

機関番号：23903
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791516
 研究課題名（和文） 過活動膀胱の発症に関わるKIT—SCF遺伝子の一塩基遺伝子多型解析
 研究課題名（英文） SNP analysis of SCF-Kit gene in patients with or without OAB
 研究代表者
 窪田 泰江（KUBOTA YASUE）
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：00381830

研究成果の概要（和文）：今回の研究では、モルモットを用いてB00モデルを作成し、過活動膀胱の発症機序について検討した。Kit陽性ICC様細胞は、B00モデルの膀胱粘膜下層および漿膜側を中心に、正常膀胱に比べ増加していた。またSCFは尿路上皮を中心に発現が増加していた。B00モデル動物にグリベックを投与したところ、排尿圧を変化させることなく、non-voiding contractionを抑制し、排尿間隔を延長させることが判った。この結果からKitがICC様細胞を介して過活動膀胱の発症機序に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：KIT is not only a detection marker of these cells, but also may play a crucial role in the control of bladder function. Research into the effect of c-kit receptor inhibitor, imatinib mesylate, on bladder function implies that KIT-positive ICCs may be therapeutic target cells to reduce bladder overactivity and that the blockage of c-kit receptor may offer a new therapeutic strategy for OAB treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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：過活動膀胱、Kit、間質細胞

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害、糖尿病、前立腺肥大症などを基礎疾患として、頻尿・尿失禁などの下部尿路症状を呈する患者はさらに増えると予想される。介護分野とも関係して、排尿障害の対

策は重要である。中でも尿意切迫感・頻尿を呈する新しい概念として、最近定義された疾患である過活動膀胱に伴う排尿障害の頻度は高くなるものと思われる。しかし同症に対する薬物療法など、いまだに満足し得る臨床成

績が得られていない。

現在、過活動膀胱に対する薬物療法の中心はムスカリン受容体遮断薬が主流である。しかし膀胱平滑筋の無抑制収縮を抑えられず、十分な効果が得られない症例が多い。そこで膀胱平滑筋自体の収縮を抑制する目的で、電位依存性カルシウム (L 型 Ca^{2+}) チャネル阻害薬やカリウムチャネル開口薬の適応が検討されてきたが、循環器系などへの副作用のため臨床応用には至っていない。

2. 研究の目的

過活動性膀胱に対する治療法や予防法を開発するためにはその成因と病態を解明する必要がある。これを解明することにより従来の薬剤とは異なる薬理作用を持つ薬物が開発・応用できる可能性がある。同じく自動運動を有する消化管平滑筋においては、カハールの間質細胞と呼ばれる細胞群が自発興奮の発生、伝達に重要な役割をしていることが明らかになっている。最近この細胞に似た間質細胞の存在が尿管、膀胱、前立腺で報告されており、自発活動への関与が考えられている。また最近では膀胱知覚神経の神経終末に存在する受容体を介した排尿反射が亢進することが、過活動膀胱発症の一因であると考えられている。そのため過活動膀胱治療薬として、膀胱求心性神経を抑制する薬剤が注目されている。また膀胱粘膜上皮も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。私たちはこれまでにモルモット尿流出路閉塞モデルの膀胱において、頻尿になるとともに Kit 陽性間質細胞が増加することも報告してきた。また過活動膀胱患者の膀胱では Kit 陽性間質細胞が増加することも知られている。

そこで今回の研究では、粘膜上皮から放出される SCF が粘膜下層に存在する間質細胞の Kit 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可能性を考え、膀胱における SCF・間質細胞の役割につき検討し、新たな薬物治療に結びつけることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 過活動膀胱における遺伝子多型解析およびヒト尿中 SCF 濃度の解析

過活動膀胱患者と正常人から採取した DNA を用い、real time PCR システムにより遺伝子多型 (SNP) タイピングと mutation 解析を行い、過活動膀胱の責任遺伝子の可能性を検討する研究を遂行したいと考えている。また尿流出路閉塞モデルを作成し、シグナル伝達系の異常による過活動膀胱発症のメカニズムを詳細に明らかにしたい。また過活動膀胱の新しい新薬の候補として、c-kit チロシキナーゼ inhibitor である Glivec の可能性について検討したい。さらに過活動膀胱患者の尿と正常人から採取した尿中 SCF 濃度を測定し、SCF の過活動膀胱への関与を検討する。

(2) c-kit 変異動物の膀胱における間質細胞の検討

c-kit ノックアウトマウス (Slc:WBB6F1-W/Wv)、SCF ノックアウトマウス (Slc:WBB6F1-S1/S1d)、c-kit 遺伝子変異ラット (Slc:WsRC-Ws/Ws) の膀胱における Kit 陽性細胞、SCF 陽性細胞の局在・染色性につき免疫抗体法により検討する。c-kit ノックアウトマウスの消化管では、一部の Kit 陽性細胞が残ると報告されている。膀胱における Kit 陽性細胞の発現量を定量的 RT-PCR、Western blotting 法等により検討する。またこれらの変異動物を用いて、尿流出路閉塞、サイクロフォスファミド投与による膀胱機能の変化を、排尿記録装置や膀胱内圧測定を用いて記録することで、排尿機能における Kit 陽性細胞の役割につき検討する。

(3) サイクロフォスファミド誘発頻尿モデル動物における Kit 陽性細胞、SCF 陽性細胞の評価

ラットもしくはモルモットを用いてサイクロフォスファミド 100mg/kg を腹腔内投与し、頻尿モデル動物を作製する。術後経時的に尿量計測装置を用いて排尿記録を取り、過活動膀胱の診断基準に合致する排尿記録上の変化が現れたら膀胱内圧測定を行なう。正常とは異なる頻尿の所見が確認できたら、

