

令和元年6月25日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16569

研究課題名(和文) 機能的遺伝子導入細胞を用いた次世代細胞治療

研究課題名(英文) cell therapy using functional gene-editing cells

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：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。しかし、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。本研究で炎症性変化時における抗炎症性サイトカインの効果が確認できた。特異的な遺伝子導入に関しては、導入効率や上皮細胞の増殖に与える影響が確認中であり、最適な導入法を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの治療学は病巣を切除するのみであり、治癒に関しては、生体の反応に委ねていた。そのため、一定の確立で合併症が発症してしまう。細胞治療、再生医療は治癒を促進できる治療法として注目されている。本研究により、抗炎症性因子が創傷治癒に与える影響が示唆された。低侵襲治療の基盤となる理論が確認できたため、創薬の基盤となるだけでなく、細胞治療として新たな医療となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：There were several treatments by cell therapies using tissue-engineering. However, the effectiveness of the cell therapies was limited in the severe inflammatory condition. Thus, it is necessary to develop the novel cell therapy for the severe inflammatory condition. In this study, anti-inflammatory cytokine help to keep the normal condition after injury. The specific gene transfer was tried in the several experiments. The gene-editing technique gave the influence about viability and growth of epithelial cells. Nowadays, we have developed the novel gene editing protocol.

研究分野：細胞治療

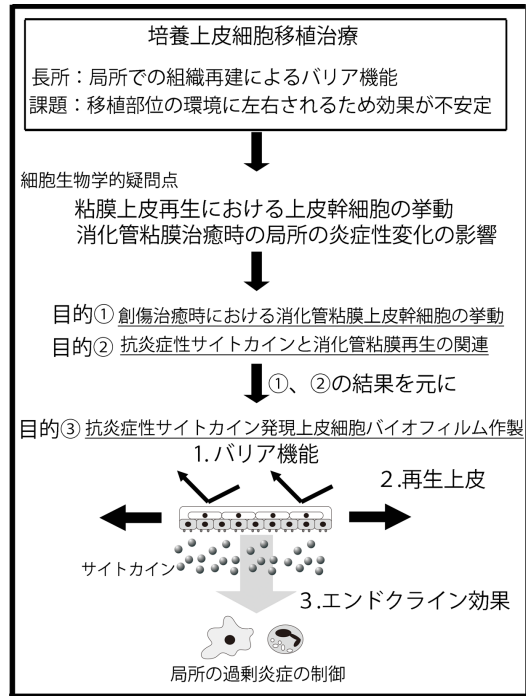
キーワード：食道狭窄 再生医療 高度炎症

## 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、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。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。

そこで抗炎症作用の強い IL-10 に注目し、皮膚創傷治癒に関して、IL-10KO マウスは肉芽形成が亢進することが報告され、IL-10 は創傷時に恒常性を保つために重要なサイトカインであると推測される。(Kieran et al. Wound Repair Regen. 2013) 一方、消化管上皮の炎症が病的に惹起される炎症性腸疾患では IL-10 レセプター異常が一因と近年解明された。(Glocker et al. N Engl J Med. 2009) さらに病的炎症において高用量の IL-10 が抗炎症効果を発揮することで、粘膜上皮再生が促進する可能性が指摘されている。(Neurath. Mucosal Immunology. 2014)

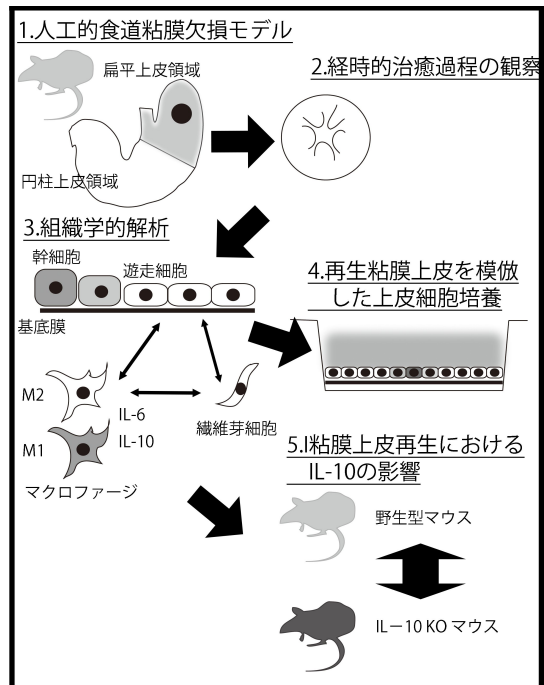


### 2. 研究の目的

本研究の目的は、IL-10 と食道粘膜上皮再生、局所の炎症の関連性を証明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

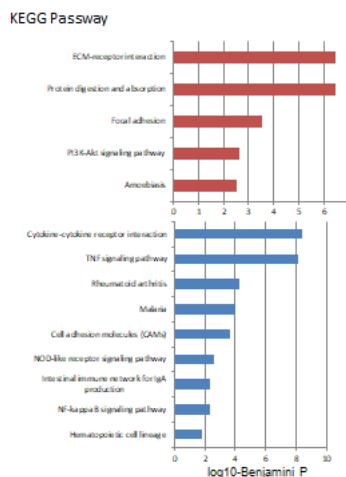
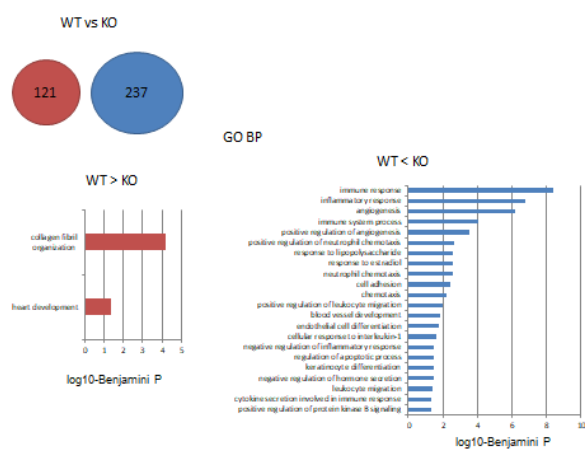
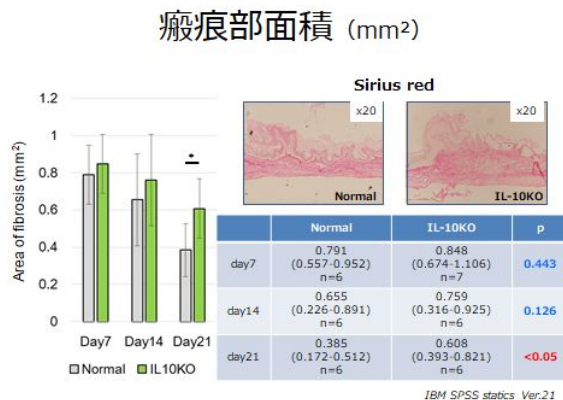
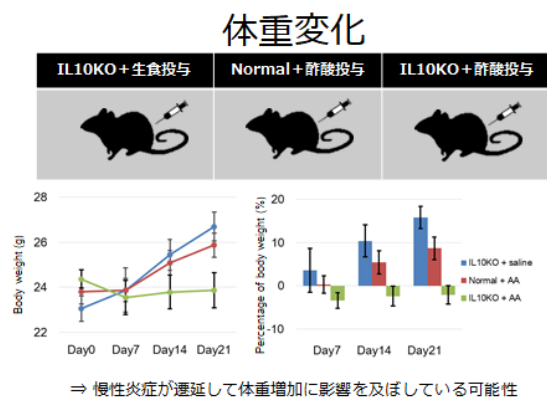
食道上皮の創傷治癒と抗炎症性サイトカインの関連を調べるために、まず食道粘膜欠損モデルを作製し、創傷治癒過程の組織学的解析を行う。次に、IL-10KO マウスの食道創傷部における創傷治癒と同系マウスと比較し、創傷治癒に与える影響を比較検討し、病態解析を行なった。術後 7、14、21 日目に組織学的解析を行い、癒痕部を次世代シーケンサーで解析した。さらに免疫組織化学染色で浸潤細胞について同定を行い、プロファイリングを行った。さらに食道筋層への影響を確認するために、ラット食道壁への酢酸注入を行った。上皮細胞株である A431 細胞と HeLa 細胞を培養し、遺伝子導入細胞作製のための予備実験を行った。



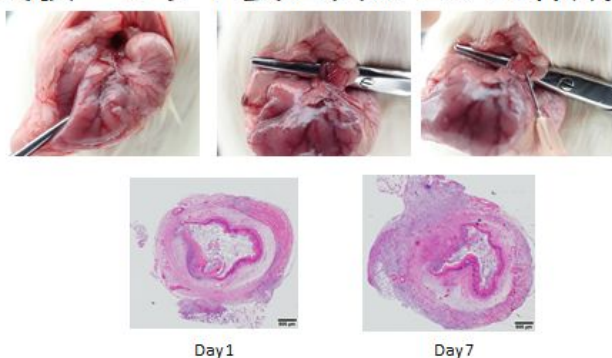
### 4. 研究成果

細胞生着性に関しては、in vitro での検証を行っており、コラーゲンと細胞シートの接着性、進展性に関して、良好な関係にあることが証明された (Kasai et al. FEBS Open Bio. 2018)。抗炎症性サイトカインと食道狭窄の関連に関しては、血中濃度との関連性は証明されなかったため、局所での反応が重要と考えられた。さらに IL10KO マウスを用いた実験において、炎症性変化時における IL-10 の効果が確認できた。線維芽細胞の挙動や炎症細胞浸潤との相関が認められており、炎症性変化の遷延が、肉芽癒痕形成の線溶が抑制されていることが確認できた。さらに、次世代シーケンサーを用いた解析で、機能解析からも理論的に説明可能である。またラット食道への酢酸注入でも同様な結果を得ており、炎症細胞浸潤の受容性が証明された。

現在論文投稿中である。また現在、培養上皮細胞に IL-10 遺伝子導入効率の検討を重ねている。導入効率や上皮細胞の増殖に与える影響が確認中であり、最適な導入法を検討中である。初代培養上皮での実験に関しては予備実験段階であり、今後の検討課題である。



## 実験 ラット食道潰瘍モデル作成



口側の食物残渣のみを、体重増減の評価  
 RNA-seqでHitした遺伝子のmRNA 5-6個 + col1a1, IL10, 解析  
 生食注入群 (n=4)  
 酢酸群 (n=4)

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10件)

1. Shinichiro Kobayashi, Sadayuki Okudaira, Kengo Kanetaka, et al. Peripheral hepatic sinusoidal obstruction syndrome due to oxaliplatin-based chemotherapy. Clin Case Rep. 2019 Jan doi.org/10.1002/ccr3.1935 査読あり
2. Shinichiro Kobayashi, Yusuke Inoue, Fumihiko Fujita et al. Extent of intraluminal exfoliated malignant cells during surgery for colon cancer: Differences in cell abundance ratio between laparoscopic and open surgery. Asian J Endosc Surg. 2018 Jul 11. doi: 10.1111/ases.12617. 査読あり

3. Shinichiro Kobayashi, Kengo Kanetaka, Yasuhiro Nagata, et al. Predictive factors for major postoperative complications related to gastric conduit reconstruction in thoracoscopic esophagectomy for esophageal cancer: a case control study. BMC Surg. 2018 Mar 6;18(1):15. doi: 10.1186/ 査読あり
4. Kengo Kanetaka, Shinichiro Kobayashi, Susumu Eguchi, et al. Regenerative medicine for the esophagus. Surg Today. 2018 Aug;48(8):739-747. 査読あり
5. Tomoko Yoshimoto, Shinichiro Kobayashi, Kengo Kanetaka et al. Preoperative chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil for locally advanced esophageal carcinosarcoma: a case report and review of the literature. Surg Case Rep. 2018 Feb 17;4(1):18. 査読あり
6. Naoyuki Yamaguchi, Hajime Isomoto, Shinichiro Kobayashi, et al. Oral epithelial cell sheets engraftment for esophageal strictures after endoscopic submucosal dissection of squamous cell carcinoma and airplane transportation. Sci Rep. 2017 Dec 12;7(1):17460. 査読あり
7. Yasuhiro Maruya, Nobuo Kanai, Shinichiro Kobayashi et al. Autologous adipose-derived stem cell sheets enhance the strength of intestinal anastomosis. Regen Ther. 2017 Jul 17;7:24-33 査読あり
8. Yoshiyuki Kasai, Naoya Takeda, Shinichiro Kobayashi, et al. 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 査読あり
9. Shun Yamaguchi, Kengo Kanetaka, Shinichiro Kobayashi, et al. 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.
10. Shiro Tanaka, Kengo Kanetaka, Shinichiro Kobayashi, et al. Cell sheet technology for the regeneration of gastrointestinal tissue using a novel gastric perforation rat model. Surg Today. 2017 ;47(1):114-121. 査読あり

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 小林慎一郎 多職種で構成する肥満症外科治療導入 110 回日本消化器病学会九州支部例会 2017
2. Shinichiro Kobayashi Biomarkers of peritoneal lavage in Gastric cancer 第 9 回日本モンゴル国際消化器癌シンポジウム(国際学会)モンゴル 2017 年
3. 小林慎一郎 術前 DCF 療法が奏効した食道癌肉腫の一例 第 109 回日本消化器病学会九州支部例会 2017
4. 小林慎一郎 胃管関連合併症予測のための内視鏡所見分類 第 117 回外科学会総会 2017 第 109 回日本消化器病学会九州支部例会 2017
5. Shinichiro Kobayashi Minimally invasive esophagectomy in esophageal cancer 13th International Course on Advances in Gastroenterology and Digestive Endoscopy (招待講演)(国際学会) ポリビア 2017
6. Shinichiro Kobayashi Management of benign esophageal strictures 13th International Course on Advances in Gastroenterology and Digestive Endoscopy (招待講演)(国際学会) ポリビア 2017
7. Shinichiro Kobayashi Predictive factors of the postoperative severe complications of gastric conduit reconstruction in thoracoscopic esophagectomy 5th International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery (国際学会) フランクフルト 2017
8. Shinichiro Kobayashi Transplanting tissue-engineered epithelial cell sheets to esophageal mucosal defect for the prevention of severe strictures. "5th TERMIS World Congress (招待講演)(国際学会) kyoto 2018
9. Shinichiro Kobayashi ENDOSCOPIC SCORING SYSTEM FOR PREDICTING THE ANASTOMOTIC COMPLICATIONS AFTER ESOPHAGECTOMY: A PROSPECTIVE COHORT STUDY. UEG Week (国際学会) オーストリア 2018
10. 小林慎一郎 食道切除後難治性吻合部狭窄に対する予防的プレドニゾロン内服療法 第 118 回日本外科学会定期学術集会 2018
11. 小林慎一郎 食道癌術後難治性狭窄に対するベストプラクティス(案) 第 73 回日本消化器外科学会総会 2018
12. 小林慎一郎 当科における有茎空腸再建の工夫と成績 第 72 回日本食道学会学術集会 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

## 取得状況（計 0 件）

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。