

難治性膀胱機能障害の病態解明を目的とした ASIC の機能解析

名古屋市立大学大学院医学研究科 機能組織学

柴田 泰宏

1. 緒言

高齢者人口の増加が加速している昨今、頻尿や尿意切迫感といった下部尿路症状を呈する患者も同様に増加傾向にある。特に、尿意切迫感を伴う病態として、過活動膀胱（OAB：overactive bladder）と呼ばれる概念が広く知られるようになってきている。頻尿や尿意切迫感は QOL や社会的活動度を著しく低下させる。また、夜間頻尿と高齢者の寝たきり率や死亡率には相関関係が報告されている。このように、膀胱機能障害は健康長寿にとって解決しなければならない課題である。

切迫性の尿意は、尿意の発生機序から考えて理論上は排尿筋過活動（detrusor overactivity）による急な膀胱排尿筋の収縮の結果と、膀胱の知覚そのものの過敏とに分類できる。しかし、現在臨床応用されている薬物は、いずれも遠心性神経／排尿筋接合部が主たる治療標的であり、治療薬の作用機序も多様化してきてはいるが、万人に満足のいく効果をあげているとは言えないのが現状である。このため、尿意発生の根本の理解と、膀胱の求心性神経を治療標的とした薬剤の開発が求められている。

また、激しい膀胱痛を主訴とする原因不明の難治性疾患として間質性膀胱炎がある。患者はほんのわずかの蓄尿量の増加で激しい膀胱痛を生じ、これを避けるために頻回にトイレに行かざるを得ない。また、間質性膀胱炎の患者は膀胱内圧が上昇すると膀胱粘膜が裂けて激痛と共に出血を生じる。これまでに生検組織を用いた様々な組織学的検討がなされ報告されているが、その病態の解明には未だ至っていないのが現状である。膀胱壁の知覚過敏や局所の免疫、サイトカインの異常が根本にあることが示唆されているが、膀胱の機械刺激受容のメカニズムの詳細が未解明であることがこの疾患の理解を妨げていると考えられる。

これまでに様々な分子が膀胱において研究されてきたが、尿意の発生に直接的に関与する分子は未確定というのが一般的な見解である。その中で私たちは、機械刺激受容体候補遺伝子である ASIC（Acid Sensing Ion Channel）ファミリーを中心に解析を行ってきた。ASIC ファミリーは 2 回膜貫通型のイオンチャネルであり、線虫において機械刺激受容体として同定された degenerin の哺乳類相同遺伝子であることが報告されている¹⁾ ことから、哺乳類において機械刺激受容体候補遺伝子と考えられている。これらを詳細に検討することにより、膀胱における

尿意発生のメカニズムを解明すると共に、膀胱の感覚入力そのものを標的とした新しい機序の過活動膀胱、間質性膀胱炎の治療薬開発のヒントとなる知見を得ることを目的とした。

2.方法

本研究においては、酸感受性イオンチャンネル (ASIC) 遺伝子ファミリーのサブユニットがマウスの膀胱で機械刺激受容機能に関与している可能性を包括的に探るため、遺伝子改変動物を用いて形態学および機能的解析を行った。

2-1) ASIC の局在の検討

現在当教室では ASIC4- β ガラクトシダーゼレポーターマウスが利用可能であり、また、ASIC4 ノックインマウスを作出しつつある段階であったため、これらを材料として膀胱組織内の ASIC4 の局在を詳細に検討した。対照群として野生型マウスを使用した。

2-2) 二電極膜電位固定方を用いた ASIC4 の電気生理学的解析

膀胱における ASIC4 の発現、局在、共局在する分子の検討などと平行して、ASIC4 の電気生理学的特徴についての検討を行う。具体的には、ASIC4 と MET チャンネルとの間に共通の性質があるか検討を行うため、MET チャンネルの阻害薬の1つであるガドリニウムイオンへの応答を確認するとともに、機械刺激の1つであるずり応力に対する反応を確認する。電気生理学的解析の材料として、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を利用する。また、パッチクランプ手技を用い、ASIC4 の *in vivo* における機能について検討を行った。

3.結果

3-1) 膀胱における ASIC4 蛋白質の分布

まず、 β ガラクトシダーゼを利用したレポーターマウスにより、ASIC4 を発現する細胞のスクリーニングを行った。ゲノム上で ASIC4 遺伝子をコードしている部分にスプライシングアクセプターおよびその下流領域にベータガラクトシダーゼを挿入した配列をノックインすることで、ASIC4 を発現している細胞で特異的にベータガラクトシダーゼを発現するマウスを作出した。このマウスを用いて内耳の薄切切片を作製し、X-gal にて発色を行うことで ASIC4 を発現する細胞を青色に標識した。その結果、膀胱筋層に ASIC4 陽性細胞を確認した。興味深いことに、生直後と比較して成獣、老齢となるにしたがって徐々に ASIC4 陽性細胞密度が低下する傾向が見られたことから、老化にともなう膀胱機能の低下に ASIC4 陽性細胞の減少が関与している可能性が示唆された。