Glivec®を投与し、その効果を観察する。サイクロフォスファミドによる頻尿が、知覚神経であるC線維を介していると考えられるので、Glivec®で頻尿が改善されれば、知覚神経を介した頻尿にKit陽性細胞が関わっている可能性が考えられる。その後摘出した膀胱の組織学的検討をHE染色にて、また膀胱粘膜下組織、筋層組織におけるKit陽性細胞、SCF陽性細胞の局在や染色性については免疫抗体法により検討する。排尿パターンとの相関についても評価したい。

4. 研究成果

今回の研究では、モルモットを用いてB00モデルを作成し、過活動膀胱の発症機序について検討した。KitおよびKitを活性化するリガンドであるSCFの局在と量的変化につき検討したところ、Kit陽性ICC様細胞は、B00モデルの膀胱粘膜下層および漿膜側を中心に、正常膀胱に比べ増加していた。またSCFは尿路上皮を中心に発現が増加していた。また正常膀胱とB00膀胱におけるICC様細胞の形態学的変化、神経や筋細胞との位置関係の違いを調べた。紡錘形をしたICC様細胞の細胞質にはミトコンドリアや粗面小胞体が豊富に存在し、細胞同士が互いに連絡しあい、神経・平滑筋とも密接している像を観察した。B00膀胱においてはICC様細胞が一部変形しており、これらの微細構造の変化が過活動膀胱の発症につながっているものと推察された。メシル酸イマチニブ(グリベック®)は、Kitを抑制することによりICC由来の消化管間葉系腫瘍に対しても効果が確認されている。私たちはこの点に注目し、B00モデル動物にグリベックを投与したところ、排尿圧を変化させることなく、non-voiding contractionを抑制し、排尿間隔を延長させることが判った。この結果からKitがICC様細胞を介して過活動膀胱の発症機序に関与している可能性が示唆された。WSRC +/-群ではCYPの化学的刺激により排尿間隔が短縮しnon voiding contractionが増加する傾向が認められたが、KIT変異群では顕著でないことからC-fiberを介した求心性刺激伝達にKIT陽性間質細胞の関与が示唆された。c-kit遺伝子変異による間質細胞の形態学的変化

は認められず、c-kit遺伝子変異はKIT陽性間質細胞の機能的消失をもたらすと考えられた。

またヒト膀胱組織を用い、免疫組織化学染色にてSCFおよびKITの発現を検討した。KITは粘膜下層および筋層において発現が認められた。またSCFは主に尿路上皮に発現していたが、B00モデルにおいては粘膜下層・筋層においても発現が増加していた。尿中SCF排泄量の測定は、コントロール患者と比べ、OAB患者において尿中に排泄されるSCF濃度が有意に上昇していた。また抗コリン薬投与によりOABSSが改善した症例では、尿中SCFが有意に減少していた。またヒト過活動膀胱の尿中SCFは、正常群に比べて有意な増加を認めた。

私たちはOAB患者のゲノムDNAを用いてc-kit遺伝子の遺伝子多型解析を行っている。KITの一塩基遺伝子多型と過活動膀胱の発症との関係を検討した。KITのSNPはたくさん報告されているが、そのうち健常者のvariationが多い2つのSNPにまず着目して現在検討している。rs1947763において、AからGへの変異を有する患者においてOABの発症が高い傾向が認められた。

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 3件)

- ① Kubota Yasue, Kojima Yoshiyuki, Shibata Yasuhiro, Imura Makoto, Kohri Kenjiro, Sasaki Shoichi. Correlation between improvements in overactive bladder symptom score and health-related quality of life questionnaires in overactive bladder patients treated with an antimuscarinic drug. *Neurourol Urodyn.*, 2011, (査読有り)
- ② 窪田 泰江: 臨床医学の展望 2011 泌尿器科学 排尿障害(尿失禁・神経因性膀胱・過活動膀胱)。日本医事新報、4530:59-60、2011, (査読無し)
- ③ 窪田 泰江、佐々木 昌一、小島 祥敬、

早瀬 麻沙、井村 誠、柴田 泰宏、郡健二郎：過活動膀胱患者に対するイミダフェナシンの早期治療効果の検討。泌尿器外科 23:827-832, 2010, (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 窪田 泰江: OABSS および QOL 質問票を用いた OAB 患者に対する塩酸プロピペリンの治療効果の検討。第 16 回東海排尿障害研究会、2011. 2. 11、名古屋市
- ② 窪田 泰江: 過活動膀胱患者に対するイミダフェナシンの早期治療効果の検討。わかしやち泌尿器科セミナー、2010. 7. 14、名古屋市
- ③ Kubota Yasue, Kojima Yoshiyuki, Hayase Masa, Sasaki Shoichi, Kohri Kenjiro: A kit ligand, stem cell factor as a possible mediator inducing overactive bladder. AUA 2010 Annual Meeting, 2010. 5. 29-6. 3, San Francisco, USA
- ④ Kubota Yasue, Kojima Yoshiyuki, Sasaki Shoichi, Hayase Masa, Okada Shinsuke, Kohri Kenjiro: Altered distribution of interstitial cells in the guinea pig bladder following bladder outlet obstruction. Smooth Muscle Rhythms -The 6th International Symposium on ICC-, 2010. 2. 8-2. 10, Miyazaki, Japan
- ⑤ 窪田 泰江、小島 祥敬、早瀬 麻沙、佐々木 昌一、橋谷 光、鈴木 光、郡健二郎：過活動膀胱における Kit 陽性間質細胞の役割。第 51 回日本平滑筋学会総会、2009. 7. 22-23、名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田 泰江 (KUBOTA YASUE)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00381830