

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 20日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591793

研究課題名（和文） ヒトおよびモルモット膀胱間質細胞の形態および生理特性の解明

研究課題名（英文） The morphological and physiological investigation into the interstitial cells of human and guinea-pig urinary bladder.

研究代表者

関 成人（SEKI NARIHITO）

九州大学・医学研究院・特別研究員

研究者番号：90294941

研究成果の概要（和文）：

消化管においてペースメーカー活動を担うといわれている間質性細胞について、膀胱での形態及び生理機能を検討した。間質性細胞は膀胱内では、筋層間に孤立するように散在していた。モルモットを用いた過活動膀胱モデルの膀胱では、自発活動電位の起源と思われるスポット数の増加は認められなかったが、その発生する電位の振幅がコントロール下でも、ムスカリン受容体やプリン受容体の刺激下でも大きくなっていった。チロシンキナーゼ阻害剤であるソラフェニブ、周期性の振幅の伝搬の電氣的役割を果たすギャップジャンクションの阻害剤であるメフロキン、また Rho キナーゼ阻害剤であるファスジルいずれの試薬とも、アゴニスト刺激による持続性と振幅性の収縮において、より振幅性の収縮を抑制することがわかった。以上のことより、間質性細胞に焦点をおいた下部尿路機能障害の新たな治療戦略の可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：

It is well known that *c-kit* positive interstitial cells act as pacemaker cells of peristaltic movement. However, the studies of interstitial cells of urinary bladder have not been sufficiently accumulated. Our present study revealed that *c-kit* positive interstitial cells were solely distributed between muscle bundles in human urinary bladder different from those in gastrointestinal tract. In guinea-pig urinary bladder, bladder outlet obstruction potentiated the amplitude of the spontaneous electrical activities and the oscillatory activities induced by the stimulation of muscarinic and purinergic receptors using micro multiple electrode arrays.

Tyrosine kinase inhibitor (sorafenib), gap junction inhibitor (mefloquine) and Rho kinase inhibitor (fasudil) predominantly inhibited the oscillatory contraction induced by muscarinic contraction in human detrusor.

These results suggest the novel treatment strategy for lower urinary tract syndrome such as overactive bladder.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1200000	360000	1560000
2011年度	900000	270000	1170000
2012年度	1000000	300000	1300000
年度			
年度			
総計	3100000	930000	4030000

研究分野：泌尿器科学

科研費の分科・細目：排尿障害

キーワード：間質細胞、排尿筋、膀胱出口閉塞、カルシウム電流

1. 研究開始当初の背景

尿路平滑筋の中でも膀胱排尿筋（以下、排尿筋と略す）は、蓄尿ならびに尿排出という下部尿路の最も重要な機能に直接関与するため、その生理および薬理学的な特性を明らかにすることは、臨床的に重要な各種排尿障害の病態解明と治療法開発に直結するポイントである。最近では尿失禁や尿意切迫感、頻尿といった蓄尿症状を呈する過活動膀胱（Overactive bladder: OAB）という症状症候群が注目され、本病態が高齢者を中心に多数存在することも明らかとなっている¹⁾。この OAB をはじめとして、細菌性や薬剤性の膀胱炎あるいは間質性膀胱炎に伴う頻尿、さらには原因不明の膀胱知覚過敏症の発症との関連で注目されているのが膀胱知覚（尿意）伝達系の活性化メカニズムである。

