

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592435

研究課題名(和文)ホローファイバーを用いた自動能を有する間質細胞への上皮間葉誘導と機能的尿路の再建

研究課題名(英文)Functional urothelial-sheet reconstruction from transformed epithelial cells using hollow-fiber cell-culture system

研究代表者

丸山 哲史 (Maruyama, Tetsuji)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50305546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000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気的刺激を負荷し、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 外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：KIT陽性細胞 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 尿路上皮細胞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

我々は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、幹細胞より誘導した尿路上皮および平滑筋細胞から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内面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目標とした。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開発した。

このように多段階的に組織を作成することで、より確実で効率的な実際応用可能なプロセスを構築する。一方、材料としてES細胞などを用い、人体に非侵襲的な治療法を最終目標とした。

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^{*4}。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（中空系）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。

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した。

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、非常に発展性の高い研究であると考えられる。

EMT の原理などを用いて、尿路上皮から平滑筋などを効率的に誘導することで、実際の効率の点でも評価できる。

さらに、シェア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たこと、自動能を調整する KIT 陽性間質細胞の誘導により、高次の生理的機能が獲得された。

(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^oC、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、 1×10^7 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 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 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。

(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する。この際、前年までに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。

(9) 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 StemCellFactor (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。

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5件)

Mizuno Kentaro, Moritoki Yoshinobu Hayashi Yutarou, Moritoki Yoshinobu, Kamisawa Hideyuki, Nishio Hidenori, Kurokawa Satoshi, Ugawa Shinya, Kojima Yoshiyuki, Kohri Kenjiro: Expression Profiling of microRNA in Cryptorchid Testes: miR-15a Contributes to the Maintenance of Spermatogonial Stem Cells by Regulating Foxo1. The Journal of Urology, 191:1174-1180, 2014 (doi: 10.1016/j.juro.2013.10.137) (査読あり).

Mizuno Kentaro, Hayashi Yutarou, Kamisawa Hideyuki, Nishio Hidenori, Moritoki Yoshinobu, Kohri Kenjiro: Expression analysis of the pluripotency marker UTF-1 for determining the applicability of testis-sparing surgery for prepubertal testis tumors. Journal of Pediatric Surgery Case Report, 1:125-128, 2013 (doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.epsc.2013.04.004) (査読あり).

Hayashi Yutarou, Mizuno Kentaro, Moritoki Yoshinobu, Nakane Akihiro, Kato Toshiki, Kurokawa Satoshi, Kamisawa Hideyuki, Nishio Hidenori, Kohri Kenjiro, Kojima Yoshiyuki: Can spongioplasty prevent fistula formation and correct penile curvature in TIP urethroplasty for hypospadias? Pediatric Urology, 81: 1330-1335, 2013 (doi:10.1016/j.urology.2013.01.005) (査読あり).

Hayashi Yutarou, Kohri Kenjiro: Circumcision related to urinary tract infections, sexually transmitted infections, human immunodeficiency virus infections, and penile and cervical cancer. International Journal of Urology, 20:769-775, 2013 (doi: 10.1111/iju.12154) (査読あり).

Mizuno Kentaro, Kojima Yoshiyuki, Kamisawa Hideyuki, Moritoki Yoshinobu, Okada Atsushi, Kubota Yasue, Yasui Takahiro, Kohri Kenjiro, Hayashi Yutaro: Gene expression profile during testicular development in patients with SRY-negative 46,XX testicular disorder of sex development. Urology, 82:1453.e1-7, 2013 (doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2013.08.040) (査読あり)。

[学会発表](計5件)

Nishio Hidenori, Hayashi Yutaro, Moritoki Yoshinobu, Kamisawa Hideyuki, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Mizuno Kentaro, Maruyama Tetsuji, Kojima Yoshiyuki, Kohri Kenjiro: Distinctive changes in histone H3K4 modification mediated via Kdm5a expression in spermatogonial stem cells of cryptorchid testes. American Urological Association Annual Meeting 2014, 2014.5.16-21, Orlando(USA).

Nishio Hidenori, Hayashi Yutaro, Moritoki Yoshinobu, Kamisawa Hideyuki, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Mizuno Kentaro, Maruyama Tetsuji, Kojima Yoshiyuki, Kohri Kenjiro: Testosterone treatment prior to hypospadias surgery transiently upregulates VEGFA mediated via AR and causes. American Urological Association Annual Meeting 2014, 2014.5.16-21, Orland(USA).

Moritoki Yoshinobu, Kojima Yoshiyuki, Mizuno Kentaro, Shibata Yasuhiro, Kamisawa Hideyuki, Imura Makoto, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Kato Toshiki, Maruyama Tetsuji, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: The role of miR-135a via regulation of

Foxo1 gene expression in maintenance of spermatogonial stem cells. American Urological Association Annual Meeting 2013, 2013.5.4-8, San Diego(USA).

Nakane Akihiro, Hayashi Yutaro, Mizuno Kentaro, Kurokawa Satoshi, Kato Toshiki, Maruyama Tetsuji, Kohri Kenjiro: Urinary flow pattern associated with status of vesicoureteral reflux in children. American Urological Association Annual Meeting 2013, 2013.5.4-8, San Diego(USA).

Mizuno Kentaro, Kojima Yoshiyuki, Kamisawa Hideyuki, Kurokawa Satoshi, Imura Makoto, Moritoki Yoshinobu, Nishio Hidenori, Shibata Yasuhiro, Nakane Akihiro, Kato Toshiki, Maruyama Tetsuji, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Functional analysis of spermatogonial stem cells in cryptorchidism using EE1A1 and TPT1 gene expression as indexes of cell differentiation. American Urological Association Annual Meeting 2012, 2012.5.19-24, Atlanta(USA).

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：20254279

(2)研究分担者

水野 健太郎 (MIZUNO KENTARO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：70448710

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・その他部局・学長
研究者番号：30122047

小島 祥敬 (KOJIMA YOSIYUKI)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：60305539