HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Author(s)	髙宮, 宗一朗
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14960
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85916
Type	doctoral thesis
File Information	TAKAMIYA_Soichiro.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

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）

２０２２年３月

北　海　道　大　学

高　宮　宗　一　朗

学　位　論　文

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）

２０２２年３月

北　海　道　大　学

高　宮　宗　一　朗

目　次

発表論文目録および学会発表目録　・・・・・・・・・・・　1頁

要旨　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　2頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　5頁

緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　6頁

方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　8頁

結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　１６頁

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　３３頁

結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　３７頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　３８頁

利益相反　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　３８頁

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　３９頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Soichiro Takamiya, Masahito Kawabori, Kazuyoshi Yamazaki, Sho Yamaguchi, Aki Tanimori, Koji Yamamoto, Shunsuke Ohnishi, Toshitaka Seki, Kotaro Konno, Khin Khin Tha, Daigo Hashimoto, Masahiko Watanabe, Kiyohiro Houkin, Miki Fujimura. Mesenchymal stem cells alleviate intestinal dysfunction after spinal cord injury through spinal-gut axis. J Neurosci (Submission)

本研究の一部は以下の学会で発表した。

1. 高宮 宗一朗、川堀 真人、山﨑 和義、関 俊隆、大西 俊介、
   山本 幸司、谷守 亜紀、山口 翔、藤村 幹

演題名；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

学会名；第 36 回日本脊髄外科学会、2021 年 6 月 3 日、国立京都国際会館

2. 高宮 宗一朗、川堀 真人、山﨑 和義、関 俊隆、大西 俊介、
   山本 幸司、谷守 亜紀、橋本 大吾、山口 翔、藤村 幹

演題名；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

学会名；日本脳神経外科学会 第 80 回学術総会、2021 年 10 月 27 日、パシフィコ横浜

要旨

【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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AD	axial diffusivity
AMSC	amnion derived mesenchymal stem cell
BBB	Basso-Beattie-Bresnahan
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
β-NGF	β-nerve growth factor
DTI	diffusion tensor imaging
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FA	fractional anisotropy
FISH	fluorescence in situ hybridization
HGF	hepatocyte growth factor
IFN	interferon
IL	interleukin
KGF	keratinocyte growth factor
MRI	magnetic resonance imaging
nNOS	neuronal nitric oxide synthase
PAS	periodic acid-Schiff
PBS	phosphate-buffered saline
RD	radial diffusivity
SD	Sprague-Dawley
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIP	vasoactive intestinal polypeptide
zo-1	zonula occludens 1

緒言

脊髄損傷は、人口 100 万人当たり 40~80 人が罹患すると報告されているが(Bickenbach et al., 2014)、医学が発達した現代においても有効な治療法は確立されておらず、未解決の問題を抱えた疾患である。重度の四肢麻痺や感覚障害、排便・排尿障害などの多岐にわたる神経症状を後遺するという医学的問題のみならず、患者が受傷以前の経済活動を継続できないことや高度の介護を要するようになることに伴う医療経済的問題もはらんでおり、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であり、数多くの基礎研究での有効性のもと、世界中で臨床研究が進行している(Cofano et al., 2019; Yamazaki et al., 2020a)。脊髄損傷に対する細胞治療の作用機序については、神経再生、血管新生、グリア瘢痕の抑制、抗炎症作用など様々な報告がなされており(Cofano et al., 2019)、複数の作用機序によって神経機能の改善が得られると考えられるが、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。例えば、腸内細菌叢の変化が、多発性硬化症やアルツハイマー病、パーキンソン病などの進行に関係すると言われており、“腸-脳相関”として認知されるようになったのは最近のトピックスである(Rutsch et al., 2020)。他にも、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、1 型糖尿病、非アルコール性脂肪肝炎など、あらゆる疾患に対して腸内細菌叢を介した腸管免疫機構の関連が報告されている(Wu et al., 2020)。脊髄についても例外ではなく、脊髄損傷後に腸内細菌叢に変化が生じる、腸内細菌叢の変化に応じて脊髄損傷後の神経機能回復が異なるなど、脊髄損傷と腸管の関連についての報告が散見される(Gungor et al., 2016; Kigerl et al., 2016; O'Connor et al., 2018)。これらの関連は、脊髄損傷後の自律神経障害に伴って生じる腸管蠕動の低下からも説明できると考えられ(Chung and Emmanuel, 2006; Enck et al., 2006; Karlsson, 2006; Riegger et al., 2007; Riegger et al., 2009)、腸管蠕動低下に伴う腸粘膜の萎縮、腸管バリア機能の障害による腸内細菌の他臓器への移行（バクテリアル・トランスロケーション)、菌体成分により炎症が惹起されることによる脊髄損傷の悪化、という悪循環が生じていると考えられている(Kigerl et al., 2016; O'Connor et al., 2018)。

このように脊髄損傷と腸管は、“脊髄-腸相関”により互いに関係していると考えられる一方で、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。本研究では、羊膜由来間葉系幹細胞（amnion derived mesenchymal stem cell: AMSC）を用いて、急性期脊髄損傷に対する細胞治療が脊髄-腸相関に影響を及ぼすかについて検証を行った。細胞治療が脊髄-腸相関にどのように関連するかを考察し、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が、本研究の目的である。

方法

1)　AMSC の準備

カネカ社から提供されたヒト AMSC 凍結バイアルを使用した。この AMSC は、健常の妊婦から出産後に提供された羊膜から単離、培養された後、-80℃まで凍結して保管されたものである。

凍結 AMSC は、動物モデルへ投与する目的で使用する際には、使用する 5 日前に解凍し回復培養を行った（Figure 1)。培養器は、室温 37℃、CO_2 濃度 5%の湿潤環境とした。使用当日に、後述する介入群に応じ、リン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline: PBS）を用いて 1 x 10^7 個/ml または 1 x 10^6 個/ml に調整した。

また、AMSC の栄養因子分泌能を評価する目的で、解凍直後に培養液で 9.5 x 10^4 個/ml に調整し、24 時間培養した後に培養上清を回収した。この際、培養液単独も同一の環境に静置し、24 時間後に回収して対照とした。

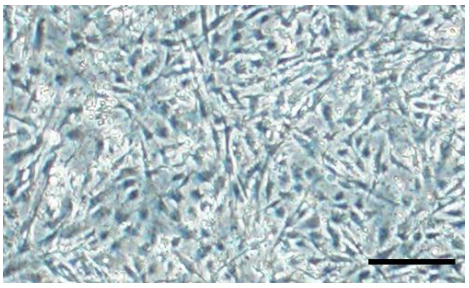

Figure 1: 回復培養中の羊膜由来間葉系幹細胞（amnion derived mesenchymal stem cell: AMSC）
紡錘状の形態を有する細胞の増殖が観察できる（scale bar = 100μm)。

2)　AMSC の栄養因子分泌能評価

AMSC からの栄養因子分泌能を評価するために、前述の培養上清および培養液をサンプルとして、Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）を実施した。測定項目としては、神経栄養因子として、脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor: BDNF)、血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor: VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor: bFGF)、肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor: HGF)、ベータ神経成長因子（β-nerve growth factor: β-NGF）を、腸栄養因子として、表皮細胞増殖因子（keratinocyte growth factor: KGF)、R-Spondin-1 を測定した(Cofano et al., 2019; Saha et al., 2011)。ELISA には市販の ELISA キット（total BDNF, human HGF, human VEGF, human bFGF, human R-Spondin 1, and human KGF: R&D Systems, Inc.,

MN, USA; human β-NGF: RayBiotech, Inc., GA, USA）を使用し、付属のプロトコールに従って実施した。

3)　動物モデルの作成

本研究に関わる動物実験は、国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認を受けた（承認番号: 17-0065)。また、北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。

127 匹の 9 週齢の雌 Sprague-Dawley（SD）ラット（CLEA Japan, Inc., Japan）が本実験で使用された。搬入後 1 週間の馴化期間の後、クリップ圧挫により脊髄損傷を作成した(Yamazaki et al., 2020b)。5%イソフルランを含む N_2O/O_2 混合ガス（N_2O 70%, O_2 30%）で麻酔導入後、イソフルラン濃度を 1.5-2%に下げて維持麻酔とした。体表から触知可能な Th2 棘突起を指標として、触診で Th6-7 を同定し、直上で背部表皮を切開した。Th6-7 の棘突起や椎弓に付着する筋群を剥離し、ニッパーで椎弓を外した。硬膜嚢腹側を愛護的に剥離した後、ミズホ社製の脊髄損傷作成用のクリップのブレードを硬膜嚢腹側に挿入し、Th6/7 高位で硬膜ごと脊髄を挟み込んだ（Figure 2)。1 分間静置した後、クリップをゆっくり外し、切離した椎弓は癒着防止のために硬膜嚢背側に戻した。筋層および表皮は 4-0 ナイロン糸で縫合して手術終了とした。

脊髄損傷作成後は、排尿障害を生じるため、脊髄損傷後 2 週間までは 1 日 3 回、以降は 1 日 2 回、用手的に排尿処置を行った。

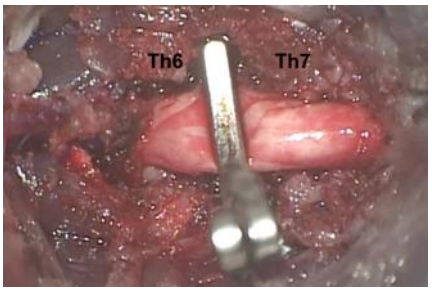

Figure 2: 脊髄損傷モデルの作成
Th6-7 椎弓切除後、Th6/7 高位の脊髄を硬膜嚢ごと小動物脊髄損傷モデル用クリップで挟み込み、脊髄損傷を作成した。

4)　AMSC 投与

脊髄損傷 24 時間後、後述する Basso-Beattie-Bresnahan（BBB）スケールで下肢運動機能を評価し、BBB スコアが 1 点以下の個体に対して介入を行った。

モデル作成時と同様に全身麻酔の導入・維持を行い、尾静脈経由で AMSC または PBS を静脈内投与した。AMSC 投与の際には、急速な投与による塞栓症等の有害事象を回避するために、ゆっくりと（0.5ml/分）投与した。介入は、除外基準を満たす個体以外の 122 匹を対象とし、無作為に高用量群（H 群, AMSC 1 x 10^7 個/ml, n=52)、低用量群（L 群, AMSC1 x 10^6 個/ml, n=18)、および対照群（C 群, PBS のみ 1ml, n=52）の 3 群に分けて行った。

5)　神経機能評価

細胞投与後の治療効果を検証するために、脊髄損傷翌日および、脊髄損傷後 1 週間毎に 4 週間後まで、神経機能評価を行った。運動機能は BBB スケールを用いて評価した(Basso et al., 1995)。ラットをオープンフィールドで 5 分間自由歩行させ、左右の後肢の運動を観察した。各肢の運動を 21 点満点（無動: 0 点、障害なし: 21 点）で点数化し、左右の平均値をその個体の運動機能として記録した。また、脊髄損傷以下の痛覚過敏を評価するために von Frey monofilament テストで評価した(Seki and Fehlings, 2008)。ラットをオープンフィールドに置き、20 段階の接触圧に分けられたフィラメント（最低圧: 0.008g、最高圧: 300g）で尾の付け根に触れ、逃避行動の有無を観察した。逃避行動を示す最低の接触圧をその個体の感覚機能として記録した。

両評価は、盲検化された 2 名の評価者が実施した。

6)　脊髄 magnetic resonance imaging（MRI）

高用量群、対照群に対して、脊髄損傷前および脊髄損傷後 1 週間毎に 3 週間後まで、脊髄 MRI を実施した。MRI は 3T の磁場強度の装置（Magnetom Prisma: Siemens Health Care, Germany）を使用し、8 チャンネルの小動物用コイルを用いて撮像した。T2 強調画像および拡散テンソル画像（diffusion tensor imaging: DTI）を撮像し、T2 強調画像で損傷高位を同定しながら、DTI で損傷高位より頭尾側方向に 3 椎体にわたる範囲（Th4-9）を評価した。DTI から、拡散の異方性を表す fractional anisotropy（FA)、軸索方向への拡散の度合いを表す axial diffusivity（AD)、軸位断面の拡散の度合いを表す radial diffusivity（RD）を、それぞれ抽出した。測定対象範囲内の脊髄を関心領域として ImageJ（National Institutes of Health, USA）で作図し、関心領域内の FA 値、AD 値、RD 値それぞれの平均値を計測した。

7）　In vivo 撮像による投与細胞の分布の評価

6 匹の SD ラットを、自家蛍光を減弱させる目的で、脊髄損傷 2 週間前よりアルファルファを含有しない食餌（iVid-neo: ORIENTAL YEAST Co., Ltd., Japan）で飼育した。また剃毛を行い、毛由来の自家蛍光も除去した。前述の如く、Th6/7 高位で脊髄損傷を作成した。

