

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390423

研究課題名（和文） 下部尿路知覚神経伝達におけるイオンチャネルの役割と新規治療応用に関する研究

研究課題名（英文） Research on the function and development of new therapy for ion channels in the lower urinary tract

研究代表者

武田 正之 (TAKEDA MASAYUKI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：80197318

研究成果の概要（和文）：特に尿路上皮に発現するイオンチャネルについてメカノセンサーとしての可能性を追求し、前述の TRP チャネルファミリーのなかでも TRPV4 が伸展刺激に対して強く反応し、さらに求心性伝達機構に重要と考えられる ATP の分泌に関与することを証明した。また、臨床検体を用いてこれらのイオンチャネルの発現程度と臨床データとの関連を調べた。さらに、同様のイオンチャネルである酸感受性イオンチャネル (Acid-sensing ion channels: ASICs) についても、若干の知見を得た。

研究成果の概要（英文）：In the urine storage phase, mechanical stretch stimulates bladder afferents. These urinary bladder afferent sensory nerves consist of small diameter Aδ- and C-fibers running in the hypogastric and pelvic nerves. Neuroanatomical studies have revealed a complex neuronal network within the bladder wall. The exact mechanisms that underline mechano-sensory transduction in bladder afferent terminals remain ambiguous; however, a wide range of ion channels (e.g. TTX-resistant Na⁺ channels, Kv channels and hyperpolarization-activated cyclic nucleotidedegated cation channels, degenerin/epithelial Na⁺ channel), and receptors (e.g. TRPV1, TRPM8, TRPA1, P2X2/3, etc.) have been identified at bladder afferent terminals and have implicated in the generation and modulation of afferent signals, which are elicited by a wide range of bladder stimulations including physiological bladder filling, noxious distension, cold, chemical irritation and inflammation. The mammalian transient receptor potential (TRP) family consists of 28 channels that can be subdivided into six different classes: TRPV (vanilloid), TRPC (canonical), TRPM (Melastatin), TRPP (Polycystin), TRPML (Mucolipin), and TRPA (Ankyrin). TRP channels are activated by a diversity of physical (voltage, heat, cold, mechanical stress) or chemical (pH, osmolality) stimuli and by binding of specific ligands, enabling them to act as multifunctional sensors at the cellular level. TRPV1, TRPV2, TRPV4, TRPM8, and TRPA1 have been described in different parts of the urogenital tract. Although only TRPV1 among TRPs has been extensively studied so far, more evidence is slowly accumulating about the role of other TRP channels, ion channels, and receptors in the pathophysiology of the urogenital tract, and may provide a new strategy for the treatment of bladder dysfunction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：イオンチャネル、膀胱上皮細胞、細胞内カルシウムイオン、TRP TRPV4

1. 研究開始当初の背景

わが国はかつてないスピードで高齢化社会を迎えており、現在では65歳以上の人口が全体の20%を占める(高齢社会白書、総務省、平成18年度)。人口の高齢化とともに前立腺肥大症などを背景とした尿失禁、過活動性膀胱、前立腺肥大症などの頻度も増加しており、老後のQOLを維持するために排尿障害治療に関して社会的必要性が高まるのは自明の理である。

過活動膀胱(OAB:Overactive bladder syndrome)は、2002年に国際尿禁制学会によって新しく定義された症状症候群であり、尿意切迫感を必須症状とする蓄尿障害である。疫学調査によれば、欧米では成人人口の約17%、日本では約13%がOAB症状を有しているとされ、生活の質を悪化させる疾患である。この尿意切迫感を引き起こすメカニズムは不明であり、尿意を伝達する求心性伝達機構の異常であることが想定されている。

2. 研究の目的

下部尿路(および求心性神経の一部である後根神経節)における以下の点について、検討することを目的とする。前述のTRPA1以外に、TRPファミリーに属するTRPV1,TRPV4,TRPM8などが下部尿路知覚の求心性伝達機構において重要な働きを担っている可能性があり、また、機械的受容体の本体である可能性の高いASICs(Acid sensing channel:酸感受性イオンチャネル)についても検討を行う。

3. 研究の方法

(1) ラット膀胱平滑筋細胞、上皮細胞培養系、上皮下に存在する間質細胞(筋繊維芽細胞)の培養系の作成

(2) ヒトおよびラット、マウス下部尿路におけるENaC、TRP(TRPV1, TRPV4, TRPM8, TRPA1)、BK channel、ASICsの局在と発現

(3) ヒトおよびラット、マウス下部尿路に

おけるENaC、TRP(TRPV1, TRPV4, TRPM8, TRPA1)、BK channel、ASICsの機能

(4) ヒトおよびラット、マウス下部尿路におけるENaC、TRP(TRPV1, TRPV4, TRPM8, TRPA1)、BK channel、ASICsの刺激(機械的刺激、温度、pH、各種受容体・イオンチャネル活性薬、遮断薬)に対する反応性の検討

4. 研究成果

本研究では、下部尿路(および求心性神経の一部である後根神経節)における以下の点について、検討することを目的として研究を開始した。

TRPA1以外に、TRPファミリーに属するTRPV1, TRPV4, TRPM8などが下部尿路知覚の求心性伝達機構において重要な働きを担っている可能性があり、また、機械的受容体の本体である可能性の高いASICs(Acid sensing channel:酸感受性イオンチャネル)についても検討を行う。

(1) ラット膀胱平滑筋細胞、上皮細胞培養系、上皮下に存在する間質細胞(筋繊維芽細胞)の培養系の作成:ラット膀胱平滑筋細胞・上皮細胞培養系については、樹立できている。

(2) ヒト膀胱平滑筋細胞、上皮細胞培養系、上皮下に存在する間質細胞(筋繊維芽細胞)の培養系の作成

(3) ヒトおよびラット、マウス下部尿路におけるENaC、TRP(TRPV1, TRPV4, TRPM8, TRPA1)、BK channel、ASICsの局在と発現

(4) ラット、マウス下部尿路におけるENaC、TRP(TRPV1, TRPV4, TRPM8, TRPA1)、BK channel、ASICsの機能

(5) ラット、マウス下部尿路培養細胞におけるENaC、TRP(TRPV1, TRPV4, TRPM8, TRPA1)、BK channel、ASICsの刺激(機械的刺激、温度、pH、各種受容体・イオンチャネル活性薬、遮断薬)に対する反応性の検討

(6) In vitro siRNAを用いたENaC、TRP(TRPV1, TRPV4, TRPM8, TRPA1)、BK channel、ASICsの選択的な遮断による効果の検討

(7) In vivo siRNA を用いた ENaC、TRP (TRPV1, TRPV4, TRPM8, TRPA1)、BK channel、ASICs の選択的な遮断による効果の検討

2008 年度の研究成果

【方法】(1) 膀胱上皮細胞の初代培養細胞を作製した。(2) マウス膀胱全層標本に対し TRPV4 抗体を用いた免疫組織染色を行い、その局在について調べた。また、膀胱上皮初代培養細胞に対し膀胱上皮のマーカーである CK7 および TRPV4 抗体を用いた免疫染色を行った。(3) WT と TRPV4KO マウスの膀胱上皮培養細胞において、TRPV4 の選択的アゴニスト 4- α PDD を投与した際の細胞内カルシウム濃度の変化をカルシウムイメージング法を用いて比較・検討した。(4) 細胞を直接伸展させることができる装置を用いた実験系を確立させた。シリコンチャンバー上で膀胱上皮細胞を培養し、これに伸展刺激を加えた際の細胞のカルシウム応答を調べた。(5) さらに伸展刺激を与えた際の細胞からの ATP 放出についてフロンイメージング装置を用いて調べた。

【結果】(1) 膀胱組織では上皮、特に基底部に局在する TRPV4 のタンパク発現が認められた。培養細胞における CK7 は遺伝子レベル同様、タンパクレベルにおいても陽性で、上皮としての特性が維持されており、また WT マウスにおいて TRPV4 タンパクの発現が確認された。(2) WT マウスでは約半分程度の細胞が 4- α PDD に反応して細胞内カルシウム濃度の増加を示した。これら応答細胞は TRPV4 を発現しており、機能的発現についても確認できた。(3) 機械伸展刺激に対して膀胱上皮培養細胞は細胞内カルシウム濃度の上昇を示し、TRPV4KO マウスでは WT マウスに比較し、有意に減弱することが示された。さらに TRP チャネルのアンタゴニストである Ruthenium Red を WT マウス培養細胞に投与した際、TRPV4KO マウス培養細胞とほぼ同等の応答となることも実証した。(4) 機械伸展刺激に対する膀胱上皮培養細胞からの ATP 放出は WT に比べ TRPV4KO マウスでは有意に低下することが示された。

