

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19390418
 研究課題名 (和文) 泌尿生殖器系における間質細胞の多様性と普遍性に関する分子生理学的検討
 研究課題名 (英文) Molecular physiological investigations into the commonality and heterogeneity of interstitial cells in the urogenital system
 研究代表者
 橋谷 光 (HASHITANI HIKARU)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：10315905

研究成果の概要 (和文)：間質細胞は小胞体 Ca^{2+} 遊離およびミトコンドリア機能に依存した自発 Ca^{2+} 濃度上昇を生じ、核周囲ミトコンドリアを起点とする Ca^{2+} 濃度上昇の細胞内伝播を認めた。間質細胞と平滑筋細胞の Ca^{2+} 濃度上昇は時間的に相関せず、腎盂では非定形平滑筋がペースメーカー細胞として機能していた。Kit 陽性間質細胞は閉塞膀胱で増加したが、Kit ないし幹細胞因子欠損マウスで間質細胞の分布や平滑筋活動は変化していなかった。

研究成果の概要 (英文)：Interstitial cells (ICs) in the urinary tract developed spontaneous Ca^{2+} transients arising from the endoplasmic reticulum Ca^{2+} release in cooperation with the perinuclear mitochondrial Ca^{2+} handling. Spontaneous Ca^{2+} transients in ICs exhibited little temporal relationship with smooth muscle Ca^{2+} signals, and atypical smooth muscle cells play a pacemaker role in the renal pelvis. The number of Kit-positive ICs was increased in the obstructed bladders, while the mice which have a mutation on Kit receptor (W/W^v) or its ligand stem cell factor (Sl/Sl^d) had effects on neither the distribution of ICs nor the smooth muscle contractility.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：Kit 受容体 / ミトコンドリア / 平滑筋 / 泌尿生殖器系 / 活動電位 / 細胞内カルシウム / 自動運動 / 間質細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 尿路及び男性生殖器系の臓器・組織の壁は主に平滑筋により構成され、自律神経系による制御を受けている。従ってその機能異常に起因する過活動膀胱や勃起不全などの病態に対する薬物治療は平滑筋ないし自律

神経を標的としている。しかしながら現在の薬物治療の無効例や非適応症例も少なくなく、新規治療薬ないし治療戦略の開発は重要な課題である。

(2) 最近の研究により泌尿生殖器系に普遍

的に分布する間質細胞の存在が示され、平滑筋機能制御を考える上で間質細胞の関与を考慮する必要性が認識され、また新たな治療標的としての可能性も示唆されるようになった。しかしながら泌尿生殖器系の間質細胞の生理機能や病態における役割は未だ明らかではなく、泌尿生殖器系の臓器・組織の機能的多様性を考慮した研究が必要である。

2. 研究の目的

(1) 泌尿生殖器系の平滑筋機能異常に起因する病態の解明と、将来的な薬理学的および分子標的治療の対象としての間質細胞の普遍性と多様性を検討することを目的とする。

(2) すでに生理機能が明らかになっている消化管の間質細胞と泌尿生殖器系の間質細胞の共通点と相違点を検討し、また泌尿生殖器系における間質細胞の部位特性を理解するため、世界の間質細胞研究の拠点研究者との情報交換を行い、研究最終年度には間質細胞の国際セミナーを日本で開催する。

3. 研究の方法

(1) 機能的検討

① 細胞内カルシウムイメージング

細胞内カルシウム蛍光指示薬 (Fluo-4) を負荷した組織標本における間質細胞と平滑筋細胞のカルシウム信号を比較する。また酵素処理により単離した間質細胞の細胞内カルシウム濃度変動を、小胞体 (ER-Tracker) およびミトコンドリア (MitoTracker) を蛍光標識することにより空間的關係を考慮して観察する。

② 電気生理学

組織標本を用いた細胞内電位記録法により平滑筋の電気活動を記録し、平滑筋機能制御への間質細胞の関与を検討する。また酵素処理により単離した間質細胞の膜電流を記録することによりイオンチャネルの特性を検討する。

