

学位論文（博士）

Development of frozen-thawed allogeneic
fibroblast sheets for esophageal anastomotic
leakage

（食道縫合不全に対する凍結解凍他家線維芽細胞
シート移植を用いた治療法の開発）

氏名 坂本 龍之介

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 器官病態外科学講座

令和 7 年 9 月

目 次

1. 要旨	3
2. 序論	4
3. 材料と方法	5
4. 結果	10
5. 考察	17
6. 結語と限界	21
7. 謝辞	22
8. 参考文献	23

要旨

食道の縫合不全は食道癌の術後に生じる重篤な合併症であるが、有効な予防法は未だに確立されていない。これまでの研究において、我々の研究室で開発した他家積層線維芽細胞シートは、種々の成長因子を分泌し、創傷治癒を促進させることを証明してきた。臨床応用を目指すには、細胞シートの長期保存方法を確立することが不可欠であるため、我々は 3D フリーザーを用いた凍結保存に着目した。本研究の目的は、凍結保存した他家積層線維芽細胞シートが、食道縫合不全の予防に有効かどうかを評価することである。

本研究ではラット口腔粘膜由来の線維芽細胞から積層線維芽細胞シートを作製し、3D フリーザーを用いて凍結保存した。ラットの食道を切離し、3 点結節縫合を行うことで縫合モデルを作製し、縫合部に自然解凍した 2 枚の他家積層線維芽細胞シートを移植した。術後に縫合不全の発生率、耐圧能、組織学的所見、コラーゲン量を評価した。

その結果、他家積層線維芽細胞シート群では、コントロール群と比較して、縫合不全の発生率が有意に低下し（コントロール群：11/18 例、61% vs. シート群：5/18 例、28%； $p = 0.02$ ）、耐圧能はシート群で有意に高値を示した（コントロール群： 78 ± 26 mmHg vs. シート群： 124 ± 30 mmHg； $p < 0.01$ ）。食道縫合部におけるコラーゲン量はシート群で増加し（コントロール群：0.09 [0.05-0.13] μg vs. シート群：0.15 [0.11-0.17] μg ； $p = 0.04$ ）、病理学的にも縫合部の粘膜下層における膠原線維の断面積はシート群で有意に増加していた（コントロール群：0.41 [0.37-0.44] mm^2/mm^2 vs. シート群：0.53 [0.49-0.58] mm^2/mm^2 ； $p < 0.01$ ）。

凍結保存した他家積層線維芽細胞シートの移植は、縫合不全の発生率や耐圧能を改善し、組織コラーゲン量を増加させる効果を示した。これらの結果は、線維芽細胞シートの移植が食道縫合不全の新たな予防法となり得る可能性を示した。

序論

食道の縫合不全は、縫合部位の破綻によって生じる合併症であり、縦隔洞炎や膿胸などの重篤な病態を惹起し、時に致命的な転帰をもたらすとされている。再建臓器や縫合方法によって異なるが、食道再建を施行された症例の 11.4～21.2 %で縫合不全が発生されると報告されており^{1,2}、長期入院や医療費の増大につながる。縫合部位や縫合方法、経鼻胃管の留置期間、大網や心膜周囲脂肪での被覆などが縫合不全の予防法として報告されてきたが³⁻⁵、未だに縫合不全の完全な予防には至っていない。

我々は以前から、末梢血単核細胞を含む自家線維芽細胞シートは難治性皮膚潰瘍の治癒を促進すると報告してきた⁶⁻⁸。線維芽細胞は血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor:VEGF) や肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor:HGF) などの成長因子を分泌する。それによりコラーゲン産生や血管新生を誘導し、パラクライン作用を介して組織再生を促進するとされている^{9,10}。

静脈不全に起因する難治性皮膚潰瘍患者を対象とした臨床研究において、我々は末梢血単核細胞を含む自家線維芽細胞シートが 6 例中 3 例で潰瘍治癒をもたらしたと報告した¹¹。一方で、残りの 3 例では自家細胞の増殖が不十分であったため、移植は実施できなかった。このことから、細胞シート移植の効率性を向上させるためには、細胞シートを事前に作製し、必要に応じて患者へ移植する体制が必要と考えた。そこで我々は他家線維芽細胞シートを開発し、実験動物の皮膚潰瘍および食道縫合モデルで、血管新生及び創傷治癒の促進を証明した^{12,13}。そして、他家線維芽細胞シートの利便性をさらに向上させるためには長期保存方法を開発する必要があると考えた。我々は 3D フリーザー（株式会社 KOGASUN、山口県、日本）を用いた凍結保存に着目し、3D フリーザーを用いることにより、線維芽細胞シートの凍結保存が可能であることを明らかにした¹⁴。

本研究の目的は、ラット食道縫合モデルにおいて凍結解凍後の他家積層線維芽細胞シートを移植し、その創傷治癒促進効果を証明することである。

材料と方法

・動物

雄の Wistar/ST ラット、Sprague Dawley (SD) ラット、および SD-Tg ラット (いずれも 10 週齢) を日本 SLC 株式会社 (静岡県、日本) から購入した。動物は、温度 (22 ± 2 °C)、湿度 (70 ± 20 %)、および 12 時間の明暗サイクルが管理された環境下で飼育した。術前は自由摂食、自由飲水として、術後は絶食、自由飲水とした。本研究は、動物実験の適正な使用に向けたガイドラインに従って実施され、山口大学の動物実験委員会によって承認された (IACUC; No. 31-008)。

・凍結他家積層線維芽細胞シートの作製

10 週齢の SD ラットおよび SD-Tg ラットを 5% イソフルラン (MSD Animal Health、東京、日本) で麻酔し、口腔粘膜組織を採取した。採取した組織は細切後に 10% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum: FBS) (Thermo Fisher Scientific、東京、日本)、5% コラゲナーゼ (富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本)、および 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific、東京、日本) を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州、米国) に懸濁し、 37°C 、5% CO_2 の条件下で 24 時間培養した。細断した組織を含む培地を遠心分離 (1200rpm、5 分間) して、上清を除去した。残存した組織断片に培地 (DMEM + 10% FBS + 1% ペニシリン/ストレプトマイシン) 10ml を添加し、3 日間培養した。培地を回収した後に 0.05% トリプシン-EDTA (Thermo Fisher Scientific、東京、日本) を用いて 10cm 細胞培養用ディッシュから線維芽細胞を剥離し、回収した培地を添加してトリプシンの反応を止めた。 $40\ \mu\text{m}$ のセルストレーナーで組織片を除去して線維芽細胞を単離した。遠心分離 (1200rpm、5 分間) 後に上清を除去し、残存した線維芽細胞に培地 (DMEM + 10% FBS + 1% ペニシリン/ストレプトマイシン) 10ml を添加し 4 日間培養した。滅菌済み CY-1 (親水化処理を施した熱可塑性樹脂フィルム) (セントラル硝子株式会社、東京、日

