

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462441

研究課題名(和文)自家骨髄幹細胞・脂肪組織由来幹細胞を利用した細胞シートを用いた下部尿路再生療法

研究課題名(英文) Tissue engineering for lower urinary tract using autologous bone marrow or fatty tissue derived stem cells.

研究代表者

石塚 修 (ISHIZUKA, Osamu)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：20184541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、ラビットの大腿骨骨髄より骨髄由来幹細胞、もしくは皮下脂肪組織から脂肪幹細胞を採取し、シート状に培養し増殖することを可能とした。そのシートを、放射線によって障害を与えた膀胱、もしくは凍結傷害を与えた尿道括約筋に移植し、その再生を免疫染色および機能的検査にて確認することができた。このことは、単なる細胞注入法での移植よりも、シート状にした幹細胞移植は、下部尿路再生により効果的であることを示すこととなった。

研究成果の概要(英文)：We could culture and proliferate the bone-marrow-derived mesenchymal stem cells derived from the femur of rabbit, or fatty-tissue derived stem cells to stem cell sheets. The cultured stem cell sheet were implanted into the radiation injured bladder or cryo-injured urethral sphincter, and we could found the reconstruction of the bladder and urethral sphincter by immuno-histological methods and functional study. This fact means stem cells sheet is more effective for tissue engineering of lower urinary tract than simple stem cell injection methods.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：再生医療 膀胱 尿道括約筋 骨髄幹細胞 脂肪幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

何らかの理由で臓器またはその機能を喪失した場合の治療は永遠の課題である。近年、生命科学とテクノロジーの進歩により、再生医療は組織の誘導、そして最終的には組織・臓器の新生なども視野に入れたきわめて能動的な手段として登場してきている。

そのような再生医療の発展の中で、骨髄および脂肪幹細胞の多分化能が注目されるようになった。そのきっかけとしては、骨髄移植を受けた患者や実験動物の組織を調べてみると、ドナー由来の細胞が様々な臓器に存在することが発見され、骨髄に存在する幹細胞も各種臓器の代謝や損傷を補充する役割を担っているのではないかと考えられるようになってきたためである。

幹細胞の泌尿器科領域での応用については尿失禁に対する尿道括約筋の再生治療としての報告が散見される。

米国のピッツバーグ大学グループの、最近の米国泌尿器科学会総会で発表された手法としては、針生検で患者の筋組織を得て、筋芽細胞の培養を行い、尿道横紋筋内に注入する手法が報告され、国内では既に数施設で臨床応用をめざした基礎的研究が行われている。例えば、前立腺全摘除術の時に採取したヒト外尿道括約筋からヒト外尿道括約筋衛生細胞の分離培養が大分大学より報告されており、筋の分化誘導には HGF は抑制インスリン様成長因子が促進すると報告されている(日泌尿会誌 97:377,2006)。また、名古屋大学からは腹圧性尿失禁症例を想定した自己皮下脂肪組織由来幹細胞傍尿道周囲注入療法をラットとブタに対して行い、有用性と安全性の基礎的検討を行った報告を認める(第7回泌尿器科再建再生研究会,2010)、その後、11名の前立腺手術

後の尿失禁に対しての臨床応用の報告も行われている(Gotoh et al. Int. J. Urol. 2013)。しかしながら、これらの報告はいずれも筋芽細胞、線維芽細胞、脂肪細胞を利用して、尿道括約筋の再生を試みた報告であり、排尿に関する下部尿路を一連の器官としての再生を試みた報告でないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的として重要な点は、以下の3点である。

これまでに行ってきた骨髄幹細胞および脂肪幹細胞をシート状に培養することにより、欠損してしまった膀胱、尿道を再生させようと試みること

臨床的な障害例として放射線による膀胱障害、癌や外傷などで損傷・欠落してしまった、膀胱、尿道の再生を想定したこと  
組織だけでなく臓器としての働きを考え、排尿全体としての機能回復を想定したことである。