さらに、この膀胱知覚伝達に重要な役割を有していると推測され、最近注目されているのが、今回我々が研究ターゲットとする、膀胱の間質細胞（interstitial cell: IC/myofibroblast）である。モルモット膀胱において、間質細胞は尿路上皮の直下および筋線維の遍縁領域に分布するが、それらはいずれも消化管のペースメーカー活動を担う、受容体型チロシンキナーゼである c-Kit 陽性（抗 c-Kit 抗体で染色される間質細胞）の Cajal の間質(介在)細胞 (Interstitial cells of Cajal: ICC) (図 1) と形態学的に類似 (ICC 類似間質細胞: ICC like-IC: ICCL-IC) しており、膀胱の自発活動を司っている可能性がある。分担研究者の梶岡は、消化管間質腫瘍 (gastrointestinal stromal tumor GIST) に効果があると報告されているチロシンキナーゼ受容体阻害薬であるメシル酸イマチニブが、膀胱のおそらく ICC を起源とする自発活動電位を抑制すること、その結果、もし OAB が ICCL-IC の病的興奮に起因するとすれば、イマチニブがその治療薬となりうる可能性を報告している³⁾。一方、Hashitani⁴⁾ や Brading^ら⁵⁾ は膀胱の ICCL-IC と排尿筋の自発活動との関連には否定的な見解を示しており、ICCL-IC は膀胱上皮と知覚神経あるいは筋線維間の電気信号伝達に介在し、それを修飾している可能性に言及している。また Fry^ら⁶⁾ は膀胱上皮直下に存在する myofibroblast (ICCL-IC) の電気的特性をパッチクランプ法で解析し、細胞内 Ca transient と膜電位の変動を報告している。また外因性の ATP により観察される内向き

電流の特性についても予備的な報告を行っているが、その生理的意義に関しては不明であり、今後の研究結果が待たれるところである。

このように、膀胱の ICCL-IC に関する詳細な研究は、消化管の ICC に比べて遅れているのが現状である。我々は、OAB を始めとする膀胱知覚（尿意）伝達系の活性化過程において、膀胱の ICCL-IC が関与する部分は少なくないと考えており、本研究では ICCL-IC に焦点を絞り、その生理的また薬理的特性を実験動物ならびにヒト組織を用いて解明してゆきたい。

2. 研究の目的

蓄尿ならびに尿排出という下部尿路機能の生理および薬理学的な特性を明らかにすることは、臨床的に重要な各種排尿障害の病態解明と治療法開発に直結するポイントである。本研究では、蓄尿機能と密接に関連する膀胱知覚伝達経路において重要な役割を有していると推測され、最近注目されている膀胱間質細胞（interstitial cell: IC/myofibroblast）に焦点を絞り、その形態的、生理的また薬理的特性を、正常ならびに病的状態（下部尿路閉塞）下での実験動物ならびにヒト組織を用いて解明することで、過活動膀胱等の膀胱蓄尿機能障害の発症メカニズムの解明と、新たな機序を有する治療薬の開発の端緒とすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織染色

ヒト膀胱、及びモルモット膀胱出口閉塞モデルの組織切片に、c-Kit (CD117/CD34) の蛍光抗体を適用して、間質性細胞の局在あるいは、膀胱出口閉塞によるその変化を確認する。

(2) 多チャンネル同時測定微小電極アレイ

(Micro-electrode Array: MEA)

モルモット膀胱における自発活動電位の発火点、あるいはアゴニスト刺激（ムスカリン受容体、プリン受容体）による電氣的興奮の発生及び伝搬を記録し、時空間的な解析を行い、モルモット膀胱出口閉塞モデルの膀胱と比較検討を行う。

(3) 等尺性収縮張力測定法

ブタ及びヒト膀胱の排尿筋に等尺性収縮張力測定法を適用する。アゴニストなしで生ずる周期性自発活動性収縮や、ムスカリン受容体のアゴニストであるカルバコール刺激によって生ずる 2 種類の収縮タイプである持

続性収縮と周期性振幅性収縮に対して、間質性細胞関連の薬剤である、チロシンキナーゼ阻害剤のソラフェニブ、周期性の振幅の伝搬の電気的役割を果たすギャップジャンクション阻害剤のメフロキン、また Rho キナーゼ阻害剤のファスジル等の効果を各々検討する。

(4) マウス排尿記録

まずは、そのサイズが小さいがゆえに、確立が非常に困難と言われているマウスの排尿記録の測定を可能にする。そこで、消化管では、ICC あるいは ICC-LC が発現していない突然変異マウスである W/W^v マウスを代謝ケージで飼育し、野生型との排尿状態の相違を検討し、間質性細胞がどのように生理的排尿に関与しているかを検討する。

4. 研究成果

(1) 分子生物学的成果

モルモットの正常膀胱と過活動膀胱モデルに各種手技を適応して、比較検討してみた。Western Blotting 法、免疫組織染色法では定量的に、膀胱に発現する間質性細胞の発現量やギャップジャンクションの発達の差異を示すことはできなかったが、排尿筋層に発現するムスカリン受容体のサブタイプである M2、M3 受容体の 2 種類のサブタイプに関しては、双方のサブタイプとも発現量が増加していることを確認したのみならず、c-kit 陽性の間質性細胞には、M3 受容体が有意に発現していることを確認した。

