

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007-2008
課題番号：19591861
研究課題名（和文） 過活動膀胱ラットの脳脊髄への骨髄間質細胞移植による下部尿路機能の再構築
研究課題名（英文） Reconstruction of lower urinary tract function by transplantation of bone marrow cells into the brain and spinal cord in rats with overactive bladder
研究代表者 菅谷 公男（SUGAYA KIMIO） 国立大学法人 琉球大学・医学部・准教授 研究者番号：20179120

研究成果の概要：排尿障害を呈する脳梗塞ラットまたは脊髄損傷ラットの脳脊髄髄腔内へ骨髄間質細胞を移植し、下部尿路機能の再構築の可能性について検討した。その結果、ドナー由来の移植細胞は脳や脊髄に定着し、一部のラットでは移植由来細胞は神経様細胞に分化しており、排尿障害も部分的に改善された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：過活動膀胱、骨髄間質細胞、移植

1. 研究開始当初の背景

排尿障害は高齢者の生活の質（Quality of Life: QOL）を低下させる第一の要因である。男性の代表的な排尿障害疾患の前立腺肥大症は、肥大した前立腺が尿道を圧迫するために尿の排出障害を呈し、同時に蓄尿障害も出現する。一般的に前立腺肥大に起因する排出障害は $\alpha 1$ 遮断薬を中心とした薬物療法で治療され、 $\alpha 1$ 遮断薬に抗コリン薬を併用することで、排出障害のみならず蓄尿障害も改善することは多い。また、薬物療法だけでは十分な効果が得られない場合は外科的治療が

選択される。しかし、薬物療法や外科的治療を行っても頻尿、尿意切迫感、切迫性尿失禁などの過活動膀胱を呈する高齢者は珍しくない。また、高齢になると、男女とも微小な脳梗塞、頸椎症や脊柱管狭窄症などの脳脊髄疾患に起因する神経因性膀胱も少なくない。このような神経因性膀胱に対する薬物療法の効果は十分とは言えず、場合によっては自己導尿、留置カテーテルやオムツの使用も考慮しなくてはならないため、著しく患者のQOLを低下させる。

最近、私達は排尿障害に対する新たな治療

法開発を目的として、自己骨髄幹細胞（骨髄間質細胞）移植による下部尿路機能の改善効果に着目した。自己骨髄細胞移植による生体機能回復の試みは、浸蝕が少なく、安全で、且つ画期的な治療効果が得られることから、近年注目されている研究領域である。

骨髄間質には多分化能を有する間葉性幹細胞が含まれており、一般的に *in vitro* で液性因子などを適宜添加した液体培地で培養し、中胚葉性の骨細胞、心筋細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へと分化誘導された後に移植研究に用いることが多い。しかし、これまでの経験から、骨髄間質細胞を *in vitro* で長期間培養すればするほど形態的には淘汰されていくものの細胞の分裂能力は衰え、それら細胞を移植に用いても低活動膀胱の機能改善効果は低かった。そこで、試行錯誤を繰り返し、最近では採取した骨髄細胞を液体培地で短期間培養し、間葉系幹細胞を含む接着性骨髄間質細胞を速やかに採集して低活動膀胱モデルラットの膀胱壁へ直接移植すると、膀胱機能の改善効果が高いことを見出した。

さらに、移植した骨髄間葉細胞の組織学的分化様式を確認するためにクラゲの蛍光緑発色源である蛋白遺伝子を組み込んだ Green fluorescence protein (GFP)-transgenic ラット（通称 GFP ラット）の骨髄細胞を同様の手技でラットの膀胱に移植した結果、移植 1 ヶ月後には移植された膀胱組織に蛍光緑で抗平滑筋抗体陽性の GFP 骨髄細胞由来の平滑筋層が形成されることを確認した。これらのことは、自己骨髄細胞実験では骨髄間質細胞を長期間培養して細胞の分化誘導を促すよりも、生き（活性度）の良い骨髄間質細胞そのものを移植に用いることが重要であり、その中の多分化能力を持つ間葉性幹細胞がその時期・環境に適した様々な支持細胞によってその分化・再生能力を発揮し、必要とされる細胞に分化することを示唆する。

また、私達は以前に胸髄損傷ネコの仙髄に自家副腎髄質の小塊を複数移植し、膀胱尿道協調不全が改善したことを報告したが（Sugaya, K, et al. J Urol, 2001）、その際も仙髄内および表面に抗チロシン水酸化酵素陽性のカテコラミン分泌細胞が存在することを確認した。これらのことから、移植による機能回復には必ずしも分化した細胞を用いる必要はなく、大切なのは生き（活動状態）の良い細胞を目的の組織またはその周辺に存在させることであり、それに伴う環境の変化が移植細胞を自ずと必要な細胞・組織へと導いてくれるものと推測する。

また、骨髄細胞からは中胚葉性細胞以外にも内胚葉性の肝細胞や、外胚様性の神経細胞や脊髄が分化・再生することが報告されている。これらのことから、骨髄間質細胞が状況によって胚葉を越えて分化する能力を持つ

のなら、骨髄間質細胞移植が脳脊髄疾患に起因する神経因性膀胱や下部尿路閉塞に伴う過活動膀胱の改善に活用できるのではないかという考えに至った。

現在、排尿障害の分野では、抗コリン薬のみでは対処できない過活動膀胱の治療をどうすべきかが問題となっている。そこで、過活動膀胱モデルの脊髄損傷ラットと脳梗塞ラットを用いて骨髄間質細胞移植の効果を検討することとした。

その前段階として、これまで当教室で続けてきた閉塞膀胱に伴う低活動膀胱の膀胱壁への GFP ラット由来の骨髄間質細胞の移植で、GFP 細胞が確実に膀胱壁に生着することを確認した（図 1 と図 2, Nishijima, S, et al. Biomed Res, 2007）。

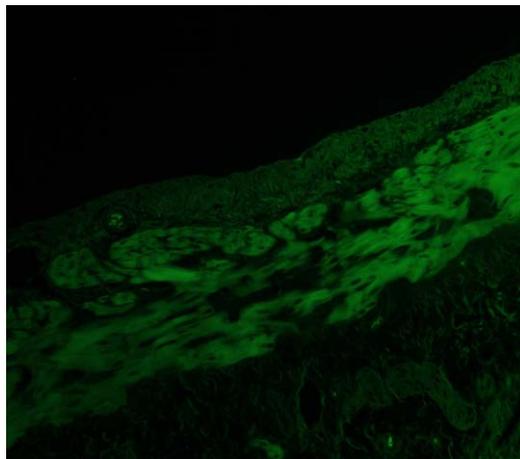


図 1. 低活動膀胱の膀胱壁に移植された GFP 細胞

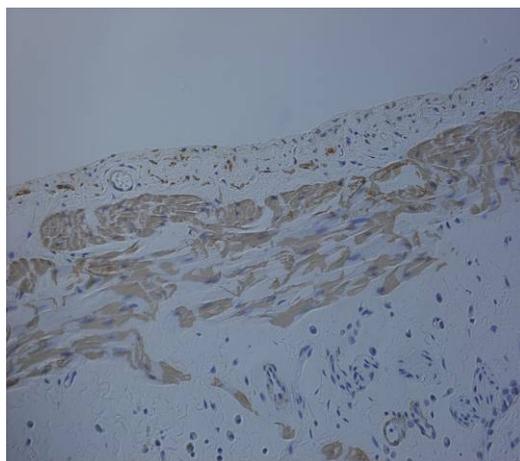


図 2. 図 1 を抗平滑筋抗体で標識した像. 図 1 の GFP 陽性細胞は抗平滑筋抗体陽性細胞である.

