

様式 C-19
科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 5 月 30 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591882

研究課題名 (和文)

サイトカインのシグナル制御を基盤とした外尿道括約筋再生療法の開発

研究課題名 (英文)

Development of Regeneration Therapy of External Urethral Sphincter based on the Regulation of Cytokine Signaling Pathway

研究代表者

三股 浩光 (MIMATA HIROMITSU)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：60219714

研究成果の概要 (和文)：

前立腺全摘後や加齢に伴う腹圧性尿失禁では、外尿道括約筋の脆弱化が原因のひとつである。本研究はヒト外尿道括約筋の再生による新規の尿失禁治療法開発を目的として、ヒト外尿道括約筋衛星細胞を分離培養し、各種サイトカインの作用とシグナル伝達経路について検討した。

TNF- α は濃度依存的にヒト外尿道括約筋衛星細胞の増殖を抑制し、一部の細胞にアポトーシスを誘導した。また、抗 TNF- α 治療薬はこれらの作用を抑制しうることが示された。

Myostatin は骨格筋特異的増殖抑制因子であるが、ヒト外尿道括約筋は Myostatin を mRNA 及び蛋白レベルで発現している。Myostatin は濃度依存的にヒト外尿道括約筋衛星細胞の増殖を抑制し、Myostatin の阻害因子であるフォリスタチンは、これらの作用を阻害することが示された。抗 TNF- α 治療薬や Myostatin の阻害剤によって外尿道括約筋の再生が可能となり、腹圧性尿失禁の新たな治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Fragility of urethral rhabdosphincter is one of the causes for urinary stress incontinence following prostatectomy and in the elderly. To develop new treatment modality of urinary incontinence by regeneration of urethral rhabdosphincter, human satellite cells of urethral rhabdosphincter were separated and cultured to explore the effects of variety of cytokines on them and the signal transduction.

TNF- α dose-dependently suppressed the growth of satellite cells of human urethral rhabdosphincter and induced apoptosis in part, and anti- TNF- α drugs inhibited these effects. Myostatin, skeletal muscle-specific growth inhibiting factor, was expressed on mRNA and protein levels in satellite cells of human urethral rhabdosphincter. Myostatin suppressed their growth dose-dependently, and its inhibitor, Follistatin, reversed its inhibitory effect.

Regeneration of human urethral rhabdosphincter may be possible with anti-TNF- α drugs and Myostatin inhibitors and prove a novel therapeutic modality for urinary incontinence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：尿失禁、外尿道括約筋、骨格筋幹細胞、サイトカイン、シグナル伝達、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

損傷後の骨格筋再生には骨格筋衛星細胞が重要な役割を果たしている。骨格筋衛星細胞は単核で筋細胞膜と基底膜の間に介在し、骨格筋の幹細胞と考えられており、通常は静止状態にあり活動に乏しいが、筋組織に損傷や刺激が加わると活発に分裂・増殖して筋芽細胞から筋管細胞へと分化していく (Dev Biol 218:115, 2000)。損傷の急性期には IL-1 β や IL-6、TNF- α などの炎症に関連するサイトカインが局所で産生され、これらのサイトカインには細胞死を惹起して自己崩壊的な二次損傷を起こしたり、骨格筋幹細胞の増殖分化を阻害して、筋再生を阻害することが知られている。

一方、外尿道括約筋は横紋筋のひとつでありながら、四肢や骨盤内の横紋筋とは発生学的及び解剖学的に著しく異なっていることが知られている。マウスでは四肢や骨盤内の横紋筋は胎生14日で既に発生しているが、尿道周囲には平滑筋組織しか存在せず、新生仔以降に尿道平滑筋から分化転換によって外尿道括約筋が発生することが示されている

(Borirakchanyavatら J Urol, 1997)。したがって外尿道括約筋には四肢の横紋筋とは異なる細胞生物学的特徴を有している可能性があり、ヒト外尿道括約筋の増殖分化について研究することは極めて重要と思われるが、このような研究は国内外では全く行われていない。われわれは前立腺全摘除術の際に前立腺尖部に付着した微量の外尿道括約筋を採取して初代培養系より、骨格筋衛星細胞の指標である neural cell adhesion molecule (NCAM) に対する抗体を用いた magnetic cell sorting (MACS) 法によってヒト外尿道括約筋衛星細胞を分離培養法を確立した。この細胞は長期培養によって筋管細胞に分化するとともに、bone morphogenetic protein-2によって骨芽細胞に、さらに γ -リノレン酸によって脂肪細胞にも分化することより、多分化能を有することなどを確認している。さらにSV40のlarge T抗原を遺伝子導入して長寿化し、各種増殖因子の外尿道括約筋衛星細胞の増殖に及ぼす影響について検討した結果、IGF-IとHGFがMAPK経路のERK1/2をリン酸化して外尿道括約筋衛星細胞の増殖を促進することを明らかにしてき

