


学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第 497 号	氏 名	秋田 泰之
審 査 委 員 会 委 員		主査氏名	藤 木 稔 
		副査氏名	榎 厚 久 司 印
		副査氏名	平 野 照 之 印
<p>論文題目 Myostatin inhibits proliferation of human urethral rhabdosphincter satellite cells (マイオスタチンは外尿道括約筋衛星細胞の増殖を阻害する)</p> <p>論文掲載誌名： International Journal of Urology, 2012</p> <p>論文要旨 横紋筋特異的に発現する TGF-βファミリー分子で、横紋筋の増殖を強力に抑制する因子 Myostatin の発現をヒト外尿道括約筋で確認し、その増殖に及ぼす作用機序を検討した。 申請者は前立腺・膀胱全摘時に微量採取したヒト外尿道括約筋組織から、その特異抗原である Neural cell adhesion molecule (NCAM) に対する抗体を用いた magnetic affinity cell sorting (MACS) 法により、外尿道括約筋衛星細胞を分離培養し、SV40T 抗原を遺伝子導入して長寿化した。Myostatin 添加時における細胞増殖試験、細胞周期試験を、また、阻害因子 follistatin 添加の影響を検討した。Western blot 法、RT-PCR 法により外尿道括約筋衛星細胞における Myostatin の発現を証明した。さらに、中和抗体による抑制実験を行った。 その結果、分離培養した NCAM 陽性細胞は横紋筋のマーカー desmin、MyoD を発現しており、分化誘導培地で7日目に筋管への分化を認め、増殖・分化能を有していること(筋衛星細胞; 筋前駆細胞)、Myostatin は濃度依存性(1-3 μg/ml)に増殖抑制作用を、またこれはSV40T 導入前の分離細胞でも認めること、Myostatin は転写因子 smad2 のリン酸化経路を介して増殖抑制に作用していること、follistatin(100ng/ml)はこの増殖抑制、smad2 リン酸化を抑制することを示した。また、Myostatin は G1 期の増加、S 期の減少、細胞周期の抑制に作用する p21 の発現を亢進、follistatin はこれらを抑制し、申請者は本効果が細胞周期の停止によるものと考察、作用機序・投与方法の検討を経て臨床応用の可能性が期待できると結論している。</p> <p>本研究は、Myostatin 発現が細胞周期停止により外尿道括約筋衛星細胞の増殖を阻害する効果を in vitro で証明したものであり、その価値を考慮し、審査委員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 秋田 泰之

論 文 題 目

Myostatin inhibits proliferation of human urethral rhabdosphincter satellite cells

(マイオスタチンは外尿道括約筋衛星細胞の増殖を阻害する)

要 旨

【緒言】 Myostatin は横紋筋特異的に発現する TGF- β ファミリー分子であり、横紋筋の増殖を強力に抑制する因子である。われわれはヒト外尿道括約筋における Myostatin の発現を確認し、その増殖に及ぼす作用機序について検討した。

【方法】 大分大学附属病院および関連病院において前立腺全摘、膀胱全摘時に微量採取したヒト外尿道括約筋組織から、その特異抗原である Neural cell adhesion molecule (NCAM) に対する抗体を用いた magnetic affinity cell sorting (MACS) 法により、外尿道括約筋衛星細胞を分離培養し、SV40T 抗原を遺伝子導入して長寿化した。

この細胞を用いて Myostatin 添加時における細胞増殖試験、細胞周期試験を行った。また、この阻害因子である follistatin の添加が及ぼす影響についても検討を行った。

Western blot 法、RT-PCR 法により外尿道括約筋衛星細胞における Myostatin の発現を証明した。さらに、中和抗体による抑制実験を行った。

【結果・考察】分離培養した NCAM 陽性細胞は横紋筋のマーカーである desmin、MyoD を発現しており、分化誘導培地で 7 日目に筋管への分化を認めた。増殖、分化能を有していることから、筋衛星細胞（筋前駆細胞）と考え、この細胞を以後の実験に使用した。

この細胞に Myostatin を添加することで濃度依存性 (1-3 $\mu\text{g/ml}$) に増殖抑制作用を認めた。この作用は SV40T 導入前の分離細胞でも認められており、SV40T 導入による長寿化が Myostatin の作用に影響しないと考えられた。

Myostatin の添加により、転写因子である smad2 のリン酸化が起こっており、この経路を介して増殖抑制に作用していることが示唆された。この増殖抑制、smad2 リン酸化の作用は follistatin の添加 (100ng/ml) によって抑制された。

細胞周期実験では Myostatin の添加により G1 期の増加、S 期の減少がみられ、細胞周期の抑制に作用する p21 の発現が亢進していた。このことから Myostatin の増殖抑制効果はアポトーシスの増加ではなく、細胞周期の停止によるものと思われた。この効果も follistatin 添加により抑制された。

Myostatin の Autocrine 作用を確認するために衛星細胞における発現を RT-PCR、Western blot 法で確認した。MACS 法によって分離された NCAM 陰性細胞では発現を認めなかった。

Myostatin の中和抗体を添加することで細胞の増殖傾向が見られたが、有意差は得られなかった。

【結語】 Myostatin は smad2 のリン酸化、細胞周期の停止により外尿道括約筋衛星細胞の増殖を抑制し、この作用は follistatin によって阻害された。

外尿道括約筋には Myostatin が蛋白レベルで発現しており、これを抑制することで外尿道括約筋の再生が確認できれば、腹圧性尿失禁の治療として臨床応用できる可能性があると思われた。