

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16712

研究課題名（和文）腹直筋を移植細胞ソースとした骨格筋由来幹細胞による尿失禁治療

研究課題名（英文）Urinary incontinence treatment with skeletal muscle-derived stem cells using rectus abdominis muscle as a transplant cell source

研究代表者

中島 信幸（Nakajima, Nobuyuki）

東海大学・医学部・講師

研究者番号：20580319

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：大型動物としてブタを使用した研究では、ブタ骨格筋間質由来幹細胞は、マウス・ラットよりもヒトに近い系譜であることが明らかとなった。また、ブタスワイン白血球抗原の100%一致（兄弟間）および50%一致（親子間）のブタ同種移植実験では、50%および100%一致グループ間の治療効果に有意差は認めず、50%一致グループにおいて明らかな有害事象は認められなかった。この結果から、骨格筋間質由来幹細胞に対する免疫反応は比較的低いと考えた。また、ラット骨格筋間質細胞サイトカインを尿道括約筋損傷モデルラットに生体吸収性ハイドロゲルを用いて投与する研究により、サイトカインによる良好な尿道機能回復効果が証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非免疫抑制下ブタ同種移植実験の結果、SLA50%および100%の一致による治療効果に差はなく、50%グループにおいて明らかな副作用は認めなかったことは、骨格筋間質由来幹細胞の免疫原性が低く、同幹細胞が、自家移植のみならず、同種移植にも使用可能であることを示唆している。また、尿道損傷モデルラットに対する生体吸収性ハイドロゲルを用いた骨格筋間質細胞サイトカイン投与による研究では、細胞そのもではなく、細胞が分泌するサイトカインによる機能回復効果が証明された。臨床応用の面で、サイトカイン投与は幹細胞移植と比較し、免疫拒絶や安全性の面からハードルが低いと考えられ、今後の展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The study using pigs demonstrated that porcine Skeletal Muscle-Derived Stem cells (Sk-MSCs) are closer in lineage to humans than to mice or rats. In allogeneic transplantation experiments using swine leukocyte antigen (SLA) matching at 100% (between siblings) and 50% (between parent and offspring), there was no significant difference in therapeutic effects between the SLA 50% and 100% matching groups, and no noticeable adverse events were observed in the 50% group. Therefore, it was concluded that the immune response to Sk-MSCs is relatively low. Additionally, the study involving the administration of rat skeletal muscle-derived stromal cell cytokines using a bioabsorbable hydrogel in rat urethral injury models demonstrated a favorable recovery of urethral function due to the cytokines effect.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：再生医療 骨格筋間質由来幹細胞 尿失禁 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い、本邦でも前立腺癌患者は増加傾向にある。ロボット手術等の普及により、前立腺全摘術後の尿失禁は減少傾向にあるものの、依然として術後の難治性尿失禁に悩む患者は少なくない。現在、本邦では前立腺全摘後の難治性腹圧性尿失禁に対する脂肪幹細胞移植を用いた再生医療が保険適用を目指した臨床研究が行われている。

これまでに我々は、骨格筋間質由来幹細胞というオリジナルの幹細胞(血管、筋、神経への分化能を有する)を用いた腹圧性尿失禁に対する再生医療の実現を目指した研究を行ってきた。ヒト骨格筋間質由来幹細胞のヌードラット尿道損傷モデルへの移植により、良好な組織再生と機能回復を証明した。ヒト骨格筋由来幹細胞を用いた腹圧性尿失禁に対する治療は、前臨床段階にあるものの、幹細胞移植の倫理、制度、費用的なハードルは依然として高く、臨床応用までに解決すべき課題は依然として多い。そこで我々は、臨床応用を目指した幹細胞そのものを使用した移植研究と並行して、幹細胞培養液から精製したサイトカインを使用した組織再生研究を開始した。骨格筋間質細胞培養上清中には、組織再生に関する様々なサイトカインが含まれることが明らかになり、先行研究として、骨格筋間質細胞サイトカインによるマウス末梢神経再生促進効果について報告した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)骨格筋間質由来幹細胞の臨床応用を目指した大型動物における効果、安全性の検証。(2)骨格筋間質細胞培養上清に含まれるサイトカインを用いた尿道括約筋の再生の2点である。

