

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 3日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390304

研究課題名(和文) 泌尿生殖器における代謝センサーとしての間質細胞の生理病態機能に関する研究

研究課題名(英文) Investigations into the role of uro-genital interstitial cells as a metabolic sensor in physiology and disease

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・教授

研究者番号：10315905

研究成果の概要(和文)：間質細胞ミトコンドリアは Ca^{2+} バッファー機構として機能し、小胞体との Ca^{2+} シャトルを介して細胞内 Ca^{2+} ウェーブ形成に関与していたが、主要な ATP 産生源としては機能していない。ペリサイトは細胞内 Ca^{2+} オシレーター依存性に自発脱分極を発生し、電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介して細胞間で同期することにより、膀胱粘膜下細静脈の自動性を駆動して組織代謝制御に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Perinuclear mitochondria in interstitial cells may regulate endoplasmic reticulum Ca^{2+} release by buffering Ca^{2+} within microdomains between both organelles, and play a dominant role in the spatial regulation of Ca^{2+} wave generation. Pericytes in bladder suburothelium generate spontaneous Ca^{2+} transients and associated contractions relying on cytosolic Ca^{2+} oscillator and voltage-dependent synchrony, and thus may function as active drainage machinery of tissue metabolites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

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：間質細胞/ミトコンドリア/ペリサイト/平滑筋/細胞内カルシウムオシレーター/電位依存性/微小循環

1. 研究開始当初の背景

(1) 泌尿生殖器系組織に分布する間質細胞は、同種および異種細胞間の情報伝達制御に関与していると考えられ、新たな治療標的としての可能性が示唆されている。

KIT 受容体陽性間質細胞の発見以来、消化管に存在するカハールの間質細胞 (ICC) と同

様に平滑筋自動運動の電氣的ペースメーカー細胞あるいは神経・筋伝達の介在細胞としての機能が推定されてきたが、未だ直接的な証明はなされていない。さらに KIT 陰性間質細胞やペースメーカー細胞の存在が明らかになり、また ICC 減少に伴う消化管機能異常を認める変異マウス (W/W^v および $S1/S1^d$) に

において、泌尿生殖器系の間質細胞の分布や自動性および神経性機能制御が障害されていないことが示された。したがって泌尿生殖器系には多様な間質細胞が存在していると考え、その組織特異的な機能について新たな視点で再検討する必要がある。

(2) LUTS と ED の相関が示され、その発症が加齢に伴って増加し、メタボリック症候群がリスクファクターであることを考慮すると、病態の背景には組織代謝障害が共通して存在すると考えられる。

間質細胞は豊富なミトコンドリアを構造上の特徴とすることから、その機能はミトコンドリア代謝基質であるグルコースと酸素の供給低下すなわち糖代謝異常と虚血を鋭敏に反映すると考えられる。さらに間質細胞の自発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が小胞体とミトコンドリアの機能協調を起点としていることから、ミトコンドリア機能は細胞内情報伝達系の Ca^{2+} 依存性制御に密接に関連し、したがって泌尿生殖器系の間質細胞は代謝性変化を早期に感知する組織内センサーとして機能している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

(1) 間質細胞の自発 Ca^{2+} 濃度変動の発生および伝播におけるミトコンドリア機能の役割を明らかにし、自発 Ca^{2+} 濃度変動を維持するための細胞内エネルギー産生基盤について検討する。間質細胞の自発活動の細胞代謝依存性変化を理解することを目的とする。

(2) 各種間質細胞における細胞間の機能的連絡、周辺細胞(平滑筋および異種間質細胞)との情報伝達について検討し、また遠心性および求心性神経による間質細胞の機能制御について調べる。間質細胞から平滑筋あるいは線維芽細胞への表現型変換の可能性とその組織代謝環境との関係について考察する。

注) 研究遂行の過程において膀胱粘膜下細静脈の自発収縮発生におけるペリサイトの重要性が明らかになり、その組織代謝制御における役割を検討した。

3. 研究の方法

(1) 単離間質細胞ライブイメージング
酵素処理により単離した間質細胞に Ca^{2+} 感受性蛍光色素 (Fluo-4) を負荷し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を可視化する。細胞内におけるカルシウム濃度変化の局在および経時的变化について、核、ミトコンドリアおよび小胞体との空間的關係を検討する目的で、ミトコンドリア選択的蛍光色素 (MitoTracker-Red)、小胞体 (ER-Tracker) および核 (DAPI) による

