

第74回東京女子医科大学学会総会
シンポジウム「東京女子医科大学・早稲田大学連携先端生命医科学研究教育施設について」

(6) 食道 ESD へ応用する再生医療—臨床応用へ向けて—

¹東京女子医科大学消化器病センター外科

²東京女子医科大学先端生命医科学研究所

³早稲田大学大学院理工学研究科生命理工学専攻

オオキ	タケシ	ヤマト	マサユキ	ムラカミ	ダイスケ	タカギ	リョウ
大木	岳志 ^{1,2}	大和	雅之 ²	村上	大輔 ^{2,3}	高木	亮 ²
コンドウ	マコト	イシイ	タカアキ	オオタ	マサホ	ナカムラ	ツトム
近藤	誠 ^{2,3}	石井	孝明 ^{2,3}	太田	正穂 ¹	中村	努 ¹
ナミキ	ヒデオ	オカノ	テルオ	ヤマモト	マサカズ		
並木	秀男 ³	岡野	光夫 ²	山本	雅一 ¹		

(受理 平成21年1月29日)

The 74th General Meeting of the Society of Tokyo Women's Medical University
TWIns Symposium

(6) Regenerative Medicine for Application to Esophageal ESD: Toward Clinical Application

Takeshi OHKI^{1,2}, Masayuki YAMATO², Daisuke MURAKAMI^{2,3}, Ryo TAKAGI²,
Makoto KONDO^{2,3}, Takaaki ISHII^{2,3}, Masaho OTA¹, Tsutomu NAKAMURA¹,
Hideo NAMIKI³, Teruo OKANO² and Masakazu YAMAMOTO¹

¹Department of Surgery, Institute of Gastroenterology, Tokyo Women's Medical University

²Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University

³Bioscience and Biomedical Engineering, Graduate School of Science and Engineering, Waseda University

With recent developments in endoscopic submucosal dissection (ESD), large esophageal cancers can now be removed under a single procedure, with few limitations in the resectable range. However, after aggressive ESD, a major complication that arises is postoperative inflammation and stenosis which can affect the patient's quality of life considerably. In order to overcome this complication, we developed a novel treatment combining ESD and endoscopic transplantation of tissue-engineered cell sheets created using autologous oral mucosal epithelial cells. The transplanted cell sheets were able to adhere to and survive on the underlying muscle layers in the ulcer sites, providing an intact, stratified epithelium. For clinical application, xenogeneic feeder layers were eliminated by utilizing temperature-responsive culture inserts. A GMP-grade cell processing center was developed, and documents in addition to validation systems were compiled based on governmental guidelines. This clinical research has been conducted since January, 2008.

Key words: esophageal ESD, regenerative medicine, cultured oral mucosal epithelial cell sheet

はじめに

本学先端生命医科学研究所で開発された次世代再生医療の中核的技術である細胞シート工学¹⁾²⁾を用いた再生医療は、角膜では2002年から³⁾、心臓では2007年から臨床応用が始まっており、良好な成績を

得ている。筆者らは、自己口腔粘膜組織から単離した上皮細胞から培養口腔粘膜上皮細胞シートを作製し、これを用いた食道の再生医療的治療法を開発してきた。本稿では、筆者らが研究を進めてきた、食道の内視鏡的粘膜下層剥離術 (endoscopic submu-

cosal dissection : ESD) の合併症回避のための再生医療的治療技術を概説し、臨床へ向けた本研究の現状を紹介する。

1. ESD の開発の歴史

内視鏡的粘膜切除術 (endoscopic mucosal resection : EMR) は早期消化管癌治療の標準的な手技として定着している。EMR は、スネアと呼ばれる金属製の輪を用いて腫瘍をポリープ状に絞扼し通電することで病変を切除する手技である。スネアを用いるために1回で切除できる大きさには限界があり、一括切除可能な病変は2cmまでとされ、それ以上の大きさの病変では複数回のEMRによる分割切除になってしまう。しかし分割切除では、切除断端の正確な病理組織学的評価が困難で、分割切除に起因する遺残再発が問題であった。この問題の解決を目的として、国立がんセンターの小野、後藤らは1999年にITナイフ (insulated-tipped diathermic knife) を開発し、新たなEMRの手技としてESDを開発した⁴⁵⁾。ITナイフは、針状ナイフ (needle knife) の先端にセラミック製の絶縁体のボールが装着している。ESDとは、粘膜と筋層の間の粘膜下組織に生理的食塩水を局注し、病変を含む粘膜を浮き上がらせた状態で、病変から十分離れた正常粘膜と思われる部位を切開し、全周性に切開を終了後、粘膜下層を直接内視鏡で観察しながら剝離して切除する手技である。ESDの開発により、大きさにかかわらず病変を一括切除することが可能となり、潰瘍等の原因で粘膜下層が線維化しているためにスネアで絞扼できずEMRができなかった病変でも切除できるようになった。一括切除で標本を得られるため、正確な病理組織学的評価が可能で、遺残や再発率の低下にも大きく寄与した。ITナイフの登場以来、様々なESD用のデバイスが開発され、現在までにESDは爆発的に普及している。

