

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591873

研究課題名 (和文) 下部尿路閉塞膀胱における骨髄由来細胞の役割

研究課題名 (英文) Role of bone marrow stromal cells in the bladder with partial outlet obstruction

研究代表者：

三井 貴彦 (MITSUI TAKAHIKO)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：90421966

研究成果の概要 (和文)：放射線照射後の wild-type ラットに GFP 陽性ラットから採取した骨髄由来細胞を骨髄移植した GFP キメラモデルラットに対して下部尿路閉塞を作成し、慢性期の下部尿路閉塞膀胱における骨髄由来細胞の関与について免疫組織学的検討を行った。GFP 陽性細胞は下部尿路閉塞膀胱の筋層で平滑筋様 phenotype へ分化しているもの、膀胱上皮下層で myofibroblasts への分化を示唆するものや、尿路膀胱上皮へ分化しているものが観察された。

研究成果の概要 (英文)：Using rats with allogenic bone marrow transplants from transgenic rats expressing green fluorescent protein, we investigated the contributions of bone marrow derived stem cells (BMCs) to the regeneration of the bladder with partial bladder outlet obstruction (PBOO). BMCs were homed into the PBOO bladder, and those cells have potential to differentiate into the bladder tissue components such as the uroepithelium cells, the myofibroblast cells, and smooth muscle cells in the bladder with PBOO.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：骨髄由来細胞、下部尿路閉塞、下部尿路機能障害、膀胱上皮、GFP

1. 研究開始当初の背景

前立腺肥大症や神経因性膀胱に代表される下部尿路閉塞疾患において、膀胱に形態的および機能的異常が生じ、頻尿、尿意切迫感、尿失禁などの症状による生活の質の低下や、時に上部尿路障害や腎機能障害を生じるが、その機序のひとつとして虚血障害が関与していることが広く知られている。ケモカイン

のひとつである Stromal cell-derived factor 1 α (SDF1 α) は、組織に虚血が起こった際に誘導される Hypoxia inducible factor 1 α (HIF1 α) により刺激されるが、骨髄由来細胞に発現する CXCR4 レセプターと結合することにより虚血組織への骨髄由来細胞の遊走・接着を制御し、組織修復に関与することが知られている。実際に、我々は下部尿路

閉塞膀胱のリモデリング過程において、虚血 (HIF1 α) により誘導された SDF1 α が膀胱組織への骨髄由来細胞の遊走・接着に関与していることを明らかにしてきた。また、GFP で標識されたラット骨髄由来細胞を用いて、下部尿路閉塞モデルラットを作成後に骨髄由来細胞を静脈内投与すると、下部尿路閉塞膀胱に骨髄由来細胞の遊走・接着することも確認された。

しかし、下部尿路閉塞膀胱に遊走・接着した骨髄由来細胞の役割については、いまだ不明のままである。そこで、下部尿路閉塞膀胱における骨髄由来細胞の役割について検討を行った。

2. 研究の目的

下部尿路閉塞膀胱に遊走・接着した骨髄由来細胞について免疫組織学的手法を用いて膀胱組織への分化の状態を検討する。

3. 研究の方法

下部尿路閉塞 (PB00) 膀胱における SDF1 α mRNA 発現の検討

雌 SD ラットに PB00 作成後、1 日目、3 日目、7 日目、10 日目、14 日目に、それぞれ 5 匹のラットの膀胱を採取した。Sham 群では、偽手術を行った 1 日後に同様に膀胱を採取した (n=5)。定量的リアルタイム PCR 法を用いて SDF1 α について定量的 PCR を行った。

GFP キメララットの作成および PB00 または Sham の作成

骨髄移植を行う前日に 12G 放射線照射を行った Wild type 雌ラットに対し、GFP 陽性トランスジェニックラットの大腿骨および脛骨から採取した骨髄細胞を尾静脈から投与する。骨髄細胞投与後、6 週間たった段階で末梢血を採取し、血球成分が GFP 陽性であること共焦点蛍光顕微鏡で観察し、GFP 陽性の骨髄細胞が生着していることを確認した。

下部尿路閉塞 (PB00) 膀胱モデルの作成

GFP 陽性の骨髄細胞が生着していることを確認したラットに対し、麻酔下で下腹部の正中切開にて膀胱頸部から尿道を露出し近位尿道に直径 1.2mm の金属棒を置き、4-0 絹糸で縛ることによって作成した (PB00 群)。Sham 手術では、尿道を剥離するのみで、腹部創を閉創した (Sham 群)。

免疫組織学的検討

PB00 または Sham 手術後 6 週目に還流固定の後に膀胱を摘出して、HE 染色および蛍光抗体法による免疫組織学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) PB00 後の SDF-1 α の経時的変化

PB00 作成後 1 日目に Sham 群の 4.0 倍まで有意に増加していた (p<0.05)。SDF1 α -mRNA は B00 作成後 3 日目には減少したが、その後漸増し B00 作成後 14 日目には Sham 群の 2.5 倍に増加していた。(図 1)

(2) PB00 膀胱の組織学的変化

PB00 膀胱では、Sham 手術を行った膀胱に比べて膀胱上皮下の組織、膀胱平滑筋が厚くなっていた。(図 2) 前立腺肥大症など高度の下部尿路閉塞の際に見られる所見に矛盾しないものであり、下部尿路閉塞によって生じた変化と考えられた。

(3) PB00 膀胱への骨髄由来細胞の遊走

PB00 膀胱では、Sham 手術を行った膀胱に比べてより多くの GFP で標識された骨髄由来細胞が膀胱に遊走しており、その多くは膀胱上皮下層に存在していた。また、膀胱上皮内および膀胱筋層内にも骨髄由来細胞が存在した。(図 3)

(4) 骨髄由来細胞の膀胱組織への分化

Sham 手術を行った群では、膀胱組織内に骨髄由来細胞が見られるものの、膀胱組織に分化している細胞は見られなかった。

PB00 膀胱では基底膜 (抗 Laminin 抗体陽性、図 3 下段) を超えて膀胱上皮内に遊走している骨髄由来細胞が見られ、その一部は GFP に加えて膀胱上皮のマーカーである抗 AE1/AE3 抗体でも標識され骨髄由来細胞の膀胱上皮への分化が示唆された。(図 4、上段の矢印)

膀胱上皮下層に存在する骨髄由来細胞の一部は、myofibroblasts のマーカーである抗 Vimentin 抗体にも標識され、膀胱に遊走した骨髄由来細胞が排尿筋過活動に関与していると考えられている myofibroblasts に分化している可能性が示唆された。(図 5、矢印)

膀胱筋層に存在する骨髄由来細胞の多くは他の部位に比べて紡錘形をしており形態の変化を認めた。膀胱筋層に存在する骨髄由来細胞の一部は抗 Actin 抗体、抗 SMA 抗体にも標識され、これらの細胞は膀胱平滑筋細胞に分化していると考えられた。(図 6、矢印)

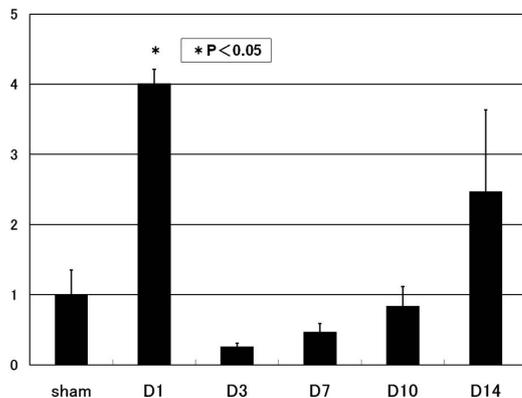
(5) 結果の考察

PB00 により骨髄由来細胞の遊走に関与している SDF-1 α が PB00 後 1 日目にピークを迎えるのに加えて、14 日目までではあるが経時的に再度 SDF-1 α が上昇していた。この SDF-1 α の上昇によってより多くの骨髄由来細胞が PB00 に遊走してきているものと考えられた。

膀胱に遊走してきた骨髄由来細胞の一部は、膀胱組織に分化していた。分化している細胞の数は PB00 後 6 週目の段階では多くはないため、PB00 膀胱における骨髄由来細胞の機能的な意味は未だ不明であるが、PB00 による膀胱の障害からの修復過程に関与しているものと考えられた。

