

平成30年6月18日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10622

研究課題名(和文) 難治性排尿障害に対する骨髄由来細胞積層型スフェロイドシートによる機能的膀胱の再生

研究課題名(英文) Bone marrow-derived cell structures reconstructs functional urinary bladders

研究代表者

今村 哲也 (Imamura, Tetsuya)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：00467143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、おもに膀胱と尿道からなる下部尿路の再生医療研究を精力的に進めている。膀胱は、尿をためる(蓄尿)機能と尿を排出する(排尿)機能を有しており、その機能が低下、消失すると患者の生活の質が著しく低下する。また、膀胱機能の低下による難治性の蓄尿、排尿障害に対しては、有効な治療がほとんどない。したがって、機能的な膀胱の再生を可能にするTissue Engineeringを基礎とした再生医療は、有望な新規治療となり得る。本研究は、バイオ3Dプリンターを利用した細胞構造体の作製を試みた。さらに、放射線照射によって傷害を与えた膀胱に骨髄由来細胞構造体を移植すると機能的な膀胱が再生することを示した。

研究成果の概要(英文)：In urology, bladder dysfunctions, which can occur as a result of various diseases such as radiation cystitis, or interstitial cystitis, are considered to be refractory lower urinary tract symptoms (LUTS). Novel treatments for the bladder dysfunctions are urgently needed. Previously, we showed that bone marrow-derived cells have the potential to reconstruct functional urinary bladders by two methods. One was the direct-injection of single cells and the other was patch-transplantation of cell sheets. Both methods successfully reconstructed functional bladders. However, there are some limitations for each method. To overcome these limitations, we have attempted to biofabricate bone marrow-derived cell structures with 3D bioprinting robot system. We determined if the transplanted biofabricated structures could reconstruct functional bladders. In this study, we showed that the biofabricated structures have great potential to treat patients with serious LUTS due to damaged bladders.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膀胱再生 骨髄由来細胞 バイオ3Dプリンター 放射線照射傷害膀胱 下部尿路再生医療 間葉系幹細胞 細胞凝集体 ラット

## 1. 研究開始当初の背景

われわれは、おもに膀胱と尿道からなる下部尿路の再生医療研究を精力的に進めている。下部尿路機能は、尿をためる(蓄尿)機能と尿を排出する(排尿)機能を有している。何らかの原因によって、下部尿路機能が低下もしくは、消失する下部尿路機能障害は、患者の生活の質を著しく低下させる。また、膀胱機能の低下による難治性の蓄尿、排尿障害に対しては、有効な治療がほとんどない。したがって、機能的な膀胱の再生を可能にする **Tissue Engineering** を基礎とした再生医療は、有望な新規治療となり得る。

これまで、凍結、あるいは、放射線照射によって傷害を与えた膀胱に、骨髄由来細胞の直接注入移植、あるいは、細胞シート移植によって機能的な膀胱が再生することを報告した。しかし、直接注入法には、移植細胞の低生着率、移植による傷害の拡大という課題があった。一方、細胞シート移植には、シート自体の脆弱性、煩雑なハンドリングなどの課題が残った。

そこで、これらの課題を克服するため、実臨床への応用を視野に入れたより効率的、かつ効果的な膀胱再生ソースとしての高機能細胞構造体の作製を考案した。

## 2. 研究の目的

本研究は、難治性の蓄尿、排尿障害を有する膀胱に対して、機能的な膀胱を再生させる再生医療を実現させるための基礎研究である。この目的から、実臨床を視野に入れ、より効率的かつ効果的な膀胱再生を可能にする高機能細胞構造体の作製、および、その膀胱再生能力について検討を行った。

研究当初の計画では、培養した骨髄由来細胞から細胞凝集体(以下、スフェロイドと呼ぶ)を形成し、温度応答性培養皿に播種しスフェロイドシートを作製して、4-5枚重ね合わせた積層型スフェロイドシートの作製を計画していた。この研究を開始直前に、新規技術であるバイオ3Dプリンターの利用が可能になった。そこで、バイオプリンターを用いることで、骨髄由来細胞スフェロイドを温度応答性培養皿に播種することなく、直接、積層型スフェロイドシート(以下、骨髄由来細胞構造体と呼ぶ)を作製できるようになった。したがって、研究方法でのバイオ3Dプリンターの導入という、若干の変更により、当初計画していた高機能細胞構造体をより効率的に、より研究目的に適うものとしての作製が可能となり、その膀胱再生能力についての検討が可能になった。

本研究は、ラット放射線照射傷害膀胱モデルを用いて、骨髄由来細胞構造体移植による機能的な膀胱の再生について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 放射線照射傷害膀胱の作製

骨髄由来細胞構造体移植による膀胱再生について検討するために、本研究では、これまでに確立した放射線照射傷害膀胱モデル(平成20-21年、22-23年若手研究)を利用した。

10週齢雌Sprague-Dawley (SD)ラットの恥骨に接する直径1cmの円内(解剖学的に膀胱がある部位)に2グレイの放射線量を1週間に1回照射した。これを5回繰り返して、最終照射から2週間通常飼育したものを放射線照射傷害膀胱モデル(レシピエント)とした。

### (2) 骨髄由来細胞構造体の作製

17週齢(移植時レシピエントと同週齢)雄Green Fluorescent Protein (GFP) transgenic SDラットの大腿骨から骨髄細胞を採取した。コラーゲンコートした培養皿で初代培養を行い、培養皿に接着、伸展、増殖した細胞を骨髄由来細胞とした。骨髄由来細胞の継代培養を3-4回繰り返して、十分な細胞数を確保した。培養を終えた細胞をスフェロイド形成培養器に播種( $4.0 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ l/well)して、スフェロイドを形成させた。

続いて、バイオ3Dプリンター(レジェノバ、株式会社サイフューズ、委託作製)を利用して(温度応答性培養皿の利用からの変更、この点が申請時の研究方法を変更した点である。)、形成したスフェロイドから構造体(5mm $\times$ 5mmの3層:図1)を作製した。

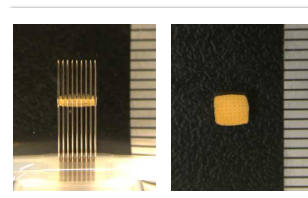


図1 骨髄由来細胞構造体

### (3) 放射線照射傷害膀胱への骨髄由来細胞構造体の移植

放射線照射したレシピエントラットの膀胱に作製した構造体を移植した。移植方法は、膀胱前壁を約5mm切開して、構造体を埋め込み(図2)、縫合固定した(n=10)。対照群には、構造体を埋め込まない偽手術を行った(n=12)。

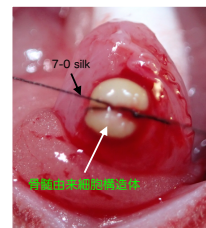


図2 構造体移植

#### (4) 構造体移植による膀胱再生の解析

構造体移植、あるいは、偽手術施行 2、4 週間後に、膀胱内圧測定を行った。膀胱内圧測定後、膀胱組織を摘出して、組織染色、免疫染色を行った。

#### 4. 研究成果

術後 2、4 週間後、移植した構造体は、レシピエント膀胱に生着していることを確認した (図 3)。特筆すべき点は、移植した構造体内にレシピエント側から伸展した血管構造を確認した (図 4)。また、その血管構造の周辺では、構造体を構成している骨髄由来細胞の平滑筋細胞への分化も認められた (図 5)。

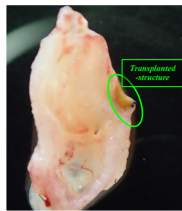


図 3 移植した構造体 (緑円内) のレシピエント膀胱への生着

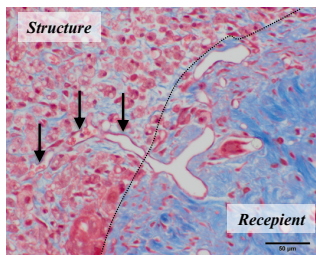


図 4 レシピエント側から移植した構造体への血管構造の伸展 (矢印)

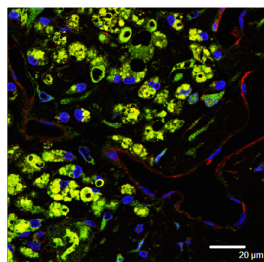


図 5 構造体を構成している骨髄由来細胞の平滑筋細胞への分化 (黄色)

偽手術を行った対照群では、強い炎症所見があり、また、膀胱平滑筋層、神経細胞が減少していた。さらに、膀胱組織内の低酸素状態が認められ、線維化が進行していた。

一方、構造体を移植した群では、膀胱平滑筋層の再構築、神経細胞の増大を確認した。また、膀胱組織内の低酸素状態が改善されており、線維化も抑制される傾向が認められた。

膀胱内圧測定によって膀胱機能を評価した。術後 2 週間目では、残尿量を除く、排尿

パラメーターにおいて両群間での差を認めなかったが、構造体移植群での残尿量は、対照群と比較して、有意に低下していた。このことから、移植 2 週間目あたりから膀胱機能の回復傾向があることが示唆された。

術後 4 週間目において、対照群では、術後 2 週目と比較して、一回排尿間隔時間、一回排尿量、膀胱容量の低下を特徴とする頻尿、および、高い残尿量を呈していた。しかし、構造体移植群では、頻尿が認められず、また、残尿量に関しても、対照群と比較して有意に低下していた。

これらの組織学的解析、および、膀胱内圧測定から、構造体を移植することによって、機能的な膀胱が再生されることを示した。膀胱再生機序としては、これまでの研究成果 (平成 23-25 年 基盤 C) から推測すると、構造体を構成している骨髄由来細胞のパラクリン効果 (Imamura, et al, Tissue Engineering Part A, 2015)、および、移植した構造体のレシピエント膀胱への組織化、すなわち、構造体を構成している骨髄由来細胞の膀胱構成細胞への分化 (Imamura, et al, Tissue Engineering Part A, 2012) が挙げられる。さらに、血管新生、もしくは、レシピエントからの伸展による血管構造の伸展による膀胱組織内の低酸素状態の改善が、線維化の抑制に大きく関与しているものと考えられる。

以上の研究成果の一部の技術に対して、産業財産権の出願 (立体型細胞構造体を用いた尿路組織の再生方法、PCT/JP2017/020531、2017 年 5 月 26 日) を行った。さらに研究結果をまとめ、学術誌 Tissue Engineering に投稿して、採択された (Imamura, et al. Biofabricated structures reconstructs functional urinary bladders in radiation-injured rat bladders. Tissue Engineering Part A, in press)。

#### 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 7 件)

- ① Imamura T, Shimamura M, Ogawa T, Minagawa T, Nagai T, Gautam S S, Ishizuka O : Biofabricated Structures Reconstruct Functional Urinary Bladders in Radiation-injured Rat Bladders. Tissue Engineering Part A, 2017, in press 査読有
- ② Imamura T, Ogawa T, Minagawa T, Nagai T, Suzuki T, Saito T, Yokoyama H, Nakazawa M, Ishizuka O: Combined treatment with a  $\beta_3$ -adrenergic receptor agonist and a muscarinic receptor antagonist inhibits detrusor overactivity induced by

cold stress in spontaneously hypertensive rats. *Neurourology and Urodynamics* 36: 1026-1033, 2017 査読有 DOI: 10.1002/nau.23061

- ③ Imamura T, Ishizuka O, Ogawa T, Minagawa T, Ishikawa M, Hiragata S, Yokoyama H, Nakazawa M, Kurizaki Y, Nishizawa O: Expression of 5-hydroxytryptamine receptors in human urinary bladders with benign prostatic hyperplasia. *Advance in Therapy* 32 : S29-S37, 2015 査読有 DOI: 10.1007/s12325-015-0242-0
- ④ Imamura T, Ogawa T, Minagawa T, Yokoyama H, Nakazawa M, Nishizawa O, Ishizuka O: Engineered bone marrow-derived cell sheets restore structure and function of radiation-injured rat urinary bladder. *Tissue Engineering Part A* 21 : 1600-1610, 2015 査読有 DOI: 10.1089/ten.TEA.2014.0592
- ⑤ Imamura T, Ishizuka O, Ogawa T, Yamagishi T, Yokoyama H, Minagawa T, Nakazawa M, Nishizawa O: Pathways involving beta-3 adrenergic receptors modulate cold stress-induced detrusor overactivity in conscious rats. *LUTS* 7 : 50-55 , 2015 査読有 DOI: 10.1111/luts.12050

[学会発表] (計 9 件)

- ① 今村哲也、放射線照射傷害膀胱への骨髄由来細胞から作製した立体組織の移植による機能的な膀胱再生、第 17 回日本再生医療学会総会、2018 年
- ② 今村哲也、放射線照射傷害膀胱に対する骨髄由来細胞構造体を用いた機能的な膀胱の再生への試み、第 13 回日本獣医再生医療学会、2018 年
- ③ Tetsuya Imamura、Biofabricated Bone Marrow-derived Cell Cubes Restore Structure and Function of Radiation-Injured Urinary Bladders in Rat、The American Urological Association 2017 105<sup>th</sup> Annual Meeting、2017 年
- ④ 今村哲也、放射線照射傷害膀胱を用いてのバイオ 3D プリンターで作製した骨髄由来細胞構造体による機能的な膀胱再生への試み、第 105 回日本泌尿器科学会総会、2017 年

⑤ 今村哲也、バイオ 3D プリンターで作製した骨髄由来細胞構造体による放射線照射傷害膀胱の機能的な膀胱再生への試み、第 16 回日本再生医療学会総会、2017 年

⑥ 今村哲也、バイオ 3D プリンターで作製した骨髄由来細胞構造体を用いた放射線照射傷害膀胱の機能的な膀胱再生への試み、第 13 回泌尿器科再建再生研究会、2016 年

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：立体型細胞構造体を用いた尿路組織の再生方法

発明者：今村哲也

権利者：同上

種類：国際出願

番号：PCT/JP/2017/020531

出願年月日：2017 年 5 月 26 日

国内外の別：国内

[その他]

信州大学医学部泌尿器科教室ホームページ  
<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/cha/r/urology/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 哲也 (IMAMURA, Tetsuya)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：00467143