

平成 21 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591568  
 研究課題名（和文） 食道内視鏡的粘膜下層剥離術に対する細胞シート工学による再生医療的治療に関する研究  
 研究課題名（英文） Research of Regenerative Medical Treatment by Using Cell Sheet Engineering for Esophageal Endoscopic Submucosal Dissection.  
 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：食道内視鏡的粘膜下層剥離術後の潰瘍に起因する狭窄に対し、温度応答性培養皿を用いて作製した培養自己口腔粘膜上皮細胞シートを経内視鏡的に移植するという再生医療的治療法の研究を進めている。本研究では、全周性の食道潰瘍を内視鏡的に作製し、細胞シートの移植を行った。その結果、従来法では手技的に移植困難であることが判明したため、新規にバルーン型細胞シート移植デバイスを開発、ex vivo モデルにて全周性に移植することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：食道外科学・再生医療・消化器内視鏡治療学・食道・細胞シート工学・内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)

## 1. 研究開始当初の背景

食道癌の内視鏡的治療は、胃癌や大腸癌と比較して外科的治療（開胸開腹手術）との侵襲度の差が顕著であり、内視鏡治療の低侵襲性の恩恵が大きいことから適応拡大が期待されている。食道癌の内視鏡治療では、胃癌の内視鏡治療法で開発した内視鏡的粘膜下層剥離術：Endoscopic Submucosal Dissection(以下 ESD)の開発により、大きな病変が一括で切除することが可能となった。しかしながら、管腔の狭い食道では、ESD 後の潰瘍に起因する癒痕狭窄が重大な合併症

の一つとして問題となっている。そのために、ESD 後に予防的にバルーンやブジーを用いた内視鏡的拡張術の反復的施行やカバー付ス TENT の一時的挿入が必要とされ、内視鏡治療後の患者の QOL (Quality of Life) は著しく低下してしまうのが現状であった。

そこで我々は、自己の細胞由来の培養口腔粘膜上皮細胞シートを人工食道潰瘍に内視鏡を用いて移植し、創傷治癒を促進し、炎症を抑制することで、術後潰瘍癒痕による狭窄を回避するのではないかと仮説を立て研究をおこなってきた。これまでに、ビーグ

ル犬を用いた大形動物モデル実験をおこない、以下の成果を得た。すなわち、食道半周、長さ 5 cm の ESD をおこない、露出させた平滑筋層に、内視鏡を用いて培養自己口腔粘膜上皮細胞シート(2cm × 2cm)を2枚移植することに成功し、培養上皮細胞シートの移植により、炎症が有意に抑制されると共に、潰瘍の創傷治癒が大きく改善されることを見出した(Takeshi Ohki, Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model, Gut, 55, 1704-1710, 2006)。

本研究では、これまでに得られた成果をさらに発展させ、全周性の ESD を対象とした。全周性の ESD は、近年のバレット食道の増加により、今後、その重要性はますます増加していくものと推測される。すなわち、日本食道学会の報告によると日本における食道癌は扁平上皮癌が 89% と主流を占めているが、欧米諸国では腺癌が過半数以上を占め、近年さらに増大傾向にある。これは、近年増大する逆流性食道炎に由来するバレット食道(本来扁平上皮である食道上皮が、持続的な酸逆流から保護するために、酸に強い円柱上皮化生を起こしてしまう)に由来していると考えられている。この治療法として、ESD を用いた内視鏡的切除が期待されているが、バレット食道のほとんどが全周性であり、内視鏡的切除後の狭窄が問題となっている。そのような背景の中で、扁平上皮癌だけではなく、バレット食道のような全周性におよぶ食道疾患に対する広範な内視鏡的切除に対しても、培養自己口腔粘膜上皮細胞シート移植が有用ではないかと着想するに至った。

## 2. 研究の目的

ビーグル犬を用いた大形動物実験にて全周性の食道 ESD を施行し、狭窄抑制に必要な培養口腔粘膜上皮細胞シートの移植プロトコルを確立する。これにより再生医療的処置による狭窄抑制の有効性を明らかにし、全周性の病変であるバレット食道への応用への基盤作りを行うことを目指した。

## 3. 研究の方法

全身麻酔下にビーグル犬の口腔粘膜組織を 10mm × 10mm の大きさで切除する。常法により、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皮のみを回収し、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(2.4cm × 2.4cm の正方形に温度応答性高分子である *N*-イソプロピルアクリルアミ

