

図 5. データ処理ソフト NucleoView TM

NucleoCounter TM 本体だけでも使用可能であるが、パソコンと接続して Nucleo View TM を用いることにより、生細胞数表示、生存率の計算、データの保存を行う（図 5）。

操作方法～3つのステップを示す。

1. 培養細胞 100 μ l をチューブにとり、細胞処理試薬 Reagent A100 と Reagent B を 100 μ l ずつ加える。（死細胞数測定の場合は、この操作は不要で、2 の操作から始める。）



図 6-1. 操作方法 1

2. NucleoCassette TM にサンプルを吸引し、NucleoCounter TM にセットする。



図 6-2. 操作方法 2

3. NucleoCounter TM の"Run"ボタンを押すと、30 秒以内で測定結果が表示される。



図 6-3. 操作方法 3

サイズは、38(W)×26(H)×22(D)cm、重さ 3kg
測定範囲は、 $5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^6$ 個/mL で
CV 値 5%以内で手術室内で迅速に細胞計測が可能となっている。

実験 3 採取した脂肪組織注入方法

今回、臨床で使用する内視鏡は脂肪組織注入のため太い針に対応可能な腎盂鏡を使用することにした。よって、長さ 35cm は限定され、針の太さを比較検討した。

実験 4

ヌードラット皮下に前述した脂肪組織とその幹細胞を混和し、18G 針で注入し、その balking effect を比較した。

ヌードラットの皮下にヒト脂肪組織から分離した脂肪組織由来幹細胞とヒト脂肪組織を 1 : 0 すなわち脂肪組織のみの群、1 : 1 すなわち脂肪組織 1g とその 1g から採取された

脂肪組織由来幹細胞のみ、1:10すなわち脂肪組織1gとその1gから採取された脂肪組織由来幹細胞の10倍の数で混ぜ合わせ群を2CCの容量で、ヌードラットの皮下に注入し瘤を作成し比較検討した。

(倫理面への配慮)

自己脂肪組織由来幹細胞を利用した腹圧性尿失禁治療の有用性に関する研究で名古屋大学医学部附属病院の倫理委員会(657)の承認を得ている。

C. 研究結果

実験1

臨床症例を見据えて脂肪組織から脂肪組織由来幹細胞分離を行った。脂肪組織由来幹細胞は5mlの軽度赤血球の混ざった細胞成分の溶液として採取可能であった。

実験2

脂肪組織由来間質細胞の細胞の数をNucleoCassette TMを用いた。その結果、脂肪組織由来幹細胞総数 $15.20 \times 10E7$ であった。そのうち $15.34 \times 10E6$ 個、89.6%もの viable cell を認めた。この細胞数の約5%が平滑筋由来、脂肪由来、骨由来、神経由来、血管内皮細胞由来の脂肪組織由来間質系幹細胞と考えられた。

実験3

脂肪組織吸引チューブ半径3mmで細かく吸引した脂肪組織を用いた場合のみ35cm細胞注入針でスムーズに注入できた。それ以上の半径5mmで吸引した脂肪は注入できなかった。

実験4

ヒト脂肪組織:脂肪由来幹細胞のみ1:0群では、瘤全体的容量の減少と血管新

生が不十分なため虚血性の潰瘍を中央に認めた(図7-1)。

1:1では比較的瘤は保たれているが軽度な虚血性の潰瘍を中央に認めた(図7-2)。

1:10では瘤は潰瘍形成はなく瘤を保っていた(図7-3)。



図7-1.



図7-2.



図7-3.

D. 考察

体内に移植された後、損傷を受けた組織およびその周辺の組織からの環境因子が幹細胞を損傷部位へと導き、自然な治癒反応を促進すると考えられる。幹細胞は多くの作用機序、すなわち組織の生存や移植組織の維持、あるいは前駆細胞の適切な細胞型への分化を促進するなどの機序により効果を発揮する。幹細胞は直接患部に注入移植されるか、もしくは軟部組織再建手術において効能を促進するために幹細胞を脂肪組織と混ぜて移植するように、scaffold（足場）とともに移植される。体内に移植された後、損傷を受けた組織およびその周辺の組織からの環境因子が幹細胞を損傷部位へと導き、自然な治癒反応を促進すると推測される。幹細胞は多くの作用機序、すなわち組織の生存や移植組織の維持、あるいは前駆細胞の適切な細胞型への分化を促進するなどの機序により効果発揮されると考えられる。

E. 結論

今回の実験では臨床治療のシミュレーションが可能であった。また臨床において脂肪組織由来幹細胞尿道周囲注入時、尿道内腔に瘤を形成し bulking effect を最も効果的に起こす脂肪組織と脂肪組織由来幹細胞の比は 1:10 で、現時点汎用内視鏡としての腎盂鏡と 18G 35cm の針を用いるのが最適であることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 後藤百万、山本徳則 腎臓・膀胱微小循環と再生 unite 2008 35-36 2008
- 2) Imamura T, Yamamoto T, Ishizuka O, Gotoh M, Nishizuka O: Freeze-injured urinary bladders in mice provide a microenvironment for bone

marrow-derived cells to regenerate smooth muscle layers tissue engineering. 2009, accepted

2. 学会発表

- 1) 渡辺達人、丸山彰一、松尾清一、山本徳則、後藤百万. ラット尿失禁モデルにおける低血清培養脂肪由来間葉系細胞を用いた治療実験. 第7回日本再生医療学会総会 名古屋 平成20年3月13日~14日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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ており、そのキャラクター・増殖速度・サイトカイン分泌能・分化などの基礎的な研究を行っている。一方で、泌尿器科領域において、女性腹圧性尿失禁に対する従来の治療法が有効でない症例に対して筋芽細胞による細胞治療が試みられている。そこで我々は、そのような症例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考えた。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、膀胱内圧の上昇を期待する実験をするにあたり、前年度においてまずは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の手技を確立した。これらをもとに、本年度はラットにおける脂肪由来間葉系細胞による細胞治療の可能性を膀胱内圧測定法により検討した。結果として、細胞治療により既存の尿失禁治療に用いられる GAX-collagen よりも尿失禁に対する治療効果がより長期に渡り持続する可能性が示された。細胞の腫瘍性増殖は認めず、安全な細胞と考えた。今後は臨床応用に向けて細胞の腫瘍性増殖の有無を含めた安全性の検討を行ってゆきたい。

