

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17024

研究課題名（和文）口腔粘膜上皮細胞シート移植による食道再生医療後の長期安全性評価基盤の構築

研究課題名（英文）Long-term prognosis and DNA damage status of oral mucosal epithelial cell sheet transplantation after esophagus endoscopic submucosal resection for squamous cell carcinoma

研究代表者

丸屋 安広（MARUYA, Yasuhiro）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・講師

研究者番号：20817085

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）：食道の内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）後に自家口腔粘膜上皮細胞シート移植を受けた10名の長期予後を検討。経過観察中に内視鏡的に前癌病変が疑われたESD瘢痕組織の組織学的評価、53BP1免疫蛍光を用いて局所DNA損傷反応を移植なしの患者のESD後生検標本5例と比較検討。移植後の長期経過としては局所再発2例、異時性の原発食道癌1例、リンパ節転移1例。局所再発と転移性食道癌の患者にはESDを行い、リンパ節転移の患者には化学療法を実施。移植患者のうち1名は他疾患で死亡したが、原疾患での死亡はなし。蛍光免疫組織化学では、移植後とコントロール群との移植なし群間でDNA損傷反応に統計的な差はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道の再生医療を受けた患者のフォローアップ期間中に施行された生検組織のサンプルおよび凍結保存されている口腔粘膜上皮細胞シートを用いて解析することで発癌リスクを含めた自家口腔粘膜上皮細胞シート（Autologous oral mucosal epithelial cell sheet; AOMECS）移植後の長期安全性評価方法を構築できないかという点で本研究を行った。今後も慎重なフォローアップが必要であるが、AOMECSの移植は、in situでのDNA損傷反応を増加させることはなかった。本研究は、AOMECS移植の長期的な安全性を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：We examined the long-term prognosis of 10 patients who underwent a clinical trial of Autologous oral mucosal epithelial cell sheet (AOMECS) transplantation for ESD for early-stage esophageal squamous cell carcinoma. We also assessed the histology of ESD scar tissue in the patient with endoscopically suspected cancerous lesions during follow-up. Further, status of local DNA damage response after AOMECS was compared employing p53 binding protein 1(53BP1) immunofluorescence in the biopsy specimen, in comparison with post ESD-biopsy specimen of the patients who did not receive cell sheet transplantation. The long-term prognosis of esophageal cancer patients who underwent AOMECS transplantation drew acceptable results, which all maintained controllable condition in esophagus. Transplantation of AOMECS did not increase DNA damage response in situ.

研究分野：消化器外科

キーワード：細胞シート移植 再生医療 食道癌 53BP1 長期予後

1. 研究開始当初の背景

東京女子医科大学の Ohki らは食道 ESD 後の狭窄予防として、自家口腔粘膜上皮細胞シートを内視鏡的に移植する食道再生治療を開発し報告した (Ohki et al., *Gastroenterology*, 2012)。Yamaguchi らは 2013 年 7 月より東京女子医科大学と共同で長崎-東京間の移送を伴った「早期食道癌に対する ESD 後食道潰瘍への自家口腔粘膜上皮細胞シート移植の臨床研究」を 10 例に実施し、良好な治療成績が得られ、短期的に深刻な有害事象は見られなかったことを報告している (Yamaguchi N et al., *Sci Rep*, 2017)。細胞シートによる食道再生治療は一定の効果が期待されているが、標準治療にするためには様々な課題がある。細胞シート移植後組織の発癌性を含めた長期安全性も課題の一つであり、適切な評価方法の確立が必要である。段階発癌にはゲノム不安定性が寄与しており、その存在は DNA 損傷応答蛋白 p53 binding protein-1(53BP1)の核内フォーカス出現により推定可能である (Nakashima et al., *Int J Cancer*, 2008)。53BP1 と増殖マーカーである Ki67 との共発現は、異常な遺伝子応答を示し、genomic instability につながることを示唆されている。長崎大学原研病理の Ueki らは食道上皮性腫瘍における 53BP1 の発現パターンを解析し、53BP1 の発現と悪性度に関連があることを報告した (Ueki et al., *Pathol Res Pract*, 2019)。本研究では、長崎大学で自家口腔粘膜上皮細胞シートによる食道再生治療を行った 10 例の経過フォロー中の内視鏡で前癌病変が疑われ食道生検を施行された生検組織のサンプルを用いて、53BP1 と Ki67 を蛍光免疫染色で染色し genomic instability を解析する。更に、凍結保存されている口腔粘膜上皮細胞シートに関する癌関連遺伝子を中心とした網羅的遺伝子解析を行い、移植後組織の genomic instability との関連を解析する。

2. 研究の目的

2013 年 7 月より東京女子医科大学と共同で長崎-東京間の移送を伴った「早期食道癌に対する ESD 後食道潰瘍への自家口腔粘膜上皮細胞シート (Autologous oral mucosal epithelial cell sheet ; 以下 AOMECS) 移植の臨床研究」を 10 例に実施し、良好な治療成績が得られ、短期的に深刻な有害事象は見られなかった。しかし AOMECS 移植後組織の長期安全性に関しては適切な評価法は確立されていないのが現状である。本研究では AOMECS 移植後の長期予後とフォローアップ期間中に施行された生検組織のサンプルを用いて、移植長期経過後の発癌リスクを解析することを目的とする。

