

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592371

研究課題名(和文)低活動膀胱の画期的治療法の基盤的研究 - トロポニンシステムの構築を中心として -

研究課題名(英文)The basic research for the novel treatment for under active bladder -focusing on the construction of troponin system in smooth muscle-

研究代表者

梶岡 俊一 (Kajioka, Shunichi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90274472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：トロポニンは、T、I、Cの三つのサブユニットから構成され、各々に心筋型、骨格筋遅筋型、骨格筋速筋型(トロポニンCでは、心筋型と骨格筋遅筋型は共通)があり、計8種類のサブユニットが報告されているが、平滑筋には、存在しないと言われていた。ヒト膀胱排尿筋において、すべてのタイプのトロポニンT及び、骨格筋遅筋型のトロポニンIが蛋白レベルでも発現していることを確認した。これらのトロポニンサブユニットは、他の平滑筋臓器と比較して、排尿筋に有意に発現していることがわかった。また平滑筋に特有の収縮蛋白であるカルポニン、カルデスモンの発現も確認し、トロポニンサブユニットとの結合による新たな収縮機構が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been generally accepted that in smooth muscle contraction, MLCK system but not troponin system is dominant. However, we found cardiac troponin T (cTnT) in urinary bladder smooth muscle.

The following present study was thus designed in order to clarify troponin subunits in smooth muscle and to explore the possibility for clinical treatment using detrusor smooth muscle. Troponin is composed of 3 subunits (T, I, and C), and categorized into 3 groups (cardiac, slow skeletal muscle, fast skeletal muscle). We examined all troponin subunits and clarified the expression of not only all types of TnT but also slow skeletal muscle type of troponin I in human detrusor. Further, dominant expression of their genes were recognized compared to other smooth muscle organs. The smooth muscle specific protein, calponin and caldesmon were also expressed at protein level suggesting novel contraction system combined with troponin subunits and their protein.

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：トロポニン 平滑筋 排尿機能 低活動膀胱 膀胱排尿筋

1. 研究開始当初の背景

低活動膀胱とは、現在では 2002 年に提唱された過活動膀胱に相対する疾患として、取り上げられているようである。原因の如何を問わず、膀胱の機能低下あるいは不全に陥って、排尿時間の延長と残尿を呈する場合を示す。過活動膀胱とともに、大きく QOL を低下させる排尿障害の一つである。しかしながら、治療法については、 $\alpha 1$ ブロッカー単独あるいは、コリン作動薬との併用が一般的であるが、とても満足の得られる治療成績からは程遠く、治療法がないと言って差し支えない。近年になってようやく、過活動膀胱には注目が集まるようになり、薬物療法では、抗コリン剤しかなかったものが、新たな薬効機序を有する薬物が、臨床応用される時期に来ているが、低活動膀胱の治療法に関しては、その基盤的な研究さえ手つかずの状態、根治的な治療法は、患者のみならず医療サイドからも強く望まれている。

2. 研究の目的

当研究室において、心筋トロポニン三量体の一つであるトロポニン T が平滑筋諸臓器に発現していることを確認し、また、膀胱平滑筋に最も多く発現していることを明らかにした。故にこの膀胱平滑筋を用いて、骨格筋、心筋と比較して、未だ不明な点の多い平滑筋の収縮調節の分子機構を、トロポニン T の生理学的意義を探りながら、解明してゆく**基礎的な研究**と、このトロポニン T を活用して平滑筋にトロポニンシステム収縮システムを新規に構築することを目的とし、機能不全に陥った低活動膀胱の機能の改善・復活を目指す**臨床応用の基盤的研究**とする。

