

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791763

研究課題名（和文）加齢に伴う TNF- α 発現量の増加と外尿道括約筋におけるアポトーシスの関連性

研究課題名（英文）

The association between TNF- α and apoptosis in urethral sphincter with aging

研究代表者 住野 泰弘

(SUMINO YASUHIRO)

大分大学・医学部(附属病院)・講師

研究者番号：30325716

研究成果の概要（和文）：加齢に伴い尿失禁に罹患する患者は増加し医療コストの増大の一因にもなっている。我々は加齢に伴い増加するとされる TNF- α などの炎症性サイトカインが尿禁制の低下に関与するか検討した。繁殖リタイアラットを用いた実験では、加齢に伴い経産ラットの尿禁制の低下が認められ、尿道の閉鎖機能不全によるものが原因として考えられた。一方で尿道組織における TNF- α を始めとする炎症性サイトカインの加齢に伴う発現の亢進は認められなかったが、細胞外マトリクス関連物質の発現は加齢に伴い低下していた。経産婦の加齢に伴う尿道の細胞外マトリクスのリモデリングの低下は尿道支持機構の減弱を来とし、腹圧性尿失禁の病因の一つになる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We explored the association between urinary continence mechanism and inflammatory cytokines (e. g. TNF- α) with aging. In the experiments using retired bleeder rat, urethral continent functions significantly decreased with aging after child-birth, and it has been considered that aging after child-birth attenuated urethral support. On the other hand, transcripts of extracellular matrixs (ECMs) in urethra were significantly decreased with aging, although there were no significant changes in those of inflammatory cytokines between young groups and aged groups. Reduction of ECM with aging might attenuate stiffness and elasticity of urethral support system, and may be a part of SUI in elderly, parous women.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：外尿道括約筋

1. 研究開始当初の背景

尿失禁は高齢者の三大症候群の一つと考えられており、高齢者の生活機能の自立を阻害し健康管理に深刻な問題点を与える重大な要因である。尿失禁のうち労作時や咳嗽時に不随意に尿が漏出する状態を腹圧性尿失禁といい、閉経以後の女性尿失禁患者の約 64.9%に認められており(Ushiroyama et al. Maturitas 1999)、

加齢に伴い多くの高齢女性はその対処に難渋している。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(Strasser et al. J Urol 2000)、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、高齢女性における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異常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。しかしこれまでに外尿道括約筋細胞の増殖分化制御機構について検討した報告は国内外とも報告されていなかった。われわれはこれまでに世界で初めてヒト外尿道括約筋線維上に筋の幹細胞である筋衛星細胞を確認し、筋衛星細胞のマーカーである NCAM の抗体標識ビーズを用いた MACS 法により筋衛星細胞を分離培養することに成功し、SV40T 抗原を遺伝子導入し長寿化した細胞を用いて、各種増殖因子やサイトカインによる増殖分化能について検討してきた(Sumino et al. Neurourol Urodyn 2007,2010。Hanada et al. J Urol 2010)。

2. 研究の目的

炎症性サイトカインの1つである TNF- α は加齢に伴い有意に増加し、四肢の骨格筋細胞にアポトーシスを誘導することも明らかにされている(Bruunsgaard et al. Clin Exp Immunol 2003, Phillips and Leeuwenburgh. FASEB J 2005)。我々はこれまでの研究の中で、外尿道括約筋筋衛星細胞が TNF- α によってアポトーシスを起こして減少し、またこのアポトーシスは TNF- α の阻害剤である etanercept にて抑制されることを明らかにした(Hanada et al. J Urol 2010)。これにより加齢に伴うヒト外尿道括約筋細胞の減少には TNF- α によるアポトーシスが関係している可能性が示唆された。本研究ではさらに in vivo での研究を勧め、加齢に伴う TNF- α を中心とした炎症性サイトカイン

の発現の変化が実際に尿禁制機能低下を惹起し、腹圧性尿失禁の発症に影響するかを検討したい。

3. 研究の方法

(1)腹圧性尿失禁(外尿道括約筋機能低下)モデルラットの作成

加齢ラットを用いて検討する前に、若年ラットにおける外尿道括約筋の機能低下モデルを作成し、同モデルにおける尿禁制の程度を把握しておくことが目的である。

①膣拡張による腹圧性尿失禁モデルを作成する。

② 同時に実際の外尿道括約筋を含む尿道組織の回復過程を分子生物学的および生理学的(ウロダイナミクス)に検討を行いその結果を基礎データとして蓄積する。

③ ここで可能であれば免疫染色、Western blot 法、RT-PCR 法にて TNF- α 及び TNF- α のレセプター(TNFR1,2 など)他、増殖因子などの発現も確認する。

(2)加齢による TNF- α の発現の変化に伴う尿禁制の検討

加齢に伴い TNF- α などの炎症性サイトカインの発現量が増えてくるのか検討することを目的とし、若年モデルと加齢モデルラットを用いて以下について基礎実験を行う。繁殖リタイアラットを経産ラットとして2群にわけ(6カ月、14か月)、未産ラット(2か月)をコントロールとして以下の実験を行った。

