

令和 5 年 10 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09522

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞を利用した立体構造体を用いた尿路再生療法の検討

研究課題名(英文) 3D structure Tissue Engineering of lower urinary tract using mesenchymal stem cells.

研究代表者

石塚 修 (Ishizuka, Osamu)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：20184541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：実験動物の大腿骨の骨髓から幹細胞を採取し、シート状に培養増殖させて、積み重ねることによって、幹細胞の多層化を試みた。そのシートを実験動物の凍結傷害による膀胱、もしくは尿道、尿管に移植した。再生は通常の顕微鏡、および蛍光顕微鏡を用いて組織学的確認した。また、膀胱および尿道に対する尿流動態検査で機能的な再生を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義としては、骨髓幹細胞は自身の細胞を利用しているため、拒絶反応に対する配慮が不要であること、また、採取しただけの細胞では少量で再生を誘導することは不可能と考えられるため、一定期間、培養することによって増殖させた後に増殖を層状に行い、シート状に増殖させ、しかも多層構造を構築することにより、高度な機能をもつ膀胱、尿管、尿道などの管腔臓器の再生を試みている点である。また、再生された膀胱・尿管・尿道組織が十分な機能を持つかの検証も尿流動態検査を行い、生理的な状態で検証する点は独創的と考えられる。この研究成果は、何らかの理由により、膀胱・尿管・尿道機能を喪失した患者に光明を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow stem cells were taken from the animal femurs. The cells were cultured and proliferated as a cell-sheet. These sheets were piled up to be multi-layered sheets. This sheet was transplanted to cryo-injured bladder, urethra or ureter. We could find the morphological regeneration by normal and fluorescence microscope and the functional regeneration by urodynamic study for the bladder and urethra.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 骨髓幹細胞 膀胱 尿道

1. 研究開始当初の背景

泌尿器科領域、特に膀胱と尿道を含む下部尿路疾患は長期間患者の QOL を著しく低下させることから健康寿命の延長、介護支援の面で重要な課題である。膀胱機能の低下を引き起こす低コンプライアンス膀胱や萎縮膀胱は膀胱炎などの疾患や膀胱癌、子宮がんに対する放射線治療の副作用によって引き起こされる病態であり、各疾患の患者数から算出すると約 38,000 人から 66,000 人と見積もられる。現在、低コンプライアンス膀胱には有効な治療手段が乏しく、抗コリン薬を中心とした保存療法が選択されるが奏功しない場合も多い。また、前立腺癌や前立腺肥大症の手術による尿道括約筋障害による腹圧性尿失禁の患者は手術数とその合併症率から換算すると約 820,000 人と見積もられている。尿道括約筋障害は、有効な薬物治療がないため、尿道括約筋機能の再生に対する期待は大きい。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、骨髄および脂肪幹細胞の多分化能が注目されるようになった。

信州大学医学部泌尿器科学教室では、これまで骨髄由来や脂肪組織由来の間葉系幹細胞を使用して低コンプライアンス膀胱や萎縮膀胱の機能の再生や、尿道括約筋機能を再生させる研究を進めてきた。

本研究は、これまでの研究の延長線上に位置づけられ、間葉系幹細胞からなる三次元構造体を用いて、神経因性膀胱から低コンプライアンス膀胱や萎縮膀胱および尿道括約筋障害を治療する方法の開発を目的とする。

2. 研究の目的

これまでの研究で、われわれは低コンプライアンス膀胱モデル動物の開発に取り組み、放射線照射による膀胱障害ラットモデルを確立した。このモデルを用いて、機能低下した膀胱に対する骨髄由来間葉系幹細胞移植の有効性について検討を行い、膀胱への直接注入 (Imamura, T. et al. Tissue Eng Part A. 2012 Aug;18:1698-1709) や、細胞シート移植 (Imamura, T., et al. Tissue Eng Part A. 2015 May;21:1600-1610) の効果について報告している。これらの試験結果から、間葉系幹細胞移植が放射線照射による膀胱の機能障害に対して有効に作用することが示唆されたが、一方で、細胞注入移植では生着率が低いという課題が明らかになった。また、細胞シートで移植した場合は細胞の生着を確認したが、細胞シートを重ねて移植する場合には、細胞への栄養供給の観点より、積層可能な層数には限界があること、また、細胞シートを縫合することができないため、再建・再生を試みる部位から剥離しないよう工夫が必要となる。これらの課題を克服すべく、われわれは間葉系幹細胞をバイオ 3D プリンタで立体的な組織へと加工した間葉系幹細胞立体構造体を開発し、膀胱・尿道などの下部尿路の再生を試みることにした。近年、バイオ 3D プリンタを用いて立体的な臓器を作製する研究が多数報告されている。バイオ 3D プリンタには、ハイドロゲルのインク中に細胞を混ぜ込み吐出して三次元組織を作り上げるものなどいくつかの種類があるが、多くのバイオ 3D プリンタは細胞以外に糊となる成分を使用する。その中で、佐賀大学の中山功一教授 (佐賀大学医学部附属再生医学研究センター) が発明した技術をもとに、株式会社サイフューズが開発したバイオ 3D プリンタ「レジェノバ^R」は、細胞のみで三次元組織を作製できるユニークな特徴

を持っている。レジェノバは細胞を凝集させて作製した直径約 500 μm の細胞塊(スフェロイド)を使用し、直径約 170 μm の針が縦横に並んだ剣山デバイス上に刺し並べることで目的のデザイン通りの三次元組織を積み上げる。その後の成熟培養で剣山上のスフェロイド同士が融合し、最終的に針から抜去することで細胞のみからなる三次元組織を得ることができ、既に人工血管の作成が試みられている。本研究は、これらの技術を膀胱、尿道括約筋などの下部尿路再生に応用することを目標としている。

3. 研究の方法

以下にその方法を手順に沿って述べる。

骨髄幹細胞もしくは脂肪細胞の採取と培養：ラット、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 の中に入れた。

これらの細胞を遠心分離した後に、Type collagen でコートした培養皿で 7 日間初代培養する。培養によって接着伸展した骨髄由来幹細胞を温度感受性培養皿で継代培養し、細胞シートを作製する手法を確立した。また、これらの実験動物の皮下脂肪細胞からも同様な細胞採取を行い、脂肪幹細胞由来の細胞シートを作製できるか検討し、骨髄細胞と比較した場合のシート作製効率、有用性を比較検討した。

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 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した。

多積層化した細胞シートを作製：ラット大腿部筋組織上の血管床にシートを重ねて、多積層化シートを作成した。

-1 **膀胱・尿道括約筋障害ラットの膀胱、尿道括約筋、尿道、尿管への移植**：漿膜側より-80 のアイスバーで障害を受けた膀胱モデルの膀胱へ、多積層化したシートを移植した。また、同様に膀胱内側より、-80 のアイスバーで内尿道括約筋の障害を受けた腹圧性尿失禁モデルの尿道対しても同様な多積層化したシートの移植を行った。

-2 **組織学的な再生の確認**：移植後 3 日目、14 日目に膀胱および尿道括約筋を取り出す。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および尿道括約筋の再生を観察した。また、14 日目においては、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、幹細胞の膀胱平滑筋、内尿道括約筋への分化、尿道、尿管の再生についての評価を定量的に行った。

排尿器官としての機能的再生の確認：14 日目に膀胱および尿道括約筋を摘出しなかった別の移植実験動物群においては、覚醒下無拘束状態下での膀胱内圧検査を行うことによって、膀胱としての機能の再生の確認、また、腹圧時尿漏出時圧測定を行うことによって尿道括約筋としての収縮機能が再生したかを検証した。

4 . 研究成果

実験動物の大腿骨骨髓より注射針で骨髓由来幹細胞を採取し7日間初代培養し、培養によって接着伸展した骨髓由来幹細胞を温度感受性培養皿で継代培養し、細胞シートを作製する手法を確立した。

培養途中の5日目の時点で、GFP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ことができた。

実験動物の大腿部筋組織上の血管床にシートを重ねて、多積層化シートを作成することができた。

漿膜側より-80℃のアイスバーで障害を受けた膀胱モデルの膀胱へ、多積層化したシートを移植した。また、同様に膀胱内側より、-80℃のアイスバーで内尿道括約筋の障害を受けた腹圧性尿失禁モデルの尿道、および部分切除した尿管に対しても同様な多積層化したシートの移植を行った。

移植後3日目、14日目に膀胱および尿道括約筋を取り出し、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および尿道括約筋、尿管の再生を確認した。また、14日目においてReal time RT-PCR法にて定量測定し、幹細胞の膀胱平滑筋、内尿道括約筋への分化、尿道、尿管の再生について確認した。

なお、14日目に膀胱および尿道括約筋を摘出しなかった別の移植実験動物群においては、覚醒下無拘束状態下での膀胱内圧検査を行い、膀胱としての機能の再生の確認、また、腹圧時尿漏出時圧測定を行うことによって尿道括約筋としての収縮機能が再生していることが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Yamanishi, T., Ishizuka, O., Shimizu, S., Kobayashi, Y., Kinoshita, F., Yamamoto, T., Mizokami, A., Narimoto, K., Toriyama, K., Kamei, Y., Kuwatsuka, Y., Mizuno, M., Gotoh, M.	4. 巻 2022 Feb 25
2. 論文標題 Influence of background characteristics in responders of regenerative therapy by periurethral injection of adipose-derived regenerative cells for male stress urinary incontinence.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Low Urin Tract Symptom	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/luts.12433	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 Sudha, S.G., Imamura, T., Shimamura, M., Minagawa, T., Nakazawa, M., Ogawa, T., Ishizuka, O.	4. 巻 68
2. 論文標題 Recovery of cryo-injured rabbit urethra by biofabricated c-shaped adipose-derived mesenchymal cell structures.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Shinshu Med. J.	6. 最初と最後の頁 357-370
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 -

1. 著者名 Gotoh, M., Shimizu, S., Yamamoto, T., Ishizuka, O., Yamanishi, T., Mizokami, A., Narimoto, K., Toriyama, K., Kamei, Y., Nakayama, S., Kuwatsuka, Y., Mizuno, M., Hirakawa, A.	4. 巻 27
2. 論文標題 Regenerative treatment for male stress urinary incontinence by periurethral injection of adipose-derived regenerative cells: Outcome of the ADRESU study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J.Urol.	6. 最初と最後の頁 859-865
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iju.14311	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北原 遼、今村哲也、道面尚久、小川典之、井上貴浩、松本侑樹、皆川倫範、小川輝之、石塚 修
2. 発表標題 ラット腎凍結障害モデルを用いた積層型デュアル間葉系幹細胞シート移植効果の検討
3. 学会等名 日本泌尿器科学会総会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川典之、今村哲也、井上貴浩、原 寛彰、鈴木 中、皆川倫範、小川輝之、石塚 修
2. 発表標題 脂肪由来細胞から作製した積層型細胞シートを用いたウサギ尿管再生の試み
3. 学会等名 日本泌尿器科学会総会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北原 遼、今村 哲也、道面尚久、小川 典之、井上 貴浩、松本 侑樹、皆川 倫範、石塚 修
2. 発表標題 ラット腎凍結傷害モデルを用いた積層型デュアル間葉系幹細胞シートによる新規治療開発の試み
3. 学会等名 第2回細胞シート工学イノベーションフォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川 典之、今村 哲也、井上 貴浩、北原 遼、松本 侑樹、皆川 倫範、小川 輝之、石塚 修
2. 発表標題 ウサギ尿管部分切除モデルを用いた自己積層細胞シートによる尿管再生の試み
3. 学会等名 第2回細胞シート工学イノベーションフォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sudha, G.S., Imamura, T., Shimamura, M., Minagawa, T., Nakazawa, M., Ogawa, T., Ishizuka, O.
2. 発表標題 Implantation of biofabricated autologous adipose derived cell structures reconstructs urethra in rabbits.
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今村哲也、小川典之、井上貴浩、松本侑樹、北原 遼、石塚 修
2. 発表標題 骨髄由来細胞を利用した機能的な膀胱再生とその再生機序の解明
3. 学会等名 第17回泌尿器再建再生研究会
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	今村 哲也 (Imamura Tetsuya) (00467143)	信州大学・学術研究院医学系・助教 (13601)	
研究分担者	上野 学 (Ueno Manabu) (00816340)	信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教 (13601)	
研究分担者	永井 崇 (Nagai Takashi) (50514353)	信州大学・医学部附属病院・特任助教 (13601)	
研究分担者	皆川 倫範 (Minagawa Tomonori) (60638873)	信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師 (13601)	
研究分担者	小川 輝之 (Ogawa Teruyuki) (90467142)	信州大学・学術研究院医学系・准教授 (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	道面 尚久 (Domen Takahisa) (90750878)	信州大学・学術研究院医学系（医学部附属病院）・助教 (13601)	

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