

機関番号：13501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791497

研究課題名 (和文) A型ボツリヌス毒素は尿路の機械的センサーを抑制する？

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

工藤 祥司 (KUDOU SHOUJI)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10313800

研究成果の概要 (和文) : 過活動膀胱に対する従来の主たる治療標的は膀胱排尿筋肉のアセチルコリン受容体であり抗コリン薬が主たる治療薬であるが、その効果には限界がある。最近使用され、従来治療法に抵抗性の過活動膀胱に対して有効性が報告されているのが、ボツリヌス毒素 (以下 BTX) である。当初、BTX の有効性はムスカリン性アセチルコリン受容体を遮断して筋肉の収縮を抑える作用によると考えられてきたが、近年、過活動膀胱に対しての新しい標的として求心性神経伝達機構が提唱されており、BTX にも求心性伝達機構の遮断作用の存在を疑わせるデータが集まりつつある。本研究では、そうした作用機序を支持するデータを集積するための準備段階の研究を行い、若干の知見を得た。

研究成果の概要 (英文) : Botulinum toxin (Botox) has been widely used for refractory overactive bladder (OAB), and its mechanism of action in OAB has been examined. In this study, we have been trying to explore the novel, afferent inhibition of Botox.

In the urine storage phase, mechanical stretch stimulates bladder afferents. These urinary bladder afferent sensory nerves consist of small diameter A $\delta$ - 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.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：排尿学

1. 研究開始当初の背景  
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、過活動膀胱の頻度も増加している。

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

(1) BTX-Aの膀胱壁内投与によって、膀胱上皮細胞、上皮下の神経細胞、および間質細胞の機械的センサー分子の発現が変化するか？

(2) BTX-Aの膀胱壁内投与によって、膀胱上皮細胞、上皮下の神経細胞、および間質細胞からの伝達物質の産生が変化するか？

を目的として研究を開始した。その前段階として、以下のような培養細胞系の作成とそのCHARACTERIZATION、求心性伝達機構における役割などについての検討を進めた。

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

③In 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

## 3. 研究の方法

A型ボツリヌス毒素（BTX-A）によって、膀胱上皮細胞、上皮下の神経細胞、および間質

細胞に発現する各種機械センサー分子群（上皮型ナトリウムチャネル；ENaC、TRPイオンチャネルファミリーなど）の発現と情報伝達物質産生機能がどのように変化するかを調べる。In vivo、in situレベルでは、ラット膀胱内局所注入による変化を調べ、in vitroでは膀胱上皮・平滑筋・上皮下間質細胞の培養系を確立し、細胞レベルでの探求を行う。また、siRNAを用いた機能解析も行う。

## 4. 研究成果

(1) マウスおよび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：マウス・ラット；摘出組織を用いて、通常のexplant culture法によって、膀胱平滑筋細胞培養系を作成した。皮細胞培養系を作成した上皮下に存在する間質細胞（筋繊維芽細胞）の培養系の作成は、現在、試行中である。

(2) マウスおよびラット下部尿路におけるENaC、TRPチャネルファミリー（TRPV1,TRPV4,TRPM8,TRPA1）の各種刺激に対する反応に関する検討：

マウスおよびラット組織；摘出した下部尿路組織を用いた。すでに購入・設置済みの細胞伸展装置を用いて、伸展刺激によって上皮から放出される伝達物質（ATP）をphoton microscopeを用いて測定した。TRPV4に関しては、活性物質による刺激と伸展刺激のいずれによっても、上皮細胞からATPが分泌されることを確認した。この反応は、wild typeマウスでは認められたが、TRPV4 k/oマウスでは認められなかった。

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 4<sup>th</sup> 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, 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 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が明らかとなった (Mochizuki T, Takeda M, Tominaga M, The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca<sup>2+</sup> influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. 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)。

(3) 泌尿器科領域における Botox 使用状況に関する全国調査：

**一次アンケート集計結果：**

まとめ

- アンケート送付 : 181 施設
- アンケート回収 : 73 施設
- アンケート回収率 : 40% ( 73/181 )
- 症例数合計 : 136 例延べ回数合計 : 184 回
- データ協力施設 : 13 施設 (経験なし 2 施設)

過去の適応と思われる症例 : 372 例

**二次アンケート集計結果 (データ協力施設 13 施設に送付)：**

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

**114 例で具体的なアンケート回収 (上記のべ回数 184 例中)**

対象臓器	合計	やや有効以上	不変
膀胱全体	77	59	18
神経因性過活動膀胱	40	32	8
非神経因性過活動膀胱	27	19	8
間質性膀胱炎	8	8	
その他	2	0	2
前立腺肥大症	37	30	7
合計	114	89	25

**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 P2X<sub>3</sub> 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。我々の研究では、Botox は、この尿路上皮からの ATP 産生を抑制することも明らかとなり、新たなメカニズムの可

能性がある（発表準備中）。

## 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）

〔学会発表〕（計3件）

1. Hideyasu Inuzuka, Hidenori Zakoji, Tatsuya Miyamoto, Satoru Kira, Syouji Kudou, Manabu Kamiyama, Norifumi SAWADA, Takayuki Tsuchida, Mizuya Fukasawa, Isao Araki, Masayuki Takeda

Operative difficult points in the laparoscopic adrenalectomy for giant pheochromocytoma: comparison between right and left sides, AUA2010, 2010.6.1 San Francisco, CA USA

2. Shoji Kudo, Tatsuya Miyamoto, Jiang Yuan Ju, Tsutomu Mochizuki, Hideki Kobayashi, Mitsuharu Yoshiyama, Hidenori Zakohji, Norifumi Sawada,

Isao Araki, Kazuya Kawahara, Masayuki Takeda, THE EXPRESSION OF TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL (TRP) V4, A1, AND V1 IN THE HUMAN BLADDER MUCOSA OF NORMAL AND BLADDER OUTLET OBSTRUCTION.

- A NOVEL MECHANISM IN THE OBSTRUCTION-INDUCED BLADDER OVERACTIVITY-

The 39<sup>th</sup> International Continence Society, San Francisco, 2009.10.3

3. Miyamoto T, Shoji Kudo, Mochizuki T, Zakohji H, Kobayashi H, Yoshiyama M, Araki I, Takeda M

THE EXPRESSION OF TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL (TRP) V4, A1, AND V1 IN THE HUMAN

BLADDER MUCOSA OF NORMAL AND BLADDER OUTLET OBSTRUCTION.

- A NOVEL MECHANISM IN THE OBSTRUCTION-INDUCED BLADDER OVERACTIVITY-

The 39<sup>th</sup> International Continence Society, San Francisco, 2009.10.3

〔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

工藤祥司 (KUDOU SHOUJI)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10313800

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし