

令和元年6月17日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11050

研究課題名(和文)磁気ターゲティングを用いた骨髄幹細胞移植による膀胱再生の開発

研究課題名(英文) Development of urinary bladder regeneration using magnetically labeled mesenchymal stem cells with magnetic targeting system

研究代表者

井上 省吾 (Inoue, Shogo)

広島大学・病院(医)・講師

研究者番号：90457177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：磁気ターゲティングを用いた磁性体化骨髄間葉系幹細胞による組織再生を検証することを本研究の目的とした。オス日本白色家兔に対して、膀胱前壁に電気凝固を施行し、膀胱損傷モデルを作成した。膀胱内に 1×10^6 個の磁性体化骨髄間葉系幹細胞を注入し、腹壁に1Tの永久磁石を10分間当てることで膀胱前壁に磁性体化骨髄間葉系幹細胞を誘導した。MRIによる画像評価やHE染色やSMA染色による組織学的評価において、対照群と比較して有意な膀胱組織再生を認めた。磁気ターゲティングを用いた磁性体化骨髄間葉系幹細胞による組織再生は膀胱組織損傷に対して有効な治療となりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、膀胱再生は、手間と技術を要する上に、再生細胞の効率が低いなど、多くの課題がある。磁気ターゲティングは、これまでの組織再生の考え方と大きく異なる革新的な手法である。MRI用造影剤であるフェルカルボトランを骨髄間葉系幹細胞に取り込ませることで、細胞は容易に磁性体化する。さらに、組織欠損部に強磁場をかけることで、磁性体化幹細胞は強力に効率的な移植細胞源となる。今回、私たちが開発した磁気ターゲティングを用いた磁性体化骨髄間葉系幹細胞による膀胱組織再生は、今後臨床応用を行うことで有効な治療選択肢となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to examine the regeneration process of damaged bladder tissue after a transurethral injection of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) into the bladder. Electrofulguration was carried out on the anterior wall of the urinary bladder of white Japanese rabbits. An external magnetic field directed at the injured site was then applied using a 1T permanent magnet. Twelve rabbits were divided into three groups. The magnetically labeled MSCs were injected into the urinary bladder with or without the magnetic field (MSC M+ and MSC M- groups), and PBS was injected as the control. The histological study showed that repair of the cauterized area was significantly better in the MSC M+ group than that in either the MSC M- group or control group. The magnetic delivery of MSCs shows promise as an effective, minimally invasive method of enhancing tissue regeneration after bladder tissue damage.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：膀胱再生 磁気ターゲティング

1. 研究開始当初の背景

近年、泌尿器科においても再生医療が注目されている。その中で、再生医療が必要とされる臓器として膀胱がある。放射線治療や糖尿病などによる膀胱組織傷害により、膀胱機能が大きく損なわれる患者は多い。さらに、筋層浸潤性膀胱癌における膀胱全摘除術後の腸管を利用した代用膀胱は、術後の生活の質を大きく損なっている。

これまでに膀胱再生の報告は多いが、手間と技術を要する上に、生着し組織再生する細胞の効率が低いことが課題である。正常な生理作用を有する膀胱再生の実現が望まれている。私たちは、膀胱再生を実現するための移植細胞源として、骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells; MSCs) 移植に着目した。

骨髄 MSCs は、主に骨・軟骨・脂肪・骨格筋・心筋などの中胚葉系細胞への分化能をもつ未分化な細胞集団で、格段に高い増殖能をもつことが知られている。骨髄 MSCs 移植は、腫瘍形成など重大な副作用は報告されておらず、安全性の点においても優れた手法である。移植の方法として、細胞を直接注入する方法が主に用いられているが、注入した細胞の一部しか組織再生に作用しない問題点が報告されている。移植細胞を効率よく標的臓器に集積させる、新たな方法として、私たちは磁気ターゲティングを開発した。

本研究では、「磁気ターゲティング」技術を膀胱再生に応用することで、これまでのアプローチと大きく異なる、新規的かつ独創的な膀胱再生の確立に向けた研究を行う。

2. 研究の目的

磁気ターゲティングを用いた、新規的かつ革新的な膀胱再生の手法を確立する目的で、磁性体化骨髄間葉系幹細胞 (Magnetically labeled bone marrow mesenchymal stem cells; M-MSCs) を作成後、膀胱損傷モデルに対する M-MSCs 移植と磁気ターゲティング手技を確立する。組織学的および機能的評価により、膀胱再生メカニズムを検証する。

3. 研究の方法

・ M-MSCs の作成

オス日本白色家兔 (体重 2.50kg ~ 2.99kg) を使用し、全身麻酔下で腸骨稜から 10 ml の骨髄液を採取した。骨髄液を 2 週間培養することで MSCs を作成し、さらに臨床で MRI 用造影剤として用いられている鉄ナノ粒子であるフェルカルボトランと共培養することで M-MSCs を作成した。MSCs と M-MSCs のセルブロックを作成し、M-MSCs の中に鉄が含まれているかを確認した。

・ 膀胱損傷モデルに対する磁性体化幹細胞移植と磁気ターゲティング手技の確立

日本白色家兔に対して、全身麻酔下に 13Fr 小児用膀胱鏡を経尿道的に挿入し、膀胱前壁に 20 × 20 mm 大の電気凝固を施行した。

膀胱内に 1×10^6 個の M-MSCs を注入し、日本白色家兔の腹壁に 1T の永久磁石を 10 分間当てることで膀胱前壁に M-MSCs を誘導した (MSC M+群、n=4)。対照として、注入したのみの群 (MSC M-群、n=4)、PBS (phosphate-buffered saline) 20 ml を注入した群 (control 群、n=4) を設定した。

・ 画像評価と組織学的評価による膀胱再生メカニズムの検証

膀胱損傷 14 日目に MRI (4.7T) を使用し、画像による評価を施行した。プロトン強調画像と T2 star を用いて 3 mm slice で撮影した。評価方法は、sagittal にて再生組織の最大面積を測定し、3 群間で比較した。

撮影後に sacrifice した後に、膀胱の再生組織を肉眼的に観察したのちに、10%ホルムアルデヒドで固定、4 μm slice でプレパラートを作成した。HE 染色および SMA 染色による免疫組織学的診断により評価した。

Real-time PCR 法を用いて、再生組織における mRNA の発現を評価した。FGF1、FGF2、IL2 を測定し、3 群間で比較した。

4. 研究成果

・ 画像評価

膀胱再生組織の面積を MRI により評価し、MSC M+群 $222.9 \pm 61.4 \text{ mm}^2$ 、MSC M-群 $112.1 \pm 50.2 \text{ mm}^2$ 、control 群 $43.9 \pm 44.4 \text{ mm}^2$ で、MSC M+群は MSC M-群 ($p = 0.0433$)、control 群 ($p = 0.0202$) と比較して有意に組織再生を認めた。

・ 組織学的評価

膀胱再生組織の肉眼所見では、MSC M+群、MSC M-群ともに膀胱損傷部位に壊死組織に覆われた再生組織を認めた。なお、MSC M+群では、より広範囲に再生組織を認めていた。

control 群では膀胱損傷部位に潰瘍および浮腫を認めたのみであった。
HE 染色および SMA 染色による組織学的評価において、MSC M+群および MSC M-群は壊死組織の下に α SMA 染色で示される筋線維組織を認めた他に、豊富な血管再生が認められた。control 群では膀胱損傷部位に尿路上皮を認めず、壊死組織が覆われていたのみで、筋線維組織の再生は認めなかった。

HE 染色で示された再生組織の面積は、MSC M+群 $24.7 \pm 6.23 \text{ mm}^2$ 、MSC M-群 $10.8 \pm 6.70 \text{ mm}^2$ 、control 群 $4.76 \pm 3.67 \text{ mm}^2$ で、MSC M+群は MSC M-群 ($p = 0.0433$)、control 群 ($p = 0.0209$) と比較して有意に組織再生を認めた。

SMA 染色で示され血管数は、MSC M+群 23.3 ± 4.21 、MSC M-群 21.8 ± 6.30 、control 群 10 ± 7.87 で、MSC M+群は MSC M-群 ($p = 0.5127$)、control 群 ($p = 1840$) と比較して血管数に有意差を認めなかった。

・再生組織における mRNA の発現

再生組織における FGF-1 は、MSC M+群 0.75 ± 0.66 、MSC M-群 0.94 ± 0.61 、control 群 1.00 ± 0.47 で、FGF-2 は、MSC M+群 0.49 ± 0.58 、MSC M-群 1.11 ± 0.85 、control 群 1.00 ± 0.66 で、IL-2 は、MSC M+群 0.97 ± 0.52 、MSC M-群 2.35 ± 0.66 、control 群 1.00 ± 0.69 で、いずれも 3 群間に有意差を認めなかった。

以上より、磁気ターゲティングを用いた磁性体化骨髄間葉系幹細胞による組織再生は、膀胱組織損傷に対して有効な治療となりうる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Sadahide K, Teishima J, Inoue S, Tamura T, Kamei N, Adachi N, Matsubara A. Endoscopic repair of the urinary bladder with magnetically labeled mesenchymal stem cells: Preliminary report. Regen Ther. 2018; 10: 46-53. doi: 10.1016/j.reth.2018.10.007. (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. T. Hayashi, K. Sentani, K Goto, H.Z. Oo, H. Abdi, K. Mutaguchi, S. Shinmei, S. Inoue, J. Teishima, W. Yasui, P.C. Black, A. Matsubara. Immunohistochemical classification using urothelial differentiation markers can stratify prognosis in patients with muscle invasive bladder cancer. 2018 AUA Annual Meeting, 2018.5.21, San Francisco

2. S. Inoue. Lecture; Where is position of Li-ESWT in guide4line? 16th Asia Pacific Society for Sexual Medicine / 12th Japan-Asian conference on Men's Health and Aging. 2017.9.13, Chiang Mai(Tailand)

3. K. Iwane, S. Inoue, H. Abdi, T. Hayashi, J. Teishima, A. Matsubara. Evaluation of the sexual function of sildenafil citrate on the patients with benign prostatic hyperplasia related lower urinary tract symptoms. 16th Asia Pacific Society for Sexual Medicine / 12th Japan-Asian conference on Men's Health and Aging. 2017.9.13, Chiang Mai(Tailand)

4. 定秀孝介、田坂亮、岩根亨輔、西田健介、栗村嘉昌、福岡憲一郎、藤井慎介、上野剛志、北野弘之、神明俊輔、稗田圭介、井上省吾、林哲太郎、亭島 淳、松原昭郎. 磁気ターゲティングを用いた磁性体化骨髄間葉系幹細胞移植による膀胱再生の試み. 第 14 回泌尿器科再建再生研究会. 2017.6.3, 東京

5. 神明俊輔、林哲太郎、福岡憲一郎、藤井慎介、仙谷和弘、亭島 淳、沖 一仁、安井 弥、松原昭郎. 尿路上皮癌における化学療法耐性獲得への P38 MAPK の役割. 第 26 回泌尿器科分子細胞研究会, 2017.3.11, 大分市

6. 井上省吾、村田大城、定秀孝介、藤井慎介、上田晃嗣、小島浩平、北野弘之、岩本秀雄、神明俊輔、永松弘孝、稗田圭介、正路晃一、林哲太郎、亭島 淳、松原昭郎. 前立腺全摘除術が及ぼす下部尿路症状 (LUTS) の影響 -ロボット支援手術、腹腔鏡手術、開放手術における各術式間の縦断的検討から-. 第 104 回日本泌尿器科学会総会, 2016.4.25, 仙台市

7. 定秀孝介、亭島 淳、井上省吾、藤井慎介、北野弘之、神明俊輔、稗田圭介、林哲太郎、松原昭郎. 根治的前立腺全摘除術の術後血尿における縫合糸の影響. 第 13 回泌尿器科再建再生研究会. 2016.6.18, 米子市

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/urology/11-kenkyu.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松原 昭郎
ローマ字氏名：Matsubara Akio
所属研究機関名：広島大学
部局名：医歯薬保健学研究科(医)
職名：教授
研究者番号(8桁)：10239064

研究分担者氏名：亭島 淳
ローマ字氏名：Teishima Jun
所属研究機関名：広島大学
部局名：医歯薬保健学研究科(医)
職名：准教授
研究者番号(8桁)：20397962

研究分担者氏名：林 哲太郎
ローマ字氏名：Hayashi Tetsutaro
所属研究機関名：広島大学
部局名：医歯薬保健学研究科(医)
職名：助教
研究者番号(8桁)：60612835

研究分担者氏名：神明 俊輔
ローマ字氏名：Shinmei Shunsuke
所属研究機関名：広島大学
部局名：病院(医)
職名：助教
研究者番号(8桁)：70749963

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。