24 時間後、高用量群に対して投与する AMSC を蛍光ラベリングする目的で、投与前に 30 分間、AMSC を 31.6mM の XenoLight DiR（Perkin Elmer, Inc., USA）と共培養した。3 匹の高用量群には蛍光ラベリングした AMSC 1 x 10^7 個を、残り 3 匹の対照群には PBS 1ml を、それぞれ尾静脈投与した。

AMSC または PBS の投与 2 時間後および、投与 1 週間後まで毎日、FUSION FX7 EDGE（Vilber Lourmat, France）を使用して蛍光の検出を行った（励起波長: 680nm、蛍光波長: 750nm）。露光時間は 0.5 秒に統一した。高用量群の 1 匹は投与 2 時間後の撮像直後に、その他の 5 匹は投与 1 週間後の撮像直後に、それぞれ安楽死させて各臓器を摘出し、臓器ごとの蛍光の検出も実施した。

8）　組織の採取

組織学的評価のために、下記の臓器を、目的に応じた時相で採取した。

i）　脊髄（Th6/7 を中心に頭尾側へ各 1cm）：脊髄損傷 2 時間後（n=7）、3 日後（n=6）、1 週間後（n=5）、4 週間後（n=26）
ii）　空腸（胃幽門部から肛門側へ 10cm～15cm）：脊髄損傷 3 日後（n=12）、2 週間後（n=14）
iii）　回腸（虫垂から吻側へ 2cm～7cm）：脊髄損傷 3 日後（n=18）、1 週間後（n=8）、2 週間後（n=14）
iv）　肝臓：脊髄損傷 1 週間後（n=8）
v）　肺：脊髄損傷 1 週間後（n=8）
vi）　胸腺：脊髄損傷 4 週間後（n=26）
vii）　脾臓：脊髄損傷 4 週間後（n=26）

臓器採取の際には、全身麻酔下に開胸し、経心臓的に生理食塩水 50ml で灌流した後、4%パラホルムアルデヒド 50ml で灌流固定を行った。各臓器は摘出後 24 時間、4%パラホルムアルデヒドに浸漬した。胸腺および脾臓以外の臓器に関しては、パラフィン包埋して切片（5～10μm 厚）を作成した。

9）　投与細胞の分布の組織学的評価

前述の組織切片（脊髄: 脊髄損傷後 2 時間後、3 日後、1 週間後; 回腸: 脊髄損傷後 3 日後、1 週間後; 肝臓/肺: 脊髄損傷後 1 週間後, 各 5μm 厚）を用い、ヒト細胞核マーカーである Ku80 に対する免疫組織化学染色を行い、投与された AMSC の分布を組織学的にも評価した。

パラフィン切片をキシレンで脱パラフィンした後、170℃に加熱した pH6.0 のクエン酸緩衝液で 3 分間抗原賦活処理を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性の阻害のため、3%過酸化水素水を滴下し 15 分静置した。一次抗体には、抗 Ku80 抗体（500 倍希釈, ab80592; Abcam, Cambridge, UK）を使用し、室温で 1 時間反応させた。その後、Histofine Simple Stain MAX-PO（Nichirei Biosciences Inc., Japan）を室温で 30 分間反応させ、3,3'-diaminobenzidine（DAB）で染色を行った。

10） 脊髄損傷の範囲の評価

前述の脊髄切片（脊髄損傷 4 週間後, 10μm 厚）を用い、Kluver-Barrera 染色を行い、脊髄損傷の範囲を評価した(Yamazaki et al., 2020b)。

パラフィン切片をキシレンで脱パラフィンした後、60℃のルクソールファストブルー液に 12 時間浸漬した。0.05%炭酸リチウム水溶液、70%エタノールで分別した後、クレシルバイオレット液で染色し、脱髄部分の頭尾側方向の長さ［L（mm）］および脊髄損傷中心部の前後径［D（mm）］を計測した。また、脊髄損傷の体積［V（mm^3）］を以下の近似式で算出した（Dohrmann and Panjabi, 1976)。

$V = \pi D^2 L/12$

11） 小腸の粘膜構造の評価

前述の空腸および回腸切片（脊髄損傷 3 日後/2 週間後, 5μm 厚）を用い、ヘマトキシリン-エオジン（H-E）染色を行い、粘膜構造を評価した(Onishi et al., 2018)。

パラフィン切片をキシレンで脱パラフィンした後、ヘマトキシリン液に 5 分間、エオジン液に 4 分間浸漬した。各標本で、絨毛および陰窩が明瞭に識別できる箇所を無作為に 10 箇所選び、絨毛の長さ（mm)、陰窩の厚さ（mm）および筋層の厚さ（mm）を計測した。また、長軸方向 1mm あたりの絨毛数を絨毛密度（/mm）として計測した。

12） 小腸の粘液産生機能の評価

前述の回腸切片（脊髄損傷 3 日後/2 週間後, 5μm 厚）を用い、過ヨウ素酸-シッフ（periodic acid-Schiff: PAS）染色を行い、杯細胞に存在する腸

粘液の量を評価した。
パラフィン切片をキシレンで脱パラフィンした後、0.5%過ヨウ素酸水溶液に 10 分間、シッフ液に 15 分間、ヘマトキシリン液に 30 秒浸漬した。各標本に対し、重複しない 5 つの拡大視野（100 倍）を無作為に選択し、陽性細胞の面積を自動計測した（BZ-X Analyzer, Keyence Co., Japan）。

13） 小腸の粘膜透過性の評価
前述の回腸切片（脊髄損傷 3 日後, 5μm 厚）を用い、密着結合の構成要素である zonula occludens 1（zo-1）、claudin 1、occludin に対する免疫組織化学染色を行い、小腸粘膜の透過性を評価した(Wang et al., 2020)。
前述と同様に免疫組織化学染色を行った。一次抗体には、抗 zo-1 抗体（1000 倍希釈, 61-7300; Invitrogen Life Technologies, Germany）、抗 claudin 1 抗体（400 倍, ab15098; Abcam, Cambridge, UK）、および抗 occludin 抗体（200 倍希釈, ab216327; Abcam, Cambridge, UK）をそれぞれ使用した。

14） 小腸の蠕動運動の評価
前述の回腸切片（脊髄損傷 3 日後/2 週間後, 5μm 厚）を用い、腸固有神経の神経伝達物質である neuronal nitric oxide synthase（nNOS）および vasoactive intestinal polypeptide（VIP）に対する免疫染色を行い、小腸の蠕動運動を間接的に評価した(Kabatas et al., 2008)。
パラフィン切片をキシレンで脱パラフィンした後、170℃に加熱した pH6.0 のクエン酸緩衝液で 3 分間抗原賦活処理を行った。一次抗体には、抗 nNOS 抗体（400 倍希釈, 4231; Cell Signaling Technology Inc., USA）および抗 VIP 抗体（300 倍希釈, 37973; Cell Signaling Technology Inc., USA）をそれぞれ使用し、4℃で一晩反応させた。その後、Histofine Simple Stain MAX-PO（Nichirei Biosciences Inc., Japan） を室温で 30 分間反応させ、TSA Fluorescein System（SAT701001EA; Akoya Biosciences, USA）で染色し、次いで 4’,6-diamido-2-phenylindole（DAPI, D1306; Invitrogen Life Technologies）で核染色を行った。ImageJ（National Institutes of Health, USA）を用いて、筋層内の陽性面積を計測した。

15） 腸内細菌叢の評価
脊髄損傷 3 日後および 2 週間後の小腸内容物および便を採取し、16S リボソーム RNA 解析を用いて、腸内細菌叢の変化を評価した。
小腸内容物および便は、前述の組織採取の際に無菌的に採取し、-80℃で

保管した。凍結乾燥したサンプルを 65℃の Lysis Solution F（Nippon Gene Co., Ltd., Japan）に溶解し、遠心後の上清から MPure Bacterial DNA Extraction Kit（MP Biochemicals, USA）を用いて DNA を抽出した。2-step tailed polymerase chain reaction 法を用いてライブラリーを作製し、MiSeq Reagent Kit v3（Illumina, USA）を用いて 2 x 300bp の条件下でシーケンシングを行った。Qiime 2（ver. 2020.8, https://qiime2.org）を用いてプライマー配列、キメラ配列、ノイズ配列を除去し、得られた代表配列と Greengene データベース（ver. 13_8）を比較して菌種を推定した。

細菌叢の多様性の指標として、Simpson インデックスを算出した。

16）　バクテリアル・トランスロケーションの評価

腸管の透過性亢進により、腸内細菌が粘液層を越えて、他臓器に移行するか否かを評価するために、①回腸を用いた細菌 fluorescence in situ hybridization（FISH）、②肝臓および肺の細菌培養を行った。

① 細菌 FISH：前述の回腸切片（脊髄損傷 3 日後/1 週間後, 5μm 厚）を用い、細菌の検出を行った(Ara et al., 2020)。プローブには Cy5 で標識した EUB338（5’-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3’）を用いた。パラフィン切片をキシレンで脱パラフィンした後、1μg のプローブを含むハイブリダイゼーション溶液を滴下し、40℃で一晩反応させた。洗浄後、DAPI 入りの封入剤で封入した。重複しない 5 つの拡大視野（200 倍）を無作為に選択し、粘膜固有層のプローブ由来の蛍光を計測することで、ムチン層を乗り越えて侵入した細菌の個数を評価した。

② 細菌培養：脊髄損傷 1 週間後、前述の組織採取に先立ち、肝臓の一部を無菌的に採取した。採取する臓器は、先行研究を参考に決定した(Kigerl et al., 2016)。採取した検体は均質化し、滅菌水で希釈液とした。希釈液は標準寒天培地（Nissui, Japan）を用いて、37℃で 48 時間培養した。培養後、コロニー数を計測した。なお、前述の先行研究の結果から肺の培養も検討したが、パイロット試験として行った正常ラット（脊髄損傷を起こしていないラット）の肺培養では、細菌の培養が認められ、脊髄損傷におけるバクテリアル・トランスロケーションを評価する臓器としては不適切と判断したため、肝臓のみで評価を行った。

17）　局所の炎症評価

前述の脊髄切片（脊髄損傷 4 週間後, 5μm 厚）を用い、活性化マクロフ

ァージおよびマイクログリアのマーカーである CD68 および Iba-1 に対する免疫組織化学染色を行い、脊髄損傷部局所での炎症を評価した(Kawabori et al., 2013; Kawabori et al., 2015)。

前述と同様に免疫組織化学染色を行った。一次抗体には、抗 CD68 抗体（500 倍希釈, MCA341GA; Bio-Rad Laboratories, Inc., USA）および抗 Iba-1 抗体（1500 倍, 019-19741; FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Japan）をそれぞれ使用した。各標本に対し、脊髄損傷中心部から 5mm 頭側および 5mm 尾側で重複しない拡大視野（400 倍）を 5 つずつ無作為に選択し、陽性細胞数を計測した。

18)　全身の炎症評価

ラットの尾静脈から経時的に血液を採取し、遠心後に得られた血清をサンプルとした ELISA により、血中 interleukin（IL）-6 および血中 interferon（IFN）-γ 濃度を定量した。採血は、脊髄損傷前、脊髄損傷翌日、3 日後、および 1 週間後に実施した。ELISA には市販の ELISA キット（rat IL-6 and rat IFN-γ; R&D Systems, Inc., USA）を使用し、付属のプロトコールに従って実施した。

また、炎症に伴い胸腺および脾臓が萎縮するという先行研究に基づいて、前述の胸腺および脾臓（脊髄損傷 4 週間後）の長さを計測し、亜急性期以降の全身の炎症を評価した(Tan et al., 2018)。

19)　統計学的手法

各データは平均値±標準誤差で表した。統計学的解析は、JMP Pro 14（SAS Institute Inc., USA）を用いて実施し、サンプルサイズは過去の当教室での脊髄損傷モデルの研究を参考に設定した(Yamazaki et al., 2020b)。in vitro の栄養因子評価を除く 2 群間比較には、Wilcoxon 順位和検定を用い、栄養因子評価における 2 群間比較では Shapiro-Wilk 検定で正規性検定を行った後、Welch の t 検定を実施した。3 群間比較には、Kruskal-Wallis 検定後に Steel-Dwass 検定で多重比較を行った。$P < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。