2. 食道 ESD

ESDは、当初、早期胃癌の内視鏡治療として始まったが、その技術は胃だけに留まらず、食道や大腸など他の早期消化管癌に対しても積極的に施行されるようになった⁶⁷⁾。特に食道という臓器は後縦隔に位置し、手術の場合には開胸操作が必要になるといふ解剖学的特徴を持っている。したがって胃や大腸と比べて癌の治療において内視鏡的治療と外科的治療との侵襲の差があまりにも大きい。また、食道ESDは、胃ESDと比較してより高度な技術を要するものの、すでに保険収載されているように、低侵

襲性への期待から食道ESDの拡大適応が望まれている。

しかしながら、広範囲な早期食道癌のESDでは、病変切除部位の大きな潰瘍が修復の際生じる癒痕化に起因する食道狭窄が問題となっている。すなわち、患者はESD後に生じる食道狭窄による食物通過障害や摂食障害を引き起し、その狭窄を解除するために内視鏡的バルーン拡張術を頻回受ける必要があり、そのことが患者のQOLを損ねることになる。そのため、2007年4月発行の日本食道学会食道診断・治療ガイドラインでは、内視鏡的粘膜切除術の適応基準として絶対適応においては周在性2/3以下という大きさの制限因子を加え、周在性3/4以上の切除は相対的適応となっている⁸⁾。

このような食道ESD後に生じる食道狭窄を予防するため、筆者らは自己口腔粘膜組織から作製した培養口腔粘膜上皮細胞シートを用いた再生医療的治療法を開発し、その臨床応用に向け研究を進めてきた。

3. 培養口腔粘膜上皮細胞シートの経内視鏡的移植術の開発

筆者らは、局所麻酔下で採取した少量の自己口腔粘膜組織から上皮細胞を単離し、温度応答性培養皿上で培養することで培養口腔粘膜上皮細胞シートを作製した。このように作製された細胞シートを経内視鏡的に食道ESD後の潰瘍面に移植するという再生医療的治療法を開発し、前臨床大動物実験結果を2006年に論文発表した⁹⁾。ビーグル犬を用いた前臨床大動物実験では、ESD予定日の2週間前に、円刃を用いて直径数ミリの口腔粘膜組織を数個採取した。そこからディスパーゼやトリプシンなどの蛋白質分解酵素を用いて上皮細胞を単離し、温度応答性培養皿上でマイトマイシンC処理した3T3フィーダーレイヤー (上皮細胞の増殖に必要な細胞成長因子を供給する) と共培養した。温度応答性培養皿の詳細については他稿に譲るが、この温度応答性培養皿を用いることにより、移植直前に室温程度に温度を下げるだけで、下面に培養中に沈着した細胞外マトリックスを保持したまま、1枚の移植可能な細胞シートとして全細胞を回収することができる。回収した培養口腔粘膜上皮細胞シートは、食道ESD直後の潰瘍面に内視鏡を用いて移植可能であった (図1)。

