HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ポリグリコール酸シートと塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた内視鏡的粘膜下層剥離術後の食道狭窄に対する新規予防法の開発［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	西村, 友佑
Description	配架番号：2817
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15688号
Issue Date	2023-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91345
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	NISHIMURA_Yusuke_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　西村　友佑

学 位 論 文 題 名

ポリグリコール酸シートと塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた内視鏡的粘膜下層剥離術後の
食道狭窄に対する新規予防法の開発

(Application of polyglycolic acid sheets and basic fibroblast growth factor to prevent esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection in pigs)

【背景と目的】

内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD；endoscopic submucosal dissection)は表在型食道癌に対する治療の第一選択として広く浸透した手技である。臓器を温存できることが最大の利点であるが、周在性の大きい切除、特に 3/4 周性以上の切除では ESD 後の食道狭窄を高確率で引き起こし、複数回の食道バルーン拡張術を要するなど患者の生活の質(QOL；quality of life)を著しく低下させる。現在実地臨床の予防法として、ステロイドの全身投与や局所注射が主に用いられているが、その有害事象が問題視されており、全周性の切除に対してはステロイドの有用性が認められていない。

また、狭窄予防法としてポリグリコール酸(PGA；polyglycolic acid)からなるシートを用いている施設もあるが、単独での狭窄予防効果は不十分で、十分な効果を得るにはステロイドとの併用を要するのが現状である。

一方、線維芽細胞促進因子(FGFs；fibroblast growth factors)は創傷治癒を促進する重要な因子として知られており、特に塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF；basic FGF)は医薬品として製品化され褥瘡や皮膚潰瘍の治療に用いられているが、消化管に用いた報告はない。

今回、我々はブタ全周性食道 ESD モデルに対し PGA シートと bFGF を併用することで、ステロイド投与を要さない新規の狭窄予防法の開発を本研究の目的とした。

【対象と方法】

本研究は北海道大学の動物実験委員会の承認を得て行った。20-25kg のメス三元交配ブタを用いて、長軸方向 3cm の全周性食道 ESD モデルを作成した。創部に対し bFGF を浸した PGA シートを貼付した群を PGA+bFGF 群、PGA シートを単独で貼付した群を PGA 群、何も治療を施さない群をコントロール群とした。各群はそれぞれ 3 頭ずつとし、ESD 後 22 日目に安楽死させ食道を摘出し狭窄率を評価した。摘出した標本に対してはヘマトキシリン・エオジン(HE；hematoxylin Eosin)染色の他、免疫染色(αSMA、calponin-1、CD107a、MPO、Elastica Masson)を行い、創部における炎症反応や線維化の状態について病理学的な検討を行った。各項目は対応のない Student の t 検定および両側検定を用いて比較した。

また、in vitro の実験としてラット由来歯根膜幹細胞を培養したコラーゲンコートディッシュに TGF-β1 や FGF-2 を添加し、細胞分化の状態を観察した。さらにαSMA、calponin-1、COL 1a1、COL 1a2 遺伝子の発現について RT-qPCR を行い、発現量を評価した。

【結果】

コントロール群と比較して、PGA+bFGF 群で有意に狭窄が予防された(コントロール群: 62.5%, PGA 群: 45.7%, PGA+bFGF 群: 34.2%)。免疫染色では、抗αSMA 抗体で染色し一視野あたりの面積専有率を比較したところ、PGA 群と PGA+bFGF 群で有意に発現が抑制されていた(コントロール群: 24.0%, PGA 群: 15.5%, PGA+bFGF 群: 16.7%)。抗 calponin-1 抗体染色でもαSMA と同様に、PGA 群と PGA+bFGF 群で有意に発現が抑制された(コントロール群: 32.9%, PGA 群: 19.8%, PGA+bFGF 群: 24.4%)。MPO 陽性細胞については発現率に有意差は認められず(コントロール群: 8.6%, PGA 群:9.5%, PGA+bFGF 群: 6.1%)、CD107a 陽性細胞も同様に有意差は認めなかった(コントロール群: 4.6%, PGA 群: 4.2%, PGA+bFGF 群: 4.3%)。

Elastica Masson 染色で線維化の特徴について評価したところ、線維層そのものの厚みの平均値はコントロール群に比べて PGA 群と PGA+bFGF 群で高い傾向があった。(コントロール群: 600.7μm, PGA 群: 973.644μm, PGA+bFGF 群: 898.96μm)。一方、線維化の均一性を評価するために創部の表層まで加えて測定したところ、平均値には有意差がなかったが(コントロール群: 962.98μm, PGA 群: 1358.05μm, PGA+bFGF 群: 1131.28μm)、最も厚い部分と最も薄い部分の差の比較ではコントロール群と PGA 群に比べて PGA+bFGF 群で有意に差が小さかった(コントロール群: 726.15μm, PGA 群: 934.89μm, PGA+bFGF 群: 467.34μm)。

ラットの歯根膜幹細胞を用いた in vitro の実験でも、FGF-2 が添加された条件では TGF-β1 の存在下でもαSMA と COL 1a1 の遺伝子発現が有意に抑制され、calponin-1、COL 1a2 についても発現が抑制される傾向にあった。

【考察】

コントロール群と比較して、PGA+bFGF 群で有意に狭窄が予防された。また PGA 群と PGA+bFGF 群ではコントロール群と比較してαSMA や carponin-1 の発現が有意に抑制されており、Elastica Masson 染色の結果から、PGA+bFGF 群では創部全体に厚みのムラがなく、線維芽細胞が密な部分と疎な部分の差が小さく均一な線維化が生じていることが示唆された。さらに in vitro の実験で得られた結果から、bFGF の抗線維化作用を確認することができた。

本研究で使用した PGA シートは、それ単体でもある程度の狭窄予防効果があることは既に示されているが、本研究では bFGF を染み込ませて創部に貼付した。bFGF はフィブラスト®スプレーとして製品化されており使用方法も容易で、皮膚潰瘍や褥瘡に対しては既に広く用いられているが消化管の創傷に対してはいまだ用いられていない。今回の検討では、PGA シートが bFGF の足場としても機能し、bFGF が急性期の無秩序な線維化を抑制することでより良い狭窄予防につながったと考えられる。

【結論】

食道 ESD 後の狭窄は急性期の線維化と密接な関連を持つ。bFGF を PGA シートと併用することで、急性期の無秩序な線維化を抑制し、全周性食道 ESD 後の有意な狭窄予防効果を示した。将来的にはヒトに対し全周性食道 ESD 後の狭窄を予防できる可能性を秘めており、臨床応用が期待される。