

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670699

研究課題名(和文) 難治性下部尿路機能障害に対する小胞型トランスポーター機能の研究

研究課題名(英文) Research on vesicular type transporter and refractory lower urinary tract dysfunction

研究代表者

武田 正之 (TAKEDA, Masayuki)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：80197318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：排尿行動検査用代謝ケージでは、ある特殊なClock遺伝子変異マウスを夜間多尿・夜間頻尿疾患モデルマウスとして公開特許を取得し、論文投稿中。野生型マウスでは、各種時計遺伝子群の概日リズムは保存され、TRPチャネル、Piezo1などの機械センサー群、VNUTコネキシン26などのATP産生機構の概日リズムも保存されていた。上記のClock遺伝子変異マウスにおいて、ex-vivo膀胱上皮細胞は、各種時計遺伝子群の日内変動が消失し、これと同期してTRPチャネル、Piezo1などの機械センサー群、VNUTコネキシン26などのATP産生機構の概日リズムも消失していた。

研究成果の概要(英文)：Micturition behavior was examined using a special metabolic cage. Male C57BL/6 mice aged 8-12 weeks old (WT) and male C57BL/6 Clock^{19/19} mice aged 8 weeks old were used. They were bred under 12-h light/dark conditions for 2 weeks and voiding behavior was investigated by measuring water intake volume, urine volume, urine volume/void, and voiding frequency in metabolic cages in the dark and light periods. Clock^{19/19} mice showed the phenotype of Nocturia(NC)/Nocturnal Polyuria(NP). The Clock^{19/19} mouse may be used as an animal model of NOC and NP. We investigated the gene expression rhythms of the mechanosensory cation channels(TRPV4, Piezo1), and a main ATP release mediate molecules (ARMM) such as VNUT and Cx26 in the urothelium, in addition to clock genes. Disruption of circadian rhythms in mechano-sensors and ARMM, in addition to abnormalities in clock genes, could be one of the causes of NOC because of the hyper-sensitivity of bladder wall extension.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：下部尿路機能 難治性下部尿路機能障害 小胞型トランスポーター 機械センサー 時計遺伝子

1. 研究開始当初の背景

機械的受容体、時計遺伝子と下部尿路機能障害の研究は比較的歴史が浅く、小胞型ヌクレオチドトランスポーターに関しては極めて新しいものである。これらを組み合わせ、さらに正常各種尿意、病的尿意の発症機序との関係を調べることによって、難治性夜間頻尿・過活動膀胱の治療法を開発する糸口となる。

2. 研究の目的

- (1) 尿意(常温時と寒冷時)と温度感受性 TRP チャンネル、Piezo1、小胞型ヌクレオチドトランスポーター、時計遺伝子との関係を調べる。
- (2) 夜間就寝中の尿意と温度感受性 TRP チャンネル、Piezo1、小胞型ヌクレオチドトランスポーター、時計遺伝子との関係を調べる。
- (3) 難治性下部尿路機能障害における温度感受性 TRP チャンネル、Piezo1、小胞型ヌクレオチドトランスポーター、時計遺伝子の異常との関係を調べる。

3. 研究の方法

- (1) 温度感受性 TRP チャンネル、Piezo1、VNUT および時計遺伝子異常と睡眠行動、24 時間排尿行動の異常との関連性を調べる。
ヒト; 遺伝子多型と臨床データの比較を行う。
山梨大学医学部附属病院および関連施設の外來患者を対象として行う。倫理審査に関しては、「人権の保護及び法令等の遵守への対応」の通りである。
対象者; 夜間頻尿・夜間多尿と同年齢・性別の正常対照者
対象遺伝子; 温度感受性 TRP チャンネル、Piezo1、VNUT および時計遺伝子
方法; 血中メラトニン、AVP、ANP、BNP の測定。
睡眠の定量は、アクチグラム(新規購入予定)で行う。
メタボロミクスによるトランスポーター機能の探索を行う。
In vivo 動物実験; 遺伝子改変動物の排尿行動を調べる。
 - 1) 遺伝子改変動物の排尿行動; 排尿行動検査用代謝ケージ(既存)を用いる。
 - 2) 遺伝子改変動物のメタボロミクスによるトランスポーター機能の探索。In vitro; 培養膀胱上皮細胞、培養膀胱平滑筋細胞の時計遺伝子の Knockdown と機械センサー機能、VNUT への影響、関連する miRNA を調べる。
- (2) 尿意(常温時と寒冷時)との関係:
ヒト新鮮尿中の剥離上皮細胞を用いた遺伝子変異と臨床データの比較。
上記 および による検討を行う。
- (3) 夜間就寝中の尿意との関係: -
- (4) 難治性下部尿路機能障害での検討:

