



Title	ブタ食道内視鏡的粘膜下層剥離術後の狭窄モデルに対するヒト羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清投与による狭窄予防効果 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	水島, 健
Description	配架番号 : 2321
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12580号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65939
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Takeshi_Mizushima_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 水島 健

学 位 論 文 題 名

ブタ食道内視鏡的粘膜下層剥離術後の狭窄モデルに対する
ヒト羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清投与による狭窄予防効果

(Oral administration of conditioned medium obtained from mesenchymal stem cell culture
prevents subsequent stricture formation after esophageal submucosal dissection in pigs)

【背景と目的】

食道表在癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術（Endoscopic submucosal dissection; ESD）は、食道癌診断・治療ガイドラインでは病変の大きさに制限がなくなり、その適応が拡大されたが、広範囲の剥離は術後狭窄をきたし、患者の QOL の低下を引き起こすリスクがある。現状の実地臨床では、バルーン拡張やステロイドを用いての狭窄予防が行われているが、それらの治療に伴う偶発症、有害事象が問題となることがある。一方、間葉系幹細胞は新しい再生医療材料ソースとして注目されており、出産後に破棄される羊膜からも大量に細胞を得ることが可能である。また、間葉系幹細胞からは炎症抑制や組織再生に関与する様々な液性因子が分泌されており、細胞培養上清（Conditioned medium : CM）による *in vivo* での炎症抑制作用も報告されている。そこで本研究では、ヒト羊膜由来間葉系幹細胞（AMSC : amnion-derived mesenchymal stem cell）から得られた CM（MSC-CM; CM obtained from MSCs）に着目して、食道 ESD 後の狭窄モデルに対する MSC-CM 投与による狭窄予防効果を検討し、さらに病態改善のメカニズムや MSC-CM の抗炎症効果の機序を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

まず始めに、国際細胞治療学会(ISCT; International Society for Cell Therapy)が提唱している MSC の定義に従い、AMSC の脂肪細胞、骨細胞への分化誘導実験および、フローサイトメトリーによる AMSC の表面抗原の解析を行なった。続いて、豚の食道に亜全周性の ESD を行い狭窄モデルの作成を行い、食道 ESD の 3 週間後に安楽死させて、食道粘膜の狭窄率および病理学的検討を行なった。CM はカルボキシメチルセルロースを用いて 5%濃度のゲルにして、内視鏡下に ESD 直後の潰瘍面に塗布した。ゲルを週に 1 回、3 週投与する weekly-CM 群(CM-W)、ESD 後より 4 日間経口投与を行なう daily-CM 群(CM-D)、ステロイド局注群およびコントロール群の 4 群で検討した。また、潰瘍治癒急性期の評価を目的とし、食道 ESD 施行後 1 週間での病理学的検討も行なった。ESD 後よりゲルを 1 週間連日経口投与する CM 群、ステロイド局注群およびコントロール群の 3 群で検討した。

【結果】

分化誘導実験では AMSC は脂肪細胞および骨細胞への分化能を有することが確認でき、また、フローサイトメトリーでは、MSC 陽性マーカーである CD44、CD73、CD90、CD105 の発現を認めた。以上より本実験で使用した AMSC は、国際細胞治療学会 (ISCT; International Society for Cell Therapy) が提唱している MSC の定義を満たしていることを確認した。続いて、MSC-CM 投与による食道 ESD 後の狭窄予防効果に関する結果は、まず、食道粘膜の狭窄率は CM-W、CM-D 群及びステロイド群でコントロール群と比べ有意に狭窄を予防した (56.3 ± 7.1 、 52.3 ± 4.7 、 49.3 ± 4.2 vs $80.0 \pm 2.0\%$)。病理学的検討では、活性化筋線維芽細胞の数 (26.8 ± 8.6 、 21.5 ± 4.9 、 20.6 ± 2.3 vs 68.3 ± 5.7 cells/HPF) と膠原線維の浸潤距離 (833 ± 26 、 987 ± 145 、 944 ± 251 vs 1609 ± 418 μm) において CM-W、CM-D 群およびステロイド群がコントロール群と比べ有意に抑制されていた。急性期の評価では、マクロファージ (13.2 ± 1.7 、 22.6 ± 2.5 vs 33.9 ± 2.8 cells/HPF) と好中球の浸潤 (31.7 ± 5.9 、 22.7 ± 4.5 vs 68.1 ± 14.2 cells/HPF) が CM 群及びステロイド群でコントロール群と比べ有意に減少した。

【考察】

本研究では、食道 ESD 後の狭窄モデルに対する MSC-CM 投与による狭窄予防効果を検討し、以下の 4 つの結果が得られた。(1)食道 ESD 後狭窄は、食道壁内での線維化の程度に関連していた。(2)CM ゲルの投与が食道 ESD 後の狭窄を予防した。(3)CM ゲルによる治療は、実地臨床で使用され、その有用性も報告されているステロイド治療と比べ、ほぼ同等の狭窄予防効果を示した。(4)CM ゲルは、ESD 後の線維化、筋線維芽細胞の活性、そして、好中球およびマクロファージの浸潤を抑制した。

食道 ESD 後に狭窄をきたす原因としては、食道壁内の炎症と線維化により、食道自体の弾性が低下するためと報告されている。特に、線維化は、その大部分がコラーゲンで構成されており、創傷治癒の過程で、筋線維芽細胞が活性化されコラーゲンを分泌し、そのコラーゲンが過剰に堆積した結果として線維化が引き起こされるとされている。それに加え、組織損傷部において、好中球とマクロファージが $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{TGF-}\beta$ 、 $\text{IL-1}\beta$ などの炎症性サイトカインを分泌し、それらのサイトカインの刺激により、線維芽細胞が筋線維芽細胞へと分化誘導される。以上より、食道 ESD 後狭窄の予防には、線維化の抑制が必要であり、線維化を抑制するためには、炎症期における好中球やマクロファージなどの炎症細胞を抑制し、それによって筋線維芽細胞の活性を抑えることで、線維化の抑制が可能であると仮説をたて、MSC から分泌される液性因子を含んだ CM を使用した。そして、今回の実験結果から、食道 ESD 後の狭窄は、炎症急性期にマクロファージ、好中球浸潤が起これ、それに続く時期に筋線維芽細胞の活性化が起これ、線維化が促進された結果として狭窄が起これと考えられ、本実験当初の仮説と一致した実験結果を得ることができた。

【結論】

MSC-CM はマクロファージや好中球の浸潤を抑制し、それに引き続く筋線維芽細胞の活性化を抑制することで線維化を抑制し、食道 ESD 後の狭窄を予防することが可能であった。また、実地臨床で狭窄予防として使用されているステロイドとも同等の治療効果が認められ、非常に期待できる予防法であると考えられる。