3-2) ASIC4-tag ノックインマウスの作出

これまで、免疫組織化学に使用できる抗 ASIC4 抗体の作製を試みたが、良質の抗体は得られなかった。また、市販抗体も全て試したが、どれも満足のいく感度、特異度を示さなかった。このため、ASIC4 の正確な細胞内局在を明らかにするために ノックインマウスを作出した。得られたノックインマウスのタグの機能を確認するため western blotting 法を用いて抗体への反

応性を確認したところ、抗 AU1 タグ抗体にて野生型と明確な差を認め、ノックインタグが機能している事が確認された。

3-3) 二電極膜電位固定方およびパッチクランプを用いた ASIC4 の電気生理学的解析

まずアフリカツメガエル卵母細胞系を用いて ASIC4 の機械刺激への感受性を検討した。低浸透圧刺激は細胞を膨張させ細胞膜に張力を発生させることから、低浸透圧刺激を機械刺激の代替として用いた。低浸透圧刺激としてスクロース浸透圧調整バッファーを使用した。また、ASIC4 による流入電流は亜鉛により阻害されることから、亜鉛感受性成分のみを ASIC4 特異的な電流として算出した。

ASIC4 の定常流入電流は、等張圧バッファーと比較して、スクロース調整低浸透圧刺激を加えた場合に増加した。この結果から、ASIC4 は機械刺激によって流入電流が増大する性質を持つことが示された。

発現系での電気生理学的特徴が *in vivo* で同様の特性を示すかどうかを、ASIC4 を発現していることが確認されている感覚細胞を用いて確認を行った。材料として外有毛細胞を選択してパッチクランプを行い、野生型マウスとノックアウトマウスで酸感受性に差があるかどうかを検討したところ、transient current 成分は両者において確認されたが、sustained current 成分が減少していることが確認された。ASIC4 は発現系において他の ASIC との共発現させた場合に Sustained current 成分を生じさせることが当教室の実験で示されていることから、*in vivo* においても ASIC4 は細胞膜に発現して持続流入電流を生じさせている可能性が示唆された。今後膀胱平滑筋に発現している ASIC4 においてもパッチクランプを用いて酸感受性があるかどうか、それが ASIC を介するものであるかどうかなど、さらなる解析を行う予定である。

4.考察

本研究のターゲットである酸感受性イオンチャネル ASIC は、線虫の機械刺激受容体の哺乳類相同遺伝子として同定された。これまでに ASIC はその名の通り酸、すなわち低 pH に応答して一過性の流入電流を発生させるとされてきた。感覚神経に発現し、心筋梗塞の際のアシドーシスによる痛みを受容する可能性などの機能が示唆されている。これに対して、ASIC4 は鋭い一過性の流入電流の代わりに、持続型の流入電流を発生させる。このため同受容体ファミリー内において機能解析が他のファミリーと比較してほとんどされていないという経緯がある。

当教室では、ASIC4 が有毛細胞などの感覚神経細胞に発現していることを考え合わせると、このチャンネルが膀胱壁筋層に発現していることは、なんらかの機械刺激や pH 変化などの感覚受容に関連していると推察される。さらに、感覚神経細胞への pH 刺激が sustained current を発生させたことから、細胞膜上に ASIC4 が発現し、低 pH 刺激による細胞膜の電氣的応答変化に ASIC4 がなんらかの機能を果たしていると考えられた。

残念ながら、ASIC4 ノックインマウスのタグ抗体染色性は免疫組織化学染色の感度を劇的に向上させることが無かったことから、2重染色による膀胱壁内の ASIC4 陽性細胞のプロパテ

イの探求は現在難航中である。今後さらなる条件検討により、膀胱における機能の解析を進めていく必要がある。

5.結語

ASIC4 は常時活性型のイオンチャネルであり、膀胱壁筋層に発現することが確認された。また、ASIC4 は *in vivo* の感覚神経上において発現系と同じ特徴をもつ電気生理学的機能が観察された。これらのことから、ASIC4 は機械刺激受容分子の1つとして機能している可能性が示唆された。今後、ASIC4 を発現している筋層間細胞の詳細なプロパティを明らかにすることで、膀胱機能における ASIC ファミリーの役割と、膀胱機能における意義を解明したい。

6.文献

1) R Waldmann, G Champigny, N Voilley, I Lauritzen, M Lazdunski 'The Mammalian Degenerin MDEG, an Amiloride-Sensitive Cation Channel Activated by Mutations Causing Neurodegeneration in *Caenorhabditis Elegans*' *J Biol Chem.* 1996 May 3;271(18):10433-6.