

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592075

研究課題名（和文） 機能的尿路再建におけるホローファイバー細胞培養システムの応用

研究課題名（英文） Functional urethral reconstruction using hollow-fiber cell-culture system

研究代表者

丸山 哲史 (MARUYAMA TETSUJI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：50305546

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。そのためには、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気的刺激が必要で、ホローファイバー（中空糸）を用いた細胞培養システムで効率化した。出発点として ES 細胞などを用いて非侵襲的な方法となった。このように多段階的に組織を作成することで、より確実に効率的な実際応用可能なプロセスを構築した。

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.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：シェアーストレス、伸展刺激、ホローファイバー、上皮間葉系誘導、平滑筋細胞、移行上皮細胞、再生医療、細胞工学

## 1. 研究開始当初の背景

私たちは、従来から幹細胞を用いた再生医療の技術および細胞工学の技術を相補的に利用し、尿路上皮および平滑筋組織を誘導した機能的な尿路組織を再生することを目標としてきた。一般的に尿路上皮は管空

組織内にあることから、内視鏡等を用いて採取しやすく再生能力も高い。一方、平滑筋細胞は組織の深部にあり採取しづらい。そこで、まず細胞工学の技術を用いて尿路上皮細胞層を作成し、第二段階として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中である。そのためには、方向性をもった流れ刺激、すなわちシェア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が必要で、ホローファイバー（中空糸）を用いた細胞培養システムで効率化できる可能性がある。一方、出発点として ES 細胞などを用いればより非侵襲的な方法となる。

このように多段階的に組織を作成することで、より確実に効率的な実際応用可能なプロセスを構築する。

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。

細胞工学の技術は近年国内でも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、既に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。

従来、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。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部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ようだ。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。尿道および尿管においては、半管状の欠損部分もしくは比較的短距離を補うことが試みられている。

## 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、まず私たちは、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、ともに解決できる可能性がある。

## 3. 研究の方法

実際の臨床応用においては、一定のサイズが必要で、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中である。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低侵襲になり、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。

#### 4. 研究成果

再生医療を尿道、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する。また、その際に変動する遺伝子群を検討する。以上の手法を用いて、より機能的な組織を効率的に作成することを目標とする。

本研究では、一部の生検組織もしくは体性幹細胞を基に豊富な手術材料を作成し、尿道下裂手術の豊富な実績に基づいて臨床的に応用することを目的とした。生理的で合併症が少ないだけでなく、手術手技の簡便、再手術などの難症例にも有用と考えられ、将来第一選択術式となる事も期待される。尿道下裂手術の豊富な実績に基づいて臨床的に応用すること、すなわち動物実験に加えて臨床的に尿道下裂手術の成績向上を最終目的としている。作成されたより生理的な手術材料は、尿管および膀胱などさまざま部位での尿路再建手術に臨床応用が可能である。

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。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には、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を利用することができる。このように ES 細胞を用いて各臓器を構成することは、特に尿路系での報告はなく、非常に先駆的で発展性の高い研究であると考えられる。

特に、シェアーストレスおよび EMT の原理などを用いて、尿路上皮から平滑筋などを誘導することで、機能面および実際の効率の点でも評価できる。

よって、それらの関連性を明らかにしつつ、尿路結石の形成機序をさらに解明し、ゲノム遺伝子レベルからの新規の診断方法、予防法、治療薬の開発を行っていく。

##### (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%CO<sub>2</sub>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 (中空糸) を用いた尿路上皮細胞の培養：

このシステムを用いて、中空糸周囲空間 (extra capillary space/ ECS) に細胞を培養する。中空糸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。中空糸の外径は 200-630 μm、膜厚は 8-150 μm となる。透析面積は 123-2200cm<sup>2</sup>、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) 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、 $1 \times 10^7$  個の細胞に対し 20  $\mu$ g の導入する遺伝子を組み込んであるプラスミド 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  $\mu$ 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ト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 を除いた培養液中で 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) が同定できた場合、その特異的な抗原で 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。

(8) 電気刺激による変調：

ホローファイバー (中空糸) 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した。この際、最適な条件で、流れおよび伸展刺激を負荷し、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。

