



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ラット脊髄損傷モデルにおける急性期FTY720投与の治療効果および亜急性期BMSC細胞シート硬膜下投与の治療効果の検証 [全文の要約]
Author(s)	山崎, 和義
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2562 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14096号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78301
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuyoshi_Yamazaki_summary.pdf



学 位 論 文(要約)

ラット脊髄損傷モデルにおける急性期 FTY720 投与
の治療効果および亜急性期 BMSC 細胞シート硬膜下
投与の治療効果の検証

(Verification of therapeutic effects of acute FTY720
administration and subacute BMSC cell sheet subdural
administration in rat spinal cord injury model)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

山崎 和義

学 位 論 文(要約)

ラット脊髄損傷モデルにおける急性期 FTY720 投与
の治療効果および亜急性期 BMSC 細胞シート硬膜下
投与の治療効果の検証

(Verification of therapeutic effects of acute FTY720
administration and subacute BMSC cell sheet subdural
administration in rat spinal cord injury model)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

山崎 和義

【背景と目的】

脊髄損傷の治療は様々な角度から全世界で精力的な研究が続けられているが、重度の脊髄損傷を劇的に改善させる有効な治療方法はまだ確立されていない。現在治療効果が期待されている有効な治療として、急性期に損傷部付近に生じる炎症や浮腫といったメカニズムを中心とする進行性の 2 次損傷と亜急性期以降に神経再生を妨げるグリア瘢痕形成を抑制する目的で使用される薬物治療が挙げられる。さらに、近年では各種の幹細胞移植を行う再生医療も注目を浴び、全世界で様々な臨床試験も進行しているが、脊髄損傷に対する細胞投与経路で最も安全性が高く有効な方法に関しても、検証の余地が残されている。

こうした背景をふまえ、脊髄損傷急性期に対する薬物治療と効果のメカニズム検証に加え、新たな亜急性期の幹細胞移植方法に関する検証を目的とした実験を行った。

脊髄損傷急性期における薬物治療の研究として、S1P 受容体作動薬として知られる FTY720(フィンゴリモド)の治療効果を動物実験で検証した。(実験①)さらに、脊髄損傷亜急性期における効果的な幹細胞移植方法を検証する目的で、骨髄間葉系幹細胞シートの治療効果と組織学的な検討を行った。(実験②)

【実験①の方法】

Sprague Dawley ラット (BW200-300g) を用いて Th6,7 レベルの椎弓切除を行い、Th6/7 脊髄をはさみ圧 30g のクリップで 1 分間 (n=30) はさみ、中等度の脊髄損傷モデルを作成した。術翌日に FTY720 を 1.5mg/kg 腹腔内注射した群(n=15)と vehicle(生理食塩水腹腔内投与)群(n=15)にわけた。その後 1 週間毎に 6 週間後まで Basso-Beattie-Bresnahan hind limb locomotor test (BBB scale) を用いて後肢運動機能を、von Frey hairs (Touch Test Sensory Evaluator Kit) を用いて mechanical allodynia について評価した。脊髄損傷後 1 週間後の炎症細胞浸潤については抗 Iba1/CD68 抗体を用いて免疫染色を行った。脊髄損傷 6 週間後の病理組織学的評価として、脊損部の頭尾側方向の長さおよび体積をルクソールファストブルー+ヘマトキシリン&エオジン染色で、損傷部付近に形成されたグリア瘢痕について GFAP 染色で評価した。さらに、下降性疼痛抑制系の評価を目的に、 μ opioid receptor (MOR) と hydroxytryptamine transporter (HTT) 抗体による蛍光免疫染色を行った。一部の個体(n=3 ずつ)には、脊損 6 週間後に脊損部 1cm 頭側に軸索トレーサー(fluor-ruby:FR)を投与し脊損部尾側の皮質脊髄路の軸索数についても評価した。

【実験①の結果】

FTY720 投与群では、術 2 週間後から BBB score と von Frey test における疼痛閾値が優位に高値となり、運動機能の改善を認める他に感覚障害改善の可能性が示唆された。脊損 6 週後の損傷範囲の長さ・体積は FTY720 投与群で優位に少なく、グリア瘢痕形成も抑制されていた。さらに、FR による運動線維の評価や、HTT や MOR による感覚関連線維の評価でも、FTY720 群で残存線維が優位に多い結果であり、高い治療効果が認められた。

【実験①の考察】

FTY720(fingolimod)は、末梢血液中の T リンパ球の数を低下させるため、強力な免疫抑

制作用を発揮することが知られている。SCI 治療においても高い炎症抑制効果が、2 次損傷を軽減し、運動・感覚系の神経線維を保護したと考えられた。さらに、FTY720 はアストロサイトの S1P レセプターへの作用により、神経再生を妨げるグリア瘢痕形成を抑制することが知られており、これらのメカニズムによって神経再生にも寄与したと考えられる結果であった。また、下降性疼痛抑制系の残存により、疼痛抑制効果が高まり、運動機能がより改善された可能性も想定された。

