

機関番号 : 35303

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20591891

研究課題名 (和文) 下部尿路閉塞に伴う膀胱平滑筋における STAT3 の発現および機能解析に関する検討

研究課題名 (英文) Correlation of bladder smooth muscle hypertrophy following bladder outlet obstruction and possible involvement of signal transducer and activator of transcription 3 expression

研究代表者

横山 光彦 (YOKOYAMA TERUHIKO)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 40325113

研究成果の概要 (和文) :

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) に着目し、STAT3 が下部尿路閉塞 (以下 BOO) に関与するかについての検討を行った。ラットを用い、BOO モデルを作製し膀胱平滑筋を摘出し蛋白発現を調べた。また STAT3 に対する small interfering RNA (siRNA) トランスフェクションの後、膀胱平滑筋細胞に、周期的な機械的伸展刺激を与え、 α -smooth muscle actin および STAT3 の発現を評価した。BOO モデルラット膀胱において、STAT3、 α -smooth muscle actin の増加を確認した。また免疫組織学的に、機械的伸展刺激を加えた膀胱平滑筋細胞では α -smooth muscle actin の増加を認め、STAT3 に対する siRNA トランスフェクション群ではその増加が抑制された。

研究成果の概要 (英文) : We examined the involvement of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in bladder outlet obstruction (BOO)-induced bladder smooth muscle hypertrophy using rat *in vivo* and *in vitro* study. BOO induced an increase in bladder weight and the thickness of bladder smooth muscle layer 1 week after operation. In the profiling study, we found an increase in the expression of STAT3. Significant increase in the nuclear phosphorylated STAT3 expression was confirmed in bladder smooth muscle tissue by immunohistochemistry and Western blot analysis. Cyclical stretch-relaxation (1 Hz) at 120% elongation significantly increased the expression of STAT3 and α -smooth muscle actin in primary cultured bladder smooth muscle cells. Furthermore, blockade of STAT3 expression by the transfection of STAT3 small interfering RNA (siRNA) significantly prevented stretch-induced increase in α -smooth muscle actin expression. These results suggest that STAT3 has an important role in the induction of bladder smooth muscle hypertrophy.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

前立腺肥大症などの下部尿路閉塞により、尿道抵抗が増加した場合、膀胱平滑筋が代償性に肥大することは良く知られている。しかし、その状態が長期に渡れば、徐々に代償しきれなくなり、その収縮力は損なわれ、非代償期へと移行する。今後高齢化社会を迎え、前立腺肥大症に伴う下部尿路閉塞における膀胱平滑筋の肥大及び過活動膀胱に関連する機能的なメカニズムの解明は重要な課題となってくるものと考えられる。

2. 研究の目的

Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)は、炎症反応やサイトカインの伝達に関連する転写因子であり、組織再生や、また近年では心肥大の関連因子として注目されている。また、STAT3の活性化がTGF- β を阻害し、心筋の線維化を抑制するとの報告もある。当該研究の目的は、STAT3の機能を明らかにし、肥大平滑筋や過活動膀胱の治療における標的となりうるか否かを明らかにし、有効な治療法を開発するための科学的基盤を形成することである。

3. 研究の方法

実験動物

全ての実験において、8週齢雌Sprague-Dawleyラット(体重180-200g)を用いた。

ラット膀胱頸部部分閉塞モデルの作製

Sodium pentobarbital麻酔下に、腹部正中切開にて膀胱を露出。直径1mmのカテーテルを尿道に平行に沿わせ、尿道ごと4-0絹糸にて結紮した後にカテーテルを抜去し、部分閉塞モデルとした。

膀胱組織からの蛋白抽出

膀胱を摘出した後、膀胱粘膜上皮を可及的に除去し、液体窒素で凍結保存した。膀胱組織を粉砕した後、組織は50mM Tris-HCl (pH 7.5)と5% SDSを含む溶液の中でホモジネートした。16,000 rpm、20分間遠沈分離した後、上清を抽出した。

抗体アレイ

抽出した蛋白にCy3あるいはCy5の蛍光色素でラベルして抗体アレイ(BD Clontech Ab Microarray 380, #K1847-1, BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA)を用いてprofilingを行った。

ラット膀胱平滑筋初代培養細胞の作製

膀胱を摘出した後、膀胱粘膜上皮を可及的に除去し、0.2% trypsin + RPMI-1640 培地

(Invitrogen)内で、30分間37°C恒温槽内で振蕩。次いで、0.1% collagenase + RPMI-1640 培地内で、膀胱標本を細切し、再度30分間37°C恒温槽内で激しく振蕩した。2000回転・5分間遠沈し、上清を除去した後の沈渣に10% FBS + 1% penicillin/streptomycin + RPMI-1640 培地を加え、ピペティングを行った。培養皿に細胞を播種し(20,000/cm²)、37°C、5%CO₂のインキュベーター内で細胞培養を行った。

膀胱平滑筋初代培養細胞への伸展刺激

ラット膀胱平滑筋培養細胞を10.24 cm²のコラーゲンコートしたシリコンチャンバーに5 × 10⁵ cells/cm²の濃度で移し、そのチャンバーを専用の伸展装置(NS-500, Strex, Nagoya, Japan)に設置し、24時間一定方向に最大120%、1 Hzの刺激を加えた。

RNA干渉法によるSTAT3の発現抑制

Silencer siRNA Transfection Kit (Ambion, Austin, TX, USA)を用いて平滑筋培養細胞に伸展刺激を加える前にSTAT3に対するsiRNAを1時間transfectさせ上記の方法で24時間伸展刺激を行った。また、同時にscrambled control siRNAをtransfectした細胞も伸展刺激を加え比較した。

ウェスタンブロットティング法

20 mM Tris-HCl (pH 7.5)と1% SDSを含む溶解バッファー中で、摘出した膀胱をホモジネートした。15,000 rpm、15分間遠沈分離した後、その上清50 μ gをSDS-PAGEゲル上に電気泳動を行い、蛋白質を分離した。メンブレンに蛋白質を転写した後、STAT3、phosphorylated STAT3、 α -smooth muscle actin、anti-NF- κ B、anti-phosph-NF- κ B p65、bFGFに対する特異抗体を一次抗体としてブロットティングした。二次抗体と反応後、enzyme-linked chemiluminescence detection kit (Amersham Pharmacia Biotech)を用いてそれぞれの蛋白のバンドを検出した。各サンプルにおいて、抗GAPDH抗体 (Chemicon International, Inc.)を用いて総蛋白量を定量し、補正した。各蛋白の発現量の定量には、NIH image ソフトウェアを用いた。

H-E染色法と組織学的検討

摘出した膀胱は、重量測定した後、4% paraformaldehydeで固定を行い、厚さ10 μ mの薄切切片を作成した。H-E染色後、膀胱壁、並びに膀胱筋層の厚みについて顕微鏡下で観察・計測した。

免疫組織学的検討

Vecstatin-ABC System Polyclonal Kit (Vector Laboratories)を用いて、

anti-phospho-STAT3(Tyr705)に対する特異的な抗体を使用して、膀胱組織内のリン酸化された STAT 3 の膀胱壁内の局在について検討した。

免疫細胞学的検討

機械的な伸展刺激を加えた膀胱平滑筋初代培養細胞を、4% paraformaldehyde にて固定し、抗 α -smooth muscle actin 抗体(Sigma Aldrich)を一次抗体、fluorescent isothiocyanate conjugated secondary antibody (Sigma Aldrich)を二次抗体に用いて蛍光免疫染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss)にて細胞を観察した。

統計学的解析

データは、平均値±SEM で示し、Student t test もしくは post-hoc Fisher's PLDS test にて検定し、 $p < 0.01$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

膀胱重量は、術 1 週間後には BOO 群は 215 ± 24.8 mg (118 – 335 mg)と偽手術群 60.5 ± 5.11 mg (30 – 77 mg)と比べ有意に増加した。組織学的には、術 1 週間後には偽手術群に比し、膀胱筋層の有意な肥厚を認めた(Fig.1)。

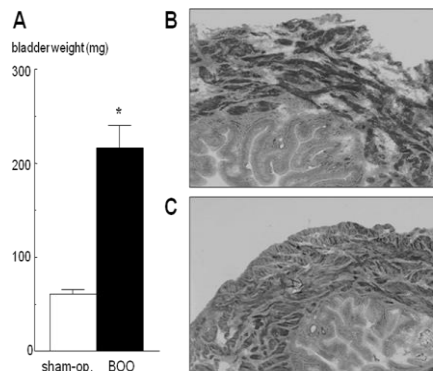


Fig.1

抗体アレイを用いた profiling では、BOO 群と偽手術群との比(INR)が 2 以上あるいは、0.5 以下の基準を満たした蛋白が 389 中 64 確認された。これらはすべて 2 以上と up-regulation したものであった。

今回抗体アレイで発現が増加していた蛋白の中で STAT 3 に着目し、先の BOO 群の組織で、免疫組織染色においてリン酸化 STAT 3 細胞の数が偽手術群に比べ有意に増加していることが確認された。

さらに、ウェスタンブロッティングでは、STAT 3 および活性化されたリン酸化 STAT 3 の発現は、術後 1 週では偽手術群と比較し有意に増加していた。また、既報で膀胱平滑筋肥大において発現が増加するとされてい

る bFGF, NF- κ B p65, リン酸化 NF- κ B p65, α -smooth muscle actin のいずれも BOO モデル術後 1 週間で有意に増加していた。ラット膀胱平滑筋培養細胞に機械的な伸展刺激を加え、STAT 3, α -smooth muscle actin の発現がどのように変化するかを確認した。STAT 3 は伸展刺激を加えた後、3 時間後にその発現が最大となり、以降 24 時間まで徐々に減少したが、いずれもコントロールより有意に発現は増加していた。一方 α -smooth muscle actin は伸展刺激 1 時間後より有意に発現が増加し、24 時間後まで徐々にその発現は増加した。また、siRNA を transfect した細胞では伸展刺激を加えても有意に α -smooth muscle actin の発現は抑制されていた(Fig.2)。

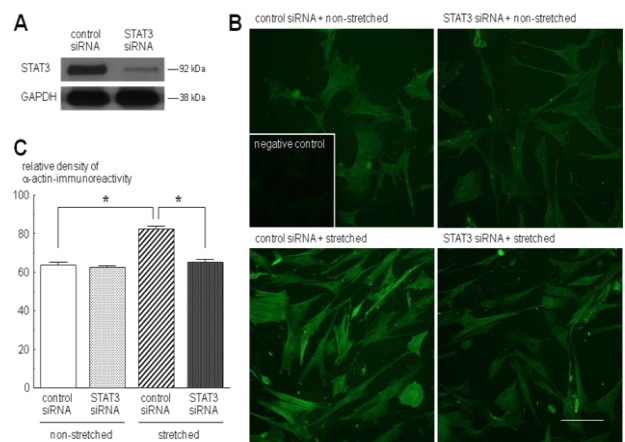


Fig.2

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 10 件)

- ① Yokoyama T, Hara R, Fukumoto K, Fujii T, Jo Y, Miyaji Y, Nagai A, Sone A. Effects of three types of alpha-1 blocker on lower urinary tract symptoms and sexual functions in males with benign prostatic hyperplasia. *Int J Urol* 18(3) 225-30,2011 査読有り
- ② Sako T, Inoue M, Watanebe T, Ishii A, Yokoyama T, Kumon H. Impact of overactive bladder and lower urinary tract symptoms on sexual health in Japanese women. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunction* 22 (2):165-169, 2011. 査読有り
- ③ Ozawa H, Chancellor MB, Nose H,

