

学位論文題名

培養尿路上皮細胞の腹腔内生着への
至適培養条件とその生着形態

学位論文内容の要旨

緒言

腸管を用いた尿路再建法は歴史を経て確立された術式となっており、優れた長期結果が報告され、患者の QOL の改善に大きく貢献してきた。しかし、手術侵襲の大きさや、慢性尿路感染、高クロール性代謝性アシドーシス、粘液産生、結石形成、長期的な発癌のリスクなどの諸問題も内包している。

近年、Tissue-Engineering を用いた臓器再生が様々な分野で報告され、注目されている。泌尿器科領域においても、培養自己細胞を用いて細胞の足場となる scaffold 上に播種し、残存膀胱と吻合することで尿路再建を行う動物実験が報告され、良好な成績を得ている。

この技術の臨床応用を考慮するとき、尿路の荒廃を伴う神経因性膀胱症例においては、残存膀胱と吻合した再生膀胱にも同様の異常が発現し、有効に機能しない可能性が危惧される。また、膀胱全摘症例のような残存膀胱が存在しない状況を想定した研究は、未だ行われておらず、その可能性については未知のままである。

今回の研究ではそのような症例への適応を考慮し、異所性尿路組織再生をめざして、培養尿路上皮細胞の腹腔内生着への至適培養条件とその生着形態を検討した。

材料及び方法

実験 1 培養方法の差異における *in vitro* での尿路上皮細胞の形態及び *in vivo* への生着への影響

1) Microporous Membrane 上でのコラーゲンゲル培養

ブタ膀胱より初代培養した尿路上皮細胞と線維芽細胞を用いて、培養方法の差異における形態を比較検討した。生体内と類似の条件を *in vitro* で再現するため、Microporous Membrane を用いて、以下の条件でコラーゲンゲル培養を行った。

Method A1: Microporous Membrane 上でコラーゲンゲル内に培養した膀胱線維芽細胞を混入しゲル化。

Method B1: Microporous Membrane 上で何も混入せずゲル化。

Method C1: Method B1 と同様に何も混入せずに Microporous Membrane 上でゲル化させ、その上に feeder layer を作成。

各々培養尿路上皮細胞をゲル上に播種・培養し、経時的に観察した。

2) 生体内への移植

以下の条件でコラーゲンスポンジとコラーゲンゲルより作成したマトリックス上に、 5×10^5 の培養尿路上皮細胞を播種した。

Method A2: ゲル内に膀胱線維芽細胞を混入。

Method B2: 何も混入せずゲル化。

Method C2: Method B1 と同様に何も混入せずゲル化させた後, feeder layer を作成。各々上皮細胞を播種・培養後, 二つ折りとし, ヌードラットの大網あるいは腸間膜に移植して, 尿路上皮細胞の生着及びその形態を評価した。

実験 2 培養自家尿路上皮細胞の腹腔内生着形態

初代培養したラット尿路上皮細胞をアテロコラーゲンスポンジとフィブリン糊より作成した scaffold 上に播種・培養し, ラットの腸間膜に固定し, 経時的に生着形態を評価した。

評価方法

組織学的検討は透過型電子顕微鏡及び光学顕微鏡を用いた。光学顕微鏡観察用にはリン酸緩衝 10%ホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成し, ヘマトキシリン-エオジン染色・免疫染色及びレクチン染色を行った。

各培養方法の生着率の比較には Fisher の直接確率計算法を用い, $p < 0.05$ にて有意とした。

結果

実験 1 : *in vitro* ではゲルの収縮が Method A1 でのみ観察された。培養後 3 週間目では, Method A1 では上皮細胞は重層化していたが, Method B1, C1 では単層であった。基底膜成分である laminin は, Method A1, C1 では正常膀胱と同様に上皮細胞の直下に染色が見られたが, Method B1 では認められなかった。移植した尿路上皮細胞の生着率は, Method A2 : 2/8(25%), Method B2 : 5/12(42%)に対し, Method C2 : 6/6(100%)であり有意に良好であった。生着した尿路上皮細胞は 2~3 層に重層化し, コラーゲンゲル内には間葉系細胞と微小血管が見られた。

実験 2 : 移植後 1 週目では, 移植した scaffold は肉眼的には嚢胞状の形態を呈し, 組織学的には, その内腔面に上皮細胞が配列していた。上皮細胞の配列の下方には, 微小血管や間葉系細胞の scaffold 内への侵入が見られた。2 週目でも嚢胞状形態は保たれており, 内腔面には, 正常膀胱と同様, 2~3 層に重層化した尿路上皮の配列を認めた。個々の細胞は正常膀胱と比較すると小さかったが, レクチン染色では, 正常膀胱と同様の染色性を示していた。scaffold 内に侵入した間葉系細胞の中には, alpha smooth muscle actin あるいは desmin に陽性の細胞が見られた。4 週目では 6 例中 2 例で嚢胞状形態が認められ, 尿路上皮の配列が確認された。この 2 例では scaffold は侵入細胞の豊富な上層と, 侵入細胞の粗な下層に分かれており, 上層の細胞外マトリックスはアテロコラーゲンスポンジとは異なっていたが, 下層にはアテロコラーゲンスポンジが残存していた。嚢胞状形態及び上皮細胞が認められなかった 4 例では, scaffold への侵入細胞は粗であり, 生着例の scaffold 下層と類似していた。

