HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Trinitrobenzene sulfonic acid誘発腸炎モデルラットに対するヒト羊膜間葉系幹細胞投与とヒト羊膜間葉系幹細胞由来培養上清の注腸投与の効果［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	宮本, 秀一
Description	配架番号：2323
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12582号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65943
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Shuichi_Miyamoto_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　宮本　秀一

学 位 論 文 題 名

Trinitrobenzene sulfonic acid 誘発腸炎モデルラットに対するヒト羊膜間葉系幹細胞投与とヒト羊膜間葉系幹細胞由来培養上清の注腸投与の効果
（Therapeutic Effects of Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation and Conditioned Medium Enema in Rats with Trinitrobenzene Sulfonic Acid-induced Colitis）

【背景と目的】クローン病は非連続性に分布する全層性肉芽種性炎症や瘻孔を特徴とする原因不明の慢性炎症性疾患で、腹痛や下痢、血便、体重減少などを生じさせる疾患である。クローン病患者数は年々増加しており、ヨーロッパや北米でのクローン病罹患率も上昇傾向であり、アジアでも急速に患者数が増加している。近年、治療抵抗性や重症のクローン病患者に対する、間葉系幹細胞(MSC; mesenchymal stem cell)を用いた細胞治療の効果が報告されている。MSC は胚性幹細胞(ES 細胞; embryonic stem cell)や人工多能性幹細胞(iPS 細胞; induced pluripotent stem cell)とともに、再生医療材料として期待されており、骨髄や脂肪由来の MSC が再生医療材料として用いられることが多い。しかし、これらの採取には身体への侵襲を伴い、一度の採取で得られる細胞数は少量であることや、ドナーが高齢だった場合など治療に必要な量の質の高い細胞を獲得することが難しい可能性がある。本研究では、ヒト羊膜には多量の MSC が含まれており、侵襲なく採取できる点などから MSC ソースとして羊膜に注目した。ヒト羊膜由来 MSC (hAMSC; human amnion-derived MSC)が、Dextran sulfate sodium 誘発腸炎モデル、放射線性直腸炎モデル、肝硬変モデルなどの様々なモデルラットに投与することによりに腸炎や肝硬変の病態を改善することが報告されており、また hAMSC 由来培養上清 (hAMSC-CM; hAMSC-conditioned medium)は炎症細胞の活性化を抑制し、放射線照射から細胞を守る能力があることも報告されている。本研究では、クローン病モデルとして幅広く用いられている Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 誘発腸炎モデルラットに対する hAMSC と hAMSC-CM のそれぞれの投与効果を検討した。
【材料と方法】北海道大学大学院医学研究科における医の倫理委員会の承認を得て、同意を得られた妊婦の帝王切開時に胎児を娩出した後、卵膜を羊膜と絨毛膜に分け、羊膜から hAMSC を分離・培養した。まず、Flow Cytometry 法を用いて hAMSC の表面抗原解析を行った。また、hAMSC の骨分化と脂肪分化誘導を行い、多分化能を評価した。hAMSC-CM は carboxymethyl cellulose を加え 2%濃度のゲルとして用い hAMSC-CM gel とした。MEM-alpha のみを室温 37°C･湿度 95%･5%二酸化炭素濃度下で 48 時間保存したものを Standard Medium(SM)として回収し、SM gel とした。続いて、10 週齢雄 SD ラットを用いて hAMSC 経静脈的投与の効果と hAMSC-CM gel 肛門的投与の効果を検討した。TNBS 誘発腸炎は Day0 に麻酔下で外径約 10mm のテフロン製動物用経口投与チューブを肛門から結腸内に挿入し、頭部を下に吊り下げた状態にし、チューブから TNBS 45 mg/kg を 30% Ethanol 200 μl に溶解したものを投与し 10 秒間その状態を保ったのちに、仰向けに寝かせ腸炎を作製した。①hAMSC 経静脈的投与の検討 : Control 群(n=6)、TNBS 群（TNBS 投与 3 時間後に陰茎静脈より PBS 200 μl を投与。n=9）、TNBS + hAMSCs 群（TNBS 投与 3 時間後に陰茎静脈より hAMSC 1.0×10^6 個を浮遊させた PBS 200 μl を投与。n=9）の 3 群に分けて実験を行った。②hAMSC-CM gel 経肛門的投与の検討 : Control 群(n=6)、TNBS + SM gel 群（TNBS 投与 3 時間後、Day1 および Day2 に肛門から SM gel 400 μl を投与 n=9）、TNBS

+ CM gel 群（TNBS 投与 3 時間後、Day1 および Day2 に肛門から hAMSC-CM gel 400 µl を投与。n=9）の 3 群に分けて実験を行った。どちらの実験系も連日の体重測定を行い、Day7 に全てのラットの内視鏡による結腸観察・評価および採血と腸管の採取を行い屠殺した。摘出したラット腸管を用いて病理学的評価･炎症性サイトカインの発現量の評価を行った。
【結果】hAMSC は MSC の陽性マーカーである CD44、CD73、CD90、CD105 の発現を認めた。また、陰性マーカーである CD34、CD11b、CD19、CD45、HLA-DR を発現していなかった。hAMSC は脂肪細胞および骨細胞への分化誘導されたことを確認した。①hAMSC 経静脈的投与の結果、TNBS + hAMSCs 群は TNBS 群より有意差をもって体重の低下を抑制した。内視鏡での評価では、TNBS + hAMSCs 群は TNBS 群より有意差をもってスコアの改善を認めた。免疫組織学的評価では MPO（Myeloperoxidase）陽性好中球、CD68 陽性単球/マクロファージの数は有意に減少していた。また TNBS + hAMSCs 投与群では TNBS 群と比較して、TNF-α、CXCL1、CCL2、IL-6 の発現が抑制されていた。②hAMSC-CM gel 肛門的投与の結果、TNBS + CM gel 群は TNBS + SM gel 群より有意差をもって内視鏡スコアの改善を認めた。Histological score では、TNBS + CM gel 群は TNBS + SM gel 群と比較して低下し、MPO 陽性好中球、CD68 陽性単球/マクロファージ、CD3 陽性 T リンパ球の組織への浸潤数は有意に減少していた。また hAMSC-CM gel 投与群では TNBS + SM gel 群と比較して、TNF-α、CXCL1、CCL2、IL-6 の発現が抑制されていた。
【考察】本研究では､TNBS 誘発腸炎ラットに対しての hAMSC 経静脈的投与と hAMSC-CM gel 経肛門的投与の治療効果を検討し、次の結果が得られた。(1) hAMSC 経静脈的投与により、体重の低下を抑制した。(2) hAMSC 経静脈的投与により内視鏡スコア、及び病理スコアの改善を認め、腸管の炎症性サイトカイン発現を抑制した。(3) hAMSC-CM gel 経肛門的投与により、内視鏡スコア、及び病理スコアの改善を認め、腸管の炎症性サイトカイン発現を抑制した。TNBS 誘発腸炎に対する骨髄由来・脂肪由来・臍帯由来 MSC の投与による腸炎改善効果は多数報告されており、投与方法も経静脈的投与・腹腔内投与・経肛門的投与など様々である。骨髄由来 MSC 投与が脂肪由来 MSC 投与よりも TNBS 誘発腸炎ギニアピッグモデルの腸管神経障害や神経叢炎を抑えるといった報告も認め､MSC のソースによっての違いも報告されているがいずれも腸炎の改善を認めている。また、MSC-CM は vascular endothelial growth factor (VEGF)、CCL2、また、basic fibroblast growth factor (bFGF) や hepatocyte growth factor (HGF)などのサイトカインを豊富に含んでいることが報告されており、これらの関与によって腸炎が抑制されているものと考えられている。本研究では hAMSC-CM gel を経肛門に投与した。MSC 同様に腹腔内投与など様々な投与方法が検討されているが、経肛門的投与は簡便で侵襲が少なく、実臨床でも 5-アミノサリチル酸製剤やステロイドの注腸が行われている点からも有用な方法と考える。本研究では MSC のソースとして羊膜を用いた。羊膜由来 MSC の利点として、他組織由来のものよりも抗炎症作用をもつ prostaglandin E2 を多く産生することや､卵膜は通常帝王切開時に廃棄されるものであり、羊膜を得るための侵襲は発生しないこと、また 1 回の羊膜採取で大量の MSC が得られる点などがある。ステロイド抵抗性の GVHD（Graft-versus-host disease）に対する hAMSC を投与した結果では骨髄由来の MSC 投与と同等の治療成績が得られており､他組織由来の MSC と比較しても効果があることがわかっている。羊膜は MSC 治療における今後期待できる細胞ソースと考えられ、今後さらなる検討が望まれる。
【結論】TNBS 誘発腸炎ラットに対して、hAMSC 経静脈的投与と hAMSC-CM gel 経肛門的投与は腸炎の改善を認めた。hAMSC は侵襲なく採取できることから、新しい治療方法として今後様々な疾患に応用されることが期待される。