

機関番号：31201
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591888
 研究課題名（和文）前立腺平滑筋細胞でのカルシウムイオン情報伝達解析を利用した治療システムの確立
 研究課題名（英文）The establishment of a treatment system using digital imaging analysis on intracellular calcium ion dynamics of golden hamster prostatic smooth muscle cells.
 研究代表者
 松浦 誠（MATSUURA MAKOTO）
 岩手医科大学・薬学部・講師
 研究者番号：00405846

研究成果の概要（和文）：前立腺平滑筋細胞における細胞内伝達系の相関を明らかにするため、ゴールデンハムスターを用いて加齢に伴う α 受容体およびプリン受容体における細胞内カルシウム濃度（ $[Ca^{2+}]_i$ ）上昇機序をリアルタイム共焦点レーザー顕微鏡にて検討した。反応パターンの解析より細胞外からのカルシウム流入により、前立腺平滑筋細胞の収縮が明らかとなった。蛍光免疫組織化学法により $\alpha 1$ 受容体の局在について検討したところ平滑筋細胞においてははっきりとした受容体の局在は認められなかった。

研究成果の概要（英文）： We examined the intracellular calcium ion dynamics ($[Ca^{2+}]_i$) in the cell in an age-related alpha receptor and the purinoceptor with real time confocal laser microscope using golden hamster to clarify the correlation of the intercellular signaling in the prostatic smooth muscle cell. The shrinkage of the prostatic smooth muscle cell became clear by calcium entry from extracellular than the analysis of the reaction pattern. After examining the local existence of alpha 1 receptor, the local existence of the clear receptor was not accepted in the smooth muscle cell by the fluorescence immunohistochemistry.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：細胞内カルシウム変動・リアルタイム共焦点レーザー顕微鏡・ $\alpha 1$ 受容体・加齢

1. 研究開始当初の背景

前立腺は男性の膀胱直下にあつて、後部尿道をとりまくように存在する臓器である。前立腺の肥大は排尿障害の原因と考えられており、現在では、70歳以上で10人に7人以上が前立腺肥大に伴う排尿困難に悩むとい

われている。今日まで、アドレナリン作動性拮抗薬（ $\alpha 1$ 受容体遮断薬）が前立腺肥大に伴う排尿障害の代表的治療薬として用いられているが、症状を完全に軽減させていない現状であった。

2. 研究の目的

本研究では、組織形態を保ったままでリアルタイム共焦点レーザー顕微鏡を用いてアドレナリン性刺激物質及び非アドレナリン性刺激物質で刺激し次の点について検討を行う。

(1) 前立腺平滑筋細胞において細胞内カルシウム濃度変動機構がどのように平滑筋収縮および拡張に関与しているのか。

(2) 関与しているとすればどのような機序によるのか。

(3) 従来臨床的に用いられている薬剤で、既知以外の作用はないか。

(4) 現在使用されている薬剤より有効であるものの検索、及び既存医薬品のキャリア化による薬剤有効性の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変動のイメージングできる組織標本を作成する。

(2) 上記で作成した標本周囲を、各種試薬を用いて灌流し、 $[Ca^{2+}]_i$ 変動を共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon RCM/Ab) を用いて観察し収縮および拡張機構の解明を行う。

①前立腺平滑筋はアドレナリン作動性受容体を有していることが知られているが、非アドレナリン性刺激物質等も使用し、各細胞群における細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 変動の伝播 (細胞間のカルシウム波) の特性を検討する。

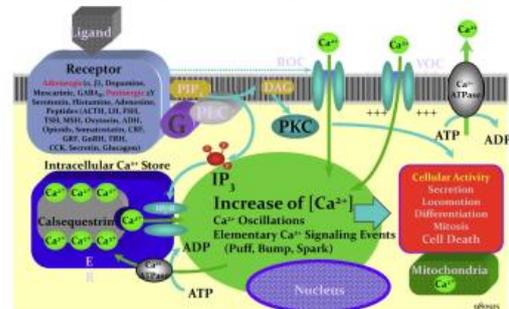
②作用させる薬物としてノルアドレナリン (NAd) および非アドレナリン性刺激物質 (ATP) を用い、それぞれどのように平滑筋細胞内での反応性が異なるか $[Ca^{2+}]_i$ を指標として検討する。

