

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号： 32653
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2009～2011
 課題番号： 21591735
 研究課題名（和文） 経内視鏡的細胞シート移植術の大腸ESD（内視鏡的粘膜下層剥離術）への応用
 研究課題名（英文） Application of endoscopic cell sheet transplantation for colorectal ESD
 研究代表者
 大木 岳志（OHKI TAKESHI）
 東京女子医科大学・医学部・助教
 研究者番号： 90307562

研究成果の概要（和文）：食道ESD後の狭窄抑制を目的とした口腔粘膜上皮細胞シートによる再生医療的治療の経験に基づき、大腸ESDへの応用に向けて基礎実験を行った。ミニブタを用いて大腸ESDモデルを作製し移植を試みた。当初、ブタ線維芽細胞シートの作製を行ったが、培養不安定なためヒト口腔粘膜上皮細胞シートを使用した。本実験系は異種移植であったものの短時間であれば移植は可能で、大腸でも細胞シートの移植が可能であることが判明した。本法は穿孔の修復やリスクを回避できる可能性があるため引き続き研究を推し進める必要がある。

研究成果の概要（英文）:Based on clinical research of regenerative medical treatments using human oral mucosal epithelial cell sheets to prevent constriction after esophageal ESD, I conducted basic experiments on miniature pigs whereby cell sheets were applied to ulcerations caused by colorectal ESD. I conducted colorectal ESD on a miniature pig, followed by engraftment using fibroblast cell sheets. However, the isolated cells of the pig grew unstably. Therefore I decided to use oral mucosal cell sheets instead. The results of our study show that colorectal cell sheet transplantation is a good short-term treatment. It is possible that perforations can be repaired with cell sheets, decreasing the risk of complications. However, this possibility requires further study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：移植・再生医療・細胞シート工学・大腸癌・内視鏡外科

1. 研究開始当初の背景

根治的治療を可能にし、ドナー不足に悩む臓器移植を代替する先端的な医療として、近年、再生医療に大きな期待が寄せられている。東京女子医科大学先端生命医学研究所の岡野らは、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

医療技術として大きな注目を集めている（Nature, 424, p884-886, 2003）。岡野らの開発した温度応答性培養皿表面には、温度応答性高分子として知られるポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）が共有結合的に固定化されており、37℃では種々の細胞が接着・増殖する。温度を室温程度に下げると表面が親水

性化して、トリのタンパク質分要とすることなが脱着し、シート状に回収することができる。この非侵襲的な培養細胞の脱着・回収において、細胞が培養の間に合成・分泌・沈着した細胞外マトリックスも、細胞シートの底面に保持されたまま回収される。すなわち、底面に糊のごとく機能する細胞外マトリックスをもつ細胞シートを得ることが可能となる。



プシンなど分解酵素を必要とすることなく培養細胞ト状に回収することができる。この非侵襲的な培養細胞の脱着・回収において、細胞が培養の間に合成・分泌・沈着した細胞外マトリックスも、細胞シートの底面に保持されたまま回収される。すなわち、底面に糊のごとく機能する細胞外マトリックスをもつ細胞シートを得ることが可能となる。

細胞シート工学を応用して食道 ESD 後に問題となる潰瘍瘢痕による狭窄に対して、食道と同様の重層扁平上皮からなる口腔粘膜組織を細胞ソースとして培養口腔粘膜上皮細胞シートを作製し、それを ESD 後の食道潰瘍面に移植するという治療法を開発した (Ohki T., 55, p1704-1710, Gut, 2006)。さらにこの治療法を用いた臨床研究を現在開始している。この臨床研究の中で、細胞シート移植された患者は、通常の食道 ESD と違い発熱や疼痛が少なく、細胞シートによるシール効果が示唆された。一方、本学呼吸器外科の神崎らは動物実験において皮下組織由来の線維芽細胞シートを気瘻部位へ移植しシール効果を示している (Kanzaki M, Eur J Cardiothorac Surg, 34, p864-869, 2008)。そこで大腸 ESD においても細胞シート移植によるシール効果により術中穿孔の修復や遅延性穿孔のリスクを回避できるのではないかと着想に至った。

2. 研究の目的

食道 ESD において ESD 後潰瘍の狭窄抑制効果を目的とした口腔粘膜上皮細胞シートの経内視鏡的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、新たに細胞シート移植 (口腔粘膜上皮細胞シートと線維芽細胞シート) を大腸 ESD へ応用することで、術中穿孔の修復や遅延性穿孔のリスクを回避できるのではないかと仮説を立て、大腸 ESD に対する細胞シート治療の有用性を、大形実験動物を用いて検証する。

