

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20083

研究課題名(和文)低活動膀胱モデルにおける脂肪由来幹細胞注入療法

研究課題名(英文)Effect of Adipose-Derived Stem Cells for Underactive Bladder

研究代表者

松川 宜久(Matsukawa, Yoshihisa)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：30378145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：当研究では低活動膀胱モデルラットに脂肪由来幹細胞を膀胱壁内に局所注入し、膀胱における組織血流の増加ならびに脂肪幹細胞の平滑筋、血管内皮、神経への分化を確認した。さらに機能学的検討により有意な膀胱機能の改善(残尿の低下、排尿効率の改善)を確認し、電気刺激、薬物刺激に対する有意な膀胱の収縮を確認した。

以上の結果より、低活動膀胱モデルにおける脂肪幹細胞の局所注入は、平滑筋分化を促進し、また機能学的側面からも膀胱機能の改善が得られており、今後の自己脂肪由来・非培養幹細胞の膀胱内注入療法の低活動膀胱の治療選択肢としての可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we injected adipose-derived stem cells for experimental animal model (rats) with underactive bladder and confirmed the differentiation to smooth muscle and bladder nerve of them. Additionally, the significant improvement of bladder functions, such as the decrease of residual urine and the improvement of voiding efficacy, and the significant contractile ability of bladder muscle by electrical stimulation were confirmed in the underactive bladder animal model.

In conclusion, adipose-derived stem cells for underactive bladder was effective in bladder functions and was found to be effective as a new therapy for underactive bladder in clinical practice.

研究分野：下部尿路機能障害

キーワード：低活動膀胱 脂肪幹細胞 再生治療

1. 研究開始当初の背景

低活動膀胱とは、排尿時の排尿筋（膀胱排尿筋）収縮力の低下により、排尿障害を呈する病態をいう。低活動膀胱では、一般に、膀胱を支配する末梢神経で最も重要な骨盤神経の障害により、生じるといわれているが、最近では高齢化社会をむかえて明らかな神経疾患がないにも関わらず、膀胱収縮障害がみられる症例が増加しており、その原因として、膀胱組織に対する虚血、加齢による膀胱平滑筋の変化、長年の膀胱出口部閉塞による影響などがいわれている。臨床的には、低活動膀胱患者では、種々の排尿症状を呈し、多量の残尿を伴うことが多い。また重症化による尿閉や、慢性的な残尿による尿路感染症の合併もしばしばみられ、問題となっている。しかしながら、その一方で、現在のところ排尿筋収縮力を改善させるような有効な治療法（薬物治療、外科的治療）はなく、不可逆性の変化でもあることから、この病態に対して臨床的には大変難渋しているのが現状である。

2. 研究の目的

現状、有効な治療法がみられない低活動膀胱（排尿筋収縮障害）に対して、今回、脂肪幹細胞を用いた再生療法により、排尿筋の収縮機能の改善が得られると考え、研究を計画した。幹細胞を用いた再生療法は種々の疾患の治療に応用できる可能性を秘めているが、培養細胞を用いた再生療法においては常に癌化、あるいは無抑制増殖の懸念が存在する。脂肪由来幹細胞については、近年、脂肪組織より体外培養を行うことなく治療必要量の幹細胞を抽出できる装置が開発され、自己脂肪組織由来・非培養幹細胞を用いた細胞治療が可能となり、臨床応用の実現性が高く、極めて安全性が高いというメリットを有する。実際に、海外では自己脂肪組織由来・非培養幹細胞を用いた臨床研究が、心筋梗塞、乳房再建などにおいて実施されている。これまで我々のグループでも、世界に先駆けて、前立腺手術後尿失禁患者に対する脂肪由来幹細胞の傍尿道注入治療をヒトにおける臨床試験として実施中であり、自己皮下脂肪から抽出した脂肪由来非培養幹細胞を尿道括約筋に注入することにより、幹細胞の括約筋への分化ならびに尿失禁の改善に加え、幹細胞注入局所における血流が経時的に増加することをドップラーエコー、造影エコーにて確認している。低活動膀胱についても、その原因の一つとして、膀胱血流障害が考えられており、脂肪幹細胞療法による膀胱組織の血流増加もまた、膀胱機能障害を改善する一助となることが示唆される。

これまで得てきた知見などにより、脂肪幹細胞の膀胱内注入は、臨床的に有効な治療法がない低活動膀胱に対して有効であると考え、本研究では、自己脂肪組織由来幹細胞の膀胱壁内注入による、膀胱平滑筋への分化、

膀胱組織血流の増加、ならびに組織線維化の抑制を評価すること、さらに膀胱収縮障害の機能的変化を評価することを目的とし、臨床応用可能な治療法となりうるか検証した。

3. 研究の方法

本研究では、低活動膀胱モデルラットにおいて、膀胱壁内に培養脂肪由来幹細胞を投与し、幹細胞の局所における分化ならびに抗炎症・抗線維化作用および膀胱収縮力に対する作用について検討した。

これらを検証するために、(1)低活動膀胱モデルラットの妥当性の評価、(2)CCD 生体顕微鏡による膀胱壁微小血流の解析、(3)膀胱組織学的変化、mRNA および蛋白質レベルの変化の検討、(4)膀胱内圧測定における蓄尿・排尿機能に与える影響の検討、の4つの研究項目を計画した。

4. 研究成果

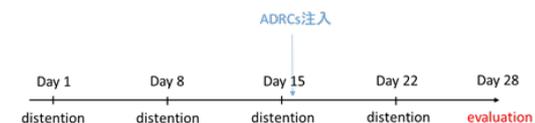
(1)低活動膀胱モデルラットの妥当性の評価

現在のところ、確立した低活動膀胱モデルラットが無いために、今回作成したモデルが、低活動膀胱モデルとして妥当か評価を行った。モデルの候補として、ストレプトゾトシン（STZ）を用いた糖尿病モデルラット、膀胱出口部閉塞モデルラットならびに膀胱過伸展モデルラットを作成し、それぞれの低活動膀胱モデルとしての妥当性を評価したところ、膀胱過伸展モデルが一番、安定性、再現性が高く、同モデルを実験系に用いることにした。具体的には、230-260 g のメスSDラットを用い1回/週、計4週間膀胱拡張を繰り返した。経尿道的にPE50カテーテルの挿入後尿道をクランプし、シリンジポンプを使用し4ml/hで3ml注入後15分留置して作成した。コントロール群と比較して、有意な1回排尿量の低下、残尿量の増加、膀胱収縮力の低下を確認し、低活動膀胱モデルラットとして妥当性を確立した。

(2)CCD 生体顕微鏡による膀胱壁微小血流の解析

膀胱壁内微小血流の改善を調べるために、脂肪幹細胞投与2週間後にウレタン麻酔下麻酔下に腹壁切開より挿入したペンシル型 CCD 生体顕微鏡により、経時的に毛細血管の血流速度を測定、コントロール群と低活動モデル群と比較検討した。

ADRCs（脂肪由来再生細胞）



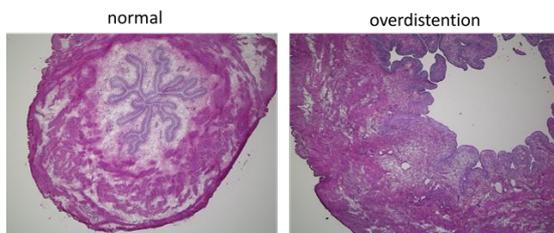
低活動膀胱モデルではコントロール群と比較して有意な膀胱内微小血流の低下がみられた。一方、ADRCs注入モデルでは、低活動モデルと比較して有意な血流の増加が

みられた。これらの結果からADRCの膀胱内注入は有意な血流改善を来すことを確認した。

(3)膀胱組織学的変化、mRNA および蛋白質レベルの変化の検討

HE染色にてnormal rat (コントロール群)と比較し、distention rat (低活動モデル)は粘膜、筋層とともに肥大しており、ADRCs ratはdistention ratsよりも粘膜、筋層の肥大は改善していた。

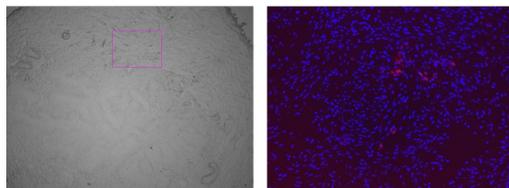
Masson-trichrome染色にて組織の線維化を観察した。Image Jを使用し、画像解析すると、normal ratは4%程度の線維化に対し、distention ratでは45%の線維化を認めたとに対し、ADRCs ratは35%の線維化の改善を認めた。(下図)



