

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461049

研究課題名(和文)他家(同種)由来細胞シートと新型デバイスを用いた食道再生治療の基礎的研究

研究課題名(英文)Basic researches of allogeneic cell sheets and novel devices for esophageal regeneration

研究代表者

金井 信雄 (Kanai, Nobuo)

東京女子医科大学・医学部・特任講師

研究者番号：90318056

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)：食道領域のアンメットメディカルニーズを解決するため、細胞シートを用いた食道再生治療の開発の基礎研究を進めた。本研究では、自己細胞だけでなく他家(同種)細胞を用いた細胞シートでも治療効果が期待できるかといった基礎研究と、3Dプリンターを使って細胞シートの移植デバイスの研究開発を進めた。ミニプタを用いた基礎研究では、食道狭窄モデルの開発に成功し、同種の上皮細胞シートでも治療効果が期待できる結果が得られたので英文雑誌に報告した。移植デバイスの開発では、3Dプリンターを使用して、シート状治療物質の内視鏡デバイスの開発に成功し、治験で使用するとともに、新規ヒト臨床研究の準備が進められている。

研究成果の概要(英文)：In order to overcome the unmet medical needs in the field of the esophageal area, we are developing of esophageal regenerative treatment using epithelial cell sheet. In this project, we researched the feasibility of allogeneic cell sheet transplantation in a porcine model and developed the novel delivery devices for cell sheets transplantation using 3D printer. In this basic research, We succeeded in developing the animal esophageal stricture model and obtained results that allogeneic cell sheets transplantation avoiding severe esophageal stricture. In developing research, We successfully developed endoscopic delivery devices for sheet-like therapeutic substances using 3D printer.

研究分野：再生医療

キーワード：細胞治療 細胞シート アンメットメディカルニーズ 3Dプリンター 移植デバイス 再生医療 同種細胞

1. 研究開始当初の背景

近年の消化器内視鏡の治療技術の進歩とともに、上部消化管領域においては早期の表在がんが低侵襲に根治できるといった医療技術革新が広がっていた。この技術革新とともに術後の食道狭窄や管腔変形といった新たなアンメットメディカルニーズも生まれてきており、これを解決するため世界中に臨床医が様々な試みがなされていた。そこで我々のグループでは細胞シートを用いた再生医療的治療のFIH試験を計画し、ヒト臨床研究を開始していた。

2. 研究の目的

細胞シートを用いた広範囲 ESD 後の食道再生治療のヒト臨床研究において、さまざまな課題が抽出されていた。例えば自己細胞を用いていることから細胞シートの製造においてバラつきが認められていたことや、細胞シートなどのシート状の治療物質を内視鏡的に運搬し貼付する内視鏡器具が市販されていないことであった。従って本研究では、自己細胞だけでなく同種細胞を用いて細胞シートを製造し、さらに大動物モデルを作製、そして ヒト臨床研究を実施するための Proof of Concept (POC)を得ることを目的とし、さらに 3Dプリンターなどを用いて細胞シート移植デバイスを開発し、食道だけでなく他の消化管にも応用可能な内視鏡的移植デバイスをも開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)効率的な上皮細胞シートの作製

NIBS 系のミニプタを入手し、腹部の皮膚組織から表皮細胞をディスペーゼ、セルソーターを使用して単離回収し、温度応答性カルチャーインサートに播種し、適時培養液を交換、カルシウム濃度を調節し、2 週間かけて重層化した表皮細胞シートを作製するとともに、より効率的な手法を確立していく。

(2)大動物モデル作成・移植実験

当研究所、大動物実験室に既に設備されているオリンパス社内視鏡を使用して、ミニプタの胸部食道粘膜を内視鏡的にフックナイフやフラッシュナイフを用いて 4cm 全周切開し、粘膜を切除する。この広範囲切除を行ったミニプタは安定して 1 週間後より食道が狭窄しはじめ、2 週間目には水分摂取も困難な程度に食道が重度の狭窄を引き起こすモデルである (Kanai N, et al. *Gastrointestinal Endoscopy*, 7(4), 873-881, 2012)。細胞シート移植は の操作で作製した細胞シートを、粘膜欠損部を覆うように で作製した内視鏡器具を用いて移植を行う。温度応答性培養皿にて作成された細胞シートは、特別な縫合や接着剤なしで貼付のみで患部に接着する。コントロール群は細胞シートを移植することなく、東京女子医科大学が定める動物実験の取扱いに従い、食道狭窄により急激に体

重減少を認める術後 2 週間の時期に犠牲死をさせる。

(3)シート状治療物質のデバイス開発

応募者はこれまでも研究所内で機械工学の研究者と連携して内視鏡デバイスの開発を行っている。具体的には研究代表者は 3D CAD にて設計を行い、当研究所に設置されている Objе 社 Eden350 を使用しデバイスのボディを作成し、医療で用いられている部品を組み込むことで内視鏡用のシート移植デバイスを作り上げていく。現在、空気を陰陽圧に変化させることでシートを吸着 発射のデバイスのプロトタイプは作成完了している。このタイプの改良と、新たなタイプの新規開発を平成 26 年から平成 27 年以降にかけて進めていく。

