

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：17501
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K09171
研究課題名(和文) 外尿道括約筋幹細胞における抑制系シグナル伝達経路の制御による尿失禁治療法の開発

研究課題名(英文) Development of urinary incontinence treatment by controlling the inhibitory signal transduction pathway in external urethral sphincter stem cells

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト外尿道括約筋幹細胞において、シグナル抑制機構であるJAK/STATシグナル伝達経路の機能解析を行った。さらに、炎症性サイトカインの一つであるIL-6はJAK/STATシグナル伝達経路を介して、ヒト外尿道括約筋細胞の増殖・分化を制御する重要な因子であることを示唆する結果を得た。今後も研究を進め、外尿道括約筋再生と尿失禁新規治療法の開発を目指していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿失禁は高齢者に高頻度にみられる疾患で、日本人女性では約20%以上にみられ、男性の場合は5-15%が罹患していると報告されており、高齢者のQOLを損なう原因の一つとして重要な疾患である。腹圧性尿失禁に対する新たな治療法として、外尿道括約筋の再生治療法の開発が望まれている。IL-6/JAK/STATシグナル伝達経路は、ヒト外尿道括約筋細胞の増殖・分化を制御する重要な因子であり、機能解明することで外尿道括約筋の再生治療の開発に大きく寄与することができる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the function of the JAK / STAT signaling pathway, which is a signal suppression mechanism, in human external urethral sphincter stem cells. Furthermore, we obtained results suggesting that IL-6, one of the inflammatory cytokines, is an important factor that controls the proliferation and differentiation of human external urethral sphincter muscle cells via the JAK / STAT signaling pathway. we will proceed with further research and aim to develop new treatments for external urethral sphincter muscle regeneration and urinary incontinence.

研究分野：医師薬学

キーワード：外尿道括約筋 IL-6 JAK-STAT

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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疾患である。外尿道括約筋は尿禁制保持に重要な役割を果たしているが、加齢とともにアポトーシスを起こし、細胞数が低下する。シグナル伝達兼転写活性因子である JAK-STAT 伝達経路は、細胞の増殖や成長、造血、免疫反応にシグナル伝達で重要な役割を果たしており、骨格筋再生に JAK/STAT 伝達経路の関与していることが報告されているが、外尿道括約筋における役割ははまだ報告されていない。また、高齢の骨格筋ではシグナル伝達経路の抑制制御機構が亢進し、若年にみられるサイトカインのシグナル伝達が不十分であることが明らかにされている。

(1)外尿道括約筋の発生学的・解剖学的特徴

外尿道括約筋は膜様部尿道を 状に取り囲む横紋筋で、マウスでは四肢・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、外尿道括約筋の他には下部食道括約筋のみが報告されている。また、ヒト外尿道括約筋は肛門挙筋と比べ、筋線維が細く間質成分が多いことを、われわれは明らかにした。このように、外尿道括約筋は他の横紋筋とは異なる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

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、その増殖分化の制御機構につい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 によって促進されるが、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 Urodynm)。IGF が PI3K 経路を活性化することに対して、HGF は MAPK 経路を強力に活性化することが関係していることを証明した。また骨格筋萎縮に関与している、加齢に伴い増加する炎症性サイトカインの TNF- α 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

われわれはヒト外尿道括約筋と肛門挙筋の発現蛋白・遺伝子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特徴が異なっていることが示唆される。Leptin や insulin のシグナル伝達経路における負の制御因子として知られる SOCS3 もそのうちの 1 つであり、外尿道括約筋において肛門挙筋の 10 倍量の遺伝子を発現している。

(4)ヒト外尿道括約筋細胞の分化能と TNF- α が与える影響

われわれが確立したヒト外尿道括約筋細胞の不死化細胞株は、抗 NCAM(CD56)抗体でほぼ 100%陽性であり、sarcomeric actin、desmin も陽性であった。また倍加時間を維持したまま 40 代まで継代が可能であり、分化後の MHC 発現も良好であった。

2. 研究の目的

本研究では、外尿道括約筋幹細胞の増殖・分化において、抑制系シグナル伝達経路である JAK/STAT 伝達経路の役割を in vitro で解明し、ヒト外尿道括約筋の再生と尿失禁に対する新規治療法の開発につなげていく。

3. 研究の方法

(1)ヒト外尿道括約筋細胞の増殖・分化において JAK-STAT 経路因子の発現

同意を得た膀胱全摘患者の外尿道括約筋を少量採取し、コラゲナーゼ処理して得た初代培養細胞をヒト筋細胞不死化法による遺伝子導入にて不死化する。不死化ヒト外尿道括約筋細胞を 10cmdish に 10^6 個まき増殖用培地にて 2 日間培養後、一部の細胞から蛋白・RNA 抽出を行い、JAK-STAT 経路の因子に対して Western blotting、RT-qPCR 行い定量分析を行う。残りの細胞は、分化培地に変え IL-6 添加した分化誘導培地に変え、10 日間培養し筋線維へ分化させる。分化後 1、2、3、5 日後の細胞から、蛋白抽出・RNA 抽出を行い、各因子に対して RT-qPCR 行い定量分析を行う。また、各因子かつ筋分化マーカーであるミオシン重鎖(MHC)の免疫染色を行い、各因子の局在変化や細胞の形態変化をみる。培地は 2 日毎に交換する。

(2)SOCS3 がヒト外尿道括約筋細胞の増殖・分化に及ぼす影響

外尿道括約筋細胞の増殖期において、SOCS3 の siRNA をトランスフェクションし、Knock down を行った後、上記培養実験(1)を行い、Western blotting、RT-qPCR にて定量分析をする。また、一部の細胞は SOCS3 の Knock down 後に、増殖培地で 3 日間培養し細胞数を測定する。

(3)IL-6 がヒト外尿道括約筋細胞の増殖・分化に及ぼす影響

増殖培地・分化培地に IL-6 を各濃度別(10pg/ml, 100pg/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 50ng/ml)に添加後、上記培養実験(1)を行い、Western blotting、RT-qPCR 行い定量分析に加え、3 日培養後の細胞数を行う。また免疫染色にて形態学的評価も行う。また、一部の細胞は IL-6 添加後に、増殖培地で 3 日間培養し細胞数を測定する。IL-6 添加・培地交換は 2 日毎とする。

4. 研究成果

ヒト外尿道括約筋幹細胞において、シグナル抑制機構である JAK/STAT 経路の機能解析を行った。増殖期において SOCS3 は高発現しており、STAT3 は抑制されている。SiRNA SOCS3 にて SOCS3 を knock down させると、STAT3・リン酸化 STAT3 の発現は増加し、細胞増殖は抑制された。分化後 SOCS3 の発現は有意に減少し、STAT1-3 は分化が進むにつれて発現が増加した。次に IL-6 を濃度別 (10pg/ml, 100pg/ml, 1000pg/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 50ng/ml) で増殖・分化時に添加したところ、増殖期では IL-6 高濃度 (10ng/ml, 50ng/ml) で細胞増殖が軽度亢進した。分化後では IL-6 低濃度 (10pg/ml, 100pg/ml) で MHC の発現が軽度増加し、筋分化を促進したと考えられる。また、IL-6 添加後は STAT3 の発現は増加し、SOCS3 の発現も軽度増加した。このように、ヒト外尿道括約筋細胞の増殖・分化において、IL-6/JAK/STAT 経路は重要な制御機構であることが示唆された。

(1) ヒト外尿道括約筋細胞の増殖・分化において JAK-STAT 経路因子の発現

Myogenin は分化培地に変更して 1 日後、MHC は 2 日後より遺伝子発現を認め、5 日後には筋管細胞の形成を認めた。JAK-STAT に関して、分化培地に変更後、SOCS1-3 は有意に低下し、SOCS1・3 は分化前より発現が亢進することはなかった。STAT1-3 は分化が進むにつれ発現は漸増した。

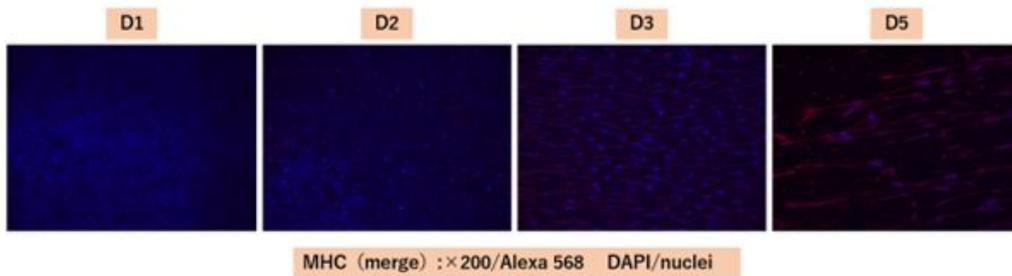


図1. Myosin heavy chain 染色 (分化後) merge MHC:Alexa556 nuclei:DAPI

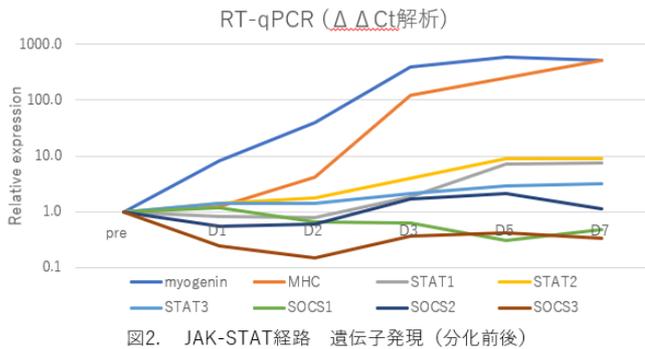


図2. JAK-STAT経路 遺伝子発現 (分化前後)

