

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21637

研究課題名（和文）膀胱上皮オルガノイド移植腸を利用した新規膀胱拡大術開発の基礎検討

研究課題名（英文）Development of novel technology for intestinal epithelial replacement with urothelial organoids and its implementation in bladder augmentation

研究代表者

山高 篤行（Yamataka, Atsuyuki）

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：40200703

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、正常マウス膀胱オルガノイド培養を安定した技術として確立し、培養細胞の性状解析を行い、さらにマウス結腸にこれら膀胱オルガノイド細胞を移植する技術開発を目指した。その結果、オルガノイド培養環境においては膀胱上皮の中でも未分化細胞が優位に維持されること、また添加するfibroblast growth factor (FGF)タンパクの種類の違いによって細胞分化の誘導に差異があるという新しい知見が得られた。また、開腹したマウスの近位結腸の内腔処理をおこない上皮を剥離し、ここに培養し増やした膀胱オルガノイドを生着させることに成功したとともに、移植片の組織解析を加えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管を利用した膀胱拡大術の術後長期合併症として、腸粘膜と膀胱組織の混在に起因する膀胱内結石や悪性腫瘍の発生が大きな問題となっており、新規治療開発が切望されている。本研究では、マウス結腸上皮を安全に剥離し、独自に培養確立した正常マウス膀胱オルガノイドを移植することで膀胱上皮化ハイブリッド結腸作成の技術基盤を築いた。本研究成果と今後の更なる進展により、腸粘膜の存在に由来する合併症リスクを緩和させるための新規膀胱拡大術へと応用させる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：By modifying a method described previously, we have developed in this study an organoid culture system of the murine bladder urothelium. We then aimed to characterize the differentiation/proliferation status of the organoid cells, and also transplant them onto the colon tissue of recipients' mice.

We observed that gene expression patterns of undifferentiated cell types in the bladder urothelium were dominantly preserved in organoids. Further, we found that different members of fibroblast growth factor (FGF) protein family possess distinctive effects on induction of urothelial differentiation. We also successfully engrafted the cultured bladder organoids onto murine proximal colon by using an epithelial replacement technique that we have developed, and carried out histological analyses of the graft tissue.

研究分野：小児外科、小児泌尿生殖器外科、新生児外科、神経因性膀胱

キーワード：神経因性膀胱 膀胱拡大術 悪性腫瘍 膀胱上皮 分化制御機構 オルガノイド fibroblast growth factor 腸上皮置換

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

二分脊椎患者では、神経因性膀胱による尿失禁や膀胱尿管逆流による反復性尿路感染などの重篤な下部尿路機能障害に対し、膀胱コンプライアンスや容量不足の向上のため腸管利用による膀胱拡大術を要することがある。しかし、腸管利用膀胱拡大術後では腸粘膜分泌機能に関連する尿路結石の発症や、両組織上皮からの腫瘍発生などのリスクがあり、これに代わる画期的治療開発が望まれる。

研究代表者は、本研究開始以前にラットを用いた膀胱移植研究と移植膀胱拡大術に関連する基礎研究を行ってきており(Transplantation 2001; J Pediatr Surg, 2003; Pediatr Res, 2005)、長らく二分脊椎患者の膀胱拡大術関連合併症に対する治療戦略において臨床・基礎研究の双方から学術的意欲を持ち続けてきた。今日、近年、種々の上皮組織を3次元的に体外培養するオルガノイド技術が進歩し再生医療への応用が期待されている。その中で代表者は、「腸上皮を剥離してその領域に別個体の腸管オルガノイドを生着させる」技術(Nat Med, 2012; Genes Dev, 2014)をこれまでに発表してきた分担者・中村と共同し、膀胱拡大術後の合併症の原因と考えられる腸粘膜の代わりに膀胱上皮化させたハイブリッド腸管を作成することで临床上の問題点を克服できるのではないかと考え、更なる技術開発と検証が必要とされる状況にあった。

2. 研究の目的

本研究は、小児外科領域において下部尿路機能障害の臨床および基礎研究に従事してきた研究代表者が、結腸への種々のオルガノイド移植実験を進めてきた分担者と連携し、(1)正常膀胱オルガノイド培養技術を確立し、(2)結腸上皮を膀胱上皮に置換したハイブリッド結腸を作成することを目的としている。本研究は膀胱上皮の異所性移植による生着片の組織学的特徴や変化を明確にするとともに、膀胱拡大術後神経因性膀胱に対する画期的な再生医療技術開発の土台につながるものと期待される。

3. 研究の方法

大きく2つの項目につき、以下の方法で研究を進めた。

(1)膀胱オルガノイドにおける増殖・分化制御機構の解析

既報を改良し、コラゲナーゼの濃度・振盪時間・振盪速度を変更して効率の良い上皮収集条件による安定した膀胱オルガノイド培養方法を検討した。続いて培養したオルガノイド細胞群の遺伝子発現に着目し、未分化細胞あるいは分化細胞でそれぞれ優位に発現が高いことが知られる複数の遺伝子の発現レベルをqPCRで解析し、培養前の単離した膀胱上皮や膀胱組織由来細胞のものと比較した。

(2)マウス移植モデルによる膀胱上皮化ハイブリッド結腸作成

まず、移植する膀胱オルガノイド培養細胞の準備として、EGFP-tag マウス膀胱から上皮を単離し培養を開始した。被移植体の腸管剥離技術導入のため、全身麻酔・開腹手術による以下の手技を試みた。すなわち、盲腸に近接する近位側結腸約1.5cm幅の領域をクランプしてキレート剤を還流させ、緩衝液の注入により上皮を剥離して被移植体モデルを作成した。生体の生存性を維持しつつ、効率よく上皮剥離し得るキレート剤の濃度・暴露時間など詳細に検討した。さらに、上皮剥離した結腸領域にGFP膀胱オルガノイド細胞を注入し、ここへ移植生着させる条件を検討した。

4. 研究成果

2年間の研究機関において以下の成果を得た。

(1)膀胱オルガノイドにおける増殖・分化制御機構の解析

膀胱組織を細分化したのちにコラゲナーゼ溶液で膀胱組織破片を攪拌し上皮を単離して、FGF7, FGF10, A83-01 を添加した培地およびマトリゲルを用いた培養法を確立した。既報ではこの培養法による膀胱オルガノイドの特性として、生体内膀胱組織において基底膜側の未分化細胞で高発現する遺伝子が顕著に高く発現するとされているが、我々が導入し培養したオルガノイド細胞群においても同様であることをqPCRで確認した。また、培地に添加する異なるFGFファミリー蛋白が、膀胱上皮細胞増殖や

分化に対してユニークな作用を示すことがわかった。

(2)マウス移植モデルによる膀胱上皮化ハイブリッド結腸作成

詳細な条件検討の上、被移植体結腸にキレート剤を還流させて上皮剥離した領域に、EGFP-tg マウス由来膀胱オルガノイド細胞を注入した後、EGFP+細胞が結腸組織上で多層移行上皮様構造を形成することが観察された。さらに、生着片では継続的に結腸成分を示唆する所見は得られず、かつ未分化で増殖能の高い幼弱な膀胱上皮様の細胞群である所見が示された。

以上の様に、本研究では動物実験を含む様々な計画をスムーズに展開することができた。研究期間内に、複数の国内外学会で成果の公表も積極的におこなった。本研究で開発される結腸への膀胱オルガノイド移植技術は、上皮以外の成分の形態機能に影響を与えず腸上皮を膀胱上皮に転換することで安全性や強度が高く保持されるハイブリッド結腸を作成しうる利点を持ち、非常に画期的なものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 須田一人、松本有加、越智崇徳、古賀寛之、山高篤行、中村哲也
2. 発表標題 オルガノイド培養を用いた膀胱上皮分化機構の解析
3. 学会等名 第58回 日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuto Suda, Yuka Matsumoto, Takanori Ochi, Hiroyuki Koga, Atsuyuki Yamataka, Tetsuya Nakamura
2. 発表標題 ANALYSIS OF THE BLADDER EPITHELIUM DIFFERENTIATION MECHANISM USING THE ORGANOID CULTURE.
3. 学会等名 22nd European Paediatric Surgeons' Association Congress
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須田一人、松本有加、越智崇徳、古賀寛之、山高篤行、中村哲也
2. 発表標題 膀胱上皮オルガノイド培養における増殖・分化機構の検討
3. 学会等名 第37回日本小児外科学会 秋季シンポジウム
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
研究分担者	松本 有加 (matsumoto yuka) (50813672)	順天堂大学・医学部・助教 (32620)	

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	中村 哲也 (nakamura tetsuya) (70265809)	順天堂大学・大学院医学研究科・特任教授 (32620)	

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