結果

1)　AMSC の栄養因子分泌能

脊髄損傷に対する AMSC の治療機序を明らかにするために、ELISA を用いて栄養因子の分泌能を評価した。AMSC の培養上清では、対照と比較して、BDNF（Fig. 3A)、VEGF（Fig. 3B)、bFGF（Fig. 3C)、KGF（Fig. 3D）の濃度が有意に高かった。一方、HGF（Fig. 3E）やβ-NGF（Fig. 3F)、R-Spondin-1（Fig. 3G）については、各栄養因子の濃度に有意な差は見られなかった。

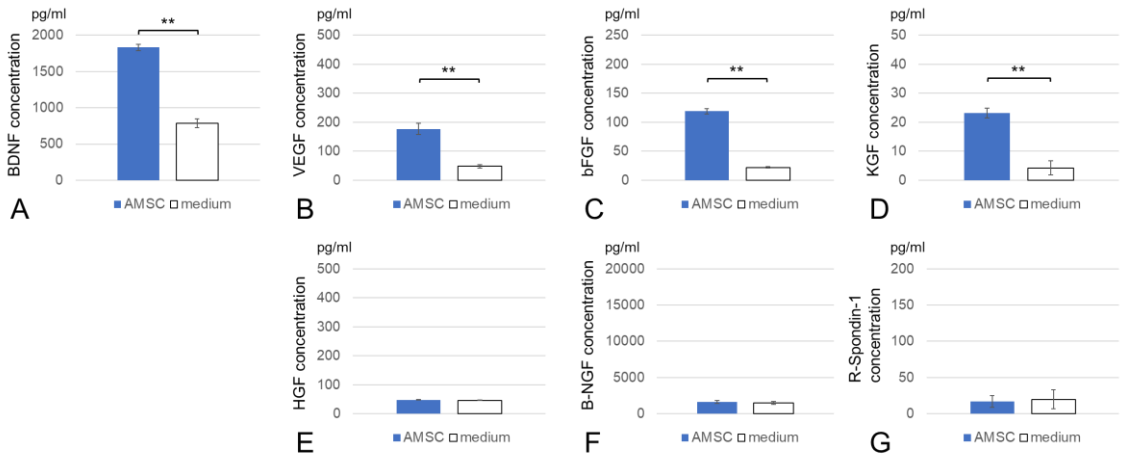

Figure 3: AMSC から放出される栄養因子の評価
各栄養因子の分泌能を、AMSC の培養上清と培養液単独をサンプルとした ELISA を比較することで評価した。（A）脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor: BDNF)、（B）血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor: VEGF)、（C）塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor: bFGF)、（D）表皮細胞増殖因子（keratinocyte growth factor: KGF）の濃度は AMSC の培養上清で有意に高かった（**p<0.01)。一方、（E）肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor: HGF)、（F）ベータ神経成長因子（β-nerve growth factor: β-NGF)、R-Spondin-1 の濃度は両者の間に有意差を認めなかった。

2)　AMSC 投与による脊髄損傷ラットの神経機能の変化

神経機能評価に組み込まれた 32 匹のうち、10 匹が H 群に、12 匹が L 群に、10 匹が C 群に無作為に割り振られた。このうち、L 群で 4 匹、C 群で 2 匹が 4 週間以内に死亡した。よって、4 週間後まで神経機能評価を完遂できた個体数は、H 群で 10 匹、L 群で 8 匹、C 群で 8 匹であった。

i）BBB スケール（下肢運動機能評価）

Figure4 に示すように、下肢運動機能は、脊髄損傷翌日はいずれの群でも BBB スケールで 0 点であった。その後、C 群を含めた全群で経時的に運動機能の改善を認めたが、2 週間以降で H 群の運動機能が C 群に比べて有意に回復した。また、L 群の運動機能も C 群より良く、3 週間後には有意な改善を認めた。H 群と L 群の間には、運動機能に関して統計学的な有意差を認めなかった。

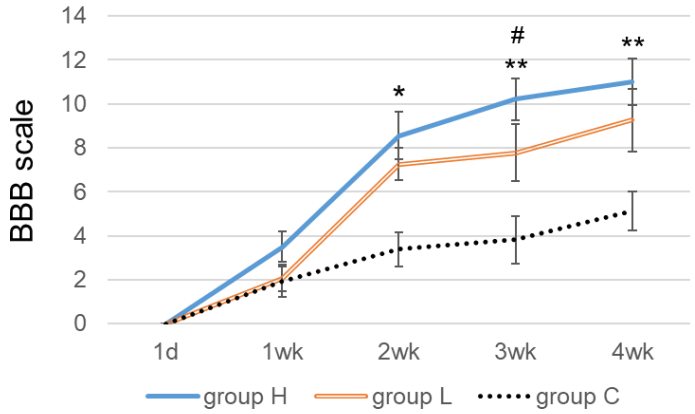

Figure4: Basso-Beattie-Bresnahan (BBB)スケールの経時変化
脊髄損傷後の下肢運動機能を BBB スケールで評価した。脊髄損傷 1 週間後まで各群に運動機能の差は認めなかったが、2 週間以降、H 群の運動機能は C 群よりも有意に良好であった（*p<0.05, **p<0.01; H 群 vs C 群）。また、3 週間後の L 群の運動機能は C 群よりも有意に良好であった（#p<0.05; L 群 vs C 群）。H 群と L 群の間には、いずれの週でも運動機能の差は見られなかった。

ii）von Frey monofilament テスト（感覚機能評価）

Figure5 に示すように、異痛症で示される感覚機能異常は、脊髄損傷翌日にいずれの群でも認められ、小さな接触圧の刺激でも逃避行動が見られた。疼痛閾値は、脊髄損傷 2 週間後まで、全群で同程度まで低下し、より小さな刺激でも過敏に逃避行動を示すようになった。その後、L 群および C 群の疼痛閾値の平均値は低下したまま推移し、H 群のみ疼痛閾値の平均値が上昇したが、統計学的な有意差は認めなかった。

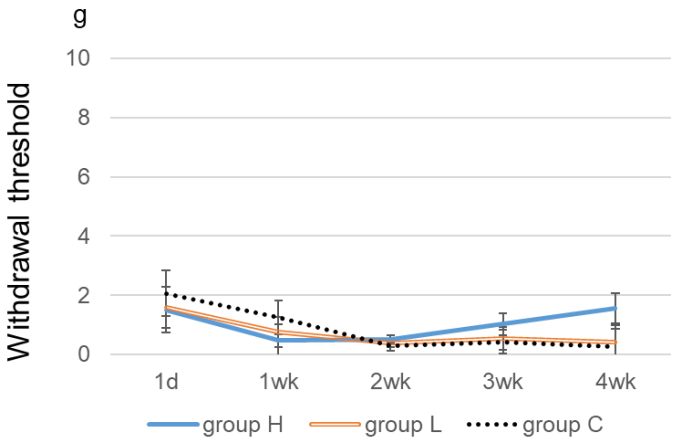

Figure5: von Frey monofilament テストによる疼痛閾値の経時変化
脊髄損傷後の感覚機能を von Frey monofilament テストで評価した。脊髄損傷 2 週間後まで、いずれの群でも疼痛閾値は同程度に低下した。2 週間以降、L 群および C 群の疼痛閾値は低値のまま変わらず、H 群の疼痛閾値は上昇したが、各群の間で有意な差は見られなかった。

3)　AMSC 投与後の脊髄損傷の長さおよび体積の変化

脊髄損傷 4 週間後の神経機能評価を実施したラット（H 群 10 匹、L 群 8 匹、C 群 8 匹）から採取した脊髄を用いて、脊髄損傷の長さおよび体積を計測した。H 群（Figure6A)、L 群（Figure6B）の脊髄損傷の範囲は、C 群（Figure6C）と比較して小さかった。脊髄損傷の長さ（Figure6D）については H 群で C 群より有意に短く、脊髄損傷の体積（Figure6E）については L 群で C 群より有意に小さかった。

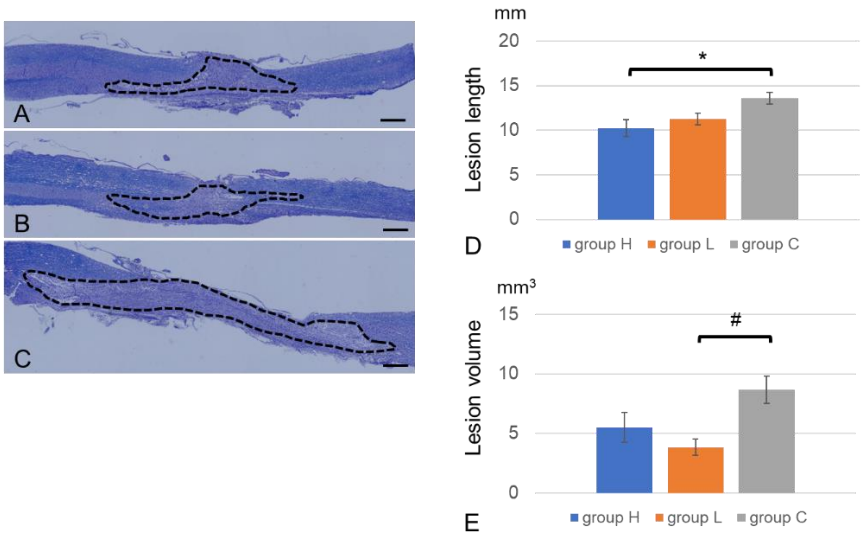

Figure6: 脊髄損傷の長さおよび体積
脊髄損傷 4 週間後に、Kluver-Barrera 染色で、H 群（A)、L 群（B）および C 群（C）の脊髄損傷の大きさを計測した（scale bar = 1mm)。脊髄損傷の長さは、H 群で C 群よりも有意に短かった（D, *p<0.05; H 群 vs C 群)。脊髄損傷の体積は、L 群で C 群よりも有意に小さかった（E, #p<0.05; L 群 vs C 群)。

4)　AMSC 投与後の MRI 所見の変化

前述の運動機能評価および脊髄損傷の範囲の結果から、急性期脊髄損傷に対する AMSC の治療効果が示唆された。H 群と L 群の間に有意な差を認めず、L 群でも治療効果が期待されるものの、H 群の方が作用機序を明確に評価できると考えられたため、以後の実験は H 群と C 群の 2 群で実施した。

脊髄損傷後の脊髄浮腫や神経線維の脱落を反映した変化を評価するために、8 匹のラット（H 群 4 匹、C 群 4 匹）が MRI 評価に組み込まれたが、脊髄損傷の影響や MRI 撮像中の麻酔の影響で死亡・脱落した個体があり、最終撮像まで完遂できたのは 5 匹（H 群 2 匹、C 群 3 匹）であった。脊髄損傷周囲の FA 値は、脊髄損傷後徐々に低下したが、両群間での差は認めなかった（Figure7A)。RD 値は脊髄損傷後に一時低下し、その後 C 群では徐々に上昇したが、H 群では個体間のばらつきが大きく、一定の傾向は見られなかった（Figure7B)。一方 AD 値は、両群とも脊髄損傷 1 週間後で大きく低下した後、再度上昇した。統計学的な有意差はないものの、特に脊髄損傷 3 週間後では C 群より H 群の方が高い傾向であった（Figure7C, p=0.0638)。関心領域内の AD 値の代表図を H 群（Figure7D)、C 群（Figure7E）に分けて示す。

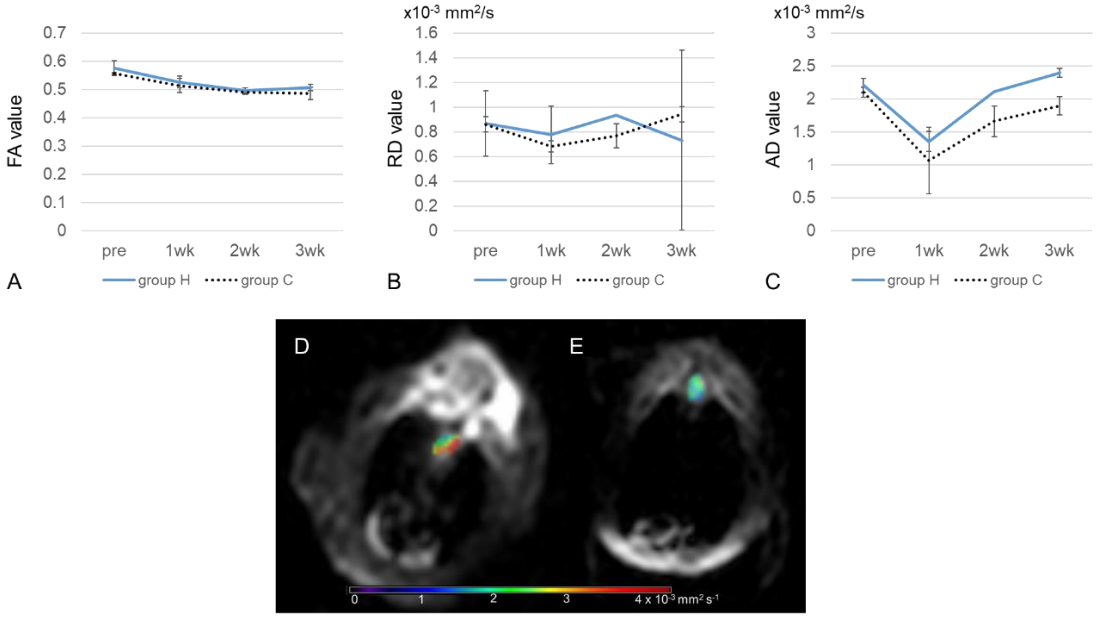

Figure7: 脊髄損傷後の fractional anisotropy (FA)、radial diffusivity (RD)、axial diffusivity (AD)の変化

