

細胞シート工学を用いた食道癌内視鏡治療のための再生医療

大木岳志

東京女子医科大学消化器外科



早期消化管癌の内視鏡治療において、従来の内視鏡的粘膜切除術 (endoscopic mucosal resection: EMR) に加えて、内視鏡的粘膜下層剥離術 (endoscopic submucosal dissection: ESD) が開発された。この方法により広範囲の病変でも一括で切除することが可能となった。しかしながら管腔の狭い食道では、内視鏡治療後に生じる広範囲の人工潰瘍に起因する癒痕狭窄の問題が生じている。我々は新規再生医療技術である細胞シート工学をもとに、食道 ESD における術後潰瘍狭窄に対する治療として培養自己口腔粘膜上皮細胞シート移植による再生医療的治療法を開発した。現在までに GMP (Good Manufacturing Practice) 準拠による CPC (Cell Processing Center) 運用プロトコルの開発を終え、まもなく東京女子医大附属病院にて臨床研究を開始する予定である。

1. はじめに： 近年、早期消化管癌の内視鏡治療して内視鏡的粘膜下層剥離術

(endoscopic submucosal dissection: ESD) が登場し、広範囲の病変でも一括切除が可能となり、内視鏡治療の新たな時代を迎えた。特に早期食道癌においては、食道の解剖学的な特徴から、内視鏡的アプローチと外科的アプローチの侵襲の差が大きく、内視鏡的粘膜切除術 (endoscopic mucosal resection: EMR) の適応拡大が期待されてきた。そのような背景の中、当初、胃から始まった ESD は、食道領域でも積極的に施行されるようになった。しかしながら、他の消化管に比べ管腔の狭い食道における ESD では、広範囲病変の ESD 後に生じる潰瘍癒痕による狭窄の問題が生じる

ため、予防的にバルーンやブジーを用いる反復的な内視鏡的拡張や、ステントの留置を必要とし、患者に大きな負担を与えてしまう。筆者らがおこなった全周性のブタおよびイヌ食道 ESD モデルを用いた実験でも、ESD 後 2 週間で完全狭窄を来し (Figure 1)、食道狭窄に対する何らかの処置が必要となることが明らかとなっている。これらの問題に対し筆者らは、近年注目されている再生医療の新規技術である“細胞シート工学“を応用して、食道 ESD 後の狭窄をコントロールすることを目的とした研究を進めてきた。

I. 細胞シート工学による再生医療

1980 年代後半、ハーバード大学医学部子供病院の消化器外科医 J P. Vacanti とマサチュ

一セツ工科大学の応用化学者 R. Langer が **Tissue Engineering** (組織工学) を提唱し、1993 年に共著の総説を **Science** 誌に発表した。彼らが提唱する組織工学の概念は、生分解性高分子製の足場(スカフォールド)に細胞を播種し、成長因子の存在下で組織形成を誘導するというものである。彼らは、生分解性高分子を用いてヒトの耳の形を作り、この足場に軟骨細胞を播種・培養の後にマウスの背部皮下に移植した。この Vacanti らの提唱する方法で作製されたマウスの背中に乗ったヒトの耳というセンセーショナルな写真は世界のマスコミで報道され、**Tissue Engineering** (組織工学) に対する大きな期待が寄せられた。しかしながら、Vacanti らの提唱する方法を用いて様々な組織の再生が試みられてきたが、軟骨や骨などの単純な構造の再生には有用であるものの、心臓・肝臓・腎臓などの複雑な構造の再生には、従来の方法に代わる新たな方法論が希求されている。足場(スカフォールド)を用いた研究が進む中、我々は、37°Cで疎水性を示し、32°C以下では親水性に変化する 温度応答性高分子である

poly(N-isopropylacrylamide)(PIPAAm)に着目し、これを培養皿表面に共有結合的に固定し、温度応答性培養皿の開発に成功した。温度応答性培養皿を用いることで、室温程度の温度処理できわめて非侵襲的に培養細胞を一枚の細胞シートとして回収することが可能となった。従来法では、トリプシンなどのタンパク質分解酵素を用いて細胞-培養皿間の接着を分解することにより回収していたため、同時に細胞-細胞間の接着も破壊され、ばらばらの

細胞のみしか回収することができなかった。温度応答性培養皿を用いることにより、37°Cで培養してコンフルエントな(集密的な)状態になった細胞集団を、常温まで下げるだけで細胞間接着を壊すことなく非侵襲的に一枚の細胞シートとして回収することが可能となる。細胞シートの底面には、培養中に沈着した細胞外マトリックス(ECM)、つまりフィブロネクチンやラミニンなどの接着タンパク質が維持されており、別の種類の細胞シートや組織の表面に容易に接着することが可能で、細胞シートをそのまま移植に供したり、複数の細胞シートを重ね合わせることで組織を構築することが可能である。