2009 年度の研究成果

TRP チャネルと下部尿路との関係については、TRPA1、TRPV1、TRPM8 などに関する多くのデ

ータを報告した (Fry, C.H., Kanai, A.J., Roosen, A., **Takeda, M.**, WoodM, D.N.: Committee 2- Cell Biology, "Incontinence 4th ed.", 2009)。さらに、イオンチャネルのなかで酸感受性のある ASICs (Acid sensing ion channel) が膀胱刺激症状の発現に関係があり、性差も有することを示した (Kobayashi, H., **Takeda, M.**, BJU Int., 2009. Yoshiyama, M, **Takeda, M.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008.)。

温度感受性と機械的刺激に対する反応性を有する TRP イオンチャネルファミリーのなかで、30°C 前後の温度に感受性のある TRPV4 は哺乳類の尿路上皮に発現している。マウスの膀胱上皮の初代培養系において、野生型と TRPV4 K/O マウスを用いて TRPV4 活性薬の効果、伸展刺激に対するカルシウムイオンの細胞内流入性、ATP 産生などについて比較を行った。マウス膀胱上皮細胞は伸展刺激に対して少なくとも一部は TRPV4 を介して細胞内 Ca²⁺ イオンの流入とそれに引き続く上皮細胞からの ATP 産生を制御することが明らかとなった (Mochizuki T, **Takeda M**, Tominaga M, The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. J Biol. Chem., 2009)。

2010 年度の研究成果

TRP チャネルと下部尿路との関係については、前年の報告に更なるデータを追加報告した (Fry, C.H., Kanai, A.J., Roosen, A., **Takeda, M.**, WoodM, D.N.: Committee 2- Cell Biology, "Incontinence 4th ed.", 2009)。さらに、イオンチャネルのなかで酸感受性のある ASICs (Acid sensing ion channel) が膀胱刺激症状の発現に関係があり、性差も有することを示した (Kobayashi, H., **Takeda, M.**, BJU Int., 2009. Yoshiyama, M, **Takeda, M.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008., Yoshiyama, M., **Takeda, M.**: Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010.)。TRPV1 k/o マウスを用いて、酸感受性に雌雄差のあることを証明した。

昨年報告で、野生型と TRPV4 K/O マウスの膀胱上皮の初代培養系において、マウス膀胱上皮細胞は伸展刺激に対して少なくとも

一部は TRPV4 を介して細胞内 Ca イオンの流入とそれに引き続く上皮細胞からの ATP 産生を制御することを示した (Mochizuki T, Takeda M, Tominaga M, J Biol. Chem., 2009)。さらに、この ATP 産生メカニズムについて詳細な検討を行い、小胞型分泌に関与する新しいトランスポーターである VNUT (Vesicular Nucleotide Transporter) の膀胱上皮での発現と TRPV4 刺激や進展刺激によって引き起こされる ATP 分泌において重要な役割を果たしていることを明らかにした (投稿準備中)。

研究成果の要約:

膀胱知覚神経の神経終末に存在する受容体を介して排尿反射を亢進させることが、過活動膀胱の発生機序の一因であると考えられるようになってきている。そのため過活動膀胱の治療薬として、膀胱求心性神経を抑制する薬剤に関心が向けられている。以前から使用されているカプサイシンや RTX などのバニロイドの作用点は、求心性神経に存在するバニロイド受容体 (TRPV1) と考えられる。最近、膀胱粘膜上皮が機械的刺激に対するセンサー機能と情報伝達物質の分泌機能を有し、求心性神経の活性化に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。ATP はその代表であり、膀胱の伸展や病的状態の際には膀胱の尿路上皮からも放出される。これが膀胱上皮下の myofibroblast の P2X₃ 受容体を介し知覚神経を刺激して排尿反射を亢進させ、過活動膀胱を起こすと考えられ、ATP 受容体阻害剤も有望な過活動膀胱の治療薬と考えられている。尿路上皮はプロスタグランジン (PG) を産生するが、様々な病態で増加することが知られている。PGE2 の受容体のサブタイプは4つに分類され、このうち EP1 受容体が膀胱知覚神経 (主に C 線維) に存在している。現在、EP1 受容体拮抗剤が過活動膀胱の治療薬として開発されている。求心性 C 線維から放出されるタヒキニン¹は脊髄側、あるいは膀胱側のニューロキニン受容体を介して膀胱の不随意収縮に関係すると考えられており、このニューロキニン受容体の拮抗薬も過活動膀胱の治療薬として期待されている。前述の TRPV1 以外にも、いくつかの

