

令和元年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：2016～2018

課題番号：16K11043

研究課題名(和文) 骨髄および脂肪由来細胞を用いた尿道括約筋様構造体による機能的尿道括約筋の再生

研究課題名(英文) Biofabricated mesenchymal cell structures regenerate functional urethra

研究代表者

中沢 昌樹 (Masaki, Nakazawa)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：60721040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：尿失禁は、日常生活、社会活動において、多くの支障を及ぼすとともに、高齢化社会を迎える本邦では、尿失禁治療開発は重要課題である。われわれは、脂肪組織由来細胞からバイオ3Dプリンターを利用して立体型構造体を用いた腹圧性尿失禁の新規治療法の開発を考案した。ウサギ脂肪由来細胞から作製したC型構造体を凍結傷害尿道に自家移植した。移植構造体の中で、脂肪由来細胞の横紋筋、平滑筋、神経細胞や血管内皮細胞等の分化が認められた。さらに、構造体を構成している細胞からの細胞成長因子などの発現が認められた。これらの結果から、構造体移植による新規尿失禁治療の可能性を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で作製した立体型組織構造体(C型構造体)移植は、腹圧性尿失禁に対する新規治療として可能性がある事が示唆された。本研究の学術的意義として、単一の脂肪組織由来細胞から尿道再生を可能にする構造体を作製したこと、構造体を構成している細胞が、移植部位で尿管構成細胞である横紋筋、平滑筋、神経細胞や血管内皮細胞等への分化を示したこと、構造体を構成している細胞からの細胞成長因子などによって周辺組織が再生したこと、が挙げられる。高齢化社会を迎える本邦において、排泄ケア(尿失禁改善)は、健康寿命を考えた上で非常に大きな要因となることから、本研究は、社会的意義も大きく、社会貢献に寄与できると考える。

研究成果の概要(英文)：Stress urinary incontinence (SUI) decreases quality of life of patients. This study produced adipose-derived cell biofabricated structures to treatment for SUI. The biofabricated structures were autologously implanted into the frozen-injured urethra. After implantation, the cells within the implanted structure differentiated into skeletal, smooth muscle or nerve cells. In addition, the cells within the implanted structures secreted growth factor and cytokines. This study demonstrated that biofabricated adipose-derived cell structures might have potential to regenerate urethra by differentiating into muscles, blood vessels, or nerve cells and secretion of growth factors and cytokines.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：脂肪組織由来幹細胞 尿道再生 バイオ3Dプリンター 凍結傷害 自家移植 ウサギ

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

1. 研究開始当初の背景

尿失禁は、生命危機に直結するものではないが、Quality of Life (QOL)を著しく損ねる疾患であり、本邦では1993年時点に約400万人が罹患していると推定されている。尿失禁は、腹圧性尿失禁、切迫性尿失禁、溢流性尿失禁、機能性尿失禁、反射性尿失禁に分類される。これらのうち、腹圧性尿失禁は、尿道括約筋の機能障害により腹圧負荷時に尿が漏れる疾患である。腹圧性尿失禁は、いずれの年齢層でも起こりうる疾患ではあるが、特に高齢者においては、その罹患率は増加する。また、腹圧性尿失禁の要因を性別で見ると、女性では妊娠・出産が挙げられる。一方、男性では、前立腺肥大症や前立腺癌に対する根治的前立腺全摘除術によって尿道括約筋が損傷した、手術後合併症として発症する。