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ており、そのキャラクター・増殖速度・サイトカイン分泌能・分化などの基礎的な研究を行っている。また、細胞が分泌するサイトカインの作用を期待した様々な動物実験（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。

泌尿器科領域において、高齢者（女性）腹圧性尿失禁に対する以下の様な研究が行われている。

●2004年 インズブルック大学グループ

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。20例中16例で完全な尿禁制が得られた。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。

●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例に針生検で42~247mgの筋組織を得て、筋芽細胞を培養し、4週後に $18\sim 22\times 10^6$ 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例でほぼ尿制が得られた。

そこで我々は腹圧性尿失禁に対する従来の治療法

- ①アドレナリン受容体刺激薬
- ②骨盤底筋体操などの理学療法
- ③膀胱頸部吊り上げ術
- ④コラーゲン尿道周囲注入療法

などが奏功しない症例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

考えた。我々は仮説として、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、が期待できるのではないかと考え、ラット LPP (Leak Point Pressure) 測定による、既に臨床で使用されている GAX-collagen と、低血清培養脂肪由来間葉系間質細胞の尿失禁治療効果の比較検討を行った。

B. 研究方法

(実験1)

脂肪組織は7週齢♂F344 ラットから採取した。

①Vehicle (DMEM®)

②GAX-collagen

③低血清培養した ASC (rLASC) 3×10^6 個を尿道壁内に各々20 μ l 注入した。Day14 と Day28 で Leak Point Pressure LPP 測定をした。

その後、Rat を sacrifice して尿道組織を HE 染色・MT 染色した。

(実験2)

臨床応用を考え、ヒト脂肪から同様に低血清培養で ASC を得て、以下の実験を行った。

① ヒト ASC をそれぞれ 20%FBS+bFGF・20%FBS (bFGF なし)・2%FBS +bFGF の3種類の培地で培養し、6代経代培養した後、10%FBSの培地で培地変換し、24時間後に培地を回収・細胞数を count し、培地中の HGF 濃度を測定した。

② 7週齢♀ヌードラット尿道壁内に、ヒト ASC 3×10^6 個注入し、day3 で組織中の HGF 濃度を測定した。

③ ヒト皮下脂肪から ASC を低血清培養し、 3×10^6 個のヒト ASC (hASC) を7週齢♀ヌードラット尿道壁内に注入し、

day14・day28 でヒト細胞核膜と特異的に反応する LaminA / C 抗体で染色した。

(倫理面への配慮)

LPP 測定時の麻酔は、ジエチルエーテルの吸入麻酔で導入し、維持麻酔はウレタンを用い、深麻酔下で全ての処置を行った。Sacrifice 時は、ジエチルエーテル吸入によると殺を行った。

C. 研究結果

(実験1)

Day14 の組織写真を示す。(図1)

Collagen 群において尿道内腔に突出する collagen の塊を認めた。ASC 群においても、注入した ASC によると思われる細胞集塊による尿道内腔のより強い狭小化を認めた。

Day28 の組織写真を示す。(図2)

Collagen 群において day14 に比べて組織内の collagen 塊の縮小を認めた。一方、ASC 群において、注入した ASC によると思われる細胞集塊が残存していた。

LPP 測定結果を示す。(図3)

全体として、LPP は ASC 群・collagen 群・Vehicle 群の順に高い傾向だった。

Day14 の LPP において、骨盤神経切除前も後も Vehicle 群に対して collagen 群も ASC 群も有意に LPP が高値を示した。collagen 群と ASC 群との間に有意差は認められなかった。Day28 の LPP において、骨盤神経切除前は Vehicle 群に対して ASC 群は有意に LPP が高く、collagen 群は有意差を認めなかった。骨盤神経切除後は、ASC 群は Vehicle 群・collagen 群に対して有意に LPP が高値を示した。Vehicle 群と collagen 群の間に有意差は認められなかった。

(実験2)

ヒト ASC の細胞培養上清において、高血清

培養よりも低血清培養のほうが、より多く HGF を分泌していた。(図 4-A)
 ヒト ASC をヌードラット尿道壁内に注入した day3 の組織中 HGF 濃度は、ASC 群が有

意に高値を示した。(図 4-B)
 Day14・28 いずれにおいても ASC 群で LaminA/C 抗体陽性の細胞集塊を認めた。(図 5)