TRP チャンネルが、過活動膀胱治療薬の標的となり得る。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 220 件)

① Akira Yoshida, Masanao Seki, Sweetly Nasrin, Atsushi Otsuka, Seiichiro Ozono, Masayuki Takeda, Keisuke Masuyama, Isao Araki, Frederick J Ehlert, and Shizuo Yamada: Characterization of muscarinic receptors in the human bladder mucosa: Direct quantification of subtypes using 4-DAMP mustard.

Urology, 2011 (in press). 査読有

② Masanao Seki, Masaki Ogoda, Shiori Kuraoka, Atsushi Otsuka, Seiichiro Ozono, Masayuki Takeda, Keisuke Masuyama, Isao Araki, and Shizuo Yamada: Muscarinic receptor binding of Imidafenacin in human bladder mucosa and detrusor and parathyroid. LUTS, 2011 (in press). 査読有

③ Osamu Yamaguchi, Hidehiko Kakizaki, Yukio Homma, Masayuki Takeda, Osamu Nishizawa, Momokazu Gotoh, Osamu Yokoyama, Narihito Seki, Masaki Yoshida on behalf of the ASSIT Study Group: Solifenacin as add-on therapy for overactive bladder symptoms - ASSIST, randomized controlled study - Urology, 2011 (Epub Ahead). 査読有

④ Masayuki Takeda, Yukio Homma, Isao Araki, Hidehiro Kakizaki, Tomonori Yamanishi, Takashi Yokota, Momokazu Gotoh, Yasuhiko Igawa, Narihito Seki, Mineo Takei, Masaki Yoshida, Kimio Sugaya, Osamu Nishizawa. The Japanese Naftopidil Neurogenic Lower Urinary Tract Dysfunction Study Group. PREDICTIVE FACTORS FOR THE EFFECT OF ALPHA1- D/A ADRENOCEPTOR ANTAGONIST, NAFTOPIDIL, ON SUBJECTIVE AND OBJECTIVE PARAMETERS IN PATIENTS WITH NEUROGENIC LOWER URINARY TRACT DYSFUNCTION. BJU Int., 2011 (Epub Ahead). 査読有

⑤ Mitsuharu Yoshiyama, Isao Araki, Hideki Kobayashi, Hidenori Zakoji, Masayuki Takeda: Functional roles of TRPV1 channels in lower urinary tract irritated by acetic acid: in-vivo evaluations on the sex difference in decerebrate unanesthetized mice *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 298: F1351-F1359, 2010. 査読有

⑥ Mochizuki T, Sokabe T, Araki I, Fujishita K, Shibasaki K, Uchida K, Naruse K, Koizumi S, Takeda M, Tominaga M The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. *J Biological Chemistry*, 284:21257-21264, 2009. 査読有

⑦ Kobayashi, H., Yoshiyama, M., Zakoji, H., Takeda, M., Araki, I. Sex differences in the expression profile of acid-sensing ion channels in the mouse urinary bladder: a possible involvement in irritative bladder symptoms. *BJU Int.*, 104:1746-1751, 2009. 査読有

⑧ Du, S., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Kasai, A., Okamura, M., Huang, T., Yao, J., Takeda, M., Araki, I., Sawada, N., Paton, A. W., Paton, J. C., Kitamura, M. Suppression of NF- κ B by cyclosporin a and tacrolimus (FK506) via induction of the C/EBP family: implication for unfolded protein response *J Immunol.*, 182:7201-7211, 2009. 査読有

⑨ Du S, Araki I, Kobayashi H, Zakoji H, Sawada N, Takeda M: Differential expression profile of cold (TRPA1) and cool (TRPM8) receptors in human urogenital organs.

