

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592363

研究課題名(和文) 自家骨髄細胞・脂肪細胞による膀胱・尿道括約筋再生療法

研究課題名(英文) Tissue Engineering for lower urinary tract by autologous bone marrow stem cell and a dispose tissue

研究代表者

石塚 修 (ISHIZUKA, Osamu)

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：20184541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的な観点から考えると、膀胱の再生においては、膀胱頸部、つまり尿道括約筋部の再生が、尿失禁の予防には重要である。まず、われわれは、ラビットの大腿骨骨髄より注射針で骨髄由来幹細胞、もしくは、腹部より脂肪組織を採取して、その中の脂肪幹細胞を採取して、培養し増殖することを可能とした。その培養細胞を、障害を与えた尿道括約筋に移植し、尿道括約筋部の再生を免疫染色およびRT-PCR法にて組織学的に、また、機能的検査にて確認することができた。

研究成果の概要(英文)：From the clinical point of view, urethral sphincter reconstruction is important to prevent urinary incontinence in the field of bladder reconstruction. At first, we could culture and proliferate the bone-marrow-derived mesenchymal stem cells derived from the femur of rabbit and abdominal adipose tissue derived stem cells. The cultured stem cells were implanted into the injured urethral sphincter, and we could found the reconstruction of the urethral sphincter by histological methods (immunohistochemistry, RT-PCR method) and functional study.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：移植・再生医療 骨髄幹細胞 脂肪細胞 膀胱 尿道括約筋

## 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。また、皮下脂肪細胞においても同様な多分化能を持つことが報告されている。

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である。

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横紋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)

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

本研究は多分化能を有すると考えられる骨髄幹細胞および脂肪幹細胞を利用して、障害を受けた膀胱もしくは尿道括約筋に移植し、膀胱を器官として再生させる試みである。移植にあたっては自分自身の骨髄幹細胞もしくは脂肪幹細胞を採取して、培養増殖した上で移植することを主目的としており、拒絶反応を考慮する必要がなく、これまでに報告のない試みである。

また、われわれは、これまでにマウスおよびラビットを使用した骨髄幹細胞による膀胱および尿道括約筋の再生の可能性、および、よりよい再生を完成させるための組織学的な足場についての検証など、一連の研究を行い、その成果を広く公表してきた。

(2006 日本泌尿器科学会総会賞、2007

Lapidus 賞 Grand Prize,

Neurourol.Urodyn. 25: 562-563, 2006,

Cell Transplantation, 17:267-278,

2008, Tissue Eng., 15:3367-3375, 2009)

本研究は、これまでのわれわれの一連の研究の延長線上にあるものであり、特徴としては、

これまでの行ってきた骨髄細胞だけではなく、自己脂肪細胞にまで移植細胞としての可能性を広げることにより、実際の臨床応用の可能性を広げたこと、より臨床的な障害例として放射線による膀胱障害、下部尿路閉塞による二次的な膀胱障害を想定したこと、膀胱のみならず、尿道括約筋に対しての治療も考え、排尿全体としての機能回復を想定した点である。

## 3. 研究の方法

本研究は実験動物のラット、ラビットを使用して、研究協力者とともに、大まかな手順としては、以下の手順で進める予定である。

骨髄幹細胞もしくは脂肪細胞を実験動物の骨髄もしくは腹腔内脂肪組織より採取する。

培養された細胞の分化を、後にレーザー蛍光顕微鏡で確認するため、培養細胞にマーキングを行う。

コラーゲンコート培養皿で継代培養し、細胞シートを作製する。

膀胱・尿管・尿道に障害を受けた病態モデル動物に培養細胞を移植する。

障害を受けた臓器内で再生が行われたかをマーキングを目印としてレーザー蛍光顕微鏡で確認し、また、mRNAにても分化した組織を定量する。

再生された膀胱、尿管、尿道括約筋が機能的にも再生されたかを確認する。

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。

漿膜側より-80 のアイスバーで障害を受けた膀胱もしくは膀胱頸部(尿道括約筋部)へ、30G注射針を使用して膀胱壁に培養細胞  $1 \times 10^5$  個/50  $\square$  I を移植する。

移植後3日目、14日目に膀胱を取り出す。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の再生を観察する。また、14日目の膀胱においては、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、骨髄幹細胞の膀胱平滑筋への分化についての評価も定量的に行う。

14日目に膀胱を摘出しなかった別の移植ラット、ラビット群においては膀胱としての機能を覚醒下無拘束状態下での膀胱内圧検査を行い、膀胱としての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

これまでの自家骨髄幹細胞移植による膀胱再生研究では実験動物としてマウスを使用しており、ICR雄マウスの骨髄幹細胞を採取して、BALB/C nu/nu 雌 nude マウスに移植するという同種移植による実験手法であった。そのため、25年度は昨年度より引き続き、マウスよりも大型のラビットを使用して、同一個体での移植を試みた。

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。細胞を遠心分離した後に、Type collagen でコートした培養皿で7日間培養し増殖することが可能であった。

細胞のマーカーとして、GFP (Green fluorescence protein) 発現遺伝子よりも蛍光発現性の長い Qtracker labeling kits を使用して、マーキングした。膀胱頸部(尿道括約筋部)の再生に注目し、膀胱頸部を粘膜面より-80 のアイスバーで障害与え、その障害部位へ、30G注射針を使用して培養した細胞  $1 \times 10^5$  個/50  $\square$  I を移植した。

移植後3日目、14日目に膀胱を取り出し、

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頸部の再生を確認した。14日目の膀胱においては、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の膀胱平滑筋への分化についての評価を定量的に行うことも可能であった。

また、膀胱内圧検査による尿道機能評価においても機能回復を証明することが可能であった。

これらの実験手法をラビットの自己脂肪幹細胞においても実験を行い、同様に良好な結果を得ることが可能であった。

これら一連の研究は、原著論文としての公表および、多くの国際学会で発表し、高く評価された。

#### 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)

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. 査読有 2014 Mar 25 [Epub ahead of print].

Imamura, T., Ishizuka, O., Zhang, L., Hida, S., Sudha, G.S., Kato, H., Nishizawa, O.: Bone marrow-derived cells implanted into radiation-injured urinary bladders reconstruct functional bladder tissues in rats. Tissue Eng Part A. 査

読有 18(15-16): 1698-709, 2012.

Imamura, T., Ishizuka, O., Kinebuchi, Y., Kurizaki, Y., Nakayama, T., Ishikawa, M., Nishizawa, O.: Implantation of autologous bone marrow-derived cells reconstructs functional urethral sphincters in rabbits. Tissue Eng. Part A 査読有 2011 Apr; 17(7-8): 1069-81.

[学会発表](計3件)

Sudha, G., Imamura, T., Ishizuka, O., Zhang, L., Noguchi, W., Yamagishi, T., Yokoyama, H., Kurizaki, Y., Nishizawa, O., Andersson, K.E.: The implantation of autologous adipose-derived cells makes the functional regeneration of frozen-injured rabbit urethra. 33th congress of the Societe Internationale d'Urologie. Vancouver, 2013/9/8-12. (Urology 82(9) suppl, S96, 2013). (presented by O.Ishizuka)

Imamura, T., Ishizuka, O., Kurizaki, Y., Yokoyama, H., Noguchi, W., Yamagishi, T., Zhang, L., Kato, H., Nishizawa, O.: Implantation of Bone Marrow-derived cells recovers tissue structures and functions of radiation-injured urinary bladders in rats. 2012 annual meeting of American Urological Association. Atlanta, 2012/5/19-23.

Imamura, T., Ishizuka, O., Kurizaki, Y., Ishikawa, M., Noguchi, A., Zhang, L., Ichino, M., Kato, H., Nishizawa, O.: Implantation of autologous bone marrow-derived cells recovers

urethral sphincter in rabbits. The 41<sup>th</sup>  
Annual Meeting of the International  
Continence Society. Glasgow,  
2011/8/29-9/2.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石塚 修 (ISHIZUKA, Osamu)

信州大学・医学部・准教授

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・講師

研究者番号：0 0 4 6 7 1 4 3