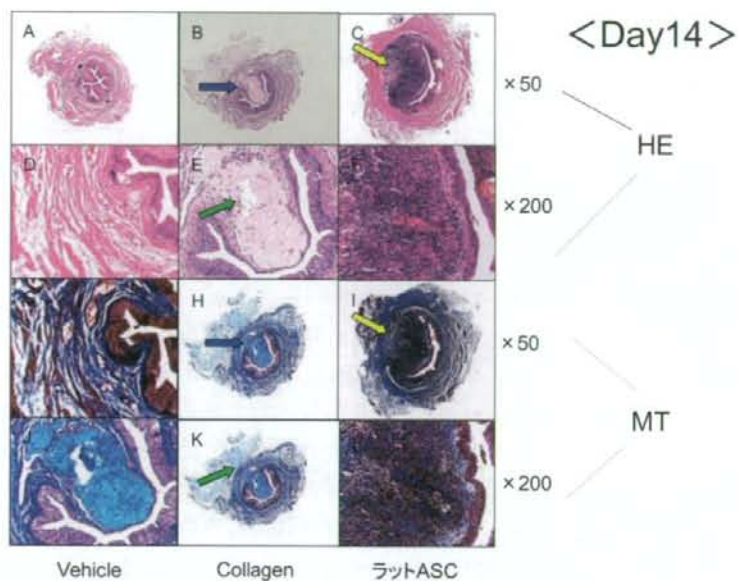


図 1. Day14 の組織写真

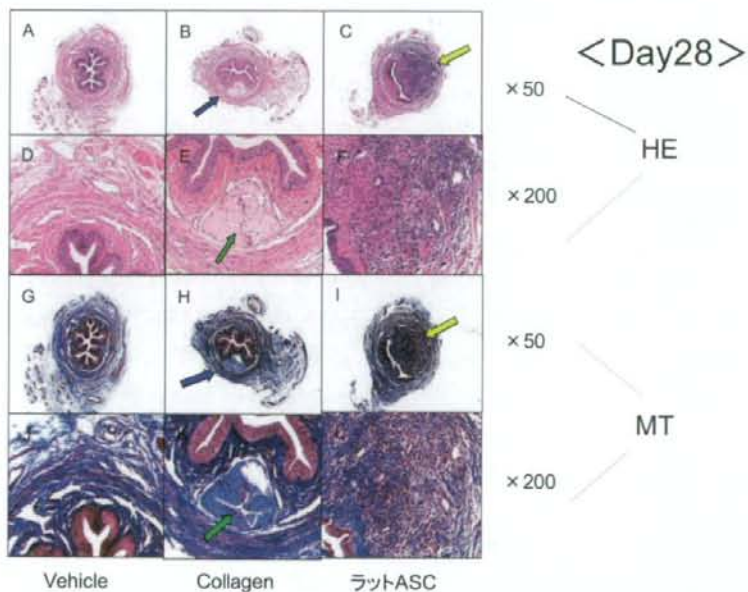
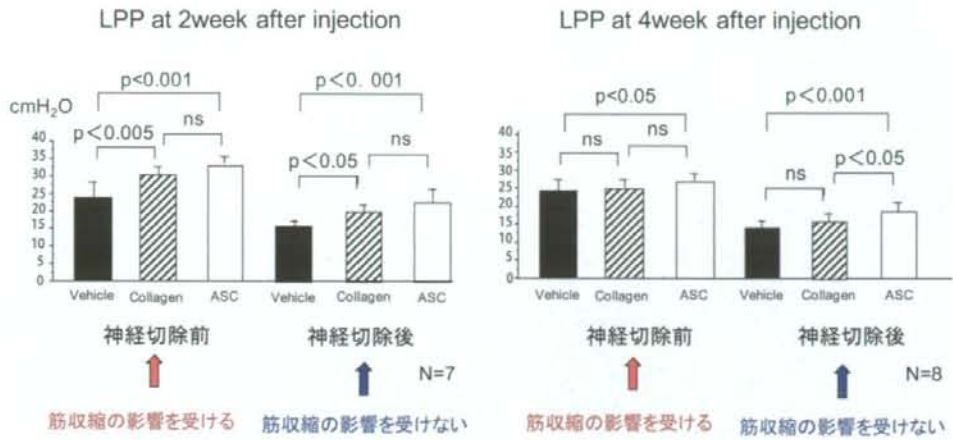


図 2. Day28 の組織写真



- 4週後では、コラーゲンの効果はなくなっていたが、細胞治療群では維持されていた。
- 細胞治療の作用機序は主として尿道における容積効果bulking effectと考えられた。

図 3. LPP 測定結果

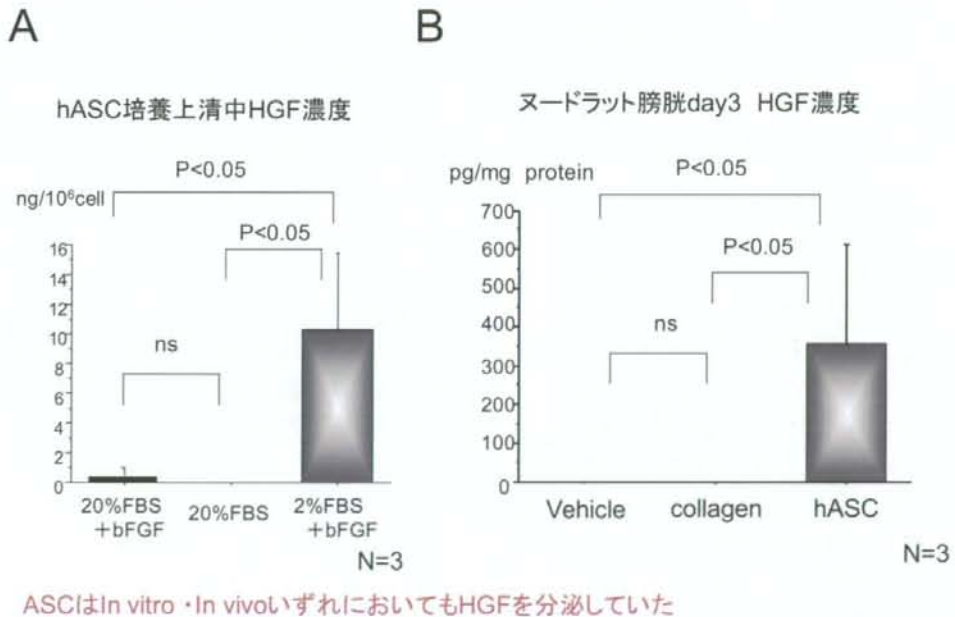
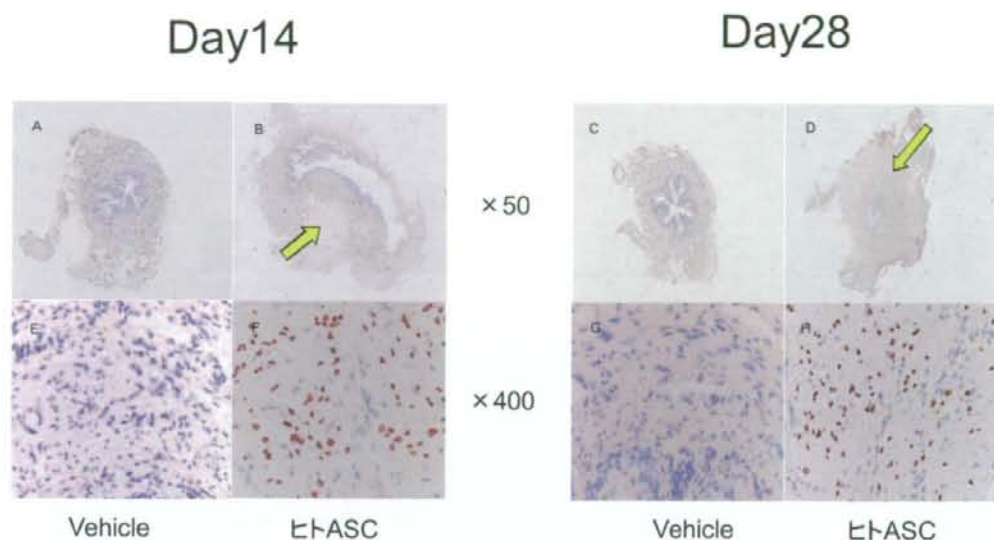


図 4. HGF



細胞はday28においてもなお残存していた

図 5. LaminA/C 抗体染色

D. 考察

Day14・28 いずれにおいても、骨盤神経切除後は、切除前に比べてLPPが低下した。これは骨盤神経切除後に局所反射が消失したためと考えた。骨盤神経切除前において、day14でコラーゲン群が Vehicle 群と有意差があったのに、day28では有意差が無くなった理由として、コラーゲンの効果がday14で強かったのが、day28では減弱した可能性を考えた。Vehicle 群において、day14とday28の間に有意差は認めなかった。ASC群・collagen群ともに、day14に比べてday28でLPPが低い傾向であった。Day28では、コラーゲンの効果は消失していたが、細胞治療群ではその治療効果が持続していた。day28において、ASC群のみ治療効果が認められた。その作用機序は主として注入したASCによるbulking effectと考えた。また、ヒトASCをヌードラット尿道壁内に注入したday3の組織中HGF

濃度は、ASC群が有意に高値を示したことは、ラットASCをラット尿道壁内に注入した場合にもHGFを分泌する可能性を示唆するものであり、HGFによる間葉系細胞の増殖・分化の促進、筋収縮自体の増強作用などが期待できるものと考えた。

E. 結論

ラットを用いた研究で尿失禁に対するASC注入療法の有効性が明らかにした。ASCを尿道壁内に注入することにより、bulking effectによる、Collagenにも勝る尿道内圧上昇効果を確認できた。これは、細胞治療により、例えば尿道括約筋やその支配神経の障害があっても尿道内圧を上昇させる可能性を示すものと考えられる。今後障害モデルで実験を行うことにより、筋力増強作用・筋分化が加われば、さらなる尿道内圧上昇効果が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Urahama Y, Ohsaki Y, Fujita Y, Maruyama S, Yuzawa Y, Matsuo S, Fujimoto T.
Lipid droplet-associated proteins protect renal tubular cells from fatty acid-induced apoptosis. *Am J Pathol.* 173(5):1286-94. 2008

2. 学会発表

- 1) 渡辺達人、丸山彰一、松尾清一、山本徳則、後藤百万. ラット尿失禁モデルにおける低血清培養脂肪由来間葉系細胞を用いた治療実験. 第7回日本再生医療学会総会 名古屋 平成20年3月13日~14日
- 2) 坂 洋祐、丸山彰一、岩島重二郎、渡辺達人、安田 香、尾崎武徳、湯澤由紀夫、松尾清一. 脂肪由来間葉系細胞を用いた低血清培養法の検討. 第7回日本再生医療学会総会 名古屋 平成20年3月13日~14日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

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

研究分担者 丸山彰一 名古屋大学大学院医学系研究科

分子総合医学専攻病態内科学講座 腎臓内科 講師

研究要旨

名古屋大学農学部の北川らは、bFGF+マトリジェルで皮下に fat ができたとの報告している。また、高齢者（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。そこで我々は、前年度において、膀胱頸部（尿道）に脂肪由来間葉系細胞を移植し、そこでの分化を期待した実験を様々な手法で行った。結果として、ラットの尿道においては、細胞生着・増殖のために足場としてゼラチンスポンジ・bFGF の混合はあまり有効でないと考え、本年度は脂肪由来間葉系細胞単独の移植による尿道内腔の狭小化や筋細胞への分化を期待した治療実験を行った。結果として、尿道内腔の狭小化を認め、移植した脂肪由来間葉系細胞の筋細胞への分化を認めた。今後は、細胞移植部位における新生血管の有無の評価や筋分化と HGF の関係の更なる検討を行いたい。

A. 研究目的

名古屋大学農学部の北川らは、bFGF+マトリジェルで皮下に fat ができたとの報告している。これは、足場と細胞増殖因子の供給により、幹細胞がそこに入り、増殖・分化するという可能性を示唆するものである。

その他に、細胞を移植する際、その増殖を促すために、足場 scaffold が有用であると報告されている。（足場 scaffold があることにより、そこに細胞が生着しやすくなる・血管が入り込みやすくなるという）

泌尿器科領域の疾患として、高齢者（女性）腹圧性尿失禁があり、アドレナリン受容体刺激薬・骨盤底筋体操などの理学療法・膀胱頸部吊り上げ術・コラーゲン尿道周囲注入療法など治療法は様々なあるが、それらの治療法が有効でない症例もある。

我々は低血清培養の脂肪由来間葉系細胞に

注目しており、そのキャラクター・増殖速度・サイトカイン分泌能・分化などの基礎的な研究を行っている。また、細胞が分泌するサイトカインの作用を期待した様々な動物実験を行っており、*Vitro* の実験において脂肪由来間葉系細胞が脂肪細胞・軟骨細胞・骨細胞へ分化することは確認している。

しかし、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と言われている。また、他のグループの報告によると、*in vivo* で脂肪由来間葉系細胞が平滑筋細胞に分化したという報告もある。そこで我々は、ラット尿道に低血清培養脂肪由来間葉系細胞を移植することによる尿道の狭小化・平滑筋細胞への分化の有無を確認した。

B. 研究方法

(実験1)

7週齢 F344♂ラットの皮下脂肪組織から Stromal Vascular Fraction (SVF) を得て、低血清培養法にて経代培養した脂肪由来間葉系細胞 (rASC) 3×10^6 個を7週齢 F344♀ラットの尿道壁内に 29G シリンジにて注入した。注入後 28日 (day28) でラットを sacrifice して尿道組織を①HE 染色② α SMA 抗体染色 (酵素抗体法) ③ED-1 抗体染色 (酵素抗体法) で評価した。

(実験2)

7週齢♂の SD Tg(CAG-EGFP)ラット (グリーンラット) 脂肪から SVF を分離し、低血清培養で経代培養して得られた ASC(rLASC) 3×10^6 個を7週齢♀F344/N-rnu/rnu rat (ヌードラット) 尿道壁内に注入し、Day28でラットを sacrifice して尿道組織を①抗 GFP 抗体 (酵素抗体法) ② α SMA 抗体染色 (酵素抗体法・蛍光抗体法) で染色した。

(倫理面への配慮)

細胞移植時の麻酔は、ジエチルエーテルの吸入麻酔で導入し、維持麻酔はペントバルビタールの筋注を用い、深麻酔下での処置を行った。

Sacrifice 時は、ジエチルエーテル吸入によると殺を行った。

C. 研究結果

(実験1) F344 ラット尿道組織の構造は、内腔側から移行上皮層・小血管を含む間質層・平滑筋層である。(図1) 実験1について

は注入細胞に標識を付けていないが、細胞を移入したと思われる部位に尿道内腔へ突出する隆起を伴う細胞集塊を認め、同部位にて α SMA 抗体陽性細胞を多数認めた。(図2) また、連続切片を用いて、炎症細胞浸潤の有無を確認するために、ED-1 抗体染色を行ったところ、ED-1 陽性細胞は、散見される程度であり、コントロールと大差無かった。(図3)

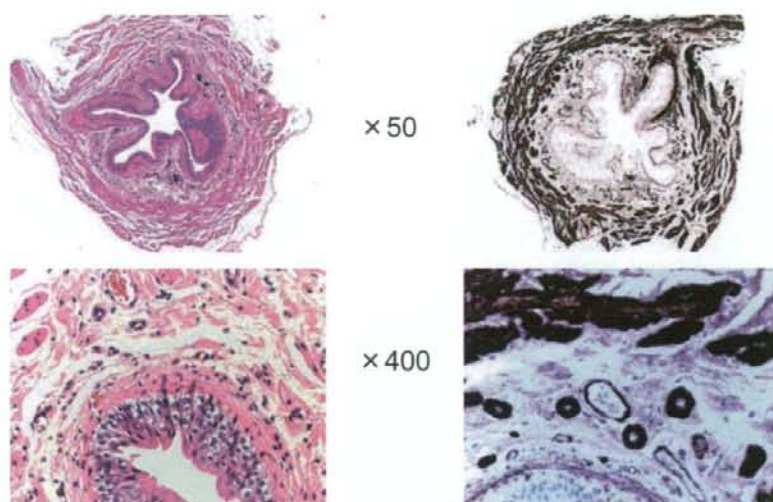
(実験2)

グリーンラット ASC をヌードラット膀胱頸部に注入した day28 の抗 GFP 染色において、尿道壁の一侧に抗 GFP 抗体陽性細胞の集塊と、それに伴う尿道内腔への突出を認めた。

(図4) 一方、vehicle (DMEM®) 注入群の尿道組織には、抗 GFP 抗体陽性細胞・尿道内腔への突出ともに認めなかった。(図5) 連続切片を用いて α SMA 染色を行ったところ、GFP 陽性細胞集塊の存在する部位に α SMA 陽性細胞が多数確認された。(図6,7) 酵素抗体法での染色工程にある賦活化の影響を除外する目的で、別の標本を生で凍結保存し、GFP 陽性細胞があることを確認後、 α SMA 染色を行った。コントロールの尿道組織において、平滑筋層と血管が α SMA 陽性となるが、移行上皮下の α SMA 陽性細胞の集塊を認めず、尿道内腔への突出所見も認めなかった。(図8) 一方、グリーンラット ASC 注入群においては、一側性に移行上皮下の α SMA 陽性細胞の集塊を認め、尿道内腔への突出所見も認めた。

(図9矢印)

また、GFP 陽性細胞と、 α SMA 陽性細胞が複数の細胞で一致した。(図10)



HE コブの形成は認められない SMA

図1. F344 ラット♀膀胱頸部無治療群

尿道へ突出する隆起を認める

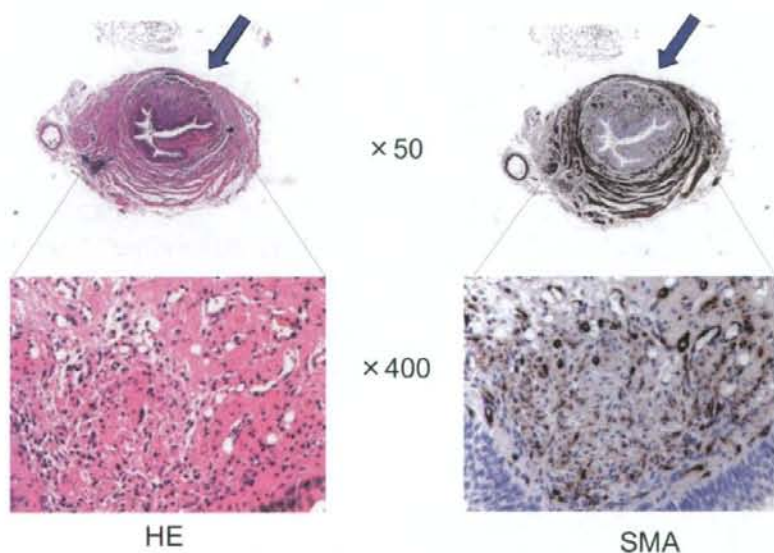


図2. F344♂ASC→F344♀膀胱頸部 day28

ASC注入部位にED-1陽性細胞は散見される程度であった。

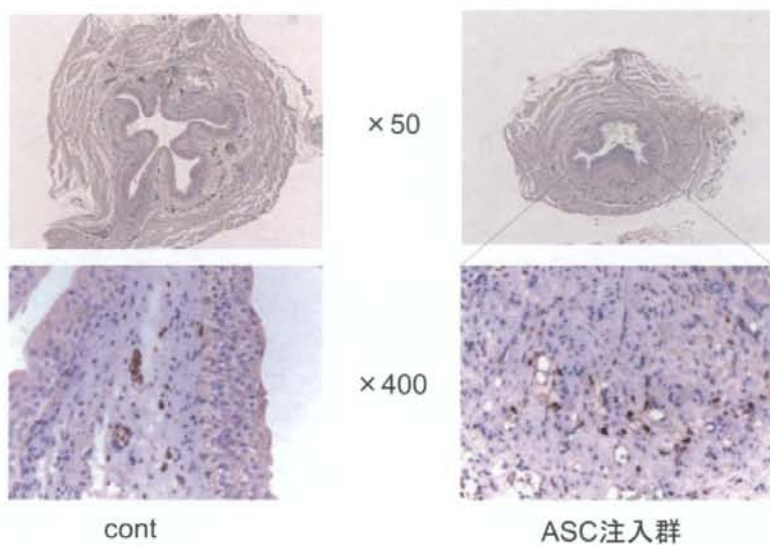


図 3. F344♀膀胱頸部 day28ED-1 染色

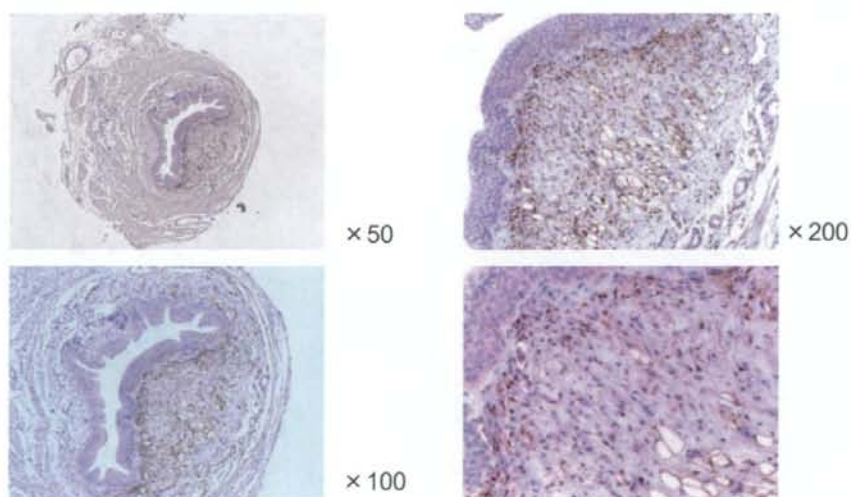


図 4. グリーンラット ASC → ノードラット膀胱頸部
day28・抗 GFP 抗体染色

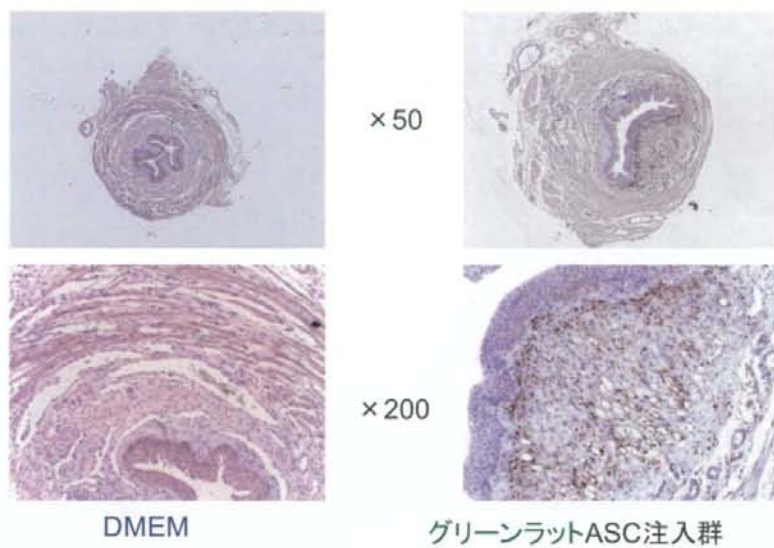


図5. ノードラット day28・抗GFP抗体染色

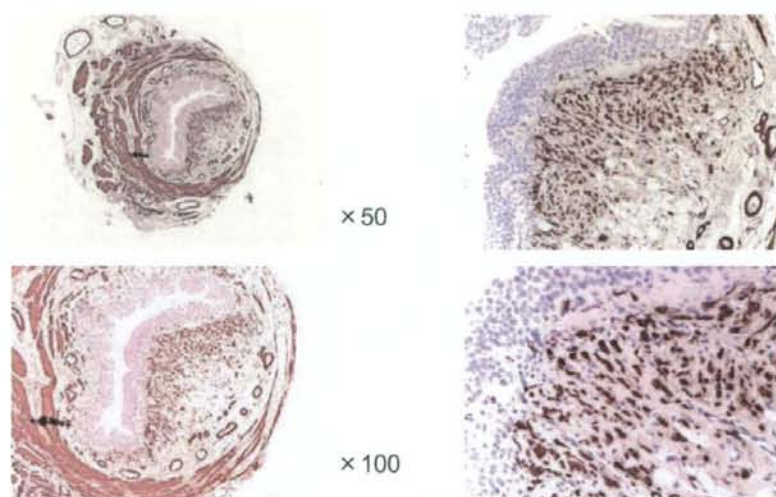


図6. グリーンラットASC → ノードラット膀胱頸部
day28・抗SMA抗体染色

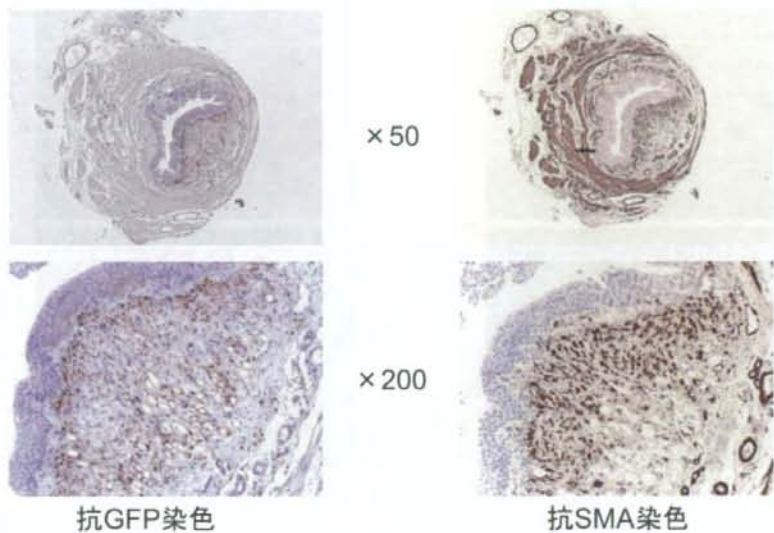


図7. グリーンラット ASC → ノードラット膀胱頸部 day28

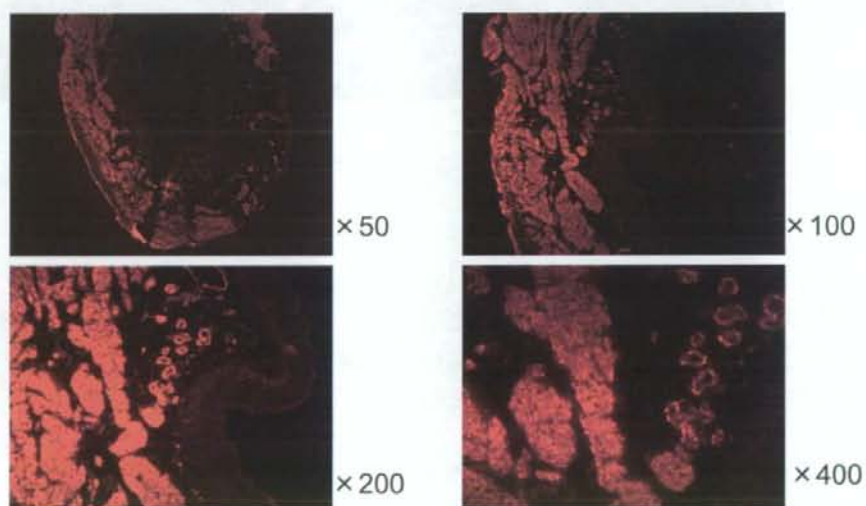


図8. ノード♀ラット膀胱頸部コントロール
抗 α SMA抗体染色

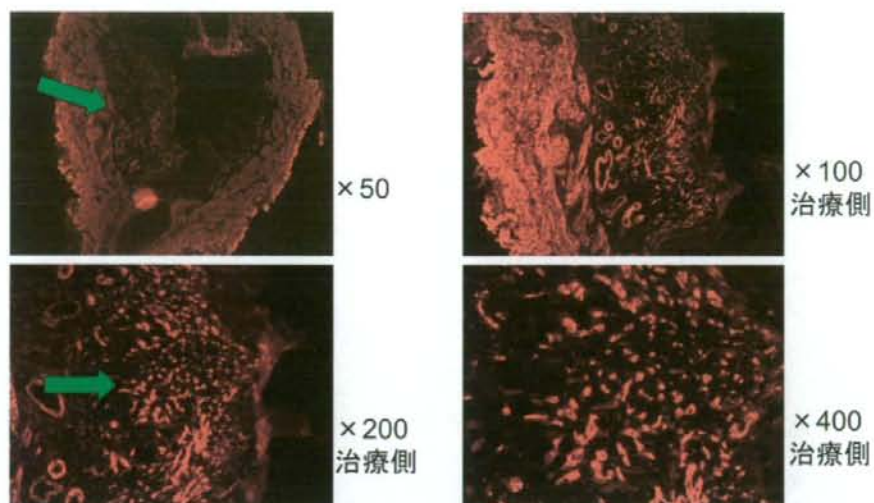


図9. ヌード♀ラット膀胱頸部 GFP 細胞治療群 α SMA

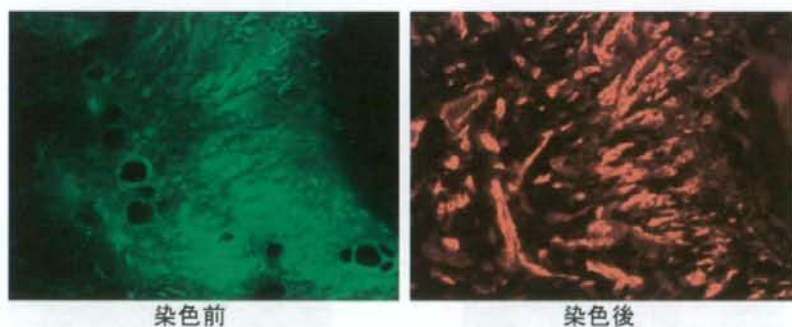


図10. ヌード♀ラット膀胱頸部 GFP 細胞治療群抗 α SMA 抗体染色 $\times 400$

D. 考察

実験1にて、脂肪由来間葉系細胞の尿道壁内注入により、day28 という比較的長期にわたり尿道内腔へ突出する細胞集塊の残存を確認でき、さらに、 α SMA 陽性細胞を認め、注入した細胞が平滑筋細胞に分化した可能性を示すものであったので、GFP 陽性細胞をヌードラットに注入することにより、細胞に標識を与えた結果、GFP 陽性部位と α SMA 陽性部位が一部一致したため、注入した細胞が平滑筋細胞に分化したと考えた。一方で、GFP 陰性細胞が α SMA 陽性という所見もあり、こ

れは移入した細胞が HGF などを分泌して移入される尿道組織にもともとある幹細胞を増殖・分化させた可能性を考えた。

E. 結論

