

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20164

研究課題名(和文) ヒト骨格筋由来幹細胞を用いたラット尿道括約筋の再生

研究課題名(英文) Regeneration of rat urethral sphincter using human skeletal muscle-derived stem cells

研究代表者

中島 信幸 (NAKAJIMA, Nobuyuki)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：20580319

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)：前立腺全摘除術の際に生じる尿道括約筋の損傷は、術後尿失禁の原因となる。筋肉・神経・血管系細胞への分化を有する骨格筋由来幹細胞(Sk-SCs)を用いて、この尿失禁治療を目標とした。ヒト腹直筋から採取、精製した骨格筋由来幹細胞(Sk-SCs)を、ヌードラット尿道括約筋損傷モデルに移植した。移植細胞は、CD34+/45-(Sk-34)とCD29+/34-/45-(Sk-DN/29+)として抽出した。移植群では、6週後に尿道内圧の回復を認めた。移植細胞は、骨格筋細胞、シュワン細胞、神経周膜細胞、血管系細胞に分化することが証明され、さらに移植細胞のパラクライン効果による活発な血管形成が証明された。

研究成果の概要(英文)：Postoperative damage of the urethral sphincter is a major complication of prostatectomy and causes urinary incontinence. Human skeletal muscle-derived stem cells (Sk-SCs) were applied to this damage. Sk-SCs were extracted from the human rectus abdominis, sorted as CD34+/45-(Sk-34) and CD29+/34-/45-(Sk-DN/29+). Urethral damage was induced by removing the muscle layer in nude rats. A mixture of Sk-34 and Sk-DN/29+ cells was applied on the damaged portion. Urethral pressure was evaluated to assess functional recovery. Cell engraftments and differentiations were detected. Expression of angiogenic cytokines was also analyzed. The transplantation group showed a higher functional recovery. Human Sk-SCs differentiated into skeletal muscle, Schwann cells, perineurium, and vascular cells. Active paracrine angiogenic cytokines were also detected with enhanced vascular formation in vivo. The Sk-SCs is useful for the reconstitution of postoperative damage of the urethral sphincter.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 尿失禁 骨格筋幹細胞 泌尿器 前立腺全摘除 パラクライン効果 Tissue Engineering
尿道括約筋

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌に対する外科的治療である前立腺全摘では、術式の改良等により失禁の発生率は低下しているものの、依然として10%程度と報告され、患者のQOL低下の主な要因となっている。これは、手術による尿道括約筋とその周囲の血管・神経ユニットの欠損に起因するものと考えられる。従って、尿道括約筋と周囲の神経・血管の再構築が可能となり、機能回復が得られれば、QOLの向上に大きく貢献できるものと考えた。

(1) 我々のグループの試み

マウス マウス、ラット ラット間移植
実験 われわれのグループは、2002年にマウス骨格筋間質より筋、血管内皮、脂肪細胞への分化能力を有する幹細胞群の同定・分離抽出・精製に成功した。さらにこれらの幹細胞群を用いた移植実験を進展させ、骨格筋細胞への分化に加えて、神経系の細胞にも分化して末梢神経線維を再構築する、即ち、移植後の生体(筋肉)内で、シュワン細胞へと分化し、ミエリンを構築、断裂した神経を再生・延長することを確認した。加えて、血管内皮細胞のみならず、血管系を構築するほとんどの細胞群(周皮細胞、平滑筋さらに繊維芽細胞)にも分化し、大小の血管そのものを構築することを明かにした。加えて、本研究に先行し、同幹細胞:Sk-34細胞(CD34+/45-)とSk-DN細胞(CD34-/45-)をラット骨格筋より抽出し、尿道周囲損傷モデルラットへの移植実験(ラットtoラット)を行い、これらの幹細胞が尿道括約筋及び神経血管束の神経-筋-血管をユニットとして再構築する能力を有することを形態学的、免疫組織化学的に確認した。さらに、仙骨部からの経皮的電気刺激にて尿道括約筋群を収縮させ、その時の尿道内圧変化を測定するシステムを開発し、損傷した尿道機能の評価を行った。その結果、幹細胞移植により尿道括約筋機能の有意な回復(約80%)が確認され、骨格筋由来幹細胞移植治療が術後尿失禁の治療に有用であることを示した。

ヒト骨格筋由来細胞を用いた研究:ヒト免疫不全動物実験

次のステップとして、われわれはヒト骨格筋由来幹細胞の分離・精製・増幅法を確立した。ヒト骨格筋由来幹細胞(Sk-SCs)が重度損傷骨格筋組織内において、マウスやラット同様に骨格筋及び周囲の神経・血管系細胞に分化し、筋・神経・血管系を再構築する能力を有することを証明した。即ち、ヒトSk-SCsの分化能力はマウスやラット骨格筋間質由来幹細胞とほぼ同等の結果であった。(Sk-34)しかし、ヒトでは筋系の幹細胞と神経・血管系の幹細胞分画がはっきりと分かれることが明らかとなった。即ち、ラット・マウスでは、Sk-34細胞とSk-DN(Sk-DN/29+)細胞分画は同一細胞系譜にあり、Sk-DN細胞がSk-34細胞の上流に位置する。さらに、両細胞分画には、筋衛星細胞

がほとんど含まれていない。これに対し、ヒトSk-DN/29+細胞の多くは、pax7陽性、つまり筋衛星細胞から構成されていること、さらにSk-34細胞分画には神経・血管系幹細胞が含まれ、筋系の幹細胞はほとんど含まれていないことが明らかとなった。

(2) 国内外における類似研究の動向

筋由来幹細胞の尿道機能不全に対する応用そのものは、これまで十分に検討されてきた。Strasserらは、培養した自家骨格筋間質由来幹細胞(本研究で用いた幹細胞とは抽出・分離・精製方法が大きく異なる)を尿失禁の患者に経尿道的に移植し、良好な機能回復が得られたことを報告している。さらに、同様の臨床応用の報告が欧米の複数グループから次々と行われ、いずれも大きな有害事象はなく、良好な治療成績を得ている。国内においても、名古屋大学のグループによる脂肪由来幹細胞を用いた、腹圧性尿失禁(SUI)に対する臨床応用が行われ、良好な結果を得ている。これらの研究結果より、自己由来幹細胞の尿道周囲への移植とその効果・安全性については、既にほぼ確立されていると考えられる。

しかし、移植細胞の生体内での生着や分化、そして組織の再建に対する具体的な寄与といった細胞運命的な詳細については、いまだ不明な点が多い。特に前立腺全摘後に生じる尿失禁は、尿道括約筋ならびに周囲の血管、神経の複合的な損傷により生じるものであることから、筋肉・神経・血管系への分化能力を有するSk-SCsの移植は有用なものとして推測された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分離・精製された、ヒト骨格筋由来幹細胞(Sk-SCs)であるSk-34とSk-DN/29+細胞を個別に培養・増幅し、免疫不全ラットの尿道損傷部位に移植して、移植細胞がどのような再生能力を示すかを検討することである。

重度に損傷した尿道括約筋の機能回復を、電気刺激を用いたin situの機能測定法で直接比較し、さらに移植細胞の生着と分化の証明を組織学的に試みた。さらに、移植細胞のパラクリン効果をmRNA及び発現タンパクレベルで検討した。本研究は、臨床応用を前提とした研究である。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨格筋由来幹細胞の分離・精製
ヒト骨格筋は腹腔鏡下前立腺全摘除の際に、カメラポートより約2g採取した。酵素処理(コラゲナーゼ)処理により抽出、フローサイトメトリーでCD34+/45-(Sk-34)とCD29+/34-/45-(Sk-DN/29+)分画として分離・精製した。その後、両細胞群を最適な条件下で、個別に2週間培養・増幅した。

(2) 尿道括約筋損傷モデルの作成と細胞移植
ヌードラットをレシピエントとし、尿道括約

筋損傷モデル（尿道腹側約 1/3 周の筋層を手術的に剥離）を作成した。個別に培養・増幅した Sk-34 と Sk-DN/29+両細胞群を移植直前に混合し、遠心によりペレット化、尿道損傷部位に直接貼付し、フィブリンゲルにより周囲をカバーした。実験群として細胞移植群（CT 群）、同量のフィブリンゲルのみを使用した群を非移植群（NT 群）とした。

