



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12580
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65940
Type	doctoral thesis
File Information	Takeshi_Mizushima.pdf



学 位 論 文

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)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

水 島 健

学 位 論 文

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)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

水 島 健

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	5-6 頁
実験方法	7-18 頁
実験結果	19-38 頁
考察	39-42 頁
総括	43 頁
謝辞	44 頁
引用文献	45-50 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究を以下の論文に発表した

1. Takeshi Mizushima, Shunsuke Ohnishi, Hidetaka Hosono, Kenichi Yamahara, Momoko Tsuda, Yuichi Shimizu, Mototsugu Kato, Masahiro Asaka, Naoya Sakamoto
“Oral administration of conditioned medium obtained from mesenchymal stem cell culture prevents subsequent stricture formation after esophageal submucosal dissection in pigs”
Gastrointestinal Endoscopy in revision

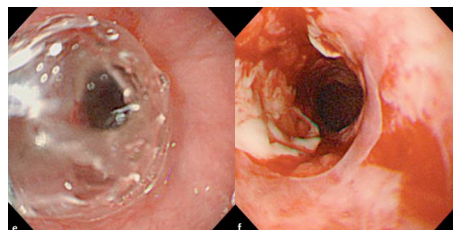
本研究の一部は以下の学会に発表した

1. Takeshi Mizushima, Shunsuke Ohnishi, Hidetaka Hosono, Momoko Tsuda, Ono Masayoshi, Reizo Onishi, Mototsugu Kato, Naoya Sakamoto
“Prevention of subsequent stricture formation after esophageal endoscopic submucosal dissection using conditioned medium obtained from amnion-derived mesenchymal stem cell culture”
Digestive Disease Week 2016
2016/5/21-2016/5/24, San Diego, United State
2. Takeshi Mizushima, Shunsuke Ohnishi, Hidetaka Hosono, Momoko Tsuda, Reizo Onishi, Naoya Sakamoto
“Oral administration of conditioned medium obtained from mesenchymal stem cell culture prevents subsequent stricture formation after esophageal submucosal dissection in pigs”
United European Gastroenterology Week 2016
2016/10/15-2016/10/19, Vienna, Austria
なお、同学会において Oral Free Paper Prize を受賞した。

緒 言

食道癌は、世界におけるその罹患率が第8位であり、死亡率に関しては第6位となっており、世界中で年間約40万人が亡くなっている¹。食道癌に対する治療法としては外科手術、放射線療法あるいは化学療法が行なわれてきたが、その侵襲は非常に大きい。一方で、早期の食道癌に対しては、低侵襲治療である内視鏡的治療が選択されることが多い²。早期の消化管悪性腫瘍に対しての内視鏡治療として、内視鏡的粘膜下層剥離術（Endoscopic submucosal dissection; ESD）が日本で開発された。従来、主流であった内視鏡治療である内視鏡的粘膜切除術（Endoscopic mucosal resection; EMR）は、病変の局在によっては切除が困難であったり、分割切除となり局所再発をきたす症例も少なくはなかったが、ESDは腫瘍の部位や大きさに関わらず一括切除が可能であり、その根治性と低侵襲性により、ESDは世界中で急速に普及してきている³⁻⁶。腫瘍の大きさに制限されないESD技術は目覚ましい進歩を遂げているが、その反面、大きな病変に対してESDを行なうと、術後の創傷治癒過程で瘢痕狭窄をきたすことがある^{7,8}。特に、食道癌に対してのESDの場合は、胃や大腸と比べると食道の管腔は狭く、術後狭窄をきたし易い。特に食道管腔の短軸方向に3/4周性以上の粘膜下層剥離を行なうと、術後に高率に瘢痕狭窄を引き起こす⁹。一旦、狭窄をきたすと、患者は経口摂取が困難となり、その狭窄を解除するために、内視鏡的バルーン拡張術を繰り返し必要とする場合があり、更に患者のquality of life (QOL)を低下させる原因となる。実地臨床において、食道ESD後の狭窄予防の治療としては、内視鏡的バルーン拡張術¹⁰、ステロイドの潰瘍面の粘膜下層への局注¹¹、ステロイドの内服¹²による治療が行なわれており、その有用性が報告されている。しかし、これらの治療は狭窄予防に有効であるが、一方で、治療に伴う偶発症や副作用にも十分な注意が必要である。内視鏡的バルーン拡張術に関しては、予防的に拡張を行なう群と拡張を行なわない群との比較検討が報告されており、前者の狭窄発生率は59%、後者では92%であり、統計学的に有意差を認めている¹⁰。バルーン拡張に伴う偶発症として、穿孔と出血が挙げられる。穿孔は9%、出血は1.3%と報告されているが¹³、食道穿孔をきたした場合は、重篤化すると生命に関わる可能性もあり慎重な対応が必要となる。

内視鏡的バルーン拡張による食道穿孔¹³



ステロイドによる治療は、ESD 後に残存した粘膜下層へステロイドを注入する局所的な治療と、内服による全身投与の 2 種類に分けられる。ステロイド局注療法は、治療群と非治療群で比較した場合、それぞれ狭窄率が 10%、66%と報告されている¹¹。しかし、偶発症として縦隔膿瘍¹⁴や遅発性の食道穿孔¹⁵のリスクを有する。ステロイド内服療法は、治療群で狭窄率が 5.3%と、非治療群と比べ有意に低かったと報告されているが、ステロイド内服による免疫抑制、消化性潰瘍などの副作用が懸念される¹⁶。そこで、より安全な狭窄予防に対する新規治療法の開発が必要であると考えられる。そして、近年の動向としては、自己口腔粘膜を採取して細胞シートを作成し、それを ESD 潰瘍面へ貼付けることで狭窄を予防する、いわゆる再生医療も行なわれる時代となってきた¹⁷。

近年、臓器障害の修復や、難治性疾患に対しての再生医療が世界中で注目され、特に、幹細胞を用いた細胞治療は新規の治療として期待されている。胚性幹細胞（ES 細胞; embryonic stem cell）や人工多能性幹細胞（iPS 細胞; induced pluripotent stem cell）などがあるが、間葉系幹細胞（MSC; mesenchymal stem cell）も新しい再生医療材料として注目されてきている。MSC は非造血系の未分化細胞であり、自己複製能を有するのみではなく、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、筋細胞、神経細胞などの中胚葉系の様々な組織へ分化する能力も有した体性幹細胞である^{18,19}。さらに、MSC は多くの組織に存在することが知られており、有用な細胞ソースとして様々な研究が行なわれている²⁰。そして、近年は多種の増殖因子や、抗炎症因子を産生して、障害を受けた組織の再生を促す能力にも注目されている^{21,22}。MSC は間葉系組織に存在していると考えられており¹⁸、再生医療ソースとしては骨髓由来の MSC が多く使用されている。しかし、骨髓から採取する場合には、身体への侵襲を伴い、且つ、一度に採取可能な細胞数は少量であることから、移植に十分な細胞数を確保するには一定期間、MSC を培養する必要がある。さらに、加齢に伴い MSC の増殖能は低下するため^{23,24}、高齢者から採取する場合や、様々な疾患を有する患者から採取する場合などは、治療に必要な高品質な細胞を得ることが困難な場合が多い。そこで、新たな細胞ソースとして羊膜に注目した。胎児を包む卵膜は、羊膜と絨毛膜から構成されており、特にヒトの羊膜には非常に豊富な MSC が含まれており、若い細胞を大量に獲得することが可能である²⁵。また卵膜自体は出産後に医療廃棄物として廃棄されるために、倫理的な問題も軽減できる。さらに羊膜は膜状構造であるため、用手的に羊膜と絨毛膜を分離することが可能であり、また、酵素処理を行なうことで容易に MSC を分離、培養できるメリットがある。羊膜由来の MSC（AMSC ; amnion-derived MSC）は、下肢虚血モデル²⁶、心筋炎モデル^{27,28}、糸球体腎炎モデル²⁹、腎虚血再灌流障害モデル³⁰、重症腸炎モデル³¹、放射線性直腸炎モデル³²、膵炎モデル³³、肝硬変モデル³⁴などの疾患の動物モデルで血管新生促進や抗炎症効果を発揮することで病態を改善させるこ

とが明らかとなってきた。また、MSC 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 (CM; conditioned medium) に、それらの因子が蓄積されており、*in vivo* での炎症抑制作用も報告されている^{35,36}。

そこで本研究では、AMSC 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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AMSC: amnion-derived mesenchymal stem cell

ANOVA: analysis of variance

APC: allophycocyanin

CD: cluster of differentiation

CM: conditioned medium

CM-D: conditioned medium gel daily

CM-W: conditioned medium gel weekly

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EMR: endoscopic mucosal resection

ESD: endoscopic submucosal dissection

FACS: fluorescence activated cell sorter

FBS: fetal bovine serum

FITC: fluorescein isothiocyanate

HLA: human leukocyte antigen

HPF: high power field

IL: interleukin

ISCT: international society for cell therapy

LPF: low power field

MEM: minimal essential medium

MHC: major histocompatibility complex

MPO: myeloperoxidase

MSC: mesenchymal stem cell

MSC-CM: CM obtained from AMSCs

PBS: phosphate-buffered saline

PE: phycoerythrin

PGE2: prostaglandin E2

ROI: region of interest

SD: standard deviation

SM: standard medium

SMA: smooth muscle actin

TGF: transforming growth factor

TNF: tumor necrosis factor

実験方法

1. 羊膜由来間葉系幹細胞の分離・培養

試薬及び材料

Collagenase	(Nippi, Tokyo, Japan)
Dispase I	(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)
FBS	(Life Technologies, Carlsbad, MD, USA)
MEM-alpha	(Life Technologies)
PBS	(Life Technologies)
Gentamicin	(MSD, Tokyo, Japan)
0.5% trypsin-EDTA	(Life Technologies)

卵膜の採取は北海道大学大学院医学研究科における倫理委員会の承認を得て行った(承認番号: 8)。また卵膜を提供して頂いた全ての妊婦の同意を得て行った。

帝王切開で胎児を娩出後、剪刀で卵膜を 5 cm 四方に切り、用手的に羊膜と絨毛膜に分けた。羊膜を PBS で洗浄後、collagenase (40 µg/ml) と dispase I (200 PU/ml) を添加し 37°C で 1 時間振盪させ、結合組織を消化し細胞を分離した。10% FBS、gentamicin (40 µg/ml) を添加した MEM-alpha を用いて 15 cm uncoated plastic dish に播種し、室温 37°C・湿度 95%・5% 二酸化炭素濃度下で培養を行った。細胞が 80% confluent になるまで、3-4 日毎に MEM-alpha を交換し、接着していない浮遊細胞を除いた。継代は 0.5% trypsin-EDTA を用いて接着細胞を剥離し、新たな培養皿に 1.0×10^6 cells/cm² の濃度で播種し培養を継続した。

2. ヒト羊膜由来間葉系幹細胞の脂肪細胞・骨細胞への分化誘導

2-1 脂肪分化誘導

試薬及び材料

hMSC Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium	(Lonza, Basel, Switzerland)
FBS	(Life Technologies)
PBS	(Life Technologies)
MEM-alpha	(Life Technologies)
penicillin	(Wako Pure Chemical Industries)
streptomycin	(Wako Pure Chemical Industries)
Oil Red O	(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
2-propanol	(Wako Pure Chemical Industries)

4% paraformaldehyde phosphate buffer solution

(Wako Pure Chemical Industries)

2 継代目のヒト羊膜由来間葉系幹細胞 (AMSC; amnion-derived mesenchymal stem cell) 1×10^5 個を 6-well plate に播種し、10% FBS・penicillin (100 U/ml)・streptomycin (100 mg/ml) を添加した MEM-alpha を用いて 80%-90% confluent になるまで培養した。その後 PBS で洗浄を行い、分化誘導培地 hMSC Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium を用いて培養を行い、分化誘導を開始した。その後、3 日毎に分化誘導培地を交換し、誘導開始 3 週間後に Oil Red O*染色液で染色し観察を行った。

それぞれの well を PBS で洗浄後、4% paraformaldehyde phosphate buffer solution を用いて 4°C 下で 60 分間浸漬した。その後、PBS で洗浄し、60% 2-propanol で 1 分間浸漬し、Oil Red O 染色液を用いて室温下で 20 分間浸漬した。続いて、60% 2-propanol で洗浄後に PBS で洗浄を行い、PBS を浸漬した well を光学顕微鏡 IX70 (Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

* Oil Red O 染色液の作製は以下の手順で行なった。

Oil Red O 75 mg を 25 ml の 100% 2-propanol に溶解し、distilled water を用いて 60% 濃度に希釈し作製した。

2-2 骨分化誘導

試薬及び材料

hMSC Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium

(Lonza, Basel, Switzerland)

FBS (Life Technologies)

PBS (Life Technologies)

MEM-alpha (Life Technologies)

penicillin (Wako Pure Chemical Industries)

streptomycin (Wako Pure Chemical Industries)

Alizarin Red S (Sigma-Aldrich)

2-propanol (Wako Pure Chemical Industries)

4% paraformaldehyde phosphate buffer solution

(Wako Pure Chemical Industries)

5 継代目の 1×10^5 個の AMSC を 6-well plate に播種し、10% FBS・penicillin (100 U/ml)・streptomycin (100 mg/ml) を添加した MEM-alpha を用いて 80%-90% confluent になるまで培養した。その後 PBS で洗浄を行い、分化誘導培地 hMSC Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium を用いて培養を行い、分化誘導を開始した。その後、3 日毎に分化誘導培地を交換し、誘導開始 2 週間後に Alizarin Red S* 染色液で染色し観察を行った。

それぞれの well を PBS で洗浄後、4% paraformaldehyde phosphate buffer solution を用いて 4°C 下で 30 分間浸漬した。その後、PBS で洗浄し、Alizarin Red S** 染色液を用いて室温下で 10 分間浸漬した。PBS で洗浄を行い、PBS を浸漬した well を光学顕微鏡 IX70 で観察した。

** Alizarin Red S 染色液の作製は以下の手順で行なった。

Alizarin Red S 3.5 g を distilled water 25 ml に溶解し、1,500rpm で 3 分間遠心後、その上清を回収し作製した。

3. Flow Cytometry 法による AMSC の表面抗原解析

緩衝液の組成

FACS Buffer 0.5% BSA+0.05% NaN₃/PBS (-)

試薬及び材料

0.5% trypsin-EDTA	(Life Technologies)
FBS	(Life Technologies)
PBS	(Life Technologies)
MEM-alpha	(Life Technologies)
penicillin	(Wako Pure Chemical Industries)
streptomycin	(Wako Pure Chemical Industries)

抗体

Human MSC Analysis Kit

(Becton, Dickinson (BD) and Company Franklin Lakes, NJ, USA)

APC mouse anti-human CD73 抗体	(BD)
FITC mouse anti-human CD90 抗体	(BD)
PE mouse anti-human CD44 抗体	(BD)
PerCP-Cy5.5 mouse anti-human CD105 抗体	(BD)
PE hMSC negative cocktail	(BD)
CD34-PE	
CD11b-PE	