た。そして外尿道括約筋細胞はこれらの増殖因子を産生し、無血清培地では抗HGF抗体および抗IGF-I抗体によって増殖が阻害されることより、これら増殖因子はオートクリン作用によってヒト外尿道括約筋衛星細胞の増殖を促進することを明らかにした(Sumino Y, et al. *Neurourol Urodyn.* 2007, 26:552-61)。

2. 研究の目的

われわれはヒト外尿道括約筋にも幹細胞が存在することを報告しており、この幹細胞の増殖分化および細胞死に対する各種サイトカインの作用を解明することを目的とした。さらにこれらのサイトカイン受容体に対する阻害剤や、シグナル伝達機構を阻害することによって、ヒト外尿道括約筋再生を促進する新たな尿失禁治療法の開発を目指した。

1) 炎症関連のサイトカインによるヒト外尿道括約筋衛星細胞の増殖抑制及びアポトーシス誘導

最近、Strasserらは加齢とともにヒト外尿道括約筋の横紋筋細胞がアポトーシスによって減少し、線維組織や脂肪組織に置換されていることを明らかにし、高齢者に多く見られる尿失禁の原因のひとつであることを示唆した(Lancet 1999, *J Urol* 2000)。加齢とともに外尿道括約筋の横紋筋細胞がアポトーシスを起こす機序は不明であったが、われわれが初めてサイトカインのTNF- α がヒト外尿道括約筋衛星細胞にアポトーシスを誘導することを2007年の日本泌尿器科学会総会にて報告した。本研究ではさらにヒト外尿道括約筋におけるTNF- α の受容体やシグナル伝達経路を解明し、アポトーシス誘導を阻害する薬剤について検討する。さらに他の炎症関連サイトカインであるIL-1 β やIL-6の作用についても検討し、これらの受容体発現とその機能についても検討する。

2) 骨格筋特異的増殖抑制因子Myostatinのヒト外尿道括約筋衛星細胞の増殖分化に及ぼす影響とそのシグナル伝達の解明

Transforming Growth Factor (TGF)- β superfamilyであるmyostatinの突然変異によって全身の著明な骨格筋肥大が起こることが報告され (Proc Natl Acad Sci USA 94: 12457, 1997)、myostatinは骨格筋細胞の増殖や肥大を抑制することが明らかにされた (Nature 387:83)。myostatinはactivin受容体に結合し、activinの阻害蛋白であるfollistatinを投与すると骨格筋細胞の増殖が促進されることも報告されている (Proc Natl Acad Sci USA 98: 9306, 2001)。われわれは既にヒト外尿道括約筋衛星細胞もmyostatin添加によって増殖が阻害されることを明らかにしているが、本研究では外尿道括約筋細胞におけるmyostatinの受容体とシグナル伝達経路を同定し、myostatinによる負の増殖制御機構について検討する。

3. 研究の方法

1) インフォームド・コンセントの得られた前立腺全摘および膀胱全摘症例より前立腺尖部に付着する外尿道括約筋を微量採取する。

2) 標本を細切し、コラゲナーゼ処理後に初代培養する。抗 NCAM 抗体結合させた磁気ビーズを用いて MACS 法にて初代培養細胞より NCAM を発現した骨格筋衛星細胞を分離する。骨格筋特異転写因子(Myf-5 と MyoD)の免疫染色を行い、骨格筋系列の細胞であることを確認し、PSA 染色して前立腺癌細胞の混入を除外する。