本) を 48 ウェルプレートに装着した。各ウェルに 2.5×10^5 個の細胞を播種し、24 時間培養した。培地を CTS AIM V SFM (Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州、米国) +HFD-1(+) (株式会社細胞化学研究所、宮城県、日本) +5%FBS に交換し、24 時間培養した。培地を除去した後バンバンカー hRM (GC リンフォテック株式会社、東京、日本) を主成分とする細胞凍結保存液 $150 \mu\text{L}$ を添加し、3D フリーザー (-35°C) で 30 分間凍結した。凍結後に 48 ウェルプレートを冷凍庫 (-80°C) で保管した。

- ・他家積層線維芽細胞シートおよび食道縫合部位の組織学的解析

凍結解凍後の他家積層線維芽細胞シートを生ハムの上に移植し、10%ホルマリン中性緩衝液 (富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本) で固定した。ラットは術後 3 日目および 5 日目に犠牲死させ、食道を摘出した後に 10%ホルマリン中性緩衝液で固定した。標本切片はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色およびアゾカルミン・アニリンブルー (AZAN) 染色を施した。炎症細胞数 (HE 染色) および膠原線維断面積 (AZAN 染色) は、縫合部周囲の粘膜下層における 0.2mm 四方の面積内における炎症細胞数と膠原線維断面積を測定した。筋層間距離は、縫合部における口側および肛門側の筋層先端間の距離として算出した。筋層角度は、筋層中央を通る直線を引き、その交点における鋭角を測定した。筋層間距離、筋層角度は縫合不全を認めない食道組織を用いて測定した。すべての組織学的画像は、BZ-X710 顕微鏡 (キーエンス株式会社、大阪、日本) で撮影し、Image J ソフトウェア (アメリカ国立衛生研究所、メリーランド州、米国) を用いて解析した。すべての組織学的解析は盲検化して行い、病理医 (小賀厚徳先生) が確認した。

- ・成長因子および細胞生存率の測定

線維芽細胞シートの凍結前に CTS AIM V SFM+HFD-1(+) +5%FBS で 24 時間培養し、その培養液を凍結前検体として $200 \mu\text{L}$ 採取した。続いて細胞凍結保存液を $150 \mu\text{L}$ 添加し、3D フリーザーを用いて凍結保存させ、冷凍庫で保管し

た。1週間後、室温で30分間静置して解凍した後に、細胞凍結保存液を除去し、CTS AIM V SFM+HFDM-1(+)+5%FBSを添加した。24時間培養した後に、その培養液を解凍後検体として200 μ L採取した。

採取した培養液のVEGF、HGF、transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1)、およびfibroblast growth factor-2 (FGF-2)の濃度を、ELISAキット(#RRV00, #MHG00, #DB100C, #MFB00; R&D Systems、ミネソタ州、米国)を用いて定量した。ATP活性はKATAMARI ATP Assay Kit Ver. 2.1 (富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本)を用いて測定した。CTS AIM V SFM+HFDM-1(+)+5%FBSを対照群として使用した。

・食道縫合モデル

Wistar/STラットを5%イソフルランで麻酔し、仰臥位頸部伸展位で固定した。麻酔濃度は麻酔開始から5分までは5%、その後は2%とした。頸部を剃毛し、頸部に約2cmの縦切開を加えた。気管と食道を周囲組織から剥離し、気管と食道を分離させた。食道を気管の前方に引き出し、縫合予定部の視野を展開した。その後の手技は顕微鏡下(タカギセイコー、富山県、日本)で施行した。食道を第9~10気管軟骨レベルで切離し、7-0ポリプロピレン糸(メドトロニック株式会社、東京、日本)を用いて縫合した。まず前壁側を2針、続いて食道を反転させて後壁を1針、計3針で縫合した。食道を気管の後方に戻し、筋肉、皮下組織及び皮膚をそれぞれ縫合した。すべての手技は同一術者(坂本龍之介)によって施行された。各ラットについて、縫合不全の発生率、膿瘍スコア、および耐圧能を評価した。

・他家積層線維芽細胞シートの移植

他家積層線維芽細胞シートを室温に30分間静置して解凍させた。CY-1上で解凍した線維芽細胞シートを後壁、前壁の順に合計2枚移植し、CY-1は回収した。この時、側壁にも細胞シートを被せ、縫合部の全周が覆われるようにした。

- ・縫合部と耐圧能の評価

ラットは術後 3 日目と 5 日目に犠牲死させた。縫合部周囲に膿瘍を認める場合を縫合不全として定義した。膿瘍の重症度は 0=膿瘍なし、0.5=1 つの小さな膿瘍 (<1mm)、1=いくつかの小さな膿瘍、2=1 つの中等度の膿瘍 (1~3mm)、3=1 つの大きな (3~5mm) 膿瘍またはいくつかの中程度の膿瘍、4=1 つの非常に大きな (>5mm) 膿瘍またはいくつかの大きな膿瘍とした^{15,16}。

食道は声門レベルから腹部食道までを摘出した。食道の肛門側から 24G サーフロー（テルモ株式会社、東京、日本）を挿入し、食道の両端を 4-0 ナイロン糸（日商工業株式会社、東京、日本）で結紮した。24G サーフローをアネロイド血圧計（HT-1500、日本精密測器株式会社、群馬、日本）に接続して縫合部の耐圧能を測定した。食道を水中に沈めた状態で空気を注入して、縫合部から air leak があつた最初の圧を耐圧能とした。本実験には合計 76 匹（対照群 38 匹）のラットを使用した。各ラットについて、縫合不全および耐圧性を評価し、膿瘍スコアを記録した。術後 3 日目には各群 20 匹、術後 5 日目には各群 18 匹を犠牲死させた。

- ・移植後の線維芽細胞シート残存期間

移植後の細胞シートの存続性は、緑色蛍光タンパク質（GFP）発現細胞を用いて評価した。SD-Tg ラット由来の他家積層線維芽細胞シートを Wistar/ST ラットの食道縫合部に移植した。ラットは術後 1 日目、3 日目、5 日目、7 日目に犠牲死させ、標本作製した。免疫染色は、抗 GFP 一次抗体（Cell Signaling Technology、マサチューセッツ州、米国）およびヤギ抗ウサギ IgG DyLight 550 二次抗体（アブカム株式会社、東京、日本）を用いて実施した。GFP 陽性および陰性細胞の面積を測定し、その比率を算出した。移植後の細胞シートの存続性を評価するために、合計 12 匹のラットを使用した。術後 1 日目、3 日目、5 日目、7 日目に各 3 匹ずつを犠牲死させた。

- ・食道縫合部における mRNA 発現レベルとコラーゲン定量

術後 5 日目に犠牲死させたラットから食道を摘出し、縫合部から口側と肛門側に 5mm ずつ、計 10mm を使用して解析を行った。RNeasy Mini キット(株式会社キアゲン、東京、日本)を使用して RNA を抽出した。RNA 濃度を nanodrop(Thermo Fisher Scientific、東京、日本)を用いて測定し、Prime Script Reverse Transcriptase(タカラバイオ株式会社、滋賀、日本)を用いて cDNA の合成を行った。定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR) は、QuantStudio 3 real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific、東京、日本)と SYBR Select Master Mix(Thermo Fisher Scientific、東京、日本)を使用して行った。ACTB を内因性コントロールとして使用し、mRNA の発現レベルは、 ΔCT 法を用いて計算した。コラーゲン定量は Rat Type I Collagen Detection Kit (Chondrex, Inc、ワシントン州、米国)を用いて測定した。

mRNA 発現量および I 型コラーゲン定量の評価には合計 39 匹のラットを使用した。I 型および III 型コラーゲンの mRNA を評価するために 18 匹(正常群 6 匹、コントロール群 6 匹、シート群 6 匹)、I 型コラーゲン含量を測定するために 21 匹(正常群 7 匹、コントロール群 7 匹、シート群 7 匹)を用いた。すべてのラットは術後 5 日目に犠牲死させた。

- ・統計分析

連続変数は、正規分布を示す場合は平均値と標準偏差、正規分布でない場合は中央値および四分位範囲で示した。群間差は、student の t 検定または Mann-Whitney U 検定を用いて解析した。 $p < 0.05$ を統計学的な有意差ありと判断した。すべての統計分析は、STATA17 (StataCorp LLC、テキサス州、米国)を使用した。

結果

・ 積層線維芽細胞シートの組織学的解析と成長因子の測定

凍結解凍した線維芽細胞シートは厚さ約 $30\ \mu\text{m}$ の多層構造を呈しており、3～4 層の線維芽細胞層で構成されていた。これらのシートには膠原線維などの細胞外マトリックス成分が少量存在していた (図 1A および 1B)。線維芽細胞シートの ATP 活性は、凍結前 $125\ (102-150) \times 10^3\ \text{RLU/秒}$ 、解凍後 $37\ (22-50) \times 10^3\ \text{RLU/秒}$ であった (図 1C)。VEGF 濃度は凍結前 $735\ (572-850)\ \text{pg/mL}$ 、解凍後 $345\ (205-433)\ \text{pg/mL}$ であった (図 1D)。HGF 濃度は凍結前 $360\ (324-396)\ \text{pg/mL}$ 、解凍後 $145\ (118-184)\ \text{pg/mL}$ であった (図 1E)。TGF- $\beta 1$ 濃度は凍結前 $740\ (595-860)\ \text{pg/mL}$ 、解凍後 $465\ (397-518)\ \text{pg/mL}$ であった (図 1F)。FGF-2 濃度は凍結前 $845\ (788-907)\ \text{pg/mL}$ 、解凍後 $385\ (293-467)\ \text{pg/mL}$ であった (図 1G)。ATP 活性および成長因子の分泌は、凍結前と比較して解凍後は減少していた。しかし、凍結した線維芽細胞シートは、解凍後においても培地と比較して高い濃度の成長因子を分泌していた (図 1、C-G)。

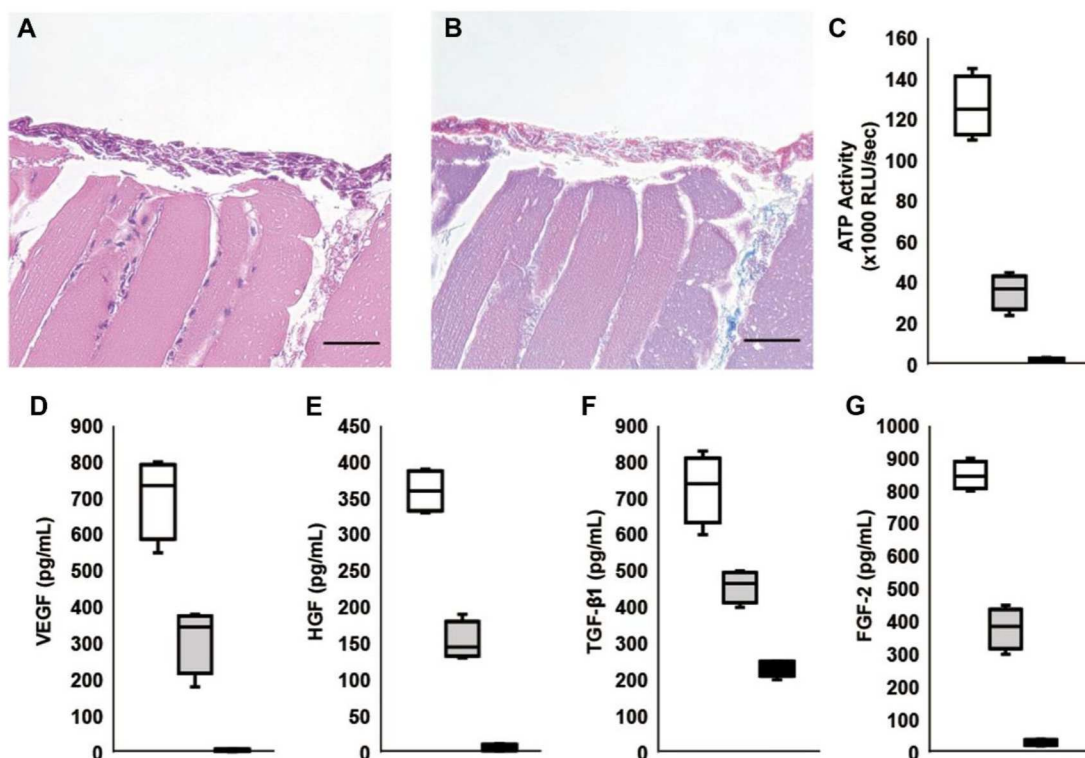


図1 凍結解凍した線維芽細胞シートの病理像と分泌する成長因子

(A, B) 生ハム上に移植された線維芽細胞シートの代表的な HE 染色 (A) と AZAN 染色 (B) 画像 (倍率 100×、スケールバー=50 μ m)。

(C) ATP 活性を用いた細胞生存率の測定。□は凍結前に 24 時間培養した培養液、■は解凍後に 24 時間培養した培養液、■は線維芽細胞を播種していない培養液 (CTS AIM V SFM+HFDM-1(+)+5%FBS) を表す (各群 n=4)。

(D, E, F, G) 線維芽細胞から分泌する成長因子。(D) は VEGF、(E) は HGF、(F) は TGF- β 1、(G) は FGF-2 を表す。□は凍結前に 24 時間培養した培養液、■は解凍後に 24 時間培養した培養液、■は線維芽細胞を播種していない培養液 (CTS AIM V SFM+HFDM-1(+)+5%FBS) を表す (各群 n=4)。

・縫合不全発生率、膿瘍スコアと耐圧能の評価

縫合不全発生率は、術後 3 日目においてコントロール群では 20 例中 13 例 (65%)、線維芽細胞シート群では 20 例中 5 例 (25%) であった。術後 5 日目では、コントロール群が 18 例中 11 例 (61%)、細胞シート群が 18 例中 5 例 (28%) であった。縫合不全発生率は、術後 3 日目 ($p = 0.01$) および 5 日目 ($p = 0.02$) のいずれにおいても、細胞シート群の方がコントロール群より有意に低かった。死亡率は、術後 3 日目および 5 日目ともに両群で 0% であった (表 1)。

表 1 縫合不全発生率と死亡率

	術後 3 日目			術後 5 日目		
	コントロール	細胞シート	p 値	コントロール	細胞シート	p 値
縫合不全	13/20 (65%)	5/20 (25%)	0.01	11/18 (61%)	5/18 (28%)	0.02
死亡率	0/20	0/20	—	0/18	0/18	—

膿瘍スコアの平均値は、術後3日目でコントロール群が1.4、線維芽細胞シート群が0.4であり、術後5日目ではコントロール群が1.3、細胞シート群が0.4であった。膿瘍スコアは、術後3日目 ($p < 0.01$) および術後5日目 ($p < 0.01$) のいずれにおいても、細胞シート群の方がコントロール群より有意に低かった (図2Aおよび2B)。縫合部の耐圧能は、術後3日目にコントロール群が 75 ± 24 mmHg、線維芽細胞シート群が 121 ± 25 mmHg であり、術後5日目ではコントロール群が 78 ± 26 mmHg、細胞シート群が 124 ± 30 mmHg であった。耐圧能は、術後3日目 ($p < 0.01$) および術後5日目 ($p < 0.01$) のいずれにおいても、細胞シート群の方がコントロール群より有意に高かった (図2C)。

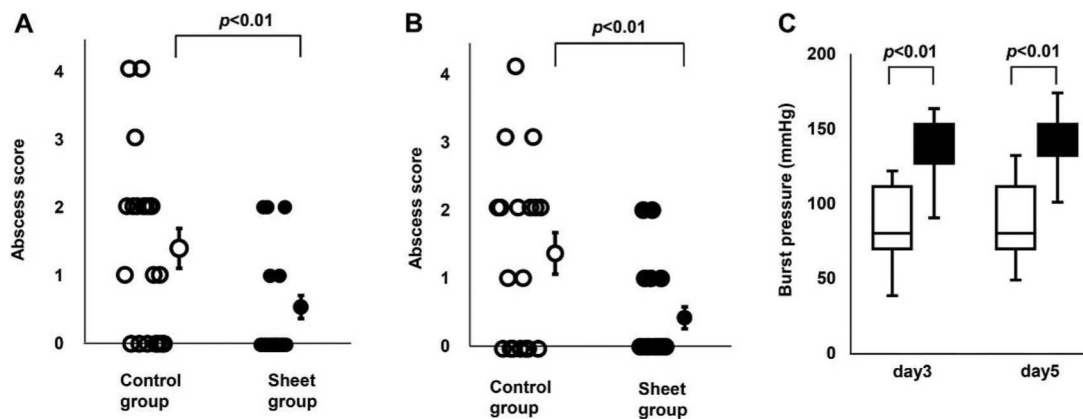


図2 線維芽細胞シート移植による治療効果

(A, B) 術後3日目 (A) と術後5日目 (B) の膿瘍スコアを表す (術後3日目は各群 $n=20$ 、術後5日目は各群 $n=18$)。平均値と標準偏差はグラフの右端に示す。

(C) 耐圧能の評価。□はコントロール群、■は線維芽細胞シート群を示す (術後3日目は各群 $n=20$ 、術後5日目は各群 $n=18$)。

・病理学的解析

図3Aは術後3日目と5日目におけるHE染色の代表的な画像を示しており、両群ともに術後3日目には粘膜上皮の再生は完了していた。術後5日目において、炎症細胞数はコントロール群 $8.9 (4.9-13) \times 10^3$ cells/mm²、細胞シート

群 $3.8 (2.1-5.6) \times 10^3 \text{ cells/mm}^2$ であり、細胞シート群はコントロール群と比較して有意に炎症細胞が少なかった ($p < 0.01$) (図 3B)。図 3C は、術後 5 日目における AZAN 染色の代表的な画像を示している。術後 5 日目において、単位体積あたりの AZAN 陽性面積はコントロール群で $0.41 (0.37-0.44) \text{ mm}^2/\text{mm}^2$ 、細胞シート群で $0.53 (0.49-0.58) \text{ mm}^2/\text{mm}^2$ であり、細胞シート群はコントロール群と比較して有意に多くのコラーゲン線維を有していた ($p < 0.01$) (図 3D)。

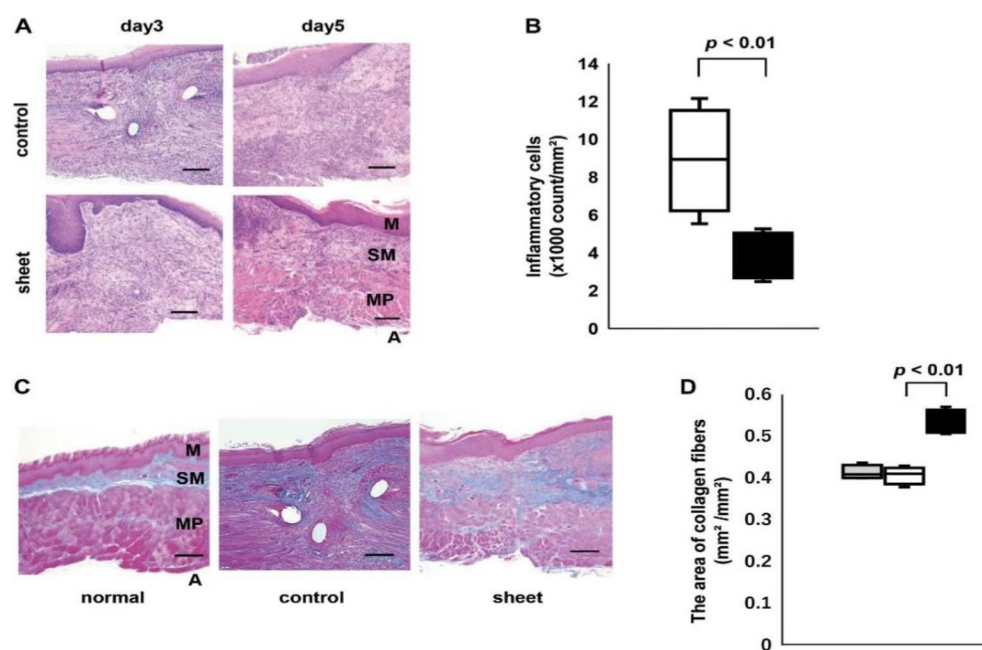


図 3 炎症細胞と膠原線維の病理学的解析

- (A) 縫合部の代表的な HE 染色画像 (倍率 100×、スケールバー=100 μm)
- (B) 術後 5 日目における炎症細胞の定量的評価。炎症細胞は粘膜下層の縫合部を中心とした 0.2mm 四方の面積内において計測した。□はコントロール群、■は線維芽細胞シート群を示す (各群 n=5)。
- (C) 縫合部の代表的な AZAN 染色画像 (倍率 100×、スケールバー=100 μm)
A は外膜、M は粘膜層、MP は固有筋層、SM は粘膜下層を示す。
- (D) 術後 5 日目における膠原線維の面積。膠原線維の面積は粘膜下層の縫合部を中心とした 0.2mm 四方の面積内において測定した。■は正常食道組織、□はコントロール群、■は線維芽細胞シート群を示す。

