

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09672

研究課題名(和文) 磁気ターゲティングを用いた勃起不全における新規治療アプローチの展開

研究課題名(英文) Development of novel approach for erectile dysfunction using magnetically labeled mesenchymal stem cells with magnetic targeting system

研究代表者

井上 省吾 (Inoue, Shogo)

広島大学・病院(医)・講師

研究者番号：90457177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、薬剤抵抗性重症勃起不全(Erectile dysfunction; ED)に対して、磁気ターゲティングによる新たな陰茎再生技術を確立することである。これらを実現するために、陰茎虚血EDモデルラットおよび磁性体化骨髄間葉系幹細胞の作成、磁気ターゲティングを用いた骨髄間葉系幹細胞移植による陰茎再生、機能的および組織学的評価による陰茎組織再生メカニズムの検証を試行した。研究期間中に陰茎虚血EDモデルラットの確立を試みたが、その目標に関しては未達成であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EDにおける標準治療は、PDE5阻害剤である。ただ、PDE5阻害剤は軽症のEDに対しては有効であるが、重症EDにおいて治療効果は低い。さらに、薬剤抵抗性で重症EDに対して有効な治療法はなく、血管内皮を再生する根治を目指した全く新しいアプローチが求められている。

骨髄間葉系幹細胞は、優れた移植幹細胞源として注目されており、MRI造影剤と共培養することで、簡便に磁性体化することができる。本研究では、磁性体化した骨髄間葉系幹細胞を体外から磁場でコントロールし、陰茎組織内へ誘導・集積させる独創的な方法を考案した。本研究は、EDの根治療法につながる画期的な方法である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish a novel approach for penile regeneration technique using magnetically labeled mesenchymal stem cells (MSCs) with magnetic targeting system. We tried to create penile ischemic erectile dysfunction (ED) model rat and magnetically labeled MSCs. In addition, we constructed a plan for penile regeneration using magnetically labeled MSCs with magnetic targeting system, so we were going to examine mechanism of penile regeneration by functional and histological evaluation. Many attempts were made to establish a penile ischemic ED model rat, unfortunately the goal was not achieved.

研究分野：性機能障害

キーワード：勃起不全 陰性再生 磁気ターゲティング 骨髄間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) ED 治療の現況

ED の有病率は、わが国においては **34.5%** と極めて高い。ED のリスクファクターとして加齢や喫煙の他に糖尿病、高血圧、高脂血症、肥満があり、これらは最近急激に増加しているメタボリックシンドロームの構成因子であることから、今後さらなる ED 症例の増加が予想される。ED の標準治療は、**PDE5 (phosphodiesterase type 5)** 阻害剤である。糖尿病では神経障害と血管障害がともに起こっているため、一酸化窒素 (**nitric oxide; NO**) の産生そのものが低下しており、**PDE5** 阻害剤の治療効果が低く難治性 ED となることが多い。また、その効果は一時的であることから、根治療法にはなりえないため、神経および血管内皮機能を再生する根治的な治療の開発が望まれる。

(2) 陰茎リハビリテーションへの応用

前立腺癌は男性で最も多い癌であり、前立腺全摘除術施行数は急増している。前立腺全摘後 ED は、手術に伴う神経損傷や血管損傷に起因しており難治性である。陰茎リハビリテーションは、“前立腺全摘後の勃起機能を最大限に回復させるため、何らかの薬剤やデバイスを使用すること”と定義され、陰茎の酸素化を術後早期から行うことで、陰茎海綿体の線維化を防止しようとする試みである。**PDE5** 阻害薬を用いた陰茎リハビリテーションでは、**PDE5** 阻害薬連日内服の効果が実証できなかった。現在、陰茎リハビリテーションに有効な方法がないのが現状である。

(3) 陰茎再生におけるこれまでの取り組み

私たちは、ヒト血管内皮前駆細胞である **CD133** 陽性細胞を用いた再生に成功しており、陰茎および陰茎海綿体神経の再生を実証した [文献、] この先行研究では、細胞の希少性や、効率的で安定した細胞移植ができないことが最大の問題であった。骨髄間葉系幹細胞は、中胚葉系細胞への分化能をもつ未分化な細胞集団であり、格段に高い増殖能をもつことが知られている。骨髄間葉系幹細胞は容易に磁性体化が可能であり、新しい再生アプローチである磁気ターゲティングを用いることで、先行研究の問題点を解決できる。

(4) 磁気ターゲティングの準備状況

排尿障害への治療を目的として、磁気ターゲティングによる膀胱再生を報告した [文献] この磁気ターゲティングを用いた骨髄間葉系幹細胞移植により膀胱局所の著明な再生効果を報告するなど、磁気ターゲティングに対して十分な実績を有する。

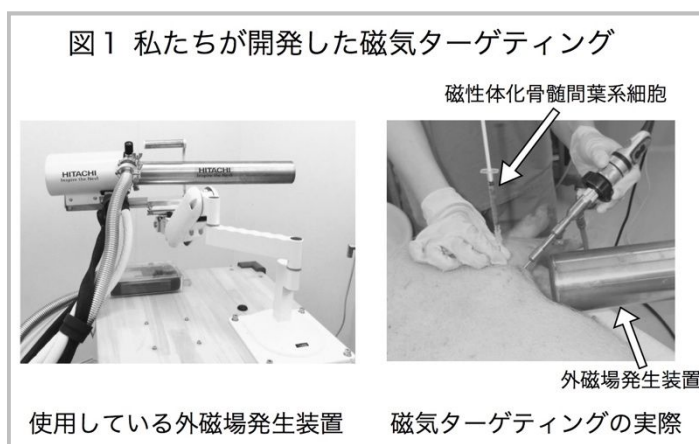
2. 研究の目的

本研究は、磁気ターゲティングによる骨髄間葉系幹細胞をより効率的に陰茎組織に集積させる、革新的な ED 治療アプローチである。

薬剤抵抗性重症 ED に対して、磁気ターゲティングによる陰茎組織再生を用いた新たな ED 治療を確立する。

磁気ターゲティングによる組織再生メカニズムを解明することで、独創的かつ根治を目指した治療アプローチを構築することを目的とする。

さらに、磁気ターゲティングを用いた陰茎組織再生における難治性 ED 治療に対する有効性を検証する (図 1)。



3. 研究の方法

私たちが作成した ED モデルラットに対して、磁気ターゲティングによる磁性体化骨髄間葉系幹細胞移植を用いた陰茎再生を構築する。陰茎再生機序を検証することで、有効な ED 治療につなげる。これらを実現するために、以下 3 つの点からアプローチする。

(1) 磁性体化骨髄間葉系幹細胞の作成

(2) 磁気ターゲティングを用いた骨髄間葉系幹細胞移植による陰茎再生

(3) 機能的および組織学的評価による陰茎組織再生メカニズムの検証

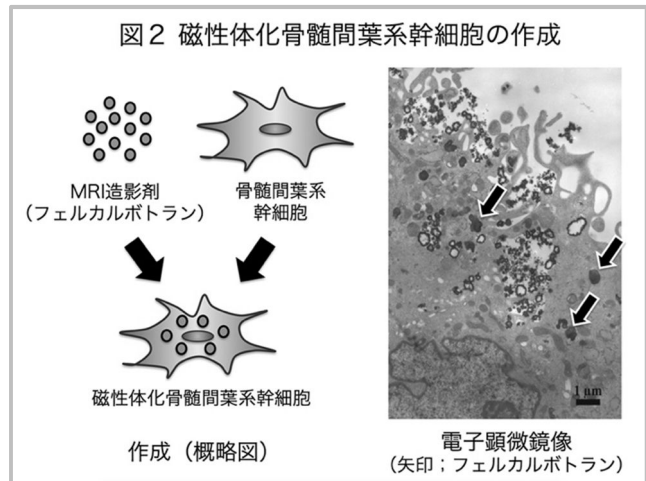
(1) 磁性体化骨髄間葉系幹細胞の作成
骨髄間葉系幹細胞とフェルカルボトランを共培養することで、容易に磁性体を幹細胞内に取り込むことができる。移植細胞ソースとして磁性体化骨髄間葉系細胞を作成する(図2)。

骨髄間葉系幹細胞の抽出

4週オス Wistar-ST ラットに、塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファンール混合麻酔による全身麻酔をかけ、腸骨稜よりヘパリン溶液の入った注射器で骨髄液を2 ml 採取する。遠心分離した後、ヘパリン溶液を破棄する。培養皿に0.5 ml の懸濁液を散布し、2 ml の培養液(DMEM+FBS+抗菌薬)を混入する。5日後に培養液を取り除き、PBS で洗浄後に培養液を追加する。以降は3日毎に培地交換を行い継代する。

磁性体化骨髄間葉系幹細胞の作成

8×10^5 個の細胞に、臨床で MRI 用造影剤として用いられている鉄ナノ粒子であるフェルカルボトランを取り込ませて、磁性体化骨髄間葉系幹細胞を作成し冷凍保存する。



(2) 磁気ターゲティングを用いた骨髄間葉系幹細胞移植による陰茎再生

EDモデルラットを作成した後に、磁性体化骨髄間葉系幹細胞を陰茎に移植する。さらに磁気ターゲティングを用いることで、より効率的な陰茎再生を確立する。

EDモデルラットの作成

8週オス Wistar-ST ラットに全身麻酔をかけ、両側内腸骨動脈を結紮し、陰茎虚血 EDモデルラットを作成する。

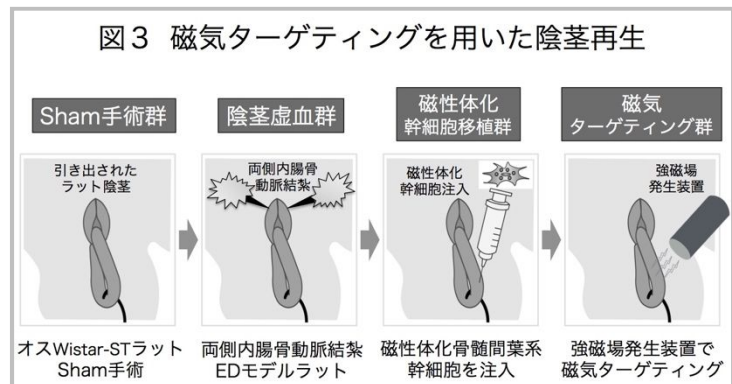
磁気ターゲティングによる効率的な膀胱再生

磁性体化骨髄間葉系幹細胞を陰茎に注入する。直径10 cmの円盤状装置に最大0.6テスラの高磁場を発生させることが可能な超電導バルク磁石システムを用いて、陰茎注入部位に強磁場を10分間発生させる。

対照群の作成

対照群として、sham群、陰茎虚血群、磁性体化骨髄間葉系幹細胞群を設定する。陰茎虚血群は、両側内腸骨動脈を結紮したのみとする。磁性体化骨髄間葉系幹細胞群では、陰茎に磁性体化骨髄間葉系幹細胞の注入のみを行い、磁気ターゲティングは行わない。

(図3)



(3) 機能的および組織学的評価による陰茎組織再生メカニズムの検証

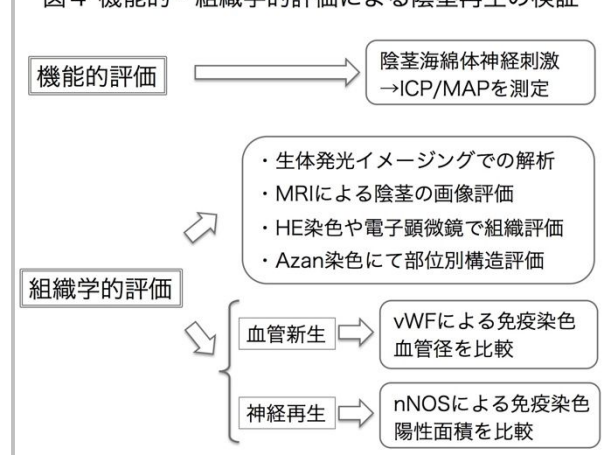
陰茎組織における機能的評価

手術後4週に陰茎海綿体神経を神経刺激システムにより刺激し、陰茎海綿体内圧および大腿動脈圧の測定に加えて、運動神経機能回復の指標として陰茎海綿体の複合筋活動電位(CMAP)や体位感覚神経機能回復の指標として体位感覚誘発電位(SEP)を測定し機能的評価とする。勃起のみならず、陰茎海綿体の弛緩についても、カルバコールやニトロプルシドナトリウムの誘発による弛緩率を評価する。

陰茎組織における組織学的評価

手術後4週にMRIでの画像評価を行ったのちに、sacrificeする。陰茎組織に対して、肉眼的評価および

図4 機能的・組織学的評価による陰茎再生の検証



組織学的評価を HE 染色や電子顕微鏡にて行う。陰茎海綿体における組織学的な構造変化を検討するため、Azan 染色による解析を行う。Azan 染色は筋線維とコラーゲンを染め分けることが可能であり、筋線維、細胞質、核が赤色に、コラーゲン、基底膜、網膜線維は青色にそれぞれ染まる。赤色染色部位を海綿体平滑筋、青色染色部位をコラーゲン、染色されなかった空洞を類洞(sinusoid)として、それぞれの面積比を算出する。血管内皮評価として vWF、神経評価として nNOS を用い、免疫染色を行う。血管や神経の比較のため、各群について染色後に陽性面積を比較する。(図 4)

陰茎組織における網羅的解析

摘出した陰茎組織をマイクロアレイにより網羅的に解析し、発現遺伝子や増殖因子、サイトカインを解析する。対照群との比較を行い、磁気ターゲティングによる膀胱再生に寄与する因子を *in vivo* にて同定する。血管形成アッセイキット (Endothelial tube formation assay) を用いて、3 次元的に血管新生を評価する。

4. 研究成果

これまでに、国内外において磁気ターゲティングを用いた陰茎組織再生の報告はなく、陰茎虚血 ED モデルラットおよび磁性体化骨髄間葉系幹細胞の作成、磁気ターゲティングを用いた骨髄間葉系幹細胞移植による陰茎再生、機能的および組織学的評価による陰茎組織再生メカニズムの検証を試行した。研究期間中に陰茎虚血 ED モデルラットの確立を試みるも、COVID-19 感染拡大に伴い、実験時間の制限や共同実験者の確保の問題も発生したことから、実験の遂行に支障をきたすなど、その目標に関しては未達成であった。

今後の方策として、実現性の点から、陰茎組織細胞に対して磁気ターゲティングによる磁性体化骨髄間葉系幹細胞移植を行い、*in vitro* における評価に切り替える必要性があるものと考えられた。

< 引用文献 >

Inoue S, Miyamoto K, Shinmei S, et al. Regeneration of rat corpora cavernosa tissue by transplantation of CD133⁺ cells derived from human bone marrow and placement of biodegradable gel sponge sheet. *Asian J Androl*. 2017;19(2):203-207.

Miyamoto K, Inoue S, Kobayashi K, et al. Rat cavernous nerve reconstruction with CD133⁺ cells derived from human bone marrow. *J Sex Med*. 2014;11(5):1148-1158.

Sadahide K, Teishima J, Inoue S, et al. Endoscopic repair of the urinary bladder with magnetically labeled mesenchymal stem cells: Preliminary report. *Regen Ther*. 2018;17(10):46-53.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Inoue Shogo, Hayashi Tetsutaro, Teishima Jun, Matsubara Akio	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of penile rehabilitation with low intensity extracorporeal shock wave therapy on erectile function recovery following robot- assisted laparoscopic prostatectomy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Andrology and Urology	6. 最初と最後の頁 1559 ~ 1565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tau-19-888	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 -
1. 著者名 Inoue Shogo, Hayashi Testutaro, Teishima Jun, Matsubara Akio	4. 巻 127
2. 論文標題 Longitudinal evaluation of the frequency of sexual intercourse and sexual activity in patients after nerve sparing robot assisted laparoscopic radical prostatectomy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BJU International	6. 最初と最後の頁 560 ~ 566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bju.15317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inoue Shogo, Miyoshi Hirotsugu, Hieda Keisuke, Hayashi Tetsutaro, Tsutsumi Yasuo M., Teishima Jun	4. 巻 11
2. 論文標題 Postoperative around-the-clock administration of intravenous acetaminophen for pain control following robot-assisted radical prostatectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84866-7	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 -
1. 著者名 Inoue Shogo, Hayashi Testutaro, Teishima Jun, Matsubara Akio	4. 巻 31(1)
2. 論文標題 Comparative analysis of robot-assisted, laparoscopic, and open radical prostatectomy regarding lower urinary tract symptoms: A longitudinal study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Urological Science	6. 最初と最後の頁 21-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 井上 省吾, 宮本 俊輔, 藤井 慎介, 福岡 憲一郎, 関野 陽平, 北野 弘之, 池田 健一郎, 後藤 景介, 稗田 圭介, 林 哲太郎, 亭島 淳, 松原 昭郎
2. 発表標題 UP TO DATE 04 「RARPにおける性機能温存と術後回復治療：UP TO DATE」：RARP術後性機能障害における低強度体外衝撃波治療
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 省吾, 鍵山 義斗, 中野 芳紀, 行廣 和真, 武本 健士郎, 村田 大城, 宮本 俊輔, 藤井 慎介, 福岡 憲一郎, 小島 浩平, 関野 陽平, 北野 弘之, 池田 健一郎, 後藤 景介, 稗田 圭介, 林 哲太郎, 亭島 淳
2. 発表標題 シンポジウム7：「性機能障害の診断と治療」 低強度体外衝撃波によるED治療の新たな展開
3. 学会等名 第72回西日本泌尿器科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 省吾, 宮本 俊輔, 藤井 慎介, 福岡 憲一郎, 関野 陽平, 北野 弘之, 池田 健一郎, 後藤 景介, 稗田 圭介, 林 哲太郎, 亭島 淳, 松原 昭郎
2. 発表標題 RARP術後EDに対する新規プロトコルを用いた低強度体外衝撃波治療 疾患特異的QOLの縦断的解析による治療効果の検証
3. 学会等名 第29回日本性機能学会西部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inoue Shogo
2. 発表標題 Longitudinal analysis of the trifecta outcome in robot-assisted laparoscopic radical prostatectomy
3. 学会等名 AUA2020 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inoue Shogo
2. 発表標題 Longitudinal evaluation of frequency of patients taking part in sexual intercourse and sexual activities after undergoing robot-assisted laparoscopic radical prostatectomy
3. 学会等名 eau2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020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	松原 昭郎 (Matsubara Akio) (10239064)	広島大学・医系科学研究科(医)・専門研究員 (15401)	
研究分担者	亭島 淳 (Teishima Jun) (20397962)	広島大学・医系科学研究科(医)・准教授 (15401)	
研究分担者	林 哲太郎 (Hayashi Tetsutaro) (60612835)	広島大学・医系科学研究科(医)・講師 (15401)	

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