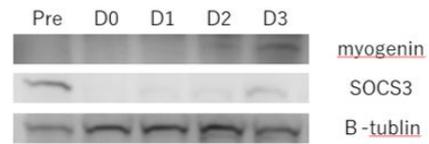


図3. SOCS3発現 (分化前後 western blotting)

(2) SOCS3 がヒト外尿道括約筋細胞の増殖・分化に及ぼす影響

増殖期で SOCS3 を SiRNA (SiRNA の濃度: SiRNA SOCS3 10nM, iMax5 μl) で knock down したところ、3 日後の細胞数は control に比べ約 80% に減少した。また、STAT3・p-STAT3 (リン酸化 STAT3) の発現は増加した。

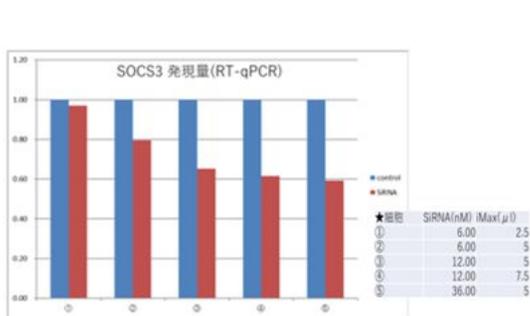


図4. SiRNA SOCS3 条件

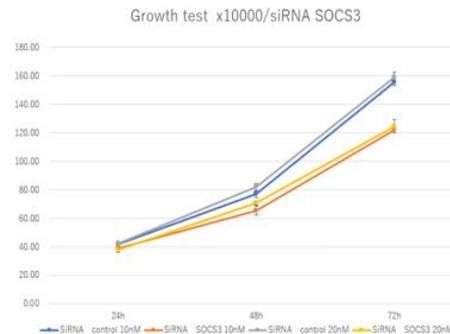


図5. SOCS3 SiRNA導入後の細胞数 (分化前後)

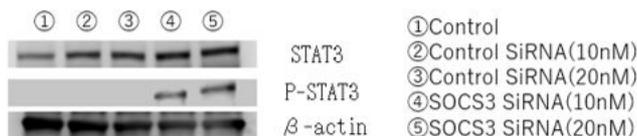


図6. STAT3発現 (SOCS3 knock down後 western blotting)

(3) IL-6 がヒト外尿道括約筋細胞の増殖・分化に及ぼす影響

増殖培地で各濃度の IL-6 を添加後、3 日間培養した後、細胞数を測定した。IL-6 濃度 < 1000pg/ml では有意な差は認められなかったが、IL-6 濃度が 10ng/ml・50ng/ml では細胞数は軽度増加した。分化培地で各濃度の IL-6 添加し、MHC の発現を分析評価した。IL-6 濃度が 10pg/ml・100pg/ml では、分化 3 日目の MHC の遺伝子発現は有意に増加し、免疫染色でも IL-6 濃度 10pg/ml では 5 日目以降も MHC の発現は増加しており、STAT3 の発現も増加を認めた。SOCS3 は分化培地後に有意に減少するが、IL-6 添加後は発現の軽度増加を認めた。

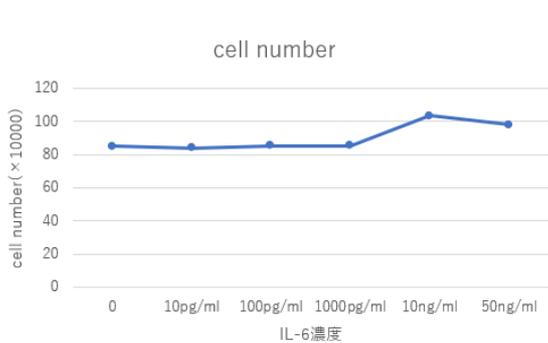


図7. IL-6添加後 細胞数

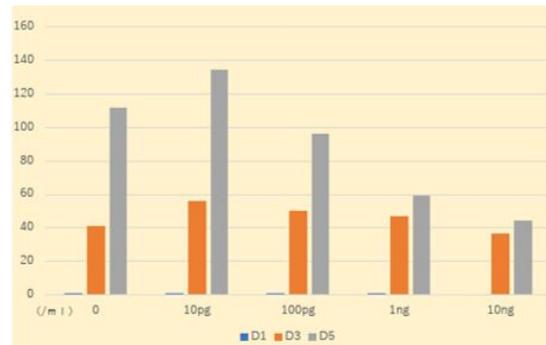


図8. IL-6添加後 Myosin heavy chain 発現 (RT-qPCR)