図 4A は筋層間距離および角度の計測方法を示している。術後 3 日目において、筋層間距離はコントロール群 576 (498-644) μm 、細胞シート群 267 (88-655) μm であり、細胞シート群はコントロール群と比較して筋層間距離が短い傾向を示した ($p = 0.06$)。術後 5 日目では、筋層間距離はコントロール群 467 (364-550) μm 、細胞シート群 149 (43-310) μm であり、細胞シート群はコントロール群と比較して筋層間距離が有意に短かった ($p < 0.01$) (図 4B)。さらに、筋層間角度は術後 3 日目にコントロール群 18 (12-26) 度、細胞シート群 6 (5-8) 度であった。術後 5 日目では、コントロール群 14 (11-18) 度、線維芽細胞シート群 4 (4-6) 度であった。術後 3 日目 ($p < 0.01$)、5 日目 ($p < 0.01$) 共に細胞シート群はコントロール群と比較して筋層角度は有意に小さく、より直線的な創傷治癒過程が示された (図 4C)。

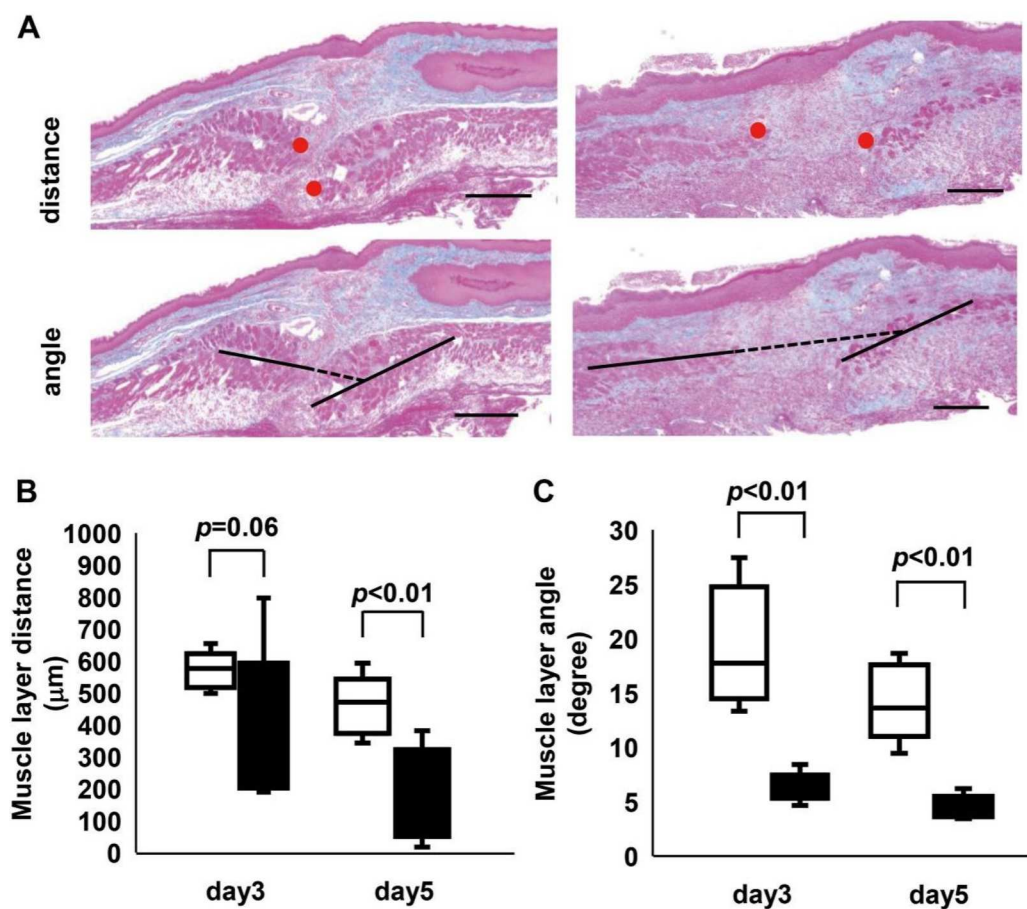


図4 筋層間距離と角度の病理学的評価

(A) AZAN 染色を用いた筋層の誤整列の評価（倍率 40×、スケールバー＝300 μ m）。筋層が接着している場合と筋層が離開している場合の代表的な病理標本を示す。筋層間距離は、縫合部の口側および肛門側の筋層先端間の距離として定義した（上図）。筋層角度は、筋層の中心を通る直線を引き、その交点で生じる鋭角を測定することで求めた（下図）。

術後 3 日目および 5 日目の筋層間距離 (B) と筋層角度 (C) を表す。□はコントロール群、■は線維芽細胞シート群を示す（各群 n=5）。

・移植後の線維芽細胞シート残存期間

図 5A は、移植後の GFP 発現細胞シートの代表的な画像を示している。GFP を発現する細胞は、術後 1 日目、3 日目、5 日目、7 日目に観察された。GFP の発現は、術後 3 日目から 7 日目にかけて減少した（図 5B）。

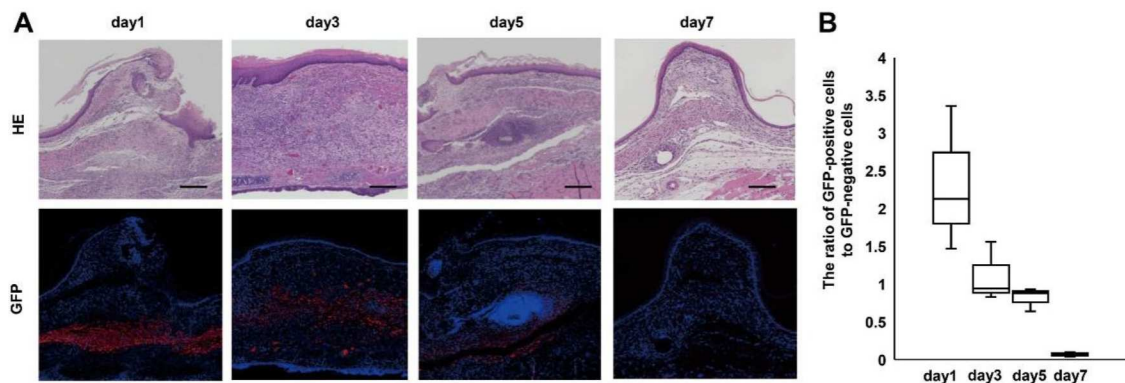


図5 移植された GFP 発現線維芽細胞シートの解析

(A) 移植後 1 日目、3 日目、5 日目、7 日目における、代表的な HE 染色画像と蛍光染色画像。GFP 発現細胞による抗 GFP 抗体染色 (GFP: 赤) および核 (DAPI: 青) の蛍光染色画像（倍率 100×、スケールバー＝100 μ m）。

(B) 移植後 1 日目、3 日目、5 日目、7 日目における GFP 陽性細胞と GFP 陰性細胞の比率。この比率は、GFP 陽性細胞数を GFP 陰性細胞数で割ることによって算出した（各群 n = 3）。

・食道縫合部における mRNA 発現レベルと I 型コラーゲン定量

術後 5 日目における I 型コラーゲン発現量は細胞シート群はコントロール群と比較して有意に多かった ($p = 0.05$) (図 6A)。術後 5 日目における III 型コラーゲン発現量は、3 群間で有意差は認めなかった (図 6B)。I 型コラーゲン定量は、コントロール群 0.09 (0.05-0.13) μg 、線維芽細胞シート群 0.15 (0.11-0.17) μg であり、細胞シート群はコントロール群と比較して有意に多かった ($p = 0.04$) (図 6C)。

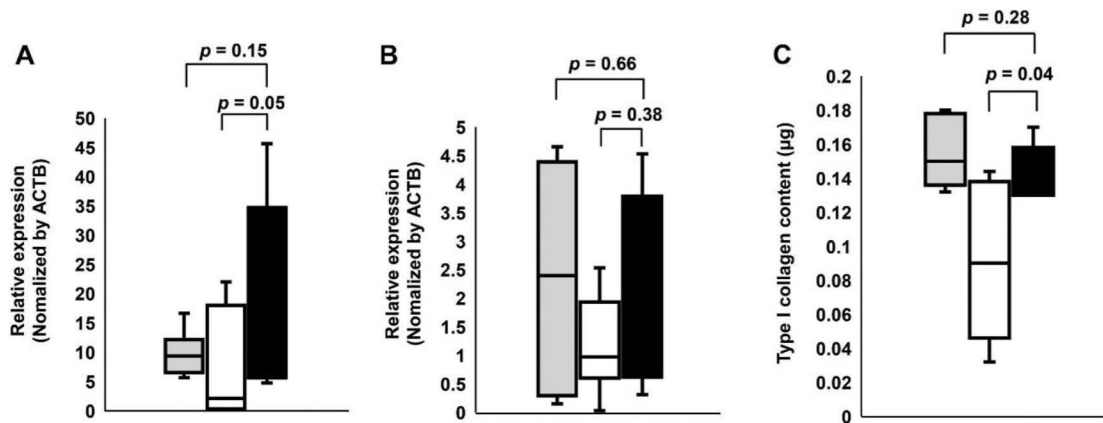


図 6 コラーゲンの解析

(A) I 型コラーゲンの mRNA 発現レベル、(B) III 型コラーゲンの mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR により評価した。■は正常食道組織、□はコントロール群、■は線維芽細胞シート群を示す (各群 $n = 6$)。

(C) I 型コラーゲン定量。■は正常食道組織、□はコントロール群、■は線維芽細胞シート群を示す (各群 $n = 7$)。

考察

線維芽細胞シートは様々な成長因子（VEGF、HGF、FGF2、TGF- β 1）やサイトカインを介したパラクライン効果により、移植部位での創傷治癒および組織再生を促進することが報告されている^{9,10,17}。そこで、我々は以前から自家および他家線維芽細胞シートによる創傷治癒効果を証明してきた^{6-8,12,13,18}。

腸管の縫合不全の原因には患者の全身状態（低栄養や内服薬、基礎疾患）や手術手技（再建臓器、縫合方法、組織への緊張、縫合部位の血流）が関連しているが、中でも縫合部の血流低下は最大のリスク因子とされている^{19,20}。VEGFは血管透過性や血管内皮細胞の遊走に関連し、炎症細胞浸潤や肉芽組織形成、創傷の閉鎖など、創傷治癒において様々な役割を果たしている^{21,22}。また、縫合不全は術後早期に発生することが多く、合併症予防のためには迅速な上皮形成が重要である。HGFは上皮形成および血管新生を促進し、創傷治癒において重要な役割を果たすとされている²³。TGF- β 1はI型コラーゲンの産生を促進し^{24,25}、FGF-2とVEGFの同時投与は創傷治癒モデルにおいて肉芽組織形成とコラーゲン沈着を改善すると報告されている²⁶。さらに、FGF-2は創傷治癒において抗線維化作用を示すことが報告されている^{27,28}。

本研究では、線維芽細胞シートからのVEGF、HGF、TGF- β 1、FGF-2の分泌を測定し、凍結解凍後の他家積層線維芽細胞シートからこれら4因子が分泌されることをラットで実証した（図1, D-G）。本研究では、解凍後のラット線維芽細胞シートにおいてATP活性が低いことも明らかとなった（図1C）。ヒトとラットにおける線維芽細胞の生存率の違いは原因不明であるが、種の生物学的差異が影響している可能性がある。我々は、解凍後24時間のヒト線維芽細胞の生存率は凍結前と同等である一方で、マウス線維芽細胞では解凍後24時間の生存率が凍結前に比べて低いことを報告した²⁹。本研究においてラットとマウスの差はあるが、以前の研究と同様の結果となった。

我々は、非凍結の自家および他家積層線維芽細胞シートを用いたWistar/STラット食道縫合モデル（4針縫合）において、縫合不全発生率、膿瘍スコア、耐圧能に差がないことを報告した¹³。先行研究では、マウス潰瘍モデルにおい

て、非凍結群と凍結解凍群の自家線維芽細胞シートによる創傷治癒効果が同等であることを示している¹⁸。しかし、本研究では非凍結群と凍結解凍群の線維芽細胞シートを、Wistar/ST ラットの 3 針縫合による食道縫合モデルで比較していない。我々は将来的な細胞シート治療の低コスト化と安定化を目指しているため、本研究では凍結解凍した他家積層線維芽細胞シート移植による組織再生に焦点を当てた。そのため、本研究では凍結解凍した他家積層線維芽細胞シート移植群をコントロール群と比較した。また、本研究は臨床応用を考慮し、採取する検体（口腔内組織）や使用する培養液、培養する環境（37℃、5%CO₂）、培養期間をヒト細胞と同じ条件下にした。本研究において、線維芽細胞シート群はコントロール群に比べて有意に高い耐圧能、低い縫合不全発生率、少ない膿瘍スコアを示した。これらの結果は、非凍結の自家および他家線維芽細胞シートの創傷治癒効果に関する先行研究と一致しており、凍結解凍した他家積層線維芽細胞シートが食道縫合不全予防に有効であることを示している。

ラットモデルにおける心筋内単細胞懸濁液注入では、移植 1 時間後に約 23% の細胞が移植部位に残存することが報告されている³⁰。角膜細胞シートは移植部位に長期間残存するが、多くの細胞移植では、自家・他家を問わず細胞は移植部位に長期的には残存しない。そのため、移植細胞の生存期間を延長するために細胞シート技術が開発された。我々の細胞シートは、潰瘍や縫合不全モデルにおいて約 1 週間で消失することが観察されている^{6-8, 12, 13, 18, 29}。また、イヌの内視鏡的粘膜下層剥離モデルにおいて、口腔粘膜上皮細胞シートは 8 日間生着するという報告もある³¹。自家由来を含む移植された細胞シートは 1 週間以内に消失するため、移植された細胞シートの消失には、獲得免疫細胞ではなく自然免疫細胞が関与している可能性が示唆される。

我々は、移植された細胞シートの役割はパラクライン効果、すなわち凍結解凍した他家線維芽細胞シートから分泌される成長因子を介して組織再生を誘導することであると考えている。図 5 では、移植された線維芽細胞シートが術後 5 日目まで存続していることが示されている。この期間中、線維芽細胞シート

が成長因子を分泌している可能性が高い。また、図 5A において day5 の組織内で観察される染色されていない領域は、食道組織（上部組織）と前頸部の筋肉（下部組織）との間の分離に起因するものであると考えられる。そのため GFP 発現細胞が上部および下部組織にまたがって存在しているように観察された。

縫合不全の予防において、本研究では創傷治癒促進と組織強度の増加という 2 つのメカニズムに着目した。術後 5 日目において、線維芽細胞シート群は、コントロール群と比べて炎症細胞浸潤が減少していた（図 3B）。創傷治癒は止血期、炎症期、増殖期、リモデリング期と明確な段階を経て進行することは広く知られている。止血後から好中球やマクロファージといった炎症細胞が創傷部位に遊走され、組織片や病原体を貪食する。マクロファージから様々な成長因子やサイトカインが分泌され増殖期へと移行し、炎症細胞は徐々に減少していく³²⁻³⁴。

細胞シート群において炎症細胞の浸潤が軽度であることは創傷治癒促進によって早期に炎症期から増殖期に移行した可能性を示唆している（図 3A および B）。また、間葉系幹細胞は免疫抑制作用を示すことが知られており、そのメカニズムのひとつとして、間葉系幹細胞から分泌される免疫抑制因子が関与しているとされている。また、HGF および TGF- β 1 は免疫抑制作用を示す³⁵。そのため、凍結解凍した他家積層線維芽細胞シートから分泌される HGF および TGF- β 1 が炎症細胞の減少に寄与したと考えられる。

さらに、細胞シート群はコントロール群と比較して筋層間の距離が短く、より直線的に癒合している病理組織像が得られた（図 4B および C）。創傷治癒が進んでいくと組織の再置換（Ⅲ型コラーゲンからⅠ型コラーゲンへの置換）や再配列といったリモデリングが生じ、正常な組織へと回復していく。また創傷の治癒過程でアクチンフィラメントが分泌されることで、創傷収縮が促進される。そのため創傷閉鎖速度が早いことは創傷治癒能力の向上を示している³⁶。細胞シート群で筋層間距離が短く、直線的な組織の癒合が起こったことはコントロール群と比較してリモデリングが加速していることを示唆している。従って、炎症期の早期離脱やリモデリングの促進は細胞シートによる創傷治癒促進

効果によるものだと考察する。

また、本研究では細胞接着の支持構造として組織強度に重要な役割を果たすⅠ型コラーゲンに着目した。線維芽細胞シート群は、コントロール群と比較して膠原線維の面積が有意に大きかった。Ⅲ型コラーゲンの mRNA 発現には有意差が認められなかったが、Ⅰ型コラーゲンの mRNA 発現レベルはシート群で高い結果であった（図 6A および 6B）。これは創傷治癒過程において、Ⅲ型コラーゲンがⅠ型コラーゲンに置換されるためだと考えられる³⁷。さらに、Ⅰ型コラーゲンの定量において、線維芽細胞シート群はコントロール群よりも有意に多いコラーゲン量を示した（図 6C）。また、線維芽細胞シート群において粘膜下層の縫合部を中心とした 0.2mm 四方の面積内において計測した膠原線維の陽性面積はコントロール群より大きかった（図 3D）。病理学的解析、mRNA レベル、コラーゲン定量の結果から、凍結解凍した他家積層線維芽細胞シート移植はコラーゲンの増殖を促進し、それによって組織強度を高め、耐圧能を向上させる可能性が示唆された。

AZAN 染色において、筋層では軽度の染色が見られ、間質では強い青染が確認された。筋層でも一部コラーゲンが産生されていた可能性があるが、その大部分は術後 5 日目までに線維芽細胞によって分泌されたと考えられる（図 3C および 3D）。これは、凍結解凍した他家積層線維芽細胞シート由来の成長因子が、移植後数日のうちにコラーゲン分泌を誘導したことを示唆している。

結語

凍結解凍した他家積層線維芽細胞シートの移植は、創傷治癒を促進し、組織強度を高めることで、最終的に縫合不全のリスクを低減させることが示された。

限界

本研究の limitation として、移植後の食道組織において線維芽細胞シートの細胞活性を確認できなかったことが挙げられる。また、本研究では移植後 7 日目までの病理組織を評価しており、移植後の長期的な病理学的解析は実施されていない。そのため、縫合不全や縫合部狭窄といった項目を細胞シートの長期的な評価の指標として検討すべきである。

謝辞

研究、論文作成の指導を賜りました、濱野公一教授、上野耕司先生に感謝申し上げます。また、病理組織を評価頂いた、小賀厚徳先生に感謝申し上げます。基材の提供および実験の助言を頂きました、吉田佳汰様、河合 亘様に感謝申し上げます。また、実験の補佐をして頂いた、弘中紫様に感謝申し上げます。

本研究は、山口大学 大学研究推進機構 総合実験センターである遺伝子実験施設、生命科学実験施設を利用して実施しました。総合実験センターは文部科学省先端研究基盤共用促進事業（コアファシリティ構築支援プログラム）JPMXS04404000XX の支援を受けております。

