



|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 下部尿路閉塞膀胱における膀胱の形態的および機能的変化の機序の解明                                                                |
| Author(s)           | 菅野, 由岐子                                                                                         |
| Description         | 配架番号 : 2081                                                                                     |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                           |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                          |
| Dissertation Number | 甲第11209号                                                                                        |
| Issue Date          | 2014-03-25                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k11209">https://doi.org/10.14943/doctoral.k11209</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/58153">https://hdl.handle.net/2115/58153</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | Yukiko_Kanno.pdf                                                                                |



# 学 位 論 文

下部尿路閉塞膀胱における膀胱の形態的および機能的変化の機序の解明

(The mechanisms of morphological and functional changes  
in the bladder with partial bladder outlet obstruction)

2014 年 3 月

北 海 道 大 学

菅野 由岐子

## 目次

|                 |    |
|-----------------|----|
| 発表論文目録および学会発表目録 | 1  |
| 緒言              | 3  |
| 略語表             | 5  |
| 第1章             |    |
| 緒言              | 7  |
| 実験方法            | 8  |
| 結果              | 11 |
| 考察              | 16 |
| 第2章             |    |
| 緒言              | 20 |
| 実験方法            | 21 |
| 結果              | 23 |
| 考察              | 27 |
| 総括および結論         | 29 |
| 謝辞              | 30 |
| 引用文献            | 31 |

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下のとおり Accept 済みである。

Kanno Y, Mitsui T, Sano H, Kitta T, Moriya K, Nonomura K.  
CONTRIBUTION OF BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL  
STEM CELLS TO THE MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE BLADDER  
AFTER PARTIAL OUTLET OBSTRUCTION: A PRELIMINARY STUDY

投稿先 : The International Journal of Urology

本研究の一部は以下のとおり投稿済みである。

Kanno Y, Mitsui T, Kitta T, Moriya K, Tsukiyama T, Hatakeyama S,  
Nonomura K.  
AN INFLAMMATORY CYTOKINE IL-18 IS INVOLVED IN BLADDER  
REMODELING AFTER BLADDER OUTLET OBSTRUCTION IN MICE

投稿先 : The Journal of Urology

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Kanno Y, Mitsui T, Sano H, Moriya K, Tanaka H, Nonomura K.  
Contribution of bone marrow derived stromal cells to the regeneration of the  
bladder after partial outlet obstruction.  
26<sup>th</sup> Annual Meeting of European Association of Urology Congress.  
March 18-22, 2011. Vienna, Austria

Kanno Y, Mitsui T, Sano H, Moriya K, Tanaka H, Nonomura K.  
Contribution of bone marrow derived stromal cells to the regeneration of the  
bladder after partial outlet obstruction.  
106<sup>th</sup> American Urological Association Annual Meeting.

May 14-19, 2011. Washington DC, USA.

Kanno Y, Mitsui T, Kitta T, Moriya K, Tsukiyama T, Hatakeyama S,  
Nonomura K.

An inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  involved in bladder remodeling after partial  
bladder outlet obstruction.

43<sup>rd</sup> Annual Meeting of International Continence Society

August 26-30, 2013. Barcelona, Spain.

菅野由岐子、三井貴彦、千葉博基、今雅史、橘田岳也、守屋仁彦、野々村克也  
下部尿路閉塞膀胱における炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  の関与～IGF-1 を介した  
リモデリングの機序の解明～

第 20 回排尿機能学会総会

平成 25 年 9 月 18 日～21 日 静岡市

## 緒言

前立腺肥大症は加齢とともに有病率が増加する疾患であり、組織学的にみると60歳の男性では50%以上に、85歳までの男性の約90%に認められ、その1/4に臨床症状が出現する<sup>1</sup>。そのため、社会の高齢化が進む現代では、泌尿器科の日常診療で扱う機会が多くなっている。前立腺肥大症では機械的な下部尿路通過障害が生じるが、一方、神経因性膀胱においても排尿筋 - 尿道括約筋協調不全により機能的な下部尿路通過障害が生じることがある。これらの前立腺肥大症や神経因性膀胱により、通過障害に起因する膀胱組織・排尿機能の変化が見られることが知られている<sup>2,3</sup>。これは、膀胱の出口部尿道が部分的閉塞を起こすことにより、慢性的な高圧排尿状態、慢性的な尿閉状態で膀胱壁の過進展が生じ、そのために虚血状態が続くことが一因であると考えられている<sup>4</sup>。

前立腺肥大症や神経因性膀胱によって生じる下部尿路閉塞では、膀胱排尿筋の変化として初期には下部尿路閉塞の抵抗に抗って排尿を行うために代償性に膀胱排尿筋の過形成が起きるが、晩期には膀胱排尿筋の平滑筋組織が次第にコラーゲンを主体とした線維性組織に置換されることが知られている<sup>3</sup>。これらの変化が進むと、下部尿路閉塞が外科的治療などで解除されたとしても、下部尿路機能障害や下部尿路症状が持続し、排尿筋過活動、過活動膀胱や低活動膀胱の病態がみられることがある<sup>5</sup>。特に70歳以上の下部尿路症状は膀胱収縮障害によることが多いといわれている<sup>5</sup>。しかし、これらの膀胱の二次的変化の機序は未だに不明な点が多く、根本的な治療も確立されていない。

尿路上皮細胞は、様々な受容体、イオンチャネルを表面に発現させ、自らもATP、Nitric oxide、Prostaglandine、アセチルコリンなどのメディエーターを産生し、排尿・蓄尿機能に関与している。また、膀胱壁の虚血や炎症、酸化ストレスによってもこれらのメディエーターの発現が変化することが知られている。下部尿路閉塞膀胱においても同様に虚血や炎症、酸化ストレス状態がおこるため、様々なメディエーターが膀胱の二次的変化にかかわっていることが想定できる。

近年、心臓において心不全などの圧負荷がかかる疾患では、炎症性サイトカインであるInterleukin-18 (IL-18)が心臓のリモデリングに関与するという報告がある。膀胱でも下部尿路閉塞状態において組織でのIL-18発現が高くなることが示されているが<sup>6</sup>、どのような役割を果たしているのかは明らかになってい

ない。

一方、近年の組織再生医学の進歩に伴い、自身の細胞を使うことで免疫学的拒絶反応や慢性的なドナー不足に苦慮することなく、障害を受けた臓器を再生させようとする研究が精力的に進められている。放射線治療などで組織が障害された膀胱においても、こうした再生医療の研究の可能性が試みられている<sup>7)</sup>。下部尿路閉塞に長期間さらされた結果、二次的な組織学的・形態学的変化を起こした膀胱においても、こうした再生技術をヒトにおいて確立されれば、外科的もしくは薬物治療による閉塞解除と併用することで、前立腺肥大症や神経因性膀胱によって生じる下部尿路機能障害や下部尿路症状の改善に大きく寄与する可能性がある。

本研究では、前立腺肥大症や神経因性膀胱などによって生じる下部尿路閉塞によって生じる組織学的および機能学的変化の機序を明らかにすることを目的とした。第1章では下部尿路閉塞後の膀胱に生じる組織学的・機能学的変化における炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  の関与について、つづいて第2章では下部尿路閉塞膀胱に遊走・接着した骨髄由来間質細胞 (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: BMSC) について免疫組織化学的手法を用いて下部尿路閉塞後の膀胱に生じる組織学的変化への骨髄由来細胞の関与について検討した。

## 略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下のとおりである。

|              |                                                  |
|--------------|--------------------------------------------------|
| $\alpha$ SMA | alpha smooth muscle actin                        |
| BC           | bladder capacity                                 |
| BMSC         | bone marrow-derived mesenchymal stem cells       |
| DMEM         | Dulbecco`s modified Eagle medium                 |
| FBS          | fetal bovine serum                               |
| GFP          | green fluorescent protein                        |
| HE           | hematoxylin and eosin                            |
| IGF- I       | insulin-like growth factor- I                    |
| IL-1 $\beta$ | interleukin-1 $\beta$                            |
| KO           | knockout                                         |
| MP           | micturition pressure                             |
| mRNA         | messenger ribonucleic acid                       |
| NVC          | non voiding contraction                          |
| pBOO         | partial bladder outlet obstruction               |
| PBS          | phosphate buffered saline                        |
| PFA          | paraformaldehyde                                 |
| PVR          | post-void residual urine volume                  |
| RT-PCR       | reverse transcription–polymerase chain reactions |
| SD           | Sprague-Dawley                                   |
| SDF- I       | stromal cell-derived factor- I                   |
| TGF- $\beta$ | transforming growth factor- $\beta$              |
| WT           | wild type                                        |



