

図3. GAX コラーゲン注入 49 日、56 日目

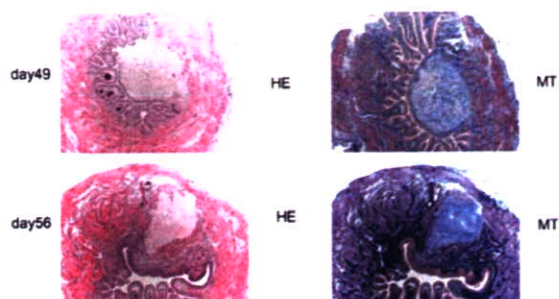
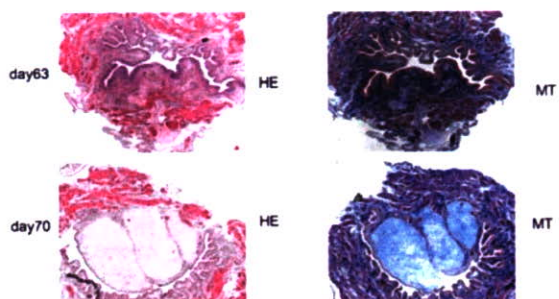


図4. GAX コラーゲン注入 63 日、70 日目



他方、GAX-collagen 塊と周囲組織の境界は明瞭であり、塊内への細胞浸潤も無く、独立した構造物として存在していた(図5・6)。

図5. 注入部位周辺組織。

(炎症所見は認められなかった)

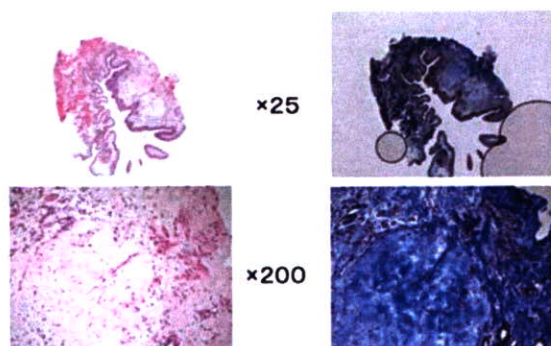
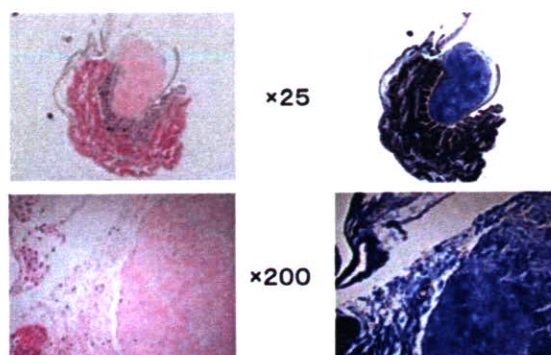


図6. 注入部位周辺組織。(細胞浸潤を中心とした炎症所見は認められなかった)



(2) 低血清培養脂肪由来間葉系細胞は VEGF 分泌能が高いことが示唆される結果であった(図7)。

細胞数 pg/10 細胞数

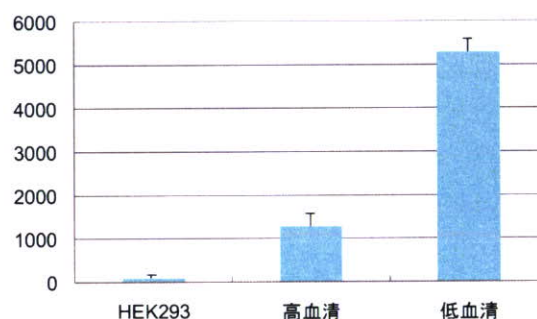


図7. VEGF 分泌能の比較

D. 考察

(1) 27G 針を用いた移植法を用いると、GAX-collagen が長期間注入部位に HE・MT 染色で特異的な構造物として残存することが判明した。今回の実験では、GAX-collagen がどの程度の量残存するか不明であったため、注入する量を多めに設定したこともあり、長期間残存するという結果となった。ただし、ヒトに用いられる使用量をラットに適用すると、約 10 μ l となり、その場合には残存する期間も今回の実験よりはかなり短くなる可能性もあると考えられた。今後は膀胱頸部に 10 μ l の GAX-collagen を注入して day14・

28 で組織を検討する必要があると考えた。

(2) 低血清培養脂肪由来間葉系細胞は、より多く VEGF を分泌し血管新生を促進することが予想され、組織の再生に能動的に関与する可能性があると考えられた。

3. その他

なし

E. 結論

尿失禁に対する細胞治療に向けて、既に臨床で使用されている GAX-collagen (バードコンティジェン®) のラット膀胱における残存と周囲組織への影響を検討した。その結果、27G 針を用いた確実な注入方法を確立した。GAX-collagen は Day70 まで残存した。今後は GAX-collagen 注入量を調節して、どの程度の脂肪由来間葉系細胞を注入するとよいか検討していきたい。また、低血清培養脂肪由来間葉系細胞は、VEGF の分泌により血管新生を促進し、組織の再生に関与する可能性があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有する細胞製剤

発明者：尾崎武徳、安田香、丸山彰一、山本徳則、後藤百万、松尾清一、北川泰雄

特許願人 名古屋大学

出願日：平成 18 年 8 月 9 日(日本特許 特願 2006-216234)

(国際特許 PCT/JP2007/065431)

2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

高齢者腹圧性尿失禁に対する新規治療法の開発：括約筋機能再生治療：

失禁モデル作成と細胞移植法の確立

分担研究者 山本徳則 名古屋大学大学院医学系研究科病態外科学講座泌尿器科学 講師

研究要旨

信州大学の西澤らはマウス凍結障害モデルを作成し、その傷害を与えた部位へ培養によって増殖させた骨髄由来幹細胞を移植すると、2週間後には移植部位で骨髄由来幹細胞が平滑筋へ分化することを発見した。そこでわれわれは同様な方法を用いて膀胱頸部に低血清培養の脂肪由来間葉系細胞を注入することにより、腹圧性尿失禁に対する治療が可能ではないかと考えた。単純に臓器に細胞を注入しても幹細胞の分化は期待出来ず、分化誘導をかけてから移入するか、あるいは再生機転のある状況に移入する必要があると考えられる。そこで、脂肪由来間葉系細胞移植の効果を確認するため、より容易な動物モデルを構築することを考え、ラットを用いた凍結障害モデルを作成して動物実験を行った。このモデルを用いて膀胱に脂肪由来幹細胞を注入したが、時間と共に細胞数の減少傾向を認めたためさらなる条件の検討が必要と考えられた。また、膀胱頸部への脂肪由来幹細胞注入の生理学的評価系としてラット神経切断尿失禁モデルを確立した。細胞注入時のレシピエント側のさらなる条件の検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

女性尿失禁診療ガイドラインによれば、尿失禁は QOL 疾患であり、治療の必要性が患者自身の個性や価値観により大きく左右されることから、各治療法の有効性・副作用・侵襲性さらに経済性に加え、患者自身の希望を考慮して治療法を選択することが必要と述べられている。女性尿失禁に対しては種々の治療法があるものの、難治性症例においては細胞治療の可能性が期待されている。信州大学の西澤らはマウス凍結障害モデル（マウス膀胱平滑筋を凍結障害によって破壊）を作成し、その傷害を与えた部位へ培養によって増殖させた骨髄由来幹細胞を移植後、day14で膀胱組織の免疫二重染色・リアルタイムPCRによる平滑筋特異的遺伝子発現量の測定を行い、移植部位での骨髄由来幹細胞の平滑筋への分化を確認したと報告している。わ

れわれは低血清培養の脂肪由来間葉系細胞に注目し、その性状・増殖速度・サイトカイン分泌能・分化などに関する基礎的な研究を行ってきた。また、脂肪由来間葉系細胞が分泌するサイトカインの作用について *in vitro* と *in vivo* において皮膚欠損モデルによる創傷治癒実験を行っているが、高血清培養に比して低血清培養条件では有意にその細胞が HGF を多く分泌にしていることを両方で明らかにしている（特許出願）。そこで、われわれは腹圧性尿失禁に対して抵抗となる膨隆形成に加えて、サイトカイン低血清培養の脂肪由来間葉系細胞の使用が有効なのではないかと考えた。単純に臓器に細胞を注入しても分化は期待出来ず、分化誘導をかけてから移入するか再生機転のある状況に移入する必要があると考えられる。この分担研究では、より容易な動物実験系を構築するために、

