

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590811

研究課題名（和文）薬剤溶出性担体を用いた内視鏡的粘膜切除術後食道瘢痕狭窄の予防

研究課題名（英文）Prevention of esophageal stricture after endoscopic surgery using new drug delivery system

研究代表者

丹羽 康正 (NIWA YASUMASA)

愛知県がんセンター（研究所）・発がん制御研究部・研究員

研究者番号：20283442

研究成果の概要（和文）：広範な早期食道癌に対する内視鏡手術後に起こる、強固な食道狭窄に対する予防的治療法として、狭窄の原因である瘢痕を形成する細胞群の増殖抑制効果を持つ、5-FUを、リポソーム・コラーゲンで包埋して徐放化担体を作成し、動物実験においてその効果を証明した。また、さらなる薬理効果の安定化を目指して、プレオマイシンと中空マイクロカプセルを用いた改良型徐放化担体の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：Circumferential endoscopic surgery in the esophagus lead to esophageal stricture. This study demonstrated development of an endoscopically injectable controlled releasing anti-scarring drug delivery system, and verification of the efficacy of our strategy for prevention of esophageal stricture.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：内科、消化管内視鏡治療、薬剤徐放

1. 研究開始当初の背景

早期食道癌（食道粘膜癌）に対する内視鏡的粘膜切除術（EMR）・内視鏡的切開剥離法（ESD）は、生活習慣の欧米化に伴う癌人口の増加や、診断技術・治療機器の革新的な進歩によって年々増加傾向にある。EMR/ESDは、侵襲の大きい手術を要する食道癌患者に対し、劇的な低侵襲化を実現した革新的な治療法であるが、広範な（3/4周、3cm以上）切除を行った場合、術後2週間から食道狭窄症状が発症することが重大な合併症と位置づけられている。この合併症によって、広範な切除を伴うEMR/ESDは、適応がガイドラインにより

制限され、このような患者は早期癌であるにもかかわらず、侵襲の大きい治療を受けることを余儀なくされる。また、相対的適応として広範囲の全周性EMR/ESDを受けた患者は、術後の瘢痕狭窄による通過障害が必至であり、バルーンによる拡張術を必要とするのだが、この狭窄はしばしば難治性で、繰り返すバルーン拡張術を要し、患者の著しいQOLの低下の原因となっている。現在のところ、本邦で確立されているEMR/ESD後の狭窄予防法はなく、早急な開発が望まれている。

(1)狭窄予防法・治療法

良性食道狭窄の症例に対する研究では、食

道ステントを用いた治療の報告や、狭窄部をバルーン拡張後にステロイドを局所注入する研究などがある。ステントについては留置後の逸脱の問題や抜去時の食道損傷のリスクがあり、ステロイドについても治療後の再狭窄までの期間の延長の効果は認められたものの、注入後の局所の感染のリスクがあり普及には至っていない。また最近では、症例報告ではあるが、mitomycin C を局所注入し治療効果を得たという報告もある。しかし、効果が持続的でなく複数回の治療が必要である。一方、食道のEMR/ESDの狭窄予防について、口腔粘膜シートを用いて、食道EMR/ESD後の粘膜欠損部を覆うことで狭窄予防を行う研究や、口腔粘膜細胞を食道EMR/ESD後の粘膜欠損部に局注する治療法が本邦から報告された。それぞれ狭窄に対しある程度の効果がみられるが、食道癌患者の口腔上皮は、発癌のリスクが懸念されること、シート状にするために培養操作を要することにより時間がかかることや培養操作の安全性に問題が残る。癌患者に対して細胞治療を行うには、切除部に遺残があったときに遺残した癌細胞を刺激してしまう可能性もあり、臨床応用にはまだまだ課題が多い。

(2)我々の経験と失敗

一方、我々は、EMR 後食道狭窄の予防法を開発するため、大型動物（犬）でEMR 後食道狭窄モデルを作成し、粘膜欠損部への骨髓単核球成分（消化管組織のリモデリングに関与する幹細胞が含まれると言われる細胞群）の注入実験を試みた。しかし、骨髓由来単核球成分による狭窄抑制試験では、血管新生は著名に促進されたが、狭窄はむしろ増悪する結果となった。この結果から癒痕狭窄に対しては、平滑筋細胞や筋線維芽細胞を含む間葉系の細胞増殖抑制と、細胞外基質の産生抑制を目指した治療および、食道上皮の再上皮化を促す治療法の開発が必要ではないかと考えた。