細胞内小器官の分布との多波長ライブイメージングを行う。ミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入およびATP産生はミトコンドリア電位に依存しているため、Rhodamine123 および TMRM をミトコンドリア内膜電位依存性に負荷し、ミトコンドリアおよび細胞質の蛍光強度の変化によりミトコンドリア脱分極反応を可視化する。

(2) 組織標本を用いた機能的検討
膀胱粘膜筋板、排尿筋平滑筋層内側および外側、腎盂および前立腺組織標本において細胞内 Ca^{2+} 蛍光指示薬 (Fluo-4 および Fluo-8) による Ca^{2+} イメージングを行い、各種間質細胞の Ca^{2+} シグナルの特性と同期性について検討する。また細胞内電位記録により各組織の平滑筋から記録される電気現象形成における間質細胞の役割を調べる。

微小血管を含む膀胱粘膜下組織標本を作成し、ビデオカメラに接続した血管壁追跡画像システムにより血管径の変化を経時的に計測する。壁細胞の細胞内 Ca^{2+} 動態を調べるとともに細胞内電位記録法により壁細胞の電気活動の特性を検討する。

(3) 組織標本を用いた形態学的検討
共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ペリサイト (α SMA, PDGFR β 、NG-2)、Kit 陽性間質細胞、筋線維芽細胞 (ビメンチン) および線維芽細胞 (PDGFR α) の3元的分布を検索する。また間質細胞の機能的マーカーである ANO1/TMEM16A (Ca^{2+} 活性化塩素イオンチャンネル) および SK3 (Ca^{2+} 活性化カリウムイオンチャンネル) についても陽性細胞の分布を検討する。さらに交感神経 (チロシンヒドロキシラーゼ)、副交感神経 (VAcHt) および求心性神経 (cGRP、サブスタンス P、TRPV1) と間質細胞との解剖学的関係についても検討する。放射線照射により骨髄機能を抑制したマウスに、GFP 標識トランスジェニックマウスをドナーとして骨髄移植を行い、骨髄由来細胞の膀胱壁における分布について解析を行う。透過型電子顕微鏡によりペリサイトおよび血管平滑筋と内皮細胞の微細構造を観察し、細胞間の接合様式についての検討を行う。

FIB (集束ガリウムイオンビーム) により超薄切片を標本表面から連続して削り取り SEM により透過型電子顕微鏡レベルの超高解像度画像を取得、得られた超薄連続切片の画像を再構築し3次元細胞構築の解析を行う。

4. 研究成果

(1) 尿道間質細胞ミトコンドリアの役割

ウサギ尿道縦走筋から酵素処理により単離した間質細胞では、核周囲にミトコンドリアと小胞体が集積しており、自発細胞内Ca²⁺濃度上昇は核周囲のミトコンドリア-小胞体集合体を基点として起こり細胞内を伝播した。

小胞体内のCa²⁺を減少させるCPA、リアノジンおよびTPENは自発Ca²⁺波を消失させ、その後のカフェインによる小胞体刺激により誘発されるCa²⁺オシレーションを阻害した。しかしミトコンドリア内膜のプロトン勾配を消失させるCCCPは自発細胞内Ca²⁺波を消失させたが、その後のカフェイン誘発Ca²⁺遊離オシレーションを阻害せず、小胞体へのCa²⁺取り込みはミトコンドリアによるATP産生に依存しないことが示唆された。小胞体へのCa²⁺取り込みはDeoxy-glucoseによる解糖系阻害によっても抑制されなかったが、 α -Iodoacetamideによるクレアチンリン酸代謝阻害により抑制された。また自発Ca²⁺波はミトコンドリアへのCa²⁺取り込みを担うCa²⁺ユニポーター阻害剤であるRU360により抑制され、ミトコンドリアからのCa²⁺遊離を担うNa⁺/Ca²⁺交換輸送体を阻害するCGP37157により頻度が低下した。

以上の結果から、ミトコンドリアは小胞体へのCa²⁺取り込みに必要なATP供給を介してではなく、Ca²⁺バッファー機構として間質細胞の自発Ca²⁺濃度上昇に関与していると考えられた。

(2) 前立腺間質細胞の自発カルシウム信号
モルモット前立腺の単離間質細胞は細胞内を伝播するCa²⁺波と細胞全体で同期して起こるCa²⁺フラッシュの2種類の自発Ca²⁺上昇を発生した。自発細胞内Ca²⁺濃度上昇はミトコンドリアおよび小胞体によるCa²⁺サイクルに依存していたが、電位依存性L型Ca²⁺チャンネルを介するCa²⁺流入にも依存しており、膜電流測定により電位依存性Ca²⁺電流が確認された。

この結果は前立腺間質細胞によるL型Ca²⁺チャンネル非依存性のペースメーカー電位の発生に疑問を呈する結果であったが、組織標本で記録されるスローウェーブの頻度が脱分極により増加し、過分極により抑制ないし消失する現象に合致していた。

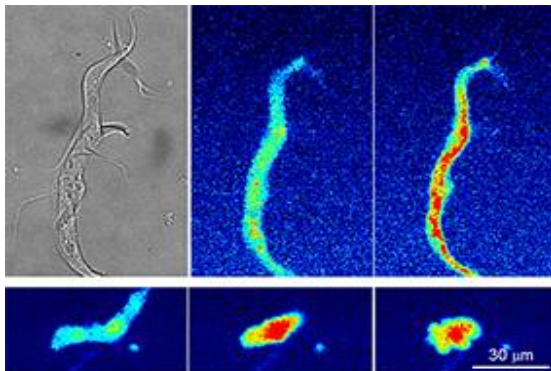


図1 モルモット前立腺の単離間質細胞と平滑筋細胞

(上段) 間質細胞は複数の突起を有し(左)、静止状態(中央)とCa²⁺濃度上昇時(右)で細胞形状が変化しなかった。

(下段) 平滑筋細胞は静止状態(左)からCa²⁺濃度上昇に伴い(中央、右)強い収縮を生じた。Ca²⁺濃度上昇はいずれも細胞外カリウム濃度上昇による。

(3) 腎盂ペースメーカー機構

マウス腎盂蠕動に参与する3種類の細胞の機能形態的識別を行った。電位依存性K⁺チャンネルK_v4.3および α -SMA発現細胞は定型的平滑筋細胞、ANO1/TMEM16Aおよび電位依存性K⁺チャンネルK_v7発現細胞は α -SMA陰性間質細胞、そして自発内向き電流を発生する α -SMA陽性は非定型平滑筋細胞であった。

マウス腎盂においてカルバコール(CCh)及びニコチンは自発収縮の振幅の上昇および頻度の低下を生じ、この反応はアトロピンにより抑制されずヘキサメソニウムおよびカプサイシンにより抑制された。CChは定型平滑筋を過分極させ、自発活動電位およびカルシウム濃度上昇の頻度を低下させたが、この反応はATP感受性カリウムチャンネル阻害薬により抑制された。一方CChによる非定型平滑筋のカルシウム濃度上昇頻度の低下はグリベンクラミドにより抑制されずカプサイシンにより抑制された。CChは神経節に作用してCGRPの放出を起こしていると考えられた。

(4) 膀胱壁の内因性制御機構

ラット膀胱平滑筋の内層(輪走筋)は外層(縦走筋)に比べ、神経性収縮に対する自発収縮の比が有意に大きかった。また輪走筋の粘膜附着標本では経壁神経刺激による一過性収縮に引き続いて持続的な基線の上昇および自発収縮の活性化が認められ、この遅延性反応はカプサイシンにより抑制された。以上の結果から、排尿筋平滑筋の内外層の機能的役割の違いとともに、粘膜(おそらく粘膜下求心性神経)から収縮性物質が放出されることが示唆された。

膀胱急性伸展により副甲状腺ホルモン関連蛋白(PTHrP)の発現が上昇し、PTHrPおよび受容体PTHrP1は排尿筋平滑筋に優位に発現していることを示した。PTHrPは平滑筋自発収縮を濃度依存性に抑制したが、経壁神経刺激による収縮に対する抑制効果はわずかであり、内在性弛緩因子として蓄尿機能を促進することが示唆された。

