

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K09480

研究課題名(和文) 抗線維化薬による食道狭窄の予防

研究課題名(英文) Prevention of esophageal stricture using antifibrotic drug

研究代表者

永見 康明 (Nagami, Yasuaki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：70464633

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)：ブタコレラ、COVID-19の影響でブタを用いた研究を中断し、ラットで研究を行った。食道潰瘍を酢酸を用いて作成し、潰瘍発生後3日目からビルフェニドン；PFD(500 mg/kg)を腹腔内に投与した。潰瘍は誘発後3日に最大化し、9日目にはほぼ癒痕化し、狭窄が見られた。PFDは潰瘍の治癒を促進し、粘膜下層の線維化を減弱させ、食道狭窄を予防した。また、PFDは6日目のNLRP3インフラマソームと線維化関連分子の上昇を抑制した。

PFDは、NLRP3インフラマソームにより産生されるIL-1 や線維化関連分子の発現抑制を介して、食道潰瘍の治癒を促進し、狭窄形成を抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌に対する内視鏡切除後に狭窄を生じることがあり、食事摂取が難しくなるため問題とされます。この狭窄の予防治療についてビルフェニドンという抗線維化薬の効果を明らかにしました。ブタでの実験が困難となったため、ラットを使用して、ビルフェニドンが抗線維化作用を示して、狭窄を予防することを明らかにしました。今後、さらに大型の動物や人への応用について検討していく必要があると考えますが、新たな狭窄予防薬の開発は内視鏡切除後だけではなく、その他の原因によって生じる食道狭窄や、その他の消化管狭窄の予防にも役立つものと考えています。

研究成果の概要(英文)：Esophageal ulcers were induced in rats via the local application of acetic acid in the serosa. PFD was intraperitoneally administered to the rats 3 days after ulcer induction.

The ulcers fully developed 3 days after induction and were almost scarred by day 9 with severe strictures. PFD promoted ulcer healing and attenuated fibrotic collagen in the submucosa by suppressing the increase in NLRP3, cleaved caspase-1, and mature IL-1 expression, improving stricture rate (PFD vs vehicle = 55% vs 81%). The NLRP3 inflammasome promotes esophageal stricture formation following ulcer healing, and PFD exerts potential prophylactic activity against strictures, possibly via the inhibition of the NLRP3/IL-1 /TGF-1 axis.

研究分野：消化器内科

キーワード：食道狭窄 ビルフェニドン

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

早期食道癌に対する内視鏡下粘膜下層剥離術後の狭窄

・食道癌は進行すると予後不良であるが、早期に治療できれば良好な予後が得られる。早期の食道癌に対しては、内視鏡下粘膜下層剥離術(Endoscopic submucosal dissection;以下ESD)が大きさに関わらずに癌を取り残すことなく一括切除できるために、再発が少なく、安全な治療として広く普及している(Ono, et al. J Gastrointest endoscopy 2009, Nagami, et al. Endosc Int Open, 2014)。しかし、その切除が3/4周を超える広範囲に及んだ際には、高頻度に食道狭窄をきたす(Ono S, et al. Endoscopy, 2009)。

・食道狭窄は食事摂取が困難となり、複数回の内視鏡的拡張術が必要となり、患者、医療者の負担の増加や医療経済の点で問題とされている。この食道狭窄の予防治療として様々な方法が検討されているが、ステロイドの局所注射療法はESD後1回の注射で、偶発症も少なく狭窄率を減少させるとされ、我々も報告をしてきた(Nagami, et al. Surg Endosc, 2015. Hanaoka, et al. Endoscopy, 2012)。

・しかし、ステロイドの局所注射療法でも狭窄を予防できない症例も存在し、病変周在性が3/4周を超えるもの、切除後周在性が5/6周以上に及ぶ場合がそのリスクとされる(Hanaoka, et al. Endosc Int Open, 2016、永見康明、第97回日本消化器内視鏡学会近畿地方会)。さらに切除後周在性が全周に及ぶ場合では、そのほかのステロイドの内服を含めた予防的治療でもほぼ全例で狭窄を生じ、課題とされている(Miwata, et al. Surg Endosc 2016)。