尿道括約筋には、蓄尿時には収縮、排尿時には弛緩するという2つの機能を有し、尿禁制における重要な役割を果たしている。この尿道括約筋機能が損なわれた腹圧性尿失禁に対する治療として、骨盤底筋訓練や α 2アドレナリン受容体作動薬(クレンブテロール塩酸塩)の薬物療法が挙げられるが、改善が認められないことが多い。外科的治療として、女性腹圧性尿失禁に対しては、尿道スリング手術が行われ好成績を示すが、異物を体内に留置することからスリング素材による膣びらんが副作用として発症することがある。一方、男性腹圧性尿失禁に対しては、傍尿道コラーゲン注入治療が行われていたが、治療持続効果が低いこと、治療用コラーゲン供給の停止などから、低侵襲的的外科的手術の選択肢が無くなった。そこで、人工括約筋植込・置換術が承認、保険適用になった。しかし、人工括約筋植込・置換術は、侵襲が大きく、異物である機器を体内に植込むことから術後合併症、植込機器の作動不良、故障が問題となっている。これらのことから、現在、**腹圧性尿失禁に対する有効な治療法の選択肢は非常に少ない**。本邦における超高齢化社会、前立腺癌の発症率の急増などの背景から、腹圧性尿失禁に対する治療開発は、極めて重要かつ喫急の課題であり、世界に先駆けた新規治療法の開発が必要である。

腹圧性尿失禁の新規治療法としての再生医療は期待される技術である。基礎研究において、研究分担者の今村は、凍結傷害を与えたウサギ尿道括約筋に骨髄由来細胞(文献)、あるいは、脂肪由来細胞(文献)の直接注入移植によって、尿道括約筋の再生を示した。また、尿道括約筋の再生にともない漏出時圧(Leak Point Pressure)が有意に増大する、すなわち、尿が漏れにくくなることを報告した。(図1)。一方、臨床においては、名古屋大学を中心に本学、金沢大学、獨協大学での多施設共同研究施設において、根治的前立腺摘除術後の尿失禁に対して、自己脂肪組織由来幹細胞を利用した尿失禁治療の医師主導型臨床試験が行われている。

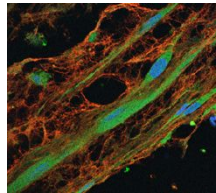


図1 移植した骨髄由来細胞の尿道括約筋を構成する横紋筋への分化

2. 研究の目的

本研究は、これまでの研究を基礎とした Tissue Engineering 技術を応用して、バイオ 3D プリンターで作製した尿道括約筋様構造体の新規腹圧性尿失禁治療への可能性を試みる。われわれは、ウサギの尿道括約筋に凍結傷害を与えて、尿が漏れやすくなった腹圧性尿失禁モデルを確立した。凍結傷害を与えた部位に自己の骨髄由来細胞、あるいは、脂肪由来細胞を直接注入移植すると、尿道括約筋が再生して、尿が漏れにくくなることを報告した(文献)。

しかし、細胞の直接注入移植には、次の3点の課題が残った。1)移植した細胞の生着率が非常に低い。2)培養した細胞を酵素処理や遠心処理で回収することから、移植時の細胞活性が低下する。3)回収過程で細胞が産生した細胞外基質などが消失する。これらの課題を解決するためにわれわれは、新規技術であるバイオ 3D プリンターで作製した立体型の尿道括約筋様構造体の利用を考案した。

現在、国内外で様々なタイプのバイオ 3D プリンターが開発されているが、本研究では、本邦で初めて市販されたバイオ 3D プリンター(レジェノバ、株式会社再フーズ)を利用した。本装置は、単一の細胞から形成される細胞凝集塊(スフェロイド)を1個ずつピックアップして、あらかじめコンピューターでデザインした通りに、剣山と呼ばれる針状の基板に差し込んで積層する。積層したスフェロイドを1週間程度培養すると、スフェロイド同士が融合する。その後、剣山を抜去すると、細胞から形成される立体型の構造体として扱うことができる。本研究は、このバイオ 3D プリンターを利用して、細胞の直接注入移植方法での課題は、ほぼ解決できると考えた。一方で、バイオ 3D プリンターで円筒状の構造体を作製して移植すると、術後に尿道狭窄の懸念があった。そこで、狭窄回避を目的とした円筒状の一部を開放した、独特の形を有するC型尿道括約筋様構造体(以下、C型構造体とする)を考案した。

