

令和元年6月26日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10635

研究課題名(和文) 排尿筋層に存在する間質細胞の超微形態三次元再構築法による機能解析

研究課題名(英文) The function and relationship between interstitial cells in the detrusor bundle and smooth muscle cells

研究代表者

林 篤正 (Tokumasa, Hayashi)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：20341357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：排尿筋は主に自律神経の作用により尿を排出する時に収縮し、蓄尿する時に弛緩している。近年、神経以外にも排尿筋の収縮を調節する機能が発見されている。我々は排尿筋束内に存在する間質細胞は自身にKチャネルを豊富に発現していることを見出し、その存在部位の特徴から周辺の排尿筋細胞の収縮を抑制すると想像したが、しかしその間質細胞を興奮させても周囲の排尿筋細胞に抑制性変化は伝えられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会に伴い、排尿障害(過活動膀胱、低活動膀胱)の罹患率も増え社会問題化している。現在これらの疾患に対する薬物療法としては自律神経作動薬のみで、効果が薄い患者群もいるため神経作動薬以外の創薬が期待されている。

我々は膀胱壁内の間質細胞で筋束内に存在する間質細胞の機能に注目した。この細胞は自身の興奮を抑えるKチャネルを豊富に発現していることを免疫染色により発見した。これらの間質細胞の興奮が周辺の間質細胞の収縮抑制をするかをカルシウムイメージで観察するもその興奮伝達は観察されなかった。

研究成果の概要(英文)：Localisation of cells expressing small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} (SK3) channels in the urinary bladder was investigated, while putative roles of SK3 (+) cells in suppressing detrusor smooth muscle (DSM) spontaneous activity were explored. SK3 (+) cells co-expressing PDGFR or vimentin were distributed in DSM bundles but not inter-bundle spaces or lamina propria. P2Y1 agonist (SK3 channel opener) caused a transient contraction in DSM. P2Y1 agonist increased the Ca^{2+} level suppressing spontaneous Ca^{2+} transients in neighboring DSM cells. Preferential localisation of SK3 positive cells in DSM bundles appears to indicate their functional interaction with DSM cells. However, increases in Ca^{2+} level of cells upon purinergic stimulation are not associated with the inhibition of Ca^{2+} or contractile activity in DSM cells. Thus, it is unlikely that the SK3-dependent hyperpolarisation generated in SK3 expressing PDGFR (+) cells is transmitted to DSMs to suppress their excitability.

研究分野：排尿障害

キーワード：排尿筋 間質細胞 SK3 免疫染色化学法 カルシウムイメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化管に存在するカハール間質細胞は、壁内神経と平滑筋との介在を行い、蠕動のペースメーカーを担うが、尿路にもその抗原性(c-kit)や電子顕微鏡所見からカハール間質細胞の存在が示唆されている。最近膀胱壁内のカハール間質細胞と類似する間質細胞が膀胱の自発収縮、また下部尿路閉塞(Bladder Outlet Obstruction: BOO)に伴う過活動膀胱(over active bladder: 以下 OAB)に関与していると報告された(Kubota et al 2012)。

予備実験から膀胱壁内の間質細胞はその分布位置により形態、サブタイプが異なり、それぞれに特異な機能があることが推測された。その中で筋束内に存在する間質細胞について周辺の排尿筋細胞との関係性を明らかにすることで、過活動膀胱への病態生理の解明になるものと期待した。

2. 研究の目的

本研究は、排尿機能調節に抑制的介在が示唆されている膀胱排尿筋層に分布する間質細胞について、形態学的側面からそれらの機能および病態について明らかにすることを目的とする。膀胱平滑筋の運動調節に関わる細胞間シグナル伝達機序の理解のために、細胞間連結様式、電気生理学的特徴を司るイオンチャネルの分布様式、生理活性物質への反応の基盤となる受容体の分布様式を、膀胱排尿筋層に存在する間質細胞を中心に光学顕微鏡および電子顕微鏡レベルの純形態観察、免疫組織化学、さらに次世代走査型電顕(FIB/SEM)による超微形態三次元再構築法により詳細に解析する。これにより過活動膀胱等における排尿機能障害の病態生理に迫り、診断・治療に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

(1)「免疫組織化学的解析」

動物(モルモット)はZanboni液にて還流固定を行い、膀胱のlayer面の方向で50 μ mの比較的厚い切片を作成し、whole mount法にて免疫染色法を行う。排尿筋層内間質細胞については抗PDGFR抗体、抗SK3抗体、抗vimentin抗体を用いて蛍光染色を行う。平滑筋は抗SMA抗体で標識する。2重、3重蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡(Olympus FV-1000)で連続切片として観察し評価する。この結果から筋束内間質細胞の分布様式、極性について光顕レベルで検討する。

(2)「ストラクチャー解析」

動物(モルモット)は当研究機関でストラクチャー解析用に新規開発した導電性樹脂に包埋し、排尿筋層に標準を合わせ、光顕レベルで観察された所見をヒントに倍率、切削方向を決定する。その後FIB/SEM(Quanta3G FEG, FEI co,)による3次元再構築を行う。

(3)「等尺性収縮実験」

動物(モルモット)の膀胱壁の筋層のみ標本を等尺性トランスデューサーに牽引し、その自発収縮の強度、頻度を計測する。間質細胞と平滑筋の機能関連性を見るために予備実験で観察された筋束内間質細胞に強発現するSK3の開口薬であるMRS2365(a P2Y₁ purinoceptor agonist)を灌流し、その収縮の変化を観察する。

(4)「カルシウムイメージング」

動物(マウス: PDGFR-GFPマウス)の膀胱平滑筋束の標本を作成し、Calbrite590 AMを用い

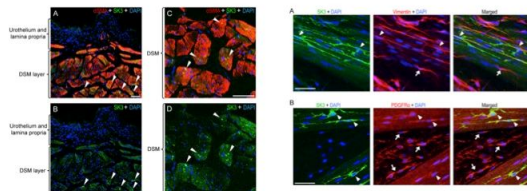
たカルシウムイメージングを行った。あらかじめの予備実験で筋束内に存在する間質細胞は PDGFR を発現しており、PDGFR-GFP マウスを用いることで、GFP 陽性の筋束内間質細胞を視覚的に同定可能となった。この標本に MRS2365 (a P2Y₁ purinoceptor agonist) を灌流し GFP 陽性の筋束内間質細胞の細胞内カルシウム上昇が、周辺の平滑筋細胞 (周期的にカルシウムオシレーションしている) に対して影響するかを観察する。

4. 研究成果

(1) 「免疫組織化学的解析」

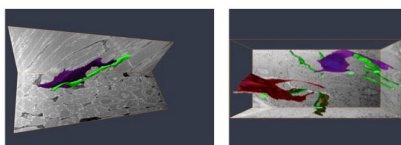
今回の抗 SK3 抗体を用いた実験を中心に、実験は薄切切片と筋層の比較的厚い (50 μm) の切片を用いて染色し観察した。

SK3 は排尿筋層のみに特異的に発現し、特に筋束内に特異的に強発現していることがわかった。筋層自体も弱く発現していた。他の上皮層、筋束周辺には存在していなかった。これらは PDGFR や vimentin と共存しており、内部に核を持つことから間質細胞の一つであることが示唆された。この細胞は扁平であり、多数の突起構造を持つ細胞でお互いにその突起構造で接続していた。免疫染色からはその周囲の平滑筋細胞との位置関係は詳細には不明であった。



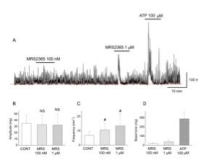
(2) 「ストラクチャー解析」

FIB/SEM 法を用いて、筋束内に存在する間質細胞について超微細構造解析を行った。筋束内の間質細胞を中心に 2000 倍の倍率で観察、約 1000 枚の連続切片を撮影し、目的の細胞をについて三次元再構築を行った。この細胞は扁平な構造で、筋層内に挟まるように存在、その周辺に神経線維が存在し細胞表面を並走していた。



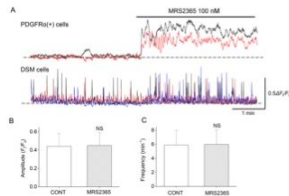
(3) 「等尺性収縮実験」

モルモット平滑筋筋束は周期的な自発収縮が観察された。SK3 は P2Y₁ 受容体を介して開口し、細胞自体は過分極し周囲の平滑筋にもその過分極電位に影響を示唆する報告がある。開口薬である MRS2365 を灌流すると予想とは逆に収縮頻度の増加、また収縮強度は変化せずに基礎収縮 (basal tone) の増強が観察された。その効果は濃度依存性であった。ATP 自体の投与でも同様の結果であった。



「カルシウムイメージング」

PDGFR - GFP マウスの膀胱筋束標本を作成した。免疫染色実験で SK3 陽性間質細胞は PDGFR に陽性であり、実際に筋束内の GFP 陽性細胞は MRS2365 投与により細胞内カルシウム上昇が観察された。この細胞はカルシウムオシレーションも観察された。しかしこれらの一過性のカルシウム上昇は周辺の平滑筋細胞のカルシウムオシレーションの頻度、また peak は変化しなかった。これらの実験から筋束内間質細胞はそれ自身は ATP により細胞内カルシウム濃度が上昇し、SK3 を開口させるも、その電位を周辺に伝え排尿筋細胞の興奮抑制には繋がる明確な根拠を得ることは出来なかった。



5. 主な発表論文等 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：武谷 三枝

ローマ字氏名：(Mitsue Takeya)

所属研究機関名：久留米大学

部局名：生理学統合自律機能部門

職名：助教

研究者番号(8桁)：30289433

研究分担者氏名：太田 啓介

ローマ字氏名：(Keisuke Ohta)

所属研究機関名：久留米大学

部局名：解剖学顕微形態部門

職名：准教授

研究者番号(8桁)：00258401

(2)研究協力者

研究協力者氏名：橋谷 光

ローマ字氏名：(Hikaru Hashitani)

研究協力者：中村 桂一郎

ローマ字氏名：(Keiichiro Nakamura)

研究協力者：上村 慶一郎

ローマ字氏名：(Keiichiro Uemura)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。