(4)治療効果の評価・デバイスの評価

コントロール群と細胞シート移植群において術後の狭窄防止の治療効果の判定は、狭窄の程度や治癒過程で評価する。狭窄の程度は、実験動物の体重減少や内視鏡画像、嚥下障害の評価として Dysphagia score (Atkinson M, et al. *J R Soc Med*, 1979. 72(12), 894-7)、標本狭窄部位の計測から粘膜狭窄率を算出して行う。さらに潰瘍の治癒過程の評価では組織標本の病理学的所見、炎症の程度の比較、移植細胞シートの免疫組織学的解析などをもって行う。デバイスの評価は、超短期的に移植時間、成功率、移植面積を計測して比較評価する。

4. 研究成果

本研究の成果は大きく二つの内容に分けられる。一つは大動物 (ミニプタ) を用いたモデルでの細胞シート移植の研究結果の報告と、その結果を POC としてヒト臨床研究の準備が進められていること。もう一つは 3D プリンターを使ってシート状治療物質の移植デバイスの開発に成功したことである。

(1) 大動物モデルでの研究系においては、自己細胞だけでなく同種細胞での移植実験と評価検討を行い、同種細胞を用いた上皮細胞シートでも人工潰瘍モデルにおいても創傷治癒効果が認められたこと。さらに食道狭窄モデルに対して内視鏡的バルーン拡張術 (EPBD) 施行部位の裂傷部位に上皮細胞シート移植により再狭窄が軽減した結果が得られたことから、この結果を英文雑誌に報告している (Kobayashi S, Kanai N, et al. *Endoscopy International Open*. 2016)。この成果に関しては平成 29 年 2 月 22 日に日経産業新聞で紹介されている。

(2) 3D プリンターを使用した細胞シート移植デバイスの開発においては、様々なタイプのモデル作成を行い、移植効率・移植時間・成功率において評価を行い、最適なバルーンタイプの移植デバイスの開発

に成功した。この結果に関して英文雑誌に報告するとともに(Maeda M, Kanai N, et al. *Gastrointestinal Endoscopy*. 2015)、多くのシンポジウム等で発表を行った。この研究で開発された細胞シート移植デバイスは、現在進行中の細胞シートを用いた食道再生治療の治験において使用されているとともに、小児の先天性食道閉鎖症術後の治療用デバイス、咽頭用デバイスなどの開発に成功し、特許を申請するとともに、ヒト臨床研究の計画が進行中である。

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 15 件)

Kobayashi S, Kanai N, Tanaka N, Maeda M, Hosoi T, Fukai F, Egushi S, Yamato M. Transplantation of epidermal cell sheets by endoscopic balloon dilatation to avoid esophageal re-strictures: initial experience in a porcine model. *Endoscopy International Open*. 2016, 04, E1116-E1123 (査読有り)

Lee Doh Young, Kim Hee-Bok, Shim In Kyoung, Kanai N, Okano T, Kwon Seong Keun. Treatment of chemically-induced oral ulcer using adipose-derived mesenchymal stem cell sheet. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2016, Epub (査読有り)

Hayakawa T, Harris I, Joung J, Kanai N, Kawamata S, Kellathur S, Koga J, Lin Yi-C, Maruyama Y, McBlane J, Nishimura T, Renner M, Ridgway A, Salmikangas P, Sakamoto N, Sato D, Sato Y, Toda Y, Umezawa A, Werner M, Wicks S, Report of the International Regulatory Forum on Human Cell Therapy and Gene Therapy Products, *Biologicals*, 2016, 44, 467-479 (査読有り)

Abe M, Kanai N, Hori K, Kawahara Y, Yamato M, Okada H. Epithelial Cells Tissue Products for Prevention of Post-ESD Complications in the Area of Pharynx. *Gastrointestinal Endoscopy*. 2016, 83(5), 578-579 (査読有り)

Eduard J, Sebastian S, Peter E, Nobuo K, Jennt E, Stephan L H, Ammar M, Teruo O, Ryo T, Takeshi O, Masakazu Y, Makoto K, Kartin M, Mei L, Masayuki Y, Magnus N, Jphan P, Pontus B, J-Matthias L. Transplantation of tissue-engineered cell sheets for stricture prevention after endoscopic submucosal dissection of the oesophagus. *United European Gastroenterology*. 2016,

e-pub (査読有り)

Maeda M, Kanai N, Yamato M, Kobayashi S, Hosoi T, Takagi R, Ohki T, Muragaki Y, Yamato M, Okano T. Endoscopic cell sheet transplantation device developed by using a 3D printer and its feasibility evaluation in a porcine model. *Gastrointestinal Endoscopy*. 2015, 82(1), 147-152 (査読有り)

Koshino K, Kanai N, Yamato M, Okano T, Yamamoto M. A novel isolated cecal pouch model for endoscopic observation in rats. *World Journal of gastroenterology*. 2015, 21(17), 5242-5249 (査読有り)

