

平成 30 年 8 月 29 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10623

研究課題名(和文) 羊膜を用いた尿路上皮粘膜を持ち収縮および弛緩を行う膀胱の再生：イヌを用いた研究

研究課題名(英文) Functional bladder regeneration with tissue engineering urothelium using human amnion: a study on dogs

研究代表者

上仁 数義 (Johnin, Kazuyoshi)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：90324590

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)：羊膜シートとP(LA/CL)シートを用い、自己組織で機能的な膀胱組織の再生を目的とした。口腔粘膜細胞と胃平滑筋細胞を培養後、in vitroでその細胞を羊膜シート、P(LA/CL)シート上で増殖させた。さらに、上皮：羊膜シート、中間：大網、筋層：P(LA/CL)の順に重ね合わせ、腹腔内の大網に巻き付け3週間熟成させた。上皮と筋層を免疫染色で確認したところ、上皮はサイトケラチン陽性、筋層は α -SMAが陽性であった。培養シートを大網の血流を保ったまま、clam法に準じ膀胱にパッチ状に吻合し、半年間経過観察した。合併症はなく、膀胱鏡にて、培養シートと膀胱間に尿路上皮の再生が認められた。

研究成果の概要(英文)：The aim is to regenerate an autologous functional bladder tissue using amnion sheets and bioabsorbable scaffold with poly-lactic acid and poly-caprolactone copolymer P(LS/CL). We cultured cells from oral buccal mucosa and stomach smooth muscle cells on the amnion and P(LS/CL) sheets. Moreover, epithelium (amnion sheet), middle layer(omentum), and muscle layer P(LS/CL) sheets were piled on subsequently, and wrapped by omentum for 3 weeks. Immunohistochemical studies showed that the epithelium was positive for cytokeratin and muscle layer was positive for α -SMA. Next we augmented regenerative bladder tissue onto native bladder with sufficient blood supply from omentum according to Clam method. After 6 months observation there were no complications, cystoscopic finding and cystography showed normal shaped bladder with normal peristalsis. These results indicated successful regeneration of functional bladder tissue using autologous tissues

研究分野：泌尿器科学

キーワード：膀胱再生

1. 研究開始当初の背景

腸管利用膀胱拡大術は、神経因性膀胱患者の高圧膀胱を是正できる確立された術式である。しかし、様々な問題点(尿路感染症、膀胱結石、代謝異常、膀胱破裂、悪性化)が存在する。そのため1990年代から再生医学の研究が進み、Atalaらは、動物実験での成を経て、小児神経因性膀胱の患者に再生膀胱による膀胱拡大術を成功させた(Atala, Lancet 2006)。再生医学の技術で、膀胱再生は成しえたかに思われたが、追試で半数に、膀胱破裂を含む重大な副作用が発生し、ヒトへの安全性が懸念され、膀胱再生の道は振り出しに戻った(Joseph, J Urol 2014)。

また膀胱がん患者は増加の傾向があり、浸潤性となると膀胱全摘除術の適応となる。尿路変向として、回腸導管や回腸新膀胱が広く行われているが、消化管を使うため合併症が必須である。

連携研究者は、消化器外科領域においてヒト羊膜を用いて、癒痕線維化のない全周性食道の再生に成功している(Nakase, J Thorac Cardiovasc Surg 2008)。膀胱再建への羊膜を用いる試みは、1987年にイヌでの報告が最初で(Fishman, 1987)。またラットの膀胱再建に羊膜のみを用い、尿路上皮と膀胱筋層の再生が観察されたが、膀胱結石の発生が半数に見られ(Iijima, Tissue Eng 2007)、更なる改良が期待されている。膀胱は、収縮と弛緩を繰り返す臓器である。以上の知見から蓄尿および排尿でも尿が漏れないためには、緊密な尿路上皮再生と、血流豊富な膀胱筋層の再生が必須であると考えた。

そこで本来の膀胱や消化管と同等の強さを持ち、尿路の特性を持った再生膀胱を、羊膜を用いて作ることができないだろうかという着想に至った。連携研究者はすでに食道の再生に成功しており、食道再生のノウハウを応用すれば、いまだ臨床応用できていない再生膀胱が可能となると考えた。この研究が成功すれば、小児から成人まで多くの患者さんを、重大な合併症から救うことが可能となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、粘膜および筋層を持ち蓄尿および排尿が可能な(つまり尿路上皮粘膜を持ち、癒痕(線維化)が無く弛緩・収縮する)膀胱を、イヌで再生することである。