- Watanabe Y, Yokoyama T, Sasaki K, Watanabe T, Kumon H. Noninvasive videourodynamics using transperineal Doppler ultrasonography. LUTS 1(9); S80-83,2009 査読有り
- ④ Lu S-H, Chancellor MB, Pruchnic R, Jankowski R, Lee JY, Yoshimura N, Yokoyama T. Muscle-derived stem cell therapy for stress urinary incontinence. LUTS 1(9):S62-65, 2009 査読有り
- ⑤ Yokoyama T, Uematsu K, Watanabe T, Sasaki K, Kumon H, Nagai A, on behalf of the Okayama Urological Research Group. Naftopidil and propiverin hydrochloride for treatment of male lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia and concomitant overactive bladder: A prospective randomized controlled study. Scand J Urol Nephrol 43(4):307-314, 2009 査読有り
- ⑥ Nishiyama Y, Yokoyama T, Tomizawa K, Okamura K, Yamamoto Y, Matsui H, Oguma K, Nagai A, Kumon H. The effects of purified newly developed botulinum neurotoxin type A in the rat prostate. Urology 74:436-439,2009 査読有り
- ⑦ Nagai A, Hara R, Yokoyama T, Jo Y, Fujii T, Miyaji Y. Ejaculatory dysfunction caused by the new α 1-blocker silodosin: A preliminary study to analyze human ejaculation using color Doppler ultrasonography. Int J Urol 15(10) 915-918, 2008 査読有り
- ⑧ Araki T, Yokoyama T, Araki M, Furuya S. A clinical investigation on mechanism of loxoprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug, for patients with nocturia. Acta Med Okayama 62 (6) 373-378 2008 査読有り
- ⑨ Hara R, Jo Y, Fujii T, Kondo N, Yokoyama T, Miyaji Y, Nagai A. Optimum approach for prostate cancer detection as an initial biopsy: a prospective randomized study comparing transperineal versus transrectal systematic 12-core biopsy. Urology 71(2) 191-195, 2008. 査読有り
- ⑩ Yokoyama T, Kumon H, Nagai A. Correlation of urinary nerve growth factor level in patients with lower urinary tract diseases. NeuroUrol Urodyn 27(5) 417-420, 2008 査読有り
- [学会発表] (計 19 件)
- ① Yokoyama T, Hara R, Miyaji Y, Nagai A. Comparison of different alpha1-adrenoceptor antagonists, tamsulosin hydrochloride and silodosin, for treatment of male lower urinary tract symptoms: A prospective randomized crossover study. Advancements in Urology 2011 an AUA/JUA Symposium 2011 2/18, Sheraton Waikiki, O'ahu Hawaii
- ② 横山光彦、福元和彦、清水真次郎、月森翔平、原綾英、藤井智浩、常義政、永井敦：前立腺肥大症に対するタムスロシン塩酸塩およびシロドシンのクロスオーバー試験—第62回西日本泌尿器科学会総会 2010年11月6日 鹿児島
- ③ 横山光彦、永井敦、公文裕巳；A型ボツリヌス神経毒素の膀胱・前立腺における作用機序；第17回日本排尿機能学会 2010年10月1日甲府（シンポジウム2；ボツリヌス毒素治療の現状）
- ④ 横山光彦、永井敦、公文裕巳；前立腺全摘術後の尿失禁に対する保存的治療—磁気背劇治療、電気刺激治療を中心に—；第17回日本排尿機能学会 2010年10月1日甲府（ワークショップ2；男性腹圧性尿失禁の治療）
- ⑤ 横山光彦、海部三香子、原綾英、藤井智浩、常義政、宮地禎幸、永井敦；難治性非神経因性過活動膀胱に対するA型ボツリヌス神経毒

注入療法の臨床的検討—第 98 回日本泌尿器科学会総会 2010 年 4 月 26 日盛岡

⑥ 横山光彦、渡邊豊彦、永井敦、公文裕巳：難治性過活動膀胱—神経因性膀胱—に対する治療 第 98 回日本泌尿器科学会総会 2010 年 4 月 26 日盛岡

⑦ 横山光彦、原綾英、近藤典生、藤井智浩、常義政、宮地禎幸、永井敦：前立腺肥大症に対する A 型ボツリヌス神経毒注入療法の臨床的検討—1 年以上経過観察症例での検討—第 97 回日本泌尿器科学会総会 2009 年 4 月 18 日岡山

⑧ 横山光彦、海部三香子、原綾英、藤井智浩、常義政、宮地禎幸、永井敦、秋山隆、濱崎周次：間質性膀胱炎患者における上皮細胞の走査電顕での検討—第 16 回日本排尿機能学会 2009 年 9 月 12 日博多

⑨ 横山光彦、海部三香子、原綾英、藤井智浩、常義政、宮地禎幸、永井敦：前立腺肥大症に対する A 型ボツリヌス神経毒注入療法の臨床的検討—第 280 回日本泌尿器科学会岡山地方会 2009 年 10 月 17 日岡山

⑩ 横山光彦、海部三香子、原綾英、藤井智浩、常義政、宮地禎幸、永井敦：女性腹圧性尿失禁に対する TOT（経閉鎖孔式テープ）手術の初期治療成績—第 61 回西日本泌尿器科学会総会 2009 年 11 月 7 日 高松

⑪ 横山光彦、海部三香子、原綾英、藤井智浩、常義政、宮地禎幸、永井敦：前立腺肥大症に対する HoLEP の治療成績と SF-36 を用いた QOL 変化の検討—第 23 回日本 EE 学会総会 2009 年 11 月 11 日 東京

⑫ Yokoyama T, Kaifu M, Hara R, Fuji T, Jo Y, Miyaji Y, Nagai A. The effects of 3 types' α 1-adrenoceptor blockers on lower urinary symptoms and sexual functions in male with benign prostatic hyperplasia. 2009 SIU Meeting November 4, Shanghai

⑬ Yokoyama T, Hara R, Kondo N, Fuji T, Jo Y, Miyaji Y, Nagai A. Naftopidil and propiverin hydrochloride for treatment of male lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia and concomitant overactive bladder: A prospective randomized controlled study. 2009 Annual Meeting of the American Urological Association April 27, Chicago, USA

⑭ Yokoyama T, Hara R, Kondo N, Fuji T, Jo Y, Miyaji Y, Nagai A, Kumon H. The effects of purified newly developed botulinum neurotoxin type A in rat and human prostate 2009 Annual Meeting of the American Urological Association April 28, Chicago, USA

⑮ 横山光彦、原綾英、近藤典生、藤井智浩、常義政、宮地禎幸、永井敦、秋山隆、濱崎周次、西山康弘：ラット膀胱壁への A 型ボツリヌス神経毒繰り返し注入による組織学的検討—第 96 回日本泌尿器科学会総会 2008 年 4 月 27 日横浜

⑯ 横山光彦、海部三香子、原綾英、近藤典生、藤井智浩、常義政、宮地禎幸、永井敦、曾根淳史：男性下部尿路症状に対する各種 α 遮断薬投与における有用性および性機能に関する比較検討—第 15 回日本排尿機能学会 2008 年 9 月 13 日東京

⑰ 横山光彦、原綾英、近藤典生、藤井智浩、常義政、宮地禎幸、永井敦：過活動膀胱患者に対するトルテロジンの有用性の検討—第 60 回西日本泌尿器科学会総会 2008 年 11 月 6 日 小倉

⑱ 横山光彦、原綾英、近藤典生、藤井智浩、常義政、宮地禎幸、永井敦：川崎医大における前立腺肥大症に対する HoLEP の初期治療成績—22 回日本 EE 学会総会 2008 年 11 月 11 日 大阪

⑲ Yokoyama T, Hara R, Kondo N, Fuji T, Jo

Y, Miyaji Y, Nagai A. Histological
investigation after repeat injections of
botulinum toxin A for rat bladder. 2008 Annual
Meeting of ICS October 20, Cairo

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 光彦 (YOKOYAMA TERUHIKO)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：40325113

(2) 研究分担者

原 綾英 (HARA RYOEI)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：90509340