3. 研究の方法

(1) 材料

ヒト膀胱排尿筋

膀胱癌などにより膀胱摘出術を施行した患者より同意を得て提供された。九州大学病院倫理審査委員会承認済み

ブタ膀胱排尿筋

福岡食肉より購入

cTnT^{+/-} ミュータントマウス

共同研究者の高橋の所属する研究室より、の提供

(2) 実験方法

分子生物学的手法及び免疫組織化学

(i) RT-PCR 法及び realtime RT-PCR 法

(ii) Western Blotting 法

平滑筋の心筋型トロポニンの T, I, C のサブユニット、あるいは平滑筋特異的な収縮関連蛋白であるカルデスモンやカルポニンの発現の確認に適用

電気生理学的手法

等尺性収縮張力の測定及び膜脱膜化標本の作製

ヒト膀胱排尿筋、ブタ膀胱排尿筋、マウス膀胱排尿筋に適用した。膜脱膜化標本は、b-escin、を用いて標本を作製した。

4. 研究成果

cTnT^{+/-} ミュータントマウス

まずは、cTnT^{+/-} ミュータントマウス(ヘテロタイプ)とワイルドタイプを用いて、膀胱排尿筋に発現している cTnT の発現状況を確認した。リアルタイム PCR 法及び、Western blotting 法においても、有意にミュータントマウスの方が発現量が少なかった。この双方の膀胱排尿筋を用いて、カルバコール刺激に対する細胞外カルシウム感受性を検討したところ、細胞外カルシウム濃度に対して、ミュータントマウスの膀胱排尿筋の収縮張力が弱く、特に低濃度(0.1 mM>[Ca²⁺]_{out})では有意に弱かった。同様に、b-escin による膜脱膜化標本においても、細胞内 Ca²⁺濃度が 1 mM 以下で有意にミュータントマウスの膀胱排尿筋の収縮張力が弱かった。この結果は、細胞内 Ca²⁺濃度が低濃度の領域では、平滑筋に存在する cTnT が生理学的に機能していることを示している。(図 1) (Kajioka et al. Sci Rep. 2012)

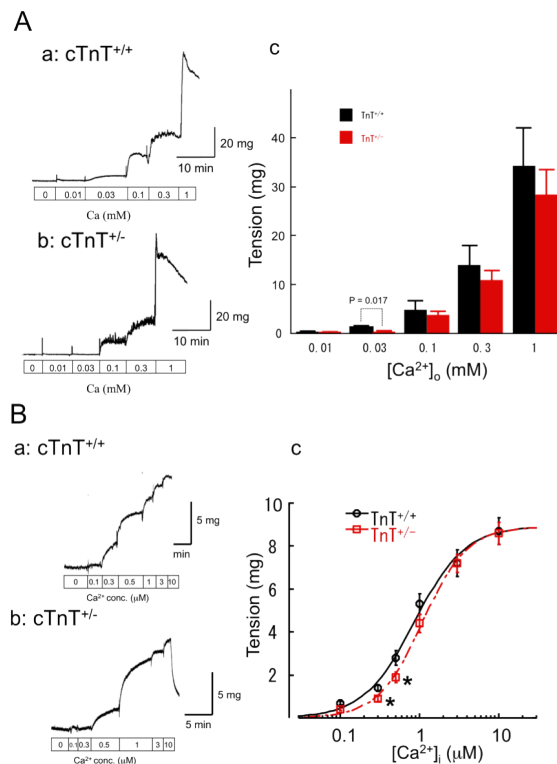


図1. cTnT^{+/-}ミュータントマウス vs 野性型マウス

ヒト膀胱排尿平滑筋のトロポニンサブユニットの包括的検討

トロポニン₁は、トロポニン T、I、C のサブユニット 3 量体から形成され、各々に心筋型、骨格筋速筋型、骨格筋遅筋型がある（トロポニン C では心筋型と骨格筋遅筋型を共有）ので、現在までに計 8 種類のサブユニットが報告されている。（表 1）

Troponin T	Troponin I	Troponin C
TNNT1 (SkM slow)	TNNI1 (SkM slow)	TNNC1 (SkM slow, cardiac)
TNNT2 (cardiac)	TNNI2 (SkM fast)	TNNC2 (SkM fast)
TNNT3 (SkM fast)	TNNI3 (cardiac)	