本研究は、われわれが確立したウサギ腹圧性尿失禁モデルを用いて、自家脂肪由来細胞から作製したC型構造体の凍結傷害を与えた尿道括約筋への移植を試みる。C型構造体の移植によって、尿道括約筋組織が再生するのかどうか検討した。

3. 研究の方法

(1) ウサギ脂肪由来細胞の C 型尿道括約筋構造体の作製

本研究は、10 週齢雌 New Zealand White(NZW)を用いた。動物に麻酔をかけ、正中切開を行い、膀胱周辺の下腹部の脂肪組織(約 1g)を採取した。採取した脂肪組織を細断して、0.2%コラゲナーゼを用いた酵素処理を行った。脂肪組織由来の細胞を含む懸濁液を遠心分離して、脂肪成分と細胞を分離した。下層に集積した細胞をコラーゲンコート培養皿に播種して、初代培養を行った。1 週間の初代培養でコラーゲンコートした培養皿に接着、伸展した細胞を脂肪由来細胞とした。1つの構造体を作製するには、約 10^7 個の細胞が必要なので、1, 2 回継代培養によって細胞数を増やした。

培養を終えた脂肪由来細胞を回収して、U 字型 96 well プレートへ播種することによって、スフェロイドを形成させた(1well あたり 4.0×10^4 cells)。バイオ 3D プリンター(レジェノバ、株式会社サイフューズ)を利用して、形成したスフェロイドを C 型の円筒状に積層して、循環培養を経て、C 型構造体を作製した(図 2)。

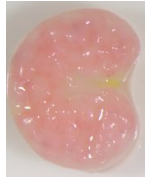


図 2 バイオ 3D プリンターで作製した C 型尿道括約筋構造体

(2) 自家 C 型尿道括約筋構造体の凍結傷害尿道への移植

ウサギに麻酔をかけ、正中切開から膀胱から尿道を露出させた。膀胱三角部から尿道上部にかけて、液体窒素を 60 秒噴霧して、凍結傷害を与えた。室温にて、凍結部位を融解させた後、約 1cm 切開して、自家細胞から作製された C 型構造体を移植した。尿道切開部を縫合した後、閉腹をして手術を終えた。対照群のウサギには、同様に凍結傷害を与えた後、C 型構造体を移植しない偽手術を行った。

(3) 自家 C 型尿道括約筋構造体の移植による尿道括約筋の再生評価

移植 2, 4 週間後に、移植部位を中心に膀胱三角部から下部尿道にかけて、組織を摘出して、4%パラホルムアリデヒドにて浸漬固定を行い、トリミングをした後、パラフィン包埋をした。組織切片の組織学的解析から、C 型構造体移植による尿道括約筋の再生を評価した。

4. 研究成果

(1) ウサギ脂肪由来細胞で作製した C 型尿道括約筋構造体

C 型構造体の特性を解析するために、移植実験に利用しなかった構造体の組織学的解析を行った。構造体を構成している脂肪由来細胞は、間葉系細胞マーカーである STR01 に陽性を示し、横紋筋や平滑筋のマーカーには、陰性であった。すなわち、構造体作製後も脂肪由来細胞は、作製前とほぼ同様な特性を有する細胞であることが示された。

(2) 自家 C 型尿道括約筋構造体の移植後の尿道、および、尿道括約筋の再生の解析

移植 2, 4 週間後、C 型構造体を移植しない偽手術を行った対照群のウサギ尿道は、狭窄を認めた。一方、C 型構造体を移植したウサギでは、明らかな狭窄を認めなかった(図 3)。

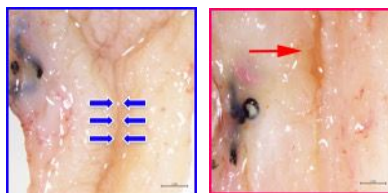


図 3 C 型尿道括約筋構造体移植後のウサギ尿道:(左、青矢印)対照群では、狭窄が認められた。(右、赤矢印)移植群では、狭窄を認めなかった。

移植した C 型構造体の周辺組織:

対照群のウサギ尿道において、凍結傷害を与えて偽手術を施行した部位では、尿道括約筋を構成する横紋筋細胞、平滑筋細胞や神経細胞が減少して、線維化が進行していた。一方、C 型構造体を移植したウサギ尿道では、移植部位での横紋筋細胞、平滑筋細胞や神経細胞が対照群と比較して増大していた。また、線維化も抑制される傾向を示していた。

移植した C 型構造体の内部:

移植する前の C 型構造体内部では、構造体を構成している脂肪由来細胞の横紋筋、平滑筋や神経細胞への分化は、認められなかった。しかし、移植後、C 型構造体内部の脂肪由来細胞は、

横紋筋、平滑筋や神経細胞に分化した。また、それらの分化した一部の細胞は、組織化を示していた。

(3) C型尿道括約筋構造体の移植による尿道再生の機序

C型尿道括約筋構造体の移植による尿道括約筋の再生の機序について解析をした。C型構造体を構成している脂肪由来細胞は、横紋筋や平滑筋への分化に関連する細胞成長因子である TGF- β 1、神経細胞への分化に関連する細胞成長因子である NGF、血管新生に関連する細胞成長因子である VEGF を発現していた。したがって、C型構造体を移植することによって、構造体を構成している細胞自身が尿道括約筋の一部に分化したこと、それらの細胞が産生した細胞成長因子などによって、周辺の細胞の分化が促進され(パラクリン効果)、全体として尿道括約筋が再生したのではないかと考察した。

(4) 本研究での課題

本研究の当初の計画では、尿漏出時圧(Leak Point Pressure; LPP)を測定して、尿道括約筋の機能を評価するものであった。しかし、対照群では、尿道狭窄が出現して LPP 値が高値になってしまい、正確な尿道括約筋としての機能を測定することができなかった。したがって、C型構造体移植による LPP の変化は、対照群と比較して、尿が漏れにくくなったことを明確にできなかった。本研究は、組織学的解析によって、尿道括約筋の再生について詳細に解析した。

(5) 本研究の成果

ウサギの尿道括約筋に凍結傷害を与えて、自己脂肪組織由来細胞で作製した C型構造体を移植すると尿道括約筋を中心とする尿道組織が再生された。また、その機序は、C型構造体を構成している脂肪由来細胞自身の分化と、パラクリン効果であることが考察された。今後、腹圧性尿失禁に対して、バイオ 3D プリンターで作製した構造体による新規治療の可能性が見いだされた。

引用文献

Imamura, Ishizuka, Kinebuchi, Kurizaki, Nakayama, Ishikawa, Nishizawa. Implantation of autologous bone marrow-derived cells reconstructs functional urethral sphincters in rabbits. *Tissue Engineering*, 17, 2011, 1069-1081

Gautam, Imamura, Ishizuka, Zhang, Yamagishi, Yokoyama, Minagawa, Ogawa, Kurizaki, Kato, Nishizawa. Implantation of adipose-derived cells reconstructs functional urethral sphincters in rabbit cryo-injured urethra. *Tissue Engineering Part A*, 20, 2014, 1971-1979

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Imamura, Ogawa, Minagawa, Nagai, Suzuki, Saito, Yokoyama, Nakazawa, Ishizuka. Combined treatment with a β_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

〔学会発表〕(計4件)

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

今村哲也、放射線照射傷害膀胱を用いたバイオ 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

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

今村哲也、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

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/urology/index.htm>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：今村 哲也

ローマ字氏名：IMAMURA, tetsuya

所属研究機関名：信州大学

部局名：学術研究院医学系

職名：助教

研究者番号（8桁）：00467143

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。