4. 研究成果

温度感受性 TRP チャンネル、Piezo1、VNUT および時計遺伝子異常と睡眠行動、24 時間排尿行動の異常との関連性に関する研究
(1) ヒト遺伝子多型、血中・尿中バイオマーカー候補と臨床症状(IPSS, OABSS, 排尿日誌など)の探索
山梨大学医学部附属病院および関連施設の外來患者を対象として行った。
夜間頻尿・夜間多尿の血中・尿中バイオマーカー候補の探索
対象者; 夜間頻尿・夜間多尿と同年齢・性別の正常対照者
対象遺伝子; 温度感受性 TRP チャンネル、Piezo1、VNUT および時計遺伝子
方法; 血中・尿中メラトニン、AVP、ANP、BNP の測定。それ以外に、メタボロミクス解析を実施した。
対象者; 夜間頻尿・夜間多尿男性患者 50 名(平均年齢 65 歳)と同年齢・性別の正常対照者(夜間排尿回数 1 回以下)40 名(平均年齢 65 歳)であった。
結果; CE TOFMS、LC TOFMS による血中、尿中物質のメタボローム解析を行った。
難治性過活動膀胱患者の血中・尿中バイオマーカー候補の探索
対象者; 難治性過活動膀胱患者と同年齢・性別の正常対照者
対象遺伝子; 温度感受性 TRP チャンネル、Piezo1、VNUT および時計遺伝子
方法; 血中・尿中メラトニン、AVP、ANP、BNP の測定。それ以外に、メタボロミクス解析を実施した。
結果; 脂質系の複数個の候補物質が検出された。
対象者; 難治性過活動膀胱患者 26 名(平均年齢 67 歳)と同年齢・性別の正常対照者 32 名(平均年齢 65 歳)であった。
結果; 結果; CE TOFMS、LC TOFMS による血中物質のメタボローム解析を行った。血漿から少なくとも 6 種類、尿から少なくとも 3 種類の候補物質が検出された。
(2) In vivo 動物実験:
遺伝子改変動物の排尿行動; 排尿行動検査用代謝ケージ(既存)を用いた結果、ある特殊な Clock 変異マウスにおいて、夜間多尿・夜間頻尿を呈することが判明し、現在、疾患モデルマウスとして公開特許を取得し、論文投稿中である。
(3) In vitro 実験:
マウス、ラットの ex-vivo 膀胱上皮細胞培養系の作成と実験; 野生型マウスでは、各種時計遺伝子群の概日リズムは保存され、TRP チャンネル、Piezo1 などの機械センサー群、VNUT、コネキシン 26 などの ATP 産生機構の概日リズムも保存されていた。上記のある特殊な Clock 変異マウスにおいて、ex-vivo 膀胱上皮細胞は、各種時計遺

伝子群の日内変動が消失し、これと同期して TRP チャネル、Piezo1 などの機械センサー群、VNUT、コネキシン 26 などの ATP 産生機構の概日リズムも消失していた。

Ex-plant culture 法による in vitro 実験：ラット、マウス摘出組織を用いて、通常の explant culture 法によって初代培養細胞系を作成した。このマウス膀胱上皮培養細胞では、伸展などの刺激に対する細胞内カルシウムイオン濃度の変化、細胞外の ATP 放出量は、野生型では概日リズムが保存され、Clock 変異マウスでは消失していた。

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 16 件)

1. Honglan Piao, Yuan Chi, Xiling Zhang, Zhen Zhang, Kun Gao, Manabu Niimi, Manabu Kamiyama, Jinming Zhang, Masayuki Takeda and Jian Yao, Suramin inhibits antibody binding to cell surface antigens and disrupts complement-mediated mesangial cell lysis
Journal of Pharmacologic Sciences, 2016 (accepted).