免疫染色について

ADRCsの培養細胞にはあらかじめSMA(平滑筋)、vWF(血管内皮)、S100(神経)のシグナルのないこと、ならびに脂肪幹細胞の培養細胞は移植前に培養細胞の時点においては何にも分化していなかったことを確認したうえで、ADRCs注入ratsの膀胱で、ADRCs投与された部位において上記SMA(平滑筋)、vWF(血管内皮)、S100(神経)の発現を確認した。これについてはADRCsには投与直前にCellVue® Claret (PKH26)により標識したうえで注入すると、SMA(平滑筋)、vWF(血管内皮)、S100(神経)の発現している場所とADRCsの細胞膜にCellVue® Claretの標識が同一部位に観察されたことにより、ADRCsが平滑筋、血管内皮、神経に分化したと考えられた。(下図)

組織(ADRCs 10⁶)
PKH26
(×4)、(×20 DAPI)



(4)膀胱内圧測定における蓄尿・排尿機能に与える影響の検討

膀胱内圧測定(cystometry: CMG):
イソフルラン吸入麻酔後、PE50カテーテ

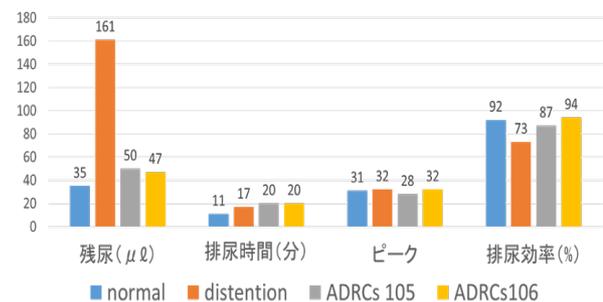
ルで膀胱瘻造設後、ボールマンケージにラットを固定し、0.04ml/minで生理食塩水を注入していった。ラットは尿道から自発的に排尿し、それを記録した。

最初の安定期間(60分)後に少なくとも4回の再現性のある排尿サイクルを記録した。ベースライン、閾値、排尿時圧のピーク、収縮間隔、最大膀胱容量、残尿、排尿効率、膀胱コンプライアンスを評価した。

結果:

残尿量: normal rats:0.035g, distention rats:0.161g, ADRCs rats:10.⁵注入群:0.05g, 10.⁶注入群:0.047gとADRCs注入モデルで有意な残尿量の低下を認めた。

排尿効率においても normal rats:92.22%, distention rats:72.686%, ADRCs rats:10.⁵注入群:87%, 10.⁶注入群:94%と低活動モデルでは有意な排尿効率の低下を認めたが、ADRCs注入群では、有意な排尿効率の改善が得られた。



摘出膀胱収縮弛緩実験(muscle strip isovolumetric study):

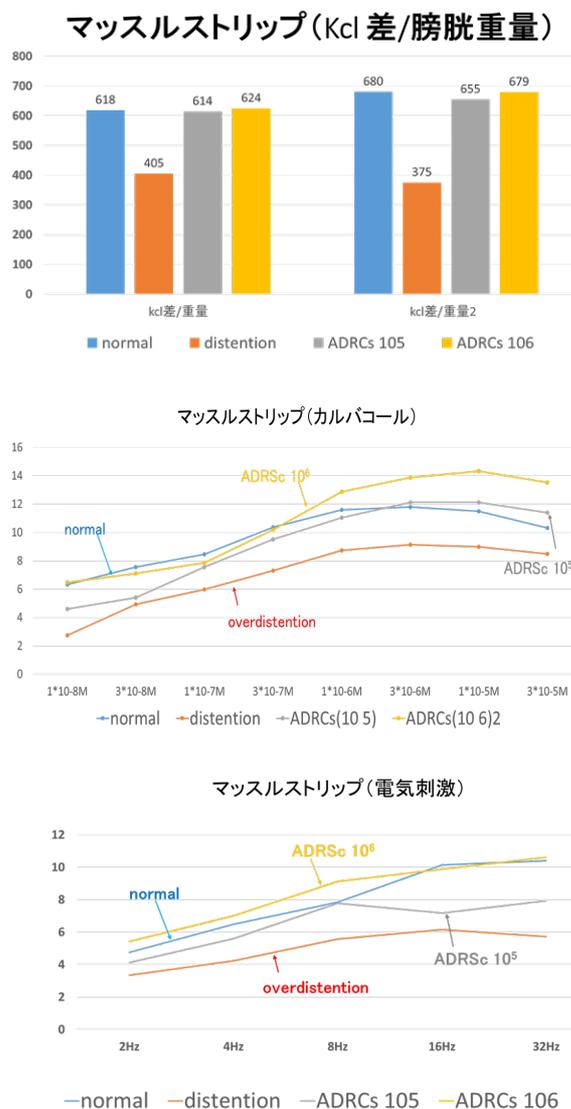
方法:

CMG後の膀胱組織を、143mMのNa⁺、5.9mMのK⁺、2.5mMのCa²⁺、1.2mMのMg²⁺、127.7mMのCl⁻、1.2mMのSO₄²⁻、1.2mMのPO₄³⁻、25mMのHCO₃⁻および11mMのグルコースからなる修飾クレス溶液95%O₂および5%CO₂でバブリングしてpH7.4にした。尿道口の上の膀胱の組織を、双眼顕微鏡下で約0.5×0.5×7mmおよび重量1~2mgのストリップに縦方向に切断した。尿路上皮を含む粘膜を両眼顕微鏡下で除去した。

各ストリップは、Myobathキャリア増幅器(World Precision Instruments, Sarasota, Florida)を用いて等尺性力変位変換器に取り付けられ、改変Krebs溶液を含む25ml浴に取り付けられた。初期荷重は1.0mgに設定した。測定前に少なくとも1時間修飾Krebs溶液中でストリップを平衡化した。電場刺激は、Grass S88刺激装置(Grass Technologies, West Warwick, Rhode Island)を有する器官浴中の2つの白金電極の間に取り付けられた調製物中で行った。内因性神経は、0.5~64Hzの周波数で持続時間が5ミリ秒の矩形の20Vパルスで刺激された。パルス列は2秒間持続し、刺激間隔は120秒間とした。

結果:

下図に示すように、distention rats 群では、電気刺激、薬物刺激ともに有意な膀胱収縮力の低下がみられたが、ADRCs 注入群では、有意な膀胱収縮の改善が得られた。



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)

- 1) Matsukawa Y, Takai S, Funahashi Y, Kato M, Yamamoto T, Gotoh M. Long-term efficacy of a combination therapy with an anticholinergic agent and an 1-blocker for patients with benign prostatic enlargement complaining both voiding and overactive bladder symptoms: A randomized, prospective, comparative trial using a urodynamic study. *Neurourol Urodyn.* 2017; 36: 748-754. (査読有)
- 2) Matsukawa Y, Funahashi Y, Takai S, Majima T, Ogawa T, Narita H, Kato M, Gotoh M. Comparison of Silodosin and Naftopidil for Efficacy in the Treatment of Benign

Prostatic Enlargement Complicated by Overactive Bladder: A Randomized, Prospective Study (SNIPER Study). *J Urol.* 2017; 197: 452-458. (査読有)

- 3) Matsukawa Y, Kato M, Funahashi Y, Majima T, Yamamoto T, Gotoh M. What are the predicting factors for the therapeutic effects of dutasteride in male patients with lower urinary tract symptoms? Investigation using a urodynamic study. *Neurourol Urodyn.* 2017. Epub. (査読有)
- 4) Hirose Y, Yamamoto T, Nakashima M, Funahashi Y, Matsukawa Y, et al. Injection of Dental Pulp Stem Cells Promotes Healing of Damaged Bladder Tissue in a Rat Model of Chemically Induced Cystitis. *Cell Transplant.* 2016; 25: 425-36. (査読有)
- 5) Yamamoto T, Furuhashi M, Sugaya T, Oikawa T, Matsumoto M, Funahashi Y, Matsukawa Y, Gotoh M, Miura T. Transcriptome and Metabolome Analyses in Exogenous FABP4- and FABP5-Treated Adipose-Derived Stem Cells. *PLoS One.* 2016; 11: e0167825. (査読有)

[学会発表](計 4 件)

- 1) Matsukawa Y. low active bladder and underactivity 2017 European urology congress (EAU) 2017年3月24日 London (UK)
- 2) 松川宜久 実臨床における男性の非神経因性低活動膀胱の特徴について 第23回日本排尿機能学会 2016年12月8日 東京国際フォーラム(東京都千代田区)
- 3) 松川宜久 男性の低活動膀胱について 第23回日本排尿機能学会 2016年12月7日 東京国際フォーラム(東京都千代田区)
- 4) Matsukawa Y. Effects of withdrawing the alpha-1 blocker from alpha-1 blocker plus 5-alpha-reductase inhibitor combination therapy on patients with benign prostatic hyperplasia from the perspective of urodynamic study. 2016 America urology congress (AUA) 2016年5月7日 San Diego (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松川 宜久 (MATSUKAWA Yoshihisa)
 名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
 研究者番号: 30378145

(2) 研究協力者

山本 徳則 (YAMAMOTO Tokunori)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号: 20182636

舟橋 康人 (FUNAHASHI Yasuhito)
 名古屋大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号: 70534824