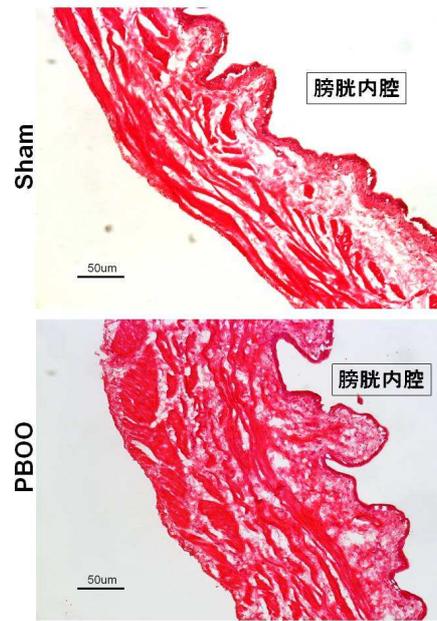
今回の研究期間の初期のころには、キメララットの作成段階で検討に値するキメララットの作成を十分に行うことができず、本来予定していた機能的実験まで行うことができなかった。また、膀胱炎モデルなど、他の病態モデルでの検討も行うことができなかった。これらの検討項目については、今後も引き続き研究を行っていく予定である。

図 1 : PB00 後の SDF-1 α の経時的变化



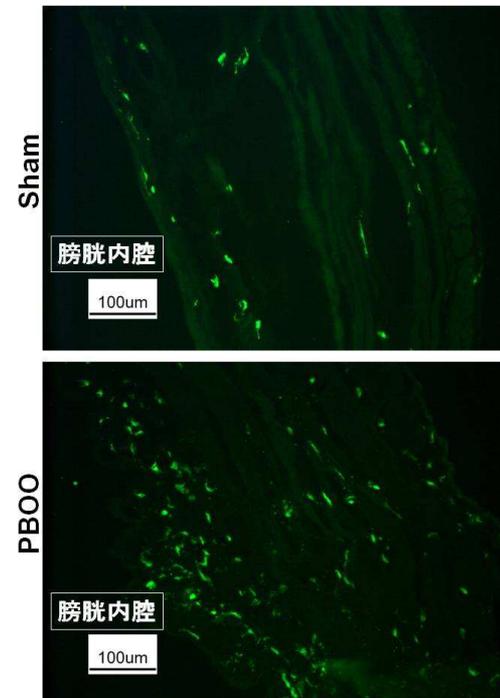
SDF1 α -mRNA は B00 作成後 3 日目には減少したが、その後 B00 作成後 14 日目まで漸増してした。

図 2 : PB00 後の膀胱組織の変化 (HE 染色)



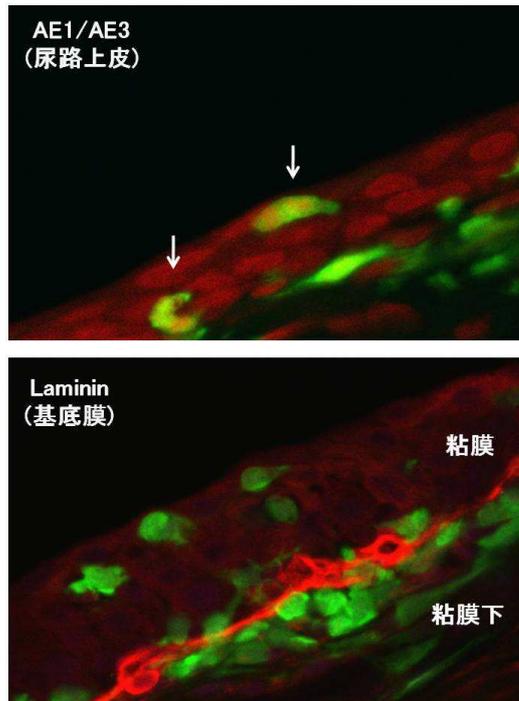
PB00 膀胱 (下段) では、Sham 手術を行った膀胱 (上段) に比べて膀胱上皮下の組織、膀胱平滑筋が厚くなっており、膀胱壁全体が肥厚していた。

