

骨髄由来細胞移植による膀胱再生

信州大学医学部泌尿器科学講座

今村 哲也

I はじめに

近年、何らかの原因によって機能を失った臓器の再生、難治性疾患の治療、あるいは、臓器移植における慢性的なドナー不足を補うことを目的とした再生医療研究が精力的に行われている。我々は、放射線治療、膀胱破裂、難治性神経因性膀胱、糖尿病などにより、膀胱組織が傷害を受け排尿機能や蓄尿機能が低下もしくは、消失した膀胱に対し、正常な膀胱機能を取り戻すための再生医療研究を進めている。その戦略は、傷害を受けた部位に、患者から採取した骨髄由来細胞を注入移植することによって、膀胱を再生させるというものである。本稿では、マウス凍結傷害膀胱モデルを用いた、骨髄由来細胞移植による膀胱再生の可能性について述べる。また、生体微小環境の視点から骨髄由来細胞移植による膀胱再生について考察する。

II 骨髄由来細胞移植による膀胱再生

我々は、5週齢 ICR マウスをドナーとし、同週齢ヌードマウスをレシピエントとした同種移植実験を行っている。ICR マウスの大腿骨から骨髄細胞を採取し、コラーゲンコートされた培養皿で7日間初代培養を行う¹⁾。この初代培養の目的は、①移植に必要な細胞数を確保する、②コラーゲン接着性を利用して混在している血球細胞、造血幹細胞などを除去する、③レシピエント組織内で移植した細胞を検出するために緑蛍光色素タンパク (GFP) 遺伝子を導入することである。7日間の培養期間で、培養皿に接着・伸展し、増殖した細胞を骨髄由来細胞として移植実験に用いている (図1)。また、培養終了時点の骨髄由来細胞は、平滑筋特異的抗体 (alpha smooth muscle actin: SMA) に対して陰性、つまり平滑筋細胞への分化を遂げていない細胞であることを確認している。

骨髄細胞の初代培養と並行して、移植3日前に、レシピエントとなるヌードマウスの膀胱に、ドライアイスで冷却した金属棒を30秒当てることによって、凍結傷害を与える¹⁾。凍結傷害を与えて3日後の膀胱には、

膀胱全体の約3分の1を占める膀胱平滑筋層が消失した凍結傷害部位がある (図1)。凍結傷害が及ばなかった残りの部位は、正常膀胱組織と同等の平滑筋層を有している¹⁾²⁾。膀胱内圧測定から、この凍結傷害膀胱モデルは、典型的かつ規則的な膀胱収縮が消失していることを確認している¹⁾。

凍結傷害を与えてから3日後、培養によって得られた骨髄由来細胞 (1×10^5 個) を凍結傷害部位に注入移植する。対照群には無細胞液を注入する。移植14日後、対照群では SMA 陽性細胞がほとんど存在しないが、細胞移植群では SMA 陽性細胞からなる平滑筋層が再構築される (図2)。再構築された平滑筋層の中には、GFP と SMA の両抗体に陽性な細胞、即ち、移植した骨髄由来細胞から分化した平滑筋細胞が認められる (図2)。その平滑筋細胞は互いに、または、ホストの平滑筋細胞と結合し層構造を構築している¹⁾。膀胱内圧測定において、対照群では膀胱収縮を認めないが、細胞移植群では正常膀胱と同等の高い膀胱収縮圧と規則正しい膀胱収縮が認められる¹⁾。以上の結果から、骨髄由来細胞移植により機能的な膀胱の再生が可能だと考えられる。

III 膀胱再生を可能にした生体微小環境

一般的に正常組織への(幹)細胞注入移植では、生着率が1%にも満たないことが知られている。我々も、正常膀胱組織への骨髄由来細胞の注入移植実験から、移植された細胞はほとんど生着しないことを確認している。しかし、凍結傷害を与えた膀胱組織に骨髄由来細胞を移植すると、高い生着率、平滑筋細胞への分化を示すとともに、平滑筋層の再構築を示す。このことから、我々は、凍結傷害を与えてから3日後の膀胱組織における生体微小環境に高い関心を寄せている²⁾。

凍結傷害を与えた部位では、正常膀胱では認められないハニカム様構造が形成されている (図3)。これは、凍結傷害によって平滑筋細胞がアポトーシスなどにより死滅したことで形成された構造であると考えられる²⁾。我々は、注入移植された骨髄由来細胞は、こ

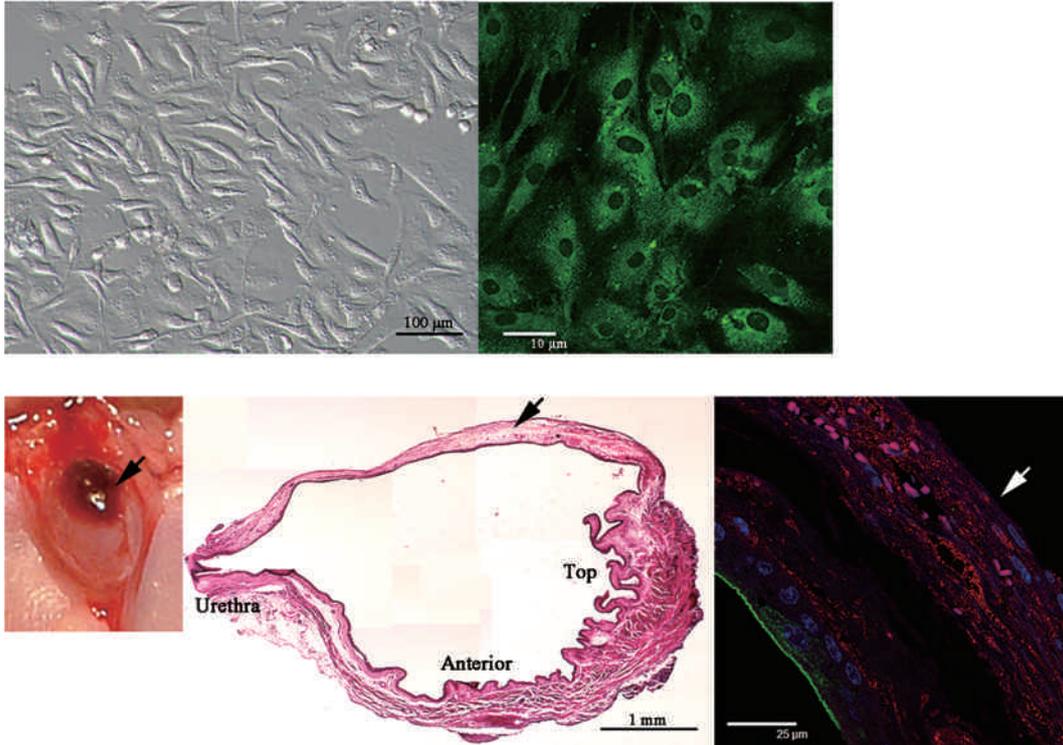


図1 骨髄由来細胞と凍結傷害膀胱モデル

初代培養によって、培養皿に接着・伸展し、増殖した GFP 発現骨髄由来細胞（上段）。凍結傷害を与えてから3日後、傷害部位（矢印）では、平滑筋層が消失している（下段）。

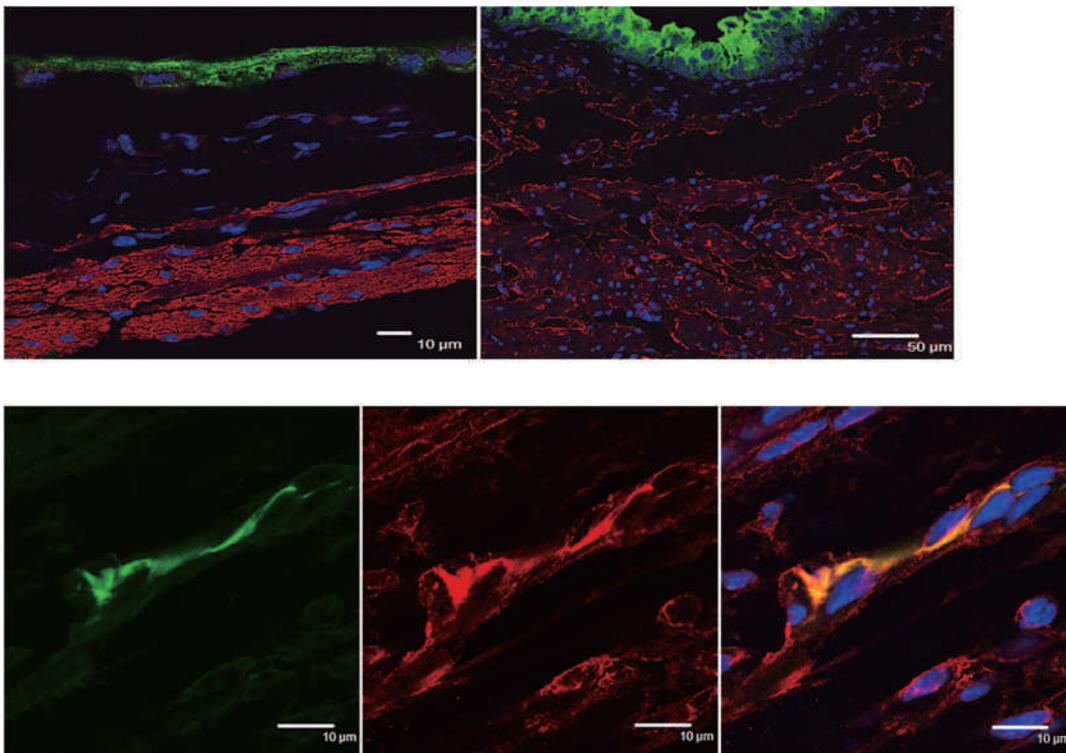


図2 膀胱平滑筋の再生と骨髄由来細胞の平滑筋細胞への分化

骨髄由来細胞を移植すると平滑筋層が再生する（上段左）が、対照群では平滑筋層は形成されない（上段右）。再生した平滑筋層には、GFP 抗体（下段左）と平滑筋マーカー（下段中央）に両陽性な細胞、即ち、骨髄由来細胞が平滑筋細胞に分化した細胞（下段右）が認められる。

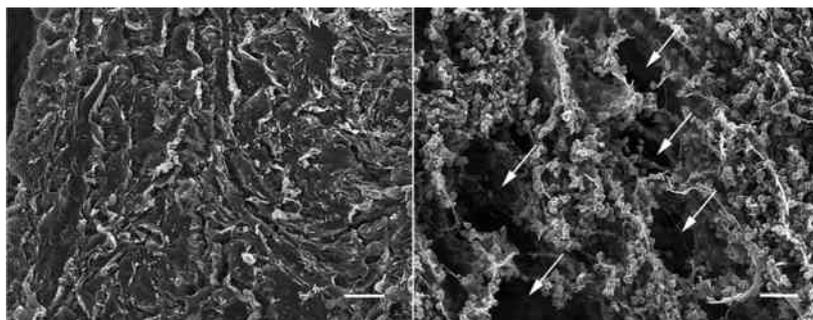


図3 凍結傷害部位の平滑筋層

正常膀胱での平滑筋層（左）には認められないが、凍結傷害部位には、ハニカム様構造（右、矢印）が形成される。

のハニカム様構造にトラップされることにより生着率が向上するのではないかと考えている。さらに、このハニカム様構造は、組織構築に必須な細胞の足場としての役割を担ったのではないかと考えている。

凍結傷害膀胱と正常膀胱における84種類の Growth factor mRNA を PCR アレイ解析すると、正常膀胱と比較して凍結傷害膀胱では、炎症反応、血管新生、組織治癒に関する19種類の Growth factor mRNA が統計学的に有意な高レベル発現を示す²⁾。特筆すべきは、平滑筋細胞への分化に関与する Growth factor である、secreted phosphoprotein 1 (SPP1), inhibin beta-A (INHBA), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), transforming growth factor beta1 (TGFB1) mRNA が含まれていることである。これは、凍結傷害が及ばなかった部位からの自然治癒が起こるからだと考えている。そして、SPP1, INHBA, GDNF, TGFB1 mRNA から翻訳された Growth factor は、移植した骨髄由来細胞の平滑筋細胞への分化に、大きく関与するのではないかと考えられる。

IV 今後の再生医療研究

Tissue Engineering は、細胞、細胞の足場と、Growth factor の3要因から構成されている。骨髄由来細胞は、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋肉細胞、神経細胞などに分化する多分化能を有している。一方で、凍

結傷害を受けた膀胱組織では、細胞の足場となりうるハニカム様構造を有し、さらに、平滑筋細胞への分化を誘導する Growth factor が発現している。つまり、骨髄由来細胞移植によって膀胱の再生に成功したのは、Tissue Engineering を構成する3要素を満足したからだと考えている。

現在の再生医療研究は、利用する幹細胞の供給源、分化能力、分化機序と制御などの細胞生物学的研究、あるいは、細胞の足場となるバイオマテリアルの開発、Growth factor デリバリーシステムの開発などの生物工学的研究など多種多様な領域で精力的に研究が行われている。しかし、利用する(幹)細胞の生着率、分化効率と制御、組織再構築に大きく影響を与える生体微小環境に関する研究は、ほとんど皆無である。日進月歩の発展を続ける幹細胞研究やバイオマテリアル研究と、再生が必要な患部における生体微小環境の研究とが融合したとき、高成績が期待できる再生医療が実現するだろう³⁾。

V ま と め

何らかの原因によって傷害を受けた膀胱に対して、骨髄由来細胞移植は機能的な膀胱再生に有用な治療となり得る可能性を示した。また、今後の再生医療におけるブレイクスルーには、生体微小環境の研究が必須である。

文 献

- 1) Imamura T, Kinebuchi Y, Ishizuka O, Seki S, Igawa Y, Nishizawa O: Implanted mouse bone marrow-derived cells reconstruct layered smooth muscle structures in injured urinary bladders. *Cell Transplantation* 17: 267-278, 2008
- 2) Imamura T, Yamamoto T, Ishizuka O, Gotoh M, Nishizawa O: The microenvironment of freeze-injured mouse urinary bladders enables successful tissue engineering. *Tissue Engineering* 15: 3367-3375, 2009
- 3) Imamura T, Ishizuka O, Yamamoto T, Gotoh M, Nishizawa O: Bone marrow-derived cells implanted into freeze-injured urinary bladders reconstructs functional smooth muscle layers. *LUTS* 2: 1-10, 2010