足場として用いるのは、今まで膀胱再生で多く用いられてきた生物分解性足場ではなく、免疫学的に寛容で無細胞化の必要のない羊膜を用いる。膀胱に羊膜を直接移植するのではなく、膀胱から自己組織(尿路上皮、膀胱平滑筋)を採取し、別々に培養増殖させ、細胞増殖因子を加え、羊膜に移植する。最終的に羊膜を用いた再生膀胱を大網の血流付きで、イヌの腹腔内で再生させる。

3. 研究の方法

再生足場に羊膜シートを用い、膀胱再生足場の全層に豊富な血流を供給する方法として羊膜と大網を四重の球状に重ね巻きした膀胱再生キャップを工夫し、血流豊富な平滑筋・線維芽細胞層を持つ膀胱を再生する。さらに、内腔側に、前もって膀胱粘膜をメッシュ状としたものを移植する。足場に播種された膀胱由来の平滑筋や線維芽細胞と腹腔内共培養(連携研究者業績3およびH19-20科学研究費助成)、羊膜と大網の球状の重層膀胱再生キャップ、の3つを工夫し、尿路上皮粘膜・筋層を持ち癒痕が無く、その結果、弛緩と収縮が可能な膀胱の再生を、イヌで行う。イヌは、高価であるに加え、麻酔などに多大な費用と労力を要するためウサギで先行実験を行った。

4. 研究成果

4. 研究成果

概略

羊膜シートとP(LA/CL)シートを用い、自己組織で機能的な膀胱組織の再生を目的とした。口腔粘膜細胞と胃平滑筋細胞を培養後、in vitroでその細胞を羊膜シート、P(LA/CL)シート上で増殖させた。さらに、上皮:羊膜シート、中間:大網、筋層:P(LA/CL)の順に重ね合わせ、腹腔内の大網に巻き付け3週間熟成させた。上皮と筋層を免疫染色で確認したところ、上皮はサイトケラチン陽性、筋層は-SMAが陽性であった。

培養シートを大網の血流を保ったまま、clara法に準じ膀胱にパッチ状に吻合し、半年間経過観察した。合併症はなく、膀胱鏡にて、培養シートと膀胱間に尿路上皮の再生が認められた。

成果報告

実験1: 羊膜上に口腔粘膜上皮細胞を乗せ培養し、免疫染色(HE染色、CK(MNF116)染色)

実験方法:

ウサギの口腔から口腔粘膜を取り出し、ディスペラーゼとトリプシンで処理し、口腔粘膜上皮細胞を初代培養した。(図1)

羊膜上に口腔粘膜上皮細胞を播種し、1週間keratinocyte SFM+DMEM中で培養した。

ホルムアルデヒドで固定し、断面をHE(図2)とcytokeratin(MNF116)(図3)で免疫染色した。

実験結果:

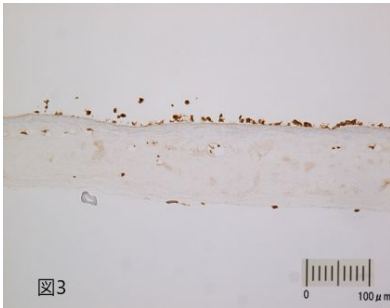
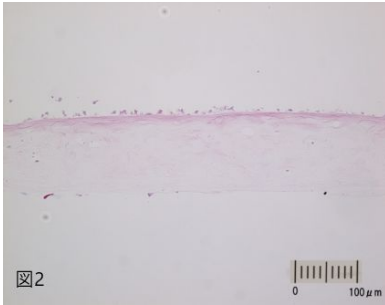
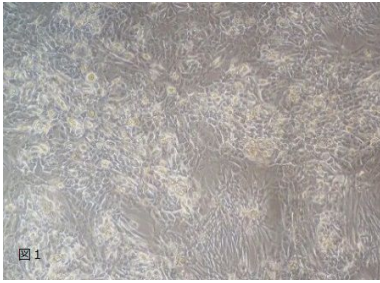


図 1. 口腔粘膜上皮細胞、
 図 2. HE 染色 x20
 図 3. CK(MNF116) x20

口腔粘膜上皮細胞は継代数 10 まで順調に生育を確認できた。また、羊膜上に細胞を播種したところ羊膜上に一層の上皮層が確認できた。

実験 2：足場材料 PLACL 上に胃平滑筋細胞を乗せ培養し、免疫染色(HE 染色、-SMA 染色)

