

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462039

研究課題名(和文) 消化管吻合部狭窄に対する細胞シート治療の基礎的研究

研究課題名(英文) A fundamental study of cell sheet treatment for gastrointestinal tract anastomotic stricture

研究代表者

大木 岳志 (Ohki, Takeshi)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：90307562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：食道内視鏡的粘膜下層剥離術後の狭窄抑制効果を目的とした自己口腔粘膜上皮細胞シート移植術による再生医療的治療法の臨床応用の経験を基に、新たに外科手術後の難治性消化管狭窄に対する細胞シート治療を開発することを目的とした。

本研究では大形動物で消化管狭窄モデル作製を試みた。開腹手術による食道胃吻合モデルでは吻合が安定しないため、ロボット支援手術(本学所有の実験用da Vinci)にてモデル作製を行った。吻合は安定したが、容易に食事摂取が困難となるため、新たに胃空腸吻合モデルを用いた狭窄モデルを作製し成功した。今後、このモデルにて細胞シート移植を試みる予定である。

研究成果の概要(英文)：Based on our knowledge and experience in clinical application of regenerative medical treatments, particularly on transplanting autologous human oral mucosal epithelial cell sheets to prevent stricture after esophageal endoscopic mucosal dissection (ESD), we conducted some basic experiments on big animals in order to develop a new treatment for patients with anastomotic stricture after surgery.

In this study, several gastrointestinal stricture models using pigs were tested. First, an open esophagogastric anastomotic stricture model was tested. However, anastomoses were not stable because the operation was highly invasive. Next, a robot-assisted esophagogastric anastomotic stricture model was tested. Anastomoses were stable, but the pigs underwent surgery were not able to eat soon. Finally, a new gastric-elevated jejunum anastomotic model was tested, and the result was satisfactory. We plan to continue our study using this gastrointestinal stricture model.

研究分野：消化器外科

キーワード：再生医療 細胞シート工学 食道狭窄 吻合部狭窄 RIC ロボット支援手術

### 1. 研究開始当初の背景

2012年ノーベル生理学医学賞を受賞された山中伸弥教授らはiPS細胞を開発し、再生医療は様々な領域において早期の臨床応用が大きな期待が寄せられている。そのような中、東京女子医科大学先端生命医科学研究所の岡野光夫らは、温度応答性培養皿を用いた「細胞シート工学」を提唱し、その成果は新規再生医療技術として注目されている。

我々は、培養口腔粘膜上皮細胞シートを内視鏡を用いて、食道内腔面に移植する新規再生医療的治療法の開発にも成功しており(Ohki,55,p1704-1710,Gut,2006)、また、この治療法はNature Clinical Practice Gastroenterology & HepatologyのResearch Highlights(4,p122,2007)に取り上げられ、その成果は国内外から大きな注目を集めた。また2008年よりヒト臨床応用を開始し、その成果を報告した(Ohki,143,p582-588, Gastroenterology,2012)。この論文はFaculty of 1000にも取り上げられ、世界的にも評価されている。

近年、食道・胃癌術後の難治性吻合部狭窄に対しRIC(endoscopic radial incision and cutting) methodをMutoらが(Muto, Gastrointestinal Endosc,75, 965-972,2012)が行われている。狭窄部の繊維組織をITナイフで切除する方法である。有効な方法であるが、再狭窄さらに減らすには切除後に細胞シート移植をすることで狭窄を治療できるのではないかと仮説を立てた。ESDでは粘膜切除(筋層は正常)のみの損傷であったが、外科手術後の狭窄は全層での損傷となる。本申請では、これまでに得られた細胞シート治療の成果をさらに発展させ、ミニブタを用いた大動物モデルで消化管吻合に対する新たな治療法を開発しこれらの課題を解決する。

### 2. 研究の目的

我々が研究を推進してきた食道ESD(内視鏡的粘膜下層剥離術)後の人工潰瘍に対する狭窄抑制効果を目的とした自己口腔粘膜上皮細胞シート移植術による再生医療的治療法の臨床応用(世界初)の経験を基に、新たに外科手術後の難治性消化管狭窄に対する細胞シート治療を開発し、大形実験動物を用いてその有効性を検証することを目的とする。

### 3. 研究の方法

ミニブタを使用する。  
当初の方法：ミニブタの食道胃接合部を切除し、circular staplerで吻合する。その際、約幅1cmの粘膜欠損を作製し、筋層のみで吻合する。手術の際、口腔粘膜上皮を採取し口腔粘膜上皮細胞シートを作製する。2週間後に狭窄していると仮定し、狭窄部位をRICで拡張後、準備していた口腔粘膜上皮細胞シートを経内視鏡的に移植を行う。移植後、2週間で内視鏡を観察し、病理組織を採取する。細胞シート移植を行わないRIC単独群と内視鏡的評価と組織学的評価を行う。

### 4. 研究成果

(1)消化管吻合部狭窄モデルの作製  
食道ESDでの周在性3/4以上の粘膜欠損では効率に狭窄を来すことから、粘膜欠損由来する消化管吻合部狭窄モデルを作製することとした。

ブタを用いて全身麻酔下による食道胃吻合部切除の手術は侵襲が大きく、安定した狭窄モデルの作製は、困難であった(写真1)。

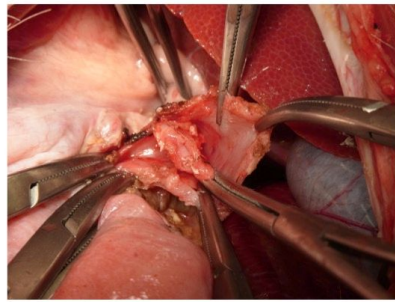


写真1

そのため、従来の食道ESD技術で全周性の狭窄モデルを作成してRICのモデルを作製した(写真2)。



ESD3週間後



88%狭窄

写真2

補正予算で厚生労働省再生医療臨床応用実用化推進事業を得て、大動物実験用のda Vinci Surgical System Siを本学先端生命医科学研究所で購入し、使用可能となった。そこで、安定した狭窄モデルを作製するためにロボット支援手術による消化管吻合部狭窄モデルの作製を開始した。da Vinci Surgical System Siは、先端が360度回転可能なため、従来の腹腔鏡手術では困難な手技が可能である。また3次元による正確な画像情報の取得が可能のため、空間認識が向上し、複雑な実験モデルで作製可能と思われた。

ロボット支援手術による消化管吻合部狭窄モデルの作製を行うため、まずは開腹下でブタの食道残胃吻合を行った。次に、二酸化炭素下(通常の腹腔鏡下手術)で手術を行い、ブタをブタの食道残胃吻合を行い、feasibleであることが確認できた(写真3)。



写真3

ところが、術後の吻合部狭窄が強く、術後管理が困難であったため、新たな狭窄モデルを作製する必要があった。そこで、胃空腸（Roux-Y）吻合を作製し、粘膜を除去して筋層だけを吻合することで食事摂取可能にも拘わらず吻合部狭窄を作製できるモデルを考案した(図1, 写真4)。

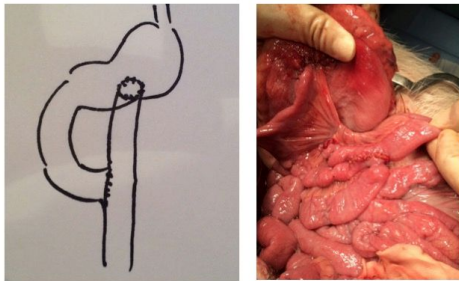


図1、写真4

実験を行い、胃空腸吻合に狭窄が生じ(写真5)かつ内視鏡的にアプローチしやすい部位に作製することに成功した。



写真5

(2) ミニブタ培養口腔粘膜上皮細胞シート作製  
全身麻酔下にミニブタの両側の口腔粘膜組織を紡錘状に切除する。常報により、タンパク質分解酵素であるディスパーゼを用いて基底膜を分解して上皮のみを回収し、トリプ

シンを用いて上皮細胞を単離する。単離した口腔粘膜上皮細胞を温度応答性培養皿に播種し、マイトマイシン C で処理した 3T3 フィーダー層存在下で、約 2 週間培養する。その後、温度を 20℃ まで下げ、一枚の細胞シートとして全細胞を回収する。従来、成長を遅らせるように品種改良したミニブタを用いても、同様な条件でできるかは不明であるが比較的安定した培養条件を得ることができた(写真6)。

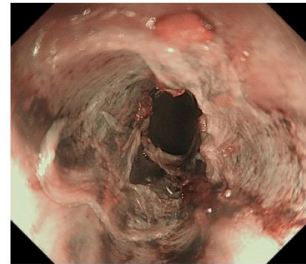


写真6

(3) RIC(endoscopic radial incision and cutting) method による消化管狭窄部組織の切除

(4) 培養口腔粘膜上皮細胞シートの経内視鏡的移植術

何れも(1)のモデル作製に時間を要し RIC + 細胞シートまで行うことができなかった。今後、この新しいモデルを用いて細胞シートを用いた狭窄抑制の研究を継続する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

大木岳志、再生医療を用いた内視鏡治療、成人病と生活習慣病、査読無、45 巻、2015、291-294

Takeshi Ohki 他、Application of regenerative medical technology using tissue-engineered cell sheets for endoscopic submucosal dissection of esophageal neoplasms、Digestive Endoscopy、査読有、27 巻、2015、182-188 DOI:10.1111/den.12354

大木岳志、食道再生細胞シートの臨床応用、東京女子医科大学雑誌、査読有、84 巻、2014、166-172

大木岳志、細胞シートによる狭窄に対する内視鏡治療、医学のあゆみ、査読無、250 巻、2014、915-920

大木岳志、食道再生、最新医学、査読無、250 巻、2014、1517-1524

Takeshi Ohki 他、Regenerative Medicine: Tissue-Engineered Cell Sheet for the Prevention of Post-Endoscopic Submucosal Dissection Esophageal Stricture, Gastrointest Endoscopy Clin N Am、査読有、24 巻、2014、273-281、<http://dx.doi.org/10.1016/j.giec.2013.11.003>

大木岳志 他、細胞シートを用いた ESD 後食道再生、Surgery Frontier、査読無、49 巻、2014、49-53

大木岳志 他、早期食道癌に対する細胞シート治療、再生医療、査読無、12 巻、2013、372-377

大木岳志 他、食道 ESD に対する培養口腔粘膜上皮細胞シートの臨床応用、胃と腸、査読無、48 巻、2013、1311-1320

〔学会発表〕(計 9 件)

大木岳志、Endoscopic Transplantation of utilizing Cell Sheet Technology to Prevent Stricture after Esophageal ESD、第 5 回世界工学会議(WECC2015)(招待講演)(国際学会)、2015.12.2、国立京都国際会館

大木岳志、食道 ESD 後の狭窄予防のための細胞シート治療、第 67 回日本気管食道科学会総会ならびに学術講演会(招待講演)、2015.11.19、ザ・セクレトン福島(福島県・福島市)

Takeshi Ohki 他、Education for widespread of endoscopic cell sheet transplantation to prevent a stricture after esophageal ESD、UEGW (国際学会) 2015.10.24、Barcelona (Spain)

Takeshi Ohki 他、Long-term Outcomes of Endoscopic Transplantation of Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets to Prevent of Esophageal Stricture after Endoscopic Submucosal Dissection、4<sup>th</sup> TERMIS World Congress (国際学会) 2015.09.08、Boston Marriot Copley Place (USA)

大木岳志 他、細胞シート工学による食道再生治療の現状と展望、第 70 回日本消化器外科学会総会、2015.07.20、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

大木岳志、食道 ESD 後狭窄に対する細胞シート治療、第 14 回日本再生医療学会(招待講演)、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Takeshi Ohki 他、The study of long term outcomes utilizing tissue-engineered cell sheet transplantation for the prevention of oesophageal stricture、UEGW (国際学会) Austria Center Vienna (Austria)

大木岳志 他、細胞シートを用いた食道再生治療の展開、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014.04.04、国立京都国際会館(京都府・京都市)

大木岳志 他、食道 ESD の手技の定型化と食道狭窄に対する再生医療技術の応用、第 85 回日本消化器内視鏡学会総会、2013.05.12

国立京都国際会館(京都府・京都市)

〔図書〕(計 2 件)

大木岳志、再生医療用語ハンドブック、Medical Tribune、112-113,117-118、2015

大木岳志、Endoscopic Submucosal Dissection: Principles and Practice、141-146、2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大木 岳志 (OHKI, Takeshi)

東京女子医科大学・消化器外科・講師

研究者番号: 90307562