表1. トロポニンサブユニット群

これらのすべてのタイプのトロポニンサブユニットの遺伝子レベルでの発現をヒト膀胱排尿筋の Real Time PCR 法で検証した。この計 8 種類のトロポニンサブユニットで、ヒト膀胱全 RNA、ヒト胃全 RNA、ヒト大腸全 RNA、ヒト小腸全 RNA、ヒト心臓全 RNA、ヒト気管全 RNA 及びヒト大動脈全 RNA を用いて Real Time RT-PCR 法を適用したところ、遺伝子レベルではトロポニン T に関してはやはり心筋型でしかも膀胱での発現がもっとも多かった。トロポニン I に関しても、骨格筋速筋型の発現が膀胱で最も多く、トロポニン C に関しては、平滑筋各組織間で有意な差は認められなかった。（図 2）

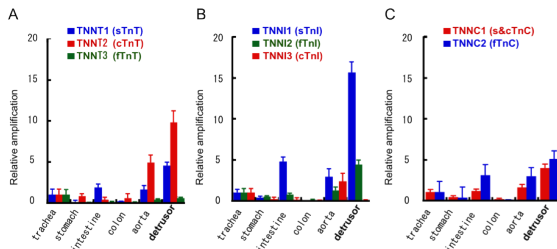


図2. ヒト各種平滑筋リアルタイムPCR

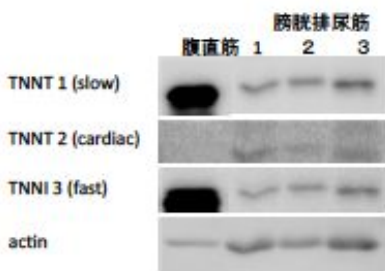


図3. ヒト膀胱排尿筋 Western Blotting Troponin T

Western Blotting 法では、以前報告した心筋型トロポニン T のみならず、骨格筋速筋型、骨格筋遅筋型とすべてのタイプのトロポニン T が発現していることを確認した。（図 3）また蛋白レベルではすべてのトロポニン I と

トロポニン C サブユニットの発現は認められなかった。平滑筋収縮関連蛋白であるカルポニン、カルデスモンの発現は双方とも認められた。（図 4）

マウス膀胱排尿平滑筋のトロポニンサブユニットの包括的検討

将来のトロポニントランスジェニックマウスの基盤的研究として、マウス膀胱排尿平滑筋におけるトロポニンサブユニットの発現状況を Western blotting 法で検討した。トロポニン T はヒトの膀胱排尿筋と同様に、すべてのタイプのトロポニン T が蛋白レベルで発現していたが、トロポニン I に関しては、

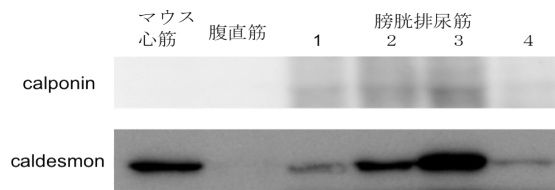


図4. ヒト膀胱排尿筋 Western Blotting Caldesmon & Calponin

遅筋タイプのものが発現していた。（図 5）トロポニン C はいずれのタイプのものも発現していなかった。

まとめ

平滑筋には、元来存在しないと言われていたトロポニンのサブユニット (cardiac TnT, cTnT) を発見した。そのヘテロタイプのノックアウトマウスである TnT^{+/-} ミュータントマウスを用いた研究では、トロポニンのサブユニットであるトロポニン T が、外部からの刺激が弱い時、あるいは細胞内の Ca 濃度が比較的低い時に、生理的に機能している可能性を示唆した。今回の研究では、マウスにはトロポニン T のみならず、トロポニン I まで、蛋白レベルで発現していることがわかった。トロポニンの残りのサブユニットであるトロポニン C は、Western blotting 法で検出されず、またリアルタイム PCR 法からも、その存在は考えにくい。従って、膀胱平滑筋においては、トロポニン T と I が存在し、おそらく、今回確認した平滑筋特有の収縮蛋白であるカルポニンや、カルデスモンと弱いながらも、結合して、新規の収縮メカニズムを構築しているということが考えられた。また、リアルタイム PCR 法で確認した、各種

