

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011~2012

課題番号：23791769

研究課題名（和文） 過活動膀胱における膀胱粘膜下微小循環の変化と KIT 陽性間質細胞の役割

研究課題名（英文） The role of bladder microcirculation and Kit positive interstitial cells in 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）：消化管平滑筋においては、カハールの間質細胞（ICC）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。ICC の存在が膀胱で報告され、特に平滑筋の自動運動や粘膜下層における C 線維を介したシグナル伝達に関与し、過活動膀胱（OAB）の発症に中心的役割を担っている可能性が示唆されている。ICC は、KIT を発現しているが、最近の研究では、KIT は ICC のマーカーのみならず、KIT そのものが膀胱機能の調節に重要な役割を担っていることが示唆されている。従って ICC および KIT の機能を明らかにすることが、OAB の病態を明らかにすることにつながる。本研究では、ICC および KIT の膀胱における発現機能および OAB との関係、さらに将来の治療ターゲットとしての可能性を検討した。さらに、KIT のリガンドである Stem cell factor の OAB の客観的診断治療マーカーとしての可能性について考察した。

研究成果の概要（英文）：

In the gastrointestinal tract, interstitial cells of Cajal (ICC) act as primary pacemaker cells, and play a fundamental role in the transmission of signals from enteric neurons to smooth muscle cells. In the urinary tract, including bladder, ICCs, which are referred to as interstitial cells (IC), ICC-like cells, or myofibroblasts, have also been identified by their morphological characteristics, but represent variability among tissues which may account for individual characteristics of organ. ICCs express the proto-oncogene c-kit, and signaling via the receptor kinase gene product, KIT, which is used as an identification marker of ICCs. Recent reports have suggested that KIT is not only a detection marker of these cells, but also may play a crucial role in the control of bladder function. Identifying the functions of ICCs and/or KIT may be a shortcut to clarify the pathophysiology of overactive bladder (OAB) and detrusor overactivity. Thus, in this study, we summarize the distribution and function of KIT-positive ICC and KIT in the bladder as well as the association between KIT-positive ICCs or KIT and OAB, and discuss the possible therapeutic target of KIT for OAB in the future. Finally, we demonstrated the usefulness of a possible objective biomarker for diagnosis and treatment efficacy, stem cell factor (SCF), which is a natural ligand for KIT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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、間質細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 背景

超高齢化が進み、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。

(2) 排尿機能におけるこれまでの研究動向

排尿をコントロールする中枢神経システムには多くの神経伝達物質が関与している。中枢神経系に作用する薬物の臨床応用には大きな期待が持たれるが、排尿中枢への選択性を持たせるのは難しい。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Ca²⁺)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。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。

(3) 本研究の位置づけ、着想に至った経緯

膀胱と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。そして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。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正常膀胱と比較し、Kit陽性間質細胞が増加することも知られている。このような背景から、私たちは尿路上皮から分泌されたKitリガンドであるStem Cell Factor (SCF)がKit陽性間質細胞を刺激することで求心性神経が活性化され、過活動膀胱(OAB)を引き起こすものと考え、本研究を企画した。

2. 研究の目的

過活動膀胱(Overactive bladder)発症の背景には、尿流出路閉塞や代謝障害に伴う膀胱壁の虚血が存在すると考えられる。粘膜下に存在する間質細胞やその周囲に存在する血管は、膀胱容量や膀胱内圧の変化に適応して血流を維持する機構を有すると推測される。粘膜下微小循環の変化は尿路上皮・求心性神経など過活動膀胱、特に尿意切迫感に関わる細胞の代謝に影響を及ぼすと考えられる。また私たちはこれまで過活動膀胱の病態において、間質細胞が関わっている可能性を検討してきた。今回これらの研究成果を踏まえ、過活動膀胱における粘膜下間質細胞の役割を検討したい。

3. 研究の方法

(1) サイクロフォスファミド誘発頻尿モデル

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。Glivec® を投与し、その膀胱機能への影響を観察する。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。

(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。またこれらの変異動物を用いて、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) ヒト正常および、過活動膀胱患者の膀胱

における粘膜下微小循環と間質細胞
被膜下前立腺摘除術の時に得られる膀胱組織および診断を兼ねた膀胱生検を行なう際に得られた膀胱組織を用いて、患者にインフォームドコンセントを行ない同意が得られたら、粘膜下層における Kit 陽性間質細胞、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。また定量的 RT-PCR、Western blotting 法等により発現量を検討する。また治療前の臨床所見と Kit および SCF の発現量の関係につき検討する。また透過型電子顕微鏡を用いて、粘膜下に存在する間質細胞を超微細構造学的に検討する。

紡錘形の間質細胞の細胞内構造が、過活動膀胱を有する患者で変化するのかどうかについても正常コントロールと比較検討する。

4. 研究成果

(1) モルモット正常膀胱における Kit および Stem Cell Factor (SCF) の発現

モルモットの膀胱において、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 陽性間質細胞は、膀胱粘膜下層を中心に膀胱全層に発現していた。また SCF は尿路上皮を中心に発現しており、下部尿路閉塞モデルモルモットの膀胱では発現が増加していた。

(2) 膀胱間質細胞の超微細構造からみた過活動膀胱の発症機序の検討

正常膀胱と過活動膀胱モデル膀胱における間質細胞の形態学的変化、また神経や筋細胞との位置関係の違いを調べた。紡錘形をした間質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。過活動膀胱モデルの膀胱においては間質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。

(3) c-kit 遺伝子変異動物を用いた膀胱 Kit 陽性間質細胞の検討

c-kit 遺伝子変異動物を用いて、膀胱の生理機能・形態学的変化を調べている。形態学的には本変異ラット膀胱の間質細胞は異常を認めなかった。また膀胱内圧測定を行ったところ、膀胱内圧や排尿間隔、non-voiding contraction の頻度は、野生型と比べて有意な差は認めなかった。しかしながら、本変異ラットにサイクロフォスファミドやプロタミンサルフェイトを投与したところ、膀胱内圧には差を認めないものの、野生型に比べて、排尿間隔の減少や non-voiding contraction の頻度増加の程度が軽微であった。このことから KIT は生理的状态下ではなくて、病的状態下において膀胱機能特に膀胱知覚の役割を担い、過活動膀胱などの蓄尿障害において KIT シ

グナル伝達系の異常が大きく関与していることが示唆された。

(4) 過活動膀胱モデル動物に対する Kit 抑制因子 (グリベック®) および SCF の作用機序

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元来慢性骨髄性白血病に対する治療薬として開発されたが、カハールの間質細胞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、過活動膀胱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 が間質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。

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 17 件)

