

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11177

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞を利用した多層化細胞シートを用いた下部尿路再生療法

研究課題名(英文) Tissue Engineering for lower urinary tract using multi-layered mesenchymal stem cell sheets

研究代表者

石塚 修 (ISHIZUKA, OSAMU)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：20184541

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)：実験動物の大腿骨の骨髄から幹細胞を採取し、シート状に培養増殖させて、積み重ねることによって、幹細胞の多層化を試みた。そのシートを実験動物の凍結傷害による膀胱、もしくは尿道に移植した。再生は通常の顕微鏡、および蛍光顕微鏡を用いて組織学的確認した。また、膀胱および尿道に対する尿流動態検査で機能的な再生を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義としては、骨髄幹細胞は自身の細胞を利用しているため、拒絶反応に対する配慮が不要であること、また、採取しただけの細胞では少量で再生を誘導することは不可能と考えられるため、一定期間、培養することによって増殖させた後に増殖を層状に行い、シート状に増殖させることによって、しかも多層構造を構築することにより、高度な機能をもつ膀胱、尿道などの管腔臓器の再生を試みている点である。また、再生された膀胱・尿道組織が十分な機能を持つかの検証も尿流動態検査を行い、生理的な状態で検証する点は独創的と考えられる。この研究成果は、何らかの理由により、膀胱・尿道機能を喪失した患者に光明を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow stem cells were taken from the animal femurs. The cells were cultured and proliferated as a cell-sheet. These sheets were piled up to be multi-layered sheets. This sheet was transplanted to cryo-injured bladder or urethra. We could find the morphological regeneration by normal and fluorescence microscope and the functional regeneration by urodynamic study for the bladder and urethra.

研究分野：再生医療

キーワード：再生療法 骨髄幹細胞 膀胱 尿道

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 何らかの理由で臓器またはその機能を喪失した場合の治療は永遠の課題である。近年、生命科学とテクノロジーの進歩により、再生医療は組織の誘導、そして最終的には組織・臓器の新生なども視野に入れたきわめて能動的な手段として登場してきている。

そのような再生医療の発展の中で、骨髄および脂肪幹細胞の多分化能が注目されるようになった。そのきっかけとしては、骨髄移植を受けた患者や実験動物の組織を調べてみると、ドナー由来の細胞が様々な臓器に存在することが発見され、骨髄に存在する幹細胞も各種臓器の代謝や損傷を補充する役割を担っているのではないかと考えられるようになってきたためである。

(2) 幹細胞の泌尿器科領域での応用については尿失禁に対する尿道括約筋の再生治療としての報告が散見される。米国のピッツバーグ大学グループの、最近の米国泌尿器科学会総会で発表された手法としては、針生検で患者の筋組織を得て、筋芽細胞の培養を行い、尿道横紋筋内に注入する手法が報告され、国内では既に数施設で臨床応用をめざした基礎的研究が行われている。例えば、前立腺全摘除術の時に採取したヒト外尿道括約筋からヒト外尿道括約筋衛生細胞の分離培養が大分大学より報告されており、筋の分化誘導には HGF は抑制インスリン様成長因子が促進すると報告されている(日泌尿会誌 97:377,2006)。また、名古屋大学からは腹圧性尿失禁症例を想定した自己皮下脂肪組織由来幹細胞傍尿道周囲注入療法をラットとブタに対して行い、有用性と安全性の基礎的検討を行った報告を認める(第7回泌尿器科再建再生研究会,2010)。その後、11名の前立腺手術後の尿失禁に対する臨床応用の報告も行われている(Gotoh et al. Int. J. Urol. 2014)。しかしながら、これらの報告は、いずれも筋芽細胞、線維芽細胞、脂肪細胞を利用して、尿道括約筋の再生を試みた報告であり、排尿に関する一連の器官としての再生を試みた報告でないのが現状である。

(3) われわれは、これまでにマウスおよびラビットを使用した骨髄幹細胞による膀胱および尿道括約筋の再生の可能性、および、よりよい再生を完成させるための組織学的な足場についての検証など、一連の研究を行い、その成果を広く公表してきている。

(Neurourol. Urodyn. 25: 562-563, 2006, Cell Transplantation, 17:267-278, 2008, Tissue Eng., 15:3367-3375, 2009, 18(15-16):1698-709, 2012, 21(9-10): 1600-1610, 2015)。現在は、その応用範囲を広げ、自己脂肪幹細胞を利用した研究も行っている(Sudha et al., Tissue Eng. Part A. 20(13-14): 1971-9, 2014)。本研究は、これまでのわれわれの研究の延長線上に位置づけられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的で、学術的、独創的な点としては、骨髄幹細胞、脂肪細胞を利用するため、比較的容易に採取できる細胞を利用していること、自身の細胞を利用しているため、拒絶反応に対する配慮が不要であること、また、利用するにあたっては、採取しただけの細胞では少量で再生を誘導することは不可能と考えられるため、採取した後に一定期間、培養することによって増殖させた後に、増殖を層状に行い、シート状に増殖させることによって、

しかも多層構造を構築することにより、これまでよりも、より高度な機能をもつ膀胱、尿道、尿管などの管腔臓器の再生を試みていることは、独創的と考えられる。

(2) 尿道の再生については、これまで、自己の口腔内粘膜を使用する方法や、自己の腸管を使用する報告は認めるが、粘膜採取や腸管利用は、本人への侵襲が大きく、とても低侵襲とは考えられない。尿道再生に、自己にとっても余分と思われる脂肪から遊離した脂肪幹細胞を利用して再生を試みることは、臨床上、意義深いと思われる。

(3) また、再生された膀胱・尿道組織が十分な機能を持ちうるのかについても、無麻酔覚醒下での膀胱内圧検査を行うというより生理的な状態で検証する点は独創的と考えられる。この研究成果は、何らかの理由により、膀胱・尿道機能を喪失した患者に光明を与えるものである。

3. 研究の方法

以下にその方法を手順に沿って述べる。

骨髄幹細胞もしくは脂肪細胞の採取と培養

ラット、ラビットの大腿骨骨髄より注射針で骨髄由来幹細胞を採取し 15% fetal bovine 血清および抗生剤附加の Dulberco Modified Eagle Medium の中に入れた。

これらの細胞を遠心分離した後に、Type collagen でコートした培養皿で 7 日間初代培養する。培養によって接着伸展した骨髄由来幹細胞を温度感受性培養皿で継代培養し、細胞シートを作製する手法を確立した。

また、これらの実験動物の皮下脂肪細胞からも同様な細胞採取を行い、脂肪幹細胞由来の細胞シートを作製できるか検討し、骨髄細胞と比較した場合のシート作製効率、有用性を比較検討した。

培養細胞のマーキング

培養途中の 5 日目の時点で、Lipofectamine 2000 Reagent を使用し、GFP 発現遺伝子を培養細胞内にトランスフェクションしてマーキングした。

多積層化した細胞シートを作製

ラット大腿部筋組織上の血管床にシートを重ねて、多積層化シートを作成した。

-1 膀胱・尿道括約筋障害ラットの膀胱、尿道括約筋、尿道、尿管への移植

漿膜側より -80 のアイスバーで障害を受けた膀胱モデルの膀胱へ、多積層化したシートを移植した。また、同様に膀胱内側より、-80 のアイスバーで内尿道括約筋の障害を受けた腹圧性尿失禁モデルの尿道対しても同様な多積層化したシートの移植を行った。

-2 組織学的な再生の確認

移植後 3 日目、14 日目に膀胱および尿道括約筋を取り出す。Monoclonal anti-GFP 抗体、平滑筋特異抗体を使用して免疫二重染色を行い、レーザー蛍光顕微鏡で移植した細胞の分化、つまり、筋層をはじめとする膀胱および尿道括約筋の再生を観察した。また、14 日目においては、Acta2 primer を使用して alpha smooth muscle actin を、Myh11 primer を使用して smooth muscle myosin heavy chain を、Real time RT-PCR 法にて定量測定し、幹細胞の膀胱平滑筋、内尿道括約筋への分化、尿道、尿管の再生についての評価を定量的に行った。

排尿器官としての機能的再生の確認

14 日目に膀胱および尿道括約筋を摘出しなかった別の移植実験動物群においては、覚醒下無拘束状態下での膀胱内圧検査を行うことによって、膀胱としての機能の再生の確認、また、腹圧時尿漏出時圧測定を行うことによって尿道括約筋としての収縮機能が再生したかを検証した。

4. 研究成果

(1) 実験動物の大腿骨髄より注射針で骨髄由来幹細胞を採取し 7 日間初代培養し、培養によって接着伸展した骨髄由来幹細胞を温度感受性培養皿で継代培養し、細胞シートを作製する手法を確立した。

(2) 培養途中の 5 日目の時点で、GFP 発現遺伝子を培養細胞内にトランスフェクションしてマーキングすることができた。

(3) 実験動物の大腿部筋組織上の血管床にシートを重ねて、多積層化シートを作成することができた。

(4) 漿膜側より -80 ℃ のアイスバーで障害を受けた膀胱モデルの膀胱へ、多積層化したシートを移植した。また、同様に膀胱内側より、-80 ℃ のアイスバーで内尿道括約筋の障害を受けた腹圧性尿失禁モデルの尿道対しても同様な多積層化したシートの移植を行った。

(5) 移植後 3 日目、14 日目に膀胱および尿道括約筋を取り出し、Monoclonal anti-GFP 抗体、平滑筋特異抗体を使用して免疫二重染色を行い、レーザー蛍光顕微鏡で移植した細胞の分化、つまり、筋層をはじめとする膀胱および尿道括約筋の再生が確認した。また、14 日目において Real time RT-PCR 法にて定量測定し、幹細胞の膀胱平滑筋、内尿道括約筋への分化、尿道、尿管の再生について確認することができた。

(6) なお、14 日目に膀胱および尿道括約筋を摘出しなかった別の移植実験動物群においては、覚醒下無拘束状態下での膀胱内圧検査を行い、膀胱としての機能の再生の確認、また、腹圧時尿漏出時圧測定を行うことによって尿道括約筋としての収縮機能が再生していることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Imamura, T., Shimamura, S., Ogawa, T., Minagawa, T., Nagai, T., Silwal Gautam, S., Ishizuka,	4. 巻 24
2. 論文標題 Biofabricated structures reconstruct functional urinary bladders in radiation -injured rat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tissue Eng. Part A	6. 最初と最後の頁 1574-1587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEA.2017.0533	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masaki, K., Sakai, M., Kuroki, S., Jo, JI, Hoshina, K., Fujimori, Y., Oka, K., Amano, T.,	4. 巻 10
2. 論文標題 FGF2 has distinct molecular functions from GDNF in the mouse germline niche.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem cell reports	6. 最初と最後の頁 1782-1792
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2018.03.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu, S., Yamamoto, T., Nakayama, S., Hirakawa, A., Kuwatsuka, Y., Funahashi, Y., Matsuoka, Y., Takanari, K., Toriyama, K., Kamei, Y., Narimoto, K., Yamanishi, T., Ishizuka, O., Mizuno, M., Gotoh, M.	4. 巻 17
2. 論文標題 Design of a single-arm clinical trial of regenerative therapy by periurethral injection of adipose-derived regenerative cells for male stress urinary incontinence in Japan: the ADRESU study protocol.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Urology	6. 最初と最後の頁 89-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12894-017-0282-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishikawa, M., Imamura, T., Nishizawa, O., Ishizuka, O.	4. 巻 65
2. 論文標題 Implantation of autologous bone marrow-derived cells improve erectile dysfunction in spontaneously hypertensive rats.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Shinshu Medical Journal	6. 最初と最後の頁 37-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imamura, T., Shimamura, S., Ogawa, T., Minagawa, T., Nagai, T., Silwal Gautam, S., Ishizuka, O.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Biofabricated structures reconstruct functional urinary bladders in radiation -injured rat bladders.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tissue Eng. Part A	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masaki, K., Sakai, M., Kuroki, S., Jo, JI, Hoshina, K., Fujimori, Y., Oka, K., Amano, T., Yamanaka, T., Tachibana, M., Tabata, Y., Shiozawa, T., Ishizuka, O., Hochi S, Takashima, S.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 FGF2 has distinct molecular functions from GDNF in the mouse germline niche.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem cell reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2018.03.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Gautam Silwal S, Imamura, T., Shimamura, M., Minagawa, T., Takashi, N., Manabu, U., Nakazawa, M., Ogawa, T., Ishizuka, O.
2. 発表標題 Biofabricated autologous adipose derived cell structures reconstruct cryo-injured urethra in rabbits
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the International Continence Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sudha, SG, Imamura,T., Shimamura,M., Minagawa,T., Nagai,T., Ueno,M., Saito,T.,Nakazawa, M., Ogawa, T., Isizuka,O.
2. 発表標題 Implantation of biofabricated C-type structures composed of autologous adipose derived cells restores cryo-injured urethra in rabbits
3. 学会等名 第15回泌尿器科再建再生研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村哲也、島村 満、ゴータム・スダ、皆川倫範、永井 崇、小川輝之、石塚 修
2. 発表標題 放射線照射傷害膀胱モデルを用いた骨髄由来細胞立体構造体の移植による膀胱再生.
3. 学会等名 第15回泌尿器科再建再生研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Imamura,T., Ogawa,T., Minagawa,T., Nagai,T., Sudha,G., Saito,T., Shimamura,M., Hatakeyama,N., Nakazawa,M., Ishizuka, O.
2. 発表標題 Biofabricated bone marrow-derived cell patches restore structure and function of radiation-injured urinary bladder in rat.
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sudha, S.G., Imamura, T., Shimamura, M., Minagawa, T., Nagai, T., Ueno, M., Saito, T., Nakazawa, M., Ogawa, T., Ishizuka, O.
2. 発表標題 Implantation of bio-fabricated autologous adipose-derived cell structure into cryo-injured urethra of rabbits.
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村哲也、島村 満、Sudha Gautam、道面尚久、永井 崇、皆川倫範、小川輝之、中沢昌樹、松岡大輔、石塚 修
2. 発表標題 放射線照射傷害膀胱への骨髄由来細胞から作成した立体組織の移植による機能的な膀胱再生.
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村哲也、島村 満、皆川倫範、ゴータム・スダ、齊藤徹一、小川輝之、中沢昌樹、石塚 修
2. 発表標題 骨髄由来細胞から作製した立体構造体を用いた放射線照射傷害膀胱の機能的な膀胱の再生への試み。
3. 学会等名 第14回泌尿器科再建再生研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今村哲也、島村 満、島山奈々美、ゴータム スダ、永井 崇、小川輝之、皆川倫範、齊藤徹一、鈴木都史郎、中沢昌樹、石塚 修
2. 発表標題 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障害膀胱の機能的な膀胱再生への試み。
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	今村 哲也 (Imamura Tetsuya) (00467143)	信州大学・学術研究院医学系・助教 (13601)	