

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791122

研究課題名（和文）

骨格筋間質由来幹細胞を用いたラット尿道括約筋及び神経血管束の再生・再建

研究課題名（英文）

Reconstitution of urethral sphincter and neurovascular bundle using skeletal muscle-derived multipotent stem cells.

研究代表者

星 昭夫 (HOSHI AKIO)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：90453711

研究成果の概要（和文）： 前立腺全摘除術々後合併症である尿失禁や勃起障害は、尿道括約筋(Urethral rhabdosphincter: URS)及びその周囲の神経血管束(Neurovascular Bundle: NVB)の障害が原因である。われわれは筋・血管・神経ユニットへの分化能を有する骨格筋間質由来幹細胞群を発見しており、これらを尿道周囲への自家移植し、URS 及び NVB が再生し得るか実験を行った。結果は、URS にドナー由来の横紋筋線維が多数認められた。さらに、NVB 内にドナー由来の神経周膜・シュワン細胞や、血管平滑筋・周皮細胞・血管内皮細胞を認め、尿道及び NVB において筋・血管・神経ユニットの再構築を確認した。さらに、尿道機能回復を評価するため尿道内圧を測定し、移植群で有意な回復を認めた。これら結果から、骨格筋間質由来幹細胞移植治療は前立腺全摘除術々後の尿道及び NVB の再生再構築に寄与することが示された。

研究成果の概要（英文）： Postoperative damage of the urethral rhabdosphincter (URS) and neurovascular bundle (NVB) is a major operative complication of radical prostatectomy. It is generally recognized to be caused by unavoidable surgical damage to the muscle-nerve-blood vessel units around the urethra. We have identified two stem cell populations in the skeletal muscle that are able to reconstitute the muscle-nerve-blood vessel unit. Thus, we tried to reconstitute post-operative damage of urethral sphincter and NVB using these stem cells. Results showed that transplanted cells differentiated into skeletal muscle fibers, peripheral nerve (Schwann cells, perineurium) and blood vessel (endothelial cells, pericyte) relating cells and facilitated the reconstitution of the muscle-nerve-blood vessel units around the urethra. Supporting these data, significant functional recovery ($P<0.05$) of urethral sphincter and NBV unit, which was evaluated as urethral pressure profile (UPP) via electrical stimulation, was observed in the cell-transplanted group compared to control group. These findings indicated that transplantation and/or treatment of skeletal muscle-derived stem cells is a useful tool for the reconstitution of reduced urethral function after radical prostatectomy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2009 年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：再生医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究は根治的前立腺全摘除術々後合併症である尿道括約筋 (Urethral rhabdosphincter: URS) 及びその周囲に存在する神経血管束 (Neurovascular Bundle: NVB) の損傷を、自己の体性幹細胞移植治療で再生させようとする臨床応用を目的としたトランスレーショナルな研究である。手術に伴う URS および NVB の損傷は術後尿失禁の原因となり、これらは患者の QOL を低下させる (星ら, 泌尿紀要, 2006)。従って、URS 及び NVB の再構築が可能となれば術後 QOL の向上に大きく貢献できる。近年、これらに対する再生医療による治療法が模索されており、Strasser ら (Strasser H et al, World J Urol, 2007) はヒトの腹圧性尿失禁患者に対し培養した骨格筋由来筋芽細胞および線維芽細胞 (本研究で用いる幹細胞とは抽出・分離・精製方法が大きく異なる) を URS に移植し、大きな副作用なく症状の改善をみたし報告している。これらは、URS に対する骨格筋由来筋芽細胞移植が、安全で有効であることを示唆しているものと考えられる。

(2) 2002 年、玉木らはマウス骨格筋間質より筋、血管内皮、脂肪細胞への分化能力を有する幹細胞群の同定・分離抽出・精製に成功した (Tamaki T et al, J Cell Biol, 2002; Tamaki T et al, Exp Cell Res, 2003)。さらにこれらの幹細胞群を用いた移植実験を進展させ、2005 年これらの幹細胞群は骨格筋細胞への分化に加えて、神経系の細胞にも分化して末梢神経線維を再構築する、即ち、移植後の生体(筋肉)内で、シュワン細胞へと分化し、ミエリンを構築、断裂した神経を再生・延長することを確認した。加えて、血管内皮細胞のみならず、血管系を構築するほとんどの細胞群 (周皮細胞、平滑筋さらに繊維芽細胞) にも分化し、大小の血管そのものを構築することを明かにした (Tamaki T et al, Circulation, 2005)。即ち、末梢の筋・血管・神経系をユニットとして再構築する幹細胞群であり、本研究の目的と合致する機能を有する幹細胞ソースである。

2. 研究の目的

(1) 本研究は根治的前立腺全摘除術々後合併症である URS 及び周囲に存在する NVB の損傷を自己の骨格筋間質由来幹細胞移植治療で再生させようとするトランスレーショナルな研究である。

(2) 本研究はこの骨格筋間質由来幹細胞の持つ、末梢の神経・筋・血管再構築能に注目し、その能力を泌尿器科手術に伴う URS 損傷及び NVB 損傷の再建に利用し、術後尿失禁を治療することを目指す。即ち、「自己の細胞を利用して、手術により損傷した部位を再生する」という正に「臨床における理想的な幹細胞移植法の確立」を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) ドナー動物には GFP トランスジェニックマウス (C57BL/6) 及びラット (SD) を用い、レシピエントにはヌードラット (F344/NJcl-mu/rnu) 及び正常 SD ラットを用いた。

(2) ヌードラット及び SD ラットを用い実験的 URS/NVB 損傷モデルを作成した。

(3) ドナー動物下肢筋群から酵素処理により細胞群を分離、細胞表面抗原 (CD34, CD45) による細胞標識とセルソーター (FACS) を用い純化、CD34+/45⁻ (Sk-34) 細胞、CD34+/45⁻ (Sk-DN) 細胞を得た (Tamaki T et al, J Cell Biol, 2002; Tamaki T et al, Exp Cell Res, 2003)。

(4) 細胞移植は、GFP-Tg マウス及びラットより得た Sk-34 細胞あるいは培養増幅した Sk-DN 細胞を損傷した尿道周囲へ直接注入とした。

(5) 移植後 4 週間で幹細胞の生着状況を in-situ にて実体蛍光顕微鏡を用いて GFP 陽性組織として確認した。

(6) その後、環流固定を行い、移植組織を摘出して凍結、組織切片を作成し各種抗体 (CD31:血管内皮マーカー、 α -Smooth muscle actin:血管平滑筋マーカー、myogenin:筋芽細胞マーカー、Skeletal muscle actin:骨格筋マーカー、GFAP:シュワン細胞マーカー、neurofilament-200:神経軸索マーカー等) を用いた免疫組織化学及び免疫電子顕微鏡的検索で移植細胞の分化状況を確認した。

(7) 新たに開発した URS 機能測定法 (Urethral Pressure Profile: UPP) を用い、尿道機能評価を行った。経膀胱的にカテーテルを尿道内に留置し、尿道末梢側を結紮、NVB を通した電気刺激による尿道内圧の変化をトランスデューサーにて測定、術後の尿道機能を移植群と非移植群で比較検討した。

4. 研究成果

(1) 機能測定：幹細胞移植後の URS 及び NVB の機能回復を評価するため術後 4, 12 週の UPP を測定した。術後 4 週の対照群 (n=5) の平均 UPP は $12.6 \pm 1.6 \text{ cmH}_2\text{O}$ であるのに対し、幹細胞移植群 (C/T; 図 1, n=5) は $24.2 \pm 2.7 \text{ cmH}_2\text{O}$ であり、C/T 群の UPP で有意に高い結果が示された ($p > 0.05$)。これらは図 1A に示した生データからも明らかである。術後 4 週のデータを術前正常値 (Pre-OP; 図 1B) に対する比率として比較すると、対照群の回復率が 37.6% であるのに対し C/T 群は 72.9% と極めて良好な改善を認めたことになる ($p > 0.05$)。この傾向は術後 12 週においても継続しており、術後 12 週の対照群 (n=4) の平均 UPP は $13.8 \pm 1.9 \text{ cmH}_2\text{O}$ 、回復率 41.6% に止まるのに対し、移植群 (C/T; 図 1B, n=4) の平均 UPP は $26.7 \pm 4.4 \text{ cmH}_2\text{O}$ 、回復率 78.4% とさらに良好な回復を認めた ($p > 0.05$)。