(3)新しい狭窄予防法の開発

循環器領域では、冠動脈の狭窄病変に対して薬剤溶出ステント(DES)がめざましい治療効果を挙げている。DESの狭窄予防機序は、DESが細胞の増殖抑制効果を持つ免疫抑制剤や抗癌剤を溶出することで、内膜肥厚を引き起こす細胞の増殖を抑制し、細胞外マトリックスの産生を抑制することにある。我々の治療戦略は上述の理論に法り、EMR/ESD直後の粘膜切除面に、免疫抑制剤や抗癌剤を内視鏡を用いて注入し狭窄を抑制するというコンセプトである。さらに、1回の治療で終了するために、狭窄が起きてくる術後1~2週間以上、局所投与した薬剤を徐放させる必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞増殖抑制効果のある薬剤を徐放化し、それをEMR/ESD後の食道に投与することで癌の治療後で癒痕収縮抑制し、術後の再発性の狭窄を予防する治療法を開発することである。細胞増殖抑制効果のある薬剤として、5-FU、プレオマイシンといった食道癌治療にも用いられる抗癌剤を選択する。また、徐放化を可能にするため、さらには内視鏡を用いての注入型の薬剤溶出キャリアとして、リポソームとコラーゲンあるいは中空マイクロカプセルを用いることにした。

3. 研究の方法

(1)薬剤溶出担体による薬剤の徐放化法の確立及び薬理効果の検討のための実験

①[細胞増殖抑制効果検討] 我々は、既に食道から間葉細胞（筋線維芽細胞等）の単離・培養し、免疫染色(αSMA, Vimentin, Desmin等)、細胞増殖曲線(倍加時間)で細胞の特異性を確立している。この細胞を用いて薬剤(5-FU)の有効薬剤投与濃度を検討。コラーゲン被覆高分子ナノキャリア化した薬剤についても同様に増殖抑制効果を検討した。

②[リポソーム開発] 脂質の最適化、徐放速度をFITC等の内包系を用いて測定し、製剤化条件検討。最適な脂質の大きさと共に、今回用いる薬剤の徐放速度を、狭窄予防に必要な薬剤濃度と投与期間と照らし合わせて最適化した。また単体での細胞毒性の検討も行った。

③[徐放化] 薬剤・空リポソーム・コラーゲン被覆剤の単体、空コラーゲン被覆リポソーム、コラーゲン被覆薬剤内包リポソームを用いたそれぞれの緩衝液中への経時的な溶出程度を測定し、比較検討することで薬剤の有効な徐放化を行うための各単体の設定を行った。また、生体内での条件に近いリリーステストを行うため、コラゲナーゼ、3T3細胞、食道間葉系細胞などの存在下で、コラーゲン被覆薬剤内包リポソームのリリーステストを行い、1~2週間の間、コントロールリリースが可能であることを確認する。薬剤の溶液内濃度を測定するため、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を使用した。

(2)大動物のEMR術後食道狭窄モデルによる効果判定における実験

①我々はすでに、犬食道に対し全周性の粘膜切除を内視鏡的に施行し、ヒトに近い食道狭窄のモデルを確立している。このモデルを用い、食道狭窄のメカニズムを解析する。食道EMR後、食道造影、内視鏡所見の経時的变化を観察し、病理所見(HE染色、アザン染色、免疫染色等)を評価する。また、色素を実際に内視鏡的に食道筋層に注入し、全周性に薬

剤を注入するための一回注入量と注入回数を最適化した。

②内視鏡の局所注入用デバイスを使用し、注入量を正確に組織内に注入できることを確認した。そして実際にイヌ食道 EMR 施行時に最適化した注入型薬剤溶出キャリア(5FU)を注入し、狭窄の予防効果を内視鏡検査やX線検査、病理所見等で評価した。また、薬剤注入による全身への影響や副作用の有無を確認するため、経時的に採血を行い、血球数や肝、腎機能、血中薬剤濃度などを測定した。

(3)新規薬剤溶出担体による薬剤の徐放化法の確立及び薬理効果の検討のための実験

当初細胞増殖抑制効果が期待できる薬剤として5-FUを用い、リポソーム及びコラーゲンで徐放化DDS(drug delivery system)を構築し、イヌ食道において一定の狭窄予防効果が認められた。＜実験(1)(2)＞しかし5-FUが低分子量かつ低親水性で、リポソームに包埋かつ徐放するのが困難なため狭窄予防効果の安定性を欠いていた。その点を改善すべく、新たな薬剤として「プレオマイシン」を選択した。またリポソームにかわりデキストラン硫酸ナトリウムと硫酸プロタミン交互被覆で作成した「中空マイクロカプセル」を採用し、プレオマイシンの癒痕組織への薬理効果及び新DDSの安全性、徐放性等を確認した。

①[細胞増殖抑制効果検討] 既に我々が単離・培養を確立したラット食道の間葉系細胞に対してのプレオマイシンの有効薬剤投与濃度を検討し適正な濃度を確定した。

②[中空マイクロカプセル] プレオマイシンを内包化したDDSを用いた緩衝液中への経時的な溶出状態を測定し、さらにin vitroでの細胞増殖抑制効果を経時的に評価することで薬剤の有効な徐放化を行うための各単体の設定を行った。またカプセル単体では細胞増殖に影響を与えないことを確認することで安全性も確認した。

(4)ラット皮膚癒痕モデルの作製

大動物での効果判定を行う前実験として、ラット皮膚癒痕モデルを作成し、前述のDDSのin vivo実験モデルとした。

4. 研究成果

(1) 薬剤溶出担体による薬剤の徐放化法の確立及び薬理効果の検討のための実験

①細胞密度の少ない場合には $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で増殖抑制を確認した。

細胞密度の濃い状態で同様に検討したところ、培養3日では増殖抑制効果は弱い結果でしたが、7日まで観察すると培養3日に比べ強い増殖抑制効果を確認した。

②今回作成したリポソームは3種の脂質合成で、表面に正電荷を持つことで細胞内に取

り込まれやすいという性質を持つ。球形で、粒子径100nm前後であった。正常皮膚線維芽細胞を用いて、リポソームの毒性を調べたがリポソームを大量に加えても、無添加のものと同様な増殖曲線を描き、また形態的にも変化はなく、リポソームの安全性が確認された。

③リポソームのコラーゲンからの徐放については、コラゲナーゼなしでは観察期間中、肉眼所見は変化しなかった。徐放についても2週間で20%程度しか放出されず、コラーゲンが溶解しない間は、ほとんどリポソームはコラーゲンに保持されていることが示された。コラゲナーゼ添加群では、7日目ごろから、リポソームがコラーゲンから放出されることが確認できた(図1A)。また5-FUの徐放性についても5-FUだけのものに比べて、リポソームによって包埋することにより、溶出を遅らせることが可能になった(図1B)。リポソームで包埋した5-FUのコラーゲングルから、溶出した上清を線維芽細胞に添加し、その増殖抑制効果を検討すると、上清の5-FU含有濃度が約 $1.26 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、5-FU単独時の $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ とほぼ同等の増殖抑制効果を確認しました。リポソームによって効果的に細胞内に薬剤が取り込まれたためと考えられた。(図2)

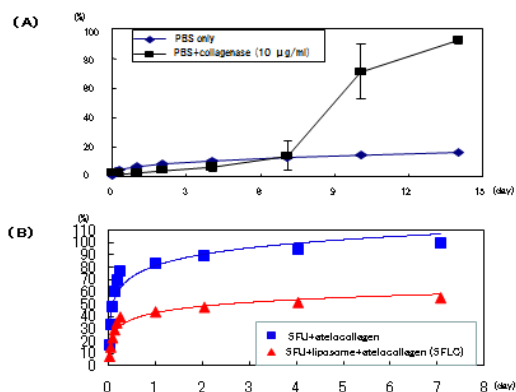


図1

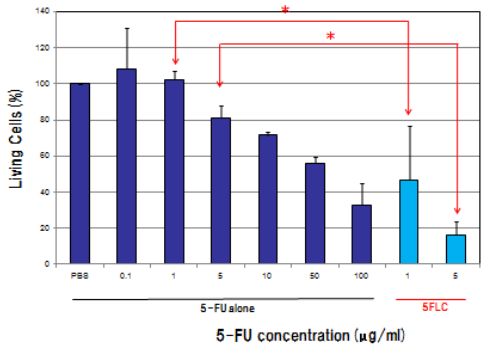


図 2

(2) 大動物の EMR 術後食道狭窄モデルによる効果判定における実験

犬を用いて食道狭窄モデルを作製したが、実際に術後 2 週間で高度の食道狭窄が発症することを確認した。この動物モデルを用いて、薬剤の効果を検討した。

コントロールとして、リポソームとコラーゲンのみを注入した食道と、5-FU を包埋したリポソーム、コラーゲンを注入した食道を比較した。粘膜切除後 4 週後において、5-FU を包埋したリポソーム、コラーゲンを注入した食道では、コントロールに比べ、嘔吐等の症状もなく狭窄予防効果がみられた。

