

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008年～2010年

課題番号：20591877

研究課題名（和文） 自家骨髄幹細胞移植による膀胱再生療法

研究課題名（英文） Bladder reconstruction by autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell

研究代表者

石塚 修（ISHIZUKA OSAMU）

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：20184541

研究成果の概要（和文）：

臨床的な観点から考えると、膀胱の再生においては、膀胱頸部、つまり尿道括約筋部の再生が、尿失禁の予防には重要である。まず、われわれは、ラビットの大腿骨骨髄より注射針で骨髄由来幹細胞を採取し培養し増殖することを可能とした。その培養細胞を、障害を与えた尿道括約筋に移植し、尿道括約筋部の再生を免疫染色およびRT-PCR法にて組織学的に、また、機能的検査にても確認することができた。

研究成果の概要（英文）：

From the clinical point of view, urethral sphincter reconstruction is important to prevent urinary incontinence in the field of bladder reconstruction. At first, we could culture and proliferate the bone-marrow-derived mesenchymal stem cells derived from the femur of rabbit. The cultured stem cells were implanted into the injured urethral sphincter, and we could found the reconstruction of the urethral sphincter by histological methods (immunohistochemistry, RT-PCR method) and functional study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：泌尿器科学

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：骨髄幹細胞、再生医療、膀胱

## 1. 研究開始当初の背景

何らかの理由で臓器またはその機能を喪

失した場合の治療は永遠の課題である。近年、生命科学とテクノロジーの進歩により、再生

医療は組織の誘導、そして最終的には組織・臓器の新生なども視野に入れたきわめて能動的な手段として登場してきている。

そのような再生医療の発展の中で、骨髄幹細胞の多分化能が注目されるようになった。そのきっかけとしては、骨髄移植を受けた患者や実験動物の組織を調べてみると、ドナー由来の細胞が様々な臓器に存在することが発見され、骨髄に存在する幹細胞も各種臓器の代謝や損傷を補充する役割を担っているのではないかと考えられるようになってきたためである。

幹細胞の泌尿器科領域での応用については尿失禁に対する尿道の再生治療としての報告が散見される。

インスブルック大学グループ、ピッツバーグ大学グループから、いずれも米国泌尿器科学会総会 2004、2006 で発表されている。手法としては、前者は患者の左上腕の筋肉を生検し、得られた組織から筋芽細胞と線維芽細胞を培養して、得られた筋芽細胞、線維芽細胞をコラーゲンと混合して尿道粘膜組織下に超音波ガイドで注入する手法である。後者は針生検で患者の筋組織を得て、同様に筋芽細胞の培養を行い、筋芽細胞を尿道横紋筋内に注入する手法である。いずれも良好な結果を得たと報告している。

国内では既に数施設で臨床応用をめざした基礎的研究が行われている。例えば、前立腺全摘除術の時に採取したヒト外尿道確約筋からヒト外尿道括約筋衛生細胞の分離培養が大分大学より報告されており、筋の分化誘導にはHGFは抑制インスリン様成長因子が促進すると報告されている（日泌尿会誌 97:377, 2006）。これらの報告は、いずれも筋芽細胞、線維芽細胞を利用して、尿道括約筋の再生を試みた報告であり、器官としての再生を試みた報告でないのが現状である。

われわれはこれまでにマウスを使用した骨髄幹細胞による膀胱の再生についての一連の研究を行ってきた。その研究成果としては、骨髄幹細胞は膀胱筋層を再生し、粘膜上皮下組織の一部も再生することを証明した（2006 日本泌尿器科学会総会賞、2007 Lapidus 賞 Grand Prize, *Neurourol.Urodyn.* 25: 562-563, 2006）。

その他、膀胱の再生では、ヒトの胎盤を使用した報告などが認められる（当教室 飯島ら 2005 日本泌尿器科学会総会賞）。

本研究は、多分化能を有すると考えられる骨髄幹細胞を、しかも、自分自身の幹細胞を利用して膀胱を器官として再生させる試みであり、これまでに報告のない試みである。

## 2. 研究の目的

本研究は多分化能を有すると考えられる骨髄幹細胞を利用して、障害を受けた膀胱に移植し、膀胱を器官として再生させる試みである。移植にあたっては自分自身の骨髄幹細胞を採取して、培養増殖した上で移植することを主目的としており、拒絶反応を考慮する必要がなく、これまでに報告のない試みである。

