

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591866

研究課題名 (和文) 上皮間誘導と伸展刺激を利用した機能的尿路再建

研究課題名 (英文)

Functional urethral reconstruction with epithelial-mesenchymal transformation and mechanical stretch of urothelial cells

研究代表者

丸山 哲史 (MARUYAMA TETUJI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：50305546

研究成果の概要：

実際の臨床応用にあたっては、一般的に尿路上皮は管空組織内にあることから、内視鏡等を用いて採取しやすく、再生能力も高い。一方、平滑筋細胞は組織の深部にあり採取しづらい。そこで、尿路上皮細胞層を作成後に、第二段階として上皮細胞から間葉系細胞が誘導される現象 (Epithelial Mesenchymal Transformation/EMT) の原理を応用することで、平滑筋細胞層を作成することを検討中である。このように、多段階的に臓器を作成することで、より確実に効率的な実際応用可能なプロセスを構築することが可能である。

EMT の原理および機械的刺激を応用することで、細胞および組織の誘導過程をより機能的および効率化できる可能性がある。伸展刺激および電気刺激を負荷し、誘導される平滑筋細胞に一定の空間的配置と電気的共同性をもたせる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：尿路再建、上皮間葉誘導、マトリックス、幹細胞、伸展刺激、平滑筋細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 尿道形成術における皮膚および口腔粘膜組織などの利用と問題点

小児先天奇形の 1 つである尿道下裂は、尿道末端組織の欠損を特徴とし、その治療は手術によるほかない (Hayashi Yutaro, Kojima Yoshiyuki, Maruyama Tetsuji et al. *Urology*, 61:1019-1022, 2003)。繊細な

技術を要する尿道形成術の特徴として、欠損した尿道末端部を別の組織で補うことが挙げられる。通常は陰茎包皮内板を用いて新尿道を形成するが、脱落・瘻孔などにより不幸にも再手術を要する症例についてはその手術材料の確保に難渋し、やむなく膀胱粘膜、口腔粘膜などが利用されている (Hayashi Yutaro, Kojima Yoshiyuki,

Maruyama Tetsuji et al. Int J Urol, 5:167-169, 1998). これらの場合には手術手技が煩雑で侵襲が大きいという問題点があり、包皮内板を用いて形成し得た場合にさえ、患児思春期以降に起こる陰毛の発毛とそれを核とした結石形成に悩まされる場合が少なくない (*Hayasi Yutaro, Kojima Yoshiyuki, Maruyama Tetsuji, et al. Int J Urol, 13:733-737, 2006*). すなわち本来の尿道組織以外を用いた再建術では長期的に見て問題点が多いといえるため、より尿道組織に近い新材料があるならば生理的で合併症の少ない手術を可能とし、理想的と考えられる。

(2) 人工膀胱作成などその他尿路再建術における新材料の必要性

また尿路上皮細胞層の治療に伴って膀胱をはじめとした尿路を再建する際、腸管を使用することがある。腸管を切るという非常に侵襲の高い手術に加え、生理的に全く違う組織を使用しているために、結石形成、細菌感染、電解質異常など様々な合併症がある。このように尿路上皮やその周囲組織を、本来の組織以外によって再建する手術ではさまざまな問題点がある。以上から、尿路再建手術に際して利用可能である、より本来の組織に近く生理的で合併症の少ない新材料の開発が切望されている。

(3) 尿路における再生医療の現状とティッシュ・エンジニアリング応用の経緯

細胞工学の技術は近年国内でも目覚ましい進歩を続け、火傷などによる皮膚欠損に対する移植片として、既に臨床応用が進められている。また口腔粘膜や軟骨に関しても研究が行われているが、尿路の分野は、これまで比較的未開発であるといえる。一方海外では膀胱を全層にわたって培養細胞にて作成し得たとの報告や、人工材料を用いての尿道形成術に成功したとの報告があるが、全て実験動物によるものである。近年、再生医療が様々な分野で脚光を浴びている。皮膚や軟骨などの細胞工学的技術を用いたものは臨床応用が進められている。しかし、尿路上皮やその周囲の組織では比較的未開発であると考えられる。国内外では現在、膀胱を全層にわたって培養細胞にて作成し得たとの報告や、人工材料を用いての尿道形成術に成功したとの報告がある。

従来、尿路においては膀胱が再生医療の対象として取り上げられてきた。これは、そのシンプルな形態および対象疾患が多かったことなどによるものである。1950年代から、テフロンなどの人工素材を用いて膀胱を作成することが試みられてきた (*Bohne AW et al. Surg Gynecol Obstet 100: 259-264, 1955*). 当初の試みは、異物反応により挫折

したが、その後、PGAなど生体内分解性のある人工素材開発につながっている (*Atala A. World J Urol 18: 364-370, 2000*). ただ、尿路上皮の再生は良好だが、平滑筋の再生が限られていることなどから、SISなどコラーゲンを中心とした、半生体素材も用いられるようになってきた (*Krop BP et al. Urology 46, 396-400, 1995*). 特に、最近ではティッシュ・エンジニアリングの手法を用いて、尿路上皮および平滑筋細部を重層化したシートを、体外であらかじめ作成した後、生体に移植された (*Oberpenning FO et al. Nature Biotech 17: 149-155, 1999*). その後の追試が十分ではないようだが、先験的な試みといえよう。一方、尿道および尿管においてはいくつかの問題点がある。形態的な問題 (径の細い管状構造) および蠕動などのより複雑な機能が必要である点などである。現在は、半管状の欠損部分もしくは比較的短距離を補うことが試みられているのみである (*Chen F et al. Urology, 54, 407-415, 1999*). (*Stefan E et al. Urology 50: 818-825, 1997*).

2. 研究の目的

更に、幹細胞を用いることにより、他の臓器を傷つけることなく、より低侵襲になり、生理的、機能的に望ましい治療法が期待できることから、ES細胞由来の細胞群を基に尿路上皮やその周囲の組織を得ることも検討中である。今までとは違った治療法へ発展させる事ができる可能性も示唆される。尿路上皮や平滑筋の幹細胞が利用できれば、未分化状態を維持したままの分裂増殖により、大きく欠損した尿路を補うのに十分な量の新しい組織を得ることが可能である。

(1) 尿路再生医療におけるES細胞利用の試みとその効率化

以上の理由により、従来から、われわれは幹細胞を用いた再生医療の技術およびティッシュ・エンジニアリング社の技術を相補的に利用し、尿路上皮および平滑筋組織を誘導し、機能的な尿路組織を再生することを目標としてきた。実際の臨床応用にあたっては、一般的に尿路上皮は管腔組織内にあることから、内視鏡等を用いて採取しやすく、再生能力も高い。一方、平滑筋細胞は組織の深部にあり採取しづらい。そこで、尿路上皮細胞層を作成後に、第二段階として上皮細胞から間葉系細胞が誘導される現象 (Epithelial Mesenchymal Transformation/EMT) の原理を応用することで、平滑筋細胞層を作成することを検討中である。このように、多段階的に臓器を

作成することで、より確実に効率的な実際応用可能なプロセスを構築することが可能である。

(2) 機械・電氣的刺激による機能的尿路組織誘導の応用

また、平滑筋細胞が組織として実際に生体内で機能するには、一定の空間的配列もたせた細胞および組織の誘導が必要である。これに際しては、伸展などの機械的刺激もしくは電気刺激を用いることで、より機能的な組織を作成することが可能と考えられる。われわれは従来、腎尿細管細胞の機械的刺激に対する反応性を検討し報告した (*Maruyama Tetsuji, Hayashi Yutaro et al. Urol Int, 75:150-158, 2005*)。また、機械的損傷に対する反応性を検討中である (*丸山哲史 他, 第93回日本泌尿器科学会総会, 2005. 4. 13-16, 東京*)。この際にも上述の EMT 現象が観察されている。

以上のように EMT の原理および機械的および電氣的刺激を応用することで、細胞および組織の誘導過程をより機能的および効率化できる。

3. 研究の方法

- (1) 培養尿路上皮シートの作成: ラットの尿道を摘出し小片とし、抗生剤含有リン酸緩衝液につけ滅菌処理する。これを Dispase 含有 DME 培地で処理することにより上皮層と筋層とに分割する。上皮層を Trypsin で処理、攪拌し上皮細胞を単離し、feeder 細胞である 3T3 細胞を敷いたフラスコ底にこれを播種する。
- (2) 細胞増殖能および細胞活性の検討: 経時に尿路上皮に対して、細胞数の算定および位相差顕微鏡での形態観察を行う。その増殖能、活性および形態学的特徴を評価し、重層化シートを成す最適な培養期間および培養の条件等を検討する。(丸山)
- (3) マトリックスの作成: 手術用縫合糸と同様の吸収素材にて繊維を作成する (polyglycolic acid (PGA): poly-DL-lactide-co-glycolide (PLGA) 50:50 など)。このマトリックス上に細胞培養を行う。尿路上皮に対して、シート状に重層化するのに最適なマトリックスの条件 (素材、線維の幅等) を検討する。(丸山・林)
- (4) マトリックスによる培養細胞層のサンドイッチ化: 平面状のマトリックス上に尿路上皮を培養する。さらにその表面をマトリックスで被覆する。(丸

山・林)

- (5) 機械的刺激による EMT 誘導: 細胞が安定した後に、被覆したマトリックスを剥離する。この処置が機械的刺激となり、上皮細胞が増殖および遊走する。その過程を免疫組織学的に追跡する。この際には、上皮系細胞のマーカであるサイトケラチンと間葉系細胞のマーカであるビメンチンの分布を検討する (予備実験として腎尿細管上皮細胞では確認済み: 下右図)
- (6) 3次元培養の構築: より現実的なシステムを構築する。共焦点レーザー顕微鏡 (CFLM) を用いることで、3次元免疫組織学的確認をおこなう。(丸山)
- (7) 伸展刺激による空間的規則性の追加: 培養細胞自動伸展器を用いて底面のマトリックスを周期的に伸展させる。平滑筋の配列に規則性があらわれることを確認する。(丸山)
- (8) 電気刺激による変調: 培養細胞自動伸展器を用いながら、同時に培養液に一定方向の周期的に強度が変動する電場をかけることで、誘導された平滑筋の配列に規則性があらわれること、およびその強度が増強し電氣的共同性を獲得することを確認する。

上記のシステムにおいて、上皮細胞として、遺伝子導入により ES 細胞から誘導した細胞系を用いて、作業を効率化することで多くの細胞系を獲得し、実際の臨床応用に備える。用いる遺伝子は、これまでわれわれの研究でその重要性が確認されたものを用いる。

- (1) 導入遺伝子の準備: 遺伝子を増幅し、プラスミドベクターに組み込む。大腸菌にトランスフォーメーションさせ増やしたプラスミドベクターのインサート部分の遺伝子配列をシーケンスで確認し、既知の遺伝子配列の情報と照らし合わせて一致することを確認する。(丸山、小島)
- (2) ES 細胞への遺伝子導入、尿路上皮細胞系の確立: 培養した ES 細胞を 0.25% トリプシン EDTA 溶液にて回収し、1 x 10⁷ 個の細胞に対し 20 μg の導入する遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を用意し、electroporation 用キュベット (BIO-RAD Gene Pulser cuvetteR) 内に混ぜ入れて、960 μF、250mV の条件で electroporation 法を行い、遺伝子を導入する。48 時間、前述の培養条件にて培養後、Neomycin、Puromycin などの耐性遺伝子に対応し

た薬剤を含む培養液に替えると遺伝子導入された(同時に耐性遺伝子を発現している)ES細胞のみが生存し選択される。最終的にはサザンブロッティング法にて遺伝子が導入されたことを確認する。(丸山、小島)

遺伝子導入したES細胞をLIFを除いた培養液中でhanging drop法を用いembryoid body(胚様体:EB)を形成させ、分化させる。5日後にEBを再度ディッシュに付着させて分化を進め、時間の経過とともに細胞を回収し、他の尿路発生の各段階で発現してくる遺伝子に変化がないかどうかまた細胞の形態変化なども評価する。(丸山、小島)

以上の実験において特出される導入遺伝子とそれに対応して発現してくる遺伝子群、また分化させたときの形態などから標的となる尿路上皮(移行上皮)やその周囲の組織(平滑筋など)が同定できた場合、その特異的な抗原でflow cytometryを用いた細胞のソート(FACS)を用いて単一の前駆細胞が抽出できるかを検討する。さらにその細胞を系統として確立することを試みる。(丸山)

- (3) マトリックスによる尿路上皮誘導 ES細胞層のサンドイッチ化:平面状のマトリックス上に尿路上皮を培養する。さらにその表面をマトリックスで被覆する。(丸山、林)

- ① 機械的刺激による EMT 誘導:細胞が安定した後に、被覆したマトリックスを剥離する。この処置が機械的刺激となり、上皮細胞が増殖および遊走する。一部はEMTを来たし平滑筋へと再分化する可能性がある。その過程を免疫組織学的に追跡する。この際、前年までもとめた最適な条件で、伸展刺激および電気刺激を負荷し、誘導される平滑筋細胞に一定の空間的配置と電気的共同性をもたせる。(丸山)

4. 研究成果

幹細胞を用いた再生医療を尿道、尿管および膀胱組織へ応用する第一段階として、その発生過程で発現する遺伝子群を検討した。膀胱を含めた尿路全体の形成過程を遺伝子レベルで解明することは、基礎的な面においても非常に重要である。また、尿路上皮の伸展などの機械的刺激もしくは電気刺激への反応性を検討し、平滑筋細胞へのEMTの有無、その場合の空間的配列の状況を検討した。その際に変動する遺伝子群を検討し、機能的な

組織を効率的に作成することを目標とした。

増殖因子を加え、37°C10%CO₂にて細胞培養し、重層化した上皮シートを作成した。平面状のマトリックス上に尿路上皮を培養した。細胞が安定した後に、被覆したマトリックスを剥離したところ、この処置が機械的刺激となり、上皮細胞が増殖および遊走した。機械的刺激は様々な様式で細胞に対することが考えられるが、特に伸展力に注目した。

特に、細胞骨格の主体であるアクチンフィラメントの分布に変化を認めた。一部はEMTを来たし平滑筋へと再分化した。培養細胞自動伸展器を用いて底面のマトリックスを周期的に伸展させたところ、平滑筋の配列に規則性があらわれた。培養細胞自動伸展器を用いながら、同時に培養液に一定方向の周期的に強度が変動する電場をかけることで、誘導された平滑筋の配列に規則性があらわれ、電気的共同性を獲得した。Hox、Wnt およびBMP遺伝子群など、腎・尿管発生(特に移行上皮)に重要な働きをしている遺伝子のプラスミドDNAを用意しelectroporation法を行い、遺伝子を導入した。hanging drop法を用いembryoid body(胚様体:EB)を形成させた。

本研究では、一部の生検組織もしくは体性幹細胞を基に豊富な手術材料を作成し、尿道下裂手術の豊富な実績に基づいて臨床的に応用することを目的とした。生理的で合併症が少ないだけでなく、手術手技の簡便、再手術などの難症例にも有用と考えられ、将来第一選択術式となる事も期待される。尿道下裂手術の豊富な実績に基づいて臨床的に応用すること、すなわち動物実験に加えて臨床的に尿道下裂手術の成績向上を最終目的としている。作成されたより生理的な手術材料は、尿管および膀胱などさまざま部位での尿路再建手術に臨床応用が可能である。尿路上皮や平滑筋の幹細胞が利用できれば、未分化状態を維持したままの分裂増殖により、大きく欠損した尿路を補うのに十分な量の新しい組織を得ることが可能である。他の臓器を傷つけることなく、より低侵襲になり、生理的、機能的に望ましい実際の治療法が期待できる。拒絶反応を起こさない利点がある。また、臓器幹細胞を得ることができない場合には、本人の体細胞と受精卵を用いて得た胚性幹細胞(ES細胞)から分化した細胞や組織を利用することができる。このようにES細胞を用いて各臓器を構成することは、特に尿路系での報告はなく、非常に先駆的で発展性の高い研究であると考えられる。

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 12 件)

- ① Nakane Akihiro, Kojima Yoshiyuki, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro, Masui Shinji, Nishinakamura Ryuichi: Pax2 overexpression in embryoid bodies induces upregulation of integrin alpha8 and aquaporin-1. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2009 Jan-Feb;45(1-2):62-8. Epub 2008 Nov 27. 査読あり
- ② Sugiyama Yukari, Mizuno Haruo, Hayashi Yutaro, Imamine Hiroki, Ito Tetsuya, Kato Ineko, Yamamoto Manami, Aoyama Mineyoshi, Asai Kiyofumi, Togari Hajime: Severity of virilization of external genitalia in Japanese patients with salt-wasting 21-hydroxylase deficiency. Tohoku J. Exp. Med., 215:341-348, 2008 査読なし
- ③ Hayashi Yutaro, Kojima Yoshiyuki: Current concepts in hypospadias surgery. International Journal of Urology, 15:651-664, 2008 査読あり
- ④ Hayashi Yutaro, Kojima Yoshiyuki, Mizuno Kentaro, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Kohri Kenjiro: Achieving a natural glanular meatus for distal hypospadias with a narrow and shallow plate: Tubularized incised plate versus modified Barcat repair. International Journal of Urology, 15:616-620, 2008 査読あり
- ⑤ Hayashi Yutaro, Kojima Yoshiyuki, Mizuno Kentaro, Maruyama Tetsuji, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Modified foreskin reconstruction for distal hypospadias and chordee without hypospadias. International Journal of Urology, 15:646-648, 2008 査読あり
- ⑥ Hayashi Yutaro, Yasui Takahiro, Kojima Yoshiyuki, Maruyama Tetsuji, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Management of urethral calculi associated with hairballs after urethroplasty for severe hypospadias. International Journal of Urology, 14(2):161-163, 2007 査読あり
- ⑦ Mizuno Kentaro, Hayashi Yutaro, Kojima Yoshiyuki, Kurokawa Satoshi, Sasaki Shoichi, Kohri Kenjiro: Influence of testicular development and histological peculiarity in the testes of flutamide-induced cryptorchid rat model. International Journal of Urology, 14(1):67-72, 2007 査読あり
- ⑧ Hayashi Yutaro, Kojima Yoshiyuki, Nakane Akihiro, Maruyama Tetsuji, Kohri Kenjiro: Can a slit-like meatus be achieved with the V-incision sutured meatoplasty for onlay island falp hypospadias repair? BJU International, 99:1479-1482, 2007 査読あり
- ⑨ Hayashi Yutaro, Kojima Yoshiyuki, Mizuno Kentaro, Nakane Akihiro, Kurokawa Satoshi, Maruyama Tetsuji, Kohri Kenjiro: Neo-modified Koyanagi technique for the single-stage repair of proximal hypospadias. Journal of Pediatric Urology, 3:239-242, 2007 査読あり
- ⑩ Kojima Yoshiyuki, Hayashi Yutaro, Yasui Takahiro, Itoh Yasunori, Maruyama Tetsuji, Kohri Kenjiro: Laparoscopic nephrectomy for a girl with giant hydronephrosis of a horseshoe kidney. International Journal of Urology, 14:647-649, 2007 査読あり
- ⑪ Kojima Yoshiyuki, Hayashi Yutaro, Yasui Takahiro, Itoh Yasunori, Maruyama Tetsuji, Kohri Kenjiro: Laparoscopic management for urachal cyst in a 9-year-old boy. Int Urol Nephrol, 39:771-774, 2007 査読あり
- ⑫ Hayashi Yutaro, Kojima Yoshiyuki, Nakane Akihiro, Kurokawa Satoshi, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Ventral based dartos flap for the prevention of the urethrocutaneous fistula urethroplasty. International Journal of Urology, 14:725-728, 2007 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kurokawa Satoshi, Kojima Yoshiyuki, Mizuno Kentaro, Imura Makoto, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Distribution of gene expression on

genital tubercles in the hypospadiac rat. AUA 2008 Annual Meeting, 2008. 5. 17-22, Orland(Florida USA)

- ② Mizuno Kentaro, Kojima Yoshiyuki, Kurokawa Satoshi, Kamisawa Hideyuki, Imura Makoto, Nakane Akihiro, Kato Toshiki, Maruyama Tetsuji, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Identification of differential expressed genes associated with testicular descent using PCR-based suppressive subtractive hybridization and relationship to germ cell maturation. AUA 2008 Annual Meeting, 2008. 5. 17-22, Orland(Florida USA)
- ③ Kato Toshiki, Kojima Yoshiyuki, Shibata, Yasuhiro, Imura Makoto, Mizuno Kentaro, Maruyama Tetsuji, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Usefulness of MR fat-suppressed T2-weighted and diffusion-weighted imaging for the diagnosis of non-palpable testes. AUA 2008 Annual Meeting, 2008. 5. 17-22, Orland(Florida USA)
- ④ Hayase Masa, Hashitani Hikaru, Yanai Yoshimasa, Kubota Yasue, Kojima Yoshiyuki, Sasaki Shoichi, Suzuki Hikaru, Kohri Kenjiro: Mechanisms of human prostate smooth muscle spontaneous contraction. AUA 2008 Annual Meeting, 2008. 5. 17-22, Orland(Florida USA)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 哲史 (MARUYAMA TETUJI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：50305546

(2) 研究分担者

林 祐太郎 (HAYASHI YUTARO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40238134

小島 祥敬 (KOJIMA YOSHIYUKI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：60305539

郡 健二郎 (KOHRI KENJIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30122047

(3) 連携研究者

なし