食道造影でも明らかに狭窄予防効果が認められ、標本上は、薬剤なしのコントロールに比べ、5-FU 注入により、瘢痕部の収縮が抑制されており、組織学的な検討では、瘢痕中央部にて、コントロールの粘膜下層の線維化に伴う厚みが、5-FU により軽減されていた (図 3)。

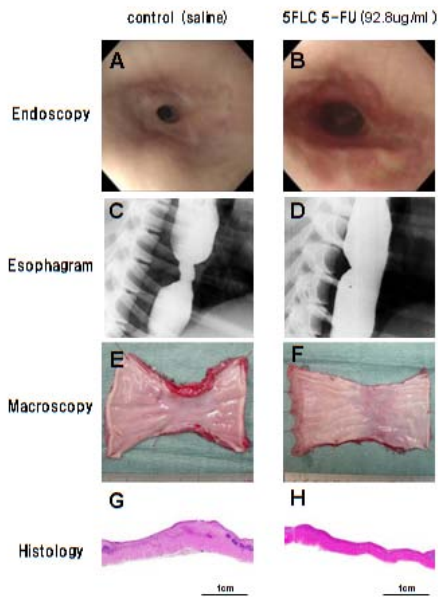


図 3

(3) 新規薬剤溶出担体による薬剤の徐放化法の確立及び薬理効果の検討のための実験

①ブレオマイシンは培養 5 日目以降、食道間葉系細胞に対し、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で有意に細胞増殖抑制効果を示した。

(図 4)

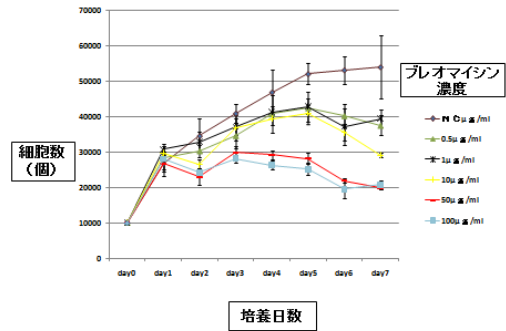


図 4

②中空ナノカプセルに包埋したブレオマイシンの徐放量を、経時的に吸光度を用いて測定し、1 週間以上にわたる緩やかな徐放効果を確認した (図 5)。

また線維芽細胞に対して、マイクロカプセル単体では細胞の変化に影響を与えず、毒性の無い事が示された (図 6 A) が、ブレオマイシンを包埋した DDS では 2 日目以降から有意に細胞増殖抑制効果を示した (図 6 B)。

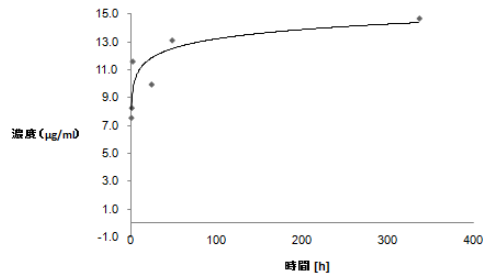


図 5

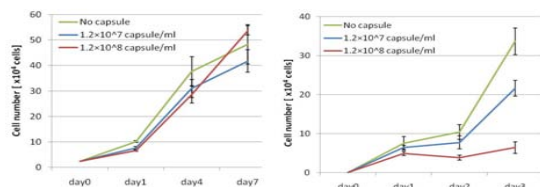


図 6 A

図 6 B

(4) ラット皮膚癒痕モデルの作製

10週齢（体重300～350g）のウイスターラットの背部に1cmの線条切開を行い癒痕モデルを作製した。創部は約1～2週で閉鎖し癒痕化することが確認された（図7）。



図7

今後本モデルにプレオマイシン及びDDSを注入し、比較検討予定である。

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1件）

丹羽康正、成田裕司、加藤竜司、後藤秀実
他8名省略（1、2、3、7、8、9、10、11番目） Novel Strategy for Prevention of Esophageal Stricture after Endoscopic Surgery Hepato-Gastroenterology
査読有2010；57：1150－1156

〔学会発表〕（計1件）

成田裕司、加藤竜司、後藤秀実 他 薬剤徐放性マイクロ中空カプセルドラッグデリバリーシステムを用いた癒痕形成予防法の開発

日本再生医療学会

2011年3月1日 東京都

6. 研究組織

(1)研究代表者

丹羽 康正 (NIWA YASUMASA)

愛知県がんセンター中央病院・部長

研究者番号：20283442

(2)研究分担者

後藤 秀実 (GOTO HIDEMI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10215501

成田 裕司 (NARITA YUJI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：60378221

加藤 竜司 (KATO RYUJI)

名古屋大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：50377884

大宮 直木 (OHMIYA NAOKI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00335035