脊髄損傷前から脊髄損傷後 3 週間まで、経時的に脊髄 MRI を撮像した。脊髄損傷周囲の FA 値（A）は、H 群、C 群とも徐々に減少し、2 群間に差は見られなかった。RD 値（B）は、C 群では脊髄損傷後一時低下し、その後上昇したが、H 群では一定の傾向を認めなかった。AD 値（C）は、両群とも脊髄損傷後に一時低下し、その後上昇したが、特に脊髄損傷 3 週間後では H 群（D）で C 群（E）より高い傾向であった。

5)　静脈内投与後の AMSC の分布

6 匹のラット（H 群 3 匹、C 群 3 匹）を用いて、静脈内投与した AMSC の体内動態を評価した。H 群では、AMSC 投与 2 時間後から、in vivo 撮像で上腹部に強い蛍光を認めた（Figure8A)。うち 1 匹のみ、安楽死させて各臓器を取り出し、in vivo 撮像で認めた蛍光の発生源を確認したところ、肝臓および肺のみで蛍光を認めた。以後、投与 1 週間後まで経時的に撮像を行った。H 群では徐々に蛍光強度は低下したものの、1 週間後まで上腹部の蛍光を確認できた（Figure8B, C)。1 週間後の in vivo 撮像の後、残る 5 匹も安楽死させて各臓器を取り出し、ex vivo 撮像を行ったが、H 群では投与 2 時間後と同様に肝臓および肺のみで蛍光を認めた（Figure8D, E)。なお、C 群ではいずれの時相でも蛍光を認めなかった。

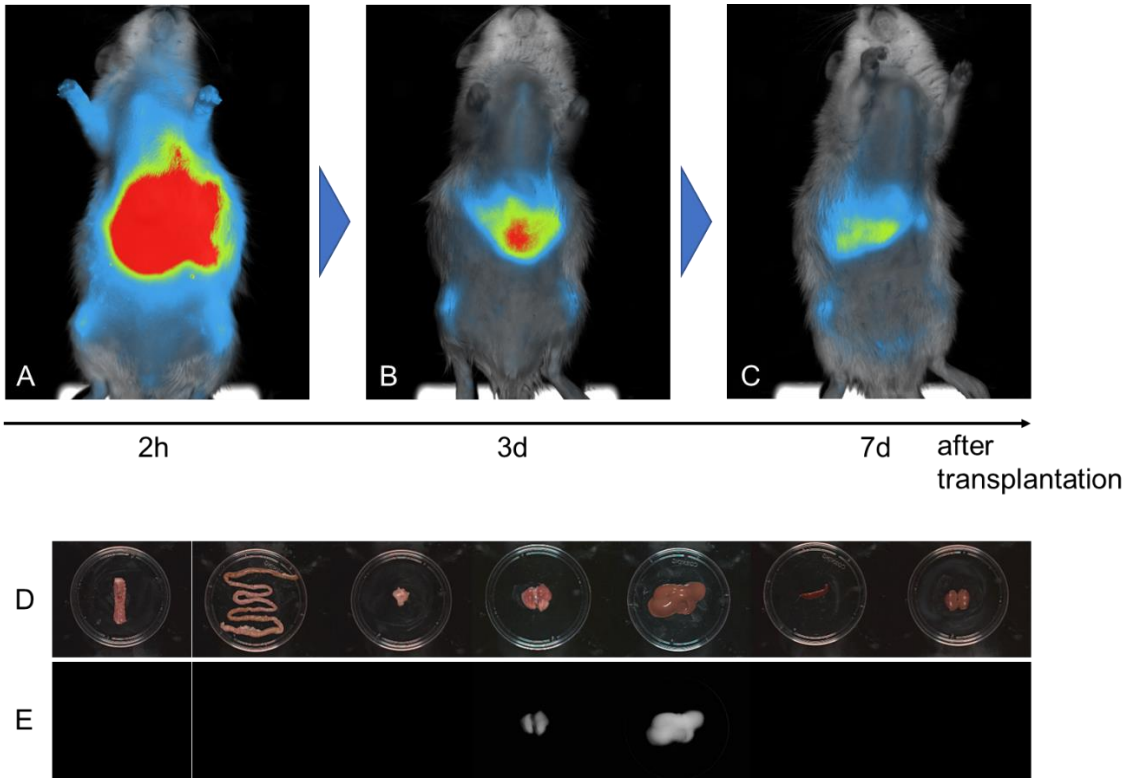

Figure8: 静脈内投与後の AMSC の分布（画像評価）
脊髄損傷ラットに対して AMSC を投与した 2 時間後から、1 週間後まで経時的に in vivo 撮像を行い、XenoLight DiR でラベリングした AMSC の分布を評価した。AMSC 投与 2 時間後には、ラットの上腹部に強い蛍光が検出され（A)、これは 3 日後（B)、1 週間後（C）にも検出可能であった。1 週間後の in vivo 撮像の後、各臓器を採取して ex vivo 撮像を行ったところ、肝臓・肺のみ蛍光を検出し、他臓器（脊髄・小腸・胸腺・脾臓・腎臓）では検出されなかった（D: 明視野撮影, E: 蛍光撮影)。

蛍光が検出された臓器に、組織学的にも AMSC が存在することを確認するため、また蛍光が検出されなかった臓器に AMSC が存在しないことを確認するために、抗 Ku80 抗体を用いて、肝臓、肺、脊髄、回腸の免疫組織化学染色を行った。肝臓、肺では AMSC 投与 1 週間後も Ku80 陽性細胞が検出された一方で（Figure9A, B)、脊髄、回腸では AMSC 投与 2 時間後、3 日後、1 週間後いずれにおいても Ku80 陽性細胞は検出されなかった（Figure9C, D)。以上より、in vivo/ex vivo 撮像における蛍光は、AMSC の分布を反映していると考えられた。

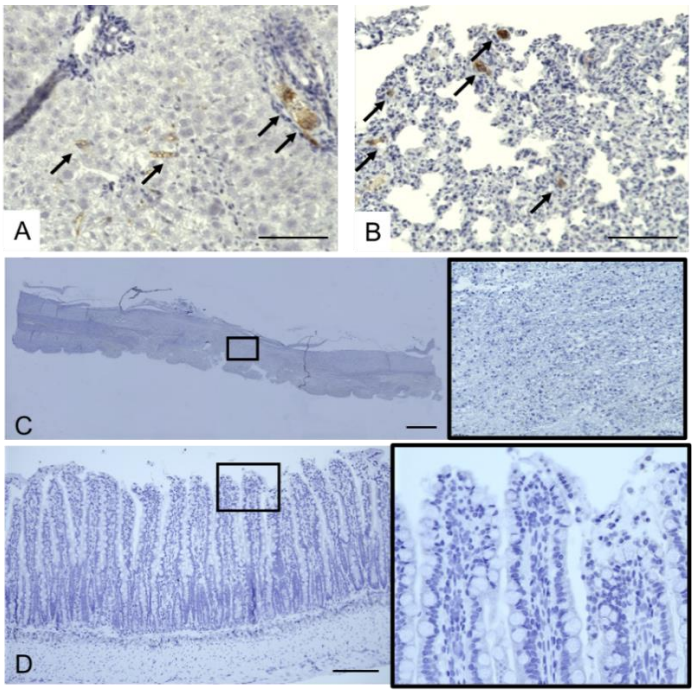

Figure9: 静脈内投与後の AMSC の分布（組織評価）
AMSC 投与 1 週間後の肝臓（A)、肺（B）には、矢印で示す Ku80 陽性細胞が検出された（scale bar = 100μm)。一方、AMSC 投与 2 時間後の脊髄（C, scale bar = 1mm）や 3 日後の回腸（D, scale bar = 200μm）には Ku80 陽性細胞を認めなかった。

6)　AMSC 投与後の腸管の変化

脊髄損傷後の運動機能の改善が脊髄損傷 2 週間以降に見られたという結果を元に、脊髄損傷 2 週間後までにどのような変化が生じるのかという観点から、脊髄損傷 3 日後と 2 週間後の空腸および回腸を組織学的に評価した。

28 匹のラットのうち、12 匹（H 群 6 匹、C 群 6 匹）を脊髄損傷 3 日後の評価に、16 匹（H 群 8 匹、C 群 8 匹）を脊髄損傷 2 週間後の評価にそれぞれ用いたが、後者の H 群で 2 匹死亡したため、脊髄損傷 2 週間後の評価は 14 匹（H 群 6 匹、C 群 8 匹）で行った。脊髄損傷 3 日後の空腸の H-E 染色では、H 群（Figure10A）の方が C 群（Figure10B）よりも絨毛構造が保たれているように見えるものの、絨毛長（Figure10C)、陰窩厚（Figure10D)、筋層厚（Figure10E)、絨毛密度（Figure10F）のいずれのパラメーターでも両群間に有意な差を認めなかった。脊髄損傷 3 日後の回腸の H-E 染色では、H 群（Figure10G）の方が C 群（Figure10H）と比較して、絨毛長（Figure10I)、陰窩厚（Figure10J)、筋層厚（Figure10K）が

有意に大きく、絨毛密度（Figure10L）には有意な差を認めなかった。

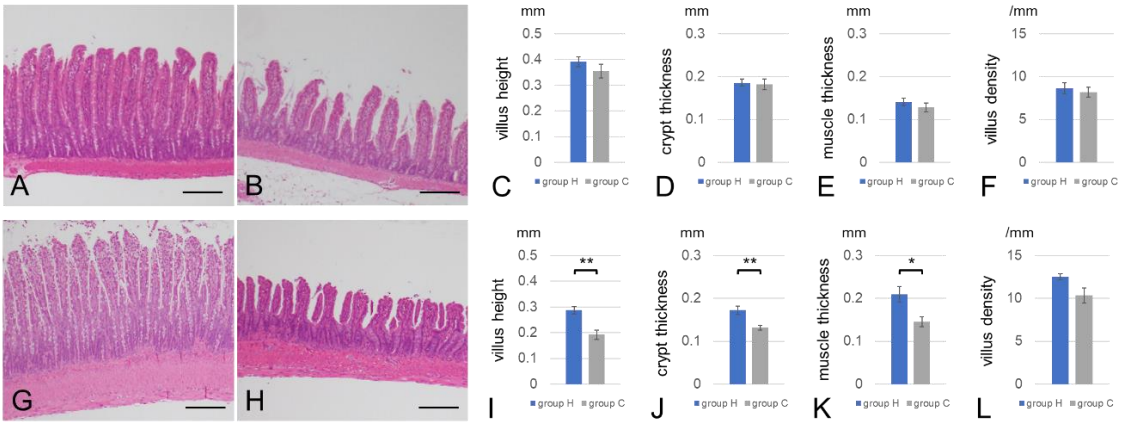

Figure10: 脊髄損傷 3 日後の空腸・回腸の構造変化
空腸の H-E 染色では、H 群（A）の方が C 群（B）よりも絨毛の萎縮が小さく見えるが、絨毛長（C)、陰窩厚（D)、筋層厚（E)、絨毛密度（F）のいずれも両群間に有意な差を認めなかった。回腸の H-E 染色では、H 群（G）の方が C 群（H）よりも、絨毛長（I）が有意に長く、陰窩厚（J)、筋層厚（K）が有意に厚かったが、絨毛密度（F）には有意差を認めなかった（scale bar = 200μm)。

脊髄損傷 2 週間後の空腸の H-E 染色では、H 群（Figure11A）と C 群（Figure11B）を比較すると、絨毛長（Figure11C）には有意な差を認めないものの、陰窩厚（Figure11D)、筋層厚（Figure11E）は有意に厚く、絨毛密度（Figure11F）も有意に大きかった。脊髄損傷 2 週間後の回腸の H-E 染色では、H 群（Figure11G）の方が C 群（Figure11H）よりも、絨毛長（Figure11I)、陰窩厚（Figure11J)、筋層厚（Figure11K)、絨毛密度（Figure11L)、すべてで有意に大きかった。以上の結果から、AMSC 投与による影響は、脊髄損傷後早期から特に回腸に見られることが明らかになり、以後の腸管評価は回腸に対して行うこととした。

