

氏 名 ・ (本籍)	喜早 祐介 (埼玉県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第1029号
学位授与の日付	令和2年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Candidate genes involved in the defunctionalization and refunctionalization of the urinary bladder induced by bladder anuria and reperfusion (ウサギモデルを使用した無尿および膀胱再灌流による廃用性萎縮膀胱および回復に関与する候補遺伝子の解明とそのヒト腎移植臨床検体での検証)
論文審査委員	(主査) 河谷 正仁 教授 (副査) 寺田 幸弘 教授      山田 武千代 教授

## 学位論文内容要旨

### Candidate genes involved in the defunctionalization and refunctionalization of the urinary bladder induced by bladder anuria and reperfusion

ウサギモデルを使用した無尿および膀胱再灌流による廃用性萎縮膀胱および回復に関与する候補遺伝子の解明とそのヒト腎移植臨床検体での検証

申請者氏名 喜早祐介

#### 研究目的

膀胱再生医療への展開を視野に、無尿による膀胱機能低下と、尿再灌流による膀胱機能回復における、分子生物学的背景の解明のため、新しいウサギ手術モデルを開発した。ウサギでの遺伝子発現結果の検証のため、ヒト移植前の透析患者の廃用性萎縮膀胱からの検体を RT-PCR で解析した。

#### 研究方法

メスの週齢 18 週から 26 週のウサギを用い、コントロール群、萎縮群、回復群の 3 つのグループに分けた。0 週、8 週、14 週に全身麻酔での開腹下で膀胱容量、膀胱内圧、膀胱コンプライアンスをウロダイナミクスで測定した。萎縮群、回復群では、0 週で両側尿管を膣に吻合する尿路変更を行い、膀胱内を無尿にした。回復群では、8 週で片側尿管を膀胱に再吻合し、膀胱内に尿を再灌流させた。14 週のウロダイナミクス測定を行ったのち、膀胱検体を採取した。採取した膀胱検体で、3 群間の膀胱重量の比較と、HE 染色と Masson-Trichrome 染色を用いて顕微鏡的に組織の厚み、膠原線維の割合などの形態比較を行った。遺伝子発現変化を網羅的に検索するため、各群 4 検体ずつの膀胱筋層組織を用いて DNA マイクロアレイを行い、各群間で有意な発現変化を認めた遺伝子のうち、膀胱機能や細胞の増殖などに関わる遺伝子について、ウサギの膀胱筋層および粘膜の検体を用いて RT-PCR で発現量の解析を行った。さらに秋田大学病院で 2015 年～2017 年に生体腎移植を行った患者の膀胱組織 44 検体を用いて同様に筋層、粘膜について RT-PCR を行い、ウサギ組織との遺伝子発現の比較を行った。

#### 研究成績

8 週目の回復群のウサギ膀胱容量とコンプライアンスは、コントロールよりも有意に低く、14 週では萎縮群よりも高かった。膀胱重量は萎縮群で軽く、組織全層の厚さには各群間で差を認めなかった。膠原線維の割合は萎縮群で他の 2 群よりも有意に増加していた。ウサギ膀胱筋層 DNA マイクロアレイでは、萎縮群における IGFBP2、UPK1B、および CST6 は有意にコントロールに比較し発現低下しており、また回復群における AGTR2 は、有意に萎縮群と比較して発現低下しており、これらの発現変化は RT-PCR によって検証された。ヒト膀胱筋層では、UPK1B と CST6 の有意な発現低下と、膀胱粘膜における IGFBP2 の有意な発現低下が膀胱萎縮の過程で示され、これらはウサギ膀胱筋層 DNA マイクロアレイとウサギ膀胱 RT-PCR の結果と一致した。

#### 結論

廃用性萎縮膀胱およびその回復の新しいウサギモデルにおける、筋層における UPK1B および CST6 と、粘膜における IGFBP2 の発現低下が、廃用性膀胱萎縮の過程でヒト腎移植前の透析患者の膀胱と共通して示された。

## 学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査：河谷 正仁

申請者：嘉早 祐介

論文題名：Candidate gene involved in the defunctionalization and refunctionalization of the urinary bladder induced by bladder anuria and reperfusion

(ウサギモデルを使用した無尿および膀胱再灌流による廃用性委縮膀胱および回復に関与する候補遺伝子の解明とそのヒト腎移植臨床検体での検証)

## 要旨

著者の研究は論文内容要旨に示すようにメスウサギに手術を加え膀胱を無尿とし、その後再度の手術によって膀胱に尿を蓄尿・排尿ができるようにした。これによっておきる膀胱の排尿機能変化、組織変化、遺伝子の変化を経時的に検討した。またヒト腎移植前の透析前患者の廃用性委縮膀胱を用いての遺伝子変化も評価し排尿機能関連遺伝子の変化を提言した。

本研究の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下のとおりである。

## 1) 斬新さ

廃用性委縮膀胱およびその回復について新しく作ったウサギモデルを用いて検討し、筋層における UPK1B よ CST6 の発現の低下、粘膜における IGFBP2 の発現の低下を報告した。さらにこれが廃用性膀胱委縮の破堤でヒト移植前の透析患者膀胱での遺伝子発現の変化の検討結果と共通していることを示した。

## 2) 重要性

無尿によっておこる膀胱機能低下が末梢臓器における組織学的な変化を伴っていることはこれまでも報告されてきた。今回は新たなウサギモデルによって機能的・形態的变化を証明しただけでなく、尿路の再灌流により排尿機能が回復することを明らかにした。これに加えて、遺伝子解析を実施し、筋層における UPK1B および CST6, 粘膜における IGFBP2 の発現の低下を報告した。さらにヒト腎移植前の透析前の患者の廃用性委縮膀胱でも同様の遺伝子の低下が認められた。排尿機能の低下と関連した遺伝子の候補を明らかとした本

研究は非常に重要である。

## 3) 実験方法の正確性

本研究では、ウサギでの尿路変更術と膀胱再灌流のための尿管吻合術を実施しモデルとして確立した。病態生理学的な膀胱機能の検討、組織学的検討とともに、DNA アレイによる遺伝子検索をおこなうことから研究の目的を十分に考えた計画と実行したこと評価できる。モデル作成に関しては無尿の期間を必要かつ最短の期間に設定し、再灌流後の結果の変化も検討するなど結果の習得に対して計画性の高さが伺える。一方、臨床でのヒト腎移植前の透析前患者の廃用性委縮膀胱において遺伝子の検討し、結果をウサギモデルの結果と比較しており目的がはっきりした検討であると評価できた。結果は統計学的検討が加えられており客観的で正確性がある。

## 4) 表現の明瞭さ

本研究の持つ意味、計測方法、評価パラメータをもとに得られた結果簡潔、明瞭に記載し、十分に考察を加えている。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定する。