

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08390

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞およびコラゲナーゼを用いた難治性食道狭窄に対する治療法の開発

研究課題名(英文) Efficacy of mesenchymal stem cell for prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection

研究代表者

橋本 哲 (Hashimoto, Satoru)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：10768667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌内視鏡治療後の食道狭窄は、粘膜治癒過程における粘膜下層の線維化が原因である。今回、我々はラット皮膚瘻孔モデルを作製し、抗炎症および抗線維化などの効果を持つとされる間葉系幹細胞(MSC)を注入する研究を行った。MSC局注群では、投与部と一致してマクロファージの集積を認め、その近傍に血管新生を示唆するCD31陽性細胞が多く見られた。一方、MSC非局注群では、これらの反応が見られず、MSCを局注する事により、組織の治癒起点を誘導しているのではないかと推察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MSCの局注および現在行っているMSC徐放化シートの効果が明らかになれば、イヌ食道粘膜欠損モデルにて検証を行う。イヌ食道粘膜欠損モデルは当科で作成可能であり、MSCの効果が確認できれば、内視鏡切除後の食道狭窄予防における臨床応用の段階となる。

研究成果の概要(英文)：Esophageal stricture following endoscopic treatment for esophageal cancer is caused by fibrosis in the submucosal layer during the mucosal healing process. In this study, we created a rat skin fistula model and investigated the effects of mesenchymal stem cells (MSCs), which are known to have anti-inflammatory and anti-fibrotic properties, by injecting them. In the MSC local injection group, we observed accumulation of macrophages coinciding with the administration site, and a significant presence of CD31-positive cells suggesting neovascularization in the vicinity. Conversely, these reactions were not observed in the MSC non-local injection group, leading us to speculate that local injection of MSCs induces the initiation of tissue healing.

研究分野：消化器内科

キーワード：食道狭窄 間葉系幹細胞 皮膚瘻孔モデル 線維化 内視鏡的粘膜下層剥離術

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

早期食道癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)は、近年低侵襲治療として適応が拡大している。しかし、周在性が亜全周を越えるような広範囲病変に対しては、術後の難治性瘢痕狭窄による患者のQOL低下が問題となる。現在、術後の狭窄予防治療の開発が重要課題とされている。我々は世界に先駆けて、食道瘢痕狭窄予防として、ステロイド製剤であるトリアムシノロンを用いた内視鏡的食道壁内注入法を開発した(Hashimoto S, et al. Gastrointest Endosc, 2011)。ステロイドは炎症細胞や線維芽細胞の活動性を低下させ、線維化を抑制する作用がある。当治療法は、ESD 切除後の潰瘍面に、トリアムシノロンを均一に局所注入する方法で、消化器内視鏡専門医であれば簡便に行うことが可能な手技である。当治療法を導入後、ESD 術後狭窄の頻度は格段に改善したが、全周例など効果が不十分な例も依然として残存し、さらなる治療法の開発を進めてきた。

一方、我々は肝硬変に対する抗線維化治療、および炎症性腸疾患モデルの抗炎症治療として、間葉系幹細胞(MSC)を用いた研究を進め、その成果を報告した。(Watanabe et al. Stem Cells Translational Medicine 2019, Cell and Tissue Research 2019)。MSCは骨髄ばかりでなく脂肪組織などの医療廃棄物からも取れ、簡便に培養でき様々なサイトカイン、エクソソームなどを産生し、抗炎症、抗酸化、抗線維化など状況に応じて様々な効果を及ぼす点、そして低抗原性で他家細胞も用いることが出来る点で注目を集めている。平成29年より、当科では本邦初の進行肝硬変に対するヒト他家脂肪細胞由来間葉系幹細胞を用いた臨床治験を開始している。これらの背景から、MSCやそのエクソソームによる線維化予防を検証し、ESD後の狭窄予防対策を考案するに至った。

