

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462526

研究課題名(和文) 排尿機能に対する末梢グリア(神経膠)細胞の作用

研究課題名(英文) Control of the micturition by the satellite glial cells of the dorsal root ganglion neurons innervating the urinary bladder

研究代表者

松吉 ひろ子 (Matsuyoshi, Hiroko)

関西学院大学・理工学部・助教

研究者番号：10448772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：正常ラット後根神経節(DRG)でのプレイオトロフィン(Ptn)タンパク質の発現は、mRNAの発現と同様、神経膠細胞特異的であった。膀胱炎モデルでも、その発現は神経膠細胞に優位であり、正常・対照処置群との差異を証明することはできなかった。そこで、ウエスタンブロット法を用いて膀胱支配神経の分布するL6 DRG、および、分布のないL4でのPtnタンパク質発現を比較したところ、膀胱炎モデルではL6 DRGで発現が増加し、L4 DRGではその変化が小さいことが明らかとなった。以上より、膀胱損傷によるL6 DRG衛星細胞でのPtnタンパク質の発現増加が排尿機能に影響を及ぼす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Expression of pleiotrophin (Ptn) protein was detected only in the glial satellite cells in the normal rat dorsal root ganglion (DRG) as like expression of mRNA. In addition, expression of Ptn protein in the cystitis model L6 DRG containing the neural cell bodies innervating urinary bladder was also shown mainly in the glial cells. Moreover, expression level of Ptn protein in L6 DRG containing the neurons innervating urinary bladder was increased by the bladder cystitis although expression level in L4 DRG unconnected the urinary bladder was stayed low. As a consequence, pleiotrophin might control to micturition and might be new therapeutic target for the voiding dysfunction.

研究分野：排尿生理学

キーワード：排尿障害 知覚神経 神経膠細胞

1. 研究開始当初の背景

下部尿路機能である蓄尿と尿排出は、膀胱と尿道の相互作用によって引き起こされる。この機能の発現には、尿貯留に伴う膀胱壁の伸展によって直接膀胱の知覚神経が刺激される仕組みや、尿中物質や膀胱伸展刺激に反応して膀胱上皮が放出したアセチルコリン、一酸化窒素、神経成長因子、ニューロペプチドなどの化学物質が膀胱知覚神経を調節する機序があり、それらの情報が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、尿排出をもたらす。

プレイオトロフィン (Pleiotrophin : PTN) は、ヒトでは第 7 染色体長腕 33 (7q33) にある 168 アミノ酸残基(分泌型は 136 アミノ酸残基)の蛋白質で、中枢神経系では神経細胞、アストロサイト(星状膠細胞)に発現する発生分化に関わる成長因子である。PTN は、この他に、神経突起伸長活性、細胞の分化増殖促進活性、線溶亢進活性、骨細胞の分化促進活性、血管新生活性などの作用をもち、中枢神経損傷モデル動物では、損傷部に近接した皮質の神経細胞体に強い発現が認められ、障害修復に関与することが示されている。また、この PTN の mRNA は、末梢神経系である後根神経節においては神経細胞より神経膠細胞である衛生細胞やシュワン細胞で有意な発現を認めるとの報告がある。よって、膀胱支配神経機能破綻時の PTN 動態を調べることにより、神経膠細胞による蓄・排尿機構の調節機構を証明できれば、新たな排尿障害治療に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

プレイオトロフィンは末梢神経においても、神経保護、損傷時の軸策再生促進、神経突起伸長ガイダンス、神経筋接合部の再構築などに関与する可能性があるといわれているが、膀胱支配神経障害時の作用についての知見はない。よって、膀胱機能破綻とプレイオトロフィンの動態変化との関連を調べることにより、神経と神経膠細胞の相互作用による蓄・排尿機構調節について考察し、その結果から、新たな排尿障害治療標的を探る。