培養口腔粘膜上皮細胞シートの移植により有意に局所の炎症が抑えられ、ESD後の潰瘍の創傷治療が

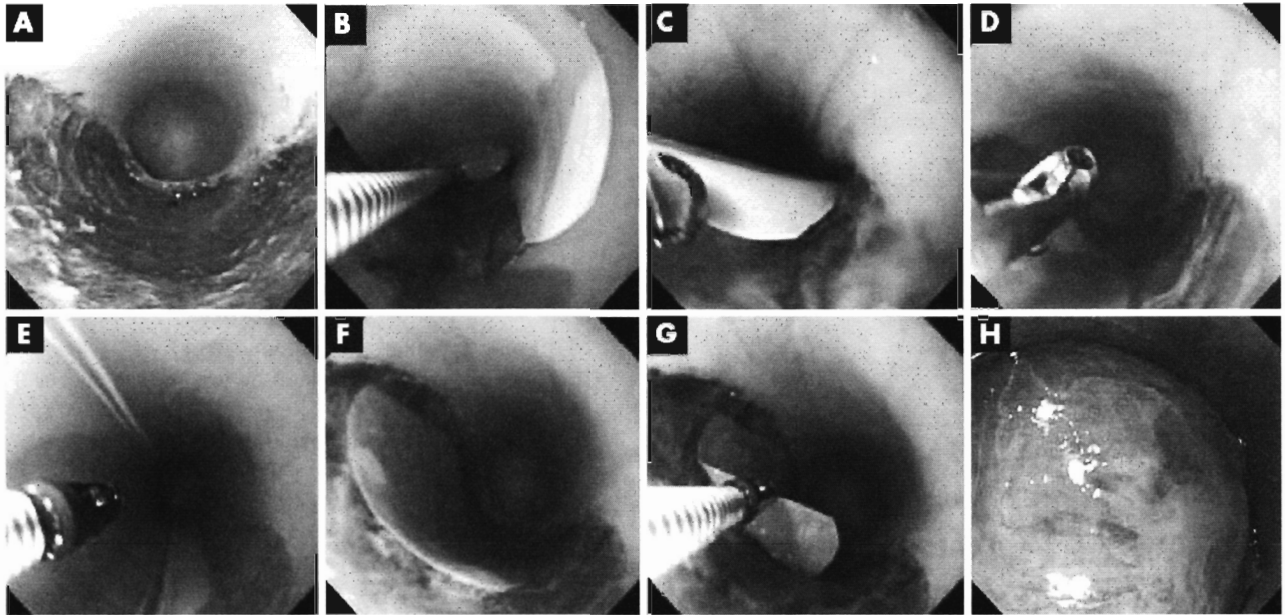


図1 経内視鏡的口腔粘膜上皮細胞シート移植術 (文献9より転載)
支持膜をキャリアにして食道 ESD 後の潰瘍面に内視鏡的に貼付する。

促進され、結果的に食道狭窄が抑制された。移植に際しては、培養口腔粘膜上皮細胞シートを運搬するためのワーキングスペースを確保するために、大口径のチューブ (食道 EMR 時に使用している EEMR-チューブ) を用いた。培養口腔粘膜上皮細胞シートを親水性加工した polyvinylidene difluoride (PVDF) 製の支持膜の上に載せた細胞シートがチューブ内壁に付着しないよう注意深く内視鏡画像を見ながら内視鏡の先端から出した生検鉗子で支持膜ごと把持して移送した。移植後の細胞シートの患部への生着は、細胞膜透過性 DNA 結合蛍光色素である Hoechst33342 や膜結合蛍光色素である DiI を用いて蛍光標識した細胞シートを移植して証明した。そもそも口腔粘膜上皮を、食道再生医療に用いる細胞ソースとして用いたのは、食道上皮と同じ重層扁平上皮で、組織学的に同一であり、また口腔からの組織採取は食道と異なり穿孔のリスクがないため安全に採取が可能だからである。

4. 臨床応用への問題点

本治療法を用いることで ESD 後の狭窄を回避でき、患者の ESD 後 QOL の劇的な向上が期待される。また、全周性の食道 ESD が可能となり、ESD の適応が広がると考えられる¹⁰⁾。大動物実験では、フィーダーレイヤーとしてマウス胎仔由来線維芽細胞である 3T3 細胞とウシ胎仔血清 (FBS) を使用していた。この培養法は重度熱傷の治療に用いる培養表皮の培養に用いられているもので、これまでに 1

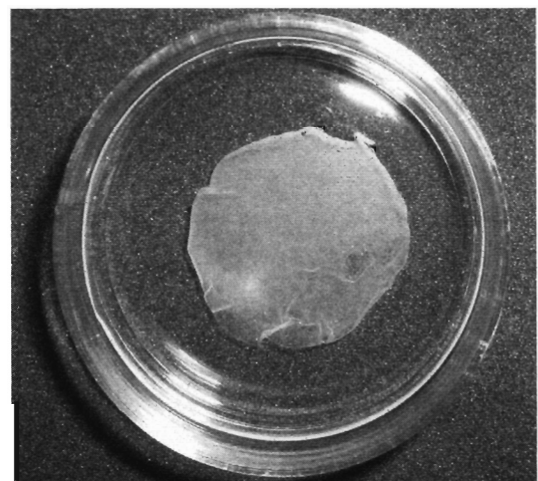


図2 培養ヒト口腔粘膜上皮細胞シート
温度応答性カルチャーインサートを用いて作製した。

万症例程度の臨床応用の実績がある。しかし、米国 FDA (食品医薬品局) や本邦厚生労働省の規制では、3T3 細胞をフィーダーレイヤーとして用いた培養系で培養した細胞の移植は、たとえ患者自己由来の細胞であっても異種移植と見なされる。厚生労働省による『異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針』に基づく「3T3J2 株及び 3T3NIH 株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針」に準拠する必要がある。ヒトの臨床応用は容易ではない。そこで筆者らは、培養底面から細胞に培地を供給できるサブミクロン径の多孔をもつ温度応答性カルチャーインサートを用い、細胞播

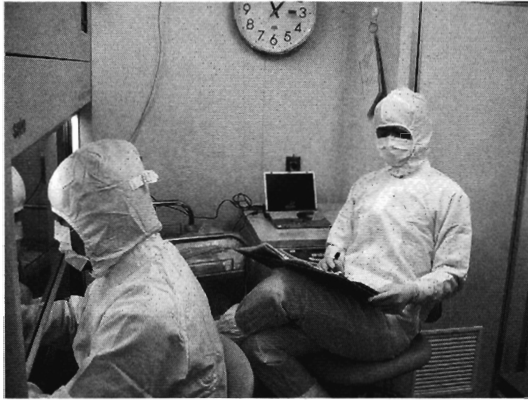


図3 GMP対応細胞培養センター (Cell Processing Center : CPC)
無塵服を着た2名で作業を行う。

種密度を最適化することでフィーダーレイヤーを不要とする培養条件を見いだすことに成功した¹¹⁾。さらにFBSの代わりに患者自己血清を用いることで、3T3細胞とFBSを使用しないヒト口腔粘膜上皮細胞シートの作製に成功した (図2)。

こうして筆者らは、前臨床大動物実験の成果をもとに臨床研究への準備を進めてきたが、2006年9月1日より「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が施行され、学内倫理委員会の承認後に厚生労働省の審査および厚生労働大臣の意見を求めることが必要となった。臨床研究に用いる細胞の培養においては、医薬品の製造施設に求められるGMP (good manufacturing practice) 準拠の細胞培養センター (Cell Processing Center : CPC) (図3)が必要であり、培養環境の整備と培養操作にかかわるスタッフの教育訓練が求められる。また、臨床の現場で世界初の臨床研究を行う上で、外来診察、口腔粘膜組織採取、CPCでの培養から、培養口腔粘膜上皮細胞シートの運搬や実際の内視鏡室での移植までの一連の過程が円滑に稼働するようなシステムの構築も同様に必要である。

おわりに

本臨床研究「内視鏡的粘膜切除術 (EMR) にもも

なう人工食道潰瘍に対する自家口腔粘膜上皮細胞シートによる再生医療的治療法 (UMIN 試験ID : 000000473) は、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に対応する体制を本学内に整え、外来から内視鏡室での移植までのコールドランを終了し、2008年1月より患者登録を開始した。今後、症例を重ね、その成果を報告したいと考えている。

文 献

- 1) Yang J, Yamato M, Nishida K et al: Cell delivery in regenerative medicine: the cell sheet engineering approach. *J Control Release* **116**: 193-203, 2006
- 2) Yang J, Yamato M, Shimizu T et al: Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. *Biomaterials* **28**: 5033-5043, 2007
- 3) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y et al: Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* **351** (12): 1187-1196, 2004
- 4) Gotoda T, Kondo H, Ono H et al: A new endoscopic mucosal resection procedure using an insulation-tipped electro-surgical knife for rectal flat lesions: report of two cases. *Gastrointest Endosc* **50** (4): 560-563, 1999
- 5) Ono H, Kondo H, Gotoda T et al: Endoscopic mucosal resection for treatment of early gastric cancer. *Gut* **48**: 225-229, 2001
- 6) Oyama T, Tomori A, Hotta K et al: Endoscopic submucosal dissection of early esophageal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* **3**: S67-S70, 2005
- 7) Yamamoto H: Endoscopic submucosal dissection of early cancers and large flat adenomas. *Clin Gastroenterol Hepatol* **3**: S74-S76, 2005
- 8) 日本食道学会: 「食道癌診断・治療ガイドライン (2007年4月版)」, pp10-13. 金原出版 (2007)
- 9) Ohki T, Yamato M, Murakami D et al: Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. *Gut* **55**: 1704-1710, 2006
- 10) New technique improves ulcer healing after esophageal ESD. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **4**: 122, 2007
- 11) Murakami D, Yamato M, Nishida K et al: Fabrication of transplantable human oral mucosal epithelial cell sheets using temperature-responsive culture inserts without feeder layer cells. *J Artif Organs* **9**: 185-191, 2006