(2) 組織学的検討

① 免疫染色

Kit、ビメンチンおよび最近消化管の間質細胞の選択的マーカーとして注目されている Anoctamin 1 (ANO-1:Ca²⁺活性化塩素イオンチャネル) 抗体を用いて組織標本における間質細胞の分布を観察する。また PGP9.5、TRPV1、CGRP 抗体などにより神経、特にペプチド含有感覚神経の分布と間質細胞の関連を調べる。

② 電子顕微鏡

間質細胞の微細構造および平滑筋、神経との位置関係を調べる。

(3) 分化と可塑性の検討

① 尿流出路閉塞モデル

近位部尿道に部分的閉塞を施術したモルモット膀胱における間質細胞の数や分布の変化を検討し、膀胱内圧上昇や膀胱壁虚血に対応する間質細胞の可塑性を検討する。

② 間質細胞欠損マウス

消化管において間質細胞の欠損ないし減少と機能異常を呈する Kit 受容体欠損 (W/W⁻) マウス、Kit 受容体リガンド (幹細胞因子) 欠損 (S1/S1^d) マウスにおける尿路間質細胞の分布と平滑筋機能を検討する。

4. 研究成果

(1) 間質細胞の自発活動発生機構

① ウサギ尿道組織に分布する間質細胞の自発細胞内カルシウム波は小胞体へのカルシウム取り込み阻害およびリアノジン、イノシトール 3 リン酸受容体を介するカルシウム遊離を阻害することにより消失した。自発細胞内カルシウム波の発生に電位依存性 L 型カルシウムチャネルは関与していなかったが細胞外カルシウム除去により消失した。同様の自発細胞内カルシウム波発生機構はモルモット膀胱およびマウス腎盂の間質細胞においても認められ、尿路の間質細胞は共通して小胞体カルシウム遊離依存性の自発性を示すことが明らかになった。

② ウサギ尿道単離間質細胞の自発細胞内カルシウム濃度上昇は核周囲に集積する小胞体およびミトコンドリアに一致して発生し、細胞長軸方向に末梢側へ伝播して細胞内カルシウム波を形成した (図 1)。この結果は間質細胞の自発カルシウム濃度上昇の空間的および時間的制御が核周囲ミトコンドリアの機能に依存することを示唆した。

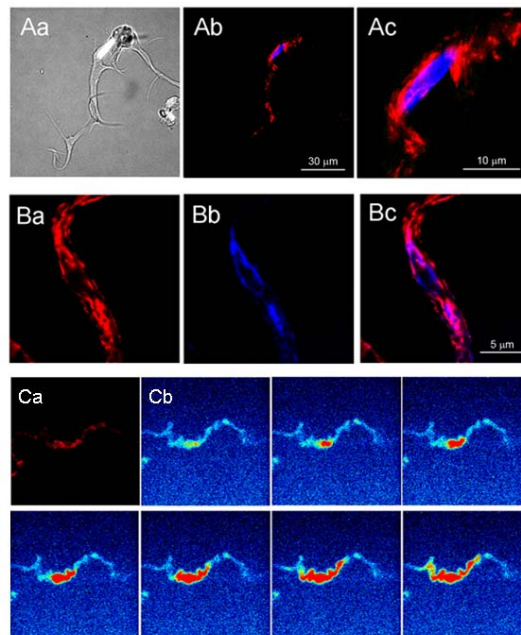


図1 間質細胞内ミトコンドリアと小胞体の分布と細胞内カルシウム波の関係

Aa: 間質細胞の透過像と核蛍光像の合成、Ab: ミトコンドリア蛍光と核蛍光の合成、Ac: Abの核周囲拡大図。

Ba: ミトコンドリア蛍光像、Bb: 小胞体蛍光像
Bc: BaとBbの合成。

Ca: ミトコンドリア蛍光像、Cb: カルシウム蛍光。上段から下段へ連続して左から右へ時間経過画像(間隔200ms)。

(2) 間質細胞と平滑筋の機能的関連

ウサギ尿道組織標本において間質細胞と隣接する平滑筋細胞のカルシウム信号とは約30%においてのみ同期性を認め、モルモット膀胱およびマウス腎盂においては間質細胞と平滑筋のカルシウム信号の間に明らかな同期性は認めなかった(図2)。間質細胞の自発カルシウム上昇は例外なく平滑筋に比べ低頻度かつ持続時間が長いのが特徴であった。尿路間質細胞は消化管の間質細胞のように隣接する平滑筋と強固な機能的連絡を有しておらず、従って電気的ペースメーカー以外の機能を有することが示唆された。

