

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791104
 研究課題名（和文）ウサギ放射線照射傷害膀胱に対する自己骨髄由来細胞による機能的な膀胱再生への試み
 研究課題名（英文）Autologous rabbit bone marrow-derived cells implanted into radiation-injured urinary bladders recovery functional tissue structures
 研究代表者
 今村 哲也（IMAMURA TETSUYA）
 信州大学・医学部・研究員
 研究者番号：00467143

研究成果の概要（和文）：我々は、放射線治療により傷害を受けた膀胱に自己骨髄由来細胞を移植することによって、正常な機能を有する膀胱が再生するのかどうか検討を行った。本研究では、ウサギ、あるいは、ラット膀胱に放射線を照射し、個体差がなく再現性のある放射線照射傷害膀胱モデルの確立を目指し研究を進めた。同時に、移植実験に用いる自己骨髄由来細胞の採取、培養を可能にする手技を確立した。適切なモデルの確立には至らなかったが、研究を遂行するための成果を確実に挙げる事ができた。

研究成果の概要（英文）：We investigated to determine if implantation of autologous bone marrow-derived cells into radiation-injured urinary bladders recovered functional tissue structures. In this study, we attempted to produce the radiation-injured urinary bladders, however the proper models were not established. We have established the methods to obtain high quality autologous bone marrow-derived cells. Therefore, our projects had been developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医学研究

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：再生医療・膀胱組織再生・放射線照射傷害・自己骨髄由来細胞移植・フラッシュアウト法・細胞培養

1. 研究開始当初の背景

再生医療研究における主たる研究は、難治性疾患の治療、あるいは、臓器移植医療におけ

るドナー不足を補うことを目的として精力的に行われている。しかし、治療過程で生じる副次的な傷害によって、機能障害を受けた臓器、あるいは、器官組織に対する再生医療についての研

究については、ほとんど皆無といえる。

膀胱癌、前立腺癌、子宮癌等の治療は、主に手術、薬物治療、放射線療法が行われている。これらの治療では、多くの場合で膀胱機能障害が生じる。しかし、その膀胱機能障害の改善、膀胱機能の回復は非常に困難である。本研究は、特に、放射線治療後に生じた膀胱機能障害に注目した。

現在、放射線療法後に生じた膀胱機能障害に対して、患者自身が尿道からカテーテルを挿入し、尿を排出するという、間欠的自己導尿が行われている。この自己導尿には、挿入したカテーテルからの感染、放射線照射によって脆弱化した膀胱、尿道の損傷などの多くの危険を有している。そして、最大の課題は、カテーテルを尿道から挿入するという、患者の負担、生活の質（QOL）の低下である。間欠的自己導尿を回避するには、放射線照射によって傷害を受け、機能低下（消失）した膀胱に対して、機能的な膀胱組織の再生が有望である。

これまでの研究から、マウス膀胱に凍結傷害を与え、膀胱平滑筋層を破壊した組織に骨髄由来細胞を移植すると、平滑筋層が再生すると共に、移植した骨髄由来細胞は平滑筋細胞へ分化することを報告した。また、平滑筋層の再生だけではなく、骨髄由来細胞からの神経細胞への分化や血管様構造の形成を認めた。さらに、骨髄由来細胞移植によって再生された膀胱は、正常膀胱と同等の機能を有していることを報告した。即ち、骨髄由来細胞移植により、機能的な膀胱の再生が可能であることを確認した。そこで、本研究は、放射線治療後に生じた膀胱機能障害に対して、骨髄由来細胞移植による機能的な膀胱組織再生を目指した。

膀胱癌、前立腺癌や子宮癌等の放射線療法において、放射線照射による膀胱やその周辺組織損傷の懸念から、照射線量が制限され、高い治療効果が得られない場合がある。または、放射線照射によって、周囲の組織が傷害を受け、患者のQOLが著しく低下してしまう場合がある。従って、本研究によって、膀胱癌や前立腺癌、さらには子宮癌等の放射線療法において、高レベル放射線照射による治療効果の向上、治療後の膀胱機能障害の回避に伴うQOLの向上など、患者にとって有益となる新たな展開が期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、放射線照射によって膀胱組織が傷害を受け、機能障害が生じた膀胱に対して、自己骨髄由来細胞移植治療は、正常な膀胱へと再生が可能かどうか検討をした。最初に、膀胱に放射線照射することによって傷害を

