

上皮細胞種に着目した間質性膀胱炎新規治療標的の探索

Department of Physiology and Pharmacology, University of Bristol

西川 信之

Bristol は排尿生理の基礎研究、臨床研究の両面において世界有数の施設である Bristol Urological Institute(BUI)を有する、世界でも有数の排尿分野の研究が盛んな都市である。

当研究室は筆者のイギリス着任と同時にできた新規の小さな研究室(主任教授、ポスドク×1(筆者)、大学院生×1)であるが、BUI および中枢神経を扱う研究室と密接に関連して共同研究する事で、排尿生理および排尿障害の病態を、基礎研究と臨床研究の両面、そして基礎研究において中枢神経系と末梢臓器(膀胱)の両面から統合的に研究する事を目指して設立された野心的な研究室である。

当研究室を主催する Christopher Fry 教授は、これまでに膀胱の生理機能において多数の先進的な研究成果を有し、現在は尿路上皮よりの神経伝達物質の放出、そして末梢神経機能への影響に関心を持って研究を進めている。

本研究は、膀胱機能制御における尿路上皮の機能を、尿路上皮のサブタイプに着目して in vitro に解析する事で、尿路上皮の神経伝達物質の放出において機能的中心となるサブタイプを同定することを目的にしている。最終的には頻尿を中心にする排尿機能異常の病態に対する新規アプローチとなることを目指している。

今年度は当研究室のセットアップ、実験系の確立から開始して、

1. Flow cytometry を用いた尿路上皮細胞のサブタイプごとの抽出系の確立、およびそのサブタイプ別の組織学的、機能的解析
2. 抗コリン剤不応性の過活動膀胱モデルとしての高齢マウスの、尿路上皮機能に関する基礎実験[1-3]を目的としている。

1. 尿路上皮細胞のサブタイプ別抽出

現時点で信用しうる、かつ効率的な尿路上皮のサブタイプ(basal, intermediate, umbrella cell)分別方法は確立されていない。そのため、最初のステップとして動物モデルを用いた尿路上皮細胞の分別、抽出系の確立を試みている。

まず3ヶ月齢ウサギ膀胱より尿路上皮組織を採取し、尿路上皮細胞の抽出を行った。当研究室においてモルモットで行われている尿路上皮細胞作成法[4, 5]を改変することで、充分量の細胞を抽出する事に成功した。

次に各サブタイプの推定量を検討するため、細胞径の検討を行った。当研究室では、以前目視での検討によりその分布を報告している[5]が、より客観的なシステムとして自動測定システムを用いて検討し、以前の結果と比較した。その結果、ウサギ尿路上皮細胞においても、先のモルモット細胞とほ

ほぼ同様の細胞径の分布を示している事が示された。(Figure 1)現在、さらにブタへの応用を検討している。

その上で、flow cytometry での分別を検討した。尿路上皮細胞の浮遊液を解析した結果、3種類の群に分別できた。(Figure 2)さらに二重鎖 DNA 染色を併用した結果、最小細胞の集塊とされた群(左下)は核を有さない細胞が大半を占めており、赤血球および破碎された細胞片の集塊と考えられた。(Figure 3)

現在、最終段階として、各集谷群の性質の同定を行うため、分化マーカーの発現解析の準備を行っている。

2. 老齢マウスにおける尿路上皮よりの ATP 放出量とその作用機序に関する検討

我々はすでにモルモットの尿路上皮が伸展刺激で ATP を放出することを示しており[6]、同手法のより小動物への適応、つまりマウスへの適応を検討している。ATP 放出の検討にマウス組織モデルを使うことは、このような神経伝達物質放出に関係する経路を検討する上で、ノックアウトマウスを使う可能性を開くため、非常に有用と思われる。

先の guinea pig に比べてそのサンプル重量の小ささのため、安定した結果を出すのに時間を要したが、徐々に安定した結果が出始めている。マウス膀胱壁に伸展刺激を加える事で ATP の放出を認め、数分の間に減少している事が示されている。(Figure 4) 今後検体数の増加とともに検討しうる結果が出ることを期待している。

(研究機関問い合わせの上、開示できないデータを報告から外しています。申し訳ありませんが、ご了承ください。)

1. Andersson KE, Schroder A: **[Changes in muscarinic receptors of the aging bladder].** *Urologe A* 2004, **43**(5):552-556.
2. Daly DM, Nocchi L, Liaskos M, McKay NG, Chapple C, Grundy D: **Age-related changes in afferent pathways and urothelial function in the male mouse bladder.** *J Physiol* 2014, **592**(Pt 3):537-549.
3. Sui G, Fry CH, Montgomery B, Roberts M, Wu R, Wu C: **Purinergic and muscarinic modulation of ATP release from the urothelium and its paracrine actions.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2014, **306**(3):F286-298.
4. McLatchie LM, Fry CH: **ATP release from freshly isolated guinea-pig bladder urothelial cells: a quantification and study of the mechanisms involved.** *BJU Int* 2014.
5. McLatchie LM, Young JS, Fry CH: **Regulation of acetylcholine release from guinea-pig bladder urothelial cells - potential role in bladder filling sensations.** *Br J Pharmacol* 2014.
6. Young JS, Matharu R, Carew MA, Fry CH: **Inhibition of stretching-evoked ATP release from bladder mucosa by anticholinergic agents.** *BJU Int* 2012, **110**(8 Pt B):E397-401.

Figure1. Cell diameter distribution of rabbit urothelial cell

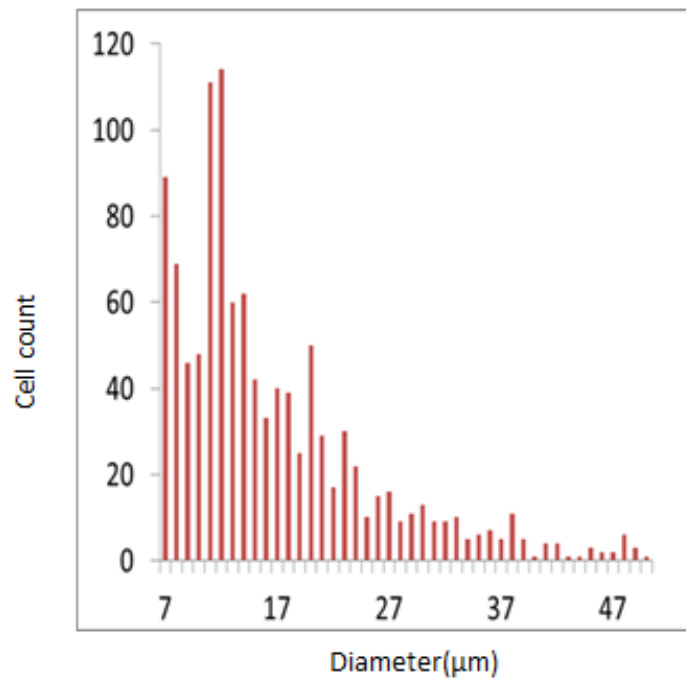


Figure2. Flow cytometry analysis of urothelial cell suspension

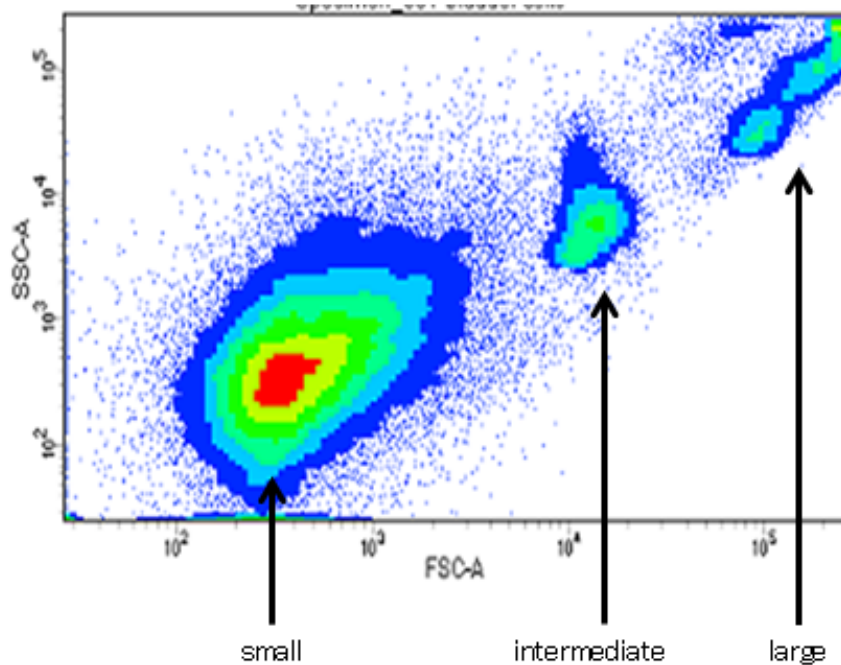


Figure3. The flow cytometry analysis with double strand DNA staining

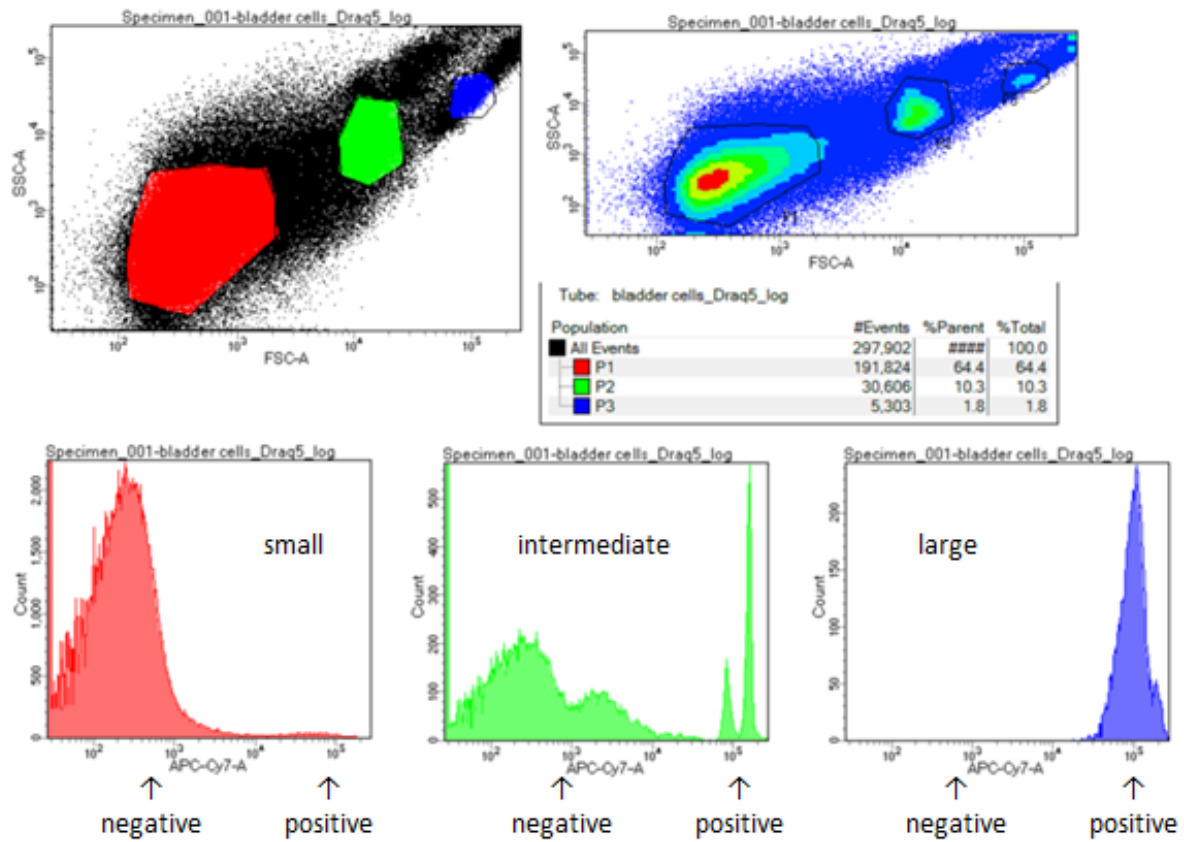


Figure4. ATP release from mouse bladder strip with stretch

