

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592069

研究課題名（和文）放射線傷害膀胱に対する自己骨髄細胞移植治療の臨床応用への検討

研究課題名（英文）Implantation of autologous bone marrow cells has a potential to be treatments for radiotherapy-induced bladder dysfunction

研究代表者

加藤 晴朗（KATO HARUAKI）

信州大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90233808

研究成果の概要（和文）：放射線照射治療後に生じた排尿障害に対して、骨髄由来細胞移植によって正常に近い機能を有する膀胱が再生できるのかを検討した。ラット膀胱に放射線を照射し、膀胱組織を破壊し、排尿障害を誘発させた新規モデルを確立した。このモデル膀胱に骨髄由来細胞を移植すると、膀胱組織が再生されるとともに、規則正しい一回排尿間隔時間、残尿量の低下など排尿障害の改善を認めた。骨髄由来細胞移植は、有益な治療となる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：We determined if implantation of bone marrow-derived cells has a potential to be treatments for radiotherapy-induced bladder dysfunction. The cell implantation reconstructed smooth muscle layers and nerve fibers. The cell-implanted urinary bladders recovered regular voiding intervals and low residual volume, which were similar to non-irradiated normal bladder function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：再生医療、放射線照射療法、排尿障害、骨髄由来細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、難治性疾患の治療、あるいは、疾患発症機序の解明を目的とした、再生医療研究が精力的に行われている。しかし、治療過程、もしくは、治療後に生じた副作用によって機能が低下・消失した器官臓器に対する再生医療研究は、ほとんど皆無である。泌尿器科領域においては、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌などの骨盤内臓器癌の治療としての放射線照射療法後に生じる排尿障害が挙げられる。放射線照射療法を受けた約半数の患者に排尿障害が認められ、さらにその約半数の患者は、

重篤化し、治療は困難を極める。現在、放射線照射療法によって生じた排尿障害に対しては、尿道からカテーテルを挿入し、排尿するという間欠的自己導尿を中心とした排尿管理を行いながら、対処療法が行われている。しかし、間欠的自己導尿による排尿管理には、カテーテル感染、膀胱や尿道の損傷などの多くの危険を有しており、さらに、患者の負担が大きく、生活の質（QOL）が低下する。放射線照射療法後の排尿障害に対して、機能的な膀胱の再生は、非常に有益な治療となると考えられる。

これまでに、凍結傷害を与えたマウス膀胱に骨髄由来細胞を移植すると、移植した細胞が分化した平滑筋細胞から形成される層構造が再生され、正常膀胱と同等の機能が回復することを確認した(研究協力者:今村)。

本研究では、ラットの膀胱に放射線を照射した膀胱機能障害モデルを作製し、骨髄由来細胞を移植することによって、排尿障害が改善するのか検討した。

## 2. 研究の目的

ラット膀胱に放射線を照射することによって、膀胱組織に傷害を与え、排尿障害を誘発した。この放射線照射傷害膀胱モデルを詳しく解析することによって、放射線照射療法後に生じる臨床的な排尿障害と同程度の膀胱機能障害を有しているのかどうか、さらに、個体差がなく、再現性が得られるモデルなのか検討した。引き続き、放射線照射した膀胱(膀胱平滑筋層)に、骨髄由来細胞を注入移植した。移植4週間後、骨髄由来細胞移植によって、膀胱組織が再生したのかどうか、組織再生にともなって排尿障害が改善するのかどうか検討した。この一連の研究から、骨髄由来細胞移植療法は、放射線照射療法後の排尿障害の治療として有益なのかどうか検討した。さらに、この研究を臨床応用するための課題について考察した。

## 3. 研究の方法

### (1)ラット放射線照射傷害膀胱モデルの作製

10週齢、雌、SDラット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、照射しない部位を鉄版(自作)で保護した。恥骨結合部位に接する直径1cm円内に、週に1回、2グレイの放射線照射を行った。これを、5回行い、その後、2週間通常飼育を行った。この放射線照射した動物を放射線照射傷害膀胱モデルとした。

### (2)骨髄細胞の採取と初代培養

17週齢、雄、GFPトランスジェニックSDラット(以下、GFPラット)の大腿骨を摘出し、骨髄細胞を採取した。採取した細胞をコラーゲンコート培養皿で1週間初代培養を行い、接着伸展した細胞を骨髄由来細胞とした。本研究は、この培養した細胞を放射線照射した膀胱に注入する同種同系移植とした。

### (3)骨髄由来細胞移植

上記の方法(1)で放射線照射したSDラットをレシピエント動物とした。また、GFPラットから採取し、初代培養した骨髄由来細胞をドナー細胞とした。放射線照射した膀胱の膀胱前壁、および、後壁のそれぞれ2カ所

に、培養した骨髄由来細胞を $2.0 \times 10^6$ 個

( $0.5 \times 10^6$ 個/ $50 \mu\text{l}$ ; 4カ所)を注入移植した。対照群には、無細胞液を同様に注入した。また、細胞注入による瘤の形成によって、膀胱組織からの移植細胞の漏れがないことを確認した。

### (4)ラット放射線照射傷害膀胱モデル、および、膀胱再生の評価

5回目の放射線照射後2週間の通常飼育した(細胞移植直前)ラット、および、細胞移植4週間後のラットに対して、膀胱内圧測定により膀胱機能評価を行った(下記①)。測定終了後、膀胱組織を摘出し組織学的解析を行った(下記②)。

#### ①膀胱内圧測定

測定2日前に、実験動物の膀胱にカテーテルを留置した。2日後、無麻酔・無拘束ラットをメタボリックケージに入れ、生理食塩水を10ml/hrの流速で、カテーテルを介して膀胱に注入し、膀胱内圧、および、一回排尿量を、圧力測定装置、および、重量測定装置で経時的に測定・記録した。そのチャートから、膀胱基底圧、排尿時膀胱圧、一回排尿間隔時間、一回排尿量、残尿量、膀胱容量を算出した。

#### ②組織学的解析

4%パラフォルムアルデヒドにて、摘出した膀胱を固定し、パラフィン包埋した。組織標本をH&E染色(全体像の把握)、マッソントリクローム染色(平滑筋層の把握)、アセチルコリンエステラーゼ染色(末梢神経の把握)、および、ピクロシリウスレッド染色(線維化の把握)を行った。また、染色画像から膀胱平滑筋層と神経組織の面積を測定し、膀胱組織の再生を数値化した。

GFP抗体を用いて、移植した細胞を検出した。GFP抗体に加え、平滑筋マーカーである、smooth muscle actin(SMA)抗体、デスミン抗体、カルボニン抗体を用いた二重線色を行った。さらに、GFP抗体と神経細胞マーカーである、S100抗体、CGRP抗体、チューブリン抗体を用いた二重染色も行った。GFP抗体と平滑筋マーカー抗体に両陽性な細胞は、平滑筋細胞に分化したことを示している。同様に、神経細胞マーカーとの両陽性は、神経細胞に分化したことを示している。

## 4. 研究成果

### (1)ラット放射線照射傷害膀胱モデルの確立

当初、本研究計画では、ウサギを用いて、放射線照射傷害膀胱モデルを作製する予定であった。しかし、ウサギでは、個体差がなく、再現性の得られる放射線照射条件を見いだすことができなかった。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、ウサギの個体差を補う調整（放射線照射距離や照射部位の微調整）が困難であった。そこで、本研究を遂行するため実験動物をウサギから、ラットへとスケールダウンを行った。その結果、研究の方法（1）に示した条件にて放射線を照射したモデル膀胱は、放射線照射療法後に生じる排尿障害に近い症状を示した。さらに、再現性が得られ、かつ、個体差がほとんどない、本研究の目的にかなう良質なモデルとなった。

ラット放射線照射傷害膀胱モデルは、平滑筋層、および、神経繊維が、放射線を照射しなかった正常膀胱と比較して、有意に減少した（図1）。また、破壊された平滑筋層には、コラーゲン繊維の異常増加など線維化が認められた（図1）。膀胱機能は、一回排尿間隔時間の不規則な遅延、および、残尿量の増大を示す排尿障害が認められた。本研究では、研究の方法（1）に従い放射線照射したラットをレシピエント動物として使用した。

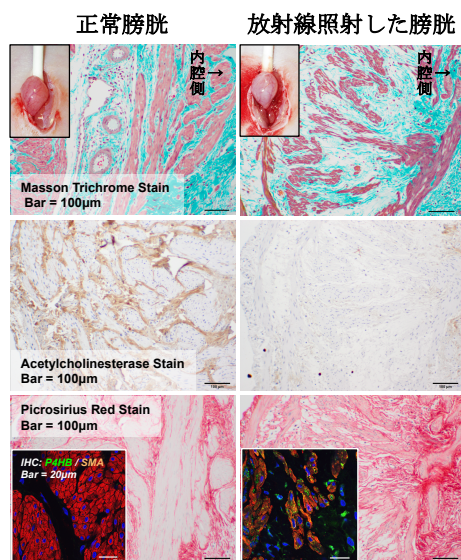


図1 放射線照射傷害膀胱モデル

## (2) 骨髄由来細胞

実験動物として、ウサギを用いる当初の計画では、自己骨髄由来細胞の移植実験が可能であった。しかし、実験動物のラットへのスケールダウンにともない、自己骨髄由来細胞の採取には、移植に必要な細胞数の確保、および、移植細胞の標識（GFP）の安定発現において、困難となった。また、放射線照射したラットからの細胞採取も動物における負荷が大きく、動物愛護法の観点からも不適切になってしまった。これらの理由から、本研究は、GFPトランスジェニックSDラットをドナーとして、同系同種移植という実験に変更した。

移植時、レシピエント動物と同週齢になる17週齢GFPラットから、上記、研究の方法（2）に従い、骨髄細胞を採取・培養した。培養に

よって、接着伸展した細胞をドナー細胞とした。このドナー細胞は、間葉系細胞マーカーであるSTRO-1抗体に対して陽性であること、平滑筋マーカーと神経マーカーには陰性であることを確認した。したがって、培養した骨髄由来細胞は、間葉系細胞であり、培養過程では、平滑筋細胞、神経細胞に分化しないことを確認した。

## (3) 骨髄由来細胞移植による膀胱組織の再生

細胞移植4週間後、細胞移植群の平滑筋層、および、神経繊維は、無細胞液を注入した対照群と比較して、有意に増大した（図2）。細胞移植群の平滑筋層、および、神経繊維の面積は、放射線照射しない正常膀胱とほぼ同等であった。また、対照群の平滑筋層では、コラーゲン繊維が不規則に集積していた（図2）。しかし、細胞移植群では、再生された平滑筋層にそって、健常膀胱で観察されるようなコラーゲン繊維が形成されていた（図2）。

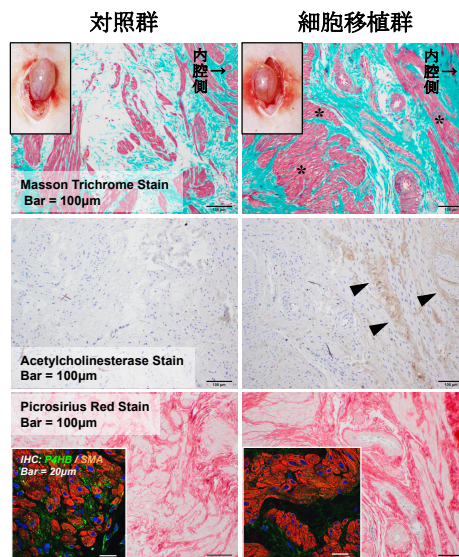


図2 骨髄由来細胞移植による膀胱組織再生

## (4) 骨髄由来細胞の平滑筋細胞、および、神経細胞への分化

GFP抗体に陽性な移植した骨髄由来細胞は、再生した平滑筋層、あるいは、神経繊維に散在していた。また、その細胞の一部は、平滑筋マーカー抗体、あるいは、神経細胞マーカー抗体に陽性であり、移植した骨髄由来細胞が平滑筋細胞、あるいは、神経細胞への分化したことが認められた（図3）。

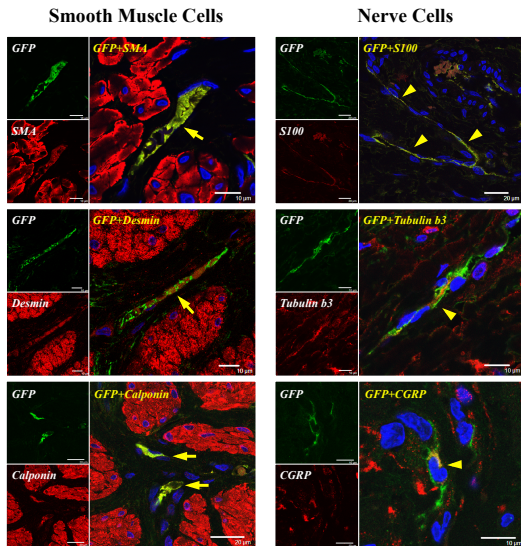


図3 骨髄由来細胞の平滑筋細胞、および、神経細胞への分化

#### (5) 骨髄由来細胞移植による膀胱機能の改善

骨髄由来細胞を移植しなかった対照群では、放射線照射した膀胱と同様な一回排尿間隔時間の不規則な遅延、および、多量の残尿量などの排尿障害を示した。しかし、細胞移植した群では、規則正しい一回排尿間隔時間、および、残尿量の有意な低下を示し、放射線照射しない健常ラットと同等な値を示した。

以上の結果から、骨髄由来細胞移植は、放射線照射治療後の排尿障害に対して、機能的な膀胱を再生させる新たな治療となり得る可能性が示唆された。今後の課題としては、放射線照射療法による膀胱萎縮、膀胱穿孔、あるいは、膀胱腸管癒着など、生命の危機にさらされるような重篤な症例に対しての膀胱再生である。このような重篤な症例に対しては、細胞注入だけでは、十分な効果が得られないことが予想される。従って、今後、細胞の足場や細胞増殖因子などを組み合わせた新たな細胞移植法を考案しなければならない。

骨盤内臓器に対する放射線照射療法では、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。本研究をさらに発展させ、実臨床に応用できたとき、放射線照射療法における高レベル放射線照射量・広範囲への照射など治療方法が見直しされ、治療効果の向上、治療後の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。

#### 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 Imamura T, Ishizuka O, Lei Z, Hida S, Sudha GS, Kato H, Nishizawa O. Bone Marrow-Derived Cells Implanted into Radiation-Injured Urinary Bladders Reconstruct Functional Bladder Tissues in Rats. *Tissue Eng Part A*: in press, 2012, 査読有 (本研究成果論文) DOI: 10.1089/ten.tea.2012.0061
- ② 加藤晴朗. 尿道の手術. こんなときどうする!? 泌尿器科手術のトラブル対処法. 110 癒痕組織が厚く吻合できそうにない. *臨床泌尿器科増刊号* 65 (4): 296-297, 2011, 査読なし
- ③ 加藤晴朗. 尿道の手術. こんなときどうする!? 泌尿器科手術のトラブル対処法. 111 尿道陰瘻の修復術で尿道粘膜の縫合線を覆う組織がない. *臨床泌尿器科増刊号* 65 (4): 298, 2011, 査読なし
- ④ Kosho T, Miyake N, Hatamochi A, Takahashi J, Kato H, Miyahara T, Igawa Y, Yasui H, Ishida T, Ono K, Kosuda T, Inoue A, Kohyama M, Hattori T, Ohashi H, Nishimura G, Kawamura R, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N. A new Ehlers-Danlos syndrome with craniofacial characteristics, multiple congenital contractures, progressive joint and skin laxity, and multisystem fragility-related manifestations. *Am J Med Genet A*. 152(A):1833-1846, 2010, 査読有 DOI: 10.1002/ajmg.a.33498
- ⑤ 加藤晴朗. 腎癌の手術療法 (根治的腎摘除術). *腎・泌尿器科癌*. 日本臨床増刊号: 102-109, 2010, 査読なし
- ⑥ 加藤晴朗. 【腎・泌尿器癌 基礎・臨床研究のアップデート】 腎癌 臨床研究治療 腎癌の手術療法 根治的腎摘除術. *日本臨床* 68 (増刊号 4 腎・泌尿器癌): 102-109, 2010, 査読なし
- ⑦ 加藤晴朗. 【泌尿器腫瘍と機能温存手術 スタンダードテクニックとピットフォール】 膀胱部分切除術. *臨床泌尿器科* 64 (1): 31-36, 2010, 査読なし
- ⑧ 加藤晴朗, 井川靖彦, 西沢 理. 【各種尿路変向術の遠隔成績と QOL】 禁制代用膀胱造設術. *排尿障害プラクティス* 17 (3): 198-207, 2009, 査読なし
- ⑨ 加藤晴朗. 【イラストレイテッド 膀胱全摘除術と尿路変向術】 手術手技 膀胱全摘除術 男性の膀胱全摘除術. *臨床泌尿器科* 63 (4): 95-105, 2009, 査読なし
- ⑩ 加藤晴朗. 男性の膀胱全摘術. *イラスト*

レイテッド 膀胱全摘術と尿路変向術  
手術手技 臨床泌尿器科増刊号:95-105,  
2009. 査読なし

- ⑪ 加藤晴朗, 井川靖彦, 西沢 理. 禁制代  
用膀胱造設術. 排尿障害プラクティス.  
17: 198-207, 2009, 査読なし
- ⑫ 加藤晴朗. 後部尿道断裂に対する経会陰  
(腹)的修復術. 排尿障害プラクティス.  
17: 270-275, 2009, 査読なし

[学会発表] (計9件)

- ① 常陰明乃, 齋藤徹一, 山岸 梓, 鈴木尚  
徳, 田辺智明, 石川雅邦, 市野みどり,  
加藤晴朗, 石塚 修, 西沢 理. TOT 手  
術後尿失禁例に対する TOT 再手術の経  
験. 第76回日本泌尿器科学会東部総会,  
横浜市, 2011/10/20-22
- ② 加藤晴朗, 塩沢世志子, 西村チエ子. 砕  
石位による尿道形成術後のコンパート  
メント症候群の1例. 第33回日本手術  
医学会総会, 鹿児島市, 2011/10/7
- ③ Kato H, Tanabe T, Yokoyama H,  
Kobayashi S, Mizusawa H, Nishizawa O.  
Surgical reconstruction for  
traumatic and iatrogenic posterior  
urethral disruption. 6th PPCS, Taipei,  
2011/9/24
- ④ Imamura T, Ishizuka O, Kurizaki Y,  
Ishikawa M, Noguchi W, Zhang L, Ichino  
M, Kato H, Nishizawa O. Implantation  
of autologous bone marrow-derived  
cells recovers urethral sphincter in  
rabbits. The 41th Annual Meeting of  
the International Continence Society,  
Glasgow, 2011/8/29-9/2
- ⑤ 齋藤徹一, 鈴木尚徳, 市野みどり, 加藤  
晴朗, 石塚 修, 西沢 理. 尿道癌術後  
完全尿失禁に対する尿失禁防止術後に  
生じた骨盤器下垂の1例. 第171回信州  
地方会, 富士吉田市, 2011/6/11
- ⑥ Igawa Y, Kato H, Ichino M, Nishizawa  
O. A new urethral lengthening  
procedure using intestinal tube for  
sphincteric incontinence in patients  
with myelodysplasia. 23rd  
International Symposium on  
Paediatric Surgical Research, Tokyo,  
2010/9/14
- ⑦ Kato H, Kobayashi S, Tanabe, T, Ogawa  
T, Nishizawa O. Reconstruction of  
obliterated vesico-urethral  
junction: use of the bulbar urethra as  
a continent valve. 30th Congress of  
the Societe Internationale  
d'Urologie. Shanghai, 2009/10/2
- ⑧ 皆川倫範, 村田 靖, 三村裕次, 加藤晴  
朗, 小川輝之, 関 聡, 石塚 修, 井川

靖彦, 西沢 理. 超音波検査を用いた膀  
胱内凝血除去術の工夫. 第97回日本泌  
尿器科学会総会, 岡山市,  
2009/4/16-4/19

- ⑨ 石川雅邦, 杵淵芳明, 石塚 修, 田辺智  
明, 小川輝之, 中山 剛, 加藤晴朗, 西  
沢 理. 転移性腎細胞癌に対するイホス  
ファミド, ドキソルビシン併用化学療法  
の経験. 第97回日本泌尿器科学会総会,  
岡山市, 2009/4/17

[図書] (計6件)

- ① 加藤晴朗. イラストレイテッド泌尿器  
科手術 第2集, 医学書院, 2011, 352  
ページ
- ② 鈴木尚徳, 西沢 理, 加藤晴朗, 石塚  
修. 南山堂, 心臓腫瘍学, 2011,  
pp301-307
- ③ 西沢 理, 鈴木尚徳, 加藤晴朗. メジ  
カルビュー社, 外傷の手術と救急処理  
(新 Urologic Surgery シリーズ),  
2011, pp138-143
- ④ 加藤晴朗. 尿管・腸管吻合法. メディカ  
ルビュー社, 尿路変向・再建術 (新  
Urologic Surgery シリーズ 6), 2010,  
pp28-37
- ⑤ 栗崎功己, 加藤晴朗, 西沢 理. 医薬  
ジャーナル社, インフォームドコンセ  
ントのための図説シリーズ 過活動膀  
胱, 2009, pp6-9
- ⑥ 田辺智明, 加藤晴朗. 医薬ジャーナル  
社, インフォームドコンセントのため  
の図説シリーズ 過活動膀胱, 2009,  
pp22-29

[その他]

ホームページ等

[http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medi  
cine/chair/urology/index.htm](http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/urology/index.htm)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 晴朗 (KATO HARUAKI)  
信州大学・附属病院・講師  
研究者番号: 90233808

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

今村 哲也 (IMAMURA TETSUYA)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：00467143