



Title	急性期脊髄損傷に対する羊膜由来間葉系幹細胞静脈投与の脊髄-腸相関への関与 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	高宮, 宗一郎
Description	配架番号 : 2701
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14960号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85829
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	TAKAMIYA_Soichiro_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 高宮 宗一朗

学 位 論 文 題 名

急性期脊髄損傷に対する羊膜由来間葉系幹細胞静脈投与の脊髄-腸相関への関与
(Amnion-derived mesenchymal stem cells intravenous injection for acute spinal cord injury influences the spinal-gut axis)

【背景と目的】

脊髄損傷は、有効な治療法が未だに確立されず、未解決の問題を多く抱えた疾患であり、有効な新規治療法の開発が求められている。細胞治療は、脊髄損傷の問題点を解決し得る新規治療法として、近年注目されている治療法であり、数多くの基礎研究、臨床研究が進行しているが、作用機序の詳細については未解明な部分も多く残されている。

近年、腸管と他臓器の関連が注目されており、様々な疾患の発症や進行に対して腸内細菌が関与することが報告され始めている。脊髄についても、脊髄損傷と腸内細菌の他臓器移行（バクテリアル・トランスロケーション）や腸内細菌叢に関連性があると報告されており、両者が“脊髄-腸相関”により互いに関係していると考えら始めている。一方で、脊髄損傷に対する細胞治療が“脊髄-腸相関”に関与するのか、あるいはどのように影響するのかについては、これまで報告されていない。本研究の目的は、急性期脊髄損傷に対する羊膜間葉系幹細胞（amnion derived mesenchymal stem cell: AMSC）を用いた細胞治療が脊髄-腸相関にどのように影響を及ぼすかについて検証し、脊髄損傷に対する細胞治療の新しい作用機序を解明することである。

【対象と方法】

In vitro の実験として、AMSC が分泌する栄養因子を評価するために、培養上清を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を行った。

In vivo の実験として、127 匹の 9 週齢の雌 Sprague-Dawley ラットに、クリップ圧挫により Th6/7 高位の脊髄損傷を施した。脊髄損傷翌日に、尾静脈経由で AMSC（ 1×10^7 または 1×10^6 個/ml）またはリン酸緩衝生理食塩水を静脈内投与した。投与した AMSC の局在を評価するために、in vivo 撮像で蛍光標識した AMSC の分布を確認した。細胞投与後の治療効果判定として、Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) を用いた運動機能評価と、von Frey monofilament テストによる感覚機能評価を 1 週間毎に行った。また、脊髄 MRI で脊髄損傷周辺の水分子の拡散性を評価した。組織学的評価として、脊髄損傷 3 日後および 2 週間後の回腸に対するヘマトキシリン・エオジン（H-E）染色、過ヨウ素酸-シッフ（PAS）染色、密着結合評価のための免疫組織化学染色、腸固有神経評価のための蛍光免疫染色、脊髄損傷 4 週間後の脊髄に対する Kluver-Barrera 染色、局所炎症評価のための免疫組織化学染色を行った。さらに、バクテリアル・トランスロケーション評価として、脊髄損傷 3 日後および 1 週間後の回腸に対する細菌 fluorescence in situ hybridization (FISH) および、脊髄損傷 1 週間後の肝臓細菌

培養を行った。加えて、全身炎症評価のために、急性期の評価として血液 ELISA を、亜急性期以降の評価として脊髄損傷 4 週間後の胸腺および脾臓の計測を行った。

【結果】

In vitro の実験で、AMSC は脳由来神経栄養因子、血管内皮増殖因子、塩基性線維芽細胞増殖因子、表皮細胞増殖因子を対照よりも多く分泌していた。

In vivo 撮像により、静脈内投与した AMSC は主に肝臓と肺に分布することが明らかになった。神経機能評価では、脊髄損傷 2 週間後以降、AMSC (1×10^7 個/ml) 投与で対照よりも有意に運動機能の改善が見られたが、感覚機能には有意差を認めなかった。脊髄 MRI では、軸索方向への拡散性を表す axial diffusivity が、脊髄損傷 3 週間後に AMSC 投与で高い傾向であった。脊髄損傷 4 週間後の組織学的な脊髄損傷の範囲も、AMSC 投与により有意に縮小していた。回腸の組織学的評価としては、脊髄損傷 3 日後から AMSC 投与により、腸粘膜の萎縮が抑制され、PAS 染色で示される粘液産生能も改善した。脊髄損傷 2 週間後には、抗 neuronal nitric oxide synthase 抗体による蛍光免疫染色で示される腸蠕動能も有意な改善を認めた。脊髄損傷 1 週間後のバクテリアル・トランスロケーションにおいても、AMSC 投与で有意に少なかった。炎症の評価では、脊髄損傷急性期には治療群間で差はなかったが、亜急性期以降の胸腺の萎縮が AMSC 投与で抑制され、炎症の低減効果が示唆された。加えて、脊髄損傷 4 週間後の脊髄局所の活性化マクロファージ浸潤も、AMSC 投与で減少していた。

【考察】

急性期脊髄損傷に対する AMSC 静脈内投与は良好な運動機能改善効果を示すが、運動機能改善に先立って、回腸のバリア機能の改善、バクテリアル・トランスロケーションの抑制が起こり、これにより全身/脊髄局所の炎症が低減され、脊髄の 2 次損傷が抑制されると考えられた。

細胞治療の機序として、投与細胞が分化する機序や、栄養因子などによる保護効果が報告されているが、AMSC 静脈投与の機序は、細胞分布の結果から後者であると考えられた。AMSC は他の細胞種と比較しても、細胞増殖能が高く、免疫原性が低いといった、臨床応用に有利な特徴を有しており、今後の研究発展に期待できる細胞種である。過去の報告で、脊髄損傷後の腸蠕動低下や、腸内細菌叢の変化、バクテリアル・トランスロケーションについて報告されており、“脊髄-腸相関”が明らかになりつつあるが、脊髄損傷に対する細胞治療の“脊髄-腸相関”への関与を示すのは本研究が初めてである。本研究では、AMSC がどのように腸の機能を改善したのかについて、およびバクテリアル・トランスロケーションが脊髄の 2 次損傷を引き起こした直接的な証拠について解明することはできなかったが、ほとんど注目されてこなかった新しい作用機序を明らかにできた点で、意義のある研究であると考えている。

【結論】

脊髄損傷に対する細胞治療の新しい作用機序の一つとして、“脊髄-腸相関”の関与が明らかになった。AMSC は脊髄損傷後早期から回腸を改善し、バクテリアル・トランスロケーションの抑制にも関与することで、脊髄損傷の悪化を抑制すると考えられる。