

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500487

研究課題名（和文）メカニカルストレスに対する生体応答時の交感神経系の役割

研究課題名（英文）The role of the sympathetic nervous system in physiological response to mechanical stress

研究代表者

浅田 啓嗣（ASADA KEIJI）

鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・講師

研究者番号：10440851

研究成果の概要（和文）：本研究は共培養システムを用いて骨と神経との生理的な相互作用の解明を目的に施行した。マウス骨芽細胞のメカニカルストレス（MS）により、骨芽細胞から神経細胞へ直接的に求心性情報が伝達されることが明らかになった。形態的に神経軸索から突起が伸び骨芽細胞の細胞膜へ接着していることが観察され、求心性伝達を遂行するシナプス様の構造が示唆された。この伝達は加齢により変化し、サテライト細胞により調節されていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of the present study was to investigate the sensory mechanism from osteoblasts to sensory neurons in co-culture system using MS of osteoblasts. The result indicated that MS of the osteoblast elicited afferent P2X receptor-mediated purinergic transmission to sensory neurons in all stages of a mouse development. Ultrastructural observation of the contact between the neurite and the osteoblast supported this finding. This afferent transmission varied with aging. Satellite cells may have protective actions on sensory neurons and could modulate this transmission.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：細胞・メカニカルストレス・神経・カルシウムイオン・伝達

1. 研究開始当初の背景

頸部痛や腰痛などの運動器疾患は、最も多くの国民が感じている痛みの症状であり、一時的な急性疼痛にとどまらず慢性疼痛を呈しやすい疾患である。慢性痛は生物学的（物理的、構造的）損傷だけでは説明がつかず、心理的・社会的要因が症状の発症・維持・悪化に関与している多様な臨床症候群として

捉えられている。すなわち、痛み体験は侵害受容器からの入力だけでなく、情動体験も伴い、視床下部の影響下にある自律神経と密接な関係にあるといえる。

運動器疾患に対する理学療法は、一般的に骨関節へのメカニカルストレス（MS）をどのように調節して進めていくかが鍵となる。加齢に伴う組織の変性は過剰な MS が主な原因

であり、侵害性のストレスでなくとも繰り返して加わることが変性を助長させる。しかし、宇宙では身体に重力負荷がかからず筋や骨の運動器は非常に脆弱となることが知られており、運動器の機能維持には適切な MS が必要である。

理学療法における徒手治療は、骨関節の位置異常の修正を行なう一種の MS を与える治療法である。徒手治療は交感神経系に作用し、疼痛を軽減させると考えられてきた (Vincenzino et al. Manual Therapy, 1998.)。しかし臨床研究では作用機序の解明は困難である。

2. 研究の目的

骨芽細胞と神経細胞との細胞間の生理的な相互作用を解明することによって、骨関節の MS が交感神経系に及ぼす影響を明らかにする。さらに、臨床応用へと発展させ、疼痛に関連した交感神経症状を改善する治療的対応基盤の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞の MS による神経への求心性反応

①細胞培養

新生仔マウス (0-5 日齢)、若年マウス (14-18 日齢) および成熟マウス (2-3 ヶ月齢) の胸腰椎より後根神経節を採取し、酵素処理にて神経細胞を単離した。骨芽細胞は仔マウス頭蓋冠より酵素処理にて細胞を単離した。ガラス底培養皿に神経細胞を培養し 24 時間後に骨芽細胞を加え共培養とした。共培養開始 24 時間後の細胞を実験に用いた。

②カルシウムイメージング

共培養細胞に蛍光カルシウム指示薬 Flou-3AM を負荷した後、骨芽細胞に対し MS を加えたときの細胞内カルシウム濃度変化を蛍光顕微鏡下で観察して細胞間相互作用を検証した。MS としてガラスマイクロピペットを単一の骨芽細胞に押し付けて直接物理的に刺激した。実験中は摂氏 35 度に維持した HEPES 緩衝液を 2ml/分で灌流した。

