

主論文の要旨

**Injection of Dental Pulp Stem Cells Promotes Healing
of Damaged Bladder Tissue in a Rat Model of
Chemically Induced Cystitis**

化学的に惹起したラット膀胱炎モデルへの歯髄幹細胞の注入は
損傷膀胱組織の治癒を促進する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 泌尿器科学分野

(指導：後藤 百万 教授)

廣瀬 雄二郎

【緒言】

間質性膀胱炎または膀胱痛症候群 (Interstitial cystitis/painful bladder syndrome: IC/PBS) は膀胱内への尿の貯留による恥骨上の痛み, 頻尿, 尿意切迫感を主な症状とする疾患である. 病理像として, 膀胱上皮の損傷とそれに伴う皮下組織の破壊が報告されている. 提唱されている治療法のほとんどが全身的な投薬による対症療法であるが, 膀胱内へは尿道を介して局所的処置を応用できる. 間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells: MSCs) の移植は様々な疾患において新たな治療の選択肢として使用されている. その中の一つに歯髄幹細胞 (Dental pulp stem cells: DPSCs) がある. 本研究では, 膀胱上皮の化学的損傷とそれに伴う皮下組織の破壊を惹起したラット膀胱炎モデルに対し, 尿道を介したDPSCsの膀胱内への注入が与える影響を検討した.

【方法】

医学的に不要で正常な智歯 (19~27歳, n = 6) を健常成人男性より抜歯後, 歯髄組織を取り出し, DPSCsを分離培養した. 実験及び解析に必要な十分量の細胞を確保するために4~5代目まで継代培養した. フローサイトメトリーにて幹細胞表面マーカー (CD105, CD29, CD44), 血管内皮細胞マーカー (CD31), そして血球系共通のマーカー (CD45) を調べた. ラット (F344/NSIc ♀ 10週齢) の膀胱に麻酔下で塩酸200 μ L (0.1 mol/L) を1分間貯留させ膀胱炎を惹起した. 膀胱炎発症24時間後に, PBS 300 μ Lに懸濁した 2.0×10^6 個のDPSCs, またはPBS 300 μ Lを注入した. 免疫抑制剤としてタクロリムスを毎日0.2 mg/kgで腹腔内投与した. タイムスケジュールをFigure 1に示す. 6日間の組織学的変化と炎症度を, 組織切片を作製しHE染色で評価した. また, 組織中及び尿中の炎症性サイトカイン定量とmyeloperoxidase (MPO) の定量を行った. 6日経過後においては, 畜尿刺激に対する膀胱のコンプライアンスを比較するために膀胱内圧測定を行った. また, 神経毒であるレジニフィラトキシンを膀胱内に投与し, 疼痛行動 (Licking, 患部を舐める; Freezing, 痛みですくむ) の頻度を測定した. さらに, 組織切片においてトリジンブルー染色, 及びアポトーシスマーカーであるcleaved caspase-3で免疫蛍光染色を行った. 移植したDPSCsの局在を確認するために, ヒトY染色体に対するプローブを作製し, *in situ* hybridizationで検出した. DPSCsの培養上清中に分泌されるtrophic factorを調べるために, 60~70%コンフルエントになるまで培養し, その後24時間の無血清培養を行った. 得られた培養上清を濃縮し, 分泌されているサイトカイン及びケモカインを測定した. 比較対象としてhuman adult dermal fibroblasts (NHDFs) の培養上清を同様に準備した.

【結果】

本実験に使用した DPSCs (Fig. 2A, B) は幹細胞表面マーカー (CD105, CD29, CD44) 陽性率がいずれも 90%以上を示し, 血管内皮細胞マーカー (CD31) 陽性率は1%以下, そして血球系共通のマーカー (CD45) の陽性細胞は確認されなかった (Fig. 2C, Table 1). PBS 注入群及び DPSCs 注入群において 2 日後では組織の炎症の程度に差は見られ

なかったが、注入 6 日後では、PBS 注入群と比較して、DPSCs 注入群において治癒傾向が確認された (Fig. 3)。これは膀胱組織および尿中の炎症性サイトカインの発現量 (Table 2, 3), 及び MPO 量 (Fig. 4A) と関連していた。注入 6 日後では、PBS 注入群と比較して、DPSCs 注入群において畜尿刺激に対する排尿間隔の延長 (Fig. 4B, Table 4), 疼痛刺激に対する疼痛行動の減少がみられた (Fig. 4C)。注入 6 日後の組織像を詳しく見てみると、PBS 注入群では膀胱上皮直下の肥満細胞の浸潤 (Fig. 5A), 膀胱上皮のアポトーシスの亢進 (Fig. 5B) が確認されたが、DPSCs 注入群では観られなかった。DPSCs は注入 3 日後まで膀胱上皮上で確認された (Fig. 6)。また、DPSCs の CM 中では、fibroblast growth factor (FGF)-2, vascular endothelial growth factor (VEGF), C-C family ケモカイン, そして C-X-C family ケモカインなどの様々な trophic factor が検出された (Table 5)。

【考察】

本研究では、化学的に惹起したラット膀胱炎モデルへの DPSCs 注入は、損傷膀胱組織の治癒を促進することが示された。DPSCs 注入群では、注入 6 日後の組織像で、膀胱上皮のアポトーシスが抑制されていた。膀胱上皮の機能不全は間質性膀胱炎で高頻度に確認され、それにより尿中の溶質、特にカリウムの透過が起こり、神経と筋を脱分極させ、組織を傷害すると報告されている。また、炎症性サイトカインである IL-1 β , IL-6, そして TNF- α は末梢神経障害、痛覚過敏を引き起こすことが知られている。本実験では、膀胱組織の治癒に応じて、IL-1 β , IL-6, そして TNF- α の組織中および尿中の量が減少している。DPSCs の注入による膀胱上皮の保護が皮下組織の保護に繋がり、膀胱のコンプライアンスの改善、及び疼痛行動の頻度減少をもたらしたと考えられる。MSCs の治療効果には trophic factor の分泌が関与していると報告されている。今回使用した DPSCs が培養上清中に豊富に分泌していた VEGF, FGF-2, MCP-1 などは血管内皮細胞や線維芽細胞のアポトーシスを抑制し増殖を促進すると報告されている。C-C family や C-X-C family のケモカインは炎症性細胞の走化性因子であるが、組織のリモデリングに関与していると報告されている。以上のことより、膀胱組織の損傷に対し、DPSCs のような MSCs が膀胱上皮上に局在することで、損傷膀胱組織のリモデリングの促進、膀胱上皮のアポトーシスを抑制することにより組織の治癒を促進すると考えられた。

【結論】

化学的に惹起したラット膀胱炎モデルへの DPSCs の注入は、損傷膀胱組織の治癒を促進することが確認された。また、DPSCs は組織治癒を促進するサイトカインを分泌する能力を有し、膀胱内に注入した場合は膀胱上皮上に局在することで膀胱上皮のアポトーシスを抑制することが示された。