

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791659

研究課題名(和文) SCF / KITシグナル伝達系を介した前立腺の収縮および増殖機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of cell proliferation and spontaneous contraction through a KIT-mediated mechanism in benign prostatic hyperplasia

研究代表者

井村 誠 (Imura, Makoto)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00551269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：KIT陽性細胞は、消化管において細胞増殖および自動収縮に関与するとされる。我々は前立腺肥大症におけるKIT陽性細胞の機能解析を目的に本研究を行った。

ヒト、モルモットの前立腺組織でc-kit、SCFの発現が認められた。ヒト前立腺間質細胞に対するSCFの投与でJAK/STAT経路を介した細胞増殖が誘導されることがわかった。また、ヒト前立腺肥大症組織でKIT陽性細胞が有意に増加していた。KIT抑制因子であるイマチニブによってモルモット前立腺の自動運動が抑制された。これらのことから前立腺におけるKIT陽性細胞は前立腺の増殖と自動収縮に関与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：KIT-positive interstitial cells in the gut are considered to function as a growth factor of stroma. Several reports have shown the existence of KIT-positive interstitial cells in the prostate. However, the role of these cells in the prostate has remained unclear. In this study, we examined the function of KIT-positive interstitial cells in BPH.

KIT was localized in interstitial cells of the stromal component in human prostate and guinea pig prostate. SCF administration increased cell proliferation dose-dependently for human prostate stromal cell line (PrSC). Treatment with SCF increased the expression of JAK2 and STAT1 dose-dependently in PrSCs. KIT expression in BPH were found to be significantly larger than in normal human prostate. Imatinib administration inhibited spontaneous contractions of guinea pig prostate dose-dependently. The role of KIT and KIT-positive cells in prostate may be related to the regulation of cell proliferation and spontaneous contraction.

研究分野：泌尿器科

キーワード：KIT陽性細胞 前立腺肥大症

### 1. 研究開始当初の背景

消化管の自動運動の源は、カハールの間質細胞(interstitial cells of Cajal)であると考えられており、カハールの間質細胞が欠損すると消化管運動が低下すると言われている。最近、自動運動を有する膀胱平滑筋においても、同様の形態学的特徴を持つ KIT 陽性の間質細胞が発見され、膀胱における自発活動の発生機序と間質細胞との関係が注目されている。またカハールの間質細胞から生じる消化管間質腫瘍(GIST)は c-kit 遺伝子に特徴的な変異が認められており、KIT 陽性細胞は消化管において自動運動だけではなく、細胞増殖にも関していると言われている。近年、ヒト前立腺の免疫組織染色にて KIT 陽性細胞が発見された。

これらのことから、私たちは消化管同様、前立腺においても KIT 陽性細胞が前立腺平滑筋の過緊張と前立腺間質細胞の増殖に関与していることを推察した。

### 2. 研究の目的

本研究では、前立腺肥大症の病態生理における KIT 陽性細胞のメカニズムを明らかにし、1 受容体阻害剤および 5 還元酵素阻害剤にかわる新規分子標的薬の開発につなげたいと考えている。

### 3. 研究の方法

(1) ヒトおよび実験動物の前立腺における KIT 陽性細胞・c-kit・SCF 発現と局在の確認

正常ヒト前立腺培養細胞、ヒト前立腺組織、実験動物(モルモット)前立腺組織から、蛋白および RNA を抽出し PCR、Western blotting、RT-PCR を行い KIT および KIT リガンドである Stem Cell Factor(SCF)の発現を検討する。

(2) 前立腺自動運動に対する KIT 陽性細胞の役割の検討

モルモット前立腺の自動運動の確認

モルモットの前立腺を摘出し、直ちに Krebs 液に保存。前立腺組織を約 10mm の長さで切断し、両端を絹糸で結ぶ。95%酸素 5%二酸化炭素の混合ガスに通気し、37℃の Krebs 液灌流下で、一端の絹糸を標本張力 transducer に固定し、反対側は chamber に固定して、等尺収縮法を用い前立腺の自動運動を確認する。

メシル酸イマチニブおよび SCF の自動運動に対する影響

自発収縮の有無を確認し、基線が安定したところで頻度および張力の観察を十分に行った後、KIT に対する抑制因子であるメシル酸イマチニブおよびリガンドである SCF を投与し、投与前後で自発収縮の頻度および振幅を比較検討する。