(5) 膀胱粘膜微小血管ペリサイトの機能

ラット膀胱粘膜下細静脈の壁細胞は、主に平滑筋細胞により構成されていたがペリサイトも分布しており、いずれも同期した自発細胞内Ca²⁺濃度上昇を発生して自発収縮を引き起こしていた。一方マウス粘膜下細静脈では近位部を除き平滑筋細胞を欠き、ペリサイトネットワークが自発細胞内Ca²⁺濃度上昇と対応する自発収縮を発生した。マウス細静脈ペリサイトの自発細胞内Ca²⁺濃度上昇はミトコンドリアATP産生に依存する小胞体Ca²⁺ポンプ、IP₃受容体を介するCa²⁺遊離および容量性Ca²⁺流入のサイクルにより発生していた。

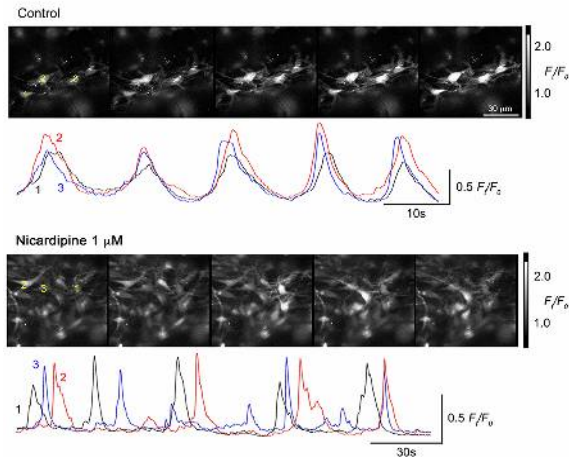
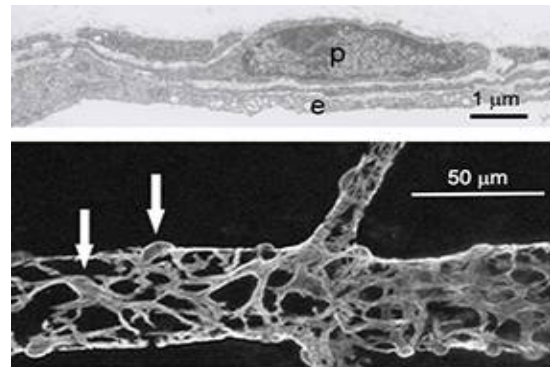


図2 マウス膀胱粘膜細静脈ペリサイトの自発細胞内Ca²⁺濃度変化

(上段) ペリサイトはネットワークを形成して同期した細胞内Ca²⁺濃度上昇を発生した。
(下段) L型Ca²⁺チャンネルを阻害により個々のペリサイトの自発細胞内Ca²⁺濃度は消失しなかったが細胞間の同期性が失われた。

細静脈ペリサイトはα-SMA陽性、NG2陰性、毛細血管ペリサイトはNG2陽性、α-SMA陰性、細動脈平滑筋はNG2陽性、α-SMA陽性であり、ペリサイトから平滑筋への表現型変換の可能性が示唆された。また骨髄由来細胞は膀胱粘膜下組織の血管壁を中心に間質に広く分布したことから、ペリサイトの一部は骨髄由来である可能性が示唆された。

FIB/SEM を用いた膀胱壁の3次元細胞構築解析により、これまで紡錘形の細胞であると考えられてきた線維芽細胞がシート状の構造を有する細胞である可能性が示された。このことは線維芽細胞により構造的のみならず機能的分画が形成されることを意味しており、特に線維芽細胞が落葉状に折り重なる粘膜下組織では、例えば尿路上皮由来の生理活性が微小血管や間質細胞さらには排尿筋平滑筋に作用するのは必ずしも容易ではないことを示唆している。



(図3) マウス膀胱粘膜細静脈ペリサイトの形態学的特徴

(上段) 透過型電子顕微鏡画像により細静脈壁は内皮細胞と近接するペリサイトにより構成され、平滑筋を欠くことが示されている。
(下段) α-SMA染色により、星形で突起を伸ばす細静脈ペリサイトのネットワークが示されている。矢印は細胞体を示す。

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10件)

- ① Nishikawa N, Kanematsu A, Negoro H, Imamura M, Sugino Y, Okinami T, Yoshimura K, Hashitani H, Ogawa O, PTHrP is endogenous relaxant for spontaneous smooth muscle contraction in urinary bladder of female rat, *Endocrinology*, 査読有、PMID:23546599、2013
- ② Mitsui R, Hashitani H, Immunohistochemical characteristics of suburothelial microvasculature in the mouse bladder. *Histochem Cell Biol.*、査読有、PMID:23314591、2013
- ③ Hattori K, Shirasawa N, Suzuki H, Otsuka T, Wada I, Yashiro T, Herbert DC, Soji T, Hashitani H、Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. XV. Properties of spontaneous and LHRH-induced Ca²⁺ transients in the transitional zone of the rat anterior pituitary in situ.、*Endocrinology.*、査読有、Vol. 154, pp. 400-409、2013
- ④ Hashitani H, Mitsui R, Shimizu Y, Higashi R, Nakamura K, Functional and morphological properties of pericytes in suburothelial venules of the mouse bladder, *Br J Pharmacol.*、査読有、Vol. 167, pp. 1723-1736、2012

- ⑤ Wilkinson L, Kurniawan ND, Phua YL, Nguyen MJ, Li J, Galloway GJ, Hashitani H, Lang RJ, Little MH, Association between congenital defects in papillary outgrowth and functional obstruction in Crim1 mutant mice.、*J Pathol.*、査読有、Vol. 227、pp. 499-510、2012
- ⑥ Iqbal J, Tonta MA, Mitsui R, Li Q, Kett M, Li J, Parkington HC, Hashitani H, Lang RJ.、Potassium and ANO1/TMEM16A chloride channel profiles distinguish atypical and typical smooth muscle cells from interstitial cells in the mouse renal pelvis.、*Br J Pharmacol.*、査読有、Vol.165、pp. 2389-2408、2012
- ⑦ Hashitani H, Takano H, Fujita K, Mitsui R, Suzuki H、Functional properties of suburothelial microvessels in the rat bladder.、*J Urol.*、査読有、Vol.185、pp.2382-2391、2011
- ⑧ Lam M, Shigemasa Y, Exintaris B, Lang RJ, Hashitani H、Spontaneous Ca²⁺ signaling of interstitial cells in the guinea pig prostate.、*J Urol.*、査読有、Vol.186、pp.2478-2486、2011
- ⑨ Shigemasa Y, Kito Y, Hashitani H, Suzuki H、Factors which determine the duration of follower potentials in longitudinal smooth muscle isolated from the guinea-pig stomach antrum.、*J Smooth Muscle Res.*、査読有、Vol.47、pp.89-110、2011
- ⑩ Hashitani H, Lang RJ, Suzuki H、Role of perinuclear mitochondria in the spatiotemporal dynamics of spontaneous Ca²⁺ waves in interstitial cells of Cajal-like cells of the rabbit urethra.、*Br J Pharmacol.*、査読有、Vol.161、pp.680-694、2010

[学会発表] (計23件)

- ① 西川信之、兼松明弘、沖波武、根来宏光、杉野善雄、今村正明、吉村耕治、橋谷光、小川修、Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)は膀胱平滑筋の自発性収縮に対する内因性抑制因子である、第101回日本泌尿器科学会総会、2013年4月26日、札幌市
- ② Hashitani H、Role of distinct layers

in the bladder wall in regulating bladder function、第90回日本生理学会大会、シンポジウム、「Compartmentalization in Smooth Muscle Organs」、(招待講演)2013年3月27日、東京都

- ③ Hashitani H、Pericytes-Genuine pacemaker cells in suburothelial venules of the bladder、The 7th International Symposium on Interstitial Cells of Cajal (招待講演)2012年9月5日、フィレンツェ(イタリア)
- ④ Hashitani H, Mitsui R, Shimizu Y, Higashi R, Nakamura K、Functional and Morphological Properties of Pericytes in Bladder Suburothelial Venules: Pacemaker Cells of Suburothelial Microcirculation、32nd Congress of the Société Internationale d'Urologie. 2012年9月30日-10月4日、福岡市
- ⑤ Hashitani H、Functional of Pericytes in regulating suburothelial microcirculation of the bladder、第90回日本生理学会大会、シンポジウム「平滑筋組織の間質に分布する各種細胞の生理機能」(招待講演)、2012年3月30日、松本市
- ⑥ 清水優希、高野博充、三井烈、橋谷光、Neural regulation of spontaneous constrictions in suburothelial venules of the rat urinary Bladder、第90回日本生理学会大会、2012年3月30日、松本市
- ⑦ 重政勇介、橋谷光、Voltage dependency of slow waves in smooth muscle cells of the guinea pig prostate、第90回日本生理学会大会、2012年3月30日、松本市
- ⑧ Hashitani H、Interstitial cells (pericytes) in the urothelium of the bladder that control the microvasculature、The joint ASCEPT (Australasian Society of Clinical and Experimental Pharmacologists and Toxicologists)-AuPS (Australian Physiological Society)-HBPRCA scientific meeting (招待講演)、2011年12月7日、パース(オーストラリア)
- ⑨ Hashitani H、Heterogeneity and function of interstitial cells in the lower urinary tract、3rd National Symposium on Advances in Urogenital and Gut research (招待講演)、2011年12月3日、フリーマントル(オース

- トラリア)
- ⑩ 橋谷光、三井烈、高野博充、清水優希、膀胱粘膜下細静脈の自動性に関わる細胞、第4回排尿障害モデル動物研究会、2011年11月25日、静岡市
 - ⑪ 三井烈、橋谷光、マウス膀胱粘膜下に存在する傍血管間質細胞の機能形態学的解析、第58回中部日本生理学会、2011年11月1日、福井市
 - ⑫ 橋谷光、過活動膀胱の発症起点～粘膜下微小循環と間質細胞～、わかしやちリサーチセミナー（招待講演）、2011年9月28日、名古屋市
 - ⑬ 橋谷光、ミッシェルラム、リチャードラング、モルモット前立腺間質細胞の自発カルシウム濃度変化の性質第18回日本排尿機能学会、2011年9月17日、福井市
 - ⑭ 清水優希、高野博充、三井烈、橋谷光、ラット膀胱粘膜下細静脈の自動運動に対する液性制御機構、第18回日本排尿機能学会、2011年9月17日、福井市
 - ⑮ 重政勇介、橋谷光、モルモット前立腺平滑筋におけるスローウェーブ発生に関与する因子について、第18回日本排尿機能学会、2011年9月17日、福井市
 - ⑯ Hashitani H、Heterogeneity of interstitial cells in the urogenital tract: Putative aetiology of LUTS. Monash University Special Seminar（招待講演）、2011年8月10日、メルボルン（オーストラリア）
 - ⑰ 橋谷光、「尿路間質細胞の機能」、第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会、シンポジウム「内臓平滑筋組織に分布する各種細胞の役割、機能と起源」（招待講演）、2011年3月30日 横浜市
 - ⑱ 橋谷光、尿路間質細胞の多様性と機能、久留米大学解剖学大学院セミナー、2011年1月28日、久留米市
 - ⑲ 橋谷光、Heterogeneity and Function of Interstitial Cells in the Urinary Tract ~Putative aetiology of LUTS～、福岡大学生理学公開セミナー（招待講演）、2010年11月12日、福岡市
 - ⑳ 橋谷光、ウサギ尿道 ICC 様細胞の自発細胞内カルシウム動態における核周囲ミトコンドリアの役割、第17回日本排尿機能学会、2012年10月1日、甲府市
 - ㉑ 橋谷光、Interstitial cells in the urinary tract: Cooperation of endoplasmic reticulum and mitochondria in generating spontaneous activity、旭川医科大学生理学学術講演（招待講演）、2012年8月17日、旭川市

- ㉒ 橋谷光、「ラット膀胱粘膜下微小血管の収縮特性」、第52回日本平滑筋学会総会、シンポジウム「過活動膀胱(OAB)の基礎と臨床」（招待講演）、2010年7月1日、仙台市
- ㉓ 橋谷光、ウサギ尿道 ICC 様細胞の自発細胞内カルシウム動態における核周囲ミトコンドリアの役割、第87回日本生理学会大会、2012年5月19日、盛岡市

〔その他〕

http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/physioll1.dir/JU_Suppl_videos/Suppl_video.html

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5381.2012.02125.x/supinfo>

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・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・名誉教授
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・講師
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

三井 烈 (MITSUI RETSU)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：90434092

(3) 連携研究者

小室 輝昌 (KOMURO TERUMASA)
早稲田大学・人間科学学術院・名誉教授
研究者番号：20037386