(2) 骨芽細胞と神経細胞間の形態的分析

ガラスチャンバースライドに骨芽細胞と神経細胞を共培養し、カルシウムイメージングにて反応が確認できた細胞を試料に用いた。グルタルアルデヒド溶液で前固定、1% 四酸化オスミウム液で後固定ののち脱水し、エポック 812 樹脂に包埋した後、超薄切片を作製し、H-7650 透過型電子顕微鏡で形態的分析した。

(3) 求心性反応のメカニズムの解明

①骨芽細胞のカルシウムチャンネルの同定

骨芽細胞から神経細胞への求心性反応のメカニズムを明らかにするため、MS による骨芽細胞の反応について伸展活性化 (または機械受容) カルシウムチャンネルブロッカー (ガドリニウム) を用いて検証した。骨芽細胞を 2 回刺激し、2 回目の刺激に先立ち灌流液にブロッカーを投与した。1 回目の反応を 100% としたときの 2 回目の反応の割合を比較した。

②ATP 伝達阻害剤による検証

骨芽細胞から神経への求心性反応に対する ATP の関与を調べるために、ATP 伝達阻害剤を用いて検証した。伝達に関与する受容体を調べるために非選択的 P2 受容体阻害剤であるスラミン、さらに選択的 P2X 阻害剤 PPADS を用いて①と同様に実験した。また ATP 分解酵素 Apyrase の効果についても検証した。

(4) 発達段階における後根神経節細胞の形態および反応の変化

①サテライト細胞の同定と混在率の変化

神経の培養に混在する神経以外の細胞がサテライト細胞であることを免疫細胞染色により確認した。細胞を 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で 10 分固定、Triton 処理ののち 10% ヤギ血清 PBS 溶液で 30 分間ブロッキングした。1 次抗体として抗 GFAP 抗体、抗ニューロフィラメント抗体を使用した。

また実験視野におけるサテライト細胞数を神経細胞体数に対する混在細胞数を求め、各発達段階で比較した。

②各発達段階における求心性反応の変化

骨芽細胞の MS に対する神経の求心性反応の正常反応の出現率を各発達段階で比較した。

(5) サテライト細胞の役割の検証

①サテライト細胞除去による解析

神経細胞と共存しているサテライト細胞を除去するため、ノンコート皿に 3 時間培養し、神経細胞とサテライト細胞の接着性の違いを利用して両細胞を分離した。その後、骨芽細胞と共培養して実験 (1) と同様に解析を行った。

②GABA_A 受容体阻害剤による検証

新生マウスの神経細胞と骨芽細胞を共培養した細胞を用いて、GABA_A 受容体阻害剤ピククリンの効果を検証した。骨芽細胞を 2 回刺激し、2 回目の刺激に先立ち灌流液に阻害剤を投与した。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞と知覚神経系細胞との相互作用

骨芽細胞を刺激すると、直後に刺激された骨芽細胞内のカルシウム濃度の上昇が見られた。ついでこの骨芽細胞に軸索を伸ばしている神経軸索のカルシウム濃度の上昇反応が観察され、骨芽-神経間に求心性の反応が起こることを認めた (図1)。

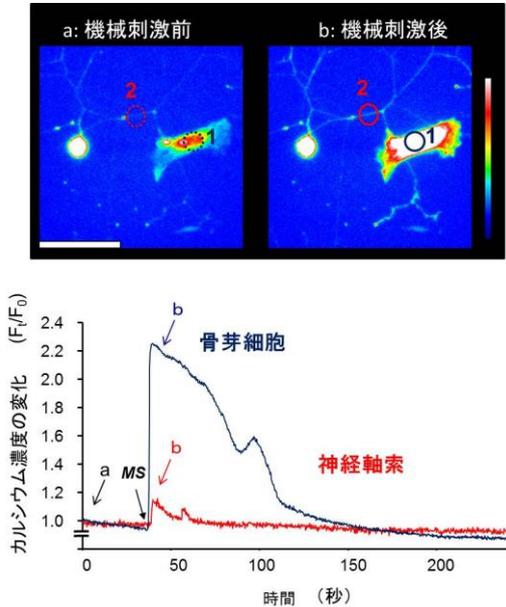


図1. 骨芽細胞の機械的的刺激による神経細胞のカルシウム濃度の経時的変化

(2) 骨芽細胞と神経細胞間の形態的分析
生理実験にて求心性反応がみられた細胞を電子顕微鏡にて観察した結果、神経軸索から突起がのび骨芽細胞の細胞膜へ接着していることが観察された (図2)。求心性伝達を遂行するシナプス様の構造が示唆された。

