

令和 4年 9月

寺岡祥吾 学位論文審査要旨

主 査 山 本 一 博
副主査 武 中 篤
同 岡 田 太

主論文

Early effects of adipose-derived stem cell sheets against detrusor underactivity in a rat cryo-injury model

(ラット凍結障害モデルにおける脂肪由来幹細胞シートの排尿筋低活動に対する初期効果)

(著者：寺岡祥吾、本田正史、牧嶋かれん、清水龍太郎、Panagiota Tsounapi、弓岡徹也、岩本秀人、李佩俐、森實修一、引田克弥、久留一郎、武中篤)

令和4年 Life Sciences doi: 10.1016/j.lfs.2022.120604

参考論文

Optimal number of systematic biopsy cores used in magnetic resonance imaging/transrectal ultrasound fusion targeted prostate biopsy

(前立腺MRI/超音波融合標的生検で併用する系統的生検コア数の至適本数)

(著者：寺岡祥吾、本田正史、清水龍太郎、西川涼馬、木村有佑、弓岡徹也、岩本秀人、森實修一、引田克弥、武中篤)

令和3年 Yonago Acta Medica doi : 10.33160/yam.2021.08.004

学位論文要旨

Early effects of adipose-derived stem cell sheets against detrusor underactivity in a rat cryo-injury model

(ラット凍結障害モデルにおける脂肪由来幹細胞シートの排尿筋低活動に対する初期効果)

膀胱再生における幹細胞の役割に着目した研究では、骨髄由来幹細胞を用いたものがほとんどである。さらに、脂肪由来幹細胞(ASC)シートのラットへの移植、および膀胱内圧測定による生理機能回復の評価、ASCシートの生存率・分化の確認については、これまでの報告で取り上げられたものはない。そこで、本研究では、ラット排尿筋低活動モデルにおいて、ASCシートの効果を検討評価した。

方法

動物実験および遺伝子組換え実験については、鳥取大学研究推進機構(32-027、20-Y-23)の承認を得た。ASCシート作製には成熟した雄Lewisラットを使用し、GFP発現ASCシートの作製には全身にGFPを発現する雄Lewisラット[LEW-Tg(CAG-EGFP)1Ys]を使用した。ラット鼠径皮下脂肪組織からASCを採取し、温度応答性培養皿を用いて細胞シートを作製した。

排尿筋低活動モデルは10週齢の雌Lewisラットに膀胱凍結障害を与えることで作成した。ASCシート移植の3日前に、麻酔下に膀胱を露出してドライアイスで冷却したアルミニウム棒を膀胱前壁に接触させて凍結損傷を与え、モデルラットを作成した。10週齢の雌Lewisラットを8匹ずつ4群にグループ化した。膀胱凍結障害を行った後、ASCシートを同部位に移植する群(凍結障害+ASCシート群)、膀胱凍結障害を行うがASCシート移植を行わない群(凍結障害群)、凍結障害やASCシートの移植は行わないが開腹手術は行う群(偽手術群)、何も処置を行わない群(対照群)である。ASCシート移植の7日後に膀胱内圧測定を実施し、安楽死させて膀胱を摘出した。摘出した膀胱の組織学的評価およびRT-PCR分析を行った。

さらに、ASCシートの生存率と分化を確認するために、GFP発現ASCシートを使用した。上記の手順に従い、25匹の雌Lewisラットに凍結障害を与え、3日後にGFP発現ASCシートを膀胱凍結障害部位に移植した。移植後3、7、14、21、28日目に5匹のラットを安楽死させた。安楽死させたラットの膀胱を露出し、蛍光実体顕微鏡で観察し、励起光下でASCシートの蛍光を確認した。その後、膀胱を摘出しGFPとvWFの二重免疫蛍光染色を行って、移植細胞の分化を確認した。

結 果

膀胱内圧測定においては、注水量、排尿量は4群間で有意差は認められなかったが、最大膀胱内圧 ($P=0.011$)、残尿量 ($P=0.020$)、排尿効率 ($P=0.020$)、尿溢流率 ($P=0.001$) に有意差が認められた。病理組織学的解析の結果、凍結障害群では急性炎症所見が観察された。一方、凍結障害+ASCシート群では、炎症細胞の浸潤による慢性炎症が観察されたが、組織壊死の程度は低く、創傷治癒過程で生じる肉芽腫形成も確認された。さらに、各群の膀胱組織を抗vWF抗体で染色し、4×視野の毛細血管数の平均値を群間比較した。毛細血管数は、凍結障害+ASCシート群で他の群に比べ有意に多かった。RT-PCRでは、凍結障害+ASCシート群は凍結障害群にVEGFとHGFのmRNA値の有意な上昇が確認出来た（それぞれ $P=0.045$ と $P=0.037$ ）。

GFP 発現 ASC シートをを用いた研究においては、移植後14日目までは全ラット（100%）、21日目には5匹中4匹（80%）、移植後28日目には5匹中1匹（20%）のラットに励起光下で移植部位での緑色蛍光が観察された。どの時点でも、緑色蛍光は膀胱の移植部位のみに限定され、他の臓器では確認できなかった。摘出した膀胱の免疫染色では、ASCシート移植部位に多数のGFP陽性細胞が認められた。3日目時点での二重免疫蛍光染色では、GFP陽性細胞はvWF陽性細胞と一致しなかったが、シート移植7日以降には、GFP陽性細胞とvWF陽性細胞が一致し、ASCの一部が血管内皮細胞に分化していることが確認出来た。

考 察

本研究では凍結障害後の膀胱にASCシートを移植することで、比較的早い段階で膀胱収縮機能が回復することが確認出来た。幹細胞の創傷治癒には、分化、ホーミング、免疫調節などいくつかのメカニズムが提唱されているが、ASCの組織修復や創傷治癒には新生血管の誘導が強く関わっていることを示す報告が多数存在する。本研究においてもGFPでマーキングしたASCが血管内皮細胞に分化し、移植後最大28日間生存していることが確認出来た。さらに、ASC自体が血管新生因子であるVEGFやHGFを分泌することで、損傷した膀胱壁への安定した血液灌流が供給され、損傷した膀胱の機能を比較的早期に回復させた可能性が示唆された。

結 論

凍結障害によるラット排尿筋低活動モデルに移植したASCシートは、移植7日後に一部が血管内皮細胞に分化するとともに、膀胱の収縮機能を早期から回復させた。