

令和元年6月11日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09284

研究課題名(和文) 食道癌の広範囲内視鏡的粘膜層剥離術を可能とする高密度コラーゲン治療デバイスの開発

研究課題名(英文) Establishment of the collagen patch device against for lethal stricture following endoscopic circumferential submucosal dissection of the esophagus

研究代表者

青木 茂久 (Aoki, Shigehisa)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：10448441

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)：早期食道癌患者に対して実施される内視鏡的粘膜剥離術(ESD)では、従来の外科的食道摘出術と比較して劇的に患者への侵襲性を軽減したが、術後合併症として強固な食道狭窄が生じるため、切除面積は限定されており予防法も現在確立されていない。本研究課題では、アテロコラーゲンヒドロゲル薄膜を利用した絆創膏型人工皮膚の開発経験をヒントに、ESDでの粘膜剥離部に貼付することで、術後の食道狭窄を抑制する新デバイスを着想し、動物実験によりその治療効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早期食道癌患者に対して実施される内視鏡的粘膜剥離術(ESD)では、従来の外科的食道摘出術と比較して劇的に患者への侵襲性を軽減したが、術後合併症として強固な食道狭窄が生じるため、切除面積は限定されており予防法も現在確立されていない。本研究課題で完成させた食道粘膜再生用高密度コラーゲンデバイスはESD後の食道狭窄を予防し食道癌ESDの適応範囲を拡大するものであり、患者QOLの拡大と医療費の削減が期待される。

研究成果の概要(英文)：Extensive excision of the esophageal mucosa by endoscopic submucosal dissection (ESD) frequently evokes a luminal stricture. This study aimed to determine the efficacy of a collagen vitrigel patch (CVP) for the prevention of esophageal stricture in extensive ESD. Animals underwent circumferential esophageal ESD under general anesthesia. In CVP treatment group, artificial ulcers were covered by two CVPs. The control group underwent circumferential ESD only. The CVP-treated group showed significantly better patency rates on both the oral and anal sides of the wound area compared with the control group at day 14. The mucosal re-epithelization ratio was significantly promoted, and the extents of mucosal inflammation and fibrosis were significantly decreased by CVP treatment in the wound area. The frequency of α -smooth muscle actin-positive cells was significantly reduced in the CVP-treated group compared with the control group.

研究分野：実験病理学

キーワード：食道癌 内視鏡的粘膜剥離術 筋線維芽細胞 線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在の ESD による広範囲粘膜切除後の食道狭窄に対する研究では、食道ステント留置やバルーン拡張、ステロイドの内服や局所注入が行われている(Yamaguchi et al. Gastrointest Endosc. 2011)。ステントは留置後の不快感や逸脱、抜去時の食道損傷が問題となる。ステロイドもある程度の抑制効果はあるが、局所注入の効果は一時的で、長期内服による感染リスクの増大もあり一般化していない。動物実験では徐放化した免疫抑制剤や抗癌剤の注入も試みられているが、ステロイド同様に感染リスクの増大と正常組織に対する傷害から実用化されていない。近年では細胞シート移植が注目されており、食道 ESD 部への口腔粘膜上皮を用いた細胞シートの移植が行われ治療効果が確認された。一方、この細胞シートの作製には 医薬品 GMP に準拠した細胞調整センターの必要性、高額な細胞シート作製費用、口腔粘膜切除による非病変部への侵襲などがあり、汎用化は困難な状況である。今回、食道と皮膚における組織構築および癒痕狭窄発症機序の共通性に着目し、内視鏡的に粘膜切除部に貼付するだけで食道狭窄を予防し、上皮化を促進する新デバイスの開発を着想した。

2. 研究の目的

本研究では高度食道狭窄を発症する広範囲食道粘膜 ESD 処置を行ったブタモデルを用い、貼付型食道狭窄防止デバイスの効果とその作用機序を解明する。

- 1) 広範囲食道粘膜切除後の食道狭窄を予防する最適なデバイス形状を確立する。
- 2) 上記 1 の狭窄抑制機序を分子生物学的に解明する。その作用機序を基に、効果増強を期待できる薬剤を含有させた改良型デバイスを作製し、その有効性を検証する
- 3) 上記 2 の作用機序を基に、効果増強が期待できる薬剤を付与した改良型デバイスを作製し、その有効性を検証する。

従来法と比較した本研究の利点は以下の通りである。

革新的な素材：低密度のコラーゲン線維にガラス化処理を加えることで得られるコラーゲンビトリゲルは、生体内の結合組織に匹敵する高密度コラーゲン線維の新素材である。さらにコラーゲンビトリゲルには様々な薬剤等を付加することが可能であり、機能的細胞外マトリックスとしての使用が可能である。現在、我々は生体適合性に優れるブタ由来のアテロコラーゲンを原料としたコラーゲンビトリゲル薄膜を完成させ、皮膚・角膜・気管・軟骨・鼓膜での再生医療における実用化研究を進行している。また、アテロコラーゲンは抗原性を示すテロペプチドが除かれている。また、ブタ由来原料はウシと異なり反芻動物基準の適応外であり、医療機器としての製品化への障壁は低い。

高い汎用性：本デバイスは、ステロイドや免疫抑制剤の注入と異なり、感染のリスク上昇がない。細胞シート移植とは異なり、生細胞は使用しておらず、侵襲的な口腔粘膜切除や細胞調整センターは不要であり、一般施設での実施が可能である。症例当たりの医療費は食道ステント治療や細胞シート移植と比較して圧倒的に安価であり医療費の面でも有利である。

3. 研究の方法

コラーゲンビトリゲルを用いた貼付型食道狭窄防止デバイス作製

再生医療用ブタアテロコラーゲンをを用いて、申請者らは皮膚、角膜、気管、関節軟骨それぞれの再生医療領域に最適化したコラーゲンビトリゲル膜を作製してきた。角膜再生用コ

ラーゲンビトリゲルは曲面構造を再現しており、その他、糸状、管状への加工も可能である。

平成 28 年度では貼付型の食道狭窄防止デバイスとして最適な治療効果を発揮する 製品形状（平膜状、円筒状など） 製品品質（コラーゲン量）を決定する。また、必要に応じて 至適デバイス強度（コラーゲン線維間の架橋追加）を検討する。同時に内視鏡操作を容易にする 内視鏡把持構造と、粘膜切除部とデバイスを簡便かつ強固に貼付可能な 固定構造を検討し、治療デバイスとして最適な製品形状を決定する。前臨床試験にむけて、試作品は全て滅菌処理を行う。

ESD によるブタ食道粘膜全周性欠損作製、貼付型食道狭窄防止デバイス貼付治療、内視鏡的評価

解剖学的にヒトに近いブタの食道もヒトと同様、食道粘膜を全周性に切除した場合、術後に高度の食道狭窄が生じる。この特性により、内視鏡の実技トレーニングや実験モデルとして汎用されている。

食道粘膜全周欠損モデル：本研究では上記実験モデルに準じて、ブタ（LWD 系、雌、体重 30-35 kg）の食道中部粘膜に、長軸方向 4 cm に渡る全周性の粘膜剥離を上部消化管内視鏡を用いて作製する。粘膜下層に生理食塩水で希釈したヒアルロン酸ナトリウムを局注し、十分に筋層との距離を確保した後、内視鏡治療用の電気メスを用いて食道粘膜を切開する。粘膜下層が露出したら、直接粘膜下層を視認しながら粘膜下層の剥離を行い、仮想病変の切除を行う。切除後の人工潰瘍は約 2 週間で完全に狭窄し食物の通過障害をきたす。

デバイス貼付・固定法：上部消化管内視鏡を用いて粘膜切除部に狭窄防止デバイスを貼付する。貼付したデバイスはクリップを用いて周囲正常粘膜と固定する。この際、デバイス形状の違いによる食道内腔の通過性、貼り付けの際の操作性、固定方法の違いによる貼付性を評価する。

術後観察：食道狭窄防止デバイス治療後 1 日、3 日、7 日目に内視鏡下で粘膜切除面における粘膜切除部の状態、貼付デバイスの変化、内腔の狭窄程度を評価する。術後 14 日目には内視鏡下に観察後に当該動物の安楽死を行い、食道を含めた周囲臓器を摘出する。