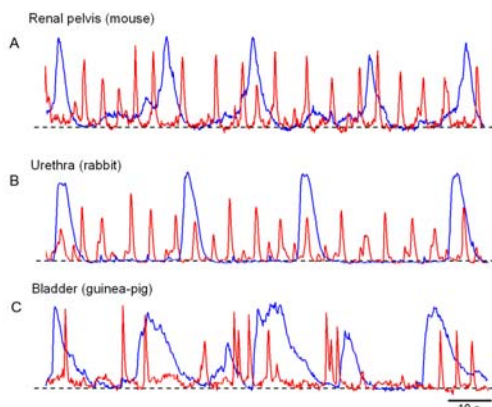


図2 間質細胞と平滑筋細胞の自発カルシウム濃度上昇の時間的關係

A: マウス腎盂、B: ウサギ尿道、C: モルモット膀胱。間質細胞(青)、平滑筋細胞(赤)。

(3) 非定形平滑筋細胞の機能

① マウス腎盂近位部に分布する非定形平滑筋はアルファ平滑筋アクチンを発現し、Kit抗体染色では陰性であった(図3)。非定形平滑筋は間質細胞と同様に小胞体からのリアノジン、イノシトール3リン酸受容体を介したカルシウム遊離による自発細胞内カルシウム濃度上昇を示し、このカルシウム濃度上昇に伴ってカルシウム活性化陽イオンチャネルの開口により一過性自発脱分極(STDs)を発生した。非定形平滑筋はSTDsにより隣接する定形平滑筋(図3)において活動電位を誘発することにより電気的ペー

スメーカーとして機能し、この活動電位とそれに伴う細胞内カルシウム濃度上昇は定形平滑筋間を腎盂近位部から遠位部に伝播して腎盂尿管蠕動のベースとなる収縮波の伝播を形成した。

② TRPV1陽性感覚神経から放出されるCGRPは定形平滑筋の活動電位および自発収縮の頻度を減少させ、持続時間を延長させた。CGRPは非定形平滑筋の自発カルシウム濃度上昇の頻度を低下させたことから、定形平滑筋の自発活動の頻度を低下させていると考えられ、従ってCGRPは非定形平滑筋に対する陰性変時作用と定形平滑筋への陽性変力作用を有することが示唆された。

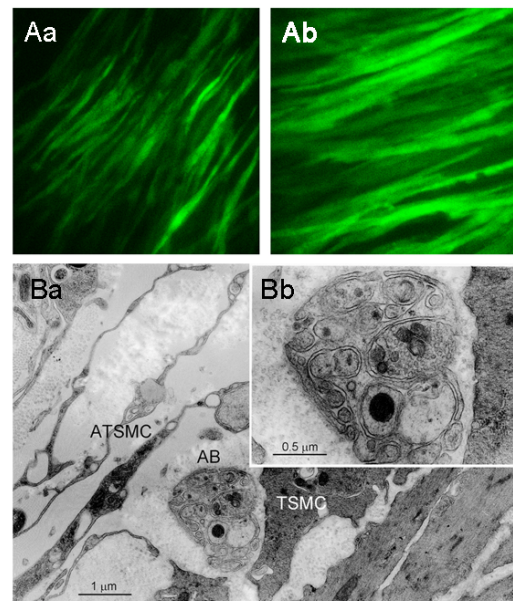


図3 マウス腎盂に分布する非定形および定形平滑筋

Aa: アルファ平滑筋アクチン YFP 発現マウスにおける非定形平滑筋細胞蛍光像、Ab: 定形平滑筋細胞の YFP 蛍光像。

Ba: マウス腎盂電顕像における非定形平滑筋細胞(ATSMC)、定形平滑筋(TSMC)および感覚神経束(AB)、Bb: 感覚神経束と定形平滑筋の近接部位の拡大像。

