

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09342

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の培養上清を用いた内視鏡的粘膜下層剥離術後の食道狭窄予防

研究課題名(英文) Prevention of stricture formation after endoscopic submucosal dissection using mesenchymal stem cell culture supernatant

研究代表者

小野 尚子 (Ono, Shoko)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：60431376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年の内視鏡治療技術の進歩により、食道がん患者に対して低侵襲の治療法が提供できる時代になってきた。しかしながら、内視鏡的に広範囲に切除すると、合併症として狭窄が高頻度に生じることが明らかになってきたため、新規治療法の開発がのぞまれている。本研究では、羊膜由来間葉系幹細胞の炎症抑制作用に着目し、その培養上清が食道内視鏡的粘膜下層切除術(ESD)後の狭窄に有効かどうかをブタで検討した。その結果、培養上清の経口投与によってESD後急性期の炎症を抑制することにより、線維芽細胞の活性化を抑制して狭窄を予防することが明らかとなった。引き続き、食道狭窄に対するバルーン拡張後の再狭窄の予防効果を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内視鏡で切除可能な早期食道がんについて、切除後の食道狭窄の予防が患者のQOLの維持に重要であり、新規治療法の開発がのぞまれている。本研究では、再生医療材料として注目されている羊膜由来間葉系幹細胞に着目し、その培養上清を飲むことで食道狭窄を予防できることをブタの実験で明らかにした。今後、培養上清に含まれる重要な因子を同定し、そのメカニズムについて明らかにして、臨床応用めざして準備を進めていく。

研究成果の概要(英文)：Endoscopic submucosal dissection (ESD) for esophageal cancer often causes postoperative stricture when more than three-quarters of the circumference of the esophagus is dissected. Mesenchymal stem cells are a valuable cell source in regenerative medicine, and conditioned medium (CM) obtained from mesenchymal stem cells reportedly inhibits inflammation. In this study, we evaluated whether CM could prevent esophageal stricture after ESD. In a pig model of esophageal stricture after ESD, CM gel prevented esophageal stricture formation by suppressing myofibroblast activation and fibrosis following the infiltration of neutrophils and macrophages in acute phase. Oral administration of CM gel would be a promising treatment for the prevention of post-ESD stricture. We are currently evaluating the effect of CM on the prevention of re-stricture after balloon dilation.

研究分野：消化器病学

キーワード：食道がん 内視鏡的粘膜下層剥離術 食道狭窄 間葉系幹細胞 羊膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の内視鏡診断・治療技術の進歩により、食道がんがより早期に発見され、内視鏡的に切除される症例が増加している。また、表層拡大型の食道がんの場合も広範囲に内視鏡的に一括切除が可能となり、食道がん患者に対して低侵襲の治療法が提供できる時代になってきた。しかしながら、内視鏡的に広範囲に切除すると、合併症として狭窄が高頻度に生じることが明らかになってきた。その治療法としては内視鏡的バルーン拡張術や、予防的にステロイドの局注または内服が試みられているが、十分な効果を認めておらず、食道穿孔やステロイドの副作用による重篤感染症などの有害事象も報告されているのが現状であるため、新規治療法の開発がのぞまれている。

一方、骨髄などに存在する間葉系幹細胞は再生医療材料として注目され、国内でも臨床応用が開始されている。また、その組織再生効果の機序として、細胞から分泌される種々の液性因子が重要と考えられている。しかしながら、ドナーから骨髄を採取することは侵襲をとめない倫理的にも問題がある。最近、分娩時に通常廃棄されている卵膜などの胎児付属物にも、間葉系幹細胞が豊富に含まれていることが明らかになり、この胎児付属物由来間葉系幹細胞が骨髄由来間葉系幹細胞にかわる新しい再生医療材料となる可能性がある。実際、研究分担者らはこれまでに、炎症性腸疾患モデル、放射線直腸炎モデル、膵炎モデル、肝硬変モデルに対するヒト羊膜由来間葉系幹細胞の効果を明らかにしてきた。これらの成果をもとに、クローン病や移植片対宿主病 (GVHD) を対象とした first-in-human 臨床試験の準備をすすめてきた。

そこで研究代表者および研究分担者は、羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清を使用することで、食道 ESD 後の狭窄を予防できるのではないかと考えた。実際に、申請者および研究分担者は、予備実験としてヒト羊膜由来間葉系幹細胞から培養上清ゲルを作成し、ブタ食道 ESD モデルに 1 週間経口投与したところ、3 週間後の評価では線維化抑制効果により食道狭窄が抑制されており、その効果がステロイドの局注に匹敵することが明らかになった。また、研究分担者は、培養上清に含まれるいくつかの低分子生理活性物質を同定し、解析をすすめているところである。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究ではヒト羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清を用いて、ブタ食道 ESD 後狭窄モデルに対する狭窄予防効果を詳細に検討してその機序を明らかにし、最適な投与条件を決定して臨床応用への基盤を整えることを目的とする。

3. 研究の方法

- 培養上清は、ヒト羊膜由来間葉系幹細胞をコンフルエントになるまで増殖させた後、無血清培地で 48 時間培養したものを回収して使用した。予備実験では、5%カルボキシルメチルセルロースを用いてゲル化することで治療効果を認め、ゲル化しない培養上清では効果を認めなかったことから、潰瘍部に一定時間以上停滞することが治療効果につながると予想している。
- 約 20 kg の雌性家畜ブタに対して、セボフルレンによる全身麻酔下に上部消化管内視鏡を挿入し、中部食道に長径 5 cm で亜全周性の ESD を行った。
- ESD 直後より培養上清ゲルを 4 連日経口投与する群と、週 1 回投与する群を設定した。

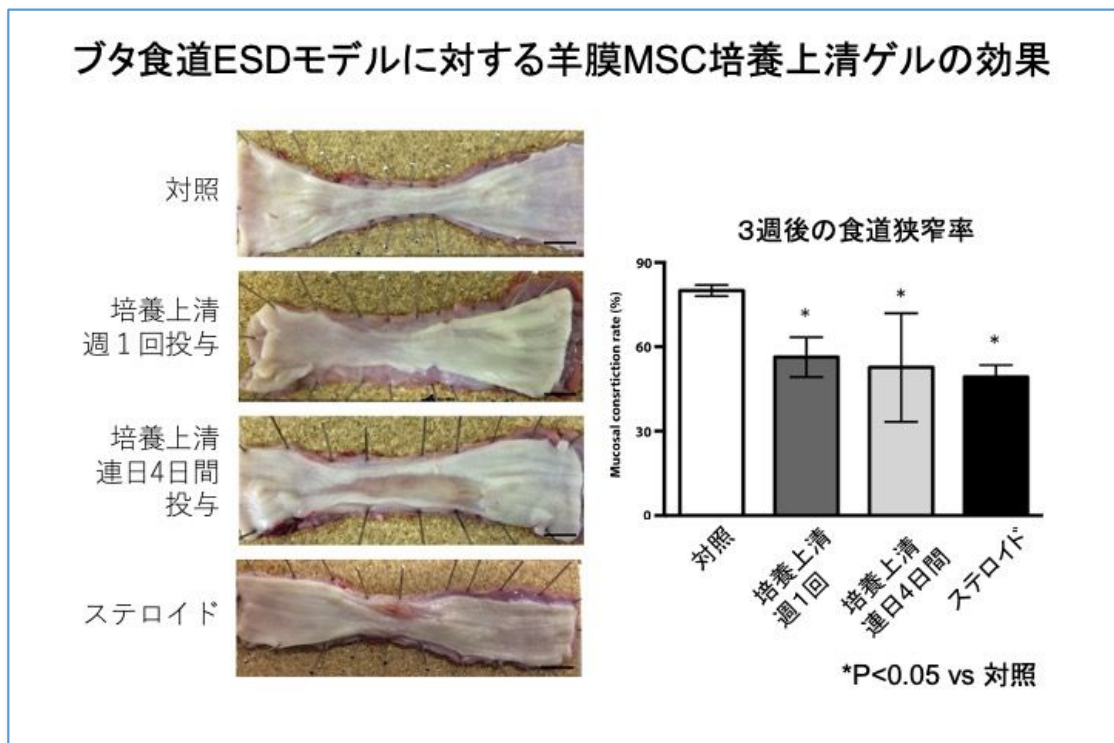
ポジティブ・コントロールとして、現在臨床の現場において狭窄予防目的で試みられているステロイドの局注を ESD 直後に行い、ネガティブ・コントロールとして無血清培地から作成したゲルを用いた。

- ESD 施行 3 週後に屠殺し、食道を抜去して狭窄率を計測した。また、食道をホルマリン固定して病理組織学的評価を行う。具体的には、HE 染色で筋層の線維の萎縮の程度を測定し、masson's trichrome 染色で線維化の範囲や厚みを測定した。また、CD107a (単球)、myeloperoxidase (好中球)、CD31 (血管密度)、 α -SMA (筋線維芽細胞)、p63 (食道上皮基底層の再生)、Ki-67 (細胞増殖) の免疫組織染色を行い、陽性細胞数や面積を画像解析ソフト (WinROOF) を用いて計測した。
- ESD 施行 1 週間後にブタを屠殺する群を設定し、潰瘍部の特に好中球や単球といった炎症細胞浸潤についての病理学的評価を行った。
- 食道全周性 ESD 後狭窄に対するバルーン拡張後の再狭窄に対する培養上清ゲルの効果の検討を試みた。

4. 研究成果

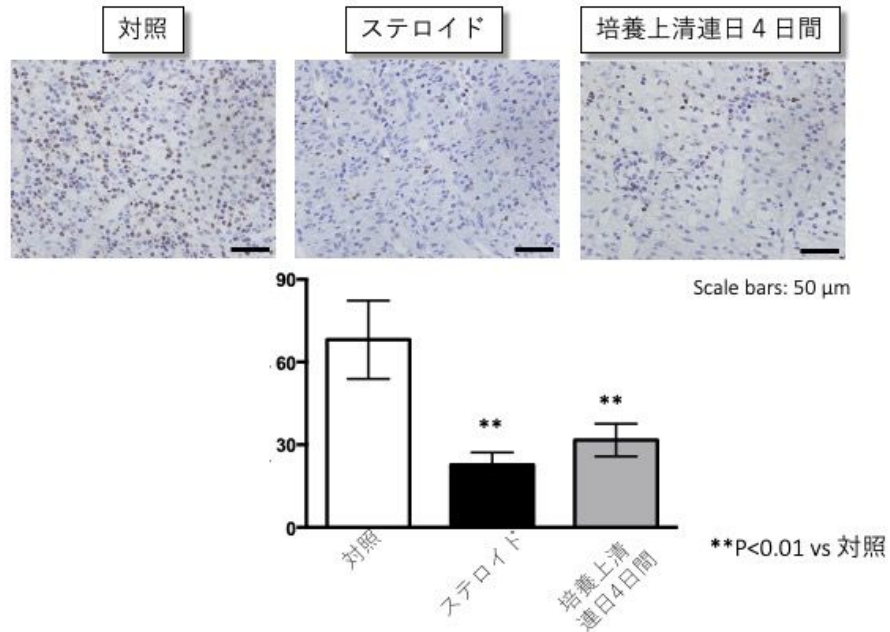
ブタ食道亜全周性 ESD 後狭窄モデルに対するヒト羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清ゲルの経口投与の効果

培養上清を週 1 回投与 (CM-W)、ESD 当日より 4 日間投与 (CM-D) した群は、コントロール群と比べて食道狭窄率が有意に改善し、ステロイド局注群と同等であった (下図)。

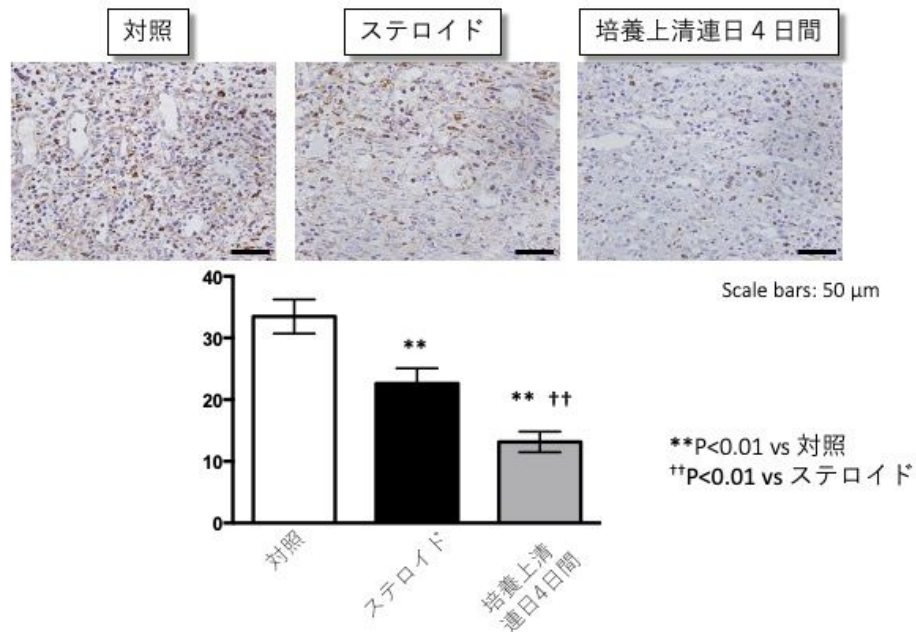


次に、ESD 後培養上清を連日投与して 1 週間後に評価する実験を行ったところ、病理学的評価において好中球ならびにマクロファージの浸潤が有意に抑制された (下図)。

好中球の浸潤（1週間後）



マクロファージの浸潤（1週間後）

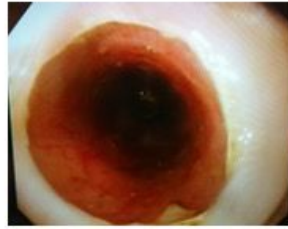


以上のことから、羊膜間葉系幹細胞の培養上清ゲルの経口投与は、食道亜全周性 ESD 後の急性期の炎症を抑制することで繊維芽細胞の活性化を抑制し、その後の狭窄を予防していると考えられた。

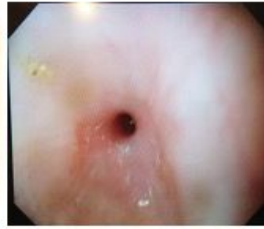
次に、食道全周性 ESD 後狭窄に対するバルーン拡張後の再狭窄に対する培養上清の効果を検討するため、全周性 ESD モデルの作成を試みた（下図）。

ブタ食道全周性ESD後狭窄に対するバルーン拡張後の再狭窄モデルの作成

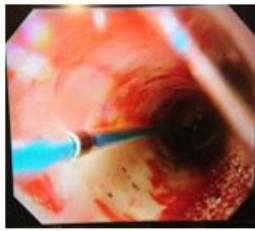
全周剥離



3週後 狭窄



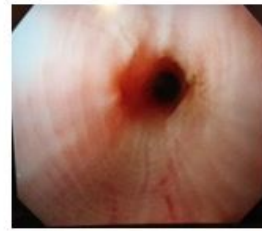
バルーン拡張



粘膜の裂創



再狭窄



安定した動物モデルの作成に成功したため、培養上清ゲルの経口投与ならびに培養上清の局注による再狭窄予防効果について引き続き検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mizushima T, Ohnishi S, Hosono H, Yamahara K, Tsuda M, Shimizu Y, Kato M, Asaka M, Sakamoto N.	4. 巻 86
2. 論文標題 Oral administration of conditioned medium obtained from mesenchymal stem cell culture prevents subsequent stricture formation after esophageal submucosal dissection in pigs.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gastrointest Endosc.	6. 最初と最後の頁 542-552
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gie.2017.01.024.	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 -

〔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	大西 俊介 (Ohnishi Shunsuke) (10443475)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	