II. 細胞シート工学による食道 ESD への応用

i) 経内視鏡的口腔粘膜上皮細胞シート移植：筆者らは、細胞シート工学を用いた食道再生医療の研究を進めており、食道 ESD 後の人工潰瘍の創傷治癒の促進および術後食道狭窄の抑制を目的とした新規再生医療的治療法の開発に成功した。この治療法は、自己由来の培養口腔粘膜上皮細胞シートを作製し、食道 ESD 後に生じる潰瘍面に内視鏡を用いて移植するという方法である。すでに前臨床的な大動物実験に成功し、論文として報告した。

以下に、本研究の概略を述べる。ESD および内視鏡的細胞シート移植術を施行する 2 週間前に、移植予定のビーグル犬の口腔粘膜組織を麻酔下に少量採取する。常法に従い、蛋白分解酵素であるディスパーゼとトリプシンを用いて口腔粘膜上皮細胞を単離する。

24mm×24mm の正方形に温度応答性高分子がグラフトされた温度応答性培養皿に細胞を

播種する。Rheinwald と Green らの方法にしたがい、マイトマイシンCで処理し増殖能を失活させた3T3細胞（マウス由来の線維芽細胞）をフィーダーレイヤーとして用い、口腔粘膜上皮細胞を2週間培養する（Figure 2-a）。移植直前に常温まで温度を下げ、細胞シートを非侵襲的に回収する（Figure 2-b）。食道ESD（半周・長径5cm）をおこない、その後、細胞シート移植のためのworking spaceを確保する目的でEEMR-tube®（Create Medic Co., Tokyo）を挿入し、PVDF(polyvinylidene difluoride)（Millipore Corporation, MA）製支持膜を用いて培養自己口腔粘膜上皮細胞シートを経内視鏡的に移植する（Figure 3）。

本治療法の特徴の一つとして、細胞ソースに自己口腔粘膜組織を使用している点があげられる。口腔粘膜上皮と食道粘膜上皮は共に重層扁平上皮であり、分化マーカーの発現においても差がない。食道再生研究において細胞ソースとして食道粘膜を用いた事例も報告されているが、細胞単離用に組織を採取する際に生じうる穿孔や後出血の合併症の可能性から、実際に臨床を前提とした場合、現実的とは考えにくく、食道粘膜上皮と酷似した口腔粘膜組織が、細胞ソースとして最も適していると考えている。口腔粘膜組織（主に頬粘膜）の採取は、穿孔がなく安全であり、局所麻酔下採取時の疼痛もない。口腔粘膜の傷が早く治ることは経験的にも知られているように創傷治癒も早く、創部もわずかなため美容的にも優れている。

ii) 臨床応用の問題点：近年、韓国ソウル大学黄教授のヒトクローン化ES細胞に関する

論文の捏造などの社会的な注目もあり、再生医療は大きな期待が集まっている反面、そのヒト臨床応用に関して一部からは社会的にも厳しい目が向けられている。今後、再生医療を広く現実のものとしていくためには、克服しなければならない多くの課題が残されている。

たとえば前述した動物実験系では3T3細胞を用いているが、米国食品医薬品局(Food and Drug Administration: FDA)は、フィーダーレイヤーを含む異種細胞との共培養系により作製した培養細胞・組織の移植を“異種移植”と分類しており、日本においても平成15年度厚生労働科学研究費補助金厚生労働科学特別研究事業より「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」が提示され、患者・医師共に様々な規制を受けることとなった。我々は、この問題をクリアするために、イヌ口腔粘膜上皮細胞を用いた詳細な検討をもとに、温度応答性カルチャーインサートを用いることで培養系から3T3細胞を除去できることを見出し、さらに同様の方法で培養ヒト口腔粘膜上皮細胞シートを作製できる培養条件を確立した（Figure 4）。

これまで、欧米とは異なり日本では再生医療のヒト臨床研究を行うには、施設内倫理委員会の承認を得るだけで十分であったが、平成18年9月より「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が施行され、状況は一変した。この指針以降、培養系で増殖する細胞（幹細胞を含有していると考えられる）を用

いたヒト臨床をおこなう場合、厚生労働省大臣の意見を求める必要があり、有識者からなる委員会の審査を受けることになった。本指針では、培養に GMP(Good Manufacturing Practice)準拠の CPC(Cell Processing Center)が必要であり、培養環境、培養等操作に関わる人員の教育訓練等、本格的な体制的な支援が必要である。

現在、食道癌治療ガイドラインにおける EMR 適応基準では、狭窄の問題から、周在性 3/4 以上の切除では相対的適応となり、絶対適応として周在性 2/3 以下という大きさの制限因子を加えている。我々が開発した新規再生医療的治療法が臨床に応用されれば、患者の QOL は大きく改善し、さらに早期食道癌における EMR/ESD の適応拡大にも寄与する可能性がある。我々の開発した経内視鏡的培養自己口腔粘膜上皮細胞シート移植は、前臨床動物実験の成果に基づき東京女子医科大学倫理委員会でヒト臨床の開始が承認されており、さらに「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に対応する体制を整えつつあり、臨床第一例目を準備中である。

主要論文

1. T.Ohki, M.Yamato, D.Murakami, R.Takagi, J.Yang, H.Namiki, T.Okano, K.Takasaki.“Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model”, Gut.1704-1710(2006).
2. D.Murakami, M.Yamato, K.Nishida, T.Ohki, R.Takagi, J.Yang, H.Namiki, T.Okano.

