

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791641

研究課題名(和文)病態モデル膀胱上皮細胞の伸展刺激に対するATP放出のメカニズム

研究課題名(英文)Research on mechanism of the ATP release from urinary bladder epithelium of disease models upon mechanical stretch stimulation

研究代表者

吉良 聡 (KIRA, Satoru)

山梨大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10530115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究における実験結果から、膀胱上皮に発現するVNUTが膀胱知覚神経伝達(尿意知覚)に関与していると考えられた。さらに、排尿障害を背景に持つヒト膀胱上皮にもVNUTが発現していることを確認し、初期尿意との関連性が示唆された。従って、膀胱上皮におけるVNUTを制御することで過活動膀胱などの排尿障害に対する新しい治療薬の開発に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have been trying to research on mechanism of VNUT in urinary bladder epithelium in various conditions. Knock down of VNUT in bladder epithelium culture cells decreased ATP release upon mechanical stretch stimulation. Furthermore, we investigated VNUT in human urinary bladder. mRNA and protein of VNUT were highly expressed in the human urinary bladder epithelium. The mRNA of VNUT level was demonstrated to be negatively correlated with First desire to void. According to these results, control of VNUT may provide a novel strategy for the treatment of bladder dysfunction.

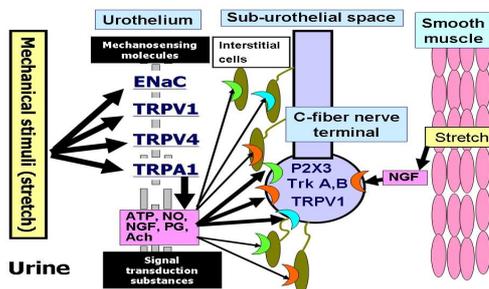
研究分野：医歯薬学

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：排尿障害 VNUT 膀胱 知覚神経伝達 過活動膀胱

## 1. 研究開始当初の背景

近年、膀胱上皮は単なる防御機構としての機能のみならず、伸展刺激や侵害刺激を感知し、求心性伝達を担う役割を果たしていると考えられている (Ferguson et al.1997;Sun et al.,2001;Birder and de Groat et al.,2007)。これまで膀胱上皮が伸展刺激に应答し、ATP や NO、アセチルコリン、PGE などの mediator を放しているとの報告が多数なされているが (Yoshimura et al.,2002;Andersson et al.,2002;Lewin GR et al.,2004;Xu L et al.2008)、未だ確証たるものはなく、現在においても未解決のままである。特に ATP に関しては、知覚神経の神経終末に存在するプリン受容体を刺激している最も注目すべき物質であり、その膀胱上皮からの刺激による ATP 放出の経路としては、connexin hemichannels, anion channels, nucleoside transporter, exocytosis などと考えられてきた。最近の研究で、神経、副腎などで細胞からの ATP 放出の経路として VNUT (vesicular nucleotide transporter Sawada et al., PNAS 2008) が同定された。研究代表者 (吉良 聡) の所属する山梨大学医学部泌尿器科学講座では、マウス、及び人の膀胱上皮 (細胞) に VNUT が発現していることを発見した (Nakagomi, H., NeuroUrol. Urodyn., 2011)。また、伸展によってマウス膀胱上皮が機械的刺激性チャネル TRPV4 の活性化を介して ATP 分泌を起こすことを証明した (Mochizuki T, et al., J Biol. Chem., 2009)。さらにマウスおよびヒトの膀胱上皮において、伸展刺激による ATP 放出についても VNUT が主な役割を果たしているかどうかを検討している。そこで次の段階として、膀胱上皮の伸展を感知した TRPV4 の活性化から ATP 放出に至る分子機構を、VNUT を介した細胞内小胞への ATP 蓄積ならびに開口放出の視点から解明する。本研究のコンセプトは、従来、情報を受け取る側の受容体の研究を中心に進められていたが解明できなかった病態を、ATP などの神経伝達物質の放出メカニズムを追求するというパラダイムシフトによって解明するというものであり、画期的な治療法への道を開く可能性を秘めていると信じている。



## 2. 研究の目的

過活動膀胱や排尿筋過活動といった蓄尿障害疾患に対し有効かつ副作用の少ない治療

法を開発するためには蓄尿時における求心路の生理的メカニズムを解明することが急務である。我々は2008年に発表され、画期的な発見である小胞型ヌクレオチドトランスポーター (ATP を分泌小胞に能動輸送するタンパク Sawada et al., PNAS 2008) が膀胱上皮にも発現し伸展刺激に対して ATP 放出应答していることを発見した。この小胞型ヌクレオチドトランスポーターを研究の中心に置き、今回我々は病態モデルマウス (閉塞膀胱モデル、炎症膀胱モデル)、VNUT Knock Down 培養細胞を用いて上記排尿生理メカニズムがどのように変化しているのかを明らかにしたいと考えている。さらに、可能であれば排尿障害を背景に持つヒトサンプルにおいても同様な検討を行いたい。

## 3. 研究の方法

病態モデルおよび VNUT 遺伝子を Knock Down させた膀胱上皮初代培養細胞を用いた in vitro の生理学実験を中心に行った。病態モデルおよび VNUT Knock Down 膀胱上皮培養細胞に伸展刺激を負荷し、細胞の应答や情報伝達物質の放出を非病態野生型 (WT) マウスと比較検討した。また、VNUT の膀胱における遺伝子レベル・タンパクレベルでの発現および局在についても改めて WT、病態モデル、VNUT Knock Down 群において再度 PCR や免疫染色を実施した。また、主に排尿障害を背景に持つヒトサンプルにおいても上記同様な検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) マウス (C57BL/6Cr) を用いた膀胱上皮培養細胞系を、これまでより安定して確実に作成できるように発展させた。病態モデルマウス群からの膀胱上皮培養細胞の作成に関しては、現在試行中である。

(2) siRNA を用いて、VNUT 遺伝子を Knock down させたマウス膀胱上皮培養細胞系を作成した。Knock Down 細胞は、WT 由来のものと比較して有意に VNUT の mRNA レベルでの発現量が少ないことを確認した。また、蛋白レベルでも (Western blotting 法) KD 群の蛋白量が少ないことを確認した。この VNUT Knock Down 培養細胞に伸展刺激を加えた時の ATP の放出量を、Control siRNA を処理した上皮培養細胞に伸展刺激を加えた際の ATP 放出量と比較検討した結果、有意に VNUT Knock down 群が ATP 放出量が低下していることを確認した。(Hiroschi Nakagomi, Tsutomu Mochizuki, Masayuki Takeda : The 107th Annual Meeting of The American Urological Association)

(3) VNUT を含む各種開口放出を抑制する薬剤を処置した上皮培養細胞群と Cotorl 投与群とで伸展刺激に対する ATP 放出量を比較検討したところ、開口放出抑制薬投与群で有意

に低下していることを認めた。(同上)

(4) さらに背景として排尿障害を持つヒト膀胱上皮におけるVNUTのmRNAの発現量及び各種排尿パラメータの関連に関して検討を行った。VNUTは排尿障害を持つヒト膀胱上皮において強く発現していることを認め、またfirst desire to void(FDV)とVNUT mRNAの発現量に負の相関を認めた。(Hiroshi Nakagomi, Satoru Kira, Masayuki Takeda : 42nd Annual Meeting of the International Continence Society(ICS))

#### 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)

1. Hideki Kobayashi, Yaburu Haneda Satoru Kira, Takayuki Tsuchida  
Isao Araki, Masayuki Takeda  
Tailor-Made Mesh for Pelvic Organ Prolapses: Correlation between Patient's Height and Mesh Size: Open Journal of Urology, 2013. 3:121-123 (査読有)

2. 小林 英樹, 羽根田 破, 吉良 聡,  
宮本 達也, 澤田 智史, 土田 孝之  
荒木 勇雄, 武田 正之  
TVM メッシュの大きさに関する検討: 日本女性骨盤底医学会誌, 2013. 10(1):216-218 (査読有)

3. Hideki Kobayashi, Norifumi SAWADA, Satoru Kira, Tatsuya Miyamoto, Yaburu Haneda, Hidenori Zakoji, Takayuki Tsuchida, Isao Araki, Masayuki Takeda  
Intraoperative Fluoroscopic Monitoring during TVM Surgery: Safer Procedure Even for Beginners: Open Journal of Urology, 2012. 2(2):72-74 (査読有)