## 第 1 章

下部尿路閉塞膀胱における炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  の関与  
～IGF- I を介したリモデリングの機序の解明～

An inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  involved in bladder remodeling  
after partial bladder outlet obstruction

## 緒言

前立腺肥大症や神経因性膀胱などの partial bladder outlet obstruction (pBOO)において、低酸素/虚血と機械的進展が膀胱壁の形態学的および機能的変化に関与している。低容量および排尿筋過活動もしくは排尿筋低活動などの下部尿路機能障害ばかりでなく、頻尿、排尿障害、残尿量の増加、尿意切迫感や切迫性尿失禁などの下部尿路症状を引き起こす。

近年、成長因子やサイトカインまたはケモカインが膀胱の炎症を誘導し、pBOO 後の膀胱組織のリモデリングに関与していることが指摘されている。また、pBOO 膀胱では炎症性サイトカインの発現が高くなっていることも明らかになっている。しかしながら、炎症が pBOO 膀胱における膀胱リモデリング関与しているかについては、いまだ議論のあるところである。

また、心臓において心不全などの圧負荷がかかる疾患では、炎症性サイトカインである Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )が心臓のリモデリングに関与するという報告が近年みられている。膀胱でも下部尿路閉塞状態において組織での IL-1 $\beta$  発現が高くなることが示されているが<sup>6</sup>、どのような役割を果たしているのかは明らかになっていない。

本研究では代表的な急性期の炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  に焦点を置き、IL-1 $\beta$  が pBOO での膀胱の形態学的・機能的変化に関与しているという仮説を立て、IL-1 $\beta$  ノックアウトマウスを用いて仮説を検証した。

pBOO の実験動物モデルを作製し、膀胱重量の変化や組織学的変化、サイトカインの messenger ribonucleic acid (mRNA)レベルでの定量、膀胱機能学的検査を行った。結果、pBOO 膀胱では IL-1 $\beta$  が Insulin-like growth factor- I (IGF-I)発現亢進を通して膀胱平滑筋の過形成にかかわっており、膀胱機能検査においても膀胱容量や排尿時圧といった尿流動態のパラメータに変化を及ぼすことが明らかになった。また、IL-1 $\beta$  は TGF- $\beta$  の発現を亢進させており、TGF- $\beta$  は後述するように臓器の線維化にかかわる成長因子であることから、pBOO 後の膀胱の末期の状態としての膀胱壁の線維化においても IL-1 $\beta$  が役割を担う可能性が考えられた。

## 実験方法

### 1. 実験動物

体重17-19gの生後8週齢雌性C57/BL6系統マウス (Japan Slc. Inc., Shizuoka, Japan) をwild type (WT)群として使用した。また、東京大学岩倉洋一郎教授より分与していただいた IL-18<sup>-/-</sup> miceをknockout (KO)群として使用した。本研究に関する実験プロトコールは北海道大学動物実験委員会によって承認された。飼育および実験に関しては、北海道大学医学研究科「動物実験に関する指針 (Guide for the Care and use of Laboratory Animals)」に準拠した。WTおよびKOにおいて、後述する方法で近位部尿道を結紮しpBOO手術を施行し、それぞれWT-pBOO群、KO-pBOO群とした。また、後述するsham手術をWTに施し、WT-sham群とした。さらに、KOに対しpBOO手術を施した後にIGF- I を腹腔内投与 (50μg/kg/day) した群をKO-IGF- I 群とした。

### 2. pBOO 手術および sham 手術

ペントバルビタール (0.04mg/g body weight; Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan)の腹腔内投与により麻酔した。下腹部正中切開後に膀胱および尿道を露出した後に、傍尿道血管の損傷に注意しつつ膣壁より尿道を注意深く剥離した。直径0.55mmの金属ロッドを近位部尿道に沿わせ、4-0絹糸にて尿道とロッドを共に結紮した。その後ロッドを取り除き、閉腹した (KO-pBOO群, WT-pBOO群, KO-IGF- I 群)。WT-sham群では、尿道を全周性に同様に剥離するのみで結紮を行わないsham手術を施行した。後述する検討3, 検討4, 検討6では、手術後1, 3, 12週後にマウスを屠殺した後に膀胱を摘出した。各群とも各週あたりn=8とした。検討5については手術後3週後で検討を行い、各群n=6とした。

### 3. 膀胱重量測定

摘出した膀胱は周囲脂肪組織を取り除き、尿を完全に排出したのち、電子天秤 (CP124S, sartorius社, Germany) にて膀胱重量を測定した。

### 4. 組織学的検討

膀胱は4%paraformaldehyde (PFA)溶液で固定し、中心で縦に二分割したのちにパラフィン包埋した。ミクロトームにて3μmの厚さに薄切し、組織学的検

討のためHematoxylin and eosin (HE) 染色を行った。

## 5. 膀胱機能学的検討

マウスにジエチルエーテル (Kanto Chemical.CO., Inc., Tokyo, Japan)にて吸入麻酔を行った後に下腹部正中切開をおき、膀胱頂部からポリエチレン製カテーテル(PE-50, Clay Adams, Parsippany, NJ)を挿入し、先端を膀胱内にカテーテル留置した。カテーテル周囲より明らかなリークがないことを確認した後に、もう一方の先端をマウスの背側から体外に出した。マウスが完全に麻酔から覚醒したのちに、カテーテルを圧モニターおよび生理食塩水注入用ラインとして使用して尿流動態測定システム (Nihon Kohden, Japan) にて下部尿路機能検査を行った。下部尿路機能では以下の尿流動態検査の項目を測定した: 1) 膀胱容量 bladder capacity (BC); 2) 排尿時圧 micturition pressure (MP); 3) 無抑制収縮の回数 non-voiding contraction (NVC); 4) 残尿量 post-void residual urine volume (PVR)。

## 6. RNA抽出、reverse transcription–polymerase chain reactions (RT-PCR) , Quantitative real-time PCRs

膀胱は、摘出後液体窒素で速やかに-80℃に凍らせた。サイトカイン (IL-1 $\beta$ , IGF-1, TGF- $\beta$ )のmRNA発現を測定するためにRT-PCRを施行した。RNAをISOGEN(Wako, Osaka, Japan)を用いて抽出しcDNAへ逆転写した。

RT-PCR は RNA 全量 (400ng) を 20 $\mu$ L とし、50℃, 30 分の条件で Rever-Tra-Plus (Toyobo, Osaka, Japan)を用いて行った。PCRでは、94℃, 20秒変性、60℃, 20秒アニーリング、72℃, 30秒伸長反応を25-28サイクル施行した。プライマーシーケンスは以下の通りである。

Ppia, forward: 5'-GAGCTGTTTGCAGAC AAAGTTC-3';

Ppia, reverse: 5'-CCCTGGCACATGAATCCTGG-3';

IL-1 $\beta$  forward: 5'-GGGATGATGATGATAACCTG-3',

IL-1 $\beta$  reverse: 5'- TGGTCGTTGCTTGGTTC TCCT-3'

TGF- $\beta$ ,forward:5'-AGCTGGTGAAACGGAAGCG-3';

TGF- $\beta$ ,reverse:5'-GCGAGCCTTAGTTTGGACAGG-3';

IGF- I ,forward:5'-CTCTGCTTGCTCACCTTC-3';

IGF- I , reverse: 5'-CCTTCTCCTTTGCAGCTTC-3';.