3) 外尿道括約筋衛星細胞に SV40 virus の large T 抗原を遺伝子導入して長寿化し、以下は長寿化外尿道括約筋細胞を用いて実

験を行う。

4) 長寿化外尿道括約筋衛星細胞より RNeasy total RNA system (QIAGEN)を用いて total RNA を抽出する。サイトカイン受容体の primer を作成し、RT-PCR 法にて増幅後、アガロースゲル電気泳動を行い、外尿道括約筋衛星細胞におけるサイトカイン受容体の mRNA 発現を検討する。また細胞を 10% SDS を含むバッファー内で溶解し、SDS-PAGE で電気泳動し、Western blotting 法にて各種サイトカイン受容体の蛋白発現も検討する。

5) 炎症性サイトカイン (IL-6 や TNF- α など) を長寿化外尿道括約筋衛星細胞に添加し、アポトーシス誘導について TUNEL 法および Flow Cytometry にて検討する。

6) 長寿化外尿道括約筋衛星細胞を TNF- α で刺激後に 10% SDS を含むバッファー内で溶解し、12000Xg で遠心後、上清を抗チロシン抗体とインキュベートする。protein A-Sepharose で免疫沈降して SDS-PAGE で電気泳動する。さらにニトロセルロース・メンブレンにブロッティングし、JAK/STAT 系や IKK、JNK および NF- κ B のリン酸化について検討する。

7) TNF- α 受容体の阻害薬である etanercept 及び infliximab を長寿化外尿道括約筋衛星細胞に加えた後、TNF- α で刺激し IKK、JNK および NF- κ B の活性化について検討する。さらにアポトーシス細胞について TUNEL 法及び Flow Cytometry で測定し、etanercept 及び infliximab の作用を検討する。

ヒト外尿道括約筋衛星細胞における Myostatin の発現とその意義について

1) ヒト外尿道括約筋衛星細胞における Myostatin の発現について、RT-PCR 及び Western blotting によってそれぞれ mRNA および蛋白の発現を検討する。

2) ヒト長寿化外尿道括約筋衛星細胞に Myostatin を添加して、その増殖抑制について検討する。

3) Myostatin の属する TGF- β superfamily はセリン・スレオニンキナーゼを介して smad のリン酸化によってシグナル伝達が行われることより、Myostatin 添加後のヒト外尿道括約筋衛星細胞の smad リン酸化について検討する。

4) TGF- β superfamily は activin 受容体に結合し、Follistatin によって拮抗阻害されることが知られているので、ヒト外尿道括約筋衛星細胞における Myostatin の受容体を RT-PCR および Western blotting にて検討し、さらに Follistatin による Myostatin の阻害作用について検討する。

4. 研究成果

①ヒト外尿道括約筋衛星細胞にTNF- α を作用させたところ、Flowcytometryによる細胞周期解析では経時間的および濃度依存性にsub-G1 populationが有意に増加し、Annexin-V陽性細胞が出現することより、アポトーシスが誘導されることが示された。さらにcaspase-3活性化とPARPの切断によってもアポトーシス誘導を確認した。また、RT-PCRおよびWestern blottingによって、ヒト外尿道括約筋衛星細胞におけるTNF- α 受容体の発現をmRNA及び蛋白レベルで確認し、TNF- α 受容体下流に位置するI κ Bのリン酸化が生じることを証明した。さらに抗TNF- α 治療薬であるInfliximabやEtanerceptによって、ヒト外尿道括約筋衛星細胞におけるTNF- α のアポトーシス誘導を阻害することも確認した。

②Myostatinは濃度依存性にヒト外尿道括約筋衛星細胞の増殖を抑制した。Myostatinの阻害因子であるフォリスタチンは濃度依存性にこの増殖抑制を阻害した。ヒト外尿道括

約筋衛星細胞はmRNAおよび蛋白レベルでMyostatinを発現していた。Immunoblot法にてMyostatinのシグナル伝達はsmad-2のリン酸化によることが示された。

【考察】高齢者における外尿道括約筋のアポトーシスは、加齢と伴に増加する血中 TNF- α によって生じている可能性があり、抗 TNF- α 治療薬がアポトーシス誘導を阻害できることより、高齢者尿失禁の新たな治療法や予防法の開発につながることを示唆された。

また、ヒト外尿道括約筋にはMyostatinが蛋白レベルで発現しており、これを抑制することで外尿道括約筋の再生が確認できれば、腹圧性尿失禁の治療として臨床応用できる可能性があると思われる。

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7件)

- ① Sumino Y, Hirata Y, Hanada M, Akita Y, Sato F, Mimata H. : Long-term cryopreservation of pyramidalis muscle specimens as a source of striated muscle stem cells for treatment of post-prostatectomy stress urinary incontinence. Prostate in press.
- ② Hanada M, Sumino Y, Hirata Y, Sato F, Mimata H. : Growth inhibition and apoptosis induction by tumor necrosis factor- α in human urethral rhabdosphincter satellite cells. J Urol 183:2445-2450, 2010.
- ③ Sumino Y, Hanada M, Hirata Y, Sato F, Mimata H. : The effects of hepatocyte growth factor and insulin-like growth

factor-1 on the myogenic differentiation of satellite cells in human urethral rhabdosphincter. Neurourol Urodyn 29:470-475, 2010.

- ④ 住野泰弘, 平田裕二, 花田麻里, 佐藤文憲, 三股浩光: ヒト外尿道括約筋衛星細胞の増殖制御機構. 西日本泌尿器科 70:569-575, 2008.
- ⑤ 花田俊勝, 三股浩光: SOCS1 による炎症性発癌の制御. 臨床免疫アレルギー科
- ⑥ 住野泰弘, 花田麻里, 三股浩光: 外尿道括約筋の再生に関する筋衛星細胞の役割. 排尿障害プラクティス 18:317-324, 2011.
- ⑦ 住野泰弘, 平井健一, 佐藤文憲, 三股浩光: 前立腺全摘出術における外科解剖一尿失禁対策. 泌尿器外科 24:27-31, 2010.

[学会発表] (計13件)

- ① 平田裕二, LIF (白血病阻害因子) はヒト外尿道括約筋筋芽細胞の遊走活性を誘導する、第96回日本泌尿器科学会総会、2008.4.25-27、横浜
- ② Yasuhiro Sumino, The effects of hepatocyte growth factor and insulin-like growth factor-1 on the myogenic differentiation of satellite cells in human urethral rhabdosphincter, AUA, 2008. 5.17-22, Orland, Florida, USA
- ③ 平田裕二, ヒト外尿道括約筋衛星細胞における遊走と浸潤についての検討、第5回泌尿器科再建再生研究会、2008.6.27、仙台
- ④ 花田麻里, ヒト外尿道括約筋衛星細胞におけるTNF- α のアポトーシス誘導、第17回日本アポトーシス研究会、2008.8.1-2、京都
- ⑤ 平田裕二, ヒト外尿道括約筋衛星細胞における遊走と浸潤についての検討、第15回日

本排尿機能学会、2008.9.11-13、東京

- ⑥花田麻里、ヒト外尿道括約筋衛星細胞においてTNF- α はTNF受容体を介してアポトーシスを誘導する、第15回日本排尿機能学会、2008.9.11-13、東京
- ⑦ Mari Hanada, Growth Inhibition and Apoptosis induction by TNF- α in Satellite cells of Human Urethral Rhabdosphincte、第60回日本泌尿器科学会西日本総会、2008.11.6-8、北九州市
- ⑧ 三股浩光、外尿道括約筋の再生療法、第22回日本老年泌尿器科学会、2009.5.9、京都
- ⑨ 秋田泰之、ヒト外尿道括約筋におけるMyostatinの発現と機能解析、第98回日本泌尿器科学会総会、2010.4.27-30、盛岡市
- ⑩花田麻里、ヒト外尿道括約筋および肛門挙筋におけるトランスクリプトーム解析、第98回日本泌尿器科学会総会、2010.4.27-30、盛岡市
- ⑪ 秋田泰之、ヒト外尿道括約筋におけるMyostatinの発現と機能解析、第7回泌尿器科再建再生研究会、2010.6.9、札幌市
- ⑫ 秋田泰之、IGF-I局所投与はラット外尿道括約筋の肥大を誘導する、第7回泌尿器科再建再生研究会、2010.6.9、札幌市
- ⑬ 秋田泰之、プロテオミクスによる外尿道括約筋特異蛋白の同定、第20回泌尿器科分子・細胞研究会、2011.3.11-12、津

[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

三股 浩光 (MIMATA HIROMITSU)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：60219714

(2) 研究分担者

佐藤 文憲 (SATO FUMINORI)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：30305049

平田 裕二 (HIRATA YUJI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30295183

住野 泰弘 (SUMINO YASUHIRO)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30325716

(3) 連携研究者

なし