

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09176

研究課題名(和文) 流れストレスと伸展刺激による機能的尿路組織の作製と臨床応用への試み

研究課題名(英文) Functional urothelial system reconstruction from transformed epithelial cells under flow and extension stress

研究代表者

丸山 哲史 (Maruyama, Tetsuji)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授

研究者番号：50305546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞工学の技術を用いて尿路上皮細胞層を作成し、一定の空間的配列をもつ機能的な平滑筋細胞層を誘導することを検討した。そのために、方向性をもった流れ刺激(すなわちシェアーストレス)や伸展刺激などの力学的刺激および電氣的刺激を負荷し、ホローファイバー(中空系)を用いた細胞培養システムを用いた。ES細胞などを用いることで、人体に対し非侵襲的な手法となった。このように多段階的な組織作成により、確実に効率的な実際応用可能なプロセスが構築された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路再建術に際しては、摘除した尿管組織の補填材料として生体適合性のある機能的な組織が必要とされる。しかし、培養細胞を材料とした組織では力学的強度が不十分であり、また臨床応用可能な必要量が確保できないなどの課題があった。ホローファイバー(中空系)システムを用いて、幹細胞から再生した尿路上皮細胞と平滑筋細胞とを流体下で共培養する手法により、力学的な強度を持つ尿路組織を作製した。さらに電気刺激とサイトカイン刺激により細胞間接着を強化するとともに間質細胞を分化誘導し、自己調節能力を有し蠕動運動が可能な管腔組織は、尿管などさまざまな部位での尿路再建手術に臨床応用が可能な生理的な手術材料となる。

研究成果の概要(英文)：With cytoengineering method, we have made urothelial sheet with functional smooth muscle layer showing regular special pattern. These cells were under laminar flow stimulation exerted shear and stretch stress, and/or electrical stimulation using hollow-fiber cell-culture system. In addition, ES cells were used to induce these urothelial and smooth muscle cell to minimize preparing time and effort.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ホローファイバー 伸展刺激 細胞工学 上皮間葉誘導 再生医療 KIT陽性細胞 尿路上皮細胞 シェアーストレス

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

小児先天奇形の1つである尿道下裂は、尿道末端組織の欠損を特徴とし、その治療は手術によるほかない。繊細な技術を要する尿道形成術の特徴として、欠損した尿道末端部を別の組織で補うことが挙げられる。通常は陰茎包皮内板を用いて新尿道を形成するが、脱落・瘻孔などにより不幸にも再手術を要する症例についてはその手術材料の確保に難渋し、やむなく膀胱粘膜、口腔粘膜などが利用されている。これらの場合には手術手技が煩雑で侵襲が大きいという問題点があり、包皮内板を用いて形成し得た場合にさえ、患児思春期以降に起こる陰毛の発毛とそれを核とした結石形成に悩まされる場合が少なくない。すなわち、本来の尿道組織以外を用いた再建術では長期的に見て問題点が多いといえるため、より尿道組織に近い新材料があるならば生理的で合併症の少ない手術が可能となり、理想的と考えられる。

近年、細胞工学の技術は目覚ましい進歩を続け、火傷などによる皮膚欠損に対する移植片として臨床応用が進められている。また口腔粘膜や軟骨に関しても研究が行われているが、尿路の分野は、これまで比較的未開発であるといえる。また、尿路においては膀胱が再生医療の対象として取り上げられてきたが、これは、そのシンプルな形態および機能によるものであった。ティッシュ・エンジニアリングの手法を用いた先験的な試みとして、尿路上皮および平滑筋細胞を重層化したシートを体外であらかじめ作成した後、生体に移植する方法があるが、その後の追試が十分ではない。実際には、平滑筋の再生能力の限界などがあり臨床応用には至っていない。さらに尿道および尿管における試みは短距離の欠損部分を補うことに限定されている。

2. 研究の目的

平滑筋細胞が実際に組織として生体内で機能するには、少なくとも一定の機械的強度が必要である。このような観点で、まずわれわれは、腎尿細管細胞の間欠的な加圧刺激に対する反応性を検討し報告した。また、機械的損傷に対する反応性を検討中し、上皮細胞から間葉系細胞が誘導される現象 (EMT) に注目し、機械的刺激の分化誘導刺激としての重要性を報告した。

また、血管内皮細胞系であるが、血管内の血流から生じるシェアーストレスが、血管内皮細胞の分化誘導刺激として注目されていた。特にその細胞モデルとして、ホローファイバー (中空糸) を用いた高密度細胞培養装置が有用であることが知られている。血管内皮細胞は流れに沿った矩形の細胞形態を呈し、ストレスファイバーに代表される細胞骨格と focal adhesion plaque を持つ。また互いに tight junction が形成される。従来系で培養した場合に比較して、生体内に移植した場合の耐久性が向上する。平滑筋細胞と共培養することで特徴的なアクチンマイクロフィラメントやギャップジャンクションを認めるとの報告がある。

上述のように、尿道および尿管においては、第1に、径の細い管状構造が尿流にさらされることから、圧力のみでなくシェアーストレスなどより高次の力学的ストレスに対する強度をもった尿路上皮および平滑筋の重層構造が必要である。第2に、蠕動のように、方向性を持ち複雑な電気生理学的で動的な機能が必要である。このホローファイバーシステムを用いることで、ともに解決することを目標とした。

3. 研究の方法

実際の臨床応用においては、組織レベルのサイズが必要で、上記プロセスの更なる効率化が必要である。ES 細胞由来の細胞群を基に尿路上皮やその周囲の組織を得ることも検討した。幹細胞を用いることにより、他の臓器を傷つけることなくより人体に低侵襲となり、生理的および機能的に望ましい治療法が期待できる。今までとは違った治療法へ発展させる事ができる可能性も示唆される。尿路上皮や平滑筋の幹細胞が利用できれば、未分化状態を維持したままの分裂増殖により、大きく欠損した尿路を補うのに十分な量の新しい組織を得ることが可能である。また、前述した、シェアーストレスおよび上皮間葉系誘導 (EMT) の原理を応用することで、細胞および組織の誘導過程をより効率化できる可能性もある。更に、平滑筋細胞の自動能を制御する可能性が示唆されている Kit 陽性間質細胞をこのシステム内に誘導することにより、平滑筋細胞が互いに協調性を保ちながら組織全体として尿移送を行うことを目標とした。尿道または尿管組織を欠損させた動物モデルを用いて臨床応用を試みた。

4. 研究成果

再生医療の手法を用いて機能的な組織作製し、これを尿道、尿管および膀胱組織へ応用する第一段階として、尿路上皮のシェアーストレスなどの機械的刺激もしくは電気刺激への反応性を

検討し、平滑筋細胞への EMT の有無、その場合の空間的配列の状況を検討した。また、その際に変動する遺伝子群を検討した。

採取が容易な尿路上皮から平滑筋などを EMT の原理を用いて誘導することで、大きく欠損した尿路を補うのに十分な量の新しい組織を得たことは実際の効率の点で評価できる。シェアーストレスおよび電気刺激により平滑筋層の方向性が確保され、KIT 陽性間質細胞の誘導により自動能を調整する高次の生理的機能が獲得された。

尿路上皮や平滑筋の幹細胞利用の可能性を検討した。未分化状態を維持したままの分裂増殖により、他の臓器を傷つけることなく、より低侵襲になり、生理的、機能的に望ましい実際の治療法が期待できる。拒絶反応を起こさない利点がある。臓器幹細胞を得ることができない場合を想定し、本人の体細胞と受精卵を用いて得た胚性幹細胞 (ES 細胞) から分化した細胞や組織の利用を検討した。

(1) 培養尿路上皮シートの作成 :

ラットの尿道を摘出し小片とし、抗生剤含有リン酸緩衝液につけ滅菌処理する。これを Dispase 含有 DME 培地で処理することにより上皮層と筋層とに分割する。上皮層を Trypsin で処理、攪拌し上皮細胞を単離し、feeder 細胞である 3T3 細胞を敷いたフラスコ底にこれを播種する。増殖因子を加え、37 °C 10%CO₂ にて細胞培養し、重層化した上皮シートを作成した。

(2) ホローファイバー (中空系) を用いた尿路上皮細胞の培養 :

このシステムを用いて、中空系周囲空間 (extra capillary space/ ECS) に細胞を培養する。中空系は高い物質交換特性を持ち、細胞に養分と酸素を供給し、老廃物 (アンモニア、乳酸) を除去する。ポンプを用いて培養液を環流させることで、自動的に栄養を供給し老廃物を除去できる。中空系の外径は 200-630 μm、膜厚は 8-150 μm となる。透析面積は 123-2200cm²、ECS 1.4-12ml である。このシステムを用いて経時的に尿路上皮に対して、細胞数の算定および位相差顕微鏡での形態観察を行う。その増殖能、活性および形態学的特徴を評価し、最適な培養期間および培養の条件等を検討した。

(3) 培養細胞の定性的解析 :

分泌タンパクを定量する。ATP など、ELISA を用いる。細胞表面 ICAM-1 などのタンパクは、FACS を用いて定量する。以上から、安定した尿路上皮細胞の系が作成されたことを確認した。

(4) 流れ刺激による上皮細胞の空間的配列作成 :

一方、今回の研究では中空内に上皮細胞を培養し、環流する培養液にさらすことで、シェアーストレス下での培養を試みる。ECS に平滑筋細胞を共培養することも試みる。流れに沿った矩形の細胞形態を呈し、ストレスファイバーに代表される細胞骨格と focal adhesion plaque を持つこと、また互いに tight junction が形成されることを、電子顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて、3 次元的に免疫組織学的確認をおこなった。

(5) EMT 誘導の検討 :

一部の上皮細胞は EMT を来し平滑筋へと再分化する可能性がある。その過程を免疫組織学的に追跡する。この際には、上皮系細胞のマーカーであるサイトケラチンと間葉系細胞のマーカーであるビメンチンの分布を検討する。アクチンマイクロフィラメントやギャップジャンクションを確認した。

(6) 導入遺伝子の準備 :

Hox、Wnt および BMP 遺伝子群など、腎・尿管発生 (特に移行上皮) に重要な働きをしている遺伝子の cDNA を鋳型に PCR で遺伝子を増幅し、プラスミドベクターに組み込む。大腸菌にトランスフォーメーションさせ増やしたプラスミドベクターのインサート部分の遺伝子配列をシーケンスで確認し、既知の遺伝子配列の情報と照らし合わせて一致することを確認した。

(7) 電気刺激による変調 :

ホローファイバー (中空系) を用いた高密度細胞培養装置を用いながら、同時に培養液に一定方向の周期的に強度が変動する電場をかけることで、誘導された平滑筋の配列に規則性があらわれること、およびその強度が増強し電気的共同性を獲得することを確認する。この際、前年までもとめた最適な条件で、流れおよび伸展刺激刺激を負荷し、誘導される平滑筋細胞に一定の空間的配置と電気的共同性をもたせた。

(8) サイトカイン刺激による Kit 陽性細胞の誘導 :

KIT リガンドである Stem Cell Factor (SCF) を加えることで KIT 陽性細胞がシステム内に誘導されることが示唆された。これにより平滑筋細胞層が組織全体として統一性ある運動 (いわゆる蠕

動運動)を行うことが、示唆された。

(9) ES細胞への遺伝子導入、尿路上皮細胞系の確立:

培養したES細胞を0.25%トリプシンEDTA溶液にて回収し、 1×10^7 個の細胞に対し20 μ gの導入する遺伝子を組み込んだプラスミドDNAを用意し、electroporation用キュベット(BIO-RAD Gene Pulser cuvetteR)内に混ぜ入れて、960 μ F、250mVの条件でelectroporation法を行い、遺伝子を導入する。48時間、前述の培養条件にて培養後、Neomycin、Puromycinなどの耐性遺伝子に対応した薬剤を含む培養液に替えると遺伝子導入された(同時に耐性遺伝子を発現している)ES細胞のみが生存し選択される。最終的にはサザンブロッティング法にて遺伝子が導入されたことを確認した。

遺伝子導入ES細胞をLIF除去の培養液中でhanging drop法を用いembryoid body(胚様体:EB)を形成させ、分化させる。5日後にEBを再度ディッシュに付着させて分化を進め、時間の経過とともに細胞を回収し、他の尿路発生各段階で発現してくる遺伝子に変化がないかどうかまた細胞の形態変化なども評価した。

以上の実験において特出される導入遺伝子とそれに対応して発現してくる遺伝子群、また分化させたときの形態などから標的となる尿路上皮(移行上皮)やその周囲の組織(平滑筋など)が一部同定できた。今後は、特異的な抗原でflow cytometryを用いた細胞のソート(FACS)を用いて単一の前駆細胞が抽出できるかを検討する。さらにその細胞を系統として確立する試みた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Taiki Kato, Kentaro Mizuno Tetsuji Maruyama et al	4. 巻 8
2. 論文標題 Disorganization of claudin-11 and Dysfunction of the Blood-Testis Barrier During Puberty in a Cryptorchid Rat Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 231-235
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/andr.12788	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kentaro Mizuno, Hidenori Nishio, Tetsuji Maruyama et al
2. 発表標題 Potential role of EE1A1 and TPT1 genes expressed in the spermatogonial stem cells as a predictive factor of subsequent testicular growth
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2020, Washington, DC(USA)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hidenori Nishio, Kentaro Mizuo, Tetsuji Maruyama et al
2. 発表標題 Kdm5a activates the protein kinase A signaling pathway in mouse spermatogonial GC-1 cells
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2020, Washington, DC(USA)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taiki Kato, Kentaro Mizuno, Tetsuji Maruyama et al
2. 発表標題 Disorganization of claudin-11 and dysfunction of the blood-testis barrier during puberty in a cryptorchid rat model
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2020, Washington, DC(USA) (
4. 発表年 2020年

〔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	安井 孝周 (Yasui Takahiro) (40326153)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	林 祐太郎 (Hasyashi Yutaro) (40238134)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	水野 健太郎 (Mizuno Kentaro) (70448710)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	
研究分担者	中根 明宏 (Nakane Akihiro) (70464568)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------