CD19-PE
CD45-PE
HLA-DR-PE

AMSC を培養中の皿を PBS で洗浄後、0.5% trypsin–EDTA を添加し、37°C 下で 3 分間 incubate した。その後、10% FBS・penicillin (100 U/ml)・streptomycin (100 mg/ml) を添加した MEM-alpha を加え、trypsin を不活性化させた。その懸濁液を 1,500 rpm で 3 分間遠心し、上清を吸引除去した後に、FACS buffer、500ml で洗浄した。濃度が 1×10^7 cells/ml になるよう FACS buffer で調整し、microtube に 100 μ l ずつ分注した。抗体を各 microtube に加え、室温、暗条件で 30 分間培養した後、FACS buffer 500 μ l で 2 度洗浄し、FACS buffer 300 μ l で再懸濁し、flow cytometer (FACS Canto II, BD)を用いて解析した。

上記抗体を以下の希釈濃度で使用した。

CD73	(dilution, 1:20)
CD90	(dilution, 1:20)
CD44	(dilution, 1:20)
CD105	(dilution, 1:20)
negative cocktail	(dilution, 1:5)

MSC の定義は以下のごとくである ³⁷

< Summary of criteria to identify MSC >

1	Adherence to plastic in standard culture conditions		
2	Phenotype	Positive ($\geq 95\% +$)	Negative ($\leq 2\% +$)
		CD105	CD45
		CD73	CD34
		CD90	CD14 or CD11b
			CD79 α or CD19
			HLA-DR
3	In vitro differentiation : osteoblasts, adipocytes, chondroblasts (demonstrated by staining of in vitro cell culture)		

4. 動物

メーカーより以下の動物を購入し実験を行なった。

三元交配ブタ 20kg メス (Sankyo Labo Service, Tokyo, Japan)

実験プロトコールは「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に則り、北海道大学動物実験委員会の承認を得た。

三元交配ブタを室温 24°C に維持された、12 時間明期-12 時間暗期の明暗サイクルの飼育環境のもと不断給餌下で、1 ケージあたり 1 頭のブタを飼育した。

5. ヒト羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清 (CM; conditioned medium) の回収 試薬及び材料

FBS	(Life Technologies)
PBS	(Life Technologies)
MEM-alpha	(Life Technologies)
penicillin	(Wako Pure Chemical Industries)
streptomycin	(Wako Pure Chemical Industries)

3 継代目の AMSC を 15 cm uncoated plastic dish に播種し、10% FBS・penicillin (100 U/ml)・streptomycin (100 mg/ml) を添加した MEM-alpha; 20ml を用いて 80%-90% confluent になるまで培養した。その後、上清を吸引除去し、PBS で合計 3 回の洗浄を行い、FBS は入れず、penicillin (100 U/ml)・streptomycin (100 mg/ml) のみを添加した MEM-alpha; 20ml を用いて 48 時間培養を継続した。48 時間後に 15 cm dish から CM を吸引して、50ml チューブに回収した。回収した CM を 2,500 rpm、室温で 5 分間遠心し、最終的な CM として回収した。

6. ヒト羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清ゲルの作成 (MSC-CM gel; CM obtained from AMSCs gel)

試薬及び材料

Carboxymethyl cellulose	(CMC, Wako Pure Chemical Industries)
-------------------------	--------------------------------------

実験 5 で回収した CM; 20ml に対して 1g の carboxymethyl cellulose を混ぜあわせて、濃度が 5% の MSC-CM gel を作成した。また、FBS は入れず、penicillin (100 U/ml)・streptomycin (100 mg/ml) のみを添加した MEM-alpha; 20ml に 1g の carboxymethyl cellulose を混ぜあわせて、同様に 5% 濃度の standard medium (SM) gel をコントロールとして作成した。

7. 食道内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD; endoscopic submucosal dissection)

後の食道狭窄ブタモデルの作成

試薬及び材料

Midazolam	(20 mg, Astellas, Tokyo, Japan)
Buprenorphine hydrochloride	(0.2 mg, Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan)
Sevoflurane	(Maruishi Pharmaceutical, Osaka, Japan)
Glyceol solution	(Chugai Pharmaceutical, Tokyo, Japan)
Normal saline solution	(Otsuka Pharmaceutical, Tokushima, Japan)

ブタに対して、麻酔前投薬として midazolam; 20 mg、buprenorphine hydrochloride; 0.2 mg の筋肉内注射を行い鎮静し、続いて 5% の sevoflurane で吸入麻酔を行なった。引き続き、5 mm (Smiths medical, Tokyo, Japan) の挿管チューブを用いて気管内挿管を行い、3% の sevoflurane で維持麻酔を行なった。また、耳後静脈よりルートを確保して生理食塩水を持続静注し、全身麻酔下に ESD を開始した。全身麻酔中は心拍数、心電図、SpO₂ を動物用モニターで監視した (Nihon Kohden, Tokyo, Japan)。全てのブタ実験で上部内視鏡 (GIF-Q240, Olympus, Tokyo, Japan) の先端にアタッチメント (Top, Tokyo, Japan) を装着して ESD を施行した。

続いて食道 ESD の方法を記す。仮想の病変を作成して ESD を行なった。

- ① 仮想病変の長軸は切歯列から 35~40cm、周在性は亜全周性と想定し、flush knife BT (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて、食道粘膜に仮想病変のマーキングを行なった。
- ② 25-gauge の局注針 (Top) を用いて、glyceol をマーキング近傍の食道粘膜下層に注入し粘膜下層に膨隆を作り、flush knife BT 及び IT nano knife (Olympus) で全周性に粘膜切開を行なった。
- ③ 引き続き、適宜、glyceol を粘膜下層に局注して、IT nano knife で粘膜下層の剥離を行い ESD を終了した。

なお、高周波電源装置 (ESG-100, Olympus) は以下の設定で手技を行なった。

粘膜切開	Pulse cut slow mode (40W)
粘膜下層剥離術	Forced coagulation mode (50W)
止血	Soft coagulation mode (40W)

全てのブタは ESD 翌日から飲水を開始して、第 2 病日の朝より食事を開始した。

8. 食道 ESD 後ブタ狭窄モデルを用いた実験プロトコール

以下の2つのプロトコールで実験を行なった。

8-1 ブタを以下の4群に分けて実験を行なった。

- ①コントロール群 (n=3)、②CM gel 隔週投与群 (n=3)、③CM gel 連日投与群 (n=3)、④ステロイド局注群 (n=3)

① Standard medium gel weekly (SM)

ESD 直後 (day1)、day8、day15 の潰瘍面に 20ml の SM を塗布した。

② Conditioned medium gel weekly (CM-W)

Day1、day8、day15 の潰瘍面に 20ml の CM を塗布した。

③ Conditioned medium gel daily (CM-D)

Day1 は 20ml の CM を ESD 直後に塗布し、day2-day4 では 40ml の CM gel を 1 日 2 回(朝・夕)に分けて経口投与を行なった。

④ Steroid injection

Day1 に残存している粘膜下層に、合計 80mg の triamcinolone acetonide を 8 か所に分けて局注した。

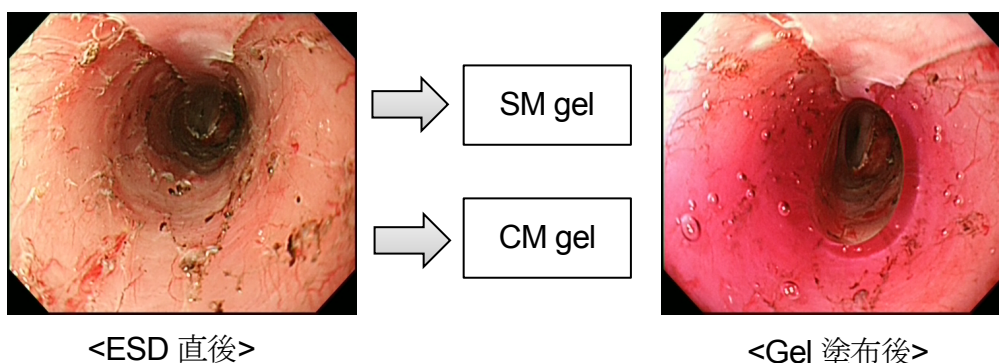
Day22 に全てのブタを全身麻酔下に KCL を用いて安楽死させ、食道の採取を行なった (下図)。



※ CM gel の運搬法および steroid の局注法を以下に示す。

18F のチューブ(Terumo, Tokyo, Japan)を上部内視鏡に沿わせ、テープで固定した。その後に、内視鏡を ESD 直後の潰瘍面まで挿入し、20ml の SM gel および CM gel をチューブから潰瘍面に直接塗布した。

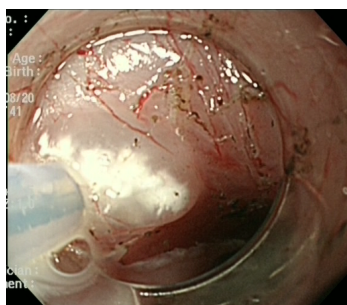




20ml の CM gel をシリンジを使用して、直接ブタに経口投与を行なった。1 日 2 回の経口投与とした。



40mg/mL の triamcinolone acetonide (Bristol-Myers Squibb, New York, New York, USA)を 2 バイアルと生理食塩水 3ml と混ぜあわせ合計 80mg とした。25-gauge の局注針 (Top)を用いて、粘膜下層剥離後のわずかに残存している粘膜下層に慎重に直接注入した。注入箇所は 8～10 ヶ所に分けて局注を行なった。



8-2 ブタを以下の3群に分けて実験を行なった。

①コントロール群 (n=3)、②CM gel 群 (n=3)、③ステロイド局注群 (n=3)

① Standard medium gel (SM)

Day1 は 20ml の SM を ESD 直後に内視鏡を用いて塗布し、day2-day7 では 40ml の SM gel を 1 日 2 回(朝・夕)に分けて経口投与を行なった。

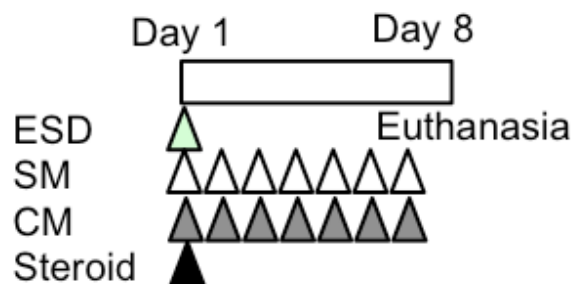
② Conditioned medium gel (CM)

Day1 は 20ml の CM を ESD 直後に内視鏡を用いて塗布し、day2-day7 では 40ml の CM gel を 1 日 2 回(朝・夕)に分けて経口投与を行なった。

③ Steroid injection

Day1 に残存している粘膜下層に、合計 80mg の triamcinolone acetonide を 8～10 箇所に分けて局注した。

Day7 に全てのブタを全身麻酔下に KCL を用いて安楽死させ、食道の採取を行なった(下図)。



9. 食道 ESD 後狭窄の程度の評価

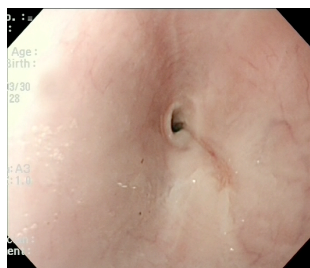
8-1 のプロトコールと同様に、全てのブタを day22 に安楽しさせ、頸部および腹部を切開して食道へアプローチした後に食道を抜去した。抜去した食道を長軸方向に切開し、コルク板に食道を自然に開いた形でピンで固定した。食道狭窄の程度の評価法としては以下の計算式を用いて狭窄率を算出した³⁸。

Mucosal constriction rate (%) =

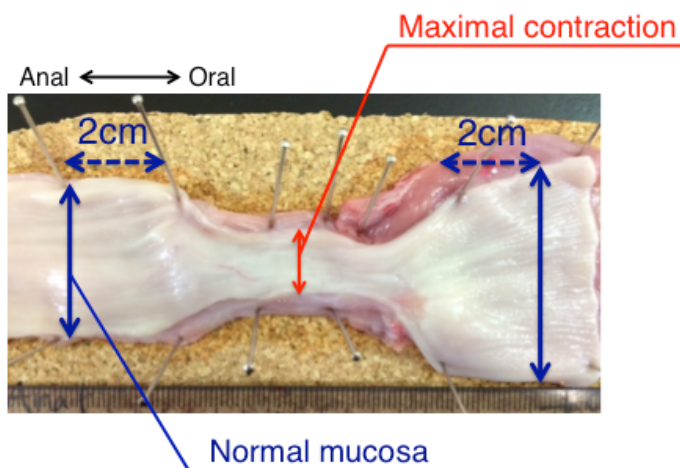
$[1 - (\text{length of short axis at site of maximal constriction}$

$/ (\text{length of short axis at a normal mucosal site on upper side} + \text{length of short axis at a}$

$\text{normal mucosal site on lower side}) / 2] \times 100.$



Day22 after ESD



10. 食道 ESD 後狭窄ブタモデルにおける食道病理組織学的評価

10-1 Masson-trichrome 染色

試薬および材料

Formaldehyde saline

(Wako Pure Chemical Industries)

Masson-trichrome

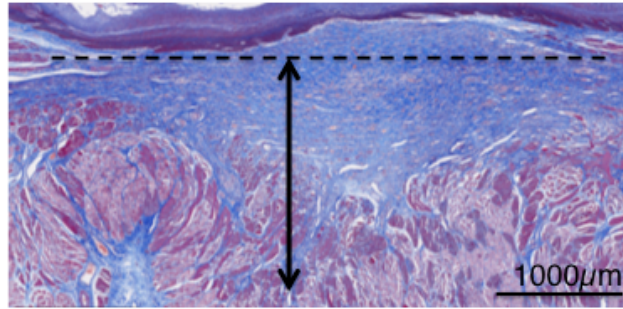
(Muto Pure Chemicals)

コルク板に貼付けた標本を 40 g/l formaldehyde saline で固定を行ない、paraffin で包埋し、薄切して 5 μ m 厚の切片を作成した。作成する切片は食道の短軸方向の切片とした。ESD 後の狭窄部における線維化の程度を、浸潤の厚さとして測定した。また、食道内輪筋の萎縮の程度の評価も行なった。染色法は masson-trichrome 染色を施行した。

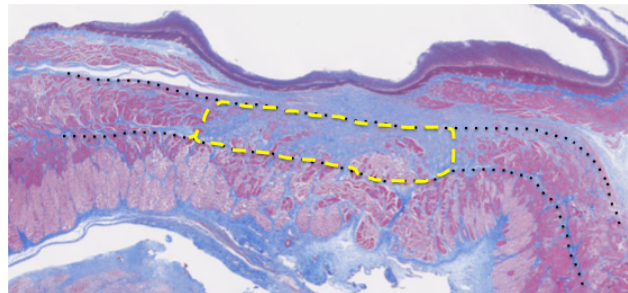
ESD を施行した部位では、粘膜筋板は再生されない。よって、粘膜筋板と粘膜筋板の間を線で繋ぎ、仮想の粘膜筋板を作成し（下図の点線）、その線から最も深部へ浸潤している線維の距離を“線維化の浸潤の厚さ”と定義した（下図の矢印直線）。

ESD を行なった部位の内輪筋に Region of Interest (ROI)を作成し、その ROI 内に残存している内輪筋の割合を測定し、“内輪筋の萎縮”と定義した（下図の黄色枠線）。

染色を施行したプレパラートを画像閲覧ソフト(NDP. view2 software, Hamamatsu, Japan)を用いて、1 頭のブタ標本から 3 視野ずつ撮影し、解析を行なった。



<線維化の浸潤の厚さ>



<内輪筋の萎縮>

10-2 免疫染色

抗体

anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) antibody (Sigma-Aldrich)

anti-myeloperoxidase (MPO) antibody

(Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

anti-CD107a antibody

(AbD Serotec, Kidlington, UK)

anti-CD31 antibody

(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA)

anti-Ki-67 antibody

(Dako, Glostrup, Denmark)

anti-p63 antibody

(Biorbyt, California, USA)

ESD 後狭窄部における筋線維芽細胞、好中球およびマクロファージの浸潤程度、また、血管新生および上皮化の程度を評価する目的で免疫染色を行なった。

光学顕微鏡 BX50 (Olympus) を使用して、1 頭のブタの標本から無作為に 9 視野を選択し撮影を行なった。筋線維芽細胞、好中球、マクロファージに関しては 400 倍視野、血管新生は 100 倍視野で撮影を行い、陽性細胞数を手でカウントし計測した。Ki-67、p63 に関しては 40 倍視野で撮影し、画像解析ソフト (WinROOF, Mitani Co., Fukui, Japan) を用いて、食道扁平上皮の基底層部に存在する陽性細胞数を計測した。

Parameter	Antibody
Activated myofibroblasts	α -SMA
Infiltration of neutrophils	MPO
Infiltration of macrophages	CD107a
Capillary density	CD31
Re-epithelialization	Ki-67/p63

上記抗体は以下の希釈濃度、染色時間として使用した。

α -SMA	(dilution; 1:1,000)	60 分
MPO	(dilution; 1:300)	40 分
CD107a	(dilution; 1:300)	60 分
CD31	(dilution; 1:600)	30 分
Ki-67	(dilution; 1:100)	60 分
p63	(Ready-to-Use)	60 分

11. 統計学的解析

データは平均値と標準偏差で表した。一元配置分散分析(one-way ANOVA)を用いて群間の有意差の有無を検討し、Newman-Keuls test により、それぞれの群間の差を検定した。p < 0.05 を統計的有意差があると判断した。

統計ソフトは GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software, San Diego, California, USA)を使用し解析を行なった。

結果

1 ヒト AMSC の多分化能の証明

ヒト羊膜から MSC を分離させて細胞が多分化能を有しているかを評価するために、脂肪細胞、骨細胞への分化誘導実験を行った。

- 脂肪分化誘導を行った AMSC は、小円形の脂肪滴が細胞膜内に多数出現した。この胞体は Oil Red O 染色で赤色に染色されたため、脂肪細胞へ分化誘導が行なわれたことが確認された(Fig. 1)。
- 骨分化誘導を行った AMSC は、細胞周囲に、細胞外基質の分泌や石灰沈着を認めた。それらは Alizarin Red S 染色にて橙色に染色されたため、骨細胞へ分化誘導が行なわれたことが確認された (Fig. 1)。

Fig. 1

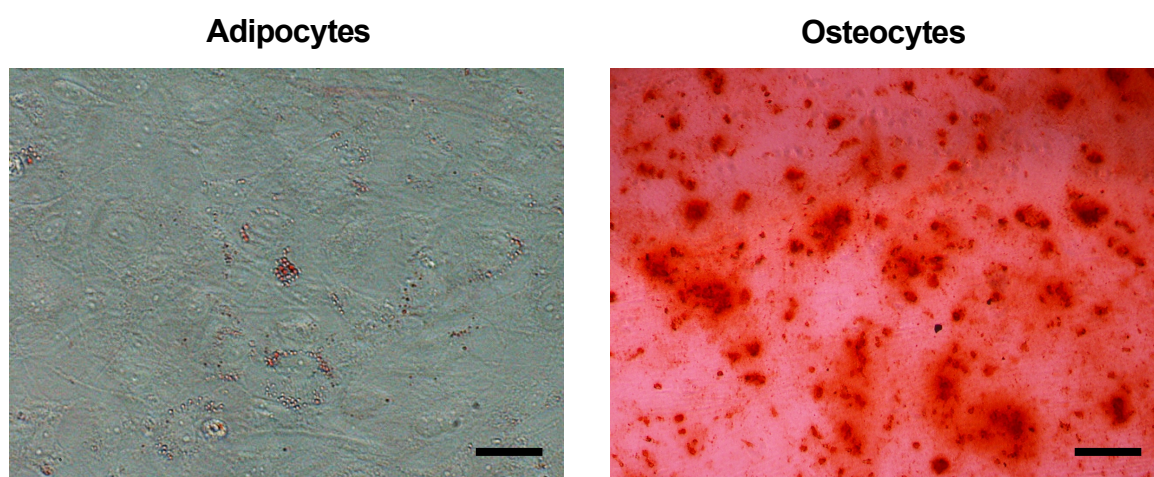


Fig. 1 ヒト AMSC の多分化能の証明

Oil Red O で赤く染色される脂肪滴の出現により、脂肪細胞への分化が確認された(左上図)。Alizarin Red S で橙色に染色される石灰沈着の出現により、骨細胞への分化が確認された(右上図)。Scale bars は 50 μm を示す。

2 細胞表面抗原の解析

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³⁷に準拠し、flow cytometry を行い、AMSC の細胞表面抗原の解析を行なった。

- AMSC は MSC の陽性マーカーである CD44、CD73、CD90、CD105 を発現しており、一方で陰性マーカーである CD11b、CD19、CD34、CD45、HLA-DR は発現していなかった (Fig. 2)。

Fig. 2

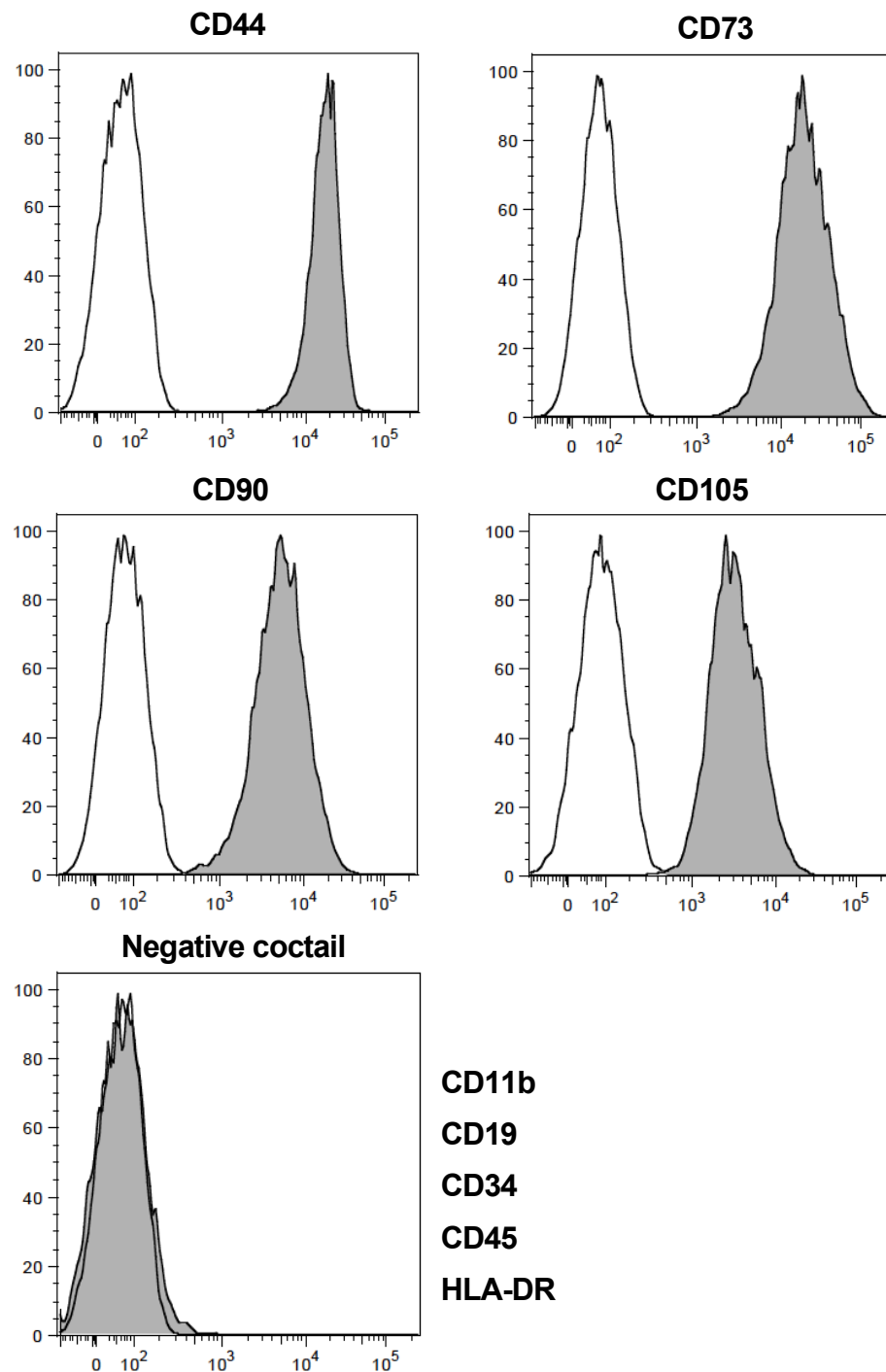


Fig. 2 細胞表面抗原の解析

AMSC の細胞表面抗原を flow cytometry で解析した。MSC の陽性マーカーである CD44、CD73、CD90、CD105 の発現を認め、陰性マーカーである CD34、CD11b、CD19、CD45、HLA-DR を発現していないことを確認した。

Closed area(グレー)は特異抗体で染色されたものを、Open area(白)は isotype control の抗体で染色されたものを示す。

3. 食道 ESD 後狭窄の程度の評価

実地臨床において、食道 ESD 後の狭窄予防にはステロイドが使用されることが多い。従って、本研究では、ステロイド治療を施行する群を設けて、その治療成績についても比較検討を行なった。

食道 ESD 後の day22 における内視鏡観察では、全ての群において、内視鏡は狭窄部を通過しなかった。

標本での狭窄率は、CM-W 群および CM-D 群で SM 群と比べ有意に狭窄率が低下しており、また、それらの狭窄率は steroid 群と同等の結果であった (Fig. 3)。

	SM	CM-W	CM-D	Steroid
Mucosal constriction %, mean±SD	80.0±2.0	56.3±7.1	52.3±19.3	49.3±4.2

Fig. 3

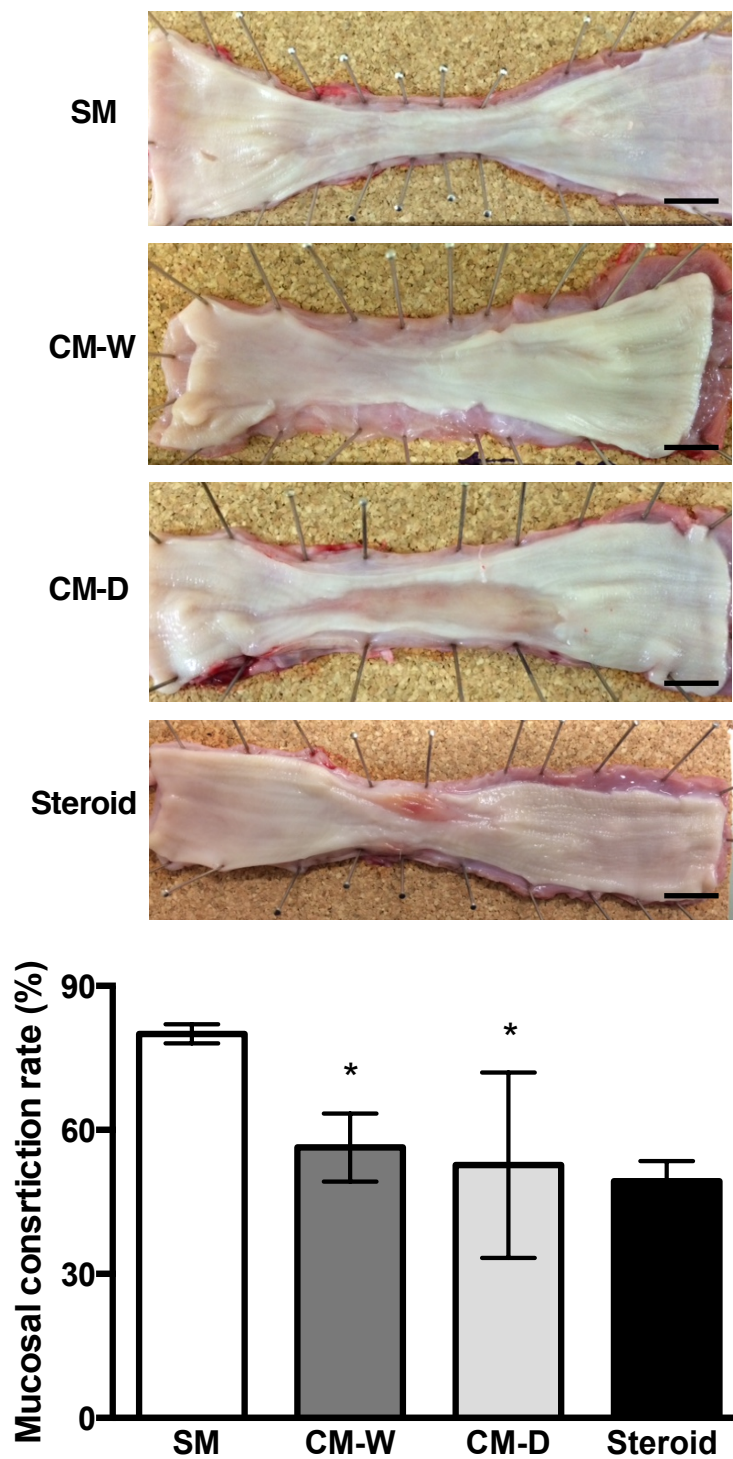


Fig. 3 食道狭窄率の評価

食道 ESD 後の狭窄率は、CM-W 群、CM-D 群および steroid 群で SM 群と比べ有意に狭窄率が低下した。

Scale bars は 10 mm を示す。統計値は平均値±標準偏差で示した。

* $p < 0.05$: vs SM 群

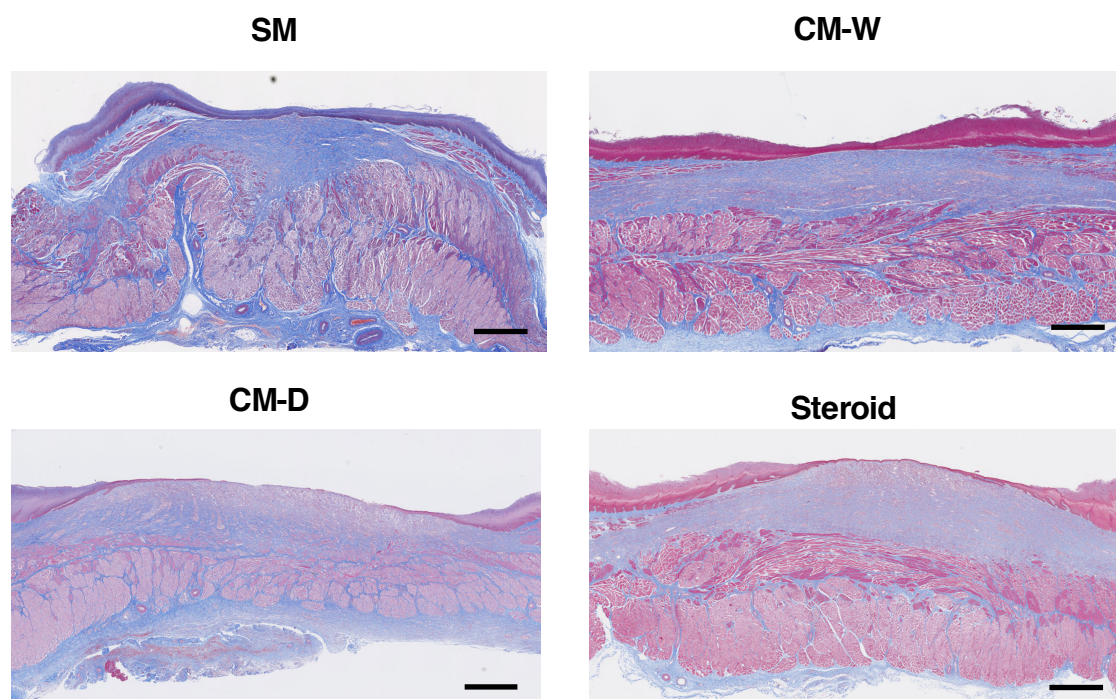
4. 食道 ESD 後狭窄ブタモデルにおける食道病理組織学的評価

4-1 線維化の浸潤の厚さ

食道 ESD を施行し、3 週間後の時点での線維化の浸潤の厚さを評価した。SM 群では線維化が非常に強く、線維化の浸潤は食道内輪筋の深部まで及んでいた。一方、CM-W 群、CM-D 群および steroid 群では、線維化は比較的軽度であり、内輪筋の浅層程度までの線維化浸潤を認めるのみであった。線維化浸潤の最深部までの距離を測定して比較をしたところ、CM-W 群、CM-D 群および steroid 群は SM 群と比べ有意に線維化の浸潤の厚さが抑制されていた (Fig. 4-1)。