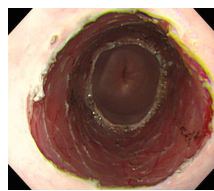
ドと、これを取り囲むように細胞非接着性のポリアクリルアミドが固定化されている培養皿)に播種し、マイトマイシン C で処理した 3T3 フィーダー層存在下で、約 2 週間培養する。その後、温度を 20 °C まで下げ、一枚の細胞シートとして全細胞を回収し、正方形の細胞シートを作製し、内視鏡的移植術に備える。

フックナイフ® (KD-620LR, オリンパス) は先端がフック状になっており、組織を確実に牽引しながら切除していく内視鏡治療デバイスである。このフックナイフを用いて、食道の全周性 ESD をおこなう。まず切除予定線にフックナイフの先端を収納したままマーキングをおこなう。青色の色素であるインジコカルミンを混入したグリセロール液を粘膜と筋層との間にある粘膜下層に局注針を用いて注入する。全周にわたり筋層を損傷しないように粘膜を切開する。その後、インジコカルミンで青くなった粘膜下層を、筋層を損傷しないように丁寧に剥離し、全周性の潰瘍を作製する。EMR チューブ® (Create Medic Co. 東京) を挿入して移植ルートを確認した後に、支持膜である PVDF 製の膜 (Immobilon-P, DURAPORE®, Millipore Corporation, Bedford, MA) に付着させた状態で回収した培養自己口腔粘膜上皮細胞シートを内視鏡を用いて移植する。

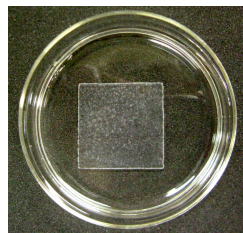
実験の結果、従来法で全周性の内視鏡的移植術が困難なため(研究成果にて後述)、新規全周性移植用デバイスを開発し、ブタ食道を用いた *ex vivo* モデルで全周性移植可能か検討した。

## 4. 研究成果

(1) ビーグル犬を用いて、フックナイフを用いて穿孔などの合併症を引き起こすことなく安定して食道に全周性の潰瘍を作製することが可能となった。

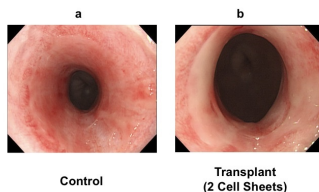


(2) 通常行われるような半周程度の食道 ESD 後の潰瘍であれば、PVDF 膜をキャリアとして培養口腔粘膜上皮細胞シートを比較的安定



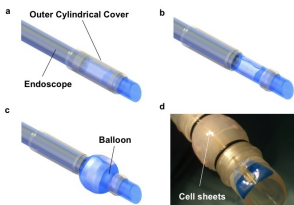
して内視鏡的に移植可能である。そこで本研究では、全周性の食道 ESD 後の潰瘍に対して従来法の移植手技で正方形の培養口腔粘膜上皮細胞シート (24mm × 24mm × 2枚) を移植した。

(3)内視鏡画像的に移植部位の培養口腔粘膜上皮細胞シートの生着と組織学的に潰瘍面の早期の上皮化を確認できたが、ある程度の狭窄抑制は認められたものの、完全な食道狭窄の抑制はできなかった。

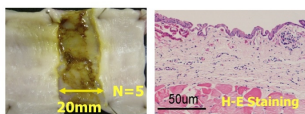


(4)原因として十分な培養口腔粘膜上皮細胞シートの移植量(面積)が不足していると思われる。よって全周性の食道ESD後の人工潰瘍に、培養口腔粘膜上皮細胞シート移植を全周性に移植できるような新規移植デバイスの開発が急務と考えられた。

(5)全周性の食道ESDに対する口腔粘膜上皮細胞シート移植術に対する全周性に移植しうる新規デバイスの開発を開始した。バルーンタイプの移植デバイスを考案した。



(6)ex vivoの検討で24mm×24mmの正方形の細胞シート口腔粘膜上皮細胞シートあるいは線維芽細胞シートを作製し、そのバルーン型細胞シート移植デバイスを用いて、全周性のESD後の潰瘍表面に4枚を一期的に移植することに成功した。マクロでも全周性に細胞シートが移植され、またHEでも潰瘍面にシート状に移植されていることを確認した。その成果を2008年4月にSEGES(米国内視鏡外科学会)にて口演発表し、バルーン型食道への応用が期待され、大きな反響を得られた。今後は、in vivoでの検討を行い、さらに臨床で使用可能な状態に改良する必要がある。



Macroscopic Findings: Complete Circumferential Transplantation of the Cell Sheets  
Iodine Staining: The All of the Cell Sheets were Successfully Attached to Esophageal Ulcer.  
Histology: The Epithelial Cell Sheets were Attached to the Remnant Submucosal Layers.

(7)また本研究と平行して、2008年4月より培養口腔粘膜上皮細胞シートの経内視鏡的移植術のヒト臨床(世界初の消化器領域における再生医療の臨床応用)を開始しており、症例集積中であるが、今後は、食道だけでなく、他の消化管臓器への細胞シートを用いた再生医療を応用し、その有用性を明らかにし

たい。

## 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8件)

大木岳志(他10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,査読有

大木岳志,食道ESDのための再生医療,癌の臨床,54巻,541-546,2008,査読無

大木岳志(他12名,1番目),食道ESDの未来展望~再生医療技術の導入~,消化器内視鏡,20巻,321-327,2008,査読無

Yang Joseph, Ohki Takeshi(他8名,7番目),Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering, Biomaterials, Vol.28, 5033-5043, 2007, 査読有

Yamato Masayuki, Ohki Takeshi(他10名,4番目),Grand Espoir: Robotics in Regenerative Medicine, Journal of Robotics and Mechatronics, Vol.19, 500-505, 2007, 査読有

大木岳志,山本雅一,細胞シート工学を用いた食道内視鏡治療のための再生医療-食道EMR/ESDへの応用-,医学のあゆみ, Vol.220, 561-564, 2007, 査読無

大木岳志(他9名,1番目),口腔粘膜上皮細胞シート移植による食道ESDのための再生医療-全周性食道ESD後の狭窄に対する新たなアプローチ,消化器内視鏡, Vol.19, 679-688, 2007, 査読無

大木岳志,細胞シート工学による消化器内視鏡治療への可能,臨床消化器内科, Vol.22, 245-247, 2007, 査読無

[学会発表](計10件)

大木岳志,食道癌患者の低侵襲性手術を可能とする再生医療,第8回日本再生医療学会総会,2009.2.22,東京

大木岳志,内視鏡治療へ応用する細胞シートを用いた食道再生治療,第21回日本バイオセラピー学会学術集会総会,2008.11.2,東京

大木岳志,特別講演:細胞工学による再生医療~食道ESDへの応用~,第62回日本食道学会学術集会,2008.6.21,東京

Takeshi Ohki, An Inflatable Device For Esophageal ESD Using Cell Sheet Engineering, SAGES 2008,2008.4.12, Philadelphia

Takeshi Ohki, Endoscopic Transplantation of Autologous Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets to Esophageal Ulceration After Full Circumferential ESD, TERMIS-AP,

2007.12.03, Tokyo

大木岳志, 細胞シート工学を用いた食道再生医療の現状と近未来展望, 第 69 回日本臨床外科学会総会, 2007.11.29, 横浜

大木岳志, 食道 ESD のための再生医療, 第 45 回日本癌治療学会, 2007.10.24, 京都

Takeshi Ohki, Development of an inflatable surgical device for endoscopic treatment using oral mucosal epithelial cell sheets, TERMIS-EU, 2007.9.07, London

大木岳志, 早期食道癌内視鏡的切除に応用する再生医療のための移植デバイス開発の試み, 第 62 回日本消化器外科学会定期学術総会, 2007.7.17, 東京

Takeshi Ohki, A Novel Inflatable Surgical Device Used in Endoscopic Transplantation of Tissue Engineered Cells Sheets for Regenerative Treatments of Esophageal Ulcerations: A Preliminary Report, DDW, 2007.5.05, Washington DC

〔図書〕(計 1 件)

大木岳志, 山本雅一, (分担) 食道, 再生医療技術の最前線, シーエムシー出版, 117-122, 2007

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 生体管路内処置デバイス

発明者: 前田真法、岡野光夫、大和雅之、大木岳志、伊関洋

権利者: ペンタックス株式会社、東京女子医科大学

種類:(A)

番号: 2008-79783

出願年月日: 2006 年 9 月 27 日

国内・外国の別: 国内

取得状況 (計 1 件)

名称: 生体管路内処置デバイス

発明者: 前田真法、岡野光夫、大和雅之、大木岳志、伊関洋

権利者: ペンタックス株式会社、東京女子医科大学

種類:(A)

番号: 2008-79783

取得年月日: 2008 年 4 月 10 日

国内・外国の別: 国内

## 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