

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592427

研究課題名(和文)放射線照射による膀胱の損傷に対する骨髄由来細胞シートを用いた膀胱再生の試み

研究課題名(英文) Bone marrow-derived cell sheets restore structure and function of radiation-injured urinary bladders

研究代表者

今村 哲也 (IMAMURA, Tetsuya)

信州大学・医学部・特任講師

研究者番号：00467143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨盤内臓器癌の放射線療法を受けると約半数の患者に排尿障害が生じる。しかし、有効な治療は皆無であり、治療に難渋する。放射線照射療法による排尿障害に対して、機能的な膀胱の再生は、非常に有望である。本研究は、温度応答性培養皿を用いて骨髄由来細胞シートを作製し、放射線を照射して傷害を与えたラット膀胱にパッチ移植した。放射線照射によって傷害を与えた膀胱に骨髄由来細胞シートを移植すると、膀胱組織が再生し、排尿障害が改善することが示された。また、膀胱再生を促進する24種類の細胞増殖因子、サイトカインを検出した。したがって、骨髄由来細胞シート移植によって、機能的な膀胱が再生されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The urinary bladder is one of the organs most often affected by the side effects of pelvic radiotherapy. In this study, we produced bone marrow-derived cell sheets in temperature-responsive culture dishes that release the monolayer sheets intact. We then determined if the recovered cell sheets could restore function to irradiated urinary bladders. After 4 weeks, the cell sheet-transplanted bladders had smooth muscle layers and nerve fibers in proportions that were significantly larger than those of the control bladders. In cystometric investigations, cell-free sheet control rats had frequent and irregular periods of micturition; however, the cell sheet-transplanted rats voided at regular intervals of micturition, which is typical for rats with uninjured bladders. There were 24 growth factors to promote reconstruction of urinary bladders in the cell sheet-transplanted urinary bladders. In conclusion, cell sheet engineering has great potential to restore damaged urinary bladders.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：膀胱再生 排尿障害 放射線照射傷害 骨髄細胞 温度応答性培養皿 細胞シート ラット Tissue Engineering

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌、前立腺癌や、子宮癌などの骨盤内臓器癌の治療として放射線療法を受けた、約半数の患者に重度の排尿障害が生じる。しかし、放射線照射療法後の排尿障害に対して、有効な治療は皆無であり、治療に難渋する。したがって、放射線照射療法後の排尿障害が生じた膀胱に対して、機能的な膀胱を再生させることは、非常に有望であると考えられる。

これまで、われわれは、マウスの膀胱に凍結傷害を与え、膀胱平滑筋層を破壊し、そこに骨髄由来細胞を注入移植すると、移植した細胞は平滑筋細胞に分化するとともに、平滑筋層が再生することを報告した。さらに、骨髄由来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が回復することも報告した (Imamura, et al. Cell transplant. 2008、2006 日本泌尿器科学会総会賞、2007 Jack Lapidus Essay Contest Grand Prize)。また、Tissue Engineering の視点からの考察によって、膀胱再生に理想的な生体微小環境を明らかにした (Imamura, et al. Tissue Eng. 2009、第 6 回泌尿器再建再生研究会賞)。

続いて、放射線照射によって膀胱に傷害を与え、排尿障害を呈するモデルを作製し、骨髄由来細胞移植による機能的な膀胱再生を試みた (科学研究費：若手研究 B 平成 20-21 年度、および、平成 22-23 年度、平成 23 年度若手研究者萌芽研究支援事業 研究代表者 今村哲也)。この研究で、膀胱に放射線を照射することによって、平滑筋層と神経細胞が減少するとともに、排尿間隔時間の延長、および、残尿量の増大などの排尿障害を示すモデルを確立した。この放射線照射によって傷害を与えた膀胱に、骨髄由来細胞を注入移植すると平滑筋層や神経組織が再生し、その一部は、移植した骨髄由来細胞が分化した平滑筋や神経細胞によって形成されていることを報告した (Imamura, et al. Tissue Eng. 2012)。同時に、骨髄由来細胞移植によって、排尿障害が改善され、正常な膀胱と同等な機能が回復することを報告した (Imamura, et al. Tissue Eng. 2012、第 8 回泌尿器再建再生研究会賞)。