2. 研究の目的

排尿障害を呈する脳梗塞、脊髄損傷、下部

尿路閉塞モデルラットの脳室内・脊髄内・脊髄髄腔内へGFPラット由来の骨髄間質細胞を移植し、その後のGFP細胞の生着状況と、排尿障害の改善効果を観察して、骨髄間質細胞移植による下部尿路機能の再構築の可能性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 胸髄損傷ラットの脊髄髄腔内への骨髄間質細胞移植実験

Splague-Dawley系メスラットを対象にイソフルレン吸入麻酔下に下部胸髄で完全に脊髄を切断し、2週間経過した時点(慢性脊損の過活動膀胱状態時)の脊髄損傷ラットをレシピエントとした。脊髄損傷後2週間は尿閉状態となるため、脊髄損傷ラットは用手的に1日2回排尿させた。ドナーとしてはSplague-Dawley系GFPドナーラットの骨髄細胞を用いた。ウレタン麻酔下にGFPラットの大腿骨を切り出し、骨頭を切断して骨髄を採取し、MEM培地で希釈・洗浄してGFPドナーラット由来のGFP陽性骨髄細胞浮遊液を作製した。移植は脊損後2週目のレシピエントの腰仙髄領域の脊髄髄腔内にGFPドナーラット由来のGFP陽性骨髄細胞浮遊液($1 \times 10^{6-7}$ 細胞/0.5ml)を注入して行なった(移植群)。シャム群として骨髄間質細胞の培養液のみを腰仙髄領域の脊髄髄腔内に注入したラットを置いた。GFPドナーラットの骨髄細胞移植から2週間後、ウレタン麻酔下での連続膀胱内圧測定を行い、膀胱活動の変化を観察した。また、移植後4週目には腰仙髄組織を取り出して組織中のGFP陽性細胞の有無を検討した。

(2) 脳梗塞ラットの脳室内への骨髄間質細胞移植実験

脊損ラットと同様に、Splague-Dawley系メスラットを用いた。イソフルレン吸入麻酔下にラットの右側内頸動脈からナイロン糸を脳底動脈まで挿入し、人為的に脳梗塞を作製した。脳梗塞作製から1日後、眼剣下垂があることを確認した脳梗塞ラットをレシピエントとした。ドナーとしてはSplague-Dawley系GFPドナーラットの骨髄細胞を用いた。ウレタン麻酔下にGFPラットの大腿骨を切り出し、骨頭を切断して骨髄を採取し、MEM培地で希釈・洗浄してGFPドナーラット由来のGFP陽性骨髄細胞浮遊液を作製した。移植は脳梗塞後1日目のレシピエントの左側脳室内にGFPドナーラット由来のGFP陽性骨髄細胞浮遊液(1×10^5 細胞/ 5μ l)を注入して行なった(移植群)。シャム群として骨髄間質細胞の培養液のみを側脳室に注入したラットを置いた。また、何も処置

しなかった正常ラットの群も、正常と脳梗塞の比較のため置いた。GFPドナーラットの骨髄細胞移植から2週間後、ウレタン麻酔下での連続膀胱内圧測定を行い、膀胱活動の変化を観察した。また、移植後4週目には腰仙髄組織を取り出して組織中のGFP陽性細胞の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) 脊髄損傷ラットの場合：シャム群、移植群とも自排尿を伴う膀胱収縮が一定間隔で検出された。残尿量は3-9mlとかなりの個体差があったが、移植群で残尿量は有意に少なかった。膀胱収縮間隔、最大膀胱収縮圧、膀胱基線圧や膀胱収縮波形には両群に差はなかった。

組織学的には、移植群の腰仙髄中にはレシピエントの神経細胞に混在したドナー由来のGFP陽性神経様細胞を多数認めた(図3と図4)。これらGFP陽性神経様細胞は内側及び外側中間灰白質に存在し、副交感神経の脊髄内起始細胞と同様の紡錘形や多局形の細胞で、2-3本の軸索を有しているようにみえた。GFPの蛍光発色がなければレシピエントの副交感神経脊髄内起始細胞との区別はできないほど近似していた。シャム群の腰仙髄には蛍光を発色する細胞はなかった。

