



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15688
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91354
Type	doctoral thesis
File Information	NISHIMURA_Yusuke.pdf



学位論文

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)

2023年12月
北海道大学
西村 友佑

学位論文

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)

2023年12月
北海道大学
西村 友佑

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
方法	12 頁
結果	20 頁
考察	35 頁
結論	38 頁
謝辞	39 頁
利益相反	40 頁
引用文献	41 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の雑誌に投稿中である。

1. Application of polyglycolic acid sheets and basic fibroblast growth factor to prevent esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection in pigs
Yusuke Nishimura; Masayoshi Ono; Naoto Okubo; Takayuki Sone; Masayuki Higashino; Shogo Matsumoto; Marina Kubo; Keiko Yamamoto; Shoko Ono; Shunsuke Ohnishi; Naoya Sakamoto
Endoscopy

本研究の一部は以下の学会にて発表予定である。

1. 西村 友佑、大野 正芳、坂本 直哉
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ESD後の食道狭窄に対する新規予防法の開発
第105回日本消化器内視鏡学会総会 2023年5月25日 - 5月27日、東京

要旨

【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、さらに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を併用することによる、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。20-25 kgのメス三元交配ブタを用いて、長軸方向3 cm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(α SMA、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- β 1やFGF-2を添加し、細胞分化の状態を観察した。さらに α SMA、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 α SMA 抗体で染色し1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 α SMA 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、厚みの平均値には有意差がなかったが(コントロール群: 962.98 μ m, PGA 群: 1358.05 μ m, PGA+bFGF 群: 1131.28 μ m)、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: 726.15 μ m, PGA 群: 934.89 μ m, PGA+bFGF 群: 467.34 μ m)。

bFGF の抗線維化作用を検証するために行なった、ラットの歯根膜幹細胞を用いた *in vitro* の実験においても、FGF-2(bFGF)が添加された条件では TGF- β 1 の存在下でも α SMA 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。蛍光染色を用いた観察でも、Calponin-1 や細胞骨格線維束の分化が bFGF を添加することで抑制されていた。

【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 α SMA や Calponin-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は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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

α SMA	α -smooth muscle actin
bFGF	basic fibroblast growth factor
EMR	endoscopic mucosal resection
ESD	endoscopic submucosal dissection
FBS	fetal bovine serum
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
HE	hematoxylin and eosin
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MPO	myeloperoxidase
NBI	narrow band imaging
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
PKC	protein kinase C
PLC γ	phosphoinositide-specific phospholipase C γ
PGA	polyglycolic acid
QOL	quality of life
RT-qPCR	reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
STAT	signal transducers and activator of transcription
TGF- β 1	transforming growth factor- β 1

緒言

食道癌の罹患数は世界で8番目に多く、2020年の罹患数は604,100人とされている(GLOBOCAN 2020)。本邦においては2019年の罹患数が26,382人(男性21,719人、女性4,663人)であり、死亡数は2020年のデータで10,981人(男性8,978人、女性2,003人)である(国立がん研究センター がん統計)。罹患数に関しては、順位は高くないものの1970年代から一貫して増加傾向である一方、死亡数は2010年頃から頭打ちになっている。診断技術の向上により早期発見の症例が増加していること、外科手術や化学療法、放射線療法等の治療法が進歩していることが原因として考えられる。

特に近年では、表在型食道癌として発見され、食道の温存が可能な内視鏡的切除の適応となる症例が増えてきている(Alsop et al., 2016; Malik et al., 2018)。内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)は、従来より行われてきた内視鏡的粘膜切除術(EMR; endoscopic mucosal resection)と比較して穿孔などの合併症が生じやすいものの、腫瘍の径や位置に関わらず一括切除が可能であり、治療後の再発率もEMRに比べて低いことが知られている(Cao et al., 2009; Fujishiro et al., 2009; Katada et al., 2005; Takahashi et al., 2010)。そのため表在型食道癌の治療の第一選択として広く浸透してきた(Min et al., 2018)。しかし、周在性の高い大きな切除を行った場合、ESD後の食道狭窄が生じ、通過障害などのため患者のQOLを著しく損なうことが問題となっている。特に3/4周以上の切除では、66-100%と高率に食道狭窄を来し、複数回の食道バルーン拡張術を要する(Miwata et al., 2016; Ono et al., 2009)。特に全周性の切除を行なった場合、通過障害が改善し拡張が不要となるまでに30回以上、期間にして1年以上にわたってバルーン拡張を要したという報告(Sato et al., 2013)があり、一度狭窄をきたしてしまうと患者のQOLを著しく損なってしまうことがわかる。

一般に生体組織において、傷を修復しようとする防御反応の実行役は筋線維芽細胞である。潰瘍等が生じると筋線維芽細胞が遊走・分化し、そこにコラーゲンが大量に分泌される。結果として生じる収縮力が過剰であることによって癒痕収縮に繋がってしまう(Zhang et al., 2018)。

食道ESD後に狭窄が生じるのもそのためと考えられ、狭窄を予防するためにバルーン拡張の他、ステロイドの投与をされることが一般的である。ステロイドはコラーゲンの合成を阻害、あるいは分解する作用がある他、急性期の抗炎症作用が狭窄予防に関与すると考えられている(Kochhar et al., 2002; Nonaka et al., 2013)。しかしこれらの方法では穿孔、縦隔膿瘍や脳膿瘍、ステロイド特有の様々な有害事象が報告されている(Ishida et al., 2015; Kinowaki et al., 2021; Yamashita et al., 2013; Yamashita et al., 2019)。さらには、予防的ステロイド投与は7/8周性の切除までは

効果的であるものの、全周性の切除に対しては無効であることが近年の報告で示された (Kadota et al., 2016)。

よって、全周性の食道 ESD に対しては、ステロイド投与にうってかわる新たな狭窄予防法が求められている。

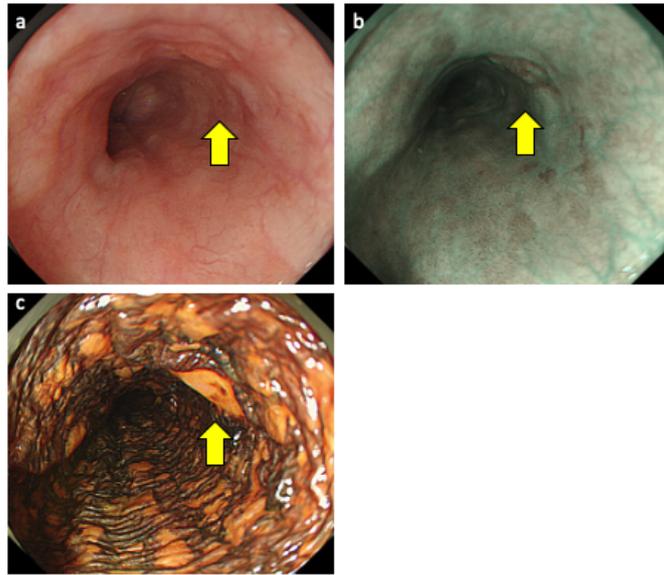


図1. 内視鏡的に発見された表在型食道癌(0-IIb型)

a 白色光観察。発赤調の平坦陥凹病変であるが、一見わかりにくい。 **b** 画像強調観察の1つであるNarrow band imaging (NBI)を用いた観察。白色光と比較し境界明瞭なBrownish areaとして観察される。 **c** ヨード散布像。ヨード不染帯として明瞭に観察される。

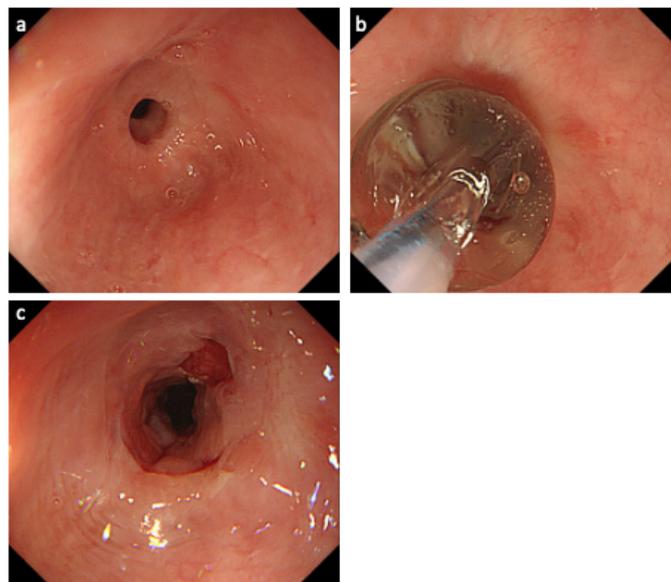


図2. 食道ESD後の狭窄と食道バルーン拡張術

a 食道ESD後にピンホール状に狭窄をきたし、スコープの通過は不可な状態。 **b** 食道バルーン拡張術。 **c** 拡張後。拡張部には裂創を認め、狭窄の程度は幾分軽快している。

生体吸収性のポリグリコール酸からなるシート(以下、PGAシート)はネオベール[®]シートとしてグンゼメディカル社から発売されており、外科領域では既に様々な用途に使用されている他、食道ESD後の狭窄予防にも一定の効果があることが報告されている(Sakaguchi et al., 2015)。狭窄を予防する機序ははまだ解明されていないが、PGAシートを患部に貼付する際に使用するフィブリン製剤には狭窄予防効果は認められない(Chen et al., 2020)ため、PGAシートに狭窄予防効果があると考えられている。ただし、SakaguchiらはPGAシートのみでは不十分で、PGAシートの貼付とステロイドの局注を併用することで十分な狭窄予防効果が得られることを示した(Sakaguchi et al., 2020)。PGAシートに何かしらの方法で狭窄予防効果を上乘せする必要があるが、簡便で、ステロイドよりも有害事象などの懸念が少ない安全な方法が望まれる。

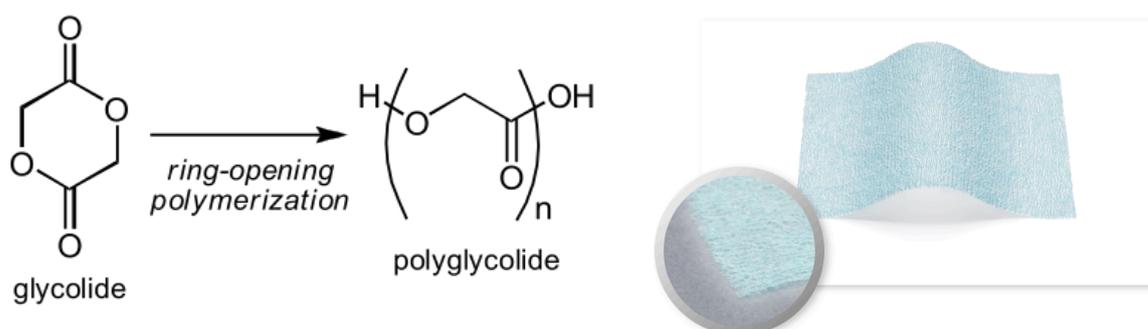


図3. ポリグリコール酸(PGA)

左：ポリグリコール酸の構造式 右：ネオベール[®]シート(グンゼメディカル社)

線維芽細胞増殖因子(FGFs)はヒト初期胚、成体ともに様々な細胞で発現するシグナル伝達ポリペプチドで(Moosa et al., 2016)、1974年の最初の発見以来、23種類のファミリータイプの存在が明らかとなっている。胚細胞にしか発現しないFGFsも一部存在するが、多くは胚組織と成体組織の両方で発現し、創傷治癒を促進する因子として非常に重要である(Beenken et al., 2009; Dvorak et al., 2005; Wang et al., 2008; Xiao et al., 2008)。特にファミリータイプの2番目(FGF2)である塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)は代謝や細胞外マトリックスの成熟を促進し、中胚葉由来細胞の働きを刺激する(Barrientos et al., 2008)。その結果、細胞の増殖と分化、遊走促進、血管新生促進などの作用が知られ(Jia et al., 2021)、線維芽細胞に分化しうる幹細胞に対しても強力な細胞分裂促進因子として作用する。2001年には世界初の組み換え型ヒトbFGF(rhbFGF ; recombinant human bFGF)製剤であるフィブラスト®スプレーが科研製薬株式会社から発売され、現在では創傷治癒や瘢痕抑制を目的に広く用いられている(Abdelhakim et al., 2020)。bFGFの投与は急性および慢性の皮膚創傷に対して治癒を促進することが知られている(Akita et al., 2008; Fu et al., 1998; Tan et al., 2008; Xiang et al., 2011)が、消化管のESD後潰瘍に用いた報告はなく、食道ESD後の狭窄予防効果は不明である。

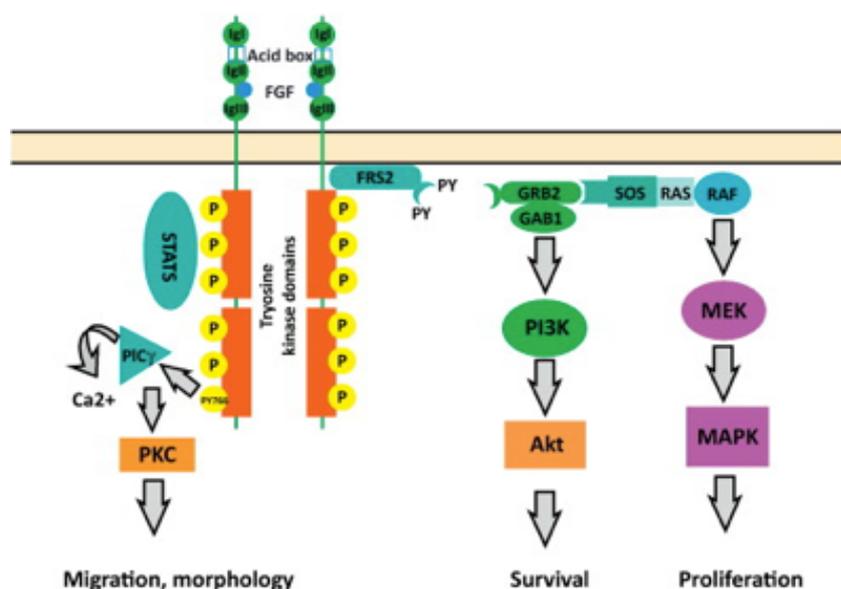


図4. FGF/FGFR シグナル

FGFはチロシンキナーゼ型受容体であるFGFRに結合し、細胞内へのシグナル伝達を行う。MAPK経路やPI3K/AKT経路、STAT経路、PLC γ /PKC経路などへの関与が報告されている。

Liang G et al. Trends Pharmacol Sci 2012;33:531-541. より引用



図5. フィブラスト®スプレー(科研製薬)

本研究の目的は、狭窄予防効果があるが単独では不十分であるPGAシートと、癒痕抑制効果が期待されるが消化管における効果が明らかにされていないbFGFを併用して食道ESD後の創部に投与し、新規の狭窄予防法としての有用性を評価することである。

方法

動物モデル

20–25kg のメスの三元交配ブタ (Sankyo Labo Service, Tokyo Japan) を使用した。前投薬として、まずアトロピン (1 mg; Terumo, Tokyo, Japan) を筋肉内注射し、10 分間置いた。次にミダゾラム (1.6 mg; Astellas Tokyo, Japan)、ブトルファノール (0.8 mg; Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan)、塩酸デクスメトミジン (0.4 mg; Nippon Zenyaku Kogyo, Fukushima, Japan) の三種を混合して筋肉内注射し、麻酔導入とした。鎮静されたブタに気管挿管を行い、人工呼吸器に接続し 3%セボフルランで麻酔を維持した。心拍数や胸部誘導心電図、酸素飽和度をモニター (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) で終始観察し、ESD は上部消化管汎用ビデオスコープ (GIF-Q240; Olympus, Tokyo, Japan) に透明な先端フード (Top, Tokyo, Japan) を装着して行った。

切除範囲は長軸方向 3 cm とし、切除ラインを決定するためナイフ長 1.5 mm の送液機能付きディスポーザブル高周波ナイフ (Dual Knife J; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて切歯から 39 cm、42 cm の食道粘膜にマーキングを行った。粘膜切開の前にグリセロール溶液を 25 ゲージ針 (Top, Tokyo, Japan) で注入し、Dual Knife J で切歯から 39 cm、42 cm の食道粘膜をそれぞれ全周切開した。粘膜下層の剥離も同様にグリセロール溶液の注入後、Dual Knife J を用いた。粘膜切開および粘膜下層剥離の際は高周波装置 (ESG-100; Olympus, Tokyo, Japan) をパルスカット、スローモード (40W) または forced 凝固モード (50W) に設定した。出血時は、必要に応じて止血鉗子 (Coagrasper; Olympus, Tokyo, Japan) をソフト凝固モード (40W) で用いて止血した。全ての ESD 手技は 1 名の内視鏡医 (西村友佑) が行い、全過程が録画され、ESD 施行時間、PGA シート貼付時間、PGA シートの枚数が記録された。全てのブタは ESD 当日のみ絶食とし、翌日は水のみ摂取させ、2 日目からは固形餌を与えた。

本研究は、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に基づき、北海道大学の動物実験委員会の承認を得て実施した。

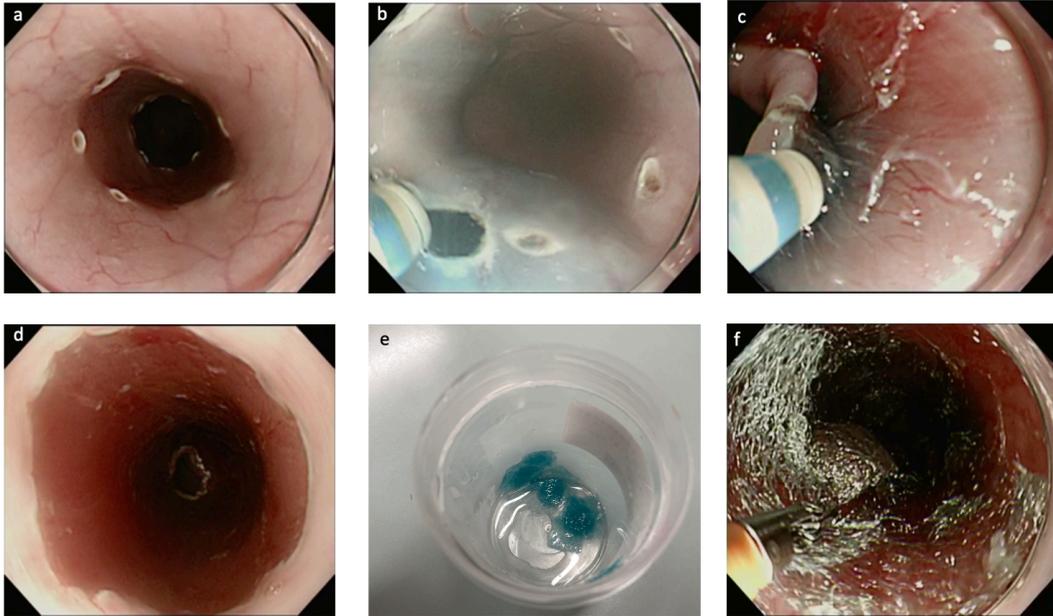


図6. 動物モデルの作成

a マーキング。 b 粘膜切開。 c 粘膜下層剥離。 d ESD 後の創部。 e 1 cm²にカットしたPGAシート。PGA+bFGF 群に対してはフィブラスト[®]スプレーを染み込ませた。 f 創部へのPGAシートの貼付。

研究デザイン

全周性食道 ESD 後の狭窄予防における bFGF の効果を評価するため、下記のように 3 つの群を設定した。各群は 3 頭ずつ、計 9 頭とした。

- 1) コントロール群
- 2) PGA 群
- 3) PGA+bFGF 群

PGA シートは 1 cm^2 にカットして 20 枚作成し、PGA+bFGF 群にはフィブラスト[®]スプレー ($250 \mu\text{g}/2.5 \text{ mL}$) を計 1 mL 、つまり計 $100 \mu\text{g}$ を浸透させて創部に貼付した。PGA 群には PGA シートを単独で貼付し、コントロール群には ESD 後に一切の処置を加えなかった。PGA+bFGF 群、PGA 群ともに、貼付した PGA シートにフィブリン製剤を散布して固定した。20 枚のシートは可能な限り全て使用し、創部全体にシートが貼付された状態を目指した。

8 日目に上部消化管内視鏡検査 (EGD ; esophagogastroduodenoscopy) を行って食道を内視鏡的に観察 (スコープは GIF-Q240 を使用) し、創部の状態と狭窄の程度を評価した。22 日目に安楽死させ食道を摘出した。

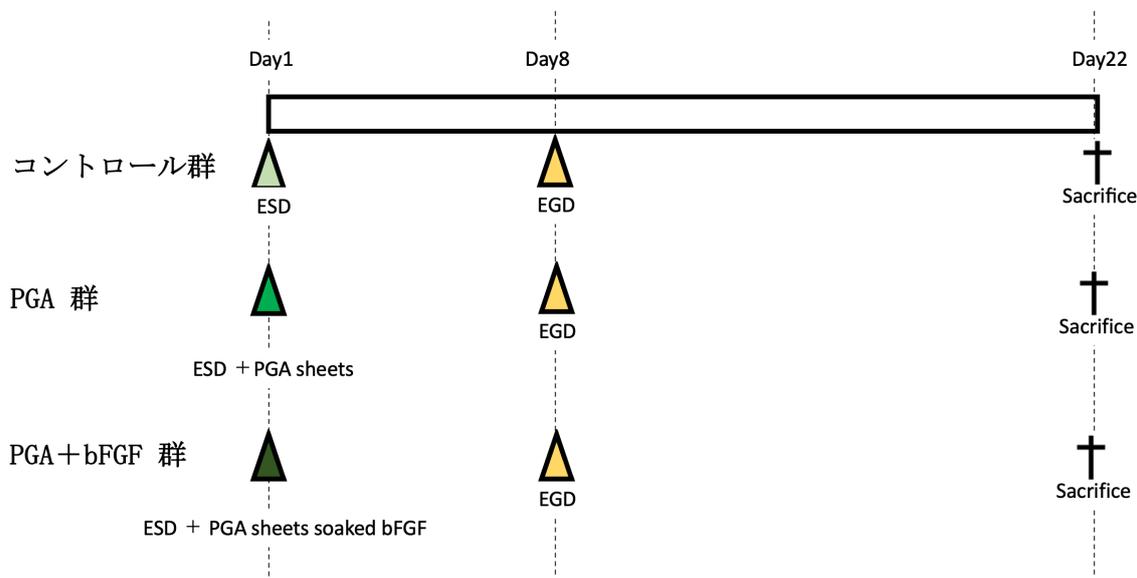


図 7. 研究デザイン

いずれの群も 1 日目に ESD を施行し、創部に対して PGA 群には 1 cm^2 の PGA シートを、PGA+bFGF 群には 1 cm^2 の PGA シートに bFGF (フィブラスト[®]スプレー) を染み込ませた状態で貼付した。いずれも 8 日目に EGD で観察し、22 日目に安楽死させ食道を摘出した。

食道 ESD 後の狭窄率の評価

安楽死は、全身麻酔後に 15%塩化カリウム(20 mL; Terumo, Tokyo, Japan)を静脈注射することにより行った。前頸部および腹部を切開し径裂孔的に食道を摘出した。ただちに長軸方向に切開し、ゴム板にピンで固定した。狭窄は短軸方向の粘膜収縮として観察されるが、既報(Kanai et al., 2012; Mizushima et al., 2017)に準じて下記のように定義し狭窄率を算出した。

$$\text{狭窄率(\%)} = [1 - (\text{最狭窄部の長さ}) / (\text{口側の正常部分の長さ} + \text{肛門側の正常部分の長さ}) / 2] \times 100$$

組織学的・免疫組織学的評価

摘出した食道は狭窄率の算出後、40 g/L のホルムアルデヒド水溶液で固定しパラフィンで包埋、短軸方向に切り出して 5 mm の切片を作成した。組織切片はヘマトキシリン・エオジン(HE ; hematoxylin and eosin)染色の他、免疫染色として抗 α 平滑筋アクチン(α SMA ; α -smooth muscle actin antibody)抗体(clone 1A4, dilution 1:1000; Sigma-Aldrich)、抗ミエロペルオキシダーゼ(MPO ; myeloperoxidase)抗体(dilution 1:300; Thermo Scientific, Waltham, Mass)、抗CD107a抗体(clone 4E9/11, dilution 1:300; AbD Serotec, Kidlington, UK)、抗カルポニン1(Calponin-1)抗体(dilution 1:1000; Abcam, Camnridge, UK)で染色した。各ブタの創部の切片のうち、任意の5視野を倍率200倍(スケールバーは50 μ m)で撮影し、デジタルイメージアナライザー(WinROOF 2018; Mitani Co., Fukui, Japan)を用いて各視野あたりの染色面積を測定した。

また、Elastica Masson 染色によるコラーゲン線維の染色も行った。染色された線維層の下端から創部表面までの厚さを測定し、最も厚い部分、最も薄い部分を含む任意の5か所を cellSens (Olympus, Tokyo, Japan)を用いて倍率40倍で観察した(スケールバーは200 μ m)。

in vitro での検証

bFGF の抗線維化作用をより明らかにするため、北海道大学大学院薬学研究院分子細胞医薬学研究室から提供いただいた単一細胞由来培養のラット由来歯根膜幹細胞を用いた in vitro の実験を行った。

〈ステップ 1〉 幹細胞の培養

以下の 4 条件で幹細胞の培養を行なった。維持条件の作成は既報 (Yoshida et al., 2012) を参考にした。

【試薬および材料】

FGF-1 (10 ng/mL)	(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)
heparin	(Sigma, St. Louis, MO)
3%, 10% ウシ胎児血清 (FBS ; fetal bovine serum)	(PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria)
F-12-HAM	(Sigma, St. Louis, MO)
TGF- β 1 (3 ng/mL)	(PEPROTEC Inc., Rocky Hill, NJ, USA)
FGF-2 (10 ng/mL)	(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)

- 1) 幹細胞をコラーゲンコートディッシュに播種し、コンフルエントにした。
- 2) コンフルエントに達した幹細胞を継代し、以下の条件で 3 日間培養した。

① 未分化能を維持できる条件 (維持条件)

10%FBS・heparin・FGF-1 (10 ng/mL) を添加した F-12-HAM

② 幹細胞の分化誘導条件 A

濃度を 3% に低下させた FBS (3%FBS) を添加した F-12-HAM

③ 幹細胞の分化誘導条件 B (条件 A + TGF- β 1)

3%FBS・TGF- β 1 (3 ng/mL) を添加した F-12-HAM

④ 幹細胞の分化誘導条件 C (条件 B + フィブラストスプレーの主成分 FGF-2)

3%FBS・TGF- β 1 (3 ng/mL)・FGF-2 (10 ng/mL) を添加した F-12-HAM

いずれも室温 37°C・5% 二酸化炭素濃度下で培養を行い、3 日後の状態を評価した。

〈ステップ2〉各条件の分化に関する評価

上記4つの条件で3日間培養後、線維芽細胞のマーカーである α SMAならびに Calponin-1(CNN1)、1型コラーゲンをコードする2種類の遺伝子(COL 1a1, COL 1a2)について定量的逆転写PCR(RT-qPCR ;Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction)を行った。さらに蛍光染色を用いて Calponin-1、線維束(アクチン)タンパクの分化について評価した。

【試薬および材料】

ISOGEN II reagent	(Nippon Gene, Toyama, Japan)
PrimeScript RT reagent Kit	(Takara-Bio, Shiga, Japan)
SYBR Premix Ex Taq II	(Takara-Bio, Shiga, Japan)
RNase free water	(Takara-Bio, Shiga, Japan)
RNeasy Mini Kit	(Qiagen, Hilden, Germany)

RNAの抽出は、ISOGEN IIを用いて以下の方法で行った。

- ① 直径6 cmの培養ディッシュをPBSで洗浄後、ISOGEN IIを200 μ L加えたのち、室温で5分間振盪培養を行い、細胞を溶解させた。
- ② 細胞溶解液を1.5 mLチューブへ移し、80 μ LのRNase free waterを加えたのち、ボルテックスした。
- ③ 室温で10分間インキュベートした。
- ④ 4 $^{\circ}$ C、12000 $\times g$ で10分間遠心分離した。
- ⑤ 200 μ Lの上清を別の1.5 mLチューブに回収した。
- ⑥ 回収した上清に2-プロパノールを200 μ L加えたのち、ボルテックスした。
- ⑦ 室温で10分間インキュベートした。
- ⑧ 4 $^{\circ}$ C、12000 $\times g$ で10分間遠心分離した。
- ⑨ RNAペレットを吸わないようにしながら注意深く、上清を取り除いたのち、70%エタノールで洗浄した。
- ⑩ 4 $^{\circ}$ C、12000 $\times g$ で5分間遠心分離した。
- ⑪ エタノール上清を取り除き、RNAペレットを室温で十分乾燥させた。
- ⑫ RNase free waterでRNAペレットを溶解し、RNA溶解液を得た。
- ⑬ Nano Drop One C, Thermo Scientificを用いて、RNA濃度測定を行った。

逆転写の過程はRT reagent Kitを用いて以下手法にて行った。

- ① 8 μ Lの500 ng RNA溶解液を作成した。
- ② RT reagent 2 μ Lを加え、10 μ Lの反応液を作成した。

- ③ TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice を用いて、37°C 10 分間の処理を行い、cDNA 溶液を作成した。

定量的逆転写 PCR の過程は SYBR Premix Ex Taq II を用いて以下手法にて行った。

- ① 逆転写の過程で作成した 500 ng RNA 相当の cDNA 溶液 10 μ L に対し、RNase free water を 190 μ L 加え、2.5 μ g/ μ L の cDNA 溶液を調整した。

- ② 定量的逆転写 PCR 反応溶液を以下の容量で調整した

• Forward primer	1.0 μ L
• Reverse primer	1.0 μ L
• cDNA 溶液	8.0 μ L
• SYBR Premix Ex Taq II	10.0 μ L

- ③ Thermal Cycler Dice® Real Time System III を用いて 40 サイクルのリアルタイム PCR 反応を行った。

遺伝子発現レベルは β -actin を内在性コントロールとして用いて、comparative threshold cycle (ddCt) method で計算したのち、グラフ作成を実施した。

α -smooth muscle actin (α -SMA)	F: AGCCAGTCGCCATCAGGAAC
	R: CCGGAGCCATTGTCACACAC
calponin-1 (CNN1)	F: ACACTTTAACCGAGGTCCTGCCTA
	R: CACGCTGGTGGTCGTATTTCTG
Col 1a1	F: GACATGTTTCAGCTTTGTGGACCTC
	R: AGGGACCCTTAGGCCATTGTGTA
Col 1a2	F: CTGGATTGACCCTAACCAAGGATG
	R: TTGACAGGTTGGGCCTGGA
β -actin	F: GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA
	R: GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG

評価項目

① 食道粘膜狭窄率

- ・PGA+bFGF 群における全周性食道 ESD 後 22 日目の狭窄率 (他群との比較)

② 病理学的検討

- ・抗 α SMA 抗体染色の 1 視野あたりの染色面積
- ・抗 Calponin-1 抗体染色の 1 視野あたりの染色面積
- ・抗 MPO 抗体染色の 1 視野あたりの染色面積
- ・抗 CD107a 抗体染色の 1 視野あたりの染色面積
- ・Elastica Masson 染色で染色された線維層、創部表面までの厚み

③ in vitro 試験における bFGF の抗線維化作用の検証

- ・線維化に関わる各遺伝子の発現
- ・細胞骨格線維束、Calponin-1 の蛍光染色像の観察

統計

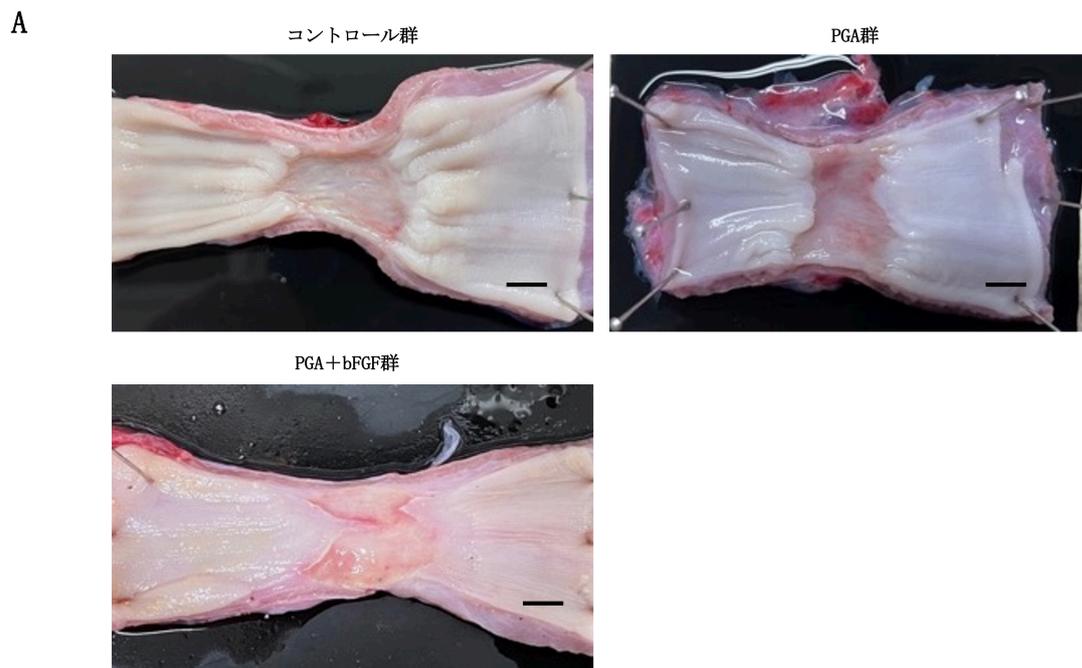
各データは平均標準偏差として表され、変数は一元配置分散分析、続いて対応のない Student の t 検定および両側検定を用いて比較した。各解析における p 値が < 0.05 の場合を統計的に有意であるとみなした。全ての分析は GraphPad Prism version 8 (GraphPad Software, San Diego, Calif) を用いて行った。

サンプルサイズについては、同様の先行研究がないため、事前にサンプルサイズを算出することは行わなかった。各群 3 頭ずつ、合計 9 頭に対し実験を行った後に算出を行い、9 頭で十分であることを確認した。

結果

狭窄率

ESD 後 22 日目に摘出した食道のマクロ写真を図 8 に示す。コントロール群と比較して、PGA+bFGF 群で有意に食道狭窄が抑制された(コントロール群: 62.5%, PGA 群: 45.7%, PGA+bFGF 群: 34.2%, $*p < 0.05$)。



B

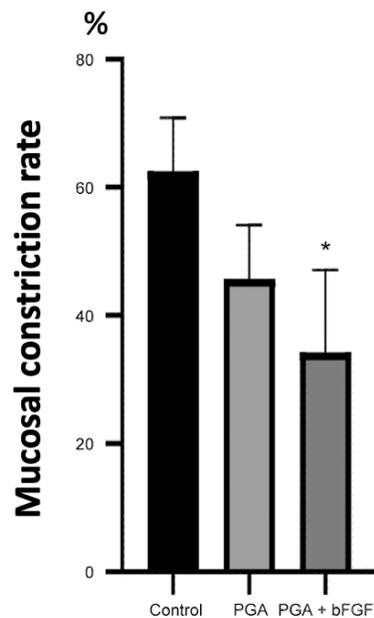


図 8. 摘出標本(食道)と狭窄率

A 写真右側が口側、左側が肛門側。

スケールバー: 10 mm

B 狭窄率。* $p < 0.05$ vs コントロール群

病理学的検討

ブタ食道 ESD モデルに対する bFGF の影響を評価するため、病理学的な検討を行った。H&E 染色ならびに Elastica Masson 染色像を下記に示す。再生組織の配列がコントロール群では無秩序である一方、PGA 群と PGA+bFGF 群では規則的な配列を示しており、特に PGA+bFGF 群ではその傾向が顕著であった(図 9)。

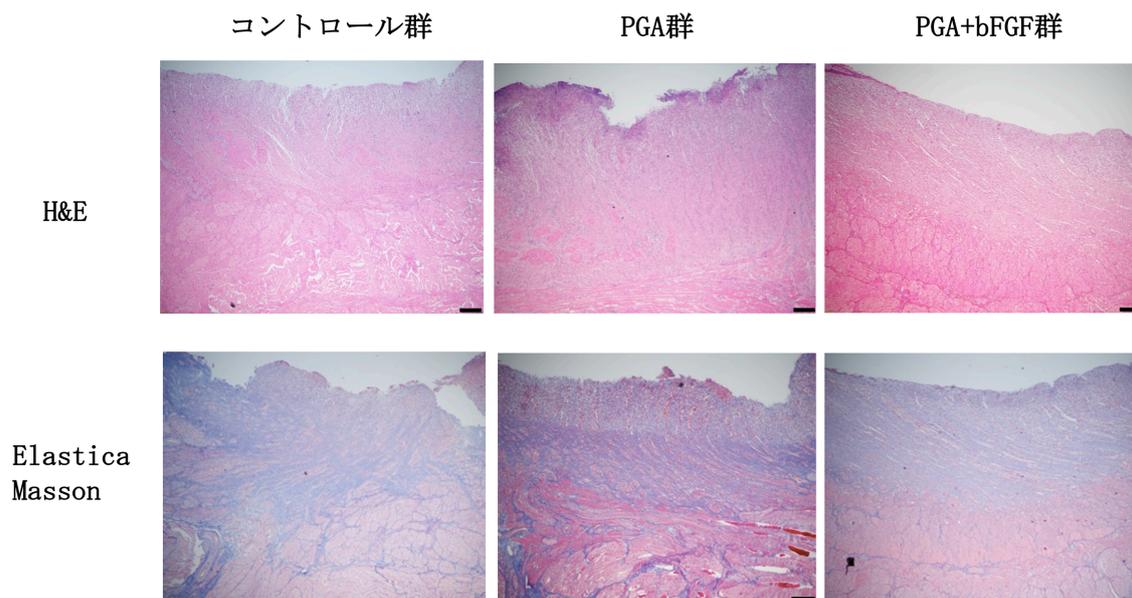


図 9. HE 染色と Elastica Masson 染色 (スケールバー : 200 μ m)

MPO の発現率は、任意の 5 視野の平均値に各群間の有意差はなかった(コントロール群: 8.6%, PGA 群:9.5%, PGA+bFGF 群: 6.1%)。CD107a の発現率も同様に、任意の 5 視野の平均値に各群間の有意差はなかった(コントロール群: 4.0%, PGA 群: 4.1%, PGA+bFGF 群: 4.3%)。つまり bFGF あるいは PGA の投与は、炎症反応や免疫反応の活性には影響を及ぼさなかった。図 10、図 11 に代表的な像を示す。

A

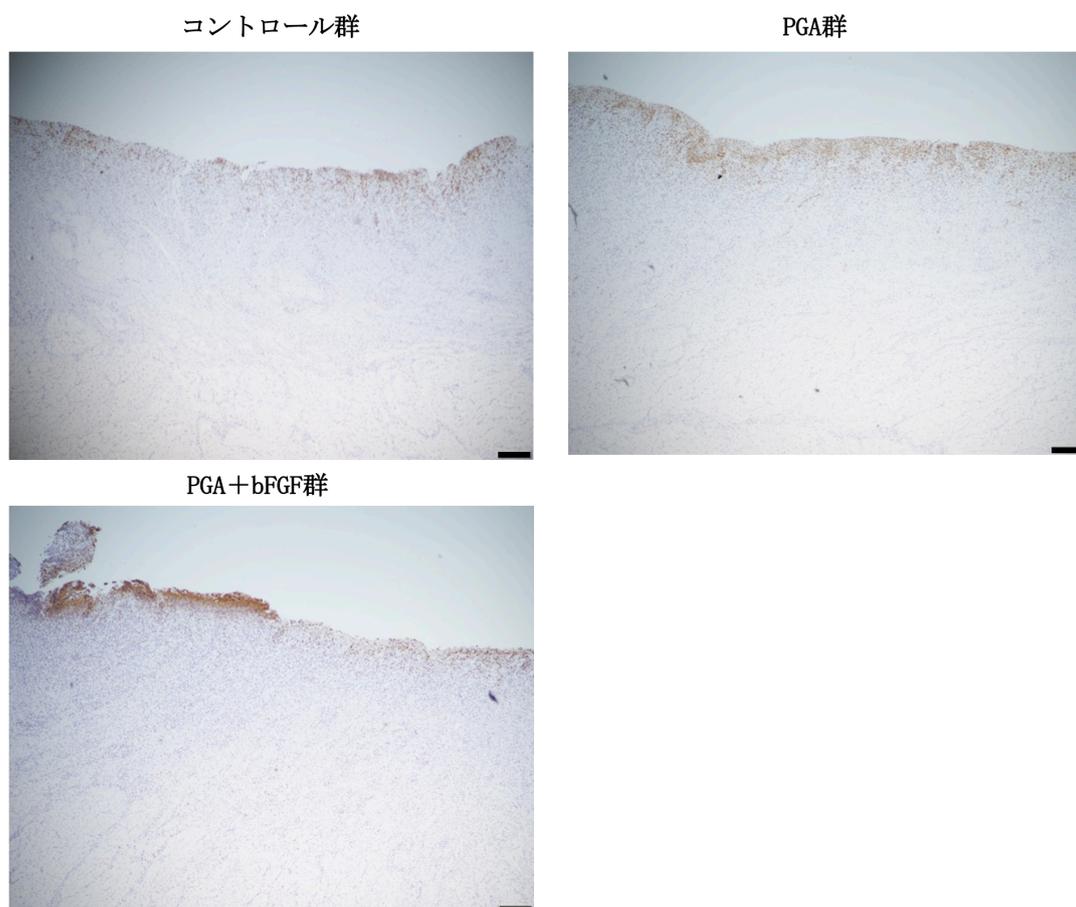


図 10 A. MPO 染色像 (スケールバー : 200 μm)

B

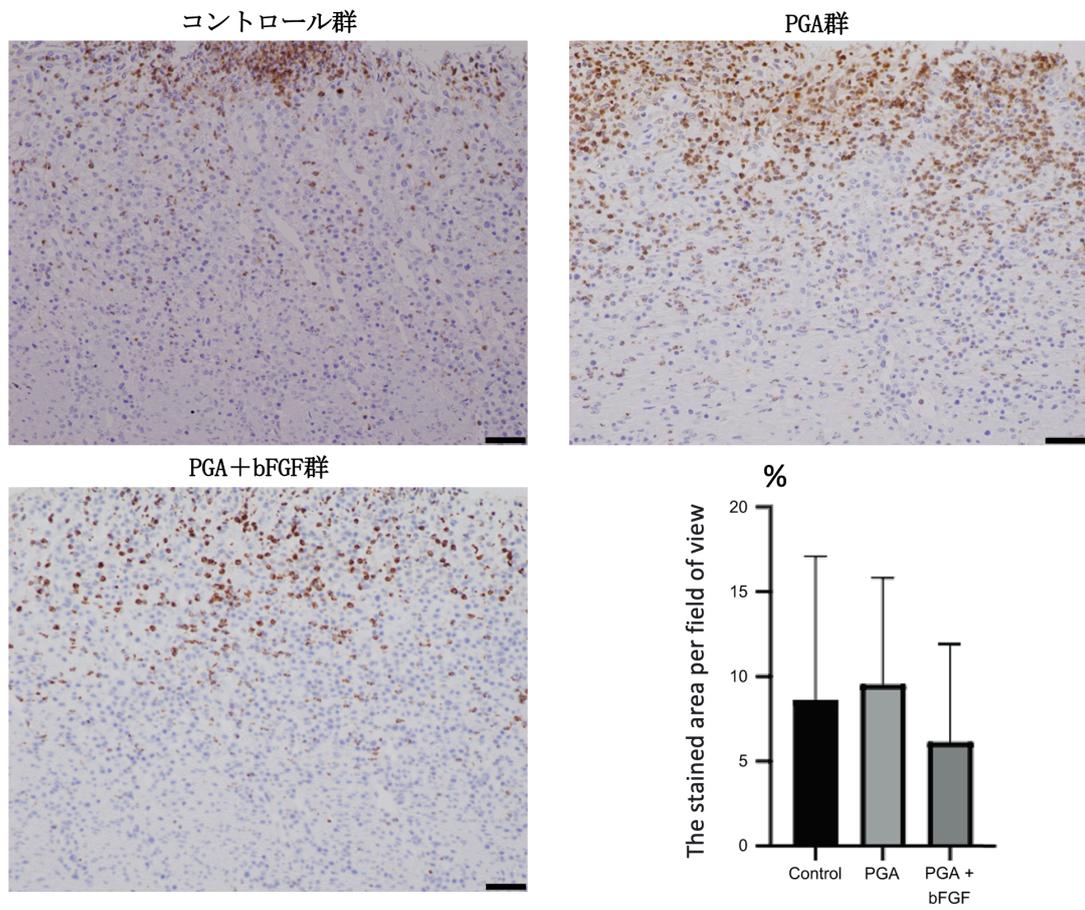


図 10 B. MPO 染色像 (スケールバー : 50 μ m) と 1 視野あたりの染色率

A

コントロール群



PGA群



PGA+bFGF群



図 11 A. CD107a 染色像 (スケールバー : 200 μ m)

B

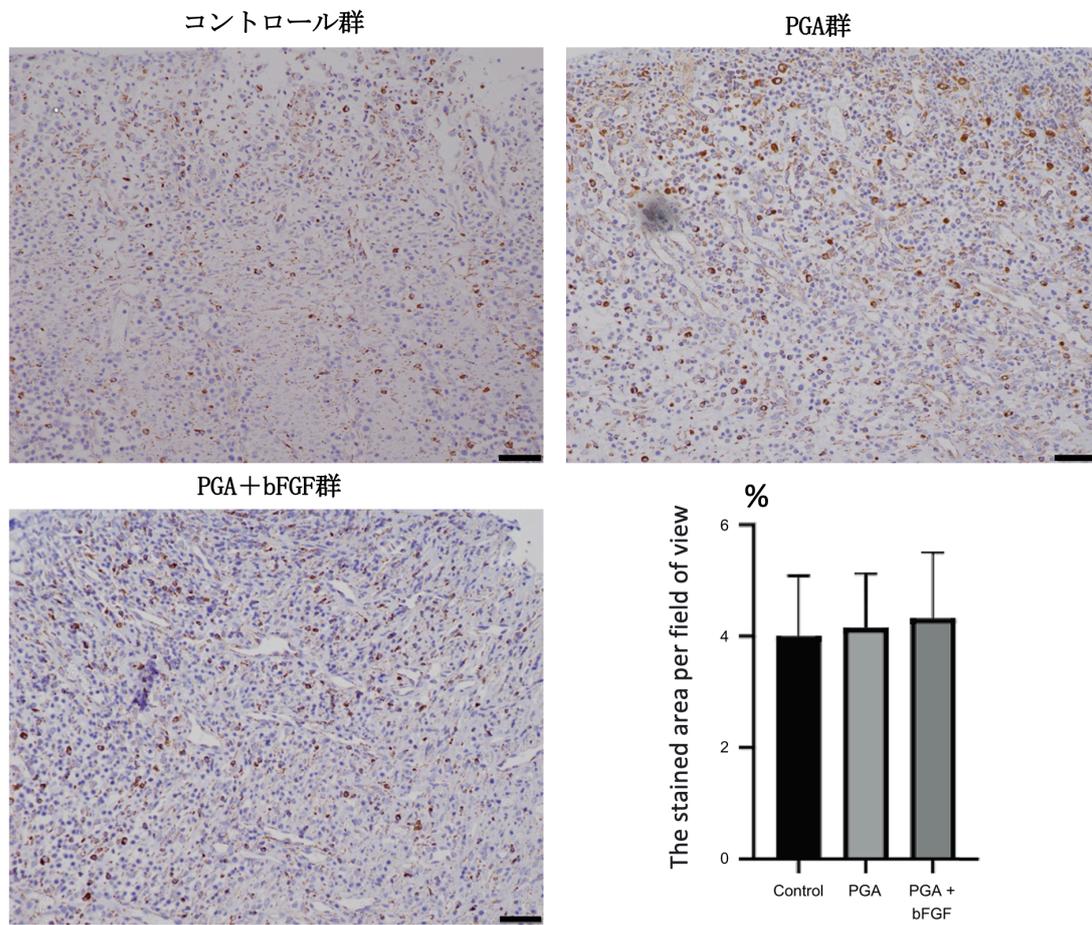


図 11 B. CD107a 染色像 (スケールバー : 50 μ m) と 1 視野あたりの染色率

一方、抗 α SMA抗体を用いて免疫染色を行うと、任意の5視野における染色率の平均値はコントロール群と比較してPGA群およびPGA+bFGF群で有意に低く、 α SMAの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%)。図12に代表的な像を示す。

A

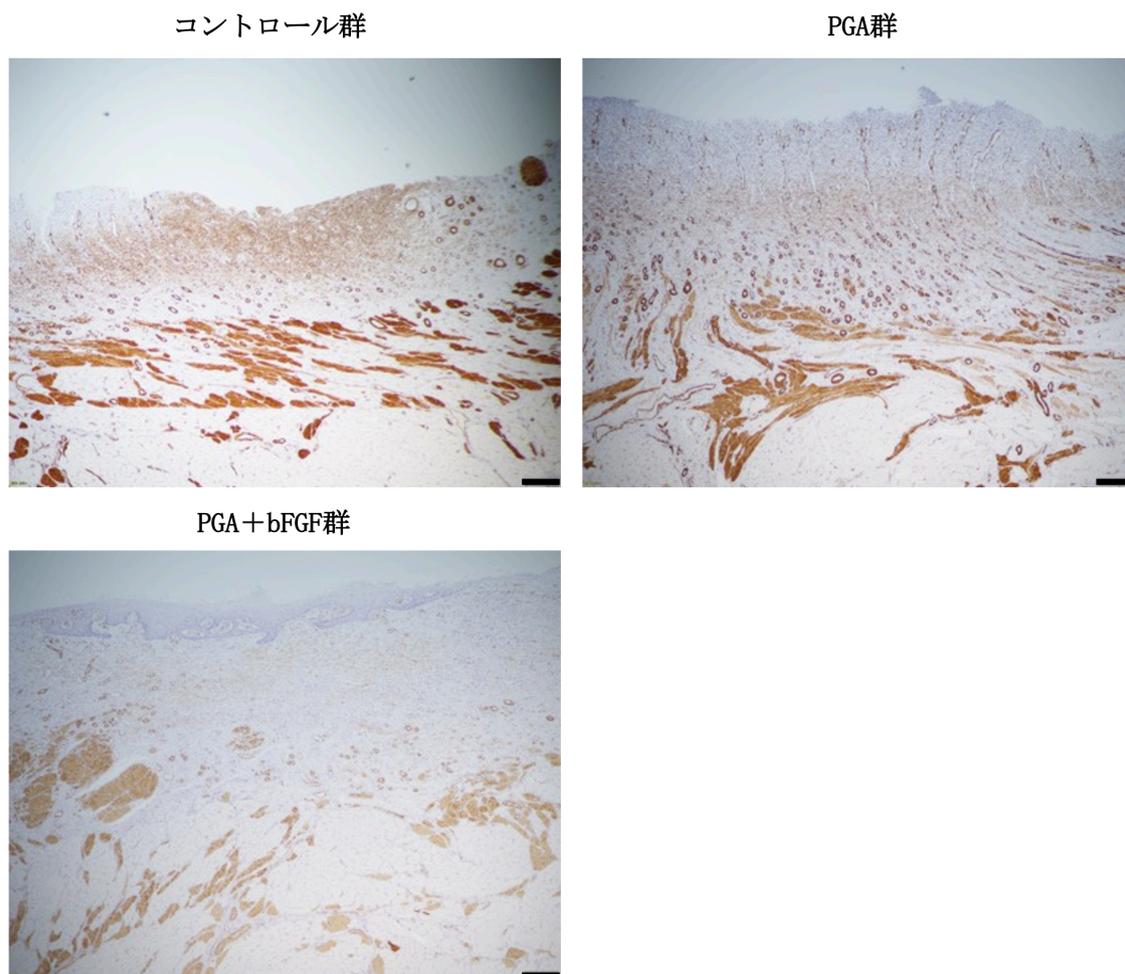


図12 A. α SMA染色像 (スケールバー: 200 μ m)