ラットを用いた結障害モデルの作成と除神経尿失禁モデルを作成した。

B. 研究方法

(1)尿失禁モデルの作成

F344♀9W ラットをウレタンで麻酔後、背部を切開・脊髄を露出し、Th8~9 レベルで切断した。次いで下腹部を縦切開し、膀胱を露出後、膀胱頂部に小切開を加えて圧測定用チューブを挿入し、膀胱に固定した。その後チューブを測定器と接続し、膀胱内圧を測定した。測定後、1度チューブを測定器と離断し、顕微鏡下で両側骨盤神経を切除。再度チューブを測定器と接続し、膀胱内圧を測定した。

(2)細胞移植の確立

(a)マウス凍傷モデルへの骨髄細胞注入

信州大西澤らの報告によれば、マウス凍結傷害は5週齢雌ヌードマウスの膀胱後壁にドライアイスで冷却した金属棒を30秒当てて作成するとあり、まずは骨髄細胞を用いて(a)透過電顕(TEM)と(b)走査電顕(SEM)レベルの検討を行った。

(b)ラット凍傷モデルへの脂肪由来幹細胞注入

F344 ラットで凍結の時間を変えて安定した障害モデルを作製した。また、臨床で間葉系細胞を培養する方法として、低血清培養を用いた。低血清培地として DMEM 粉末、MCDB201、L-glutamin、NaHCO₃、Ascorbic acid、H₂O、LA-BSA、ITS、FBS (2%)、FGF-2、培養皿として Fibronectin-coated dish を使用した。7週齢 F344♂ラットで細胞を採取し、経代培養した脂肪組織由来幹細胞を PKH26 で染色して DMEM で 3x10⁶ 個/50 μl に伸展して、7週齢 F344♀ラット凍結傷害作成3日後に凍結傷害を与えた膀胱組織部位に 29G マイクロシリンジにて注入移植した。なお、対照群として DMEM のみを傷害部位に同量

注入した。移植2週間後に膀胱組織を摘出し、細胞膜の脂質部位が染色される PKH26 と平滑筋が染色される SMA 抗体との2重染色 (FITC で標識) を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験については、名古屋大学医学部動物実験施設における規定に準じて行った。

C. 研究結果

(1)尿失禁モデルの作成

脊髄の切断時の出血が多いとラットが弱って膀胱内圧に影響する可能性があり、止血は慎重に行った。切断の確認は、基本的には肉眼で行った。念のために、圧測定・sacrifice後に脊髄を完全に露出して切断を確認した。圧測定前に、膀胱頸部の捻転が無いこと・チューブ先端が膀胱壁に当たっていないこと・水の入ったシリンジを 40cmH₂O くらいまでゆっくり上げて、尿道口から水が漏れることを確認した (図1)。

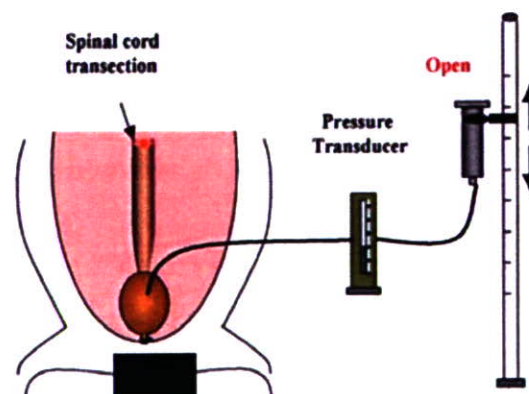


図1. 神経切断尿失禁ラットモデルの Leak Point Pressure の測定

(2)マウス凍傷モデルの膀胱に骨髄細胞注入

ドライアイスで5分冷却したメスの柄で30秒間冷却、膀胱内の尿は半分ほど排出すると、適当な凍結障害が作成出来ることが判明した。

(a)透過電顕所見

図2の正常組織では、密な平滑筋層が存在している（上段）。凍結傷害を与えるとその密な平滑筋層が破壊され、所々小さなスペースが形成される（中央）。傷害を与えて3日経過すると、傷害によって形成されたスペースが大きくなると同時に、その数が増加する（下段）。骨髄細胞を正常組織に移植したとき、ほとんど移植細胞は生着しない。しかし、傷害を受けた組織に移植すると、移植細胞はかなり高い効率で生着した。

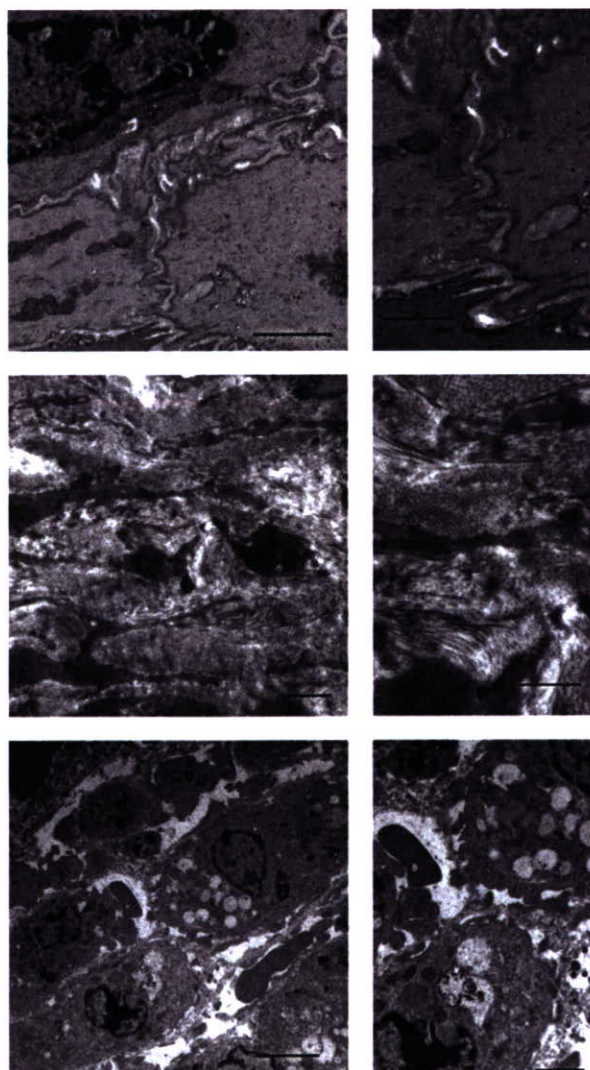


図2. 膀胱凍傷モデルの透過電顕所見
上：正常組織
中央：傷害を与えた直後（20分後）
下：傷害を与えて3日後（移植直前）

(b)走査電顕所見

図3の正常組織での平滑筋細胞は、明瞭な細胞間結合によって結合しているが、傷害を与えると、その結合が破壊され、同時に細胞自体も破壊されている。傷害を与えて3日経過すると、破壊を回避した（生存した）平滑筋細胞も認められるが、正常組織で確認された細胞間結合はほとんど存在しない。