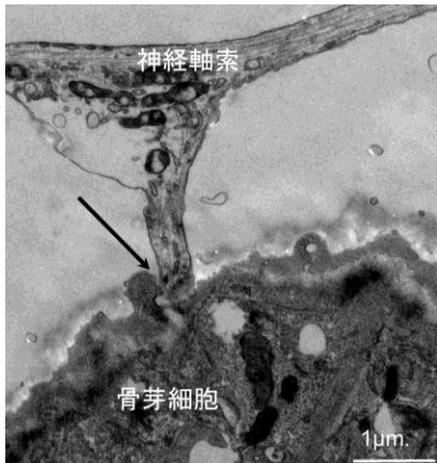


図2. 骨芽細胞と神経軸索の接着

(3) 求心性反応のメカニズムの解明
①骨芽細胞のカルシウムチャネルの同定
伸展活性化 (または機械受容) カルシウム

チャンネルブロッカー存在下では何も投与しない時に比べ骨芽細胞の反応は有意に減少した (図3)。この結果からMSに対する骨芽細胞の反応には伸展活性化または機械受容カルシウムチャンネルが関与していることが示唆された。

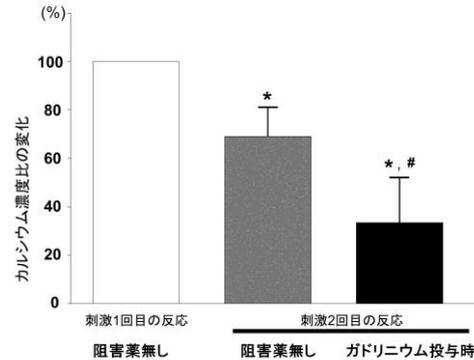


図3. 機械的的刺激を加えた骨芽細胞の反応に対するカルシウムチャンネルブロッカーの効果

②ATP 伝達阻害剤による検証

非選択的 P2 受容体阻害剤であるスラミン、選択的 P2X 阻害剤 PPADS いずれの場合においても神経の反応のみが消失した (図4)。ATP 分解酵素アピラーゼの投与によっても神経軸索の反応のみが消失した。以上の結果から骨芽細胞から神経細胞への求心性情報伝達に ATP が関与していることが示唆された (図4)。

