

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 4 月 19 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18608

研究課題名(和文)膀胱拡大術に対する羊膜上皮細胞と脂肪由来幹細胞を用いた機能的膀胱の再生

研究課題名(英文) Regeneration of functional bladder using amniotic epithelial cells and adipose-derived stem cells for bladder augmentation

研究代表者

堀井 常人 (Horii, Tsunehito)

滋賀医科大学・医学部・技術補佐員

研究者番号：70838458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：まず、2層性の足場材料の作製、羊膜上皮細胞、脂肪由来幹細胞の分離・培養を行った。羊膜上皮細胞は、採取した羊膜上皮の培養を行った。脂肪由来幹細胞は、ウサギ鼠頸部より脂肪組織を採取し、培養を行った。間葉系幹細胞マーカーであるCD44が陽性で、CD11b、CD31、CD45が陰性であった。次に、採取した各細胞を2層性足場材料に播種し、ウサギの膀胱上半切除モデルに貼付縫合し、予後の組織形成と膀胱機能について検討した。結果、半年後の造影検査で、材料群は、蠕動運動が確認でき、膀胱容量の増加も認められた。さらに、材料中央部の電気刺激による膀胱筋収縮測定にて、筋収縮が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、尿路再建において回腸利用尿管再建術は、最も汎用される確立された術式であったが、腸管利用による様々な合併症が問題とされ、新たな方法が望まれている。そこで、本研究においては、体内臓器を傷害しない膀胱拡大術における再建方法の確立を目指し、生体吸収性の2層性足場材料及び羊膜上皮細胞や脂肪由来幹細胞を用いてウサギの膀胱に対して膀胱拡大を試みた。結果、半年後には再生膀胱の機能的、組織学的形成が認められる傾向があり、今後長期の検討の結果によっては、臨床で現方法の代替となり得る可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：At first, electrospun two-layered scaffold were created and also amniotic epithelium and adipose derived stem cells (ADSCs) were cultured. The surface marker with cultured ADSCs were measured by Flow cytometry. CD44 was positive and CD11, CD31 and CD45 were negative. Next, in order to evaluate the regenerated bladder form and bladder function, urodynamics study, cystography and muscle strip study were conducted. Then, peristaltic movement could be found in the regenerated bladder in cystography. Also, the bladder capacity was a little increased after 6 month, compared with non-treated control. Muscle strip study showed the regenerated bladder reacted with electric stimulation.

研究分野：再生医学

キーワード：膀胱再生 泌尿器再建 泌尿器科学 再生医学 バイオマテリアル 神経因性膀胱 膀胱拡大術

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

尿路再建において回腸利用尿管再建術は、最も汎用される確立された術式である。しかし、腸管を利用することにより様々な合併症が問題とされる。そのため、その解決策の一つとして、近年、生体吸収性の足場材料を利用した再生医学の研究が注目されている。Atala らによる研究報告にはイヌの膀胱で足場材料を用いた膀胱再建術をし、成功を修めている(Atala A., Lancet, 2006)。しかしながら、2014 年の Joseph らの追試では、半数に膀胱破裂を含む重篤な合併症が認められ、ヒトに対する安全性が懸念された(Joseph DB., J Urol, 2014)。そのため、膀胱再生は振り出しへと戻った。Joseph らの膀胱再生実験では、病的膀胱由来の膀胱上皮と筋層を使用した場合に生育が悪く、癒痕化が起こっていることを問題として挙げており、なるべく病的膀胱の組織を利用しない方法が望まれた。そこで、以前我々は、羊膜の抗癒痕効果に注目して、イヌの口腔粘膜上皮を羊膜上に播種したものを膀胱上皮とし、自己胃平滑筋細胞を生体吸収性足場材料に播種したものを膀胱筋層として用いて膀胱再生実験を実施しており、1 年後に膀胱造影検査とウロダイナミクス検査を行ったところ、正常膀胱と同程度の造影像とコンプライアンスの上昇が認められた(平成 27 年-29 年度科研費[羊膜を用いた尿路上皮粘膜を持ち収縮および弛緩を行う膀胱の再生：イヌを用いた研究])。しかしながら、上記実験では、自己口腔粘膜と消化管である胃の平滑筋を用い、体内臓器を犠牲にする必要があるため、実際の臨床応用が困難であることが問題として挙げられる。そこで、我々は、その解決策として、足場材料に羊膜上皮細胞を播種したものを尿路上皮とし、初期に開腹して採取していた自己胃平滑筋細胞の代替として脂肪由来幹細胞(ADSCs)を膀胱筋層とすることで、体内臓器を犠牲にせず、膀胱再生することが可能であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、尿路上皮層と筋層を持ち、正常の膀胱構造と排尿機能的にも良好な(つまり十分な尿路上皮粘膜と平滑筋層を持ち、癒痕化の無い)膀胱を、羊膜上皮細胞と脂肪由来幹細胞(ADSCs)を播種した生体吸収性の足場材料で再生することである。