図 3 骨髄由来細胞の膀胱への遊走



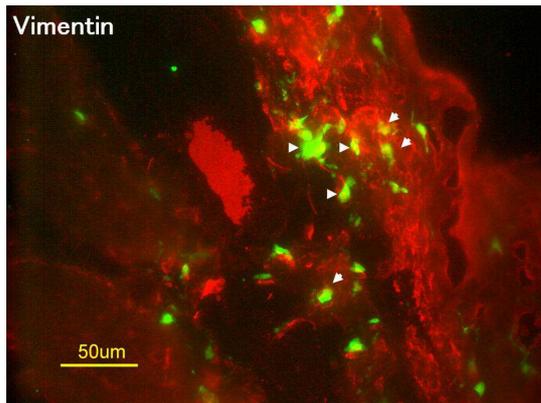
PB00 膀胱 (下段) では、Sham 手術を行った膀胱 (上段) に比べて、より多くの GFP で標識された骨髄由来細胞が膀胱に遊走していた。緑色に光っている細胞が骨髄由来細胞で、その多くは膀胱上皮下層に存在していた。

図4 膀胱上皮への骨髄由来細胞の遊走と分化



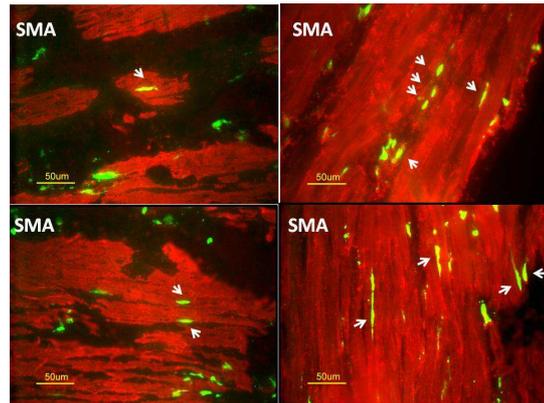
PB00膀胱では抗Laminin抗体陽性部分(下段)を超えて膀胱上皮内に遊走している骨髄由来細胞が見られた。その一部は膀胱上皮のマーカーである抗AE1/AE3抗体でも標識された(下段、矢印)。
Sham手術を行った群では、膀胱組織内に骨髄由来細胞が見られるものの、膀胱平滑筋膀胱上皮に分化している細胞は見られなかった。

図5 Myofibroblasts への分化



膀胱上皮下層に存在する骨髄由来細胞の一部は、myofibroblastsのマーカーである抗Vimentin抗体にも標識された(矢印)。
Sham手術を行った群では、膀胱組織内に骨髄由来細胞が見られるものの、myofibroblastsに分化している細胞は見られなかった。

図6 膀胱平滑筋への分化



膀胱筋層に存在する骨髄由来細胞の多くは他の部位に比べて紡錘形をしていた。膀胱筋層に存在する骨髄由来細胞の一部は抗Actin抗体、抗SMA抗体にも標識された(矢印)。
Sham手術を行った群では、膀胱組織内に骨髄由来細胞が見られるものの、膀胱平滑筋に分化している細胞は見られなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

①Sano H, Mitsui T. et al.: STROMAL CELL-DERIVED FACTOR 1 α INDUCES HOMING OF MARROW-DERIVED STROMAL CELLS TO THE PARTIALLY OBSTRUCTED RAT BLADDER, submitted. (査読: 有)

[学会発表] (計3件)

①Kanno Y, Mitsui T. et al.: CONTRIBUTION OF BONE MARROW DERIVED STROMAL CELLS TO THE REGENERATION OF THE BLADDER AFTER PARTIAL OUTLET OBSTRUCTION, AUA, 2011. 5. 14, Washington DC.

②Kanno Y, Mitsui T. et al.: CONTRIBUTION OF BONE MARROW DERIVED STROMAL CELLS TO THE REGENERATION OF THE BLADDER AFTER PARTIAL OUTLET OBSTRUCTION, EAU, 2011. 3. 18, Vienna.

③佐野 洋、三井貴彦、他: 慢性期下部尿路閉塞膀胱における骨髄由来細胞の関与について 日本排尿機能学会, 2008. 9. 12, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 貴彦 (MITSUI TAKAHIKO)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号: 90421966

(2)研究分担者

田中 博 (TANAKA HIROSHI)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：60344470

野々村 克也 (NONOMURA KATSUYA)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60113750

(3)連携研究者：なし