3. 研究の方法

食道 ESD 後に AOMECS 移植の臨床試験を受けた患者 10 名の長期予後を検討。また、経過観察中に内視鏡的に癌病変が疑われた患者の ESD 瘢痕組織の組織学的評価も行った。さらに、AOMECS 移植後の局所 DNA 損傷反応の状態を、生検標本の p53 結合蛋白 1 (53BP1) 免疫蛍光を用いて、細胞シート移植を受けなかった患者の ESD 後の生検標本 5 例と比較検討した。

4. 研究成果

AOMECS を移植した 10 名の患者の長期フォローアップ結果を Table1 にまとめた。全員が扁平上皮癌と診断され、腫瘍サイズの中央値は 35.5mm (25-78mm) であった。腫瘍の浸潤深度の亜分類の分布は、T1s-EP : 1、T1a-LPM : 6、T1a-MM : 2、T1b-SM : 1、であった。En bloc resection は 10 例 (100 %) に行われた。内視鏡的切除不能の理由は 3 例で、リンパ管侵襲

(Case 1) リンパ管侵襲と垂直断端陽性 (Case 2) 粘膜下層への SCC 侵襲 (Case 9) であった。3 例とも化学放射線療法 (CRT) による追加療法を選択した。追跡期間中央値 100.5 ヶ月 (52-109 ヶ月) のうち、Case1、2 の 2 例が内視鏡的治療を必要とし、生検で高悪性度の上皮内新生物 (SCC in situ) を認めた Case 7 は、CT での肺門リンパ節再発と放射線治療前のため化学療法が選択された。Case 1 は生検で高悪性度上皮内新生物 (SCC in situ) と診断され ESD を受けたが、最終病理結果は低悪性度上皮内新生物であった。Case 4 の症例が異時性異所性の原発 SCC を発症し、Case 7 の症例がリンパ節転移を発症した。局所再発と転移性癌を発症した 3 名は ESD を選択し、リンパ節転移を発症した Case 7 は 5-FU ベースの化学療法を選択した。Case 9 の症例は原発性肺癌で死亡した。

Cases	Age/ Sex	Histology	Tumor size	Depth of tumor	Lymphatic invasion	Vessel invasion	Positive vertical margin	Resection state	Additional therapy	Observation period (months)	LNM recurrence	SCC at AOMECS site	Metachronous primary cancer	tre ri
1	55/M	SCC	42 mm	LPM	+			En bloc	CRT	109		+		
2	68/M	SCC	35 mm	LPM				En bloc		108		+		
3	73/M	SCC	25 mm	LPM				En bloc		107				
4	58/M	SCC	33 mm	EP				En bloc		82			+	
5	67/M	SCC	30 mm	LPM				En bloc		104				
6	56/M	SCC	36 mm	LPM				En bloc		101				
7	63/M	SCC	55 mm	MM	+	+	+	En bloc	CRT	100	+	+		Ch
8	72/M	SCC	78 mm	MM				En bloc		100				
9	62/F	SCC	43 mm	SM2			+	En bloc	CRT	52				
10	74/M	SCC	35 mm	LPM				En bloc		94				

Table 1. AOMECS 移植した 10 名の患者の長期経過

Table2 に、AOMECS 移植の有無にかかわらず、ESD 後の癒痕部からの食道生検の結果を示す。AOMECS 移植後の経過観察中に前癌病変が疑われ、ESD 後癒痕部は 10 人中 4 人の病変で生検された。AOMECS 移植から生検までの期間の中央値は 41 ヶ月であった。生検した組織の病理診断は、非腫瘍性 3 例、intraepithelial neoplasia 4 例、扁平上皮癌 1 例、carcinoma in situ 2 例であった。一方、対照群 (AOMECS 非移植群) では、ESD から生検までの期間の中央値は 7.5 ヶ月であった。AOMECS 移植を行っていない ESD 後の傷跡で食道生検が行われたのは全部で 6 例で、そのうち 4 例が非腫瘍性、2 例 intraepithelial neoplasia であった。

Esophageal biopsy from post-ESD during follow-up after AOMECS transplantation

Case Number	Duration from AOMECS transplantation to biopsy (months)	Pathological diagnosis
1	6	SCC in situ
2	30	Intraepithelial neoplasia
2	35	Non-neoplastic
2	48	Intraepithelial neoplasia
2	54	Squamous cell carcinoma
3	49	Intraepithelial neoplasia
3	53	Intraepithelial neoplasia
7	3	Non-neoplastic
7	8	Non-neoplastic
7	47	SCC in situ

Esophageal biopsy tissue from post-ESD scar area without AOMECS transplantation (control group)

Case Number	Duration from ESD to biopsy (months)	Pathological diagnosis
1	6	Non-neoplastic
2	53	Non-neoplastic
3	21	Non-neoplastic
4	1	Non-neoplastic
5	4	Intraepithelial neoplasia
6	9	Intraepithelial neoplasia

Table 2. ESD 後の癒痕部からの食道生検結果（上段：AOMECS 移植群、下段：AOMECS 非移植群）

次に、53BP1 免疫蛍光法を用いて、AOMECS 移植後の非腫瘍性、上皮内新生物、SCC 組織における DNA 損傷反応の状態を可視化することを試みた。全体的な異常発現の割合、Ki67 陽性細胞における Large foci と 53BP1 共局在は、病理学的グレードとともに数値的に増加したが、それぞれの組織診断内での有意差は観察されなかった。また、53BP1 核病巣の発現パターンは、AOMECS 移植群と対照群との間に差はなかった（Figure 1）。

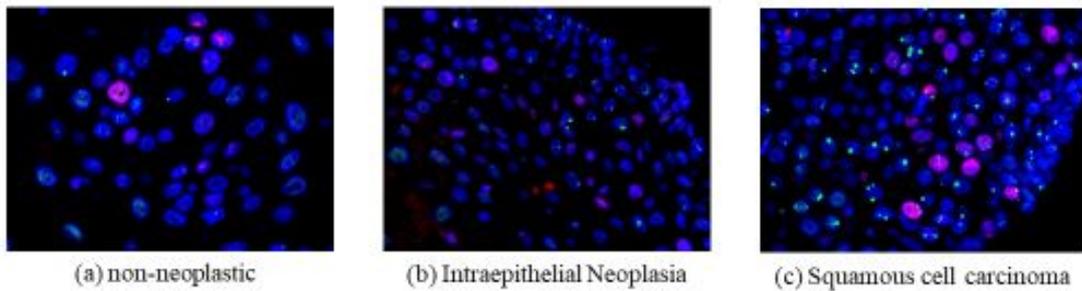


Figure 1. ESD 後の癒痕からの食道生検における 53BP1 と Ki-67 の二重標識免疫蛍光染色の代表画像（53 BP1：緑、Ki-67：赤、DAPI：青。(a) 非腫瘍性、(b) intraepithelial neoplasia、(c) 扁平上皮癌）

AOMECS 移植を受けた 10 名のうち、最終的に AOMECS 移植部位に扁平上皮癌を発症した 3 名（Case 1、2、7）は、経過観察期間中に複数回の生検を受けた。そこで、これらの患者の組織状態、および 53BP1 核病巣の発現パターンを時系列的に評価した。Case 2 の生検標本は、非腫瘍性から上皮内新生物、そして SCC へと変化した（Figure 2）。53BP1 異常率は、上皮内新生物の状態の数値が上昇し、その後 SCC に進展した。

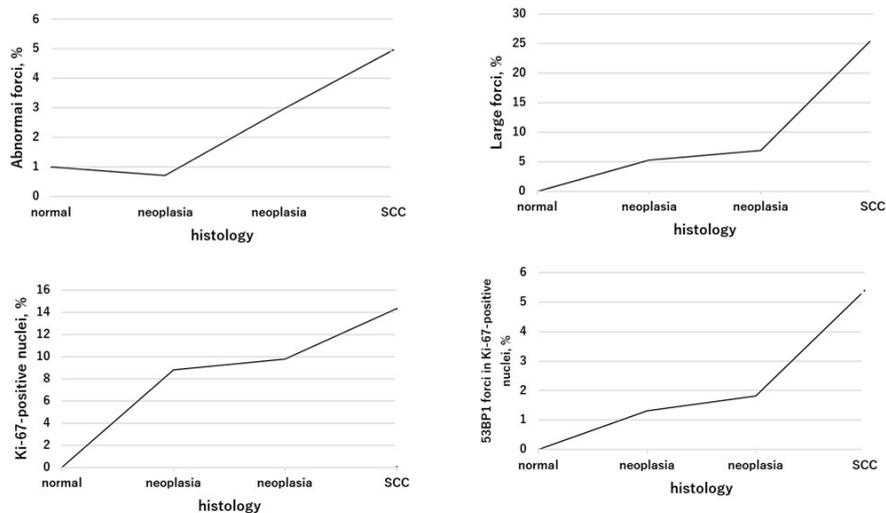


Figure 2. 病理学的悪性度と 53 BP1 発現の時系列および Case 2 の ESD 後癒痕からの生検組織におけるゲノム不安定性の関係性

53 BP1-foci は新生物に蓄積され、SCC への進行中にその数を増やし続け、段階的にゲノムの不安定性が増していることを示している。

AOMECS 移植を受けた食道癌患者の長期予後は、全例で食道内のコントロール可能な状態を維持し、良好な結果を得た。AOMECS の移植は、in situ での DNA 損傷反応を増加させることはなかった。本研究は、AOMECS 移植の長期的な安全性を示唆するものである。移植後の細胞シートの安全性を評価するために、今後も慎重なフォローアップが必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------