(4) 閉塞膀胱モデル

部分的尿流出路閉塞モルモットは排尿間隔の短縮と蓄尿期収縮の多発を呈し、摘出膀胱ではKitおよびビメンチン陽性間質細胞が漿膜下から平滑筋間において著明に増加していた。また尿路上皮下組織では間質細胞の分布が平滑筋層に向けて拡大する所見が認められた、間質細胞の増加あるいは分布の変化が過活動膀胱の発症に関連している可能性が示唆された。

(5) 間質細胞欠損マウス

Kit 受容体欠損(W/W⁰) マウス、Kit 受容体リガンド(幹細胞因子)欠損(S1/S1^d)マウスのいずれにおいても、Kit 陽性間質細胞の分布様式と密度は膀胱、腎盂とも変化を認めなかった。また膀胱、腎盂平滑筋の自発細胞内カルシウム濃度上昇、収縮にも明らかな変化を認めなかったことから、尿路間質細胞はしばしば Kit 陽性細胞として同定されるものの、その分化、増殖には Kit/幹細胞因子系以外の制御機構が存在することが示唆された。

(6) 膀胱における cAMP/cGMP の機能

① 膀胱平滑筋の自発収縮および活動電位の発生に対して一酸化窒素は cGMP 非依存性の興奮作用を示したが、cGMP 自体は抑制作用を示した。PDE5 阻害薬は単一平滑筋線維から記録した活動電位に対しては無効であったが、多線維標本の自発収縮を約 60%の標本において抑制したことから、平滑筋線維間の情報伝達への cGMP 陽性間質細胞の関与が推定された。

② ベータ 3 受容体作動薬および PDE4 阻害薬は自発収縮を強く抑制し、膀胱平滑筋収縮抑制における cAMP の主要な役割が確認された。ベータ 3 受容体作動薬および PDE4 阻害薬は神経刺激による収縮は約 20%抑制するのみであり、神経性収縮に対する抑制効果は電位依存性 L 型カルシウムチャネルを阻害した条件下でも同様に認められたことから cAMP の弛緩作用にはカリウムチャネル活性化などによる電位依存性カルシウムチャネルからのカルシウム流入の抑制以外の機構が主要な役割を果たしていると考えられた。

(7) 膀胱粘膜下細静脈の自動性

膀胱粘膜下に分布する細静脈は毎分約 5 回の自発収縮を発生していた。自発収縮は神経伝達遮断薬によっては影響を受けなかったが、小胞体へのカルシウム取り込み阻害、イノシトール 3 リン酸受容体を介するカルシウム遊離を阻害および電位依存性 L 型カルシウムチャネル、カルシウム活性化塩素イオンチャネルの阻害により消失した。細静脈の分布する膀胱粘膜下標本において Kit ないし Ano-1 陽性細胞は認められず自発収縮への間質細胞の関与は現時点では不明である。

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 18 件)

① Hashitani H, Lang RJ, Suzuki H, Role of perinuclear mitochondria in the

spatiotemporal dynamics of spontaneous Ca²⁺ waves in ICC-like cells of the rabbit urethra, Br J Pharmacol, 査読有、In Press、2010

② Hashitani H, Lang RJ, Functions of ICC-like cells in the urinary tract and male genital organs, J Cell Mol Med, 査読有、PMID: 20184664、2010

③ 橋谷光, 平滑筋の自動運動の発生機構に関する最近の話、Nagoya Medical Journal, 査読無、Vol 50、pp.207-216、2010

④ Lang RJ, Hashitani H, Tonta MA, Bourke JL, Parkington HC, Suzuki H, Spontaneous electrical and Ca signals in the mouse renal pelvis that drive pyeloureteric peristalsis, Clin Exp Pharmacol Physiol, 査読有、Vol 37、pp.2030-2045、2010