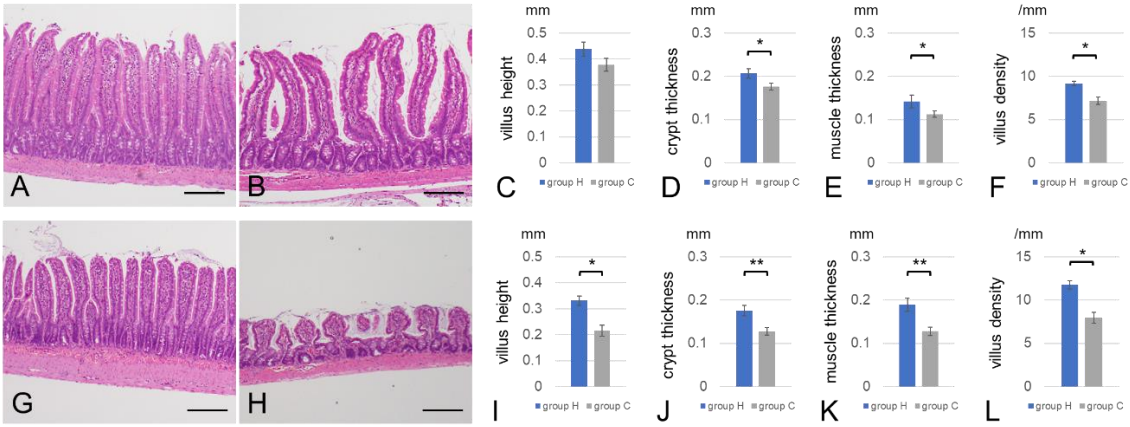

Figure11: 脊髄損傷 2 週間後の空腸・回腸の構造変化
脊髄損傷 2 週間後の空腸の H-E 染色では、H 群（A）と C 群（B）を比較すると、絨毛長（C）には有意な差を認めないものの、陰窩厚（D)、筋層厚（E）は有意に厚く、絨毛密度（F）も有意に大きかった。回腸の H-E 染色では、H 群（G）の方が C 群（H）よりも、絨毛長（I)、陰窩厚（J)、筋層厚（K)、絨毛密度（L)、すべてで有意に大きかった（scale bar = 200μm)。

脊髄損傷 3 日後の回腸の PAS 染色では、H 群（Figure12A）の方が C 群（Figure12B）よりも PAS 陽性面積が有意に大きかった（Figure12C)。この差は脊髄損傷 2 週間後の回腸でも同様に見られ、H 群（Figure12D）の方が C 群（Figure12E）よりも PAS 陽性面積が有意に大きかった（Figure12F)。

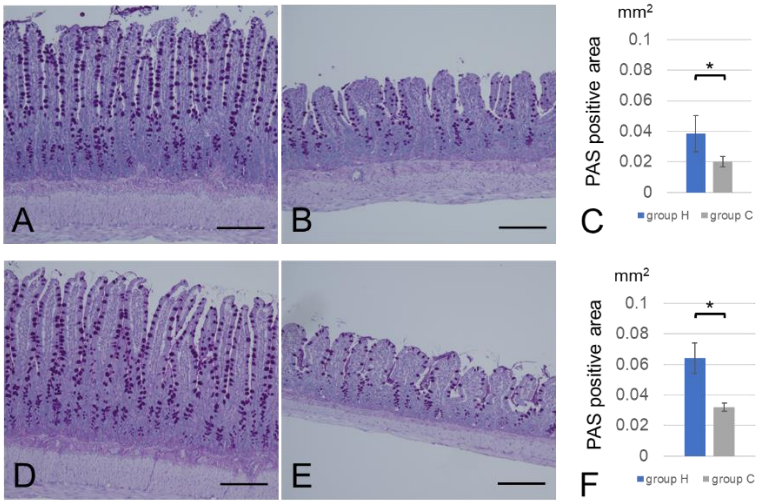

Figure12: 脊髄損傷 3 日後および 2 週間後の回腸の粘液産生の変化
脊髄損傷 3 日後の回腸の PAS 染色では、H 群（A）の方が C 群（B）より

も PAS 陽性面積が有意に大きかった（C, p<0.05)。脊髄損傷 2 週間後の回腸でも、H 群（D）の方が C 群（E）よりも PAS 陽性面積が有意に大きかった（F, p<0.05）(scale bar = 200μm)。

脊髄損傷 3 日後の回腸の密着結合評価のための免疫組織化学染色では、抗 zo-1 抗体での染色で H 群（Figure13A）の方が C 群（Figure13B）よりも細胞間の染色性が強かったが、定量的な評価は困難であった。抗 claudin-1 抗体での染色（H 群: Figure13C, C 群: Figure13D)、抗 occludin 抗体での染色（H 群: Figure13E, C 群: Figure13F）は、両群とも同程度の染色性であった。

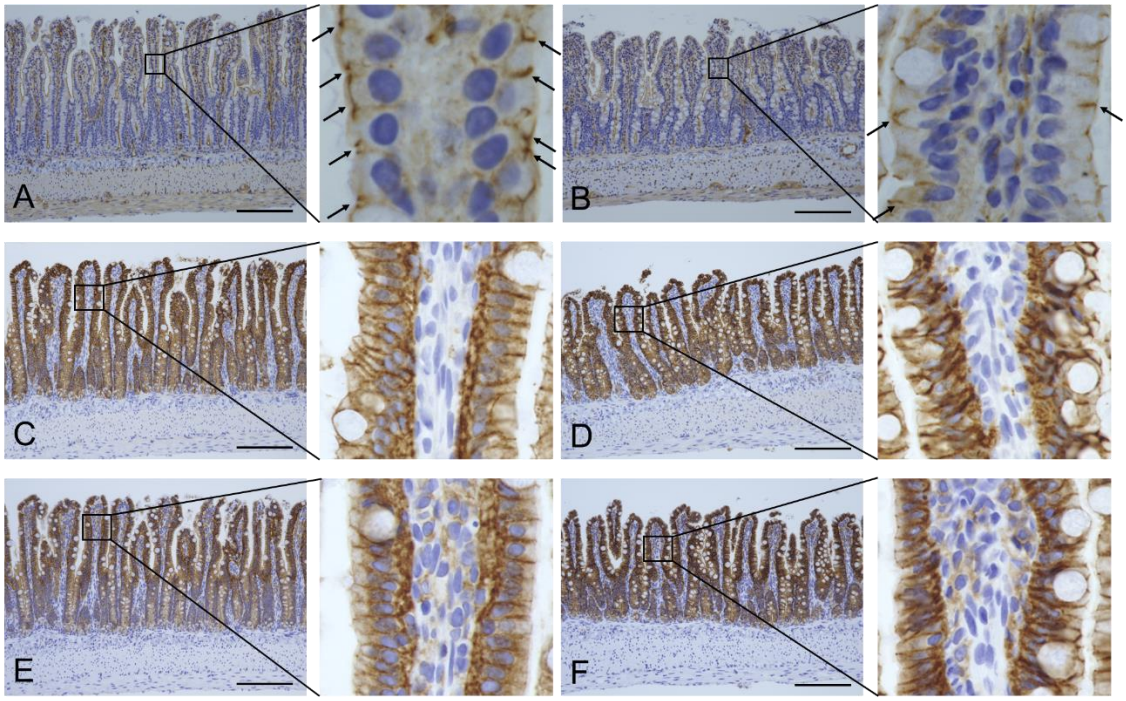

Figure13: 脊髄損傷 3 日後の回腸の密着結合の変化
脊髄損傷 3 日後の回腸において、zonula occludens 1 は H 群（A）の方が C 群（B）よりも強く発現していたが、claudin-1（C: H 群, D: C 群)、occludin（E: H 群, F: C 群）は 2 群間で同程度の発現であった（scale bar = 200μm)。

脊髄損傷 3 日後の回腸の神経伝達物質の蛍光免疫染色では、抗 nNOS 抗体での染色で H 群（Figure14A）の方が C 群（Figure14B）よりも nNOS 陽性面積が大きかったが、有意な差ではなかった（Figure14C)。一方、脊髄損傷 2 週間後の回腸では、H 群（Figure14D）の方が C 群

（Figure14E）よりも nNOS 陽性面積が有意に大きかった（Figure14F）。
　脊髄損傷 3 日後の回腸で、抗 VIP 抗体での染色には H 群（Figure15A）と C 群（Figure15B）の間に有意差は見られず（Figure15C）、脊髄損傷 2 週間後でも同様に、H 群（Figure15D）と C 群（Figure15E）の間に有意差を認めなかった（Figure15F）。

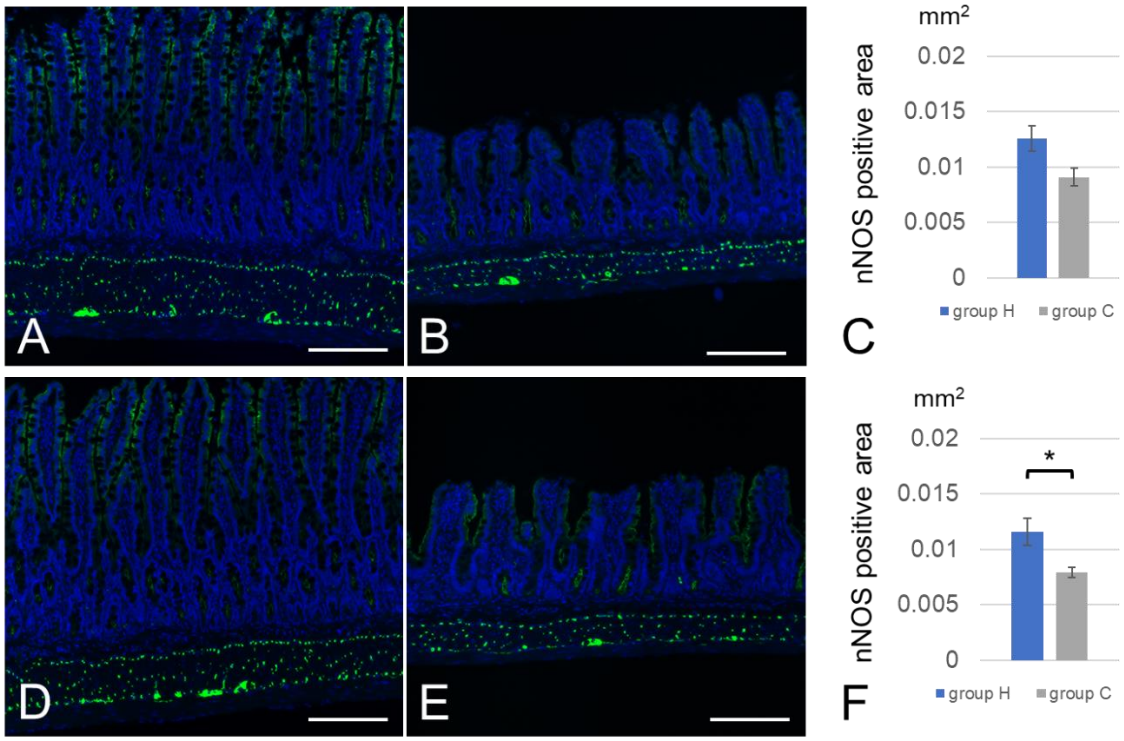

Figure14: 脊髄損傷 3 日後および 2 週間後の回腸の neuronal nitric oxide synthase（nNOS）の変化
脊髄損傷 3 日後の回腸において、nNOS 陽性面積は H 群（A）と C 群（B）の間に有意差は無かったが（C）、脊髄損傷 2 週間後の回腸では、H 群（D）の方が C 群（E）よりも nNOS 陽性面積が有意に大きかった（F）（scale bar = 200μm）。