(2) 電気生理学的成果

i) 微小電極アレイ

多チャンネル同時記録測定微小電極アレイの導入によるモルモット膀胱排尿筋の自発活動電位の新しい評価法を用いた実験では、予備的実験としてモルモットの膀胱では計測範囲の一部に自発性同期性振幅電位変化を認め、カルバコールや ATP によって計測範囲の全体にわたって電位変化が同調して拡大伝搬することを報告してきた。それらのスペクトラムは有意に過活動膀胱モデルで増加していた。微小電極アレイを用いた研究では、モルモットの正常膀胱と過活動膀胱モデルの膀胱を用いて、自発活動電位の起源と思われるスポット数に双方で変化は認められなかったが、その振幅がコントロール下でも、カルバコール存在下でも大きくなっていた。

ii) 等尺性収縮張力測定法

等尺性収縮張力測定法を用いた実験では、膀胱のペースメーカーの発生、伝搬に関連すると思われる各種薬剤の効果を検討した。ヒト膀胱排尿筋をこの張力測定装置に適用したところ特徴的な 2 種類の収縮タイプを記録することができた。一つは、カルバコールなどのアゴニストによるムスカリ

ン受容体刺激による持続的な一定の収縮で、もう一つは、刺激なし、あるいはムスカリン受容体の低刺激によって観察される持続的な周期性振幅性収縮である。この後者の収縮が、ペースメーカー細胞すなわち c-kit 陽性間質性細胞が関係する収縮と考えられている。そこで c-kit はチロシンキナーゼ型であるので、チロシンキナーゼ阻害剤であるソラフェニブ、周期性の振幅の伝搬の電気的役割を果たすギャップジャンクションの阻害剤であるメフロキン、また膀胱出口閉塞では、排尿筋の Rho キナーゼ活性が増加しているため、Rho キナーゼ阻害剤であるファスジルを用いてこれらの収縮に対する効果を検討した。すべての薬剤ともに、持続性収縮よりも振幅性周期性収縮をよりよく抑制した。(メフロキン IC₅₀: 2.3 μM、ソラフェニブ IC₅₀: 2.8~3.9 μM、ファスジル IC₅₀: 5.4~10.7 μM)以上のことより、上記の 3 種類の薬剤は、ペースメーカー細胞の生理機能を利用した排尿治療薬となり得ることが示唆された。

また、自発性収縮の異常を神経終末の神経伝達物質の放出に焦点をおいて、ヒト及びブタ膀胱排尿筋に等尺性収縮張力測定法を適応したところ、プリン受容体を a-b, methyleneATP と suramin で抑制しても、あるいは、ムスカリン受容体を atropine で抑制しても、電気刺激による収縮張力に有為な減少は認めなかったが、双方の受容体を同時に抑制したところ、約 1/2 の張力となった。この電気刺激による収縮は、Na チャネル阻害薬であるテトロドトキシンでも消失せず、またカルシウム拮抗剤であるニフェジピン、及びセロトニン受容体拮抗剤にも抵抗性を示したことから、未だに明らかにされていない神経伝達物質が介在していることが示唆された。

(3) In vivo 成果

消化管では、ICC あるいは ICC-LC が発現していない突然変異マウスである W/W^v マウスを代謝ケージで飼育し、排尿状態を記録したが、野生型のマウスとは有意な変化を認めなかった。

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 8 件)

- 1) 野尻佳克、荒井陽一、関成人、内藤誠二、町田二郎、長谷川友紀、服部良平、松田公志、矢内原仁、岡村菊夫: TURP 術後の最適なカテーテル抜去日. Jpn J Endourol 25 (1): 118-122, 2012 査読無
- 2) Saito H, Matsuda T, Tanabe K, Kawauchi A, Terachi T, Nakagawa K, Iwamura M, Shigeta M,