Urology 72: 450-455, 2008. 査読有

⑩ Sawada N, Yao J, Hayakawa K, Araki I, Takeda M, Kitamura M: Involvement of hypoxia-triggered endoplasmic stress in outlet obstruction-induced apoptosis in the urinary bladder. *Laboratory Investigation*, 88:553-563, 2008. 査読有

⑪ Araki I, Tsuchida T, Nomura T, Fukasawa

M, Takahana Y, Koyama Y, Takeda M: Differential impact of lower urinary tract symptoms on geriatric and disease-specific quality of life in men and women.

Urologia Internationalis, 81: 60-65, 2008.

査読有

[学会発表] (計 120 件)

① Norifumi SAWADA, LI Kai, Jian YAO, Hiroshi Nakagomi, Tatsuya Miyamoto, Satoru Kira, Hideki Kobayashi, Takayuki Tsuchida, Masanori KITAMURA, Masayuki Takeda, GPJ4:Platelet derived growth factor-mediated upregulation of connexin 43 in bladder smooth muscle cells: A possible role in urinary bladder overactivity, The 5th Pan-Pacific Continence Society Meeting, 2010.9.3. Korea

② Tsutomu Mochizuki, Hiroshi Nakagomi, Tatsuya Miyamoto, Isao Araki, Mitsuharu Yoshiyama, Masayuki Takeda, The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked CA²⁺ influx and ATP release in primary urothelial cell cultures using original culture cell stretch system, AUA 2010, 2010.5.30, U.S.A.

③ Masayuki Takeda, Symposium:Male LUTS Chairs: The 4th Pan-Pacific Continence Society Meeting, 2009.9.10, Fukuoka

④ Norifumi SAWADA, Jian YAO, Nobuhiko HIRAMATSUE, Hideki Kobayashi, Hidenori Zakoji, Tsutomu Mochizuki, Masanori KITAMURA, Isao Araki, Masayuki Takeda, PDGF-mediated regulation of connexin43 expression in bladder smooth muscle cells, The 4th Pan-Pacific Continence Society Meeting, 2009.9.10, Fukuoka

⑤ Masayuki Takeda, Session I. LUTS in 2008 Co-chairs:Masayuki Takeda, The 3rd Pan-Pacific Continence Society Meeting, 2008.9.27, Taiwan

⑥ Takashi Yamagishi, Hidenori Zakoji, Mizuya Fukasawa, Teruhisa Nomura, Takayuki Tsuchida, Yoshio Takihana, Isao

Araki, Masayuki Takeda, High incidence of non-detected tumor (pT0) after neoadjuvant endocrine treatment and radical prostatectomy was not correlated with lower incidence of psa recurrence in localized prostatic carcinoma in yamanashi, Japan, 2008. 5. 20, U. S. A.

⑦ Jiang Yuan Jun, Hideki Kobayashi, Norifumi SAWADA, Mitsuharu Yoshiyama, Tsutomu Mochizuki, Hidenori Zakoji, Isao Araki, Masayuki Takeda, The expression of prostaglandin E2 receptors (EP1, 2, 3, and 4) in the human urinary bladder epithelium of normal and bladder outlet obstruction. -A novel mechanism in the afferent hyperactivity of bladder-, AUA 2008, 2008. 5. 20, U. S. A.

[図書] (計 1 件)

① C. H Fry, A. J Kanai, A. Roosen, Masayuki Takeda, D. N Wood, Health Publication Ltd, INCONTINENCE, 2009, 116-166

[その他]

ホームページ等

<http://www.uro-yamanashi.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 正之 (TAKEDA MASAYUKI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：80197318

(2) 研究分担者

荒木 勇雄 (ARAKI ISAO)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50252424

座光寺 秀典 (ZAKOUJI HIDENORI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：60345717

小林 英樹 (KOBAYASHI HIDEKI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：50402053

芳山 充晴 (YOSHIYAMA MITSU HARU)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：20422694

富永 真琴 (TOMINAGA MAKOTO)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構 (共通施設)・教授

研究者番号：90260041

深澤 瑞也 (FUKASAWA MIZUYA)

山梨大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80252039

望月 勉 (MOCHIZUKI TSUTOMU)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：50377496

澤田 智史 (SAWADA NORIFUMI)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70402055

土田 孝之 (TSUCHIDA TAKAYUKI)

山梨大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30217327

(3) 連携研究者

なし