3. 研究の方法

膀胱炎モデルラットの作製

イソフルラン麻酔下の 200 ~ 250 g Wistar または Sprague-Dawley ラット尿道より挿入した PE-50 カテーテルより 0.4 M HCl 0.2 mL を膀胱に注入する。90 秒後にこれを排出させ、生理食塩水で洗浄した。その後 1 週間通常飼育をした。

免疫染色用ラット組織採取

イソフルラン麻酔下のラットを 4 パーセントパラホルムアルデヒドで灌流固定し、一晚後固定した後根神経を 10、20、30 パーセントスクロース入りリン酸バッファー処理し、凍結した。凍結組織をクリオスタットで薄切し、スライドグラスに貼り付け免疫染色用資料を作成した。

内在性ピオチンの影響を省くための 3 パーセント過酸化水素水処理した試料に抗 PTN 抗体 (ab79411) を反応させ、ペルオキシダーゼ反応による DAB 発色により PTN の発現を検出した。

ウエスタンブロット

イソフルラン麻酔下のラットより組織を採取しタンパク質抽出緩衝溶液 (10 mM トリス、0.32 M スクロース、150 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA、1 mM DTT、0.5% NP-40) 中で組織を破碎した。4 下、15,000rpm で 30 分間遠心し上清をウエスタンブロット用試料とした。

各試料(総タンパク量 10 µg)を 15%PAGE ゲルで分離し、PVDF 膜に転写した。これに抗プレイオトロフィン抗体を作用させ、ECL で検出した。

in situ ハイブリダイゼーション

正常ラット脳または後根神経節より抽出した RNA に逆転写酵素を作用させラット cDNA ライブラリーを作製し、プレイオトロフィン、およびその受容体である antiproteoglycan-type protein tyrosine phosphatase zeta/beta(Rptp ζ/β) Anaplastic lymphoma kinase(Alk) Syndecan 3(Sdc3) 遺伝子合成用プライマーとともに PCR により遺伝子を増幅しプラスミドに挿入し形質転換した大腸菌を培養することにより目的遺伝子を増やした。その後抽出したプラスミド DNA を直鎖型にし、RNA 合成酵素を用いて各遺伝子 (mRNA) 検出用のアルカリフォスファターゼ標識した RNA プローブを合成した。

それぞれの遺伝子の sense-、antisense-鎖用プローブをハイブリダイゼーション用緩衝溶液中で試料と反応させ、アルカリフォスファターゼ反応 NBT/BCIP 発色により遺伝子の存在を検出した。

パッチクランプ

培養用クリーンベンチ、CO₂ インキュベーターを実験室に新たに設置した。膀胱支配神経を可視化するための逆行性神経標識物質、Hydroxystilbamidine (Fluoro Gold) を膀胱壁に注入したラットの後根神経節を採取し、トリプシン、コラーゲン分解酵素、DNA 分解酵素処理して細胞を単離し、さらに、30% パーコールによる密度遠心分離により神経と衛生細胞を分離し、それぞれを馬血清、牛胎児血清、グルタミン酸塩などを含む培養液

中で初代培養した。

蛍光顕微鏡(CKX41、落射式蛍光装置付属)をシールド箱内に設置し、顕微鏡下で測定できるように、パッチクランプ用増幅器(Axopatch 200B)、デジタル変換機(Digidata 1322A)、データ取込解析ソフトウェア(pCLAMP:パーソナルコンピュータ上で操作)を設置・接続し(図1)実際の測定が行えるようノイズ除去等装置を調整した。加えて、ホールセル測定用実験プロトコルを準備した。なお、マニピュレーションシステム

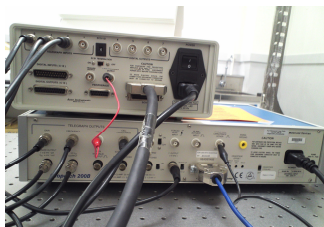
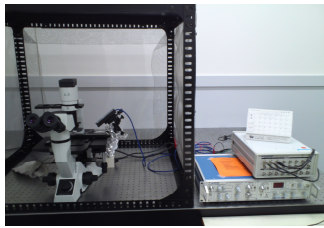


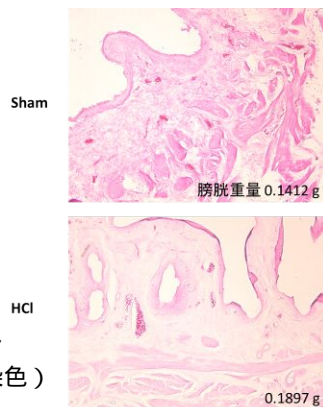
図1 パッチクランプ装置

は簡易的な手動のものを借用し、ガラス電極(Filament/Fire Polished Standard Glass Capillaries, 4 in., 1.5 / 0.84 OD/ID)はマイクロピペットプーラー(P-97 Sutter Ins.を用いて製作した。

4. 研究成果

0.4N HCl 膀胱内投与により作成したモデルラットでは膀胱重量の増加と粘膜変性を認めた(図2)。

図2 HCl 投与による膀胱粘膜の変性(ヘマトキシリン・エオジン染色)



これまでの研究で、末梢神経節では神経膠細胞のみにプレイオトロフィン mRNA が発現するという結果が得られていたが、今研究では、正常ラット後根神経節でのプレイオトロフィンタンパク質発現も、mRNA の発現と同様に、神経膠細胞特異的であることを明らかにした(図3)。

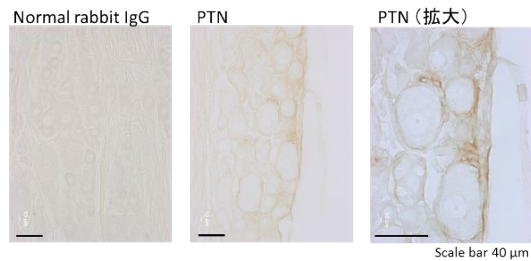


図3 正常ラット後根神経節におけるプレイオトロフィンタンパク質の発現

次に、膀胱炎モデル動物でのプレイオトロフィンタンパク発現について実験を行ったが、その発現は、正常ラット神経節同様、神経膠細胞に優位であり、正常、対照処置群との差異は免疫組織化学的には証明できなかった(図4)。

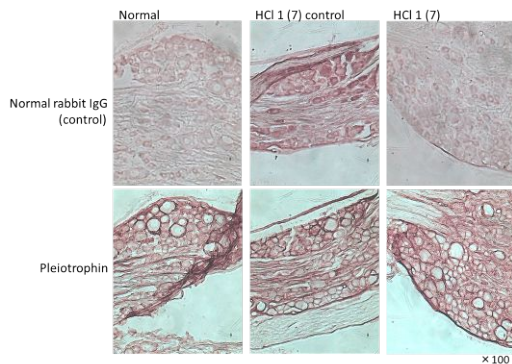


図4 膀胱炎モデルラット膀胱支配後根神経節におけるプレイオトロフィンタンパク質の発現

続いて、プレイオトロフィンタンパク質の発現量変化についてウエスタンブロット法を用いて考察した。膀胱炎モデルラットにおける膀胱支配神経の分布するL6位の後根神経節でのタンパク質の発現と支配神経の分布しないL4位での発現量とを比較したところ、L6後根神経節での発現量がL4後根神経節での発現量より多いことが明らかとなった(図5、6)。

さらに、プレイオトロフィンの作用発現経路についての知見を得るため、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いてラット後根神経節でのプレイオトロフィンとその受容体である Rptp ζ / β 、Alk、Sdc3 の mRNA 発現を調べた。実験を繰り返すことにより温度、時間等反応条件を検討したが、結果を得ることができなかった。その後、再実験を検討したが、設備・機器の問題が発生し、実験の継続が難しくなった。ただし、異動後の所属研究室では恒温器の新規購入など実験再開に向けての環境整備が進みつつある。

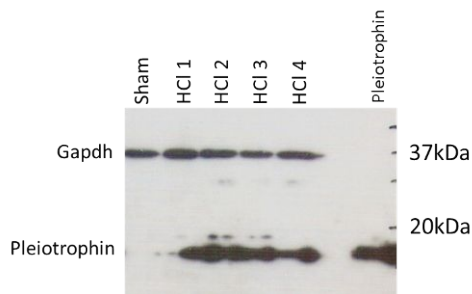


図5 膀胱炎モデルラット L6 後根神経節におけるプレイオトロフィンタンパク質の発現

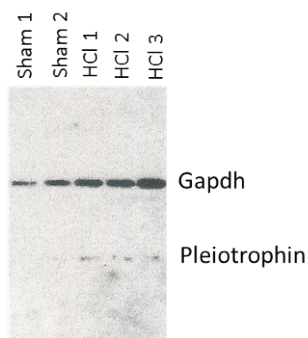


図6 膀胱炎モデルラット L4 後根神経節におけるプレイオトロフィンタンパク質の発現

パッチクランプ用の装置についても、前住地では購入に時間がかかり設置するに至らなかったが、現在は光学定盤が提供されるなど、研究環境が著しく改善され、装置自体も今後微調整は必要であるが、一応、使用可能な状態にできた。マニピュレーション装置は手動のものを準備したが、測定自体は可能であるものの、操作性が高いとは言い難く、電極操作に時間がかかるという欠点があり、この点については改善の必要がある。

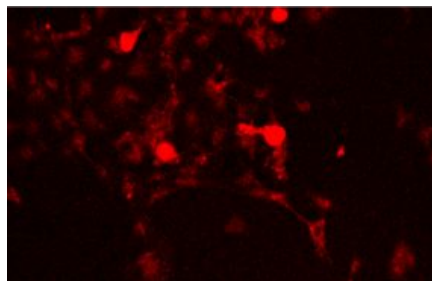


図7 後根神経節細胞の培養
(赤色：後根神経節知覚神経細胞)

一方、測定用細胞培養については、神経細胞培養は可能であった(図7)が、新しい実験環境での至適条件がはっきりせず、最適の環境を得る更なる努力が必要である。また、衛星細胞と神経細胞を分散するのが難しく、すべての衛星細胞を神経細胞から分離することができず、神経と衛星細胞の相互作用を検出するには至っていない。

今研究では、膀胱損傷時には、膀胱に分布し膀胱機能の調節に關与する知覚神経の細胞体が存在する後根神経節の衛星細胞のみプレイオトロフィンタンパク発現量が増加することを明らかにできた。故に、プレイオトロフィンタンパク発現量の増加が排尿機能に影響すると考えられ、この作用を調節することができれば排尿障害状態を緩和することになり、プレイオトロフィンが新たな治療標的となりうる可能性があることを示すことができたと考える。

しかしながら、この仮説をさらに確かなものにするためには、細胞培養技術を改良し神経と衛星細胞との相互作用を電気生理学手法で測定することによりプレイオトロフィンの生理機能への影響を明らかにする、膀胱内圧測定などの *in vivo* 実験による排尿機能への影響を明らかにする等の生理学的実験による証明が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 1 件)

Spec 2016

Matsuyoshi H, Hashimoto K, Ogawa N, Taketani A, Yoshimura N, Sato H
Raman study for detecting the change of property of DRG neurons innervating the urinary bladder.

Montreal (Canada). 29th June, 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松吉 ひろ子 (Matsuyoshi Hiroko)

関西学院大学 理工学部 助教

研究者番号：10448772

(2) 連携研究者

佐藤 英俊 (Sato Hidetoshi)

関西学院大学 理工学部 教授

研究者番号：10300873