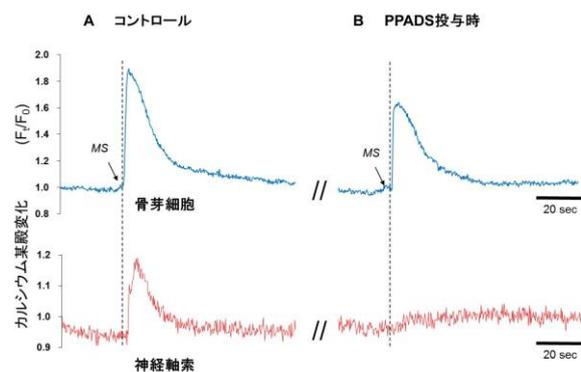


図4. 細胞の反応に対する P2X 阻害剤 PPADS の効果

(4) 発達段階における神経細胞の形態および反応の変化

①サテライト細胞の同定と混在率の変化

神経細胞に混在する細胞は免疫細胞染色により GFAP 陽性 であることからサテライト細胞と判定した。このサテライト細胞の

混在率は新生マウス、若年マウス、成熟マウスと発達段階が進むにつれて有意に減少していた (図5)。

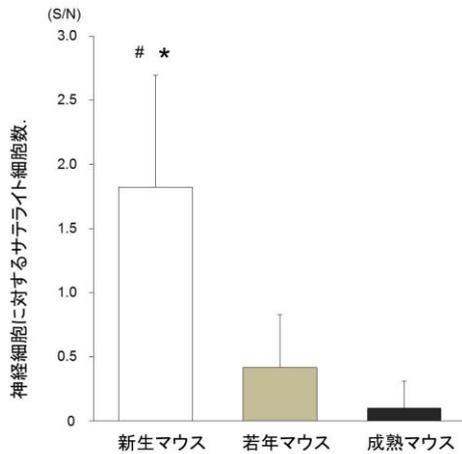


図5. 各発達段階によるサテライト混在率

②各発達段階における求心性反応の変化

骨芽細胞のMSに対して神経が単一の反応を示す正常反応の出現率を各発達段階で比較すると、成長に伴い減少傾向を示した (図6)。

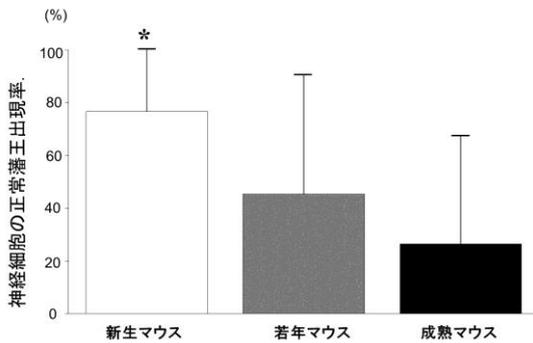


図6. 各発達段階における神経細胞の正常反応率

(5) サテライト細胞の役割

①サテライト細胞除去による解析

新生マウスの神経細胞ではサテライト細胞を除去すると、カルシウム濃度上昇が大きくなりなおかつ繰り返しおこる (Phasic-type) 異常反応が全視野の40%以上の視野に観察された。持続的なカルシウム濃度上昇反応を示す Tonic type の異常反応も20%生じた。異常反応がほとんど見られなかった新生マウスにおいて、サテライト細胞除去により両タイプ合わせて60%以上の視野に異常反応がみられた (図7)。

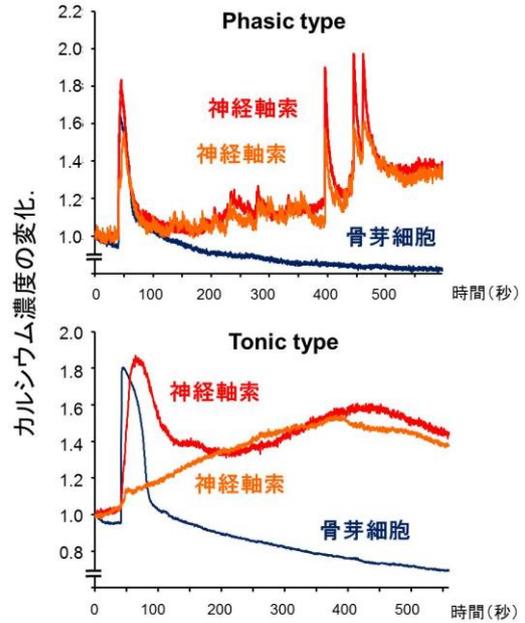


図7. サテライト細胞除去後にみられる神経細胞の異常反応

②GABA_A受容体阻害剤による検証

幼若マウス神経細胞の求心性反応は、GABA_A受容体阻害剤であるビククリン投与により正常反応出現率が低下した。幼若マウス神経細胞に混在するサテライト細胞はGABA_A受容体を介してこの求心性情報伝達における保護作用を有していることが示唆された。

これらの結果から、骨芽細胞の機械的刺激により、骨芽細胞から神経細胞へ直接的に求心性情報が伝達されることが明らかになった。そして、この伝達は加齢により変化し、サテライト細胞により調節されていることが示唆された。これらの結果は加齢に伴う神経系の機能低下がメカニカルストレスの受容に影響を与え、骨形成能力や疼痛閾値に変化を与えている可能性が考えられ、理学療法介入における基盤となりうる成果である。

今後は効果的な理学療法介入の確立に向け、本研究において着手できなかった骨以外の関節構成細胞および*in vivo*での検討をさらに進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)

浅田啓嗣: 高齢者の姿勢異常に対する評価と理学療法—メカニカルストレスの適正化—。理学療法兵庫. 2013 (in press).