3. 研究の方法

(1) ESD による大腸潰瘍モデルの作製

ミニブタ (メス・NIBS 系) を使用。実臨床と同様の方法と機材で直腸の内視鏡的粘膜下層剥離術 (endoscopic submucosal dissection: ESD) を行う。

(2) 培養口腔粘膜上皮細胞シートの作製と大腸 ESD 後人工潰瘍面に対する経内視鏡的移植術手技の開発

全身麻酔下にブタの口腔粘膜組織を紡錘状に切除する。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。温度応答性高分子であるポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) が培養皿表面に培養皿を使用する。

(3) ブタ線維芽細胞シートの作製

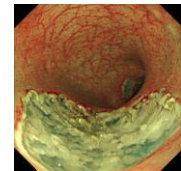
神崎らの培養法に準じ、ブタ皮下組織を用いて explant 法で細胞を継代し、温度応答性培養皿で培養を行う。

(4) 直腸 ESD 後潰瘍ヒト培養上皮細胞シート移植の feasibility study

培養系の安定したヒト培養上皮を用いてミニブタの直腸 ESD 潰瘍へ経内視鏡的に移植。移植当日、標本を摘出し移植部位の組織を得る。HE 染色で細胞シートの有無を検査する。

4. 研究成果

(1) フックナイフ® (KD-620LR, オリンパス) と粘膜下局注は、インジコカルミンを混入したグリセロールを局注針で注入する。全周切開の後、粘膜下層を剥離することで、人工潰瘍を作製することが可能であった。ブタモデルでの大腸 ESD の feasibility を確認した。



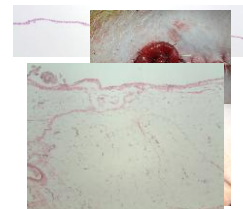
(2) ブタ口腔粘膜上皮細胞シートの作製は可能だが、個体により細胞シートとして回収できないことがあり、培養方法の最適化を行う必要があった。そこで培養液の内容および細胞播種数等を調整したり、温度応答性培養皿のポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) の含有量を変えたりすることで、内視鏡的な移植にも使用可能なブタ培養口腔粘膜上皮細胞シートを作製する実験を行った。比較的安定した細胞シートを作製することが可能となった。(別の実験系で私用している。)

(3) 神崎らの培養法に準じ、線維芽細胞シート作製を試みたが、ミニブタでの線維芽細胞の増殖が不良 (右上の写真) であった。そのため次の移植実験を行うに辺り培養系の確立したヒト培養口腔粘膜上皮細胞シート (右下の写真) を用いて移植を行うことに至った。



(4) 大形動物では前処置

(下剤) 投与が困難なため、人工肛門を S 状結腸に作製し、直腸 EMR/ESD を行った人工潰瘍部位にヒト培養口腔粘膜上皮細胞シートの移植を行った。短時間での評価では移植部位に HE 染色で細胞シートの移植を確認した。本実験では異種移植のため、長



期では拒絶反応が懸念されるが、短時間であれば移植は可能であることが示唆された。本研究により食道だけでなく組織の異なる（扁平上皮と円柱上皮）大腸粘膜であっても、細胞シートの移植が可能であることが判明した。

