

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09187

研究課題名(和文) 骨格筋間質由来幹細胞移植による膀胱機能障害に対する新治療法の開発

研究課題名(英文) The establishment of a novel treatment in neurogenic bladder by the transplantation of the stem cells derived from the skeletal muscle stroma

研究代表者

星 昭夫 (Hoshi, Akio)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：90453711

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)：本研究は「骨格筋間質由来幹細胞移植が、膀胱機能障害に対して、神経、血管の再構築を介して膀胱機能障害が改善する」という仮説の検証を目指すものである。

本研究では新たな下部尿路障害モデルを確立した上で幹細胞移植実験を行う予定であったが、COVID-19感染拡大に伴い実験計画が大きく遅れ、新しいモデルの確立には至らなかった。このため、別の新たなモデルとして下部尿路放射線照射モデルの確立を目指している。それに先立ち放射線照射後の下部尿路症状の発生に関する臨床基礎データを解析し、照射時刻による差がある事を見出した。現在、当院放射線腫瘍科研究室に助言を仰ぎ、新しい下部尿路放射線照射モデルの作成を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は「骨格筋間質由来幹細胞移植が、膀胱機能障害に対して、神経、血管の再構築を介して膀胱機能障害が改善する」という仮説の検証を目指すものである。

近年放射線治療の進歩に伴い、前立腺癌や膀胱癌の放射線治療の適応が広がっているが、副作用として膀胱機能障害・下部尿路症状がQOLを低下させている。効果的な治療方法がないのが現状であり、新しい疾患モデルとして膀胱放射線照射モデルの確立を目指した。それに先立ち前立腺癌放射線照射後の下部尿路症状の発生に関する臨床基礎データを解析し、照射時刻による差がある事を見出した。照射時刻を一定としたモデルの作成によって、幹細胞移植の可能性につき検討しうる土台となる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to test the hypothesis that "skeletal muscle-derived stem cell transplantation improves bladder dysfunction through remodeling of nerves and blood vessels for bladder dysfunction."

In this study, we planned to establish new models of lower urinary tract disorder and conducted stem cell transplantation experiments on these models. However, the initial experimental plan was significantly delayed due to COVID-19 pandemic. Therefore, we have aimed to establish a lower urinary tract radiation model as another model. Prior to this study, we analyzed clinical data on the lower urinary tract symptoms after radiation therapy for the basic information and found that there was a significant difference depending on the irradiation time. Currently, we are in the process of conducting an experiment to create the new radiation model with the advice of the laboratory of radiotherapy in our institute for the skeletal muscle-derived stem cell transplantation.

研究分野：再生医療

キーワード：骨格筋間質由来幹細胞 膀胱機能障害病態モデル 下部尿路放射線照射モデル 幹細胞移植

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

尿路への体性幹細胞移植は広く行われており、国内外ではすでにヒトへの臨床応用が行われている。Strasser らは培養した自家骨格筋間質由来幹細胞(本研究で用いる幹細胞と異なる)を尿失禁の患者に経尿道的に移植し、大きな有害事象はなく、良好な治療成績を得ている(Strasser, 2007)。さらに本邦では、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に対する臨床応用が行われ、良好な結果を得ている(Yamamoto, Int J Urol 2012)。

一方、膀胱機能障害に対し幹細胞移植が有用であったとの報告は動物モデルであっても少ない。われわれは、筋-神経-血管をユニットとして再生する多能性を有している骨格筋間質由来幹細胞(Tamaki, J Cell Biol, 2002; Tamaki, Exp Cell Res, 2003)を機械的膀胱損傷モデル(術後膀胱機能損傷モデル)に移植し、膀胱周囲の神経・血管を再構築することを形態学的、免疫組織化学的に確認した。これにより、尿道のみならず膀胱周囲においても本細胞移植治療が膀胱機能障害に有用であることを示した(Nitta, Transplantation 2010)。この多能性幹細胞を移植治療に用いる事で、今までは困難であった神経因性膀胱(過活動膀胱及び低活動膀胱)への新しい治療法となることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究は「骨格筋間質由来幹細胞移植が、下部尿路閉塞、血流障害や代謝障害による膀胱機能障害に対して、神経、血管の再構築を介して膀胱機能障害が改善する」という仮説を検証しつつ、新規膀胱機能障害治療法の開発を目指すものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨格筋間質由来幹細胞の分離・純化、移植方法の改良