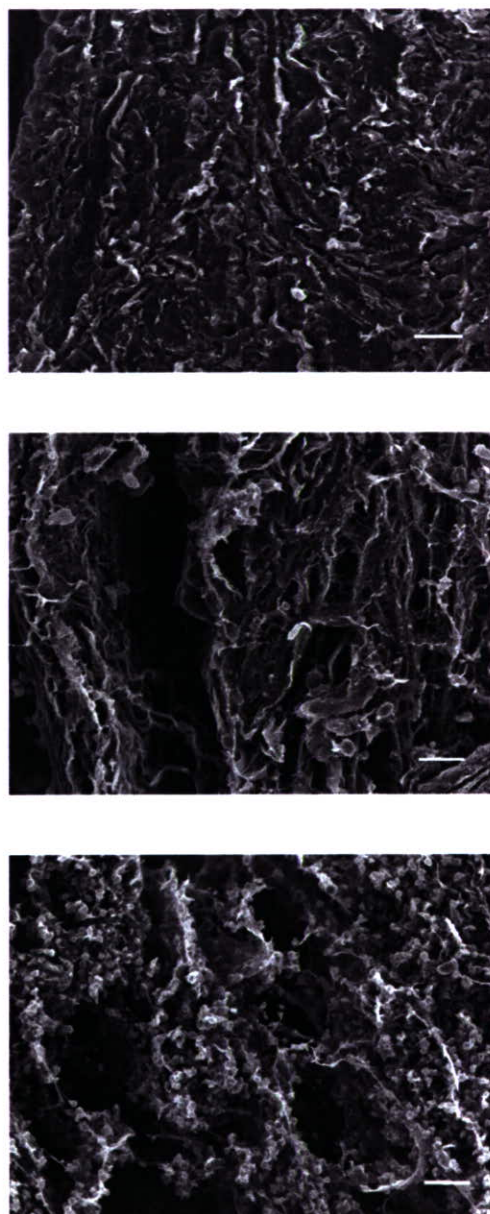


図3. 膀胱凍傷モデルの走査電顕所見
上：正常組織
中央：傷害を与えた直後（20分後）
下：傷害を与えて3日後（移植直前）

(2)ラット凍傷モデルへの脂肪由来幹細胞注入

マウスと同様の方法では F344 ラットで凍結障害モデルは作成できず、下記の方法でラットにおける適切な凍傷モデルが出来ることを明らかにした。

- ①ドライアイスで5分冷却したメスの柄で30秒間冷却、膀胱内の尿は排出しない
- ②ドライアイスで5分冷却したメスの柄で30秒間冷却、膀胱内の尿は全て排出する
- ③ドライアイスで5分冷却したメスの柄で30秒間冷却、膀胱内の尿は半分ほど排出する

(a)培養脂肪由来幹細胞の染色

注入する細胞は、PKH26 抗体で染色され(図4 上段)、1 継代培養すると増殖することを確認した(図4 下段)。これらから、細胞を PKH26 で染色しても細胞に致命的な障害は与えないであろうと予測された。

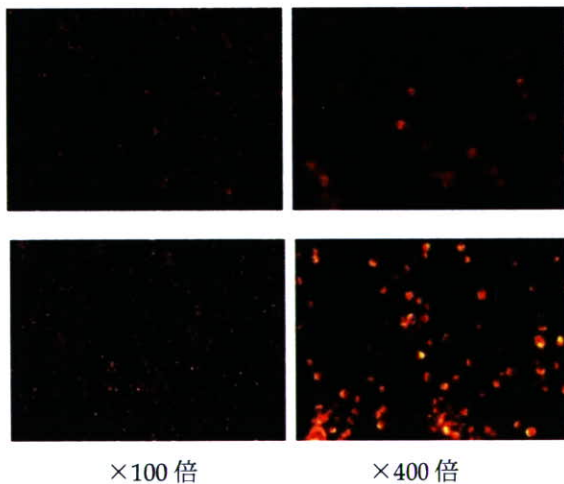


図4. PKH26 抗体染色された培養脂肪由来幹細胞と継代培養の細胞所見

(b) 膀胱凍傷モデルへの脂肪由来幹細胞注入凍結障害細胞治療群 day14 において、単核球と思われる細胞の浸潤が認められた(図5)

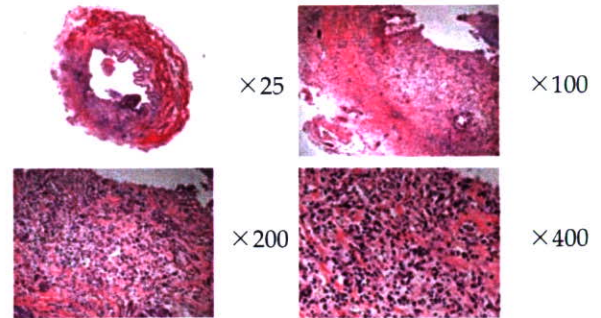


図5. 凍傷モデルへの細胞注入 14 日目

図6は SMA 抗体で二重染色したもので、細胞はわずかに存在を確認できたが、筋細胞への分化は確認出来なかった。

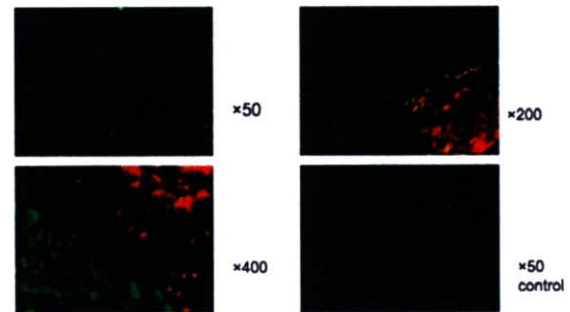


図6. 赤：PKH26 陽性細胞、緑：SMA 陽性細胞

ここで、近交系ラットを使用しているために拒絶が起きた可能性を考え、Fisher の Nude Rat に実験動物を変更し、移入する脂肪由来間葉系細胞を SD の GFPTg Rat から採取し同様の実験を行った。Nude Rat の膀胱の構造は F344 ラットと大きな差異はなかった(図7)。

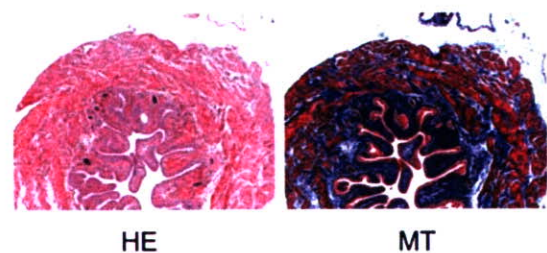


図7. ラット膀胱病理組織

移入した細胞は緑に蛍光していることを確認した（図8）。

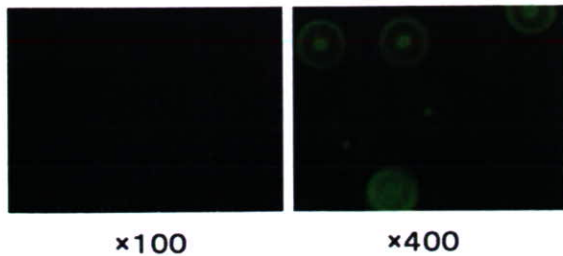


図8 培養移植細胞が緑に発色

しかし、細胞移入群において GFP 陽性細胞を確認出来なかった。凍結保存した組織を薄切して染色前に確認したところ、GFP 陽性部位はあるが細胞形態は確認できなかった。

D. 考察

（1）傷害を与えて3日経過すると、破壊を回避した（生存した）平滑筋細胞も認められるが、正常組織で確認された細胞間結合はほとんど存在しない。いったん凍傷により組織がほどよく壊れることがそのものによって足場が形成され再生に有利な環境になると考察した。

（2）動物によって凍結傷害の程度に差があることが判明した。細胞の分化のみを見るのであれば、観察範囲の少なさ・凍結傷害の安定度からは実験動物はラットよりはマウスが良いと考えられた。

（3）細胞を PKH26 で染色しても細胞に致命的な障害は与えないであろうと予測された。

（4）細胞移入群で GFP が確認出来なかった理由として、組織の固定の問題・細胞の拒絶の可能性・細胞移入時の注射針通過時の物理的傷害の可能性などが考えられた。

E. 結論

細胞治療の評価に適したラット神経切断尿失禁モデルを確立した。以前に報告にあっ

た凍傷マウスモデルに骨髄細胞を注入して、筋細胞への分化に成功した。同様の方法を用いて凍傷ラットモデルへ注入したが細胞が時間と共に減少し、さらなる条件の検討が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有する細胞製剤

発明者：尾崎武徳、安田香、丸山彰一、山本徳則、後藤百万、松尾清一、北川泰雄
特許願人 名古屋大学

出願日：平成18年8月9日(日本特許 特願 2006-216234)

(国際特許 PCT/JP2007/065431)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

高齢者腹圧性尿失禁に対する括約筋機能再生治療：培養・移植系の有効性・安全性総合評価

分担研究者 松尾清一 名古屋大学大学院医学系研究科

病態内科講座免疫応答内科学泌尿器科学 教授

研究要旨

我々は低血清培養の脂肪由来間葉系細胞に注目し、その性状・増殖速度・サイトカイン分泌能・分化などに関する基礎的な研究を行ってきた。泌尿器科領域において女性腹圧性尿失禁に対する筋芽細胞による細胞治療が試みられており、女性腹圧性尿失禁に対して低血清培養の脂肪由来間葉系細胞を用いた治療の可能性を想起した。ラット膀胱頸部に脂肪由来間葉系細胞を移入することにより尿道閉鎖圧の上昇を期待する実験を行うにあたって、移入する細胞の調整方法・デリバリー方法と、ラットでの膀胱内圧測定方法について検討した。細胞移入基礎実験の結果からは、この細胞は腫瘍性に増殖する性状はなく、安全であると考えられた。また、脂肪由来間葉系細胞をラットの膀胱頸部へ注入する方法の確立に向けての基礎実験を行った。細胞はフィルターを通してもその数はさほど減少せず、通さなくても細胞外基質の混入は有意でなく、培養皿にコーティングしてある Fibronectin の混入も無いことより、今後の細胞の処理・デリバリーは通常の細胞処理をして、100 μ m のフィルターを通さずに 29G より太い注射針で組織内へ注入すれば良いと考える。この方法を用いて尿失禁モデルに細胞を注入したところ、14 日目で尿道閉鎖の程度を示す leak point pressure が有意に上昇し、その有用性を確認した。今後は、これらを尿失禁モデルに対して、細胞注入部位、評価期間を長期検討項目として細胞治療実験に用いて行く予定である。

A. 研究目的

我々は、低血清培養の脂肪由来間葉系細胞に注目し、その性状・増殖速度・サイトカイン分泌能・分化などに関する基礎的な研究を行ってきた。また、細胞が分泌するサイトカインの作用を確認するため様々な動物実験（皮膚欠損モデルによる創傷治癒実験・急性腎不全モデルに対する細胞治療など）を行っている。一方、泌尿器科領域において、腹圧性尿失禁に対する細胞治療について種々の研究が行われている。2004 年、インスブルック大学グループは上腕筋肉を生検して筋芽細胞

を培養し、尿道横紋筋内へ注入することにより 20 例中 16 例で完全な尿禁制が得られたと報告している。筋芽細胞から放出される HGF のような成長因子が括約作用に寄与している可能性も指摘された。また、2005 年、ピッツバーグ大学・トロント大学共同研究で、女性腹圧性尿失禁患者 7 例より針生検で 42～247mg の筋組織を採取して筋芽細胞を培養し、4 週後に 18～22 \times 10⁶ 個の自家筋芽細胞を尿道横紋筋内へ注入したところ、7 例中 4 例でほぼ尿禁制が得られたと報告している。そこで我々は腹圧性尿失禁に対する低血清培

養の脂肪由来間葉系細胞を用いた治療の可能性を想起した。つまり、ラット膀胱頸部に脂肪由来間葉系細胞を移入することにより、脂肪への分化による mass volume の増大による尿道内腔の狭小化・サイトカイン分泌による尿道括約筋の収縮能の上昇や筋組織の増大などによる膀胱内圧の上昇が生じるという仮説を立てた。本実験に先駆けて、①細胞が確実に移入できているかどうかの確認と、②膀胱内圧測定系の確立が必要と考えた。

B. 研究方法

(1) 細胞移入基礎実験

- a. 10cm Fibronectin coated dish 10 枚をトリプシン処理・血清で中和・遠心して(いつもの細胞回収の方法)沈殿物の有無を確認した。
- b. 細胞を回収する際に、細胞外基質を除く目的で 100 μ m のフィルターを通すことで違いが出るかどうか確認した。フィルターを通した細胞と通さなかった細胞を各々ラットの膀胱頸部に注入して day 1 で sacrifice して組織を HE・MT 染色で評価した。
- c. 細胞を培養皿から回収したそのペレットを注射針 (27G・29G) に 1 回通した後、再び培養した。
- d. 7 週齢 F344 σ ラットソケイ部の皮下より脂肪を採取し、メスにて細断し、1mg/ml のコラゲナーゼ type I を加えて 37 $^{\circ}$ C、60 分間震盪した。処理溶液を孔径が 100 μ m のメッシュで濾過し、コラゲナーゼ消化されていない組織片を取り除いた。室温で 5 分間、1200rpm の遠心で細胞懸濁液を遠心することで、沈殿する細胞分画を得た。それを低血清培養 (DMEM/MCDB201 + 2%FBS + 10ng/ml FGF-2) で経代して細胞を回収・DMEM で 3×10^6 個 / 20 μ l に伸展して、7 週齢 F344 σ ラットの膀胱頸部に

27G マイクロシリンジにて注入移植して、day14・28 で組織学的評価を行った。

(2) 膀胱内圧測定手技とその有用性の確認
F344 σ 9W ラットをウレタンで麻酔後、背部を切開・脊髄を露出し、Th8~9 レベルで切断した。次いで下腹部を縦切開し、膀胱を露出後、膀胱頂部に小切開を加えて圧測定用チューブを挿入し、膀胱に固定した。その後チューブを測定器と接続し、膀胱内圧を測定した。測定後、1 度チューブを測定器と離断し、顕微鏡下で両側骨盤神経を切除。再度チューブを測定器と接続し、膀胱内圧を測定した。その有用性を確認するために脂肪由来幹細胞を 27G 針でこのモデルの膀胱頸部に注入した。

(倫理面への配慮)

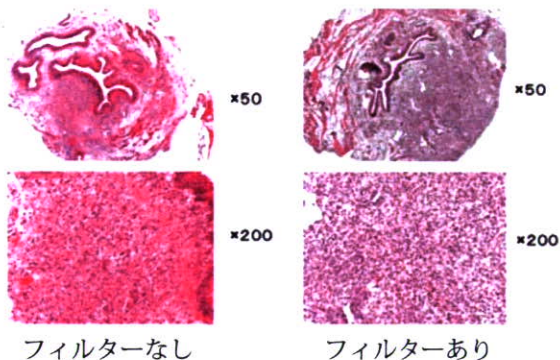
動物実験については、名古屋大学医学部動物実験施設における規定に準じて行った。

C. 研究結果

(1) 細胞移入基礎実験

- a. 注入する細胞のペレットへの細胞培養用の Fibronectin (培養皿をコーティングしている) の混入の有無を確認したが、その可能性はほぼ認められなかった。
- b. 細胞を培養皿から回収する際に細胞外基質のような物質が細胞のペレットに混入して mass volume に関与している可能性を検討したが、細胞外基質の影響は認められなかった。
- c. 細胞を移入する際の注射針の径が細胞に与える影響(細い針だと細胞が傷害されるか)についても検討するため、29G・27G 針を一度フィルターを通した細胞と通さない細胞を経代してみたが、通常の増殖速度で培養可能・形態的(図1)にも変化は認めなかった。

図1. フィルター用いない場合と用いた場合の細胞培養の比較



d. 異常に増殖した細胞集塊は認めなかったが、移入した細胞に標識を付けなかったため、細胞の同定は未施行である(図 2a, b)。

図 2a. 細胞注入後 14 日目
異常に増殖した細胞集塊は認めなかった

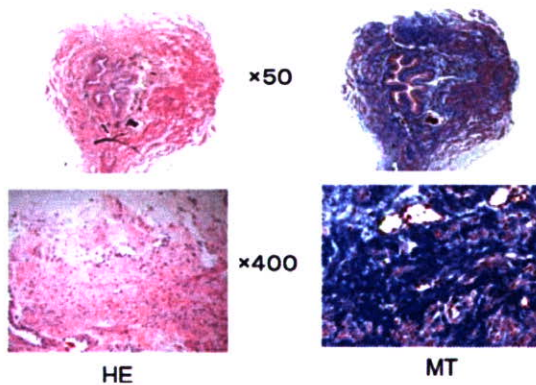
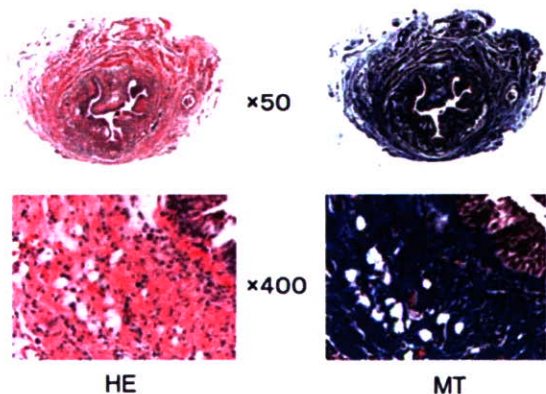


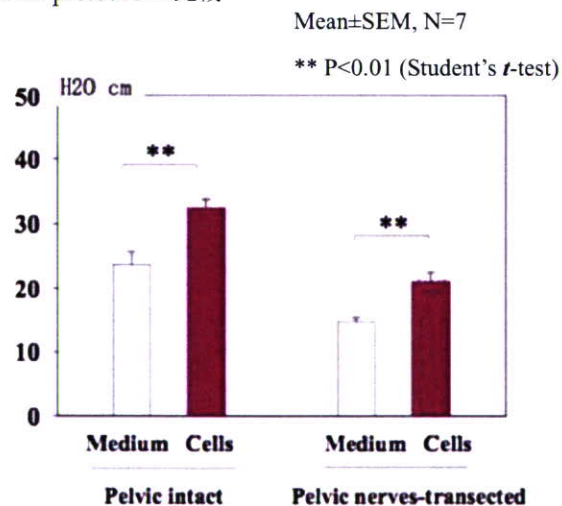
図 2b. 細胞注入後 28 日目
異常に増殖した細胞集塊は認めなかった



(2) 膀胱内圧測定系の確立

脊髄の切断時の出血が多いとラットが弱って膀胱内圧に影響する可能性があり、止血は慎重に行った。切断の確認は、基本的には肉眼で行った。念のために、圧測定・sacrifice後に脊髄を完全に露出して切断を確認した。圧測定前に、膀胱頸部の捻転が無いこと・チューブ先端が膀胱壁に当たっていないこと・水のいったシリンジを 40cmH₂O くらいまでゆっくり上げて、尿道口から水が漏れることを確認した。このモデルを用いて脂肪由来幹細胞を膀胱頸部に注入すると 14 日目で見明らかに leak point pressure がコントロール群に比して細胞注入群が明らかに高いすなわち尿道内圧が高く、その有用性を確認した。

図 3. 細胞注入群とコントロール群における leak point pressure の比較



D. 考察

細胞移入基礎実験の結果より、少なくともこの細胞は腫瘍性に増殖する性格は有していないと考えた。また、脂肪由来間葉系細胞をラットの膀胱頸部へ注入する方法の確立に向けての基礎実験を行った。細胞はフィルターを通してその数はさほど減少せず、通さなくても細胞外基質の混入は有意でなく、培養皿のコーティングの Fibronectin の混入も無いことより、今後の細胞の処理・デリバリー

は通常の細胞の処理をして 100 μ m のフィルターを通さずに 29G より太い注射針で組織内へ注入すれば良いと考える。この方法を用いて尿失禁モデルに細胞を注入したところ、leak point pressure が上昇にその有用性を確認した。

E. 結論

今回の実験で、膀胱頸部に注入した脂肪間細胞に腫瘍性増殖所見がなく安全であることを確認した。また、注射針による細胞の致命的な傷害が無いことを明らかにし、尿失禁モデルに実際注入し leak point pressure の上昇を認め有用性を確認した。また、今後実験に用いる予定であるラットでの膀胱内圧測定の手技を確立した。今後は、これらを細胞治療実験に用いる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有する細胞製剤

発明者 尾崎武徳、安田香、丸山彰一、山本徳則、後藤百万、松尾清一、北川泰雄

特許願人 名古屋大学

出願日 平成 18 年 8 月 9 日

(日本特許 特願 2006-216234)

(国際特許 PCT/JP2007/065431)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

高齢者腹圧性尿失禁に対する括約筋機能再生治療：

脂肪細胞の培養と幹細胞化の安全性に関する検討

分担研究者 丸山彰一 名古屋大学大学院医学系研究科

病態内科講座免疫応答内科学泌尿器科学 講師

研究要旨

オーストリアにおいては女性腹圧性尿失禁に対する筋芽細胞を用いた細胞治療が報告されている。一方、名古屋大学農学部の北川らは bFGF とマトリジェルを用いた脂肪組織由来幹細胞移入手技により皮下に脂肪組織が形成されたと報告している。そこでわれわれは、膀胱頸部（尿道）に脂肪由来間葉系細胞を移植することにより脂肪または筋組織に分化した「抵抗となる膨隆部」が形成されるという仮説のもとに、ラット膀胱への脂肪由来間葉系細胞移入実験を行った。その他、細胞の安全性・臨床での脂肪採取の方法等についても検討した。結果として、移入した細胞は時間とともに消失していくことが判明した。細胞生着・増殖のための足場としてゼラチンスポンジ・bFGF を混合したが、顕著な有効性は示されなかった。細胞の腫瘍性増殖は認めず、安全な細胞と考えた。今後はより長期に渡って細胞が組織に生着する方法を検討し、脂肪あるいは筋細胞への分化についても検討していきたい。

A. 研究目的

名古屋大学農学部の北川らは、bFGF とマトリジェルを用いた移入手技により皮下に脂肪組織が形成されたと報告した。これは、足場と細胞増殖因子の供給により、幹細胞がそこに生着し、増殖・分化するという可能性を示唆するものである。

細胞を移植する際、その増殖を促すために、足場 scaffold の供給が有用であるとの報告は他にもなされている。すなわち、足場 (scaffold) が存在することにより、そこに細胞が生着し・血管が入り込みやすくなることが示唆されている。

泌尿器科領域における罹患率の高い疾患として女性腹圧性尿失禁がある。薬物治療、理学療法、スリング手術などの外科的治療、コラーゲン傍尿道注入療法など、種々の治療が行われているが、高齢者に対しては、より有

効でかつ侵襲の低い治療法の開発が望まれている。

われわれは低血清培養の脂肪由来間葉系細胞に注目し、その性状・増殖速度・サイトカイン分泌能・分化などについて基礎的な研究を行ってきた。また、細胞が分泌するサイトカインの作用に関する様々な動物実験を行っており、*in vitro* の実験において脂肪由来間葉系細胞に分化誘導を行うことにより、脂肪細胞へ分化することを確認した。また、筋細胞への分化の可能性も考えている。

他方、腎臓への細胞治療（再生）実験は、その構造の複雑さから、組織の再生は現在のところ困難である。また、幹細胞（前駆細胞）をそのまま組織へ移植しても分化を期待することは難しい。

そこでわれわれは、膀胱頸部（尿道）に脂肪由来間葉系細胞を移植することにより脂肪

または筋細胞の「抵抗となる膨隆部」が形成されるといふ仮説をたてて実験を行った。

B. 研究方法

(1) ラット膀胱頸部に脂肪由来間葉系細胞を移入すると、①脂肪の塊が出来て、LPP (Leak Point Pressure) が上昇し、尿禁制が得られる、②脂肪由来間葉系細胞が cytokine を放出し膀胱・尿道括約筋作用に寄与するという仮説にもとづいて、実験方法を構築した。まず、膀胱組織に脂肪由来間葉系細胞を移入して塊が出来るかどうかの検証を行った。単に脂肪由来間葉系細胞を膀胱組織内に注入しても、細胞の生着、分化もしくはサイトカイン分泌の確認は難しいと考えられたため、足場 scaffold としてゼラチンスポンジ (スポンゼル®) を用いた。

a. F344♀ラットの実験

細胞はゼラチンスポンジと bFGF で調整し、F344♀7W ラット膀胱に 29G 針をつけた注射器で注入した。Day14 で sacrifice して組織 rat collagen type I 抗体染色を行った。

b. ヌードラットの実験

細胞の調整・移入方法は(a)と同様で、ヌードラット♀膀胱にヒト脂肪由来間葉系細胞 hLASCs 1×10^7 個と、PBS で膨潤後破碎したゼラチンスポンジ+bFGF4 μ g (合計 100 μ l) を移入した。Day14、28 で sacrifice して組織を HE, MT, Lamin A/C, Collagen type I 抗体で染色した。

(2) 低血清培養ヒト脂肪由来間葉系細胞をもちいた実験

- 低血清培養ヒト脂肪由来間葉系細胞を経代してその増殖能を day70 まで観察した。
- 低血清培養ヒト脂肪由来間葉系細胞をヌードラットの腎皮膜下へ 29G 注射器で注

入した。day28 の組織を Human specific antigen (LaminA/C) 染色した。

(倫理面への配慮)

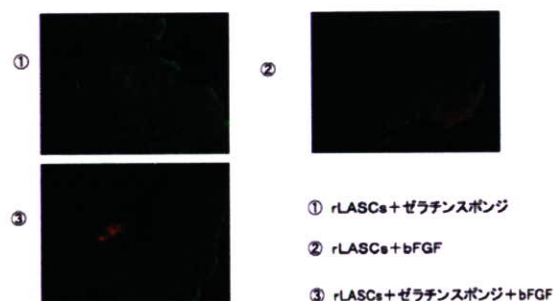
動物実験については、名古屋大学医学部動物実験施設における規定に準じて行った。

C. 研究結果

(1)

- day14 で細胞は残存していた (図1)。この F344 ラットによる細胞移入実験では、細胞の確実な生存の確認が困難であり、コラーゲン染色を行っても、細胞が産生したかどうか判別は出来なかった。

図 1. F344♀7W ラット膀胱に細胞注入後 14 日組織 rat collagen type I 抗体染色で細胞は残存していた



- day14 (図 2・3)・day28 (図 4・5) ともに、細胞は生着して残存していたが、その数は時間とともに減少していた。

図 2. ヌードラット♀膀胱にヒト脂肪由来間葉系細胞 + PBS で膨潤後破碎したゼラチンスポンジ + bFGF を移入した 14 日組織で細胞は残存していた

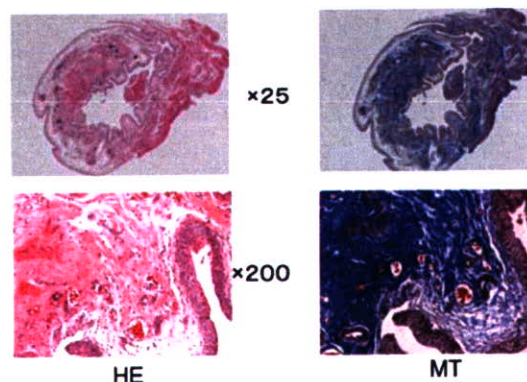


図 3. 図 2 同部位をヒト由来のラミニンとコラーゲンで染色しどちらも陽性であった

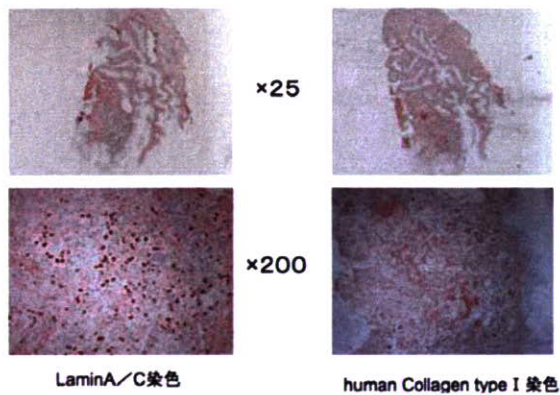


図 4. 同条件で 28 日目細胞は残存していた

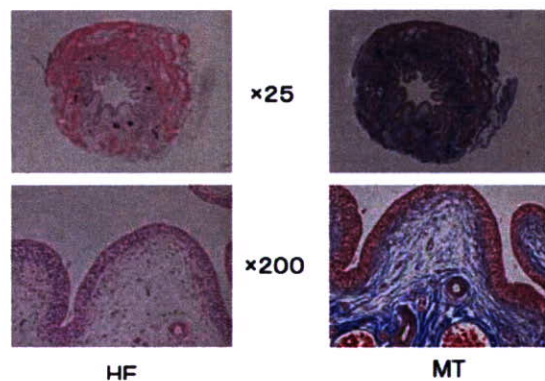
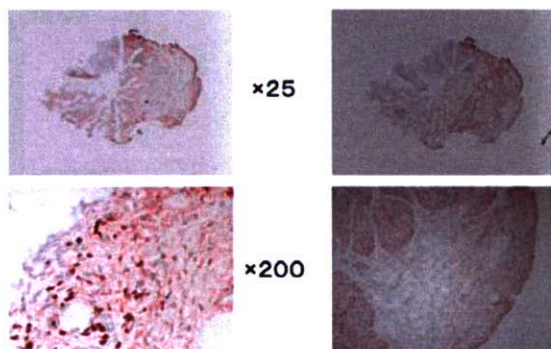
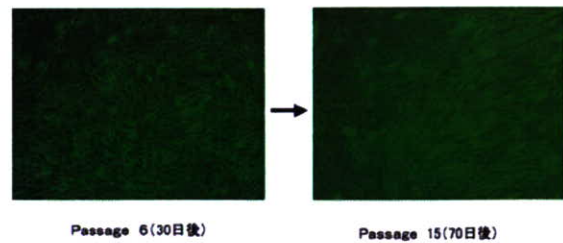


図 5. 図 4 同部をヒト由来のラミニンとコラーゲンで染色しどちらも陽性であった



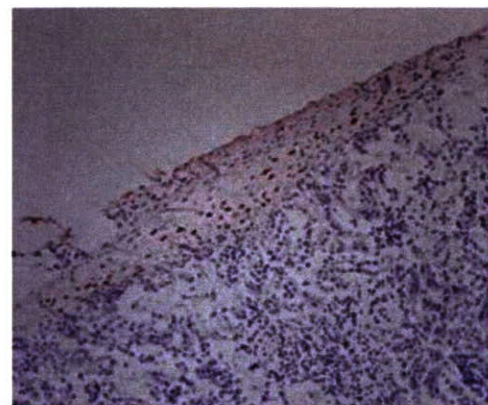
a. 徐々に細胞増殖速度は減少した。腫瘍性増殖は認めなかった。また、形態的には経代を重ねると線維芽細胞様に変化していくようであった (図 6)。

図 6. 形態的には経代を重ねると線維芽細胞様に変化する



b. 脂肪由来幹細胞は 1 ヶ月後も残存し、腫瘍の所見はなかった (図 7)。

図 7. 脂肪由来幹細胞は 1 ヶ月後残存、腫瘍の所見はなかった



D. 考察

ラット膀胱への脂肪由来間葉系細胞移入実験において、細胞は時間とともに消失していくことが判明した。細胞生着・増殖のために足場としてゼラチンスポンジ・bFGF を混合したが、顕著な有効性は認められなかった。細胞の投与数・ゼラチンスポンジの投与量・破碎の程度・bFGF の投与量などの変更の余地はあると考えられる。また、足場を変更の必要性も考慮された。

その他、実際の臨床で細胞治療を行うために必要な基本的な検証を行った。

脂肪の採取部位と採取方法について

ヒト細胞の場合、脂肪採取部位としては①皮下②腎周囲③骨盤腔が選択肢として挙げられる。脂肪から間葉系細胞を確実に得るため

に必要な最低限の量は 3g であり、5g あればまず確実と考える。腎周囲・骨盤腔においては、5g 程度の脂肪を採取しても dead space は出来にくい、なるべく 2 箇所以上から採取するのが望ましいと考える。皮下の場合、1 箇所では採取した場合、皮膚がひきつれて美容的に問題になる場合もあるので、出来れば 1 塊として採取せず 1 切開でも 2~4 箇所から採取するのが望ましいと考えた。

(日本特許 特願 2006-216234)
(国際特許 PCT/JP2007/065431)

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

細胞培養について

細胞培養はクリーンベンチで行っており、培養液には抗生物質を加えている。また、培養後凍結保存した細胞を解凍した 5 検体をマイコプラズマ検査したところ、いずれもマイコプラズマ陰性であった。

E. 結論

ラット膀胱への低血清培養脂肪由来間葉系細胞移入実験を行った。移入した細胞数は時間とともに減少し、「コブ」状の構造物の形成は認められなかった。今後はより長期に渡って細胞が組織に細胞が生着する方法を検討していきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有する細胞製剤

発明者 尾崎武徳、安田香、丸山彰一、山本徳則、後藤百万、松尾清一、北川泰雄

特許願人 名古屋大学

出願日平成 18 年 8 月 9 日

研究要旨

前立腺全摘出手術時に摘出した腹直筋あるいは錐体筋より、筋幹細胞を分離し、培養による増幅を試みた。その結果、高齢者骨格筋から再現性よく筋細胞のみを分離・増殖させることに成功した。また、筋組織の消化過程において、従来用いてきた動物由来タンパク質分解酵素を、より安全性の高い組み換えタンパク質分解酵素に代替できることが明らかになった。

A. 研究目的

自己骨格筋幹細胞を標的とした腹圧性尿失禁に対する新規治療法を開発するため、ヒト骨格筋から筋幹細胞を分離・培養する条件を確立する。本分担研究は、(1) 自己骨格筋細胞移植による再生治療開発のための細胞供給源の確保、および(2) 内在性筋細胞の増殖・肥大による治療法を開発するためのスクリーニング系の確立に欠くことのできない技術基盤を提供する。

B. 研究方法

筋生検

国立長寿医療センター倫理委員会の承認を得た手順に従って、事前に同意を得た患者を被験者（全て男性）とした。被験者の年齢は59歳から70歳、実施件数は9件であった。前立腺全摘出手術時に、開腹部位の腹直筋あるいは錐体筋を約1g摘出し、筋組織は直ちに氷冷された。筋組織は、質重量を測定した後、各検討目的毎に裁断され、摘出後2時間以内に実験に供された。

ヒト筋組織からの細胞分離

全ての操作は、滅菌した器具および試薬を用い、クリーンベンチ内で無菌的に行った。摘出後2時間以内の筋組織100-500mgを滅

菌したダルベッコ・リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で3回洗浄した後、余分な脂肪組織などをできるだけ丁寧にピンセットで除去した。筋組織は、眼科用ハサミでできるだけ細かく裁断された。細胞分散液A（下記参照）5mlを加え、室温で5分間消化した。手でやさしく混和した後、毎分200回転で2分間、遠心し、上清を新しい50-mlチューブにうつし、ウシ胎児血清（FBS）を1ml加えた。細胞分散液Aによる消化操作をさらに4回繰り返し、約30mlの上清を得た。これを40 μ mのナイロン・メッシュに通して筋繊維由来の残渣を除いた後、その1/10（筋組織15-30mgに相当する）を、直径100mmのI型コラーゲン・コート培養ディッシュ（c-1シャーレ、スミロン）に播種した。

組み換えタンパク質分解酵素を用いる場合は、次のようにして筋組織を消化した。細切した筋組織40-60mgあたり1ml TrypLE express (GIBCO)を加え、37°Cで15分間消化した。この間、5分毎に手でやさしく混和した。消化後、毎分200回転で2分間遠心し、上清を新しい50-mlチューブにうつし、ウシ胎児血清（FBS）を酵素液5mlに対して1mlずつ加えた。同様の消化操作を繰り返した。以下、得られた上清は、上述の方法にしたがって処理した。

細胞分散液 A : 0.05% Trypsin、0.025% collagenase V を高グルコース含有ダルベッコ改変細胞培養液 (hDMEM) に溶解した。

細胞培養

細胞培養液としては Primary Myocytes Growth Medium (pmGM、Wada et al., 2002) を用いた。また、気相は、「二酸化炭素：空気=1：9」とし、培養温度は 36.6-36.8℃を保ち、37℃を越えることがないように設定した。

(倫理面への配慮)

動物およびヒト材料を用いた実験に関しては、国立長寿医療センターの動物実験倫理委員会、の承認を得、規定にしたがって実施した。ヒトからの筋生検に関しては、国立長寿医療センター倫理委員会の承認を受けたうえで、説明と同意に関する所定の手続きを行い、注意深く実施した。

C. 研究結果

骨格筋細胞純粋培養の条件

培養開始時に顕微鏡下で観察すると、100 mm ディッシュ当たり 100 以下の細胞しか認められなかった。播種された細胞数は不明であるが、既知数の細胞を播種した場合との比較から 100mm ディッシュ当たり 1000 細胞を越えることはないと考えられた。およそ 3 週間の培養後、同心円状の細胞塊 (コロニー) の形成が認められた。培養開始時の細胞密度がきわめて低いことから、これらのコロニーは単一細胞由来のクローンとして増殖した結果である可能性が高いと考えられた。得られたコロニーは、含まれる細胞の形態から、(1) 細胞の長軸が最大でも核の 3-4 倍程度のコンパクトな細胞(compact cell)と、(2) 細胞の長軸が核の 10 倍以上の、大きく広がった細胞 (spreading cell) の二つに大別され

た。ほとんどのコロニーは前者から形成され、後者のコロニーが形成されることは少なかった。さらに培養を継続すると、前者は細胞融合して筋管細胞を形成するのに対し、後者は著しい増殖低下を示し、順次培養面から剥離した。したがって、compact cell は筋細胞であり、spreading cell は非筋細胞 (おそらくは繊維芽細胞) であると考えられた。この培養結果は、低密度培養によって、筋細胞を選択的に増殖させることができることを示している。

組み換えタンパク質分解酵素の有効性

Trypsin/collagenase V を用いてヒト筋組織を消化し、pmGM で培養したところ、筋重量 15-20 mg 当たり約 30 個のコロニーが形成された。一方、同じ筋サンプルを組み替え酵素 TrypLE Express を用いて消化したところ、より多くのコロニーが形成されていた。初代培養 18 日目に細胞数を計数したところ、Trypsin/collagenase V を用いた場合は筋組織 20 mg から 16 万個の細胞が得られたのに対し、組み替え酵素を用いた場合は、筋組織 20 mg から 160 万個の細胞が回収された。

D. 考察

私たちは先行研究において、「単一細胞由来のクローンが形成されるような低細胞密度」で骨格筋組織の初代分散培養を行うと、繊維芽細胞などの非筋細胞は増殖が著しく低下するのに対して、筋幹細胞は単一細胞由来のクローンとして増殖できることを、主にマウスの筋組織を用いて見いだした (Wada, et al., 2002; Hashimoto, et al., 2004)。一方、ヒト筋組織の分散培養における低密度培養の効果については、先行研究によって有効性が示唆されていたものの、実施例数が少なく、従来は十分な再現性を確認するまでに到っていなかった。しかし、本研究においては、

59歳から70歳という高齢者の筋組織9例から、いずれも筋細胞のみを含むコロニーが形成された。これは、低細胞密度培養法によって、高齢者筋組織から選択的に筋細胞のみを増殖させることが可能であることを示している。高齢者の骨格筋組織には繊維化や脂肪化の進行傾向が認められることから、非筋細胞の混入は避けられず、筋細胞の純粋培養は困難であると考えられてきた。私たちの培養条件では、非筋細胞の割合は低く、かつその増殖能力は著しく低下していた。非筋細胞は、培養中に死滅して排除される傾向があり、かつ残存した場合も筋細胞とは異なる、形態的に識別可能なコロニーを形成するため、顕微鏡下でのピペット操作によって容易に排除することができる。したがって、高齢者由来筋組織を用いても、筋細胞を純粋培養することが可能となった。

本研究における分離・培養条件では、播種される細胞数が少なすぎるため、培養開始時の播種細胞数を計数することは困難である。また、培養開始時に播種された細胞の多くは、赤血球などの血液由来細胞であると考えられるため、播種細胞数からその中に含まれる筋幹細胞数を推定することはできない。しかし、既知数の細胞を播種した場合との比較から、本研究における播種細胞数は100mm ディッシュ当たり1000細胞を越えることはないと考えられる。マウス筋組織から分離した単核細胞の解析結果から、骨格筋ごとに変動はあるにせよ、筋幹細胞の割合は得られる単核細胞の10%を越えることはないと推定される。したがって、培養開始時に播種された筋幹細胞数は、100個あるいはそれ以下であると推定される。得られたヒト筋細胞コロニー数の最大値は50を越えており、初代培養でありながら、筋幹細胞のコロニー形成率は50%近い高率であると推定される。この結果は、最もよく実施されているヒト繊維芽細胞

の初代培養における常識、即ち、「細胞密度の低下は増殖低下をもたらす」という結論と相反するものである。筋幹細胞が成長因子などを盛んに自己分泌するオートクリン細胞であること (Hashimoto, et al., 2008) が、単一細胞からのコロニー形成 (クローン成長) を可能にしているのではないかと考えられる。

組み替え酵素を用いた筋組織の消化によって、従来の動物由来酵素を用いた場合よりも約10倍の筋細胞が得られた。その原因として、筋組織からの細胞分離効率の向上、酵素消化による細胞障害の低減などが考えられる。播種時点で観察する限り、筋組織消化に用いた酵素の違いによって播種された細胞数に10倍もの違いは認められなかった。したがって、組み替え酵素を用いた場合に見られた筋細胞の高収量は、細胞障害の低減による増殖効率の向上が主な原因ではないかと考えている。

高齢者筋組織に含まれる筋幹細胞の数については、正確なデータが得られていない (分担研究者の上住-池本らが検討中) が、老化マウス筋組織の予備的な分析結果からは、骨格筋1gあたり少なくとも2万個以上の筋幹細胞が含まれるものと推定されている。今回の初代培養では、高齢者筋組織20-30mgから分離した細胞を100mm ディッシュ1枚に播種した。マウスのデータを外挿すると、ヒト筋組織20-30mgには約500個の筋幹細胞が含まれると推定される。本研究では最大50を越えるコロニーの形成が認められたが、それは筋組織に存在する筋幹細胞の1%を分離・培養できたに過ぎない。従って、将来的に、より細胞障害が少なく、より効率よく細胞を分離する技術が開発できれば、さらに10倍以上の筋幹細胞を得られる可能性がある。

E. 結論

前立腺全摘出手術時に、切開部位の腹直筋あるいは錐体筋を約1g摘出することにより、被験者への負担を最小にとどめ、かつ予後に影響を与えることなく、筋幹細胞分離に供する筋組織を得ることができた。さらに、低細胞密度培養法によって、ヒト筋組織から再現性よく筋細胞を分離し、純粋培養（クローン培養）することに成功した。安全性の高い分離・培養法を開発するため、組み替えタンパク質分解酵素を用いた、効率の良い筋幹細胞分離条件を確立した。今後、さらに技術改良を進めることによって、より大量の筋幹細胞を調製できる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mukai, A. and Hashimoto, N. Localized cyclic AMP-dependent protein kinase activity is required for myogenic cell fusion. *Exp.Cell Res.*, 314: 387-397 (2008).
- 2) Hashimoto, N., Kiyono, T., Wada, M. R., Umeda, R., Goto, Y., Nonaka, I, Shimizu, S., Yasumoto, S., and Inagawa-Ogashiwa, M. Osteogenic Properties of Human Myogenic Progenitor Cells. *Mech. Dev.* 125 : 257-269 (2008)

2. 学会発表

- 1) 日本発生生物学会第40回大会 日本細胞生物学会大59回大会 合同大会
福岡、2007年5月28日～30日
向敦史、栗崎知浩、佐藤智、小林俊秀、橋本有弘
「Role of microdomain molecules in myogenic cell fusion」
- 2) 日本発生生物学会第40回大会/日本細胞生物学会大59回大会 合同大会

福岡、2007年5月28日～30日

柳澤美智子、内山英穂、橋本有弘

「Modulation of Fate Determination in Muscle Stem Cells by Mutated ALK2 Found in a Heritable Human Disease」

- 3) 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会

横浜（パシフィコ横浜）、2007年12月11日～15日

柳澤美智子、橋本有弘

「Modulation of fate determination in multipotent myogenic progenitor cells by mutated ALK2 found in a heritable human disease」

- 4) 第5回幹細胞シンポジウム

兵庫県淡路市 2007年5月17日～19日

柳澤美智子、池本円、橋本有弘

「変異 ALK2 による筋サテライト細胞分化制御機構の破綻」

- 5) 第8回運動器科学研究会

徳島県鳴門市 2007年8月24日～25日

橋本有弘

「筋の再生と分化の分子機構」

- 6) FASEB Summer Research Conference
Skeletal muscle satellite and stem cells
2007.7.14-19

Naohiro Hashimoto, Atsushi Mukai and Si-Yong Song

“Progressive muscular dystrophy in muscle satellite cell-deficient Mdx mice”

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究要旨

前立腺全摘出手術時に、摘出した高齢者の腹直筋あるいは錐体筋より、CD56 を指標としてセルソーターによって筋幹細胞を分離する条件を明らかにした。その成果により、移植用筋細胞の性質をきたままの状態を確認し、移植後の治療効果および安全性を担保するための品質管理システムを確立するために必要な、基盤となる解析系を確立した。

A. 研究目的

自己骨格筋幹細胞を用いた腹圧性尿失禁に対する括約筋機能再生治療を実現するためには、移植用筋細胞の性質を確認し、治療効果および安全性を担保するための品質管理システムを確立することが必要である。本分担研究は、セルソーターを用いて、(1) 移植に適した筋細胞と適さない細胞を識別する方法、および(2) 移植に適した細胞のみを、きたまま分離する方法、を確立することにある。本分担研究の成果は、内在性筋幹細胞の増殖・分化能力の維持あるいは亢進に関わるシグナル分子を探索するために有用な実験系を提供する。

B. 研究方法

筋生検

国立長寿医療センター倫理委員会の承認を得た手順に従って、事前に同意を得た患者（59歳から70歳の男性）を被験者とした。平成19年12月までの実施件数は9件であった。前立腺全摘出手術時に、開腹部位の腹直筋あるいは錐体筋を約1g摘出し、直ちに氷冷し、摘出後2時間以内に実験に供された。

ヒト筋組織からの細胞分離

全ての操作は、滅菌した器具および試薬を用い、クリーンベンチ内で無菌的に行った。筋組織 100-500 mg を滅菌したダルベッコ・リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した後、余分な脂肪組織などをできるだけピンセットで除去した。筋組織は、ハサミで細かく裁断し、20 ml ビーカーに移し、細胞分散液 (0.2% collagenase type II を PBS に溶解したもの) 4 ml を加え、攪拌しながら 37°C で 30 分間消化した。18G 注射針をつけた 5 ml シリンジに数回通し、さらに 20 分間消化した。これを細胞洗浄液 (2% ウシ胎児血清を含む PBS) で希釈しながら、100 μm 次いで 40 μm のナイロン・メッシュに通して筋線維由来の残渣を除いた後、毎分 1,500 回転で 5 分間遠心し、上清を除去した。細胞ペレットをよくほぐし、赤血球除去液 (0.83% NH₄Cl と 0.17M トリス緩衝液を 9 : 1 で混ぜたもの) 2 ml を加え、室温で 2 分間反応させた後、細胞洗浄液を加え、毎分 1,500 回転で 5 分間遠心を行った。上清を除去し、生細胞を染色するため、細胞ペレットにヘキスト染色用メディアウム (2% ウシ胎児血清と 10 mM HEPES