

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462443

研究課題名(和文) 尿路平滑筋幹細胞の創出と尿道括約筋再生のための基盤的研究

研究課題名(英文) Establishment and regenerative research of urinary smooth muscle stem cells for urethral sphincter

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：尿失禁は尿が不随意に漏れる状態であり、社会的・身体的に問題となる状態と定義され、本邦でも多くの患者が存在する。本申請研究では、人工多能性幹細胞等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。複数の条件下において、尿道括約筋幹細胞候補株を誘導することができた。その一部の細胞株では、免疫組織学的染色により平滑筋細胞マーカーの発現を確認した。

研究成果の概要(英文)：Urinary incontinence is associated with negative effects on a woman's social and physical well-being and the prevalence is increasing in Japan. In this study, we conducted a regenerative research for the establishment and application of urinary smooth muscle stem cells for the urethral sphincter. In the selected stem cells, expression of smooth muscle markers was confirmed by immunohistochemistry.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：尿失禁 幹細胞 平滑筋再生

## 1. 研究開始当初の背景

尿失禁とは尿が不随意に漏れる状態であり、社会的、衛生的に問題となる状態と定義され、腹圧性、切迫性、混合性、溢流性、機能性尿失禁の5種類に分類される。本邦における疫学調査では、40歳以上の潜在保有者は腹圧性尿失禁が780万人、混合性尿失禁が500万人に達すると推測されている。特に腹圧性尿失禁に対しては、有効な薬物療法はなく、メッシュや人工尿道括約筋装着術など異物を利用、埋設する手術療法に頼らざるを得ないことに加え、いずれも非生理的な方法である。そのため、device感染などの合併症が大きな欠点となっている。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)細胞をはじめ再生治療の可能性も示唆されているが、実用化には至っていない。

## 2. 研究の目的

我々はこれまで人工多能性幹細胞(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ってきた。iPS細胞を尿道周囲括約筋部へ直接移植する方法では、機能を回復させるだけの十分量の平滑筋細胞に分化させることができず、その効率性に問題がある。生体内移植により自律性をもって増殖、平滑筋細胞に分化しうる尿路平滑筋幹細胞の樹立ができれば、排尿機能、尿道括約筋機能回復に寄与することが期待できる。しかしながら、尿路平滑筋幹細胞の樹立は未だ為されていないため、臨床応用に直結するような研究もない。本研究では、これらの分化万能性細胞を経ることなく、我々が独自に開発した逆行性幹細胞誘導法に基づき平滑筋幹細胞を誘導・分離することを試み、尿路平滑筋幹細胞移植による尿道括約筋再生を目指した基盤的研究を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 購入したヒトiPS細胞にレチノイン酸

(Retinoic Acid  $10^{-5}$  mol/L) を添加し、iPS細胞を培養し、平滑筋細胞の分化誘導実験を行った。平滑筋細胞への分化は、コントロール群(無添加)を設定し、形態学的比較、ならびにRT-PCR法で平滑筋細胞特異マーカー(SMA)の発現で確認した。また、他にもMyocardin, Myosin-heavy chainなどの平滑筋細胞表面マーカーを用いて、コントロール群と比較することにより、免疫組織学的に平滑筋細胞への分化誘導を確認した。

(2) 購入したヒト正常間質組織由来の初代培養細胞に山中4因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC)をトランスフェクションすることにより、逆行性に尿路平滑筋幹細胞を誘導した。誘導された幹細胞は、Epigenetic memoryによる各由来組織への分化志向性を有すると考えられる。また、当該幹細胞を利用した細胞移植法についての予備実験を行った。

## 4. 研究成果

本研究では、平滑筋幹細胞を誘導・分離し、それらを膀胱尿道括約筋部へ移植することにより、尿道括約筋機能再生による新規尿失禁治療を開発するための基盤となる実験を行った。

平成26年、27年度は、主にヒトiPS細胞から平滑筋への分化誘導を試みた。具体的には、iPS細胞にレチノイン酸を添加することで尿路平滑筋細胞への誘導を行なった。免疫組織学的染色(SMA, Myocardin, Myosin-HC, desmi)により平滑筋への誘導を確認した。また、分化誘導過程において、平滑筋幹細胞を含むと思われる細胞コロニーを認めた。

また、ヒト正常間質組織由来の初代培養細胞に山中4因子をトランスフェクションすることにより、逆行性に尿路平滑筋幹細胞の誘導を行った。これらの研究の中で、臨床応用を目指す観点から、間葉系幹細胞を含む細胞コロニーから、平滑筋幹細胞を効率よく分離する必要があると考えられた。そこで我々

が独自に開発した Advanced TSTA(Ad-TSTA) システム(グルココルチコイドレプターとポリグタミンを組み合わせた酵素を TSTA 遺伝子発現システム内部に挿入することで、機能的に重要であるにもかかわらず転写活性が弱い多くの特異的プロモーター群において、転写活性を飛躍的に高めることができる)を用いて、平滑筋幹細胞に特異的な Myocardin プロモーター活性ならびに hTERT プロモーター活性により分化の各段階の幹細胞群をハサミ打ちして、尿路平滑筋幹細胞を分離させるための予備実験を行った。

尿失禁は尿が不随意に漏れる状態であり、社会的・身体的に問題となる状態と定義され、本邦でも多くの患者が存在している。本申請研究では、人工多能性幹細胞等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い、複数の条件下において、尿道括約筋幹細胞候補株を誘導することができた。その一部の細胞株では、免疫組織学的染色により平滑筋細胞マーカーの発現を確認することができた。

## 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 14 件)

1. Cost-effectiveness analysis of long-term intermittent self-catheterization with hydrophilic-coated and uncoated catheters in patients with spinal cord injury in Japan. Watanabe T, Yamamoto S, Gotoh M, Saitoh T, Yokoyama O, Murata T, & Takeda M, (査読有, 責任著者), LUTS. 2015; [E pub ahead of print] DOI: 10.1111/luts.12122.
2. Comparison of Purification Solutions With Different Osmolality for Porcine Islet Purification. Miyagi-Shiohira C, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Matsushita M, Noguchi H, (査読有), Cell Med. 2016;9(1-2):53-59. DOI: 10.3727/215517916X693140.
3. The Evaluation of Islet Purification Methods That Use Large Bottles to Create a Continuous Density Gradient. Miyagi-Shiohira C, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Matsushita M, Noguchi H, (査読有), Cell Med. 2016;9(1-2): 45-51. DOI: 10.3727/215517916X693131.
4. Evaluation of Serum-Free, Xeno-Free Cryopreservation Solutions for Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. Miyagi-Shiohira C, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Matsushita M, Noguchi H, (査読有), Cell Med. 2016;9(1-2): 15-20. DOI: 10.3727/215517916X693122.
5. The gender specific risk factors for prolonged hospitalization due to acute pyelonephritis in a Japanese tertiary emergency center. Muneishi R, Tanimoto R, Wada K, Hsiao P, Eguchi J, Araki M, Watanabe T, Nasu Y, Akebi N, (査読有), Journal of Infection and Chemotherapy .2016; 22(2), 108-111. DOI: 10.1016/j.jiac.2015.11.007.
6. Factors predicting adhesion between renal capsule and perinephric adipose tissue in partial nephrectomy. Kobayashi Y, Kurahashi H, Matsumoto Y, Wada K, Sasaki K, Araki M, Ebara S, Watanabe T, Nasu Y, (査読有), Acta Med Okayama. 2016; 70(2),69-74. <http://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/ja/54185>.
7. Clinical analysis of bacterial strain profiles isolated from urinary tract infections:A 30-year study, Wada K,

- Uehara S, Yamamoto M, Sadahira T, Mitsuhashi R, Araki M, Kobayashi Y, Ishii A, Kariyama R, Watanabe T, Nasu Y, Kumon H., (査読有), Journal of Infection and Chemotherapy.2016; 22(7), 478-482.DOI:10.1016/j.jiac.2016.04.004.
8. The efficacy of rituximab in high-risk renal transplant recipients. Araki M, Wada K, Mitsui Y, Kubota R, Yoshioka T, Ariyoshi Y, Kobayashi Y, Kitagawa M, Tanabe K, Sugiyama H, Wada J, Watanabe M, Watanabe T, Hotta K, Nasu Y, (査読有), Acta Med Okayama. 2016; 70(4),295-297.http://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/54507.
9. A phase clinical trial evaluating the preventive effectiveness of lactobacillus vaginal suppositories in patients with recurrent cystitis. Wada K, Uehara S, Ishii A, Sadahira T, Yamamoto M, Mitsuhashi R, Takamoto A, Araki M, Kobayashi Y, Watanabe M, Watanabe T, Hotta K, Nasu Y, (査読有), Acta Med Okayama, 2016;70(4),299-302. http://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/54508.
10. Japanese guideline for clinical research of antimicrobial agents on urogenital infections:second edition. Yasuda M, Muratani T, Ishikawa K, Kiyota H, Sakata H, Shigemura K, Takahashi S, Hamasuna R, Hayami H, Mikamo H, Yamamoto S, Watanabe T, Arakawa S, (査読有), Journal of Infection and Chemotherapy.2016; 22, 651-66. DOI: 10.1016/j.jiac.2016.07.018.
11. Cryopreservation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. Miyagi-Shiohira C, Kurima K, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Matsushita M, Noguchi H, (査読有), Cell Med. 2015;8(1-2):3-7. DOI: 10.3727/215517915X689100.
12. A vaccine strategy with multiple prostatic acid phosphatase-fused cytokines for prostate cancer treatment. Fujio K, Watanabe M, Ueki H, Li SA, Kinoshita R, Ochiai K, Futami J, Watanabe T, Nasu Y, Kumon H, (査読有), Oncol Rep. 2015, 33,1585-1592. DOI: 10.3892/or.2015.3770.
13. Potential Factors for the Differentiation of ESCs/iPSCs Into Insulin-Producing Cells. Tsugata T, Nikoh N, Kin T, Saitoh I, Noguchi Y, Ueki H, Watanabe M, James Shapiro AM, Noguchi H, (査読有), Cell Med. 2014;7(2):83-93. DOI:10.3727/215517914X685178.
14. Induction of tissue-specific stem cells by reprogramming factors, and tissue-specific selection. Noguchi H, Saitoh I, Tsugata T, Kataoka H, Watanabe M, Noguchi Y, (査読有), Cell Death Differ. 2015;22(1):145-55. DOI: 10.1038/cdd.2014.132.
- [学会発表](計0件)
- [図書](計0件)
- [産業財産権]
- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)
- [その他]
- なし

## 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)

岡山大学病院・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