

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462446

研究課題名(和文)尿道組織における細胞外マトリクスが尿禁制に及ぼす機能的、形態学的検討

研究課題名(英文) the functional and morfological evaluation of extracellular matrix in urethral tissue

研究代表者

住野 泰弘 (Sumino, Yasuhiro)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：30325716

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)：本研究ではFACIT Collagenの一つであるCollagen (19)が外尿道括約筋に与える影響について検討した。Collagen ノックアウトマウスを作成し、対象として129wildマウスを用いた。両者4週齢の雌を用いて、Leak point pressure (LPP)および形態的評価を行なった。尿禁制機能検査では、LPPはノックアウト群で高い傾向にあったが有意差はみられなかった。形態学的には外尿道括約筋のサイズ、尿道内腔の平均面積、周囲長に有意差はなかった。以上より、Collagen は外尿道括約筋の機能には関与していないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We explored whether Collagen , one of FACIT collagens, effects on the rhabdosphincter. We made Collage knockout female mice and used 129/wild type female mice as control. We measured Leak Point Pressure as the functional assessment, and mean area of urethral lumen and urethral circumference of as morphological evaluations at 4week-old. In results, there were no significant difference between two groups in functional and morphological enalutations. So, Collagen doesn't involve with function of rhabdosphincter.

研究分野：排尿機能

キーワード：コラーゲン Leak point pressure 外尿道括約筋 尿禁制

1. 研究開始当初の背景

(1) 腹圧性尿失禁は閉経以降の女性尿失禁患者の 40%にみられる。その原因として括約筋機構と同時に尿道支持機構としての細胞外マトリクス(Extracellular matrix: ECM)の低下による尿道閉鎖不全による影響が推測される。

(2) 尿道において ECM は尿道支持に重要な役割を担っている。分娩と加齢は腹圧性尿失禁の原因とされており、分娩後の尿道組織における ECM の変化が報告されている。経産ラットにおいて加齢に伴い尿禁制低下がみられ、これには尿道閉鎖機能不全が原因と考えられ、全尿道組織における ECM 関連組織における ECM 関連物質の発現もこれに伴い低下していた。

(3) 外尿道括約筋は横紋筋であるが、平滑筋からの分化転換により発生する。この発生機構をもつ横紋筋は下部食道括約筋と外尿括約筋の二つのみである。他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。FACIT コラーゲンの一つである Collagen は胎児マウス下部食道括約筋に強く発現しており、Collagen ノックアウトマウスでは下部食道括約筋の機能障害が疑われたことより、食道平滑筋から横紋筋への分化転換に寄与している可能性が報告されている。

2. 研究の目的

- (1) 加齢変化に伴う尿禁制機能低下に影響を及ぼす可能性がある尿道の ECM の同定
- (2) 外尿道括約筋機能に影響を及ぼす ECM の同定
- (3) 外尿道括約筋の機能、形態変化に Collagen が関与するか

3. 研究の方法

- (1) FACIT Collagen の一つである Collagen (19) が外尿道括約筋に与える影響につい

て検討した。Collagen ノックアウト(KO)マウスを作成し、wild および KO マウスにおける尿禁制機能検査(図1) また外尿道括約筋、尿道における形態変化を検討した。

