

平成30年 8月31日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10625

研究課題名(和文)慢性炎症を基盤とする病態におけるヒト外尿道括約筋の脆弱化機序の解明と治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the fragile mechanism of human urethral rhabdosphincter based on chronic inflammation and development of its treatment

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：外尿道括約筋は、尿禁制を維持するための重要な組織の1つである。外尿道括約筋の細胞数の減少は尿失禁の原因の1つと考えられ、老化に伴う慢性炎症はその減少に影響を及ぼすと考えられている。我々は外尿道括約筋組織より高純度に筋前駆細胞を単離する方法と筋分化可能な不死化ヒト外尿道括約筋を生成する方法を確立した。さらに、炎症性サイトカインの一つであるTNF- α はp-38MAPK及びPI3K/Aktシグナル伝達経路を介してヒト外尿道括約筋細胞の分化を抑制し、TNF- α 阻害薬はその分化抑制を阻害することを示唆する結果を得た。TNF- α 阻害薬は高齢者尿失禁の治療の一つとなる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：An external urethral sphincter is one of the important tissues for maintaining urinary continence. The decrease of muscle cell number in external urethral sphincter is suggested to be one of the causes of urinary incontinence and chronic inflammation accompanying aging may affect the decrease. We established a method to isolate muscle precursor cells with high purity from external urethral sphincter tissue and to generate differentiable immortalized human external urethral sphincter muscle. Moreover we showed that TNF- α , one of the inflammatory cytokines, suppressed muscle differentiation via p-38MAPK and PI3K/Akt signal transduction pathway reversed its effects. TNF- α inhibitors are expected to be one of the treatments for elderly urinary incontinence.

研究分野：医歯薬学

キーワード：外尿道括約筋 尿失禁 TNF-

1. 研究開始当初の背景

尿失禁は高齢者の10~50%にみられ、生活の質を低下させる重要な疾患である。尿禁制保持に重要な組織として、外尿道括約筋が挙げられる。加齢により外尿道括約筋細胞は減少することが知られており、細胞数の減少が尿禁制の機能障害を引き起こす原因の一つと考えられる。細胞数の減少の原因として慢性炎症が挙げられている。

(1)外尿道括約筋は発生学的及び解剖学に他の横紋筋と異なる

外尿道括約筋は膜様部尿道を状に取り囲む横紋筋である。マウスにおいて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唆されている(Borirakchanyavatら J Urol, 1997)。ヒトも同様で、このような平滑筋からの分化転換により発生する横紋筋は、外尿道括約筋と下部食道括約筋のみが報告されている。また、われわれはヒト外尿道括約筋と肛門挙筋の組織生化学的究より、横紋筋線維の比率に差はないものの、外尿道括約筋の筋線維は肛門挙筋に比べて細く、また間質成分が多いことを明らかにした。外尿道括約筋には他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る。

(2)ヒト外尿道括約筋幹細胞の増殖とアポトーシスの分子機序に関する研究

これまでわれわれは横紋筋の幹細胞とされる横紋筋衛星細胞がヒト外尿道括約筋にも存在することを証明し、さらにその増殖分化の制御機構に関しても世界で初めて報告してきた。ヒト外尿道括約筋衛星細胞はIGFやHGFによって促進され、IGFは分化も促進するのに対しHGFは分化を抑制することを明らかにした(Sumino Y, et al Neurourol Urodyn)。これらの違いは、IGFがPI3K経路を活性化するのに対して、HGFはMAPK経路を強力に活性化することで生じるということも証明した。また、四肢の骨格筋の萎縮には加齢に伴い増加する炎症性サイトカインのTNF- α が関与しているが、ヒト外尿道括約筋衛星細胞の増殖も濃度依存性に抑制し、またアポトーシスを誘発することを証明した(Hanada M, et al J Urol)。このことから、加齢に伴うTNF- α の増加が、外尿道括約筋細胞の減少を引き起こし、尿禁制の機能障害を生じると考えられる。

(3)ヒト外尿道括約筋におけるサイトカインのシグナル伝達関連遺伝子群の同定と機能解析

われわれは既にヒト外尿道括約筋と肛門挙筋の発現蛋白や発現遺伝子の差異についてプロテオーム解析及び網羅遺伝子発現解

析を行い、外尿道括約筋に高発現する蛋白や外尿道括約筋に2倍以上高発現する遺伝子を同定している。これらの遺伝子群には各種接着因子や細胞外基質蛋白、イオンチャンネル、サイトカインや神経伝達物質のシグナル伝達関連蛋白など、多彩な遺伝子が含まれており、外尿道括約筋はその他の骨格筋と生物学的特徴が異なっていることが示唆される。

2. 研究の目的

本研究では慢性炎症を基盤とする肥満や加齢の病態における外尿道括約筋細胞の脆弱化の機序を解明し、外尿道括約筋の再生や強化する新たな治療法の開発を目的としている。

3. 研究の方法

(1)外尿道括約筋の筋前駆細胞の単離と増殖・分化に伴う遺伝子発現

予め同意を得た膀胱全摘患者から手術時に外尿道括約筋組織を採取、組織を細断した後、collagenaseおよびaccutase処理を行い調製した細胞を増殖培地で2週間程度培養する。その後、蛍光標識された抗CD56抗体と水中で反応させ、標識された細胞をFacs-Aria (BD Biosciences)にて単離後、必要数になるまで4日以上細胞を培養し、一部の細胞でRNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN)を用いてRNAを抽出し、残りの細胞は分化誘導培地で3日間培養した後、同様の方法でRNAを抽出する。マイクロアレイ(Agilent Technology社)を用いてRNAから遺伝子を測定し、増殖・分化に伴う遺伝子発現を網羅的に解析する。

(2)ヒト外尿道括約筋細胞の分化能とTNF- α が与える影響

(1)とは別に、同意を得た膀胱全摘患者より外尿道括約筋を初代培養し、ヒト筋不死化法(Shiomi et al. 2011)に基づきcyclin D1、Cyclin dependent kinase3、teromeraseを遺伝子導入した長寿化したヒト外尿道括約筋細胞を作成する。長寿化したヒト外尿道括約筋細胞を用いて下記の から を検討する。

NCAM(CD56)、sarcomeric actin、desminを一次抗体とする免疫染色にて括約筋細胞の確認、培養継続が可能な継代数、分化能の有無、TNF- α 添加による分化能への影響、TNF- α 阻害薬であるEtanercept前投与後のTNF- α 添加による分化能への影響、 と におけるシグナル伝達経路への影響

の分化能評価はRT-qPCR、western blotting、免疫染色でのMyosin heavy chain発現にて、 の評価はAkt及びp38を一次抗体とするwestern blottingにて行う。

4. 研究成果

(1)外尿道括約筋の筋前駆細胞の単離と増殖・分化に伴う遺伝子発現

抗CD56抗体陽性である筋前駆細胞は97-99%の高純度で単離することができた。

マイクロアレイの結果では、分化誘導前の細胞で未分化な筋前駆細胞の遺伝子マーカーである Pax7、Myf5 遺伝子の発現を認め、分化誘導後の細胞では骨格筋特異的な遺伝子である MyoG、Myh 遺伝子の発現を認めた。また、分化誘導により発現増加した遺伝子には筋構造、筋収縮、筋形成、液胞、細胞内代謝に関係する遺伝子が認められ、発現が減少した遺伝子には、細胞周期、細胞周期依存的な核内構造体、RNA 輸送に関係する遺伝子が認められた。

(2) ヒト外尿道括約筋細胞の分化能と TNF- α が与える影響

抗 NCAM (CD56) 抗体陽性細胞はほぼ 100% であり、sarcomeric actin、desmin 陽性にて外尿道括約筋細胞と同定した。長寿化ヒト外尿道括約筋細胞は倍加時間を維持したまま 40 代まで継代が可能であった。分化後は分化前と比較して有意に myosin heavy chain の発現が高くみられた。TNF- α の濃度依存性に myosin heavy chain の発現は低下した。

Etanercept 前投与しない群に比べ MHC の発現は増加した。TNF- α 添加により Akt、p38 の発現低下、Etanercept 前投与により Akt、p38 の発現は改善した。

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 11 件)

(1) Hypoxia-induced angiopoietin-like protein 4 as a clinical biomarker and treatment target for human prostate cancer.

Hata S, Nomura T, Iwasaki K, Sato R, Yamasaki M, Sato F, Mimata H.

Oncol Rep. 2017 Jul;38(1):120-128. 査読有

(2) Tumor necrosis factor- α inhibits differentiation of myogenic cells in human urethral rhabdosphincter.

Shinohara M, Sumino Y, Sato F, Kiyono T, Hashimoto N, Mimata H.

Int J Urol. 2017 Jun;24(6):461-467. 査読有

doi: 10.1111/iju.13330

(3) Effects of Estrogen Receptor Stimulation in a Rat Model of Non-Bacterial Prostatic Inflammation.

Mizoguchi S, Mori K, Wang Z, Liu T, Funahashi Y, Sato F, DeFranco DB, Yoshimura N, Mimata H.

Prostate. 2017 May;77(7):803-811. 査読有

(4) Kidney-specific knockout of Sav1 in the mouse promotes hyperproliferation of renal tubular epithelium through suppression of the Hippo pathway.

Kai T, Tsukamoto Y, Hijiya N, Tokunaga A, Nakada C, Uchida T, Daa T, Iha H, Takahashi M, Nomura T, Sato F, Mimata H, Ikawa M, Seto M, Matsuura K, Moriyama M.

J Pathol. 2016 May;239(1):97-108. 査読有

(5) Downregulation of WDR20 due to loss of 14q is involved in the malignant transformation of clear cell renal cell carcinoma.

Takahashi M, Tsukamoto Y, Kai T, Tokunaga A, Nakada C, Hijiya N, Uchida T, Daa T, Nomura T, Sato F, Mimata H, Matsuura K, Moriyama M.

Cancer Sci. 2016 Apr;107(4):417-23. 査読有

(6) IGF-1 as an Important Endogenous Growth Factor for Recovery from Impaired Urethral Continence Function in Rats with Simulated Childbirth Injury.

Sumino Y, Yoshikawa S, Mori K, Mimata H, Yoshimura N.

J Urol. 2016 Jun;195(6):1927-35. 査読有
10.1016/j.juro.2015.12.087

(7) Association of metabolic complications with plasma mid-regional pro-adrenomedullin level in stable kidney transplant recipients.

Suzuki Y, Katagiri F, Sato F, Fujioka T, Tanaka R, Sato Y, Mimata H, Itoh H.

Clin Chim Acta. 2016 Jan 30;453:160-3. 査読有

(8) Age-related changes in bladder function with altered angiotensin II receptor mechanisms in rats.

Mori K, Noguchi M, Tobu S, Sato F, Mimata H, Tyagi P, Chancellor MB, Yoshimura N.

Neurourol Urodyn. 2016 Nov;35(8):908-913. 査読有

(9) CYP3A5 polymorphism affects the increase in CYP3A activity after living kidney transplantation in patients with end stage renal disease.

Suzuki Y, Fujioka T, Sato F, Matsumoto K, Muraya N, Tanaka R, Sato Y, Ohno K, Mimata H, Kishino S, Itoh H.

Br J Clin Pharmacol. 2015 Dec;80(6):1421-8. 査読有

(10)Angiopoietin-like protein 2 induces androgen-independent and malignant behavior in human prostate cancer cells. Sato R, Yamasaki M, Hirai K, Matsubara T, Nomura T, Sato F, Mimata H. Oncol Rep. 2015 Jan;33(1):58-66. 査読有

(11)Downregulation of NDUFB6 due to 9p24.1-p13.3 loss is implicated in metastatic clear cell renal cell carcinoma. Narimatsu T, Matsuura K, Nakada C, Tsukamoto Y, Hijiya N, Kai T, Inoue T, Uchida T, Nomura T, Sato F, Seto M, Takeuchi I, Mimata H. Moriyama M. Cancer Med. 2015 Jan;4(1):112-24. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) ICS 2016 (International Continence Society) (2016.9/13-16,Tokyo,Japan)
Tumor Necrosis Factor- inhibits the differentiation of myogenic cells in human urethral rhabdosphincter.
Mayuka Shinohara, Yasuhiro Sumino, Yasuyuki Akita, Mari Hanada, Toshitaka Shin, Kenichi Mori, Fuminori Sato, Naohiro Hashimoto, Hiromitsu Mimata

(2)第 23 回日本排尿機能学会(2016.12/6-8 東京)
TNF- はヒト外尿道括約筋細胞の分化を抑制する
篠原 麻由香, 住野 泰弘, 花田 麻里, 秋田 泰之, 秦 聡孝, 佐藤 文憲, 橋本 有弘, 三股 浩光

(2) 第 104 回日本泌尿器科学会総会 (2016.4/23-25 仙台)
接着力の違いを利用した細胞分離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
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

〔図書〕(計 1 件)

【下部尿路機能再生医療の現況】筋再生における外尿道括約筋衛星細胞の役割(解説/特集)
篠原 麻由香, 住野 泰弘, 三股 浩光
泌尿器外科 (0914-6180)29 巻 1 号
Page15-20(2016.01)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.med.oita-u.ac.jp/hinyoki/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
三股 浩充 (MIMATA HIROMITSU)
大分大学・医学部・泌尿器科・教授
研究者番号: 60219714

(2)研究分担者
森 健一 (MORI KENICHI)
大分大学・医学部・客員研究員
研究者番号: 00579013

(3)連携研究者
住野 泰弘 (SUMINO YASUHIRO)
大分大学・医学部・客員研究員
研究者番号: 30325716

(4)研究協力者 ()