

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17051

研究課題名（和文）食道表在癌内視鏡治療後狭窄に対する多種積層化細胞シートを用いた再生治療の開発研究

研究課題名（英文）Developmental study of regenerative therapy using multi-layered cell sheet for stenosis after endoscopic treatment for superficial esophageal cancer

研究代表者

安部 真（Abe, Makoto）

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：00819104

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：消化管腫瘍に対する粘膜切除術後に生じる消化管狭窄等の合併症を予防する目的に粘膜再生治療が注目されている。術後潰瘍への上皮細胞シート移植や、間葉系幹細胞の訓化培地の移植が実施され効果をあげている。本研究では創傷治癒効果の相乗効果を期待して、細胞シート工学をもちいて製造された上皮細胞シートおよび間葉系細胞シートを積層化することに成功した。積層化シートの特徴から、ヒト臨床において有効に使用できる環境として咽頭領域への展開が妥当と考えられたため、臨床応用にむけて前臨床研究を施行した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞を用いて製造される間葉系幹細胞シートは高い創傷治癒能力を有しているが、消化管への移植は困難であった。本研究は、同分野で既に臨床応用されている上皮細胞シートと積層化することで、同シートの移植を可能とし、さらに創傷治癒の相乗効果を期待している。同シートの積層化は既報がなく、本研究で初めて積層化に成功した。積層化シートを移植することで、咽頭領域の内視鏡治療後の嚥下機能障害および誤嚥性肺炎の発症を抑制することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Mucosa regeneration therapy is attracting attention as a means of preventing complications such as gastrointestinal stenosis that may occur after mucosal resection for gastrointestinal tumors. Transplantation of epithelial cell sheets into postoperative ulcers and mesenchymal stem cell tutoring medium have been used to good effect. In this study, we succeeded in stacking epithelial cell sheets and mesenchymal cell sheets produced by cell sheet engineering in anticipation of synergistic effects on wound healing. The characteristics of the stacked sheets suggested that they could be used effectively in the pharyngeal region in human clinical practice, and preclinical studies were conducted for their clinical application.

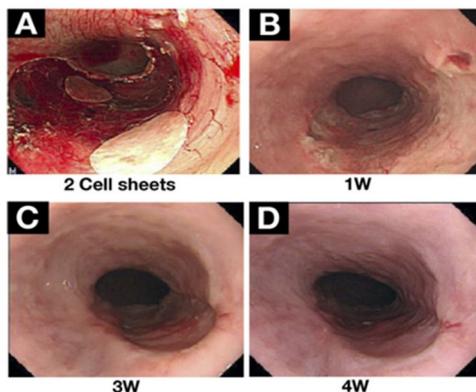
研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 消化器内視鏡治療 上皮細胞シート 間葉系細胞シート 細胞シート工学

1. 研究開始当初の背景

食道表在癌に対する内視鏡的切除(内視鏡的粘膜下層剥離術(以下 ESD))は、既存の治療(食道全摘、化学放射線療法)と比較して低侵襲であり、患者の術後の QOL (quality of life) が大きく改善されることから、標準治療となっている。ところが、広範な食道表在癌(3/4 周性以上の広範な粘膜切除を要する)においては、術後潰瘍の治癒に伴って難治性の狭窄をきたし、バルーン拡張を頻回に要することから、内視鏡治療の適応外病変とされてきた。これに対して、術後潰瘍底へのステロイドの局所注射や全身投与等、様々な術後狭窄予防策が講じられ、現在は相対適応病変となっている。しかし、未だに狭窄の完全な予防は困難であり、これらの予防策を施した上でも術後狭窄に対して内視鏡的バルーン拡張等の治療を繰り返す必要がある。内視鏡的バルーン拡張術は数十回も施行せざるを得ないこともあり、狭窄症例における患者の精神的負担

図1. 上皮細胞シート移植による狭窄抑制



および医療経済的負担は非常に大きく問題となっている。

そのような術後狭窄予防の方法として近年注目されているのが再生医療である。間葉系幹細胞による訓化培地の投与 (Mizushima T, et al. Gastrointest Endosc 2017.) や自己上皮細胞シートを用いた粘膜再生医療は有効性が報告されており、自己上皮細胞シートにおいてはヒト臨床研究も進められている (Ohki T, et al. Gastroenterology 2012; 図 1.)。副作用がほとんどなく安全に施行可能であるが、治療効果はステロイドを用いた方法と同等といわれている。特に、臨床上最も治療に難渋することの多い全周性の粘膜切除の症例では狭窄を生じている。そのため狭窄抑制効果のより高い新たな治療方法が求められている。

また、咽頭表在癌に対する咽頭腫瘍に対する経口的切除術(咽頭 ESD 含む)は安全性と有効性が報告されているが、特に下咽頭腫瘍や比較的大きな表在癌に対する経口的切除術後に誤嚥性肺炎や嚥下障害をきたすことが報告されている。また、粘膜切除後の潰瘍が治癒する過程で癒痕拘縮をきたすが、異時性に生じた新たな病変に対する治療は、病変が小さな表在癌であっても、初回治療に関連した嚥下機能低下や癒痕が原因で難渋することが多く、結局喉頭全摘出術を必要とし、患者の QOL を大きく低下させてしまうこともある。嚥下機能は年齢とともに低下するため、咽頭の経口的切除を施行された患者が将来、誤嚥性肺炎の頻回の治療、胃瘻栄養状態への移行、喉頭全摘出術を施行される可能性が増加することが予想され、患者の QOL が低下するとともに医療経済上の課題となっている。こういった新たな課題に対して、ステロイドの局所注射、全身投与、PGA シートの貼付等が試みられているが、いずれも解決に至らず、未だアンメットメディカルニーズとなっている。

2. 研究の目的

これらの再生治療の機序は、移植された細胞や組織、訓化培地から分泌される種々のサイトカインによる炎症抑制、創傷治癒の促進といわれているが、特に間葉系幹細胞は、高い抗炎症作用、創傷治癒促進作用が報告されている (Okamoto R, et al. Nature Med. 2002.)。一方、細胞シートは幹細胞単独の投与や訓化培地の投与と比較すると細胞間接着と細胞外マトリックスが維持されることで周囲の環境に対して反応し、これが良好な治療効果をきたすと考えられている。そこで我々は、以前に脂肪由来の間葉系幹細胞シートを作成し食道 ESD 後の潰瘍に移植し、狭窄予防効果の程度を検証する大動物研究を行ったが、上皮細胞シートを用いた場合ほどの有効性を示すことができなかった。この結果は、間葉系幹細胞が消化管の創傷部位の環境において十分にその効果が発揮できていないためと考えられた。そこで我々は、動物実験において訓化培地の投与と同様に狭窄抑制効果を認めている間葉系幹細胞をシート状に培養した脂肪由来培養間葉系細胞シート(以下 ADMSCs シート)の上に、食道 ESD 術後の狭窄に対してヒト臨床研究で抑制効果を認めている培養上皮細胞シート(以下 ESCs シート)を重ね、積層化シート(以下 ME シート)を用いることが有用であると考えた。つまり、間葉系幹細胞をシート状にすることで治療効果を高め、食道内腔の異物(口腔内細菌)や物理的接触から扁平上皮層を有する ESCs シートを上乗せし保護することで安定した治療効果が期待されると考えた。また、ESCs シートと ADMSCs シートが接着することによる相互作用によって抗炎症作用、創傷治癒促進作用において相乗効果も期待できると考えた。

よって本研究の目的は、ME シートを作成する方法を探索/製造すること、製造された ME シートを食道、咽頭等の粘膜切除後の合併症予防に使用する可能性を探索することとした。

3. 研究の方法

ヒト上皮ケラチノサイトおよびヒト脂肪組織由来幹細胞を用いてそれぞれ、ESC s シートおよび ADMSCs シートを作成する。

培養中の ADMSCs シート上に ESCs シートを移植することで ME シートを作成する。ADMSCs シートおよび ESCs シートの培養日数および重層化後の培養日数に関して条件を変更することで最適な ME シート作成条件を探索する。

培養液を回収し、フローサイトメトリーおよび ELISA キット (TNF- α 、IL-6、IL-10、TGF- β 、VEGF、FGF-2) により特性解析を行い、最適な ME シートの回収時期を明らかにする。

ME シートを用いた大動物実験

3-1) NIBS 系ミニブタ(20kg \pm 2kg)を用いた咽頭 ESD 後狭窄モデルを作成する。狭窄により食事摂取が困難となる術後 14 日で犠牲死させ、咽頭を摘出し狭窄率、再上皮化率、および免疫組織化学的に炎症抑制効果、炎症細胞浸潤数を計測する。

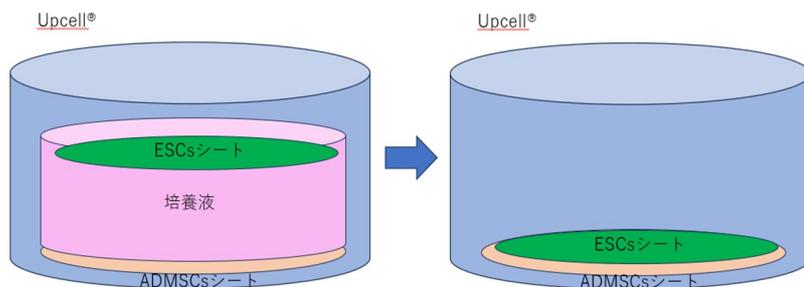
3-2) ミニブタの腹部の皮膚および脂肪由来の ME シートを作成し、粘膜切除術施行直後に ME シートを移植する。食事摂取状況を記録し、術後 14 日で犠牲死させ、咽頭を摘出し狭窄の程度をコントロール群と比較する。RT-PCR(α SMA、VEGF、type1 collagen 等) を用いて炎症抑制効果、炎症細胞浸潤数について比較検討する。

4. 研究成果

培養中の ADMSCs シート上に ESCs シートを移植する手技に関しては下記の問題点がある。

ESCs シートは剥離時に収縮して回収される。ADMSCs シートはわずかな物理刺激で自然剥離する傾向がある。ADMSCs シートに物理的の刺激を加えずに ESCs シートを移植する必要がある。移植時に ESCs シートを展開する必要がある。当初 cellshifter[®]を用いて ESCs シートを ADMSCs シート上に移植することを計画していたが、cellshifter[®]の物理刺激により ADMSCs シートが剥離収縮してしまうことが判明した。そのため、upcell[®]で培養中の ADMSCs シートに充分量の培養液を満たし、回収した ESCs シートを培養液中に浮遊させた状態で展開し、愛護的に培養液を吸引除去することで ADMSCs シートを剥離することなく、積層化した ME シートを作成することに成功した。ADMSCs シートの強度を確保するため、播種後 9 日間培養した ADMSCs シートを用いた場合において積層化成功率が最も良好であった。ESCs シートおよび ADMSCs シートそれぞれの培養中の培地を回収し、各種サイトカインの分泌量を比較

図 2. ME シート作成法

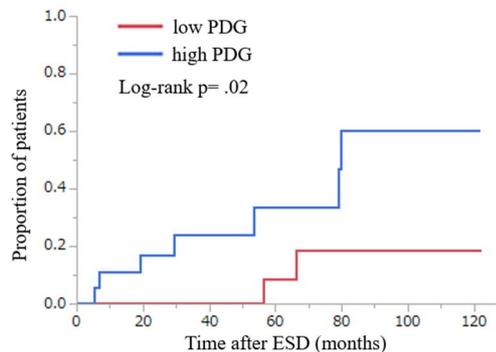


検討した。培養液は 24 もしくは 48 時間毎に回収されるが、いずれの培養液においても各種サイトカイン濃度に有意差は認められなかったため、以後の ME シート作成においては、ADMSCs シートは播種後 9 日、ESCs シートは播種後 14 日目で回収、積層化することとした。

また、回収した ME シートはホルマリン包埋後薄切し、切片において接着を確認した。算出した平均接着(積層化)面積は 19.5mm² であり、想定より小さいものとなった。原因としては上記方法をもちいても積層化時に ESCs シートの収縮を抑制するのが困難であり、また積層化後に ESCs シートの収縮を復元させることが困難であることによる。今後も積層法の改善が必要と考えられた。上記の如く本研究で製造可能であった ME シートは小径であることから、比較的広範囲の粘膜切除が臨床上的の問題となる食道の内視鏡治療後ではなく、小範囲の粘膜切除であっても治療後の癒痕による咽頭変形が臨床上的の問題となり、咽頭の複雑な構造から、より小径の上皮シートの移植が求められている咽頭領域でより有用であると考えられたため、咽頭腫瘍に対する ESD 後の癒痕拘縮に伴う咽頭変形予防を念頭とした前臨床試験を施行することとした。

臨床的な問題点を明確にするために、岡山大学病院で咽頭 ESD を施行し、1 年以上の追跡が可能であった 52 症例について、治療退院後の誤

図 3.

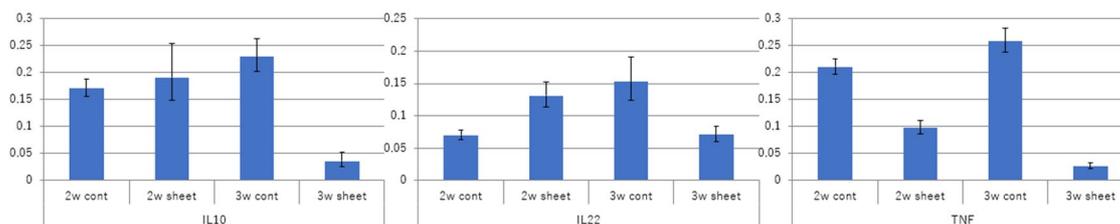


Number at risk	0	20	40	60	80	100	120
low PDG	34	32	16	12	4	4	3
high PDG	18	15	9	7	4	2	2

嚥性肺炎発症と咽頭変形の程度の関連性について解析したところ、全症例における嚥性肺炎の術後 3 年累積発症率は 9.0%であったが、術後癒痕による咽頭変形が高度であった症例は 23.9%(95%CI, 9.2-49.5%)、変形が軽度であった症例は 0%であり有意に高率に嚥性肺炎を生じていることが判明し(図 3.) 本結果を論文発表した。以上より本研究において作成された ME シートを用いて咽頭変形を抑制することによって、長期的な嚥性肺炎の抑制につながることを期待された。

大動物をもちいた前臨床研究として、NIBS 系ミニプタの下咽頭粘膜を ESD で切除し、術後の潰瘍底に ME シートを移植して癒痕収縮抑制効果および抗炎症サイトカイン等の創傷治癒に関する因子の変化を解析する計画を立てた。以前の研究でミニプタの下咽頭切除、癒痕拘縮モデルは作成済みであるため、今回の研究の目的は ME シートの相乗効果を測定することであるために、粘膜切除後に ESCs シートを移植したものをコントロールとして比較検討する方針とした。移植後 2 週および 3 週後に犠牲死させ咽頭を摘出すると、ESCs シート移植群では組織の収縮が抑制されたうえで潰瘍の再上皮化が 3 週時点ではほぼ完了しているのに対して、コントロール群では組織の収縮が進む一方、再上皮は遅れていた。ESD 後潰瘍/癒痕組織を用いて RT-PCR を施行すると、抗炎症サイトカインとして測定した IL10、IL22 はコントロール群では 2 週目から 3 週目にかけて増加傾向であったのに対し、ESCs シート移植群では減少傾向となっており、炎症性サイトカインとして測定した TNF α はシート移植群では 2, 3 週と減少傾向であったが、コントロール群ではむしろ増加傾向を認めた(図 4.)。これらの結果から ESCs シートは創傷治癒を促進するとともに組織の癒痕拘縮も抑制していると考えられた。今後この結果をもとに ME シートを用いて相乗効果を検討していく予定である。

図 4.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Abe Makoto, Kawahara Yoshiro, Obayashi Yuka, Baba Yuki, Hamada Kenta, Sakae Hiroyuki, Kono Yoshiyasu, Kanzaki Hiromitsu, Iwamuro Masaya, Kawano Seiji, Makino Takuma, Noda Yohei, Marunaka Hidenori, Okada Hiroyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Degree of pharyngeal deformation caused by pharyngeal endoscopic submucosal dissection is associated with the incidence of aspiration pneumonia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Endoscopy International Open	6. 最初と最後の頁 E351 ~ E357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/a-2033-9707	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujino Akihiro, Fuchimoto Yasushi, Mori Teizaburo, Kano Motohiro, Yamada Yohei, Ohno Michinobu, Baba Yoshiyuki, Isogawa Nobutaka, Arai Katsuhiko, Yoshioka Takako, Abe Makoto, Kanai Nobuo, Takagi Ryo, Maeda Masanori, Umezawa Akihiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Evaluation of safety and efficacy of autologous oral mucosa-derived epithelial cell sheet transplantation for prevention of anastomotic restenosis in congenital esophageal atresia and congenital esophageal stenosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-023-03321-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirai Ryosuke, Kinugasa Hideaki, Yamamoto Shumpei, Ako Soichiro, Tsutsumi Koichiro, Abe Makoto, Miyahara Koji, Nakagawa Masahiro, Otsuka Motoyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Methylation analysis of DCC gene in saliva samples is an efficient method for non-invasive detection of superficial hypopharyngeal cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-024-02654-2	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 -

1. 著者名 Abe Makoto, Kawahara Yoshiro, Obayashi Yuka, Baba Yuki, Hamada Kenta, Sakae Hiroyuki, Kono Yoshiyasu, Kanzaki Hiromitsu, Iwamuro Masaya, Kawano Seiji, Makino Takuma, Noda Yohei, Marunaka Hidenori, Okada Hiroyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Degree of pharyngeal deformation caused by pharyngeal endoscopic submucosal dissection is associated with the incidence of aspiration pneumonia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Endoscopy International Open	6. 最初と最後の頁 E351 ~ E357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-2033-9707	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0件

〔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
---------	---------