2. Osamu N, Masaki Y, Masayuki T, Osamu Y, Yoji M, Masahiro M, Lars V: Tadalafil 1.5 mg once daily for the treatment of Asian men with lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia: analyses of data pooled from three randomized, double-blind, placebo-controlled studies, Int J Urol, 2015, 22:378-384. 査読有

3. Mitsuharu Y, Tsutomu M, Hiroshi N, Tatsuya M, Satoru K, Ryoji M, Takaaki S, Yasunori T, Makoto T, Masayuki T: Functional roles of TRPV1 and TRPV4 in control of lower urinary tract activity: dual analysis of behavior and reflex during the micturition cycle, Am J Physiol Renal Physiol 2015, 308: F1128-F1134. 査読有

4. Osamu Y, Yasuhiko I, Masayuki T, Takafumi Y, Masahiro M, Lars V: Tadalafil for lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia: a review of clinical data in Asian men and an update on the mechanism of action, Therapeutic Advances in Urology, 2015, 7:249-264. 査読有

5. Akira Y, Shiori K, Yoshiki I, Takashi O, Yoshiharu D, Atsushi O, Seiichiro O, Masayuki T, Isao A, Shizuo Y: Muscarinic Binding of the Novel Radioligand, [3H]

Imidafenacin in the Human Bladder and Prostatic Gland, J Pharmacol Sci, 124: 40-46, 2014. 査読有

6. Yamaguchi O, Marui H, Kakizaki H, Homma Y, Igawa Y, Takeda M, Nishizawa O, Gotoh M, Yoshida Y, Yokoyama O, Seki N, Ikeda Y, Ohkawa S: Phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study of the 3-adrenoceptor agonist, mirabegron 50 mg once-daily, in Japanese patients with overactive bladder, BJU Int, 113:951-960, 2014. 査読有

7. Masayuki T, Osamu Y, Sung WL, Masahiro M, Yoji M, Lars V: Tadalafil 5 mg once-daily therapy for men with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial performed in Japan and the Republic of Korea, Int J of Urol 2014;21:670-675. 査読有

8. Yuan C, Kun G, Hui Z, Masayuki T, Jian Y: Suppression of cell membrane permeability by suramin: involvement of its inhibitory actions on connexin 43 hemichannels, Brit J Pharmacol 171 3448-3462. 2014 査読有

9. Yuan C, Kun G, Kai L, Shotaro N, Satoru K, Masayuki T, Jian Y: Purinergic control of AMPK activation by ATP released through connexin 43 hemichannels - pivotal roles in hemichannel-mediated cell injury, J Cell Sci, 127, 1487-1499, 2014 査読有

10. Tatsuya M, Tsutomu M, Hiroshi N, Satoru K, Masaki W, Yasunori T, Yoshiro S, Schuichi K, Masayuki T, Makoto T: Functional Role for Piezo1 in Stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP Release in Urothelial Cell Cultures, J Biol Chem, 2014, 289, 23:16565-16575. 査読有

11. 山梨大学の腎移植報告-2012年-
神家満学, 秋山 大一郎, 井上 千尋, 大竹 裕子, 羽根田 破, 座光寺 秀典, 古屋 文彦, 深澤 瑞也, 武田 正之
山梨透析研究会会誌 32: 34-35, 2014 査読無

12. 山梨大学の腎移植報告 2-2012年-
秋山 大一郎, 神家満学, 古屋 文彦, 井上 千尋, 大竹 裕子, 羽根田 破, 座光寺 秀典, 深澤 瑞也, 武田 正之
山梨透析研究会会誌 32: 36-37, 2014 査読無

13. バイポーラプレミアムフォーセプスおよび IO 電極を使用したソフト凝固によるミニ

マム創 超短時間阻血併用無縫合腎部分切除術野村 照久, 萱沼 賢司, 鈴木 祥司, 武田 正之
日本ミニマム創泌尿器内視鏡外科学会雑誌 6(1): 71-78, 2014 査読無

14. 腹圧性尿失禁に対するミラベグロンの効果: 小林 英樹, 羽根田 破, 大竹 裕子, 吉良 聡, 井上 千尋, 土田 孝之, 荒木 勇雄, 武田 正之
日本女性骨盤底医学会誌 11(1): 106-109, 2014 査読無

15. Renal cell carcinoma treated with stereotactic radiotherapy with histological change confirmed on autopsy: a case report: Hiroshi O, Tomonori K, Hidenori Z, Takashi Y, Takafumi K, Kengo K, Masayuki A, Ryo S, Shinichi A, Yoshiyasu M, Licht T, Kan M, Iori W, Mitsuhiko O, Tsutomu A, Nobuyuki E, Masayuki T, Ryohei K BMC Research Notes 7:270, 2014 査読有

16. Transperitoneal laparoscopic ureterolithotomy for a large calculus in a two-year-old child: A case report Hidenori Z, Tatsuya M, Hideyasu I, Norifumi S, Masayuki T
Japanese Journal of Endourology 27(2) : 409-411 2014 査読無

[学会発表](計 18 件)

1. Organizing Committee : Masayuki T
The 9th of Pan-Pacific Continence Society Meeting, Taichung, Taiwan, 2014.9.12

2. State of Art Lecture III: Masayuki T
The 9th of Pan-Pacific Continence Society Meeting, Taichung, Taiwan, 2014.9.13

3. ICS Trustee: Masayuki T
44th Annual Meeting of the International Continence Society, Rio de Janeiro, Brazil 2014.10.20

4. Session 22(Podium Poster)- Mechanisms Underlying Pain and Cystitis: Masayuki T
44th Annual Meeting of the International Continence Society, Rio de Janeiro, Brazil 2014.10.22

5. Relationship between nocturnal bladder capacity and nocturia in BPH/OAB patients with alpha1-blocker and anticholinergic drug treatment; Post-hoc analysis of Addition study. Masaki Y, Masayuki T, Osamu N, Momokazu G, Satoru T, Naoya M
29th Annual EAU Congress, Stockholm, Sweden, 2014.4.14

6. Purinergic transmission via P2Y6 receptor plays an essential role in bladder storage function in mice
Satoru K, Mitsuharu Y, Tatsuya M, Hiroshi N, Tsutomu M, Eiji S, Schuichi K, Masayuki T
29th Annual EAU Congress, Stockholm, Sweden, 2014.4.13

7. Inhibition of Piezo1 in bladder urothelium: A potential therapy for overactive bladder
Tatsuya M, Hiroshi N, Tatsuya I, Satoru Kira, Tsutomu Mochizuki, Makoto Tominaga, Masayuki Takeda
29th Annual EAU Congress, Stockholm, Sweden, 2014.4.13

8. Should PSA mass screening be done in local area of Japan? 9 years consecutive survey for prostatic cancer screening and detection in Yamanashi, Japan
Manabu K, Takashi Y. Hiroaki M, Naoki I, Masayuki T
29th Annual EAU Congress, Stockholm, Sweden, 2014.4.14

9. Acid-sensing ion channels are involved in afferent excitatory transmission controlling reflex bladder activity in mice.
Mitsuharu Y, Hideki K, Isao A, Masayuki T
American Urological Association 2014 Annual Meeting, Orlando, USA, 2014.5.17

10. Protective Effect of Tadalafil in a Novel Rat Model of Chronic Penile Ischemia.
Norifumi S, Masanori N, Mona Z, Masayuki T, Karl-Erik A
American Urological Association 2014 Annual Meeting, Orlando, USA, 2014.5.18

11. Connexin 43 Sensitizes Prostate Cancer Cells to Thioredoxin Inhibitor PX12-Induced Apoptosis.
Gang L, Kun G, Jian Y, Norifumi S, Masasori K, Masayuki T
American Urological Association 2014 Annual Meeting, Orlando, USA, 2014.5.18

12. Change in the treatment from darbepoetin to continuous erythropoietin receptor activator in peritoneal dialysis patients in whom target hemoglobin levels cannot be achieved even at maximum doses of darbepoetin .
Mizuya F, Yuko O, Takashi Y, Manabu K, Hideki K, Masayuki T
51st ERA-EDTA2014, Amsterdam, The

Netherlands, 2014.6.1

13. Systemic Injection of A-317567, an Acid-Sensing Ion Channel Blocker Alleviates Bladder Hyperactivity Induced By Intravesical Acetic Acid Irritation In Decerebrate Unanesthetized Mice
Mitsuharu Y, Hideki K, Masayuki T
The 9th of Pan-Pacific Continence Society Meeting, Taichung, Taiwan, 2014.9.13