本研究は、やまぐち再生医療等実用化・産業化推進補助金事業、宇部市再生医療等先端的研究開発実用化推進補助金事業、科学研究費助成事業の支援を受け、実施致しました。

参考文献

1. Low DE, Kuppusamy MK, Alderson D, et al. Benchmarking complications associated with esophagectomy. *Ann Surg* 2019;269:291-298.
2. Seesing MFJ, Gisbertz SS, Goense L, Eshuis WJ, Henegouwen MIB, Gisbertz SS. A propensity score matched analysis of open versus minimally invasive transthoracic esophagectomy in the Netherlands. *Ann Surg* 2017;266:839-846.
3. Hagens ERC, Reijntjes MA, Anderegg MCJ, Eshuis WJ, Henegouwen MIB, Gisbertz SS. Risk factors and consequences of anastomotic leakage after esophagectomy for cancer. *Ann Thorac Surg* 2021;112:255-263.
4. Vetter D, Gutschow CA. Strategies to prevent anastomotic leakage after esophagectomy and gastric conduit reconstruction. *Langenbecks Arch Surg* 2020;405:1069-1077.
5. Grigor EJM, Kaaki S, Fergusson DA, et al. Interventions to prevent anastomotic leak after esophageal surgery: a systematic review and meta analysis. *BMC Surg* 2021;21:42.
6. Ueno K, Takeuchi Y, Samura M, et al. Treatment of refractory cutaneous ulcers with mixed sheets consisting of peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts. *Sci Rep* 2016;6:28538.
7. Takeuchi Y, Ueno K, Mizoguchi T, et al. Ulcer healing effect of autologous mixed sheets consisting of fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells in rabbit ischemic hind limb. *Am J Transl Res* 2017;9:2340-2351.
8. Mizoguchi T, Ueno K, Takeuchi Y, et al. Treatment of cutaneous ulcers with multilayered mixed sheets of autologous fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells. *Cell Physiol Biochem* 2018;47:201-211.

9. Platas J, Guillen MI, Caz MDP, et al. Paracrine effects of human adipose derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes. *Aging* 2016;8:1703-1717.
10. Liang X, Ding Y, Zhang Y, Tse HF, Lian Q. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplantation* 2014;23:1045-1059.
11. Mizoguchi T, Suehiro K, Ueno K, et al. A pilot study using cell-mixed sheets of autologous fibroblast cells and peripheral blood mononuclear cells to treat refractory cutaneous ulcers. *Am J Transl Res* 2021;13:9495-9504.
12. Nagase T, Ueno K, Mizoguchi T, et al. Allogenic fibroblast sheets accelerate cutaneous wound healing equivalent to autologous fibroblast sheets in mice. *Am J Transl Res* 2020;12:2652-2663.
13. Yamamoto N, Ueno K, Yanagihara M, et al. Allogenic multilayered fibroblast sheets promote anastomotic site healing in a rat model of esophageal reconstruction. *Am J Transl Res* 2023;15:3217-3228.
14. Ueno K, Ike S, Yamamoto N, et al. Freezing of cell sheets using a 3D freezer produces high cell viability after thawing. *Biochem Biophys Reports* 2021;28:101169.
15. Verco SJ, Peers EM, Brown CB, Rodgers KE, Roda N, Zerega G, et al. Development of a novel glucose polymer solution (icodextrin) for adhesion prevention: pre-clinical studies. *Hum Reprod* 2000;15:1764-1772.
16. Sukho P, Boersema GSA, Cohen A, et al. Effects of adipose stem cell sheets on colon anastomotic leakage in an experimental model: proof of principle. *Biomaterials* 2017;140:69-78.

17. Zeigler AC, Nelson AR, Chandrabhatla AS, Brazhkina O, Holmes JW, Saucerman JJ. Computational model predicts paracrine and intracellular drivers of fibroblast phenotype after myocardial infarction. *Matrix Biol* 2020;91-92:136-51.
18. Ike S, Ueno K, Yanagihara M, et al. Cryopreserved allogenic fibroblast sheets: development of a promising treatment for refractory skin ulcers. *Am J Transl Res* 2022;14:3879-3892.
19. Kassis ES, Kosinski AS, Ross P, Koppes KE, Donahue JM, Daniele VC. Predictors of anastomotic leak after esophagectomy: an analysis of the society of thoracic surgeons general thoracic database. *Ann Thorac Surg* 2013;96:1919-1926.
20. Renna MS, Grzeda MT, Bailey J, et al. Intraoperative bowel perfusion assessment methods and their effects on anastomotic leak rates: meta analysis. *Br J Surg* 2023;110:1131-1142.
21. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Canic MT. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008;16:585-601.
22. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Adv Wound Care* 2014;3:647-661.
23. Li JF, Duan HF, Wu CT, et al. HGF accelerates wound healing by promoting the dedifferentiation of epidermal cells through β 1-Integrin/ILK pathway. *Biomed Res Int* 2014;2013:470418.
24. Evans RA, Tian YC, Steadman R, Phillips AO. TGF- β 1 mediated fibroblast myofibroblast terminal differentiation the role of Smad proteins. *Exp Cell Res* 2003;282:90-100.

25. Runyan CE, Schnaper HW, Poncelet AC. Smad3 and PKCdelta mediate TGF-beta1 induced collagen I expression in human mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:413-422.
26. Losi P, Briganti E, Errico C, et al. Fibrin-based scaffold incorporating VEGF and bFGF loaded nanoparticles stimulates wound healing in diabetic mice. *Acta Biomater* 2013;9:7814-7821.
27. Dolivo DM, Larson SA, Dominko T. Fibroblast growth factor 2 as an antifibrotic: antagonism of myofibroblast differentiation and suppression of pro-fibrotic gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev* 2017;38:49-58.
28. Wu B, Tang X, Zhou Z, Ke H, Tang S, Ke R. RNA sequencing analysis of FGF2 responsive transcriptome in skin fibroblasts. *PeerJ* 2021;9:e10671.
29. Suto Y, Ueno K, Kurazumi H, et al. Wound-healing effects of frozen-thawed allogeneic fibroblast sheet transplantation and xenogeneic fibroblast cell sheet transplantation cultured on a new substrate. *Tissue Cell* 2025;95:102888.
30. Bonios M, Terrovitis J, Chang CY, et al. Myocardial substrate and route of administration determine acute cardiac retention and lung bio-distribution of cardiosphere derived cells. *J Nucl Cardiol* 2011;18:443-450.
31. 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* 2006;55:1704-1710.
32. Almadani YH, Vorstenbosch J, Davison PG, Murphy AM. Wound healing: a comprehensive review. *Semin Plast Surg* 2021;35:141-144.

33. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care* 2012;25:304-314.
34. Han G, Ceilley R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. *Adv Ther* 2017;34:599-610.
35. Kot M, Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Musiał-Wysocka A, Suda-Szczurek M, Majka M. The importance of HLA assessment in "Off-the-Shelf" allogeneic mesenchymal stem cells based-therapies. *Int J Mol Sci* 2019;20:5680.
36. Souza Neto Junior J de C, De Moura Estevão LR, Baratella-Evêncio L, et al. Mast cell concentration and skin wound contraction in rats treated with *Ximenia americana* L. *Acta Cir Bras* 2017;32:148-156.
37. Morgan RB, Shogan BD. The science of anastomotic healing. *Semin Colon Rectal Surg* 2022;33:100879.