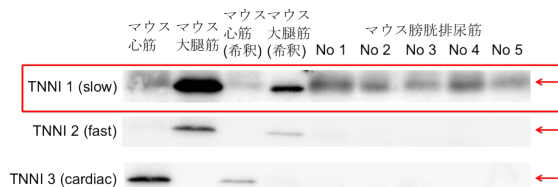


図5. マウス膀胱排尿筋 Western Blotting Troponin I

平滑筋臓器のトロポニンサブユニット発現レベルは、ヒトにおいてトロポニンTとIが膀胱排尿筋において、非常に高いということは、膀胱機能の亢進や不全に対して、この特徴を活かした選択的な治療薬の開発が可能であることを強力に示唆している。今後十分に検討していく価値のある課題である。

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6件)

Kato K, Okamura K, Hatta M, Morita H, Kajioka S, Naito S, Yamazaki

J. Involvement of IP3-receptor activation in endothelin-1-induced Ca(2+) influx in rat pulmonary small artery. Eur J Pharmacol. 2013 Nov 15;720(1-3):255-263

Taniguchi M, Kajioka S, Shozib HB, Sawamura K, Nakayama S. Spatial analysis of slowly oscillating electric activity in the gut of mice using low impedance arrayed microelectrodes. PLoS One. 2013 Oct 4;8(10):e75235.

Shahab N, Kajioka S, Takahashi R, Hayashi M, Nakayama S, Sakamoto K, Takeda M, Masuda N, Naito S. Novel effect of 2-aminoethoxydiphenylborate through inhibition of calcium sensitization induced by Rho kinase activation in human detrusor smooth muscle. Eur J Pharmacol. 2013 May 15;708(1-3):14-20.

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 Ca(2+)-mediated smooth muscle contraction. Sci Rep. 2012;2:979

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 carbachol-induced calcium sensitization in contraction of -toxin permeabilized guinea pig detrusor smooth muscle. Neurorol Urodyn. 2012 Apr;31(4):593-599 (査読有)

Sugihara M, Morita H, Matsuda M, Umebayashi H, Kajioka S, Ito S, Nishida M, Inoue R, Futatsuki T, Yamazaki J, Mori Y, Inoue R, Ito Y, Abe K, Hirata M.

Dual signaling pathways of arterial constriction by extracellular uridine 5'-triphosphate in the rat. J Pharmacol Sci. 2011;115(3):293-308. (査読有)

[学会発表](計17件)

Shahab N, Kajioka S, Seki N, Naito S, The role of muscarinic receptors in calcium sensitization and their contribution to rho-kinase and protein kinase C pathways in contraction of human detrusor smooth muscle. 26th Annual Congress of The European Association of Urology, Vienna, Austria, 2011 (Best presentation award)

Kajioka S, Shahab N, Seki N, Naito S, The muscarinic receptor subtype of M2 mediates Ca²⁺ sensitization via indirect activation of rho-kinase pathway in human detrusor smooth muscle. The 4^{1st} Annual Meeting of The International Continence Society, Glasgow, UK, 2011

Shahab N, Kajioka S, Seki N, Naito S, Photoselective Vaporization of The Prostate Versus Transurethral Resection of The Prostate: A Comparison of Improvement in Clinical Outcomes Following Surgery. The 29th World Congress of Endourology (WCE) & SWL, Annual Meeting of the East Asian Society of Endourology, Annual Meeting of Japanese Society of Endourology, November 30 - December 3 2011, Kyoto - Japan.

梶岡俊一, Nouval Shahab, 柚木貴和, 関成人, 内藤誠二、ブタ及びヒト膀胱平滑筋でのトロポニン収縮蛋白による収縮機構の完成を試みる 第99回 日本泌尿器科学会総会(名古屋)

梶岡俊一, Nouval Shahab, 林摩耶, 柚木貴和, 内藤誠二、カルシウムセンシタイザーレボシメンダンはカルシウム脱感作を介してヒト膀胱排尿筋を弛緩させる。第18回 日本排尿機能学会総会(福井)

