

# 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	小川 典之
論文審査担当者	主 査 柴祐司 副 査 栗田浩・高橋淳・三井貴彦
論文題目	Autologous Bilayered Adipose-Derived Mesenchymal Cell-Gelatin Sheets Reconstruct Ureters in Rabbits (脂肪由来間葉系幹細胞から作製した積層細胞シートを用いたウサギ尿管再生の試み)
(論文の内容の要旨)	
<p>【背景と目的】泌尿器科領域において、尿管狭窄や尿管損傷に対する根治治療として外科的治療が行われる。狭窄や損傷の部位に応じて、尿管端々吻合術、psoas hitch 法、Boari-flap 法などが行われる。しかし、術後の吻合部狭窄、吻合部からの尿溢流などによって、再手術に至る症例が多いことが臨床的課題である。本研究は、脂肪由来間葉系幹細胞 (Adipose-derived mesenchymal cell: AMC) から作製した積層型細胞シートを利用して、尿管の病変部位に依存せず、術後の吻合部狭窄や尿溢流などのリスクを回避できる尿管再生が可能であるかどうか検討した。</p> <p>【方法】10 週齢雌ウサギの下腹部の脂肪組織から分離した細胞をコラーゲンコート培養皿上で初代培養を行い、接着、増加した細胞を AMC とした。コンフルエントに達した後、移植後の AMC を検出するために PKH26 で細胞標識処理をした。標識した AMC を温度応答性培養皿に継代培養した。オーバーコンフルエントに達した後、温度応答性培養皿の温度を低下させて、単層状に浮遊した細胞をゼラチン繊維基材に付着させ回収した。この細胞シートを 2 枚作製して、細胞同士が接着するように積層して、2 日間培養を行ったものを積層細胞シートとした。ゼラチン繊維基材のみを 2 枚重ねたものを無細胞シートとした。ウサギの尿管を約 1cm 部分切除した後、尿管内にポリエチレンチューブを挿入して、切除断端を含むように巻き付ける形で積層細胞シートを自家移植した (積層細胞シート群; n=9)。また、無細胞シートを用いて同様な手術を行ったものを対照群 (n=9) とした。移植 4 週間後 (積層細胞シート群 n=7、対照群 n=6)、および、移植 4 週間後にポリエチレンチューブを抜去して、さらに 4 週間飼育した後 (積層細胞シート群 n=2、対照群 n=3)、移植部位を含む尿管を摘出して、4%PFA 固定、脱灰処理、パラフィン包埋した。HE 染色、マッソン染色、免疫組織二重染色の組織学的解析により、尿管再生について検討を行った。</p> <p>【結果】積層細胞シートでは、2 層のゼラチン繊維基材の間に間葉系幹細胞マーカーである STRO-1 抗体陽性な AMC が存在していた。それらの細胞は、細胞接着因子である Integrin <math>\beta 1</math> や N-cadherin を発現する細胞活性を示した。移植 4 週間後、両群において、目視下では腹腔内への尿溢流を認めない尿管組織が再構築された。対照群では、シート移植部位より腎側の尿管が著しく蛇行、および拡張していたが、積層細胞シート群では、著しい蛇行や拡張を呈さない尿管が再構築されていた。再構築された尿管部位において、対照群では、粘膜層と尿管筋層の間に線維化した層を認めたが、積層細胞シート群では、AMC の抗線維化作用などにより線維化が抑制されていた。積層細胞シート群では、シート移植部位における尿管筋層の厚みは、対照群と比較して有意に増大した。移植 8 週間後 (ポリエチレンチューブ抜去 4 週間後)、対照群のシート移植部位では、粘膜層と尿管筋層の間の線維化が進行し、内腔が狭窄していたが、積層細胞シート群では、粘膜層下の線維化や内腔の狭窄を認めなかった。積層細胞シート群では、PKH26 で標識された AMC の生着を認めるとともに、その一部は、Pax7 陽性筋芽細胞、Desmin 陽性未熟平滑筋細胞や SMA 陽性成熟平滑筋細胞へと段階的に分化していた。尿管組織の再構築の機序として、断端部からゼラチン繊維基材に沿って線維芽細胞が遊走して薄い層構造を形成したところに、移植した AMC が TGF シグナル経路などを経て平滑筋細胞に分化する、あるいは、断端部から平滑筋細胞が遊走して、尿管筋層を形成することが考えられた。</p>	

【結論】本研究では、尿管の一部を摘除した欠損部に無細胞シート、あるいは、積層細胞シートを移植すると、尿管組織が再構築されることを示した。再構築された尿管において、対照群では、著しい蛇行や拡張を認めたが、積層細胞シート群では、蛇行や拡張を認めなかった。また、積層細胞シート群では、対照群よりも尿管筋層の厚みが有意に増大しており、線維化による内腔の狭窄が抑制されていた。尿管組織の再構築の機序として、AMCの平滑筋細胞への分化、断端部からの線維芽細胞の遊走などを示した。したがって、積層型脂肪由来間葉系幹細胞シートを利用することによって、尿管の病変部位に依存せず、術後の吻合部狭窄や尿溢流などのリスクを回避できる尿管再生が可能であると結論づけた。