(3) 前立腺における細胞増殖機構の解明

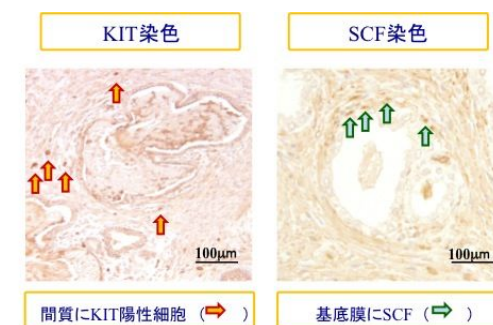
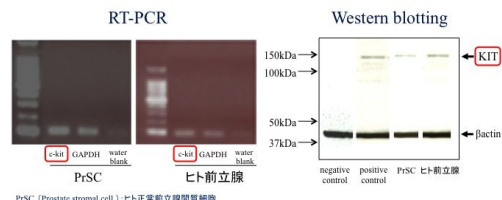
ヒト前立腺の培養細胞(Prostate Stromal Cells、Prostate Smooth Muscle Cells および Prostate Epithelial Cells)を培養し、KIT に対する抑制因子であるメシル酸イマチニブおよび KIT リガンドである Stem Cell Factor(SCF)を作用させ、MTT assay により細胞増殖能の変化を検討し、Western blotting 法により、KIT 下流蛋白である JAK2 および STAT1 の発現変化を解析し、前立腺における KIT 陽性細胞の細胞増殖機構を検討する。

(4) ヒト正常前立腺と前立腺肥大症における KIT 陽性細胞および SCF の発現の比較

ヒト正常前立腺と前立腺肥大症の免疫組織染色を行い、KIT 陽性間質細胞数/間質細胞数を比較する。また分子生物学的解析(RT-PCR、Western blotting)を用いることにより、ヒト正常前立腺と前立腺肥大症における KIT および SCF の発現を比較する。

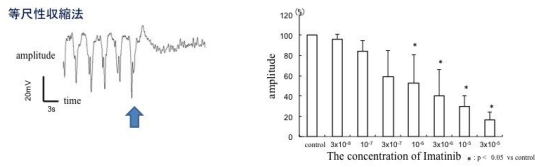
### 4. 研究成果

(1) ヒト、実験動物の前立腺における KIT 陽性細胞・c-kit・SCF 発現を確認するために正常ヒト前立腺細胞を培養し、蛋白、および RNA を抽出し PCR、Western blotting、RT-PCR を行った。被膜下前立腺摘除術、膀胱・前立腺全摘除術を施行した際に得られたヒト前立腺組織から、同様に蛋白、RNA を抽出した。それらの検体から KIT とそのリガンドである Stem Cell Factor(SCF)の発現を確認した。

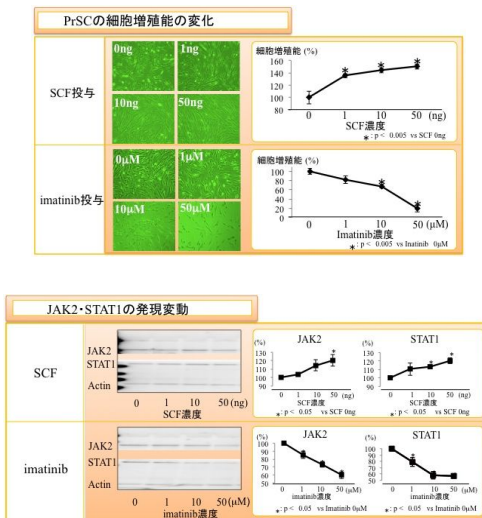


(2) 前立腺自動運動に対する KIT 陽性細胞の役割を検討するために、モルモットの前立腺を摘出し、等尺収縮法を用い前立腺の自動運動を確認した。自発収縮の有無を確認し、基線が安定したところで頻度および張力の観察を十分に行った後、KIT に対する抑制因子であるメシル酸イマチニブを投与したと

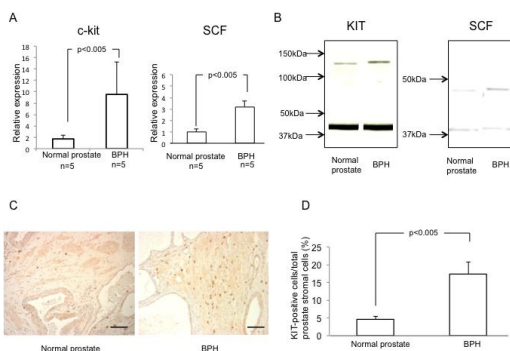
ころ、自発収縮の振幅が濃度依存的に抑制された。



(3) 前立腺における細胞増殖機構を解明するために、ヒト前立腺の培養細胞 Prostate Stromal Cells を培養し、KIT に対する抑制因子であるメシル酸イマチニブおよびKIT リガンドである Stem Cell Factor(SCF)を作用させ、MTT assay により細胞増殖能の変化を検討し、Western blotting 法により、KIT 下流蛋白である JAK2 および STAT1 の発現変化を解析した。KIT リガンドはヒト前立腺培養細胞の細胞増殖能および JAK2・STAT1 の発現を亢進させた。一方、KIT 抑制因子はこれらを抑制した。



(4) ヒト正常前立腺と前立腺肥大症における KIT 陽性細胞および SCF の発現を比較した。ヒト正常前立腺と前立腺肥大症の免疫組織染色を行い、KIT 陽性間質細胞数/間質細胞数を比較したところ前立腺肥大症組織において優位に KIT 陽性細胞数が増加していた。またヒト正常前立腺と前立腺肥大症における KIT および SCF の発現を、RT-PCR、Western blotting で検討したところ、mRNA、タンパク質ともに、前立腺肥大症において KIT、SCF の発現が増強していた。



- A : 前立腺における KIT、SCF の発現 (RT-PCR)
- B : Western blotting による発現の検討
- C : 免疫染色による KIT 陽性細胞の局在
- D : KIT 陽性細胞の発現率

## 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1件)

1. Makoto Imura, Yoshiyuki Kojima, Yasue Kubota, Takashi Hamakawa, Takahiro Yasui, Shoichi Sasaki, Yutaro Hayashi, Kenjiro Kohri: Regulation of cell proliferation through a kit-mediated mechanism in benign prostatic hyperplasia. Prostate. 査読有 72(14):1506-1513, 2012 DOI: 10.1002/pros.22500

〔学会発表〕(計5件)

1. Imura Makoto, Kojima Yoshiyuki, Hamakawa Takashi, Shibata Yasuhiro, Kubota Yasue, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Regulation of cell proliferation through a KIT-mediated mechanism benign prostatic hyperplasia, 第32回国際泌尿器科学会(SIU), 2012.9.30-10.4, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
2. Imura Makoto, Sasaki Shoichi, Hamakawa Takashi, Shibata Yasuhiro, Hayase Masa, Kubota Yasue, Kojima Yoshiyuki, Kohri Kenjiro: Regulation of cell proliferation through a KIT-mediated mechanism benign prostatic hyperplasia. Nagoya Sinshu Forum, 2012.8.31-9.1, 名古屋マリOTTアジアホテル(愛知県・名古屋市)
3. 井村 誠, 佐々木 昌一, 窪田 泰江, 濱川 隆, 柴田 泰宏, 早瀬 麻沙, 小島 祥敬, 郡 健二郎: KIT 陽性間質細胞による前立腺の自動収縮作用. 第19回日本排尿機能学会, 2012.8.29-31, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
4. Imura Makoto, Kojima Yoshiyuki, Hamakawa Takashi, Okada Atsushi, Kubota Yasue, Umemoto Yukihiro, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Regulation of cell proliferation through a KIT-mediated mechanism. American Urological Association Annual Meeting 2012, 2012.5.19-24, Atlanta (USA)
5. 井村 誠, 小島 祥敬, 濱川 隆, 柴田 泰宏, 早瀬 麻沙, 窪田 泰江, 佐々木 昌一, 林 祐太郎, 郡 健二郎: SCF/ KIT シグナル伝達系を介した前立腺肥大症

増殖機構の解明。第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012.4.21-24、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井村 誠 ( IMURA MAKOTO )

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号 : 00551269