

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791113

研究課題名(和文) ヒト外尿道括約筋におけるマイオスタチンの関与とその抑制による筋再生についての研究

研究課題名(英文) The Role and Inhibitory Effect of Myostatin for Muscle Regeneration in Human Urethral Sphincter

研究代表者

住野 泰弘 (SUMINO YASUHIRO)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30325716

研究成果の概要(和文)：

外尿道括約筋の横紋筋線維は遅筋成分を主体とし持続性の収縮により尿禁制に重要な役割を果たしており、外尿道括約筋の機能不全は難治性の腹圧性尿失禁の原因となる。今回我々は、外尿道括約筋から横紋筋の組織幹細胞である筋衛星細胞を用いて骨格筋特異的抑制因子であるマイオスタチンによる増殖分化制御機構について検討した。マイオスタチンは TGF- β スーパーファミリー経路の smad-2 をリン酸化し細胞周期停止をすることにより筋衛星細胞の増殖、また分化を抑制した。一方でマイオスタチンの競合的阻害因子であるフォリスタチンは smad-2 のリン酸化を阻害し筋衛星細胞の増殖抑制を阻害した。また外尿道括約筋衛星細胞にはマイオスタチンの発現が確認されたが抗マイオスタチン抗体で明らかな増殖抑制の阻害は認められずオートクリン作用は確認できなかった。

マイオスタチンの発現抑制は新たな腹圧性尿失禁の治療ターゲットになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：

Urethral rhabdoshincter that mainly consist of slow muscle fibers, have an important role of urinary continence mechanism with continuous contraction. Thus, dysfunction of urethral rhabdoshincter caused intractable urinary incontinence.

In this research, we studied the mechanism of growth and differentiation in human urethral rhabdoshincter (HUR) satellite cells (striated muscle stem cells) by myostatin (MST), which was a negative regulator of myogenesis of skeletal muscle. MST inhibited the proliferation of HUR satellite cells through phosphorylated smad-2 and cell cycle arrest. On the contrary, FS suppressed these effects. On the other hand, current results could not indicate that HUR satellite cells had an autocrine action of MST for the growth inhibition by itself.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：泌尿器科学

科研費の分科・細目：排尿機能、再生医療

キーワード：外尿道括約筋、筋衛星細胞、腹圧性尿失禁、マイオスタチオン

1. 研究開始当初の背景

横紋筋（骨格筋）は損傷に対してもっとも修復能の高い組織であり、最近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ことが明らかになっている。骨格筋衛星細胞は単核で筋細胞膜と基底膜の間に介在する細胞で Mauro によって初めて報告された (J Biophys Biochem Cytol 9: 493, 1961)。この細胞は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き (Dev Biol 218:115, 2000)、骨格筋の幹細胞と考えられている。

外尿道括約筋は膜様部尿道を Ω 状に取り囲む主として遅筋成分からなる横紋筋線維であり、持続的筋収縮を行うことにより尿禁制に寄与している (Sumino et al. J Urol, 2006)。加齢に伴いこれら外尿道括約筋細胞数はアポトーシスにより減少していることが明らかになり、その機能低下は男性における前立腺手術後の外尿道括約筋損傷とともに、腹圧性尿失禁の原因の 1 つと考えられている。これら外尿道括約筋の機能以上に伴う腹圧性尿失禁では外尿道括約筋細胞の増殖が治療として有効と思われ、外尿道括約筋細胞の増殖分化制御機構を検討することは新たな治療法の開発にもつながることが期待される。

最近、Transforming Growth Factor (TGF)- β スーパーファミリーであるマイオスタチン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 (PNAS 94: 12457, 1997)、マイオスタチン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) (マイオスタチンをノックアウトしたマウスは各骨格筋重量が野生型の 2-3 倍であり、これらの発達した骨格筋を詳しく

調べてみると筋線維核の増大と各筋線維の肥大が観察された)。

マイオスタチン抑制による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ため、本研究を計画、開始した。

2. 研究の目的

(1) 外尿道括約筋細胞においてマイオスタチンが外尿道括約筋細胞の増殖、分化の抑制に影響を及ぼしていること、(2) マイオスタチンの抗体や siRNA がマイオスタチンによる外尿道括約筋細胞の増殖、分化の抑制を阻害できるかどうか検討すること、(3) 上記の結果を in vivo で証明すべく実際にラットの外尿道括約筋損傷モデルを作成し抗マイオスタチン抗体や siRNA を局所投与して外尿道括約筋再生が認められるかを検討すること、(4) 腹圧性尿失禁を発症しやすい中高齢女性のヒト外尿道括約筋の横紋筋線維固有の特徴を他の横紋筋や男性の横紋筋線維と比較検討すること、を研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) 外尿道括約筋衛星細胞の分離培養、長寿化
インフォームド・コンセントの得られた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し、コラゲナーゼ処理後に初代培養する。次いで抗 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 染色して前立腺細胞の混入を除外する。外尿道括約筋衛星細胞に SV40T 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。

