

京都大学	博士 ( 医学 )	氏 名	本 多 通 孝
論文題目	Use of adipose tissue-derived stromal cells for prevention of esophageal stricture after circumferential EMR in a canine model (脂肪由来間質細胞の自家移植は食道粘膜切除後の狭窄を予防する (イヌモデルによる検討) )		
(論文内容の要旨)			
<p>【背景】早期食道癌に対する内視鏡的粘膜切除術(Endoscopic mucosal resection 以下EMR)は低侵襲治療として広く普及している。しかし、広範囲に食道EMRを行うと粘膜欠損部は高度の潰瘍を形成し、その治癒過程で食道壁が線維化し内腔が狭窄する。一方で線維化組織を再生する治療として組織幹細胞を病変部に移植する手法がある。とくに骨髄由来や脂肪組織由来の間質細胞(adipose tissue derived stromal cells 以下ADSCs)は肝硬変、肺線維症、癒痕声帯などの線維化の病態改善に寄与することが報告されている。本研究は自己脂肪組織から採取したADSCsが、広範囲の食道EMR後の狭窄予防効果を有するという仮説を検証する目的でビーグル犬モデルを利用した実験を行った。</p> <p>【方法】2歳以下のビーグル犬10頭をランダムにADSCs移植群(A群;5頭)とコントロール群(C群;5頭)の2群に分けた。A群では以下の手順でADSCsの分離を行った。約20gの脂肪組織を皮下または大網組織から採取・細断し、VIII型コラゲナーゼ溶液とともに37°C60分温浴にて混和融解した。10%ウシ胎仔血清を添加した培地(DMEM)で中和後、遠心分離を行い得られたペレットを培養ディッシュ上に1晩インキュベートし接着系の細胞群を使用した。EMRはヒト臨床と同等のデバイスを用いて、全身麻酔下に胸部食道に長径5cmの全周性EMRを施行した。施行後、A群ではすでに採取しておいたADSCs(5~10x10<sup>6</sup>個)をリン酸バッファーに浮遊させ、内視鏡的に注射針を用いて粘膜欠損部に8か所に分けて均等に注入し、C群ではリン酸バッファーのみを注入した。主要評価項目は食道粘膜収縮割合とした。すなわち術後2か月後に犠死せしめた対象の食道摘出標本において、最も収縮した部位の短軸長を正常部の短軸長で除した値について両群の平均値の差をt検定(有意水準0.05未満)にて検証した。副次的評価項目として、体重減少、症状、内視鏡検査、組織標本の評価を行った。移植細胞に蛍光色素で標識を施し、蛍光顕微鏡を用いてその動態を観察した。</p> <p>【結果】A群は1頭、C群は全例が狭窄症状を来とし、経管のもしくは経静脈的に栄養補給を要した。食道粘膜の収縮割合はA群:C群=45.3:75.7%(P&lt;0.008)であり有意にA群で狭窄が軽度であった。体重減少割合の平均値はA群:C群=10.5:24.5%(P=0.034)、組織学的にC群はA群と比較して固有筋層の破壊が高度であり、固有筋層の全層が障害され線維組織に置換されている例も認められた。また、A群では癒痕部の粘膜下層の毛細血管が豊富であった。蛍光色素で標識した移植細胞は粘膜下組織に多数存在していたが、明らかな筋細胞や上皮細胞への分化は確認できなかった。</p> <p>【考察】創傷治癒におけるADSCsの主な作用点は2つ考えられており、一つは幹細胞様の多分化能による作用、もう一つは液性因子の分泌作用である。今回の研究では前者の作用を示す所見は明らかでなく、主にADSCsが分泌する増殖因子が重要な役割を果たしたと考えられる。ADSCsが高濃度に分泌するhepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factorは抗炎症、抗線維化作用を有しており、食道壁の上皮細胞の増殖促進、固有筋層の破壊や癒痕組織の過度の線維化を抑制することで、組織学的に質の高い治癒が得られた。その結果としてEMR後の食道狭窄の予防効果を示したと考えられた。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

内視鏡的粘膜切除術は、早期食道癌に対する低侵襲で有効な治療法であるが、合併症として難治性の食道狭窄が問題となる。本論文は自己の脂肪組織から分離した間質細胞を食道の粘膜欠損部に移植することで術後狭窄の予防効果を示した。まずヒト臨床と同等のデバイスを用いてビーグル犬の胸部食道に5cmの長さの全周性粘膜切除を行いモデルを作成した。次いで、20gの自己の脂肪組織を採取しVIII型コラゲナーゼを用いて間質細胞(5~10x10<sup>6</sup>個)を分離し、内視鏡的に直接食道粘膜欠損部に移植した。移植をしなかったコントロール群では、食道粘膜切除後の粘膜欠損部は潰瘍化し粘膜下層および固有筋層に高度の炎症が引き起こされ、食道壁全層の線維化・収縮を認め、最終的に扁平上皮に覆われる時期に合わせて内腔の狭窄が形成される様子が観察された。一方で脂肪組織由来の間質細胞の移植を行った群では潰瘍部の炎症反応が抑制され、食道壁とくに固有筋層の線維化が軽微であり、結果として内腔の狭窄が軽度であった。また、粘膜切除後2か月の臨床症状(嚥下スコア、体重減少)、肉眼および組織学的所見(食道粘膜の収縮割合、固有筋層の障害程度、粘膜下層における炎症細胞数)のいずれのアウトカムも有意に改善されることが示された。以上の研究は食道狭窄の病態の解明に貢献し、その治療および予防策の進歩に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成25年12月13日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降