

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592372

研究課題名(和文) ヒト外尿道括約筋に高発現するサイトカイン・シグナル伝達関連遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of cytokine signal transduction-related factors in human urethral rhabdosphincter

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) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：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を同定しそれらの機能解析を行った。TGF-βはヒト外尿道括約筋に高発現しておりヒト外尿道括約筋から分離培養し長寿化した筋衛星細胞においてSmad2/3のリン酸化を介してp21の発現を亢進させ、外尿道括約筋衛星細胞の増殖を抑制した。またラットによる実験では加齢に伴い経産ラットの尿禁制の低下が認められ、一方で尿道の炎症サイトカインの加齢に伴う発現の亢進は認められなかったが、細胞外マトリックス関連物質の発現は加齢に伴い低下していた。慢性炎症を基盤とする病態における外尿道括約筋の脆弱化は高齢者の腹圧性尿失禁の一因となっている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We explored the identification of specifically expressed factors in human RS and examined the effect on RS satellite cell growth, differentiation and the mechanisms of intracellular signal transduction by those factors. TGF-beta highly increased in ECM of RS by immunohistochemistry. Moreover, we identified that TGF-beta could inhibit cell proliferation and differentiation of human RS satellite cells through Smad2/3 phosphorylation. In the experiments using rat, urethral functions significantly decreased with aging after child-birth, and it has been considered that aging after child-birth attenuated urethral support. On the other hand, transcripts of ECM in urethra were significantly decreased with aging, although there were no significant changes in those of inflammatory cytokines between young and aged groups. Reduction of ECM or chronic inflammatory state in urethra including RS with aging might attenuate urethral support system, and be a part of SUI in elderly people.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・再生医学

キーワード：外尿道括約筋 尿失禁 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

### 1 外尿道括約筋は尿禁制機構に重要な横紋筋組織である

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。外尿道括約筋は、膜様部尿道を状に取り囲む横紋筋で、尿失禁を防止する上で、非常に重要な組織であるが、加齢とともにアポトーシスを起こして、横紋筋細胞が減少し、高齢者尿失禁の原因と考えられている。

### 2 外尿道括約筋は解剖学的及び発生学的に他の横紋筋と異なっている

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ことが知られている。マウスでは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、このように平滑筋からの分化転換によって横紋筋が発生するのは、外尿道括約筋と下部食道括約筋のみが報告されている。したがって外尿道括約筋には四肢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。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研究より、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。

### 3 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。げっ歯類の横紋筋衛星細胞は bFGF によって著明に増殖が促進されることがこれまで報告されているが、ヒト外尿道括約筋衛星細胞に関しては、bFGF による増殖促進は全くみられず、HGF や IGF によって促進されること、また 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)。これらの HGF と IGF の作用機序の違いは前者が MAPK 経路を強力に活性化することに対し、IGF は PI3K 経路を活性化することによることも証明してきた。さらに加齢に伴ってヒト外尿道括約筋細胞が減少することが報告されているが、その機序については全く解明されていなかった。われわれは炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  が加齢に伴って増加し、四肢の骨格筋の萎縮に関与していることから、ヒト外尿道括約筋衛星細胞に及ぼす TNF- $\alpha$  の作用について詳細に検討した。その結果、ヒト外尿道括約筋衛星細胞には

TNF- $\alpha$  の受容体が発現しており、濃度依存的に TNF- $\alpha$  は増殖を抑制し、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)。