- (2) マイオスタチンによる外尿道括約筋衛星細胞の増殖、分化抑制試験
外尿道括約筋衛星細胞にマイオスタチンを濃度依存的に添加しその増殖抑制効果を確認する。また、一部の細胞は温度感受性 SV40T 抗原を遺伝子導入し筋分化誘導培地に変更後にマイオスタチンの分化抑制効果を確認する。
- (3) マイオスタチンによる外尿道括約筋衛星細胞のシグナル伝達および細胞周期の検討
マイオスタチンのシグナル伝達機構の検討 (smads のリン酸化) を Western blot 法、および細胞周期解析を FACS にて行う。
- (4) フォリスタチンによるマイオスタチンの阻害効果
TGF- β 及びマイオスタチンの阻害因子であるフォリスタチンを長寿化外尿道括約筋衛星細胞に添加し、その増殖分化抑制の阻害実験、またシグナル伝達、細胞周期に及ぼす影響を検討する。
- (5) 外尿道括約筋衛星細胞におけるオートクリン作用
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。各増殖因子の 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骨格筋特異的抑制因子であるマイオスタチンのほか、TGF- β 及びフォリスタチンの 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 法にて各因子の蛋白発現も検討する。
- (6) In vivo モデルを用いた実験
ラット外尿道括約筋損傷モデルを作成

し、コントロールモデルにおける、外尿道括約筋再生のパターンを検討する。形態学評価は、H.E 染色のみならずデスミンやミオシン重鎖など横紋筋由来の抗体を用いた免疫染色による検討も行う。機能評価には Leak point pressure の測定により評価する。

次に、ラットの損傷部に直視下にマイオスタチン、フォリスタチン、およびマイオスタチンの抗体や siRNA の局所注射 (マトリクスゲルを併用) を行い形態学的、機能的評価を行う。

- (7) プロテオーム解析による外尿道括約筋と他の骨格筋との比較検討
採取したヒト外尿道括約筋線維の一部はイソペンタン下に急速冷凍し、10 μ m 厚の連続薄切標本を作製する。一部は HE 染色、ATPase 染色を行い、TYPE1 線維、TYPE2 線維を区別する。次いで、一部を laser-captured microdissection にて筋線維を回収し、回収蛋白におけるマイオスタチンの発現を検討する。また、それらを Ettan DIGE (Differential Gel Electrophoresis) (GE Healthcare) を用いて蛋白の質量分析を行う。

4. 研究成果

- (1) マイオスタチンによる外尿道括約筋衛星細胞の増殖、分化抑制試験
マイオスタチンによる増殖抑制テストでは 10%FBS 含有 F-10 培地においてマイオスタチンはヒト外尿道括約筋衛星細胞の細胞増殖を濃度依存的 (0.1 μ g/ml) に有意に抑制した。またマイオスタチンの競合的阻害因子であるフォリスタチン投与によりヒト外尿道括約筋衛星細胞は増殖を促進したがマイオスタチン無添加群とマイオスタチン添加群ではその増殖能に有意な差を認めなかった。

また外尿道括約筋衛星細胞を筋分化誘導培地に変更後にマイオスタチンを濃度依存的に添加し、ミオシン重鎖の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて検討したところマイオスタチンは濃度依存的にミオシン重鎖 mRNA の発現を抑制したがマイオスタチンの阻害剤である Follistatin による筋分化抑制は確認できなかった。

(2) マイオスタチンによる外尿道括約筋衛星細胞のシグナル伝達および細胞周期の検討

シグナル伝達における検討ではマイオスタチンは添加 15 分後には smad-2 のリン酸化を亢進したが 120 後にはリン酸化は元のレベルまで戻っていた。フォリスタチンによるマイオスタチンの阻害の検討ではフォリスタチン 100 μ g/ml ではマイオスタチン添加群の smad-2 のリン酸を有意に抑制した。

またマイオスタチン投与により外尿道括約筋衛星細胞は cdk-2 の発現が低下し p21 の発現増加が認められた。一方フローサイトメトリーによる細胞周期解析では、マイオスタチンの濃度依存的に sub G1 分画の増加と G2/M の減少傾向を認め、フォリスタチンの前処理により sub G1 分画の増加は抑制された。つまり外尿道括約筋衛星細胞のマイオスタチンの増殖抑制効果はアポトーシス誘導によるものではなく細胞周期停止によるものであると思われた。また、この増殖抑制効果マイオスタチンの阻害因子であるフォリスタチンにより抑制された。

(3) 外尿道括約筋衛星細胞におけるマイオスタチンのオートクリン作用
ヒト外尿道括約筋衛星細胞におけるマ

イオスタチンの autocrine 作用の検討も試みた。RT-PCR および免疫染色、Western blot 法ではヒト外尿道括約筋衛星細胞はマイオスタチンを発現していた。が抗マイオスタチン抗体を用いた中和試験では有意なマイオスタチンの阻害効果は認められずヒト外尿道括約筋衛星細胞におけるマイオスタチンのオートクリン作用は確認できなかった。

