

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：蜂須賀 智

専攻分野：腎泌尿器外科学

コース：

指導教授：力石 辰也

主論文の題目：

Enhanced Recellularization of Renal Extracellular Matrix Scaffold Under Negative Pressure (細胞外マトリックスを骨格とした腎再生における陰圧環境を用いた再細胞化の効率向上に関する検討)

共著者：

Yuichi Sato, Miki Yoshiike, Ryuto Nakazawa, Hideo Sasaki, Tatsuya Chikaraishi

緒言

腎移植は末期腎不全に対する有効な治療法であるが、慢性的なドナー不足がこの治療のより広い普及の妨げになっている。近年、臓器全体を脱細胞化した後、得られた細胞外マトリックス (ECM) を骨格として再細胞化し、移植可能な臓器の作成を試みる研究がなされている。しかし、再細胞化効率が低いため、十分な機能を発揮する臓器の作成には至っていない。

今回我々は、ラット腎の ECM を骨格とした再細胞化の実験において、それを陰圧環境下に置くことで細胞注入効率の向上が得られるか否かを検討した。

方法

摘出したラット腎の動脈から界面活性剤 (sodium dodecyl sulfate; SDS) の濃度を 0.01-1% と徐々に上昇させつつ、1 ml/min の流速で 3 日間持続灌流し、細胞成分を除去した。その後、得られた ECM 骨格の腎動脈

よりラット血管内皮細胞 (Rat Arterial Endothelial Cells) を 20×10^6 個、尿管より尿細管上皮細胞 (NRK-52E) を 1×10^6 個注入した。その再細胞化 ECM に transrenal pressure gradient (TPG) を加えることを目的に、内部圧力を任意に調節可能な装置を作成し、再細胞化 ECM をその中に静置した。内部圧力は動脈側からの細胞注入では -100mmHg 、尿管側からの細胞注入では -20mmHg に設定し、持続時間は両者とも 60 分とした。その後、腎門部を通る横断面で組織切片を作成した。

動脈側からの再細胞化では、組織内の総細胞数・細胞陽性糸球体率を、尿管側からの再細胞化では、腎盂壁を通過して腎実質内に移動した細胞数を測定した。それぞれの注入経路において TPG(+) 群と TPG(-) 群の比較検討を行った。

また、機能的評価として動脈から再細胞化した ECM を 3 日間持続培養した後、擬似血液を灌流し、その血管抵抗(圧力 [mmHg]/灌流速度 [ml/min]) および尿管からの流出液量(ml) を評価もおこなった。統計学的解析では Student t-test を用い、 $p \leq 0.05$ を有意であると設定した。

動物実験計画承認番号：1502007 号

結果

SDS の持続灌流により、腎は経時的に無色半透明に変化した。組織学的には、細胞成分が完全に除去され、腎本来の微細な内部構造が保持されていることが確認された。

動脈側からの再細胞化において、RAE cell の総細胞数は TPG(-) 群で 15100 ± 7100 個 ($n=5$)、TPG(+) 群で 18300 ± 11400 個 ($n=5$) と上昇傾向を示した。細胞陽性糸球体率は TPG(-) 群で 72.3% ($n=5$)、TPG(+) 群で 85.5% ($n=5$) と有意に上昇した ($p < 0.05$)。

一方、尿管側からの再細胞化では、NRK-52E の総細胞数は TPG(-) 群で 50 ± 20 個 ($n=5$)、TPG(+) 群で 390 ± 160 個 ($n=5$) と有意な増加を認めた ($p < 0.05$)。

血管抵抗は非再細胞化組織では平均 $23 \pm 7\text{mmHg}/(\text{ml}/\text{min})$ ($n=4$) であったのに対し、再細胞化腎では平均 $187 \pm 10 \text{mmHg}/(\text{ml}/\text{min})$ ($n=5$) と、再細胞化腎で有意に増加した ($p < 0.01$)。また、流出液量は非再細胞化組織で平均 4.8 ml ($n=4$)、再細胞化腎で平均 0.2ml ($n=5$) と再細胞化により有意に減少した ($p < 0.05$)。

考察

これまでも、腎臓 ECM の再細胞化において、陰圧環境が効果的であるとされる研究が行われているが、至適な条件設定は示されていない。今回我々の実験では、それぞれの細胞注入経路における至適な圧力の設定と、それによる細胞注入効果を検討した。TPG の設定に際して、過度の

TPGはECMの損傷を招き、注入した細胞がECM外に漏出することが考えられた。我々は動脈側、尿管側でのTPGをそれぞれ-100mmHg、-20mmHgと設定し、ECMの微細構造を破壊することなく細胞をより広範囲に分布させることに成功した。

ECMへの細胞注入後、TPGを加えることで動脈側では糸球体陽性率が、尿管側では腎実質内に移動する細胞数が有意に増加していた。これらの結果は、単一臓器内に複数の細胞注入経路が存在する場合には、経路に応じて適切なTPGを設定することの必要性を示唆している。

機能的解析では、動脈側からRAE cellを注入した再細胞化腎で、擬似血液灌流時の血管抵抗が有意に増大した。これは細胞の注入、生着にともなうECMの空隙率の低下を反映していると思われ、再細胞化の効率を判定する手段としても有用であると考えられた。

結論

今回我々は、複数の再細胞化経路に対して適切な圧力勾配を付加することで、より広範囲な細胞分布が可能になることを示した。本方法は比較的容易施行でき、効果的であった。

臨床応用が可能な臓器作成のためには、脱細胞化・再細胞化に関する更なる評価が必要であるが、我々が得た知見はECM骨格を用いた臓器作成の研究に大いに有用であると考えられる。