Takagi R, Kobayashi S, Yamato M, Owaki T, Kasai Y, Hosoi T, Sakai Y, Kanetaka K, Minamizato T, Minematsu A, Kondo M, Kanai N, Yamaguchi N, Nagai K, Miyazaki Y, Kohno S, Yamamoto M, Nakao K, Eguchi S, Okano T. How to prevent contamination with *Candida albicans* during the fabrication of transplantable oral mucosal epithelial cell sheets. *Regenerative therapy*. 2015, 1, 1-4 (査読有り)

金井信雄, 大和雅之、細胞シート食道再生治療:日本・欧州で治験へ、月刊細胞、2015、47 巻 8 号、374-377 (査読無し)

金井信雄、細胞シートによる食道再生治療の普及を目指して、日本気管食道学会会報、2015、66 巻 2 号、73-74 (査読無し)

金井信雄、岡野光夫、日本が発信する再生医療の実用化と展望、日本耳鼻咽喉科学会会報、2015、118 巻、171-175 (査読無し)

Kanai N, Yamato M, Okano T. Cell sheets engineering for esophageal regenerative medicine. *Annals of Translational Medicine*. 2014, 2(3), 28 (査読有り)

Kobayashi S, Kanai N, Ohki T, Takagi R, Yamaguchi N, Isomoto H, Kasai Y, Hosoi T, Nakao K, Eguchi S, Yamamoto M, Yamato M, Okano T. Prevention of esophageal strictures after endoscopic submucosal dissection. *World Journal of Gastroenterology*. 2014, 20(41), 15098-15109 (査読有り)

Ohki T, Yamato M, Ota M, Takagi R, Kondo M, Kanai N, Okano T, Yamamoto M, Application of regenerative medical technology using tissue engineered cell sheets for endoscopic submucosal dissection of esophageal neoplasms, *Digestive Endoscopy*. 2014, e-pub (査読有り)

金井信雄、大和雅之、山本雅一、岡野光夫、普及を目指した他家細胞シート移植

による食道再生医療の試み、最新医学、
2014、69 巻 3 月増刊、178-185 (査読無
し)

〔学会発表〕(計 8 件)

第 16 回日本再生医療学会総会
第 15 回日本再生医療学会総会
第 14 回日本再生医療学会総会
第 22 回日本遺伝子細胞治療学会総会
第 37 回日本炎症・再生医学会総会
第 36 回日本炎症・再生医学会総会
第 66 回日本気管食道科学会総会
第 65 回日本気管食道科学会総会
(いずれもシンポジウム)

〔図書〕(計 6 件)

金井信雄、細胞シート製品による食道再
生治療、先進医療 NAVIGATOR 今日の再生
医療、日本医学出版、2016、29-31
腰野蔵人、金井信雄、食道上皮再生シ
ート製品の開発、再生医療等製品の開発と
実用化展望、シーエムシー出版、2016、
165-166
腰野蔵人、金井信雄、自己上皮細胞シ
ート製品による食道再生治療、メディカル
サイエンスダイジェスト、ニューサイエ
ンス社、2016、73-76
金井信雄、岡野光夫、組織工学(細胞シ
ート)～細胞シート技術が切り拓く再生
医療の実用化～、日本移植学会 50 周年記
念誌、2014、297-302
金井信雄、細胞シートを利用した食道再
生治療、先進医療 NAVIGATOR (再生医
療・がん領域の実用化への TOPICS)、日
本医学出版、2014、94-96
Kanai N, Yamato M, Okano T. Principles
of Cell Sheet Technology, Regenerative
Medicine Application in Organ
Transplantation. 2014, 1, 57-66

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称：治療物質運搬デバイス、及び治療
物質運搬キット
発明者：前田真法、金井信雄、安部真、
藤井祐介、大和雅之
権利者：学校法人東京女子医科大学
種類：特許権
番号：2015-177993
出願年月日：平成 27 年 9 月 9 日
国内外の別：国内

名称：治療物質の運搬用器具
発明者：前田真法、金井信雄、小林慎一
朗、大和雅之、岡野光夫
権利者：学校法人東京女子医科大学
種類：特許権
番号：2014-046921

出願年月日：平成 26 年 3 月 10 日
国内外の別：国内

名称：シート状治療用物質搬送器具、シ
ート状治療用物質の貼付方法
発明者：田中信行、金井信雄、大和雅之、
岡野光夫
権利者：学校法人東京女子医科大学
種類：特許権
番号：WO 2014069292A1
出願年月日：平成 25 年 10 月 23 日(PCT)
国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

[http://gyoseki.twmu.ac.jp/twmhp/KgApp?k
yoinId=ymdogbybggk](http://gyoseki.twmu.ac.jp/twmhp/KgApp?kyoinId=ymdogbybggk)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井信雄 (KANAI, Nobuo)
東京女子医科大学・医学部・特任講師
研究者番号：90318056