(4) In vivo モデルを用いた実験

メス Spraque-Dawley (8W) の外尿道括約筋部に IGF-1 を (200ng/ml) 0.3ml 3 回/週 投与し 8W 後の外尿道括約筋直径を評価したところ、コントロール群 平均 6.0 μ m \pm 1.2、IGF-1 投与群 平均 8.2 μ m \pm 2.0 で有意 (P=0.013) に IGF-1 投与群において筋線維の肥大を認めた。今回 in vitro study にてマイオスタチンのオートクリン作用が確認できなかったために in vivo でのマイオスタチンの発現抑制の検討は行わなかった。尿失禁モデルにおけるマイオスタチンの発現抑制による尿失禁改善の試みは今後の検討課題だと思われる

(5) ヒト外尿道括約筋および肛門挙筋 におけるプロテオーム解析

外尿道括約筋、および肛門挙筋を微量採取しイソペンタン下に急速冷凍し、10 μ m 厚の連続薄切標本を作製、一部は HE 染色、ATPase 染色を行い、TYPE1 線維、TYPE2 線維を区別、一部をトルイジンブルー染色し、Laser Microdissection (AS LMD) を用いて外尿道括約筋および肛門挙筋の Type1, Type2 線維をタンパクを回収した。次いで CyDye DIGE Fluor saturation dyes を用いたシステイン残基の飽和標識法にて、内部標準および横紋筋サンプルをそれぞれ Cy3 および Cy5 で標識し、

Immobiline DryStrip を用いた Ettan IPGphor II による等電点電気泳動の後、SDS-PAGE での電気泳動を行った。次いで二次元電気泳動ゲルのシグナルを Ettan DIGE Imager で取り込み、Image Quant TL で処理した後、Image Master 2D Platinum DIGE Software により解析し、外尿道括約筋と肛門挙筋を Type 別に比較し発現が異なるスポットをカウントした。検討した 3 例において RS で特異的に発現を認めたスポットは、type1 では 5 個、type2 では 10 個であった。また、LA での特異的発現部位は type1 では 7 個、type2 では 4 個であった。今回の検討では回収したタンパク量が少ないためタンパク同定までは行えなかった。

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 5 件)

1. 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(4). 317-24. 2011 (査読無)
2. Sumino Y, Hirata Y, Hanada M, Akita Y, Sato F and 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. 2011. (査読有)
3. Hanada M, Sumino Y, Hirata Y, Sato F, Mimata H. Growth inhibition and apoptosis induction by tumor necrosis factor-alpha in human urethral rhabdosphincter satellite cells. J Urol. 183: 2445-50. 2010 (査読有)

4. 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. 29:470-5. 2010 (査読有)
5. 住野泰弘、三股浩光. ヒト外尿道括約筋衛星細胞の増殖制御機構. 西日泌尿. 70:569-575, 2008 (査読無)

[学会発表] (計 6 件)

1. Sumino Y, Akita Y, Hanada M, Mori K, Nomura T, Sato F, Mimata H, Myostain Inhibits Growth of Satellite Cells in Human Urethral Rhabdosphincter via Phosphorylation of Smad -2/3-IUGA 2010(Joint Annual Meeting of the International Continence Society and the International Urogynecological Association), (2010. 8. 23-27) Toronto, Canada.
2. Sumino Y, Hirata Y, Hanada M, Akita Y, Sato F, Mimata H, Long-term Preservation of Pyramidal Muscle Specimen as a Source of Striated Muscle Stem Cells for the Treatment of Post-Prostatectomy Stress Incontinence. AUA (2010. 5. 27-6. 3) San Francisco, CA, USA
3. 住野泰弘、秋田泰之、花田麻里、平田裕二、佐藤文憲、三股浩光. ヒト外尿道括約筋と肛門挙筋のプロテオーム解析. 第 16 回排尿機能学会. 2009. 9. 10-12. 福岡
4. 住野泰弘、秋田泰之、花田麻里、平田裕二、佐藤文憲、三股浩光. ヒト女性外尿道括約筋における横紋筋線維型の検討. 第 97 回日本泌尿器科学会. 2009. 4. 16-19. 岡山

5. Sumino Y, Hirata Y, Hanada M, Yamasaki M, Sato F, Mimata H, Growth Mechanism of Satellite cells in Human Urethral Rhabdosphincter. 第96回日本泌尿器科学会総会 ワークショップ[Urologist Research Workshop-Further Advance after Recent AUA Presentation]2008. 4. 25-27. 横浜
6. 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. AUA (2008. 5. 17-22) Orland, Florida, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

住野 泰弘 (SUMINO YASUHIRO)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30325716