	SM	CM-W	CM-D	Steroid
Fiber thickness μm, mean±SD	1609±418	833±26	987±145	944±251

Fig. 4-1



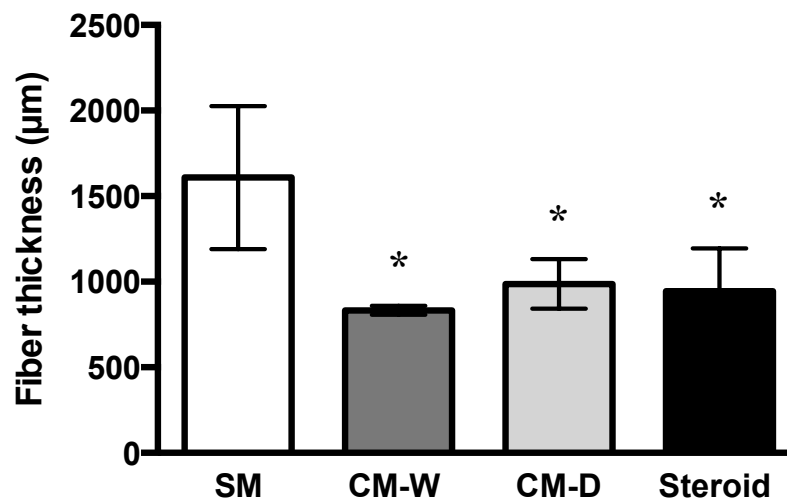


Fig. 4-1 線維化浸潤の厚さの評価

線維化浸潤の厚さは、CM-W 群、CM-D 群および steroid 群で SM 群と比べ有意に抑制された。

Scale bars は 1 mm を示す。統計値は平均値±標準偏差で示した。

*p < 0.05 : vs SM 群

4-2 食道内輪筋の萎縮の程度の評価

食道壁の筋層は外輪筋と内輪筋とに分けられる。ESD 施行部では、その内輪筋が著名に萎縮しており、その萎縮率を比較した。結果は、各群で萎縮率の有意差は認めなかったが、CM-W 群、CM-D 群、steroid 群の萎縮率はほぼ同様の結果となり、また、SM 群と比べ萎縮を抑える傾向であった (Fig. 4-2)。

	SM	CM-W	CM-D	Steroid
Muscle atrophy %, mean±SD	70.0±8.5	43.7±9.1	52.3±5.2	56.7±12.9

Fig. 4-2

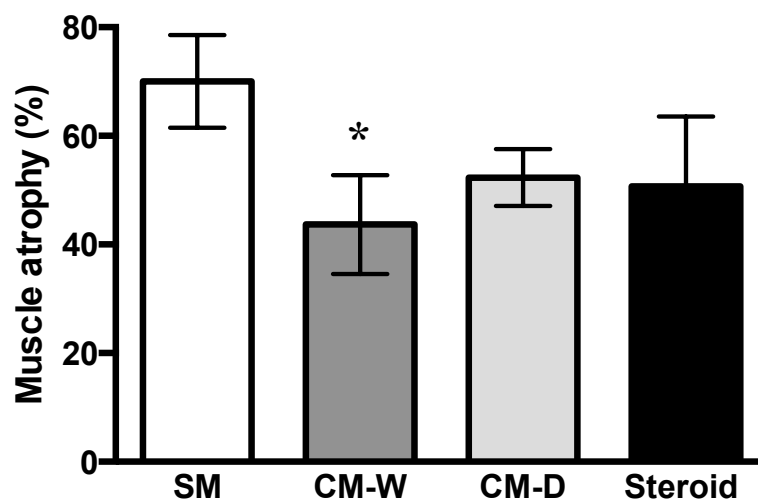
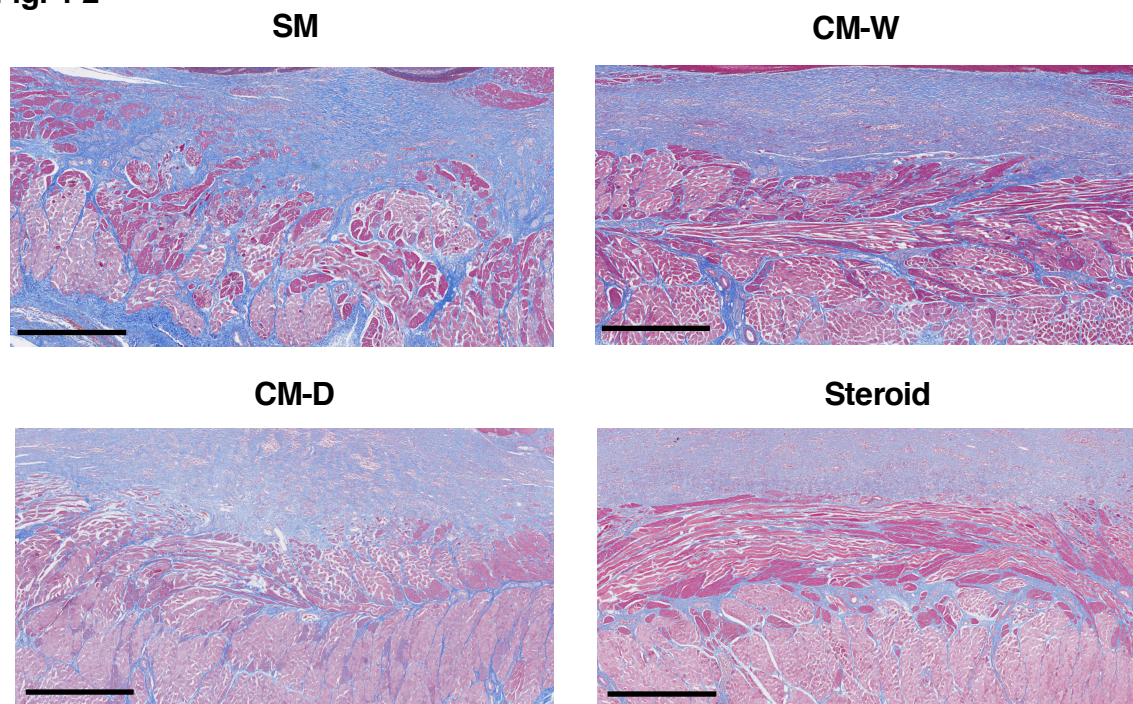


Fig. 4-2 食道内輪筋の萎縮の評価

各群で萎縮率の有意差は認めなかった。CM-W 群、CM-D 群、steroid 群の萎縮率は、SM 群と比べて、萎縮を抑える傾向を示していた。

Scale bars は 1 mm を示す。統計値は平均値±標準偏差で示した。

* $p < 0.05$: vs SM 群

5. 免疫染色による食道 ESD 後狭窄部の病理組織学的評価

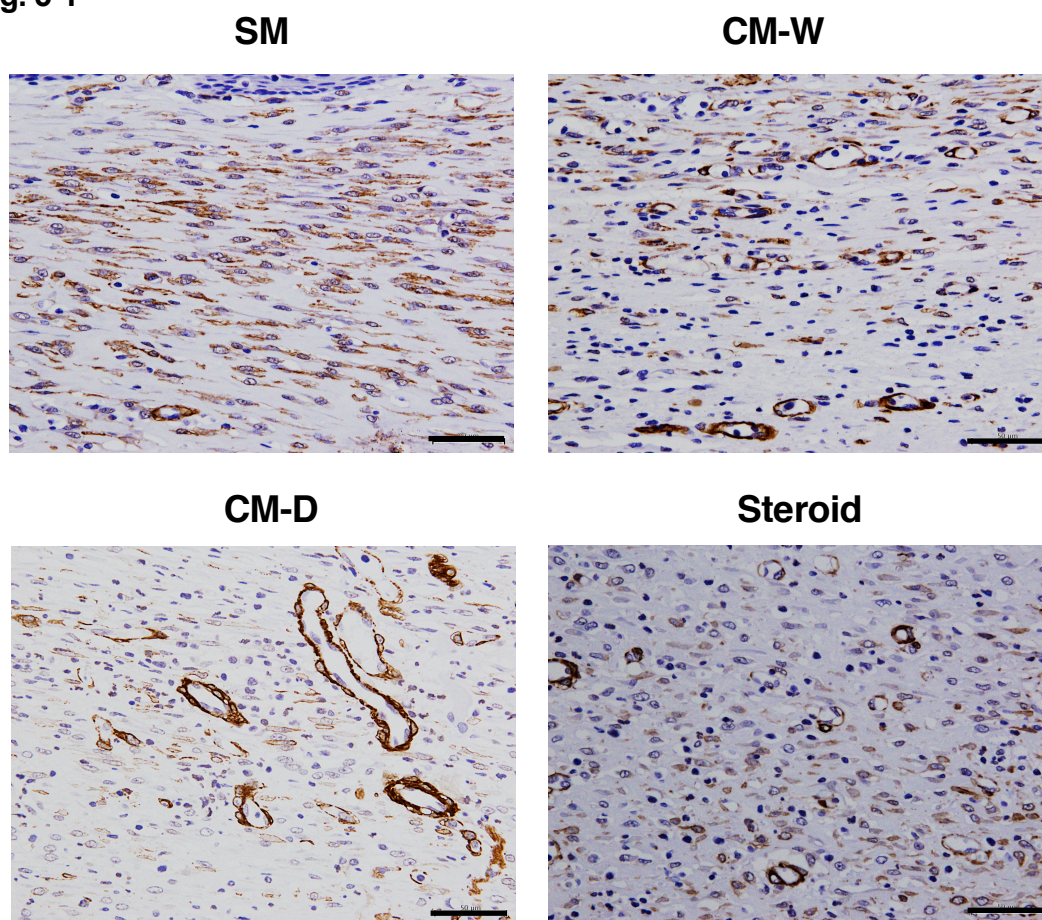
筋線維芽細胞、好中球およびマクロファージの浸潤程度、また、血管新生および上皮化の程度を評価する目的で免疫染色を行なった。染色抗体に関しては、方法の章で述べた抗体を使用した。

5-1 筋線維芽細胞の活性化

線維化の大部分はコラーゲンで構成されている。コラーゲンは筋線維芽細胞により分泌され蓄積していく。そこで、線維化の程度を相対的に評価する為に、筋線維芽細胞数のカウントを行なった。筋線維芽細胞の数は、CM-W 群、CM-D 群および steroid 群で SM 群と比べ有意に抑制されていた (Fig. 5-1)。

	SM	CM-W	CM-D	Steroid
Activated myofibroblasts cells/HPF, mean±SD	68.3±5.7	26.8±8.6	21.5±4.9	20.6±2.3

Fig. 5-1



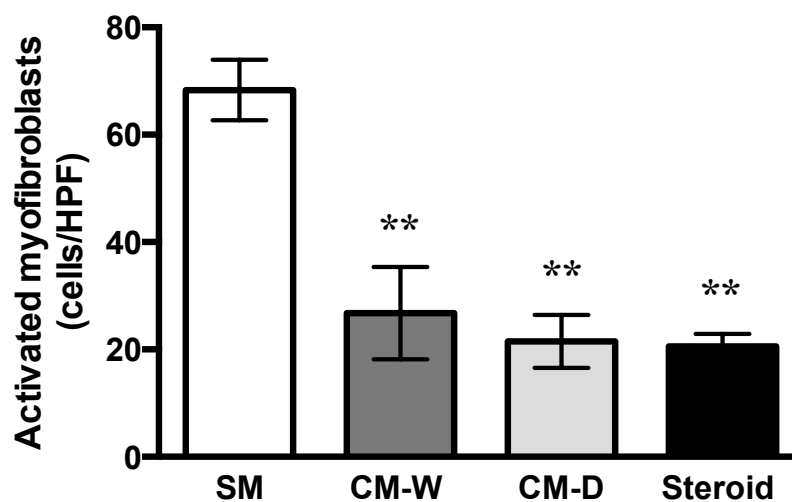


Fig. 5-1 筋線維芽細胞の活性化の評価

筋線維芽細胞の数は、CM-W 群、CM-D 群および steroid 群で SM 群と比べ有意に抑制されていた。

Scale bars は 50 μ m を示す。統計値は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

**p < 0.01 : vs SM 群

5-2 好中球浸潤の評価

食道 ESD 後の潰瘍面には強い炎症が起きている。その炎症を評価する目的で好中球浸潤の数をカウントした。結果は、CM および steroid で好中球浸潤を抑えることはできず、各群で好中球浸潤数に有意差は認めなかった (Fig. 5-2)。

	SM	CM-W	CM-D	Steroid
MPO-positive neutrophils cells/HPF, mean $\pm$ SD	16.8 $\pm$ 21.0	7.2 $\pm$ 7.1	26.3 $\pm$ 3.8	24.9 $\pm$ 3.7

Fig. 5-2

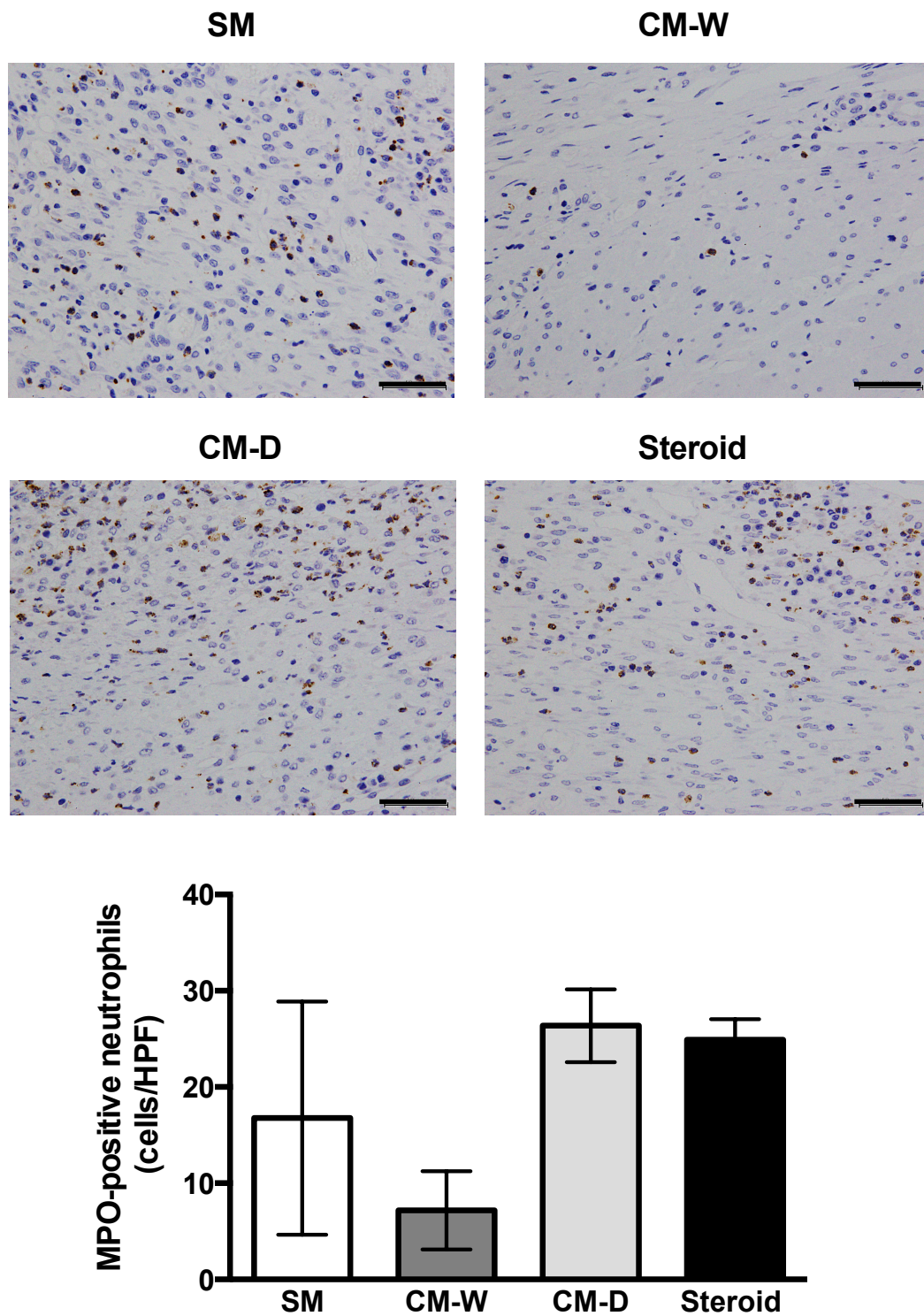


Fig. 5-2 好中球浸潤の評価

好中球の数は、各群で有意差を認めなかった。

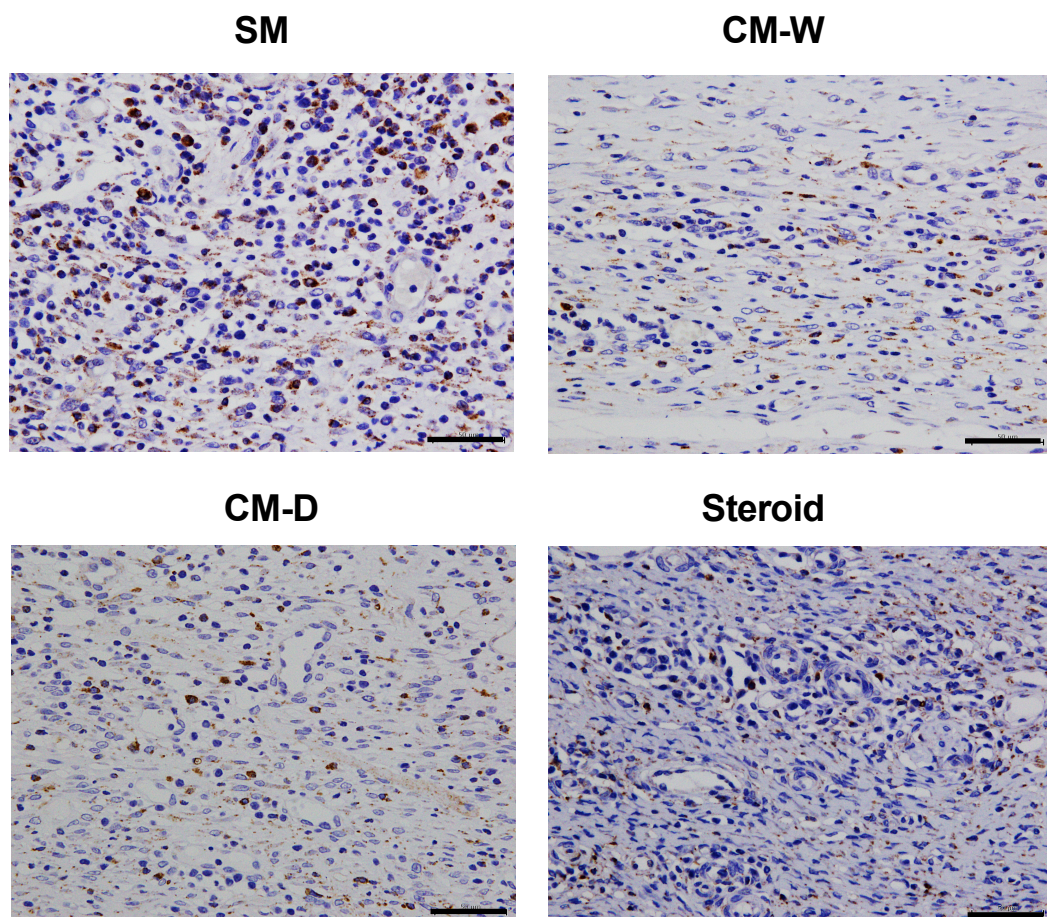
Scale bars は 50 μ m を示す。統計値は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

5-3 マクロファージ浸潤の評価

好中球と同様に、マクロファージも炎症時に大きな役割を果たすため、炎症の程度の指標として、その数をカウントして評価を行なった。結果は、各群でマクロファージ数に有意差は認めなかったが、SM群と比べて、CM-W群、CM-D群およびsteroid群で、その数を抑制している傾向にあった (Fig. 5-3)。

	SM	CM-W	CM-D	Steroid
CD107a-positive macrophages cells/HPF, mean $\pm$ SD	42.0 $\pm$ 15.1	28.2 $\pm$ 13.6	23.0 $\pm$ 6.2	24.6 $\pm$ 5.0

Fig. 5-3



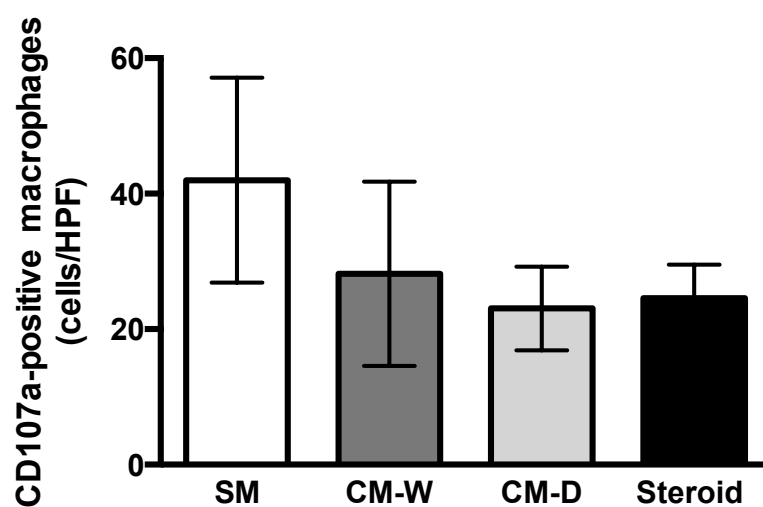


Fig. 5-3 マクロファージ浸潤の評価

マクロファージの数に関しては、各群で有意差を認めなかった。

Scale bars は 50 μ m を示す。統計値は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

5-4 血管新生に関する評価

MSC の液性因子による効果の 1 つとして、血管新生があげられる。CM 中には、その因子が含まれており、血管新生を促進しているかの評価を行なった。CM 群と SM 群では、血管新生に関しては差は認めなかった。一方で、CM 群と比較し、steroid 群では血管新生が有意に抑制されていた (Fig. 5-4)。

	SM	CM-W	CM-D	Steroid
Capillary density cells/HPF, mean $\pm$ SD	23.7 $\pm$ 4.0	27.7 $\pm$ 4.3	28.9 $\pm$ 2.6	19.4 $\pm$ 3.0

Fig. 5-4

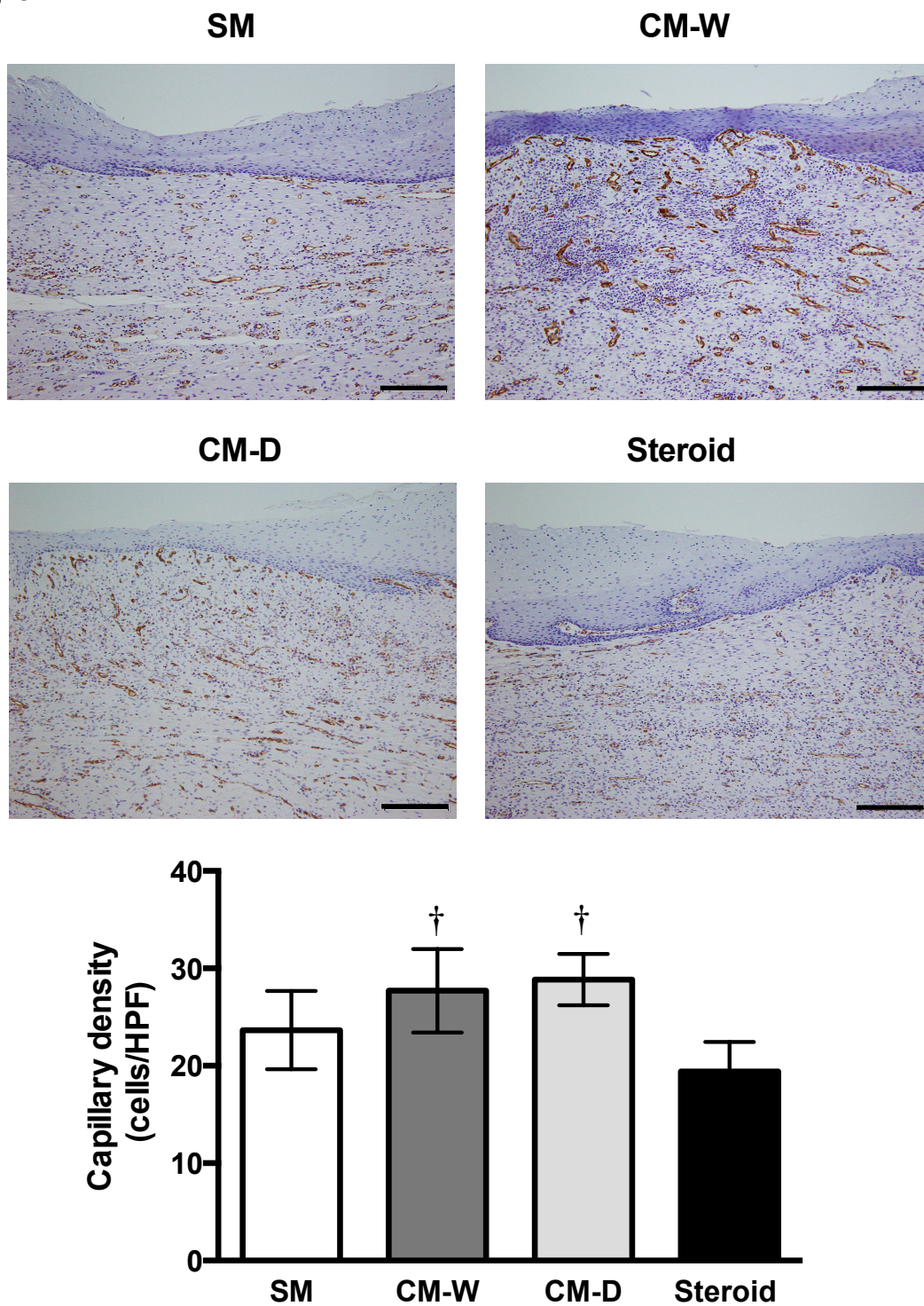


Fig. 5-4 血管新生に関する評価

血管新生に関しては、CM 群と steroid 群で有意差を認めた。

Scale bars は 200 μ m を示す。統計値は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

† $p < 0.05$: vs SM 群

5-5 食道粘膜の上皮化の評価

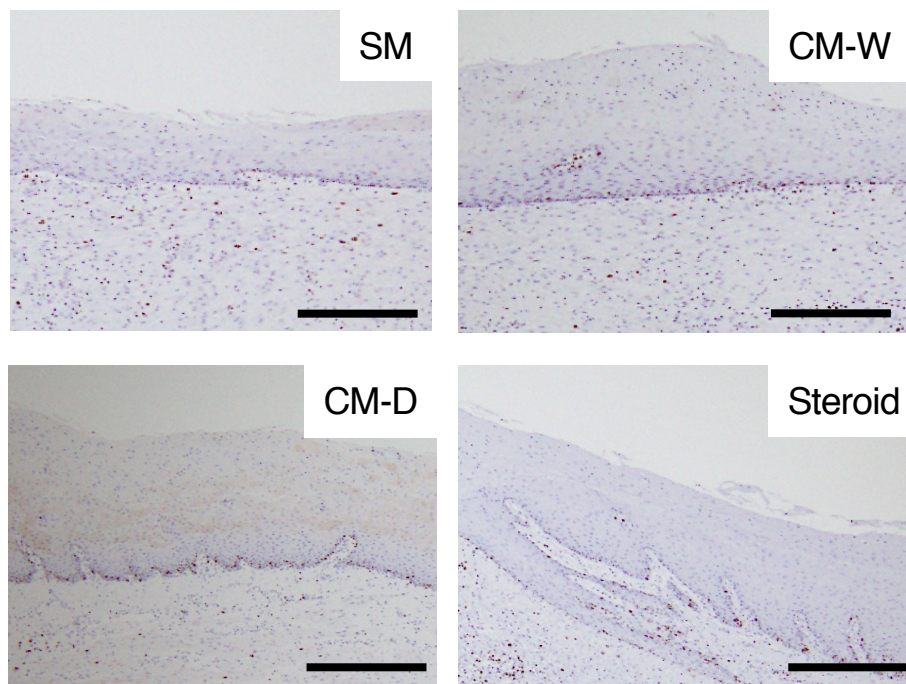
CM による上皮化を評価する目的で、食道基底層での Ki-67 および p63 陽性細胞の数をカウントした。Ki-67、p63 のいずれも各群で差は認めなかった (Fig. 5-5 a,b)。

	SM	CM-W	CM-D	Steroid
Ki-67 positive cells cells/LPF, mean±SD	741.3±298.7	516.8±88	1170.0±188.9	989.2±738.7

	SM	CM-W	CM-D	Steroid
p63 positive cells cells/LPF, mean±SD	1123.0±359	656.1±43.1	1331.0±462.8	1548.0±109

Fig. 5-5

(a) Ki-67



(b) p63

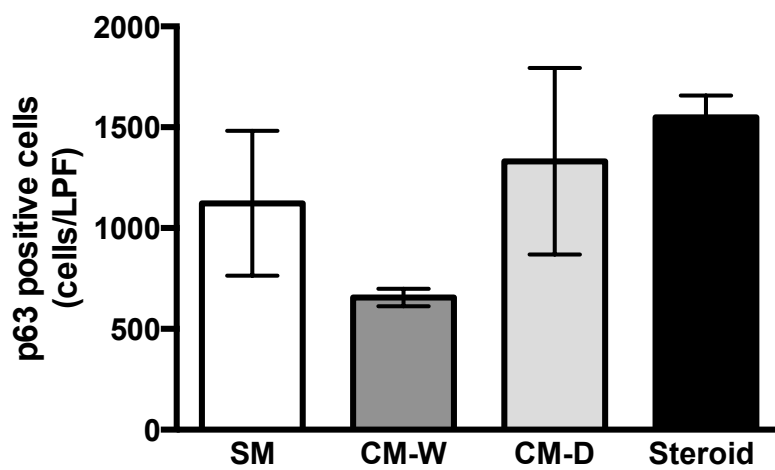
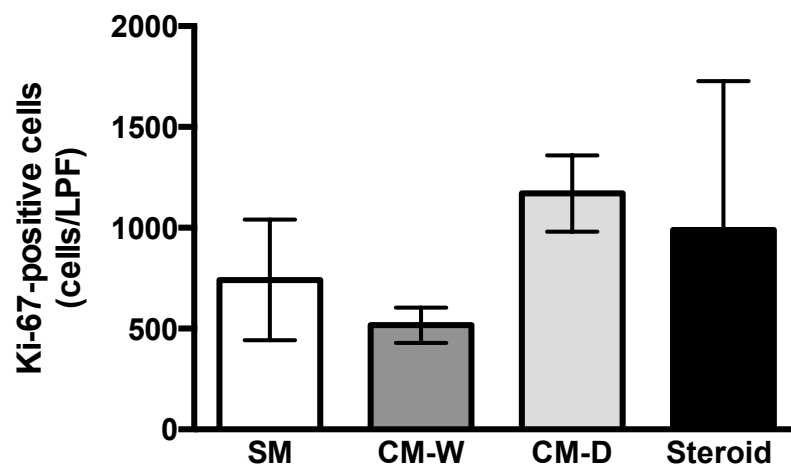
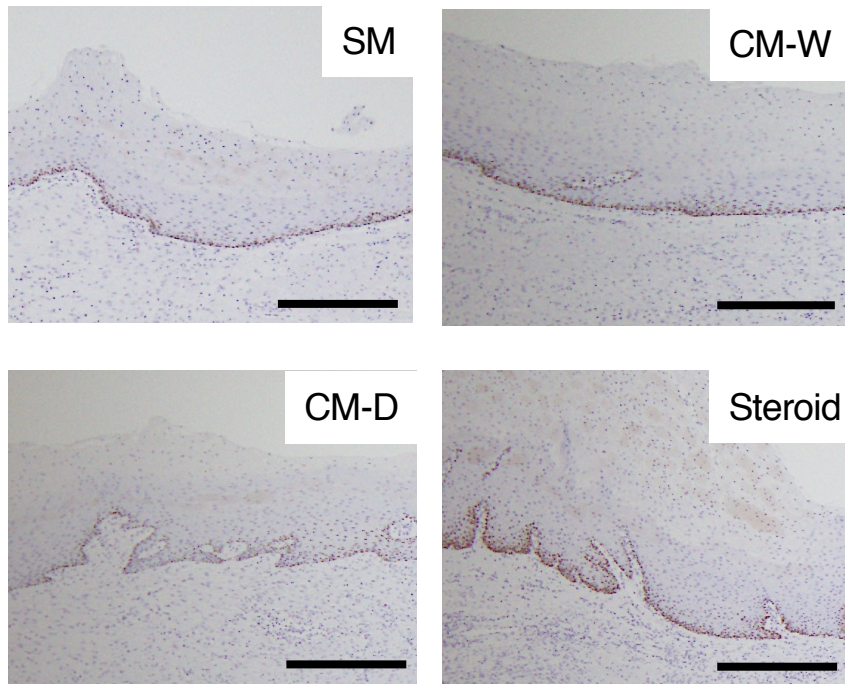


Fig. 5-5 食道粘膜の上皮化の評価

粘膜上皮化に関しては、Ki-67、p63 陽性細胞数で評価を行なったが、いずれの群にも差は認めず、一定の傾向も認めなかった。

Scale bars は 0.5 mm を示す。統計値は平均値±標準偏差で示した。

6. 免疫染色による食道 ESD 潰瘍部における 1 週間後の病理組織学的評価

創傷治癒の過程では、1 週間以内が最も炎症が強いと言われている。その時期における ESD 施行部の炎症に対して、CM がどのような影響を及ぼすかを評価する目的で、筋線維芽細胞、好中球およびマクロファージの浸潤程度に関して免疫染色を行なった。染色抗体に関しては、方法の章で述べた抗体を使用した。

6-1 創傷治癒急性期における筋線維芽細胞の活性化

結果 5-1 でも述べた如く、線維化の大部分はコラーゲンで構成されている。コラーゲンは筋線維芽細胞により分泌され蓄積していくため、炎症の急性期における線維化の程度を評価するために、活性化筋線維芽細胞数のカウントを行なった。結果は、活性化筋線維芽細胞の数は、CM 群、steroid 群および SM 群の間には差は認めなかった (Fig. 6-1)。

	SM	CM	Steroid
Activated myofibroblasts cells/HPF, mean±SD	13.6±3.9	6.8±4.0	10.9±2.6

Fig. 6-1

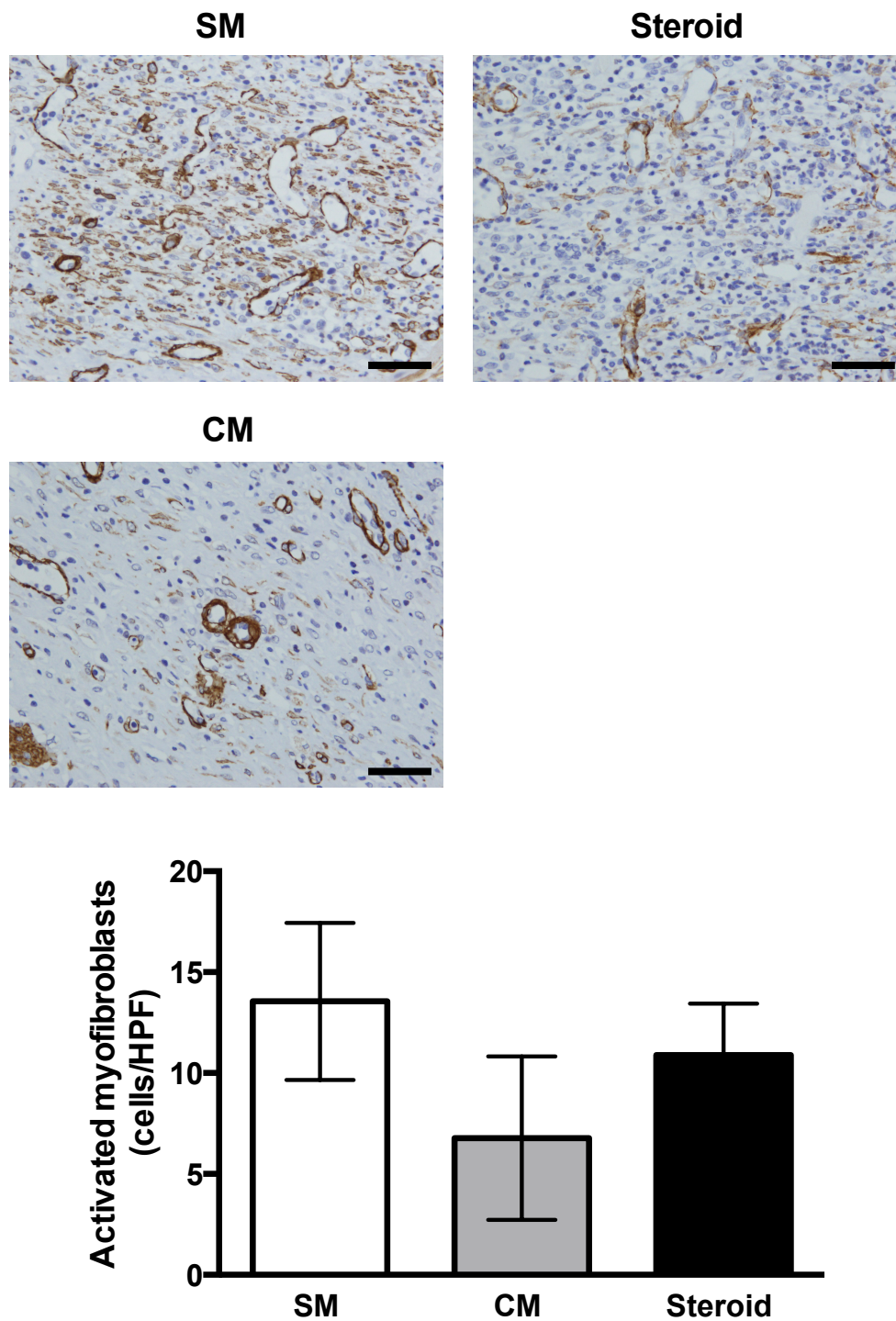


Fig. 6-1 創傷治癒急性期における活性化筋線維芽細胞の評価
活性化筋線維芽細胞数に関しては、3群で有意差を認めなかった。
Scale bars は 50 μ m を示す。統計値は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

6-2 創傷治癒急性期における好中球浸潤の評価

急性期の炎症を評価する目的に、好中球浸潤の数をカウントした。CM 群および steroid 群で、SM 群と比べ有意に好中球の浸潤を抑制していた (Fig. 6-2)。

	SM	CM	Steroid
MPO-positive neutrophils cells/HPF, mean±SD	68.1±14.2	31.7±5.9	22.7±4.5

Fig. 6-2

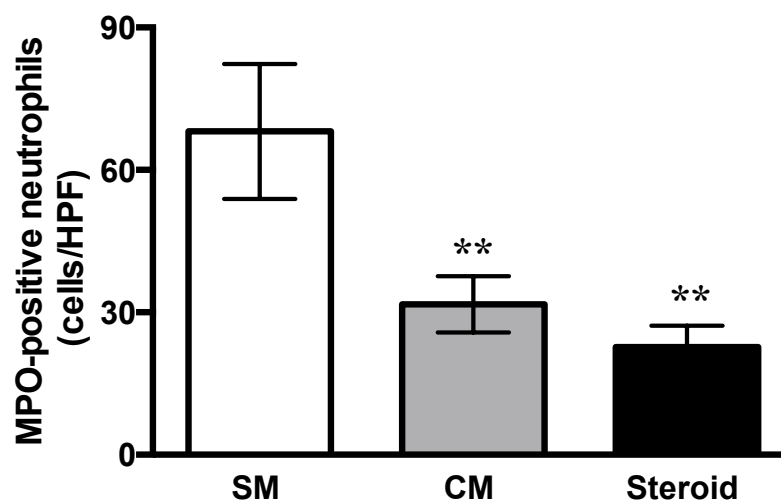
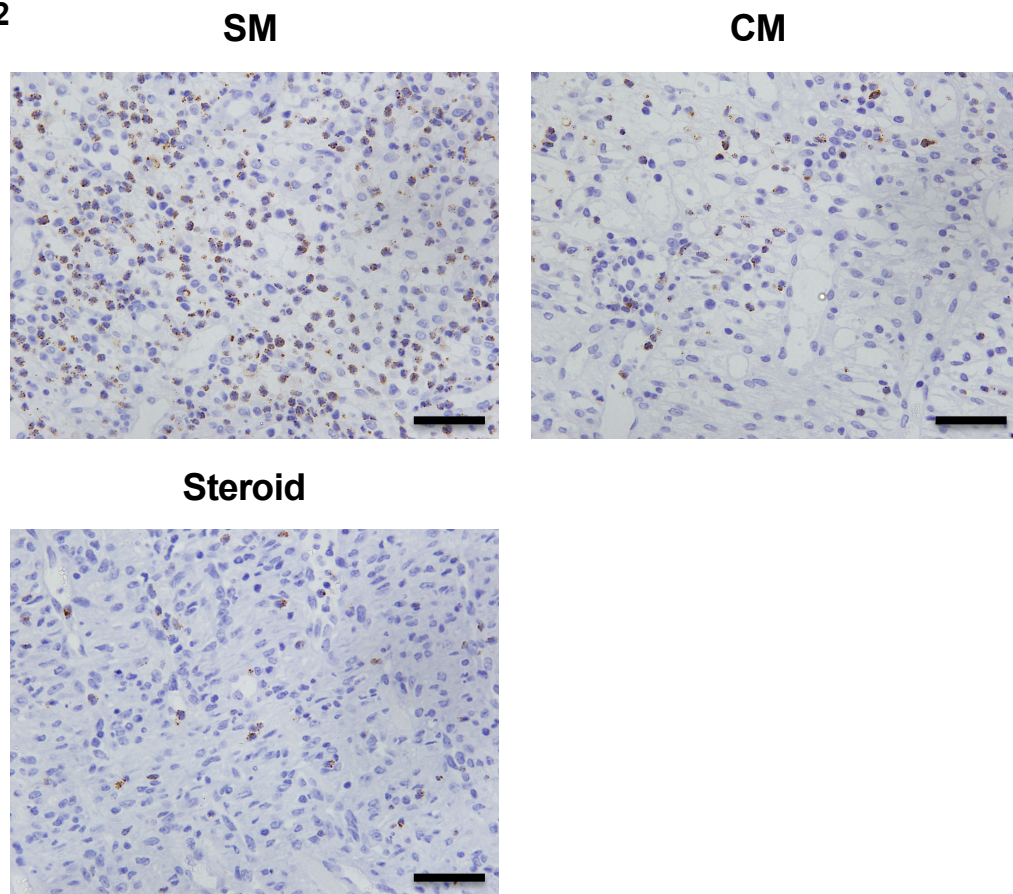


Fig. 6-2 創傷治癒急性期における好中球浸潤の評価

好中球の数に関しては、**CM** 群および **steroid** 群で、**CM** 群と比較し抑制していた。

Scale bars は 50 μ m を示す。統計値は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

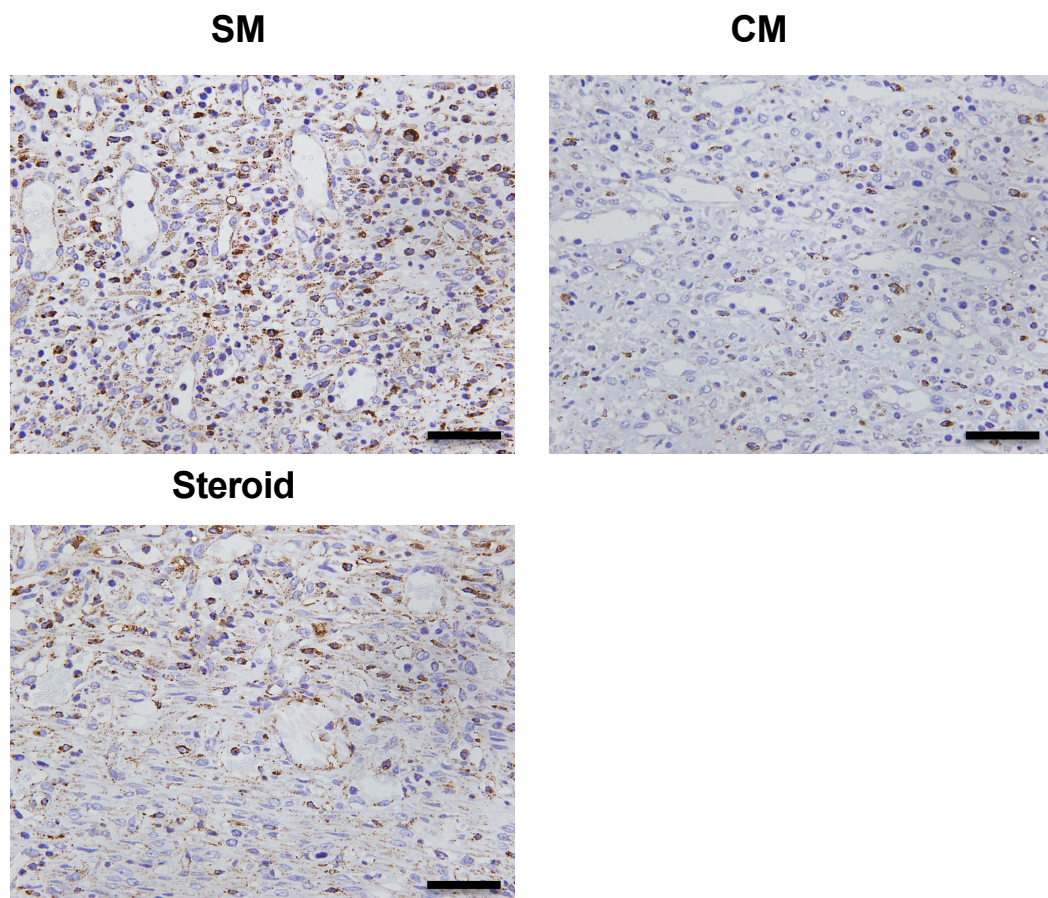
****p < 0.01 : vs SM 群**

6-3 創傷治癒急性期におけるマクロファージ浸潤の評価

急性期の炎症を評価する目的に、マクロファージ浸潤の数をカウントした。**CM** 群および **steroid** 群で、**SM** 群と比べ有意に好中球の浸潤を抑制していた。また、**CM** 群は **steroid** 群よりも更に好中球浸潤を抑制した (Fig. 6-3)。

	SM	CM	Steroid
CD107a-positive macrophages cells/HPF, mean $\pm$ SD	33.9 $\pm$ 2.8	13.2 $\pm$ 1.7	22.6 $\pm$ 2.5

Fig. 6-3



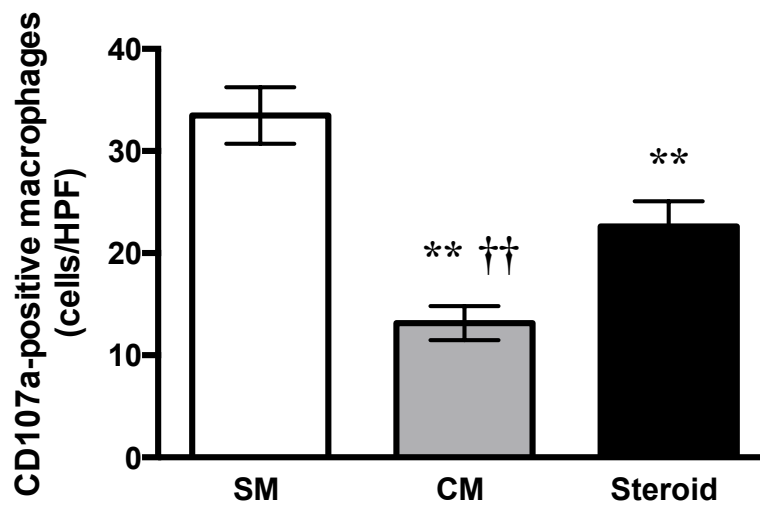


Fig. 6-3 創傷治癒急性期におけるマクロファージ浸潤の評価

CM 群および steroid 群で SM 群と比較しマクロファージの浸潤を抑制した。また、CM 群は steroid 群よりも更にマクロファージの浸潤を抑制した。

Scale bars は 50 μ m を示す。統計値は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

**p < 0.01 : vs SM 群

† † p < 0.01: vs Steroid 群

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相関していた。(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。

消化管の早期悪性腫瘍に対しての ESD が日本で誕生し 15 年が経過した。その期間で ESD は急速に普及し、近年は病変の大きさに関わらず、早期の状態であれば内視鏡的に根治切除が可能となった。一方で、大きな病変に対して ESD を行なった場合、術後に癒痕狭窄をきたす場合がある。特に大きな食道病変に対しての ESD 後は狭窄のリスクが高く、一旦、狭窄をきたすと食事摂取が困難となり、また、狭窄解除目的に複数回の内視鏡的バルーン拡張が必要となり、患者の QOL を低下させる。よって、食道 ESD 後の狭窄予防は非常に重要となってくる。

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³⁸。線維化とは、その大部分がコラーゲンで構成されている。創傷治癒過程で、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³⁹。更に、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ていく。一方、CM はそれらのサイトカインを抑制する方向へ働くことが、動物実験レベルで証明されている^{40,41}。以上の知見から、われわれは食道 ESD 後狭窄の予防には、線維化の抑制が必要であると考えた。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、本来ならばそれらの細胞によって活性化される筋線維芽細胞の活性を抑えることで、それに続いて起こる線維化の抑制が可能となると仮説を立てた。炎症を抑制する手段として、今回、われわれは MSC に着目し、特に MSC から分泌される炎症抑制に関与する液性因子を含んだ CM に注目した^{35,36}。

本研究では、MSC-CM の治療効果の検討に先立って、食道 ESD 後狭窄モデルの作成を行なった。既報の動物実験では、全周性の食道 ESD を行ない狭窄モデルを作成していたが、本研究では亜全周性の剥離を行なった。20kg のブタの食道管腔は狭く、全周性の ESD を行なうのは技術的に困難と判断した為である。しかし、亜全周の ESD を行なった場合でも、ばらつきが非常に小さい狭窄モデルの作成が可能であった。食道狭窄モデルに MSC-CM の投与を行い、day22 で安楽死させてブタから食道を抜去

し検討を行なったが、既報にある同様の動物実験では **day15** で食道抜去を行っており、十分な食道粘膜の上皮化及び狭窄モデルを作成できていた。よって、安定した狭窄モデルを作成するには **2 週間**以上の時間経過が必要と考え、本研究では **day22** で食道抜去を行なっている^{17,42,43}。治療 **3 週間**後の **MSC-CM** の治療効果としては、食道の狭窄率は **CM** ゲル投与により低下させることに成功した。同時期の病理学的評価に関しては、**CM** 群では **SM** 群と比較して筋線維芽細胞と線維化の浸潤を有意に抑制していた。しかし、マクロファージ、好中球といった炎症細胞浸潤に関しては、**SM** 群と **CM** 群の間で差は認めなかった。創傷治癒の過程は①炎症期②増殖期③再構築期となっており、**day22** では炎症期の結果が反映されていないと考察した。犬を用いた実験での食道 **EMR** 後の粘膜治癒過程を検討した報告によると、治療 **1 週間**以内が最も炎症が強い時期であるといわれており⁴⁴、食道 **ESD1 週間**の時点が炎症の急性期と判断して、その時期の炎症の評価も行なった。結果としては、炎症急性期では、**CM** 群は **SM** 群と比べて、有意にマクロファージおよび好中球の浸潤を抑制していた。逆に筋線維芽細胞の活性に関しては **SM** 群と **CM** 群の間では差を認めていなかった。以上の結果から、食道 **ESD** 後の狭窄は、炎症急性期にマクロファージ、好中球浸潤が起こり、それに続く時期に筋線維芽細胞の活性化が起こり、線維化が促進された結果として狭窄が起こると考えられ、本研究当初の仮説と一致した実験結果となった。

本研究では細胞ソースとして **AMSC** を使用したが、それらが **MSC** の基準を満たしている事を確認した。**AMSC** は脂肪細胞や骨細胞への分化能を有しており、発現している表面マーカーは **MSC** に特異的である **CD44**、**CD73**、**CD90**、**CD105** であり、骨髓由来および脂肪組織由来の **MSC** と類似した特徴を持っていることを示した¹⁸。これまでに、**AMSC** を用いて食道 **ESD** 後の狭窄を予防した再生医療の報告は無く、本研究は初の試みとなる。近年、再生医療を応用し食道 **ESD** 後狭窄予防へ向けての積極的な取り組みが、動物実験レベルで行なわれている。それらの予防方法としては大きく分けて **2 種類**となっている。**1** つは細胞シートを用いた方法、もう一方は細胞を局所に注入する方法である。**Kanai** らは、自己口腔粘膜を採取して培養し、粘膜上皮細胞シートを作成し、食道 **ESD** 後の潰瘍面に移植した¹⁷。彼らは細胞シート移植によって、食道狭窄率および線維化を低下させ、上皮化を促進することが可能であったと報告している。**Perrod** らは脂肪組織由来の **MSC** から細胞シートを作成し、食道 **ESD** 後潰瘍面へ移植を行なった⁴⁵。彼らもまた、食道の狭窄率と線維化を抑制したと報告している。**Barret** らは、ヒト羊膜グラフトを用いて狭窄予防を試みたが、狭窄出現の時期を遅らせることは可能であったが、予防はできなかったと報告している⁴²。**Honda** らは、自己の脂肪細胞から幹細胞を分離させ、それらを食道粘膜切除術後の潰瘍面に残っている粘膜下層へ直接注入した³⁸。彼らは幹細胞を局所注入することで、食道狭窄率を低下させ、血管新生を促進することができたと報告している。われわれが使用

した **MSC-CM** も既報と同様に狭窄率、線維化を抑制したが、それに加え、急性期の炎症も抑制できることを確認した。**MSC-CM** にはプロスタグランジン **E2 (PGE2)** と **IL-10** などの炎症を抑制する因子が含まれていることが知られているが⁴⁶、それらの因子により抗炎症作用が強く働いたものと推測される。また、脂肪由来の **MSC** は **IL-10** などの因子を介して、炎症性 **M1** マクロファージを炎症制御性 **M2** マクロファージへと変化させることが報告されており⁴⁷、今回使用した **MSC-CM** でも、同様のメカニズムで抗炎症効果を発揮したものと推測している。

次に、治療薬の運搬方法を考察していく。本実験では、**CM** をゲル状にして運搬する方法を選択したが、ゲル状にすることで、治療薬を目的の場所へより簡単に運搬できる可能性を考えたためである。細胞シートを使用する場合は、その運搬に時間を要するケースが多く^{17,48}、また、細胞の局注を行なう場合に関しては、**ESD** 後の潰瘍面に残っている粘膜下層は非常に薄く、そこへ局注針を用いて注入するため、技術的な **learning curve** が必要である。一方、**CM** ゲルを内視鏡を用いて、あるいは経口投与を行なった場合、その大部分のゲルは食道の蠕動などの影響で **ESD** 後潰瘍部から流れ落ちてしまうが、今回使用したゲルは、**50,000-60,000 cP** の粘稠度を有しており、わずかではあるが、潰瘍表面にゲルがコーティングを形成することで停滞が可能であったと考えている。しかし、**CM** ゲルがどのくらいの時間、停滞しているかを確認することは難しく、今後の検討課題と考える。本実験では **CM** ゲルを隔週で内視鏡下に直接潰瘍面へ塗布する群と、**CM** ゲルを **4** 日間の連日経口投与させる群を設定している。将来的な臨床応用を考えた場合、内視鏡を用いた投与は患者への負担が大きく、経口投与の方がより現実的と考えたためである。狭窄率を含めた結果はどちらの群もほぼ同等の結果であり、将来的には経口投与で狭窄予防が充分可能であると考え。逆に、隔週投与と **4** 日間の連日投与で実験結果に差を認めなかった原因に関しては、内視鏡を用いた投与の方が、より選択的に **CM** ゲルを **ESD** 後潰瘍面へ運搬できていたと考察している。

実地臨床では、食道 **ESD** 後狭窄の予防として、抗炎症作用を有するステロイドによる治療が近年、徐々に普及し、また、その有用性が報告されている^{11,12,49}。一方、再生医療を含め、様々な食道 **ESD** 後狭窄予防の動物実験が報告されているが、臨床応用を見据えた場合、ステロイドによる治療効果と比較していく必要があるが、今のところステロイドの治療効果と比較した動物実験は報告されていない。そこで、本研究では **CM** ゲルとステロイドによる狭窄予防効果を比較する目的で、ステロイド局注群も設定して実験を行なったが、本研究を通じて、**CM** ゲルとステロイドによる狭窄予防効果は、ほぼ同等の成績であることが明らかとなった。

食道 **ESD** 後狭窄予防としてのステロイドの全身投与あるいは **ESD** 潰瘍面への局注は有用な治療ではあるが、副作用や偶発症に気をつける必要がある。ステロイドの全

身投与は初期投与量として 30mg/day から開始し、減量を含め 8 週間投与すると、最終的に累積投与量は約 1000mg となる¹²。従って、免疫抑制、消化性潰瘍、精神症状、白内障、糖尿病などのステロイドによる副作用に注意を要する¹⁶。また、ステロイドの局注療法では、ステロイドを食道筋層へ誤って注入してしまうと食道壁内膿瘍¹⁴および遅発性穿孔¹⁵のリスクとなるため、確実に ESD 直後の潰瘍面に残っている粘膜下層へ注入する必要がある。

本研究には以下の **limitation** が認められる。(1) 少ないサンプル数である。(2) 20kg の小さなブタを使用した実験結果であるため、その結果を単純に人へ応用が可能かどうかは検討が必要である。(3) 本実験では、一人のドナーから得られた **CM** を使用したが、**CM** の個体差の有無を検証していく必要があると考える。また、臨床応用を見据えた場合、拒絶反応や毒性に関しての検証も必要となる。本実験では **MSC-CM** を使用しており、拒絶反応のリスクは細胞投与よりも低いと考えるが、仮に細胞投与を行なった場合でも、**MSC** は主要組織適応遺伝子複合体 (**major histocompatibility complex: MHC**) クラス II を発現していないため、T 細胞による攻撃を回避できるため拒絶を受けにくいとの報告もある⁵⁰。

MSC-CM を用いた再生医療は、骨髄由来の **MSC** を用いた研究が行なわれている^{35,40,41}。しかし、**MSC** を獲得するには、脂肪組織や骨髄の採取が必要であり身体的侵襲を伴うことになる。また、組織内に含まれる **MSC** は少量であるため、治療に必要な **MSC** を獲得するには、多くの細胞採取が必要であり、且つ、長期間の **MSC** 培養が必要となる。そして、加齢に伴い **MSC** の増殖能は低下するため、より質の高い細胞を獲得する工夫も必要である。一方、卵膜は医療廃棄物として破棄されるため、低侵襲でより多くの **MSC** が獲得可能で、倫理的ハードルも軽減される可能性が高い。また、胎児由来の細胞であるため若く良質の細胞の獲得が可能である。よって、**MSC** は今後の再生医療の可能性を大きく拡大させる可能性を持っているものと思われる。

総括

本研究において、以下の知見が得られた。

1. 食道 ESD 後狭窄は、食道壁内での線維化の程度に相関していた。
2. ヒト AMSC より作成した CM ゲルの投与は、食道 ESD 後の狭窄を予防した。
3. CM ゲルによる治療は、ステロイドによる治療と比べ、ほぼ同等の狭窄予防効果を認めた。
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。

本研究において、ヒト AMSC より作成した CM ゲルの動物モデルに対する治療効果が示され、有用な治療法である可能性が示された。

現在、MSC を用いた研究では、様々な組織を細胞ソースとした MSC が使用されている。今回、われわれが着目したヒト AMSC は、低侵襲で組織採取が可能であり、また、胎児由来のため、若い MSC を一度に多量に獲得が可能であるという面で大きな利点を持っていることから、羊膜は MSC を用いた細胞治療の新しい細胞ソースと考えられる。今後は食道 ESD 後狭窄予防を始め、様々な疾患に対し臨床応用がなされていくことを期待したい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、有益な御指導・御助言を頂きました、北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野 坂本直哉教授に深く感謝致します。

研究に対して素人であった私に、その心構え、信念、実験方法、データ解析、論文作成そして海外での発表方法など、あらゆる面において御指導・御援助頂きました北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野 大西俊介准教授には感謝の念に堪えません。厚く御礼申し上げます。

関西から札幌までお越し頂き、卵膜由来間葉系幹細胞のご提供、幹細胞の分離・培養における技術指導を賜りました、兵庫医科大学病院 輸血・細胞治療センター 山原研一准教授には、心より感謝いたします。

実験の開始にあたり、実験方法の御指導、環境を御提供頂いた、北海道医療大学 学長 浅香正博先生ならびに国立病院機構函館病院 病院長 加藤元嗣先生には、深く感謝致します。

最後に、本研究に尊い生命を提供して頂きました実験動物諸霊に深く感謝いたします。

2017 年 3 月

水島 健

引用文献

- 1 Jemal, A., Center, M. M., DeSantis, C. & Ward, E. M. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **19**, 1893-1907 (2010).
- 2 Berry, M. F. Esophageal cancer: staging system and guidelines for staging and treatment. *J. Thorac. Dis.* **6 Suppl 3**, S289-297 (2014).
- 3 Toyonaga, T., Man-i, M., East, J. E., Nishino, E., Ono, W., Hirooka, T., Ueda, C., Iwata, Y., Sugiyama, T., Dozaiku, T., Hirooka, T., Fujita, T., Inokuchi, H. & Azuma, T. 1,635 Endoscopic submucosal dissection cases in the esophagus, stomach, and colorectum: complication rates and long-term outcomes. *Surg. Endosc.* **27**, 1000-1008 (2013).
- 4 Mizushima, T., Kato, M., Iwanaga, I., Sato, F., Kubo, K., Ehira, N., Uebayashi, M., Ono, S., Nakagawa, M., Mabe, K., Shimizu, Y. & Sakamoto, N. Technical difficulty according to location, and risk factors for perforation, in endoscopic submucosal dissection of colorectal tumors. *Surg. Endosc.* **29**, 133-139 (2015).
- 5 Kosaka, T., Endo, M., Toya, Y., Abiko, Y., Kudara, N., Inomata, M., Chiba, T., Takikawa, Y., Suzuki, K. & Sugai, T. Long-term outcomes of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer: a single-center retrospective study. *Dig. Endosc.* **26**, 183-191 (2014).
- 6 Takahashi, H., Arimura, Y., Masao, H., Okahara, S., Tanuma, T., Kodaira, J., Kagaya, H., Shimizu, Y., Hokari, K., Tsukagoshi, H., Shinomura, Y. & Fujita, M. Endoscopic submucosal dissection is superior to conventional endoscopic resection as a curative treatment for early squamous cell carcinoma of the esophagus (with video). *Gastrointest. Endosc.* **72**, 255-264, 264 e251-252 (2010).
- 7 Iizuka, H., Kakizaki, S., Sohara, N., Onozato, Y., Ishihara, H., Okamura, S., Itoh, H. & Mori, M. Stricture after endoscopic submucosal dissection for early gastric cancers and adenomas. *Dig. Endosc.* **22**, 282-288 (2010).
- 8 Ohara, Y., Toyonaga, T., Tanaka, S., Ishida, T., Hoshi, N., Yoshizaki, T., Kawara, F., Lui, K. L., Tepmalai, K., Damrongmanee, A., Nagata, M., Morita, Y., Umegaki, E. & Azuma, T. Risk of stricture after endoscopic submucosal dissection for large rectal neoplasms. *Endoscopy* **48**, 62-70 (2016).
- 9 Ono, S., Fujishiro, M., Niimi, K., Goto, O., Kodashima, S., Yamamichi, N. & Omata, M. Predictors of postoperative stricture after esophageal endoscopic

- submucosal dissection for superficial squamous cell neoplasms. *Endoscopy* **41**, 661-665 (2009).
- 10 Ezoe, Y., Muto, M., Horimatsu, T., Morita, S., Miyamoto, S., Mochizuki, S., Minashi, K., Yano, T., Ohtsu, A. & Chiba, T. Efficacy of preventive endoscopic balloon dilation for esophageal stricture after endoscopic resection. *J. Clin. Gastroenterol.* **45**, 222-227 (2011).
 - 11 Hanaoka, N., Ishihara, R., Takeuchi, Y., Uedo, N., Higashino, K., Ohta, T., Kanzaki, H., Hanafusa, M., Nagai, K., Matsui, F., Iishi, H., Tatsuta, M. & Ito, Y. Intralesional steroid injection to prevent stricture after endoscopic submucosal dissection for esophageal cancer: a controlled prospective study. *Endoscopy* **44**, 1007-1011 (2012).
 - 12 Yamaguchi, N., Isomoto, H., Nakayama, T., Hayashi, T., Nishiyama, H., Ohnita, K., Takeshima, F., Shikuwa, S., Kohno, S. & Nakao, K. Usefulness of oral prednisolone in the treatment of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection for superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Gastrointest. Endosc.* **73**, 1115-1121 (2011).
 - 13 Takahashi, H., Arimura, Y., Okahara, S., Uchida, S., Ishigaki, S., Tsukagoshi, H., Shinomura, Y. & Hosokawa, M. Risk of perforation during dilation for esophageal strictures after endoscopic resection in patients with early squamous cell carcinoma. *Endoscopy* **43**, 184-189 (2011).
 - 14 Rajan, E., Gostout, C., Feitoza, A., Herman, L., Knipschild, M., Burgart, L., Chung, S., Cotton, P., Hawes, R., Kalloo, A., Kantsevoy, S. & Pasricha, P. Widespread endoscopic mucosal resection of the esophagus with strategies for stricture prevention: a preclinical study. *Endoscopy* **37**, 1111-1115 (2005).
 - 15 Yamashina, T., Uedo, N., Fujii, M., Ishihara, R., Mikamori, M., Motoori, M., Yano, M. & Iishi, H. Delayed perforation after intralesional triamcinolone injection for esophageal stricture following endoscopic submucosal dissection. *Endoscopy* **45 Suppl 2 UCTN**, E92 (2013).
 - 16 Sarnes, E., Crofford, L., Watson, M., Dennis, G., Kan, H. & Bass, D. Incidence and US costs of corticosteroid-associated adverse events: a systematic literature review. *Clin. Ther.* **33**, 1413-1432 (2011).
 - 17 Kanai, N., Yamato, M., Ohki, T., Yamamoto, M. & Okano, T. Fabricated autologous epidermal cell sheets for the prevention of esophageal stricture after circumferential ESD in a porcine model. *Gastrointest. Endosc.* **76**, 873-881 (2012).

- 18 Le Blanc, K. & Mougiakakos, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 383-396 (2012).
- 19 Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. & Marshak, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).
- 20 Schaffler, A. & Buchler, C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* **25**, 818-827 (2007).
- 21 Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 726-736 (2008).
- 22 Doorn, J., Moll, G., Le Blanc, K., van Blitterswijk, C. & de Boer, J. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. *Tissue Eng. Part B Rev.* **18**, 101-115 (2012).
- 23 Wong, R. K., Hagg, E. U., Rabie, A. B. & Lau, D. W. Bone induction in clinical orthodontics: a review. *Int. J. Adult Orthodon. Orthognath. Surg.* **17**, 140-149 (2002).
- 24 Stolzing, A. & Scutt, A. Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. *Aging. Cell* **5**, 213-224 (2006).
- 25 Alviano, F., Fossati, V., Marchionni, C., Arpinati, M., Bonsi, L., Franchina, M., Lanzoni, G., Cantoni, S., Cavallini, C., Bianchi, F., Tazzari, P. L., Pasquinelli, G., Foroni, L., Ventura, C., Grossi, A. & Bagnara, G. P. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev. Biol.* **7**, 11 (2007).
- 26 Ishikane, S., Ohnishi, S., Yamahara, K., Sada, M., Harada, K., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Kitamura, S., Nagaya, N. & Ikeda, T. Allogeneic injection of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells induces therapeutic angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia. *Stem Cells* **26**, 2625-2633 (2008).
- 27 Ishikane, S., Yamahara, K., Sada, M., Harada, K., Kodama, M., Ishibashi-Ueda, H., Hayakawa, K., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Kangawa, K. & Ikeda, T. Allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells attenuates acute myocarditis in rats. *J. Mol. Cell Cardiol.* **49**, 753-761 (2010).
- 28 Ohshima, M., Yamahara, K., Ishikane, S., Harada, K., Tsuda, H., Otani, K.,

- Taguchi, A., Miyazato, M., Katsuragi, S., Yoshimatsu, J., Kodama, M., Kangawa, K. & Ikeda, T. Systemic transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis. *J. Mol. Cell Cardiol.* **53**, 420-428 (2012).
- 29 Tsuda, H., Yamahara, K., Ishikane, S., Otani, K., Nakamura, A., Sawai, K., Ichimaru, N., Sada, M., Taguchi, A., Hosoda, H., Tsuji, M., Kawachi, H., Horio, M., Isaka, Y., Kangawa, K., Takahara, S. & Ikeda, T. Allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells contribute to renal repair in experimental glomerulonephritis. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **299**, F1004-1013 (2010).
- 30 Tsuda, H., Yamahara, K., Otani, K., Okumi, M., Yazawa, K., Kaimori, J. Y., Taguchi, A., Kangawa, K., Ikeda, T., Takahara, S. & Isaka, Y. Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protects against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Cell Transplant.* **23**, 889-899 (2014).
- 31 Onishi, R., Ohnishi, S., Higashi, R., Watari, M., Yamahara, K., Okubo, N., Nakagawa, K., Katsurada, T., Suda, G., Natsuizaka, M., Takeda, H. & Sakamoto, N. Human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates dextran sulfate sodium-induced severe colitis in rats. *Cell Transplant.* **24**, 2601-2614 (2015).
- 32 Ono, M., Ohnishi, S., Honda, M., Ishikawa, M., Hosono, H., Onishi, R., Nakagawa, K., Takeda, H. & Sakamoto, N. Effects of human amnion-derived mesenchymal stromal cell transplantation in rats with radiation proctitis. *Cytotherapy* **17**, 1545-1559 (2015).
- 33 Kawakubo, K., Ohnishi, S., Fujita, H., Kuwatani, M., Onishi, R., Masamune, A., Takeda, H. & Sakamoto, N. Effect of fetal membrane-derived mesenchymal stem cell transplantation in rats with acute and chronic pancreatitis. *Pancreas* **45**, 707-713 (2016).
- 34 Kubo, K., Ohnishi, S., Hosono, H., Fukai, M., Kameya, A., Higashi, R., Yamada, T., Onishi, R., Yamahara, K., Takeda, H. & Sakamoto, N. Human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates liver fibrosis in rats. *Transplant. Direct.* **1**, e16 (2015).
- 35 Osugi, M., Katagiri, W., Yoshimi, R., Inukai, T., Hibi, H. & Ueda, M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat

- calvarial bone defects. *Tissue Eng. Part A* **18**, 1479-1489 (2012).
- 36 Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Shou, M., Lee, C. W., Barr, S., Fuchs, S. & Epstein, S. E. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* **109**, 1543-1549 (2004).
 - 37 Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. & Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317 (2006).
 - 38 Honda, M., Hori, Y., Nakada, A., Uji, M., Nishizawa, Y., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Shimada, H., Kida, N., Sato, T. & Nakamura, T. Use of adipose tissue-derived stromal cells for prevention of esophageal stricture after circumferential EMR in a canine model. *Gastrointest. Endosc.* **73**, 777-784 (2011).
 - 39 Wynn, T. A. & Ramalingam, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.* **18**, 1028-1040 (2012).
 - 40 Du, Z., Wei, C., Cheng, K., Han, B., Yan, J., Zhang, M., Peng, C. & Liu, Y. Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces liver injury and enhances regeneration in reduced-size rat liver transplantation. *J. Surg. Res.* **183**, 907-915 (2013).
 - 41 Chen, Y. X., Zeng, Z. C., Sun, J., Zeng, H. Y., Huang, Y. & Zhang, Z. Y. Mesenchymal stem cell-conditioned medium prevents radiation-induced liver injury by inhibiting inflammation and protecting sinusoidal endothelial cells. *J. Radiat. Res.* **56**, 700-708 (2015).
 - 42 Barret, M., Pratico, C. A., Camus, M., Beuvon, F., Jarraya, M., Nicco, C., Mangialavori, L., Chaussade, S., Batteux, F. & Prat, F. Amniotic membrane grafts for the prevention of esophageal stricture after circumferential endoscopic submucosal dissection. *PLoS One* **9**, e100236 (2014).
 - 43 Sakurai, T., Miyazaki, S., Miyata, G., Satomi, S. & Hori, Y. Autologous buccal keratinocyte implantation for the prevention of stenosis after EMR of the esophagus. *Gastrointest. Endosc.* **66**, 167-173 (2007).
 - 44 Honda, M., Nakamura, T., Hori, Y., Shionoya, Y., Nakada, A., Sato, T., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Shimada, H., Kida, N., Hashimoto, A. & Hashimoto, Y. Process of healing of mucosal defects in the esophagus after endoscopic mucosal resection: histological evaluation in a dog model.

- Endoscopy* **42**, 1092-1095 (2010).
- 45 Perrod, G., Rahmi, G., Pidial, L., Camilleri, S., Bellucci, A., Casanova, A., Viel, T., Tavitian, B., Cellier, C. & Clement, O. Cell sheet transplantation for esophageal stricture prevention after endoscopic submucosal dissection in a porcine model. *PLoS One* **11**, e0148249 (2016).
 - 46 Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815-1822 (2005).
 - 47 Anderson, P., Souza-Moreira, L., Morell, M., Caro, M., O'Valle, F., Gonzalez-Rey, E. & Delgado, M. Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. *Gut* **62**, 1131-1141 (2013).
 - 48 Iizuka, T., Kikuchi, D., Yamada, A., Hoteya, S., Kajiyama, Y. & Kaise, M. Polyglycolic acid sheet application to prevent esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection for esophageal squamous cell carcinoma. *Endoscopy* **47**, 341-344 (2015).
 - 49 Hashimoto, S., Kobayashi, M., Takeuchi, M., Sato, Y., Narisawa, R. & Aoyagi, Y. The efficacy of endoscopic triamcinolone injection for the prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection. *Gastrointest. Endosc.* **74**, 1389-1393 (2011).
 - 50 Ryan, J. M., Barry, F. P., Murphy, J. M. & Mahon, B. P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J. Inflamm. (Lond.)* **2**, 8 (2005).