

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 6 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592078

研究課題名（和文） 再生基質に羊膜を用いた尿路再生

研究課題名（英文） Urinary reconstruction using the cultivated oral mucosal epithelial sheet

研究代表者

内藤 泰行 (NAITOH YASUYUKI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：50405312

研究成果の概要（和文）：

家兎動物モデルを用いて羊膜を培養の基質として、培養口腔粘膜上皮シートを作成した。羊膜上で培養した口腔粘膜上皮細胞は、1 週間で羊膜基質上で敷石状に増殖しコンフルエントになり、約 2 週間で、5-6 層に重層化した上皮層を形成した。培養口腔粘膜上皮シートの組織学的特徴としては、非角化型の粘膜上皮としての性質を保持していることがわかった。

この口腔粘膜再生シートが生体に着床することを確認する目的で、ウサギ腹壁（腹腔内）に移植した。口腔粘膜再生シートは、周囲組織から血流の供給をうけ、口腔粘膜の構造を持ったまま着床した。この口腔粘膜再生シートを用いて尿道形成が可能なことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Cultivated oral mucosal epithelial sheets were developed using animal model by culturing them on amniotic membrane matrix. The oral mucosal epithelial cells cultured on amniotic membrane proliferated in a cobblestone-like pattern and became confluent on amniotic membrane matrix in a week and formed five- to six-layered stratified epithelial cell layers in approximately two weeks. Histological characteristic of these cultivated oral mucosal epithelial sheets includes the maintenance of non-keratinized mucosal epithelial characteristics. To confirm that the oral mucosal regeneration sheet is capable of being implanted on the living body, it was grafted on a rabbit abdominal wall (in the abdominal cavity). Receiving blood flow via surrounding tissues, the oral mucosal regeneration sheet was grafted while maintaining the structure of oral mucosa, suggesting that the oral mucosal generation sheet can be used for urethroplasty.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：臨床系外科学・泌尿器科学

キーワード：再生医療、尿路上皮、尿路再建

1. 研究開始当初の背景

1) 泌尿器科領域における再生医療は、small intestine submucosa:SIS や bladder acellular matrix:BAM といった生体由来の材料を基質に、尿道や膀胱を形態的、機能的に再生する試みが報告されているが、いずれの生体由来の基質も異種または同種由来のものを使用するため、感染症や免疫学的な問題がある。さらに、BAM を用いた尿道部分置換では、全周性に置換すると狭窄をきたすとの報告や、膀胱再生においては、膀胱萎縮などのために良好な成績は得られておらず、尿路上皮を用いた尿路再生は形態的、機能的において不十分であるのが現状である。

2) 一方、共同研究者は眼科領域において、口腔頬粘膜から羊膜を基質にして培養シートを作成し、角膜上皮の代わりに移植する自己培養口腔粘膜上皮再生の臨床研究を行い注目されている。さらに、同様の手法を用いて、皮膚上皮の培養シートを作成することにも成功している。

元来、尿道下裂に対する尿道再建術は陰茎皮膚や口腔粘膜を用いて行われ、多くの長期的な治療成績の報告がなされている。尿路再建の結果を左右する要因のひとつは、再建に十分な上皮をいかに確保できるかという点にあり、以上の背景をもとに、上皮再生技術を応用し多量の上皮を確保し尿路再建がを目的に実験を開始した。

2. 研究の目的

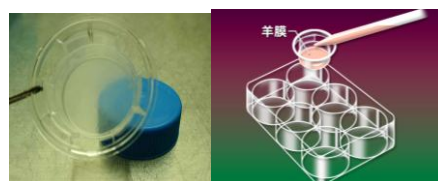
本研究の目的は、今までの尿路再生のように尿道や膀胱の再建に、尿路上皮を尿道や膀胱として機能するように再生させるという発想からはなれ、少量の皮膚や口腔粘膜上皮

から作成した自家培養上皮シートを保存し、尿路再建の際にその自家培養皮膚や口腔粘膜を使用することである。さらに、再生上の新しい発想は、再生基質に元来の SIS のような異種由来の生体材料ではなく、免疫学的に寛容で無細胞化の必要のない羊膜を用いて自家培養上皮再生をおこなうことである。現在、本研究が応用可能であると考えられる疾患は、膀胱癌に対する膀胱全摘術後の尿路変更術、尿道下裂に対する尿道形成術、尿管や尿道狭窄に対する形成術時などである。そこでまず少量の皮膚と口腔粘膜上皮細胞を用いて羊膜を基質とした培養シートを作成し、その特性や強度を検索し、各々の尿路再建に適したものかを明らかにする。更に、実験動物を用いて、少量採取した皮膚と口腔粘膜上皮細胞から、培養シートを作成し、尿道、膀胱、尿管の再生を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

1. 培養皮膚シートの作成

実験動物の口腔粘膜から口腔粘膜上皮を採取し培養を行う。培養液成分としては感染症フリーの10%の子牛血清、インシュリン、EGF、コレラトキシンを含む標準的な上皮培養液を用いる。羊膜上でこれらの幹細胞を含む皮膚および口腔粘膜を培養し、培養液と3T3 feeder cellの調整、air lifting法の併用などで上皮細胞をシート状に培養する。



2. 組織学的、細胞生物学的検討

上記により作成した各々の培養上皮シートが、どの程度各々の正常の上皮層に近い組

組織学的構造を持ち、尿路再建に適した構造および強度を持ちうるかを検討する。

3. 実験動物における尿路再建の可能性の検討

実験動物を用いて各種上皮細胞を採取し培養シートを作成し、In vitroでの検討結果に基づき、尿道、膀胱、尿管各々に適当と考えられる再生上皮を用いて、各臓器における尿路再建の可能性を検討する。

実験動物より採取した上皮細胞をもちいて培養上皮シートを作成し、これを用いて尿道形成術・膀胱拡大術・尿管形成術を行う。光学顕微鏡、電子顕微鏡、免疫組織化学的手法などにより各々の組織の検討を行う。

4. 研究成果

1・培養皮膚シートの作成

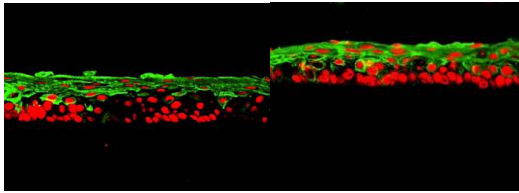
家兎動物モデルを用いた実験を行い、家兎の培養口腔粘膜上皮シートを作成した。羊膜を口腔粘膜上皮培養の基質として使用した。日本白色家兎から口腔粘膜を無菌的に採取した。組織を、ディスパーゼおよび0.05%トリプシン-EDTA 溶液に浸漬し、口腔粘膜上皮細胞を分離した。その後、セルフィルターで余分な組織を除去し、口腔粘膜上皮細胞を単離した。マイトマイシンC処理をした NIH-3T3 細胞と羊膜上皮を搔爬した羊膜基質を準備して、その上に口腔粘膜上皮細胞を共培養した。培地には、DMEM/F12 混合培地に、10% FBS, インシュリン(5mg/ml)、コレラトキシン(0.1nM)、ペニシリン-ストレプトマイシン(50IU)、ヒトリコンビナント上皮細胞増殖因子(EGF)(10ng/ml)を添加したものを使用した。この培地中で1~2週間培養した。その後、air-lifting 法を1-2日行い、細胞分化を誘導した。

2・組織学的、細胞生物学的検討

作成した培養口腔粘膜上皮シートの特徴は、組織学的、免疫組織学的、電子顕微鏡的に検討した。培養口腔粘膜上皮シートのケラチンに対する免疫組織学的検討では、表皮角化型ケラチンであるケラチン1と10は陰性であり、粘膜特異的ケラチンであるケラチン4と13は陽性であった。電子顕微鏡的観察では、走査型及び透過型電子顕微鏡を用いて作成した粘膜上皮シートの形態学的特性を評価した。羊膜上で培養した口腔粘膜上皮細胞は、1週間で羊膜基質上で敷石状に増殖しコンフルエントになり、約2週間で、5-6層に重層化した上皮層を形成した。培養口腔粘膜上皮シートは組織学的に角化していない非角化上皮であった。また、その最表層には無数の微絨毛やGlycocalyx 様構造物が存在し、細胞間には多数のデスモゾームによる細胞接着が認められた。また、基底細胞と羊膜間にはヘミデスモゾームによる接着構造が認められた。以上のことから、培養口腔粘膜上皮シートの組織学的特徴としては、非角化型の粘膜上皮としての性質を保持していることがわかった。



培養口腔粘膜

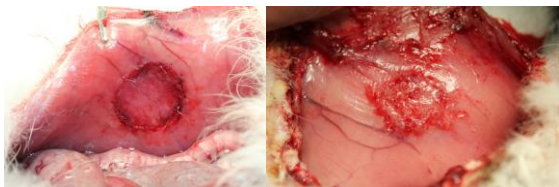


粘膜分化型 ケラチン

3. 実験動物における尿路再建の可能性の検討

口腔粘膜再生シートを用いて尿道形成を目的として、その基礎的実験を行った。臨床で行われている採取口腔粘膜を用いた尿道形成術の実際は、まず最初に口腔粘膜を患者の陰茎に移植し着床させる。着床が確認されたのちにこの口腔粘膜を筒状に形成することで尿道を形成する。したがって、この手順に準じてこの口腔粘膜再生シートが生体に着床することを確認する目的で、ウサギ腹壁（腹腔内）に移植した。

口腔粘膜再生シートは、周囲組織から血流の供給を受け、口腔粘膜の構造を持ったまま着床した。以上より、周囲組織から血流を受け着床した口腔粘膜再生シートを用いて尿道形成が可能なが示唆された。



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 8 件)

1. Laparoendoscopic single-site surgery for pediatric patients in urology. Kawauchi A, Naitoh Y, Miki T. *Curr Opin Urol.* 21(4) 2011.
DOI:10.1097/MOU.0b013e3283468d40
2. Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. Nakamura T, Takeda K, Inatomi T, Sotozono C, Kinoshita S. *Br J Ophthalmol.* 95(7): 942-946, 2011.
DOI: 10.1136/bjo.2010.188714
3. Ocular surface reconstruction using the combination of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation and eyelid surgery for severe ocular surface disease. Takeda K, Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Watanabe A, Kinoshita S. *Am J Ophthalmol.* 152(2): 195-201, 2011.
DOI: 10.1016/j.ajo.2011.01.046
4. Laparoendoscopic single-site urological surgery: initial experience in Japan. Kawauchi A, Kamoi K, Soh J, Naitoh Y, Okihara K, Miki T. *Int J Urol* 17 (3) 289-292 2010.
DOI:10.1111/j.1442-2042.2010.02470.x
5. Experimental study for electrovaporization of renal cell carcinoma using a new shape memory alloy probe. Naitoh Y, Kawauchi A, Soh J, Kamoi K, Miki T. *Urology.* 75 (6) 1509-1513, 2010.
DOI: 10.1016/j.urology.2009.11.047
6. Immunohistochemical Study of Oral Epithelial Sheets Cultured on Amniotic Membrane for Oral Mucosal Reconstruction. Amemiya T, Nakamura T, et al. *Biomed Mater Eng.* 20(1): 37-45, 2010.
DOI: 10.3233/BME-2010-0613
7. Transvesical laparoscopic cross-trigonal ureteral reimplantation for correction of vesicoureteral reflux: initial experience and comparisons between adult and pediatric cases. Kawauchi A, Naitoh Y, Soh J, Hirahara N, Okihara K, Miki T. *J Endourol,* 23(11) 1875-1878, 2009.
DOI: 10.1089/end.2009.0239
8. Novel Sutureless Keratoplasty with a Chemically Defined Bioadhesive.

Takaoka M, Nakamura T, Sugai H, et al.
Invest Ophthalmol Vis Sci.
50(6):2679-2685, 2009.
DOI: 10.1167/iovs.06-1104

〔学会発表〕（計1件）

羊膜を基質とし作成した口腔粘膜再生シートを用いた尿路再建

内藤泰行、河内明宏、三木恒治他

日本再生医療学会：2012, 6, 14、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 泰行 (NAITOH YASUYUKI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：50405312

(2) 研究分担者

三木 恒治 (MIKI TSUNEHARU)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：10243239

河内 明宏 (KAWAUCHI AKIHIRO)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：90240952

邵 仁哲 (SOH JINTETSU)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：40305587

中村 隆宏 (NAKAMURA TAKAHIRO)
同志社大学・研究開発推進機構・講師

稲富 勉 (INATOMI TSUTOMU)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：40305587

平原 直樹 (HIRAHARA NAOKI)
京都府立医科大学附属病院・専攻医
研究者番号：80530360
(H21-22)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：