本法は穿孔の修復やリスクを回避できる可能性があるため引き続き研究を推し進める必要がある。

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 12 件）

- ①大木岳志, 大和雅之, 太田正穂, (他 5 名, 1 番目), 食道 ESD 後の培養細胞シートの現状, 消化器内視鏡, 37 巻, 110-113, 2012, 査読無
- ②大木岳志, 大和雅之, 岡野光夫, (他 1 名, 1 番目), 食道内視鏡治療のための食道上皮の再生医療食道 ESD のための再生医療, Medical Science Digest, 37 巻, 323-326, 2011, 査読無
- ③大木岳志, 大和雅之, 太田正穂, (他 6 名, 1 番目), 細胞シートを用いた食道再生, Journal of Gastrointestinal Research, 19 巻, 541-546, 2011, 査読無
- ④Takeshi Ohki, Masayuki Yamamoto, Masaho Ota, (他 2 名, 1 番目), “Application of cell sheet technology for esophageal endoscopic submucosal dissection”, Techniques in Gastrointestinal Endoscopy, Vol13, 105-109, 2011, 査読無
- ⑤大木岳志, 大和雅之, 太田正穂, (他 3 名, 1 番目), 食道再生医療の現状と未来展望, 日本医工学治療学会機関誌, 22 巻, 199-203, 2010, 査読無
- ⑥大木岳志, 大和雅之, 岡野光夫, (他 1 名, 1 番目), ナノテクノロジーを活用した細胞シート工学の臨床応用, Surgery Frontier, 117 巻, 119-123, 2010, 査読無
- ⑦大木岳志, 大和雅之, 太田正穂, (他 3 名, 1 番目), 食道再生医療の最前線, 医学のあゆみ, 233 巻, 613-616, 2010, 査読無
- ⑧大木岳志, 大和雅之, 太田正穂, (他 3 名, 1 番目), 食道領域の再生医療, 日本気管食道科学会「専門医通信」, 39 巻, 1-5, 2009, 査読無
- ⑨大木岳志, 大和雅之, 岡野光夫, (他 1 名, 1 番目), “幹細胞を用いた再生医療で ESD 後の食道狭窄を防ぐ”, 分子消化器病, 6 巻, 347-352, 2009, 査読無
- ⑩大木岳志, 大和雅之, 岡野光夫, (他 1 名, 1 番目), 食道上皮の再生医療, Surgery Frontier, 16 巻, 295-302, 2009, 査読無
- ⑪大木岳志, 食道の再生治療, 治療学, 43 巻,

641-645, 2008, 査読無

- ⑫大木岳志, 大和雅之, 村上大輔, (他 8 名, 1 番目), 食道 ESD へ応用する再生医療-臨床応用へ向けて-, 東京女子医科大学雑誌, 79 巻, 113-116, 2009, 査読無

〔学会発表〕（計 14 件）

- ①大木岳志, 直腸カルチノイドの EMR 後垂直断端陽性症例に対し ESD を施行した 2 例, 第 73 回日本臨床外科学会, 2011.11.17, 京王プラザホテル (東京都)
- ②Takeshi Ohki, Two Cases of Salvage ESD after EMR of a Rectal Carcinoid, he International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists, 2011.11.12, 京王プラザホテル (東京都)
- ③ Takeshi Ohki, Prevention of postoperative stricture after esophageal endoscopic submucosal dissection by transplantation of autologous human oral mucosal epithelial cell sheets, United European Gastroenterology Week, 2011.10.25, Stockholm (スウェーデン)
- ④大木岳志, 食道 ESD 後狭窄抑制のための細胞シート移植の実際, 第 81 回日本消化器内視鏡学会総会, 2011.8.17, 名古屋国際会議場 (名古屋)
- ⑤大木岳志, 細胞シート工学技術による食道再生医療の臨床研究, 第 66 回日本消化器外科学会総会, 2011.7.13, 名古屋国際会議場 (名古屋)
- ⑥ Takeshi Ohki, Esophageal Endoscopic Submucosal Dissection and Cell Sheet Technology for Treatment of Early Esophageal Carcinoma, 2011 Utah-Inha Joint Symposium and Inha Nano-Clinic Symposium (招待講演), 2011.06.11, Inchen (韓国)
- ⑦大木岳志, 細胞シート工学を用いた食道癌内視鏡治療の臨床応用, 第 27 回日本 DDS 学会学術集会 (招待講演), 2011.6.9, 東京大学本郷キャンパス (東京都)
- ⑧大木岳志, 食道 ESD へ応用する細胞シートを用いた再生医療, 日本癌治療学会, 2010.10.30, 国際会議場 (京都)
- ⑨大木岳志, 細胞シート工学を用いた食道 ESD への先進的アプローチ, 日本癌学会, 2010.9.27, リーガロイヤル (大阪)
- ⑩大木岳志, Cell Sheet Technology Applied to Esophageal ESD, 日本消化器内視鏡学会, 2010.5.13, 高輪プリンス (東京)
- ⑪ 大木岳志, Advances in Cell Sheet Technology to Prevent Post-esophageal ESD Stenosis: Clinical Research Results, Digestive disease week, 2010.5.3, シカゴ (米国)

⑫大木岳志，食道再生医療の現状と未来展望，日本医工学治療学会，2010.4.1，都市センター（東京）

⑬大木岳志，当科における食道ESDの偶発症に対する予防と対策～細胞シート移植を含めて～，日本消化器内視鏡学会，2009.11.12，京都

⑭大木岳志，口腔粘膜上皮細胞シート移植術による食道再生医療の臨床応用，日本消化器外科学会，2009.7.16，大阪

〔図書〕（計1件）

①大木岳志，ドラッグデリバリーシステムの新展開Ⅱ（分担），シーエムシー出版，255-259，2012

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・医学部・助教
研究者番号：90307562

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし