

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：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791471

研究課題名（和文）放射線照射傷害膀胱に対する自己骨髄由来細胞移植による機能的な膀胱再生の検討

研究課題名（英文）Implantation of autologous bone marrow cells into radiation-injured urinary bladders Regenerates functional urinary bladders

研究代表者

今村 哲也（IMAMURA TETSUYA）

信州大学・医学部・助教

研究者番号：00467143

研究成果の概要（和文）：放射線照射によって膀胱組織に傷害を与え、排尿障害を誘発させたラット膀胱を用いて、骨髄由来細胞移植による機能的な膀胱の再生について検討した。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や神経細胞からなる膀胱組織が再生した。また、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が改善した。放射線照射療法後に生じた排尿障害の治療として、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）：Implantation of bone marrow-derived cells into radiation-injured rat urinary bladders reconstructed smooth muscle layers and nerve fibers. Some of the implanted cells differentiated into smooth muscle or nerve cells. The cell-implanted urinary bladders recovered regular voiding intervals and low residual volume. Therefore, the implantation of bone marrow-derived cells would be treatments for radiotherapy-induced bladder dysfunction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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、膀胱、骨髄由来細胞、放射線照射療法、排尿障害

1. 研究開始当初の背景

これまでの再生医療研究は、難治性疾患の治療、あるいは、臓器移植医療におけるドナー不足解消を目的とした研究が精力的に行われている。しかし、治療過程、もしくは、治療後に生じる副次的な傷害によって機能障害を受け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。この例として、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌などの骨盤内臓器癌に対する放射線照射療法により生じた膀胱機能障

害に対する改善、回復を目的とする治療は皆無である。現在、放射線照射療法によって、膀胱が傷害を受け、機能低下（消失）した排尿障害に対しては、患者自身が尿道からカテーテルを挿入し、排尿するという、間欠的自己導尿が行われている。しかし、この間欠的自己導尿による排尿管理には、挿入したカテーテルからの感染、放射線照射によって脆弱化した膀胱、尿道の損傷などの多くの危険を有している。さらに、患者の負担、生活の質

(QOL)の低下が懸念される。間欠的自己導尿を回避するには、機能的な膀胱の再生が必要である。本研究は、放射線照射療法によって生じた排尿障害に対して、骨髄由来細胞移植は機能的な膀胱を再生する有益な治療となるのか検討した。

これまでの研究から、マウス膀胱に凍結傷害を与え、膀胱平滑筋層を破壊した組織に骨髄由来細胞を移植すると、平滑筋層が再生すると共に、移植した骨髄由来細胞は平滑筋細胞へ分化することを確認した。細胞移植によって再生された膀胱は、正常膀胱と同等の機能を有していることも確認した。(2006 日本泌尿器科学会総会賞・2007 Jack Lapides Essay Contest GRAND PRIZE・2009 Urology Resarch Grant 研究奨励賞受賞研究)。

本研究では、ラットを用いて放射線照射傷害膀胱モデルを作製し、骨髄由来細胞を移植することによって、膀胱組織が再生し、排尿障害が改善されるのか検討した。

2. 研究の目的

放射線照射によって傷害を受け、排尿障害が生じた膀胱に対して、骨髄由来細胞移植は機能的な膀胱を再生できるのか検討した。最初に、放射線照射療法後に生じる排尿障害と同程度の膀胱機能障害を有しており、個体差がなく、再現性が得られるラット放射線照射傷害膀胱モデルの確立を目指した。続いて、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。移植後一定期間をおき、骨髄由来細胞移植による膀胱組織再生、および、排尿障害改善について評価を行った。この一連の研究から、放射線照射によって膀胱組織が傷害を受け、排尿障害が生じた膀胱に対して、骨髄由来細胞移植療法は、有益な治療となるのかどうか検討を行った。

3. 研究の方法

(1)ラット放射線照射傷害膀胱モデル(レシピエント動物)の作製

SD ラット(雌 10 週齢)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、照射しない部位に鉄版(自作)をあて保護した。恥骨結合部位に接する直径 1cm 円内(図1矢印)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(レシピエント)とした。



図1 ラット放射線照射傷害膀胱モデル作製

(2)骨髄細胞の採取と初代培養(ドナー細胞の採取)

細胞移植 1 週間前に、GFP トランスジェニック SD ラット(雄 17 週齢)の大腿骨を摘出し、骨髄細胞を採取した。採取した骨髄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(ドナー細胞)とした。本研究は、この培養した細胞を放射線照射したレシピエントの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)で放射線照射したレシピエント動物の膀胱に培養した骨髄由来細胞を注入移植した。細胞移植は、膀胱前壁、および、後壁のそれぞれ 2 カ所に 0.5×10^6 個/ $50 \mu\text{l}$ の細胞懸濁液を注入した(全細胞数: 2.0×10^6 個)。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)膀胱再生の評価

細胞移植 4 週間後、膀胱内圧測定(下記①)を行い、膀胱の機能評価を行った。測定終了後、膀胱組織を摘出し組織学的解析(下記②)を行った。

①膀胱内圧測定

実験動物に全身麻酔をかけ、膀胱カテーテル留置術を施行する。2 日後、生理食塩水を 10ml/hr の流速で、カテーテルから膀胱に注入し、膀胱内圧および、一回排尿量を、それぞれ圧力測定装置、重量測定装置で経時的に記録する。得られたデータから、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

摘出した膀胱を 4%パラフォルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋した。組織切片に対して、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。これらにより得られた画像から膀胱平滑筋層や神経組織の面積などを測定し、膀胱組織の再生を数値化した。

移植した細胞の分化については、GFP 抗体、および、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、あるいは、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を行った。

4. 研究成果

(1) 放射線照射傷害膀胱モデルの確立

上記、研究の方法(1)に示した条件にて放射線を照射した膀胱は、平滑筋層、および、神経繊維が、放射線を照射しない正常膀胱と比較して、有意に減少した(図2)。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2)。膀胱機能においては、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。このモデルは、放射線照射療法によって生じた排尿障害に近い状態と考えられた。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であった。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。

(2) 骨髄由来細胞

本研究において、当初の計画では、自己骨髄由来細胞の移植を予定していた。自己細胞を用いる場合、必要細胞数の確保、および、細胞標識の安定発現という視点から本研究遂行に支障をきたした。また、放射線照射したラットからの細胞採取もレシピエント動物における負荷が大きく、動物愛護法からも不適格となる。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(以下、GFPラット)をドナーとして、同系同種移植とした。さらに、移植時、レシピエント動物と同週齢になるように、17週齢ラットを選んだ。上記、研究の方法(2)に従い、GFPラットから採取した骨髄細胞を培養し、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、細胞標識マーカーであるGFP抗体と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を確認した。また、移植前、これらの細胞は、平滑筋マーカーと神経マーカーには陰性で、培養過程では、平滑筋細胞、神経細胞への分化が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

骨髄由来細胞を移植すると、膀胱平滑筋層、および、神経繊維が、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)。

(4) 骨髄由来細胞の平滑筋細胞、および、神経細胞への分化

再生した平滑筋層、あるいは、神経繊維に

は、GFP抗体に陽性な移植した骨髄由来細胞が認められた。また、その一部は、平滑筋マーカー抗体にも陽性であり、移植した骨髄由来細胞が平滑筋細胞に分化したことが認められた(図3)。同様に、GFP抗体と神経細胞マーカー抗体に両陽性な細胞も認められ、骨髄由来細胞が神経細胞への分化も認められた(図4)。

(5) 骨髄由来細胞移植による膀胱機能の改善

細胞を移植しなかった対照群では、一回排尿間隔時間の不規則な遅延、および、多量の残尿量における改善が認められなかった。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が認められ、間隔時間も放射線照射しない健常ラットと同等になった。さらに、細胞移植したラットの残尿量は、対照群と比較して有意に低下し、正常値を示した。このことから、骨髄由来細胞移植により、放射線照射によって生じた排尿障害が改善された。

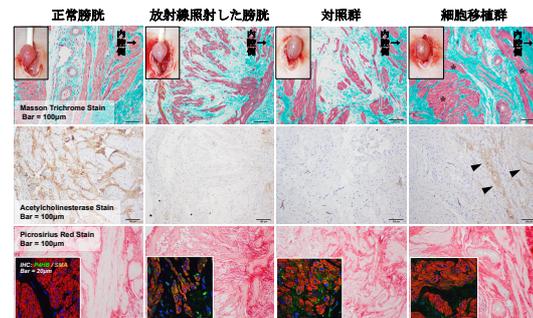


図2 骨髄由来細胞移植による膀胱組織再生

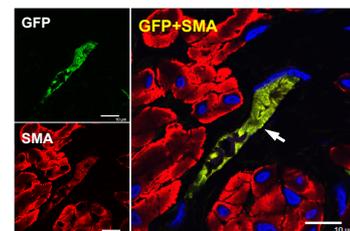


図3 骨髄由来細胞の平滑筋細胞への分化

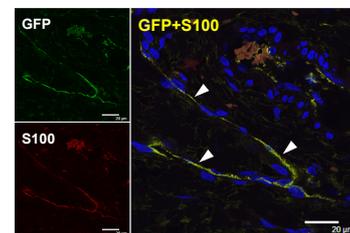


図4 骨髄由来細胞の神経細胞への分化

以上の結果から、放射線照射治療後の排尿障害に対して、骨髄由来細胞移植は、膀胱組織を再生させ、排尿機能を回復させる新たな治療となり得る可能性が示唆された。今後、本研究を臨床応用するためには、ヒト幹細胞指針で明確に示されている、科学的根拠に基

づく治療効果の予測、および、安全性の特段の考慮に対して、真摯に応じていかなければならない。本研究をさらに発展させ、それらの課題を解決することができれば、放射線照射療法によって、不幸にも排尿障害を発症してしまった患者にとって、大きな希望を与えられる。

放射線照射療法では、放射線照射による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。したがって、本研究が実臨床に応用されたとき、骨盤内臓器癌における放射線照射療法において、高レベル放射線照射による治療効果の向上、治療後の膀胱機能障害の回避に伴う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9件)