Kajioka S, Takahashi-Yanaga F, Shahab N, Takahashi R, Matsuda M, Yonemitsu Y, Seki N, Nakayama S, Naito S, Detection of cardiac troponin T in detrusor smooth muscle. -Does troponin system operate in

smooth muscle?- 第84回 日本薬理学会総会 (横浜)

Kajioka S, Shahab N, Takahashi-Yanaga F, Takahashi R, Matsuda M, Yonemitsu Y, Seki N, Nakayama S, Generosity of cardiac troponin T in smooth muscle and its functional analysis in detrusor smooth muscle 第88回 日本生理学会総会 (横浜)

Kajioka S, Shahab N, Takahashi R, Seki N, Naito S. The effect of cyclic nucleotides on Ca sensitization induced by muscarinic stimulation in pig detrusor smooth muscle. The 27th Annual EAU Congress (Feb 24-28 2012 @Paris France)

Kajioka S, Shahab N, Hayashi M, Takahashi R, Seki N, Naito S, Rho-kinase pathway diminishes the relaxation effect of cyclic adenosine monophosphate on carbachol-induced calcium sensitization in contraction of α -toxin permeabilized Human detrusor smooth muscle. AUA Annual Meeting (2012 May 19-23 @Atlanta USA)

Kajioka S, Shahab N, Hayashi M, Takahashi R, Seki N, Naito S, The effect of cyclic nucleotides on carbachol-induced calcium sensitization in contraction of alpha-toxin permeabilized human and pig detrusor smooth muscle. The 32nd Congress of Societe internationale d'Urologie (Sept 30-Oct 4 2012 @Fukuoka Japan)

Kajioka S, Shahab N, Hayashi M, Yunoki T, Naito S, The comparable study of cyclic nucleotides-induced relaxation in Ca^{2+} dependent and independent contraction of α -toxin permeabilized detrusor smooth muscle. 第89回日本生理学会大会 (2012年 3月) 松本

梶岡俊一、Nouval Shahab、林摩耶、柚木貴和、内藤誠二、ブタ膀胱排尿筋膜脱膜化標本におけるcAMPの弛緩効果の検討 第100回日本泌尿器科学会総会 (2012年4月) 横浜

梶岡俊一、Nouval Shahab、高橋良輔、内藤誠二、ヒト膀胱排尿平滑筋のトロポニン

サブユニットの分子生物学的包括的検討 第19回排尿機能学会 (2012年8月) 名古屋
Takahashi R, Kajioka S, Shahab N, Hayashi M, Naito S, Ca^{2+} sensitization without activation of G protein is independent of calmodulin in contraction of human detrusor smooth muscle. Poster presentation, 28th Annual EAU Congress 2013 (Milan), Mar 15-19, 2013

Kajioka S, Hayashi M, Takahashi R, Naito S, The role of cyclic nucleotides in regulation of pig urethral smooth muscle. Poster presentation The 43rd Annual Meeting of International Continence Society (Barcelona) Aug 26th - 30th Aug, 2013

梶岡俊一、Nouval Shahab、林摩耶、高橋良輔、坂本一志、武田全弘、増田典之、内藤誠二、ヒト膀胱排尿筋のCa感受性の収縮機構の検討 第101回日本泌尿器科学会総会 (2013年4月) 札幌

梶岡俊一、林摩耶、高橋良輔、石上隆雄、武田全弘、増田典之、内藤誠二、ヒト膀胱排尿筋のcAMPによるCa感受性収縮機構への弛緩効果の検討 第20回日本排尿機能学会 (2013年 9月) 静岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶岡 俊一 (KAJIOKA SHUNICHI)
九州大学・大学院医学研究院・特任准教授
研究者番号: 90274472

(2) 研究分担者

関 成人 (SEKI NARIHITO)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 90294941

高橋 富美 (TAKAHASHI FUMI)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号: 50274436

松田 美穂 (ITO SHINICHI)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号: 40291520

米満 吉和 (YONEMITSU YOSHIKAZU)
九州大学・大学院薬学研究院・客員教授
研究者番号: 40291520

中山 晋介 (NAKAYAMA SHINSUKE)
名古屋大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 30192230