

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18791119
 研究課題名 (和文) 膀胱線維化の抑制に関する基礎的研究と治療法の開発
 研究課題名 (英文) Investigation for fibrosis of bladder: Over-expression of Smad6 and Smad7 in endothelial cells inhibits in vitro angiogenesis
 研究代表者
 乃美 昌司 (NOMI MASASHI)
 神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
 研究者番号：10324930

研究成果の概要：

本研究では神経因性膀胱における膀胱の線維化プロセスを分子生物学的に解明することを目標とした。膀胱の線維化には微小血管の虚血が関与していることが予想されており、また組織の線維化において Transforming growth factor (以下 TGF) - β が重要な役割を果たしていることから、今回我々は TGF- β の微小血管形成における役割を解明する為に、TGF- β からの情報伝達の下流に位置する Smad 蛋白群に着目し、Smad6, 7 がヒト血管内皮細胞の増殖能、遊走能に影響を与え、血管内皮細胞による血管新生を抑制することを証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	600,000	0	600,000
2007 年度	600,000	0	600,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	1,900,000	210,000	2,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：再生医療、泌尿器科学

1. 研究開始当初の背景

二分脊椎症や脊髄損傷に起因する神経因性膀胱では膀胱炎などの感染症や膀胱内圧上昇による直接障害などで、膀胱容量及びコンプライアンスが低下する症例を高率に認める。膀胱の容量及びコンプライアンス低下の主因は膀胱壁の線維化であるが、健全な膀胱が正常な神経支配を失った後にどのようなプロセスを経て線維化が進行していくのか詳細な検討はなされていない。

2. 研究の目的

本研究では膀胱線維化の研究において、形態的及び組織学的検討の次になされるべき分

子生物学的検討を中心に行うこと、さらにその知見に基づき、将来的に神経因性膀胱の膀胱機能維持に向けた新たな治療法の開発につなげることを目的とする。

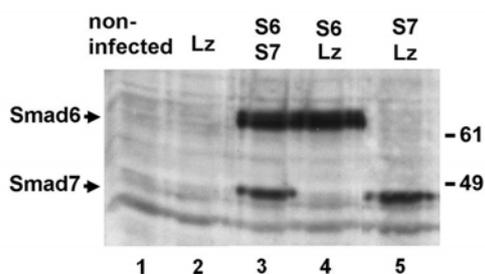
3. 研究の方法

本研究では、多くの臓器で線維化に関わるとされ、膀胱においても線維化に関与していることが証明されている Transforming growth factor- β (TGF- β) とその情報伝達において下流の蛋白 Smad に焦点を当てた基礎実験を行った。Smad は TGF- β スーパーファミリーの下流に存在し、主に転写因子として作用

する R-Smad (Smad1, 2, 3, 5, 8)、R-Smad と協調して作用する Co-Smad (Smad4)、これらのシグナル伝達を抑制する I-Smad (Smad6, 7) に分類される。ヒト血管内皮細胞 HMEC-1 に Smad6, 7 を強制発現し、増殖能、遊走能を評価し、マトリゲルコート培養皿上で微小血管様の管状構造を形成させる Capillary-like tube formation assay を行った。

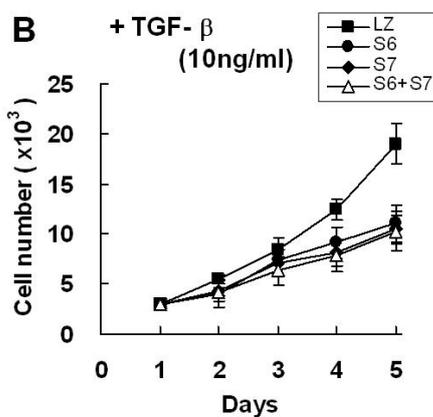
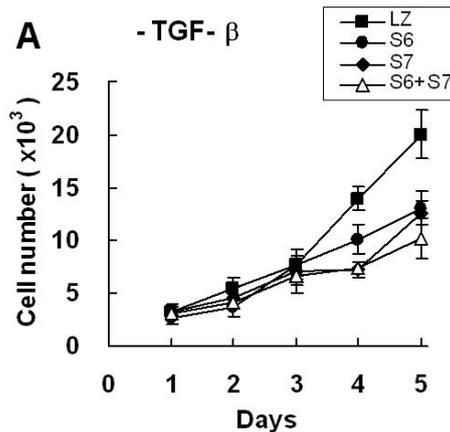
4. 研究成果

- ① まず我々は血管形成における Smad 蛋白の役割を調べるために、アデノウイルスベクターを用いてヒト血管内皮細胞に Smad6, 7 およびコントロールとして LacZ を強制発現させた。導入された LacZ 蛋白は X-gal 染色により 90% の細胞で確認され、ウエスタンブロッティング法にて Smad 蛋白の発現が確認された。各蛋白は Smad6+Smad7, Smad6+LacZ および Smad7+LacZ の各組み合わせで共発現させることが可能であった。



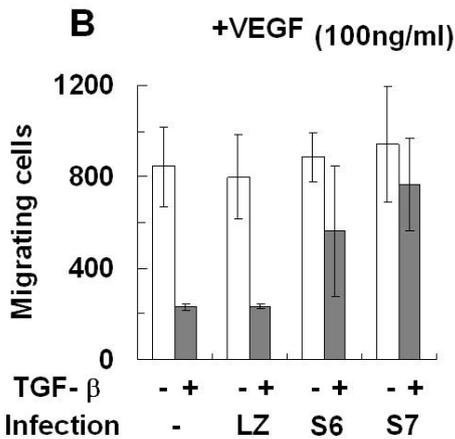
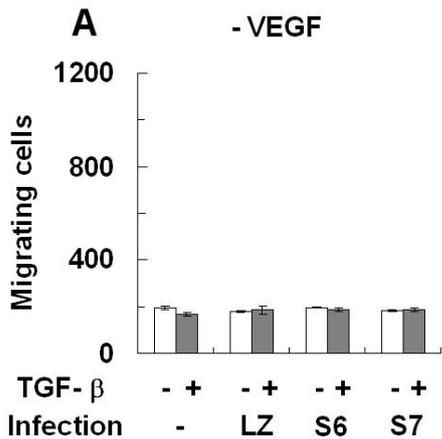
Human ECs were infected with AdvCMVSmad6, AdvCMVSmad7 and AdvCMVLacZ alone or in combination. ECs were infected 4 groups as AdvCMVLacZ (LZ), AdvCMVSmad6 with AdvCMVLacZ (S6), AdvCMVSmad7 with AdvCMVLacZ (S7), AdvCMVSmad6 with AdvCMVSmad7 (S6+S7). The expression of Smad6 and Smad7 proteins were detected with Western blotting analysis 48 hours after adenovirus infection.

- ② Smad 蛋白の血管内皮細胞に対する作用を調べるために Smad 蛋白強制発現下での細胞増殖能を評価した。Smad6, 7 は血管内皮細胞の増殖を TGF- β の存在の有無にかかわらず軽度に抑制することが観察された。下図 A は TGF- β の存在しない条件下、図 B は TGF- β を培養液に加えた条件下での細胞数を示したものである。



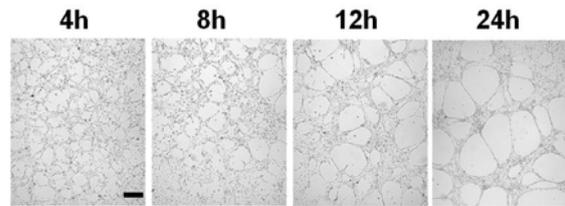
Proliferation assay was performed in 48well plates. LZ significantly inhibited proliferation compared with non-infected cells. S6, S7 and S6+S7 significantly inhibited proliferation severer than LZ.

- ③ Smad 蛋白の細胞遊走能へ与える影響を調べるため、Boyden chamber 法による遊走試験を行った。TGF- β は血管内皮成長因子 VEGF165 により誘導される血管内皮細胞の遊走を本実験の条件下では抑制するが、Smad6, 7 は TGF- β の作用を阻害することが観察された。すなわち下図 A は VEGF の存在しない条件下であり、どのグループにおいても同じ遊走性が観察された。一方、下図 B では VEGF により細胞の遊走能が賦活化されるが (棒グラフ白)、TGF- β を加えた条件下 (棒グラフ黒) では VEGF の作用が抑制されることが示されている。その TGF- β による VEGF の抑制作用は Smad6, 7 により抑制されることが観察された。



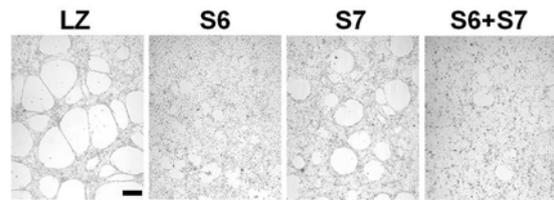
Migration assay was performed in a Boyden chamber. In no-chemoattractant condition, each groups showed same migration activity, and TGF-β showed no effect for any groups. VEGF induced chemotaxis in all groups and no significant difference between them. TGF-β inhibited migration activity induced by VEGF165 in non-infected and LZ but not in S6 and S7.

- ④ 我々はSmad蛋白の血管形成における役割を調べるためにマトリゲルでコーティングした培養皿上での微小血管様管状構造の形成を観察するCapillary-like tube formation assayの方法を確立した。マトリゲルはTGF-βを1.7-4.7ng/ml含有している。LacZを強制発現した 4×10^5 個のヒト血管内皮細胞をマトリゲルコーティングした24穴培養皿上で培養したところ下図のように24時間までに微小血管様構造の形成が確認された。



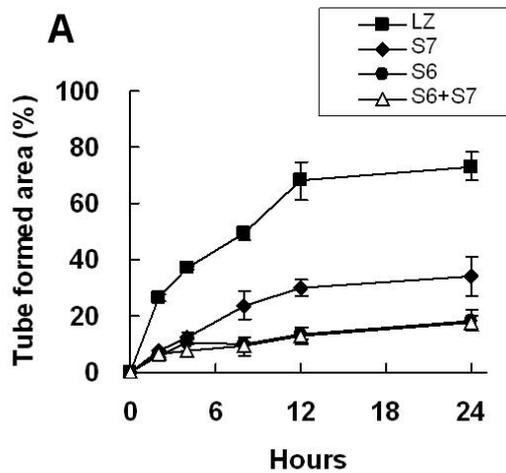
Human ECs were seeded at a density of 4×10^5 cells/well in 24well plates pre-coated with Matrigel and incubated from 0 to 24 hours. Cells started to form capillary-like tube formation after 4 hours of incubation and completed 24 hours. Bar equals 250um.

- ⑤ 続いてLacZの他、Smad6, Smad7 および Smad6+Smad7 共発現の各条件下で capillary like tube formation assayを行った。培養開始より24時間経過後、LacZと比較してSmad群では微小血管様構造の形成が阻害されることが確認された。

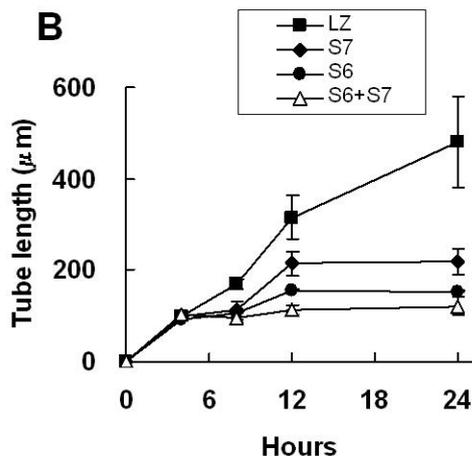


Adenovirus infected ECs formed capillary like tubule formation after 24 hours incubation. Ectopic expression of Smad6 and/or Smad7 prevented capillary-like tube formation. Bar equals 250um.

- ⑥ Capillary-like tube formation assayを定量的に評価するために、微小血管様管状構造を形成した面積および管状構造の長さをAdobe Photoshop 5.0およびNIH-Imageを用いて、2, 4, 8, 12, 24時間で計測し、それぞれ下図Aおよび下図Bとしてグラフ化した。管状構造を形成した面積は24時間の時点でLacZと比較し、Smad7, Smad6, Smad6+7においてそれぞれ46%, 24%, 24%と小さくなっていることが確認された。管状構造の長さも同様に45%, 32%, 25%と短くなっていることが確認された。以上よりSmad6およびSmad7は本実験の条件下において微小血管様構造の形成を抑制することが確認された。



The tube formed areas on the MatrigelTM were measured after 2, 4, 8, 12 and 24 hours incubation. LZ showed significantly smaller tube formed area than that of non-infected. S6, S7 and S6+S7 showed significantly smaller area of tube formation than that of LZ.



The tube lengths were measured after 4, 8, 12 and 24 hours incubation. Tube length of non-infected cells was longer than that of LZ. S6, S7 and S6+S7 formed significantly shorter tubes than that of LZ.

- ⑦ 以上の実験結果より、Smad 6, 7 がヒト血管内皮細胞の増殖能、遊走能に影響を与え、本実験の条件下では血管内皮細胞による血管新生を抑制することを証明した。

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)

[学会発表] (計 2 件)

1.

乃美 昌司

Smad6, 7 はヒト血管内皮細胞による血管新生を抑制する

第 5 回泌尿器科再建再生研究会

2008. 6. 28

仙台

2.

Masashi Nomi

Over-expression of SMAD6 and SMAD7 in Endothelial cells inhibits in vitro angiogenesis

The 18th Annual meeting of the international urological conference of Taiwan

2008. 8. 30

Taiwan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乃美 昌司 (NOMI MASASHI)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号：10324930

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者