

令和元年6月11日現在

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06768

研究課題名(和文) 羊膜と足場材料を用いた収縮と弛緩の可能な膀胱の再生：ウサギを用いた研究

研究課題名(英文) Regeneration of bladder using amnion and P(LA/CL) scaffold

研究代表者

伊狩 亮 (Ikari, Ryo)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70804293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経因性膀胱や膀胱癌全摘に対する膀胱拡大術に腸管を用いない新たな方法として、羊膜と生体吸収性足場P(LA/CL)を代替として用い、良好な膀胱組織形成と機能改善できないかを検討した。6ヶ月以降にX線造影を行った結果、拡大膀胱の蠕動運動を確認することができた。また、ウロダイナミクス検査で膀胱容量と膀胱機能を確認したところ、容量の増加と内圧の変化が認められ、また、膀胱筋収縮力検査においては、再生膀胱の正常と変わらない程度の収縮反応が確認できた。さらに、組織学的に再生膀胱を確認したところ、正常と変わらない上皮と筋層を形成した膀胱組織が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱癌に対する膀胱全摘除術では腸管を利用した尿路変向術が標準術式である。しかし、次世代の治療としてなるべく他臓器を犠牲にしない再生医療の応用が待ち望まれている。そこで、我々は、1)免疫学的に寛容で無細胞化をする必要がなく、抗瘢痕効果のある羊膜上に、柔軟性に富む口腔粘膜上皮細胞を播種しシート状にしたものと2)生分解性の足場材料に、胃平滑筋細胞を播種しシート状にしたものを重ね合わせ、腹腔内大網でロール状にして熟成させることで、拡大膀胱としての利用可能性について検討を行った。6カ月後の膀胱造影や容量測定、内圧測定、筋収縮力測定にて、膀胱容量と機能の改善が認められ、新膀胱としての利用可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：At first, the rolled cell seeded materials covered with omentum after two weeks weren't found scar formation and could find the separated epithelium and muscle layers. Next, in order to evaluate the regenerated bladder form and bladder function, urodynamics study, cystography and muscle strip study were conducted. Then, peristaltic movement could be found in the regenerated bladder in cystography. Also, the bladder capacity was a little increased after 6 month and 12 month, compared with non-treated control. Muscle strip study showed the regenerated bladder reacted with electric stimulation. These results are indicated the regenerated bladder using two layer materials covered with omentum showed great bladder form and function. Moreover, bladder epithelium and bladder muscle were confirmed in HE immunostainings. Therefore, cell seeded amniotic membrane and P(LA/CL) scaffold covered with omentum showed regenerated functional bladder and formed bladder epithelium and bladder muscle.

研究分野：泌尿器再生

キーワード：泌尿器 再生医療 生体吸収性材料 羊膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膀胱全摘除術後の尿路変向術では回腸導管が最も多く行われている。また、尿道温存可能な浸潤性膀胱癌患者では新膀胱造設がしばしば選択される。しかしながら、腸管利用により術後腸閉塞や吻合不全などのリスクは不可避であるため、消化管利用に代わる新たな医療材料を用いる方法が望まれた。そこで1990年代以降、膀胱再生研究が進み、2006年のAtalaらによる研究報告にはイヌの膀胱で足場材料を用いた膀胱再建術をし、成功を修めている(文献1)。しかしながら、2014年のJosephらの追試では、半数に膀胱破裂を含む重篤な合併症が認められ、ヒトに対する安全性が懸念された(文献2)。そのため、膀胱再生は振り出しへと戻った。Josephらの膀胱再生実験では、病的膀胱由来の膀胱上皮と筋層を使用した場合に生育が悪いことを問題として挙げており、なるべく病的膀胱の組織を利用しない方法が望まれた。そこで、我々は、消化器外科領域において羊膜を足場として口腔粘膜細胞と胃平滑筋を用いて癒痕線維化のない全周性食道の再生に成功した、研究協力者の萩原(同志社大学 生命医科学)の協力の元、膀胱再建に上記技術を利用できないかと考えた。

### 2. 研究の目的

膀胱癌に対する膀胱全摘除術では腸管を利用した尿路変向術が標準術式である。しかし、次世代の治療としてなるべく他臓器を犠牲にしない再生医療の応用が待ち望まれている。我々は、研究協力者の萩原(同志社大学 生命医科学)の協力の元、これまでに1)免疫学的に寛容で無細胞化をする必要がなく、抗癒痕効果のある羊膜上に、柔軟性に富む口腔粘膜上皮細胞を播種しシート状にしたもの2)生分解性ポリグリコール酸の足場材料に、胃平滑筋細胞を播種しシート状にしたものそれぞれを作成し、1)と2)を重ね合わせ、血流の豊富な大網に巻き付け腹腔内共培養を行なった。その結果、癒痕形成の起こらない組織形成を予備的に確認することができた。これら一連の組織工学の技術を踏まえ、本研究では、口腔粘膜上皮細胞を尿路上皮の代替として用い、また膀胱筋層に胃平滑筋を用いて粘膜および筋層を持ち蓄尿および排尿が可能な膀胱組織を作製し、膀胱癌患者に対する再建治療に役立てたい

### 3. 研究の方法

#### . In vitroの実験

##### (1)口腔粘膜細胞を播種した羊膜上皮シートの作成

ウサギの口腔から口腔粘膜細胞を採取し、さらに上皮層と下層を分離し、それぞれ上皮層は上皮増殖因子の添加された培地中に下層は牛血清添加の通常培地で1週間分離培養する。これらを羊膜シート上に下層、上皮層の順に播種し2週間ほど、細胞増殖因子を加え体外で培養し、羊膜上に上皮層と下層の層構造を形成させる。

##### (2)胃平滑筋細胞を播種した足場材料

ウサギの胃から胃平滑筋細胞を採取し、牛血清添加の通常培地で1週間培養する。培養した胃平滑筋細胞を足場材料に播種し、2週間ほど、細胞増殖因子を加え体外で培養し、足場材料中に平滑筋細胞を増殖させ、平滑筋層を形成させる。

#### . 動物実験(ウサギの膀胱再生実験)

動物実験では、上記 In vitro の実験で作成した羊膜上皮シートと平滑筋を播種した足場材料から膀胱を再生する。再生は2段階の手術により行う。

##### (1)第1回手術

ウサギを開腹し、無菌操作で以下を行う。羊膜上皮シートと平滑筋を播種した足場材料を大網上に並べて、プラスチック筒に大網とともに2重にロールする。そして、大網ロール組織を腹腔内に2-3週間程度置く。その理由は、この期間に大網血管からの豊富な血流供給を上皮と平滑筋層に送り、三次元的に腹腔内共培養を行い、熟成した膀胱組織を作製するためである。また、羊膜の抗癒痕性と増殖促進効果により、十分に良好な膀胱組織を形成することが期待される。

##### (2)第2回手術

2-3週間後にウサギを再開腹し、膀胱三角部を残し、膀胱部分切除を行い、腹腔内共培養していた組織を大網がつながった状態で半分切り取り、元の膀胱と吻合する(再生膀胱利用膀胱再建術)

#### . 再生結果の評価

膀胱再生手術後6ヶ月-2年後まで経時的にウロダイナミクス検査と膀胱造影検査を行い、再生膀胱の形態的、生理的機能を評価する。同時に、ウサギを犠牲死せしめ、再生膀胱を摘出して再生状態(膀胱粘膜層等の膀胱壁各層の再生状態、癒痕形成の有無などの病理組織学的所見)を評価する。統計学的解析の観点から、一時点につき4-6匹犠牲死させる

#### 4. 研究成果

本研究では、神経因性膀胱や膀胱癌全摘に対する膀胱拡大術に腸管を用いない新たな方法として、羊膜と生体吸収性足場 P(LA/CL) を代替として用い、良好な膀胱組織形成と機能改善できな  
いかを検討した。ウサギの膀胱上部から三角部にかけて切り開き、腹腔内で熟成した再生組織  
を上から覆い被せ、縫合し、予後の組織形成と膀胱機能について検討を行った。その結果、6  
ヶ月後の X 線膀胱造影で、羊膜と足場材料 P(LA/CL) を膀胱に貼付縫合した群は、蠕動運動が確  
認でき、膀胱内圧測定においても膀胱の容量変化が認められた。また、膀胱容量も少し増加が  
認められた。さらに、羊膜と足場材料 P(LA/CL) 部分の膀胱筋収縮測定にて、正常な筋収縮が見  
られるか どうかを検討したところ、control (未材料) とほとんど変わらない程度の収縮が認  
められた。組織学的にも材料群は尿路上皮と筋層の形成が認められた。これら の結果より、羊  
膜と足場材料 P(LA/CL) で膀胱拡大を行ったものは、尿路上皮と筋層を有した、膀胱機能的にも  
収縮や弛緩が可能な膀胱の拡大をすることが可能で あることが分かった

#### 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〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

##### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：萩原 明郎

ローマ字氏名：HAGIWARA Akeo

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、研究者個人に帰属されます。