

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09300

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞を用いた広範囲内視鏡的直腸粘膜下層剥離術後狭窄の予防法の開発

研究課題名(英文) Preventive effect of mesenchymal stem cells on luminal stricture after endoscopic submucosal dissection in the rectum

研究代表者

桂田 武彦 (Katsurada, Takehiko)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：90507592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞は再生医療材料として注目されており、出産時に通常廃棄される羊膜にも間葉系幹細胞が豊富に存在する。我々は、羊膜間葉系幹細胞のパラクライン効果による抗炎症・高線維化効果に着目して、羊膜間葉系幹細胞の培養上清ゲルを作成し、大腸内視鏡的粘膜下層剥離術後の狭窄予防効果をブタを用いて検討した。その結果、培養上清の注腸投与が大腸内視鏡的粘膜下層剥離術後の炎症反応を抑制し、線維化も抑制することで狭窄を予防できることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の内視鏡技術の発達により、大腸がんを内視鏡で広範囲に切除する方法(ESD)が普及しつつある。しかしながら、広範囲に切除すると大腸が狭窄して腸閉塞になるリスクがある。我々は、羊膜間葉系幹細胞から分泌される因子に着目し、この細胞の培養上清をESD後の部分に塗りつけることで狭窄を予防できることを動物実験で明らかにした。この方法が確立すれば、内視鏡医が術後の狭窄を危惧せずに広範囲に切除できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) are valuable in regenerative medicine, and MSC culture supernatant (MSC-CS) reportedly inhibits inflammation and fibrosis. We investigated whether the development of luminal stricture after circumferential endoscopic mucosal dissection (ESD) in the rectum could be prevented using MSC-CS enema. The degree of luminal stricture in the rectum was significantly lower in the MSC-CS group than in the control group. Furthermore, MSC-CS attenuated myofibroblast activation and hypertrophy of the muscularis propria and reduced inflammatory cell infiltration. Taken together, MSC-CS enema prevented luminal stricture after ESD, possibly by inhibiting the inflammatory reaction and fibrosis.

研究分野：再生医療

キーワード：間葉系幹細胞 大腸がん 内視鏡的粘膜下層剥離術

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、早期大腸がんが内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)により広範囲に切除される症例が増加しており、今後も技術の普及によりさらに増加すると予想される。しかしながら、内視鏡的に直腸を広範囲に切除すると、合併症として狭窄が一定の頻度で生じることが明らかになってきた。その治療法としては内視鏡的バルーン拡張術が試みられているが、報告は散発的であり、狭窄を予防する方法は現在のところ存在しない。

一方、骨髄に存在する間葉系幹細胞は再生医療材料として注目され、国内でも臨床応用が開始されている。また、その組織再生効果の機序として、細胞から分泌される種々のパラクリン因子が重要と考えられている。しかしながら、ドナーから骨髄を採取することは侵襲をとめない倫理的にも問題がある。最近、分娩時に通常廃棄されている卵膜などの胎児付属物にも、間葉系幹細胞が豊富に含まれていることが明らかになり、この胎児付属物由来間葉系幹細胞が骨髄由来間葉系幹細胞にかわる新しい再生医療材料となる可能性がある。実際、申請者は炎症性腸疾患モデルに対するヒト羊膜由来間葉系幹細胞の効果を明らかにし、その他にも所属する研究室から放射線直腸炎モデル、膵炎モデル、肝硬変モデルに対する効果が最近報告された。これらの成果をもとに、申請者の研究室を中心にクローン病や移植片対宿主病(GVHD)を対象とした first-in-human 臨床試験の準備をすすめ、まもなく開始されようとしている。

これまでの予備実験で、ヒト羊膜由来間葉系幹細胞から培養上清を回収し、これをブタ食道 ESD モデルの潰瘍面に塗布したところ、抗線維化作用により食道狭窄を有意に抑制していることが明らかになった。細胞から分泌される何らかの生理活性物質が線維化抑制に寄与していると考えられ、すでにいくつかの候補となる低分子生理活性物質を同定し、解析をすすめている。

そこで、羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清を使用することで、直腸広範囲 ESD 後の狭窄を予防できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究ではヒト羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清を用いて、ブタ直腸広範囲 ESD 後狭窄モデルに対する狭窄予防効果を詳細に検討して、その機序を明らかにし、臨床応用への基盤を整えることを目的とする。

- (1) ブタを用いて、直腸広範囲 ESD 後狭窄モデルを確立する。
- (2) ヒト羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清の適切な投与法を決定する。
- (3) 培養上清の投与後の治療効果およびその機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ブタ直腸広範囲 ESD 後狭窄モデルの確立

