

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09719

研究課題名(和文) 生体内ダイレクト・リプログラミングによる膀胱平滑筋の再生

研究課題名(英文) Regeneration of bladder smooth muscle by in vivo direct reprogramming

研究代表者

松原 弘樹 (Matsubara, Hiroki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：00530362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱線維化(Bladder fibrosis)は神経の異常によって膀胱の収縮が慢性的に妨げられた状態が続くと起こる不可逆的な病態である。平滑筋細胞の萎縮や喪失、膀胱間質内の線維芽細胞から分泌される細胞外マトリックスの過剰な沈着により、膀胱収縮能と膀胱容量が低下し、頻尿や残尿増加をきたしうる病態であり、治療法は確立されていない。我々は最近、MYOCD遺伝子を導入すると、ヒトのfibroblasts(線維芽細胞)を平滑筋細胞に変えられる(ダイレクト・リプログラミング)ことを見出した。本研究ではこの技術を、bladder fibrosisに対する新しい再生医療の樹立につなげるための基礎実験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに我々の研究室では、遺伝子導入を用いて線維芽細胞を尿路上皮細胞に直接転換させる技術を開発し報告している。

本研究では線維芽細胞から平滑筋細胞を直接転換させることにより、現在根本的治療のない膀胱線維化患者に対して、新規治療法を提供することが可能となり、また膀胱再生医療に大きく寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Bladder fibrosis is an irreversible condition that occurs when bladder contraction is chronically disturbed by nerve abnormalities. Atrophy or loss of smooth muscle cells and excessive deposition of extracellular matrix secreted by fibroblasts in the cystic stroma can reduce bladder contractility and bladder capacity, leading to increased urinary frequency and residual urine. No treatment has been established. We recently found that transfection of the MYOCD gene can convert human fibroblasts into smooth muscle cells by direct reprogramming. In this study, we performed fundamental research to apply this technology to establish a new regenerative medicine for bladder fibrosis.

研究分野：泌尿器外科学

キーワード：膀胱平滑筋 direct reprogramming ダイレクトリプログラミング 膀胱線維化 再生医療

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

膀胱線維化 (Bladder fibrosis) は排尿時の病的な膀胱内圧上昇、脊髄損傷、放射線照射、先天性尿路奇形などが原因となり引き起こされる。平滑筋細胞の萎縮や喪失、膀胱間質内の fibroblasts から分泌される細胞外マトリックス (Extracellular matrix; ECM) の過剰な沈着により膀胱収縮能と膀胱容量が低下し、頻尿や残尿増加をきたす。最終的に排尿が不可能となり尿路感染症や腎後性腎不全をきたすため、バルンカテーテルの留置が必要となる。Bladder fibrosis に至る前段階、例えば初期の病的な膀胱内圧上昇に対しては、尿路閉塞を改善させる薬物療法 (前立腺肥大症に対する α -blocker 等) や手術療法 (前立腺肥大症に対する経尿道的切除術) によって症状の改善および bladder fibrosis の予防が可能である。しかし bladder fibrosis は不可逆的であり、現時点で根本的治療法はない。Bladder fibrosis への根治的療法としては、fibroblasts からの ECM 産生抑制、平滑筋の萎縮や喪失に対する平滑筋の再生などが考えられる。しかし前者は研究段階であり、膀胱平滑筋細胞の再生はこれまで報告されていない。

2. 研究の目的

我々の研究グループはダイレクト・リプログラミングにより種々の細胞種を作出することに成功しており、この技術で膀胱平滑筋を再生できないか検討した。ダイレクト・リプログラミングとは、ある細胞種を他の細胞種に、直接変える技術である。Fibroblasts などに特定の遺伝子を導入することで、神経細胞、肝細胞、心筋細胞など種々の細胞に変えられることが報告されてきた。さらに注目すべきは、マウス心筋梗塞部に直接遺伝子を注入して生体内で心筋細胞に転換させ (生体内ダイレクト・リプログラミング) 心機能を改善させた報告がある。

そこで我々は、Bladder fibrosis で増生した fibroblasts を直接平滑筋細胞へ転換させれば、膀胱収縮力と膀胱容量を改善できるのではないかと考えた。そして平滑筋のマスター因子の一つと言われる転写因子「MYOCD」の遺伝子を、ヒト fibroblasts に導入することで平滑筋様細胞への転換に成功している。

誘導した平滑筋細胞の詳細なキャラクターや機能は未解明であり、膀胱内に注入した場合にどの程度 bladder fibrosis を改善できるかはわかっていない。また in vivo で fibroblasts を平滑筋細胞へ転換出来るかについては、全く未解明である。今回の目的は、我々のダイレクト・リプログラミング法で誘導した平滑筋細胞をキャラクタライズするとともに、ex vivo 法と in vivo 法でマウスの bladder fibrosis の治療モデル実験を行って、将来的に根治療法としての有用性を検証する。

3. 研究の方法

MYOCD 遺伝子を導入した fibroblasts のキャラクタリゼーション

ヒト fibroblasts に MYOCD 遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターを感染させ、ex vivo で平滑筋細胞へ運命転換する。誘導平滑筋細胞の遺伝子発現を解析する。また種々の薬剤添加し、収縮機能を確認する。

Bladder fibrosis モデルマウス作成、誘導平滑筋細胞の移植 (ex vivo 法)

免疫不全マウス (NOG/SCID) の膀胱壁に冷却した金属棒をあてがい、凍結障害させた bladder fibrosis モデルマウスを作成する。誘導平滑筋細胞を膀胱へ移植する。マウスの排尿行動を解析し、膀胱機能、膀胱組織を評価する。

Bladder fibrosis モデルマウスへの in vivo direct reprogramming (in vivo 法)

Bladder fibrosis モデルマウスの膀胱壁の障害部位に、遺伝子を直接注入する。マウスの排尿行動を解析し膀胱機能の評価、組織評価を行う。

ベクターの種類の見直し

遺伝子をレトロウイルスベクター以外のウイルスベクターに組み込み、これらを用いた fibroblasts から平滑筋細胞への転換効率を計測する。

4. 研究成果

誘導平滑筋細胞のキャラクタリゼーション

ヒト fibroblasts に MYOCD 遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターを導入し、平滑筋細胞への誘導を行った。real-time RT-PCR で平滑筋細胞に特徴的なマーカーの上昇を確認することができた。収縮機能についてはヒト線維芽細胞、誘導平滑筋細胞にカルバコールを添加し、細

胞形態を経時的に確認したところ、誘導平滑筋細胞については変形しており、収縮能を得た可能性が示唆された。また、誘導平滑筋細胞は正常膀胱平滑筋に比べ、平滑筋細胞に特徴的なマーカーの上昇があまりにも強く、膀胱平滑筋とはキャラクターが異なると考えられた。

Bladder fibrosis モデルマウス作成、誘導平滑筋細胞の移植 (ex vivo 法)

膀胱を一部凍結した膀胱凍結モデルを作成し、凍結後 7 日後に全膀胱を取り出し、tRNA を抽出後、real-time RT-PCR を行い、対照群と比較して線維化マーカーが上昇していることを確認できた。また膀胱凍結モデルマウスは排尿回数が増加し 1 回排尿量が減少しており、排尿症状の増悪を認めた。また摘出膀胱は病理学的にも凍結部分で筋層が著明に萎縮しており、モデルとして適している可能性が示唆された。誘導平滑筋細胞の移植については上記の通り、膀胱平滑筋のキャラクターと異なっていたために、誘導方法の再検討を開始した。

Bladder fibrosis モデルマウスへの in vivo direct reprogramming (in vivo 法)

マウス膀胱へのウイルス導入効率を確認するために、GFP 遺伝子を組み込んだウイルスベクターをマウス膀胱へ直接注入し、数日後に膀胱を取り出した後、GFP 蛍光を顕微鏡にて確認したところ、膀胱の一部に GFP 蛍光を確認することができた。しかし感染したのは尿路上皮細胞層であり、粘膜下層や平滑筋層に感染はしておらず、注入の方法に検討が必要と考えられた。また、マウスの膀胱機能の評価、組織評価に関しては、遺伝子導入の方法が確立していないので、その再検討が必要であると考えられる。

ベクターの種類を検討

誘導効率については誘導平滑筋細胞のキャラクタライズが不十分であったため、誘導方法の確立後に再度確認する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	松田 修 (Mazda Osam) (00271164)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	岸田 綱郎 (Kishida Tsunao) (00370205)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	
研究分担者	浮村 理 (Ukimura Osamu) (70275220)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	

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