われわれは、放射線照射によって傷害を受けた膀胱に、骨髄由来細胞を直接注入移植すると正常な膀胱が再生されることを示した。しかし、細胞の直接注入移植法には、培養期間中に産生された細胞外基質により単層を形成した細胞を球状の単一細胞として回収し移植に用いることから、単層状態の崩壊、細胞生存率の低下などの欠点を有している。さらに、傷害を受けた組織 (膀胱) に針で細胞を注入するという手技によって、傷害の程度がさらに増悪する可能性がある。

これらの細胞直接注入移植における欠点を克服するため、本研究は、岡野らが開発した温度応答性培養器材 (Biomaterials, 1995) を利用し、骨髄由来細胞シートの作製を試みた。温度応答性培養皿は、37 のとき細胞接着面

を提供し、25 以下のとき細胞遊離面に変化する。この性質を利用することによって、温度応答性培養皿で培養した細胞は、酵素処理などを必要とせず回収できる。回収した細胞は、培養期間中に形成した単層を維持し、シート状を呈す。また、細胞シート移植は、傷害部位へパッチ移植が可能であり、注入移植のような傷害部位の拡大などのリスクがない。

本研究は、温度応答性培養皿を利用し作製した細胞シートを傷害部位 (膀胱) へのパッチ移植することにより機能的な膀胱の再生が可能かどうか検討を行った。

2. 研究の目的

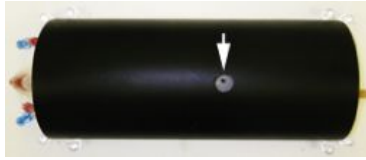
本研究は、放射線照射療法により機能障害が生じた膀胱に対して、骨髄由来細胞を用いて作製した細胞シートのパッチ移植によって、機能的な膀胱が再生されるのかどうか動物 (ラット) を用いて検討した。

これまで、われわれは、ラット膀胱に放射線を照射して膀胱組織に傷害を与え、排尿障害を呈するラット放射線照射傷害膀胱モデルを確立した (Imamura, et al. Tissue Eng. 2012)。また、われわれは、ラット大腿骨から骨髄細胞を採取し、初代培養を行うことで、培養皿に接着伸展した骨髄由来細胞を得る方法を確立している。そこで、本研究は、温度応答性培養皿を用いて骨髄由来細胞シートの作製を試みた。さらに、作製した骨髄由来細胞シートをラット放射線照射傷害膀胱モデルにパッチ移植した。移植後、組織学的解析、遺伝子学的解析、膀胱内圧測定によって、細胞シートを移植した膀胱では、膀胱組織が再生され、排尿障害が改善されるのかどうか検討するとともに、再生機序について考察した。

3. 研究の方法

(1) ラット放射線障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) にて全身麻酔をかけた後、全身を保護する鉄板を被せ、恥骨に接する直径 1cm の円内に 2 グレイの放射線線量を週 1 回照射した (下図)。これを 5 回繰り返し、5 回目の照射終了後、2 週間通常飼育を行った。これまでの研究から、この放射線照射の条件で、膀胱平滑筋層と神経細胞の減少、および、排尿間隔時間の延長と残尿量の増大などの排尿障害を示す膀胱モデルが作製されることを確認している (Imamura, et al. Tissue Eng. 2012、科学研究費：若手研究 B 平成 20-21 年度、および、平成 22-23 年度、平成 23 年度 若手研究者萌芽研究支援事業 研究代表者 今村哲也)。また、このモデル作製過程における、放射線照射後 2 週間の通常飼育期間に、下記に示す骨髄由来細胞シート作製を行った。



(図)放射線傷害膀胱モデル作製：恥骨に接する直径1cm円内(矢印)に2グレイの放射線量を週1回照射し、これを5回繰り返す。

(2) 骨髄由来細胞シートの作製

17週齢(移植時のレシピエント動物と同週齢)雄GFPトランスジェニックSDラットの大腿骨を摘出し、骨髄細胞を採取した。これまでに確立した方法に従い、採取した細胞をコラーゲンコートした培養皿で1週間初代培養した(科学研究費:若手研究B平成20-21年度、および、平成22-23年度、平成23年度若手研究者萌芽研究支援事業 研究代表者今村哲也)。培養皿に接着・伸展した細胞を骨髄由来細胞として回収し、 1.0×10^6 cells/wellの骨髄由来細胞を温度応答性培養器材(48well UCell® 株式会社セルシード)へ継代培養した。培養2日後、細胞シート回収用支持体(CellShifter™ 株式会社セルシード)を培養した細胞の上に置き、培養皿の温度を20以下にした。温度を下げて5分後、細胞支持体をゆっくり剥がし、骨髄由来細胞をシート状で回収(骨髄由来細胞シート)した。また、本研究は、ドナーとレシピエントの個体が異なる、同種同系移植となる。

(3) 放射線照射によって傷害を与えた膀胱への骨髄由来細胞シートのパッチ移植

レシピエントラットを上記と同様に、麻酔をかけ、放射線照射した膀胱を露出させた。放射線照射した膀胱の前壁に骨髄由来細胞シートを覆いかぶせ、5分放置した。細胞が膀胱組織から剥がれないように、慎重に、ゆっくり、細胞支持体のみを剥がした(パッチ移植)。対照群には、無細胞シートを同様に、膀胱全壁に覆いかぶせた。

(4) 骨髄由来細胞シート移植による膀胱組織再生の解析

細胞シート移植4週間後に、下記の膀胱内圧測定を行った後、膀胱を摘出した。摘出した膀胱をパラフィン包埋し、組織標本とした。膀胱組織に対して、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、組織全体を観察し、画像を得る。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画像解析し、膀胱組織の再生を数値化した。

移植した細胞の生着と分化について、GFP抗体、および、平滑筋マーカーである、smooth

muscle actin抗体、あるいは、神経細胞マーカーである、S100抗体を用いた二重染色を行った。

また、94種類の細胞増殖因子、サイトカインのmRNA発現について、リアルタイムRT-PCRアレイを行った。細胞シート群において、無細胞シート対照群と比較して有意に2倍以上発現が増大したmRNAを検出した。

(5) 骨髄由来細胞シート移植による膀胱機能回復の解析

細胞シート移植4週間後に、膀胱カテーテル留置手術を行った。手術2日後、無拘束・無麻酔・絶飲食下にて、留置したカテーテルを介して膀胱に生理食塩水を10ml/hrで注入し、膀胱基底圧、排尿閾値圧、排尿時膀胱収縮圧、排尿間隔時間、一回排尿量、残尿量、および、膀胱容量を測定した。

4. 研究成果

(1) 細胞シート移植による膀胱組織の再生

細胞シート移植4週間後、マッソントリクローム染色から、細胞シート移植群の平滑筋層(0.28 ± 0.02)は、無細胞シート対照群(0.18 ± 0.01)と比較して、有意に増大したことが示された。同様に、アセチルコリンエステラーゼ染色から細胞シート移植群の神経細胞(0.040 ± 0.005)は、対照群(0.008 ± 0.004)と比較して、有意に増大したことが示された。

また、細胞移植群でのアポトーシスを誘発した細胞数(4.46 ± 0.49 個)は、対照群(13.74 ± 1.77)と比較して、有意に減少した。さらに、ピクロシリウスレッド染色、線維化マーカーP4HB染色により、細胞移植群における平滑筋層の線維化は、対照群と比較して、抑制される傾向が認められた。