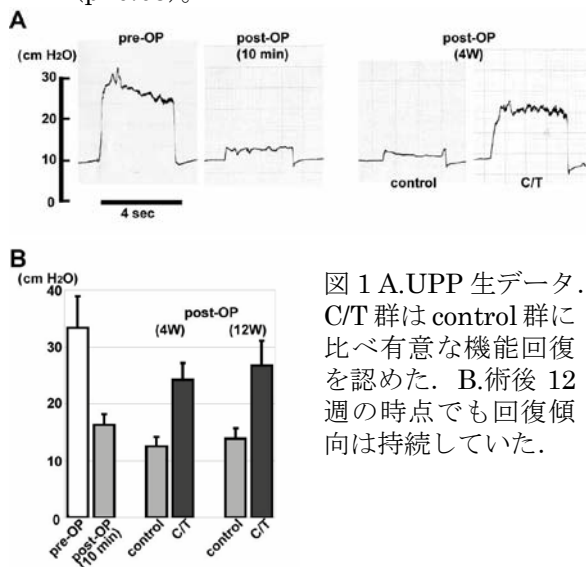


図 1 A. UPP 生データ。C/T 群は control 群に比べ有意な機能回復を認めた。B. 術後 12 週の時点でも回復傾向は持続していた。

(2) 免疫組織化学的検索： 蛍光顕微鏡による検索では、主に横断面に対して垂直に走行する多数の GFP 陽性骨格筋線維群 (GFP+MFs; 図 2A、縦走筋と考えられる) が観察された。同様に、横断面に対して平行方向に位置する GFP 陽性骨格筋線維群 (輪状筋と考えられる) も多数観察された (図 2A)。これらの GFP 陽性骨格筋線維は GFP 陰性 (レシピエント由来) 骨格筋線維 (GFP-MFs; 図 2A) と隣接して走行しており、既存の筋線維と協合する形で骨格筋線維を再構築したものと考えられた。さらに GFP 陽性細胞は、尿道周囲の NVB 内にも認められた。抗 α SMA 抗体による血管平滑筋および抗 N-200 抗体による神経軸索の同定を行い、これらが移植細胞 (GFP 陽性) から分化した神経系細胞 (GFP+NFs; 図 2B) 及び血管系細胞 (GFP+BV; 図 2B) であることが確認された。さらに、高倍率による観察と免疫電子顕微鏡検索により、これら GFP 陽性細胞が神

経系細胞 (神経周膜・シュワン細胞) 及び血管系細胞 (血管内皮細胞、周皮細胞、血管平滑筋) へ分化し、かつ既存の細胞と共同し尿道周囲組織の再構築に貢献していることが確認された。すなわち、骨格筋間質由来幹細胞移植治療が栄養血管再生や神経入力の新構築などにも関与し、結果として尿道周囲の筋・神経・血管をユニットとして再生・再構築し、その機能回復に大きく貢献したことを裏付けていた。

以上から、骨格筋間質由来幹細胞 (Sk-34 及び Sk-DN 細胞) を用いた幹細胞移植治療は、根治的前立腺全摘除術々後合併症 (術後尿失禁、勃起障害) の主因である URS/NVB 損傷を再生・再構築し、尿道機能回復に貢献し得ることが示された。

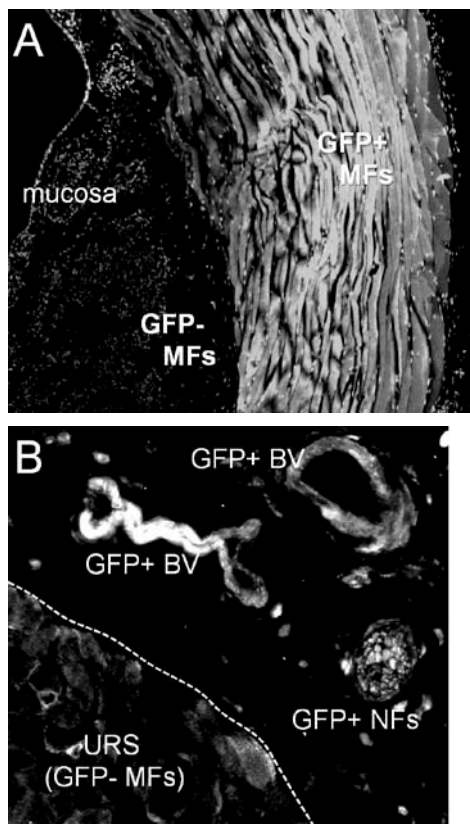


図 2 A. 尿道免疫染色横断面。尿道括約筋内にドナー由来筋繊維 (GFP+ MFs) を多数認めた。B. NVB 免疫染色横断面。尿道括約筋 (URS) 外側に存在する NVB 内にドナー由来血管 (GFP+ BV) およびドナー由来神経線維 (GFP+ NFs) が認められた。

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 1 件)

① Hoshi A, Tamaki T, Tono K, Okada Y,

Akatsuka A, Usui Y, Terachi T.
Reconstruction of Radical
Prostatectomy-Induced Urethral
Damage Using Skeletal
Muscle-Derived Multipotent Stem
Cells. Transplantation. 査読有, 85,
2008, 1617-1624

〔学会発表〕(計1件)

- ① 星昭夫、実験的ラット尿道括約筋・神経血管束損傷モデルを用いた新しい尿道機能評価法、第15回日本排尿機能学会総会、2008年9月12日、東京。

6. 研究組織

(1)研究代表者

星 昭夫(HOSHI AKIO)
東海大学・医学部・助教
研究者番号：90453711

(2)研究分担者

()

(3)連携研究者

玉木哲朗 (TAMAKI TETSURO)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：10217177