

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861417

研究課題名(和文) 間質性膀胱炎モデルでの脂肪由来幹細胞静脈注入療法

研究課題名(英文) Anti-inflammatory effect of intravenous injection of adipose-derived regenerative cells using a cystitis rat model

研究代表者

舟橋 康人 (Funahashi, Yasuhito)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70534824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱炎症モデルラットの尾静脈より脂肪由来幹細胞を注入したところ、近赤外線 in vivo イメージによる膀胱炎症巣へ幹細胞が集積することを確認した。CCD生体顕微鏡により膀胱壁微小循環を定量化したところ、幹細胞注入群で有意に血流が増加していた。組織学的には著明な変化はみられなかったが、ELISAにて炎症性サイトカインは抑制された。膀胱内圧測定にて排尿感覚は延長し、膀胱疼痛刺激は減弱していた。本研究の成果は、自己脂肪由来・非培養幹細胞の静脈注入療法が間質性膀胱炎の新規治療選択肢となりうることを示した。

研究成果の概要(英文)：We injected adipose-derived regenerative cells (ADRCs) via the tail vein using a cystitis rat model. Near-infrared light in vivo imaging showed "homing phenomenon" of ADRCs to the inflamed bladder. Pencil lens charge-coupled device microscopy showed increased microcirculation of the bladder wall in the ADRCs-injected rats. There were no obvious histological changes in the bladder, and a significant decrease of pro-inflammatory cytokines by ELISA. Cystometrogram revealed prolonged intercontraction intervals. Nociceptive behaviors decreased in the ADRCs-injected group. The results of this study indicated the possibility of intravenous injection of ADRCs as a new treatment for interstitial cystitis.

研究分野：排尿障害学

キーワード：脂肪由来幹細胞 膀胱 炎症 homing ラット

1. 研究開始当初の背景

幹細胞を用いる再生療法は種々の疾患の治療に応用できる可能性を秘めているが、培養細胞を用いた再生療法においては常に癌化、あるいは無抑制増殖の懸念が存在する。脂肪由来幹細胞については、近年、脂肪組織より体外培養を行うことなく治療必要量の幹細胞を抽出できる装置が開発され、自己脂肪組織由来・非培養幹細胞を用いた細胞治療が可能となり、臨床応用の実現性が高く、極めて安全性が高いというメリットを有する。実際に、海外では自己脂肪組織由来・非培養幹細胞を用いた臨床研究が、心筋梗塞、乳房再建などにおいて実施されている。

脂肪由来幹細胞は静脈注入による全身投与により、炎症臓器へ集積することが報告されており、我々のグループでも近赤外線 *in vivo* イメージングを用いて、阻血腎障害モデルラットに静脈投与した脂肪由来幹細胞が腎に経時的に集積することを確認している。このことから、膀胱炎症モデルにおいては経静脈に投与した幹細胞は膀胱に集積することが予測される。

近年、膀胱機能障害の病因として膀胱血流障害が注目され、過活動膀胱、前立腺肥大症、間質性膀胱炎などの病態における膀胱血流障害の重要性についての知見が報告されつつある。実際に、我々も膀胱壁の血流増加により排尿筋過活動が改善することを報告している [1]。また、我々は世界に先駆けて、前立腺手術後尿失禁患者に対する脂肪由来幹細胞の傍尿道注入治療をヒトにおける臨床試験として実施中であり、自己皮下脂肪から抽出した脂肪由来非培養幹細胞を尿道括約筋に注入することにより、尿失禁が改善することに加え、幹細胞注入

局所における血流が経時的に増加することをドップラーエコー、造影エコーにて確認している [2]。以上より、幹細胞療法が血流増加により膀胱機能障害を改善することが示唆される。

また、我々のグループは培養脂肪由来幹細胞をラット腎被膜下に注入し、薬剤性腎線維化を抑制することを報告し [3] その機序として脂肪由来幹細胞から分泌される HGF が関与していることを確認している。間質性膀胱炎においても膀胱組織の線維化により膀胱容量の低下が起こることが知られていることから、線維化の抑制に脂肪由来幹細胞療法が有効である可能性が示唆される。

ラット膀胱への塩酸注入により、膀胱粘膜～筋層の炎症を惹起し、その後線維化を起こすことが知られている。機能的には疼痛閾値の低下とともに排尿筋過活動が認められ、これらは臨床においてしばしば問題となる間質性膀胱炎の病態と共通する部分が多く、間質性膀胱炎のモデルとして塩酸膀胱注入ラットモデルが用いられている。

2. 研究の目的

本研究では塩酸膀胱注入ラットモデルを用いて、尾静脈より培養脂肪由来幹細胞を投与し、炎症を起こした膀胱への幹細胞の集積を確認するとともに、幹細胞の組織保護作用について組織学的・機能的に検討する。今回の研究により、経静脈投与した脂肪由来幹細胞が炎症を起こした膀胱に集積し、組織学的のみならず機能的にも保護効果を有することを明らかにできれば、幹細胞治療の新しい作用機序を解明することができ、さらに臨床的には間質性膀胱炎に対する新規治療の開発につながることを期待される。

3. 研究の方法

膀胱炎症ラットモデル作成においては、12週齢雌性SDラットに0.1N塩酸200 μ Lを経尿道的に注入し、膀胱を傷害した。脂肪由来幹細胞については、雄性GFP発現遺伝子改変SDラットから大腿皮下脂肪を採取し、脂肪より抽出した幹細胞を2週間低血清培養(3×10^6 cell/20 μ L)し、XenoLight DiRでラベルしたものを、塩酸注入翌日に雌性SDラットの尾静脈より投与した。

(1)近赤外線 in vivo イメージ

尾静脈より注入した幹細胞が炎症を起こした膀胱に集積することを確認する目的で、塩酸膀胱注入1時間後、24時間後、7日後にIVIS®イメージングシステム(Caliper社)にて注入細胞の体内動態を非侵襲的に可視化した。

(2)CCD生体顕微鏡による膀胱壁微小循環の評価

膀胱壁内微小循環の改善を調べるために、幹細胞投与1週間後に麻酔下に腹壁切開より挿入したペンシル型CCD生体顕微鏡により、経時的に毛細血管の血流速度を測定した。膀胱壁微小循環の解析は、倍率400倍で録画した膀胱毛細血管のビデオ映像から対象血管の血流測定を行い数値化(ml/min/100gm)する。[4]

(3)生化学的・組織学的検討

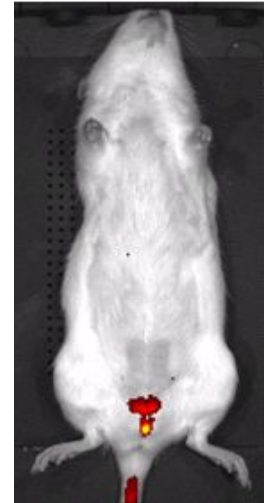
幹細胞投与1週間後に膀胱を摘出し、炎症性サイトカインを蛋白レベルで定量化した。また組織学的には、H&E染色にて炎症・線維化の抑制、血管新生の評価を行った。

(4)膀胱内圧測定

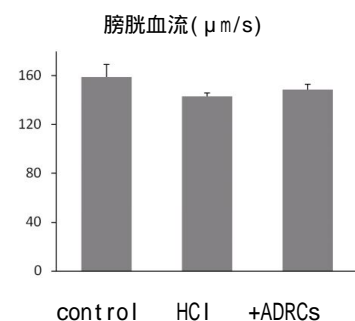
幹細胞投与1週間後に膀胱内圧測定にて排尿間隔、膀胱容量、膀胱収縮力、残尿量、排尿筋過活動を評価し、幹細胞注入による過活動膀胱の抑制効果を検討した。[5]

4. 研究成果

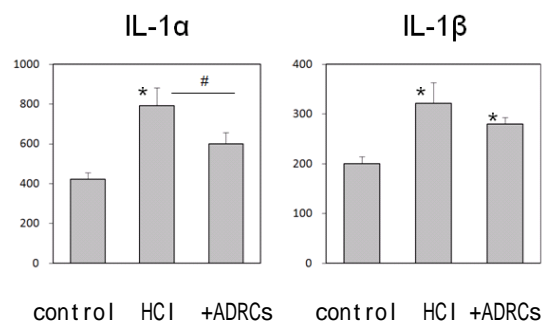
(1)膀胱炎症モデルラットの尾静脈より脂肪由来幹細胞を注入したところ、近赤外線 in vivo イメージによる膀胱炎症巣へ幹細胞が集積することを確認した。

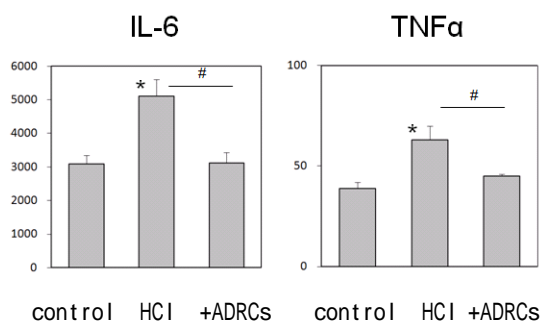


(2)CCD生体顕微鏡により膀胱壁微小循環を定量化したところ、幹細胞注入群で有意に血流が増加していた。



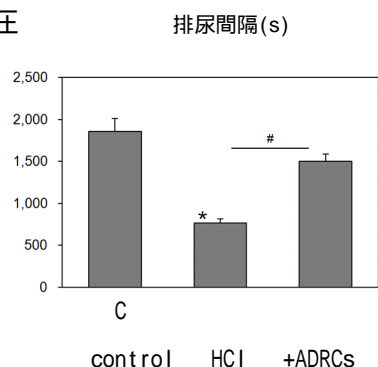
(3)組織学的には著明な変化はみられなかった。ELISAにて炎症性サイトカインは抑制された。





(4) 膀胱内圧

測定にて
排尿間隔
の延長が
確認され
た。



以上の結果より、膀胱炎症モデルラットの尾静脈より注入した脂肪由来幹細胞は、炎症を起こした膀胱へ集積し、膀胱の炎症を抑制し、排尿筋過活動を抑制することが明らかとなった。今後、臨床的には間質性膀胱炎に対する新規治療の開発につながることを期待される。

<引用文献>

[1] Mine S, Yamamoto T, Mizuno H, Endo K, Matsukawa Y, Funahashi Y, Kato M, Hattori R, Gotoh M. Effect of tamsulosin on bladder microcirculation in rat model of bladder outlet obstruction using pencil lens charge-coupled device microscopy system. *Urology*. 2013 Jan;81(1):155-9.

[2] Yamamoto T, Gotoh M, Kato M, Majima T, Toriyama K, Kamei Y, Iwaguro H, Matsukawa Y, Funahashi Y. Periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells for the treatment of

male stress urinary incontinence: Report of three initial cases. *Int J Urol*. 2012 Jul;19(7):652-9.

[3] Katsuno T, Ozaki T, Saka Y, Furuhashi K, Kim H, Yasuda K, Yamamoto T, Sato W, Tsuboi N, Mizuno M, Ito Y, Imai E, Matsuo S, Maruyama S. Low serum cultured adipose tissue-derived stromal cells ameliorate acute kidney injury in rats. *Cell Transplant*. 2013;22(2):287-97.

[4] Yamamoto T, Hayashi K, Tomura Y, Tanaka H, Kajiya F. Direct in vivo visualization of renal microcirculation by intravital CCD videomicroscopy. *Exp Nephrol*. 2001 Mar-Apr;9(2):150-5.

[5] Funahashi Y, Oguchi T, Goins WF, Gotoh M, Tyagi P, Goss JR, Glorioso JC, Yoshimura N. Herpes simplex virus vector mediated gene therapy of tumor necrosis factor- blockade for bladder overactivity and nociception in rats. *J Urol*. 2013 Jan;189(1):366-73.

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

舟橋 康人 (FUNAHASHI, Yasuhito)
名古屋大学 医学部附属病院・助教
研究者番号: 70534824

(2)研究分担者

なし