（3）尿道機能評価

回復期（6 週間後）の機能評価として仙骨部からの経皮的電気刺激による尿道内圧（Urethral Pressure Profile; UPP）変化を測定した。吸入麻酔下に、下腹部正中切開を行い、膀胱頂部を切開し、そこから先端が前立腺部尿道に位置するようにカテーテルを留置した。カテーテルと膀胱頸部を絹糸で結紮、陰茎根部をクランプし尿道閉鎖空間を作成した。カテーテルには尿道内圧測定用の水柱と連続させ、尿道と水柱（10 cm H₂O の圧）の間に圧トランスデューサーを接続した。次に、仰臥位でラットを固定し、電気刺激装置に接続した自作の双極銀電極を用いて L6/S1 間レベルの皮膚に接着した。電気刺激（5V, 10Hz, 1.0-ms duration）を 5 秒間行い、尿道の収縮を誘発した。圧トランスデューサーは増幅器に接続し、リアレコーダーで記録を行った。刺激は 5-10 秒の間隔を空けて連続 3 回行い、これを 1 セットとし、約 3 分間の間隔を空けて、3 セット施行した。

（4）組織学的評価

細胞の生着と分化能については、免疫組織化学さらに免疫電子顕微鏡的検索を行った。細胞の分化能とパラクライン効果を調べるために、骨格筋・神経周囲細胞・血管細胞系統の特異的マーカーならびに神経栄養因子・血管因子の発現を RT-PCR 法により解析した。血管新生に関わるキーサイトカインのタンパクレベルでの発現については、抗体アレイキットを用いて解析した。

4. 研究成果

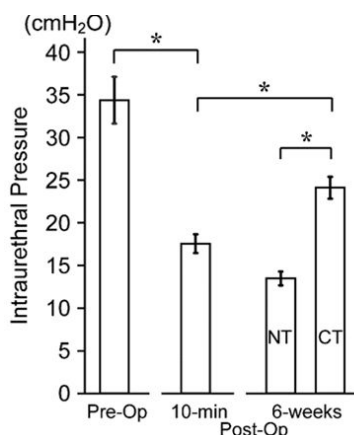
（1）尿道機能回復

尿道機能の回復は、術前、術後 10 分、6 週間後の UPP 測定で評価した。尿道損傷術後 10 分で、UPP は術前と比較して有意に低下した。術前の機能を表す UPP は 34.3±2.7cmH₂O (n=13) であり、実験的損傷後は約 50%低下し 17.6±1.1cmH₂O (n=13) であった。この結果は、作成した尿道損傷モデルが研究目的に適した損傷 + 機能低下モデルであることを示していた。これに対し、移植 6 週間後の時点で、CT 群は UPP 24.1±1.3 (n=22) と約 70%までの回復を認め、この結果は NT 群 (UPP 13.5±0.8, n=12, 約 39%) と比較して有意に高値であった。

（2）ヒト Sk-SCs の着床能

ヒト Sk-SCS (Sk-34 + Sk-DN/29+細胞) の着床能を調べるために HNA 抗体による染色を行った。厚さ 7μm の損傷尿道の横断切片中に多数のドナー由来の HNA 陽性細胞を

認められた。1 切片中の HNA 陽性細胞数の平均は 3523±243 個であった。HNA 陽性細胞は、筋線維間にも認められ、NT 群と比較して良好な筋線維再生が認められた。これらの筋線維のうち何本かは、HNA 陽性の核を有しており、ヒト由来細胞による筋線維形成が生じたことを意味しているものと推測された。



図：尿道内圧測定

術前、術後 10 分、術後 6 週間後の尿道内圧平均値。尿道内圧は術後 10 分において著明に低下（約 50%）した。6 週間後において、CT 群の尿道内圧は NT 群と比較して有意に高値であった。CT 群の値は、術後 10 分の値と比較しても、有意に高値であった。

（3）着床したヒト細胞の分化能

移植した HNA 陽性細胞の核を有する筋線維を認め、ヒト Sk-SCs 細胞の骨格筋細胞への分化が証明された。

また、HNA 陽性の赤い核を有するヒト細胞は、N200 陽性の神経軸索の近傍に多く認められた。加えて、HNA 陽性細胞は p75 にも陽性を示し、シュワン細胞への分化が証明された。

さらに、HNA 陽性細胞は小血管（RECA-1+）大血管壁にも密着するように存在していた。そのうち、いくつかの細胞は HNA と SMA の両方で陽性であった。この結果は、ヒト Sk-SCS が、小～大型血管と密接な関連性を持ち、それらの細胞の一部は血管平滑筋に分化したことを示唆するものである。

