

論文内容要旨

Rat cavernous nerve reconstruction with CD133⁺ cells derived from human bone marrow

(ヒト骨髄由来 CD133 陽性細胞を用いたラット陰茎海綿体神経の再生)

Journal of Sexual Medicine, in press.

主指導教員：松原 昭郎 教授

(統合健康科学部門 腎泌尿器科学)

副指導教員：平川 勝洋 教授

(応用生命科学部門 耳鼻咽喉科学・頭頸部外科学)

副指導教員：亭島 淳 講師

(統合健康科学部門 腎泌尿器科学)

宮本 克利

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

(背景、目的)

前立腺癌に対する標準術式である根治的前立腺全摘除術においては、陰茎海綿体神経を含む神経血管束を離断し、前立腺と併せて摘除するため、術後の勃起障害が問題となる。

末梢神経の再生において、CD133陽性細胞の移植が末梢神経の再生において有用であることが報告されている (*Kijima, J Neurosurg, 2009*)。一方で、ラット陰茎海綿体神経欠損モデルを用いた神経再生の実験において、創傷被覆材であるアルギン酸ゲルシートの有用性が報告されている (*Matsuura, Urology, 2006*)。今回、これらの研究を踏まえ、陰茎海綿体神経再生のより効果的な手法確立の糸口とすべく、陰茎海綿体神経損傷ラットモデルを用いて、CD133陽性細胞とアルギン酸ゲルシートの併用による神経再生の実験を行った。

(材料と方法)

8週齢雄ヌードラットを用い、下腹部正中切開で前立腺周囲の両側陰茎海綿体神経を露出。両側の神経2mm切除し、切除したのみの群 (EX群)、切除部位にアルギン酸ゲルシートを貼付した群 (AL群)、貼付したシートにヒト骨髄由来CD133陽性細胞 1×10^4 個を添加した群 (CD群)、およびsham群 (SH群)の4群 (各群7匹、計14側) について12週後に機能的評価と組織学的評価を行った。機能評価は、陰茎海綿体神経の中枢側にあるmajor pelvic ganglionを電気刺激 (0.5mA、20Hz、1min) し、陰茎海綿体内圧 (intracavernous pressure: ICP) と大腿動脈での平均動脈圧 (mean arterial pressure: MAP) を測定。ICP/MAPを用いて勃起機能を評価し比較した。組織学的評価は、前立腺を摘出し、各群のラット2匹 (4側) についてパラフィン切片を作成しHE染色にて形態的に評価した。別のラット2匹 (4側) について、凍結切片を作成して蛍光免疫染色を行った。神経組織の評価に、neuronal nitric oxide synthase: nNOSに対する一次抗体を用いて、nNOS陽性面積を各群比較した。血管の評価に、AL群、CD群についてvon Willebrand factor: vWF、 α -smooth muscle actin: α SMAに対する一次抗体を用いて2重染色し、前立腺周囲で2重陽性となった血管数を測定し、血管密度を比較した。CD群については、移植細胞の分化についても12週後に検討し、別に作成した2匹を用いて手術4日後についても検討を行った。分化の検討は、ヒト細胞の存在を証明するためのマーカーとしてHNA (human nuclei antibody)を用い、これと血管系のvWF、神経系のS100、nNOSに対する一次抗体とで、それぞれ2重染色を行うことで評価した。またAL群、CD群各3匹を追加作成し、手術4日後にアルギン酸ゲルシートを取り出してreal time RT-PCRを行い、nerve growth factor: NGF、vascular endothelial growth factor: VEGFについて比較した。

(結果)

(機能評価) ICP/MAPはSH群 0.68 ± 0.19 、EX群 0.31 ± 0.20 、AL群 0.38 ± 0.24 、CD群 0.57 ± 0.26 で、切除群に比較してCD群では有意に上昇した ($P = 0.04$)。CD133陽性細胞を移植した群が機能的に良好であった。(組織学的評価) HE染色ではEX群以外は前立腺周囲に神経組織を認めた。蛍光免疫染色でのnNOS陽性面積は、CD群がEX群、AL群と比較して有意に大きかった ($P < 0.01$)。また、HE染色で前立腺周囲にアルギン酸ゲルシートが残存しており、シート内に血管構造を認めた。血管密度は、CD群で有意に豊富であった ($p = 0.02$)。(移植細胞の分化) 蛍光免疫染色では、手術4日後と12週後ともに、HNAとvWFの2重陽性細胞を認め、移植細胞の血管内皮への分化を認めた。しかし、陽性細胞はわずかであり、多くの血管は、ラット由来と考えられた。HNAとS100、nNOSの2重陽性細胞は認めなかった。(Growth factorの評価) CD群がNGF、VEGFとも有意に上昇していた ($P = 0.03$, $P = 0.04$)。

(考察及び結論)

陰茎海綿体神経損傷ラットにヒト骨髄由来CD133陽性細胞を移植することで、神経再生を認めた。CD133陽性細胞の血管内皮への分化を認めたが、ごくわずかであった。アルギン酸ゲルシートを解析するとNGF、VEGFが上昇していたことから、再生機序として移植細胞の血管内皮への分化よりは、移植によるNGF、VEGFの上昇が関与していると考えられた。