⑤ Hashitani H, Lang RJ, Mitsui R, Mabuchi Y, Suzuki H, Distinct effects of CGRP on typical and atypical smooth muscle cells involved in generating spontaneous contractions in the mouse renal pelvis, Br J Pharmacol, 査読有、Vol 158、pp.2030-2045、2009

⑥ Hayase M, Hashitani H, Kohri K & Suzuki H, Role of K⁺ channels in regulating spontaneous activity in detrusor smooth muscle in situ in the mouse bladder, J Urol, 査読有、Vol 181、pp.509-515、2009

⑦ Tanaka C, Domae K, Hashitani H, Suzuki H, Modulation of slow waves by transmural nerve stimulation of smooth muscle tissue isolated from the corpus of the guinea-pig stomach, J Smooth Muscle Res, 査読有、Vol 45、pp.109-124、2009

⑧ Hashitani H, Hayase M, Suzuki H, Effects of imatinib mesylate on spontaneous electrical and mechanical activity in smooth muscle of the guinea-pig stomach, Br J Pharmacol, 査読有、Vol 154、pp.451-459、2008

⑨ Kubota Y, Hashitani H, Shirasawa N, Kojima Y, Sasaki S, Mabuchi Y, Soji T, Suzuki H, Kohri K, Altered distribution of interstitial cells in the guinea pig bladder following bladder outlet obstruction, Neurorol Urodyn, 査読有、Vol 27、pp.330-340、2008

- ⑩ Yanai Y, Hashitani H, Hayase M, Sasaki S, Suzuki H, Kohri K, Role of nitric oxide/cyclic GMP pathway in regulating spontaneous excitations in detrusor smooth muscle of the guinea-pig bladder, *NeuroUrol Urodyn*, 査読有、Vol 27、pp. 446-453、2008
- ⑪ Hirst GDS, Hashitani H, Suzuki H, Cellular mechanism of the voltage-dependent change in slow potentials generated in circular smooth muscle of the guinea-pig gastric corpus, *J Physiol*, 査読有、Vol 586, pp. 5521-5536、2008
- ⑫ Kim YC, Suzuki H, Xu WX, Hashitani H, Choi W, Yun HY, Park SM, Youn SJ, Lee SJ, Lee SJ, Voltage-dependent Ca^{2+} current identified in freshly isolated Interstitial Cells of Cajal (ICC) of guinea-pig stomach, *Korean J Physiol Pharmacol*, 査読有、Vol 12, pp. 323-330、2008
- ⑬ Domae K, Hashitani H, Suzuki H, Regional differences in the frequency of slow waves in smooth muscle of the guinea-pig stomach, *J Smooth Muscle Res*, 査読有、Vol 44, pp. 231-248、2008
- ⑭ Brading AF, Heaton JP, Hashitani H, A survey of commonalities relevant to function and dysfunction in pelvic and sexual organs, *Int J Impot Res*, 査読有、Vol 20, pp.1-16、2008
- ⑮ Hashitani H, Suzuki H, Properties of spontaneous Ca^{2+} transients recorded from interstitial cells of Cajal-like cells of the rabbit urethra *in situ*, *J Physiol*, 査読有、Vol 583, pp. 505-519、2007
- ⑯ Lang RJ, Hashitani H, Tonta MA, Parkington HC, Suzuki H, Spontaneous electrical and Ca^{2+} signals in typical and atypical smooth muscle cells and interstitial cell of Cajal-like cells of mouse renal pelvis, *J Physiol*, 査読有、Vol 583, pp. 1049-1068、2007
- ⑰ Lang RJ, Hashitani H, Tonta MA, Suzuki H, Parkington HC, Role of Ca^{2+} entry and Ca^{2+} stores in atypical smooth muscle cell autorhythmicity in the mouse renal pelvis. *Br J Pharmacol*, 査読有、Vol 152, pp. 1248-1259、2007
- ⑱ Hayase M, Hashitani H, Suzuki H, Kohri K, Brading AF, Evolving mechanisms of action of alverine citrate on phasic smooth muscles. *Br J Pharmacol*, 査読有、Vol 152, pp. 1228-1238、2007
- [学会発表] (計13件)
- ① Hashitani H, Lang RJ & Suzuki H, Role of perinuclear mitochondria in spatiotemporal dynamics of spontaneous Ca^{2+} waves in ICC-like cells ~Do they sense metabolic demand?~, Workshop- 'ICC-like cells in uro-genital organs - Current and Future Views' in the 6th International Symposium on Interstitial Cells of Cajal、2010年2月10日、宮崎市
- ② Takano H, Fujita K, Mitsui R, Hashitani H, Suzuki H, Properties of spontaneous vasoconstrictions in suburothelial venule of the rat, The 6th International Symposium on Interstitial Cells of Cajal、2010年2月10日、宮崎市
- ③ 橋谷光、膀胱における間質細胞の役割とは? 第16回日本排尿機能学会ワークショップ「膀胱における情報伝達: 最新のエビデンス」、2009年9月12日、福岡市
- ④ 橋谷光、リチャード・ラング、鈴木光、マウス腎盂に分布する定形および非定形平滑筋細胞の機能的識別、第16回日本排尿機能学会、2009年9月11日、福岡市
- ⑤ Hashitani H, Hayase M, Kohri K, Suzuki H, Role of K^+ channels in regulating spontaneous activity in detrusor smooth muscle *in situ* of the mouse urinary bladder, The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences、2009年7月28日、京都市
- ⑥ Lang RJ, Hashitani H, Tonta MA, Iqbal J, Bourke JL, Parkington H, Suzuki H, Spontaneous electrical and calcium signals in atypical smooth muscle cells of the mouse pyeloureteric system、2009年7月28日、京都市
- ⑦ Hashitani H, Lang RJ Suzuki H, Sensory nerve mediated regulation of spontaneous activity in the renal pelvis, 'Neural regulation of smooth muscle activity' in Post-genomic Advances in the Physiology of Smooth Muscle、2009年7月24日、名古屋市

- ⑧ 橋谷光、泌尿器生殖器系における NO の組織特異性-ICC 様細胞との関連-、第 11 回 UTP シンポジウム、2009 年 1 月 17 日、東京都
- ⑨ 橋谷光、リチャード・ラング、鈴木光、マウス腎盂平滑筋自発活動の感覚神経性制御における K ATP channel とミトコンドリアの役割、第 15 回日本排尿機能学会、2008 年 9 月 13 日、東京都
- ⑩ 橋谷光、早瀬麻沙、郡健二郎、鈴木光、マウス膀胱平滑筋の自発活動制御における K channel の役割、第 50 回日本平滑筋学会総会ワークショップ「下部尿路機能の基礎と臨床：尿路上皮の役割を中心に」、2008 年 7 月 3 日、弘前市
- ⑪ Hashitani H, Lang RJ, Suzuki H, Role of K ATP channels and mitochondria in sensory nerve-mediated regulation of spontaneous activity in the mouse renal pelvis、第 85 回日本生理学会大会、2008 年 3 月 26 日、東京都
- ⑫ 橋谷光、リチャード・ラング、鈴木光、マウス腎盂における ICC 様細胞の蠕動ペースメーカー機構における役割、第 14 回日本排尿機能学会、2007 年 10 月 5 日、猪苗代町
- ⑬ Hashitani H, Properties of spontaneous Ca transients in ICC-like cells of the rabbit urethra *in situ* -less secure pacemaker cells-, 5th International Symposium on Interstitial Cells of Cajal、2007 年 8 月 20 日、Ireland

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://reswww.cc.nagoya-cu.ac.jp/rd/search/researcher/10315905/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋谷 光 (HASHITANI HIKARU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：10315905

(2) 研究分担者

鈴木 光 (SUZUKI HIKARU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80037548

窪田 泰江 (KUBOTA YASUE)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00381830

郡 健二郎 (KOHRI KENJIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30122047

曾爾 疆 (SOJI TSUYOSHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：50056925

(H19→H20:連携研究者)

(3) 連携研究者