



Modulation of the microenvironment by growth factors regulates the in vivo growth of skeletal myoblasts

柳内，章宏

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2010-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4978

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004978>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 柳内 章宏
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博い第 4978 号
学位授与の要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の日 付 平成 22 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Modulation of the microenvironment by growth factors regulates the in vivo growth of skeletal myoblasts(マウス足底筋由来筋芽細胞の in vivo における生着・増殖に至適な微小環境の基礎的検討)

審 査 委 員

主 査 教 授 西尾 久英
教 授 田原 真也
教 授 黒坂 昌弘

(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Modulation of the microenvironment by growth factors
regulates the *in vivo* growth of skeletal myoblasts

マウス足底筋由来筋芽細胞の *in vivo* における生着・増殖に至適な
微小環境の基礎的検討

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
腎泌尿器科学
(指導教員: 藤澤 正人 教授)

柳内 章宏

【目的】

尿失禁を訴える患者は世界に 2 億人以上いると想定されており、社会生活において重大な有害事象であり生活の質を大きく落とすものである。腹圧性尿失禁は労作時に起こる不随意な尿の漏出であり、最も一般的な尿失禁であるが、投薬による治療の効果は十分に満足できるものではない。代替治療として、注射できる牛コラーゲンや PTFE、シリコン粒子も用いられたが、効果の持続が不良で重大な合併症も出現し、十分な結果は残せなかった。よって、長期にわたる安定した効果が得られ、生理的アプローチを用いた腹圧性尿失禁に対する新たな治療戦略の構築は必須のものとなっている。

近年の組織再生技術の進歩に伴い、筋芽細胞の移植は、様々な筋疾患において治療上のオプションと考えられるようになった。腹圧性尿失禁の治療において、筋芽細胞が分化・融合し筋繊維となり、注射可能な外尿道括約筋の再生へつながれば、治療成績の飛躍的向上に繋がる可能性がある。しかし現状では、筋芽細胞の筋層内注射は限られた効果しか生み出していない。現在までに、生体内における筋芽細胞の移植の効率を改善させるためにいくつかの研究が行われており、筋芽細胞とその周囲の微少環境の相互作用が、移植された組織の生存の制御に最も重要な潜在要素の一つであると考えられるようになっている。そこで我々は、成長因子の中から bFGF, HGF, IGF-I, PDGF を選び、*in vitro* および *in vivo* における筋芽細胞の増殖、生着に与える最善の微少環境についての検討を行った。

【方法】6 週齢 FVB マウスの足底筋を採取し細切の後、コラゲナーゼ処理を施し、得られた筋線維を Matrigel をコートしたペトリディッシュにて培養した。トリプシン処理を行い遊離させ、さらに継代培養を行った。*In vitro* での、成長因子が筋芽細胞に与える効果を調べるために、MTT アッセイを行った。筋芽細胞の遊走能についてはボイデン・チャンバー法にて測定した。さらに細胞外マトリクスの代謝酵素である MMP-9, MMP-2 を測定し、MMP-9 の特異的阻害物質である SB-3CT を異なる濃度で加え、遊走能に変化がみられるかを検討した。次に、生体内での増殖、生着を検討するため、 1×10^6 個の筋芽細胞と Matrigel を bFGF, HGF, IGF-I, PDGF とともにヌードマウス皮下に注射したモデルと、膀胱筋層に注射したモデルを作成し、1 週および 2 週後の腫瘍容積を測定した。

【結果】

In vitro での筋芽細胞数は、各成長因子の濃度に比例して増加し、時間の経過とともに増加した。4 種の成長因子の中では bFGF 注入群が濃度、時間ともに最も顕著に増加した。また、筋芽細胞の移動(遊走)に関しては、4 種の成長因子の中で PDGF による効果が最も高かった。筋芽細胞の遊走能を刺激する要因を明らかにするため、成長因子の投与に伴う細胞外基質分解酵素 MMP-2 と MMP-9 の産生の変化を測定した。成長因子の投与により MMP-2 の産生は変化しなかつたが、MMP-9 産生は全て

の成長因子投与によって濃度依存性に増加した。さらに、MMP-9 の特異的阻害物質である SB-3CT を併せて投与したところ、成長因子による遊走能の亢進が抑制される結果となった。生体内での筋芽細胞の増殖効果を検討するため、筋芽細胞を成長因子とともにヌードマウスの皮下、膀胱筋層に注射し、1週後および2週後の腫瘍容積を測定したところ、4種類全てにおいて、成長因子を投与しない群に比べ、皮下においても膀胱筋層においても腫瘍増殖能は亢進した。成長因子の種類により腫瘍の生着・増殖に影響を与える時期は異なり、注射1週後には bFGF の投与が、2週後には PDGF の投与が最も効果的であった。そこで、bFGF および PDGF を併せて投与したところ、皮下注射群、膀胱筋層注射群において、成長因子単独注射群に比べ筋芽細胞の増殖能に対する相乗効果が認められた。

