

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)	氏名	宮本 克利
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目			
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)			
論文審査担当者			
主 査	教授 越智 光夫		
審査委員	教授 瀧原 義宏		
審査委員	教授 横田 和典		
〔論文審査の要旨〕			
<p>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。近年、様々な領域において手術後の機能再建に再生医学を用いた手法が研究されつつある。例えば整形外科領域では、末梢神経の再生に CD133 陽性細胞の移植が有用であること (<i>Kijima, J Neurosurg, 2009</i>)、泌尿器科領域では、ラット陰茎海綿体神経損傷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が有用であることが報告されている (<i>Matsuura, Urology, 2006</i>)。そこで本研究では、陰茎海綿体神経再生のより効果的な手法の確立を目指し、ラット陰茎海綿体神経損傷モデルを用いて、ヒト骨髄由来 CD133 陽性細胞とアルギン酸ゲルシートの併用による神経の再生を検討した。</p> <p>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、中央部を 2mm 切除した。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 手術を行った群 (SH 群) の 4 群を作成した。手術 12 週後に陰茎海綿体神経の中枢側にある major pelvic ganglion に電気刺激を加え、最大陰茎海綿体内圧 (intracavernous pressure: ICP) と平均大腿動脈圧 (mean arterial pressure</p>			

：MAP) の比 (ICP/MAP) を算出し、勃起機能を評価した。続いて前立腺を摘出、凍結切片を作成し、神経組織の指標として neuronal nitric oxide synthase (nNOS) に対する蛍光免疫染色を行い、その陽性面積を比較した。同様に、血管の指標として von Willebrand factor (vWF)、 α -smooth muscle actin (α SMA) に対する 2 重染色を行い、2 重染色陽性の血管をカウント、血管密度を算出して比較した。さらに、再生した神経、血管におけるヒト CD133 陽性細胞由来の割合を検討するため手術 4 日後、12 週後における CD 群の前立腺を用いて、ヒト由来マーカーである human nuclei antibody (HNA) と vWF、HNA と S100、HNA と nNOS との 2 重染色を行った。また、神経、血管の再生機序を解明するため手術 4 日後にアルギン酸ゲルシートを摘出し、real time PCR を用いて nerve growth factor (NGF)、vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現量を AL 群と CD 群で比較した。

その結果、EX 群を除く 3 群において前立腺周囲に神経組織が、AL 群、CD 群ではアルギン酸ゲルシート内に血管構造が確認された (HE 染色)。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 、nNOS 陽性面積は SH 群 $8670 \pm 940 \mu\text{m}^2$ 、EX 群 $1350 \pm 340 \mu\text{m}^2$ 、AL 群 $2440 \pm 490 \mu\text{m}^2$ 、CD 群 $7390 \pm 1240 \mu\text{m}^2$ で、CD 群では EX 群に比較して有意に ICP/MAP が高く、nNOS 陽性面積が広がった。また、CD 群の血管密度 ($12.67 \pm 0.25/\text{mm}^2$) は AL 群 ($4.96 \pm 1.27/\text{mm}^2$) のそれよりも有意に高かった。HNA との 2 重染色試験では、S100、nNOS の陽性細胞はすべて HNA 陰性、vWF と HNA の 2 重陽性細胞はごくわずかであり、再生された神経ならびに血管の多くはラット由来と考えられた。アルギン酸ゲルシートにおける CD 群の NGF、VEGF 発現量は、AL 群に比較してそれぞれ 9.8 倍、4.8 倍高かった。

以上の結果から、本論文は移植された CD133 陽性細胞は、NGF、VEGF の発現を増強させ、神経再生、血管新生を促進させること、その作用はアルギン酸ゲルシート単独よりも強いことが示唆された。

また、本論文はヒト骨髄由来 CD133 陽性細胞がラット陰茎海綿体神経の再生を誘導することを示す初めての研究であり、前立腺癌の術後勃起障害に対する新しい再生医療としての可能性を提供するものである。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。