### 4 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

ヒト外尿道括約筋に特異的に発現する遺伝子群を同定することは、外尿道括約筋の増殖分化に関連する遺伝子や新は神経受容体が解明につながり、外尿道括約筋再生医療や新たな尿失禁薬物治療法の開発の有用である。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の差異についてプロテオーム解析を行ったところ、遅筋成分で 23 個、速筋成分で 29 個の外尿道括約筋に高発現する蛋白を認め、蛋白発現レベルでヒト外尿道括約筋と肛門挙筋が異なっていることを世界で初めて証明した。さらに網羅的遺伝子発現解析によってヒト外尿道括約筋と肛門挙筋の差異について研究を行っており、ヒト外尿道括約筋に 2 倍以上高発現する遺伝子を約 1 万個見出した。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、多彩な遺伝子に発現の差異がみられた。中でもサイトカイン受容体関連遺伝子の fibroblast growth factor receptor 3、bradykinin receptor B2, interleukin 4 receptor、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14、GDNF family receptor alpha 3, sortilin-related receptor, G protein-coupled receptor 4、platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide、G protein-coupled receptor 56、interleukin 27 receptor, alpha などがヒト外尿道括約筋組織に高発現していた。

## 2. 研究の目的

本研究ではまず外尿道括約筋組織に高発現していた mRNA と蛋白発現についてそれぞれ定量的 RT-PCR および Western blot によって検証する予定である。さらに既に当教室で確立したヒト長寿化外尿道括約筋細胞を用いて、これらのリガンドであるサイトカインの増殖や細胞死に及ぼす影響について検討したい。

また、各種サイトカインが腹圧性尿失禁にどのような影響をもたらすかについてラットを用いた検討も行いたい。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト外尿道括約筋組織と肛門挙筋より Laser Microdissection により横紋筋細胞を

採取して、cDNA microarray 法にて遺伝子発現を比較検討する。外尿道括約筋細胞に高発現するサイトカインのシグナル伝達関連遺伝子群を選び、quantitative RT-PCR および Western blot で mRNA および蛋白発現を検証する。

(2) ヒト外尿道括約筋に高発現するシグナル伝達関連遺伝子に作用するサイトカインを pathway 解析によって同定し、そのサイトカインのヒト外尿道括約筋細胞の増殖分化および細胞死に及ぼす影響を検討する。実際にサイトカインによってシグナル伝達関連遺伝子群が活性化されるかどうかを immunoblot 法にて検証する。

(3) 加齢による炎症性サイトカイン発現の変化に伴う尿禁制の検討

加齢に伴い TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの発現量が増えてくるのか検討することを目的とし、若年モデルと加齢モデルラットを用いて以下について基礎実験を行う。繁殖リタイアラットを経産ラットとして2群にわけ(6カ月、14カ月)、未産ラット(2カ月)をコントロールとして以下の実験を行った。  
1) 機能解析：失禁圧、尿道基線圧、膀胱圧上昇時の尿道反応、2) 分子生物学的解析：real-time RT-PCR による尿道組織における各種炎症性サイトカイン及び細胞外マトリクスの mRNA の発現。

#### 4. 研究成果

<ヒト外尿道括約筋に高発現する TGF- $\beta$  の外尿道括約筋衛星細胞に対する増殖分化制御機構>

(1) 外尿道括約筋局所では TGF- $\beta$  の発現が高い：外尿道括約筋は、錐体筋と比較し、局所における TGF- $\beta$  の発現が高いことが、免疫組織化学により明らかとなった。

(2) TGF- $\beta$  は Smad 2/3 のリン酸化を介して p21 の発現を亢進させ、外尿道括約筋衛星細胞の増殖を抑制する：長寿化した外尿道括約筋衛星細胞を用いた検討の結果、TGF- $\beta$  は外尿道括約筋衛星細胞の増殖を抑制させた。TGF- $\beta$  投与後一過性の Smad 2/3 リン酸化の亢進を認め、さらに CDK inhibitor である p21 の発現亢進を認めた。

(3) ALK5 inhibitor や Losartan は TGF- $\beta$  に拮抗作用を有す：ALK5 inhibitor の投与により、TGF- $\beta$  による上記作用は拮抗された。また降圧薬である Losartan の投与によっても、TGF- $\beta$  による Smad 2/3 のリン酸化亢進が抑制された。特に Losartan はすでに幅広く使用されている降圧薬でもあり、外尿道括約筋萎縮に対する治療標的としての可能性が示唆された。

(4) TGF- $\beta$  は外尿道括約筋の分化を抑制する：分化能を維持した長寿化外尿道括約筋衛星細胞を用いた検討の結果、TGF- $\beta$  の投与によって、筋管形成や Myosin heavy chain の発現が抑制され、筋分化が抑制された。

(5) Apoptosis の検討：Flowcytometry を用い cell cycle の解析を行ったところ、TGF- $\beta$  により G0/G1 への細胞の蓄積を認めたが、sub G0/G1 への集積は認めなかった。caspase family の活性を western blot で検討したが、cleaved caspase3 の増加等、apoptosis を示唆する所見を認めなかった。骨格筋において TGF- $\beta$  による apoptosis 誘導の報告もあるが、今回の結果より cell cycle progression が抑制されていることが判明した。

(6) non-Smad signal の検討：Smad 以外の signal pathway の重要性も報告されており、検討したところ、JNK リン酸化の一過性の亢進を認めた。今後更なる検討を予定中である。  
(3) 分化についての検討：各種 MRFs の発現の変化についても検討を行った。

<各種 adipokine の検討>

外尿道括約筋は他の骨格筋と比較して間質の増生や脂肪変性が顕著であり、adipokine の影響を考慮し外尿道括約筋衛星細胞での検討を行った。

(1) Adiponectin: adiponectin は抗炎症作用等を有する分泌タンパクである。外尿道括約筋衛星細胞において増殖、分化につき検討を行ったが、有意な変化は認めなかった。(2) leptin: leptin は食欲や代謝を制御するペプチドホルモンである。筋への影響が報告されているも、外尿道括約筋衛星細胞において明らかな効果は認められなかった。

<加齢による炎症性サイトカインの発現変化に伴う尿禁制の検討>

1) 機能解析：失禁圧、尿道基線圧は14カ月群において有意に他群と比較して低下していた。膀胱内圧上昇時の尿道反応は他群と比較して低下する傾向にあったが有意差は認めなかった。

2) 分子生物学的解析：炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、cox-2 の mRNA の発現は6カ月群において2カ月群と比較して上昇が認められたが14カ月群では低下しており2カ月群とは有意差は認められなかった。一方、細胞外マトリクスの代謝産物である Col1 $\alpha$ -1、Col3 $\alpha$ -1、LOX の mRNA の発現は6カ月群において2カ月群と比較して上昇する傾向が認められ、14カ月群においてこれらの mRNA の発現は他群と比較して有意な低下が認められた。

#### 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 9 件)

(1) Therapeutic effects of IGF-1 on stress urinary incontinence in rats with simulated childbirth trauma. Sumino Y.

Yoshikawa S, Mimata H, Yoshimura N. J Urol. 2014;191:529-38. (査読有)

(2)The Vav3 oncogene enhances the malignant potential of prostate cancer cells under chronic hypoxia. Hirai K, Nomura T, Yamasaki M, Inoue T, Narimatsu T, Chisato Nakada PD, Yoshiyuki Tsukamoto PD, Matsuura K, Sato F, Moriyama M, Mimata H. Urol Oncol. 2014;32:101-9. (査読有)

(3) Hanada T, Weitzer S, Mair B, Bernreuther C, Wainger BJ, Ichida J, Hanada R, Orthofer M, Cronin SJ, Komnenovic V, Minis A, Sato F, Mimata H, Yoshimura A, Tamir I, Rainer J, Kofler R, Yaron A, Eggan KC, Woolf CJ, Glatzel M, Herbst R, Martinez J, Penninger JM. CLP1 links tRNA metabolism to progressive motor-neuron loss. Nature 495: 474-480, 2013. (査読有)

(4)Regenerative medicine as a new therapeutic strategy for lower urinary tract dysfunction. Sumino Y, Mimata H. Int J Urol. 2013;20:670-5. (査読有)

(5)Targeting the Vav3 oncogene enhances docetaxel-induced apoptosis through the inhibition of androgen receptor phosphorylation in LNCaP prostate cancer cells under chronic hypoxia. Nomura T, Yamasaki M, Hirai K, Inoue T, Sato R, Matsuura K, Moriyama M, Sato F, Mimata H. Mol Cancer. 2013 8;12:27. (査読有)

(6)Akita Y, Sumino Y, Mori K, Nomura T, Sato F, Mimata H. Myostatin inhibits proliferation of human urethral rhabdosphincter satellite cells. Int J Urol. 2012. 522-9. (査読有)

(7)Mori K, Noguchi M, Sumino Y, Sato F, Mimata H. Use of procalcitonin in patients on chronic hemodialysis: procalcitonin is not related with increased serum calcitonin. ISRN Urol. 2012. 431859. (査読有)

(8)Sumino Y, Nakano D, Mori K, Nomura T, Sato F and Mimata H. Left Transperitoneal Adrenalectomy with a Laparoendoscopic Single-Site Surgery Combined Technique: Initial Case Reports. Case report in Med. 2011. 651380. (査読有)

(9) Sumino Y, Hirata Y, Hanada M, Akita Y, Sato F and Mimata H. Long-Term Cryopreservation of Pyramidalis

Muscle Specimens as a Source of Striated Muscle Stem Cells for Treatment of Post-Prostatectomy Stress Urinary Incontinence. Prostate. 2011. 1225-30. (査読有)

[学会発表](計 6 件)

(1) ICS 2013 (Annual Meeting of the International Continence Society) (2013.8.25-30, Barcelona, Spain.) Association of remodelling of extracellular matrix and urethral dysfunction inducing stress urinary incontinence in aged, multiparous rats. Sumino Y, Yoshikawa S, Mimata H, Yoshimura N

(2) AUA2013 (2013.5.04-08 San Diego CA, USA) Insulin-like growth factor-1 as an important endogenous growth factor for the recovery from stress urinary incontinence in rats with simulated childbirth injury. Sumino Y, Yoshikawa S, Mimata H, Yoshimura N.

(3) ICS 2012 (Annual Meeting of the International Continence Society), (2010.10.17-20) Peking, China. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) accelerates recovery from stress urinary incontinence in rats with simulated childbirth trauma injury through Akt signal transduction pathway Sumino Y, Yoshikawa S, Mimata H, Yoshimura N

(4) 第9回泌尿器科再建再生研究会 (2012.6.16:湯布院) 膣拡張による腹圧性尿失禁モデルラットにおける Insulin-like growth factor-1(IGF-1) の治療効果 住野泰弘, 吉川 悟, 三股浩光, 吉村直樹

(5) AUA (2012. 5.19-24) Atlanta GA, USA Therapeutic effects of insulin-like growth factor-1 on stress urinary incontinence in rats with simulated childbirth trauma injury Sumino Y, Yoshikawa S, Mimata H, Yoshimura N

(6) 第99回日本泌尿器科学会総会(名古屋 2011.4.21-24) シンポジウム 腹圧性尿失禁に対する外尿道括約筋自己再生を目指して 住野泰弘, 三股浩光

( )

〔図書〕(計 2 件)

三股浩光, 佐藤文憲. 泌尿器科基礎手術学  
泌尿器科手術の術前・術後管理. ベッドサイ  
ド泌尿器科学 (改訂第4版): 168-174, 2013.

泌尿器科疾患: 後腹膜腫瘍, 後腹膜線維症. 三  
股浩光. 今日の治療指針. 山口 徹, 北原光  
夫, 福井次矢. 医学書院. 東京. 2012 年版:  
944-945, 2012.

〔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 浩光 (MIMATA HIROMITSU)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号: 60219714

### (2) 研究分担者

佐藤 文憲 (SATO FUMINORI)  
大分大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30305049

住野 泰弘 (SUMINO YASUHIRO)  
大分大学・医学部・講師  
研究者番号: 30325716

森 健一 (MORIKENICHI)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号: 00579013

### (3) 連携研究者

研究者番号: