

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：15101
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2020
 課題番号：17K11182
 研究課題名(和文) 脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた細胞シートによる排尿筋低活動治療の確立

 研究課題名(英文) Adipose-derived stem cell sheet transplantation therapy for detrusor underactivity

 研究代表者
 武中 篤(TAKENAKA, Atsushi)

 鳥取大学・医学部・教授

 研究者番号：50368669
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、膀胱凍結傷害によるラット排尿筋低活動モデルに対する脂肪幹細胞シートの有効性を検討した。凍結傷害作成3日後に、脂肪幹細胞シートを傷害部位に貼付し、凍結傷害10日後に膀胱内圧測定等を行った。膀胱内圧測定では、尿溢流発症率が凍結傷害+脂肪幹細胞シート貼付群において有意に減少した。凍結傷害+脂肪幹細胞シート貼付群のvascular endothelial growth factorおよびhepatocyte growth factor遺伝子は有意な発現上昇を認めた。脂肪幹細胞シートは排尿筋低活動を部分的に回復する可能性があることが示唆された。今後、国際学術誌での発表を予定している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下部尿路機能障害に対する新規治療薬および治療法開発の重要性は高齢化に伴い益々高まっており、排尿筋低活動に関わる研究は今後最も重要視される領域の一つである。国内外で下部尿路機能に関わる受容体や神経伝達物質に関する研究が盛んに行われている。しかし、排尿筋低活動に関しては侵襲を伴う清潔間欠導尿が標準的治療法であり、その他に確立された治療法が存在せず、安全で長期的に安定した治療成績が得られる治療法の開発が求められている。本研究成果は、根本的な治療法が確立されていない排尿筋低活動に対する再生医療を用いた治療に関する研究の重要な基盤になり得ると考えている。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of adipose-derived stem cell sheet on a rat detrusor underactivity model due to cryoinjury. A cryoinjury of detrusor was induced by placing chilled aluminum rod. Adipose-derived stem cell sheet was attached on day 3 after cryoinjury. We performed cystometrogram on day 10 after cryoinjury. On cystometrogram, urine overflow during cystometrogram in the cryoinjury group was improved by the application of cystometrogram sheets. Real-time polymerase chain reaction testing showed a statistically significant increase in vascular endothelial growth factor gene and hepatocyte growth factor gene in cryoinjury + adipose-derived stem cell sheet group. According to our findings, the cryoinjury of rat detrusor models myogenic detrusor underactivity, was partially reversed by the application of adipose-derived stem cell sheet.

研究分野：下部尿路機能障害

キーワード：排尿機能 再生医療 生理学 排尿筋低活動 脂肪幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、下部尿路機能障害が生活の質 (QOL) を大きく低下させることが注目されている。その中でも、排尿筋低活動は QOL を低下させるだけでなく、尿路感染症や腎機能障害などの他の疾患を誘発すると言われている。

(2) 多発性硬化症、パーキンソン病、認知症、脊髄疾患、糖尿病などの疾患や、根治的前立腺全摘除術や広範な子宮摘出術などの骨盤手術が排尿筋低活動を引き起こす可能性がある。その他、向精神薬などの薬物、麻酔、便秘、日常生活動作の低下など多くの危険因子が報告されている。

(3) 排尿筋低活動の診断や治療は難しく、十分な基礎研究や臨床研究は行われていない。実際、排尿筋低活動の治療には、コリン作動薬による薬物療法が考えられるが、十分なエビデンスのある薬物療法がないのが実状である。そのため、一定量の残尿がある場合には、清潔間欠自己導尿や尿道カテーテル留置などを検討する必要がある。そのため、排尿筋低活動に対する新たな治療法の開発が重要な課題と考えられている。

(4) 再生医療は臓器移植に代わる新しい医学分野として発展してきており、再生医療に用いる幹細胞として間葉系幹細胞 (MSC) が注目を集めている。MSC はさまざまな組織より採取できることが利点となる。近年、骨髄以外の組織に存在する間葉系幹細胞が次々と発見されている。泌尿器科領域においても、膀胱再生を目的とした革新的な治療戦略を提供できる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題では、排尿筋低活動モデルとしてラット膀胱凍結傷害モデルを用いて、脂肪由来幹細胞 (ASC) シートの排尿筋低活動への効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) 動物実験および遺伝子組換え実験のプロトコールは鳥取大学研究推進機構より承認を得た (32-027, 20-Y-23)。すべての実験は鳥取大学が定めるガイドラインに従って実施した。