## 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 10 件) (1~10、全て査読あり)

- ① Mizuno Kentaro, Kojima Yoshiyuki, Kurokawa Satoshi, Kamisawa Hideyuki, Kohri Kenjiro, Hayashi Yutaro: Altered expression and localization of estrogen receptors alpha and beta in the testes of a cryptorchid rat model. Urology, 77:251.e1-6, 2011
- ② Kato Toshiki, Kojima Yoshiyuki, Kamisawa Hideyuki, Takeuchi Mitsuru, Mizuno Kentaro, Sasaki Shigeru, Kohri Kenjiro, Hayashi Yutaro: Findings of fat-suppressed T2-weighted and diffusion-weighted magnetic resonance imaging in the diagnosis of non-palpable testes. BJU International, 107:290-294, 2011
- ③ Kojima Yoshiyuki, Sasaki Shoichi, Imura Makoto, Kubota Yasue, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Correlation between expression of  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtype mRNA and severity of lower urinary tract symptoms or bladder outlet obstruction in benign prostatic hyperplasia patients. BJU International, 107:438-442, 2011
- ④ Hayashi Yutaro, Mizuno Kentaro, Kojima Yoshiyuki, Moritoki Yoshinobu, Nishio Hidenori, Kato Toshiki, Kurokawa Satoshi, Kamisawa Hideyuki, Kohri Kenjiro: Characterization of the urethral plate and the underlying tissue defined by expression of collagen subtypes and microarchitecture in hypospadias. International Journal of Urology, 18:317-322, 2011
- ⑤ 丸山 哲史、黒川 覚史、永田 大介：腎盂形成術。臨床泌尿器科、65:449-455、2011
- ⑥ 丸山 哲史：臨床医学の展望 2011 泌尿器科学 尿路・性感染症。日本医事新報、4530:60-61、2011
- ⑦ Hayashi Yutaro, Kojima Yoshiyuki Mizuno Kentaro, Nakane Akihiro, Kato Toshiki, Kurokawa Satoshi, Kamisawa Hideyuki, Maruyama Tetsuji, Kohri

Kenjiro: Demonstration of postoperative effectiveness in ventral lengthening using a tunica vaginalis flap for severe penile curvature with hypospadias. Urology, 76:101-106, 2010

- ⑧ Mizuno Kentaro, Kojima Yoshiyuki, Kurokawa Satoshi, Maruyama Tetsuji, Sasaki Shoichi, Kohri Kenjiro, Hayashi Yutaro: Identification of differentially expressed genes in human cryptorchid testes using suppression subtractive hybridization. The Journal of Urology, 181:1330-1337, 2009
- ⑨ Nakane Akihiro, Kojima Yoshiyuki, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro, Masui Shinji, Nishinakamura Ryuichi: *Pax2* overexpression in embryoid bodies induced upregulation of *integrin  $\alpha 8$*  and *aquaporin-1*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 45:62-68, 2009
- ⑩ Yasui Takahiro, Itoh Yasunori, Maruyama Tetsuji, Akita Hidetoshi, Hashimoto Yoshihiro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: The single-knot method with Lapra-Ty clips is useful for training surgeons in vesicourethral anastomosis during laparoscopic radical prostatectomy. International Urology and Nephrology, 41:281-285, 2009

[学会発表] (計3件)

- ① Kojima Yoshiyuki, Hayashi Yutaro, Mizuno Kentaro, Umemoto Yukihiro, Sasaki Shoichi, Kohri Kenjiro: Role of transcription factor DAX-1 as a new functional marker of undifferentiated sertoli cells in azospermia patients. AUA 2011, 2011.5.14-19, Washington(U.S.A)
- ② Nakane Akihiro, Nishinakamura Ryoichi, Mizuno Kentaro, Kojima Yoshiyuki, Maruyama Tetsuji, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Pax2 overexpression in embryoid bodies induces upregulation of genes with retinoic acid and activin a involved in kidney development. AUA 2011, 2011.5.14-19, Washington (U.S.A)
- ③ Hayashi Yutaro, Mizuno Kentaro, Kojima

Yoshiyuki, Kohri Kenjiro: Evaluation of long-term functional outcome with uroflowmetry after proximal hypospadias repair:original Koyanagi repair vs modified Koyanagi repair. AUA 2011, 2011.5.14-19, Washington (U.S.A)

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丸山 哲史 (MARUYAMA TETSUJI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号: 50305546

### (2) 研究分担者

小島 祥敬 (KOJIMA YOSHIYUKI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 60305539

林 祐太郎 (HAYASHI YUTARO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 40238134

郡 健二郎 (KOHRI KENJIRO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 30122047