

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670704

研究課題名(和文)尿失禁に対する再生療法を目指した線維芽細胞から外尿道括約筋細胞への直接誘導法開発

研究課題名(英文) Direct reprogramming of fibroblasts toward external urethral sphincter for future regenerative therapy in urinary incontinence

研究代表者

秦 聡孝 (Shin, Toshitaka)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60404381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、外尿道括約筋細胞とその幹細胞の転写制御ネットワークを詳細に検討し、外尿道括約筋細胞とその幹細胞に特異的な転写因子を見出し、最終的には、それらを線維芽細胞に導入し、ダイレクト・リプログラミングによる外尿道括約筋細胞とその幹細胞の作製による新たな尿失禁療法の開発を目指している。今回は、本テーマの基盤となる効率的な外尿道括約筋衛星細胞の増殖・回収を図るべく、長時間トリプシン添付培養などを試み、比較的簡便かつ効率的に外尿道括約筋衛星細胞の増殖・回収が可能となる手技を確立した。

研究成果の概要(英文)：Our ultimate goal is to develop direct reprogramming of fibroblasts toward external urethral sphincter for future regenerative therapy in urinary incontinence. After analysis of specific transcriptional factors for satellite cells in urethral rhabdosphincter, we plan to deliver these genes into fibroblasts for direct reprogramming toward external urethral sphincter. At the beginning of this project, we have to culture and collect satellite cells in urethral rhabdosphincter effectively.

In this study, we established an effective method to culture and collect satellite cells in urethral rhabdosphincter using long-term trypsin incubation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：外尿道括約筋衛星細胞 医療 尿失禁
ダイレクトリプログラミング Pax-7 IL-6 長時間トリプシン添付培養 再生

1. 研究開始当初の背景

- (1) 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。(Suminoら, J Urol, 2006)
- (2) 骨格筋衛星細胞は、骨格筋の発生や損傷後の骨格筋再生に重要な役割を果たしており、骨格筋の幹細胞とされている。分裂・増殖して筋芽細胞から筋管細胞へと分化し、骨格筋の再生に寄与することが知られている。(Hawkeら, J Appl Physiol, 2001) これまでにわれわれはヒト外尿道括約筋にもこの衛星細胞が存在することを証明し、さらに分離培養法を確立し、そ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について検討してきた。(Suminoら Neurourol Urodyn, 2007) (Hanadaら J Urol, 2010) (Akitaら, Int J Urol, 2013)
- (3) サイトカインや幹細胞注入による外尿道括約筋再生が期待されたが、局所投与したサイトカインは周囲に拡散し、速やかに分解されてしまうため、サイトカインの局所注入の効果は限定的であり、また繰り返し投与は新たな外尿道括約筋損傷を来す恐れがある。また、骨格筋や脂肪、骨髄に由来する幹細胞の局所注入も、注入した細胞のわずか1~3%未満の細胞しか生着せず、ほとんどは数日以内に死滅してしまうため、大量の細胞注入が必要とされている。さらに、生き残った細胞が必ずしも横紋筋に分化するとは限らないことも問題である。

2. 研究の目的

外尿道括約筋は、尿禁制保持にきわめて重要な横紋筋であるが、加齢により減少し、線維組織や脂肪細胞に置き換わり、高齢者の尿失禁の原因となる。最近、目的とする細胞に特異的な特定の因子を導入することによって、特定の組織幹細胞や機能細胞に分化させる手法が開発されており、ダイレクト・リプログラミングと呼ばれている。本研究では、すでにわれわれが見出している外尿道括約筋に特異的に高発現する転写因子に加えて、横紋筋の幹細胞である衛星細胞に特異的に高発現する転写因子をも網羅的に探索し、転写制御ネットワークを再構築し、絞り込んだ因子を線維芽細胞に導入することで、ダイレクト・リプログラミングによる外尿道括約筋再生療法の開発を目指す。本手法が成功すれば、筋ジストロフィー症等の骨格筋疾患の治療にも応用できることが期待される。

3. 研究の方法

ダイレクト・リモデリングによる外尿道括約筋衛星細胞の作製に向けた基盤となる研究を行った。具体的には、転写制御ネットワークの解明に不可欠な、既存の外尿道括約筋衛星細胞の効率的な回収を目指した研究を行った。骨格筋衛星細胞の転写因子としては、Pax (Paired Box) family に属する Pax-7 が重要であることが知られている。通常、幹細胞はその特異的な細胞表面マーカーを標的とする flow cytometry を用いて収集されることが多いが、Pax-7 は細胞表面に局在していないため、外尿道括約筋衛星細胞の高率な回収が困難であり、これまで研究邁進の妨げとなってきた。

- (1) 予め同意を得た膀胱全摘出術の患者から外尿道括約筋を採取し NCAM をマーカーとして衛星細胞を分離培養し

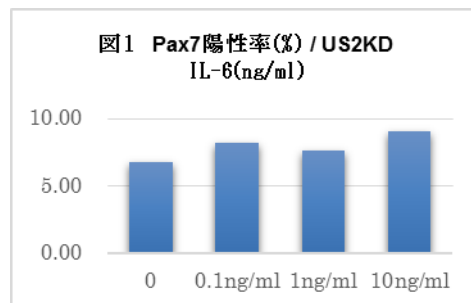
た。Rb 活性化を抑制するため、橋本らの樹立したヒト筋細胞不死化法 (Shiomi et al.2011) に従い、human telomerase reverse transcriptase (hTERT)、 human cyclin D1 および human mutant CDK4 (CDK4R24C) を entry vector に結合させ、 pDONR221 を donor vector とするレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行い、不死化ヒト外尿道括約筋衛星細胞 (US2KD) を作成した。

- (2) 高率な外尿道括約筋衛星細胞の回収を目指し、IL-6 (Interleukin-6) による Pax-7 陽性の外尿道括約筋衛星細胞の増殖実験を行った。0.1-10ng/ml の IL-6 を長寿化したヒト外尿道括約筋衛星細胞 (US2KD) と錐体筋細胞 (HU5) に添付し、抗 Pax-7 抗体を用いて、その陽性細胞数をカウントした。
- (3) さらに効率的な外尿道括約筋衛星細胞の回収を目指し、幹細胞のストレス耐性に注目し、最近報告されている長時間トリプシン添付培養 (LTT: long-term trypsin incubation) を行った。長寿化したヒト外尿道括約筋衛星細胞 (US2KD) を長時間トリプシン添付培養し、1 時間・6 時間処理後に、抗 Pax-7 抗体を用いて、その陽性細胞数をカウントした。

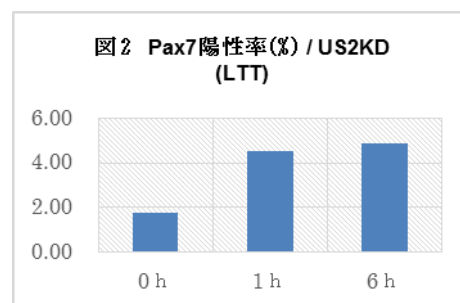
4. 研究成果

- (1) US2KD は 40 代まで継代が可能だった。分化実験では US2KD は SV40T 抗原の遺伝子導入による長寿化細胞と比較し高率に筋管細胞への分化がみられた。
- (2) US2KD において、IL-6 の濃度依存的に Pax-7 陽性細胞数は増加する傾向にあったが顕著ではなく、HU5 と比較しても、その増加傾向は有意ではな

かった。(図 1)



- (3) 長時間トリプシン添付培養 (LTT: long-term trypsin incubation) にて、Pax-7 陽性細胞数は経時的に有意に増加した。(図 2) 外尿道括約筋衛星細胞の転写制御ネットワークを詳細に検討するため、効率良く外尿道括約筋衛星細胞の増殖・回収を行える手技が確立された。



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 3 件)

Sumino, Y., Yoshikawa, S., Mori, KI., Mimata, H., Yoshimura, N.: IGF-1 as an Important Endogenous Growth Factor for the Recovery from Impaired Urethral Continence Function in Rats with Simulated Childbirth Injury. J Urol. 査読有 Jan 6, 2016. [Epub ahead of print]

Shin, T., Ukimura, O., Gill, IS.: Three-dimensional printed model of prostate anatomy and targeted biopsy proven index tumor to

facilitate nerve-sparing prostatectomy. Eur Urol. 査読有 69: 377-9, 2016.

篠原麻由香, 住野泰弘, 三股浩光.: 筋再生における外尿道括約筋衛星細胞の役割. 泌尿器外科. 査読有 29: 15-20, 2016.

[学会発表](計5件)

篠原麻由香, 住野泰弘, 花田麻里, 森健一, 佐藤文憲, 橋本有弘, 三股浩光. 長時間トリプシン処理による高純度不死化ヒト外尿道括約筋衛星細胞株作成の試み. 第12回泌尿器科再建再生研究会. 2015.6.6, TKP ガーデンシティ横浜 (神奈川県横浜市)

Sumino, Y., Yoshikawa, S., Shinohara, M., Mori, K., Sato, F., Mimata, H., Yoshimura, N. The association between impaired urinary continence mechanisms and age-related inflammation in female rats. American Urology Association. 2015.5.16, New Orleans (USA)

秦聡孝, 藤浪弘行, 三木大輔, 澁谷忠正, 山崎六志, 佐藤文憲, 三股浩光. 経尿道的操作を併用した逆行性アプローチによるロボット支援根治的前立腺全摘除術. 第103回日本泌尿器科学会総会. 2015.4.19, 石川県立音楽堂 (石川県金沢市)

篠原麻由香, 住野泰弘, 花田麻里, 佐藤文憲, 橋本有弘, 三股浩光. Tumor Necrosis Factor- はヒト外尿道括約筋細胞の筋分化誘導を抑制する. 第103回日本泌尿器科学会総会. 2015.4.18, 金沢都ホテル (石川県金沢市)

Shinohara, M., Sumino, Y., Miki,

D., Hanada, M., Sato, F., Hashimoto, N., Mimata, H. Tumor Necrosis Factor- inhibit the differentiation of myogenic cells in human urethral rhabdosphincter. International Society for Stem Cell Research 2014.6.26. Stockholm (Sweden)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秦 聡孝 (SHIN, Toshitaka)
大分大学・医学部・助教
研究者番号: 60404381

(2) 連携研究者

三股 浩光 (MIMATA, Hiromitsu)
大分大学・医学部・教授
研究者番号: 60219714

住野 泰弘 (SUMINO, Yasuhiro)
大分大学・医学部・客員研究員
研究者番号: 30325716

篠原 麻由香 (SHINOHARA, Mayuka)
大分大学・医学部・医員
研究者番号: 30774666