

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591798

研究課題名(和文) 共培養した膀胱上皮細胞と膀胱知覚神経細胞のクロストーク解析

研究課題名(英文) Elucidation of cross-interaction between bladder urothelial cells and sensory neurons innervating the urinary bladder in co-culture system.

研究代表者

松吉 ひろ子 (Matsuyoshi, Hiroko)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10448772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱知覚神経と膀胱上皮の相互作用を調べる実験系確立のため、膀胱分布神経の視覚化、膀胱知覚神経培養法、膀胱上皮細胞培養法を確立した。さらに、培養膀胱上皮細胞に機械刺激を与えると同一シャーレ中の周囲の膀胱上皮細胞に興奮が伝達されるという特性を、カルシウムイメージ法を用いて明らかにした。また、排尿機能制御機構解明による排尿・蓄尿障害に対する新しい治療標的発見を目的に、膀胱知覚神経細胞を有するレベルの後根神経節のC線維知覚神経細胞体での、排尿に関与するAタイプカリウムチャネルの基となるKv4および修飾サブユニットの発現を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, the procedures for visualization and culture of sensory neurons innervating the urinary bladder and for culture of bladder urothelial cells have been established. In addition, the transmission of excitation in response to mechanical stimuli from one cultured urothelial cell to surrounding urothelial cells in culture system was characterized using calcium imaging techniques. Also, in order to elucidate the mechanisms underlying autonomic regulation of bladder function and detect new therapeutic target for bladder dysfunction including overactive bladder, expression of Kv4 pore-forming and auxiliary subunits, which constitute A-type potassium channels that participate in the control of micturition, was clarified in C-fiber afferent neurons from L6-S1 dorsal root ganglia, which contain bladder afferent neurons.

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：排尿機能 後根神経節 膀胱上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

膀胱上皮は尿中侵害物質の膀胱壁内への侵入を防ぐ働きに加え、上皮が受容した情報をアセチルコリン、一酸化窒素、神経成長因子、ニューロペプチドなどの神経伝達物質を放出することにより膀胱支配神経に伝達する機能を有していると考えられている。そして、その情報は上位中枢である脊髄、脳に伝えられ、遠心性神経経路を通じ膀胱、尿道、尿道括約筋等の協調運動を起こし、それらの結果としての尿排出をもたらす。研究代表者らは、これまで、膀胱支配神経での神経伝達物質や過分極活性化チャネル(HCN)のように活動電位に関与し、排尿機能に影響を与えるタンパク等の発現を証明し、特に過分極活性化チャネル阻害薬を生体ラット硬膜腔投与に投与することにより頻尿が改善することを明らかにするなど、新たな頻尿治療標的を示したが、複雑な生体システムでの限局した解析は難しく、上皮と神経の相互作用について明快な結果を得ることは困難であった。

2. 研究の目的

ラットより膀胱上皮、膀胱由来知覚神経細胞を有する L6-S1 レベルの後根神経節を採取・共培養し、上皮細胞と神経節細胞間の相互作用を調べることによって、排尿機能の自律神経制御機構の中でも、特に、知覚制御機構の直接的解明をすすめ、過活動膀胱等の排尿・蓄尿障害に対し現在行われている治療の強化および新しい治療標的の発見に結びつける。

3. 研究の方法

(1) 膀胱支配神経の可視化

イソフルラン麻酔下の Wistar または Sprague Dawley ラットを開腹し、露出させた膀胱の壁全周に 30 ゲージ針付きシリンジを用いて 4% Hydroxystilbamidine (Fluoro Gold : FG)(逆行性神経標識物質) 20 μ L を注入し閉創、その後、1 週間通常飼育する。

(2) 膀胱知覚神経の培養

イソフルラン麻酔下で、背中切開により下部腰椎から仙骨上部を露出させ、さらに、椎骨を砕いて脊髄を露出させ、脊髄レベルを確認した上でラット膀胱由来知覚神経の細胞体の集まる L6、S1 レベルの後根神経節(DRG)を露出させる。ラット頸動脈切断による瀉血を行った後、L6、S1 レベルの DRG をすばやく採取し、培養液に移す。取り出した DRG の髄鞘を顕微鏡下で注意深く取り除く。この神経節を蛋白分解酵素(トリプシン)、コラーゲン分解酵素、DNA 分解酵素を含む培養液に移し、35 で酵素処理し知覚神経細胞を単離し、馬血清、牛胎児血清、グルタミン酸塩を含む培養液中で初代培養する。