ESD 後食道粘膜欠損部に対する貼付型食道狭窄防止デバイスの生理活性解析

上皮欠損に伴う再生組織では筋線維芽細胞が出現し、創部の収縮と細胞外器質のリモデリングを行う。この再生過程での筋線維芽細胞も過剰な増殖は、創部に肥厚性癒痕や病的過剰収縮を来す。この癒痕形成には様々なサイトカインが関与しており、食道においても TGF- β などのサイトカインの影響が明らかにされている。

摘出臓器から得られた病理標本を用いて、デバイス貼付による治療効果を組織学的に解析する。粘膜欠損部の上皮化の程度、粘膜固有層から筋層にかけての筋線維芽細胞の出現頻度、線維化や炎症の程度を、治療を行わず狭窄を来した対照組織と HE 染色、特殊染色、免疫染色を用いて比較検討する。特に狭窄の主体となる筋線維芽細胞の動態と線維化関連因子への免疫染色を用い、詳細な組織学的解析を行う。

4 . 研究成果

CVP の作製と内視鏡的操作

0.5% のブタアテロコラーゲン（11.0 mg collagen/1.0 cm²）を使用し、直径 34 mm の膜状のコラーゲンビトリゲルパッチ(CVP)を作製した。

本研究課題において CVP は食道内腔の通過を考慮した 巻き取り型と カーブを付与し

た弯曲型を作製した。その結果、巻き取り型は把持が容易であるが、創部での展開が困難であった。弯曲型は食道内腔を通過時に変形するものの、形状が断裂することはなく、粘膜切除部位に容易に貼付可能であった。24 週齢の雌豚(LWD pigs; Aratoyama SPF Farm)に対して、食道粘膜に長径 2 cm の全周性の粘膜剥離術を行った。CVP 貼付群では、CVP 2 枚を粘膜切除部位に貼付した。Control 群は全周性粘膜切除のみを行った。CVP は EZ clip (Olympus)を用いて、それぞれ 2 枚の CVP に対して口側と肛門側の 2 ヶ所を固定した。

CVP は広範囲食道粘膜 ESD 処置後の高度食道狭窄を抑制する

従来の報告通り Control 群では術後の食道狭窄による摂食障害が生じたため、動物愛護の観点から実験期間を術後 14 日までで終了することとした。

術後 14 日目の内視鏡による観察の結果、Control 群では粘膜切除部位は pin hole 様の高度の食道狭窄像を示した。一方、CVP 群では軽度の内腔狭窄は認めるものの、内腔は開存していた。屠殺後の摘出臓器を用いて開存率(狭窄部周長/正常部周長)を評価した。その結果、CVP 群(0.65 ± 0.12)に対して Control 群(0.23 ± 0.10)であり、統計学的に有意な狭窄抑制効果を認めた。

CVP は広範囲食道粘膜 ESD 処置後の上皮化を促進する

摘出標本において、Control 群では粘膜切除部位には、広範にびらんが見られた。一方、CVP 群ではびらんの範囲は狭く、重層扁平上皮細胞による粘膜の上皮化は高い割合を示した。粘膜切除部における上皮化の割合は、CVP 群(0.59 ± 0.26) に対し Control 群(0.15 ± 0.05)であり有意な上皮化促進作用が認められた。

CVP は広範囲食道粘膜 ESD 処置後の炎症と線維化を抑制する

ESD 後再生粘膜において、Control 群ではびらん部を中心に、密な炎症細胞浸潤が見られた。一方、CVP 群では再生粘膜の被覆が見られ、浸潤する炎症細胞浸潤数も低値であった。観察した組織内に異物型反応(異物型巨細胞)の出現は見られなかった。再生粘膜における線維化の程度は CVP 群($149.47 \pm 23.38 \mu\text{m}$)であり、一方、Control 群($423.63 \pm 95.57 \mu\text{m}$)であり、CVP による有意な線維化抑制効果が認められた。線維化関連因子の CTGF の発現を解析したところ、単位面積当たりの CTGF 陽性細胞の出現率は、CVP 群($60.0 \pm 33.2 \text{ cells/mm}^2$)、Control 群($121.9 \pm 18.9 \text{ cells/mm}^2$)であった。更に、狭窄の主たる原因となる αSMA 陽性筋線維芽細胞の単位面積の出現率は CVP 群($40.6 \pm 19.2 \text{ cells/mm}^2$)、Control 群($173.9 \pm 35.5 \text{ cells/mm}^2$)であった。以上より、CVP は CTGF を介した線維化および筋線維芽細胞の出現を抑制することで、広範囲食道粘膜 ESD 処置後の食道狭窄を抑制することが示唆された。

CVP の治療効果は創部との密着性に相関する

ブタによる CVP 治療は全般的に高い治療効果を示したものの、貼付に難渋した個体や創部から CVP が早期に脱落した症例では、CVP の食道狭窄予防効果は低い傾向が見られた。そこで、広範囲食道粘膜切除に対する CVP の治療効果を向上させるため、食道粘膜と組織学的な類似性をもつ皮膚に着目し、皮膚全層欠損モデルマウスを用いて、創部と CVP の密着度による組織再生効果を解析した。従来の我々の報告通り、CVP を創部に貼付すると皮膚再生は促進した。それらの個体の中で皮膚再生(上皮化)への治療効果が高い個体群と

低い個体群を中心に、病理組織学的な検討を中心に解析を行った。貼付後早期（3日目）までは、それぞれの群間に大きな差異は見られなかった。CVP貼付14日後の組織学的検索では、CVPが創部組織に密着した個体では、従来の報告通り、重層扁平上皮細胞の増殖（上皮化）の促進が見られ、CVP周囲の筋線維芽細胞の出現数の低下、炎症細胞浸潤の軽減が見られた。一方、CVPが創部組織との間に空隙を作った場合、空隙内部にはフィブリン析出を伴う滲出液の貯留、リンパ球、形質細胞浸潤が見られた。特に、この場合ではCVP上部の上皮化も遅延する傾向が見られた。以上より、CVPの治療効果は創部との密着性が重要であることを確認した。

現在、CVPの表面形状を改良し創部との密着性を高める加工技術と医療機器としての性能改良を進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Aoki S, Takezawa T, Nagase K, Oshikata-Mitazaki A, Morito S, Sakumoto T, Masuda M, Yamamoto-Rikitake M, Akutagawa T, Toda S. A high-density collagen xerogel thread prevents the progression of peritoneal fibrosis. *Biomater Sci.* 2018 Dec 18;7(1):125-138.

Akutagawa T, Aoki S, Yamamoto-Rikitake M, Iwakiri R, Fujimoto K, Toda S. Cancer-adipose tissue interaction and fluid flow synergistically modulate cell kinetics, HER2 expression, and trastuzumab efficacy in gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2018 Nov;21(6):946-955.

Aoki S, Sakata Y, Shimoda R, Takezawa T, Oshikata-Miyazaki A, Kimura H, Yamamoto M, Iwakiri R, Fujimoto K, Toda S. High-density collagen patch prevents stricture after endoscopic circumferential submucosal dissection of the esophagus: a porcine model. *Gastrointest Endosc.* 2017 May;85(5):1076-1085.

〔学会発表〕(計 3 件)

青木茂久 竹澤俊明 芥川剛至 山本美保子 戸田修二 広範囲の内視鏡的粘膜層剥離術後に生じる高度食道狭窄を予防する革新的コラーゲンデバイスの開発 第47回日本創傷治癒学会 2017, 11, 27-28

Shigehisa Aoki, Toshiaki Takezawa, Takashi Akutagawa, Mihoko Yamamoto, Hajime Sugihara, Shuji Toda Collagen vitrigel patch prevents stricture following circumferential ESD of the esophagus 第106回日本病理学会 2017, 4, 27-29

青木茂久 竹澤俊明 坂田資尚 戸田修二 内視鏡的粘膜層剥離術後の食道狭窄を予防するコラーゲン新素材治療デバイスの開発 第16回日本再生医療学会総会 2017, 3, 7-9

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：粘膜再生用デバイス

発明者：青木茂久、坂田資尚、竹澤俊明

権利者：国立大学法人佐賀大学、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

種類：特許

番号：特願 2015-251401

出願年：2015

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：竹澤 俊明

ローマ字氏名：Toshiaki Takezawa

所属研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

部局名：生物機能利用研究部門

職名：主席研究員

研究者番号（8桁）：50301297

研究分担者氏名：坂田 資尚

ローマ字氏名：Yasuhisa Sakata

所属研究機関名：佐賀大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：50404158

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。