

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462525

研究課題名(和文) 羊膜を基質として作成した培養口腔粘膜シートを用いた尿路再建法の開発

研究課題名(英文) Urinary reconstruction using the cultivated oral mucosal epithelial sheet on amniotic membrane matrix.

研究代表者

内藤 泰行(Naitoh, Yasuyuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50405312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：培養した口腔粘膜上皮シートは、細胞間のデスモゾームによる細胞接着の状態、基底細胞と羊膜間のヘミデスモゾームによる接着の状態ともに、本来の口腔粘膜上皮と同じ構造を有することを確認した。培養上皮シートの強度・伸展性については、培養シートが不可逆的変化を起こすまでの進展性及び強度は、正常尿管の3分の2程度であることが示された。

この培養シートを尿管の形状にしてウサギの腹壁に移植した。1か月後に開腹して移植した培養口腔粘膜が、尿管のごとく管状の状態を保ち、かつ移植した部位の周囲の組織から、血液の供給を受けて生着したことを確認した。組織学的に粘膜の状態を保持し、発がんや組織の萎縮のないことも確認した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, an oral mucosal epithelial sheet was cultivated and found to have the same structures as the original oral mucosal epithelium both in terms of the status of desmosomal cell-to-cell adhesion and hemidesmosomal adhesion between base cells and the amnion. Regarding the strength and extensibility of the cultivated epithelial sheet, both properties remained at approximately two-thirds those of the normal ureter until irreversible changes occurred in the sheet. We prepared a cultivated sheet in the shape of the ureter and transplanted it into the abdominal wall of a rabbit. One month later, we opened the abdominal cavity and confirmed that the transplanted cultivated oral mucosal membrane retained a tubular shape similar to that of the ureter and was engrafted successfully, as it was receiving blood supply from the tissue surrounding the transplantation site. The sheet maintained the histological status of the mucosa with no carcinogenesis or tissue atrophy.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：口腔粘膜 尿路再建 再生医学

1. 研究開始当初の背景

今までの泌尿器科領域における再生医療は、生体由来の材料を基質として施行されてきたが、いずれの基質も異種または同種の生体由来であるため、感染症や免疫学的な問題があった。さらに現時点においても、尿路上皮を用いた尿路再生は形態的、機能的に十分な成果が得られていない。一方、共同研究者の中村らは眼科領域において、患者の口腔頬粘膜から上皮細胞を採取し、免疫学的に寛容な羊膜を基質にして培養シートを作成し、角膜上皮として移植する自己培養口腔粘膜上皮再生の臨床応用を可能にしている。

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、そこでこの上皮再生技術を応用し多量の上皮を確保し尿路再建ができないかという着想に至った。

2. 研究の目的

このような背景のもと、私たちは尿路の再建を目的としてウサギ口腔粘膜から、羊膜を基質にして培養口腔粘膜シートを作成することに成功した。そして、培養口腔粘膜シートの組織学的特徴として、非角化型でWater tight な粘膜上皮としての性質を保持していることを確認した。さらに、この培養口腔粘膜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、ウサギ腹壁（腹腔内）に移植した培養口腔粘膜シートは、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できることを確認した。

以上より本法の良好な生体適合性という結果を踏まえ、さらに具体的に各臓器（尿道・膀胱・尿管）への臨床応用を目指した研究をするのが目的である。

3. 研究の方法

培養上皮シートの細胞学的検証および強度・伸展性の検討

培養口腔粘膜シートにおいて、上皮の持つ細胞の形態および接着構造特性を検証する。電子顕微鏡的手法を用いて、最表層の微絨毛やGlycocalyx様構造物の存在、細胞間のデスマゾームによる細胞接着の状態、基底細胞と羊膜間のヘミデスマゾームによる接着構造を検証する。

尿路再建の対象臓器が尿道、膀胱、尿管であるために、培養口腔粘膜シートには十分な伸縮性と強度を持つことが要求される。そこで、シートの伸縮性および強度を、引張試験により検討する。

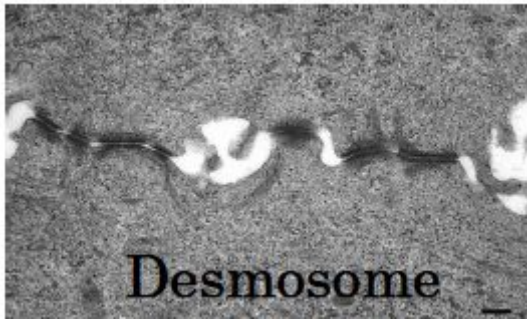
実験動物における尿路再建の可能性の検討

実験用犬および豚から採取した口腔粘膜細胞をもちいて培養口腔粘膜シートを作成し、尿道形成術・膀胱拡大術・尿管形成術を行う。さらに、長期的な経過観察を行い、発がんの有無や組織の萎縮などについて、組織学的変化について評価する。

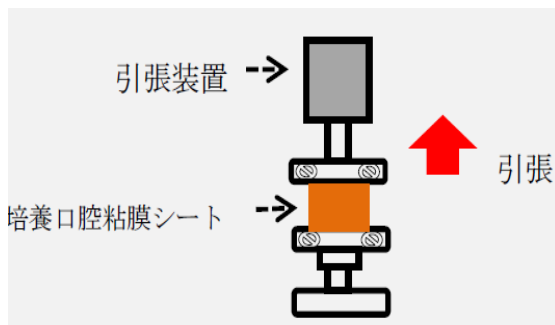
4. 研究成果

培養上皮シートの細胞学的検証および強度・伸展性の検討

培養した口腔粘膜上皮シートは、非角化性の性質を有し、いわゆる水分環境に対して強い性質を有する非角化性の粘膜上皮であることが確認された。さらに、電子顕微鏡的手法を用いて、本来の口腔粘膜が有すべき最表層の微絨毛の存在が確認された。細胞間のデスマゾームによる細胞接着の状態、基底細胞と羊膜間のヘミデスマゾームによる接着構造についても、本来の口腔粘膜上皮と同じ構造を有することが確認された。

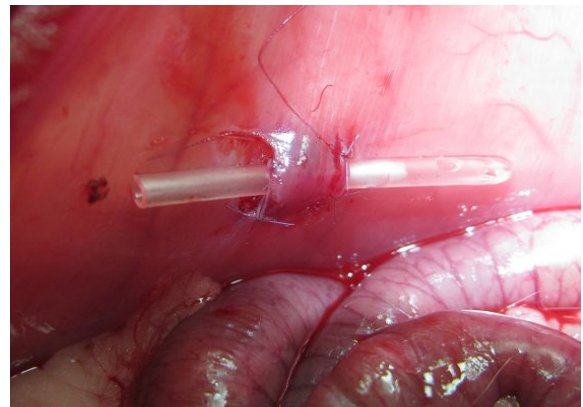


培養上皮シートの強度・伸展性の引張試験により検討した。まずは比較対象を尿管としたが、培養シートが不可逆的变化を起こすまでの進展性及び強度は、正常尿管の3分の2程度であることが示された。



実験動物における尿路再建の可能性の検討

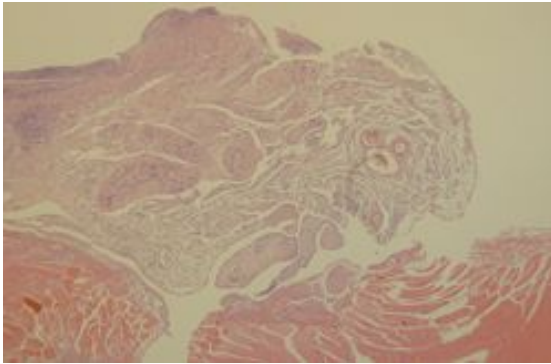
実験動物における尿路再建の可能性を踏まえ『尿管形成の検討』を行った。まずウサギ口腔（頬粘膜）を採取し、口腔粘膜培養シートを作成した。この口腔粘膜培養シートを尿管の形状にするために、管状にしてカテーテルを心棒にしてウサギの腹壁に移植した。この腹壁の移植するアイデアについては、腹腔内は腹水があり、尿路を想定した環境として適しており、以前に行った実験に基づくものである。



結果は、1か月後に開腹して移植した培養口腔粘膜が、尿管のごとく管状の状態を保ち、かつ移植した腹壁および腹膜などの周囲の組織からの血液の供給を受けて生着したことを確認した。この結果により、培養口腔粘膜シートを用いて尿管形成の可能性が確認された。また、『経過観察によるデータ収集』として、組織学的に粘膜の状態を保持し、短期間ではあるが発がんや組織の萎縮のないことも確認した。



肉眼的所見



組織学的所見

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 6件)

1. Transvesical laparoscopic surgery for double renal pelvis and ureter with or without ureterocele. Naitoh Y, Oishi M, Kobayashi K, Yamada Y, Nakamura T, Johnin K, Hongo F, Naya Y, Okihara K, Kawauchi A. Int J Urol. 23(4):332-6. 2016. (査読有) doi: 10.1111/iju.13049.
2. Laparoendoscopic Single-Site Surgery for Pediatric Urologic Disease. Yamada Y, Naitoh Y, Kobayashi K, Fujihara A, Johnin K, Hongo F, Naya Y, Kamoi K, Okihara K, Kawauchi A, Miki T. J Endourol. 30(1):24-7, 2016. (査読有) doi: 10.1089/end.2015.0130.
3. Percutaneous nephrolithotripsy and antegrade ureterolithotripsy in a 10-month-old infant with urinary stones in both kidney and ureter. Naitoh Y, Yamada Y, Fujihara A, Naya Y, Hongo F, Kamoi K, Okihara K, Miki T. Int J Urol.22(1):128-30, 2015. (査読有) doi: 10.1111/iju.12626.
4. Laparoendoscopic single-site versus conventional laparoscopic pyeloplasty : A matched pair analysis.

Naitoh Y, Kawauchi A, Yamada Y, Fujihara A, Hongo F, Kamoi K, Okihara K, Miki T. Int J Urol. 21(8):793-796, 2014. (査読有) doi: 10.1111/iju.12427.

5. Nephrolithotomy Performed concurrently with laparoendoscopic single-site pyeloplasty. Naitoh Y, Kawauchi A, Kamoi K, Soh J, Hongo F, Okihara K, Miki T. Urology, 83(1) :243-246, 2013. (査読有) doi: 10.1016/j.urology.2013.08.051.
6. Hemostatic effect of New Surgical Glue in Animal Partial Nephrectomy Models. Naitoh Y, Kawauchi A, Kamoi K, Soh J, Okihara K, Hyon S, Miki T. Urology ,81(5): 1095-1100, 2013.(査読有) doi: 10.1016/j.urology.2013.01.002.

[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〕

該当なし

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

稲富 勉 (INATOMI, Tsutomu)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：00305583

三木 恒治 (MIKI, Tsuneharu)

京都府立医科大学・医学研究科・特任教授

研究者番号：10243239

中村 隆宏 (NAKAMURA, Takahiro)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30411078

邵 仁哲 (SOH, Jintetsu)

明治国際医療大学・医学教育センター・
教授

研究者番号：40305587

河内 明宏 (KAWAUCHI, Akihiro)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：902400952

(3)連携研究者

該当なし