

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 大野正芳

学位論文題名

ラット放射線性直腸炎モデルに対するヒト羊膜由来間葉系幹細胞投与の効果
(Effect of human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation in rats with radiation proctitis)

【背景・目的】放射線治療は担癌患者に対し一般的に行われている治療であり、前立腺癌、子宮頸癌のような骨盤内腫瘍に対しても行われている。しかしながら放射線治療は、標的周囲の正常の組織に対しても副作用を生じさせ、さらにはその障害が慢性化するという問題がある。放射線性直腸炎は、骨盤内腫瘍に対し放射線治療を行っている患者に最も起こりやすい合併症の一つであり、さらには晩期障害になると不可逆であることが多い。主な症状として毛細血管拡張による下血があるが、さらに重篤なものとして約 1%で腸管狭窄、0.4%で瘻孔を引き起こすと報告されている。治療法としては、argon plasma coagulation (APC)を用いた内視鏡的止血術の他、高圧酸素療法、外科手術などがあるが、いずれも再発を繰り返し難治性であることも多く、現在の治療法では、十分な治療効果を得ているとは言い難いのが現状である。一方、近年、難治性疾患、臓器障害の修復に対し、再生医療が世界中で注目されており、その中でも、幹細胞を用いた治療は新規治療として非常に期待が高まっている。本邦による研究が世界をリードしている人工多能性幹細胞(iPS細胞；induced pluripotent stem cell)も胚性幹細胞(ES細胞；embryonic stem cell)に並び、間葉系幹細胞(MSC；mesenchymal stem cell)は非常に注目を集めている。間葉系幹細胞(MSC)は骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋細胞といった様々な組織に分化する能力を有する体性幹細胞として知られており、多くの組織に存在するため、国内外において有用な細胞ソースとして様々な研究が行われている。しかし現在、MSC移植治療を行う際は、多くは骨髄由来MSCを用いているが、骨髄などから自家移植に必要な細胞を採取する場合、身体への侵襲を伴う上に、一度で得られる細胞数は限りがあり、治療を行うまでに一定時間がかかってしまう。一方ヒト羊膜には、非常に豊富なMSCが含まれていることが知られており、より若い細胞を一度に大量に獲得できるという利点を持っている。実際、羊膜由来MSC(AMSC；amnion-derived MSC)は、下肢虚血モデル、心筋炎モデル、糸球体腎炎モデル、腎虚血再灌流障害モデル、GVHDモデル、重症腸炎モデルなど、様々な疾患のラットモデルにおいて、血管新生促進や抗炎症効果を発揮することで病態を改善させることが明らかとなってきた。そこで本研究では、羊膜を新たな細胞ソースとしたラット放射線性直腸炎モデルに対するAMSC投与の効果を検討し、さらに病態改善のメカニズムやAMSCの抗炎症効果の機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】母親の同意のもと、帝王切開時に卵膜を提供いただき、羊膜を採取し、AMSCを分離・培養した。国際細胞治療学会より提唱されているMSCの基準に従いフローサイトメトリーを施行し、さらに骨分化誘導、脂肪分化誘導を行った。In vivoの実験において、7週齢の雄性SDラットに対し、チャンバーに固定し、肛門周囲のみが3×4cmの範囲で開いている厚さ6mmの鉛遮へい板をチャンバーの上に配置した後、5Gy/日を直腸に5日間照射し、照射最終日にAMSC(1×10⁶ cells)を陰茎静脈から静注した。照射開始から8日目に屠殺し、直腸の病理組織学的検討と炎症性サイトカインの発現を定量的RT-PCR法にて検

討した。また、in vitro の実験においては、ラット小腸上皮細胞(IEC-6)に対する放射線照射後、AMSC の培養上清である conditioned medium(CM)による培養を行い、caspase3/7 活性測定、trypan blue による死細胞の評価、定量的 RT-PCR 法により CM による細胞障害抑制効果について検討した。同様に HEK293 細胞に対する放射線照射後、CM による培養を行い、p53 の転写活性を reporter gene assay 法により検討した。

【結果】フローサイトメトリー法により、使用した AMSC は MSC の陽性マーカーである CD44、CD73、CD90、CD105 を発現していたが、陰性マーカーである CD11b、CD19、CD34、CD45、HLA-DR を発現していなかったことを確認した。脂肪分化誘導、骨分化誘導のいずれにおいても、分化誘導が確認された。ラット直腸の病理学的評価として、HE 染色では放射線照射群において腺管構造の破壊、炎症細胞浸潤を認めたが、AMSC 投与群でいずれも改善していた。また independent observer が評価した病理スコアも「炎症」、「粘液細胞の減少」の項目において、AMSC 群で有意にスコアが改善していた。PAS 染色では放射線照射群において、杯細胞の著明な減少を認めたが、AMSC 投与群では放射線照射群と比較し、有意に杯細胞の減少が改善していた。単球/マクロファージを反映している CD68 を免疫染色した結果、AMSC 投与群では放射線照射群と比較し有意に浸潤の領域が減少していた。さらには好中球を反映している MPO を免疫染色した結果、AMSC 投与群では放射線照射群と比較し、有意に浸潤の領域が減少していた。いずれの結果からも病理組織学的に AMSC は放射線照射による組織障害を改善していた。また、CXCL1、CCL2、IL-6、TNF- α など種々の炎症性サイトカインの発現は、放射線照射により著明に上昇したが、AMSC の投与により有意差はないものの、減少傾向を示した。一方 in vitro において、IEC-6 細胞に対する放射線照射により、死滅した細胞を trypan blue にてカウントすると、CM 投与群では放射線照射群と比較し、死細胞の数が有意に減少していた。Caspase 3/7 活性にてアポトーシスレベルを評価したが、放射線照射群において、有意にアポトーシスレベルが増加していたものの、CM 投与群では有意に改善していた。さらに HEK293 細胞に対し、放射線照射を行ったところ、放射線照射群は p53 転写活性を有意に上昇させたが、CM 投与群は放射線照射群と比較し、有意に p53 転写活性を改善した。加えて CM は p53 の標的遺伝子である p21 の発現は抑制されたが Bax の発現は抑制されなかった。

【結論】AMSC の投与により、ラットの放射線性直腸炎を改善させた。また、CM 投与は放射線による細胞障害を抑制し、さらには Caspase 3/7 活性、p53 転写活性、p21 発現をいずれも抑制した。本研究において、ヒト AMSC 投与によりラット放射線性直腸炎モデルに対して治療効果があることが示され、AMSC は有用な細胞ソースであると考えられた。AMSC は今後の再生医療を大きく変える可能性を秘めていると思われ、放射線性直腸炎を含めた、様々な難治性疾患に対し臨床応用されることが期待される。ただし、そのメカニズムに関しては、未だ不明な点が多いのが現状であるため、さらなる検討により、MSC の詳細が明らかになることが期待される。