結論

実験 1 では, 尿路上皮細胞の腹腔内移植には安定した scaffold と基底膜形成が重要と考えられ, feeder layer を用いて尿路上皮細胞を scaffold 上に播種することで良好な生着が得られることが確認された。実験 2 では, 培養尿路上皮細胞を自家移植することで, 異所性であっても分化した尿路上皮で内腔面が覆われた嚢胞状組織の作成が可能であることを示した。scaffold 内には, 平滑筋細胞を播種していないにもかかわらず, 平滑筋の性質を持った細胞が観察された。長期的には, 間質のリモデリングの途中で尿路上皮細胞が脱落したと考えられる所見を認め, より安定した材料を scaffold として用いる必要があると考えられる。今後, 改良すべき点はあるものの, この技術により, 新たな尿路組織の作成と尿路再建法への応用の可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 柳 知 彦

副 査 教 授 杉 原 平 樹

副 査 教 授 渡 辺 雅 彦

学 位 論 文 題 名

培養尿路上皮細胞の腹腔内生着への 至適培養条件とその生着形態

この論文は、培養尿路細胞を用いることで自己尿路組織と連続性のない異所性の尿路組織の再生を試みており、feeder layer 法を用いて培養自己尿路上皮細胞を生体適合性のある scaffold 上に培養し、生体内に移植することにより、内腔を重層・分化した再生尿路上皮細胞で被われた嚢胞状の組織の再生が可能であったことを報告している。質疑応答では副査の渡辺雅彦教授から、再生組織への神経の再生の有無、将来的な尿路再建の方法についての質問があった。これらの質問に対し申請者は、発表内容ではふれなかったが PGP9.5 を用いた免疫染色で神経の侵入も確認されている。しかし、その神経は腸間膜由来のものであり、再生尿路組織における機能については不明である。将来的にこの技術の適応となる症例の中には、様々な神経障害を有する神経因性膀胱症例もあることが予想されることから、長期的に安定した再生組織の作成が可能となり、この再生組織を用いた膀胱拡大術や異所性蓄尿器作成として応用された際には拡張・収縮等における侵入した神経の働きを明らかにしてゆく必要があると解答した。次いで、副査の杉原平樹教授から、3次元培養法での組織の再生方法について現在の問題点と将来の方法論についての質問があった。今回の研究では上皮細胞の培養方法に着眼し、feeder layer 法を用いることで良好な生着を確認しているが、自家移植モデルでは上皮細胞の生着時には scaffold 内に周囲より侵入細胞が入ってきており、培養線維芽細胞を scaffold 内に混入させたのと同様の相互作用が生着した上皮細胞の重層・分化を促し、かつ細胞外マトリックスの remodeling を促進させていると考えられる。長期的な生着には、足場となる scaffold の融解と新たな細胞外マトリックスの産生という間質の remodeling に耐えうる素材が必要である。様々な臓器再生の報告より、その素材として有用であると思われるのはバイクル®やデキソン®等の人工素材、あるいは生体組織から採取し、細胞成分を除去したコラ

一ゲンを主体とする acellular matix であり、今後、検討をしてゆくべき問題であると解答した。また、出席者からは生着した組織がなぜ嚢胞状の形態をとるのかという点についての質問があり、移植時の尿路上皮細胞の微細構造より細胞の下面すなわち scaffold との接着面側と、その反対側すなわち自由側とで異なっており、生着は scaffold との接着面側でのみおこると推察されることより、結果として嚢胞上の形態を示すことを説明した。別の出席者からは再生組織における平滑筋の機能と尿路再建に応用した際の変化について質問があった。In vitro での平滑筋細胞は培養中の伸展刺激により細胞分裂が活性化され apoptosis が抑制されるとの報告があり、この再生組織を尿路再建に用いた際には平滑筋の組織量が増加してくることが予想される。さらに、他の研究者の報告では培養細胞を播種していない形でも平滑筋が再生しており、平滑筋の再生という観点から考えれば異所性に再生された尿路組織は、体内に移植した後、再生早期に尿路再建に応用できる組織となる可能性があるとの解答をした。最後に主査の小柳知彦教授より北海道大学医学部泌尿器科の歴史の中で 30 年ほど前に培養細胞は使用しなかったが、膀胱の再生力を応用した尿路再建の試みがあったことの歴史的な背景から、成長因子や移植する細胞・scaffold とする材料に起因するとされる再生組織の悪性化の可能性があり、今後、そのような点への着眼も忘れずに研究を進めてゆくことが必要とのコメントで終了となった。

この論文は、将来の新たな医療の可能性を示しているものとして高く評価され、今後の発展により新たな尿路再建法の確立が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の単位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。