脂肪由来間葉系細胞の尿道壁内への注入により尿道内腔の狭小化を認め、移植した脂肪由来間葉系細胞の筋細胞への分化を認めた。今後は、細胞移植部位における新生血管の有無の評価や筋分化と HGF の関係の更なる検討を行いたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Urahama Y, Ohsaki Y, Fujita Y, Maruyama S, Yuzawa Y, Matsuo S, Fujimoto T. Lipid droplet-associated proteins protect renal tubular cells from fatty acid-induced apoptosis. *Am J Pathol.* 173(5):1286-94. 2008

2. 学会発表

- 1) 渡辺達人、丸山彰一、松尾清一、山本徳則、後藤百万. ラット尿失禁モデルにおける低血清培養脂肪由来間葉系細胞を用いた治療実験. 第7回日本再生医療学会総会 名古屋 平成20年3月13日～14日
- 2) 坂 洋祐、丸山彰一、岩島重二郎、渡辺達人、安田 香、尾崎武徳、湯澤由紀夫、松尾清一. 脂肪由来間葉系細胞を用いた低血清培養法の検討. 第7回日本再生医療学会総会 名古屋 平成20年3月13日～14日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究要旨

私たちは、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、ヒト筋幹細胞を分離し、再現性よく培養下で増幅させることに成功した。こうして得られた初代培養ヒト筋細胞を、免疫不全マウスの骨格筋に移植し、ヒト筋細胞が筋再生に寄与していることを明らかにした。

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。平成 20 年度に実施した筋生検の被験者の年齢は 61 歳から 75 歳、実施件数は 4 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 100-500 mg 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 20-40mg を眼科用ハサミでできるだけ細かく裁断した後、組み替え酵素 TrypLE Express 10 ml を加え、37℃で 15 分間消化した。その間、5 分ごとに手で 30 秒間混和した。毎分 200-300 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 2 ml 加えた。同様の消化操作をもう一度繰り返し、約 24 ml の上清を得た。これを 40 μm 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 15-30 mg に相当する) を、直径 100 mm の I 型コラーゲン・コート培養デイスコ (c-1 シャーレ、スミロン) に播種した。

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。

免疫不全マウスへのヒト筋細胞移植

初代培養筋細胞に組み換えレンチウイルスを感染させ、蛍光タンパク質 Venus で標識した。移植 24 時間前に cardiotoxin を注射した NOD/Scid マウスの前頸骨筋に 2.6×10^5 細胞を注入した。5 ないし 6 週間後に前頸骨筋を摘出し、蛍光実体顕微鏡で蛍光 Venus 陽性筋繊維の有無を検討した。さらに定法により凍結切片を作成し、抗 GFP 抗体を用いて蛍光タンパク質 Venus 陽性筋繊維の有無を病理学的に検討した。

(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

高齢者由来骨格筋細胞の分離培養の再現性

昨年までに確立した分離培養法を用いて、腹直筋あるいは錐体筋から筋幹細胞の分離培養を試みた。その結果、4 例の筋組織から増殖・分化能を有する筋細胞を得ることに成功した。いずれの実験においても、14-21 日間の初代培養によって、重量 30 mg 前後の微量な筋組織から百万個以上の細胞を得ることができた。本研究において条件検討し、確立した低密度細胞培養法は、細胞収量に関する再現性が高く、ヒト筋細胞の分離・培養法として、きわめて有効であることが確認された。

免疫不全マウス骨格筋への移植によるヒト筋細胞の再生能力検定系

初代培養ヒト筋細胞（幹細胞としての性質

を完全に保持してはいないため、厳密には筋幹細胞とは言えないので、ここでは単に「筋細胞」と呼ぶことにする)にレンチウイルス・ベクターを用いて Venus を発現させた。MOI(組み換えウイルスの実効濃度に相当する)を調整することにより、ほぼ全ての細胞を Venus で標識することができた。Venus 標識ヒト筋細胞 2.6×10^5 細胞を $20 \mu\text{l}$ L-15 培地に懸濁し、NOD-Scid マウスの前頸骨筋に注入した。5 ないし 6 週間後に筋組織を単離し、蛍光実体顕微鏡でマクロ観察したところ、移植した筋組織 3 例全てにおいて蛍光標識された筋線維を確認できた。さらに凍結切片を作成して病理学的に検討したところ、Venus の発現は、辺縁核を有する成熟筋繊維にも認められた。この結果から、移植されたヒト筋細胞は、マウス筋組織における筋繊維形成に参画し、筋再生に貢献したことが明らかになった。また、宿主筋組織に腫瘍形成は認められなかった。

D. 考察

私たちはこれまでの研究によって、「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、筋幹細胞は単一細胞由来のクローンとして増殖できるのに対し、非筋細胞は増殖できないことを明らかにした。私たちは、当初、マウス筋幹細胞を用いて分離培養条件の最適化を行ってきたが (Wada, et al., 2002; Hashimoto, et al., 2004)、昨年度の本分担研究により、ヒト筋組織からの筋幹細胞分離培養においても、低密度培養法が有効であることを明らかにした。さらに分離培養法に改良を加えることにより、70 歳以上の高齢者に由来する筋組織からも、十分な増殖分化能を持つ筋細胞を得ることに成功した。従来、高齢者の骨格筋組織には繊維化や脂肪化の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が、私たちの確立した分離培養法を用いることにより、非筋細胞の混入のない、ヒト筋細胞の純粋培養が可能になった。ヒト筋細胞の細胞移植治療への試みは、国内外で盛んに行われている。しかし、最も重要な細胞の調製方法（分離培養条件）に関しては、1970年代に報告された方法のマイナーチェンジの域を出ていない。私たちは、予備的研究において、従来の方法では、ヒト筋細胞に形態変化が惹起され、私たちの培養法に比べて増殖が大きく低下することを見だしている。筋細胞移植治療においては、移植細胞の「質」が治療効果の有無に直結する、もっとも重要な要因であると考えられる。にもかかわらず、従来研究における移植細胞の「質」についての検討は、筋細胞マーカー分子の発現を確認するに止まっており、十分とは言えない。私たちの確立したヒト筋幹細胞の分離培養法は、従来法に比べて増殖分化能が高く、形態変化も見られない筋細胞を、再現性よく、大量に調製できるという点で、きわめて大きな利点を有している。

移植用ヒト筋細胞の増殖分化能力は、*in vitro* 培養系で検討されてきた。しかし、それは必ずしも、筋組織内(*in vivo*)における筋形成・筋再生への貢献を保障するものではなかった。昨年度、私たちは、独自に樹立した不死化ヒト筋細胞を免疫不全マウス骨格筋に移植し、不死化ヒト筋細胞が *in vivo* における筋再生に貢献できることを報告した。こうして確立できた「免疫不全マウスを宿主とする、ヒト筋細胞の *in vivo* 機能および安全性検定系」は、従来検討されていなかった「筋組織内における筋形成・筋再生への寄与」を保障する有力な評価システムとなりうる。今回、移植された初代培養ヒト筋細胞の筋形成への寄与が確認できたことは、培養ヒト筋細胞の *in vivo* における機能を保障する科学的

証拠が得られたという意味で、たいへん重要である。この *in vivo* 検定系を用いて、長期間の移植（6ヵ月をメドとする）を行い、造腫瘍性の有無、形成された筋繊維が維持されるか、を検討する必要がある。また、免疫不全マウス骨格筋への移植実験系は、筋細胞移植の有効性を高めるための宿主筋組織の処置方法の開発など、臨床研究実施にむけて解決が望まれる種々の課題に対して有用な *in vivo* 検定系となると考えられる。

E. 結論

前立腺全摘出手術時に、切開部位より摘出した腹直筋あるいは錐体筋より、再現性よく筋幹細胞を分離し、培養する方法を確立した。得られた培養ヒト筋細胞を免疫不全マウス骨格筋に移植し、ヒト筋細胞が生体内における筋繊維形成に寄与出来ることを確認した。免疫不全マウス骨格筋への移植実験系は、臨床研究実施のために解決が望まれる種々の課題に対して有用な *in vivo* 検定系となると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

- 1) 向敦史、橋本有弘
Specification of fusion-competent areas of plasma membrane in myogenic cells
日本発生物学会第41回大会
徳島、2008年5月28日～30日
- 2) 柳澤美智子、橋本有弘
Inhibition of myogenesis and myogenin promoter activity by mutated ALK2 found in a heritable human disease
日本発生物学会第41回大会
徳島、2008年5月28日～30日