まずはMSC局注による創傷治癒過程を確認するため、ラット皮膚瘻孔モデルを作成し、炎症細胞浸潤および線維化抑制効果について検討した。さらに3Dプリンターを用いてMSC含有シートを作成し、その効果を検討した。同時にイヌ食道粘膜欠損部に対するMSC局注または貼付を行うため、食道皮膚欠損モデルを作成した。

2. 研究の目的

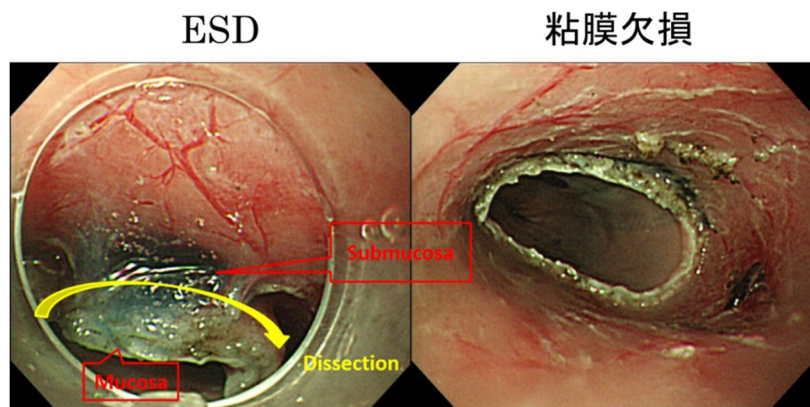
イヌ食道粘膜欠損モデルの作成すること。

ラット皮膚瘻孔モデルに対するMSC局注およびシート貼付の炎症細胞浸潤、血管新生、線維化抑制効果について検討すること。

3. 研究の方法

イヌ食道粘膜欠損モデルの作成

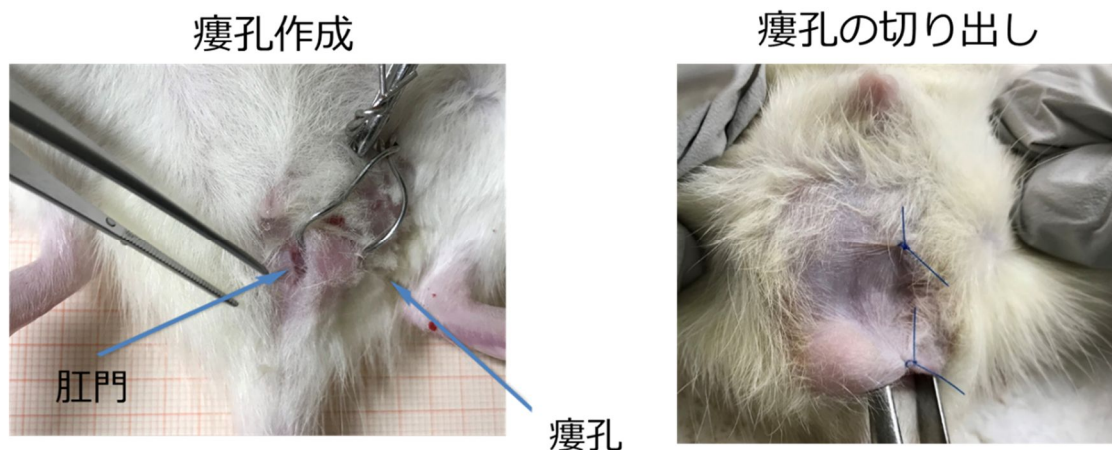
ビーグル犬に対し全身麻酔呼吸器管理下に、上部消化管内視鏡を経口挿入し、食道粘膜下にグリセオールを粘膜下注入したのちESDを施行した。上部、中部、下部食道にそれぞれ全周性の粘膜欠損を作成した(図1)。



(図1)

スチールワイヤーによるラット痔瘻モデルを以下の様に作製した後、MSCの投与を行った。

ラットは 10 週の Wister rat、雄、体重 250 ~ 300g 程度のものを用いた。文献報告 (Gustavo T R, et al. Acta Cirurgica Brasileira-Vol.31(6)2016-377) に基づき、スチールワイヤーによりラット痔瘻モデルを作成した。麻酔下で Number 1 steel wire を肛門の 1cm 右側から肛門括約筋を横切るようにして通し、外瘻を作成する。ワイヤーを入れたまま 28 日間飼育し、28 日目に除去することでラット痔瘻モデルを作成した。28 日後 MSC (1×10^6 cells/rat) もワイヤー除去時に、瘻孔周辺に投与し 14 日間観察し、瘻孔の改善、マクロファージ (CD163) や血管内皮 (CD31) の免疫染色を行った (図 2)。



(図 2)

4 . 研究成果

イヌ食道粘膜欠損モデルは、それぞれの部位で偶発症なく作成可能であった。

ラットの瘻孔周辺に MSC の投与を行ったが有意な瘻孔系の改善は、今回は得られなかった。上記の方法で作成した瘻孔に、瘻孔の方向と垂直になるように 3 分割になるように割を入れて、瘻孔の面積を BZ-9000 fluorescence microscope を用いて測定した。

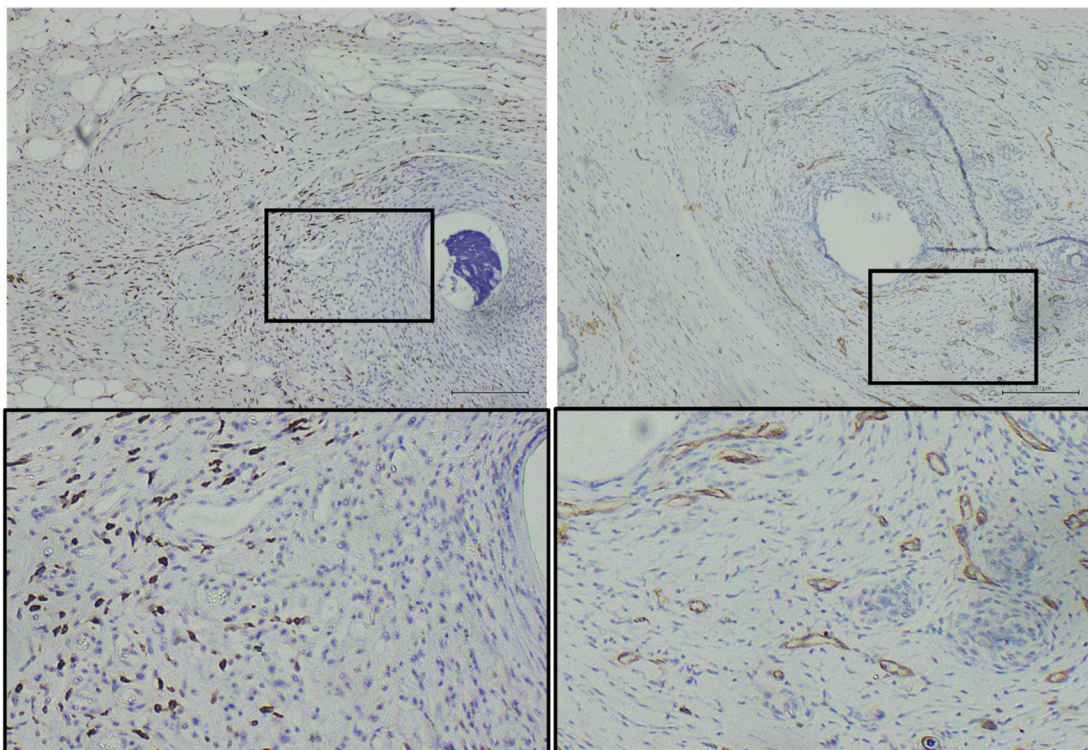
その結果、今回は残念ながら、細胞を投与しなかったコントロール群に比し、MSC を投与した群で治療効果が優れているという結果は得られなかった。問題点として、瘻孔を解析のために割を入れていたが、必ずしも分割が観察できないものもあり、また、組織の固定の難しさから割が斜めに入ってしまったものもあり、今後の改善点と考えられた。

MSC を瘻孔周囲に打った物では CD163 陽性のマクロファージの集団や CD31 陽性の血管内皮の増生が確認できた。

今回、瘻孔内腔の投与や内腔から打ち込むという打ち方ではなく、瘻孔に並行する形で細胞投与を行った。14 日後の解析では、投与した細胞であろうものを認める事はできず、投与細胞は 14 日以内に少なくとも生着、増殖することはまれな現象であろうと考えられた。更に、我々は MSC のマクロファージへの影響 (抗炎症性にする) や血管新生への影響が報告されていたので、投与部位にこれらの細胞が集まってきているかを確認した。その結果 MSC を投与したものでは投与部位と思われるところに CD163 陽性の抗炎症性マクロファージや CD31 陽性の血管内皮細胞が多く存在している傾向が見えた (図 3)。この結果から、今回瘻孔の系の改善という点では統計的な有意な結果は得られなかったが、抗炎症性のマクロファージの誘導、血管新生という観点からは、MSC 投与は意義があったのではないかと推察された。

CD163

CD31



(図 3)

考察

今回、瘻孔の改善を期待して MSC を周囲に投与したが、投与細胞は、長期間生着するわけではなさそうであり、現在産生する液性因子や細胞外小胞などが影響していると考えられた。従って、MSC の投与は抗炎症性マクロファージや血管新生の誘導という観点からは意義があると想定された。本研究の最終目的とする食道粘膜欠損部への治療効果、創傷治癒過程の基礎実験として本実験を行ったが、今後、食道狭窄に対し MSC を活用できる可能性はあると考えられた。しかし、投与形態は、基礎実験からも当初考えていた 3D プリンターでの作成より、温度応答培養皿の様な方法がよいであろうと考察した。今後、MSC をどのような方法で生かしていくかは、まだまだ解析して行かなければならないが、本研究により MSC の役割の一端を明らかにできたことは有意義と考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hashimoto S, Sato H, Mizuno Ken-ichi, Takahashi K, Takatsuna M, Yokoyama J, Ichikawa H, Takeuchi M, Kobayashi M, Terai S	4. 巻 -
2. 論文標題 Endoscopic Submucosal Dissection for Gastric Tube Carcinoma after Esophagectomy Contributes to Long-Term Outcomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2022/1631415	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Katada C, Yokoyama T, Hirasawa D, Iizuka T, Kikuchi D, Yano T, Honbu T, Yoshio T, Yoshimizu S, Ono H, Yabuuchi Y, Terai S, Hashimoto S, Takahashi K, Tanaka S, Urabe Y, Arima M, Tanabe S, Wada T, Furue Y, Oyama T, Takahashi A, Sakamoto Y, Muto M	4. 巻 -
2. 論文標題 Curative management after endoscopic resection for esophageal squamous cell carcinoma invading muscularis mucosa or shallow submucosal layer - multicenter real-world survey in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14309/ajg.0000000000002106.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato C, Takahashi K, Sato H, Naruse T, Nakajima N, Takatsuna M, Mizuno K, Hashimoto S, Takeuchi M, Yokoyama J, Kobayashi M, Terai S	4. 巻 -
2. 論文標題 Endoscopic Findings and Treatment of Gastric Neoplasms in Familial Adenomatous Polyposis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 381-394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5230/jgc.2022.22.e30.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	寺井 崇二 (Terai Shuji) (00332809)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	上村 顕也 (Kamimura Kenya) (00579146)	新潟大学・医歯学総合病院・講師 (13101)	
研究分担者	佐藤 裕樹 (Sato Hiroki) (50644556)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	
研究分担者	土屋 淳紀 (Tsuchiya Atsunori) (70464005)	新潟大学・医歯学総合病院・講師 (13101)	
研究分担者	横尾 健 (Yokoo Takeshi) (80750629)	新潟大学・医歯学総合研究科・特任准教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------