われわれはこれまでにマウスを使用した骨髄幹細胞による膀胱の再生についての一連の研究を行ってきた。その研究成果としては、骨髄幹細胞は膀胱筋層を再生し、粘膜上皮下組織の一部も再生することを証明した（2006 日本泌尿器科学会総会賞、2007 Lapidus 賞 Grand Prize, *Neurourol.Urodyn.* 25: 562-563, 2006, *Cell Transplantation* (in press)）。

これまでの研究では実験動物としてマウスを使用しており、ICR雄マウスの骨髄幹細胞を採取して、BALB/C nu/nu 雌 nude マウスに移植する（拒絶反応への配慮のため）という同種移植による実験手法

であった。

本研究は、これまでの研究の延長線上にあるものであり、特徴としては、

- (1) マウスよりもやや大型のラットもしくはラビット、羊を使用して、拒絶反応を考えなくてもよい同一個体で移植を試みること
- (2) これまでのわれわれの実験での膀胱への障害の与え方は漿膜側より $-80^{\circ}\text{C}$ のアイスバーで障害を与えるという臨床ではやや考えにくい障害の作成法であったため、より臨床的な膀胱の障害例として放射線による膀胱障害、下部尿路閉塞による二次的な膀胱障害を想定した点である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨髄幹細胞の採取と培養

ラット、ラビット、羊の大腿骨骨髄より注射針で骨髄由来幹細胞を採取し 15% fetal bovine 血清および抗生剤附加の Dulberco Modified Eagle Medium の中に入れる。細胞を遠心分離した後に、Type I collagen でコートした培養皿で 7 日間培養する。

採取部位、培養条件を様々な状況で確認することにより、一定の手技を確立する。

#### (2) 培養細胞のマーキング

培養途中の 5 日目の時点で、Lipofectamine 2000 Reagent を使用し、GFP (Green fluorescence protein) 発現遺伝子を培養細胞内にトランスフェクションしてマーキングする。

#### (3) 障害部位への移植

漿膜側より $-80^{\circ}\text{C}$ のアイスバーで障害を受けた膀胱もしくは膀胱頸部（尿道括約筋部）へ、30G 注射針を使用して膀胱壁に培養細胞  $1 \times 10^5$  個/50 $\mu\text{l}$  を

移植する。

#### (4) 組織学的な再生の確認

移植後 3 日目、14 日目に膀胱を取り出す。Monoclonal anti-GFP 抗体、平滑筋特異抗体を使用して免疫二重染色を行い、レーザー蛍光顕微鏡で移植した細胞の分化、つまり、筋層をはじめとする膀胱の再生を観察する。

また、14 日目の膀胱においては、Acta2 primer を使用して alpha smooth muscle actin を、Myh11 primer を使用して smooth muscle myosin heavy chain を、Real time RT-PCR 法にて定量測定し、骨髄幹細胞の膀胱平滑筋への分化についての評価も定量的に行う。

#### (5) 機能的な再生の確認

14 日目に膀胱を摘出しなかった別の移植ラット、ラビット群においては膀胱としての機能を覚醒下無拘束状態下での膀胱内圧検査を行い、膀胱としての機能が再生したかをコントロールと比較して検証する。

### 4. 研究成果

これまでの自家骨髄幹細胞移植による膀胱再生研究では実験動物としてマウスを使用しており、ICR 雄マウスの骨髄幹細胞を採取して、BALB/C nu/nu 雌 nude マウスに移植するという同種移植による実験手法であった。そのため、本年度は昨年度より引き続き、マウスよりも大型のラビットを使用して、同一個体での移植を試みた。

ラビットの大腿骨骨髄より注射針で骨髄由来幹細胞を採取し 15% fetal bovine 血清および抗生剤附加の Dulberco Modified Eagle Medium の中に入れる。細胞を遠心分離した後に、Type I collagen でコートした培養皿で 7 日間培養し増殖することが可能であった。

細胞のマーカーとして、GFP (Green fluorescence protein) 発現遺伝子よりも蛍光発現性の長い Qtracker labeling kits を使用して、マーキングした。膀胱頸部 (尿道括約筋部) の再生に注目し、膀胱頸部を粘膜面より -80°C のアイスバーで障害与え、その障害部位へ、30G 注射針を使用して培養した細胞  $1 \times 10^5$  個/50 $\mu$ l を移植した。

移植後 3 日目、14 日目に膀胱を取り出し、Monoclonal anti-GFP 抗体、平滑筋特異抗体を使用して免疫二重染色を行い、レーザー蛍光顕微鏡で移植した細胞の分化、つまり、筋層をはじめとする膀胱頸部の再生を確認した。14 日目の膀胱においては、Acta2 primer を使用して alpha smooth muscle actin を、Myh11 primer を使用して smooth muscle myosin heavy chain を、Real time RT-PCR 法にて定量測定し骨髄幹細胞の膀胱平滑筋への分化についての評価を定量的に行うことも可能であった。

また、膀胱内圧検査による尿道機能評価においても機能回復を証明することが可能であった。

これら一連の研究は、原著論文としての公表、および、多くの国際学会で発表し、高く評価された。

#### 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 10 件)

- ① Imamura, T., Ishizuka, O., Kinebuchi, Y., Kurizaki, Y., Nakayama, T., Ishikawa, M., Nishizawa, O.: Implantation of autologous bone marrow-derived cells reconstructs functional urethral sphincters in rabbits. Tissue Eng. 査読有 Part A 2010 Nov 23. (Epub ahead of print)

- ② Mimura, Y., Imamura, T., Kinebuchi, Y., Aizawa, N., Ishizuka, O., Nishizawa, O.: Rat bladders augmented with a novel bovine pericardium-derived biomaterial reconstruct functional tissue structures. LUTS, 査読有 2: 76-82, 2010.
- ③ Kinebuchi, Y., Aizawa, N., Imamura, T., Ishizuka, O., Igawa, Y., Nishizawa, O.: Autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation into injured rat urethral sphincter. Int.J.Urol., 査読有 17:359-368, 2010.
- ④ Imamura, T., Yamamoto, T., Ishizuka, O., Gotoh, M., Nishizawa, O.: The microenvironment of freeze-injured mouse urinary bladders enables successful tissue engineering. Tissue Eng., 査読有 15(11): 3367-3375, 2009
- ⑤ Imamura, T., Kinebuchi, Y., Ishizuka, O., Seki, S., Igawa, Y., Nishizawa, O.: Implantation of mouse bone marrow cells reconstructs layered smooth muscle structures in injured urinary bladder. Cell transplantation 査読有 17: 267-278, 2008.

[学会発表] (計 19 件)

- ① Minagawa, T., Imamura, T., Aizawa, N., Ishizuka, O., Igawa, Y., Nishizawa, O.: Implantation of human amniotic mesenchymal cells promotes morphological and functional recovery of the freeze-injured mouse urinary bladder. 25<sup>th</sup> EAU 2010. Barcelona. 2010/4/16-20.
- ② Imamura, T., Yamamoto, T., Ishizuka, O., Gotoh, M., Nishizawa, O.: Mice freeze-injured urinary bladders provide a microenvironment for bone

marrow-derived cells to regenerate  
smooth muscle layers. The 4<sup>th</sup>  
Pan-pacific continence society meeting.  
Fukuoka, 2009/9/10.

- ③ Ishizuka, O.: Possibility of regeneration  
of urinary bladder and urethral  
sphincter by own bone marrow cell.  
2009 Asia-European International  
Academic Forum for Urethral  
Reconstruction. 2009/2/6, Shanghai.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石塚 修 (ISHIZUKA OSAMU)  
信州大学・医学部・准教授  
研究者番号：2 0 1 8 4 5 4 1

(2) 研究分担者

今村 哲也 (IMAMURA TETSUYA)  
信州大学・医学部・研究員  
研究者番号：0 0 4 6 7 1 4 3