Quantitative real-time PCRはSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用い、StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems)で施行した。

## 7. 統計学的解析

データは中央値±標準誤差で示した。解析は群間の比較にnon-parametric Mann-Whitney U-testを用い、p-value <0.05を有意差ありとした。

## 結果

### 1. 膀胱重量 (図1)

WT-pBOO 群において、WT-sham 群よりも膀胱重量は有意に増加していた。WT-pBOO 群での膀胱重量は手術後 1 週間後で最大となり、その後緩徐に減少するものの、12 週の時点で WT-sham 群よりも有意に大きかった。KO-pBOO 群において、WT-pBOO 群に比し膀胱重量の増加は有意に抑えられた。しかし KO-IGF I 群では WT-pBOO 群で見られたような膀胱重量の増加が再現された。

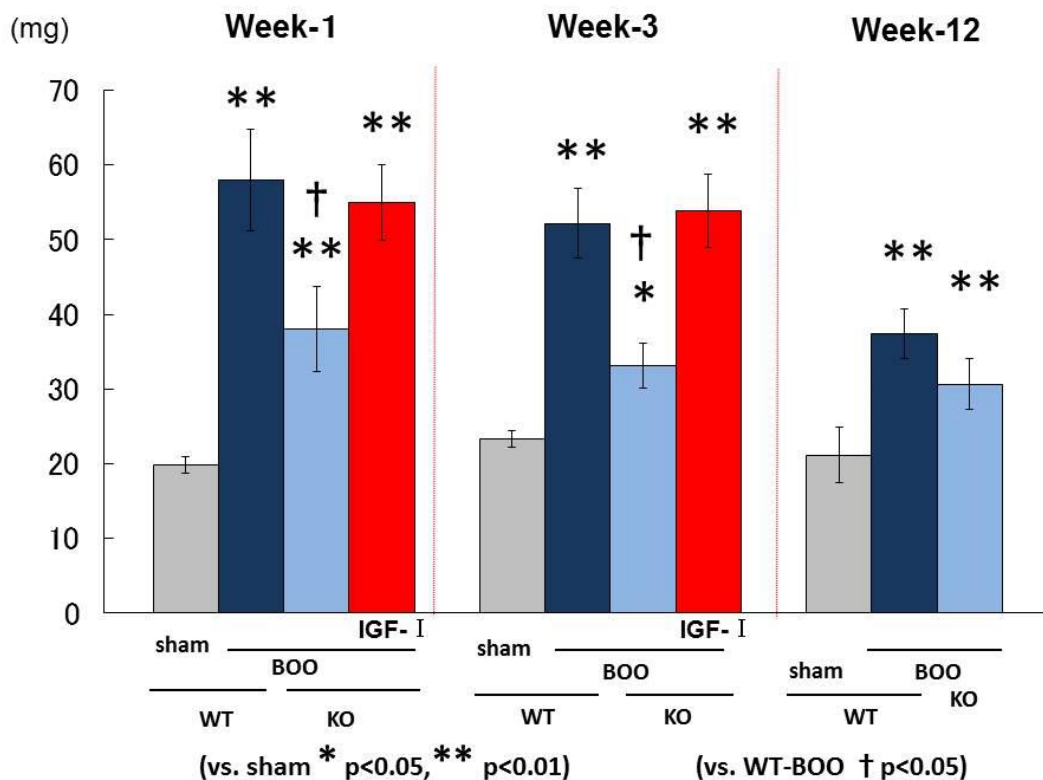


図. 1 : 膀胱重量の変化

WT-pBOO 群では WT-sham 群に比べ有意に膀胱重量が高値であったが、KO-pBOO 群においては、膀胱重量の増加が有意に抑制された。一方、KO-IGF I 群では膀胱重量の増加が再現された。

### 2. 組織学的検討 (図 2)

HE 染色では、WT-pBOO 群において手術後 1 週後で間質の浮腫がみられ、

手術後 3 週後で膀胱平滑筋の過形成が見られた。KO-pBOO 群では平滑筋の過形成は WT-pBOO 群に比べて軽度であったが、KO-IGF- I では WT-pBOO 群と同様な平滑筋の過形成が見られた。

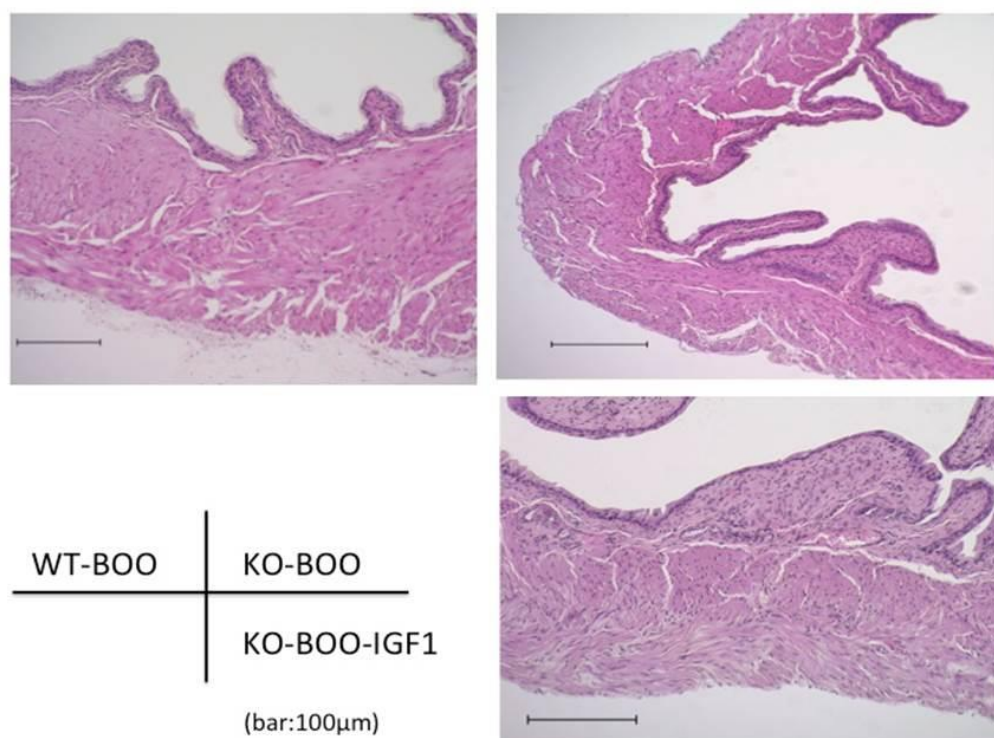


図 2：組織学的検討 pBOO 手術後 3 週後

WT-pBOO 群では間質の浮腫と平滑筋の過形成が観察される。一方 KO-pBOO 群では筋過形成は緩徐であり、IGF- I 投与により WT-pBOO 群と同等の筋過形成が再現された。

### 3. サイトカイン発現量

WT-pBOO 群では WT-sham 群に比べ、手術後 1 週で IL-1 $\beta$  が有意に高く発現していた(図 3)。また、IGF- I は、WT-pBOO 群で pBOO 後すべての週において WT-sham 群に比べ有意に発現量が高かった。TGF- $\beta$  は手術後 6 週後において WT-pBOO 群で WT-sham 群に比べて有意に発現量が高かった(図 4)。KO 動物では IL-1 $\beta$  は感度以下で検出されず、IGF- I および TGF- $\beta$  は WT-pBOO 群および WT-sham 群の間に有意な差はなかった(図 4)。

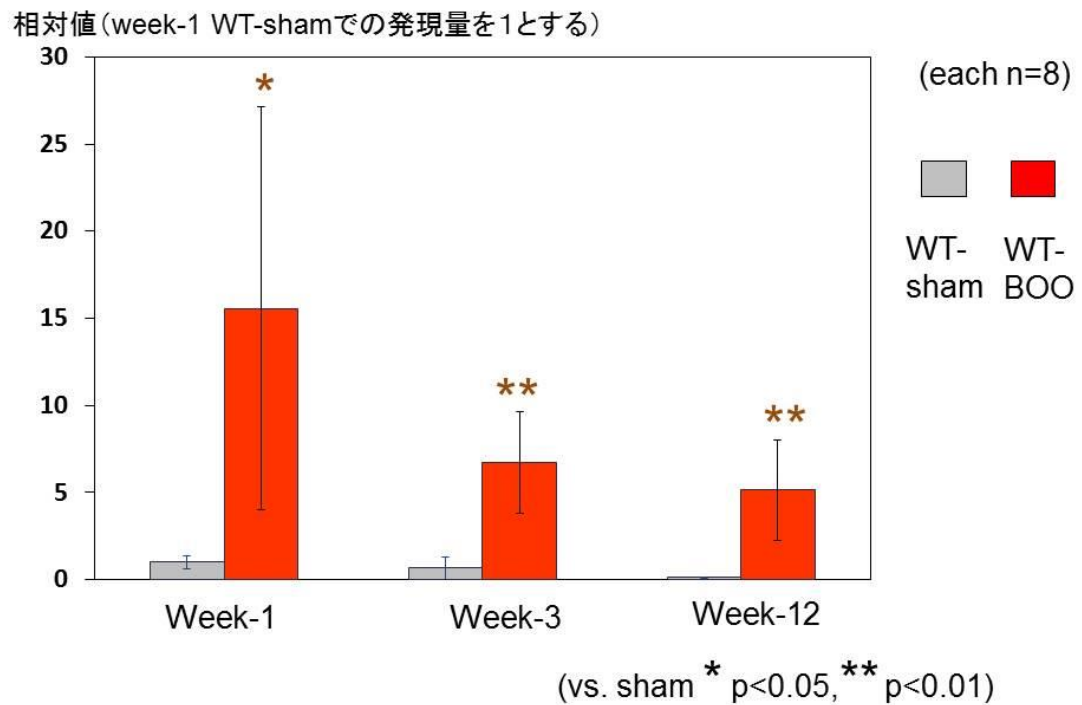


図 3 : WT における IL-18 発現量

IL-18 は pBOO 手術後 1 週後に有意に発現が上昇し、その後減少するものの、手術後 12 週後でも高発現を示した。



相対値 (week-1 WT-shamでの発現量を1とする)