- 前日にセボフルレンによる吸入麻酔下に上部内視鏡を用いて腸管洗浄剤（ムーベン®）を胃内に投与した。直腸 ESD は吸入麻酔下に行い、屠殺後に開腹して直腸を抜去し狭窄率の評価ができるように、肛門より 10-15cm の範囲で長径 5 cm の全周性の切開を行った。3 週間後に屠殺し、直腸を抜去して長軸に沿って切開し、狭窄率を測定した。
- 抜去した直腸をホルマリン固定して病理組織学的評価を行った。具体的には、HE 染色で筋層の線維の萎縮の程度を測定し、masson's trichrome 染色で線維化の範囲や厚みを測定した。また、CD107a（単球）、myeloperoxidase（好中球）、CD31（血管密度）、 α -SMA（筋線維芽細胞）、の免疫組織染色を行い、陽性細胞数や面積を画像解析

ソフト（WinROOF）を用いて計測した。

(2) ヒト羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清の適切な投与法の確立

- 培養上清は、ヒト羊膜由来間葉系幹細胞をコンフルエントになるまで増殖させた後、無血清培地で48時間培養したものを回収して使用した。また、臨床の現場で使用されているメチルセルロースを用いて、経内視鏡的に塗布可能かつ塗布後に潰瘍部に一定時間以上停滞するような硬度の培養上清ゲルを作成した。

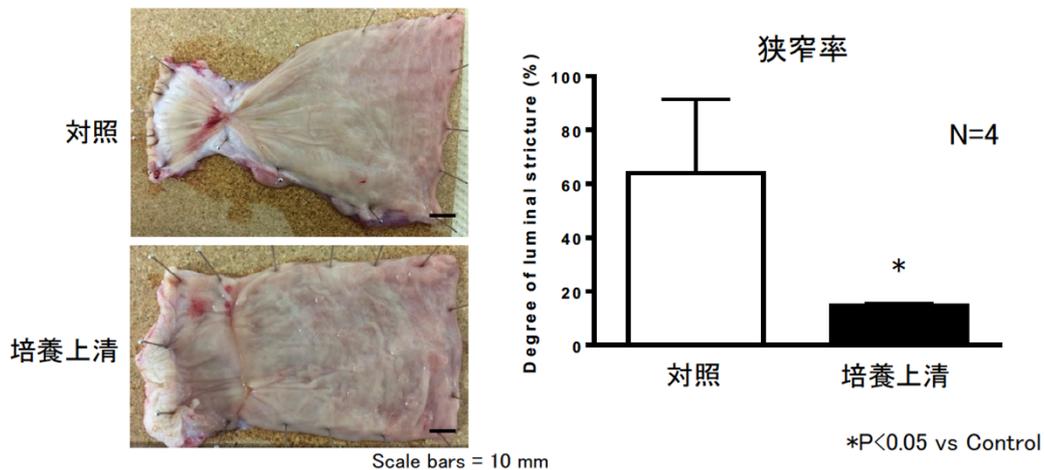
(3) 培養上清の投与後の治療効果およびその機序の解明

- 直腸ESD1週間後または3週間後に屠殺し、直腸を抜去して長軸に沿って切開し、狭窄率を測定した。
- 抜去した直腸をホルマリン固定して病理組織学的評価を行った。具体的には、HE染色で筋層の線維の萎縮の程度を測定し、masson's trichrome染色で線維化の範囲や厚みを測定した。また、CD107a（単球）、myeloperoxidase（好中球）、CD31（血管密度）、 α -SMA（筋線維芽細胞）、の免疫組織染色を行い、陽性細胞数や面積を画像解析ソフト（WinROOF）を用いて計測した。

4. 研究成果

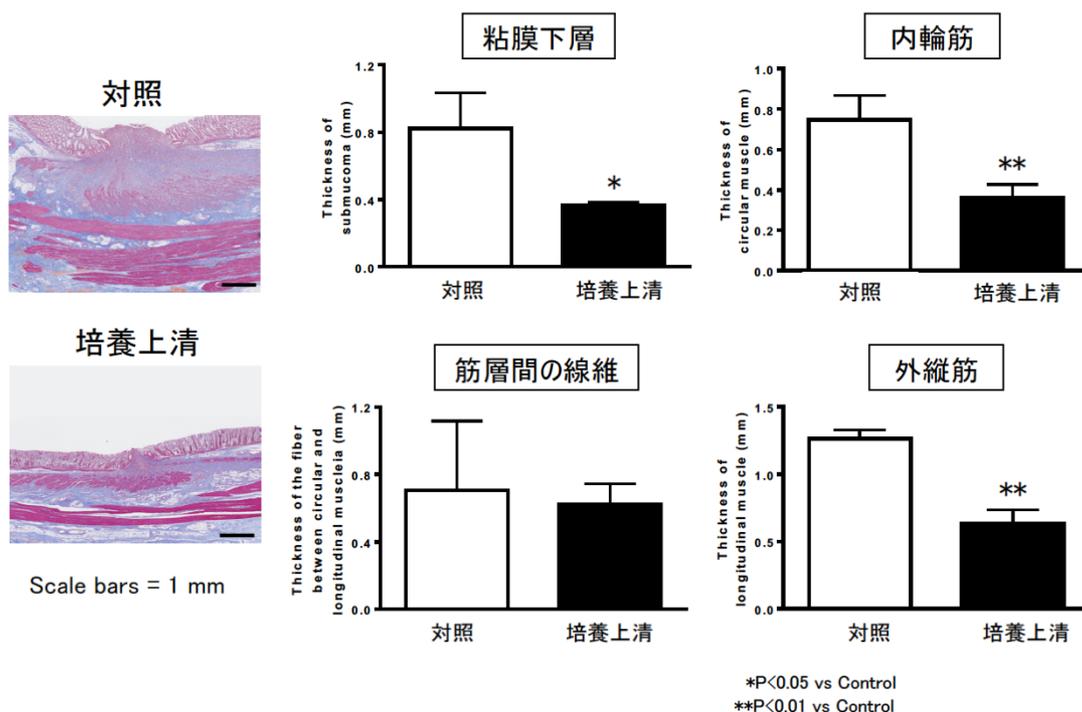
直腸ESD3週間後の狭窄率は、対照ゲル注腸群と比較して培養上清ゲル注腸群で有意に改善されていた(63.9 \pm 27.4% vs 14.7 \pm 0.64%, P<0.05, 図1)。

図1： 直腸ESD後狭窄モデルに対する羊膜MSC培養上清ゲルの効果



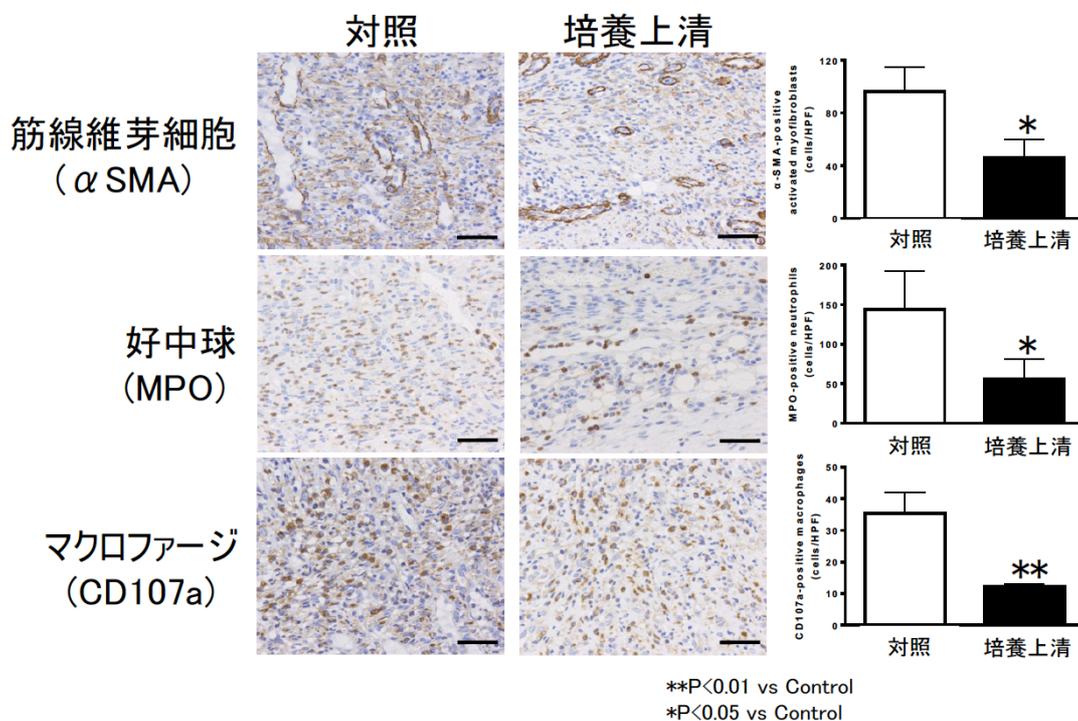
各層の厚さに関しても、培養上清ゲル注腸群で、対照ゲル注腸群と比較し粘膜下層、輪状筋、縦走筋の厚さを有意に抑制していた（図2）。

図2: 各層の厚さ



筋線維芽細胞数、好中球数、マクロファージ数に関しては、培養上清ゲル注腸群で対照ゲル注腸群と比べ有意にその数を抑制していた (図3)。

図3: 免疫染色



血管新生に関しては、有意差は認めなかった。以上の結果から、培養上清ゲルの注腸投与は炎症抑制を介して線維芽細胞の活性化を抑制し、狭窄予防に有効であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

1. Tsuda M, Ohnishi S, Mizushima T, Hosono H, Yamahara K, Ishikawa M, Abiko S, Katsurada T, Shimizu Y, Sakamoto N. Preventive effect of mesenchymal stem cell-culture supernatant on luminal stricture after endoscopic submucosal dissection in the rectum of pigs. **Endoscopy** 2018;50(10):1001-16. (査読有り)

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者
該当なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：大西俊介

ローマ字氏名：Shunsuke Ohnishi