以上のことから、胸髄損傷ラットへ移植した骨髄細胞は神経様細胞へと分化し、排尿障害を部分的に改善したことが示唆された。その改善は、以前、私達が脊髄損傷ネコの腰仙髄へ自家副腎髄質を移植した際にみられた膀胱尿道協調不全の改善と同様と推測され、脊髄損傷ラットでも移植群における残尿量の減少としてその効果が現れたものと考えられた。

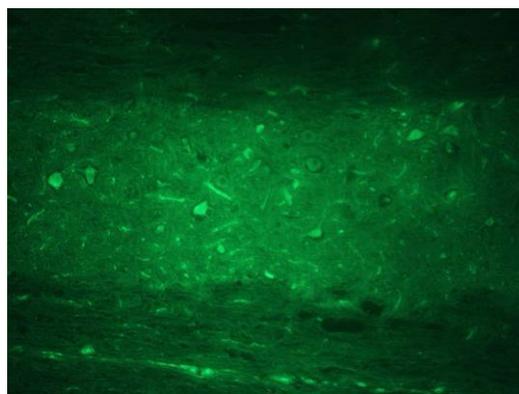


図3. 脊髄損傷ラットの脊髄内に観察されたGFP細胞. 脊髄髄腔内に移植したGFP細胞は腰仙髄の灰白質に定着している。

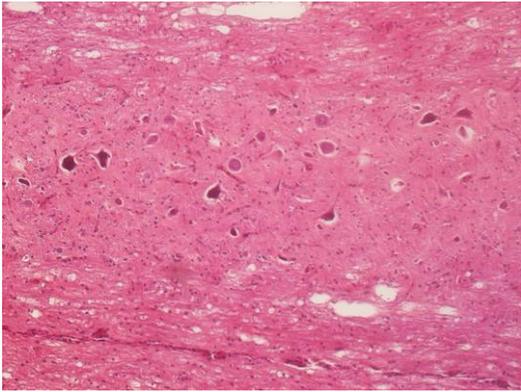


図4. 図1をHE染色した像. 図1のGFP陽性細胞は中間外側核細胞(副交感神経起始細胞)と同様の形態を呈している.

(2) 脳梗塞ラットの場合: 正常ラットに比べて脳梗塞直後のシャム群および移植群の膀胱収縮間隔は短く、膀胱基線圧は上昇していた。最大膀胱収縮圧は3群で差はなかった。しかし、移植群においては、脳梗塞直後に比べて2週間後には膀胱収縮間隔と膀胱基線圧はともに正常ラットとほぼ同程度にまで改善していた。シャム群でも経時的に排尿反射は多少改善したが、その程度は移植群の方が勝っていた。

組織学的には、移植群の脳組織には、脳室近傍や視床下部の弓状核にレシピエントの細胞に混在したドナー由来のGFP陽性神経様細胞が少数ながら散在していた。シャム群の脳では蛍光を発色する細胞はなかった。

以上のことから、胸髄損傷ラットまたは脳梗塞ラットへ移植したGFP骨髄細胞は神経様細胞へと分化し、中枢神経障害に伴う排尿障害を部分的に改善したことが示唆された。しかし、脳梗塞ラットへ移植されたGFP細胞のうち、どの領域に生着した細胞が下部尿路機能の改善に働いたのかは不明であった。

この移植の手技は比較的簡単であり、低活動膀胱の膀胱壁への骨髄間質細胞の移植や、脊髄損傷に伴う神経因性膀胱に対する脊髄腔内への骨髄間質細胞の移植は、臨床の場面でも実施可能と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

①Nishijima S, Sugaya K, Miyazato M, Kadekawa K, Oshiro Y, Uchida A, Hokama S, Ogawa Y.: Restoration of bladder contraction by bone marrow

transplantation in rats with underactive bladder. Biomed Res, 28:275-280, 2007. 査読有.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅谷 公男 (SUGAYA KIMIO)

琉球大学・医学部・准教授

研究者番号: 20179120

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし