

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20118

研究課題名(和文) FIB/SEMを用いた前立腺上皮細胞の超微細的な解析

研究課題名(英文) Ultrastructural analysis of prostatic epithelial cells using FIB/SEM tomography

研究代表者

上村 慶一郎 (Uemura, Kei-ichiro)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70446079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺上皮に存在する稀な細胞である神経内分泌細胞と成体幹細胞に注目して研究を進めた。神経内分泌細胞は、セロトニンやクロモグラニンAが汎用されているマーカーである。セロトニンやクロモグラニン陽性細胞は前立腺の腺房には存在せず、導管の基底側の尿道側に偏在していた。FIB/SEM tomographyを用いた分析では、尿道近傍の導管基底側に分泌顆粒を豊富に有する細胞を同定した。open typeの細胞は管腔に接する部位に微絨毛を豊富に有していた。closed typeの細胞は管腔と直接のコンタクトは認めず、管腔との間に介在する細胞の存在を確認した。成体幹細胞に関しては、現在分析を行っている。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the neuroendocrine cell and adult stem cell of prostate. These cells were very rare in the epithelial region. The neuroendocrine cells were located in basal layer of prostatic duct near the urethra, and the cells were not in the acinus region. The findings of FIB/SEM tomography revealed that the neuroendocrine cells had an abundant secretory granule, and the shape was very long and looked like amoeba. Open type cells had a microvilli which is contact to the lumen. Closed type cells did not directly contact to the lumen, but interposition cell between neuroendocrine cell and lumen was existed. The adult stem cells are now under study.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：神経内分泌細胞 成体幹細胞 導管 尿道 前立腺

1. 研究開始当初の背景

(1)我々の研究室で導入した FIB/SEM tomography は電子顕微鏡レベルで細胞を 3D 再構築できる優れた顕微鏡である。その電子顕微鏡を用いて、様々な組織における細胞の研究を開始した。その中で前立腺上皮に存在する種々の細胞を超微細的に解析することとなった。

(2)前立腺上皮には、主に腺上皮細胞と基底上皮細胞が存在している。しかし、その中に稀ではあるが神経内分泌細胞と成体幹細胞が存在する。今回はその稀に存在するとされる細胞の分布、周囲組織との関係、超微細構造を含めて解剖学的な解析を行う事となった。

2. 研究の目的

前立腺より発生する前立腺癌や前立腺肥大症等の病気は高齢男性に好発する病気である。従って泌尿器科領域において前立腺は非常に注目されており盛んに研究が進められている臓器である。それにも関わらず、正常前立腺上皮細胞の組織学的な解析は進んでいないのが現状である。

前立腺上皮に稀に存在するとされる神経内分泌細胞や成体幹細胞は謎が多い細胞である。神経内分泌細胞は、その機能に関しては不明である。また、前立腺癌のホルモン耐性に関与するとされる神経内分泌分化に関連しているとされ臨床的にも非常に重要な細胞である。成体幹細胞に関しても不明なことが多いが、癌幹細胞との関連や前立腺肥大症の病因に関連している可能性もある。その細胞が正常前立腺内のどこに存在し、そのような構造をしているのかを解剖学的に解析することで臨床上の課題を克服する手がかりとすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

12 週齢雄マウスを 4%パラホルムアルデヒドで還流固定を行い、下部尿路（膀胱、前立腺、尿道、精囊、精管遠位部）を一塊にして摘出した。下部尿路を一塊のままに凍結包埋を行った。その組織を 3~5µm の薄さで完全連続切片を作製後に免疫染色を行った。神経内分泌細胞は代表的なマーカーであるセロトニンやクロモグラニン A を使用し、成体幹細胞は Sca-1、CD49f、Trop2、CD44、CD117、CD133 等を使用して解析を行った。

完全連続切片は一つのスライドガラスに 2 つの組織片を載せて、尿道が確認されてから膀胱頸部に到達するまでの切片とした。そのスライドガラスを 20 枚毎にセロトニンとクロモグラニン A を使用して免疫染色を行った。また、様々な神経内分泌マーカーや因子、上皮間質関連蛋白、性ホルモンレセプター、細胞接着因子や細胞増殖因子等をセロトニンと二重染色することによって神経内分泌細胞に局在するかどうか検討を行った。

また、電子顕微鏡的な研究も行った。その際は 12 週齢マウスをハーフカルノフスキーで還流固定し下部尿路を一塊にして摘出して

実体顕微鏡下に組織のトリミングを行った。前立腺部尿道を約 1mm スライスにして、特殊染色を施し、その組織をエポンで包埋後に電子顕微鏡で観察する準備を行った。まず FIB/SEM tomography を用いて、その組織の詳細な表面観察を行いターゲットとなる細胞を確認した。ターゲットとなる細胞（神経内分泌細胞）をさらに詳細に解析し、その超微細構造を確認した。

4. 研究成果

(1)完全連続切片を作製し、免疫染色を行って前立腺及び周囲臓器における神経内分泌細胞の分布について検討を行った。前立腺神経内分泌細胞に対して汎用されているセロトニンとクロモグラニン A を用いた。セロトニン陽性細胞の分布は、ventral prostate、dorsal-lateral prostate、coagulating gland、seminal vesicle、prostatic urethra とそれぞれの部位において尿道近傍に偏在していた。また、上皮の基底側に存在していた。同様に、クロモグラニン A 陽性細胞も尿道近傍の導管に偏在しており、上皮基底側に存在していた。

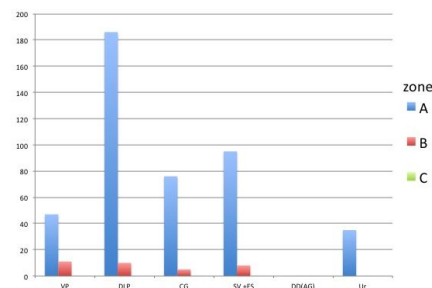


図 1：セロトニンの分布 A:尿道近傍の導管 B:尿道遠位の導管 C:腺房部

過去の報告にある、前立腺神経内分泌細胞に関連した様々な神経内分泌マーカーや神経内分泌因子に関してセロトニンとの関連も検討した。代表的な神経内分泌因子である、クロモグラニン A、Neuron Specific Enlose(NSE)、CD56、Synaptophysin はそれぞれセロトニンと 70~90%共陽性であった。

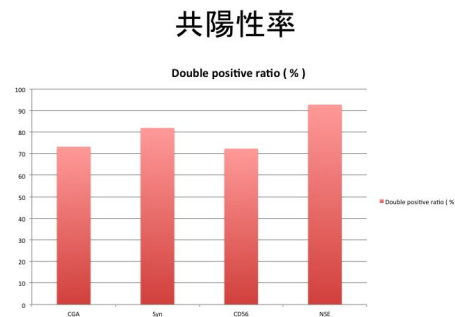


図 2 セロトニンと神経内分泌マーカー

また、神経内分泌因子である Somatostatin、Calcitonin Gene Related Peptide、Gastrin Releasing Peptide、Vasoactive Intestinal Polypeptide、Arginin vasopressin、Cholecystokinin、Histamine、Parathyroid Hormone Like Hormone、Insulin、Neuropeptide Y、Vascular Endothelial Growth Factor、Glucagonでも検討を行った。Calcitonin Gene Related Peptide、Gastrin Releasing Peptide、Cholecystokinin、Histamine の4つの因子はセロトニンと共陽性率が70~90%であった。しかし、それ以外の因子でセロトニンと共陽性ではなかった。

共陽性率(セロトニン+神経内分泌因子)

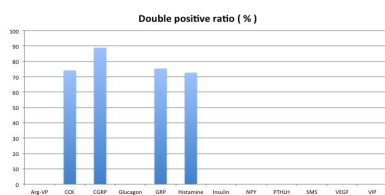


図3 セロトニンと神経内分泌因子

上皮や間質関連蛋白とも検査を行ったが、cytokeratin8/18 以外とは反応しなかった。性ホルモンの受容体や prolactin との関連も調べたが全ての抗体は反応しなかった。細胞接着因子である E-cadherin や N-cadherin との検討では E-cadherin のみ周囲の細胞と神経内分泌細胞の間に反応した。以上の結果より、前立腺神経内分泌細胞は分泌上皮と同様に cytokeratin8/18 に反応し性ホルモンとの関連性がなく周囲細胞との接着性がある細胞であることがわかった。電子顕微鏡での超微細構造的解析では、神経内分泌細胞は細胞室内に豊富に分泌顆粒を有し非常に長い細胞であることがわかった。直接腺管内腔に突出する Open type と呼ばれるものと腺管内腔に突出しない Closed type と呼ばれる2つの type の細胞が存在していた。Open type の細胞のなかには周囲細胞と細胞間隙を有するものもあり神経内分泌細胞が細胞間隙内を伸縮している可能性があることを示唆する所見を得た。また、Open type の細胞は腺管内腔に突出する部分に豊富な微絨毛を有していた。Closed type の細胞は腺管内腔と直接接してはいないが、腺管内腔との間に介在する細胞があり、その細胞が腺管内腔と接する部分は微絨毛が発達していた。過去に上皮下の間質の血管や神経とコンタクトがあるとの報告があるが、今回の研究では血管や神経と近接はしているが直接接しているところは確認ができなかった。以上の研究から、前立腺神経内分泌細胞に関して過去に報告された結果と相違する所見

が得られた。また、超微細構造の研究では前立腺神経内分泌細胞は細胞間隙内で変化できる能力を有する可能性があることを示唆する所見を得る事ができた。

前立腺の成体幹細胞に関する研究であるが、Sca-1、CD49f、Trop2 は広範囲に染色されるため確認が困難であった。CD117、CD133 陽性細胞は前立腺腺房ではなく導管に存在することを確認できた。CD44 に関しては広範囲に前立腺基底部の細胞に陽性を示した。しかし、共陽性の細胞は存在しなかった。前立腺成体幹細胞に関してはさらなる研究をすすめている。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：  
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

上村 慶一郎 (Uemura Kei-ichiro)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70446079

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

林 篤正 (Hayashi Tokumasa)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：20341357

中村 桂一郎 (Nakamura Kei-ichiro)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：20172398