Tatsugami K, Ito A, Machida J, Kawakita M, Kinoshita H, Shinohara N, Ioritani N, Seki T, Arai Y; Japanese Society Of Endourology Laparoscopic Partial Nephrectomy Study Group: Surgical and oncologic outcomes of laparoscopic partial nephrectomy: a Japanese multi-institutional study of 1375 patients. J Endourol 26 (6): 652-659, 2012 査読有

3) Kajioka S, Takahashi-Yanaga F, Shahab N, Onimaru M, Matsuda M, Takahashi R, Asano H, Morita H, Morimoto S, Yonemitsu Y, Hayashi M, Seki N, Sasaguri T, Hirata M, Nakayama S, Naito S. Endogenous cardiac troponin T modulates Ca²⁺-mediated smooth muscle contraction. Sci Rep 2:979, 2012 査読有

4) Shahab N, Kajioka S, Takahashi-Yanaga F, Onimaru M, Matsuda M, Seki N, Naito S. Obstruction enhances rho-kinase pathway and diminishes protein kinase C pathway in carbacol-induced calcium sensitization in α -toxin permeabilized Guinea pig detrusor smooth muscle. Neurourol & Urodynam 31(4):593-9, 2012 査読有

5) Shahab N, Kajioka S, Seki N, Naito S. Functional role of muscarinic receptor subtypes in calcium sensitization and their contribution to rho-kinase and protein kinase C pathways in contraction of human detrusor smooth muscle. Urology 79(5):1184.e7-13, 2012 査読有

6) Kajioka S, Shahab N, Asano H, Morita H, Sugihara M, Takahashi-Yanaga F, Yoshihara T, Nakayama S, Seki N, Naito S. Disphosphate regulation of adenosine triphosphate sensitive potassium channel in human bladder smooth muscle cells. J Urol. 186 736-744 2011 査読有

7) Kajioka S, Seki N, Shahab N, Yunoki T, Naito S. Etiology of overactive bladder and its therapeutic perspective--focusing on a myogenic basis for the overactive bladder. Fukuoka Acta Medica 101(5): 94-100, 2010 査読無

8) Myers RP, Seki N, Gotoh M, Chai TC, Kaplan SA, Inoue K, Trachtenberg J, Kikuchi E, Nishiyama H, Chang SS, Lee C, Muto S, Ito K, Andriole GL, Eto M, Sumitomo M, Kamba T, Wood CG, Margulis V, Naito S, Egawa S. Fifth joint meeting of the American Urological Association and the Japanese Urological Association International Affiliate Society Meeting at the 105th Annual Meeting of the American Urological Association. Int J Urol 17(8): 745-753, 2010 査読有

〔学会発表〕(計 21件)

1) 岡村菊夫、野尻佳克、津島知靖、川喜田睦

司、関成人、松田公志、荒井陽一、服部良平、内藤誠二、長谷川友紀 クリニカルパスを用いた経尿道的前立腺切除術周術期管理の改善：多施設共同研究。第26回日本泌尿器内視鏡学会総会 2012年11月22日 仙台

2) 桑原勝孝、野村博之、山口秋人、黒松 功、伊原博之、関成人、奥野 博、後藤百万、平尾佳彦、内藤誠二、「AMS GreenLight HPS」を用いた前立腺蒸散術(PVP)の有用性に関する前向き研究。第26回日本泌尿器内視鏡学会総会 2012年11月22日 仙台

3) 黒松 功、桑原勝孝、伊原博行、鈴木和雄、野村博之、山口秋人、奥野博、関成人、内藤誠二、平尾佳彦、後藤百万、杉村芳樹、「AMS GreenLightHPS」を用いた前立腺肥大症に対する蒸散術(PVP)の有用性に関する前向き研究。第19回日本排尿機能学会 2012年8月29日 名古屋

4) 高橋良輔、柚木貴和、林摩耶、ノハルンジャブ、梶岡俊一、関成人、内藤誠二、高齢者における経尿道的前立腺蒸散術(TURisV)の安全性、有用性についての検討。第25回日本老年泌尿器科学会 2012年6月1日 徳島

5) 野村博之、関成人、山口秋人、内藤誠二、当院における120ワット高出力光選択的前立腺蒸散術(photoselective vaporization of the prostate: PVP)の効果と安全性に関する前向き研究。第1回PVP研究会学術集会 2012年4月24日 横浜

6) 柚木貴和、高橋良輔、林 摩耶、梶岡俊一、関成人、内藤誠二、前立腺肥大症に対するTURisV手術における術中経直腸的前立腺エコーモニタリング法の有用性の検討。04.21-24 第100回日本泌尿器科学会総会 2012年4月21日、横浜

7) 関成人、ディベート1：前立腺肥大症に対するレーザー治療 PVP vs HoLEP 「BPHに対する蒸散ならびに核出術の最適化に向けて」第25回日本泌尿器内視鏡学会 2011年11月30日京都

8) 関成人、シンポジウム3：新時代の前立腺肥大症治療「手術療法の新展開」第18回日本排尿機能学会 2011年9月17日福井

9) 関成人、シンポジウム7：前立腺肥大症診療ガイドライン ー作成の経緯と今後の展望ー「外科的治療法(手術ならびに低侵襲治療)について」第99回日本泌尿器科学会総会 2011年4月23日名古屋

10) 関成人、サテライトセミナー2：Recent progress in the medical treatment of overactive bladder syndrome 「日本人のOAB治療 ーASSIST試験の結果からー」第99回日本泌尿器科学会総会 2011年4月21日名古屋

11) 関成人、シンポジウム7：「BPHガイドラインの手術療法について」第61回日本泌尿器科学会中部総会 2011年

11月18日、京都

12) Seki N, Laser treatment of BPH: HOLEP & PVP. 10th Asian Congress of Urology of the Urological Association of Asia 2010年8月27日 Taipei Taiwan

13) Seki N, Gotoh M, Chai TC, Kaplan SA Male LUTS "Management of male LUTS: how optimized and different between countries? AUA 105th Annual Meeting 2010年5月3日 San Francisco, USA

14) Nouval S, Kajioka S, Seki N, Takahashi R, Yunoki T, Naito S. The enhancement of Rho kinase pathway and the decrement of protein kinase C pathway in carbachol-induced calcium sensitization in α toxin permeabilized guinea pig detrusor smooth muscle following bladder outlet obstruction. AUA 105th Annual Meeting 2010年5月3日 San Francisco, USA

15) 関成人、日本におけるBPH/OAB治療戦略－ASSIST試験からの知見－第62回日本泌尿器科学会西日本総会2010年11月4日鹿児島

16) 関成人、下部尿路に対する内視鏡的診断・治療の最前線 KTP laser を用いた光選択的前立腺蒸散術.第24回日本Endourology・ESWL学会総会 2010年10月21日京都

17) 関成人、野村博之、山口秋人、梶岡俊一、柚木貴和、Nouval Shahab、内藤誠二、前立腺肥大症 (BPH) に対する経尿道的手術：尿流動態因子と治療効果の関連 第17回日本排尿機能学会 2010年9月29日 甲府

18) 関成人、野村博之、柚木貴和、高橋良輔、山口秋人、内藤誠二、高齢者に対する光選択的レーザー蒸散術 (PVP) の検討。第23回日本老年泌尿器科学会 2010年5月14日 東京

19) 関成人、野村博之、山口秋人、内藤誠二、KTPレーザーを用いた光選択的前立腺蒸散術 (PVP) の臨床成績。 第98回日本泌尿器科学会総会 2010年4月27日 盛岡

20) Nouval Shahab、梶岡俊一、関成人、内藤誠二 Calcium sensitization by protein kinase C pathway in contraction of human and guinea-pig detrusor smooth muscle following partial bladder outlet obstruction. 第3回排尿障害モデル動物研究会 2010年11月26日 静岡

21) 梶岡俊一、Nouval Shahab、高橋富美、鬼丸満穂、柚木貴和、関成人、内藤 誠二、膀胱排尿筋の心筋型トロポニンT (cTnT)の発見とその生理学的意義を探索。第17回日本排尿機能学会 2010年10月1日甲府

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 成人 (SEKI NARIHITO)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号 : 9 0 2 9 4 9 4 1

(2) 研究分担者

中山 晋介 (NAKAYAMA SHINSUKE)

名古屋大学・医学部・准教授

研究者番号 : 3 0 1 9 2 2 3 0

梶岡 俊一 (KAJIOKAI SHUNICHI)

九州大学・医学研究院・特任准教授

研究者番号 : 9 0 2 7 4 4 7 2