(2) ASC シート作製には雄 Lewis ラットを用いた。GFP を発現する ASC シート作製には CAG プロモーターの制御化で全身の組織細胞に GFP を発現する雄 Lewis ラット (LEW-Tg (CAGEGFP)1Ys) を用いた。

(3) ASC シートを移植する対象には 10 週齢の成体雌 Lewis ラットを使用した。すべてのラットは 12 時間毎の明暗周期で、食物ペレットおよび水道水は自由摂食として、標準的な実験条件下で飼育した。

(4) 膀胱内圧測定などを行うにあたり、ラットを、膀胱凍結傷害を与えた後に ASC シートを傷害部位に貼付する群 (凍結傷害 + ASC シート群) 膀胱凍結傷害を与えるが ASC シートは貼付しない群 (凍結傷害群) 手術手技は同様に行うが凍結傷害を与えず、ASC シートも貼付しない群 (シャムオペレーション群) いずれの処置も行わない群 (コントロール群) の 4 群に分けた。

(5) ASC シートは雄 Lewis ラットの鼠径部皮下脂肪組織から分離作製した。採取した脂肪組織を PBS(-) で洗浄し、可及的に血管や結合組織などの非脂肪組織を除去した。その後に脂肪組織を細分化し、コラゲナーゼタイプ Ⅱ にて 37℃、60 分震盪させて組織の消化処理を行った。基礎培地には高グルコース ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM) に 20% 濃度の胎仔牛血清 (Fetal Bovine Serum: FBS) 抗生剤を添加したものを使用した。脂肪組織を消化処理後、細胞成分を 100µm のフィルターで濾過し 2500rpm、5 分にて遠心処理を行い、沈殿した細胞ペレットを攪拌し、基礎培地にて 37℃、5% CO₂ の条件下で 35-mm temperature-responsive culture dishes (UpCell, Cell Seed Inc., Tokyo, Japan) を用いて培養を行った。培養によって接着進展した脂肪由来幹細胞を継代培養し、ASC シートを作製した。

(6) ASC シート移植の 3 日前に、膀胱に対して凍結傷害処置を行った。まず、雌 Lewis ラットを 4% 濃度のイソフルランで麻酔導入し、2% で麻酔を維持した。仰臥位として下腹部正中に小切開をおいた。経尿道的にカテーテル (PE-10) を挿入し膀胱内に生食を注入し、膀胱を膨らませた状態で、ドライアイスにて冷却した直径 8mm のアルミ棒を膀胱前壁に 30 秒間接触させて凍結傷害処置を行った。シャムオペレーション群では、同様に膀胱を露出させて生理食塩水を注入するだけで凍結障害は与えなかった。

(7) 傷害手術から3日後に、上記と同様にイソフルランを用いてラットに麻酔をかけてから下腹部正中切開をにおいて膀胱傷害部位を露出した。その後、経尿道的にカテーテル(PE-10)を挿入し膀胱内に生理食塩水を注入し膀胱を充満した。ASCシート移植群については、膀胱を膨らませた状態で凍結傷害部にASCシートを貼付した。凍結傷害群およびシャムオペレーション群も同様に、膀胱を再度露出して生理食塩水を膀胱に注入するが、ASCシートの貼付は行わなかった。これらの手術の7日後に膀胱内圧検査を行った後にラットを安楽死させ、膀胱を摘出して組織学検査とRT-PCR検査を行った。

(8) ASCシート貼付7日後(凍結傷害10日後)に膀胱内圧測定を行った。イソフルランを4%で導入し2%で維持し麻酔を行った。膀胱圧測定のためにポリエチレンカテーテル(PE-60)を膀胱内腔に挿入して縫合糸で固定した。続いて、ポリエチレンカテーテル(PE-10)を内頸静脈に挿入して縫合糸で固定して経静脈ルートとした。手術後、イソフルラン麻酔をウレタン麻酔(0.75 g/kg)に変更し、必要に応じて追加量の麻酔薬(0.1g/kg/注射)を経静脈的に投与した。生理食塩水を膀胱内に0.04 mL/minの速度で連続的に注入し、数回にわたって単回の膀胱内圧を記録した(図1)。

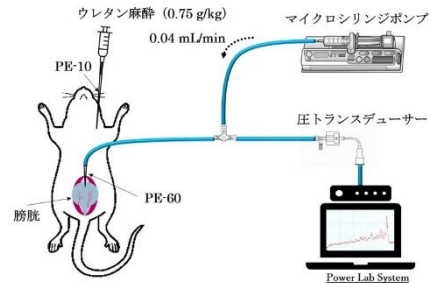


図1 膀胱内圧測定

(9)膀胱内圧施行後に、膀胱を摘出しヘマトキシリン&エオジン(HE)染色およびマッソントリクローム染色を行った。

(10)ASCシートの生着および分化を確認するため、GFPを発現するASCシートを作製した。雄LEW-Tg(CAGEGFP)1Ysラットの鼠径脂肪組織から同様の方法でASCシートの作製を行った。雌Lewisラットに凍結傷害を与えて3日後にGFPを発現するASCシートを膀胱に移植した。移植後の3日後、7日後、14日後、21日後、28日後にラットを安楽死させ、腹部を切開し蛍光実体顕微鏡で観察し、ASCシートの生着を励起光下で確認した。

4. 研究成果

(1)膀胱内圧測定では、各群とも膀胱内圧および注水量に有意差はみられなかったが、シート貼付群では残尿量の有意な改善を認めた($p < 0.001$)(図2および3)。

(2)膀胱内圧測定では、凍結傷害群でみられた尿溢流について、凍結傷害+ASCシート群では有意な改善を認めた($p=0.01$)(図2および3)。

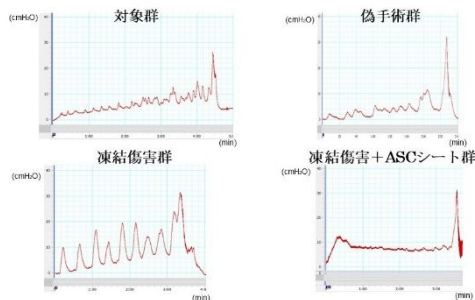


図2 各群の膀胱内圧測定図

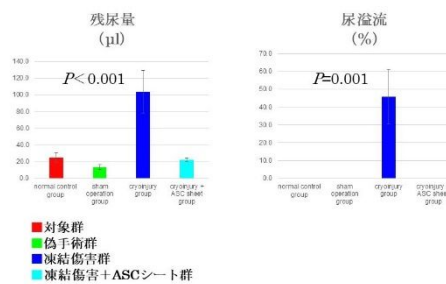


図3 膀胱内圧測定: 残尿量・尿溢流

(3)RT-PCR検査では、Vascular Endothelial Growth Factor 遺伝子 ($p < 0.01$) および Hepatocyte Growth Factor 遺伝子 ($p < 0.05$) が、凍結傷害+ASCシート群では有意に増加した(図4)。

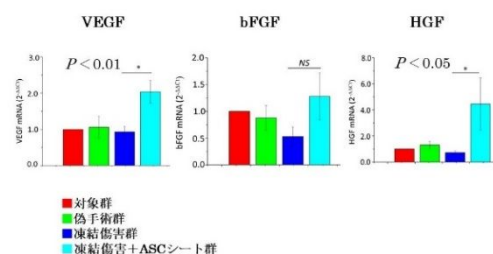


図4 RT-PCR

(4)免疫組織染色では、貼付後7日目以降でGFP発現ASCシートはvWF陽性であることが示され、内皮細胞に分化した可能性が示唆された(図5)。

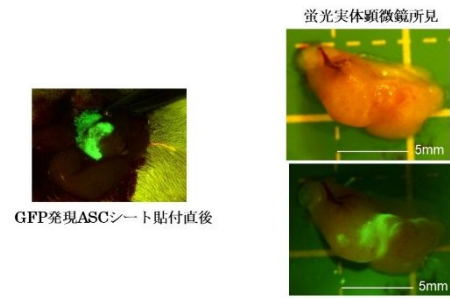


図5 ASCシートの生着・分化の確認

(5)ASCシートが早期から血管内皮細胞へ分化するとともに、移植細胞から分泌される増殖因子により、ASCシートは排尿筋低活動を部分的に回復する可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寺岡祥吾、本田正史、Panagiota Tsounapi、弓岡徹也、岩本秀人、Peili Li、森實修一、引田克弥、久留一郎、武中 篤
2. 発表標題 凍結障害によるラット排尿筋低活動モデルに対する脂肪由来幹細胞シートの治療効果の検討
3. 学会等名 第18回泌尿器科再建再生研究会
4. 発表年 2021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	本田 正史 (HONDA Masashi) (20362890)	鳥取大学・医学部・准教授 (15101)	
研究分担者	久留 一郎 (HISATOME Ichiro) (60211504)	鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------