“Fabrication of transplantable human oral mucosal epithelial cell sheets using temperature-responsive culture inserts without feeder layer cells” J Artif Organs. 9,185-91(2006)

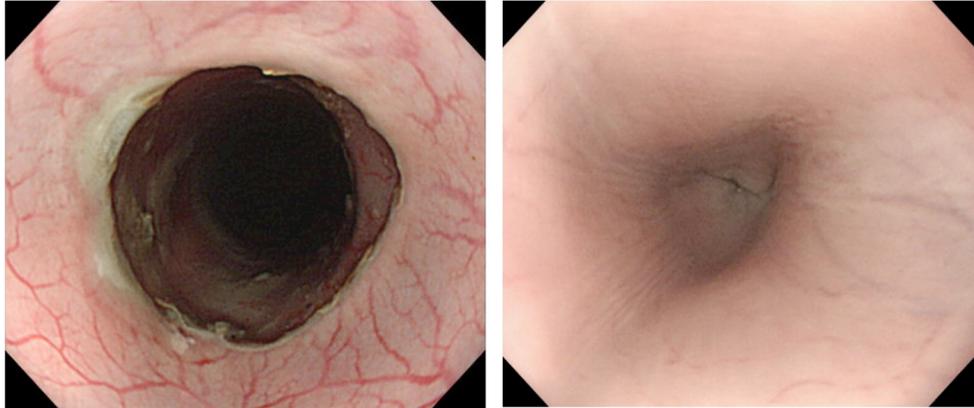
3. D.Murakami, M.Yamato, K.Nishida, T.Ohki, R.Takagi, J.Yang, H.Namiki, T.Okano. “The effect of micropores in the surface of temperature-responsive culture inserts on the fabrication of transplantable canine oral mucosal epithelial cell sheets” Biomaterials. 27,5518-5523(2006).

4. 大木岳志, 山本雅一. “細胞シート工学を用いた食道内視鏡治療のための再生医療-食道 EMR/ESD への応用” 医学のあゆみ 220, 561-564(2007)

5. 大木岳志, 大和雅之, 岡野光夫, 村上大輔, 並木秀男, 前田真法, 伊関洋, 太田正穂, 中村努, 山本雅一.” 口腔粘膜上皮細胞シート移植による食道 ESD のための再生医療-全周性食道 ESD 後の狭窄に対する新たなアプローチ” 消化器内視鏡. 19, 679-688(2007)

6. 大木岳志. “細胞シート工学による消化器内視鏡治療への可能性” 臨床消化器内科. 22, 245-247(2007)

7. 大木岳志, 山本雅一. “再生医療技術の最前線” シーエムシー出版 分担: 食道 117-122(2007)



a

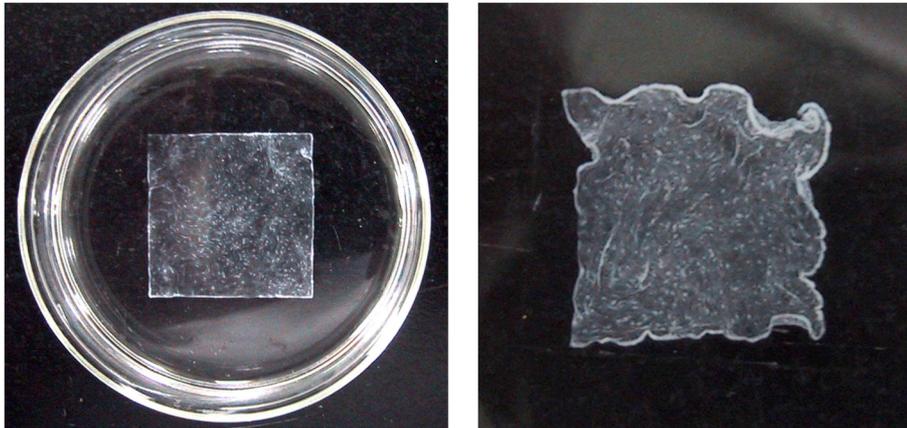
b

Figure 1

食道全周性ESD（ブタモデル）

a. 全周性食道ESD直後の人工潰瘍

b. 全周性食道ESD後2週間後に完全狭窄を来す



a

b

Figure 2

イヌ口腔粘膜上皮細胞シート

a. 正方形に温度応答性高分子をグラフトした温度応答性培養皿上の口腔粘膜上皮細胞シート（37°C）

b. 低温処理で回収した口腔粘膜上皮細胞シート（20°C）