

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659763

研究課題名(和文) 過活動膀胱発症起点におけるペリサイト多能性の役割

研究課題名(英文) Dysfunction of multipotent pericytes as the primary cause of overactive bladder

研究代表者

橋谷 光 (HASHITANI, HIKARU)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10315905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱粘膜下細静脈の壁細胞はIP3依存性の小胞体Ca²⁺遊離により自発細胞内Ca²⁺濃度変動を生じ、L型Ca²⁺チャネルの自己再生的性質に依存した電気的結合により細胞間同期性を維持している。細静脈の自発収縮は組織代謝産物の能動的ドレナージュに関わり、交感神経支配に加えて尿路上皮や排尿筋平滑筋などから放出される生理活性物質により制御される。細静脈壁細胞はNG2(-)/SMA(+)、毛細血管ペリサイトはNG2陽性(+)/-SMA陰性(-)、細動脈平滑筋はNG2(+)/SMA(+)であり、細静脈壁細胞は細動脈および毛細血管壁細胞とは異なる発生起源ないし過程から生じることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mural cells in bladder suburothelial venules exhibit spontaneous Ca²⁺ transients arising from IP₃-mediated Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum. Electrical coupling depending on the regenerative nature of L-type Ca²⁺ channels play a critical role in maintaining intercellular synchrony amongst mural cells. Spontaneous venular constrictions contribute to active drainage of tissue metabolites, and appear to be regulated by sympathetic innervations as well as bioactive substances released from urothelium and detrusor smooth muscle. Mural cells in suburothelial microvasculature consist of NG2(-)/αSMA(+) venular mural cells, NG2(+)/αSMA(-) capillary pericytes and NG2(+)/αSMA(+) arteriolar smooth muscle cells, suggesting that the origin or process of differentiation of venular mural cells may be distinct from that of mural cells in capillary or arteriole.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：ペリサイト 微小循環 自動運動 組織酸性化 過活動膀胱

1. 研究開始当初の背景

過活動膀胱の診断基準であり、病態発症の起点となる尿意切迫感¹は知覚神経C線維を介した求心性信号の亢進により起こると考えられる。しかし正常な尿意を生じる細胞間情報伝達、すなわち尿路上皮由来ATPによるA線維のP2X受容体刺激から、C線維を介した尿意切迫感にスイッチする過程および機構については未だ解明されていない。C線維への信号入力には尿路上皮細胞、上皮間質細胞、平滑筋細胞からの液性因子、機械的刺激に加えて組織酸性化の関与が示唆されている。その背景には尿路上皮下の微小循環障害による細胞代謝障害が深く関与していると考えられる。尿路上皮下の細静脈は自発収縮を発生して微小循環、とりわけ静脈ドレナージの維持に関わることが示唆されている。自発収縮の発生に重要な役割を果たしているペリサイトの生理機能を、細胞内カルシウム動態とイオンチャネルの特性に着目して解明することは、尿路上皮下微小循環の生理病態機能の理解につながる。また代謝性病態におけるペリサイトの多能性による間質細胞、平滑筋細胞への分化・増殖の可能性について検討をすることにより、膀胱壁リモデリングの時間的および空間的過程が明らかになる。

2. 研究の目的

細静脈壁に存在するペリサイトの収縮特性と多能性に着目して過活動膀胱の発症起点を解明し、尿流出路閉塞、加齢・生活習慣病に伴う細胞代謝障害を起点とする過活動膀胱の病態を解明することを目的とする。またペリサイトの機能を制御することにより粘膜下循環障害の改善、予防および膀胱壁リモデリング抑制を目指す新たな治療戦略を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

膀胱粘膜下ペリサイトの機能特性の検討

(1) 細胞内カルシウム(Ca^{2+})動態 (*in situ* 組織標本)

細胞内 Ca^{2+} 蛍光指示薬(Fluo-4 ないしFluo-8)を負荷した粘膜下組織標本においてペリサイトの細胞内 Ca^{2+} 動態を可視化し、細静脈平滑筋細胞の Ca^{2+} 信号との時間的および空間的同期性について検討した。また経壁神経刺激、外因性の神経および尿路上皮細胞由来の生理活性物質によるペリサイトの Ca^{2+} 動態の修飾について調べた。

(2) 電気生理学的特性 (*in situ* 組織標本)

粘膜下組織標本を用いて細胞内電位記録を行い、ペリサイトの細胞内 Ca^{2+} 動態に対応

する膜電位変化を記録した。細胞内 Ca^{2+} 蛍光指示薬によりあらかじめ細胞形態によりペリサイトを同定、あるいは電極から蛍光色素を注入することにより平滑筋細胞との識別を試みた。自発膜電位変化に対する経壁神経刺激、内皮依存性因子および各種イオンチャネル開口薬・阻害薬の効果を検討した。

(3) 新鮮単離ペリサイトの機能的研究

酵素処理により単離した細胞群においてペリサイトと平滑筋細胞を形態および収縮性により識別、細胞内 Ca^{2+} 蛍光指示薬(Fluo-4)を負荷して細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動を可視化することを試みた。またパッチクランプ法を導入し、新鮮単離ペリサイトの膜電流形成に関わるイオンチャネルの解析、細胞内 Ca^{2+} 濃度変動との関連の検討を試みた。

(4) 電顕および蛍光免疫染色

透過および走査電子顕微鏡観察によりペリサイトを形態学的に血管平滑筋および内皮細胞、さらには傍血管線維芽細胞と識別し、また細静脈、毛細血管および細動脈におけるペリサイトの分布と形態の違いについて検討した。

集束イオンビーム走査電子顕微鏡(FIB/SEM)により微小血管壁構築におけるペリサイトの3次元分布および形態の解析を行った。

免疫蛍光組織染色によりペリサイトと血管平滑筋(平滑筋アクチン)および間質細胞(Kit、vimentin、Anoctamin-1)、線維芽細胞(PDGFR、SK3)との比較を行った。知覚神経とペリサイトの解剖学的関係について、免疫蛍光組織染色(cGRP、サブスタンスP)を用いて検討した。

(5) 2型糖尿病および加齢モデルマウスにおけるペリサイト機能

糖尿病網膜病変の形成において重要な役割を果たしているペリサイトの、膀胱粘膜下微小循環における機能変化を調べるため2型糖尿病モデル(db/db)マウスを用いて実験を行った。

4. 研究成果

(1) マウス膀胱粘膜下細静脈ペリサイトの機能特性

マウス膀胱尿路上皮下組織(以下、粘膜下組織)に分布する細静脈の機能および形態的特性について検討を行った。既に報告されているラット膀胱粘膜下の細静脈と同様(Hashitani et al., 2011, J.Urol., 185:2382)、マウス粘膜下細静脈は1分間に約5回の周期的な自発収縮を有しており、その発生は小胞体からのカルシウム(以下、 Ca^{2+})遊離と電位依存性L型 Ca^{2+} チャネルを介した

Ca²⁺流入に依存していた。しかしラットでは自発細胞内Ca²⁺濃度上昇を示す細胞は主に平滑筋細胞であるのに対して、マウス粘膜下細静脈ではペリサイトのネットワークが自発細胞内Ca²⁺濃度上昇を発生していた。

自発細胞内Ca²⁺濃度上昇の細胞間同期性はL型Ca²⁺チャンネルに依存しており、その発生には小胞体からのPLCおよびIP₃に依存したCa²⁺遊離とともに、Ca²⁺貯蔵部位活性化型Ca流入が必須であることが示された。また小胞体のCa²⁺ポンプの機能はミトコンドリアにおけるATP産生と密に連携していた。

マウス粘膜下細動脈および細静脈には交感神経、副交感神経およびサブスタンスP、CGRPを含む一次求心性神経が分布しており、経壁神経刺激により細動脈は潜時の短い収縮を起こすのに対して細静脈では1~2秒の潜時の後に径の細い部位では一過性の収縮に続く自発収縮の抑制が、径の大きな部位では弛緩反応のみが認められた。収縮反応は受容体を介した交感神経性収縮であり、受容体阻害条件下では作動性弛緩を生じた。この弛緩反応はニトロアルギニンにより抑制されたことから一酸化窒素を介して生じると考えられた。

10週齢の2型糖尿病モデル(db/db)マウスにおいては粘膜下細静脈の自動性に明らかな障害は認めなかった。

(2) ラット膀胱粘膜下細静脈の神経性および液性制御

ラット膀胱粘膜下細静脈の自発収縮は経壁神経刺激により受容体依存性に促進、受容体依存性に抑制され、 β 3受容体作動薬によっても抑制されたが、これら抑制反応一酸化窒素(NO)合成阻害により抑制された。またCGRPはNO非依存性弛緩を、サブスタンスPは収縮を生じ、AChは細動脈を弛緩させる一方で細静脈では収縮反応を生じた。膀胱粘膜下の微小循環は交感神経のみならず求心性神経および尿路上皮由来のAChによって制御されていると考えられた。またATPおよびADPは一過性収縮に引き続いて細静脈の自発収縮の抑制と拡張を生じ、一方、メチレンATPIは収縮のみを生じたことから、尿路上皮由来のATPIは細静脈に対しておそらくP2Y受容体を介した弛緩作用を有することが示唆された。

排尿筋平滑筋において産生され、膀胱壁伸展により遊離される内因性弛緩物質である副甲状腺関連蛋白(PTHrP)はラット膀胱粘膜下細静脈の自発収縮を抑制し血管径の拡張を生じたが、壁細胞の細胞内Ca²⁺濃度上昇に対する抑制効果は明らかではなく、収縮蛋白のカルシウム感受性を低下させることにより弛緩を生じると考えられた。

(3) マウス膀胱粘膜下細静脈ペリサイトの形態特性

透過および走査電子顕微鏡による構造解析によっても、マウス粘膜下細静脈壁は内皮細胞とペリサイトのみで構成され平滑筋を欠くことが明らかになった。FIB/SEM解析によりペリサイトと内皮細胞および血管周囲線維芽細胞との3次元構造関係が明らかになった。

蛍光免疫染色により粘膜下細静脈ペリサイトは平滑筋アクチン(α -SMA)抗体により染色され、細胞体から伸びる複数の突起によりネットワークを形成していたが、これまで膀胱壁の間質細胞での発現が報告されているKitおよび血小板由来成長因子(PDGFR)では標識されなかった。また毛細血管のペリサイトマーカーとして知られるNG2コンドロイチン硫酸(NG2)には陰性であり、PDGFRにも特異的な染色性を示さなかった。ペリサイトが強い収縮性を有することと考え合わせると、その表現型はむしろ平滑筋型であると考えられた。

(4) マウス膀胱粘膜下微小血管壁細胞の表現型と起源

マウス膀胱粘膜下の毛細血管ペリサイトはNG-2陽性(+)/ α -SMA陰性(-)、細静脈ペリサイトはNG2(-)/ α -SMA(+)、細動脈平滑筋はNG2(+)/ α -SMA(+))であり、マウス粘膜下細静脈の壁細胞は血管径の増加に伴い α -SMA陽性のペリサイトから平滑筋に移行し、いずれも同じ細胞内機序により自発細胞内Ca²⁺濃度上昇を発生することからペリサイトから平滑筋への表現型移行が示唆された。

NG2-DsRedトランスジェニックマウスを用いた検討においても、毛細血管ペリサイトはDsRed蛍光を強発現し、細動脈平滑筋細胞もDsRed蛍光を発現していたが、自発細胞内Ca²⁺濃度上昇を示す細静脈のペリサイトにはNG2-DsRedを全く認めなかった。形態的には平滑筋細胞よりもペリサイトに類似する細静脈壁細胞は細動脈および毛細血管の壁細胞とは異なる発生起源ないし過程を有する可能性が示唆された。またPDGFR β -eGFPトランスジェニックマウスにおいて膀胱粘膜下血管壁に沿ってPDGFR β 陽性細胞を認めた。しかしこれらPDGFR β 陽性の傍血管線維芽細胞は自発細胞内Ca²⁺濃度上昇を示さなかった。

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 9 件)

Shigemasa Y, Lam M, Mitsui R, Hashitani H. Voltage-dependency of slow wave frequency in the guinea-pig

prostate. *J Urol.*、査読有、2014、doi: 10.1016/j.juro.2014.03.034.

Lang RJ, Tonta MA, Takano H, Hashitani H. Voltage-operated Ca^{2+} currents and Ca^{2+} -activated Cl^- currents in single interstitial cells of the guinea pig prostate. *BJU Int.*、査読有、2014、doi: 10.1111/bju.12656.

Shimizu Y, Mochizuki S, Mitsui R, Hashitani H. Neurohumoral regulation of spontaneous constrictions in suburothelial venules of the rat urinary bladder. *Vascul Pharmacol.* 60:84-94、査読有、2014、doi: 10.1016/j.vph.2014.01.002.

Tamada H, Hashitani H. Calcium responses in subserosal interstitial cells of the guinea-pig proximal colon. *Neurogastroenterol Motil.* 26:115-23、査読有、2014、doi: 10.1111/nmo.12240.

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*、154:2058-2068、査読有、2013、doi: 10.1210/en.2012-2142.

Mitsui R, Hashitani H, Immunohistochemical characteristics of suburothelial microvasculature in the mouse bladder. *Histochem Cell Biol.*、140: 189-200、査読有、2013、doi: 10.1007/s00418-012-1074-5.

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.*、170:968-977、査読有、2013、doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02125.x.

Nguyen MJ, Angkawaijawa S, Hashitani H, Lang RJ. Nicotinic receptor activation on primary sensory afferents modulates autorhythmicity in the mouse renal pelvis. *Br J Pharmacol.*、170:1221-32、査読有、2013、doi:10.1111/bph.12395.

Mitsui R, Miyamoto S, Takano H, Hashitani H. Properties of submucosal venules in the rat distal colon. *Br J Pharmacol.* 170:968-77. 査読有、2013、doi:10.1111/bph.12347.

〔学会発表〕(計 12 件)

Hashitani H: "Role of T-type Ca^{2+} channel in generating spontaneous Ca^{2+} transients in pericytes of the guinea-pig stomach" 第91回日本生理学会大会(招待講演)、2014年3月16日、鹿児島市

Hashitani H、Functional and morphological diversity of interstitial cells in the urinary tract、Joint Meeting ISAN-EFAS 2013 (招待講演)、2013年07月29日~2013年08月02日、ギーセン(ドイツ)

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、2013年4月15日、札幌市

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

Hashitani H, Mitsui R, Shimizu Y, Higashi R, Nakamura K. Functional and Morphological Properties of Pericytes in Bladder Suburothelial Venues: 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

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)

Hashitani H: "Function of pericytes in regulating suburothelial microcirculation of the bladder" 第89回日本生理学会大会(招待講演)、2012年3月30日、松本市

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)

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)

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

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

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～、わかしゃちリサーチセミナー(招待講演)、2011年9月28日、名古屋市

〔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〕

なし

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

高野 博充 (TAKANO HIROMICHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70410313

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