B

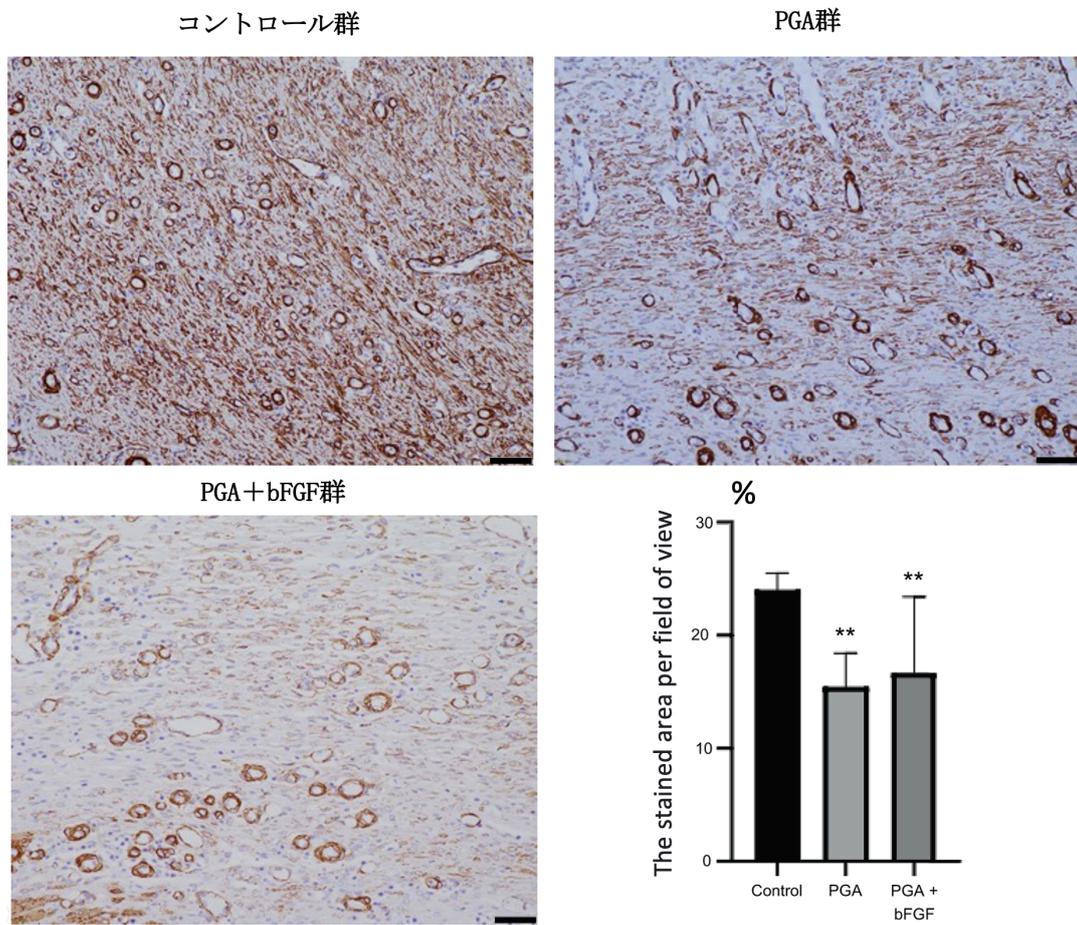


図 12 B. α SMA 染色像 (スケールバー : $50\mu\text{m}$) と 1 視野あたりの染色率
** $p < 0.01$ vs コントロール群

抗 Calponin-1 抗体を用いた免疫染色においても、5 視野における染色率の平均値はコントロール群と比較して PGA 群および PGA+bFGF 群で有意に低く、Calponin-1 の発現が抑制されていた(コントロール群: 32.9%, PGA 群: 19.8%, PGA+bFGF 群: 24.4%)。図 13 に代表的な像を示す。

A

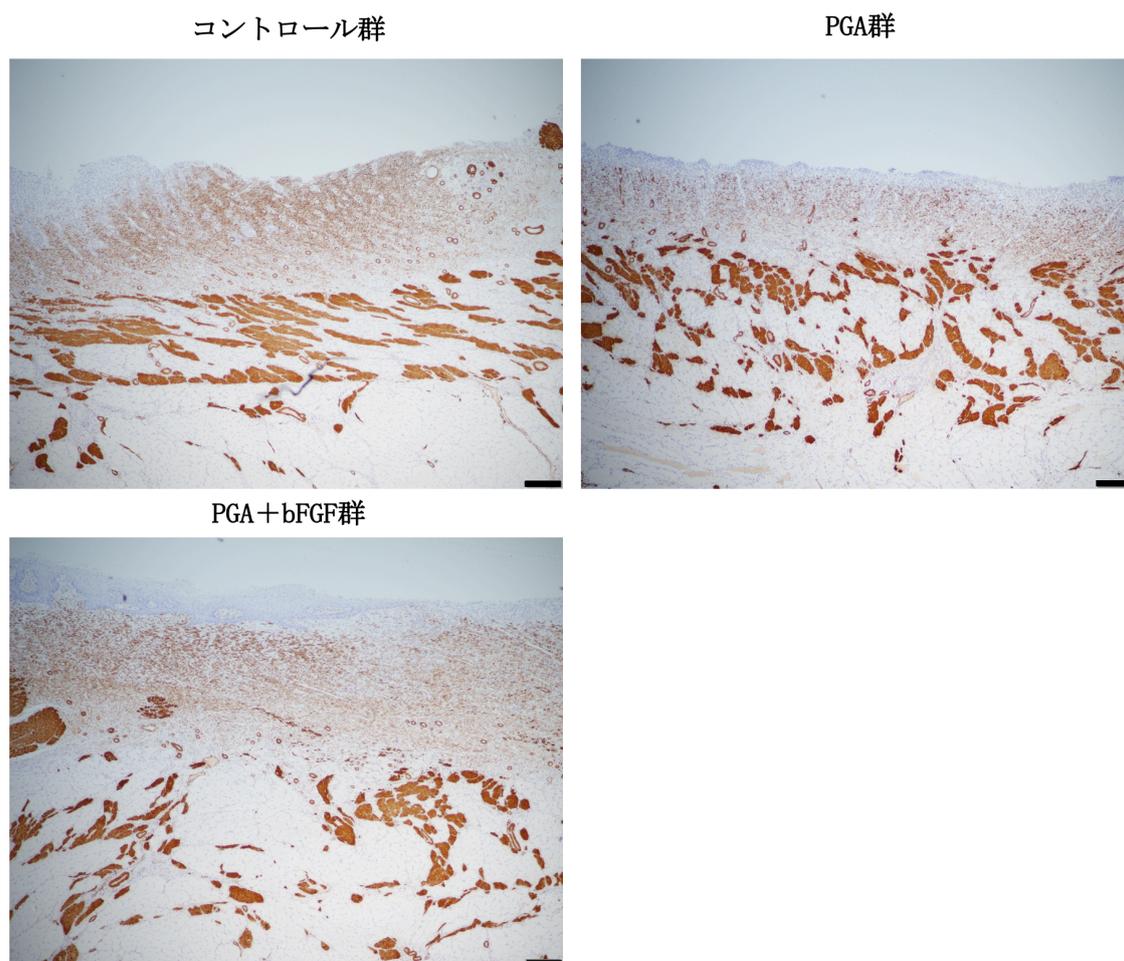


図 13 A. Calponin-1 染色像 (スケールバー : 200 μ m)

B

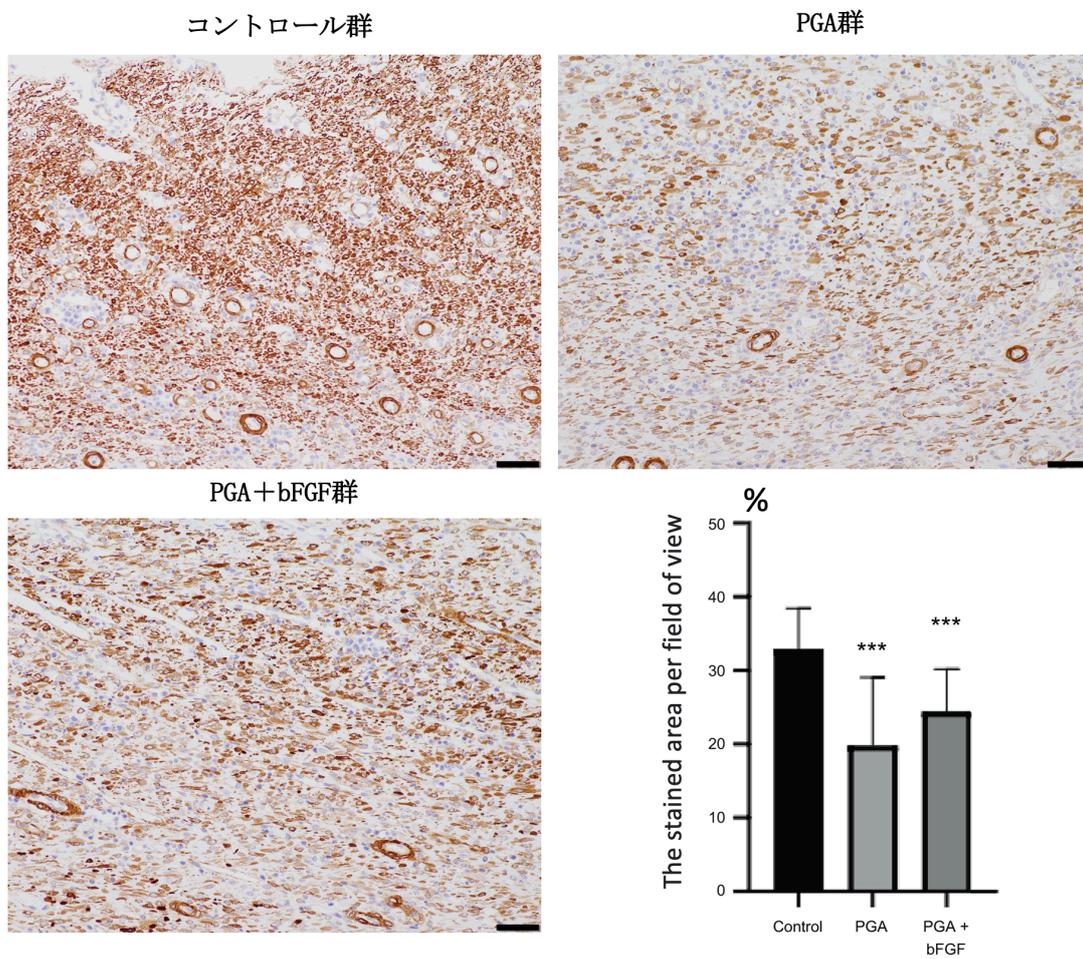
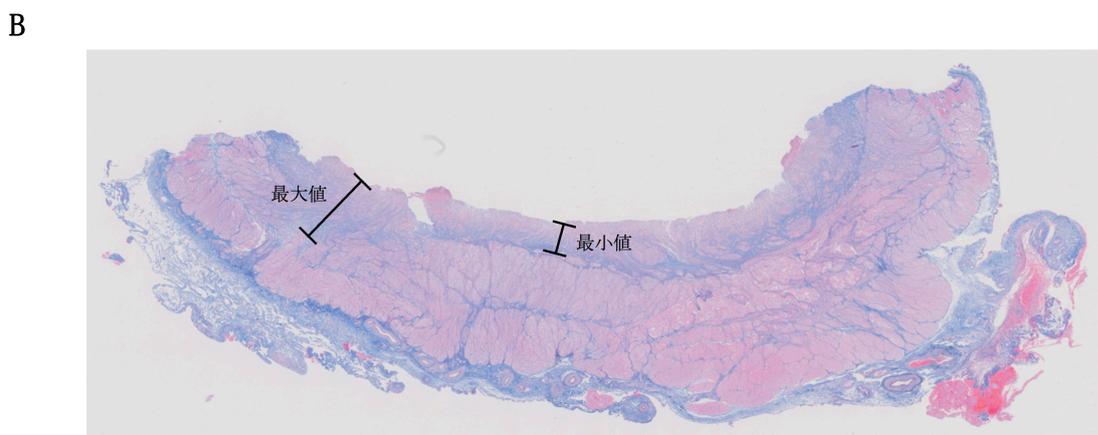
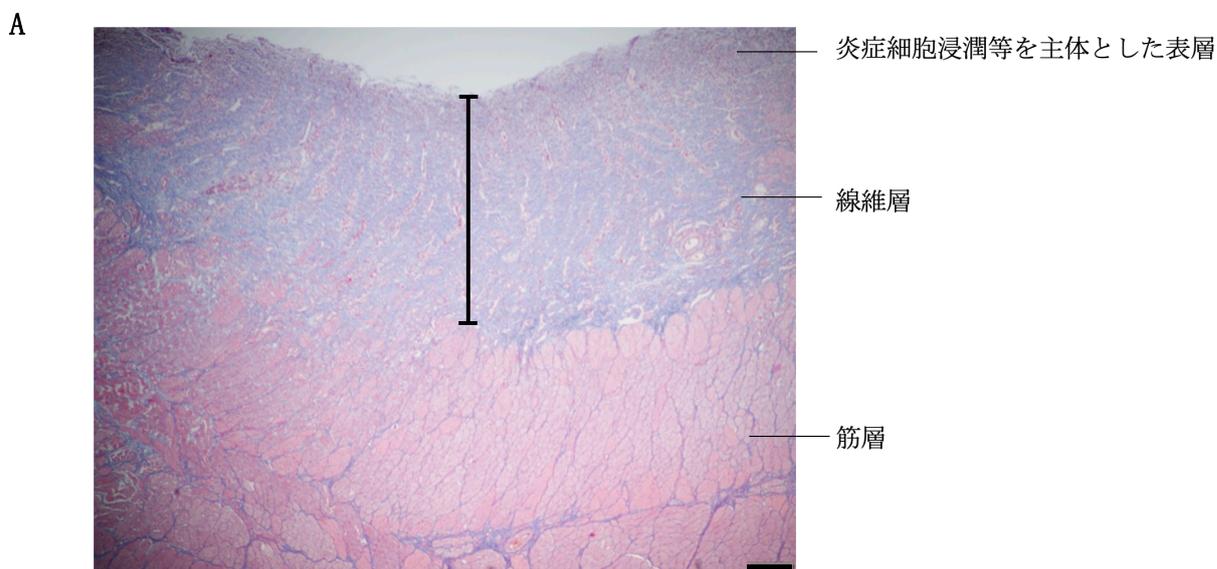


図 13 B. Calponin-1 染色像 (スケールバー : 50 μ m) と 1 視野あたりの染色率
*** p < 0.001 vs コントロール群

Elastica Masson で染色された線維層の上層には炎症細胞の浸潤などが認められるが、創部の均一性を評価するため、線維層の下端から創部表面までの距離を測定した(図 14 A)。最も厚みのある部分、最も厚みのない部分を含む任意の 5 か所で測定し、平均値をとると各群に有意差はなかった(コントロール群: 962.98 μm , PGA 群: 1358.05 μm , PGA+bFGF 群: 1131.28 μm)。一方、最も厚みのある部分と最も厚みのない部分の差をとると(図 14 B)、PGA+bFGF 群ではコントロール群、PGA 群に対して有意に差が小さかった(コントロール群: 726.15 μm , PGA 群: 934.89 μm , PGA+bFGF 群: 467.34 μm)。この結果から、PGA+bFGF 群では創部全体に均一な線維化が起こったことが示された。



C

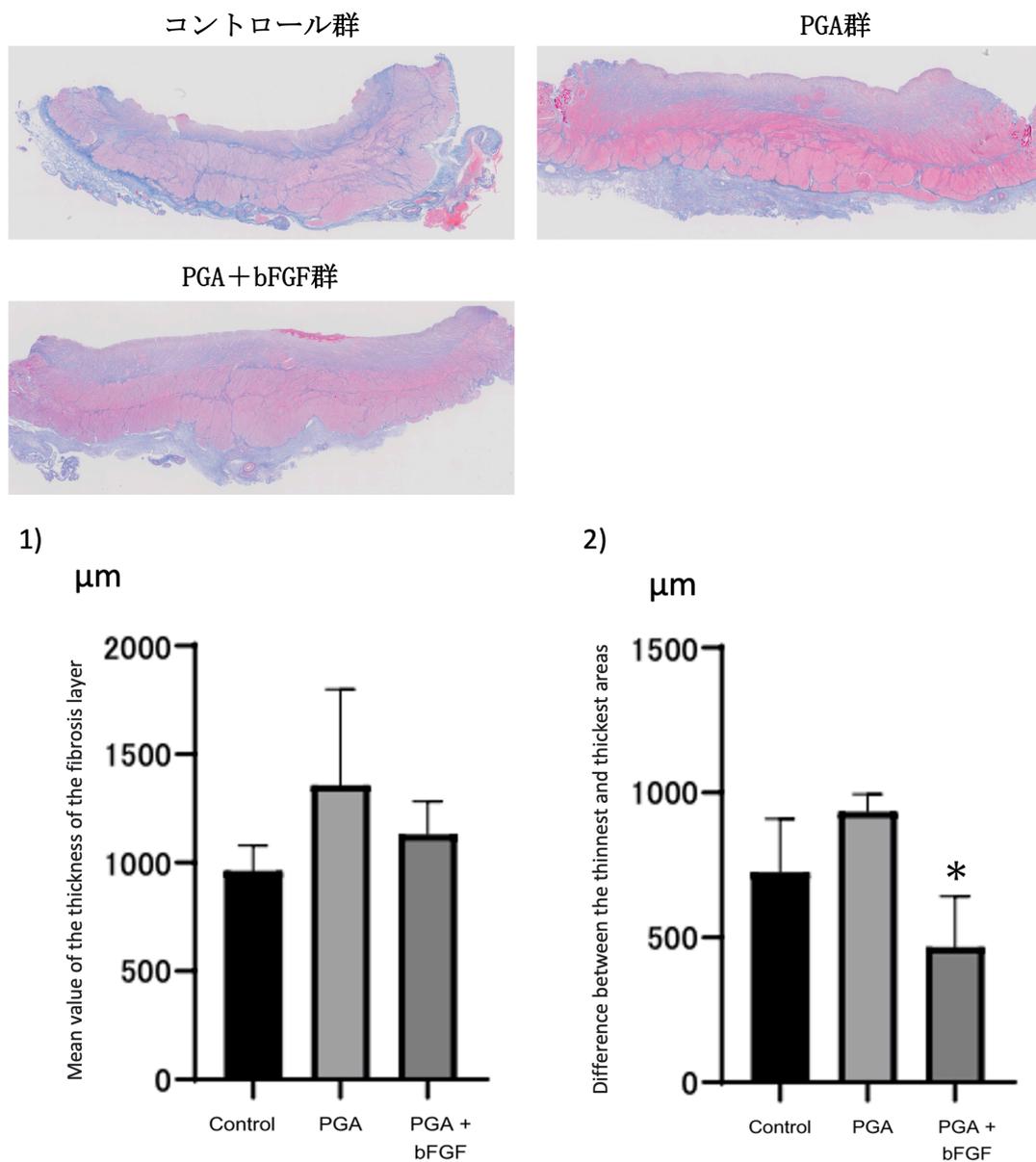


図 14 線維層の測定方法と結果

- A. Elastica Masson 染色で染色された線維の下端から創部の表層までを測定した。
スケールバー：200 μm
- B. 最も厚みのある部分(最大値)と最も厚みのない部分(最小値)を測定か所に必ず含めるようにし、平均値の他に最大値と最小値の差(最大値 - 最小値)を算出した。
- C. 代表像(上段)ならびに測定結果(下段)。
- 1) 測定した5か所の平均値。
 - 2) 最大値と最小値の差。* $p < 0.05$ vs コントロール群, PGA 群

in vitro での検証

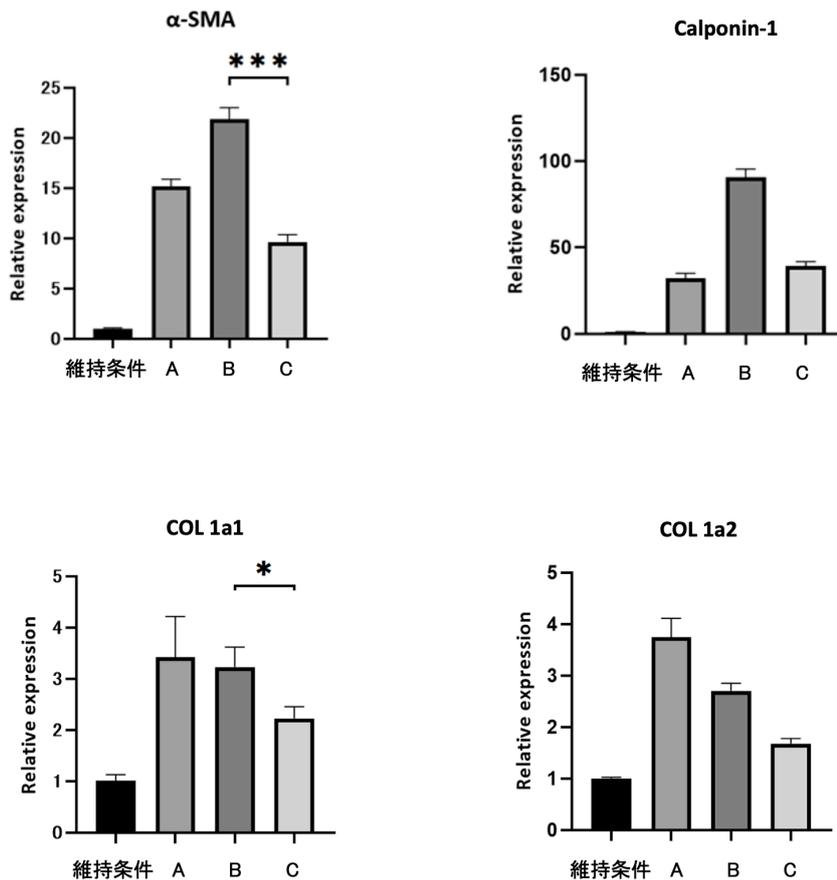
〈線維化に関する遺伝子の発現〉

単一細胞由来培養したラット由来歯根膜幹細胞に関して、各条件における培養後の RT-qPCR の結果を示す。

まず α SMA 遺伝子については、TGF- β 1 で刺激された分化誘導条件 B に対し、FGF-2 を添加した分化誘導条件 C では有意に遺伝子発現量が低下していた。

同様に Calponin-1 についても、TGF- β 1 存在下にも関わらず、FGF-2 の添加で Calponin-1 の発現が抑制される傾向にあった。

COL 1a1、COL 1a2 についても同様の結果が得られ、TGF- β 1 による分化誘導条件ではいずれも遺伝子も強く発現したのに対し、TGF- β 1 (3 ng/mL) に bFGF を添加すると発現が抑制され、特に COL 1a1 では有意な差をもって抑制された。



A:分化誘導条件A、B:分化誘導条件B、C:分化誘導条件C

図 15 . 線維化に関する遺伝子の RT-qPCR

*** $p < 0.001$ 、* $p < 0.05$

〈タンパクの発現〉

幹細胞が未分化能を保ったままの維持条件とは異なり、FBS濃度を下げた分化誘導条件Aでは筋線維芽細胞への分化が起き、細胞質に細胞骨格線維束が確認された。さらにTGF- β 1を添加した分化誘導条件Bでは、細胞骨格線維束の分化は分化誘導条件Aよりも顕著であった。一方、FGF-2(bFGF)を添加した分化誘導条件Cでは細胞骨格線維束の分化は著明に抑制されていた。

ファロイジンで細胞骨格線維束を蛍光染色すると、維持条件ではほとんど発現しておらず各々のサイズも小さい線維束が、分化誘導条件Aでは発現が誘導され、各々のサイズも大きくなっていった。さらに分化誘導条件Bではそれが顕著となっていることがわかる。一方、FGF-2を添加した分化誘導条件Cでは発現が明らかに抑制されていた(図16)。

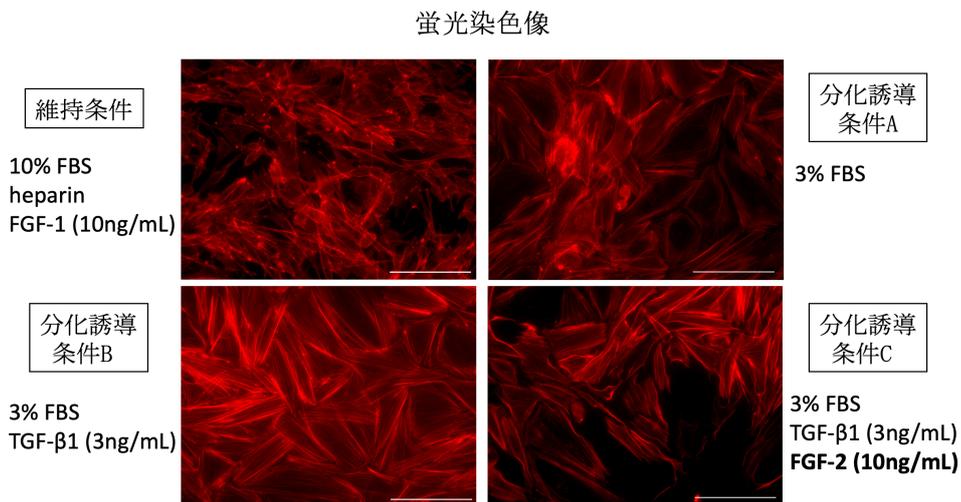


図16. 細胞骨格線維束の蛍光染色像(スケールバー: 100 μ m)

さらに、Calponin-1 についても蛍光染色を行うと、線維束と同様の傾向が得られた (図 17)。

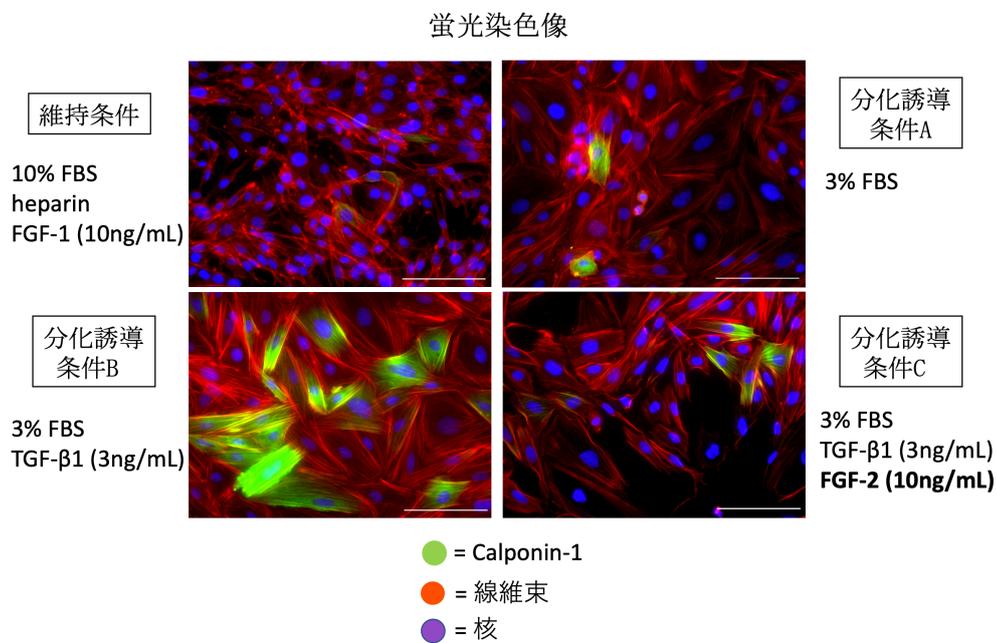


図 17. Calponin-1、線維束、核の蛍光染色像のマージ。
(スケールバー : 100 μ m)

考察

全周性の食道 ESD では術後の狭窄は必発であり、通過障害が生じて複数回の食道バルーン拡張術を要するなど患者の QOL を著明に低下させることから、狭窄の予防は重要な課題である。

ブタ食道はヒト食道と解剖学的に近似しており (Bruns et al., 2019)、さらに FGF およびそのレセプターは種を超えて高度に保存されている分子である。bFGF は FGFR1 および FGFR3 に対する親和性が高い (Zhang et al., 2006) が、ヒトとブタにおいてはアミノ酸配列の相同性が非常に高く、bFGF と FGFR1 は 98.7%、FGFR3 は 89.9% 一致すると言われている。従ってその立体構造にも大きな差はないと考えられ、本研究ではブタ全周性食道 ESD モデルを用いて bFGF 製剤の狭窄予防効果を検討した。その結果、既存の PGA シートに bFGF を染み込ませて創部に貼付することで、PGA シート単独で用いるよりも効果が上乘せされることが示された。

創傷の治癒過程で、線維芽細胞はマイクロフィラメント束の形成と α SMA の de novo 発現を特徴とする収縮表現型を獲得する (Shinde et al., 2017)。この活性化された線維芽細胞は筋線維芽細胞と呼ばれる (Davis et al., 2014; Gabbiani et al., 2003; Gabbiani et al., 1976; Gabbiani et al., 1972; Hinz et al., 2007; Hinz et al., 2016; Tomasek et al., 2002)。損傷部位を修復しようとする生体の防御反応の実行役である筋線維芽細胞が遊走または分化し、創を閉じる方向に働く収縮力の発現とそれに見合ったコラーゲンの大量分泌を行う。筋線維芽細胞の活性化状態が遷延したり過剰であったりすることが、高度な線維化による組織の収縮と癒痕化、ひいては臓器の機能不全を引き起こすと考えられている (Kong et al., 2014; Travers et al., 2016; Turner et al., 2013)。食道の内視鏡治療においても、治療後におこる炎症反応と線維化によって弾力性やコンプライアンスが低下し、癒痕化すると考えられている (Honda et al., 2011)。

創傷治癒における bFGF の抗癒痕効果は、皮膚の創傷においては既に知られ (Akita et al., 2013; Shi et al., 2013)、我々は食道 ESD 後の狭窄予防にも有用なのではないか、と仮説を立てた。bFGF はフィブラスト[®]スプレーとして販売されており、入手が容易であることは大きな利点の 1 つである。現在は皮膚潰瘍と褥瘡を適応症として皮膚科・形成外科領域では広く使用されており、これらの治療には噴霧して用いるが、液体であるため創部への投与は容易である。

今回 bFGF と併用した PGA シート (ネオベール[®]シート) は、食道 ESD 後の狭窄予防にある程度効果的であることは既に示されている。本研究においても PGA 群で狭窄予防効果が得られたがコントロール群と比較して有意ではなく、PGA シート単独では不十

分であることが示されたことも、既報と一致する。十分な効果を得るためには現状ではステロイド投与と併用せざるを得ないが、本研究でPGAシートにbFGFを染み込ませて併用することで狭窄率の低下が有意なものとなることを示すことができた。PGAシートは、PGAそのものの狭窄予防効果に加え、創部を覆うことで保護し、かつ液体であるbFGF製剤の足場としての役割も果たしたと考えられた。

本研究においてはPGA群ならびにPGA+bFGF群で線維化の初期マーカーである α SMA、後期マーカーであるCalponin-1の発現が有意に抑制されており、bFGFによって癒痕化や狭窄に繋がる線維芽細胞の活性化を抑制されたことが示唆された。

Elastica Masson染色はMasson trichrome染色に弾性線維染色を加えた重染色の1つであり、弾性線維やコラーゲン線維を鮮明に染色する。この特徴を利用して線維化の特徴を評価した。PGA群およびPGA+bFGF群ではコントロール群と比較して厚みのある線維層が形成されたが、特にPGA+bFGF群では線維芽細胞の密な部分と疎な部分の差が有意に少なく、全体が均一に治癒していくことが示唆された。Mihashiらはイヌの声帯の片側を切除しPGAシートにbFGFを染み込ませて創部に投与したところ、機能的にも組織学的にも正常側に近い声帯組織が再生されたと報告した(Mihashi et al., 2020)。免疫染色による病理組織学的な検討はされていないが、本研究と同様に線維芽細胞の過剰な活性化が抑えられ、均一な組織修復がされた可能性を示唆している。

一方でMPO、CD107aの発現については、コントロール群とPGA群、PGA+bFGF群に有意な差はなく、bFGFは炎症反応や免疫応答には影響を与えなかったことも示された。

ただし本研究では、Elastica Masson染色を用いた線維化の均一性の評価を除き、狭窄率や病理学的所見においてPGA群とPGA+bFGF群の間には有意差は得られなかった。抗線維化作用がPGAシートの効果ではなく、本当にbFGFによるものであるのかを検証すべく、in vitroでの細胞培養実験を追加した。

歯根膜幹細胞を用いた筋線維芽細胞への分化誘導実験により、細胞増殖に対し抑制性に働き分化を促進するサイトカインであるTGF- β 1を添加すると(分化誘導条件B)、細胞形態学的に、細胞質内の細胞骨格線維束が著明に認められた。遺伝子発現解析においては α SMA遺伝子とCalponin-1遺伝子の他、組織に強度と弾力性を与えるコラーゲン(Rittie et al., 2017)として知られる1型コラーゲンをコードするCOL1a1遺伝子、COL1a2遺伝子について評価を行なった。これらの発現が顕著であった分化誘導条件Bは、食道狭窄の病態を模倣(ミミック)した条件である。一方、TGF- β 1の存在下にbFGFを添加(分化誘導条件C)すると、細胞形態学的には、細胞質内の細胞骨格線維束は著しく抑制されることが確認され、遺伝子発現解析において、 α SMA遺伝

子、Calponin-1 遺伝子、COL 1a1 遺伝子、COL 1a2 遺伝子の発現も著明に抑制された。これは筋線維芽細胞への分化が FGF-2 (bFGF) によって抑制されたことを意味しており、in vivo (ブタ) の実験で示唆された bFGF の抗線維化作用をサポートする結果となった。

本研究にはいくつかの limitation が挙げられる。第一に、本研究はサンプル数の少ない研究である。例えば抗 α SMA 抗体による免疫染色では、PGA 群のほうが PGA+bFGF 群よりも発現が抑制されているような結果になったが、これは PGA+bFGF 群の 3 頭のうち 1 頭で α SMA の発現が多く、平均値を上げてしまったことによる。動物愛護の視点を持ちつつも、より大きなサンプル数で検討を加えることが必要である。第二に、ブタを用いた研究であるため、得られた結果がそのままヒトに反映されるかは不明である。第三に、フィブラスト[®]スプレーの投与量の問題である。添付文書では創部 1 か所につき 5 プッシュまでしか使用することができない。本研究では 1cm² にカットした PGA シートを約 20 枚ずつ用いたが、十分に bFGF を浸透させるためには、1cm² の PGA シート 1 枚に対して 1 プッシュを要した。第四に、bFGF には細胞増殖を促進する性質がある (Li et al., 2015; Maehara et al., 2017; Turner et al., 2010) ため、癌の存在する部位への使用は禁忌とされている。表在型食道癌を ESD で切除したあとの創部ではあるが、断端など病理組織学的な診断を待たずに使用してよいかについては議論の余地がある。ただし全周性の ESD など狭窄が必発である場合には、繰り返すバルーン拡張による穿孔などの合併もありうるため、リスク&ベネフィットを考慮した使用も許容されると考える。最後に、PGA シートを内視鏡的に創部に貼付するには技術が必要である。本研究のように、スコープの鉗子口を通るサイズにカットして 1 枚ずつ貼付する必要があるが、他のシートと一塊になってしまうなどして創部全体に均一に貼付するには修練が必要と思われた。Mizushima らはブタ食道 ESD モデルに対し、羊膜由来間葉系幹細胞をゲル化して投与した (Mizushima et al., 2017)。このように、シートの貼付よりも簡便で、かつ bFGF の足場となって創部に留まることが可能な方法を検討する必要がある。

結論として、ESD 後の食道狭窄は急性期の線維化に関連しており、bFGF の投与は急性期に線維芽細胞の活性化を抑制することによって収縮を予防した。

結論

本研究では以下の知見が得られた。

- 1) PGA シートに bFGF を含浸させることで、PGA シート単独よりも狭窄予防効果が上乘せされた。
- 2) bFGF は食道 ESD 後の創部における線維芽細胞の活性化を阻害した。
- 3) bFGF は急性期の無秩序な線維化を抑制し、より正常に近い均一な創傷治癒を促進した。

今後の展望

食道 ESD 後の狭窄を予防する機序の解明には、創部が完全に治癒するまでの長期の経時的変化を評価する必要があると考える。

bFGF の創部へのデリバリー方法についてもより簡便な方法の開発が望まれる。既報では、エンベロープ法と呼ばれる方法で、複数枚のシートを内蔵したエンベロープを胃内にデリバリーし、その中から取り出して貼付する方法が報告されている (Sakaguchi et al., 2021)。この方法は、シートを鉗子口に通す必要がないため 1cm² より大きなサイズで使用できる可能性があるが、今回の我々の検討では、濡れた状態では PGA シートが塊状になってしまい、大きなサイズでは貼付が困難であった。あるいはカルボキシメチルセルロースなど他の生体吸収性素材を貼付した報告 (Jian et al., 2018) もあるため、PGA シート以外の生体吸収性素材に bFGF を含浸させたり、先述のようにゲル化するなどの様々な検討も行うことが望まれる。

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。

謝辞

本研究の機会を与えて下さった、北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室 坂本直哉教授に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行する貴重な機会を与えていただき、研究方法の指導から論文作成まで、御指導・御支援を賜りました、北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室 大野正芳特任助教に心より感謝申し上げます。

本検討の実施に関連して検討内容に関する助言やご協力をいただいた北海道大学大学院薬学研究院分子細胞医薬学研究室 大西俊介教授、大久保直登講師に深く御礼申し上げます。実験の介助をしていただいた薬学部生の山之内海心さんにも感謝を申し上げます。

本検討の実施に関連して動物愛護の観点も含めたブタの取り扱いについて様々なご助言やご協力をいただいた北海道大学医学研究院附属動物実験施設 土佐紀子助教に深く御礼申し上げます。

また、本研究を支えて下さった消化器内科学分野の皆様に感謝申し上げます。

2023年3月
西村 友佑

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Abdelhakim, M., Lin, X., and Ogawa, R. (2020). The Japanese Experience with Basic Fibroblast Growth Factor in Cutaneous Wound Management and Scar Prevention: A Systematic Review of Clinical and Biological Aspects. *Dermatol Ther (Heidelb)* *10*, 569–587. 10.1007/s13555-020-00407-6.
- Akita, S., Akino, K., and Hirano, A. (2013). Basic Fibroblast Growth Factor in Scarless Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* *2*, 44–49. 10.1089/wound.2011.0324.
- Akita, S., Akino, K., Imaizumi, T., and Hirano, A. (2008). Basic fibroblast growth factor accelerates and improves second-degree burn wound healing. *Wound Repair Regen* *16*, 635–641. 10.1111/j.1524-475X.2008.00414.x
- Alsop, B.R., and Sharma, P. (2016). Esophageal Cancer. *Gastroenterol Clin North Am* *45*, 399–412. 10.1016/j.gtc.2016.04.001.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* *16*, 585–601. 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x
- Beenken, A., and Mohammadi, M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* *8*, 235–253. 10.1038/nrd2792.
- Bruns, N.E., Glenn, I.C., Craner, D.R., Schomisch, S.J., Harrison, M.R., and Ponsky, T.A. (2019). Magnetic compression anastomosis (magnamosis) in a porcine esophagus: Proof of concept for potential application in esophageal atresia. *J Pediatr Surg* *54*, 429–433. 10.1016/j.jpedsurg.2018.09.014.
- Cao, Y., Liao, C., Tan, A., Gao, Y., Mo, Z., and Gao, F. (2009). Meta-analysis of endoscopic submucosal dissection versus endoscopic mucosal resection for tumors of the gastrointestinal tract. *Endoscopy* *41*, 751–757. 10.1055/s-0029-1215053.

Chen, M., Dang, Y., Ding, C., Yang, J., Si, X., and Zhang, G. (2020). Lesion size and circumferential range identified as independent risk factors for esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection. *Surg Endosc* *34*, 4065-4071. 10.1007/s00464-020-07368-z.

Davis, J., and Molkenin, J.D. (2014). Myofibroblasts: trust your heart and let fate decide. *J Mol Cell Cardiol* *70*, 9-18. 10.1016/j.yjmcc.2013.10.019.

Dvorak, P., and Hampl, A. (2005). Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells. *Folia Histochem Cytobiol* *43*, 203-208.

Fu, X., Shen, Z., Chen, Y., Xie, J., Guo, Z., Zhang, M., and Sheng, Z. (1998). Randomised placebo-controlled trial of use of topical recombinant bovine basic fibroblast growth factor for second-degree burns. *Lancet* *352*, 1661-1664. 10.1016/s0140-6736(98)01260-4.

Fujishiro, M., Kodashima, S., Goto, O., Ono, S., Niimi, K., Yamamichi, N., Oka, M., Ichinose, M., and Omata, M. (2009). Endoscopic submucosal dissection for esophageal squamous cell neoplasms. *Dig Endosc* *21*, 109-115. 10.1111/j.1443-1661.2009.00837.x.

Gabbiani, G. (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* *200*, 500-503. 10.1002/path.1427.

Gabbiani, G., Le Lous, M., Bailey, A.J., Bazin, S., and Delaunay, A. (1976). Collagen and myofibroblasts of granulation tissue. A chemical, ultrastructural and immunologic study. *Virchows Arch B Cell Pathol* *21*, 133-145. 10.1007/bf02899150.

Gabbiani, G., and Majno, G. (1972). Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. *Am J Pathol* *66*, 131-146.

Hinz, B. (2007). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* *127*, 526-537. 10.1038/sj.jid.5700613.

Hinz, B. (2016). Myofibroblasts. *Exp Eye Res* *142*, 56–70.
10.1016/j.exer.2015.07.009.

Honda, M., Hori, Y., Nakada, A., Uji, M., Nishizawa, Y., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Shimada, H., Kida, N., Sato, T., and Nakamura, T. (2011). Use of adipose tissue-derived stromal cells for prevention of esophageal stricture after circumferential EMR in a canine model. *Gastrointest Endosc* *73*, 777–784.
10.1016/j.gie.2010.11.008.

Ishida, T., Morita, Y., Hoshi, N., Yoshizaki, T., Ohara, Y., Kawara, F., Tanaka, S., Yamamoto, Y., Matsuo, H., Iwata, K., et al. (2015). Disseminated nocardiosis during systemic steroid therapy for the prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection. *Dig Endosc* *27*, 388–391. 10.1111/den.12317.

Jia, T., Jacquet, T., Dalonneau, F., Coudert, P., Vaganay, E., Exbrayat-Heritier, C., Vollaire, J., Josserand, V., Ruggiero, F., Coll, J.L., and Eymin, B. (2021). FGF-2 promotes angiogenesis through a SRSF1/SRSF3/SRPK1-dependent axis that controls VEGFR1 splicing in endothelial cells. *BMC Biol* *19*, 173. 10.1186/s12915-021-01103-3.

Kanai, N., Yamato, M., Ohki, T., Yamamoto, M., and Okano, T. (2012). Fabricated autologous epidermal cell sheets for the prevention of esophageal stricture after circumferential ESD in a porcine model. *Gastrointest Endosc* *76*, 873–881.
10.1016/j.gie.2012.06.017.

Kadota, T., Yano, T., Kato, T., Imajoh, M., Noguchi, M., Morimoto, H., Osera, S., Yoda, Y., Oono, Y., Ikematsu, H., et al. (2016). Prophylactic steroid administration for strictures after endoscopic resection of large superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Endosc Int Open* *4*, E1267–E1274. 10.1055/s-0042-118291.

Katada, C., Muto, M., Manabe, T., Ohtsu, A., and Yoshida, S. (2005). Local recurrence of squamous-cell carcinoma of the esophagus after EMR. *Gastrointest Endosc* *61*, 219–225. 10.1016/s0016-5107(04)02756-7.

- Kim, K.K., Sheppard, D., and Chapman, H.A. (2018). TGF- β 1 Signaling and Tissue Fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *10*. 10.1101/cshperspect.a022293.
- Kinowaki, S., Shimizu, Y., Ono, M., ZiJian, Y., Tanaka, I., Shimoda, Y., Inoue, M., Ishikawa, M., Yamamoto, K., Ono, S., et al. (2021). Experiment on endoscopic balloon dilation for esophageal stenosis after endoscopic submucosal dissection in pigs. *J Gastroenterol* *56*, 527–536. 10.1007/s00535-021-01791-2.
- Kochhar, R., and Makharia, G.K. (2002). Usefulness of intralesional triamcinolone in treatment of benign esophageal strictures. *Gastrointest Endosc* *56*, 829–834. 10.1067/mge.2002.129871.
- Kong, P., Christia, P., and Frangogiannis, N.G. (2014). The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci* *71*, 549–574. 10.1007/s00018-013-1349-6.
- Li, S., Payne, S., Wang, F., Claus, P., Su, Z., Groth, J., Geradts, J., de Ridder, G., Alvarez, R., Marcom, P.K., et al. (2015). Nuclear basic fibroblast growth factor regulates triple-negative breast cancer chemo-resistance. *Breast Cancer Res* *17*, 91. 10.1186/s13058-015-0590-3.
- Maehara, O., Suda, G., Natsuzaka, M., Ohnishi, S., Komatsu, Y., Sato, F., Nakai, M., Sho, T., Morikawa, K., Ogawa, K., et al. (2017). Fibroblast growth factor-2-mediated FGFR/Erk signaling supports maintenance of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* *38*, 1073–1083. 10.1093/carcin/bgx095.
- Malik, S., Sharma, G., Sanaka, M.R., and Thota, P.N. (2018). Role of endoscopic therapy in early esophageal cancer. *World J Gastroenterol* *24*, 3965–3973. 10.3748/wjg.v24.i35.3965.
- Mihashi, R., Chitose, S.I., Sato, F., Tanaka, H., Sato, K., Ono, T., Fukahori, M., Sueyoshi, S., Kurita, T., Sato, K., and Umeno, H. (2020). Endoscopic Sealing With a Polyglycolic Acid Sheet for Restoration of Vocal Fold Mucosa in Dogs. *Laryngoscope* *130*, E436–e443. 10.1002/lary.28357.

Min, Y.W., Lee, H., Song, B.G., Min, B.H., Kim, H.K., Choi, Y.S., Lee, J.H., Hwang, N.Y., Carriere, K.C., Rhee, P.L., et al. (2018). Comparison of endoscopic submucosal dissection and surgery for superficial esophageal squamous cell carcinoma: a propensity score-matched analysis. *Gastrointest Endosc* *88*, 624-633. 10.1016/j.gie.2018.04.2360.

Miwata, T., Oka, S., Tanaka, S., Kagemoto, K., Sanomura, Y., Urabe, Y., Hiyama, T., and Chayama, K. (2016). Risk factors for esophageal stenosis after entire circumferential endoscopic submucosal dissection for superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Surg Endosc* *30*, 4049-4056. 10.1007/s00464-015-4719-3.

Mizushima, T., Ohnishi, S., Hosono, H., Yamahara, K., Tsuda, M., Shimizu, Y., Kato, M., Asaka, M., and Sakamoto, N. (2017). Oral administration of conditioned medium obtained from mesenchymal stem cell culture prevents subsequent stricture formation after esophageal submucosal dissection in pigs. *Gastrointest Endosc* *86*, 542-552 e541. 10.1016/j.gie.2017.01.024.

Moosa, S., and Wollnik, B. (2016). Altered FGF signalling in congenital craniofacial and skeletal disorders. *Semin Cell Dev Biol* *53*, 115-125. 10.1016/j.semdb.2015.12.005.

Nonaka, K., Miyazawa, M., Ban, S., Aikawa, M., Akimoto, N., Koyama, I., and Kita, H. (2013). Different healing process of esophageal large mucosal defects by endoscopic mucosal dissection between with and without steroid injection in an animal model. *BMC Gastroenterol* *13*, 72. 10.1186/1471-230x-13-72.

Ono, S., Fujishiro, M., Niimi, K., Goto, O., Kodashima, S., Yamamichi, N., and Omata, M. (2009). Predictors of postoperative stricture after esophageal endoscopic submucosal dissection for superficial squamous cell neoplasms. *Endoscopy* *41*, 661-665. 10.1055/s-0029-1214867.

Sakaguchi, Y., Tsuji, Y., Ono, S., Saito, I., Kataoka, Y., Takahashi, Y., Nakayama, C., Shichijo, S., Matsuda, R., Minatsuki, C., et al. (2015). Polyglycolic acid sheets with fibrin glue can prevent esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection. *Endoscopy* *47*, 336-340. 10.1055/s-0034-1390787.

Sakaguchi, Y., Tsuji, Y., Shinozaki, T., Ohki, D., Mizutani, H., Minatsuki, C., Niimi, K., Yamamichi, N., and Koike, K. (2020). Steroid injection and polyglycolic acid shielding to prevent stricture after esophageal endoscopic submucosal dissection: a retrospective comparative analysis (with video). *Gastrointest Endosc* *92*, 1176–1186 e1171. 10.1016/j.gie.2020.04.070.

Sakaguchi, H., Takao, T., Takegawa, Y., Koga, Y., Yamanaka, K., Sagata, M., Tanaka, S., Morita, Y., Toyonaga, T., and Kodama, Y. (2021). Efficacy of the Envelope Method in Applying Polyglycolic Acid Sheets to Post-Endoscopic Submucosal Dissection Ulcers in Living Pigs. *Clin Endosc* *54*, 64–72. 10.5946/ce.2020.014.

Sato, H., Inoue, H., Kobayashi, Y., Maselli, R., Santi, E.G., Hayee, B., Igarashi, K., Yoshida, A., Ikeda, H., Onimaru, M., et al. (2013). Control of severe strictures after circumferential endoscopic submucosal dissection for esophageal carcinoma: oral steroid therapy with balloon dilation or balloon dilation alone. *Gastrointest Endosc* *78*, 250–257. 10.1016/j.gie.2013.01.008.

Shi, H.X., Lin, C., Lin, B.B., Wang, Z.G., Zhang, H.Y., Wu, F.Z., Cheng, Y., Xiang, L.J., Guo, D.J., Luo, X., et al. (2013). The anti-scar effects of basic fibroblast growth factor on the wound repair in vitro and in vivo. *PLoS One* *8*, e59966. 10.1371/journal.pone.0059966.

Shinde, A.V., Humeres, C., and Frangogiannis, N.G. (2017). The role of alpha-smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* *1863*, 298–309. 10.1016/j.bbadis.2016.11.006.

Takahashi, H., Arimura, Y., Masao, H., Okahara, S., Tanuma, T., Kodaira, J., Kagaya, H., Shimizu, Y., Hokari, K., Tsukagoshi, H., et al. (2010). 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. 10.1016/j.gie.2010.02.040.

Tan, Y., Xiao, J., Huang, Z., Xiao, Y., Lin, S., Jin, L., Feng, W., Cai, L., and Li, X. (2008). Comparison of the therapeutic effects recombinant human acidic and basic fibroblast growth factors in wound healing in diabetic patients. *Journal of Health Science* *54*, 432-440.

Tang, J., Ye, S., Ji, X., Liu, F., and Li, Z. (2018). Deployment of carboxymethyl cellulose sheets to prevent esophageal stricture after full circumferential endoscopic submucosal dissection: A porcine model. *Dig Endosc* *30*, 608-615. 10.1111/den.13070.

Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 349-363. 10.1038/nrm809.

Travers, J.G., Kamal, F.A., Robbins, J., Yutzey, K.E., and Blaxall, B.C. (2016). Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ Res* *118*, 1021-1040. 10.1161/circresaha.115.306565.

Turner, N., and Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* *10*, 116-129. 10.1038/nrc2780.

Turner, N.A., and Porter, K.E. (2013). Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair* *6*, 5. 10.1186/1755-1536-6-5.

Wang, W., Lin, S., Xiao, Y., Huang, Y., Tan, Y., Cai, L., and Li, X. (2008). Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-crosslinked collagen sponge containing recombinant human acidic fibroblast growth factor in healing-impaired STZ diabetic rats. *Life Sci* *82*, 190-204. 10.1016/j.lfs.2007.11.009.

Xiang, Q., Xiao, J., Zhang, H., Zhang, X., Lu, M., Zhang, H., Su, Z., Zhao, W., Lin, C., Huang, Y., and Li, X. (2011). Preparation and characterisation of bFGF-encapsulated liposomes and evaluation of wound-healing activities in the rat. *Burns* *37*, 886-895. 10.1016/j.burns.2011.01.018.

Xiao, J., Lv, Y., Lin, S., Jin, L., Zhang, Y., Wang, X., Ma, J., Hu, K., Feng, W., Cai, L., et al. (2010). Cardiac protection by basic fibroblast growth factor from ischemia/reperfusion-induced injury in diabetic rats. *Biol Pharm Bull* 33, 444-449. 10.1248/bpb.33.444.

Yamashina, T., Uedo, N., Fujii, M., Ishihara, R., Mikamori, M., Motoori, M., Yano, M., and Iishi, H. (2013). Delayed perforation after intralesional triamcinolone injection for esophageal stricture following endoscopic submucosal dissection. *Endoscopy* 45 Suppl 2 UCTN, E92. 10.1055/s-0032-1326253.

Yamashita, S., Kato, M., Fujimoto, A., Maehata, T., Sasaki, M., Inoshita, N., Sato, H., Suzuki, K., and Yahagi, N. (2019). Inadequate steroid injection after esophageal ESD might cause mural necrosis. *Endosc Int Open* 7, E115-e121. 10.1055/a-0781-2333.

Yoshida, M., Okubo, N., Chosa, N., Hasegawa, T., Ibi, M., Kamo, M., Kyakumoto, S., and Ishisaki, A. (2012). TGF- β -operated growth inhibition and translineage commitment into smooth muscle cells of periodontal ligament-derived endothelial progenitor cells through Smad- and p38 MAPK-dependent signals. *Int J Biol Sci* 8, 1062-1074. 10.7150/ijbs.4488.

Zhang, J., Li, Y., Bai, X., Li, Y., Shi, J., and Hu, D. (2018). Recent advances in hypertrophic scar. *Histol Histopathol* 33, 27-39. 10.14670/hh-11-908.

Zhang, X., Ibrahimi, O.A., Olsen, S.K., Umemori, H., Mohammadi, M., and Ornitz, D.M. (2006). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem* 281, 15694-15700. 10.1074/jbc.M601252200.