本幹細胞は移植後の形態学的、免疫組織化学的検討のため、GFP トランスジェニックラットをドナーとする。ドナー下肢筋肉を酵素処理により細胞を分離、細胞表面抗原(CD29, 34, 45)、セルソーター(FACS)を用いたフローサイトメトリー法を基本として純化する。この分離・純化方法及び基本培養法に関してはすでに確立しており、どの状態が最も移植に適しているか等、明らかになっている。この他、移植により適した方法の改良も併せて行う。

#### (2) 膀胱機能障害病態モデル動物の確立

下部尿路閉塞モデル: Sprague-Dawley rat (SD ラット) に対し麻酔下に尿道を部分的に結紮する。  
骨盤血管うっ血モデル: SD ラットに対し麻酔下に下腹部切開し両総腸骨静脈を結紮、あわせて両側子宮動静脈、子宮角も一塊に結紮する。  
STZ 誘発糖尿病モデル: SD ラットに対し STZ 45mg/kg を腹腔内投与し、STZ 投与 5 日後に尾静脈から全血を採取して血糖値を測定し、血糖値が 350mg/dl 以上を糖尿病発症と診断する。

#### (3) 病態モデル動物の評価

幹細胞移植群(レシピエント群)とコントロール群に分けて比較する。レシピエント群は各モデル作成と同時にハミルトンシリンジを用いて本幹細胞を膀胱壁に移植する。両群とも 4 週及び 12 週(慢性期)の時点で下記の評価を行う。

組織学的検討: 麻酔下 in-situ の状態で実体蛍光顕微鏡を用いて GFP 陽性細胞・組織の着床状態を解析する。その後、ラットをパラホルムで灌流固定し移植部分を摘出・固定後凍結切片を作成、各種抗体(-Smooth muscle actin: 平滑筋マーカー、GFAP: シュワン細胞マーカー、neurofilament-200: 神経軸索マーカー等)及び蛍光顕微鏡を用いた免疫組織化学的検索を行う。  
膀胱血流解析: 2次元レーザー血流計を用いた emptied bladder blood flow (BBF) 法にて膀胱血流解析を行う。

膀胱機能解析: 覚醒下膀胱内圧測定にて排尿間隔(Intercontraction Interval; ICI)、Base pressure (BP)、Pressure threshold (PT)、amplitude、voiding volume (VV)、Residual volume (RV)、non voiding contraction (NVC) を測定する。また、各フェーズでの膀胱 muscle strip を用いて organ bath による排尿筋収縮実験を行い排尿筋収縮力についても評価する。

排尿行動解析: 代謝ケージによる排尿行動解析を行う。

膀胱機能関連因子の評価: 幹細胞移植による治療効果判定のため、ROS や NO、PGE2、NGF 等の発現を尿や組織検体を用いた Elisa、RT-PCR、Western blot、免疫染色や測定キットにて評価する。線維化に関しては Masson trichrome 染色による線維占有率も評価する。また、本研究では、いずれのモデルでも明らかでない、慢性期での解析を加えることで、過活動膀胱から低活動膀胱に至る膀胱機能障害の一連の流れを明らかにする。

#### 4. 研究成果

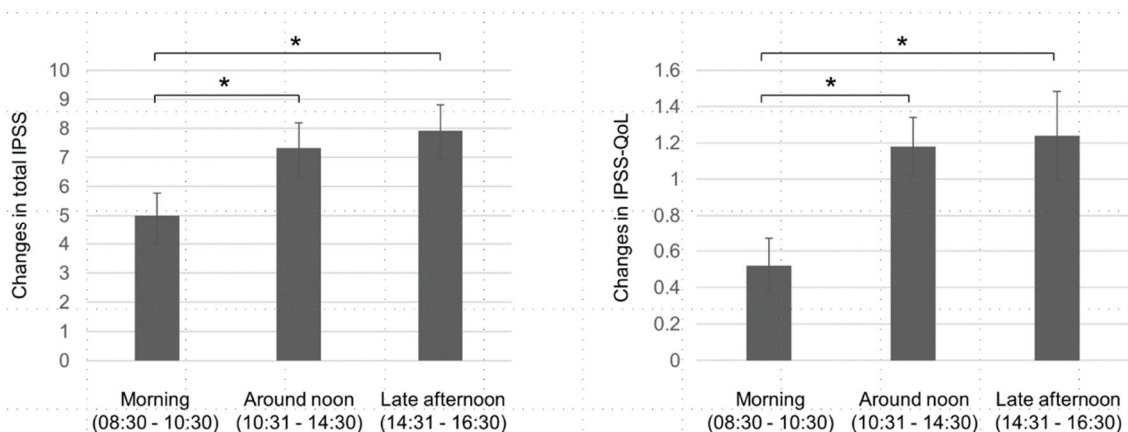
##### (1) 骨格筋間質由来幹細胞の移植方法の改良

術後尿路機能損傷モデルに対する移植実験では、幹細胞を直接損傷部に注入する方法にて良好な治療成績を報告してきた(Hoshi, Transplantation 2008; Nitta, Transplantation 2010)。一方、神経因性膀胱など、膀胱の広範な損傷を伴う膀胱損傷モデルでは、幹細胞をどの部位に注入するか等の問題が多く、直接注入する以外の新しい移植方法の開発も併せて必要であると考えられた。われわれは、より広い範囲で移植幹細胞をはたらかせる移植方法として、生体吸収性ポリグリコネートフェルトと幹細胞を併せて移植する方法を開発した(Kazuno, J Clin Med 2018)。この方法は他の臓器損傷に対する移植実験ではあるが、広範な損傷が想定される膀胱機能障害病態モデルへの幹細胞移植方法として応用可能であり、広範囲の膀胱組織に幹細胞が着床することが期待できる、より適した方法であると考えられた。

##### (2) 膀胱機能障害病態モデル動物の確立

当初、膀胱機能障害病態モデル(下部尿路閉塞モデル、骨盤血管うっ血モデル、STZ 誘発糖尿病モデル)動物の確立を目指した。しかし、これら当初予定していたモデルの確立が大きく遅れた。研究協力者である国際医療福祉大学の高岡准教授に助言を仰いだら、COVID-19 感染拡大による多施設との共同研究が大きく制限されたことも相まって、安定したモデルの確立には至らなかった。このため、新たなモデルとして令和元年度からは膀胱放射線照射モデルの確立を目指した。放射線照射は急性から亜急性の膀胱機能障害を生ずる。このため、先行研究で用いた術後機能障害モデル(急性の膀胱機能障害モデル)に近く、幹細胞移植治療の効果がより期待できると予想されたことから着想した。さらに、当院で膀胱癌や前立腺癌といった下部尿路癌に対する膀胱放射線治療を積極的に行っていることも考慮し、新たなモデルとして下部尿路放射線照射モデル確立を目指すこととした。

それに先立ち、放射線照射後の下部尿路症状の発生に関する臨床基礎データ解析を行った。当院にて前立腺癌陽子線治療を受けた168名を対象とした。評価項目として、照射前と照射最終週に国際前立腺症状スコア(IPSS)を取得した。照射時刻を8時30分~10時30分(朝)、10時31分~14時30分(昼)、14時31分~16時30分(夕)の3グループに分け、治療前後のIPSS変化量、IPSS-QOL変化量についての影響を、年齢、NCCNリスク分類、ホルモン治療の有無、照射線量、Clinical Target Volume (CTV)、糖尿病、IPSS重症度、下部尿路症状治療薬の有無、抗血小板薬の有無を因子にいれ、重回分析にて解析した。結果は、人数は朝(n=52)、昼(n=64)、夕(n=52)であり、年齢中央値はそれぞれ、68、67、68.5歳であった。IPSS合計の変化量はそれぞれ、 $5 \pm 0.77$ 、 $7.33 \pm 0.86$ 、 $7.92 \pm 0.87$ 、IPSS-QOLの変化量は、 $0.52 \pm 0.15$ 、 $1.18 \pm 0.16$ 、 $1.24 \pm 0.24$ であり、朝の照射時刻のみが有意な因子(  $\beta = -0.24$ ,  $p = 0.008$ 、  $\beta = -0.27$ ,  $p = 0.004$  )であった。以上から、照射時刻により下部尿路症状の発症に差があるところを見出した(下図。J Clin Med 2020)。



この臨床研究データから、放射線照射モデルに関しても安定した膀胱機能障害モデルを確立するには、照射時刻を統一する必要があることがわかった。現在、当院放射線腫瘍科の研究室にも助言を仰ぎ、安定したモデル作成を進めている。COVID-19 感染拡大の影響もあり研究協力者との共同研究が大きく制限されたことから、当初の実験計画を達成することはかなわなかったが、新たなモデルである下部尿路放射線照射モデルを早期に確立させ、幹細胞移植による治療効果を明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	木村 友和  (Kimura Tomokazu)  (10633191)	筑波大学・医学医療系・講師    (12102)	
研究分担者	小島 崇宏  (Kojima Takahiro)  (40626892)	筑波大学・医学医療系・准教授    (12102)	
研究分担者	河合 弘二  (Kawai Koji)  (90272195)	国際医療福祉大学・国際医療福祉大学成田病院・教授    (32206)	

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