1) 機能解析: 失禁圧、尿道基線圧、膀胱圧上昇時の尿道反応、2) 分子生物学的解析: real-time RT PCR による尿道組織における各種炎症性サイトカイン及び細胞外マトリクスの mRNA の発現。

4. 研究成果

(1)膣拡張による腹圧性尿失禁モデルにおけ

る尿禁制機能の検討

尿禁制メカニズムの客観的な評価が可能なモデルとして経膣分娩モデルとして用いられる膣拡張による腹圧性尿失禁モデルラットを作成し、このモデルを用いて膣拡張後の経時的な失禁圧、尿道内圧、膀胱内圧上昇時の尿道反応の測定を行った。4,7日後に失禁圧、尿道内圧、尿道反応は有意に低下したが14日後には元のレベルに改善した。またこの経時的変化に伴う各種サイトカインの mRNA レベルの発現の変化についても検討した。TNF- α などの炎症性サイトカインは膣拡張直後には sham 群と比較して有意に上昇したものの4日目には有意な上昇は認められなかった。一方増殖因子の一つであるインスリン様増殖因子-1(IGF-1)は4日目、7日目と有意な上昇が認められ、尿禁制機能との負の相関が認められた。

(2)IGF-1 投与による尿禁制機能の治療効果
遺伝子組み換えヒト IGF-1 を膣拡張1日前から7日間投与を行い膣拡張による腹圧性尿失禁の改善にどのような効果があるか検討を行った。Vehicle 群、IGF-1(50,150 μ g/kg/day)の3群のうち、IGF-1 投与群では膣拡張後4,7日目で失禁圧、尿道内圧、尿道反応の有意な改善を認めた。またそれぞれの群の尿道組織における Akt のリン酸化を Western blot にて検討を行ったところ IGF-1(150 μ g/kg/day)投与群において Akt のリン酸化の有意な亢進が認められた。

(3)加齢による尿道組織における各種サイトカインの発現の変化と尿禁制との相関

① 機能解析：失禁圧、尿道基線圧は14カ月群において有意に他群と比較して低下していた。膀胱内圧上昇時の尿道反応は他群と比較して低下する傾向にあったが有意差は認めなかった。

② 分子生物学的解析：炎症性サイトカインで

ある TNF- α ,IL-1 β ,IL-6,cox-2 の mRNA の発現は6カ月群において2カ月群と比較して上昇が認められたが14カ月群では低下しており2カ月群とは有意差は認められなかった。一方、細胞外マトリクスの代謝産物である Col1a-1, Col3a-1, LOX の mRNA の発現は6カ月群において2カ月群と比較して上昇する傾向が認められ、14カ月群においてこれらの mRNA の発現は他群と比較して有意な低下が認められた。

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)Akita Y, Sumino Y, Mori KI, Nomura T, Sato F, Mimata H. Myostatin inhibits proliferation of human urethral rhabdosphincter satellite cells. Int J Urol. 2012. 522-9. (査読有)

(2)Mori K, Noguchi M, Sumino Y, Sato F, Mimata H. Use of procalcitonin in patients on chronic hemodialysis: procalcitonin is not related with increased serum calcitonin. ISRN Urol. 2012. 431859. (査読有)

(3)Sumino Y, Nakano D, Mori K, Nomura T, Sato F and Mimata H. Left Transperitoneal Adrenalectomy with a Laparoendoscopic Single-Site Surgery Combined Technique: Initial Case Reports.

Case report in Med. 2011. 651380. (査読有)

(4)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. 1225-30. (査読有)

(5) 住野 泰弘、花田 麻里、三股 浩光. 外尿道筋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. 2011;18(4):317-24.
(査読無)

[学会発表] (計 5 件)

(1) ICS 2012 (Annual Meeting of the International Continence Society), (2010.10.17-20) Peking, China.

Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) accelerates recovery from stress urinary incontinence in rats with simulated child birth trauma injury through Akt signal transduction pathway

Sumino Y, Yoshikawa S, Mimata H, Yoshimura N

(2) 第 19 回日本排尿機能学会 (2012.8.29-31 : 名古屋)

シンポジウム 下部尿路機能障害の再生療法 : サイトカイン制御による外尿道括約筋再生療法.

住野 泰弘

(3) 第9回泌尿器科再建再生研究会(2012.6.16: 湯布院)

膣拡張による腹圧性尿失禁モデルラットにおける Insulin-like growth factor-1(IGF-1)の治療効果

住野 泰弘^{1,2}、吉川 悟²、三股 浩光¹、吉村 直樹²

(4) AUA (2012. 5.19-24) Atlanta GA, USA

Therapeutic effects of insulin-like growth factor-1 on stress urinary incontinence in rats with simulated child birth trauma injury

Sumino Y, Yoshikawa S, Mimata H, Yoshimura N

(5) 第 99 回日本泌尿器科学会総会 (名古屋

2011.4.21-24)

シンポジウム

腹圧性尿失禁に対する外尿道括約筋自己再生を目指して

住野 泰弘、三股 浩光

[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 (住野 泰弘)

研究者番号 : 30325716

(2)研究分担者

なし