(3) 平滑筋収縮機構解析と受容体の局在を観察する。細胞局在を蛍光免疫組織学的手法を用いて確認する。

4. 研究成果

前立腺平滑筋細胞における細胞内伝達系の相関を明らかにするため、細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変動をモニターし、反応機構を解析した。

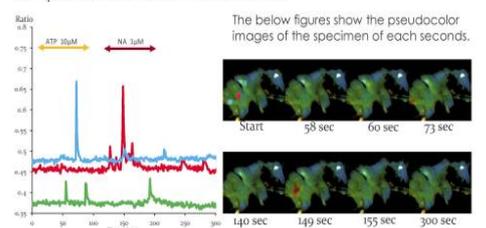
General scheme of $[Ca^{2+}]_i$ changes



①前立腺平滑筋細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変動をイメージングできる標本を作製した。動物種としてはマウスより

ゴールデンハムスターの方が観察しやすい標本を作製でき、今後この種を用いて実験を行う計画とした。

ATP or NA-induced $[Ca^{2+}]_i$ dynamics of 50 Weeks old GH prostatic smooth muscle cells

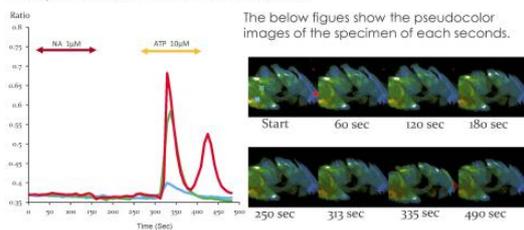


②①で作成した標本周囲を、NAd、ATP 及び各種試薬を用いて灌流し、収縮機構の違いについてリアルタイム共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。NAd もしくは ATP 刺激によって前立腺平滑筋細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変動を認めた。この $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のパターンは両者で異なっており、NAd 刺激では一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めたのに対し、ATP 刺激では $[Ca^{2+}]_i$ の律動的変動を認めた。細胞外 Ca^{2+} 非存在下条件では、NAd 誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は部分的に抑制されたのに対し、ATP 誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は完全に阻害された。

③ $\alpha 1$ 受容体 antagonist の Tamsulosin 存在下での NAd および ATP による反応を検討したところ、NAd 誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は完全に阻害されたのに対し、ATP 誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は阻害されなかった。このことから、NAd と ATP では異なった細胞内情報伝達経路を持つ可能性が示唆された。

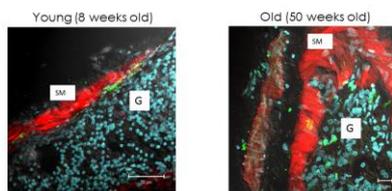
④加齢に伴う前立腺平滑筋細胞における α 受容体およびプリン受容体における $[Ca^{2+}]_i$ 上昇機序の違いについて検討した。前立腺肥大のモデルとして7 or 8週齢(Young)と50週齢経過(Old)したゴールデンハムスターを比較検討した。双方で作製した標本の周囲を、NAd及びATPを用いて灌流し、収縮機構の違いについて検討した。NAd刺激によってYoung及びOldとも前立腺平滑筋細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変動を認めた。しかしながらOldの場合、Youngの1/10倍濃度の刺激によって反応を示しており、加齢に伴ってNAdに対する感受性が増大する傾向が見られた。ATP刺激によってYoung及びOldとも同様の反応を示していた。今回のNAdの反応パターンの解析から、前立腺平滑筋細胞の肥大に α 受容体が関与していることが示唆された。

ATP induced $[Ca^{2+}]_i$ dynamics of 8 Weeks old GH prostatic smooth muscle cells



⑤④においてNAd刺激による反応性の違いがみられたことから、蛍光免疫組織化学法により、YoungとOldにおける $\alpha 1$ 受容体の局在について検討した。YoungとOldともに、基底膜部分において発現が認められているものの、平滑筋細胞への発現ははっきり認められなかった。

The fluorescent immuno staining of golden hamster prostate smooth muscle cells



Expression was confirmed to a basal membrane an alpha receptor, but a smooth muscle cell was able to confirm expression in neither of Young and Old clearly. (The green shows alpha receptor)