各 6 匹ずつ用いた。

- (2) 未経産の雌 Brown-Norway rat 若年群(8 週齢)、加齢群(18 か月齢)各群 10 匹ずつで次の通り実験を行った。

麻酔下に膀胱頂部にカテーテルを挿入し膀胱瘻を造設した。Th8-9 レベルで脊髄を完全切断し、

尿流動態検査(失禁圧、尿道基線圧測定)を施行した。

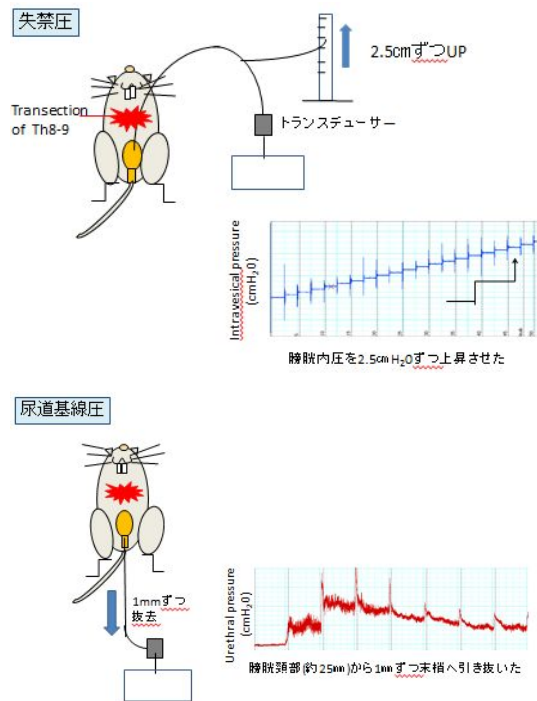


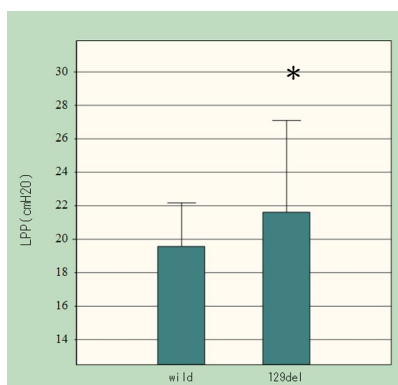
図 1 尿禁制機能測定法

Bio-Plex を用いて血清炎症サイトカイン濃度を測定した。

4. 研究成果

- (1) コントロールに用いる 129wild マウスの尿道には qRT-PCR にて Collagen の発現があることを PCR にて確認した。尿禁制機能検査では、Leak point pressure ではノックアウト群で高い傾向にあったものの有意差は

認められなかった(図2)。形態学的には外尿道括約筋のサイズも明らかな違いは認められなかった(図3)。尿道内腔の平均面積、周囲長に有意差は認められなかった(図4)。以上の結果より、Collagen は外尿道括約筋の機能障害には関与していないことが示唆された。外尿道括約筋は食道下部括約筋と同様に平滑筋からの分化転換により発生する特異な括約筋であるが、食道下部括約筋とは異なり Collagen の存在は直接尿禁制には関与していないことが明らかになった。



* P<0.05

図2 失禁圧(Leak point pressure)

左:wild マウス

右:Collagen KO マウス

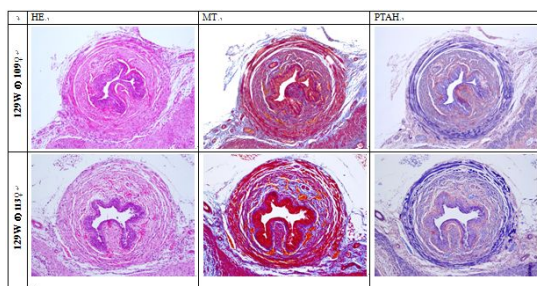


図3 尿道形態

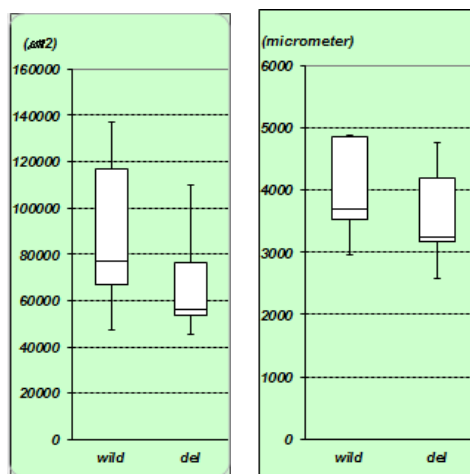
上段:wild マウス

下段:Collagen KO マウス

左:ヘマトキシリンエオジン(HE)染色

中央:マッソントリクローム(MT)染色

右:リントングステン酸ヘマトキシリン(PTAH)染色



平均面積

平均周囲長

図4 尿道内腔の平均面積と平均周囲長

上段:wild 下段:Collagen KO マウス

(2) 機能解析では、失禁圧は若年群 $42.80 \pm 3.74 \text{ cmH}_2\text{O}$ 、加齢群 $49.82 \pm 5.77 \text{ cmH}_2\text{O}$ であり、加齢群が有意に高値を示した (* $p < 0.05$)。最大尿道基線圧は若年群 $40.09 \pm 5.84 \text{ cmH}_2\text{O}$ 、加齢群 $30.01 \pm 5.90 \text{ cmH}_2\text{O}$ と若年群が有意に高値だった (** $p < 0.01$) (図5、6)。血清における Bio-Plex Pro サイトカインアッセイでは、Bio-Plex Pro サイトカインアッセイでは、加齢群において TNF- α をはじめ複数の炎症性サイトカインが有意に高値を示した。IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- γ , GCSF, TNF- α (** $p < 0.01$)、IL-4 (* $P < 0.05$) (図7)。