与え、膀胱機能障害を有するモデルを確立することを旨とした。本研究は、より臨床に近いモデルにすることを考慮し、傷害を与えた動物から骨髄細胞を採取し、同一個体の傷害部位に自家移植する計画をたてた。従って、モデル作製実験と並行して、自己骨髄由来細胞移植実験を可能とするための骨髄由来細胞の採取・培養手技の確立を目指した。これらの手技手法を組み合わせて、放射線照射傷害膀胱モデルの膀胱平滑筋層に自己骨髄細胞移植を試みた。移植後一定期間をおき、移植された膀胱の組織・機能を評価することによって、膀胱組織が再生するのかどうか、また、再生した膀胱は本来の機能を取り戻しているのかどうかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 放射線照射傷害膀胱モデルの作製：実験動物をペントバルビタールナトリウム

(25mg/kg)で全身麻酔をかけ、下腹部を剃毛した後、保定台に乗せた。膀胱への局所的な放射線照射を行うため、照射しない部位に鉄板(自作)をあて保護した。1分間に1または、2グレイの線量を、一週間に1回、4サイクル照射した。放射線照射を終えた動物に対して、膀胱内圧測定(下記(4)の通り)を行い、膀胱機能障害の有無、その程度を確認した。測定終了後、動物を安楽死させ膀胱を摘出し、組織学的解析および、遺伝子発現量解析(下記(5)の通り)を行った。放射線照射傷害膀胱モデル作製において、最も重要な課題は、個体差がなく、再現性のあるモデルを確立することである。そのため目的に合うモデルが作製できるまで、放射線照射条件の変更、例えば、照射線量を大きくする、被爆回数を増やすなど、条件設定について検討を行った。

(2) 自己骨髄由来細胞の採取と培養：上記

(1)と同様に、実験動物をペントバルビタールナトリウム(25mg/kg)で全身麻酔をかけた後、保定台に乗せた。大腿骨の上部(骨盤側)と下部(膝側)に小児用骨髄生検針を刺した後、一方から生理食塩水押し流し、他方から流れ出てきた骨髄細胞を採取するという、フラッシュアウト法を行った。採取した骨髄細胞をコラーゲンコートした培養フラスコに播種し、15%血清入り培地で培養を10日間行った。また、移植部位での細胞検出のため、培養8日目に蛍光発色タンパク(GFP)遺伝子をリポフェクタン法にて導入した。この培養において、培養皿に接着・伸展し、細胞標識を行った細胞を骨髄由来細胞として移植実験に用いた。

(3) 放射線照射によって傷害を受けた膀胱

への自己骨髄由来細胞移植：上記（1）の方法に従い、放射線照射傷害膀胱モデルを作製した。放射線照射4サイクル目を行ってから、1週間後、フラッシュアウト法により、その動物の骨髄細胞を採取した。上記（2）の方法に従い、骨髄細胞を培養し、移植細胞を得た。得られた骨髄由来細胞を、その細胞由来の個体における傷害膀胱の10箇所、それぞれ骨髄由来細胞 1×10^5 個（総数 1×10^6 個）を注入移植した。対照群には、無細胞液を注入した。移植後、1, 2, および4週目に、骨髄由来細胞移植による膀胱機能の変化を、膀胱内圧測定により時間経過での比較及び、対照群との比較によって評価した（下記(4)の通り）。膀胱組織の再生については、摘出した膀胱を免疫組織染色及び、遺伝子発現量の解析により評価した（下記(5)の通り）。

（4）膀胱内圧測定：移植後、1, 2, および4週目に、実験動物をセボフルラン吸入で全身麻酔をかけた後、膀胱にカテーテルを留置した。圧力測定装置と連結したカテーテルと膀胱留置カテーテルを連結した。生理食塩水を100ml/hrの流速で、先に連結した膀胱留置カテーテルを介して、膀胱に注入し、そのときの膀胱内圧を圧力測定装置で測定すると共に、経時的に記録した。膀胱に注入した生理食塩水が尿道から漏れ出たときの膀胱内圧値を記録した。また、生理食塩水注入時間から注入量を換算した値を求めた。漏れ出たときの膀胱内圧値を生理食塩水注入量で割ることによって、膀胱コンプライアンス (cmH₂O/ml) を算出した。

（5）免疫組織染色・遺伝子発現量の解析：移植後、1, 2, および4週目に、膀胱内圧測定を行った後、膀胱を摘出した。摘出した膀胱は、免疫組織染色用検体は、4%パラホルムアルデヒドにて固定を行い、一方、遺伝子発現量解析用検体は、組織RNA保存液に浸漬した。膀胱組織の再生を評価するために、平滑筋層の再生及び、神経細胞の再生に焦点を当てた。平滑筋層再生の評価は、平滑筋特異的マーカーである、alpha smooth muscleactin, myosin heavy chain, desmin, calponin I の発現に対して、神経細胞再生の評価は、神経特異的マーカーである S100 の発現に対して、免疫組織染色および、リアルタイム RT-PCR（相対的遺伝子発現量定量）にて行った。また、移植した細胞は、GFP 抗体を用いて、免疫組織染色により検出した。

4. 研究成果

（1）ウサギ放射線照射障害膀胱モデル作製について：個体差がなく、再現性があるモデ

ルの作製は困難であった。その原因は、使用予定していた既存の放射線照射装置の規格では、ウサギ個体差を補う調整（放射線照射距離、照射部位の微調整など）ができなかった。そこで、実験動物をウサギから、ラットに変更し、放射線照射傷害膀胱モデル確立を目指し研究を進めている。

（2）ラット放射線照射障害膀胱モデル作製について：ラットを照射線量によって群分けを行った。麻酔をかけたラットを保定台に乗せ、膀胱の位置を確認しマークした。ラットに鉄板をかぶせ、膀胱のみ局所的な放射線照射ができるように、鉄板にあけた穴を膀胱位置マークした部位に合わせた（図1）。本研究では、1分間に1または、2グレイの線量を、一週間に1回、4サイクル照射するプロトコルを施行した。放射線照射処置を終えた1週間後、膀胱内圧測定を行った。この条件において、2グレイを照射した群のラットは、1グレイを照射したラットと比較して、排尿時膀胱収縮力が低下する傾向があったが、有意差は認められなかった。組織解析においても、両群間の明らかな差は、認められなかった。また、本研究で行った放射線照射条件では、個体差でのバラツキが大きく、再現性という視点からも課題が残った。現在、この原因については検討中である。今後、本研究の目的に合う、つまり、明らかな組織損傷と膀胱機能障害を有しており、個体差がなく、再現性のあるモデルが作製できるまで、放射線照射条件の変更、例えば、照射線量を大きくする、被爆回数を増やすなど、条件設定について検討を行っていく予定である。



図1 ラットの全身（照射時は、頭部も保護する）を保護し、膀胱（穴部位）に放射線照射する。

（3）ウサギ自己骨髄由来細胞の採取と培養について：ウサギ大腿骨の上部（骨盤側）と約2cm離れた下部（膝側）に、2本の小児用骨髄針を刺し、一方から生理食塩水を押し流し、他方から押し流されてきた骨髄細胞を回収するという、フラッシュアウト法という手技を確立した（図2）。このフラッシュアウト法で得られた細胞は、血球成分、骨細胞など多種多様な細胞が混在していた。そこで、採取された細胞を、コーゲンコートされた培養フラスコに播種し、15%血清入り培地で培養を10日間行った。培養期間中、1日おきに培地を全量交換し、培養フラスコに接着しなかった細胞を取り除いた。培養10日後、培養フラスコに接着・伸展した細胞を骨髄由来細胞とし、移植実験に用いることにした。

フラッシュアウト法で採取され、培養された細胞は、個体に関係なく再現性も得られた。また、培養8日目に、移植部位での細胞を検出するために、緑色蛍光発色タンパク (GFP) をコードした遺伝子を導入し、細胞標識を行った。この細胞標識化に関しては、多くの方法論が確立されているが、我々が行ったリポフェクタン法は、細胞のダメージが最も小さく、高効率・再現性を確保できることを確認した。



図2 フラッシュアウト法による骨髄細胞採取

(4) ラット自己骨髄由来細胞の採取と培養について：ウサギの場合と同様に、フラッシュアウト法にて骨髄細胞を採取でき、培養によってコラーゲンコートされた培養皿に接着・伸展した骨髄由来細胞を得ることができた。また、細胞標識も、ウサギ骨髄細胞で行った方法と同様に行うことができた。ラットにおいても、これらの骨髄由来細胞は、個体に関係なく再現性も得られた (図3)。培養を終えた時点での骨髄由来細胞は、平滑筋マーカー抗体に陰性であった、即ち、培養終了時点では、平滑筋に分化していないことも確認した (図4)。放射線照射によって傷害を与えた部位に移植することによって、この細胞が平滑筋に分化するのかどうか検討を行って行く予定である。本研究で、実験動物をウサギから、ラットに変更した場合、最も困難と考えていたラット自己骨髄細胞の採取・培養を確立できた。今後の研究遂行のための大きな成果である。

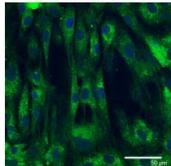


図3 培養終了時のラット自己骨髄由来細胞 緑：GFP

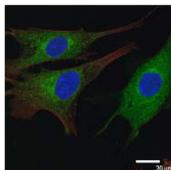


図4 培養直後の骨髄由来細胞は、平滑筋マーカー抗体 (SMA：赤) に陰性である。緑：GFP；青：核

(5) ウサギ膀胱機能測定および、組織解析について：放射線照射処置1週間後、膀胱機能障害の有無、その程度など評価するため、膀胱内圧測定を行った。この測定を行うために、ウサギ用の膀胱機能 (内圧) 測定装置を

作製した (図5)。麻酔をかけたウサギを保定台上に固定し、開腹して膀胱を露出した。膀胱にカテーテルを留置し、圧力測定装置と連結したカテーテルと接続した。生理食塩水を100ml/hrの流速で、膀胱留置カテーテルから膀胱に注入し、そのときの膀胱内圧を圧力測定装置で測定するとともに、経時的に記録した。膀胱に注入した生理食塩水が尿道から漏れ出たときの膀胱内圧と、生理食塩水注入時間から注入量を換算した値で割った膀胱コンプライアンス (cmH₂O/ml) によって、膀胱機能評価を行った。1グレイと2グレイとの放射線量の違いによる膀胱コンプライアンスには、差がなかった。また、対照群の放射線照射しない群との比較においては、放射線照射した群の膀胱コンプライアンスは、低下する傾向があったが、統計学的な有意差は得られなかった。

組織学的解析における組織標本作製では、当初想定していなかったウサギ膀胱内の結石 (砂状尿) により困難を極めた。しかし、膀胱に付着し、除去ができない結石に対して、カルシウムキレート剤を用いた脱灰処理を施行することによって、組織標本作製することが可能であることを確認できた。作製した標本を組織学的解析したところ、放射線照射によって生じたと考えられる明らかな組織傷害は、認められなかった。

しかし、一部の個体においては、膀胱機能測定および、組織学的解析で、放射線照射によって傷害を受け、膀胱機能障害が生じたと考えられる個体もあった。しかし、これは、グループ内でのバラツキであるため、再現性という視点では、本研究の目的に合わない判断した。この原因は、4.(1)でも述べたが、既存の放射線装置の規格では、ウサギの個体差を補うための照射距離、照射部位の微調整ができなかったためと考えている。



図5 ウサギ膀胱機能 (内圧) 測定装置

(6) ラット自己骨髄由来細胞移植について：本研究を遂行するためには、2つの課題を解決しなければならない。1つは、自己骨髄細胞の採取と培養によって、移植用の自己骨髄由来細胞を得ることである。この課題に関しては、実験動物が、ウサギでも、ラットでも、個体差がなく、高品質な細胞が得られたことから解決できた。もう一つは、膀胱に放射線照射することによって傷害を与え、膀胱機能障害を有するモデルを確立することである。この放射線照射傷害膀胱モデルは、

個体差がなく、再現性があることが命題である。しかし、当初計画していたウサギでは、この課題を解決することができなかった。従って、実験動物をラットに変えて、この課題に取り組んでいる。放射線照射傷害膀胱モデルが確立次第、自己骨髄細胞移植実験に移行したと考えている。

(7) 今後の展望：現在の再生医療研究は、難治性疾患の治療、あるいは、臓器移植医療におけるドナー不足を補うことを目的が主である。しかし、治療過程で生じる副次的な傷害によって、機能障害を受けた臓器、あるいは、器官組織に対する再生医療についての研究については、ほとんど皆無といえる。本研究は、放射線療法による組織損傷のため、患者のQOLが著しく低下してしまった場合を想定した研究である。本研究によって、今後の放射線療法における患者の利益が大きくなる新たな展開が期待できる。

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 Tetsuya Imamura, Osamu Ishizuka, (他3名). Bone Marrow-Derived Cells Implanted into Freeze-injured Urinary Bladders Reconstructs Functional Smooth Muscle Layers. LUTS, 2009 掲載決定, 査読有
- ② Yuji Mimura, Tetsuya Imamura, (他4名). Rat Bladders Augmented with a Novel Bovine Pericardium-Derived Biomaterial Reconstruct Functional Tissue Structures. LUTS, 2009 掲載決定, 査読有
- ③ Tomonori Minagawa, Tetsuya Imamura, (他4名). Differentiation of Smooth Muscle Cells from Human Amniotic Mesenchymal Cells Implanted in The Freeze-injured Mouse Urinary Bladder. European Urology, 2009 掲載決定, 査読有
- ④ Yoshiaki Kinebuchi, Naoki Aizawa, (他4名, 3番目). Autologous Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation into Injured Rat Urethral Sphincter. International Journal of Urology, 2009 掲載決定, 査読

有

- ⑤ Teruyuki Ogwa, Toshiki Homma, (他4名, 6番目). CXCR3 Binding Chemokine and TNFSF14 Over Expression in Bladder Urothelium of Patients With Ulcerative Interstitial Cystitis. The Journal of Urology, (183, 1206-1212, 2010, 掲載).2009 掲載決定, 査読有
- ⑥ Tetsuya Imamura, Tomonori Yamamoto, (他3名). The Microenvironment of Freeze-injured Mouse Urinary Bladders Enables Successful Tissue Engineering. Tissue Engineering, 15(11), 3367-3375, 2009.査読有
- ⑦ Tetsuya Imamura, Osamu Ishizuka, (他7名). An Extract (THC-002) of Ba-Wei-Die-Huang-Wan Inhibits Expression of Tachykinins, and P2X3 and TRPV1 Receptors, and Inhibits ATP-Induced Detrusor Overactivity in Spontaneously Hypertensive Rats. Neurourology and Urodynamics, 28, 529-534, 2009.査読有
- ⑧ Chen Zhong, Osamu Ishizuka, (他6名,3番目). Stimulation of Skin Menthol Receptors Stimulates Detrusor Activity in Conscious Rats. Neurourology and Urodynamics, 2009 掲載決定, 査読有
- ⑨ Chen Zhong, Osamu Ishizuka, (他5名,3番目). Role of $\alpha 1$ -Adrenergic Receptors in Detrusor Overactivity Induced by Cold Stress in Conscious Rat. Neurourology and Urodynamics,28, 251-256, 2009.査読有
- ⑩ Tetsuya Imamura, Yoshiaki Kinebuchi, (他4名). Implanted Mouse Bone Marrow-Derived Cells Reconstruct Layered Smooth Muscle Structures in Injured Urinary Bladders. Cell Transplantation, 17, 267-278,

2008.査読有

- ⑪ Tetsuya Imamura, Osamu Ishizuka, (他6名).
Cold Environment Stress Induces Detrusor
Overactivity via Resiniferatoxin-Sensitive
Nerves in Conscious Rats. *Neurourology and
Urodynamics*, 27, 348-352, 2008.査読有
- ⑫ Tetsuya Imamura, Osamu Ishizuka, (他6
名). Goshajinkigan Reduces Transmitter
Protein and Sensory Receptors Associated
with C Fiber Activation Induced by Acetic
Acid in Rat Urinary Bladder. *Neurourology
and Urodynamics*, 27, 832-837, 2008.査読
有

[学会発表] (計4件)

- ① 今村哲也、ウサギ腹圧性尿失禁モデルを
用いた自家骨髄細胞移植による尿失禁
改善への検討、第9回日本再生医療学会
総会、2010.3.19、広島
- ② 今村哲也、Mice Freeze-injured Urinary
Bladders Provide a Microenvironment
for Bone Marrow-Derived Cells to
Regenerate Smooth Muscle Layers、The
4th Pan-Pacific Continence Society
Meeting、2009.9.10、福岡
- ③ 今村哲也、骨髄細胞移植による膀胱平
滑筋層再生が生じた凍結傷害膀胱組織
の検討、第97回日本泌尿器科学会総
会、2009.4.17、岡山
- ④ 今村哲也、凍結傷害を受けた膀胱組織で
の骨髄細胞移植による膀胱平滑筋層の
再構築における環境の解明、第8回日本
再生医療学会総会、2009.3.6、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 哲也 (IMAMURA TETSUYA)

信州大学・医学部・研究員

研究者番号：00467143