4. 吉良 聡, 羽根田 破, 小林 英樹  
荒木 勇雄, 武田 正之,  
TOT 手術における術前後の排尿状態の変化に関する検討: 日本女性骨盤底医学会誌,  
2012. 9(1):118-121 (査読有)

5. 小林 英樹, 澤田 智史, 今井 佑樹  
吉良 聡, 宮本 達也, 羽根田 破  
荒木 勇雄, 武田 正之  
透視下 TVM 手術の検討: 日本女性骨盤底医学会誌, 2012. 9(1):68-71 (査読有)

6. 座光寺 秀典, 工藤 祥司, 犬塚 秀康  
吉良 聡, 宮本 達也, 武田 正之  
孤立性副腎転移に対する腹腔鏡下副腎摘除術の経験: 日本泌尿器科学会雑誌,  
2012. 103(3):535-539 (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Tatsuya Miyamoto, Hiroshi Nakagomi  
Satoru Kira, Tsutomu Mochizuki  
Schuichi KOIZUMI, Makoto Tominaga  
Masayuki Takeda  
Piezo1, a novel mechanosensor in the bladder urothelium, transmits signals of bladder secsation: 28th Annual EAU Congress 2013.3.16 Milan, Italy

2. Tatsuya Miyamoto, Hiroshi Nakagomi  
Satoru Kira, Tsutomu Mochizuki  
Schuichi KOIZUMI, Makoto Tominaga  
Masayuki Takeda  
PIEZO1, A NOVEL MECHANOSENSOR IN THE BLADDER UROTHELIUM: 42nd Annual Meeting of the International Continence Society(ICS) 2012.10.19 Beijing, China

3. Hiroshi Nakagomi, Tsutomu Mochizuki  
Tatsuya Miyamoto, Satoru Kira, Mitsuharu Yoshiyama, Kazuya Kawahara, Y Moriyama  
Schuichi KOIZUMI, Masayuki Takeda  
VESICULAR NUCLEOTIDE TRANSPORTER(VNUT) IS A KEY MOLECULE FOR MECHANOSENSING IN THE HUMAN URINARY BLADDER: NEGATIVE CORRELATION BETWEEN VNUT EXPRESSION IN HUMAN BLADDER MUCOSA AND FIRST DESIRE TO VOID: 42nd Annual Meeting of the International Continence Society(ICS) 2012.10.17 Beijing, China

4. Hideki Kobayashi, Yaburu Haneda  
Satoru Kira, Tatsuya Miyamoto, Norifumi SAWADA, Takayuki Tsuchida, Isao Araki  
Masayuki Takeda  
TAILOR-MADE MESH FOR PELVIC ORGAN PROLAPSED PATIENTS IS BETTER THAN READY-MADE UNIFORM MESH: 42nd Annual Meeting of the International Continence Society(ICS) 2012.10.17 Beijing, China

5. Hideki Kobayashi, Satoru Kira, Yaburu Haneda, Tatsuya Miyamoto, Norifumi SAWADA  
Takayuki Tsuchida, Isao Araki  
Masayuki Takeda  
Tailor-made mesh for pelvic organ prolapsed patients is better than ready-made uniform mesh: The 7th Pan-Pacific Continence Society Meeting. 2012.08.28 Nagoya, Japan

6. Hiroshi Nakagomi, LI Kai, Norifumi SAWADA, Tatsuya Miyamoto, Satoru Kira  
Masanori KITAMURA, Masayuki Takeda  
PDGF-evoked Beta-catenin signaling contributes to bladder smooth muscle cell contraction through up-regulation of Cx43

expression: The 7th Pan-Pacific  
Continent Society Meeting  
2012.08.28 Nagoya, Japan

7. WU Yongyang, Tatsuya Miyamoto  
LI Kai, Hiroshi Nakagomi, Norifumi SAWADA  
Satoru Kira, Hideki Kobayashi, Hidenori  
Zakoji, Isao Araki, Masayuki Takeda  
Significant correlation between Vitamine  
D receptor and epithelial Ca<sup>2+</sup> ion channel  
TRPV5 and TRPV6 in renal cell carcinoma.  
: The 107th Annual Meeting of The American  
Urological Association. 2012.05.20  
Atlanta, USA

〔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

吉良 聡 (KIRA, Satoru)

山梨大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10530115