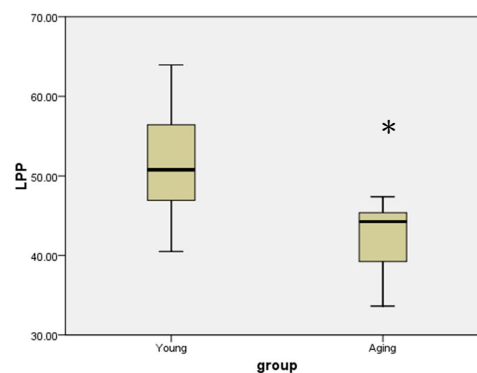
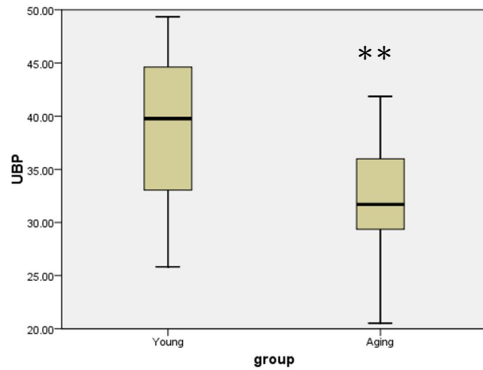


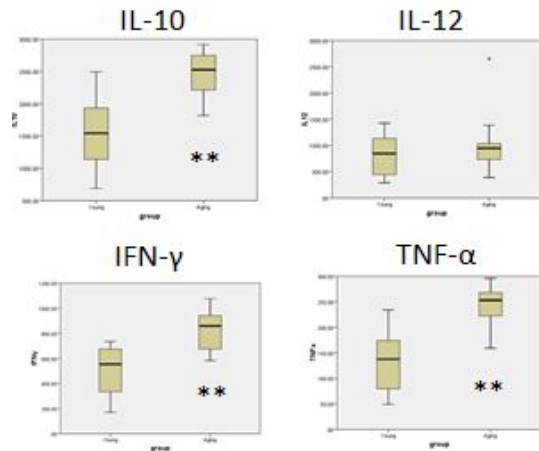
図5 失禁圧(Leak point pressure)

左:若年群 右:加齢群



**p<0.01 * P<0.05

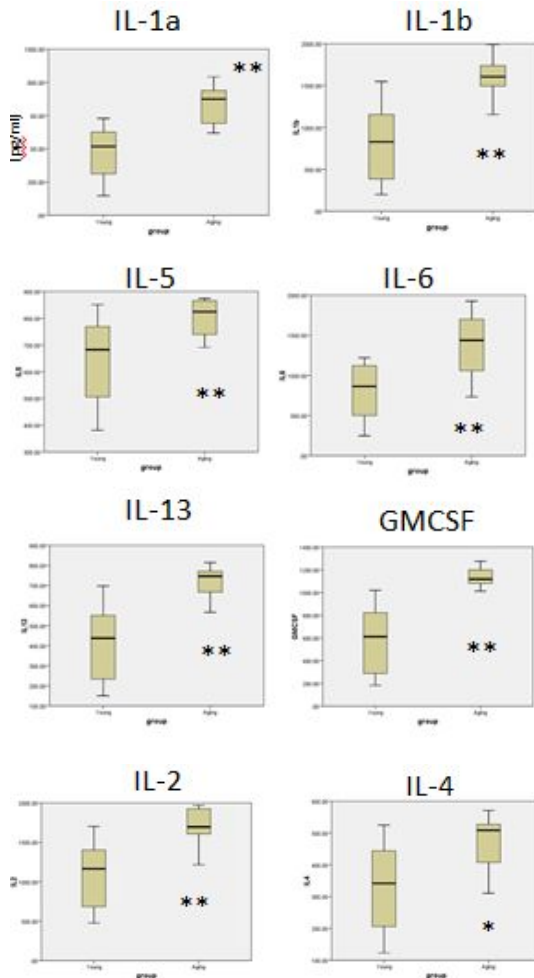
図6 最大尿道基線圧 (maximum urethral baseline pressure)
左：若年群 右：加齢群