- ① 今村哲也, 石塚修, 張雷, 他3名 Bone marrow-derived cells implanted into radiation-injured urinary bladders reconstructs functional bladder tissues in rats. *Tissue Engineering Part A*, 15&16 : in press, 2012, 査読有 (本研究成果発表論文)
doi: 10.1089/ten.tea.2012.0061
- ② 田辺智明, 石塚修, 市野みどり, 小川輝之, 今村哲也, 他3名 Analysis of the pressure-flow study in weak detrusor patients with benign prostatic hypertrophy. *LUTS* 3 : 109-112, 2011, 査読有
- ③ 今村哲也, 石塚修, 杵渕芳明, 他4名 Implantation of autologous bone marrow-derived cells reconstructs functional urethral sphincters in rabbits. *Tissue Engineering* 17 : 1069-1081, 2011, 査読有
doi: 10.1089/ten.tea.2010.0478
- ④ 栗崎功己, 石塚修, 今村哲也, 他5名 Relation between expression of $\alpha 1$ -adrenoceptor mRNAs in bladder mucosa and urodynamic findings in men with lower urinary tract symptoms. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 45 : 15-19, 2011, 査読有
doi:10.3109/00365599.2010.515611
- ⑤ 三村裕司, 今村哲也, 杵渕芳明, 他3名 Rat Bladders Augmented with a Novel Bovine Pericardium-Derived Biomaterial Reconstruct Functional Tissue Structures. *LUTS* 2 : 76-82, 2010, 査読有
- ⑥ 皆川倫範, 今村哲也, 相澤直樹, 他3名 Differentiation of Smooth Muscle Cells from Human Amniotic Mesenchymal Cells Implanted in The Freeze-injured Mouse Urinary Bladder. *European Urology* 58 : 299-306, 2010, 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2009.12.031>
- ⑦ 小川輝之, (他8名,5番目) CXCR3 Binding Chemokine and TNFSF14 Over Expression in Bladder Urothelium of Patients With Ulcerative Interstitial Cystitis. *The Journal of Urology* 183 : 1206-1212, 2010, 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2009.11.007>
- ⑧ 杵渕芳明, 相澤直樹, 今村哲也, 他3名 Autologous Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation into Injured Rat Urethral Sphincter. *International Journal of Urology* 17 : 359-368, 2010, 査読有
DOI: 10.1111/j.1442-2042.2010.02471.x
- ⑨ 陳忠, 石塚修, 今村哲也, 他5名 Stimulation of Skin Menthol Receptors Stimulates Detrusor Activity in Conscious Rats. *Neurourology and Urodynamics* 29 : 506-511, 2010, 査読有
doi: 10.1002/nau.20774

[学会発表] (計10件)

- ① 今村哲也, 他5名 ラット放射線照射傷害膀胱モデルを用いた骨髄由来細胞移植による膀胱再生の試み、第4回排尿傷害モデル動物研究会、2011.11.25、静岡
- ② 今村哲也 冷えストレスによる下部尿路傷害の治療と予防を目指して(シンポジウム)、第18回日本排尿機能学会総会、2011.9.17、福井
- ③ 今村哲也, 他9名 Implantation of

autologous bone marrow-derived cells recovers urethral sphincter in rabbits、 The 41th Annual Meeting of the International Continence Society, 2011. 8. 30、 Glasgow

- ④ 今村哲也、他 6 名 放射線照射によるラット膀胱機能障害モデルを用いた骨髄由来細胞移植による膀胱再生の試み(研究会賞受賞演題)、第 8 回泌尿器科再生再生研究会、2011. 6. 11、京都
- ⑤ 今村哲也、他 6 名 塩分負荷による自然発症高血圧ラット膀胱での α 1 交感神経受容体発現変化についての検討、第 99 回日本泌尿器科学会総会、2011. 4. 24、名古屋
- ⑥ 今村哲也 骨髄由来細胞移植による膀胱再生の試み (シンポジウム)、第 99 回日本泌尿器科学会総会、2011. 4. 23、名古屋
- ⑦ 今村哲也、他 6 名 ウサギ自己骨髄由来細胞移植による機能的な尿道組織再生への試み、第 10 回日本再生医療学会総会、2011. 3. 1、東京
- ⑧ 今村哲也、他 2 名 Autologous bone marrow-derived cells recovers urethral sphincter structures composed skeletal and smooth muscle in rabbit bladder necks. The 5th Pan-Pacific Continence Society Meeting、2010. 9. 3、韓国
- ⑨ 今村哲也、他 7 名 ウサギ自己骨髄細胞移植による膀胱頸部組織再生の試み(研究会賞受賞演題)、第 7 回泌尿器科再生再生研究会、2010. 9. 19、札幌
- ⑩ 今村哲也、他 7 名 ウサギ腹圧性尿失禁モデルを用いた自己骨髄由来細胞移植による尿失禁改善への検討、第 98 回日本泌尿器科学会総会、2010. 4. 27、盛岡

[その他]

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/urology/luts/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 哲也 (IMAMURA TETSUYA)

信州大学・医学部・助教

研究者番号 : 00467143

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :