

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11181

研究課題名(和文) バイオ3Dプリンターを用いた脂肪幹細胞含有自己組織化尿道の作成

研究課題名(英文) Human urethra-engineered with human adipose stem cells with maturation by rearrangement of cells for self-organization - Newly developed scaffold-free three-dimensional bio-printer

研究代表者

山本 徳則 (Tokunori, Yamamoto)

名古屋大学・医学系研究科・特任教授

研究者番号：20182636

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)：ヒト脂肪幹細胞を用いて3Dバイオプリンターを用いて尿道様構造物作成と移植に成功した。ヌードラットを対象に、尿道を移植する尿道様構造物と同じ長さの尿道を切除後、その部分に尿道様構造物を移植した。その構造部に逆行性に色素を注入して、吻合不全がないことと腹腔内と交通していないことも確認した。また、HE染色で尿道吻合部を中心に染色し、サブマクロでも移植後の尿同様構造物組織の再生状態を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎で生成された尿は腎盂から尿管を経て膀胱に蓄尿され、さらに尿道を経て体外に排尿される。この経路を尿路と言う。健全な膀胱の機能は1) 蓄尿機能(普段は尿を失禁することなく安定して貯めることができる。)と2) 排尿機能(充満時には尿意に基づいて自分の意志で残尿なく排出することができる。)がともに両立することが求められる。尿道は排尿機能の体外への排出の重要な役割を果たす。下部尿路再建術において十分再建ができないような症例(先天性尿道下裂(出生1名/300名)、難治性尿道狭窄、尿道膀胱全摘術後)の治療に対してこの技術は有効で社会的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：We developed newly developed scaffold-free three-dimensional bio-printer by Nakayama K(JP 2009-509335). Cell aggregates by human adipose stem cells (h-ASCs) called "spheroids" are conditioned into three-dimensional macroscopic structures without the need for any scaffold. By adjusting needles length and quantity researchers could change the thickness of urethra from h-ASC(step1:loading, 2:3D printing, 3: maturation by rearrangement of cells for self-organization, 3: shear stress). The histologic staining showed that two layers of cells developed in the h-urethra with tension force for the nude rat and extension with dilation. The urethra showed two layer and human nuclei pathologically. The supranent of urethra revealed 20 cytokines with regeneration. We succeeded production of an urethra-like structure made of h-ASCs using 3D bio printer and the transplant of it to a nude rat.

研究分野：医学分野

キーワード：3Dバイオプリンター 集塊 脂肪幹細胞 培養 尿道再建

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非培養脂肪幹細胞を用いた損傷した括約筋実験小動物モデルそして大動物モデルへの実験を行い、臨床での腹圧性尿失禁症例への後ろ向き試験で有用性安全性を明らかにした。現在前向き多施設試験とした男性腹圧性尿失禁に対する非培養自己ヒト皮下脂肪組織由来再生(幹)細胞の傍尿道注入治療の有用性及び安全性を検討する多施設共同非盲検非対照試験 (UMINCTR (UMIN000017901, ClinicalTrials.gov (NCT02529865)) の 45 症例の割付が終了し尿失禁量が 60%以下に減少する症例が 60%以上であり有効性を確認している、すなわち我々は脂肪幹細胞の臨床再生技術を有している。またバイオ 3D バイオプリンターでの管腔臓器再生を行う技術が報告されている。よって、この脂肪幹細胞再生技術を用いた 3D バイオプリンター技術での管腔臓器再生を行う背景は十分有している。

2. 研究の目的

この脂肪幹細胞実験そして臨床効用の TR 研究の経験技術を応用して今回の 3D バイオプリンターで脂肪幹細胞集塊培養を行い尿道様構造物作成後移植を行い、泌尿器科臓器構築を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

このヒト脂肪幹細胞は間葉系の細胞マーカを免疫染色で検査する。脂肪幹細胞を集塊培養してその集塊を針山に串刺しすることによって自己組織化を誘導し集塊と集塊との間隙を組織で埋めて管腔構造を作成し細胞構築を電子顕微鏡と病理組織で評価した。作成した尿道用構造物の培養上清液の 38 項目のサイトカインを測定した。ヒト脂肪幹細胞幹細胞で作成した尿道用構造物をヌードラットに移植を行い吻合の状態、病理組織を評価した。

4. 研究成果

Introduction: The current tissue engineering approaches typically use matrices such as animal collagen or hydro gel as scaffold material. However, as these materials are foreign for human bodies, the use of scaffold raises a concern about safety such as toxicity, rejection response, and unknown infection. In addition, these materials sometimes reduce effectiveness of tissue regeneration by limiting cellular interactions and oxygen/nutrient diffusion. We developed newly developed scaffold-free three-dimensional bio-printer by Nakayama K(JP 2009-509335).

Methods: Using our proprietary technologies, cell aggregates(diameter:0.5mm) by human mesenchymal stem(h-MSC) called "spheroids" are conditioned into three-dimensional macroscopic structures without the need for any scaffold. By adjusting needles(10 x0.1 mm) length and quantity researchers could change the thickness of urethra from h-MSC(step1:loading, 2:3D printing,3: maturation by rearrangement of cells for self-organization, 3: shear stress). The human urethra were transplanted to nude rats.

Results: The histologic staining showed that two layers of cells developed in the h-urethra(Internal diameter:0.7X0.7X4mm) with tension force(68.1mN)for the X-SCID rat(132.4mN) and extension of long axis from 4 to 6cm(with dilation(12Kpaskal,20%). The urethra showed two layer and human nuclei pathologically. The superelement of urethra revealed 20 cytokines. The retrograde insertion of dye revealed no sign of stricture. The human urethra were transplanted to nude rat(n=6) .

Conclusion: We have successfully printed human urethra by cell aggregates of h-MSC in 10 days time using this needle array system and transplanted to nude rats by newly developed scaffold-free 3D bio fabrication system. This technology will enable researchers to develop a wide range of cell-products for restoring tissues and urological organs from living cells safely and efficiently.

ヒト脂肪幹細胞を用いて3Dバイオプリンターを用いて尿道様構造物作成と移植に成功した。今年はその尿道用構造物の培養上清液の38項目のサイトカインを測定し、HGF、VEGFを含む多彩な再生サイトカインを分泌することを確認した。自己組織化の現象解析として走査電顕で評価をしたところ、スフェロイドが癒合して管腔構造を形成していることを確認した。また、HE染色で管腔構造断面は二層性の細胞配列になっていた。ヒト脂肪幹細胞をシャーレーで培養後、集塊培養してその集塊を剣山に串刺しにすることによって、自己組織化を誘導した。集塊と集塊との間隔を組織で埋めて管腔構造を作る経時的な構造と変化を走査電顕で明らかにし、ヒト脂肪幹細胞を用いてまた3Dバイオプリンターを用いて尿道様構造物を作成した。ヌードラット(n=6)を対象に、尿道を移植する尿道様構造物と同じ長さの尿道を切除後、その部分に尿道様構造物を移植した。移植後2週間で評価したところ、50%(3/6)が生存した。その構造部に逆行性に色素を注入して、吻合不全がないことと腹腔内と交通していないことも確認した。また、HE染色で尿道吻合部を中心に染色し、サブマクロでも移植後の尿同様構造物組織の再生状態を確認した。その構造物から脂肪幹細胞由来の抗炎症性、血管新生、間質組織再生性、接着性、創傷治癒に関連する多彩な再生サイトカインを臓器再生の一つに泌尿器科領域が適していることを示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wang C, Oda M, Hayashi Y, Yoshino Y, Yamamoto T, Frangi AF, Mori K.	4. 巻 1 (60)
2. 論文標題 Tensor-cut: A tensor-based graph-cut blood vessel segmentation method and its application to renal artery segmentation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Med Image Anal.	6. 最初と最後の頁 101623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jptra.2019.01.003. eCollection	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wang C, Roth HR, Kitasaka T, Oda M, Hayashi Y, Yoshino Y, Yamamoto T, Sassa N, Goto M, Mori K	4. 巻 19 (77)
2. 論文標題 Precise estimation of renal vascular dominant regions using spatially aware fully convolutional networks, tensor-cut and Voronoi diagrams.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Comput Med Imaging Graph	6. 最初と最後の頁 101642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.compmedimag.2019.101642	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toriyama K, Gotoh M, Ebisawa K, Nakamura Y, Kamei Y, Yagi S, Yamamoto T, Takanari K	4. 巻 12 (19)
2. 論文標題 Liposuction for autologous adipose-derived regenerative cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Results of donor-site complications in male stress urinary incontinence JPRAS Open	6. 最初と最後の頁 121-124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jptra.2019.01.003. eCollection	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato M, Hirakawa A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Ishida R, Kamihira O, Kimura T, Majima T, Ishida S, Funahashi Y, Sassa N, Fujita T, Matsukawa Y, Yamamoto T, Hattori R, Gotoh M, Tsuzuki T	4. 巻 79 (10)
2. 論文標題 The influence of the presence of intraductal carcinoma of the prostate on the grade group system's prognostic performance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Prostate	6. 最初と最後の頁 1065-1070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pros.23818. Epub	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Majima T, Funahashi Y, Matsukawa Y, Inoue S, Sassa N, Kato M, Yamamoto T, Gotoh M	4. 巻 38(5)
2. 論文標題 Investigation of the relationship between bladder function and sarcopenia using pressure flow studies in elderly male patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurourology and Urodynamics	6. 最初と最後の頁 1417-1422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/nau.24001. Epub	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Majimat T, Matskawa Y, Funahashi Y, Takai S, Kato M, Yamamoto T, Gotoh M	4. 巻 26(6)
2. 論文標題 Urodynamic analysis of the sequential impact of diabetes mellitus on bladder function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Urol	6. 最初と最後の頁 618-622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.13935. Epub	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsukawa Y, Takai S, Majima T, Funahashi Y, Sassa N, Kato M, Yamamoto T, Gotoh M	4. 巻 -
2. 論文標題 Comparison in the efficacy of fesoterodine or mirabegron add-on therapy to silodosin for patients with benign prostatic hyperplasia complicated by overactive bladder	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 A randomized, prospective trial using urodynamic studies.Neurourol Urodyn	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/nau.23935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mastukawa Y, Kanada Y Takai S, Inoue S, Majima, T, Funahashi, Y, Kato M; Yamamoto T, Gotoh, M	4. 巻 16
2. 論文標題 Pre-treatment serum testosterone level can be a useful factor to predict the improvement in bladder outlet obstruction by tadalafil for male patients with lower urinary tract symptoms induced by benign prostatic obstruction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Aging Male	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13685538.2018.1563777	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gotoh M, Yamamoto T, Shimizu S, Mastukawa Y; Kato, Majima T, Takai, S, Funahashi Y, Toriyama, K	4. 巻 26(3)
2. 論文標題 Long-term efficacy and safety of regenerative treatment for male stress urinary incontinence using autologous adipose-derived regenerative cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Urol	6. 最初と最後の頁 400-405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirose Y, Funahashi Y, Matsukawa Y, Majima T, Yamaguchi M, Kawabata S, Gotoh M, Yamamoto T	4. 巻 20
2. 論文標題 Comparison of trophic factors secreted from human adipose-derived stromal vascular fraction with those from adipose-derived stromal/stem cells in the same individuals	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cytotherapy	6. 最初と最後の頁 589-591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.jcyt.2018.02.001. [Epub ahead of print]	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今村 哲也 (Imamura Tetsuya) (00467143)	信州大学・学術研究院医学系・助教 (13601)	
研究協力者	中山 功一 (Nakayama Koichi)		