

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462531

研究課題名(和文) ヒト膀胱平滑筋細胞の不死化に関する研究

研究課題名(英文) Study for immortalization of human bladder smooth muscle cells

研究代表者

吉田 正貴 (YOSHIDA, Masaki)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・手術・集中治療部・部長

研究者番号：20201858

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)：不死化ヒト膀胱平滑筋細胞hBS11を樹立することに成功した。hBS11は培養下で、未分化増殖状態と分化状態を双方向に行き来できるきわめてユニークな性質を示した。病理組織学的解析結果から、生体内の平滑筋細胞は、組織再生過程において、「分化状態 未分化増殖状態 分化状態」と細胞の性質を変化させると考えられている。hBS11細胞は、平滑筋細胞が本来持っている分化の可塑性を保持していることが示された。hBS11は、平滑筋細胞分化の分子機構、平滑筋組織の再生機構、平滑筋細胞の機能制御機構の解明に加えて、下部尿路機能障害の発症機構の解明および新規治療法の開発に、これまでにない有用な解析系を提供する。

研究成果の概要(英文)：We have established human immortalized bladder smooth muscle cell (hBS11). The hBS11 showed the extremely unique property that could bi-directionally go back and forth in the undifferentiated proliferative state and differentiation state under culture. It is thought that from a result of the histopathological analysis in a reproduction process the in vivo smooth muscle cell changes the property of the cell, that is "differentiation state undifferentiated proliferative state differentiation state". The present study demonstrates that the hBS11 cell maintains plasticity of the differentiation that a smooth muscle cell originally has.

Immortalized hBS11 cell provides useful analytical system for elucidation of the pathophysiological mechanism of lower urinary tract dysfunction and the development of the new treatment options, in addition to the elucidation of molecular differentiation mechanism, reproduction mechanism, and the function control mechanism of the smooth muscle cell.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：膀胱平滑筋 不死化細胞 下部尿路機能障害 尿失禁 低活動膀胱 再生医療

1. 研究開始当初の背景

膀胱は尿排泄に関わる重要な臓器であり、膀胱平滑筋は自律神経の調節のもと、弛緩と収縮を繰り返し蓄尿と排尿を担う組織である。蓄尿に際しては交感神経が活性化し、ノルアドレナリンによる膀胱平滑筋の α_1 受容体を介した膀胱の弛緩がおり、排尿期には副交感神経が活性化され、アセチルコリンによるムスカリン M3 および M2 受容体を介した膀胱の収縮が惹起される。しかしこのような膀胱平滑筋機能は加齢やさまざまな病的状態により変化を来す。

たとえば、加齢に伴い膀胱は過敏な状態になるとともに、膀胱収縮力の低下を来す(いわゆる DHIC: detrusor hyperactivity with impaired contraction)。これまで、正常あるいは加齢や病的状態に伴う膀胱平滑筋の形態や機能について、組織学的、薬理的、分子生物学的検討が行われ、膀胱平滑筋の線維化や自律神経受容体の数、反応性や親和性の変化、細胞内伝達系の変化などが報告されてきているが、未だ十分に解明されているとはいえない。

膀胱平滑筋の多彩な機能および加齢や病的膀胱でのそれらの機能変化を検討する一つの方法として、培養膀胱平滑筋細胞を利用した実験系がある。また、この系は下部尿路機能障害の新規の薬剤を開発する際にも有用であると考えられる。しかしながら、通常膀胱平滑筋細胞の培養を試みても、細胞はわずか1~2週間で増殖を停止し、継代が不可能となり、機能も低下するために、安定した研究ができないのが現状である。このため、培養系での実験は困難であることが多く、膀胱平滑筋の機能の解明や新規薬剤の開発に関する実験を進めるためには、膀胱平滑筋細胞を不死化する技術が必要と考えられる。

我々はこれまで、「横紋筋再生メカニズムに基づいた腹圧性尿失禁に対する再生医療の研究」の中で筋細胞純化法による「不死化ヒト外尿道括約筋細胞培養系」を確立し、ヒト外尿道括約筋細胞の不死化に成功した。

本研究ではこれまでに蓄積されたヒト外尿道平滑筋の不死化の技術を応用して、不死化ヒト膀胱平滑筋細胞の樹立を試みる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、不死化ヒト膀胱平滑筋細胞を樹立することである。膀胱は蓄尿と排尿という複雑な機能を営み、その機能は加齢や様々な病的状態により変化し下部尿路機能障害を来すことが知られている。そのような変化の詳細やメカニズムを解明するために、in vivo, in vitro の実験系において、組織学的、薬理的あるいは分子生物学的検討が行われてきているが、必ずしも十分とは言えない。特に、培養膀胱平滑筋細胞を用いた実験では細胞の継代や機能の喪失などにより安定した研究が行われていないのが現状である。不死化ヒト膀胱平滑筋細胞

を樹立することにより、細胞レベルでの様々なメカニズムの解明が可能となるだけでなく、下部尿路機能障害の治療、特に新規薬剤の開発にも寄与しうると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では不死化ヒト膀胱平滑筋細胞を樹立することを目的として、以下の検討を行う。1) ヒト膀胱平滑筋細胞培養液成分の検討。2) CD56 抗体結合磁気ビーズを用いたヒト膀胱平滑筋細胞の分離。3) ヒト膀胱平滑筋細胞の不死化のための遺伝子導入。4) ヒト膀胱平滑筋組織の発現解析。5) ヒト膀胱平滑筋組織の機能解析。

平滑筋細胞の不死化については、これまで我々が「横紋筋再生メカニズムに基づいた腹圧性尿失禁に対する再生医療の研究」において樹立したヒト不死化外尿道括約筋細胞に関する実験方法に準じて行う。発現解析については各種のマーカーや受容体などの組織免疫染色、immunoblotting 法、RT-PCR 法などを用いて行う。また、平滑筋機能の解析は各種刺激で増加する細胞内伝達物質を測定することにより行う。

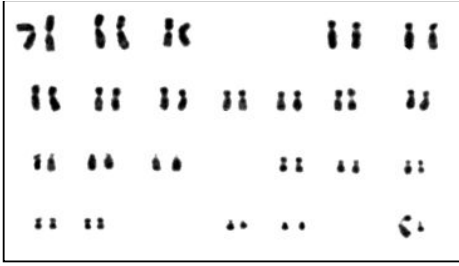
ヒト膀胱平滑筋の培養液の組成および不死化のための遺伝子導入の方法は以下のとおりである。ヒトのテロメラーゼ遺伝子(hTERT) CDK4 変異体遺伝子(24番目のアルギニンをシスチンに置換したもの)および cyclin D1 遺伝子を、レンチウイルスベクターに導入し、複製能欠損組換えレンチウイルスを作成した(14)。68歳白人男性由来から分離された、継代数6の初代培養ヒト膀胱平滑筋細胞(PromoCell社, Lot6110301.10)に、組換えウイルスを感染させ、不死化した。培養液は、4.5 g/L グルコース含有ダルベッコ改良最少必須培地を基本培地とし、増殖培地 pmGM には、20%ウシ胎児血清および2% Ultrosor G (Biosepra社)を、分化培地 pmDM には、2%ウシ胎児血清、10 nM セレン、5 μ g/ml トランスフェリン、10 μ g/ml インシュリンを添加した(15)。培養器は、通常の細胞培養用ディッシュ等を用い、細胞外基質等のコーティングは行わなかった。培養は、10%炭酸ガスを含む飽和水蒸気中で、36.8 $^{\circ}$ Cで行った。

4. 研究成果

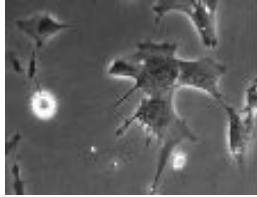
これまで得られた研究成果は以下のとおりである。

- (1) CDK4R24C, Cyclin D1, hTERT の3遺伝子を、レンチウイルスベクターを使って初代培養膀胱平滑筋細胞に導入した。初代培養膀胱平滑筋細胞は、継代数7-9で増殖を停止したが、3遺伝子を発現させた細胞(hBS11)は、population doublings が50(50回分裂したことを意味する)を超えても増殖し続けることを確認した。
- (2) 不死化細胞 hBS11 は、正常二倍体を維持

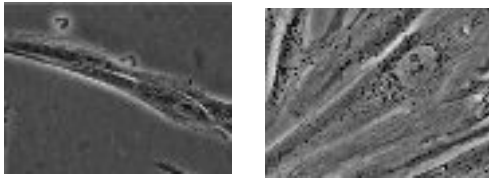
しており、染色体の構成異常は認められなかった。



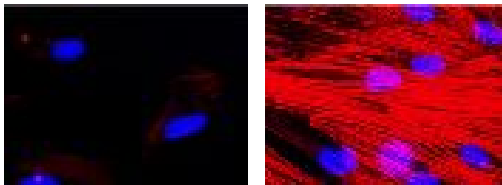
- (3) 増殖培地中において、不死化細胞 hBS11 は、小型で多角形の形態を示した。タイムラップスによる直接測定の結果、 18 ± 3.2 h という非常に短い細胞周期での分裂を繰り返していた。



- (4) 分化条件下では、hBS11 は、徐々に細胞分裂を停止した。培養初期(1-3日)で、細胞は紡錘型の形態となり、培養後期(9-12日)では、著しい肥大を示した。



- (5) 平滑筋マーカーである SMA, SMA, Calponin および MYH11 は、増殖条件下においても発現が認められた。
 (6) 分化条件下では、SMA, SMA, Calponin の発現は増大したが、MYH11 は、変化しなかった。
 (7) 分化条件下においてのみ、平滑筋特異的な Caldesmon アイソフォーム (h-caldesmon) が検出された。



- (8) 増殖中の hBS11 細胞には、アクチン線維 (ファイバー) に乏しく、短い線維が細胞膜直下に少数検出されるにとどまった。
 (9) 分化培地中では、アクチン線維が発達し、細胞あたりの本数と長さが著しく増加した。
 (10) アクチン線維を構成するアクチン・アイソフォームは、増殖条件下および分化培

養初期では、アクチンであったが、分化培養後期では、アクチン線維に SMA が追加される。すなわち、分化に伴って、アクチン線維を構成するアクチン・アイソフォームが変化した。

- (11) ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ 2 (mAChR2) は、分化-未分化状態とも、かなり大量に発現している。一方ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ 3 (mAChR3) の発現レベルは低かったが、分化に伴って増加した。
 (12) 分化細胞を Calbachol で刺激すると、細胞内カルシウムの上昇が誘導された。しかし、細胞の収縮は見られなかった。細胞は、接着構造を介して基質面に強固に接着しているため、物理的に収縮が阻たげられたものと考えられた。
 (13) Calbachol による細胞内カルシウムの上昇は、接触する細胞に伝播することが明らかになった。
 (14) 細胞外液のカリウム濃度を高くする (90 mM KCl) ことによって細胞膜の脱分極を誘導すると、細胞内 Ca 濃度が上昇した。これは、電位依存性カルシウムチャネルの開口によるものと考えられる。
 (15) カルシウムイオノフォア A23187 $5 \mu\text{M}$ によって、細胞内カルシウム濃度を急激に上昇させると、アクチン線維は短縮し、細胞は急速に収縮した。
 (16) Gap junction の構成タンパク質である Connexin 43 は、分化培養すると細胞表面に分布するようになり、細胞接触部位に集積した。(13)で示したカルシウムの細胞間伝播は、Gap junction を介したものと考えられる。
 (17) 分化させた hBS11 に増殖培地を与えると、細胞は厚みのある小型細胞に形態を変えた。アクチン線維は消失し、やがて細胞は分裂増殖を再開した。
 (18) 結論：不死化ヒト膀胱平滑筋細胞 hBS11 を樹立することに成功した。hBS11 は、培養下で、未分化増殖状態と分化状態を双方向に行き来できる、きわめてユニークな性質を示した。病理組織学的解析の結果から、生体内の平滑筋細胞は、組織再生過程において、「分化状態 未分化増殖状態 分化状態」と細胞の性質を変化させると考えられている。しかし、従来の研究では、培養下では、平滑筋細胞は速やかに分化形質を失い、「分化状態 脱分化増殖状態」という一方方向性の応答しか報告されていない。hBS11 細胞は、平滑筋細胞が本来持っている分化の可塑性 (reversible differentiation) を保持していると考えられる。不死化ヒト膀胱平滑筋細胞 hBS11 は、従来、適切な実験系がないために、解析が進んでいなかった、平滑筋細胞分化の分子機構、平滑筋組織の再生機構、平滑筋細胞の機能制御機構の解明に加えて、下部尿路機能

障害の発症機構の解明および新規治療法の開発に、これまでにない有力な解析系を提供する。

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 17 件)

Yoshida M, Flores NM, Vietri J, Lee M, Murakami M, Burden of benign prostatic hyperplasia among men in Japan: Patient-reported outcomes among those diagnosed and experiencing symptoms. *Int J Urol*, 22 (10) 949-955, 2015.
Doi: 10.1111/iju.12849.

Ogawa R, Ma Y, Yamaguchi M, Ito T, Watanabe Y, Ohtani T, Murakami S, Uchida S, De Gaspari P, Uezumi A, Nakamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Hashimoto N, Braun T, Tanaka T, Takeda S, Yamamoto H, Fukada S. Doublecortin marks a new population of transiently amplifying muscle progenitor cells and is required for myofiber maturation during skeletal muscle regeneration. *Development* 142(1), 51-61, 2015.
Doi: 10.1242/dev.122317

Iwata Y, Suzuki N, Ohtake H, Kamauchi S, Hashimoto N, Kiyono T, Wakabayashi S. Cancer cachexia causes skeletal muscle damage via transient receptor potential vanilloid 2-independent mechanisms, unlike muscular dystrophy. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 2015
DOI: 10.1002/jcsm.12067

Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Tsuchida K, Fukada S, Yamamoto H, Yamamoto N, Shiomi K, Hashimoto N. Pro-insulin-like growth factor-II ameliorates age-related inefficient Stem Cells, 33(8) : 2456-68, 2015.
Doi: 10.1002/stem.2045

Yoshida M, Yamaguchi O, Detrusor Underactivity: The Current Concept of the Pathophysiology. *Low Urin Tract Symptoms*. 6:131-137, 2014.
Doi: 10.1111/luts.12070

Funahashi Y, Yoshida M, Yamamoto T, Majima T, Takai S, Gotoh M. Intravesical application of rebamipide

promotes urothelial healing in a rat cystitis model. *J Urol*, 192:1864-70, 2014.

DOI: 10.1016/j.juro.2014.06.081

Funahashi Y, Yoshida M, Yamamoto T, Majima T, Takai S, Gotoh M. Intravesical application of rebamipide suppresses bladder inflammation in a rat cystitis model. *J Urol*, 191:1147-52, 2014.

DOI: 10.1016/j.juro.2013.11.026

Zeng W, Chen YY, Newkirk DA, Wu B, Balog J, Kong X, Ball AR Jr, Zanotti S, Tawil R, Hashimoto N, Mortazavi A, van der Maarel SM, Yokomori K. Genetic and epigenetic characteristics of FSHD-associated 4q and 10q D4Z4 that are distinct from non-4q/10q D4Z4 homologs. *Hum Mutat*, 35(8), 998-1010, 2014.

Doi: 10.1002/humu.22593

Shimoda N, Izawa T, Yoshizawa A, Yokoi H, Kikuchi Y, Hashimoto N. Decrease in cytosine methylation at CpG island shores and increase in DNA fragmentation during zebrafish aging. *AGE*, 36:103-115 2014.

Doi: 10.1007/s11357-013-9548-5

Shiomi K, Nagata Y, Kiyono T, Harada A, Hashimoto N, Differential Impact of the Bisphosphonate Alendronate on Undifferentiated and Terminally Differentiated Human Myogenic Cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 61:418-427, 2013.

Doi: 10.1111/jphp.12171

Mukai A, Hashimoto N. Regulation of Pre-Fusion Events: Recruitment of M-cadherin to Microrfts Organized at Fusion-competent Sites of Myogenic Cells. *BMC Cell Biol* 14(1): 37, 2013.

Doi: 10.1186/1471-2121-14-37

[学会発表](計 23 件)

吉田正貴.低活動膀胱に対する今後の展望 ~ bench to bedside. 第 80 回日本泌尿器科学会東部総会 . 2015 年 9 月 26 日、京王プラザ (東京)

Yoshida M, Otani M, Miyamoto Y, Kudo J, Yamaguchi O, Development of new nomograms of urinary flow rates in Japanese men. International Continence Society 45th Annual Meeting, 2015.10.7, Canada (Montrial).

橋本有弘、倉谷麻衣、大久保咲 . 酸化ストレスによるマウス筋前駆細胞 (筋芽細胞) の細胞増殖抑制機構 . 日本筋学会第 1 回学術集会、2015 年 8 月 8 日、国立精神・神経医療研究センター (東京)

橋本有弘、大久保咲、倉谷麻依 . 酸化ストレスによってマウス筋前駆細胞 (筋芽細胞) に誘導される Mitotic Catastrophe . 第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド (神戸)

大久保咲、橋本有弘 . 高齢者由来ヒト筋前駆細胞 (筋芽細胞) の細胞増殖特性 . 第 38 回日本分子生物学会年会 . 2015 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド (神戸)

橋本有弘、ヒト骨疾患における骨格筋幹細胞 (筋サテライト細胞) の役割 . 第 32 回日本骨代謝学会学術集会、2014 年 7 月 26 日、大阪国際会議場 (大阪)

上住 円、上住聡芳、土田邦博、深田宗一郎、橋本有弘 . Pro-IGF-II 補充による老化骨格筋再生不良改善効果の検討 . 第 14 回日本再生医療学会総会、2014 年 3 月 20 日、パシフィコ横浜 (横浜)

倉谷麻依、橋本有弘 . マウス未分化筋細胞の増殖制御機構: ステロイドおよび成長因子応答性の解析 . 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜 (横浜)

上住 円、上住聡芳、土田邦博、深田宗一郎、橋本有弘 . 老化骨格筋再生能力低下を引き起こす環境因子の同定 . 第 13 回日本再生医療学会総会、2014 年 3 月 4-6 日、国立京都国際会館 (京都)

塩見浩介、橋本有弘 . グルココルチコイドは、ヒト筋芽細胞の Rb 依存的な細胞周期の停止を解除する . 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 7 日、神戸ポートアイランド (神戸)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 正貴 (YOSHIDA, Masaki)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・手術・集中治療部・部長
研究者番号: 20201858

(2) 研究分担者

橋本 有弘 (HASHIMOTO, Arihiro)
国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・再生再建医学研究部・部長
研究者番号: 00208456