3. 研究の方法

. In vitro の実験:A) 2 層性の足場材料の作製:内側は、1 層の尿路上皮層を形成するために、より細かい繊維を用い、外側は、多層の筋層を形成するために、細胞浸潤可能な繊維で、P(LA/CL)を用いて作製する。B)羊膜上皮細胞の分離・足場材料への播種:羊膜は 1 層の上皮と基底膜層と分かれており、上皮細胞を分離し培養を行った後、前述の材料内層に播種し、1 週間培養する。C) 脂肪由来幹細胞(ADSCs)の分離・足場材料への播種:ADSCs は、ウサギ鼠頸部より脂肪組織を採取し、自動脂肪細胞分離機により、ADSCs とその他脂肪組織を分離する。分離した ADSCs は、培養を行った後、前述の材料外層に播種し一週間培養する。

. 動物実験(ウサギの膀胱再生実験):ウサギを開腹し、無菌操作で以下を行う。膀胱を露出させた後、膀胱の三角部より上部 5cm 四方を切除する。その後、2 層性の足場材料を膀胱切除部位に貼付・縫合する。縫合は、8 点結節縫合を行った後、連続縫合する。膀胱切除部位に貼付・縫合後、その部位に上から腹腔内大網を覆い、共培養することで、十分に再生組織内に血流供給を行い、再生膀胱の再生を促す。

. 再生結果の評価:膀胱再生手術後 6 か月後まで経時的に膀胱造影検査を行い、再生膀胱の形態的、生理的機能を評価する。さらに、ウロダイナミクス検査にて再生膀胱の尿流量、コンプライアンス等を評価する。同時にウサギを犠牲死せしめ、再生膀胱を摘出して再生状態(膀胱上皮層等の膀胱各層の再生状態、癒痕形成の有無などの病理組織学的所見)を評価する。統計学的解析の観点から、一時点に 4-6 匹を犠牲死させる。

4. 研究成果

2 層性の足場材料の作製、羊膜上皮細胞、脂肪由来幹細胞の分離・培養を行った。2 層性の足場材料は、エレクトロスピンニング法を用いて、ポリ乳酸とカプロラクタム重合体(P(LA/CL))を約 5cm 四方の大きさで上皮層をより繊維間隔を細かく、また、外層をより繊維間隔が広い材料になるよう作製した。羊膜上皮細胞は、取り出した羊膜をスクレーパーで上皮を剥がした後に、培養を行った。脂肪由来幹細胞は、ウサギの鼠頸部より、脂肪組織を取りだし、酵素処理を施し、培養を行った。この脂肪由来幹細胞フローサイトメトリーを行った結果、間葉系幹細胞マーカーである CD44 が陽性で、CD11b、CD31、CD45 が陰性であった。

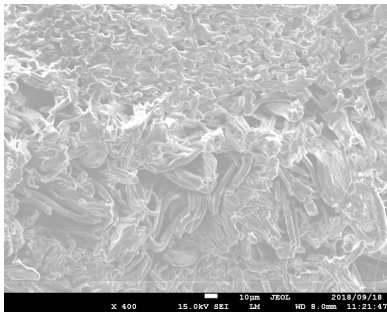


図 1. 1 体型 2 層性足場材料 SEM 写真

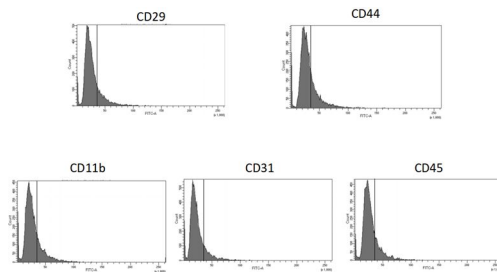


図 2. 採取した脂肪由来幹細胞の分化・未分化マーカー発現

次に、採取した羊膜上皮細胞及び脂肪由来幹細胞を 2 層性の足場材料に播種し、ウサギの膀胱上部から三角部にかけて切り開いたモデルに対して、貼付縫合を行い、予後の組織形成と膀胱機能について検討を行った。その結果、6 ヶ月後の X 線膀胱造影で、材料を膀胱に貼付縫合した群は、蠕動運動が確認でき、膀胱内圧測定においても膀胱の容量変化が認められた。また、膀胱容量も少し増加が認められた。さらに、材料中央部の電気刺激による膀胱筋収縮測定にて、正常な筋収縮が見られるかどうかを検討したところ、筋収縮が認められた。組織学的にも材料群は尿路上皮と筋層の形成が認められた。今後、より長期間で膀胱破裂や膀胱尿管逆流症等の合併症の有無と、膀胱組織の癒痕化等を検討する必要があると考えられた。

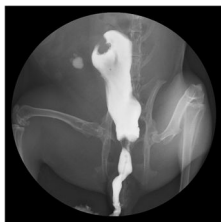


図 3. 6 カ月後膀胱造影写真

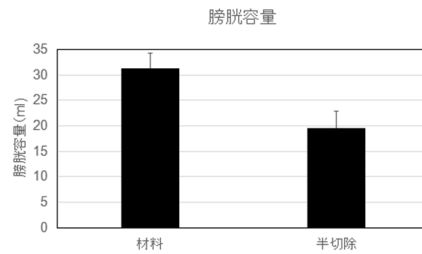


図 4. 膀胱容量の比較

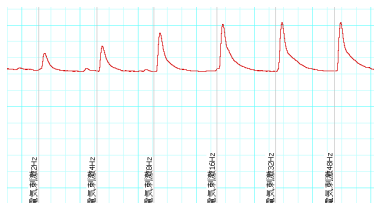


図 5. 電気刺激による再生膀胱筋収縮

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 0件）

1. 著者名 Horii Tsunehito, Tsujimoto Hiroyuki, Kageyama Susumu, Yoshida Tetsuya, Kobayashi Kenichi, Takamori Hideki, Minato Hiroshi, Ueda Jo, Hagiwara Akeo, Ichikawa Hiroshi, Kawauchi Akihiro	4. 巻 31
2. 論文標題 The usefulness of re-attachability of anti-adhesive cross-linked gelatin film and the required physical and biological properties	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bio-Medical Materials and Engineering	6. 最初と最後の頁 351 ~ 360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/BME-206009	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀井 常人, 萩原 明郎, 辻本 洋行, 上仁 数義, 影山 進, 吉田 哲也, 小林 憲市, 富田 圭司, 窪田 成寿, 永澤 誠之, 河内 明宏
2. 発表標題 膀胱拡大術に対する羊膜と足場材料P(LA/CL)による機能的膀胱の再生
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀井 常人, 萩原 明於, 上仁 数義, 辻本 洋行, 影山 進, 吉田 哲也, 富田 圭司, 村井 亮介, 窪田 成寿, 河内 明宏
2. 発表標題 膀胱拡大術における羊膜と足場材料P(LA/CL)を用いた機能的膀胱の再生
3. 学会等名 第27回日本排尿機能学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀井常人, 萩原 明郎, 辻本 洋行, 上仁 数義, 影山 進, 吉田 哲也, 河内 明宏
2. 発表標題 生体吸収性 PGA 不織布の繊維間隔による細胞浸潤の違いと組織再生への影響
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021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
研究協力者	萩原 明郎 (Hagiwara Akeo) (90198648)	滋賀医科大学・泌尿器科学講座・客員教授 (14202)	
研究協力者	辻本 洋行 (Tsujiimoto Hiroyuki) (20521272)	同志社大学・研究開発推進機構・嘱託研究員 (34310)	

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