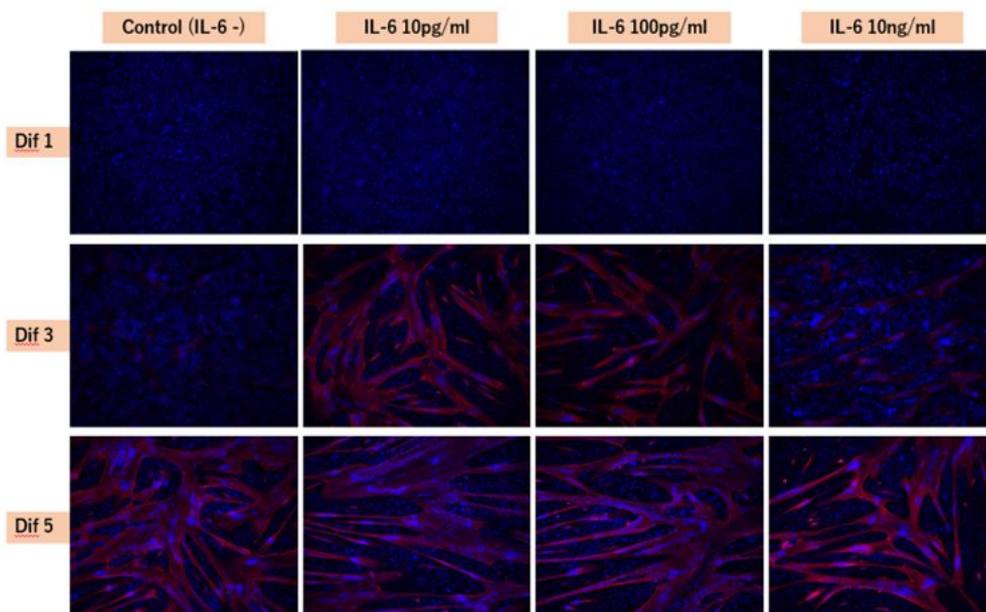


図9. IL-6添加後 (分化) Myosin heavy chain 染色(merge MHC:Alexa555 nuclei:DAPI)

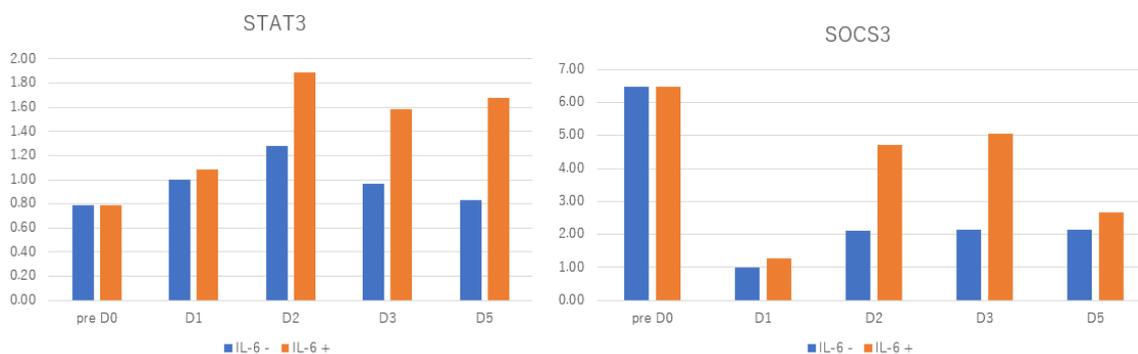


図10. IL-6 (10pg/ml) 添加後 STAT3・SOCS3 発現 (RT-qPCR)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 吉泰 (Sato Yoshiyasu) (00796302)	大分大学・医学部・医員 (17501)	
研究分担者	秦 聡孝 (Shin Toshitaka) (60404381)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	
研究分担者	山中 直行 (Naoyuki Yamanaka) (60796415)	大分大学・医学部・医員 (17501)	
研究分担者	安藤 忠助 (Tadasuke Ando) (20433047)	大分大学・医学部・講師 (17501)	
研究分担者	平井 健一 (Kenichi Hirai) (10404386)	大分大学・医学部・客員研究員 (17501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------