さらに、免疫電子顕微鏡を用いて、着床したヒト細胞のさらに詳細な解析を行った。筋衛星細胞において、HNA 陽性反応が認められた。同様に、HNA 陽性の核を有する骨格筋線維も確認された。

また、毛細血管周囲の HNA 陽性細胞が、血管周皮細胞、有髄神経軸索周囲の HNA 陽性細胞が、神経周膜細胞であることが確認された。

以上の結果より、移植したヒト Sk-SCs は、ラット尿道組織内において、骨格筋細胞、筋衛星細胞、血管平滑筋細胞、血管周皮細胞、

シュワン細胞、神経周膜細胞、及び線維芽細胞に分化することが明らかとなった。

(4) 移植細胞のパラクライン効果の検討

われわれは一連のヒト骨格筋由来細胞移植実験で、細胞移植群の血管形成において間接的な効果(パラクライン効果)が期待できることに気付いていた。実際、尿道の損傷部位では、多くの血管形成を認められた。この点について、血管の数をCT群とNT群において計測、比較を行った。CT群の尿道では良好な筋再生を認めたが、NT群ではわずかであった。続いて、RECA-1陽性の血管数をカウントし、その平均値を算出した。血管数はCT群において有意に高値であり(約3倍)、移植群の尿道損傷部(細胞生着部)において血管形成が促進していることを示していた。これらの血管には必ずしもHNA陽性細胞の付随が認められる訳ではなく、むしろ移植したヒトSk-SCsのパラクライン効果で形成されたレシピエント由来(ラット由来)の血管であると考えられた(RECA-1陽性)。

さらに、ヒトSk-SCsの移植前後におけるRT-PCRとタンパク解析を行った。まず、移植直前のSk-SCsにおける血管増殖系のサイトカイン、骨格筋分化マーカー、神経成長因子サイトカインのmRNA発現を検討した。全てのマーカーmRNAの発現を認めた。さらに、移植後の同mRNA解析でも、全てのマーカーmRNAの発現が認められ、移植後でもパラクライン効果が期待できることを示していた。加えて、血管形成に関連サイトカインである、アンジオジェニン、IGF binding protein (BP)-3、IL-8、MCP-1、MMP-9、PIGF(胎盤成長因子)そしてVEGFの相対的タンパク発現レベルは、Sk-34とSk-DN/29+の培養上清の混合液中において、明らかに上昇していた。血管増殖関連サイトカインでmRNA、タンパクレベル共通で上昇が認められた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

1. Nakajima N, Tamaki T, Hirata M, Soeda S, Nitta M, Hoshi A, Terachi T. Purified Human Skeletal Muscle-Derived Stem Cells Enhance the Repair and Regeneration in the Damaged Urethra. Transplantation. 2017 Oct; 101(10):2312-2320. doi: 10.1097/TP.0000000000001613. 査読有

2. Tamaki T, Hirata M, Nakajima N, Saito K, Hashimoto H, Soeda S, Uchiyama Y, Watanabe M. A Long-Gap Peripheral Nerve Injury Therapy Using Human Skeletal Muscle-Derived Stem Cells (Sk-SCs): An Achievement of Significant Morphological, Numerical and functional Recovery. PLoS One. 2016 Nov 15; 11(11):

e016639 査読有

[学会発表](計 3件)

1. 中島信幸, 玉木哲朗, 大瀧達也, 梅本達哉, 清水勇樹, 川上正能, 金伯士, 新田正広, 花井一也, 河村好章, 宮嶋哲. Human skeletal muscle-derived stem cells repair rat urethral damage with paracrine effect. 第106回日本泌尿器科学会総会. 2018.4 京都

2. Nakajima N, Tamaki T, Hirata M, Nitta M, Hoshi A, Terachi T. Reconstruction of experimental urethral damage in rat using human skeletal muscle-derived stem cells. American Urological Association Annual meeting 2016, 2016.5, San Diego USA

3. 中島信幸, 玉木哲朗, 増田真樹, 星昭夫, 清水勇樹, 金伯士, 花井一也, 河村好章, 野本剛史, 寺地敏郎. 尿道括約筋損傷モデルラットに対するヒト骨格筋由来幹細胞移植の効果. 第104回日本泌尿器科学会総会 2016.4 仙台

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 信幸 (NAKAJIMA, Nobuyuki)

東海大学・医学部・助教

研究者番号: 20580319