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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　　宮本　秀一

	主査	教授　武冨　紹信
審査担当者	副査	教授　岩永　敏彦
	副査	教授　坂本　直哉
	副査	教授　平野　聡

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）

本研究で、申請者は Trinitrobenzene sulfonic acid 誘発腸炎モデルラットに対してヒト羊膜由来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を検討した。

まず、申請者はクローン病モデルである Trinitrobenzene sulfonic acid（TNBS）誘発腸炎モデルラットを作成した。10 週齢のオスのラットに、30%エタノール 200μL に TNBS 45mg/kg を溶解したものを注腸し、クローン病に類似した全層性の炎症を発生させ腸炎モデルラットとした。次に、TNBS 誘発腸炎モデルラットにヒト羊膜由来間葉系幹細胞（hAMSCs; human amnion-derived MSCs）の静脈投与とヒト羊膜間葉系幹細胞由来培養上清（hAMSC-CM; hAMSC-conditioned medium）ゲルの注腸の効果を検討した。体重変化の推移、内視鏡的評価、病理学的評価、炎症性サイトカインの発現量を用いて腸炎の改善の程度を評価した。病理学的評価は既報を用いて炎症の程度をスコア化し、また免疫染色を行いマクロファージ・好中球・T リンパ球といった炎症性細胞浸潤の程度をカウントした。炎症性サイトカインとして TNF-α・CXCL1・CCL2・IL6 の発現量を評価した。

TNBS 誘発腸炎モデルラットに対する hAMSCs 静脈投与を実験 1 として施行した。hAMSCs 静脈投与の結果、非投与群よりも有意差をもって体重減少を抑制、内視鏡スコアの改善、マクロファージ・好中球数の減少を確認した。また炎症性サイトカインの発現量が抑制される傾向があった。つづいて TNBS 誘発腸炎モデルラットに対する hAMSC-CM の注腸を実験 2 として施行した。hAMSC-CM 注腸の結果、非投与群よりも有意差をもって内視鏡スコアの改善、マクロファージ・好中球数・T リンパ球の減少を確認した。また炎症性サイトカインの発現量が抑制される傾向があった。

これらの結果から、hAMSCs と hAMSC-CM の投与は TNBS 誘発腸炎を抑制する効果があることを示

した。また、侵襲がなく採取できる点などから hAMSCs や hAMSC-CM はクローン病の新規治療法として期待される。

審査にあたり、まず副査の岩永教授より、ヒトではなくラットの羊膜由来 AMSC を用いたほうが治療効果を強く認めるのかどうか、また投与された hMSCs は炎症部位に集積しているのかどうかとの質問があり、申請者はラットの AMSC を用いた検討は既報も含めて認めないため、現時点では効果の差については不明なことを説明した。また、hMSCs の集積については、申請者らの研究グループで過去に行った放射線腸炎モデルラットに hAMSCs 静脈投与を行った結果から、hAMSCs は肺に集積して腸炎部位には認めなかったことを説明し、hAMSCs 細胞自体の効果ではなく細胞から産生される液性因子によるパラクライン効果による腸炎抑制が考えられると回答した。次に副査の平野教授より、TNBS 腸炎モデルのラットごとでの腸炎の程度の均一性について、また複数回の内視鏡観察を行いラットごとの腸炎の程度を確認してから hAMSCs を投与することはできなかったのかとの質問があった。まず、申請者は hAMSCs 投与前のラットごとの腸炎の程度の均一性についての確認はできていないことを説明した。TNBS 腸炎特有の腸炎部位が散在性かつ炎症の程度も不安定にできるといった評価を困難にする点を補うために今回申請者は内視鏡で最も炎症が強い部位を確認し、同部位腸管を切除し検討し評価した。また内視鏡観察を行うためには麻酔が必要なため、麻酔死のリスクもあるため複数回の内視鏡観察ができないことを説明した。副査の坂本教授からは hAMSCs から分泌される液性因子はどのようなものがあるか、また今後本研究を臨床試験として行うために解決しなければいけない点についての質問があった。MSC-CM には Prostaglandin E2 (PGE2)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、basic fibroblast growth factor (bFGF)、hepatocyte growth factor (HGF)などのサイトカインが豊富に含まれていることが報告されていることを説明し、とくに hAMSC-CM には PGE2 が多く含まれていることを説明した。また今後臨床試験を行うために安全性などの項目を確認していかなければいけないと回答した。最後に主査の武冨教授から現在進行している人に対する臨床試験の現状についての質問がある、再生不良性貧血や GVHD など様々な疾患に対して投与されており、phase3 や phase4 に進んでいるものがあると返答した。

本研究の基礎論文は現在 American Journal of Translational Research 誌に投稿中であり、国際学会においても高く評価され、今後のクローン病領域の治療開発につながることが期待される。

審査員一同は，これらの成果を高く評価し，大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ，申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。