




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 582 号	氏名	篠原 麻由香
審査委員会委員	主査氏名	柴田 洋孝	
	副査氏名	濱田 文彦	
	副査氏名	松尾 哲孝	
<p>論文題目 Tumor Necrosis Factor-Alpha Inhibits Differentiation of Myogenic Cells in Human Urethral Rhabdosphincter (TNF-<math>\alpha</math> はヒト外尿道括約筋細胞の分化を抑制する)</p> <p>論文掲載雑誌名 International Journal of Urology</p> <p>論文要旨 【緒言】加齢に伴う外尿道括約筋数の減少が高齢者尿失禁の一因となる。炎症性サイトカインの TNF-<math>\alpha</math> は加齢に伴う筋肉量減少の指標となり、ヒト外尿道括約筋細胞の増殖を抑制することが報告されており、本研究は TNF-<math>\alpha</math> がヒト外尿道括約筋細胞の分化への影響を検討した。</p> <p>【方法】1) ヒト RS 細胞の作成：膀胱全摘組織の外尿道括約筋組織から初代培養細胞を調製し、ヒト筋細胞不死化法 (human telomerase reverse transcriptase, human cyclin D1, human mutant CDK4 をレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入) により不死化細胞のヒト RS 細胞を得た。2) 横紋筋細胞マーカーの免疫染色 (CD56, sarcomeric actin, desmin)、3) 分化誘導による分化能の検討、4) 分化誘導時に TNF-<math>\alpha</math> 添加による影響と TNF-<math>\alpha</math> 阻害薬 etanercept の前処置による TNF-<math>\alpha</math> の影響について qRT-PCR, Western blotting, 免疫染色などにより検討した。また、シグナル伝達経路として Akt, p38 の Western blotting を行った。</p> <p>【結果】1) 得られたヒト RS 細胞は 40 代まで継代可能であった。2) 横紋筋細胞マーカーである CD56 (NCAM), sarcomeric actin, desmin とともに陽性であり、外尿道括約筋細胞であることが確認された。3) 分化誘導後、MHC の発現が有意に増加し、ヒト RS 細胞が分化能を有することが確認された。4) TNF-<math>\alpha</math> 添加による分化誘導では、TNF-<math>\alpha</math> の濃度依存性に MHC 発現およびリン酸化 Akt, p38 発現が有意に低下し、TNF-<math>\alpha</math> 阻害薬 etanercept の前処置下では、それらは有意に増加した。</p> <p>【考察】本研究により、筋肉に分化可能な不死化ヒト外尿道括約筋細胞 RS 細胞の樹立に成功した。TNF-<math>\alpha</math> は p38MAPK および PI3K/Akt シグナル伝達経路を介して、外尿道括約筋細胞の分化を抑制し、etanercept がそれを改善したことから、高齢者尿失禁の治療として TNF-<math>\alpha</math> 阻害薬が有効である可能性が示唆された。</p> <p>本研究は、不死化ヒト外尿道括約筋 RS 細胞の樹立に初めて成功し、加齢に伴う尿失禁の新しい治療法の確立につながる可能性が示され、今後は女性例や in vivo での検討が期待される。このため、審査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>			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第582号	氏名	篠原麻由香
審査委員会委員	主査氏名	柴田 洋孝	
	副査氏名	瀧田 文彦	
	副査氏名	松尾 哲孝	

学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について、以下の質問を受けた。

1. 尿失禁に關与する外尿道括約筋、内尿道括約筋、肛門挙筋の筋肉としての特性にどのような違いがあるか？
2. 内因性括約筋不全の2つの原因(アポトーシス・炎症性サイトカイン)のどちらが主な要因と考えられているか？
3. 患者から採取したばかりの細胞の分化状態はどうなっているか？最終分化した細胞が優位なのか？
4. 増殖用の培養液と分化誘導用の培養液との間の根本的な違いは何か？何が分化に重要なのか？
5. TNF- $\alpha$ の生体内での産生細胞や産生組織に関する知見はどれくらい分かっているのか？
6. 不死化にtelomerase RT, cyclin D1, 変異型CDK4の3つの遺伝子を選んだのはなぜか？
7. 不死化細胞の培養で、線維芽細胞などの細胞の混在の割合やそれらをどのように除去して作成したか？
8. 不死化細胞におけるTNF受容体の発現は確認しているか？
9. TNF- $\alpha$ シグナルの阻害薬としてetanerceptを用いているが、TNF- $\alpha$ 受容体のsiRNAによる内因性発現の抑制実験を行ったか？
10. 調製した不死化細胞(Fig.1)において、不死化前の細胞の横紋筋マーカーの染色結果はどうなるか？
11. TNF- $\alpha$ によるAktおよびp38リン酸化抑制のメカニズムは何か？また、AktおよびP38阻害薬を用いると、本細胞において分化が実際に抑制されるのか？
12. Aktおよびp38のリン酸化の下流シグナルは、どのように筋細胞の分化を誘導するのか？
13. 不死化細胞自身がTNF- $\alpha$ を分泌するのか？ また、etanerceptを単独投与した時にどうなるか？
14. TNF- $\alpha$ 以外の加齢に伴うサイトカインの影響は検討しているか？

これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。