実験方法：

イヌ、あるいはウサギの胃から胃平滑筋を取り出し、コラゲナーゼで処理し、胃平滑筋を初代培養した。(図 4)

コラーゲンをコーティングした PLACL 上に胃平滑筋細胞を播種し、1 週間 DMEM 中で培養した。

ホルムアルデヒドで固定し、断面を HE(図 5)と -SMA(図 6)で免疫染色した。
 実験結果：

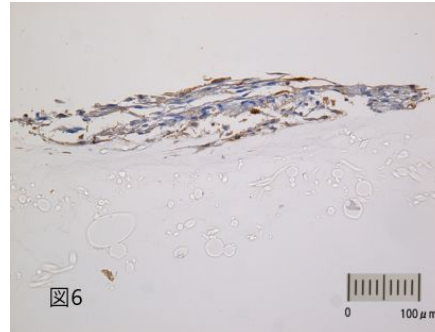
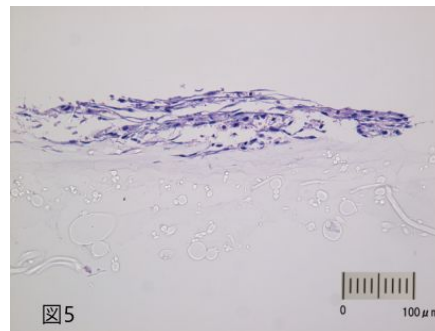
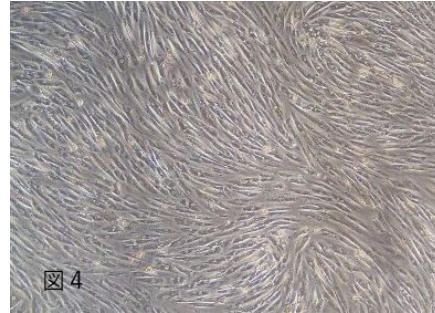


図 4. 胃平滑筋細胞
 図 5. HE x20
 図 6. SMA x20

胃平滑筋細胞は、継代数 10 まで順調に生育し、紋状が確認できた。コラーゲンをコーティングした足場材料 PLACL 上に播種した胃平滑筋細胞は図 5 のように層状になるのが確認できた。

実験 3：上皮+平滑筋層を重ね合わせ腹腔内で共培養

実験方法：

実験 1 と実験 2 で作製した上皮、筋層シートをウサギ大網上に並べ重ね合わせ、3 週間腹腔内で共培養を行った。

3 週間後に重ね合わせたシートを取り出し、その状態を確認した。(図 6, 図 7)

実験結果：

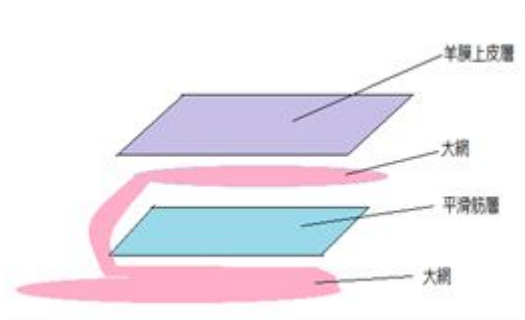


図 6, 重ね合わせ方法

図 7, 大網と材料

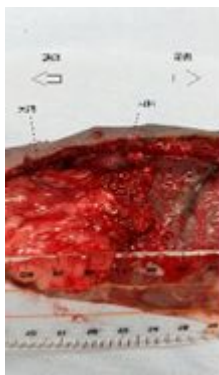


図 6 のように上皮、大網、平滑筋層、大網となるように重ね合わせ腹腔内で共培養した。重ね合わせた材料は図 7 のように大網と合わせり血流供給されていることが分かる。今後は、この組織を免疫染色し層構造を確認するとともに、作製した組織を膀胱欠損部に貼り付けウロダイナミクス検査で膀胱機能を評価する。

実験 4：ビデオウロダイナミクス検査による膀胱機能評価

足場材料を用いた膀胱再生データ

・膀胱 X 線造影

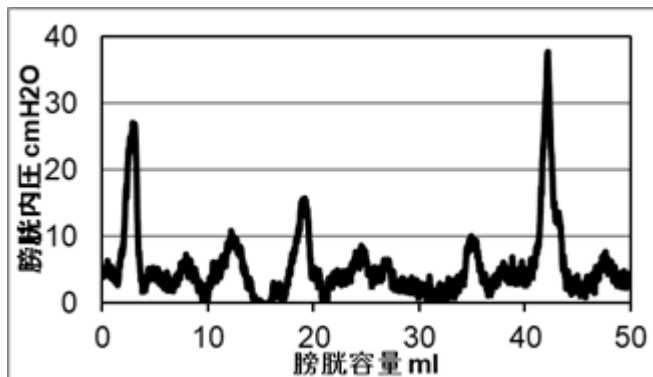


Normal
羊膜+P(LA/CL)

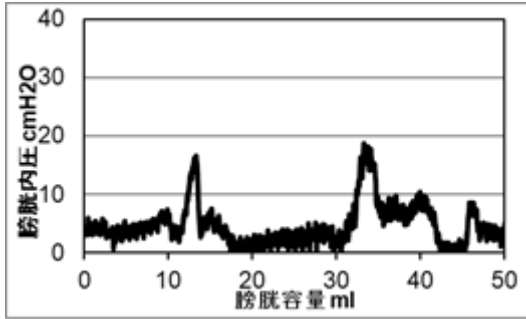
足場材料(羊膜+P(LA/CL))で膀胱を作製した群の撮影像は normal 群とほとんど変わらず、膀胱の異常な変形等、また膀胱内の異常は認められなかった。

足場材料(羊膜+P(LA/CL))群において、排尿の際の蠕動運動が見られた。

・ウロダイナミクス検査



Normal



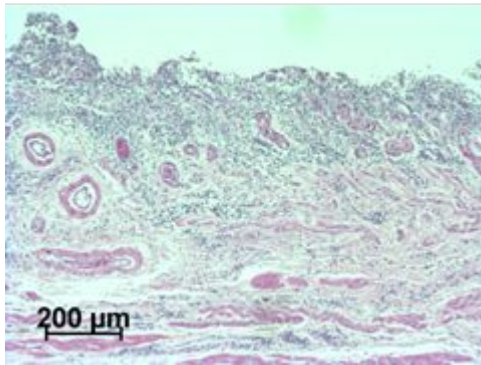
羊膜+P(LA/CL)

羊膜+P(LA/CL)においても排尿による内圧変化が認められた。

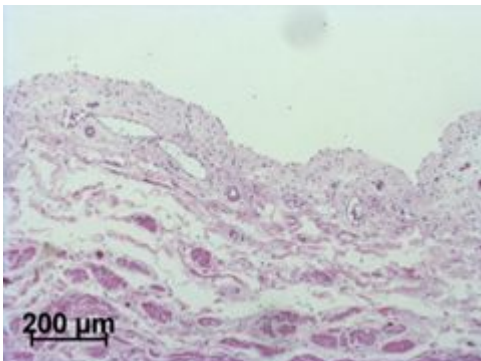
	最大膀胱容量	コンプライアンス
normal	46.5ml	13.6
材料(羊膜+P(LA/CL))	49.2 ml	8.7

材料(羊膜+P(LA/CL))群で normal 群よりも膀胱容量の増加が認められた。しかしながら、コンプライアンスは材料群で上昇は認められず、低下していた。

・組織画像(HE 染色)



Normal



羊膜+P(LA/CL)

材料群は、上皮の形成、筋層組織の成熟が十分認められ、癒痕形成が殆ど起こっていない。

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)

なし

〔雑誌論文〕(計 0件)

なし

〔学会発表〕(計 0件)

なし

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

上仁 数義 (ジヨウニン カズヨシ)

Kazuyoshi Johnin

研究者番号: 90324590

滋賀医科大学・医学部・講師

(2)研究分担者

小林 憲市 (コバヤシ ケンイチ)

Kenichi Kobayashi

研究者番号: 40727434

滋賀医科大学・医学部・助教

(2)研究分担者

影山 進 (カゲヤマ ススム)

Susumu Kageyama

研究者番号: 50378452

滋賀医科大学・医学部・講師

(2)研究分担者

河内 明宏 (カワウチ アキヒロ)

Akihiro Kawauchi

研究者番号：90240952

滋賀医科大学・医学部・教授

(3)連携研究者

萩原 明郎 (ハギワラ アケオ)

Akeo Hagiwara

研究者番号：90198648

同志社大学・生命医科学部・教授

(4)研究協力者

()