また、本研究の学術的、独創的な点としては、骨髄幹細胞、脂肪細胞を利用するため、比較的容易に採取できる細胞を利用し、また、自身の細胞を利用しているため、拒絶反応の対する配慮が不要であること、また、利用するにあたっては、採取しただけの細胞では少量で再生を誘導することは不可能と考えられるため、採取した後に一定期間、培養することによって増殖させた後に、増殖を層状に行い、シート状に増殖させることによって、膀胱、尿道などの管腔臓器の再生を試みた点は、独創的と考えられる。尿道の再生については、これまで、自己の口腔内粘膜を使用する方法や、自己の腸管を使用する報告は認めるが、粘膜採取や腸管利用は、本人への侵襲が大きく、とても低侵襲とは考えられない。尿道再生に、自己にとっても余分と思われる脂肪が

ら遊離した脂肪幹細胞を利用して再生を試みることは、臨床上、意義深いと思われる。

また、再生された膀胱・尿道組織が十分な機能を持ちうるのかについても、無麻酔覚醒下での膀胱内圧検査を行うというより生理的な状態で検証する点は独創的と考えられる。

### 3. 研究の方法

以下にその方法を手順に沿って述べる。

骨髄幹細胞もしくは脂肪細胞の採取と培養

ラット、ラビットの大腿骨骨髄より注射針で骨髄由来幹細胞を採取し 15% fetal bovine 血清および抗生剤附加の Dulberco Modified Eagle Medium の中に入れる。

これらの細胞を遠心分離した後に、Type collagen でコートした培養皿で 7 日間初代培養する(Imamura T. et al., LUTS, 2010)。培養によって接着伸展した骨髄由来幹細胞を温度感受性培養皿で継代培養し、細胞シートを作製する手法を確立する。

また、これらの実験動物の皮下脂肪細胞からも同様な細胞採取を行い(Sudha G. et al., 日本泌尿器科学会総会, 2013)、脂肪幹細胞由来の細胞シートを作製できるか検討する。

培養細胞のマーキング

培養途中の 5 日目の時点で、Lipofectamine 2000 Reagent を使用し、GFP ( Green fluorescence protein ) 発現遺伝子を培養細胞内にトランスフェクションしてマーキングする(Imamura T., et al. Tissue Eng. 2009)。もしくは、蛍光時間の長い Qtracker cell labeling kits 1 重染色によるマーキングを行う(Imamura T.et al., Tissue Eng. 2011)。

膀胱・尿道障害ラットの膀胱、尿道への移植

漿膜側より-80 のアイスバーで障害を受けた膀胱モデル ( Imamura T., Tissue Eng. 2009 ) の膀胱へ、作成した細胞シートを貼り付ける。また、同様に膀胱内側より、-80 のアイスバーで内尿道括約筋の障害を受けた腹圧性尿失禁モデル、放射線障害により尿道括約筋収縮力の低下した尿失禁モデル(Imamura T.et al, Tissue Eng., 2012)、尿道を途中から断裂させた尿道損傷モデルに対しても、障害部位に貼り付ける、もしくは漿膜側から巻くなどの手法をもちいて、同様な移植を行う。

組織学的な再生の確認

移植後 3 日目、14 日目に膀胱および尿道括約筋を取り出す。Monoclonal anti-GFP 抗体、平滑筋特異抗体を使用して免疫二重染色を行い、レーザー蛍光顕微鏡で移植した細胞の分化、つまり、筋層をはじめとする膀胱および尿道括約筋の再生を観察する(Imamura T. et al., Tissue Eng. 2009, 2012, 2013)。また、14 日目においては、Acta2 primer を使用して alpha smooth muscle actin を、Myh11 primer を使用して smooth muscle myosin heavy chain を、Real time RT-PCR 法にて定量測定し、骨髄幹細胞もしくは脂肪細胞の膀胱平滑筋、内尿道括約筋への分化、尿道の再生についての評価も定量的に行う。

一連の排尿器官としての機能的再生の確認

14 日目に膀胱および尿道括約筋を摘出しなかった別の移植ラット群(ラビット群)においては、覚醒下無拘束状態下での膀胱内圧検査を行うことによって、膀胱としての機能の再生の確認、また、腹圧時尿漏出時圧測定を行うことによって尿道括約筋としての収縮機能が再生したかを、コントロールと比較して検証する。

#### 4. 研究成果

ラット、ラビットの大腿骨の骨髄より注射針で骨髄由来幹細胞を採取し遠心分離した後に、Type collagen でコートした培養皿で7日間初代培養した。培養によって接着伸展した骨髄由来幹細胞を温度感受性培養皿で継代培養し、細胞シートを作製することができた。なお、培養途中の5日目の時点で、Lipofectamine 2000 Reagent を使用し、GFP (Green fluorescence protein) 発現遺伝子を培養細胞内にトランスフェクションしてマーキングすることができた。

漿膜側より-80 のアイスバーで障害を受けた膀胱モデルの膀胱へ、細胞シートを移植した。また、同様に膀胱内側より、-80 のアイスバーで内尿道括約筋の障害を受けた腹圧性尿失禁モデルの尿道に対しても同様な細胞移植を行った。

移植後3日目、14日目に膀胱および尿道括約筋を取りだし、骨髄幹細胞の膀胱平滑筋、内尿道括約筋への分化、尿道の再生についての評価を行ったところ、再生が確認できた。

一方では、14日目に膀胱および尿道括約筋を摘出しなかった別の移植ラット群(ラビット群)においては、覚醒下無拘束状態で膀胱内圧検査を行い、管腔臓器としての機能が回復したことが確認できた。

#### 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3件)

1. Ishikawa, M., Imamura, T., Nishizawa, O., Ishizuka, O.: Implantation of autologous bone marrow-derived cells improves erectile dysfunction in spontaneously hypertensive rats. Shinshu Medical Journal 65(1):37-44,

2017. (査読有り)

2. 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 Eng. Part A 21(9-10): 1600-1610, 2015. (査読有り)
3. Sudha, G.S., Imamura, T., Ishizuka, O., Zhang, L., Yamagishi, T., Yokoyama, H., Minagawa, T., Ogawa, T., Kurizaki, Y., Kato, H., Nishizawa, O.: Implantation of autologous adipose-derived cells reconstructs functional urethral sphincters in rabbit cryo-injured urethra. Tissue Eng. Part A. 20(13-14): 1971-9, 2014. (査読有り)

[学会発表](計6件)

1. 今村哲也、島村 満、畠山奈々美、ゴータム スダ、永井 崇、小川輝之、皆川倫範、齊藤徹一、鈴木都史郎、中沢昌樹、石塚 修。バイオ3Dプリンターで作製した骨髄由来細胞構造体による放射線障害膀胱の機能的な膀胱再生への試み。第16回日本再生医療学会総会。2017/3/7 仙台市
2. 今村哲也、小川輝之、皆川倫範、横山 仁、石川雅邦、永井 崇、平形志朗、中沢昌樹、石塚 修：骨髄由来細胞シートによる放射線照射傷害膀胱の機能的な膀胱への再生とその機序解明の試み。第14回日本再生医療学会総会 2015/3/19-21。横浜市
3. 今村哲也、石塚 修、スダ ゴータム、山岸貴裕、横山 仁、皆川倫範、中沢昌樹、小川輝之、加藤晴朗、西沢 理：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 青森市．(学会  
賞)

4. 今村哲也、石塚 修、Sudha Gautam、加藤晴朗、西沢 理．骨髓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 京都市．
5. Imamura, T., Ishizuka, O., Ogawa, T., Yokoyama, H., Minagawa, M., Nakazawa, M., Nishizawa, O.: Transplantation of cell sheets produced from bone marrow-derived cells reconstructs functional urinary bladders in radiation injury rat models. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Continence Society. Rio de Janeiro, Brazil, 2014/10/22
6. Imamura, T., Ishizuka, O., Ogawa, T., Minagawa, M., Yokoyama, H., Nakazawa, M., Kato, H., Nishizawa, O.: Cell sheet produced by bone marrow-derived cells regenerate functional urinary bladders in rat radiation-injured bladder model. The 9<sup>th</sup> Pan-Pacific Continence Society Meeting. Taichung, Taiwan. 2014/09/12-13

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

石塚 修 (ISHIZUKA, Osamu)  
信州大学・学術研究院医学系・教授  
研究者番号：2 0 1 8 4 5 4 1

### (2)研究分担者

今村 哲也 (IMAMURA, Tetsuya)  
信州大学・医学部・特任講師  
研究者番号：0 0 4 6 7 1 4 3