- ① Yasuhiro Fujii, Atsushi Okada, Takahiro Yasui, Kazuhiro Niimi, Shuzo Hamamoto, Masahito Hirose, Yasue Kubota, Yoshiyuki Kojima, Keiichi Tozawa, Yutaro Hayashi, and Kenjiro Kohri. Adiponectin ameliorates kidney stone formation in metabolic syndrome model mice by inhibition of inflammation and apoptosis. *Journal of biological chemistry*. 8(4): e61343., 2013, 査読あり doi:10.1371/journal.pone.0061343
- ② Shoichiro Iwatsuki, Shoichi Sasaki, Kentaro Mizuno, Hiroki Kubota, Yasue Kubota, Yukihiro Umemoto, Takahiro Yasui, Yutaro Hayashi, Kenjiro Kohri. Regulation of spermiogenesis by Numb and Numb-like in rat testes: analysis using an in vivo gene transfer technique. (submitting)
- ③ Imura Makoto, Kojima Yoshiyuki, Kubota Yasue, Hamakawa Takashi, Yasui Takahiro, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro. Regulation of cell proliferation through a KIT-mediated mechanism in benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 72(14):1506-13, 2012, 査読あり doi: 10.1002/pros.22500.
- ④ Kojima Yoshiyuki, Sasaki Shoichi, Kubota Yasue, Imura Makoto, Hayashi Yutaro and Kohri Kenjiro. Tamsulosin reduces nighttime urine production in benign prostatic hyperplasia patients with nocturnal polyuria: A prospective open-label long-term study using frequency-volume chart. *Neurourol Urodyn*. 31(1):80-5, 2012, 査読あり doi: 10.1002/nau.21224.
- ⑤ Kojima Yoshiyuki, Kubota Yasue, Sasaki Shoichi, Kohri Kenjiro: Molecular basis of α_1 -AR and its clinical application in male LUTS medical therapy. *Current Bladder Dysfunction Reports*, 7(4):256-259, 2012, 査読あり doi: 10.1007/s11884-012-0149-4
- ⑥ Niimi Kazuhiro, Yasui Takahiro, Hamamoto Shuzo, Itoh Yasunori, Okada Atsushi, Kubota Yasue, Kojima Yoshiyuki, Tozawa Keiichi, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro. Mitochondrial permeability transition pore opening induces the initial process of renal calcium crystallization. *Free Radic Biol Med*. 52(7):1207-17, 2012, 査読あり doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.005.
- ⑦ Kubota Yasue, Kojima Yoshiyuki, Kohri Kenjiro. Maternal anterior sacral meningocele presenting as acute urinary retention in pregnancy. *Int J Urol*. 19(3):279-80, 2012, 査読あり doi: 10.1111/j.1442-2042.2011.02940.x
- ⑧ Hirose Masahito, Tozawa Keiichi, Okada Atsushi, Hamamoto Shuzo, Higashibata Yuji, Gao Bin, Hayashi Yutaro, Shimizu Hideo, Kubota Yasue, Yasui Takahiro, Kohri Kenjiro: Role of osteopontin in

- early phase of renal crystal formation: immunohistochemical and microstructural comparisons with osteopontin knock-out mice. *Urol Res.* 40(2):121-129, 2012, 査読あり
doi: 10.1007/s00240-011-0400-z.
- ⑨ Kojima Yoshiyuki, Sasaki Shoichi, Kubota Yasue, Imura Makoto, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro. Tamsulosin reduces nighttime urine production in benign prostatic hyperplasia patients with nocturnal polyuria: A prospective open-label long-term study using frequency-volume chart. *Neurourol Urodyn.* 31(1):80-5, 2012, 査読あり
doi: 10.1002/nau.21224.
- ⑩ Kubota Yasue, Kojima Yoshiyuki, Shibata Yasuhiro, Imura Makoto, Kohri Kenjiro, Sasaki Shoichi. Role of KIT-positive interstitial cells of Cajal in the urinary bladder and possible therapeutic target for overactive bladder. *Adv Urol*, Vol. 2011, Article ID 816342, 2011, 査読あり
doi:10.1155/2011/816342
- ⑪ 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.*, 30(7): 1309-1314, 2011, 査読あり
doi: 10.1002/nau.21065.
- ⑫ Kojima Yoshiyuki, Sasaki Shoichi, Kubota Yasue, Imura Makoto, Oda Nobuyuki, Kuniwa Mamoru, Hayashi Yutaro and Kohri Kenjiro. Up-regulation of α (1a) and α (1d)-adrenoceptors in the prostate by administration of subtype selective α (1)-adrenoceptor antagonist tamsulosin in patients with benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 186: 1530-1536, 2011, 査読あり
doi: 10.1016/j.juro.2011.05.048.
- ⑬ Shibata Yasuhiro, Ugawa Shinya, Imura Makoto, Kubota Yasue, Ueda Takashi, Kojima Yoshiyuki, Ishida Yusuke, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro, Shimada Shoichi. TRPM8-expressing dorsal root ganglion neurons project dichotomizing axons to both skin and bladder in rats. *Neuroreport.* 22(2): 61-67, 2011, 査読あり
doi:10.1097/WNR.0b013e3283424c9c.
- ⑭ Yoshiyuki Kojima, Shoichi Sasaki, Makoto Imura, Yasue Kubota, Yutaro Hayashi, Kenjiro Kohri. Correlation between expression of α 1-adrenoceptor subtype mRNA and severity of lower urinary tract symptoms or bladder outlet obstruction in benign prostatic hyperplasia patients. *BJU Int.* 107:438-442, 2011, 査読あり
doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09596.x
- ⑮ Sasaki Shoichi, Tomiyama Yoshitaka, Kobayashi Shinya, Kojima Yoshiyuki, Kubota Yasue, Kohri Kenjiro. Characterization of α (1)-adrenoceptor subtypes mediating contraction in human isolated ureters. *Urology.* 77(3):762.e13-7, 2011, 査読あり
doi: 10.1016/j.urology.2010.09.034.
- ⑯ Okada Shinsuke, Kojima Yoshiyuki, Kubota Yasue, Mizuno Kentaro, Sasaki Shoichi, Kohri Kenjiro. Attenuation of bladder overactivity in KIT mutant rats. *BJU Int.* 108(2 Pt 2):E97-103, 2011, 査読あり
doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09870.x.
- ⑰ Kubota Hiroki, Sasaki Shoichi, Kubota Yasue, Umemoto Yukihiro, Yanai Yoshimasa, Tozawa Keiichi, Hayashi

Yutaro, Kohri Kenjiro. Cyclooxygenase-2 protects germ cells against spermatogenesis disturbance in experimental cryptorchidism model mice. J Androl. 32:77-85, 2011, 査読あり
doi: 10.2164/jandrol.109.008888.

[学会発表] (計9件)

- ① 窪田 泰江: 教育講演④ 最新情報: 基礎のOverview「過活動膀胱におけるSCF-Kitシグナル伝達系の機能解析」第6回下部尿路機能先端セミナー 2012.7.15-16, 東京
- ② Kubota Yasue, Kojima Yoshiyuki, Hamakawa Takashi, Imura Makoto, Shibata Yasuhiro, Sasaki Shoichi, Kohri Kenjiro: Urinary stem cell factor as a novel diagnostic and therapeutic biomarker for overactive bladder. American Urological Association Annual Meeting 2012, 2012.5.19-24, Atlanta(USA)
- ③ Kojima Yoshiyuki, Sasaki Shoichi, Hamakawa Takashi, Shibata Yasuhiro, Imura Makoto, Kubota Yasue, Tozawa Keiichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Receptor binding ability of α 1-AR antagonists is responsible for therapeutic efficiency with long-term use in benign prostatic hyperplasia. American Urological Association Annual Meeting 2012, 2012.5.19-24, Atlanta(USA)
- ④ Kojima Yoshiyuki, Sasaki Shoichi, Imura Makoto, Mizuno Kentaro, Okada Atsushi, Kubota Yasue, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Gene expression profiling and functional network analysis of benign prostatic hyperplasia model rat. American Urological Association Annual Meeting 2012, 2012.5.19-24, Atlanta(USA)
- ⑤ Imura Makoto, Kojima Yoshiyuki, Hamakawa Takashi, Okada Atsushi, Kubota Yasue, Umemoto Yukihiro, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri

Kenjiro: Regulation of cell proliferation through a KIT-mediated mechanism. American Urological Association Annual Meeting 2012, 2012.5.19-24, Atlanta(USA)

- ⑥ 窪田 泰江、小島 祥敬、佐々木 昌一、郡 健二郎、山田 泰之、窪田 裕樹、池内 隆人、多和田 俊保: 過活動膀胱患者に対する層別解析を用いたイミダフェナシンの治療効果の検討。第100回日本泌尿器科学会総会、2012.4.21-24、横浜市
- ⑦ 窪田 泰江、小島 祥敬、井村 誠、柴田 泰宏、佐々木 昌一、郡 健二郎: 尿中Stem Cell Factor (SCF)値の測定はOABの診断と治療効果判定に有用である。第18回日本排尿機能学会、2011.9.15-18、福井市
- ⑧ Kubota Yasue: Role of KIT-positive interstitial cells in the urinary bladder. Roles, mechanisms and origin of various cell types in visceral smooth muscles, 2011.4.29-30, Gamagoori
- ⑨ 窪田 泰江、小島 祥敬、佐々木 昌一、郡 健二郎: SCF/KITシグナル伝達系を標的とした過活動膀胱に対する新しい治療戦略。第99回日本泌尿器科学会総会、2011.4.21-24、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