3. 研究の方法

(1) 大型実験動物(ミニブタ)における移植効果、安全性の検討

緑色蛍光トランスジェニックマイクロミニブタ骨格筋から、骨格筋間質細胞を分離し、さらにフローサイトメトリーによってCD34+/45-分画(Sk-34細胞)とCD34-/45-/29+分画(Sk-DN細胞)にソーティングした。Sk-34細胞、Sk-DNの細胞培養(in vitro)と、ヌードマウス、ヌードラットの前脛骨筋、坐骨神経損傷モデルへの細胞移植(in vivo)によって検討を行った。細胞分化能についてRT-PCR、免疫組織化学、免疫電子顕微鏡を用いて検討した。また、ミニブタ-ミニブタの非免疫抑制下における同種移植実験では、ブタのSLA(Swine Leukocyte Antigen)について、完全一致(兄弟間)、50%一致(親子間)における移植効果の比較、安全性の検討を行った。

(2) ラット骨格筋間質細胞サイトカインのラット尿道損傷モデルへの移植実験

ラット下腿筋を酵素処理(コラゲナーゼ)処理し、骨格筋間質細胞を分離・精製した。培養開始1週間後に培養液を無血清培地に変更し、その24時間後に培養液を回収して遠心分離を行い、上清を得た。上清に含まれるサイトカインはマルチプレックス抗体アレイキットを用いて測定した。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、細胞移植群では、精製したサイトカインを生体吸収性ゼラチンハイドロゲル(MedGel)に吸収させ(MedGel 1mgあたりサイトカイン 10µL)、これを損傷部位近傍の骨盤内に留置することで、サイトカインの徐放を行った。このハイドロゲルは、正電荷と負電荷の2種類のものがあり、2種を同時に使用することで、サイトカインカクテル内の多種のサイトカインの徐放が可能となった。

尿道機能については、損傷前、損傷直後、損傷4週間後の移植群、コントロール群(非移植群)における尿漏出時圧(LPP)での評価を行った。麻酔下にラット下腹部を正中切開して膀胱を露出。膀胱頂部を切開し、カテーテル(8Frアトムチューブ)を挿入。膀胱頂部を糸で結紮してカテーテルを固定、膀胱を閉鎖した後に閉腹した。ラットは仰臥位で固定、膀胱頂部に固定したカテーテルを圧トランスデューサーに接続し、膀胱内圧を測定した。カテーテルから膀胱内に生理食塩水を注入し、外尿道口から生理食塩水が漏出した時点での注入量を膀胱容量とした。膀胱内を空にし、膀胱容量の80%の生理食塩水を再度膀胱内に注入し、基礎圧が安定したところで、下腹部に一定の圧力を徐々にかけ、生理食塩水の漏出が認められた時点の膀胱内圧を尿漏出時圧(LPP)とした。

4. 研究成果

(1) 大型実験動物(ミニブタ)における移植効果、安全性の検討

Sk-34細胞とSk-DN細胞の筋組織への分化能力は、Pax7およびMyoDの発現と筋線維の形成によって評価した(Figure 1)。その結果、筋線維への分化能は、Sk-34細胞よりもSk-DN細胞で高かった。これに対して、末梢神経および血管細胞系への分化能力はSk-34細胞で有意に高かった。特に、Sk-DN細胞は損

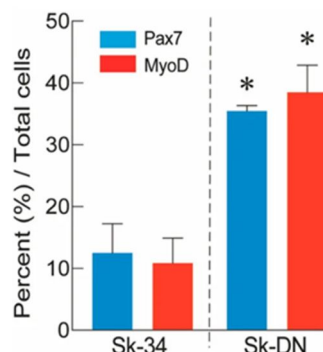


Figure1

Sk-34, Sk-DN細胞におけるPax7, MyoD陽性率

傷した神経に定着しなかったが、Sk-34 細胞は積極的に定着し、内神経膜/内周膜細胞、内皮細胞、および血管平滑筋細胞に分化した。これらは、以前にわれわれが報告したヒトの骨格筋間質由来幹細胞と同様の結果であった。したがって、ブタの Sk-34 および Sk-DN 細胞は、マウスよりもヒトに近い系譜であると考えられた。さらに、臨床応用を前提として、主要組織適合複合体 (MHC) 50% および 100% の一致による移植効果の差について検証した。スワイン白血球抗原 (SLA: Swine Leukocyte Antigen) クラス I ハプロタイプを同定し、ブタ骨格筋間質由来幹細胞を SLA100% 一致 (兄弟間) 50% 一致 (親子間) のブタ腓骨神経損傷モデルへ移植する同種移植実験を行った。いずれの移植実験においても、非免疫抑制下において、良好な腓骨神経修復と運動機能改善効果を認めた。50% および 100% の SLA の一致による治療効果には有意差はなく、50% グループにおいても移植による明らかな副作用は認めなかった。したがって、Sk-MSCs に対する免疫反応は比較的低いと考えられた。

(2) ラット骨格筋間質細胞サイトカインのラット尿道損傷モデルへの移植実験

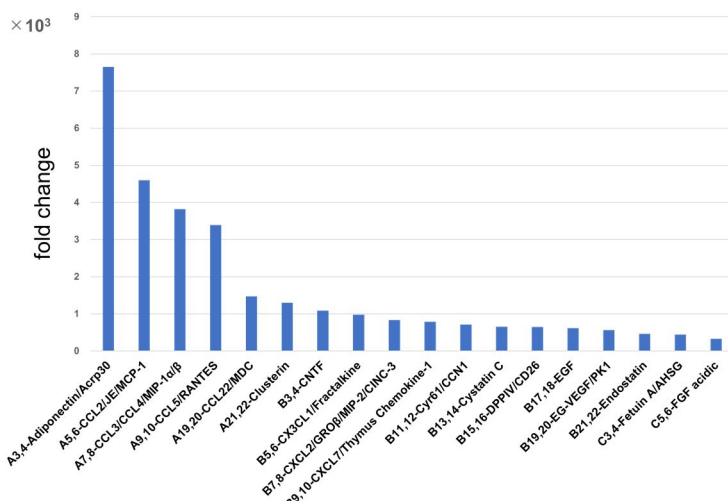


Figure2 骨格筋間質細胞培養上清中の主要なサイトカイン

まず、マルチプレックス抗体アレイキットにより、ラット骨格筋間質細胞培養上清中には、Adiponectin、LIX/CXCL5、Serpine、VEGF、IGFBP3 などの組織再生に与関するサイトカインが豊富に含まれていることが明らかになった (Figure 2)。遠心分離した培養上清中をそのまま使用したことで、使用したサイトカインカクテル内には多種のサイトカインが含まれていた。これらのサイトカインを効率よく徐放するために、生体吸収性ゼラチンハイドロ

ゲル (MedGel®) を使用した。このハイドロゲルは、正電荷と負電荷の 2 種類のものであり、2 種を同時に骨盤内尿道近傍に留置することで、サイトカインカクテル内の多種のサイトカインの徐放が可能となった。ラット尿道括約筋損傷モデルへのサイトカイン投与による尿漏出時圧の検討では、尿漏出時圧は損傷直後に 50% 程度に低下し、コントロール群では 4 週後の測定において回復が認められなかったのに対して、サイトカイン投与群においては、損傷前の 70% 程度まで回復が認められ、コントロール群に対して有意な回復効果を認めた (Figure 3)。骨盤内に留置したハイドロゲルは移植 4 週間後には完全に吸収されており、周囲の癒着等も認めず生体に対する悪影響は少ないものと考えられた。

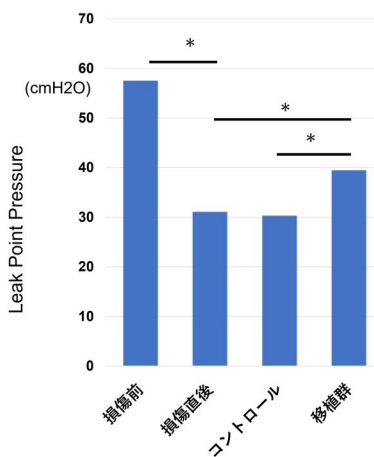


Figure3 尿漏出時圧

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamaki Tetsuro, Natsume Toshiharu, Katoh Akira, Nakajima Nobuyuki, Saito Kosuke, Fukuzawa Tsuyoshi, Otake Masayoshi, Enya Satoko, Kangawa Akihisa, Imai Takeshi, Tamaki Miyu, Uchiyama Yoshiyasu	4. 巻 24
2. 論文標題 Differentiation Capacity of Porcine Skeletal Muscle-Derived Stem Cells as Intermediate Species between Mice and Humans	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9862 ~ 9862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24129862	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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 中島信幸
2. 発表標題 Human skeletal muscle-derived stem cells repair the rat damaged urethra with paracrine effect
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------