

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893100

研究課題名(和文)コネキシンのヘミチャネルに着目した尿路上皮機能の日内変動の検討

研究課題名(英文)Diurnal change of urothelial function focusing on the hemichannel of connexin43

研究代表者

根来 宏光(Negoro, Hiromitsu)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80708595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：不死化ヒト尿路上皮細胞2種(TRT-HU1、nhu-TERT)に、serum shock法を用いて細胞の時計を同調させることで、主要時計遺伝子、Cx43の発現に概日リズムがあることを確認した。次に、TRT-HU1において、機械刺激によるATP放出量は、Cx43を強制発現させると有意に上昇し、Cx43をノックダウンさせた場合や、ヘミチャネル阻害剤を使用した場合に有意に低下した。以上によってCx43ヘミチャネルは尿路上皮においてATP放出経路の一つであると示唆された。これらの結果をもとにATP放出量の日内変動、さらに尿路上皮のCx43が膀胱機能に与える影響について研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：We have found that major clock genes and connexin43 (Cx43), a gap junction protein in the bladder, were expressed in the circadian manner in two immortalized human urothelial cells (TRT-HU1 and nhu-hTERT) by synchronizing the clock in each cells using serum shock method. To address whether Cx43 has a function as hemichannel, overexpression/knock down of Cx43 were induced in these cells. The amount of ATP release from nhu-TERT with Cx43 overexpression was higher compared with that from the control. On the other hand, the amount of ATP release by mechanical stimulation was smaller in TRT-HU1 with knock down of Cx43 or with addition of hemichannel inhibitors than that in their controls. These results indicate that one of the pathways of ATP release is the Cx43 hemichannel in these urothelial cells.

We presently progress the research to investigate whether the amount of ATP release has diurnal change and how the role of urethral Cx43 for the bladder function by using mouse model.

研究分野：排尿障害

キーワード：体内時計 尿路上皮 コネキシン43 ヘミチャネル

1. 研究開始当初の背景

1) 哺乳類では、睡眠覚醒、体温調節、ホルモン分泌をはじめとする数多くの 24 時間周期の生理機能が、時計遺伝子の形成する概日時計の制御を受けている。我々はこれまで、膀胱の概日時計の存在とその日内排尿リズムへの関与を、ギャップジャンクション構成蛋白であるコネキシン 43(Cx43)に着目し、主に筋原性メカニズムの面から明らかにした()。

この論文では、排尿筋の被刺激性に関わるギャップジャンクション(GJ)構成蛋白であるコネキシン 43(Cx43)の発現が、時計遺伝子のひとつによって制御され日内変動することを示し、蓄尿量が日中より夜間に大きくなる日内排尿リズムの形成に関与していることを、膀胱平滑筋に着目して明らかにした。

2) 一方、膀胱機能において、尿路上皮が ATP や PGE2、アセチルコリンなどを放出し、刺激情報を尿路上皮間、間質、筋層に伝達することで膀胱機能を調節していることが分かってきている。Cx43 は細胞間の GJ だけでなく細胞外へヘミチャネルを形成し、ATPなどを放出する経路となることが星状膠細胞等で近年報告されており、これらの分子は、膀胱機能上重要な役割を有している。

2. 研究の目的

尿路上皮で Cx43 が GJ やヘミチャネルとしての機能を有するのか、さらに尿路上皮はどのように日内排尿リズムと関連するのかを検討し、夜間頻尿や夜尿症といった日内排尿リズムの破綻や未形成と考えられる病態のさらなる解明を目指す。

3. 研究の方法

1) 尿路上皮細胞の時計遺伝子と Cx43 の蛋白および RNA 発現リズムの解析

膀胱平滑筋に末梢時計が存在し、膀胱機能が日内変動することを報告しているが、尿路上皮における末梢時計の役割は未知である。まず、尿路上皮にも末梢時計が存在しているかどうか不死化ヒト尿路上皮細胞を用いて証明する。

2) 尿路上皮における Cx43 ヘミチャネル機能の解析

不死化ヒト尿路上皮細胞に、RNAi 法を用いて Cx43 の発現をノックダウン、遺伝子導入にて Cx43 を強制発現させた細胞を作製する。その後、ルシフェラーゼアッセイにて ATP の放出量を検討することで、Cx43 ヘミチャネルの ATP 放出への関与を明らかにする。

3) 尿路上皮細胞からの ATP 放出の日内変動の検討

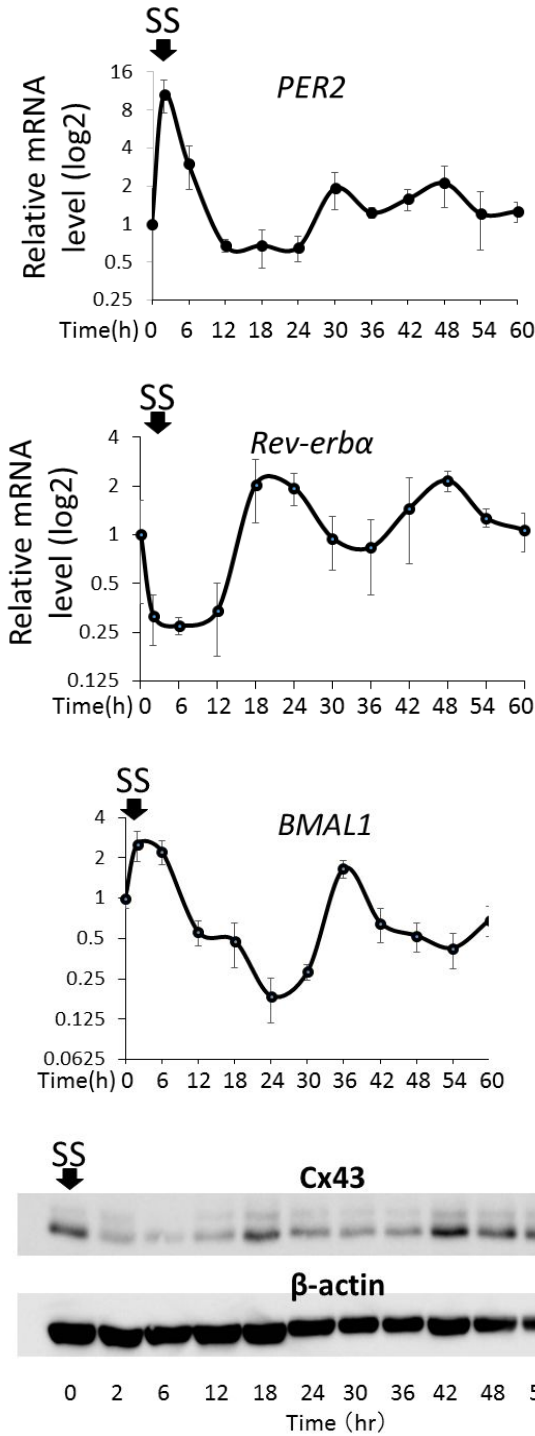
1) 、 2) の結果をもとに、不死化ヒト尿路上皮細胞から放出される ATP 量に概日リズムが存在するかどうかを検証する。

4. 研究成果

1) 尿路上皮シグナル伝達機能の日内変動の解析

細胞の時計を同調させる Serum shock 法 (SS) (50%血清による細胞刺激) にて、2 種的不死化ヒト尿路上皮細胞に、主要時計遺伝子である BMAL-1, PER2, Rev-erb に加え、Cx43 の発現に概日リズムがあることが確認された(図 1)。

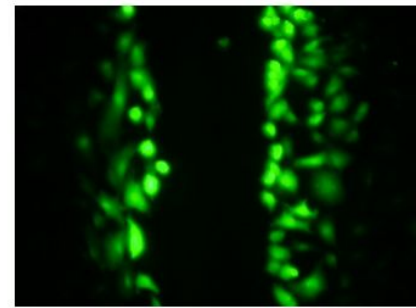
図1 不死化ヒト尿路上皮細胞(TRT-HU1)における概日リズム



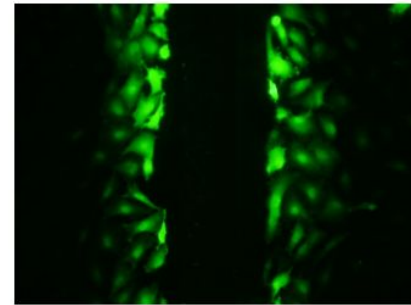
2) 尿路上皮における Cx43 ヘミチャネル機能の解析

さらに、Cx43 をノックダウンさせた不死化ヒト尿路上皮細胞(Cx43shRNA)では、Gap junction の機能が低下するとともに、機械刺激による ATP 放出量が有意に低下していた (図 2)。

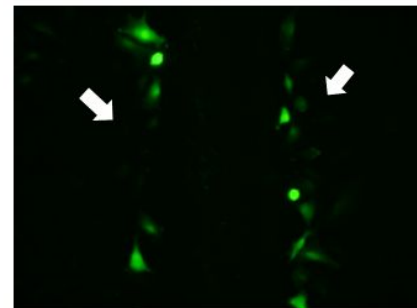
図2 Cx43shRNA導入細胞におけるdye transfer、ATP放出量



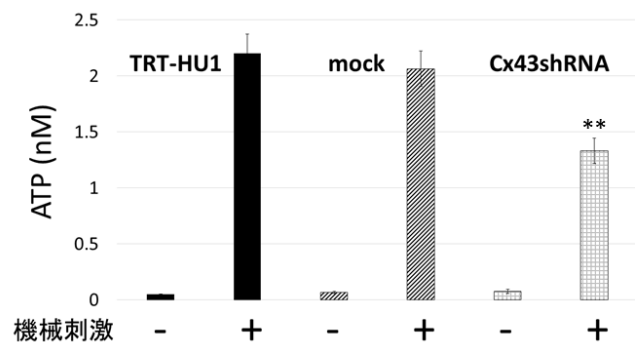
TRT-HU1



mock



Cx43shRNA



Cx43をノックダウンさせた細胞 (Cx43shRNA)では、他と比べて、細胞間情報伝達の程度を示すdyeの広がり少なく(白矢印)、かつ機械刺激によるATP放出量が有意に少ない(左図、** $P < 0.01$ Student's *t*-test)。

一方、Cx43 を強制発現させたヒト尿路上皮細胞 (Cx43^{o/e} nhu-TERT) において、機械刺激による ATP 放出量が有意に増加しているとともに、これは Gap junction/Cx43 ヘミチャネル阻害剤 (Carbenoxolone) で有意に抑制された。

3) 尿路上皮細胞からの ATP 放出の日内変動の検討

これまでの結果から、ATP の放出経路の一つとして Cx43 ヘミチャネルの存在が考えられ、現在、時計を同調させた尿路上皮細胞から放出される ATP 量に日内変動が存在しているかを検証中である。

<引用文献>

Involvement of urinary bladder Connexin43 and the circadian clock in coordination of diurnal micturition rhythm.
Negoro H, Kanematsu A, Doi M, Suadicani SO, Matsuo M, Imamura M, Okinami T, Nishikawa N, Oura T, Matsui S, Seo K, Tainaka M, Urabe S, Kiyokage E, Todo T, Okamura H, Tabata Y, Ogawa O.
Nat Commun. 2012 May 1;3:809.

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 2 件)

Negoro H, Urban-Maldonado M, Liou LS, Spray DC, Thi MM, Suadicani SO.
Pannexin 1 channels play essential roles in urothelial mechanotransduction and intercellular signaling.
PLoS One. 2014 Aug 29;9(8):e106269.

Okinami T, Imamura M, Nishikawa N, Negoro H, Sugino Y, Yoshimura K, Kanematsu A, Hashitani H, Ogawa O.

Altered detrusor gap junction communications induce storage symptoms in bladder inflammation: a mouse cyclophosphamide-induced model of cystitis.
PLoS One. 2014 Aug 6;9(8):e104216.

[学会発表](計 5 件)

尿路上皮とコネキシンの時間生物学
第 102 回日本泌尿器科学会総会
ヤングリサーチグラント報告
2014 4/23-27 (4/24) 神戸 国際会議場

排尿を司る体内時計
第 102 回日本泌尿器科学会総会
教育講演
2014 4/23-27 (4/25) 神戸 国際会議場

未来につながる排尿基礎研究 排尿を司る体内時計
第 21 回排尿機能学会シンポジウム
2014 9/17-20 岡山コンベンションセンター

Coordination of day-night changes in urination by the circadian clock
筑波グローバルサイエンスシンポジウム
9/28/2014 茨城 筑波大学

"Pannexin 1 channels participate in urothelial ATP release and signaling"
ICS2014 2014 10/20-24 Rio, Brasil

[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:
出願年月日:
取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

根来 宏光 (NEGORO, Hiromitsu)
京都大学・大学院医学研究科泌尿器科・特
定助教
研究者番号：80708595

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：