

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06503

研究課題名(和文) 遺伝子導入と組織工学による局所環境制御を目指した次世代細胞治療法の開発

研究課題名(英文) next generation cell therapy using gene editing and tissue engineering

研究代表者

小林 慎一郎 (KOBAYASHI, Shinichiro)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：80623363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：培養上皮細胞シートを用いた内視鏡治療後食道狭窄予防は臨床応用可能な技術を確立したが、腐食性食道炎や放射線化学療法後などの高度炎症環境下では治療効果が期待できない。よって、本研究の目的は、消化管創傷治癒における上皮細胞挙動と抗炎症性サイトカインの関連性を解明することである。8週齢のControlマウスおよびIL-10KOマウスを用いて、化学的粘膜欠損モデルでの継時的組織学的解析を行なった。IL-10KOマウスでは継時的に癒痕が増強しており、体重減少も認められた。IL-10は特に癒痕期にかけて作用していることが示唆された。現在詳細な検討を行うべく組織学的解析を継続している。

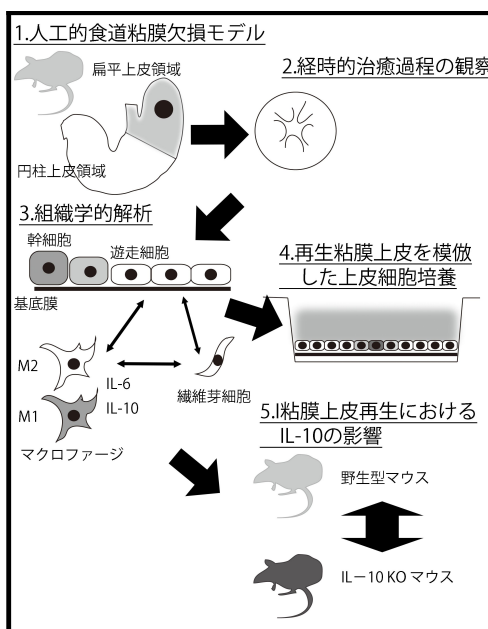
研究成果の概要(英文)： We have established the epithelial cell sheet transplantation to prevent esophageal strictures after endoscopic surgery. However, epithelial cell sheet therapy is not expected to prevent esophageal strictures with the severe inflammatory conditions such as corrosive esophagitis and post-radiation therapy. The purpose of this study was that the relationships between epithelial cells and anti-inflammatory cytokines were revealed. We performed the histological examination using chemical mucosal defects models in control and IL-10KO mice. In IL-10KO mice, the fibrosis after chemical mucosal defect continuously increased. The body weight was decreased. We concluded IL-10 strongly influenced the fibrosis in the scarred stage.

研究分野：消化器外科学

キーワード：IL10 食道再生

1. 研究開始当初の背景

近年、組織工学を応用した細胞治療が様々な分野で行われている。特にiPS細胞を用いた網膜色素細胞シート移植は大きな関心を集めている。そのほかにも、心筋再生、軟骨再生、骨再生など様々な機能不全に対して再生医療的治療の研究が進んでいる。東京女子医科大学では培養上皮細胞シートを用いた食道内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)後狭窄予防の臨床研究を実施し、安全性のみならず有効性も示唆された。(Ohki et al. *Gastroenterology*. 2012)培養法に関しては臨床応用可能な技術を確立したが、腐食性食道炎や放射線化学療法後などの**高度炎症環境下**では治療効果が期待できない。治療効果を向上させるには、細胞生物学的解析に基づいた新たな技術開発が必要である。(Kobayashi et al. *WJG*. 2014)炎症を伴う局所環境においては、組織工学による組織構築だけでなく、局所の炎症を制御することが重要と考えた。よって**粘膜上皮再生機序と炎症性サイトカイン**のクロストークを解明し、培養技術に反映させる新規治療を考案した。



2. 研究の目的

本研究の目的は、消化管創傷治癒における上皮細胞挙動と抗炎症性サイトカインの関連性を解明し、細胞治療に応用するための基盤研究を行うことである。

3. 研究の方法

8週齢のC57BL/6マウスを用いて、Okabeらの方法を改変して行う。まず、胃前庭部で切開し、前胃の扁平上皮組織の粘膜下に生食を局注する。その後40%高濃度酢酸を用いて直径10mm大の化学的焼灼を加えたのちに、粘膜組織を除去する。(Okabe et al. *Bio Pharm Bull*. 2005)数日おきの組織学的解析を行う。

8週齢のIL-10KOマウスを用いて、同様な食道粘膜治癒モデルを作製し、創傷治癒過程を野生型マウスと組織学的に比較検討する。また、Kieranらの方法を参考に肉芽形成や炎症細胞(マクロファージ)の浸潤に注目し解析を行う。

4. 研究成果

前胃での潰瘍モデル作成を施行したのちに、ControlマウスおよびIL-10KOマウスで継続的な変化を確認したところ、IL-10KOマウスでは継続的に癒痕が増強しており、体重減少も認められた。具体的には、3日目には変化がないが、1週間後、2週間後では壁肥厚、線維化の進行に差を認めた。よってIL-10は特に癒痕期にかけて作用していることが示唆された。また、生食注入群ではIL-10KOマウスでは明らかな癒痕形成を認めておらず、粘膜障害による影響と考えられた。現在詳細な検討を行うべく組織学的解析を継続している。上皮再生についてはあまり大きな差がなく、現在線維化部位の免疫染色および、次世代シーケンサーでの解析を追加中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1. Kasai Y, Takeda N, Kobayashi S, Takagi R, Yamato M. Cellular events and behaviors after grafting of stratified squamous epithelial cell sheet onto a hydrated collagen gel. FEBS Open Bio. 2017;7(5):691-704 査読有
2. Yamaguchi S, Kanetaka K, Kobayashi S, Nagata Y, Kinoshita N, Fukuoka J, Murakami S, Fujita F, Takatsuki M, Eguchi S. Severe neutrophilic leukocytosis as a progression marker in granulocyte colony-stimulating factor-producing squamous cell carcinoma of the esophagus. Clin Case Rep. 2017;5(5):688-693. 査読有
3. Tanaka S, Kanetaka K, Fujii M, Ito S, Sakai Y, Kobayashi S, Yamanouchi K, Fujita F, Kuroki T, Eguchi S. Cell sheet technology for the regeneration of gastrointestinal tissue using a novel gastric perforation rat model. Surg Today. 2017 ;47(1):114-121. 査読有
4. Kobayashi S, Kanai N, Tanaka N, Maeda M, Hosoi T, Fukai F, Eguchi S, Yamato M. Transplantation of epidermal cell sheets by endoscopic balloon dilatation to avoid esophageal re-strictures: initial experience in a porcine model. Endosc Int Open. 2016 ;4(11):E1116-E1123. 査読有
5. Kobayashi S, Kamohara Y, Nagata Y, Ito M, Fujioka H. Intraductal papillary mucinous neoplasm in an annular pancreas: a case report. Surg Case Rep. 2015 ;1(1):68. 査読有

6. Kobayashi S, Soyama A, Takatsuki M, Hidaka M, Adachi T, Kitasato A, Kinoshita A, Hara T, Kanetaka K, Fujita F, Kuroki T, Eguchi S. Relationship between immune function recovery and infectious complications in patients following living donor liver transplantation. Hepatol Res. 2015;46(9):908-15. 査読有

7. 小林 慎一郎, 金高 賢悟, 江口 晋. 消化管粘膜欠損に対する再生治療 2015 Surgery Frontier 2015;22(4):43-49. 査読無

〔学会発表〕(計5件)

1. Shinichiro Kobayashi. Minimally invasive treatment of complications after esophagectomy. Republication scientific-practical conference. (2016.10.21) Almaty, Kazakhstan 招待講演
2. 小林 慎一郎. 鏡視下食道切除術での胃管関連合併症発症を予測する術後因子の解析. 日本食道学会学術集会 (2016.07.04) 東京都港区 ザ・プリンスパークタワー東京
3. 小林 慎一郎. 細胞調整施設間長距離輸送で実施した、表在食道癌内視鏡治療後狭窄予防のための自家口腔粘膜細胞シート移植. 日本結合組織学会学術大会 (2016.06.24) 長崎県長崎市 長崎大学医学部良順会館
4. 小林 慎一郎. 鏡視下食道癌手術における胃管関連合併症発症の周術期因子の解析. 日本外科学会定期学術集会 (2016.04.14) 大阪府大阪市 大阪国際会

議場

なし

5. Shinichiro Kobayashi. BALLOON DILATION WITH EPIDERMAL CELL SHEET TRANSPLANTATION TO ESOPHAGEAL STRICTURES FOR AVOIDING RE-STRICTURES - A NEW ENDOSCOPIC PROCEDURE FOR REGENERATIVE MEDICINE. 23th United European Gastroenterology Week (2015.10.27) Barcelona, Spain

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

Oral Free Paper Prize 23th United European Gastroenterology Week (2015.10.27) Barcelona, Spain

Travel Grant 23th United European Gastroenterology Week (2015.10.27) Barcelona, Spain

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 慎一郎 (KOBAYASHI, Shinichiro) 長崎大学・病院 (医学系)・助教

研究者番号 : 80623363

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者