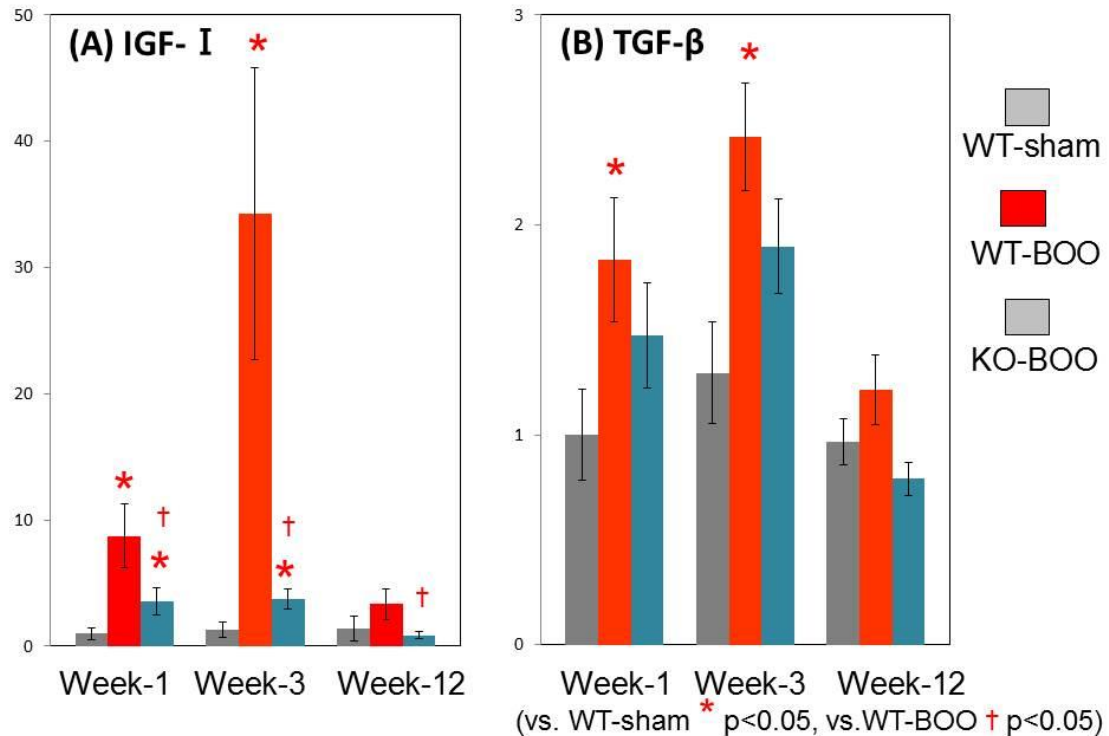


図 4: サイトカイン発現量

(A) pBOO 手術後有意に IGF- I の発現が亢進していた。KO-pBOO 群では、IGF- I は WT-pBOO 群に比べ有意に発現が低かった。

(B) pBOO 手術後 TGF-β の発現は有意に亢進していた。KO-pBOO 群では、TGF-β は WT-sham 群と有意差が見られなかった。

#### 4. 下部尿路機能学的検査

下部尿路機能検査では、WT-pBOO 群において WT-sham 群に比べ BC および MP は有意に高値であった(表 1)。KO-pBOO 群において、WT-pBOO 群に比べ BC および MP は有意に低かった。NVC および PVR はいずれも各群で明らかな有意差は見られなかった。

|                                   | WT-sham                | WT-BOO                 | KO-BOO                             |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------------------|
| <b>BC (μl)</b>                    | <b>51</b><br>(±11.6)   | <b>199*</b><br>(55.0)  | <b>77<sup>†</sup></b><br>(±22.2)   |
| <b>MP</b><br>(mmH <sub>2</sub> O) | <b>40.6</b><br>(±6.29) | <b>54.8*</b><br>(±7.0) | <b>47.8<sup>†</sup></b><br>(±4.77) |
| <b>NVC</b><br>(times/micturition) | <b>1.31</b><br>(±1.25) | <b>7.19</b><br>(±4.33) | <b>4.23</b><br>(±1.45)             |
| <b>PVR (μl)</b>                   | <b>0</b><br>(±0)       | <b>7.5</b><br>(±4.79)  | <b>5.0</b><br>(±2.89)              |

(\*: p<0.05 vs. WT-sham)

(<sup>†</sup>: p<0.05 vs. WT-BOO)

表 1 : 下部尿路機能検査の各パラメータ

KO-pBOO 群では WT-pBOO 群に比べ有意に BC, MP が低く、pBOO 手術後の下部尿路機能の変化が抑えられた。

## 考察

下部尿路閉塞膀胱では、膀胱壁の虚血や低酸素状態、および機械的進展によって、形態学的、機能学的変化を引き起こすことが知られている。実際、低容量および排尿筋過活動もしくは排尿筋低活動などの下部尿路機能障害や、頻尿、排尿障害、残尿量の増加、尿意切迫感や切迫性尿失禁などの下部尿路症状を引き起こす。今回の研究では、IL-18 ノックアウトマウスを用い、pBOO 後の膀胱において IGF- I の発現を亢進させることで膀胱平滑筋の過形成を引き起こし、膀胱機能の面からも下部尿路機能障害を起こすことを明らかにした。これは pBOO 膀胱において、膀胱のリモデリングに IL-18 が関与することを示した最初の報告である。

pBOO 手術後 1 週後において、炎症性サイトカインである IL-18 の発現が高値となり、膀胱にも平滑筋の過形成や線維化などの形態的变化が見られたとする報告がある<sup>6</sup>。しかしながら、今回の研究では術後 12 週においても IL-18 の発現が高い状態持続した。これは慢性期においても IL-18 が膀胱のリモデリングに何らかの役割があることを示唆していると考ええる。pBOO 手術後において、IL-18 ノックアウトマウスでは IGF- I の有意な発現上昇はみられず、平滑筋の過形成は野生型に比べ軽度であったが、IGF- I を投与することで平滑筋の過形成が引き起こされた。このことは、pBOO 膀胱の平滑筋過形成に、持続的な IL-18 の刺激およびそれによる IGF- I 分泌亢進が関わっていることを示唆している。IGF- I については、血管・膀胱などの平滑筋の過形成を促進する作用が指摘されており、pBOO 動物モデルでの膀胱平滑筋では IGF- I の mRNA 発現量が上昇していることが報告されている<sup>8</sup>。また、膀胱再生への有用性を示す報告もみられている<sup>9</sup>。

膀胱重量については、pBOO 手術後 1 週後に有意な上昇がみられた。これは主として間質の浮腫からくるものと考えられ、その後 pBOO 手術後 1 週間には平滑筋の過形成が見られた。今回の研究での膀胱重量の変化は、以前の報告と比較しても同様であり、pBOO モデルを再現できていることを示している<sup>10,11</sup>。Metcalf らは pBOO による膀胱の形態学的変化についても報告しており<sup>3</sup>、炎症性反応としての間質の浮腫が最初にみられ、続いて平滑筋の過形成が生じると述べている。今回の研究でのサイトカインの発現量を併せて考えると、間質の浮腫および平滑筋の過形成は、IL-18 および IGF- I の発現の亢進によって生

じていると考えられた。

下部尿路機能検査に関しては、野生型において、pBOO 手術後 3 週後での BC および MP は sham 手術した群に比べ有意に高かった。しかしながら IL-18 ノックアウトマウスでは、このような変化は見られなかった。これは IL-18 がおそらくは炎症に関与しており、下部尿路機能の変化に関わっていることを示唆した。

他臓器に着目すると、最近の報告では IL-18 が圧負荷または容量負荷の心疾患において、心臓のリモデリングに関与することが明らかになっている<sup>12-15</sup>。慢性心不全では、高い末梢血管抵抗に抗って心拍出量を維持しようとするために心筋の過形成が生じる。圧負荷および機械的進展が IL-18 産生を誘導し、IGF-I 産生を通して心筋過形成と間質の線維化を引き起こすと報告されている<sup>12</sup>。このように IL-18 は組織のリモデリングを促進する働きを担っていると考えられる。今回の研究では、膀胱においても同様に IL-18-IGF-I 経路を介して膀胱平滑筋の過形成生じていることを示した。

IL-18-IGF-I 経路以外では、膀胱壁の虚血・低酸素と機械的進展が pBOO による膀胱のリモデリングのトリガーになっていることが知られている<sup>6,16,17</sup>。また我々は、古くから知られているケモカインの一つである stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)  $\alpha$  が pBOO 膀胱で発現が亢進していることを報告したが、SDF-1 $\alpha$  は pBOO での虚血により発現が亢進し、pBOO 膀胱での膀胱組織への BMSC の遊走に関与していた<sup>18,19</sup>。他の報告では、ヒト骨髄内皮細胞において IL-18 が SDF-1 $\alpha$  の発現を促進するとされている<sup>20</sup>。また、IL-18 の刺激により、半月板細胞と bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSC) が協調性をもって軟骨基質を産生することが明らかにされている<sup>21</sup>。このように IL-18 は、BMSC を介した臓器再生にも関わっていることが推察される。実際、膀胱の平滑筋過形成および線維化にも BMSC は関与しており、膀胱の線維化を抑える治療において BMSC の有用性を示唆する報告もある<sup>22</sup>。IL-18 を介したこのような様々な経路が、pBOO 膀胱のリモデリングに関わっている可能性があり、これらの機序のさらなる解明が必要である。

pBOO 膀胱の線維化については、今回の検討では IL-18 が線維化のトリガーになるか否かについて詳細な検討を行っていない。しかしながら今回の結果では、pBOO 後の IL-18 上昇により TGF- $\beta$  発現量が高くなっていた。TGF- $\beta$  は臓器の線維化にかかわっていることが明らかになっており、これまで腎臓、肺、肝臓な

どで報告がみられる<sup>23-25</sup>。またpBOO膀胱においても膀胱の線維化が生じ<sup>3</sup>、TGF- $\beta$ が膀胱の線維化を促進する可能性が報告されている<sup>26,27</sup>。以上より、IL-1 $\beta$ がTGF- $\beta$ 発現亢進を介して膀胱線維化にも関わっている可能性が推察される。IL-1 $\beta$ と線維化の関係についても、さらなる研究が今後必要である。

## 第 2 章

下部尿路閉塞膀胱における骨髄由来間質細胞の膀胱再生への寄与

Contribution of bone marrow derived stromal cells to the regeneration of the  
bladder after partial outlet obstruction.

## 緒言

下部尿路閉塞状態では、低酸素/虚血と機械的進展が慢性的に続くことで膀胱壁の形態学および機能的変化がおきる。形態学的には、当初下部尿路閉塞の抵抗に抗い排尿を実現するために平滑筋の過形成がみられるが、その後線維性組織へと置換していく<sup>3</sup>。こうした膀胱の組織学的変化は非可逆的であり、低容量および排尿筋過活動もしくは排尿筋低活動などの下部尿路機能障害ばかりでなく、頻尿、排尿障害、残尿量の増加、尿意切迫感や切迫性尿失禁などの下部尿路症状を引き起こす。

近年の組織再生医学の進歩に伴い、自身の細胞を使うことで、免疫学的拒絶反応や慢性的なドナー不足に苦慮することなく、障害を受けた臓器を再生させようとする研究が精力的に進められている。放射線治療などで組織が障害された膀胱においても、こうした再生医療研究の可能性が試みられている<sup>7</sup>。下部尿路閉塞に長期間さらされた結果、二次的な組織学的・形態学的変化を起こした膀胱においても、こうした再生技術をヒトにおいて確立されれば、外科的もしくは薬物治療による閉塞解除と併用することで、下部尿路機能障害や下部尿路症状の改善に大きく寄与する可能性がある。

今回、下部尿路閉塞膀胱に遊走・接着した骨髄由来間質細胞（BMSC）について免疫組織化学的手法を用いて下部尿路閉塞後の膀胱に生じる組織学的変化への骨髄由来細胞の関与について検討した。GFPを発現するトランスジェニックラットからの同種異型の骨髄細胞移植をしたキメララットを用い、組織染色および免疫蛍光法を pBOO 手術から 6 週間後に行った。結果、BMSC が pBOO 膀胱に遊走し、尿路上皮細胞や排尿平滑筋細胞などの複数の構成成分に分化し、pBOO 膀胱の形態学的な変化に関与する可能性を示した。

## 実験方法

### 1. GFP キメララットの作製

10 週齢の雌性 Sprague-Dawley(SD)ラット (Japan Slc.Inc ,Shizuoka, Japan) および、同齢の大阪大学岡部教授が作製された green fluorescent protein (GFP) トランスジェニック SD ラット(GFP ラット)(Japan Slc. Inc.)を使用した。GFP ラットは BMSC のドナーとするために用いた。本研究に関する実験プロトコールは北海道大学動物実験委員会によって承認された。飼育および実験に関しては、北海道大学医学研究科「動物実験に関する指針(Guide for the Care and use of Laboratory Animals)」に準拠した。

### 2. GFP ラット骨髓からの BMSC 抽出

GFP ラットはペントバルビタール (100 mg/kg, Dainippon Seiyaku, Osaka, Japan)を腹腔内投与することにより安楽死させ、以前より確立されている方法により GFP ラットの大腿骨および脛骨より BMSC を得た。骨髓を 10 % fetal bovine serum (FBS, Sigma) および抗生剤(100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml amphotericin B) (GIBCO.NY, USA)を含んだ Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) / Ham's F12 (1:1) (Sigma, Mo, USA)にてフラッシュすることで BMSC を得た。

### 3. 放射線照射および骨髓移植

SD ラット自身の骨髓細胞を死滅させることを目的に、放射線照射(12 Gy/body) (HITACHI MBR-1520R-3)を行い、その翌日に GFP ラットより得られた BMSC ( $5 \times 10^6$  個)を尾静脈より投与することにより骨髓移植を施行した。骨髓移植施行後 6 週後に末梢血を採取し、フローサイトメトリおよび蛍光顕微鏡にて GFP とのキメリズムを確認した。キメララットの末梢血は赤血球溶解後に約 30%の GFP 陽性細胞を含むことを確認し、以前の報告と同様であった。

### 4. pBOO 手術および sham 手術

キメララットはペントバルビタール (40 mg/kg)腹腔内投与により麻酔した。下腹部正中切開後に膀胱および尿道を露出した。尿道は傍尿道血管の損傷に注意しつつ膣壁より注意深く剥離した。直径 0.9mm の金属ロッドを近位部尿道



に沿わせ、4-0 絹糸にて尿道とロッドを共に結紮した (pBOO 群、n=4)。その後ロッドを取り除き、閉腹した。対照群(sham 群、n=4) では、尿道を全周性に同様に剥離するのみで結紮を行わず、閉腹して終了する sham 手術を施行した。

## 5. 組織染色および免疫蛍光染色

pBOO または sham 手術後 6 週目に、致死量のペントバルビタール (100 mg/kg)を腹腔内投与することで麻酔を行い、200 ml phosphate buffered saline (PBS)、次いで氷温の 4% paraformaldehyde (PFA) 固定液 PBS 500ml にて心腔内還流し安楽死させた。膀胱を摘出し 4%PFA 液にて 4℃下 24 時間固定したのち、3~5 日間 30%ショ糖液に浸漬した。組織は OCT compound (Sakura Finetechnical Co., Japan)で包埋し、-80℃で保存した。クライオスタットにてミクロトームを用い 10  $\mu$ m の厚さで凍結切片を作製した。正荷電ガラススライドに載せ HE 染色を行った。

免疫蛍光組織染色のため切片を PBS で洗浄し、0.3 % Triton-X100 で 5 分浸透させた。切片は 60 分室温で 10 %ヤギ血清にてブロッキングした(Vector laboratories, CA, USA)。その後 4℃で抗 GFP ポリクローナルウサギ抗体(1:200, anti-GFP antibody、CHEMICON international Inc., CA, USA)、および基底膜 (抗 Laminin マウスモノクローナル抗体、1:25、Sigma))、尿路上皮 (抗 AE1/AE3 マウスモノクローナル抗体、1:50、DAKO))、線維芽細胞 (抗 Vimentin マウスモノクローナル抗体、1:400、Sigma))、平滑筋細胞 (抗 alpha Smooth Muscle Actin (SMA)マウスモノクローナル抗体、1:400、Sigma)) に対するマウスモノクローナル抗体を、それぞれ 24 時間反応させた。その後 PBS で洗浄し、60 分室温で fluorescein conjugated anti-rabbit IgG antibodies (1:200, Jackson Immuno Research, PA, USA) および rhodamine conjugated anti-mouse IgG antibodies (1:200, Jackson Immuno Research,)で処理した。スライドは PBS で洗浄し、Permafluor (Beckman Coulter, CA, USA)で包埋した。共焦点レーザー蛍光顕微鏡(MRC-1024; Bio-Rad Laboratories, CA, USA)を用いて鏡検した。

## 結果

### 1. BMSC の膀胱への遊走

HE 染色では、pBOO 群において、対照群にくらべ平滑筋の過形成による膀胱壁の肥厚がみられた(図 1)。

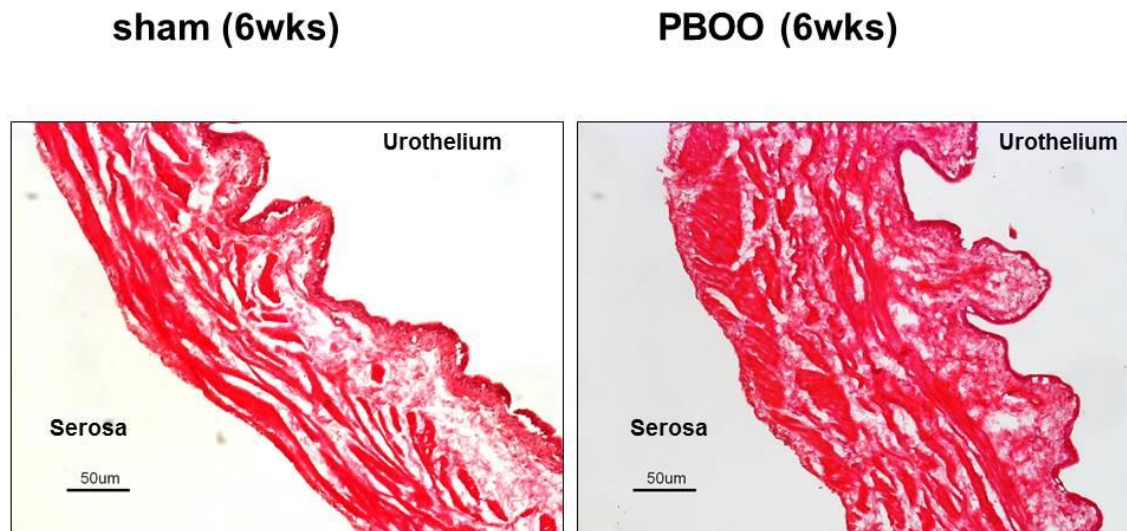


図 1：膀胱 HE 染色 (pBOO 手術後 6 週後)

pBOO 手術後の膀胱壁は、sham 手術後に比べ肥厚し平滑筋の過形成がみられる。

免疫蛍光組織染色では pBOO 群において、対照群よりもより多くの GFP 陽性 BMSC が観察された。

ほとんどの GFP 陽性 BMSC は基底膜および尿路上皮下の粘膜固有層に存在していた(図 2)。

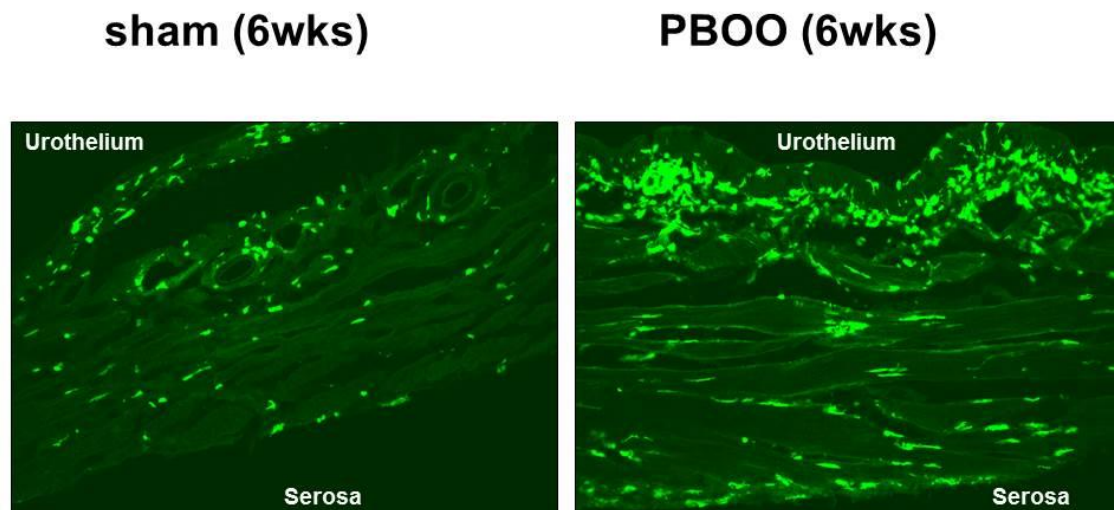


図 2：膀胱での BMSC の局在（免疫蛍光組織染色）

sham に比べ pBOO 膀胱では GFP 陽性の BMSC が多数遊走しており、これらの BMSC は基底膜もしくは尿路上皮下の lamina propria に多く観察された。

## 2. BMSC の尿路上皮への分化

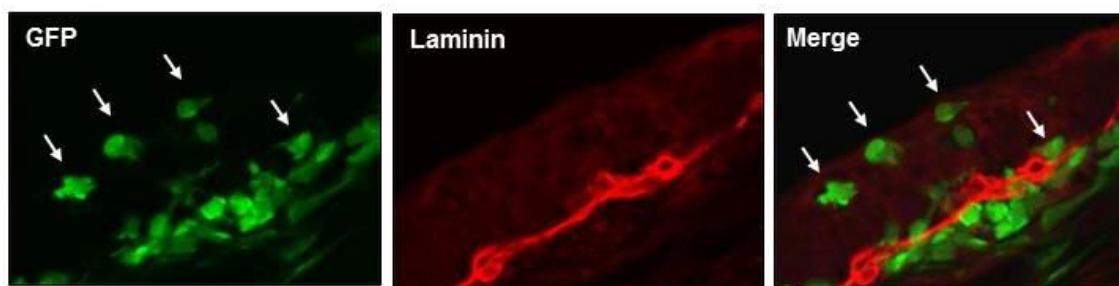
pBOO 群での抗 Laminin 抗体および抗 GFP 抗体での二重染色では、BMSC は主に基底膜および尿路上皮下の間質組織に遊走していた(図 3-A)。GFP および AE1/AE3 陽性の BMSC は尿路上皮層に遊走していた(図 3-B)。この結果は pBOO 群において、尿路上皮に分化する BMSC が存在することを示唆している。これらの結果は sham 群ではみられなかった。

## 3. BMSC の膀胱間質組織(線維芽細胞)への分化

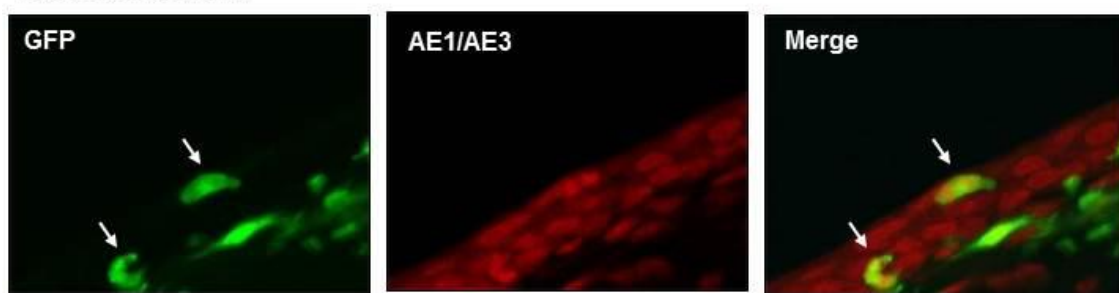
間質組織に存在する BMSC のなかには、抗 GFP 抗体および抗 vimentin 抗体により二重染色されるものがあり、BMSC が線維芽細胞に分化することを示唆した(図 3-C)。これらの結果は sham 群ではみられなかった。

4. BMSC の膀胱平滑筋組織への分化抗 SMA 抗体による染色では、平滑筋層に遊走した BMSC は紡錘形の形態を示し、その中には抗 GFP 抗体および抗 SMA 抗体に二重染色され、BMSC が排尿筋に分化することを示唆した(図 3-D)。これらの結果は sham 群ではみられなかった。

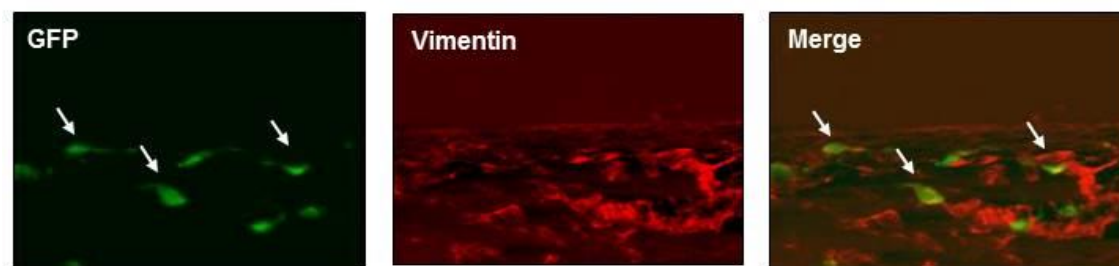
#### A: Basement membrane



#### B: Urothelium



#### C: Myofibroblasts



#### D: Smooth muscle

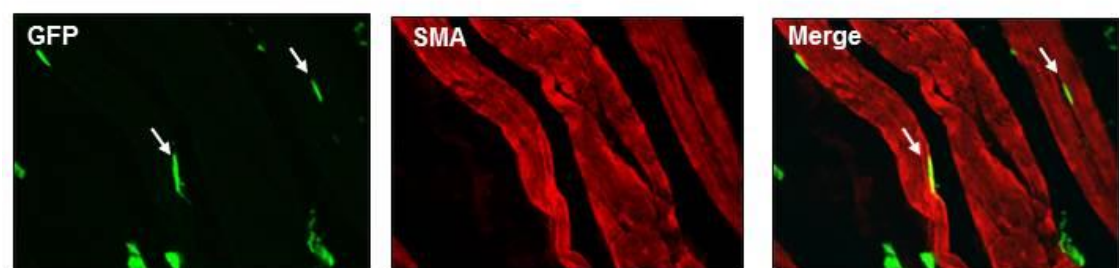


図 3 : pBOO 膀胱における BMSC の膀胱構成細胞への分化 (免疫蛍光組織染色)

- (A) 基底膜および尿路上皮下の間質にみられる GFP 陽性 BMSC 細胞。
- (B) 尿路上皮層の BMSC 細胞。AE1/AE3 との二重染色に染まる GFP 陽性細胞が観察される。
- (C) 間質に存在する BMSC 細胞のうち、vimentin との二重染色に染まる GFP 陽性細胞が観察される。
- (D) 平滑筋層に存在する BMSC 細胞は紡錘形の形態を示し、SMA との二重染色に染まる GFP 細胞が観察される。

## 考察

今回の研究では pBOO モデルにおいて BMSC が形態学的に膀胱組織細胞に変化することに焦点をあてた。GFP を発現するトランスジェニックラットからの同種異型の骨髄細胞移植をしたキメララットを用い、組織染色および免疫蛍光法を pBOO 手術から 6 週間後に行った。BMSC が pBOO 膀胱に遊走し、尿路上皮や排尿筋などの複数の構成成分に分化することを示した。ゆえに BMSC は pBOO 膀胱の形態学的な変化に関与する可能性が考えられた。BMSC が造血系細胞だけでなく、非造血系細胞にも分化する潜在能力を持っていることは 1960 年代に Friedenstein らにより初めて報告された<sup>28</sup>。また、BMSC は免疫応答を調節し細胞の微小環境ニッチ形成に寄与することも報告されている<sup>29,30</sup>。再生医療における BMSC の可能性は様々な実験でも検討されている。心筋梗塞において BMSC が血管の再生に寄与することが実験動物レベル<sup>31</sup>および臨床試験<sup>32</sup>において報告されている。BMSC の自家移植は虚血性疾患の患者で安全かつ有効であるという報告があり<sup>33</sup>、そのほか非代償性肝硬変<sup>34</sup>、脳梗塞<sup>35</sup>、脊髄損傷<sup>36,37</sup>の治療においても将来的な可能性を秘めている。近年、1 型糖尿病での膵島移植においても BMSC を用いた治療について研究が進められている<sup>38</sup>。

しかしながら、組織に遊走または移植した BMSC が生存していることを確かめることは難しい。今回我々は、GFP トランスジェニックラットから、致死量の放射線照射により自身の骨髄細胞をほぼ失った SD ラットに骨髄を移植することでキメララットを作製した。これによりドナー由来の BMSC を可視化することができ、組織で BMSC が生着していることを確認した。

pBOO において、膀胱壁の進展と高い膀胱内圧が慢性的に継続することにより、膀胱壁の虚血/低酸素状態が引き起こされる。下部尿路閉塞の存在により、部分除神経や C 線維の出現、平滑筋の過形成、間質の線維化がみられる。これらのリモデリングは排尿筋の過活動や膀胱コンプライアンスの変化などを引き起こす結果、膀胱の機能障害をもたらす。いくつかのサイトカインやケモカインが膀胱のリモデリングに関与することが報告されており、我々はケモカインの一つである SDF-1 $\alpha$  が pBOO 膀胱の虚血状態により誘導され、BMSC の膀胱への遊走にかかわることを報告した<sup>19</sup>。

今回の研究では下部尿路閉塞における膀胱組織の変化に BMSC が関与することを示した。BMSC の所作が膀胱機能に影響しているのか否かは今回検討さ

れていないが、BMSC を pBOO 膀胱に直接移植する研究では、膀胱機能の改善が見られたことが報告されている<sup>39)</sup>。この結果からは、骨髓から pBOO 膀胱に BMSC が遊走することでも膀胱機能の改善が見込めるのではないかと期待できる。

## 総括および結論

### 第 1 章

1. 下部尿路閉塞膀胱において、炎症性サイトカイン IL-18 は膀胱のリモデリングに関与し、尿流動態にも影響を与えた。
2. 特に IL-18 の刺激により IGF- I の発現が亢進し平滑筋の過形成が起こることが明らかとなった。

### 第 2 章

1. BMSC は pBOO 膀胱に遊走し、これらの細胞は膀胱の複数の構成細胞に分化した。
2. BMSC は pBOO 膀胱の形態学的変化に寄与する。

今回の研究によって、炎症性サイトカイン IL-18 が IGF- I 発現を刺激することにより下部尿路閉塞膀胱での平滑筋過形成を誘導していることが明らかになった。さらに TGF- $\beta$  発現を刺激することで膀胱壁の線維化にかかわっている可能性も示唆された。諸家の報告と合わせると、骨髓由来細胞の膀胱リモデリングにおいても IL-18 が関与している可能性があり、IL-18 が下部尿路閉塞膀胱での膀胱の二次的変化において果たす役割につきさらなる解明が期待される。

下部尿路閉塞膀胱における骨髓由来細胞の膀胱組織への遊走に関しても、遊走した骨髓由来細胞自らが、膀胱組織それぞれの構成細胞に分化することが示された。今回の研究では遊走した BMSC が膀胱機能に影響しているのか否かについて検討を行っていないが、他の報告とあわせると pBOO 膀胱により多くの BMSC が遊走することによって、膀胱機能の改善が見込めるのではないかと期待できる、このように、今後の膀胱における新しい再生医療の分野を切り拓く糸口となる可能性に期待したい。



## 謝辞

稿を終えるにあたり、IL-18 ノックアウトマウスの分与にご協力をいただきました東京大学医科学研究所教授岩倉洋一郎教授（現東京理科大学生命医科学研究所教授）に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の機会を与えてくださり、終始ご指導、ご助言を賜りました北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学分野野々村克也教授および北海道大学大学院医学研究科医学専攻生化学講座医科学分野畠山鎮次教授に深く感謝いたします。

併せて本研究にあたりご指導ご高閲をいただきました北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学分野三井貴彦助教、橘田岳也助教、守屋仁彦講師、北海道大学大学院医学研究科医学専攻生化学講座医科学分野築山忠維助教、高橋秀尚助教、渡部昌助教に心より感謝いたします。

また、様々な面でご協力いただきました両分野の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1 Berry, S. J., Coffey, D. S., Walsh, P. C. & Ewing, L. L. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *The Journal of urology* **132**, 474-479 (1984).
- 2 Hald, T. Urodynamics in benign prostatic hyperplasia: a survey. *The Prostate. Supplement* **2**, 69-77 (1989).
- 3 Metcalfe, P. D. *et al.* Bladder outlet obstruction: progression from inflammation to fibrosis. *BJU international* **106**, 1686-1694, doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09445.x (2010).
- 4 日本排尿機能学会. 過活動膀胱診療ガイドライン. *Blackwell Publishing* (2005).
- 5 Abarbanel, J. & Marcus, E. L. Impaired detrusor contractility in community-dwelling elderly presenting with lower urinary tract symptoms. *Urology* **69**, 436-440, doi:10.1016/j.urology.2006.11.019 (2007).
- 6 Oka, M. *et al.* Suppression of bladder oxidative stress and inflammation by a phytotherapeutic agent in a rat model of partial bladder outlet obstruction. *The Journal of urology* **182**, 382-390, doi:10.1016/j.juro.2009.02.104 (2009).
- 7 Imamura, T. *et al.* Bone marrow-derived cells implanted into radiation-injured urinary bladders reconstruct functional bladder tissues in rats. *Tissue engineering. Part A* **18**, 1698-1709, doi:10.1089/ten.TEA.2012.0061 (2012).
- 8 Chen, Y. *et al.* Increase in insulin-like growth factor I in hypertrophying smooth muscle. *The American journal of physiology* **266**, E224-229 (1994).
- 9 Lorentz, K. M., Yang, L., Frey, P. & Hubbell, J. A. Engineered insulin-like growth factor-1 for improved smooth muscle regeneration. *Biomaterials* **33**, 494-503, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.088 (2012).
- 10 Monson, F. C., Sun, L., Wein, A. J. & Levin, R. M. Hyperplasia in the rabbit bladder urothelium following partial outlet obstruction.

- Autoradiographic evidence. *Molecular and cellular biochemistry* **152**, 167-173 (1995).
- 11 Saito, M., Longhurst, P. A., Tammela, T. L., Wein, A. J. & Levin, R. M. Effects of partial outlet obstruction of the rat urinary bladder on micturition characteristics, DNA synthesis and the contractile response to field stimulation and pharmacological agents. *The Journal of urology* **150**, 1045-1051 (1993).
  - 12 Honscho, S. *et al.* Pressure-mediated hypertrophy and mechanical stretch induces IL-1 release and subsequent IGF-1 generation to maintain compensative hypertrophy by affecting Akt and JNK pathways. *Circulation research* **105**, 1149-1158, doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.208199 (2009).
  - 13 Hedayat, M., Mahmoudi, M. J., Rose, N. R. & Rezaei, N. Proinflammatory cytokines in heart failure: double-edged swords. *Heart failure reviews* **15**, 543-562, doi:10.1007/s10741-010-9168-4 (2010).
  - 14 Hwang, M. W. *et al.* Neutralization of interleukin-1beta in the acute phase of myocardial infarction promotes the progression of left ventricular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* **38**, 1546-1553 (2001).
  - 15 Bujak, M. & Frangogiannis, N. G. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* **57**, 165-176, doi:10.1007/s00005-009-0024-y (2009).
  - 16 Sawada, N. *et al.* Involvement of hypoxia-triggered endoplasmic reticulum stress in outlet obstruction-induced apoptosis in the urinary bladder. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **88**, 553-563, doi:10.1038/labinvest.2008.21 (2008).
  - 17 Park, J. M. *et al.* Obstruction stimulates COX-2 expression in bladder smooth muscle cells via increased mechanical stretch. *The American journal of physiology* **276**, F129-136 (1999).
  - 18 Sano H. 下部尿路閉塞ラット膀胱における SDF1  $\alpha$  遺伝子発現と骨髄由来ストローマ細胞遊走の関連性. *北海道医誌* **82**, 365-371 (2007).
  - 19 Sano, H. *et al.* Stromal Cell-Derived Factor 1 $\alpha$  Induces Accumulation

- of Intravenously Administered Marrow-Derived Stromal Cells in the Partially Obstructed Rat Bladder. *LUTS* **4**, 154-160 (2012).
- 20 Yun, H. J. & Jo, D. Y. Production of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and expression of CXCR4 in human bone marrow endothelial cells. *Journal of Korean medical science* **18**, 679-685 (2003).
  - 21 ChowdhuryA, B., Mulet-SierraA, JomhaN, AdesidaA. Effect of interleukin-1b treatment on co-cultures of human meniscus cells and bone marrow mesenchymal cells. *BMC Musculoskeletal Disorders* **14**, 2471-2474 (2013).
  - 22 Tanaka, S. T. *et al.* Recruitment of bone marrow derived cells to the bladder after bladder outlet obstruction. *The Journal of urology* **182**, 1769-1774, doi:10.1016/j.juro.2009.02.081 (2009).
  - 23 Okuno, M. *et al.* Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF-beta. *Gastroenterology* **120**, 1784-1800 (2001).
  - 24 Oga, T. *et al.* Prostaglandin F(2alpha) receptor signaling facilitates bleomycin-induced pulmonary fibrosis independently of transforming growth factor-beta. *Nature medicine* **15**, 1426-1430, doi:10.1038/nm.2066 (2009).
  - 25 Ghayur, A. & Margetts, P. J. Transforming growth factor-beta and the glomerular filtration barrier. *Kidney research and clinical practice* **32**, 3-10 (2013).
  - 26 Anumanthan, G. *et al.* Bladder stromal loss of transforming growth factor receptor II decreases fibrosis after bladder obstruction. *The Journal of urology* **182**, 1775-1780, doi:10.1016/j.juro.2009.05.126 (2009).
  - 27 Halder, S. K. *et al.* Elucidating the mechanism of regulation of transforming growth factor beta Type II receptor expression in human lung cancer cell lines. *Neoplasia* **13**, 912-922 (2011).
  - 28 Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I. & Frolova, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* **6**, 230-247 (1968).
  - 29 Doroudian, G., Curtis, M. W., Gang, A. & Russell, B. Cyclic strain

- dominates over microtopography in regulating cytoskeletal and focal adhesion remodeling of human mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, doi:10.1016/j.bbrc.2012.11.120 (2012).
- 30 Schraufstatter, I. U., Discipio, R. G. & Khaldoyanidi, S. Mesenchymal stem cells and their microenvironment. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **16**, 2271-2288 (2011).
  - 31 Fukuhara, S. *et al.* Bone marrow cell-seeded biodegradable polymeric scaffold enhances angiogenesis and improves function of the infarcted heart. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **69**, 850-857 (2005).
  - 32 Strauer, B. E. *et al.* Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. *Journal of the American College of Cardiology* **46**, 1651-1658, doi:10.1016/j.jacc.2005.01.069 (2005).
  - 33 Tateishi-Yuyama, E. *et al.* Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* **360**, 427-435, doi:10.1016/S0140-6736(02)09670-8 (2002).
  - 34 Takami, T., Terai, S. & Sakaida, I. Advanced therapies using autologous bone marrow cells for chronic liver disease. *Discovery medicine* **14**, 7-12 (2012).
  - 35 Honmou, O., Onodera, R., Sasaki, M., Waxman, S. G. & Kocsis, J. D. Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke. *Trends in molecular medicine* **18**, 292-297, doi:10.1016/j.molmed.2012.02.003 (2012).
  - 36 Aizawa-Kohama, M. *et al.* Transplantation of bone marrow stromal cells-derived neural precursor cells ameliorates deficits in a rat model of complete spinal cord transection. *Cell transplantation*, doi:10.3727/096368912X658791 (2012).
  - 37 Saito, F. *et al.* Administration of cultured autologous bone marrow stromal cells into cerebrospinal fluid in spinal injury patients: a pilot

- study. *Restorative neurology and neuroscience* **30**, 127-136, doi:10.3233/RNN-2011-0629 (2012).
- 38 Hematti, P., Kim, J., Stein, A. P. & Kaufman, D. Potential role of mesenchymal stromal cells in pancreatic islet transplantation. *Transplantation reviews*, doi:10.1016/j.trre.2012.11.003 (2013).
- 39 Nishijima, S. *et al.* Restoration of bladder contraction by bone marrow transplantation in rats with underactive bladder. *Biomedical research* **28**, 275-280 (2007).