【考察】

筋芽細胞の生体内における生着・増殖に関連する成長因子は多数あるが、今回我々はそのうち4種類を選択し検討を行った。*in vitro* ではそのすべてにおいて、濃度・時間依存的増殖刺激を確認した。組織内での生着のためには、細胞外マトリクスで構成された結合組織を通過しなければならない。そのため、遊走能が最も重要な要素のひとつとされてきた。4種の成長因子の使用によりその遊走能も有意に増加したが、その実証のために代表的な細胞外基質分解酵素である MMP 産生の変化を測定した。その結果細胞の生着過程で4種すべての成長因子の投与で MMP-9 の産生は増加したが MMP-2 の産生は増加しなかった。さらに MMP-9 の特異的阻害物質である SB-3CT により MMP-9 を不活化することで、筋芽細胞の遊走が抑制された。このことは成長因子によりもたらされた MMP-9 の増加が筋芽細胞の遊走能を刺激することを強く示唆するものであった。ヌードマウスへの移植実験では、皮下、膀胱筋層への注射ともに成長因子を加えることにより1週間後の筋芽細胞の増殖が有意に増強した。その中でも bFGF の増強効果がもっとも高かった。注射2週間後には、筋芽細胞により形成された腫瘍は皮下、膀胱筋層ともにいずれの成長因子を用いても退縮したが、その中でも PDGF がもっとも退縮の抑制効果が最も高かった。また、bFGF と PDGF を併せて注射することにより、単独で注射するよりも、腫瘍容積の維持に相乗効果がみられた。以上の結果から、生体内における筋芽細胞の微少環境に影響する様々な要因について検討し、筋芽細胞の移植にもっとも適した環境を調整することが重要と考えられた。

【結論】

今回の我々の研究により、成長因子、特に bFGF と PDGF は筋芽細胞の増殖、遊走能を増強し、MMP-9 の産生を刺激することにより筋芽細胞の移植をより有効にすると考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2094号	氏名	柳内 章宏
論文題目 Title of Dissertation	<p>Modulation of the microenvironment by growth factors regulates the <i>in vivo</i> growth of skeletal myoblasts</p> <p>マウス足底筋由来筋芽細胞の <i>in vivo</i> における生着・増殖に至適な微小環境の基礎的検討</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 西尾 久英</p> <p>副査 Vice-examiner 田原 真也</p> <p>副査 Vice-examiner 黒坂 昌弘</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【目的】
尿失禁を訴える患者は世界に2億人以上いると想定されており、社会生活において重大な有害事象であり生活の質を大きく落とすものである。腹圧性尿失禁は労作時に起こる随意な尿の漏出であり、最も一般的な尿失禁であるが、投薬による治療の効果は十分に満足できるものではない。代替治療として、注射できる牛コラーゲンやPTFE、シリコン粒子も用いられたが、効果の持続が不良で重大な合併症も出現し、十分な結果は残せなかつた。よって、長期にわたる安定した効果が得られ、生理的アプローチを用いた腹圧性尿失禁に対する新たな治療戦略の構築は必須のものとなっている。
近年の組織再生技術の進歩に伴い、筋芽細胞の移植は、様々な筋疾患において治療上のオプションと考えられるようになつた。腹圧性尿失禁の治療において、筋芽細胞が分化・融合し筋繊維となり、注射可能な外尿道括約筋の再生へとつながれば、治療成績の飛躍的向上に繋がる可能性がある。しかし現状では、筋芽細胞の筋層内注射は限られた効果しか生み出していない。現在までに、生体内における筋芽細胞の移植の効率を改善させるためにいくつかの研究が行われており、筋芽細胞とその周囲の微少環境の相互作用が、移植された組織の生存の制御に最も重要な潜在要素の一つであると考えられるようになっている。そこで本研究者らは、成長因子の中からbFGF, HGF, IGF-I, PDGFを選び、 <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> における筋芽細胞の増殖、生着に与える最善の微少環境についての検討を行つた。

【方法】

6週齢 FVB マウスの足底筋を探取し細切の後、コラゲナーゼ処理を施し、得られた筋線維を Matrigel をコートしたペトリディッシュにて培養した。トリプシン処理を行い遊離させ、さらに継代培養を行つた。In vitro での、成長因子が筋芽細胞に与える効果を調べるために、MTT アッセイを行つた。筋芽細胞の遊走能についてはボイデン・チャンバー法にて測定した。さらに細胞外マトリクスの代謝酵素である MMP-9, MMP-2 を測定し、MMP-9 の特異的阻害物質である SB-3CT を異なる濃度で加え、遊走能に変化がみられるかを検討した。次に、生体内での増殖、生着を検討するため、1×10⁶ 個の筋芽細胞と Matrigel を

bFGF, HGF, IGF-I, PDGFとともにヌードマウス皮下に注射したモデルと、膀胱筋層に注射したモデルを作成し、1週および2週後の腫瘍容積を測定した。

【結果】

*In vitro*での筋芽細胞数は、各成長因子の濃度に比例して増加し、時間の経過とともに増加した。4種の成長因子の中では bFGF 注入群が濃度、時間ともに最も顕著に増加した。また、筋芽細胞の移動（遊走）に関しては、4種の成長因子の中で PDGF による効果が最も高かった。筋芽細胞の遊走能を刺激する要因を明らかにするため、成長因子の投与による細胞外基質分解酵素 MMP-2 と MMP-9 の産生の変化を測定した。成長因子の投与により MMP-2 の産生は変化しなかったが、MMP-9 産生は全ての成長因子投与によって濃度依存性に増加した。さらに、MMP-9 の特異的阻害物質である SB-3CT を併せて投与したこと、成長因子による遊走能の亢進が抑制される結果となった。生体内での筋芽細胞の増殖効果を検討するため、筋芽細胞を成長因子とともにヌードマウスの皮下、膀胱筋層に注射し、1週後および2週後の腫瘍容積を測定したところ、4種類全てにおいて、成長因子を投与しない群に比べ、皮下においても膀胱筋層においても腫瘍増殖能は亢進した。成長因子の種類により腫瘍の生着・増殖に影響を与える時期は異なり、注射1週後には bFGF の投与が、2週後には PDGF の投与が最も効果的であった。そこで、bFGF および PDGF を併せて投与したこと、皮下注射群、膀胱筋層注射群において、成長因子単独注射群に比べ筋芽細胞の増殖能に対する相乗効果が認められた。

【考察】

筋芽細胞の生体内における生着・増殖に関連する成長因子は多数あるが、今回本研究者はそのうち4種類を選択し検討を行った。*in vitro*ではそのすべてにおいて、濃度・時間依存的増殖刺激を確認した。組織内での生着のためには、細胞外マトリクスで構成された結合組織を通過しなければならない。そのため、遊走能が最も重要な要素のひとつとさ

れてきた。4種の成長因子の使用によりその遊走能も有意に増加したが、その実証のために代表的な細胞外基質分解酵素である MMP 産生の変化を測定した。その結果細胞の生着過程で4種すべての成長因子の投与で MMP-9 の産生は増加したが MMP-2 の産生は増加しなかった。さらに MMP-9 の特異的阻害物質である SB-3CT により MMP-9 を不活化することで、筋芽細胞の遊走が抑制された。このことは成長因子によりもたらされた MMP-9 の増加が筋芽細胞の遊走能を刺激すること強く示唆するものであった。ヌードマウスへの移植実験では、皮下、膀胱筋層への注射とともに成長因子を加えることにより1週間後の筋芽細胞の増殖が有意に増強した。その中でも bFGF の増強効果がもっとも高かった。注射2週間後には、筋芽細胞により形成された腫瘍は皮下、膀胱筋層ともにいずれの成長因子を用いても退縮したが、その中でも PDGF がもっとも退縮の抑制効果が最も高かった。また、bFGF と PDGF を併せて注射することにより、単独で注射するよりも、腫瘍容積の維持に相乗効果がみられた。以上の結果から、生体内における筋芽細胞の微少環境に影響する様々な要因について検討し、筋芽細胞の移植にもっとも適した環境を調整することが重要と考えられた。

【結論】

今回の本研究者らの研究により、成長因子、特に bFGF と PDGF は筋芽細胞の増殖、遊走能を増強し、MMP-9 の産生を刺激することにより筋芽細胞の移植をより有効にすると考えられた。

本研究は、筋芽細胞について、その移植の条件を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった成長因子の効果について重要な知見を得たものとして価値ある集積と認められる。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。