

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592369

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた尿道括約筋機能再生のための基盤的研究

研究課題名(英文) Basic research of smooth muscle cells generated from induced pluripotent stem cells for urethral tissue engineering.

研究代表者

渡邊 豊彦 (Watanabe, Toyohiko)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：30432644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：人工多能性幹細胞(iPS)細胞に注目し、人工多能性(iPS)幹細胞による尿道括約筋機能再生を目指した基盤的研究を行なった。ヒトiPS細胞にレチノイン酸を添加することにより、平滑筋細胞への分化させる方法を確立した。RA添加後7日目にはRT-PCRにて平滑筋に特異的に発現するマーカーであるSmooth Muscle Actin (SMA)の発現を安定的に確認することが可能となった。Myocardin, Myosin Heavy Chain (MHC)などのSMA以外の平滑筋マーカーを免疫組織的染色により確認することにより、ヒトiPS細胞の平滑筋への分化誘導の確実性を証明することが出来た。

研究成果の概要(英文)：Stress urinary incontinence is associated with a reduced quality of life. An intact urethral sphincter is mandatory to maintain urinary continence. Adult stem cell injection therapy for the regenerative repair of an impaired sphincter is currently at the forefront of research. Recently, the establishment of iPS cells has offered a novel therapeutic strategy to generate patient-specific stem cell lines. Here we have investigated whether iPS cells are able to differentiate into smooth muscle cells (SMCs) in vitro. Human iPS cell monolayers were treated with 10⁻⁵ mol/L all-trans retinoid acid (RA). After 7 days of RA treatment, we found that iPS cells highly expressed the SMC-markers including Sma-actin, SM myosin HC, myocardin, and desmin determined by immunofluorescence. Our data have established a simple iPS-SMC system to generate SMCs in vitro, which has tremendous potential to generate individualized SMCs for urethral tissue engineering and continence recover.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：再生医学

1. 研究開始当初の背景

尿失禁に対する治療は外科治療が主体であるが、尿道をメッシュにより挙上するスリング手術、人工デバイスである人工尿道括約筋装着術に限られる。いずれも非生理的であり、尿道周囲へ異物挿入を必要とし、異物感染をはじめとする合併症が大きな欠点となっている。我々は、これまで尿道括約筋不全による失禁に対し、尿道周囲に自家大腿筋皮弁を巻つける形で移植し、さらに体内ペースメーカーからの電気刺激を介した移植筋皮弁の筋収縮・弛緩による尿禁制調節システムを独自に開発し、動物実験でその有用性を示し、ヒトに臨床応用し報告してきた (Watanabe T et al. J Urol. 1996, Chancellor MB, Watanabe T et al., J Urol. 1997)。

また、我々のグループは、泌尿器科領域では世界に先駆け、間葉系の stem cell の性質を持つ骨格筋由来細胞 (muscle derived cell : MDC) を尿道周囲に移植することによる尿道括約筋再生に関する基礎的研究を報告してきた (Yokoyama T et al. Urology 2001)。その後、Strasser らが、腹圧性尿失禁患者への臨床応用を開始したが、現時点では期待されたほどの効果は認められていない。

近年、人工多能性幹細胞 (iPS) 細胞の作製方法が確立され、iPS 細胞を用いることによりこれまで困難であった尿道括約筋そのものの再生を目的とした尿失禁に対する細胞治療が可能になると考えられる。そのため、我々は、京都大学の山中教授らにより報告

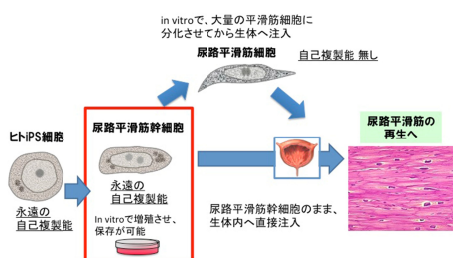
された iPS 細胞作製のための 4 遺伝子 (Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc) をレンチウイルスまたはプラスミドにより線維芽細胞にトランスフェクションする実験系の立ち上げを行った。さらに、我々は独自に開発した、強力な遺伝子発現システム『遺伝子発現を上昇させるシステム及び当該システムを保持したベクター (特願 2009-264299)』の特許申請を行っており、このシステムによりこのほぼ全ての細胞についてタンパク質の発現を強力に上昇させることができるようになり、それにより効率的な iPS 細胞の樹立が可能になると考えた。本申請研究で我々が樹立を進めている iPS 細胞を用いることにより、低侵襲でかつ強力な革新的腹圧性尿失禁治療が可能になるものと考えられた。

2. 研究の目的

本邦では 400 万人を超える腹圧性尿失禁の罹患者が存在すると推測されている。特に、男性腹圧性尿失禁は近年急増する前立腺癌に対する根治的前立腺摘除術を受けた患者の合併症として発生することが多く、極めて難治性である。この場合、人工尿道括約筋装着術以外に治療法はなく、機械の作動トラブルが多いこと、また、異物を挿入することで感染など合併症が多いため、本邦では保険診療外であり、ほとんど普及していないのが現状である。そこで我々は 2006 年に発見同定された多分化能を有する人工多能性幹細胞 (iPS) 細胞に注目し、本申請課題において臨床応用を目指した観点か

ら、iPS 細胞またはそれに派生する細胞を尿道周囲括約筋部へ直接移植する方法による尿道括約筋機能再生のための基盤的研究を行う。

具体的には、この iPS に関する技術を臨床応用する基盤を確立するため、誘導性組織特異的幹細胞 (induced tissue-specific stem cells: iTS 細胞)である尿路平滑筋幹細胞を樹立することを目的とした基礎的研究を実施した。この iTS 細胞とは、永遠の自己複製能を持ち、しかも iPS 細胞や他の幹細胞と比べて容易に当該目的臓器細胞に分化誘導が可能で、かつ奇形腫形成が無く ES/iPS 細胞で懸念される未分化細胞残存による腫瘍形成の心配が無い、幹細胞群を指す。



3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞にレチノイン酸を添加する方法により平滑筋細胞の分化誘導実験を行う。

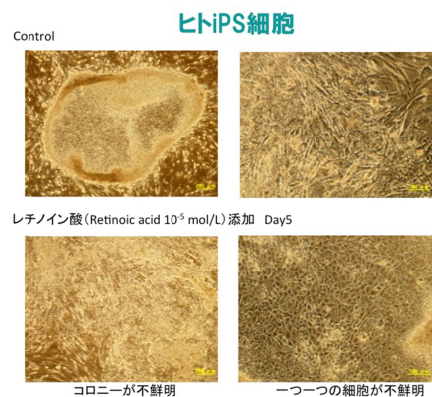
- レチノイン酸 (Retinoic Acid 10^{-5} mol/L) を添加し、iPS 細胞を培養し、control 群 (無添加) と比較検討する
- 1) レチノイン酸添加 iPS 細胞と Control 群との形態学的比較

- 2) RT-PCR 法で平滑筋細胞マーカーである SMA の発現をレチノイン酸添加 iPS 細胞と Control 群とで比較検討する。
- 3) 平滑筋への分化誘導を示す SMA, Myocardin, Myosin-HC などの細胞表面マーカーの発現を免疫染色でレチノイン酸添加 iPS 細胞と Control 群とで比較検討する。

4. 研究成果

- 1) レチノイン酸添加 iPS 細胞と Control 群との形態学的比較

レチノイン酸を添加した iPS 細胞は添加 5 日目にはコロニーが不鮮明となり、また、一つ一つの細胞が不鮮明になり、急速な細胞の分化誘導と考えられる形態像を呈していた。



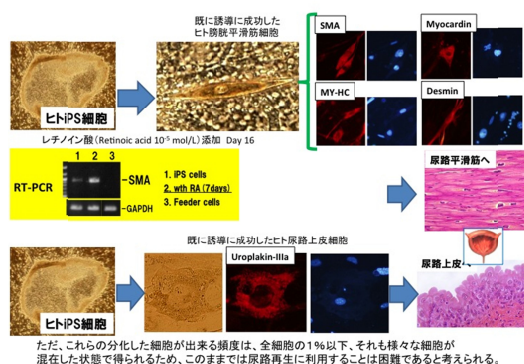
また、レチノイン酸添加 16 日目には、平滑筋細胞と考えられる紡錘形を呈した細胞を認め、平滑筋への分化誘導と考えられた。



2) RT-PCR 法で平滑筋細胞マーカーである SMA の発現をレチノイン酸添加 iPS 細胞 と Control 群とで比較検討

レチノイン酸を添加した iPS 細胞では、添加 7 日目には、平滑筋細胞マーカーである SMA の発現を強く認めた。

3) 平滑筋への分化誘導を示す SMA , Myocardin , Myosin-HC , desmin などの細胞表面マーカーに免疫染色



レチノイン酸添加後 7 日目には RT-PCR にて平滑筋マーカーである SMA の発現を確認し、16 日目の平滑筋への分化誘導を示す SMA , Myocardin , Myosin-HC などの細胞表面マーカーの発現を免疫染色で確認することができた。現在も、ヒト iPS 細胞を用いた平滑筋細胞誘導実験を継続して実施している。

今後は、我々が独自開発した遺伝子強力発現システムを iPS 細胞誘導系に応用するための遺伝子コンストラクトの作製を現在行っており (myocardin promotor 導入)、実際にこれらのプラスミドを用いて iPS 細胞を誘導することにより、当該遺伝子発現システムの再生・細胞治療への有用性を検

証することとしている。

本研究は、ヒト iPS 細胞からより効率的にヒト平滑筋細胞を誘導する技術を確立するために、尿路平滑筋幹細胞株の樹立へ向けた基礎的成果が得られた研究であると言える。

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 13 件)

1. Assessment of antimicrobial prophylaxis to prevent perioperative infection in patients undergoing prostate brachytherapy: multicenter cohort study. Watanabe T. (査読有、30 人中 21 番目) *J Infect Chemother.* 2013; 19(5): 926-930.
2. Adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy: Development of an autologous cancer vaccination therapy. Watanabe M. (査読有、3 人中 1 番目) *Oncology Letters.* 2013; 7(3): 595-601.
3. Stabilization of Actin Bundles by a Dynamin 1/Cortactin Ring Complex Is Necessary for Growth Cone Filopodia. Watanabe M. (査読有、12 人中 9 番目) *J Neurosci.* 2013. Mar; 33(10): 4514-26.
4. In vivo imaging of transplanted islets labeled with a novel cationic nanoparticle. Watanabe M. (査読有、11 人中 7 番目) *PLoS One.* 2013; 8(2): e57046.
5. Cancer stem cell-like characteristics of a CD133+ subpopulation in the J82

- human bladder cancer cell line.
Watanabe M, Ueki H. (査読有、15人中2, 4番目) *Molecular and Clinical Oncology*. 2013; 1(1): 180-184.
6. Laparoscopic-assisted tension-free vaginal mesh: An innovative approach to placing synthetic mesh transvaginally for surgical correction of pelvic organ prolapse. Watanabe T. (査読有、10人中1番目, 責任著者) *Acta Med Okayama*. 2012. Jan;66(1): 23-29.
7. Pelvic surgeons caught in the meshes of the law. Watanabe T. (査読有、2人中1番目, 責任著者) *Reviews in Urology* 2012; 14(1-2): 35-36.
8. Ureteroscopic management of chronic unilateral hematuria: A single-center experience over 22 years. Watanabe T. (査読有、9人中6番目) *PloS One* 2012; 7(6): e37639
9. Prevalence of pharyngeal Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae among heterosexual men in Japan. Watanabe T. (査読有、13人中8番目) *J Infect Chemother*. 2012;18(5): 729-733.
10. Preclinical biodistribution and safety study of REIC/Dkk-3 encoding adenovirus vector for prostate cancer gene therapy. Watanabe M, Ueki H. (査読有、10人中2, 6番目) *Oncol Rep*. 2012. Nov;28(5):1645-52.
11. Nerve growth factor level in the

prostatic fluid of patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome is correlated with symptom severity and response to treatment. Watanabe T., Inoue, M., Sasaki, K. (査読有、8人中1番目, 責任著者):*BJU Int*. 2011 Sep; 108(2): 248-251.

12. Advanced two-step transcriptional amplification as a novel method for cancer-specific gene expression and imaging. Watanabe M, Ueki H. (査読有、10人中1, 2番目) *Oncol Rep*. 2011. Oct;26(4):769-75.
13. Impact of overactive bladder and lower urinary tract symptoms on sexual health in Japanese women. Watanabe T. (査読有、4人中3番目) *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2010 Aug; 22(2):165-169.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 豊彦 (WATANABE TOYOHIKO)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：30432644

(2) 研究分担者

渡部 昌実 (WATANABE MASAMI)
岡山大学・大学病院・准教授
研究者番号：70444677

植木 英雄 (UEKI HIDEO)
岡山大学・医学部・技術専門職員
研究者番号：90537218