以上の解析から、放射線照射によって傷害を与えた膀胱に骨髄由来細胞シートを移植すると、膀胱組織が再生することが示された。

(2) 細胞シート移植による膀胱機能の回復

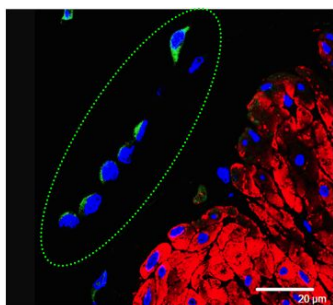
移植4週間後の膀胱内圧測定において、細胞シート群は、規則正しい排尿パターンを示したが、対照群では、不規則な排尿パターンが認められた。それぞれのパラメーターについて解析すると、膀胱基底圧と排尿時収縮圧には、両群とも差がなかった。しかし、細胞シート群の排尿閾値圧(17.59 ± 2.56 cmH₂O)、排尿間隔時間(6.83 ± 0.75 min)、一回排尿量(1.25 ± 0.12 ml)、膀胱容量(1.27 ± 0.12 ml)は、対照群のそれぞれ(10.93 ± 0.69 cmH₂O、 4.30 ± 0.61 min、 0.73 ± 0.13 ml、 0.78 ± 0.12 ml)と比較して、有意に増大した。さらに、細胞シート群の残尿量(0.01 ± 0.01 ml)は、対照群(0.05 ± 0.03 ml)と比較して、有意に低下した。

膀胱内圧測定から、放射線照射によって生じた排尿障害は、骨髄由来細胞シート移植によって、排尿障害が改善することが示された。

(3) 膀胱再生機序の考察

上記(1)(2)より、細胞シートを移植すると機能的な膀胱が再生されることが示された。そこで、膀胱再生機序について考察した。

最初に、免疫組織染色によって、膀胱前壁において、移植した細胞(シート)を検出した(下図)。しかし、検出された細胞の平滑筋細胞、あるいは、神経細胞への分化は、認められなかった。



(図)移植した細胞(シート)の検出:移植4週間後、GFP(緑)陽性の骨髄由来細胞が膀胱前壁において検出された。

続いて、リアルタイム RT-PCR アレイを行い、細胞シート移植によって、有意に2倍以上発現が増大した細胞増殖因子、サイトカイン mRNA を検出した。細胞シート群において、平滑筋再生に関与すると考えられる Growth differentiation factor 10 (GDF10)、血管新生に関与する Fibroblast growth factor 17 (FGF17)、神経細胞再生に関与する Neurotrophin 3(Ntf3) など、24 種類の細胞増殖因子、サイトカイン mRNA が検出された。それらの細胞増殖因子、サイトカインなどは、移植された細胞から産生されるのか、レシピエント側から産生されているのかは、今後の研究課題である。

以上の解析から、放射線照射傷害膀胱に、骨髄由来細胞シートを移植すると膀胱の再生を促進するような細胞増殖因子、サイトカインなどが産生され、膀胱平滑筋層や神経細胞が増大し、アポトーシス細胞、線維化の減少により、機能的な膀胱が再生されたと考察した。

本研究成果は、学術誌 Tissue Engineering Part A, 21, 2015, pp. 1600-1610 に採択され、また、第11回泌尿器科再建再生研究会(2014/7/5、青森市)にて研究会賞を受賞した。

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14件)

- Imamura T, Ogawa T, Minagawa T, Yokoyama H, Nakazawa M, Nishizawa O, Ishizuka O: Engineered bone marrow-derived cell sheets restore structure and function of radiation-injured rat urinary

bladder. Tissue Engineering Part A, 査読有, 21, 2015, pp. 1600-1610
DOI: 10.1089/ten.yea.2014.0592

- Imamura T, Ishizuka O, Ogawa T, Yamagishi T, Yokoyama H, Minagawa T, Nakazawa M, Nishizawa O: Pathways involving beta-3 adrenergic receptors modulate cold stress-induced detrusor overactivity in conscious rats. LUTS, 査読有, 7, 2015, pp. 50-55
DOI: 10.1111/luts.12050

- Yamagishi T, Ishizuka O, Imamura T, Yokoyama H, Ogawa T, Kurizaki Y, Nishizawa O, Karl-Erik Andersson: Alpha1-adrenergic receptors mediate bladder overactivity induced by cold stress in rats with bladder outlet obstruction. Neurology and Urodynamics, 査読有, 34, 2015, pp. 280-285
DOI: 10.1002/nau.22543

- Imamura T, Ishizuka O, Ogawa T, Gautam S S, Yamagishi T, Yokoyama H, Minagawa T, Nakazawa M, Nishizawa O: Muscarinic receptors mediate cold stress-induced detrusor overactivity of type2 diabetes mellitus rats. International Journal of Urology, 査読有, 21, 2014, pp. 1051-1058
DOI: 10.1111/iju.12475

- Gautam S S, Imamura T, Ishizuka O, Zhang L, Yamagishi T, Yokoyama H, Minagawa T, Ogawa T, Kurizaki Y, Kato H, Nishizawa O: Implantation of adipose-derived cells reconstructs functional urethral sphincters in rabbit cryo-injured urethra. Tissue Engineering Part A, 査読有, 20, 2014, pp. 1971-1979
DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0491

- Imamura T, Ishizuka O, Nishizawa O: Cold stress induces lower urinary tract symptoms. International Journal of Urology, 査読有, 20, 2013, pp. 661-669
DOI: 10.1111/iju.12129

- Imamura T, Ishizuka O, Gautam S S, Zhang L, Hosoda T, Noguchi W, Yamagishi T, Yokoyama H, Kurizaki Y, Nishizawa O: A galenical produced from Ba-Wei-Die-Huang-Wan (THC-002) provides resistance to the cold stress-induced detrusor overactivity in conscious rats. Neurology and Urodynamics, 査読有, 32, 2013, pp. 486-492
DOI: 10.1002/nau.22335

- Noguchi W, Ishizuka O, Imamura T, Kurizaki Y, Yamagishi T, Yokoyama H, Zhang L, Gautam S S, Nishizawa O, Karl-Erik Andersson : The Relationship between alpha1-adrenergic receptors and TRPM8 Channels in Detrusor Overactivity Induced by Cold Stress in Ovariectomized Rats. *Journal of Urology*, 査読有, 189, 2013, pp. 1975-1981
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2012.10.014
- Zhang L, Ishizuka O, Imamura T, Noguchi W, Yamagishi T, Yokoyama H, Gautam S S, Hosoda T, Nishizawa O, Karl-Erik Andersson : Functional roles of Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) channels in the cold stress-induced detrusor overactivity pathways in conscious rats. *Neurourology and Urodynamics*, 査読有, 32, 2013, pp. 500-504
DOI:10.1002/nau.22325
- Imamura T, Ishizuka O, Nishizawa O : Autologous Bone Marrow-Derived Cells Regenerate Urethral Sphincters. *LUTS*, 査読有, 4, 2012, pp. 87-94
DOI: 10.1111/j.175-5672.2011.00136.x
- Imamura T, Ishizuka O, Zhang L, Hida S, Gautam S, Kato H, Nishizawa O : Bone marrow-derived cells implanted into radiation-injured urinary bladders reconstructs functional bladder tissues in rats. *Tissue Engineering Part A*, 査読有, 18, 2012, pp. 1698-1709
DOI: 10.1089/ten.tea.2012.0061
- [学会発表](計21件)
- Imamura Tetsuya, Transplantation of cell sheets produced from bone marrow-derived cells reconstructs functional urinary bladders in radiation injury rat models. The 46rd Annual Meeting of the International Continence Society, 2014/10/22, Rio de Janeiro, Brazil
- 今村哲也、シンポジウム：「前立腺肥大症の治療戦略」下部尿路閉塞をともなう膀胱におけるトランスレーショナルリサーチ。第79回日本泌尿器科学会東部総会、2014/10/14、パシフィコ横浜会議センター、神奈川県、横浜市
- 今村哲也、自然発症高血圧ラットの冷えストレス誘発排尿筋過活動におけるミラベクロンの薬理効果の検討。第21回日本排尿機能学会、2014/9/18、岡山コンベンションセンター、岡山県、岡山市
- Imamura Tetsuya, Cell sheet produced by bone marrow-derived cells regenerate functional urinary bladders in rat radiation-injured bladder model. The 9th Pan-Pacific Continence Society Meeting, 2014/09/13, Taichung, Taiwan
- 今村哲也、骨髄由来細胞を用いた細胞シート組織工学による放射線照射傷害膀胱における機能的な膀胱再生の試み。第11回泌尿器科再建再生研究会、2014/7/5、青森県観光物産館アスパム、青森県、青森市
- Imamura Tetsuya, Bone Marrow-derived Cell Sheet Engineering Improves Urinary Functions of Radiation-injured Urinary Bladders in Rat. 2014 American Urological Association Annual Meeting, 2014/5/16-21, Orlando, USA
- 今村哲也、シンポジウム「泌尿器科領域における幹細胞治療のフロントライン」骨髄由来幹細胞による膀胱再生医療研究。第102回日本泌尿器科学会総会、2014/4/27、神戸国際会議場、兵庫県、神戸市
- 今村哲也、放射線照射障害膀胱モデルを用いた骨髄由来細胞シート移植による機能的な膀胱再生の試み。第102回日本泌尿器科学会総会、2014/4/26、神戸国際会議場、兵庫県、神戸市
- 今村哲也、骨髄由来細胞シート移植による放射線照射傷害膀胱の機能的な膀胱再生の試み。第13回日本再生医療学会総会、2014/3/5、国立京都国際会館、京都府、京都市
- 今村哲也、病態モデルラットの冷えストレス排尿筋過活動抑制機序におけるムスカリン受容体の機能的役割の検討。第20回日本排尿機能学会、2013/9/20、静岡コンベンションアーツセンターグランシップ、静岡県、静岡市
- Imamura Tetsuya, Roles of muscarinic receptors for the cold stress induced detrusor overactivity in diabetes rats. The 33th congress of the Societe Internationale' Urologie, 2013/9/9, Vancouver, Canada
- Imamura Tetsuya, β 3-adrenergic receptor involving pathways mediate rat detrusor overactivity induced by cold stress. The 43rd Annual Meeting of the International Continence Society. 2013/8/27, Barcelona,

Spain

- 今村哲也、糖尿病モデルラットにおける冷えストレス誘発排尿筋過活動に対するイミダフェナシンの薬理効果の検討。第 101 回日本泌尿器科学会総会、2013/4/26、さっぽろ芸術文化館、北海道、札幌市
- 今村哲也、放射線照射によるラット膀胱障害モデルを用いた骨髄由来細胞移植による機能的な膀胱再生の試み。第 11 回日本再生医療学会、2012/06/14、パシフィコ横浜国際会議場、神奈川県、横浜市
- Imamura Tetsuya, Implantation of Bone Marrow-derived cells recovers tissue structures and functions of radiation-injured urinary bladders in rats. The 107th AUA Annual Meeting, 2012/5/20, Atlanta, USA
- 今村哲也、組織工学に基づく骨髄由来細胞を利用した膀胱再生。第 100 回日本泌尿器科学会総会 シンポジウム：「泌尿器における再生医療」、2012/4/22、パシフィコ横浜国際会議場、神奈川県、横浜市
- 今村哲也、放射線照射による排尿障害を有するラット膀胱を用いた骨髄由来細胞移植による機能的な膀胱再生の試み。第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012/4/21、パシフィコ横浜国際会議場、神奈川県、横浜市

〔図書〕(計 2 件)

- 今村哲也、加藤晴朗、山岸貴裕、他、膀胱の構造と機能、過活動膀胱はなぜ起こるのか インフォームドコンセントのための図説シリーズ 過活動膀胱と骨盤臓器脱(西沢 理編) 医薬ジャーナル社、2013, pp. 8-13, pp. 14-17
- Imamura T, Ishizuka O, Nishizawa O, INTEC : Regenerative Medicine and Tissue Engineering (Edited by Jose A. Andrades) Bone Marrow-derived Cells Regenerate Structural and Functional Lower Urinary Tracts. (Chapter 17), 2013, pp. 411-428

〔その他〕

ホームページ等
信州大学医学部泌尿器科学教室
<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/urology/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 哲也 (IMAMURA, Tetsuya)
信州大学・医学部・講師

研究者番号：00467143