14. The Effects of 5alpha-Reductase Inhibitors in the Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia: Evaluation of the Last Five Years at Our Institute
Tadashi A, Hideki K, Yuko O, Satoru K, Takashi Y, Tatsuya M, Norifumi S, Manabu K, Shoji K, Hidenori Z, Takayuki T, Masayuki T
The 9th of Pan-Pacific Continence Society Meeting, Taichung, Taiwan, 2014.9.13

15. Retrospective Analysis of Efficacy and Tolerability of Once-Daily Oxybutynin Patch in Geriatric Patient with Nocturia
Tadashi A, Norifumi S, Nobuhiro T, Yuko O, Yuki I, Tatsuya I, Satoru K, Tatsuya M, Hideki K, Masayuki T
The 9th of Pan-Pacific Continence Society Meeting, Taichung, Taiwan, 2014.9.13

16. Efficacy and safety of tadalafil 5mg once daily in Asian males with lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia (BPH-LUTS): Integrated analysis from 3 asian double-blind, randomized, placebo-controlled clinical studies.
Masayuki T, Masahiro M, Yoji M, Lars V
44th Annual Meeting of the International Continence Society, Rio de Janeiro, Brazil
2014.10.23

17. Systemic administration of an acid-sensing ion channel blocker alleviates bladder hyperactivity induced by intravesical acetic acid irritation in mice.
Mitsuharu Y, Hideki K, Masayuki T
44th Annual Meeting of the International Continence Society, Rio de Janeiro, Brazil
2014.10.23

18. Lower urinary tract dysfunctions in patients with chronic methyl mercury poisoning.
Noboru H, Hisashi S, Masayuki T
44th Annual Meeting of the International Continence Society, Rio de Janeiro, Brazil

204.10.23

〔図書〕(計8件)

1. UAA Consensus on the Management of BPH/Male LUTS 1st Edition、Masayuki T
Urological Association of Asia, 1-136, 2014

2. 間質性膀胱炎 武田 正之
今日の治療指針 2014年版, 1048, 医学書院, 2014

3. 排尿障害治療薬 武田 正之
ポケット判 治療薬 UP-TO-DATE 2014, 606-620, メディカルレビュー社, 2014

4. 第2章 各論 低活動膀胱 小林 英樹, 武田 正之
プライマリ・ケア医のための LUTS 診療ハンドブック, 101-113, 中外医学社, 2014

5. 腎盂尿管移行部通過障害に対する腹腔鏡下腎盂形成術のガイドライン
武田 正之, 浅沼 宏, 岩村 正嗣, 座光寺 秀典, 宋 成浩, 永井 敦, 馬場 志郎
Japanese Journal of Endourology 泌尿器腹腔鏡手術ガイドライン 2014 年度版, 39-46, 日本泌尿器内視鏡学会, 2014

6. 薬剤性排尿障害及び鑑別と治療
武田 正之
神経因性膀胱ベッドサイドマニュアル, 69-91, 中外医学社, 2014

7. 間質性膀胱炎 interstitial cystitis (IC)
武田 正之
TODAY'S THERAPY 2014 今日の治療方針 私はこう治療している, 35-36, 医学書院, 2014

8. 泌尿器科 泌尿器腹腔鏡手術ガイドライン
武田 正之
技術認定取得者のための内視鏡外科診療ガイドライン 2014 年度版 日本内視鏡外科学会雑誌 特別号, 121-156, 一般社団法人 日本内視鏡外科学会, 2014

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称: 睡眠期頻尿乃至多尿モデル、及び評価対象薬剤の睡眠期頻尿乃至多尿治療効果の評価
発明者: 井原 達矢、武田 正之
権利者: 山梨大学
種類: 特許
番号: ST022-15P
出願年月日: 平成27年9月7日

国内外の別： 国内

【国際特許分類】 G 0 1 N 3 3 / 1 5
G 0 1 N 3 3 / 5 0
A 6 1 P 1 3 / 0 0

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

武田 正之 (TAKEDA, Masayuki)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号：80197318

(3)連携研究者

座光寺 秀典 (ZAKOJI, Hidenori)
山梨大学・総合研究部・准教授
研究者番号：60345717

澤田 智史 (SAWADA, Norifumi)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：70402055

宮本 達也 (MIYAMOTO, Tatsuya)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：80456459

井原 達矢 (IHARA, Tatsuya)
山梨大学・医学部附属病院・診療助教
研究者番号：90622407