**p<0.01 * P<0.05

図7 血清 Bio-Plex Pro サイトカインアッセイ 左：若年群 右：加齢群

加齢に伴い尿禁制が低下すること、また複数の血清サイトカインが増加することが明らかになったが、尿道細胞外マトリクス代謝産物の局所再現測定までは十分なサンプル量が採取できず行えなかった。



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 2 件)

Mayuka Shinohara, Yasuhiro Sumino, Fuminori Sato, Tohru Kiyono, Naohiro Hashimoto and Hiromitsu Mimata

Tumor necrosis factor-alpha inhibits differentiation of myogenic cells

in human urethral rhabdosphincter

International of Urology, 2017 Mar 22

査読有

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28332237>

Sumino Y, Yoshikawa S, Mori KI, Mimata H, Yoshimura N

IGF-1 as an Important Endogenous Growth Factor for the Recovery from Impaired Urethral Continence Function in Rats with Simulated Childbirth Injury.

Journal of Urology, 2016, Jun; 195 (6) pp.1927-35.d

査読有

DOI:10.1016/j.juro.2015.12.087. ,

〔学会発表〕(計 7件)

TNF- はヒト外尿道括約筋細胞の分化抑制する 篠原 麻由香, 住野 泰弘, 花田 麻里, 秋田 泰之, 秦 聡孝, 佐藤 文憲, 橋本 有弘, 三股 浩光

第 23 回排尿機能学会総会

2016 年 12 月 6-8 日

東京国際フォーラム(東京, 千代田区)

接着力の違いを利用した細胞分離による高純度不死化ヒト外尿道括約筋衛星細胞株作成の試み 篠原 麻由香, 住野 泰弘, 花田 麻里, 森 健一, 佐藤 文憲, 橋本 有弘, 三股 浩光

第 104 回 日本泌尿器科学会総会

2016 年 4 月 23-25 日仙台国際センター(宮城、仙台)

慢性炎症は腹圧性尿失禁の一因となるか 篠原 麻由香, 住野 泰弘, 溝口 晋輔, 森 健一, 佐藤 文憲, 三股 浩光

第 22 回日本排尿機能学会総会

2015 年 9 月 9-11 日

京王プラザホテル札幌(北海道, 札幌)

遮断薬効果不十分の前立腺肥大症患者に対するタダラフィルへの切り替え効果 (KYU-PRO STUDY)宮里 実, 大城 琢磨, 斎藤 誠一, 高橋 良輔, 西井 久枝, 藤本 直浩, 住野 泰弘, 三股 浩光

第 22 回日本排尿機能学会総会

2015 年 9 月 9-11 日

京王プラザホテル札幌(北海道, 札幌)

未治療前立腺肥大症患者に対するタダラフィルの効果(KYUU-PRO STUDY)

高橋良彰, 宮里実, 住野泰弘, 西井久枝, 藤本直浩, 三股浩光, 大城琢磨, 斎藤誠一

第 22 回日本排尿機能学会

2015 年 9 月 9-11 日

京王プラザホテル札幌(北海道, 札幌)

Tumor Necrosis Factor- はヒト外尿道括約筋細胞の筋分化誘導を抑制する 篠原麻由香, 住野泰弘, 花田麻里, 佐藤文憲, 橋本有弘, 三股浩光

第 103 回日本泌尿器科学会総会

2015 年 4 月 18-21 日

金沢都ホテル(石川, 金沢)

The association between impaired urinary continence mechanisms and age-related inflammation in female rats Yasuhiro Sumino, Satoru Yoshikawa, Mayuka Shinohara, Ken-ichi Mori, Fuminori Satoh, Hiromitsu Mimata and Naoki Yoshimura

American Urology Association 2015

2014 年 5 月 16-21 日

New Orleans, LA USA

〔図書〕(計 1件)

下部尿路機能再生医療の現況 筋再生における外尿道括約筋衛星細胞の役割

篠原 麻由香, 住野 泰弘, 三股 浩光

泌尿器外科 29 巻 1 号 Page15-20 2016.01

〔産業財産権〕

出願状況（計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

住野 泰弘 (Sumino, Yasuhiro)

大分大学・医学部腎泌尿器外科学講座・客員
研究員

研究者番号：30325716

(2) 研究分担者

吉岡 秀克 (Yoshioka, Hidekatsu)

大分大学・医学部マトリックス医学講座・教
授

研究者番号：00222430

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

篠原 麻由香 (Shinohara, Mayuka)