



学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 号	氏 名	花田 麻里
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	横山 繁生	
	副査氏名	楠原 久司	印
	副査氏名	白石 憲男	
論文題目： Growth Inhibition and Apoptosis Induction by TNF- α in Satellite Cells of Human Urethral Rhabdosphincter (ヒト外尿道括約筋衛星細胞における TNF- α の増殖阻害およびアポトーシス誘導)			
論文掲載誌名： Journal of Urology			
論文要旨： <p>高齢者ではアポトーシスを誘導する TNF-α が上昇し、アポトーシスによる外尿道括約筋細胞の減少が高齢者尿失禁の一因と考えられている。本研究では外尿道括約筋衛星細胞における TNF-α のアポトーシス誘導能、TNF 受容体の発現について検討した。</p> <p>抗 NCAM (CD56) 抗体を用いた MACS 法で分離培養した外尿道括約筋衛星細胞の初代培養細胞および SV40T 抗原を遺伝子導入した長寿化細胞を用い、まず TNF-α による増殖阻害試験を行った。アポトーシスの誘導に関しては、フローサイトメトリーによる細胞周期解析、Annexin V-FITC 細胞染色法、ウェスタンブロット法によるカスパーゼカスケード活性 (カスパーゼ 8, 3, PARP) により検討した。また、TNF 受容体の mRNA およびタンパク発現に関しては RT-PCR 法およびウェスタンブロット法を用い、さらに、受容体下流のシグナル伝達経路についても検討した。臨床への応用も考え、TNF-α 拮抗剤であるエタネルセプトが TNF-α の増殖抑制やアポトーシス誘導に与える影響についても検討した。</p> <p>TNF-α は濃度依存的に衛星細胞の増殖を抑制し、上記のアポトーシスに関する全ての方法でアポトーシスの誘導が起こっていることが確認された。また、衛星細胞には TNF 受容体 (TNFR1 及び TNFR2) が発現していた。エタネルセプト添加によって TNF-α の増殖抑制が有意に阻害されていたが、エタネルセプトが TNF-α による IκBα のリン酸化を抑制するためと考えられた。</p> <p>本論文は、加齢に伴うヒト外尿道括約筋細胞の減少には TNF-α によるアポトーシスが関係し、TNF-α 拮抗剤は加齢による外尿道括約筋細胞の減少を防止することによって、高齢者尿失禁の予防と治療に有用である事を示唆するもので、審査員の合議により学位論文に値すると判定した。</p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 花田 麻里

論 文 題 目

Growth Inhibition and Apoptosis Induction by TNF- α in Satellite Cells of Human Urethral Rhabdosphincter (ヒト外尿道括約筋衛星細胞における TNF- α の増殖阻害およびアポトーシス誘導)

要 旨

(目的) 外尿道括約筋は尿禁制保持に重要な横紋筋であるが、加齢と共に脆弱化し、高齢者尿失禁の一因とされている。近年、ヒト外尿道括約筋細胞は加齢に伴って減少し、アポトーシス誘導がその原因と報告されているものの、その機序は未だ解明されていない。一方、炎症性サイトカインである Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) は四肢の骨格筋細胞にアポトーシスを誘導すること、その血中濃度は高齢者で上昇していることが報告されている。我々は、加齢に伴うヒト外尿道括約筋細胞減少に TNF- α が関与している可能性を考え、ヒト外尿道括約筋衛星細胞における TNF 受容体の発現とそのアポトーシス誘導能について検討した。

(対象と方法) インフォームドコンセントの得られた患者において、前立腺全摘または膀胱全摘時に外尿道括約筋組織を微量採取し、初代培養後、抗 NCAM 抗体を用いた MACS 法により外尿道括約筋衛星細胞を分離培養した。(Sumino Y. et. al. NeuroUrol and Urodyn. 2007) 数代の継代の後、SV40T 抗原の遺伝子導入によって長寿化細胞を作成し、以下の実験に用いた。初代培養細胞、長寿化細胞を用いて、

TNF- α による増殖阻害試験を行った。アポトーシス誘導は、フローサイトメトリー法を用いた細胞周期解析、Annexin V-FITC 細胞染色法、さらにウェスタンブロット法によるカスパーゼカスケードの活性により検討した。また、TNF 受容体の mRNA およびタンパク発現は RT-PCR およびウェスタンブロット法によりそれぞれ確認し、さらに受容体下流のシグナル伝達経路について検討した。TNF- α 治療薬のエタネルセプトで前処理を行い、TNF- α による増殖阻害やアポトーシス誘導の抑制についても検討した。

(結果) TNF- α は濃度依存的にヒト外尿道括約筋衛星細胞の増殖を阻害した。初代培養細胞及び長寿化細胞において、TNF- α はそれぞれ 1 ng/ml 以上及び 0.1 ng/ml 以上で有意な細胞増殖阻害効果を認めた。フローサイトメトリー法による細胞周期解析では、TNF- α の添加により sub-G1 分画の有意な増加と G2/M 分画の減少傾向を認めた。また、TNF- α は濃度依存的に Annexin V 陽性細胞を増加させることより、初期アポトーシスを誘導することが示唆されたが、他方、Propidium Iodide 陽性のネクローシス細胞数は変化しなかった。ウェスタンブロット法では、カスパーゼ 8、カスパーゼ 3 の活性、PARP の切断を認めた。ヒト外尿道括約筋衛星細胞において、TNF 受容体の TNFR1 及び TNFR2 がともに発現していた。エタネルセプトでの前処理後 TNF- α による増殖阻害試験を行い、エタネルセプト ≥ 0.01 ug/ml の濃度で TNF- α による増殖阻害を有意に抑制した。細胞周期解析においてエタネルセプトは、TNF- α により誘導された sub-G1 分画の増加を、濃度依存的に抑制した。また、IkB α は TNF- α 刺激によって 2 から 5 分後にリン酸化され、10 分後には元のレベルに戻るが、この TNF- α による IkB α のリン酸化はエタネルセプト前処理によって抑制された。

(考察、結語) ヒト外尿道括約筋衛星細胞は、TNF- α 受容体である TNFR1 および TNFR2 を発現しており、TNF- α 刺激によって IkB α のリン酸化が起こり、caspase cascade の活性化によってアポトーシスが誘導され、細胞増殖が抑制される。またエタネルセプトは、TNF- α によるヒト外尿道括約筋衛星細胞のアポトーシス誘導と増殖阻害を抑制する。加齢に伴うヒト外尿道括約筋細胞の減少には TNF- α とその受容体の関与が考えられ、TNF- α 治療薬のエタネルセプトは加齢による外尿道括約筋細胞の減少を防止し、高齢者尿失禁の治療や予防に有用である可能性が示唆された。