(3) 膀胱上皮細胞の培養

イソフルラン麻酔下ラットの膀胱を MEM 溶液中に摘出し、膀胱を開き上皮側が露出するよう組織を伸展・固定する。この状態の組織に、デイスパーゼを作用させ、膀胱上皮をこそげとる。さらに、トリプシンを加え 37 で 20 分間作用させ、ペニシリン・ストレプトマイシン・アンホテリシン B を含む MEM 培養液で洗浄し、上皮細胞用培養液(keratinocyte serum-free medium)に交換して 37 で培養する。

(4) 膀胱知覚神経と膀胱上皮細胞の共培養

上皮細胞用培養液にて培養中の膀胱上皮細胞に膀胱知覚神経を含む L6、S1 位後根神経節細胞を加え、膀胱上皮細胞培養条件で共培養する。

(5) 刺激伝達測定

底面がガラスで出来た測定用培養皿で培養した膀胱上皮細胞に最終濃度 2 μ M になるよう fluo 3-AM を加え 37 でさらに 30 分培養する。培養液を HEPES 緩衝液に置換し、デジタルイメージングシステム AQUACOSMOS を用いて、ガラスピペットによる細胞への物理刺激後のカルシウムの発現・移動を fluo 3-AM を 488 nm 光で励起し、515-565 nm の光を観察することにより観察する。

(6) チャネルの発現

ラットを 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した後、L6、S1 位の後根神経節を採取し、凍結させ、厚さ 10 μ m の組織スライドを作成する。これに抗 Kv 抗体を反応させて蛍光法、DAB 法で Kv を検出する。

ジゴキシゲニンで標識された Kv4.1、Kv4.3、修飾サブユニット DPP6 および DPP10 の RNA プローブを作成し、in situ hybridization 法を用いてそれぞれの mRNA の発現を調べる。

4. 研究成果

(1) 膀胱支配神経の可視化

逆行性神経標識物質である 4% Hydroxystilbamidine を膀胱壁に注入されたラット後根神経節組織を観察すると、膀胱由来知覚神経細胞を有する L6、S1 位の後根神経節において、標識された神経の細胞体が認められた(図 1)。また、4% Hydroxystilbamidine を注入されたラットの後根神経節を培養すると膀胱に分布する神経のみで発色するので、パッチクランプ等に応用すれば、膀胱由来神経のみを標的として実験が可能となる。

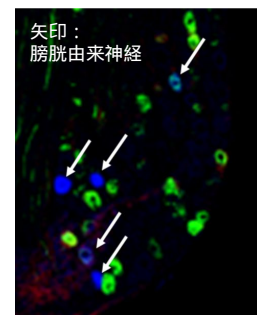


図 1 L6 後根神経節に存在する膀胱由来神経

(2) 膀胱知覚神経の培養

トリプシン、コラーゲン分解酵素、DNA 分解酵素で処理することにより、後根神経節神経細胞を単離し、培養系を確立することができた(図2)。この単離神経細胞は、培養液を工夫することにより、電気生理測定に 응용が可能である。

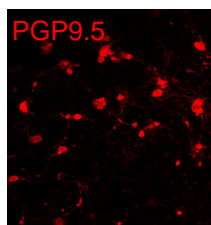


図2 後根神経節神経細胞

(3) 膀胱上皮細胞の培養

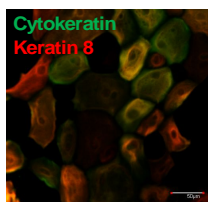


図3 初代培養膀胱上皮細胞

ディスペラーゼ、トリプシン処理と上皮系細胞用培養液の使用により、膀胱上皮の単離が可能となった。培養された細胞の種類を確認するために行った抗ケラチノサイト抗体による染色で

は、培養された細胞で反応が陽性であった(図3)。

(4) 膀胱知覚神経と膀胱上皮細胞の共培養

培養中の膀胱上皮細胞に膀胱知覚神経を加えて、上皮細胞条件での共培養を試みたが、刺激実験で安定した結果を得られる系としては確立していない。

(5) 細胞刺激伝達測定

カルシウムイメージ法を用いてシャーレ中の1個の膀胱上皮細胞に機械刺激を与えると、同シャーレ中の周囲の膀胱上皮細胞に興奮が伝達されるという現象を観察した。この結果より、膀胱上皮に入力した痛み等の刺激が膀胱上皮の反応として増幅され、そのために痛み等の感覚を強く感じる可能性がある可能性も否定できない。さらに、膀胱上皮のみではなく、知覚神経細胞と知覚神経細胞、知覚神経細胞と膀胱上皮細胞、更には、知覚神経細胞と神経膠細胞様細胞との相互作用を研究することにより排尿機能の自律神経制御機構の解明に繋がると考えられる。

(6) チャネルの発現

後根神経節における A タイプカリウムチャネルの発現

ラットの後根神経節では、C 線維知覚神経細胞体で Kv4.3 蛋白発現が認められたが、Kv4.2 の発現は認められなかった(図2)。加えて、Kv4.3 mRNA の発現も C 線維知覚神経細胞体にも認められた。しかし、Kv4.1 mRNA の発現は認められなかった。これらの結果より、後根神経節の知覚細胞では Kv4.3 が細胞の興奮を抑制するよう作用する A タイプカリウムチャネルを構成し、細胞の興奮性に影響を与えていると考えられる。

A タイプカリウムチャネルを構成する修飾サブユニット KChIP(Kv channel interacting protein) および、DPP(Dipeptidyl-related proteins) の発現

ラット後根神経節では KChIP3 の発現が認められたが Kv4.3 との共発現は認められなかった(図4)。また、後根神経節神経細胞の70%以上に DPP6 mRNA の発現が認められた。一方、DPP10 は小型から中型細胞で発現が認められた。

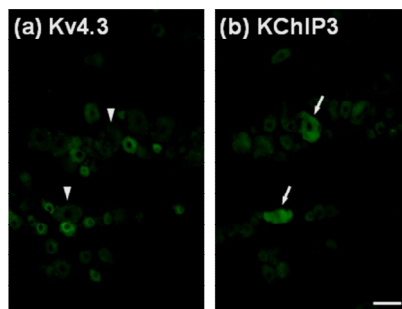


図4 A タイプカリウムチャネルを構成する Kv4.3、KChIP3 の後根神経節における発現(Life Sciences 91 (2012) 258-263 より)

膀胱由来知覚神経での Kv チャネルの発現

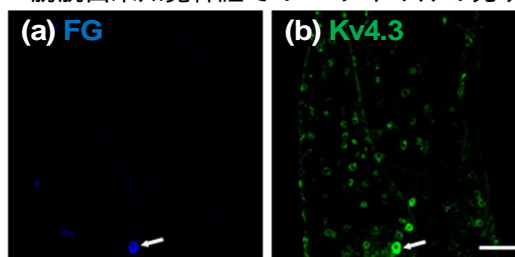


図5 膀胱由来知覚神経における Kv4.3 の発現

正常ラットの場合、膀胱由来知覚神経の中で Kv4.3 を発現する細胞の割合は大きくない(図5)。しかし、膀胱が傷害された場合や上位神経損傷が起きた場合には、その発現量が変化し、神経活動に変化をもたらす可能性はある。

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 1 件)

1、Matsuyoshi H, Takimoto K, Yunoki T, Erickson VL, Tyagi P, Hirao Y, Wanaka A, Yoshimura N.

Distinct cellular distributions of Kv4 pore-forming and auxiliary subunits in rat dorsal root ganglion neurons.

Life Sciences 91(7-8):258-263. 2012.

doi: 10.1016/j.lfs.2012.07.007

査読あり

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松吉 ひろ子 (Matsuyoshi Hiroko)

奈良県立医科大学 医学部医学科 助教

研究者番号：10448772