【実験②の方法】

実験①と同じ方法でラット脊髄損傷モデルを $n=60$ 作成し、1 週間後に各ラットを細胞シート移植群、髄内直接移植群、コントロール群にふりわけた($n=20$ ずつ)。細胞シート群には、GFP-SD ラットから採取・培養した 7.0×10^4 の細胞数の BMSC 細胞シートを、損傷部脊髄背側硬膜下に移植した。髄内移植群には、脊損 5mm 頭側髄内に同数の細胞を注射した。コントロール群は脊損部の硬膜を切開・縫合する処置のみを行った。

脊損から 7 週間後まで、BBB score、von Frey test を評価した。組織学的評価脊損後 7 週間後に、実験①と同様な組織評価を行った。さらに、移植細胞の生着について確認する目的で、抗 GFP 抗体と抗 NeuN 抗体による 2 重蛍光免疫染色を追加した。

【実験②の結果】

脊損 7 週間後の BBB score はシート群で最も高値であり、von Frey test の疼痛閾値も他 2 群と比べて優位に高かった。さらにシート群では、髄内移植群同様に脊損部周囲に GFP 陽性移植細胞の遊走・生着が確認され、一部は NeuN 陽性を示していた。また、細胞シート治療群は損傷範囲も無治療群に比べて小さく、炎症細胞数も少なかった。脊損部尾側における軸索トレーサーによる運動線維数の評価では、細胞シート群と髄内直接移植群で優位差は無かったが、MOR,HTT については細胞シート群で優位に保たれていた。

【実験②の考察】

脊髄髄内への直接注射は、正常脊髄の 2 次損傷を誘発するリスクがあり、より安全で有効な幹細胞投与方法の確立が重要と考えられる。幹細胞シート移植療法は、シートそのものが効率的な細胞生着に重要な役割を果たす足場の働きを有すると考えられ、多くの細胞を効率よく損傷部付近の組織に安全に供給可能となることで、良好な治療結果が期待されている。今回の実験でも、シート移植群は運動機能の優位な改善をもたらした上に、髄内細胞直接注射よりも高い疼痛抑制効果を有している可能性があり、今後のメカニズムの検証が重要となると考えられた。

【全体としての考察】

脊髄損傷における重要な後遺症の一つとして、進行性に悪化する感覚障害があげられる。これは、急性期から亜急性期にかけて起こる炎症が収束し、慢性期に移行する過程で、脊髄空洞の形成・拡大や、癒着性クモ膜炎が進行するために起こるとも考えられている。感覚障害の中でも、進行性の疼痛に関しては、運動機能の更なる悪化につながるだけでなく、心理面でも著しい悪影響を及ぼし、QOL を大幅に低下させるため、そのメカニズムの解明

と有効な治療方法開発が望まれる。しかし、多くは鎮痛剤を中心とした薬物治療に代表される対症療法が主体となっており、運動機能や自律神経機能と同様に、劇的な改善効果をもたらす確立された治療方法は少なく、様々な観点からの研究継続が重要と考えられる。

今回の実験で検証を行った、ラット脊髄損傷に対する急性期 FTY720 投与や亜急性期硬膜下幹細胞シート移植による治療は、後肢運動機能の改善だけでは無く、想定される以上の疼痛抑制効果ももたらしめている可能性が示唆される結果であった。そのメカニズムとして、炎症・グリア瘢痕形成の抑制に加えて、それぞれ異なる機序を通して疼痛抑制効果をもたらしていることが想定されており、感覚障害改善の機序解明に焦点をあてた研究を継続することで、脊髄損傷患者における感覚障害改善に役立つ新たな研究結果がもたらされる可能性がある。

本実験でも行われたように、FTY720 はラット脊損モデルに対しては腹腔内投与を行うだけで十分な治療効果を認めており、細胞移植治療と組み合わせた実験計画を立てることも容易に可能と考えられる。即ち、他家細胞移植において有利に働く免疫抑制作用に加えて、移植された幹細胞の生着に有利な局所環境を整える働きが知られており、今回行われた骨髄間葉系幹細胞シート移植の治療効果をさらに高める可能性も期待される。従って、今後の研究継続によるこうした薬物治療と幹細胞移植の併用療法の検証と早期の臨床応用が期待される。

【結論】

ラット急性期脊髄損傷モデルに対する FTY720 の治療効果を検証し、運動機能改善効果のみならず、疼痛抑制にも強い治療効果をもたらしている可能性が考えられた。

さらに、ラット脊損亜急性期の有効な幹細胞投与方法の検証を行う目的で、骨髄間葉系幹細胞シートの治療効果の検討を行った。脊損部への亜急性期細胞シート移植は、同数の幹細胞数の髄内直接移植よりも運動・感覚機能改善効果が高い可能性が示唆された。