Takeshita D, Obata K (6番目), Takak M (9番目), 他6名: A new calpain inhibitor protects left ventricular dysfunction induced by mild ischemia-reperfusion in *in situ* rat hearts. J

Physiol Sci 63.113-123, 2013. (査読有)
Doi: 10.1007/s12576-012-0243-6.

Mitsuyama S, Obata K (3番目), Takaki M (5番目), 他2名: Left ventricular mechanical and energetic changes in long-term isoproterenol-induced hypertrophied. J Mol Cell Cardiol. 59, 95-106. 2013. (査読有)
Doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.02.012.

Goto K, Obata K (5番目), Takaki M (10番目), 他7名: In vivo imaging of enteric neurogenesis in the deep tissue of mouse small intestine. hearts of SERCA2a transgenic rats. PLoS ONE, 8,e54814. 2013. (査読有)
Doi: 10.1371/journal.pone.0054814.

Kawahara I, Obata K (5番目), Takaki M (8番目), 他5名: Comparison of effects of a selective 5-HT reuptake inhibitor versus a 5-HT4 receptor agonist on in vivo neurogenesis at the rectal anastomosis in rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 302, 588-597. 2012. (査読有) Doi: 10.1152/ajpgi.00284.2011.

Zhang GX, Obata K (2番目), Takaki M (11番目), 他8名: Evaluation of left ventricular mechanical work and energetics of normal hearts in SERCA2a transgenic rats. J Physiol Sci 62, 221-231.2012. (査読有)
DOI: 10.1007/s12576-012-0200-4.

Hattori H, Obata K (7番目), Takaki M (10番目), 他7名: NHE-1 blockade reversed changes in calcium transient in myocardial slices from isoproterenol-induced hypertrophied rat left ventricle. Biochem Biophys Res Commun 419, 431-435. 2012. (査読有)
Doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.041.

Asada K, Obata K, Horiguchi K, Takaki M: Age-related changes in afferent responses in sensory neurons to mechanical stimulation of osteoblasts in coculture system. Am J Physiol Cell Physiol. 302, 757-765. 2012. (査読有)
Doi:10.1152/ajpcell.00362.2011.

Shibata M, Obata K (3番目), Takaki M (7番目), 他4名: NHE-1 participates in isoproterenol-induced down-regulation of SERCA2a and development of cardiac remodeling in rat hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 301, 2154-2160. 2011. (査読有)
Doi:10.1152/ajpheart.00483.2011.

浅田啓嗣, 川村和之: 姿勢の評価と治療～メカニカルストレスに対する反応の視点から～. 奈良理学療法4, 8-12. 2012.

Takaki M, Misawa H, Matsuyoshi H, Kawahara I, Goto K, Zhang GX, Obata K, Kuniyasu H: In vitro enhanced differentiation of neural networks in ES gut-like organ from mouse ES cells by a 5-HT4-receptor activation. Biochem Biophys Res Commun. 406, 529-533.2011. (査読有)
Doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.072.

Yoshikawa Y, Obata K (3番目), Asada K (5

番目), Takaki M (7番目), 他3名: A cardioprotective agent of a novel calpain inhibitor, SNJ-1945 exerts beta1-actions on left ventricular mechanical work and energetics. Am J Physiol Heart Physiol. 299, 396-401. 2010. (査読有) Doi: 10.1152/ajpheart.00153.2010.

[学会発表] (計16件)
浅田啓嗣, 小泉宗久, 小畑孝二, 高木 都, 田中康仁: Interaction between osteoblast and neurons in co-culture system. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会. 2013年10月17日～18日. 千葉. (発表確定)

Asada Keiji (1番目), Kotoura Terumasa, 他5名: Compensatory lumbopelvic rotation during hip external rotation in individuals with and without low back pain. The 6th Asia Western Pacific Region of World Confederation for Physical Therapy. 2013年09月07日～08日. Taichung (Taiwan). (発表確定)

Kawamura Kazuyuki, Asada Keiji (2番目), 他3名: Gender differences on the thickness of deep trunk muscles using ultrasonography in upright standing. The 6th Asia Western Pacific Region of World Confederation for Physical Therapy. 2013年09月07日～08日. Taichung (Taiwan). (発表確定)

浅田啓嗣, 川村和之, 前原由紀, 尾崎圭吾, 鈴木正人, 松田実友貴: 膝関節屈曲位および伸展位における膝蓋骨位置測定方法の検討. 第47回日本理学療法学会大会. 2012年05月25日～27日. 神戸.

小畑孝二, 竹下大輔, 高木 都: SERCA2a 過剰発現心臓の力学的エネルギー学的性質について. 第22回日本病態生理学会. 2012年08月03日～05日. 大分.

川原 勲, 國安弘基, 後藤 桂, 小畑孝二, 藤井久男, 高木 都: 選択的セロトニン再取り込み阻害薬とセロトニン受容体作動薬が腸壁内神経損傷後の in vivo 神経再建に与える効果の比較. 第5回J-FD研究会. 2012年11月10日. 東京.

Obata K, Takeshita D, Mitsuyama S, Abe C, Morita H, Takaki M: Positive and negative inotropic effects of left ventricular mechanical work and energetics in hypothermic and hyperthermic rat hearts. 第90回日本生理学会大会. 2013年03月28日. 東京.

Asada K, Itoh H, Kawamura K, 他2名: A comparison of lumbar spinal position sense in standing and four-point kneeling in healthy

subjects. The International Federation of Orthopaedic Manipulative Physical Therapists 2012 Conference , 2012 年 10 月 01 日～05 日 Quebec (Canada).

Takaki M, 他 4 名; In vivo neural regeneration and neurogenesis promoted by 5-HT4 receptor activation. Neurogastroenterology and Motility 2012 Joint International Bologna Meeting. 2012 年 09 月 06 日～08 日. Bologna (Italy).

Asada K, Obata K, Horiguchi K, Takaki M: The role of satellite cells in afferent responses in sensory neurons to mechanical stimulation of osteoblasts in co-culture system. 第 89 回日本生理学会大会. 2012 年 3 月 30 日. 松本.

浅田啓嗣: 姿勢の評価と治療～メカニカルストレスに対する反応の視点から～姿勢の評価と治療～メカニカルストレスに対する反応の視点から～. 第 21 回奈良学会 (招待講演). 2011 年 6 月 26 日. 生駒郡.

Takaki M : ES gut-like organ. An annual meeting of The Korean Society of Smooth Muscle Research (招待講演). 2011 年 6 月 18 日. Seoul (Korea) .

Asada K, Obata K, Aoki K, Zhang GX, Matsuyoshi H, Takaki M: Comparison of afferent responses from osteoblasts to sensory neurons in neonatal, juvenile, and adult mice in co-culture system. 第 88 回日本生理学会大会. 2011 年 3 月 30 日. 横浜.

浅田啓嗣, 小畑孝二, 青木久美子, 張 国興, 松吉ひろ子, 高木 都: 骨芽細胞から知覚神経への求心性経路におけるサテライト細胞の役割. 第 38 回自律神経生理研究会. 2010 年 12 月 4 日. 東京.

浅田啓嗣, 小畑孝二, 青木久美子, 張 国興, 松吉ひろ子, 高木 都: 骨芽細胞から知覚神経への求心性経路における ATP の関与を共培養実験系により解析する. 第 63 回自律神経学会総会. 2010 年 10 月 23 日. 横浜.

Asada K, Obata K, Aoki K, Zhang GX, Matsuyoshi H, Takaki M: Afferent pathways from osteoblasts to sensory neurons activated by mechanical stimulation in co-culture system. 第 87 回日本生理学会大会. 2010 年 5 月 19 日. 盛岡.

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅田 啓嗣 (ASADA KEIJI)

鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・講師
研究者番号：10440851

(2)研究分担者

高木 都 (TAKAKI MIYAKO)

奈良県立医科大学・医学部・特任教授
研究者番号：00033358

小畑 孝二 (OBATA KOJI)

岐阜大学・医学系研究科・助教
研究者番号：40378229