Abbreviations:G,gland cell;SM,Smooth muscle cells

⑥ゴールデンハムスターの週齢をヒトに換算すると50週齢ではヒトの25歳前後となることから、さらに加齢前立腺肥大のモデルとして100週齢経過したゴールデンハムスターを用いて作成した標本の周囲を今までと

同様に灌流し、 $[Ca^{2+}]_i$ の違いについて検討した。NAd刺激によって50週齢同様に前立腺平滑筋細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変動を認めた。ATP刺激についても50週齢と同様の反応パターンを示していた。双方の反応とも50週齢よりも強い傾向を認めた。

⑦100週齢経過したゴールデンハムスターを用いて作製した標本について蛍光免疫組織化学法により $\alpha 1$ 受容体の局在について検討した。50週齢同様に基底膜部分においては発現が認められたが、平滑筋細胞においてははっきりとした局在は認められなかった。このことから加齢に伴い α 受容体における感受性が高まることは示唆されるが、肥大と関係があると考えられる前立腺平滑筋細胞には α 受容体は認められなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

(1) Saino T, Misaki T, Matsuura M, Shikanai T, Satoh Y (2008): Dipyridamole inhibits intracellular calcium transients in isolated rat arteriole smooth muscle cells. Arch Histol Cytol. 71:235-247.

(2) Masu K, Saino T, Kuroda T, Matsuura M, Russa AD, Ishikita N, Satoh Y (2008): Regional differences in 5-HT receptors in cerebral and testicular arterioles of the rats as revealed by Ca^{2+} imaging of real-time confocal microscopy: variances on artery size and organ specificity. Arch Histol Cytol. 71:291-302.

(3) Tamagawa Y, Saino T, Matsuura M, Satoh Y (2009): The effects of diuretics on intracellular Ca^{2+} dynamics of arteriole smooth muscles as revealed by laser confocal microscopy. Acta Histochem Cytochem 42(4):121-128.

(4) Sadzuka Y, Matsuura M, Sonobe T. (2009): The effect of taurine, a novel biochemical modulator, on the antitumor activity of Doxorubicin. Biol Pharm Bull. 32(9):1584-1587.

〔学会発表〕(計 6 件)

(1) 齋野朝幸、枅一毅、松浦誠、佐藤洋一 :
ラット精巣・大脳細動脈平滑筋での細胞内カルシウム動態におけるセロトニン(5-HT) の効果の比較。第6回岩手医科大学先端医療研究センター公開シンポジウム 2008年7月盛岡

(2) Masu K, Saino T, Kuroda T, Matsuura M, Russa AD, Ishikita N, Satoh Y: Ca²⁺ imaging revealed regional differences of 5-HT receptors in cerebral and testicular arterioles of rats: dependence on arteries size and organ specificity. The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting 2008, Dec, San Francisco

(3) Matsuura M, Kuroda T, Saino T, Satoh Y, Sadzuka Y: ATP-induced intracellular calcium dynamics in prostatic smooth muscles of golden hamsters. The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting 2008, Dec, San Francisco

(4) Tamagawa Y, Matsuura M, Saino T, Satoh Y: Comparison of effects with respect to diuretics on intracellular calcium dynamics in rat testicular arteriole smooth muscle cells. The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting 2008, Dec, San Francisco

(5) Matsuura M, Kuroda T, Tamagawa Y, Saino T, Satoh Y, Sadzuka Y: Age-associated change in the reactivity of Noradrenalin-induced intracellular calcium dynamics in prostatic smooth muscles, The 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2009, Dec, San Diego

(6) 玉川靖則、齋野朝幸、松浦誠、佐藤洋一 : ラット精巣細動脈での各種利尿剤の作用特性の比較。第115回日本解剖学会総会・全国学術集会 2010年3月、盛岡

〔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

松浦 誠 (MATSUURA MAKOTO)
岩手医科大学・薬学部・講師
研究者番号 : 00405846

(2) 研究分担者

齋野 朝幸 (SAINO TOMOYUKI)
岩手医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 40305991

佐藤 洋一 (SATO YOH-ICHI)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 40118253

(3) 連携研究者

藤岡知昭 (TOMOAKI FUJIOKA)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 80173409