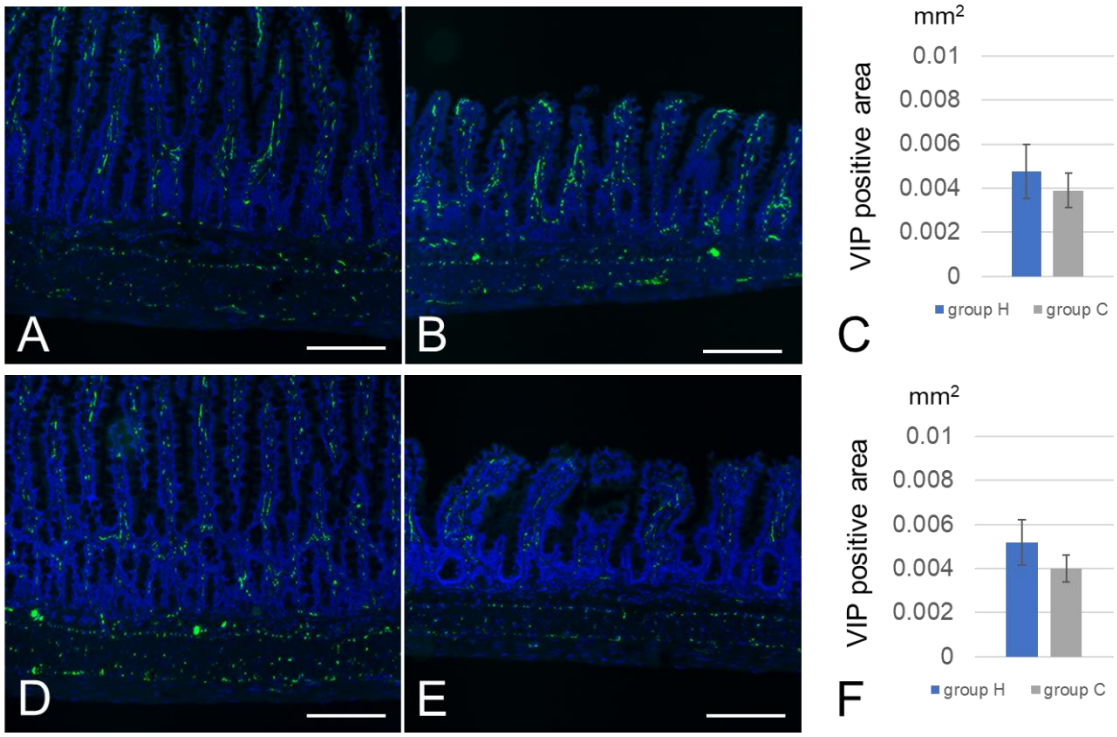

Figure15 脊髄損傷 3 日後および 2 週間後の回腸の vasoactive intestinal polypeptide（VIP）の変化
脊髄損傷 3 日後の回腸において、VIP 陽性面積は H 群（A）と C 群（B）の間に有意差は無く（C)、脊髄損傷 2 週間後の回腸でも、H 群（D）と C 群（E）の間に有意差は無かった（F）(scale bar = 200μm)。

7）　AMSC 投与後の腸内細菌叢の変化
前述の回腸の構造的・機能的変化が、腸内細菌叢に影響を与えるかを評価するために 16S リボソーム RNA 解析を行った。小腸内容物について、バクテロイデス目の占める割合は脊髄損傷 3 日後から 2 週間後で大きく変わらず（Figure16A)、クロストリジウム目の占める割合は小さくなったが（Figure16B)、いずれも H 群と C 群の間には有意な差を認めなかった。腸内細菌叢の多様性指標である Simpson index も、脊髄損傷 3 日後（Figure16C)、2 週間後（Figure16D）ともに 2 群間の差を認めなかった。便については、バクテロイデス目の占める割合は大きく変わらず（Figure16E)、クロストリジウム目の占める割合は大きくなったが（Figure16F)、いずれも H 群と C 群の間には有意な差を認めなかった。Simpson index についても、脊髄損傷 3 日後（Figure16G)、2 週間後（Figure16H）ともに 2 群間の差を認めなかった。

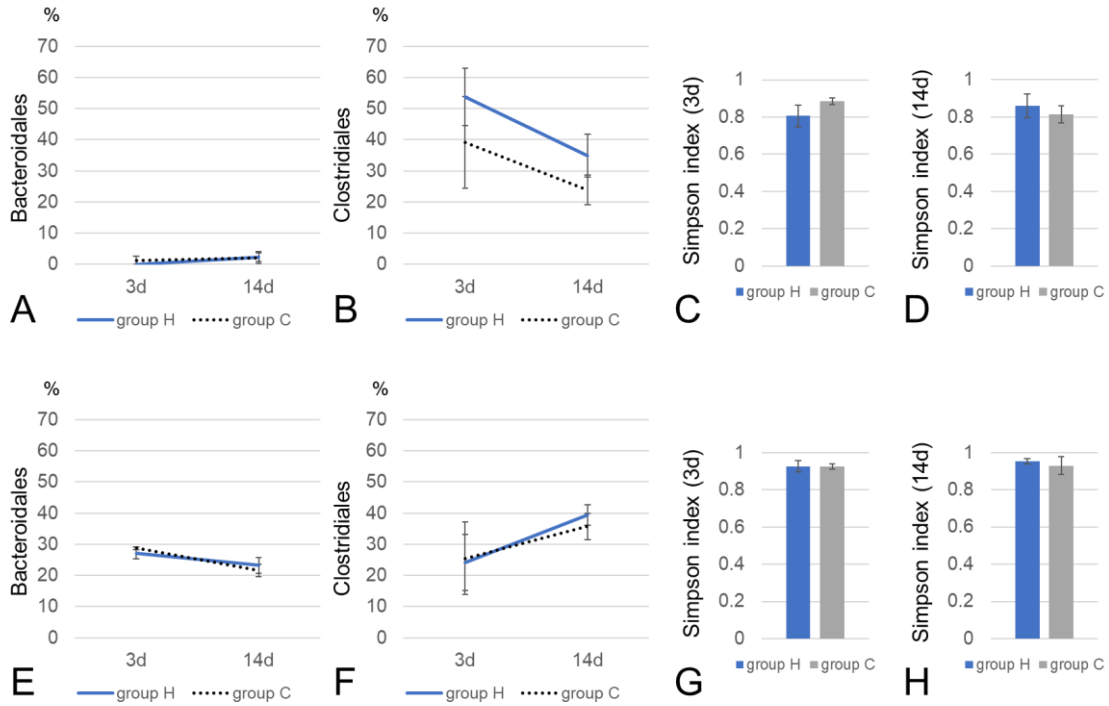

Figure16 脊髄損傷 3 日後および 2 週間後の腸内細菌叢の変化
小腸内容物において、バクテロイデス目（A)、クロストリジウム目（B）とも、その割合は治療群間で差を認めず、Simpson index で示す細菌叢の多様性も、脊髄損傷 3 日後（C)、脊髄損傷 2 週間後（D）で治療群間の差を認めなかった。便においても、バクテロイデス目（E)、クロストリジウム目（F）とも、その割合は治療群間で差を認めず、Simpson index も、脊髄損傷 3 日後（G)、脊髄損傷 2 週間後（H）で治療群間の差を認めなかった。

8)　AMSC 投与後のバクテリアル・トランスロケーションの変化

i）細菌 FISH による評価

14 匹のラットのうち、6 匹（H 群 3 匹、C 群 3 匹）を脊髄損傷 3 日後の評価に、8 匹（H 群 4 匹、C 群 4 匹）を脊髄損傷 1 週間後の評価にそれぞれ用いた。

脊髄損傷 3 日後は、H 群（Figure17A)、C 群（Figure17B）とも、粘膜固有層にはほとんど細菌を認めず、両群間に差は無かった（Figure17C)。一方、脊髄損傷 1 週間後には、H 群（Figure17D）の方が C 群（Figure17E）よりも粘膜固有層に侵入した細菌の数が有意に少なかった（Figure17F)。

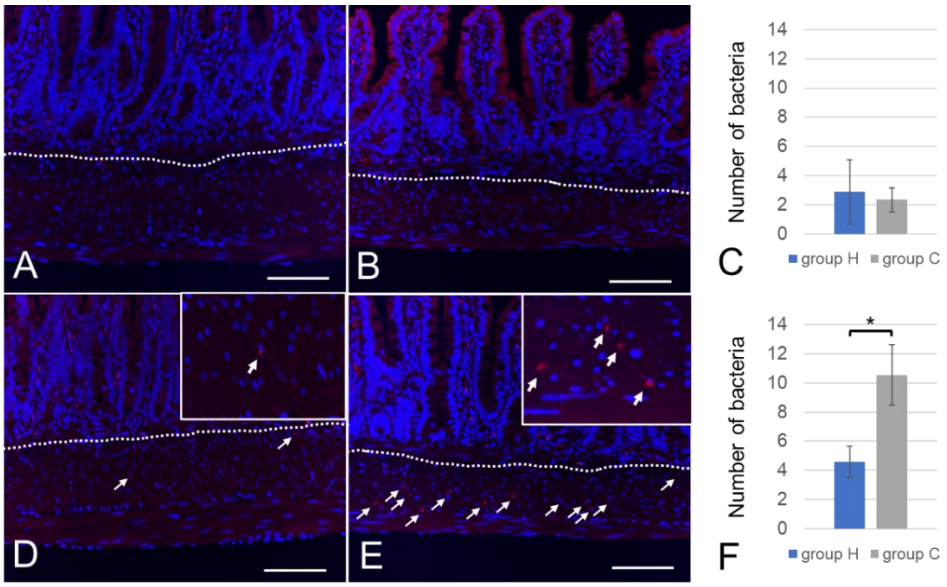

Figure17: 脊髄損傷 3 日後および 1 週間後の回腸の細菌 fluorescence in situ hybridization
脊髄損傷 3 日後は、H 群（A)、C 群（B）とも、ムチン層（点線）を越えて粘膜固有層に侵入した細菌はほとんど無く、両群間に差は無かった（C)。一方、脊髄損傷 1 週間後には、H 群（D）の方が C 群（E）よりも粘膜固有層に侵入した細菌（矢印）の数が有意に少なかった（F, $p<0.05$）（scale bar = 200μm)。

ii）細菌培養による評価

16 匹のラットのうち、介入内容が不確かであった 1 匹を除く 15 匹（H 群 8 匹、C 群 7 匹）を用いて、脊髄損傷 1 週間後に肝臓を無菌的に摘出して細菌培養を行った。H 群（Figure18A）からはほとんど細菌が培養されなかった一方で、C 群（Figure18B）では多くの検体から細菌が培養され、培養細菌数は有意に多かった（Figure18C)。

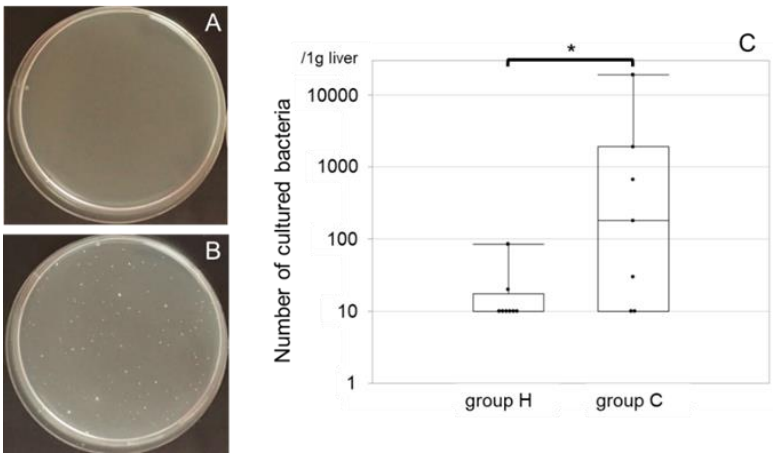

Figure18: 脊髄損傷 1 週間後の肝臓の細菌培養
H 群（A）では細菌はほとんど見られない一方で、C 群（B）では多くの細菌が見られ、培養細菌数は有意に多かった（C, $p<0.05$）。

9)　AMSC 投与後の炎症の変化

i)急性期の全身炎症

16 匹のラット（H 群 8 匹、C 群 8 匹）から経時的に採血を行い、血清をサンプルとして ELISA を行った。検体量が不十分であった場合は適宜除外し、各時相で各群 4〜8 検体ずつ解析に組み込まれた。IL-6 は C 群で一時的に軽度高値を示す個体があったが、ばらつきが大きく、またほとんどの検体で検出感度以下であり、各時相で両群間に有意差は無かった（Figure19A）。IFN-γ は、脊髄損傷翌日（AMSC または PBS 投与前）および脊髄損傷 3 日後にわずかに高値となったが、両群間に有意差は無かった（Figure19B）。

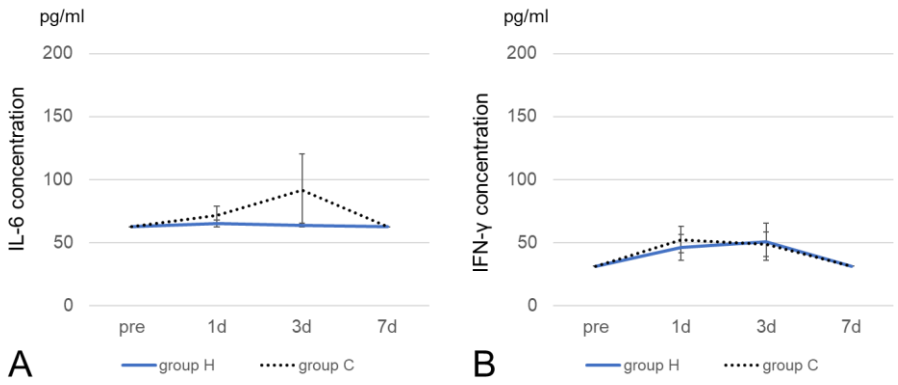

Figure19: 血液の炎症性サイトカイン ELISA
IL-6 は C 群で一時的に軽度高値を示したが、ばらつきが大きく、各

時相で両群間に有意差は無かった（A)。IFN-γは、脊髄損傷翌日および3日後にわずかに高値となったが、両群間に有意差は無かった（B)。

ii)亜急性期以降の全身炎症

神経機能評価に用いた脊髄損傷4週間後のラット、H群10匹、C群8匹から胸腺および脾臓を採取し計測した。胸腺の高さはH群の方がC群よりも有意に高かった（Figure20A）一方で、脾臓の長さは両群で同程度であった（Figure20B)。

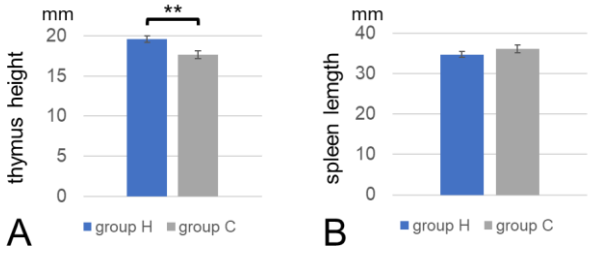

Figure20: 脊髄損傷4週間後の胸腺および脾臓の大きさ
脊髄損傷4週間後、胸腺の高さはH群の方がC群よりも有意に高かった（A, $p<0.01$)。一方、脾臓の長さはH群とC群で有意な差を認めなかった（B)

iii)脊髄局所の炎症

神経機能評価に用いた脊髄損傷4週間後のラット、H群10匹、C群8匹から採取した脊髄を用いて、CD68およびIba-1の免疫組織化学染色を行った。CD68については、H群（Figure21A）の方がC群（Figure21B）よりも有意に陽性細胞が少なかった（Figure21C)。Iba-1については、H群（Figure21D）とC群（Figure21E）の間で陽性細胞数は同程度であり、有意差は認めなかった（Figure21F)。

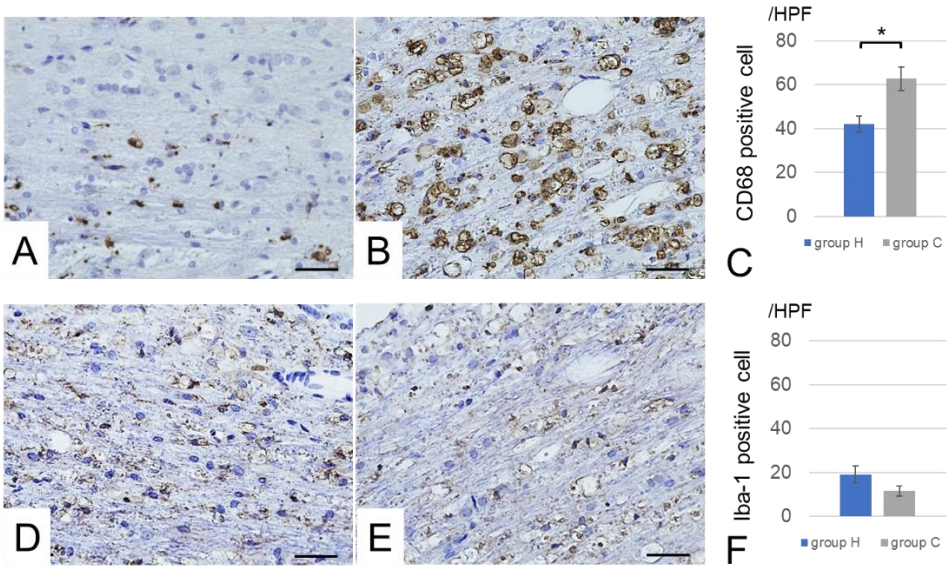

Figure21: 脊髄損傷 4 週間後の脊髄局所の炎症
CD68 は、H 群（A）の方が C 群（B）よりも有意に陽性細胞が少なかった（C, $p<0.05$）。Iba-1 については、H 群（D）と C 群（E）の間に有意差は認めなかった（F）（scale bar = 20μm）。

考察

本研究で、急性期脊髄損傷に対する AMSC の静脈内投与は、脊髄損傷後の下肢運動機能を改善させることが明らかになった。また、AMSC 投与により、運動機能回復に先立ち、回腸の構造的および機能的な改善が得られることも明らかになった。さらに腸管の改善が、その後生じるバクテリアル・トランスロケーションの抑制や炎症の抑制につながっていることが示唆された。特に AMSC 投与による回腸の改善やバクテリアル・トランスロケーションの抑制についてはこれまでに報告はなく、新たな知見として意義深い結果であると考えている。

１）急性期脊髄損傷に対する AMSC 静脈投与の作用機序について

脊髄損傷に対する細胞治療の作用機序として、投与細胞そのものが神経細胞などに分化し失われた神経ネットワークに置き換わる機序と、投与細胞から放出される栄養因子やサイトカインにより神経機能を回復させる機序が報告されている(Yamazaki et al., 2020a)。前者では脊髄局所に投与細胞が到達することが必要と考えられるが、経静脈投与の場合、投与細胞はほとんど脊髄に分布しないとされており(Ohta et al., 2017)、後者が主たる作用機序であることが推測される。本研究でも、投与した AMSC は脊髄には存在しておらず、大部分が肝臓や肺に分布していた。また in vitro の実験で、過去に脊髄損傷に対する有効性が報告される BDNF や VEGF、bFGF などの神経栄養因子(Cofano et al., 2019)が AMSC から分泌されており、急性期脊髄損傷に対する AMSC 静脈内投与の作用機序は神経栄養因子の内分泌が関与していると考えられる。

２）細胞治療に用いる細胞種について

細胞治療に用いる細胞種にはいくつかの選択肢があるが、その中で間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell: MSC）は、胚性幹細胞や人工多能性幹細胞と比較して倫理的な問題点や腫瘍化の懸念などが少なく、臨床応用の障壁が比較的少ない細胞種と言える。MSC の中にも細胞の由来によって骨髄由来 MSC や脂肪由来 MSC、臍帯由来 MSC などが存在し、脊髄損傷に対する細胞治療の基礎研究に用いられてきたが(Yamazaki et al., 2020a)、AMSC を経静脈的に投与した研究は本研究が初めてである。AMSC の特徴として、他の MSC よりも増殖能が高い、免疫原性が低いなどが報告されている(Choudhery et al., 2013; Hass et al., 2011; Ma et al., 2019)。これらの特徴は、大量生産性、他家移植時の安全性など、今後臨床応用を見据える際に有利な特徴であり、脊髄損傷に対する AMSC 静脈内投与の有効性を

新たに報告することは価値があると思われる。

３）AMSC の神経機能改善効果について

本研究における神経機能評価では、下肢運動機能が AMSC 投与により改善し、特に H 群での改善が顕著であった。また、脊髄損傷 3 週間後のみ L 群でも C 群より運動機能改善が有意に高かった。一方、H 群と L 群の間には有意差を認めなかった。本研究では AMSC の作用機序に主眼を置いたため、投与細胞数による効果の差異を検証するに至らなかったが、実験個体数を増やすことにより AMSC が用量依存的に治療効果を発揮するか否かを明らかにすることができると考える。感覚機能評価として実施した von Frey monofilament テストでは、いずれの治療群間でも有意な差を認めなかった。過去の当科での研究で、急性期脊髄損傷に対する FTY720 の投与が運動機能のみならず脊髄損傷後の異痛症にも効果を発揮することが明らかとなっている(Yamazaki et al., 2020b)。S1P 受容体作動薬である FTY720 は強力な免疫抑制作用を有することが知られており、脊髄局所の炎症細胞浸潤が本研究よりも抑制されていたことから、脊髄損傷に伴う後索周囲の機能回復にはより強い抗炎症作用が必要である可能性がある。一方で本研究結果でも、統計学的な差はないもののH群で疼痛閾値の改善傾向が見られており、より長期的な観察によって感覚機能が改善した可能性はある。

４）AMSC 投与と MRI の拡散テンソル画像について

脊髄損傷に対する拡散テンソル画像を用いた放射線学的評価も、過去に報告されている(Zhao et al., 2018)。脊髄は軸索方向の拡散性（AD）が軸位断方向（RD）に比べて大きいため、正常では拡散の異方性（FA）が大きい臓器であるが、脊髄損傷によって生じる急性期の浮腫と、神経細胞の減少による神経密度の低下のバランスによってこれらの値は経時的に変化すると考えられる。本研究では MRI 実験での脱落個体が多く結果にばらつきが大きいため、MRI の結果を単独で解釈することは困難であるが、運動機能の改善と併せると、AD の上昇が急性期の脊髄浮腫の改善を反映している可能性があり、H 群で脊髄浮腫が抑えられたことが示唆された。

５）AMSC 投与と腸蠕動運動について

本研究では、AMSC が腸管の蠕動機能にも影響を与えることが示された。腸蠕動は、中位胸髄以下の脊髄由来の交感神経系、迷走神経由来の副交感神経系、および腸固有神経により支配されており(Hou and

Rabchevsky, 2014)、脊髄損傷と密接な関係がある。脊髄損傷によって腸蠕動が低下し排便障害を生じることが問題になるが、これは脊髄損傷高位以下で交感神経の過活動が生じるためとされている(Ueno et al., 2016)。また、脊髄損傷後の腸蠕動低下に随伴して、腸固有神経の神経伝達物質である nNOS、VIP が低下したとする報告があり(Kabatas et al., 2008)、脊髄損傷後の交感神経過活動により、腸固有神経が抑制される機序が推察される。本研究でも、脊髄損傷後の回腸の nNOS が C 群では経時的に低下したが、H 群では高く維持されており、AMSC 投与により脊髄損傷後の腸蠕動が改善した、あるいは悪化せずに維持できたことが示唆された。

6）AMSC 投与とバクテリアル・トランスロケーションについて

本研究では、AMSC 投与により、腸蠕動のみならず、腸粘膜構造や粘液産生能も改善することが示された。これらにより、回腸でのバリア機能が維持され、バクテリアル・トランスロケーションが防がれたと考えている。過去の報告でも、脊髄損傷後 1 週間で、肝臓を含む多臓器から細菌が検出されたとされており(Kigerl et al., 2016)、これは本研究の結果を支持すると考えられる。一方、脊髄損傷により腸内細菌叢が変化すること(Kigerl et al., 2016; O'Connor et al., 2018)、腸内細菌叢が悪くなると脊髄損傷後の運動機能回復が悪くなることや、逆に腸内細菌叢を良い状態に保つことで脊髄損傷後の運動機能回復が良くなることが報告されており(Kigerl et al., 2016)、バクテリアル・トランスロケーションのみならず、腸内細菌叢と脊髄損傷の関係についても議論されている。本研究では脊髄損傷 2 週間後までの間に、腸内細菌叢の変化は見られたが治療群間での差異は確認できず、AMSC の治療効果と腸内細菌叢の関連は見出せなかった。しかし、過去の報告はいずれも脊髄損傷 3 週間以降で腸内細菌叢の変化を観察しており、本研究でもより晩期には腸内細菌叢も治療群間で変化した可能性はある。

7）AMSC 投与と全身/局所炎症について

AMSC 投与と炎症の関係について、本研究では次の 3 つの結果を得た。すなわち、①脊髄損傷後急性期（1 週間以内）では、全身炎症に治療群間での差はない、②脊髄損傷亜急性期以降では、胸腺の萎縮で示される全身炎症は AMSC 投与で有意に抑制される、③脊髄損傷 4 週間後の時点で、脊髄局所の炎症は AMSC 投与で有意に抑制される、という結果である。①、②の結果と、先のバクテリアル・トランスロケーションが腸管のバリア機能低下とともに亜急性期以降で増加するという結果から、バクテリアル・

トランスロケーションと全身が関連している可能性があると考えられる。この全身炎症が、脊髄局所の炎症を惹起しているという可能性の他、バクテリアル・トランスロケーションで全身に移行した細菌あるいは菌体成分が脊髄に作用して、各種ケモカインを産生し脊髄の炎症を悪化させる機序も想定される。過去には、CC ケモカインリガンド-3 や CC ケモカイン受容体-1, 5 が脊髄損傷後に増加し、脊髄 2 次損傷を悪化させているとする報告もある(Pelisch et al., 2020)。ケモカインの一部はマクロファージを集簇させる作用があり(Mantovani et al., 2004)、本研究で脊髄固有のマイクログリア（Iba-1 陽性）よりも脊髄外由来の活性化マクロファージ（CD68 陽性）の方が脊髄損傷周辺に多く存在していたという結果を説明できる機序と考えている。

８）本研究の限界点

本研究にはいくつかの限界点がある。1 つ目は、AMSC がどのように回腸の構造および機能を改善したのかが明らかにならなかった点である。想定される機序として、①AMSC が腸に直接作用した、②AMSC が脊髄に作用し、脊髄交感神経系を改善することで間接的に腸を改善した、という機序が考えられる。腸栄養因子としての R-Spondin-1 や KGF は AMSC からあまり分泌されないことから、前者よりも後者の機序の方が合理的と考えている。この問題点を明らかにするために、脊髄から腸に分岐する腹腔神経節や上腸管神経節を切除するモデルの作成を試行したが、ラットではこれらの神経節の同定が困難であり、本実験に進むことを断念した。博士課程における研究としては実施できなかったが、より大型の実験動物を用いれば解明が可能かもしれない。

2 つ目として、本研究ではバクテリアル・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ことの直接的な証拠を示せなかった。腸内細菌を除菌したモデルを用いて同様の実験を行い、除菌を行わなかったモデルと比較して脊髄 2 次損傷の程度が小さいことを示すことができれば、この問題を解明することができると考える。

3 つ目として、本研究では AMSC と炎症の関係についてのデータが不十分であると考えている。急性期の全身炎症のマーカーとして、IL-6 と IFN-γ を用い、治療群間で差が見られなかったが、他のマーカーで差が出る可能性はある。また、考察で述べたケモカインについても、脊髄局所で発現するケモカインを網羅的に解析することで作用機序をより強固に示すことができると考える。

結論

１）ラット急性期脊髄損傷モデルに対する AMSC 静脈内投与は良好な運動機能改善効果を示した。
２）AMSC 静脈内投与は、運動機能改善に先立ち、回腸粘膜構造・蠕動機能・粘液産生機能を改善した。
３）AMSC 静脈内投与は、回腸バリア機能の改善により、バクテリアル・トランスロケーションを抑制した。
４）AMSC 静脈内投与によるバクテリアル・トランスロケーションの抑制により、全身/脊髄局所の炎症が低減され、脊髄の 2 次損傷が抑制された。

上記の新知見により、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。これまでにあまり注目されてこなかった領域であるため、本研究をきっかけに排便障害に着目した新しい治療介入が発展することが期待される。

また AMSC という臨床応用に有利な細胞種で有効性を示すことができたことで、急性期脊髄損傷の細胞治療研究が加速することも考えられる。本研究の知見が、ヒトでの臨床試験に発展することを期待したい。

一方、本研究はラット急性期胸髄損傷モデルに対する尾静脈投与という、限定的な条件での有効性を示したに過ぎず、異なる損傷高位のモデル、異なる細胞投与量や投与回数、投与のタイミングでの検証を行い、より普遍的な有効性を明らかにすることが望まれる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださりました、北海道大学医学院医学研究院脳神経外科　藤村幹教授に謝意を表します。併せて、本研究の着想や実験計画を含め、直接ご指導を賜りました、北海道大学医学院医学研究院脳神経外科　川堀真人先生、関俊隆先生、山﨑和義先生に感謝申し上げます。また、実際の実験に際し、細胞培養や実験手技面でのご協力をいただいた、実験助手　谷守亜紀様、カネカ社　再生・細胞医療研究所　山口翔様にも御礼申し上げます。

さらに、本研究は様々な分野の先生方からの重要なご助言により、専門とする神経分野にとどまらない研究に発展することができました。“脊髄-腸相関”の核心に迫るために多くの有用なご助言をいただいた、北海道大学大学院薬学研究院分子細胞医薬学分野　大西俊介教授、北海道大学大学院医学研究院内科学講座消化器内科学教室　山本幸司先生に感謝申し上げます。MRI における条件設定や実際の撮像、解析までご指導いただきました、北海道大学大学院医学研究院医理工学グローバルセンター　Khin Khin Tha 准教授、バクテリアル・トランスロケーション後の炎症に関して有用なご助言をいただきました北海道大学大学院医学研究院内科学講座血液内科学分野　橋本大吾准教授に感謝申し上げます。

最後に、本研究に多大なご協力を頂きました、実験助手　長島理香様をはじめ研究助手の皆様、北海道大学脳神経外科教室員および秘書の皆様に厚く御礼申し上げます。

利益相反

本研究において開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Ara, T., Hashimoto, D., Hayase, E., Noizat, C., Kikuchi, R., Hasegawa, Y., Matsuda, K., Ono, S., Matsuno, Y., Ebata, K.*, et al.* (2020). Intestinal goblet cells protect against GVHD after allogeneic stem cell transplantation via Lypd8. Sci Transl Med *12*.

Basso, D.M., Beattie, M.S., and Bresnahan, J.C. (1995). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J Neurotrauma *12*, 1-21.

Bickenbach, J., Officer, A., Shakespeare, T., and von Groote, P. (2014). International Perspectives on Spinal Cord Injury, 1st edn (World Health Organization).

Choudhery, M.S., Badowski, M., Muise, A., and Harris, D.T. (2013). Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue. Cytotherapy *15*, 330-343.

Chung, E.A., and Emmanuel, A.V. (2006). Gastrointestinal symptoms related to autonomic dysfunction following spinal cord injury. Prog Brain Res *152*, 317-333.

Cofano, F., Boido, M., Monticelli, M., Zenga, F., Ducati, A., Vercelli, A., and Garbossa, D. (2019). Mesenchymal Stem Cells for Spinal Cord Injury: Current Options, Limitations, and Future of Cell Therapy. Int J Mol Sci *20*.

Enck, P., Greving, I., Klosterhalfen, S., and Wietek, B. (2006). Upper and lower gastrointestinal motor and sensory dysfunction after human spinal cord injury. Prog Brain Res *152*, 373-384.

Gungor, B., Adiguzel, E., Gursel, I., Yilmaz, B., and Gursel, M. (2016). Intestinal Microbiota in Patients with Spinal Cord Injury. PLoS One *11*, e0145878.

Hass, R., Kasper, C., Bohm, S., and Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. Cell Commun Signal *9*, 12.

Hou, S., and Rabchevsky, A.G. (2014). Autonomic consequences of spinal cord injury.

Compr Physiol *4*, 1419-1453.

Kabatas, S., Yu, D., He, X.D., Thatte, H.S., Benedict, D., Hepgul, K.T., Black, P.M., Sabharwal, S., and Teng, Y.D. (2008). Neural and anatomical abnormalities of the gastrointestinal system resulting from contusion spinal cord injury. Neuroscience *154*, 1627-1638.

Karlsson, A.K. (2006). Autonomic dysfunction in spinal cord injury: clinical presentation of symptoms and signs. Prog Brain Res *152*, 1-8.

Kawabori, M., Hokari, M., Zheng, Z., Kim, J.Y., Calosing, C., Hsieh, C.L., Nakamura, M.C., and Yenari, M.A. (2013). Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-2 Correlates to Hypothermic Neuroprotection in Ischemic Stroke. Ther Hypothermia Temp Manag *3*, 189-198.

Kawabori, M., Kacimi, R., Kauppinen, T., Calosing, C., Kim, J.Y., Hsieh, C.L., Nakamura, M.C., and Yenari, M.A. (2015). Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) deficiency attenuates phagocytic activities of microglia and exacerbates ischemic damage in experimental stroke. J Neurosci *35*, 3384-3396.

Kigerl, K.A., Hall, J.C., Wang, L., Mo, X., Yu, Z., and Popovich, P.G. (2016). Gut dysbiosis impairs recovery after spinal cord injury. J Exp Med *213*, 2603-2620.

Ma, J., Wu, J., Han, L., Jiang, X., Yan, L., Hao, J., and Wang, H. (2019). Comparative analysis of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane, umbilical cord, and chorionic plate under serum-free condition. Stem Cell Res Ther *10*, 19.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol *25*, 677-686.

O'Connor, G., Jeffrey, E., Madorma, D., Marcillo, A., Abreu, M.T., Deo, S.K., Dietrich, W.D., and Daunert, S. (2018). Investigation of Microbiota Alterations and Intestinal Inflammation Post-Spinal Cord Injury in Rat Model. J Neurotrauma *35*, 2159-2166.

Ohta, Y., Hamaguchi, A., Ootaki, M., Watanabe, M., Takeba, Y., Iiri, T., Matsumoto, N., and Takenaga, M. (2017). Intravenous infusion of adipose-derived stem/stromal cells improves functional recovery of rats with spinal cord injury. Cytotherapy *19*, 839-848.

Onishi, S., Kaji, T., Yamada, W., Nakame, K., Machigashira, S., Kawano, M., Yano, K., Harumatsu, T., Yamada, K., Masuya, R.*, et al.* (2018). Ghrelin stimulates intestinal adaptation following massive small bowel resection in parenterally fed rats. Peptides *106*, 59-67.

Pelisch, N., Rosas Almanza, J., Stehlik, K.E., Aperi, B.V., and Kroner, A. (2020). CCL3 contributes to secondary damage after spinal cord injury. J Neuroinflammation *17*, 362.
Riegger, T., Conrad, S., Liu, K., Schluesener, H.J., Adibzahdeh, M., and Schwab, J.M. (2007). Spinal cord injury-induced immune depression syndrome (SCI-IDS). Eur J Neurosci *25*, 1743-1747.

Riegger, T., Conrad, S., Schluesener, H.J., Kaps, H.P., Badke, A., Baron, C., Gerstein, J., Dietz, K., Abdizahdeh, M., and Schwab, J.M. (2009). Immune depression syndrome following human spinal cord injury (SCI): a pilot study. Neuroscience *158*, 1194-1199.

Rutsch, A., Kantsjo, J.B., and Ronchi, F. (2020). The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host Inflammasome Influence Brain Physiology and Pathology. Front Immunol *11*, 604179.

Saha, S., Bhanja, P., Kabarriti, R., Liu, L., Alfieri, A.A., and Guha, C. (2011). Bone marrow stromal cell transplantation mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. PLoS One *6*, e24072.

Seki, T., and Fehlings, M.G. (2008). Mechanistic insights into posttraumatic syringomyelia based on a novel in vivo animal model. Laboratory investigation. J Neurosurg Spine *8*, 365-375.

Tan, C., Zhao, S., Higashikawa, K., Wang, Z., Kawabori, M., Abumiya, T., Nakayama, N., Kazumata, K., Ukon, N., Yasui, H.*, et al.* (2018). [18F]DPA-714 PET imaging shows immunomodulatory effect of intravenous administration of bone marrow stromal cells after transient focal ischemia. EJNMMI Research *8*, 1-10.

Ueno, M., Ueno-Nakamura, Y., Niehaus, J., Popovich, P.G., and Yoshida, Y. (2016). Silencing spinal interneurons inhibits immune suppressive autonomic reflexes caused by spinal cord injury. Nat Neurosci *19*, 784-787.

Wang, Z., Higashikawa, K., Yasui, H., Kuge, Y., Ohno, Y., Kihara, A., Midori, Y.A., Houkin, K., and Kawabori, M. (2020). FTY720 Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury by Preventing the Redistribution of Tight Junction Proteins and Decreases Inflammation in the Subacute Phase in an Experimental Stroke Model. Transl Stroke Res *11*, 1103-1116.

Wu, W.H., Zegarra-Ruiz, D.F., and Diehl, G.E. (2020). Intestinal Microbes in Autoimmune and Inflammatory Disease. Front Immunol *11*, 597966.

Yamazaki, K., Kawabori, M., Seki, T., and Houkin, K. (2020a). Clinical Trials of Stem Cell Treatment for Spinal Cord Injury. Int J Mol Sci *21*.

Yamazaki, K., Kawabori, M., Seki, T., Takamiya, S., Tateno, T., Konno, K., Watanabe, M., and Houkin, K. (2020b). FTY720 Attenuates Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury by Decreasing Systemic and Local Inflammation in a Rat Spinal Cord Compression Model. J Neurotrauma *37*, 1720-1728.

Zhao, C., Rao, J.S., Pei, X.J., Lei, J.F., Wang, Z.J., Zhao, W., Wei, R.H., Yang, Z.Y., and Li, X.G. (2018). Diffusion tensor imaging of spinal cord parenchyma lesion in rat with chronic spinal cord injury. Magn Reson Imaging *47*, 25-32.