食道狭窄の機序

・ESD後狭窄の機序としては、ESD後潰瘍の創傷治癒に伴う過度な線維化による(Nonaka K, et al. BMC Gastroenterol. 2013)。創傷治癒の過程では組織に線維芽細胞が増殖し、その後、収縮作用の強い筋線維芽細胞へと分化し、創部の収縮が起こり、上皮化が惹起され、創傷治癒が完成する。Transforming Growth Factor- (以下TGF-)は線維芽細胞から筋線維芽細胞への形質転換を促進する増殖因子であり、線維化をきたす病態下では局所での産生増加が知られており、線維化の原因の一つとして重要である。線維化をきたす病態下で局所の肥満細胞が増加し、肥満細胞からTGF- が産生されることを我々は報告してきた(末包剛久等 IBD Research. 2013)

線維化に対する治療

・近年、特発性肺線維症に対する治療として抗線維化薬ピルフェニドンが有効とされ、線維化形成に關与する増殖因子であるTGF-、線維芽細胞、筋線維芽細胞への分化を促すb-FGF、血小板由来増殖因子(PDGF)などのサイトカインを抑制することで線維化を抑制する(Noble P, et al. Lancet. 2011)。ピルフェニドンはステロイドと異なり正常な線維化は抑えず、可能な線維化のみを抑制する(Shimizu T, et al. Kidney Int. 1998)。

・同薬は、皮膚科領域での癬痕拘縮、ケロイドの予防や緑内障における線維化予防に対して有効であることが報告されている(Armendariz-B J, et al. Ann Plastic Surg. 2012)。

・また、ラットのNaOHによる食道熱傷モデルにおいて、コントロール群と比べてピルフェニドン投与群では優位に狭窄を予防することが確認された(Orozco-Perez J, et al. J Surg Res 2015)。

2. 研究の目的

我々はピルフェニドン(Pirfenidone)が食道 ESD 後の食道狭窄を予防するとの仮説、さらには TGF- β など線維化増殖因子であるサイトカインの産生抑制を介して、食道 ESD 後潰瘍部位で線維芽細胞から筋線維芽細胞への形質転換を減少させ狭窄を予防するのではないかと仮説のもと、ESD 後食道狭窄の病態を明らかにし、その予防治療の開発を行うため以下の実験を計画した。

3. 研究の方法

ブタを用いた研究

SPFの家畜ブタ(LWD種)、雌性、35-40 kg(3-4か月齢)を使用。第1日目に胸部食道に内視鏡的に5 cm長、全周性の内視鏡的粘膜下層剥離術(以下、ESD)を施行した。麻酔導入にはミダゾラム0.8 mg/kg、メドミジンの混合液を筋肉注射し、気管挿管を行った後、イソフルラン3%で維持麻酔を行った。Pirfenidoneは非常に刺激が強く、苦みの強い薬であり、甘味の強いゼリー内にPirfenidoneを粉砕し混ぜ、摂取することで内服が可能となった。予備実験として2頭にPirfenidone 800 mg/日を朝夕2回に分け内服させた。全周性のESDを施行し、第8、15日目に、ESD創部の口側から4検体の組織を採取した。第15日目に、安楽死させ、食道を採取し実測により狭窄率を算出した。組織学的評価のため4%ホルマリンに48時間浸漬しパラフィン包埋を行った後にHE染色とMasson trichrome染色を施行した。半分は分子生物学的評価のため細片化し-80℃で冷凍保存した。既報とのマクロ所見の比較で効果が不十分と考え、本実験をPirfenidone 1200 mg/日を朝夕2回で投与する方針とした。

続いて、本実験を開始した。4頭にPirfenidone 1200 mg/日を内服させ、コントロール群とした2頭にPirfenidoneを含まないゼリーのみを同量摂取させ、上記予備実験と同様の手順で施行した。

ラットを用いた研究

豚コレラの流行で一時ブタの使用禁止、その後のCOVID19の流行により人的不足も一因となり、大動物を使用した実験を一旦中断し、ラットの食道狭窄モデルにおけるPirfenidoneによる狭窄予防効果を示す実験を行うことに切り替えた。ラットモデルの利点は条件検討が比較的容易で、より分子生物学的な検討に重きを置くことである。その理由はこれまでin vivoでの食道線維化のメカニズムを検討した報告が少なく、食道線維化のメカニズムを解明の重要性を認識したことによる。

ラットの食道潰瘍は、第0日目にイソフルラン2%での維持麻酔下を行い、開腹の上、既存の方法に改良を加え、先端が楕円形のポリエチレンチューブを用いて漿膜に酢酸を3分間局所的に接触させて誘発した。潰瘍発生後3日目からPirfenidone(500 mg/kg)を1日1回腹腔内に投与した。潰瘍治癒後の食道狭窄に対するPirfenidoneの効果は、9日目に食道造影により評価した。Caspase-1および成熟型IL-1 β の蛋白質量をウェスタンブロッティングで評価した。食道の線維化はMasson trichrome染色で病理学的に評価した。

4. 研究成果

ブタを用いた研究

主な評価項目である肉眼的な狭窄率はControl群で61.1%、Pirfenidone 800 mg/日群で67.8%、Pirfenidone 1200 mg/日で58.1%であり、有意差は認めなかった。さらに、RT-PCR法によりTGF β 1、TNF α 、IL1 β 、IL6、IL13、CTGF、EGF、VEGF、Fibronectin1、SMA、Collagen1のmRNA定

量を行ったが、PirfenidoneによるこれらのmRNAを低下させることを示す有意な変化はなかった。つまり、ブタにおける今回の実験の条件ではPirfenidoneの狭窄予防の効果を明らかにすることができなかった。しかし、本実験ではブタのESD後潰瘍は第14日目において、病理所見とmRNAのダイナミズムから治癒過程であることが明らかになり、さらにPirfenidoneで低下させるとされるmRNAが有意な低下を示さず、今後Pirfenidoneの用量の条件検討が必要と考えた。

ここまでの成果を2020年の国際学会と国内学会で発表した。

ラットを用いた研究

潰瘍は誘発後3日に最大化し、9日目にほぼ癒痕化し、重度の狭窄が見られた。Pirfenidoneは潰瘍の治癒を促進し、粘膜下層の線維化を減弱させ、食道狭窄を予防した。また、Pirfenidoneは6日目のNLRP3インフラマソームと線維化関連分子の上昇を抑制した。IL-1の投与で、Pirfenidoneの潰瘍治癒と狭窄形成に対する治療効果が消失した。さらに、NLRP3阻害剤およびCaspase-1阻害剤は、Pirfenidoneの効果と同様に、creaved caspase-1と成熟IL-1タンパク質および線維化関連分子の増加を抑制することが示された。

以上の結果からPirfenidoneは、NLRP3インフラマソームにより産生されるIL-1や線維化関連分子の発現抑制を介して、食道潰瘍の治癒を促進し、狭窄形成を抑制することが明らかとなった。本研究の成果は食道狭窄の予防薬として有力な候補薬となる可能性があり、今後の本研究分野の発展に寄与し得る成果であると考えられる。

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 Hirano S, Higashimori A, Nagami Y, Nadatani Y, Tanigawa T, Ominami M, Fukunaga S, Otani K, Hosomi S, Tanaka F, Kamata N, Taira K, Watanabe T, Fujiwara Y.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Pirfenidone prevents esophageal stricture by inhibiting nucleotide binding oligomerization domain like receptor protein 3 inflammasome activation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jgh.15861.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平野慎二、東森啓、永見康明、灘谷祐二、大谷恒史、渡辺俊雄、藤原靖弘
2. 発表標題 食道潰瘍治癒及び癒痕狭窄に対するNLRP3インフラマソームを介したピルフェニドンの効果
3. 学会等名 GIweek2022（潰瘍学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinji Hirano, Yasuaki Nagami, Taishi Sakai, Yuki Kakiya, Kojiro Tanoue, Kappei Hayashi, Masafumi Yamamura, Akinari Sawada, Hirotsugu Maruyama, Masaki Ominami, Shusei Fukunaga, Yuji Nadatani, Koji Otani, Shuhei Hosomi, Fumio Tanaka, Noriko Kamata, Koichi Taira, Tetsuya Tanigawa, Toshio Watanabe and Yasuhiro Fujiwara
2. 発表標題 The effect of Pirfenidone for esophageal stricture after circumferential esophageal endoscopic submucosal dissection in a porcine model
3. 学会等名 第99回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Shinji Hirano, Yasuaki Nagami, Taishi Sakai, Yuki Kakiya, Kojiro Tanoue, Kappei Hayashi, Masafumi Yamamura, Akinari Sawada, Hirotsugu Maruyama, Masaki Ominami, Shusei Fukunaga, Yuji Nadatani, Koji Otani, Shuhei Hosomi, Fumio Tanaka, Noriko Kamata, Koichi Taira, Tetsuya Tanigawa, Toshio Watanabe and Yasuhiro Fujiwara
2. 発表標題 THE EFFECT OF PIRFENIDONE FOR ESOPHAGEAL STRICTURE AFTER CIRCUMFERENTIAL ESOPHAGEAL ENDOSCOPIC SUBMUCOSAL DISSECTION IN A PORCINE MODEL
3. 学会等名 DDW2020（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021年

〔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
---------	---------