

例 2 は 83 歳男性で、前立腺癌に対する根治的
前立腺摘除術後 7 年経過し、中等度の腹圧性
尿失禁を有し、術前前立腺癌臨床病期は
T1cN0M0 でその他の適応基準を満たした。

2. 治療手技 (図 1)

皮下脂肪吸引、ADRCs 分離、ADRCs の経
尿道的注入の過程は問題なく実施できた。



図 1. 経尿道的 ADRCs 傍尿道注入術

3. 治療結果

治療後 12 ヶ月経過観察後の治療結果を示
す。

3-1. 24 時間パッドテストによる一日の尿失 禁量 (図 2)

1 日の尿失禁量は症例 1 では平均 35gm か
ら 0gm と尿失禁が消失し、症例 2 では平均
44gm から 17gm へ改善した。

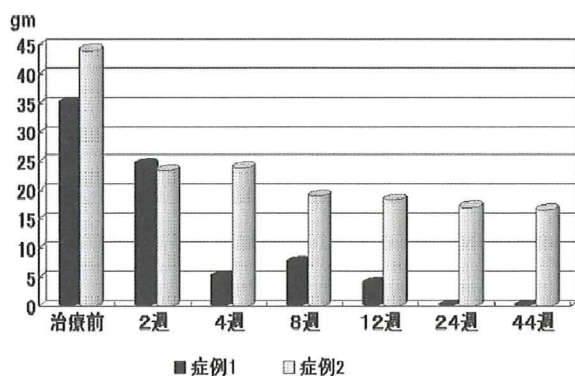


図 2. 1 日尿失禁量の推移

3-2. 症状・QOL 質問票評価 (図 3)

国際尿失禁症状・QOL 質問票による評価で
は、2 例とも尿失禁量、尿失禁頻度、QOL の
改善が得られた。

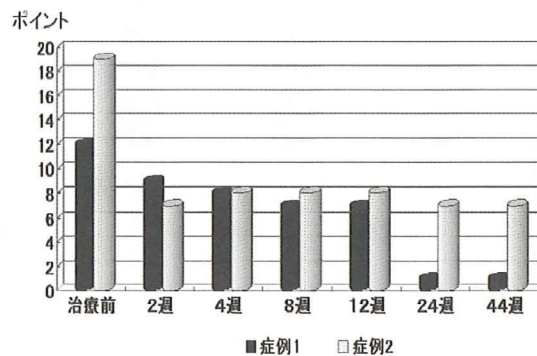


図 3. ICIQ-SF の経時的推移

3-3. 尿流動態検査による評価

尿道内圧測定では、2 例とも最大尿道閉鎖
圧の上昇 (症例 1: 28cmH₂O から 43cmH₂O、
症例 2: 21cmH₂O から 36cmH₂O) (図 4)、
機能的尿道長の増加 (症例 1: 14mm から
32mm、症例 2: 17mm から 27mm) (図 5)
がみられ、尿道抵抗の改善が他覚的に確認さ
れた。

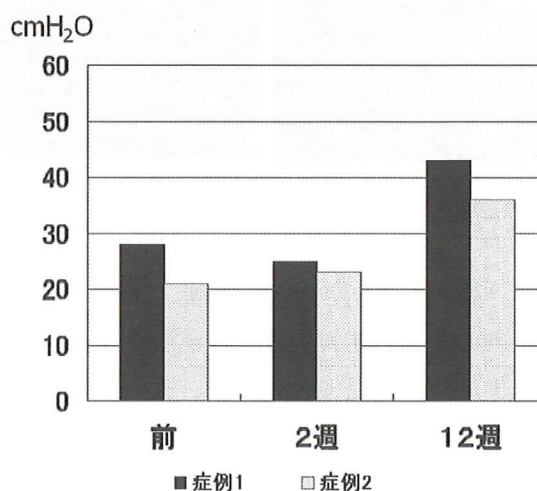


図 4. 最大尿道閉鎖圧の推移

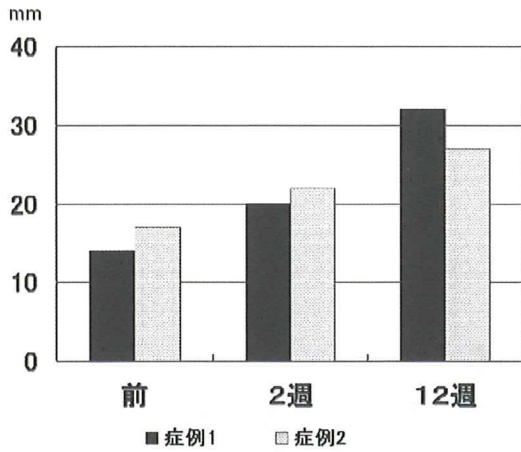


図5. 機能的尿道長の推移

3-4. 造影超音波検査による評価 (図6)

造影超音波検査による、ADRC 傍尿道注入部の血流評価においては、注入前に比べて注入翌日から血流の増加がみられ、注入後 56 日まで注入部の血流の経時的な増加がみられた。

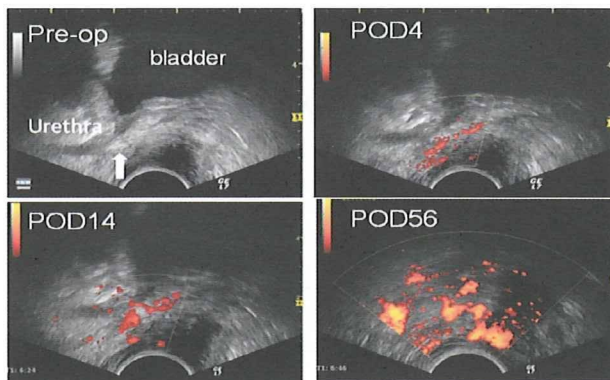


図6.ADRCs 注入部の血流の増加 (症例1)

3-5. MRI による注入部の評価 (図7)

尿道粘膜下に注入された自己脂肪組織は注入後 3 ヶ月の時点においても、吸収による消失はみられず持続して注入部に存在した。

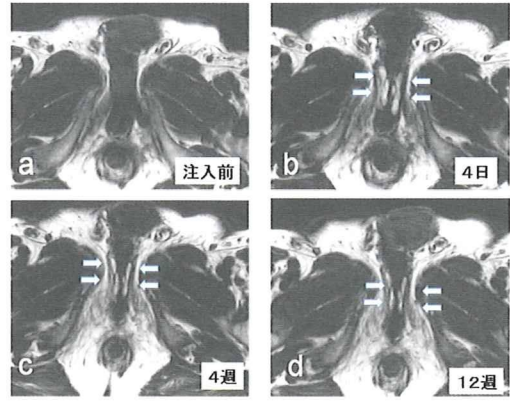


図7. 傍尿道注入された脂肪組織 (症例1)

3-6. 副作用の評価

皮下脂肪吸引後の皮下出血による皮膚色の変化が、2 例ともみられたが、1 ヶ月以内に自然消失した。その他には、注入術中、術直後、および術後 1 年の経過において、自覚症状、検査所見とも明らかな副作用を認めなかった。

D. 考察

今回施行した 2 例の根治的前立腺摘除術後の腹圧性尿失禁患者においては、ADRCs の傍尿道注入治療により尿失禁の改善がみられ、特に 1 例では尿失禁が消失した。また、他覚検査により、尿道抵抗の増大、尿道粘膜下に注入した脂肪組織の長期残存が示された。括約筋機能障害による腹圧性尿失禁患者に対する、今回の ADRCs 傍尿道注入は、括約筋機能の改善により腹圧性尿失禁を改善することが示された。我々の大動物 (豚)、小動物 (ラット) における ADRCs を用いた基礎的検討において、ADRCs の傍尿道注入による尿道抵抗増加による尿漏出圧の増加 (括約筋機能の増大)、注入された ADRCs の平滑筋の平滑筋への変化、ADRCs からのサイトカインの産生 (HGF、VEGF) を確認していることから、本治療の有効性の機序として、(1) 尿道粘膜下に脂肪組織と ADRCs の混合液注入による bulking 効果による尿道抵抗の増大、お

よび ADRCs の作用による注入脂肪組織の長期生着、(2) 注入された ADRCs の平滑筋への変化、(3) 注入された ADRCs より産生されたサイトカインによる血流増加、その他の作用による括約筋機能の改善、を考えている。今回施行した 2 症例とも、尿失禁の改善が経時的に進み、特に尿失禁消失例では尿失禁改善が漸次改善し、24 週 (6 ヶ月) で消失したこと、造影超音波検査により、経時的な注入部での著明な血流増加がみられたことから、尿道括約筋機能の改善は、単に脂肪組織注入による bulking 効果のみでなく、再生機序が強く関与しているものと考えられる。

本研究における皮下脂肪組織の採取は、脂肪吸引という形成外科では標準的で低侵襲の方法により行うことができ、さらに脂肪組織からの ADRCs 採取は、分離装置を用いることにより、培養工程を必要とせず、短時間で安全に行うことができ、さらに一連の治療手技過程において、皮下脂肪採取、ADRCs の採取、採取した ADRCs の経尿道的傍尿道注入を行うことができる。以上より、自己 ADRCs の傍尿道注入治療は腹圧性尿失禁に対する新規非侵襲性外科的治療として、安全性が高く、有用な臨床再生療法であり、医学的意義が高いと考えられる。前立腺手術後の腹圧性尿失禁は、女性における腹圧性尿失禁に比べて非常に難治性であり、今回の 2 例で有効性が得られたことから考えると、女性腹圧性尿失禁に対する有効性が示唆される。さらに、超高齢化社会に突入し、生活の質の向上が問われる日本社会においては、まさに QOL 疾患である尿失禁に対する治療開発は、極めて重要かつ喫緊の課題であり、世界に先駆けた新規治療の開発を行う必要があるが、本研究は、腹圧性尿失禁に対する、低侵襲で、有効性の高い新規治療法の開発を行うものであり、本疾患の罹患率が非常に高く、また今後さらなる増加が推定されること、また本疾

患が QOL を著しく阻害することから、本研究での新規治療法の開発は医学的意義のみならず社会的意義も高いものと考えられる。

E. 結論

非培養自己脂肪組織由来間葉系前駆細胞の傍尿道注入治療は、尿道括約筋障害による腹圧性尿失禁に対して、有効な再生治療であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamamoto T, Gotoh M, Hattori R, Toriyama K, Kamei Y, Iwaguro H, Matsukawa Y, Funahashi Y: Periurethral injection of autologous adipose-derived stem cells for the treatment of stress urinary incontinence in patients undergoing radical prostatectomy: Report of two initial cases. *Int J Urol*, 17:75-82, 2010

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

脂肪組織由来間葉系幹細胞を含有する、勃起不全または尿意障害の細胞製剤

山本徳則、後藤百万 特許願人 名古屋大学

出願日：平成 21 年 10 月 6 日 (特願 2009-232068)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

研究分担報告書

高齢者腹圧性尿失禁に対する新規治療法の開発：

脂肪由来幹細胞の平滑筋への分化と安全性の検討

研究分担者 山本徳則 名古屋大学大学院医学系研究科泌尿器科 講師

研究要旨

これまでの基礎研究データを基に、2009年1月23日より前立腺癌術後難治性腹圧性尿失禁症例に対して脂肪幹細胞分離装置を用いて、自己吸引脂肪組織由来幹細胞治療を開始した。5例に行い、そのうちの2症例の短期間経過を論文発表した。この治療のメカニズムについては、注入細胞の1) bulking 効果 2) 平滑筋分化再生を介した尿道閉鎖圧上昇とサイトカイン再生による局所血流の増加による尿道括約筋機能改善。尿失禁改善そのなかでの重要なメカニズムの一つである脂肪由来幹細胞の平滑筋への分化について *in vivo*, *in vitro* でラット、豚そしてヒトでの検討を行ったので報告する。

A. 研究目的

これまでに行ってきた基礎研究データを基に、2009年1月23日より前立腺癌術後の腹圧性尿失禁症例に対して、幹細胞分離装置を用いた臨床自己脂肪組織由来幹細胞治療（非培養法）を開始した。今回の治療の最も重要なメカニズムの一つの平滑筋への分化について検討した。

B. 研究方法

【実験1】

細胞分離装置で抽出した脂肪由来幹細胞/間質細胞（ADRCs）の細胞特性
前回は、自己吸引脂肪から抽出した ADRCs の生細胞についての割合を検討した。今回は FACS での間葉系幹細胞の確認と誘導培地での分化能について検討した。

【実験2】

ヌードラット傍尿道周囲に Green ラット脂肪由来幹細胞を注入し、移植した細胞がどの程度平滑筋細胞に分化するか 28 日目での病理

組織を検討した。

【実験3】

ADRCs 注入傍尿道周囲組織を平滑筋抗体で染色して、未熟から成熟した平滑筋細胞が染色される smooth muscle actin (α SMA)、未熟から中等度成熟した平滑筋細胞が染色される calponin type 1(CP), そして成熟した平滑筋細胞が染色される myosin heavy chain (MHC) で比較検討した。

【実験4】

大動物として豚を対象に臨床と同様自己吸引脂肪を細胞分離装置で ADRCs を抽出し、傍尿道周囲に注入した。細胞注入 28 日後に α SMA, CP, そして MHC 染色し比較検討した。また、全臓器摘出病理組織での安全性の検討を行った。

（倫理面への配慮）

自己脂肪組織由来幹細胞を利用した腹圧性尿失禁治療の有用性に関する研究で名古屋大

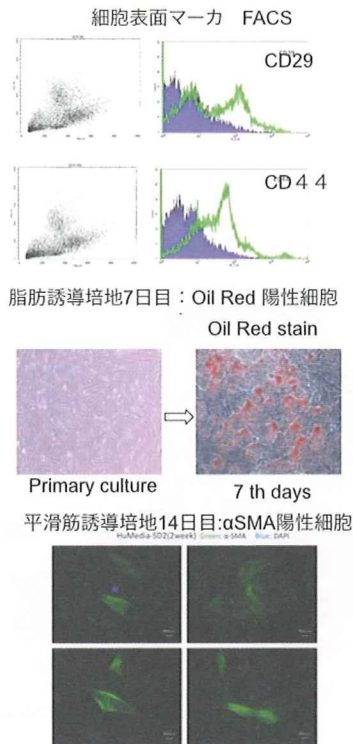
学倫理委員会承認を得ており、ヒト幹細胞指針の審査にすでに申請している。

C. 研究結果

【実験 1】

実際、臨床症例で抽出し、治療に使用した細胞を FACS で解析した細胞表面マーカーは、間葉系幹細胞の CD29 と CD44 が共に陽性であった。また、その細胞を脂肪誘導培地と平滑筋誘導培地で、それぞれ Oil Red で染色される脂肪細胞と αSMA 染色される平滑筋細胞に分化した。

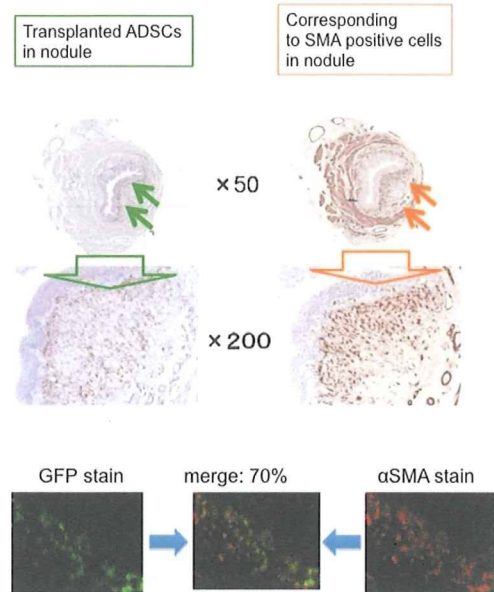
よって、細胞分離装置抽出した細胞は ADRCs の特徴を有していることを確認した。



【実験 2】

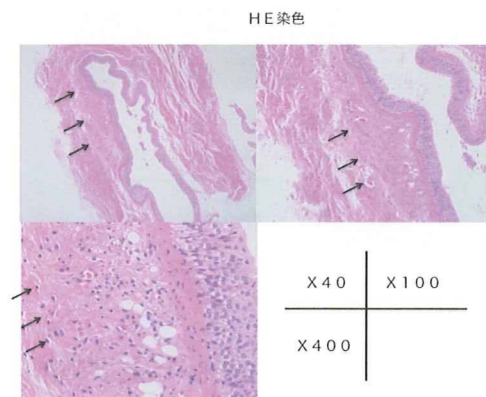
ヌードラット傍尿道周囲の細胞注入隆起部に Green rat の ADRCs 塊を認める。同部位に αSMA 陽性細胞塊を認め、約 70% がマージすることを確認した。注入した ADRCs の約 70% が平滑筋由来細胞に分化することを明らかにした。

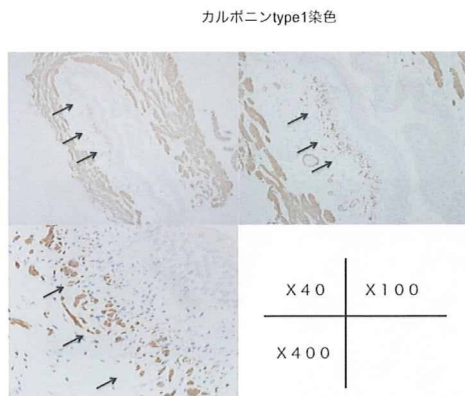
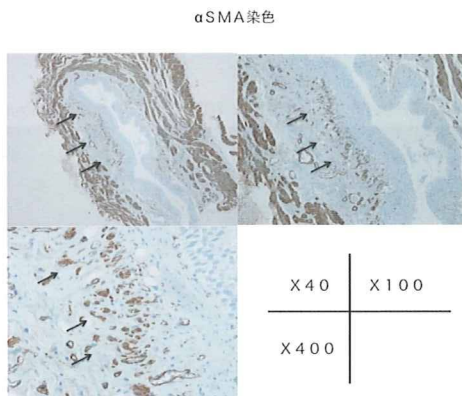
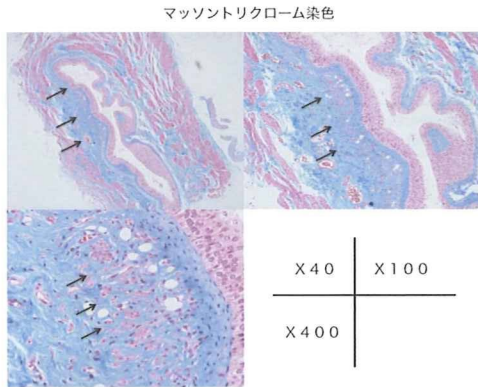
Green Rat ADSCs の nude rat への注入



【実験 3】

傍尿道周囲への ADRCs 注入部位が隆起し、マッソン・トリクローム(MC)で筋肉構造として染色された。さらに αSMA と CP で 2 種類以上の平滑筋抗体で染色されが、MHC では染色されなかった。





【実験 4】

開創直視下自己脂肪組織由来/間質細胞傍尿道周囲注入手術

手術時間：55分 出血量：10ml以下

細胞分離時間：70分

手術記録

術者：山本徳則（泌尿器科専門医）

介助：鳥山和宏（形成外科専門医、指導医）

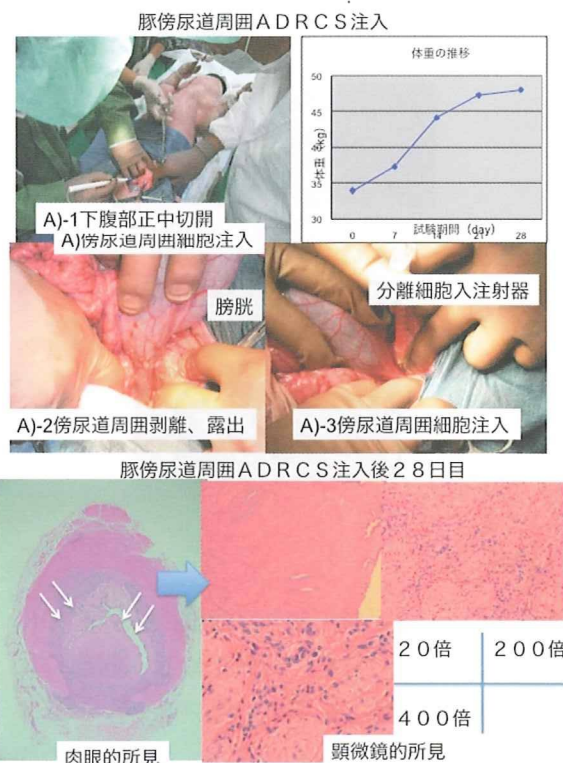
全身麻酔下に仰臥位をとる。臨床で行うと同

様の手技で皮下にボスミン含有生理食塩水（100ml）注入し 18G の皮下脂肪吸引管にて 100g 自己脂肪組織を吸引する。この組織を細胞分離装置で脂肪組織由来/間質細胞を抽出する（5ml 溶液となる）。同時に下腹部正中切開にて骨盤腔内に入り膀胱頸部を剥離、露出する。

膀胱頸部尿道から遠位に向かい約数 cm 傍尿道周囲に細胞含有液を数回に分けて注入する。出血なきことを確認し、皮下（吸収糸；バイクル 3-0）皮膚（非吸収糸；絹糸 1-0）で縫合し、手術を終了する。

術後経過

手術後同日から自尿あり、完全尿閉の合併症ないことを確認した。その後も順調に自尿あり導尿処置の必要性はなかった。術後の全身状態も良好で体重の推移は 28 日間に 33.9 から 48.9 kg で 14.1kg 増加していた。



細胞注入後 28 日

血液データ

貧血、低栄養状態、炎症の末梢血、生化学データ異常を認めなかった。

摘出臓器所見

肉眼的所見

皮膚、筋肉：腫瘍、炎症、循環障害なし

脳：髄液の色調異常なく、脳表面、割面に腫瘍、炎症、循環障害なし

胸腔：肺；胸水、癒着、腫瘍、炎症、無し出血、うっ血無し；心臓；心のう液正常、心膜癒着無し、心外膜出血無し

腹腔：腹水、癒着無し、腫瘍、炎症、循環障害なし

消化管、肝胆膵、脾臓 腫瘍、炎症、循環障害なし

後腹膜臓器（腎、尿管、膀胱、前立腺、精嚢）、陰茎：異常なし

傍尿道周囲 ADRCs 注入部位病理組織

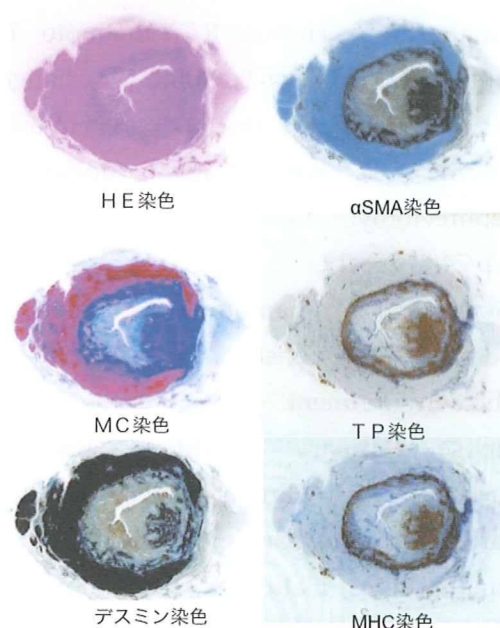
注入部は隆起し（HE 染色）、筋肉構造が MC 染色とデスミン染色の 2 つの抗体で染色された。また平滑筋構造が α SMA、CP、MHC 3 種類の抗体で共に染色された。

豚ではラットで染色されなかった MHC でも染色され成熟した平滑筋細胞であることを示した。

D. 考察

傍尿道周囲に注入した ADRCs の約 70% は平滑筋に分化する可能性を有していた。ラットにおいては細胞注入後 28 日で成熟しきっていない平滑筋細胞への分化であったが、豚では成熟した平滑筋細胞へ分化していることが明らかになり大動物での安全性の確認と再生の違いを認め臨床における腹圧性尿失禁改善のメカニズムを詳細に検討した。

豚傍尿道周囲 ADRCs 注入後 28 日



E. 結論

今回、前立腺癌術後の腹圧性尿失禁に対する脂肪由来幹細胞の有用性について論文発表し、その中でも重要なメカニズムである脂肪由来幹細胞の平滑筋への分化と安全性について小動物、大動物を対象に検討した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto T, Gotoh M, Hattori R, Toriyama K, Kamei Y, Iwaguro H, Matsukawa Y, Funahashi Y Peri-urethral Injection of Autologous Adipose-derived Stem Cells for Treatment of Stress Urinary Incontinence in Patients Undergoing Radical Prostatectomy: Report of Initial Two Cases. *Int J Urol.* 17:75-82, 2010.
- 2) Imamura T, Ishizuka O, Yamamoto T, Gotoh M, Nishizawa O. Bone Marrow-Derived Cells Implanted into Freeze-injured Urinary Bladders Reconstruct Functional Smooth Muscle

- Layers LUTUS 2010 in press
- 3) Funahashi Y, Hattori R, Yamamoto T, Kamihira O, Moriya Y, Gotoh M. Change in contralateral renal parenchymal volume 1 week after unilateral nephrectomy. Urology. 2009 Sep;74(3):708-12.
 - 4) Imamura T, Yamamoto T, Ishizuka O, Gotoh M, Nishizawa O: The Microenvironment of Freeze-injured Mouse Urinary Bladders Enables Successful Tissue Engineering Tissue Eng Part A. 2009 Nov;15(11):3367-75.
 - 5) Funahashi Y, Hattori R, Yamamoto T, Mizutani K, Yoshino Y, Matsukawa Y, Sassa N, Okumura K, Gotoh M. Ewing's sarcoma / primitive neuroectodermal tumor of the kidney. Aktuelle Urol. 2009 Aug;40(4):247-9. Epub 2009 Mar 17.
 - 6) Sassa N, Hattori R, Yamamoto T, Katoh M, Komastu T, Matstukawa T, Funahashi Y Direct visualization of renal hemodynamics affected by carbon-dioxide induced pneumoperitoneum Urology. 73: 311-5, 2009.
2. 学会発表
 - 1) Yamamoto T, Toriyama I, Waguro H, Funahashi Y, Hattori R, Gotoh M First Patient Treated in Adipose Stem & Regenerative Cell Study for Stress Urinary Incontinence Workshop IFAT2009
 - 2) 山本徳則、後藤百万 自己皮下脂肪からの脂肪由来幹細胞を用いた前立腺全摘後難治性尿失禁の治療経験 第一回臨床再生キックオフミーティング講演会 獨協医科大学 2010
 - 3) 山本徳則、鳥山和宏、亀井譲、丸山彰一、岩畔英樹、岩崎豊、舟橋康人、服部良平、後藤百万難治性泌尿器科臨床疾患を対象とした臓器機能回復を目的とした自己脂肪組織由来幹細胞/間質細胞移植治療経験：(吸引皮下脂肪組織から細胞分離装置を用いた臨床的検討) 間葉系幹細胞治療ワークショップ 再生医療学会2010
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願
 - 1) 脂肪組織由来間葉系幹細胞を含有する、前立腺癌治療用細胞製剤 発明者 山本徳則、小出直史、後藤百万、武井佳史 特許願人 名古屋大学 出願日平成 21 年 12 月 7 日 (特願 2009-277437)
 - 2) 脂肪組織由来間葉系幹細胞を含有する、勃起不全または尿意障害の細胞製剤 発明者 山本徳則、後藤百万 特許願人 名古屋大学 出願日平成 21 年 10 月 6 日 (特願 2009-232068)
 2. 実用新案登録

なし
 3. その他

なし

研究要旨

腹圧性尿失禁に対しては骨盤底筋体操などの理学療法が初期治療として行われるが、一般に中等症以上には無効であるとされている。中等度以上の女性腹圧性尿失禁に対する治療としては、TVT（Tension-free Vaginal Tape）手術が優れた治療とされているが、高齢患者では侵襲が大きい。尿道壁内牛組織由来コラーゲン注入療法は注入後吸収されてしまう問題があり、1～3ヶ月以内に再発する可能性が高い。男性の腹圧性尿失禁は、前立腺肥大症、前立腺癌の手術後に起こる括約筋障害がその主な原因で起こり、現在有効な治療法が確立していない。ヒト女性の腹圧性尿失禁患者に対して myoblast、fibroblast をそれぞれ筋層、粘膜下層に注入することにより高い治療効果があったとする報告があるが、治療手順が煩雑で、筋組織を採取する必要がある。また、最近この研究の手続きに問題があり、再検証が必要ではないかと考えられている。一方、名古屋大学医学部腎臓内科の岩島らは、脂肪組織を低血清培養することにより多分化を有する細胞の増幅が可能であると報告した。

昨年度の報告において、我々は ASC（adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell）を尿道壁内に注入することにより尿道内圧が上昇することを示した。その理由の一つとして注入した ASC が平滑筋に分化する可能性があることをあげたが、今回、注入細胞の残存、平滑筋分化について追加実験を行った。

A. 研究目的

昨年度までの研究で、ラット皮下脂肪由来の低血清培養間葉系細胞（rLASC: rat low serum cultured adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell）を尿道周囲に注入し、尿失禁発生時膀胱内圧（LPP: Leak Point Pressure）を測定した結果、GAX-collagen と同等もしくはそれ以上の効果が期待できると報告した（図 1）。その理由として、bulking effect とともに、注入された細胞から分泌される HGF などが何らかの形で尿道平滑筋の収縮能増強に関与しているという考察を行った。そこで今回は、注入した細胞が残存しているかどうか、平滑筋に分化しているかどうかについて再度検討した。

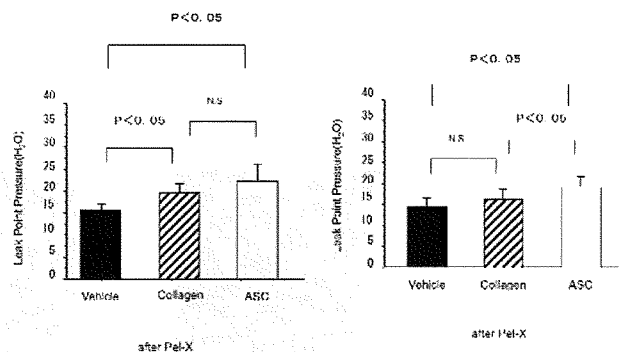


図 1. Vehicle・Collagen・ASC 尿道壁内注入後の尿失禁発生時膀胱内圧(LPP)

B. 研究方法

7 週 齢 雄 green fluorescent protein (GFP) transgenic rat のソケイ部皮下より採取した脂肪から SVF (Stromal Vascular Fraction) を抽出し、さらに低血清培養で間葉系間質細胞 (rLASC: rat low serum cultured adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell) を調整した。GFP (Green Fluorescence Protein) - rLASC を調製し、各々 3×10^6 個ずつを 7 週 齢 雌 ノードラットの尿道周囲に注入し、4 週 後に組織を抗 GFP 抗体 α SMA 抗体で染色して評価した。

(倫理面への配慮)

細胞移植時の麻酔は、ジエチルエーテルの吸入麻酔で導入し、維持麻酔はペントバルビタールの筋注を用い、深麻酔下での処置を行

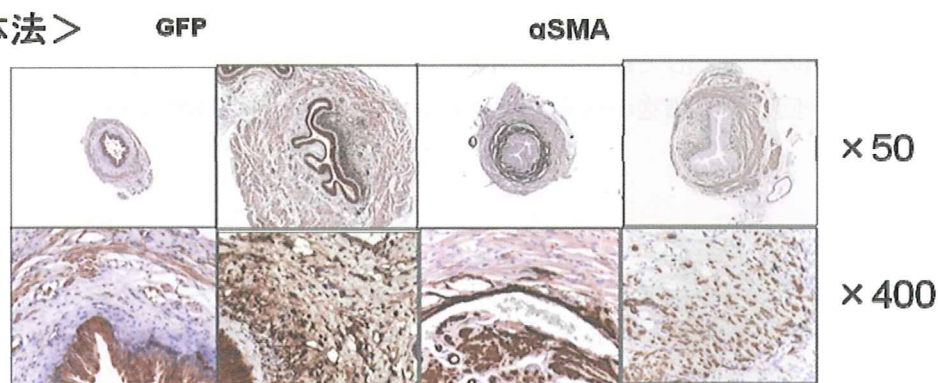
った。Sacrifice 時は、ジエチルエーテル吸入によると殺を行った。

C. 研究結果

図 2 に示すように、まず、酵素抗体法で抗 GFP 抗体染色を行ったところ、尿道壁内抗 GFP 抗体陽性細胞集塊を認めて、それによる尿道壁の尿道腔内への膨隆を認めた。同じ検体で α SMA 抗体染色を酵素抗体法で行ったところ、同様の部位に α SMA 抗体陽性細胞の集塊を認め、やはりそれによると考えられる尿道壁の尿道腔内への膨隆を認めた。

次に別の検体を用いて、GFP 陽性細胞の確認できた切片で、蛍光抗体法で α SMA 抗体染色を行ったところ、いくつかの細胞で α SMA 抗体陽性であった。

< 酵素抗体法 >



< 蛍光抗体法 >

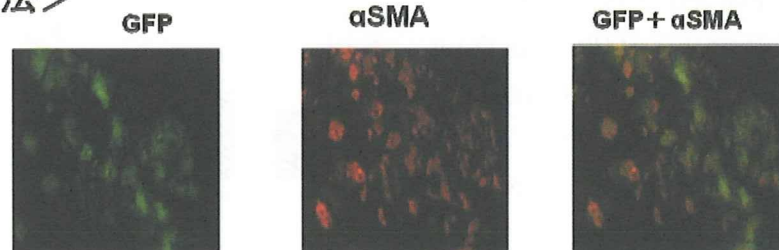


図 2.移植実験

D. 考察

前回までの報告で我々は、ASC を尿道壁内に注入することにより、Collagen に勝る尿道内圧上昇効果を期待できる理由として、① bulking effect と②HGF の関与、③注入した ASC が平滑筋細胞に分化した可能性を挙げてきた。今回の実験は、③の再現性を確認する目的で行ったが、結果としては、前回と同様の結果を得ることが出来た。また、蛍光抗体法の染色については、前回よりも細胞の輪郭がはっきりとした画像を供覧することが出来た。しかしながら、単独の抗体での染色で分化と断じるのは危険であり、今後は他の平滑筋染色を行い分化の有無を証明する必要があると考えた。

E. 結論

ASC を尿道壁内に注入することにより、Collagen にも勝る尿道内圧上昇効果が期待出来る要因の一つとして、注入した細胞が平滑筋に分化する可能性が、再度示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 渡辺達人、丸山彰一、松尾清一、山本徳則、後藤百万、ラット尿失禁モデルにおける低血清培養脂肪由来間葉系細胞を用いた治療実験、第7回日本再生医療学会総会 名古屋 平成20年3月13日～14日
- 2) 坂洋祐 丸山彰一、岩島重二郎、渡辺達人、安田香、尾崎武徳、湯澤由紀夫、松尾清一、脂肪由来間葉系細胞を用いた低血清培養法の検討、第7回日本再生医療学会総会 名古屋 平成20年3月13日～14日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有する細胞製剤

尾崎武徳、安田香、丸山彰一、山本徳則、後藤百万、松尾清一、北川泰雄

特許願人：名古屋大学

出願日：平成18年8月9日(特願2006-216234)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究要旨

本邦で 400 万人以上が罹患する腹圧性尿失禁は、尿道括約筋機能の障害により腹圧時に尿が漏れるものをいう。本疾患の治療では、理学療法が初期治療として行われるが、中等症以上には無効である。外科的治療としては、TVT（Tension-free Vaginal Tape）手術が女性腹圧性尿失禁に対して広く行われ、良好な成績が得られているが、患者に対する侵襲が大きい。尿道壁内牛組織由来コラーゲン注入療法が行われることがあるが、注入後数週間以内に吸収されるため 1~3 ヶ月以内に再発するといわれている。男性の腹圧性尿失禁は、前立腺肥大症、前立腺癌の手術後に起こる括約筋障害がその主な原因で起こり、現在有効な治療法が確立していない。ヒト女性の腹圧性尿失禁患者に対して myoblast を筋層に、fibroblast を粘膜下層に注入することにより、GAX-collagen よりもより高い治療効果があったとの報告があるが、この報告の治療法では、手順が煩雑で、筋組織を採取する侵襲があり、なおかつ、最近この研究の手続きに問題があり、再検証が必要ではないかと考えられている。また、名古屋大学医学部腎臓内科の岩島らは、脂肪組織を低血清培養することにより、多分化を有する細胞の増幅が可能であると報告している。

A. 研究目的

我々は、腹圧性尿失禁に対する細胞治療の開発を目的とし、前回までの研究で、ラット皮下脂肪由来の低血清培養間葉系細胞（rLASC: rat low serum cultured adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell）を尿道周囲に注入し、Leak Point Pressure LPP を測定した結果、GAX-collagen と同等もしくはそれ以上の効果が期待できると報告し、その理由として、bulking effect と、HGF などが分泌され、それが何らかの形で尿道平滑筋の収縮能増強に関与しているという考察を行った（図 1）。そこで今回は、細胞や collagen を注入することにより形成される膨

隆領域（Area of bulking mass）の面積を比較し、LPP との関連を検討した。

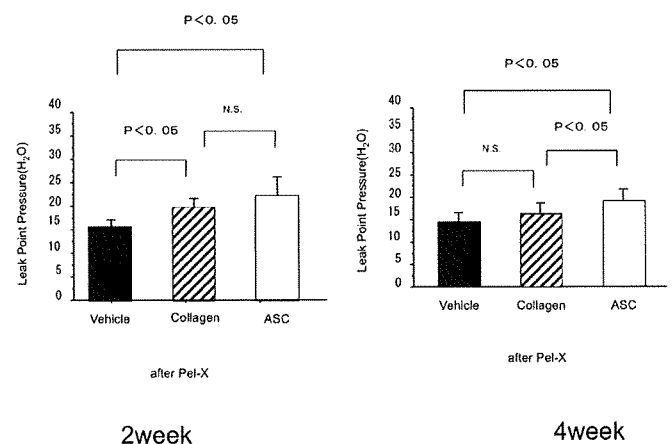


図 1. Vehicle・Collagen・ASC 尿道壁内注入後の尿失禁発生時膀胱内圧(LPP)

B. 研究方法

7週齢雄 F344 ラットのソケイ部皮下より採取した脂肪から SVF (Stromal Vascular Fraction) を抽出し、さらに低血清培養で間葉系間質細胞 (rLASC: rat low serum cultured adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell) を調整した。① 3×10^6 個の rLASC、および対照として、②GAX-collagen(牛由来)、③vehicle を各々 7 週齢雌 F344 ラットの尿道壁内に注入し、各群の 2 週、4 週後の注入部組織所見 (HE・MT 染色) を比較検討した。また、collagen 群と ASC 群については、 $n=3$ ずつで Day14・28 で collagen 群と ASC 群の計 4 群で尿道組織を連続切片にして、各々の組織で膨隆部位が最も広い切片で面積を MetaMorph 6.3 (Universal Imaging Co., West

Chester, PA) を用いて測定して Day28 の collagen 群の面積を 1 として他群との比を表した。

C. 研究結果

図 2 に示すように、2 週後の尿道周囲組織で、細胞注入群、collagen 群ともに尿道内腔に膨隆する領域を認めたが、4 週後には、collagen 群においてその吸収傾向が認められた。

図 3 に、Day14 と Day28 の collagen 群と ASC 群の Area of bulking mass の面積を示す。Day14 の collagen 群は $3.09 (SD \pm 2.35)$ 、ASC 群は $3.08 (SD \pm 1.93)$ 、Day28 の collagen 群は $2.60 (SD \pm 0.93)$ 、ASC 群は $1 (SD \pm 0.07)$ であり、有意差を認めたのは、Day28 の collagen 群と ASC 群の間のみであった。

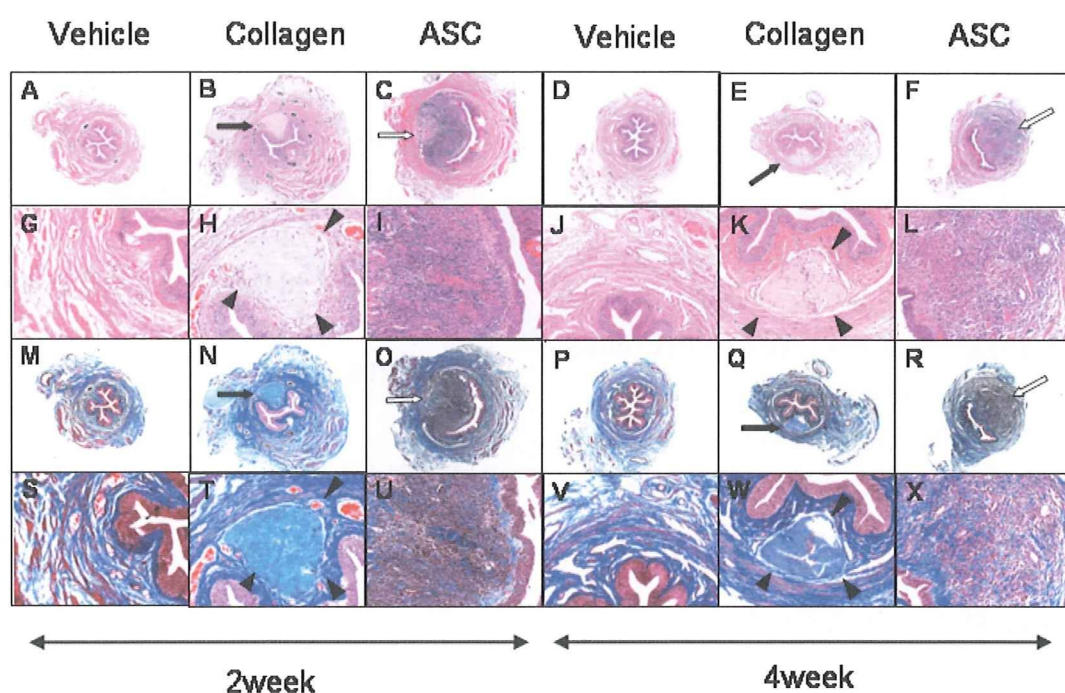


図 2. 注入後の組織学的所見

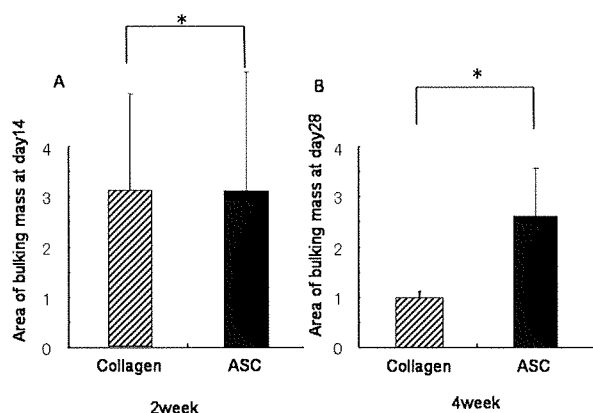


図3. 注入部位における残留容積

D. 考察

図1に示すように、前回の報告で我々はDay14においてはcollagen群とASC群の間に有意差は無く、Day28においてcollagen群よりもASC群のほうがLPPが有意に高値であり、ASCはcollagenよりもより長期に渡り残存することが示された。

図2において、collagen群ではDay14に比べるとDay28のArea of bulking massは小さくなっているように見え、一方でASC群では、Day14とDay28でArea of bulking massにcollagen群ほどの変化は認められなかった。

図3では、Day14ではcollagen群とASC群では有意差を認めず、Day28ではcollagen群とASC群に有意差を認めた。

また、有意差は認めないものの、collagen群ではDay14に比べてDay28はかなりの低下率(67.5%)であり、ASC群ではDay14に比したDay28における低下率(15.9%)はcollagen群ほどではなかった。

以上の結果から、ASCはcollagenよりもより長期に渡り残存し、残存することにより尿道内圧上昇効果を示すであろうことが、Area of bulking massの面積を測定することにより再確認できた。

E. 結論

ASCを尿道壁内に注入することにより、bulkingによる尿道閉鎖圧上昇効果はCollagenに勝るものであることを確認できた。

これは、細胞治療により、例えば尿道括約筋やその支配神経の障害があっても尿道内圧を上昇させる可能性を示すもと考える。障害モデルで実験を行うことにより、筋力増強作用・筋分化が加われば、さらなる尿道内圧上昇効果が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有する細胞製剤

尾崎武徳、安田香、丸山彰一、山本徳則、後藤百万、松尾清一、北川泰雄

特許願人：名古屋大学

出願日：平成18年8月9日(特願2006-216234)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究要旨

私たちは、開腹手術時に摘出した腹直筋あるいは錐体筋より、ヒト筋幹細胞を分離し、再現性よく培養下で増幅させることに成功した。細胞培養液には、多くの動物由来物質が含まれている。臨床試験に必要とされる安全性を担保するために、培養液の成分、特に成長因子および血清の代替あるいは低減を検討した。初代培養細胞を用いた解析で問題となる個体差および細胞老化の影響を排除するため、不死化ヒト筋細胞クローン KD3 を独自に樹立し、解析した。その結果、ウシ胎児血清の低減は増殖の低下をもたらしたが、グルココルチコイドによって、部分的に増殖が回復する傾向が示された。

A. 研究目的

自己骨格筋幹細胞を標的とした腹圧性尿失禁に対する新規治療法を開発するため、ヒト骨格筋から筋幹細胞を分離・培養する条件を確立する。本分担研究は、「(1) 自己骨格筋細胞移植による再生治療開発のための細胞供給源の確保」、および「(2) 内在性筋細胞の増殖・肥大による治療法を開発するためのスクリーニング系の確立」に欠くことのできない技術基盤を提供する。平成 21 年度は、培養液に含まれるウシ胎児血清および成長因子の低減および代替法を検討した。

B. 研究方法

筋生検

国立長寿医療センター倫理委員会の承認を得た手順に従って、事前に同意を得た患者を対象者とした。平成 21 年 3 月から平成 21 年 12 月に、8 件の筋生検を実施した。被験者の年齢は 60 歳から 86 歳で、内訳は男性 7 名女性 1 名であった。開腹手術時に、開腹部位の腹直筋あるいは錐体筋を約 1g 摘出し、直ちに氷冷した。筋組織は、湿重量を測定した後、

各検討目的毎に裁断し、摘出後 2 時間以内に凍結保存あるいは実験に供した。

ヒト筋組織からの細胞分離

全ての操作は、滅菌した器具および試薬を用い、クリーンベンチ内で無菌的に行った。摘出後 2 時間以内の筋組織 100-500 mg を滅菌したダルベッコ・リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄した後、余分な脂肪組織などをできるだけ丁寧にピンセットで除去した。筋組織 20-40mg を眼科用ハサミでできるだけ細かく裁断した後、組み替え酵素 TrypLE Express 10 ml を加え、37℃で 15 分間消化した。その間、5 分ごとに手で 30 秒間混和した。毎分 200-300 回転で 2 分間遠心し、上清を新しい 50-ml チューブに移し、ウシ胎児血清 (FBS) を 2 ml 加えた。同様の消化操作をもう一度繰り返し、約 24 ml の上清を得た。これを 40 μ m のナイロン・メッシュに通して筋繊維由来の残渣を除いた後、その 1/10 (筋組織 15-30 mg に相当する) を、直径 100 mm の I 型コラーゲン・コート培養ディッシュ (c-1 シャーレ、スミロン) に播種した。

細胞培養

細胞培養液としては Primary Myocyte Growth Medium (pmGM、Wada et al., 2002) を用いた。また、気相は、「二酸化炭素：空気 = 1：9」とし、培養温度は 36.6-36.8℃を保ち、37℃を越えることがないように設定した。

ヒト筋細胞の不活化

単一細胞に由来する初代培養筋細胞クローン Hu5 (本研究以前に申請者が分離し、標準ヒト筋細胞として用いている初代培養細胞) (Wada et al., 2002 ; Hashimoto et al., 2006) に、レンチおよびレトロウイルスベクターを用いて、ヒト telomerase 遺伝子、変異型ヒト CDK4 遺伝子 (CDK4R24C)、およびヒト Cyclin D1 遺伝子を導入し発現させ、不活化した。
(倫理面への配慮)

動物およびヒト材料を用いた実験に関しては、国立長寿医療センターの動物実験倫理委員会の承認を得、規定にしたがって実施した。ヒトからの筋生検に関しては、国立長寿医療センター倫理委員会の承認を受けた上で、説明と同意に関する所定の手続きを行い、注意深く実施した。

C. 研究結果

不活化ヒト筋細胞クローンの樹立

初代培養ヒト筋細胞を用いて増殖に必要な因子、条件を解析する場合、成長因子に対する感受性の個人差および細胞老化などが原因となって、再現性ある結果を得ることは、たいへん難しい。したがって、まず不活化ヒト筋細胞株を用いて培養条件を検討した後、初代培養筋細胞への適用を検討することが望まれる。そこで、私たちは独自に不活化ヒト筋前駆細胞を樹立した。得られたクローン KD3 は、初代培養ヒト筋細胞に近い増殖速度 (倍加間は、23.0 時間) を示し、かつ、高い筋分化能を保持していた (図 1)。

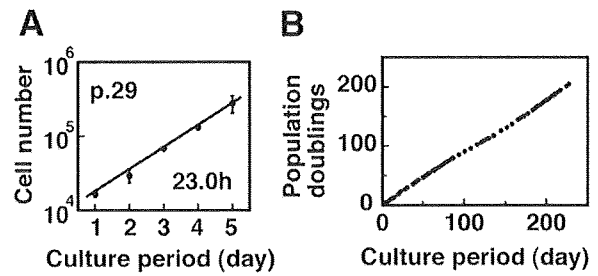


図1 不活化ヒト筋細胞クローン KD1 の増殖特性
A: 倍加時間は、23.0 時間と短い
B: 無限に増殖を続けることができる

ウシ胎児血清の低減およびグルココルチコイドによる回復

再生医療のための細胞培養におけるウシ胎児血清の使用については、安全性を担保するための基準を確立しなければならない。その前提として、ウシ胎児血清の使用をできるだけ低減することが必要である。ヒト筋細胞に関しては、標準となる細胞株が樹立されておらず、解析系が初代培養細胞しかないことが主な原因となって、研究が進んでいない。そこで、私たちは不活化ヒト筋前駆細胞クローン KD3 を用いて、ウシ胎児血清の低減による増殖への影響を検討した。

血清濃度を 20% から 2% の間で検討したところ、血清濃度の低下にともなって、KD3 細胞の増殖は低下した。この細胞増殖の低下を補う因子の候補として、グルココルチコイド (メチルプレドニゾロン、Mpdn) の作用を検討した。Mpdn は、ディシェンヌ型筋ジストロフィーの治療薬として用いられている合成ステロイドであるが、その作用機序は明らかになっていない。様々な濃度の血清と Mpdn を組み合わせて検討したところ、Mpdn は、5% あるいは 10% FBS を含む培地に添加すると、KD3 細胞の増殖を向上させることが示された。しかし、より低濃度および高濃度の血清存在下では、Mpdn の効果は認められなかった。また、Mpdn は、分化培地に添加すると、

筋分化に対して抑制効果を示した。

さらに、ウシ胎児血清成分の代替試薬として、ヒト ES 細胞の培養において血清代替添加物として用いられている KSR (Knockout Serum Replacement, Invitrogen) の効果を、初代培養ヒト筋細胞を用いて検討した。その結果、初代培養で得られた細胞数は、ウシ胎児血清を用いた場合の約 25% に留まった。ヒト筋細胞の培養には、ES 細胞とは異なる特有の培養条件を明らかにする必要があると考えられる。

培地添加用成長因子混合物の必要性に関する検討

増殖培地 pmGM には、ウシ胎児血清および市販の成長因子混合物 (Ultrosel G, Invitrogen) が添加されている。Ultrosel G は、ウシ下垂体抽出物などの成長因子を含む動物由来成分を含んでいる。それ故、Ultrosel G そのものを臨床試験に用いることはできない。そこで、まず Ultrosel G の必要性を詳細に検討した。初代培養ヒト筋細胞を、pmGM および pmGM から Ultrosel G を除き、20%FBS のみを添加した培地 (20%FBS) で培養した。培養 18 日後に得られた細胞数は、20%FBS は pmGM の約 2% に留まった (図 2)。

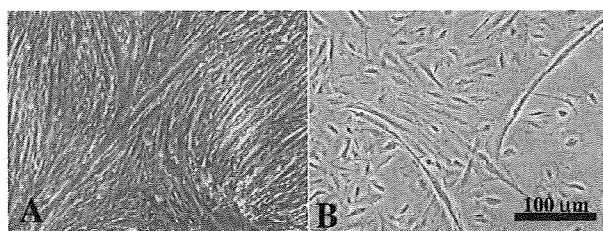


図 2 ヒト筋細胞の初代培養 (18 日目)

A: pmGM では細胞増殖が盛んで、自発的筋分化が誘導される

B: 20%FBS では、細胞増殖が著しく低下するものの、一部では自発的筋分化が誘導される

20%FBS 培地で得られた細胞は、老化細胞様の広がった形態を示し、増殖は著しく低下し

ていたが、細胞系譜マーカーから判断する限り、全て筋細胞であり、筋分化能力も保持していた。したがって、Ultrosel G を安全性の担保された試薬で代替することは、移植治療に必要な細胞数を確保するために必要であり、解決しなければならない優先度の高い課題であることが明確になった。

D. 考察

高齢者腹圧性尿失禁に対する自己筋幹細胞移植による再生医療を実現するためには、臨床試験に必要とされる移植細胞の安全性を担保することが必須である。そのためには、これまでの研究で確立した分離培養条件および因子の必要性と作用機序を地道に検証し、安全性の担保された試薬への代替、あるいは安全性を担保する基準の確立を図らねばならない。その中でも、培地成分の安全性の担保は、最も重要な課題である。ほとんどの初代培養細胞は、培養下での増殖維持にウシ胎児血清を必要としており、その代替は、これまでも大きな課題とされてきた。しかし、筋細胞を含む多くの初代培養細胞においては、無血清培養は実現できていないのが現状である。本研究においても、ヒト筋細胞の培養におけるウシ胎児血清の必要性が明確に示された。一部の再生医療研究では、ウシ胎児血清に替えて、患者本人の自己血清を用いる方法が検討されている。しかし、患者の自己血清を用いる場合には、量的な制限 (培養スケールを大きくできない)、増殖支持能力のバラツキ (個人・ロット差)、作業員に対する安全性の担保 (感染危険性の排除) など、たいへん解決の難しい課題の解決が必要になる。そのため、私たちは患者の自己血清ではなく、『安全性を担保された特定のウシ胎児血清』を用いることが、再生医療実現のための現実的方策であると考えている。そのためには、信頼度の高い安全性基準を確立することが重要であ

る。私たちは、ヒト筋幹細胞の臨床利用のために必要な「ウシ胎児血清の安全性評価指標」の確立をめざして検討を進める予定である。また、ウシ胎児血清の低減は、人獣感染症などの危険性を低減させると考えられる。その点を考慮すると、今回得られた「グルココルチコイド Mpdn が、ウシ胎児血清の低減によるヒト筋細胞の増殖低下を補う」という結果は、新たなアプローチの有効性を示唆している。ただし、私たちの実験結果の示している「Mpdn は、血清およびその他の成長因子によって惹起されるシグナル系に干渉することによってヒト筋細胞の増殖を昂進する」という可能性に十分留意する必要がある。すなわち、単なる加算効果あるいは代替作用以外の作用機構を念頭に、Mpdn の作用機序を解明しなければならない。

Ultrosel G によるヒト筋細胞の増殖促進効果は著しいため、移植用細胞数を確保するうえで、その代替法の開発はきわめて重要である。Ultrosel G は、様々な精製あるいは合成成長因子およびウシ下垂体抽出物などの成長因子を含む動物由来成分を含んでいるうえ、メーカーは内容物の正確な情報を公開していない。したがって、Ultrosel G の構成成分を、順次安全性の担保された試薬に置き換えていくということはきわめて難しい。私たちは、Ultrosel G の代わりに塩基性繊維芽細胞細胞成長因子 bFGF を添加した培地中で培養すると、ある程度培養筋細胞の増殖が回復するとの結果を得ている。しかし、これまでの検討では、Ultrosel G と同等の増殖支持効果を示す添加物およびその組み合わせは見出されていない。

これまでヒト筋細胞の性質を解析するには、初代培養細胞を使用するしか方法がなかったため、ヒト筋細胞の培養条件の検討には大きな制約があった。私たちが樹立した不死化ヒト筋細胞クローン KD3 は、きわめて高い増殖

能力と分化能力を合わせ持っており、これまでにない再現性を有する実験解析系を提供する。KD3 細胞を用いた解析は、課題解決（ブレークスルー）の端緒となることが期待できる。

E. 結論

臨床試験に必要とされる安全性を担保するために、培養用試薬、特に成長因子および血清の代替あるいは低減を検討した。個人差、細胞老化によって影響を受けるため、再現性に問題が生じやすい初代培養ヒト筋細胞の欠点を補うため、不死化ヒト筋細胞クローンを確立し、培養条件を検討した。その結果、ウシ胎児血清、成長因子混合物の完全な代替は困難であるが、グルココルチコイドによる部分的増殖促進によるウシ胎児血清の低減など、安全性を担保するための方向性を明らかにすることができた（図 3）。

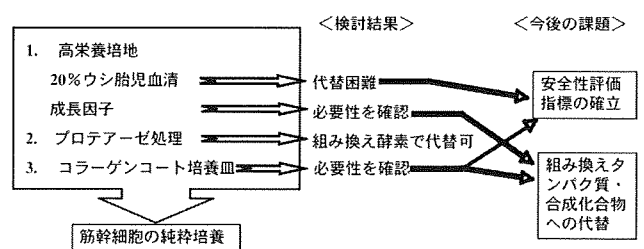


図3 ヒト筋細胞培養液成分の安全性を担保するための方策
代替困難な成分については、安全性評価の指標を確立することができる

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mukai, A., Kurisaki, T., Sato, A. B., Kobayashi, T., Kondoh, G. and Hashimoto N.: Dynamic clustering and dispersion of lipid rafts contribute to fusion competence of myogenic cells. *Exp.Cell Res.* **315**: 3052-3063, 2009.

2. 学会発表
 - 1) 向 敦史、栗崎知浩、橋本有弘：骨格筋細胞融合における脂質ラフトの役割 第42回日本発生生物学会、新潟、2009年5月28-31日
 - 2) Michiko Yanagisawa and Naohiro Hashimoto: Fibrodysplasia Ossificans Progressiva as a Candidate for Muscle Stem Cell Disease: A Synergistic Induction of Osteogenesis by Inflammatory Cytokine and mutated ALK2. 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9-12日
 - 3) Atsushi Mukai and Naohiro Hashimoto: Dynamic clustering and dispersion of lipid rafts contribute to fusion competence of myogenic cells. 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9-12日
 - 4) 塩見浩介、上住円、清野透、岡村菊夫、橋本有弘：CDK4/Cyclin D1/hTERTによって不死化されたヒト筋前駆細胞の増殖・分化特性 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9-12日
 - 5) Nobuyoshi Shimoda, Toshiaki Izawa, Yutaka Kikuchi and Naohiro Hashimoto: Zebrafish age with localized hypomethylation and extensive fragmentation of the genome. 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9-12日
 - 6) Michiko Yanagisawa and Naohiro Hashimoto: Fibrodysplasia Ossificans Progressiva as a Candidate for Muscle Stem Cell Disease: A Synergistic Induction of Osteogenesis by Inflammatory Cytokine and mutated ALK2. The Society for Muscle Biology and FASEB Conference “ Making Muscle in the Embryo and Adult”, New York , USA,

May 27-June 2, 2009.

- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

研究分担報告書

高齢者腹圧性尿失禁に対する括約筋機能再生治療：

移植用筋細胞の品質管理システムの開発と筋増殖・肥大因子のスクリーニング

研究分担者 上住（池本）円 国立長寿医療センター 細胞再生研究室長

研究要旨

昨年度、我々は高齢者の筋組織から分離後、培養によって増幅された筋細胞から、CD56 と骨・肝臓・腎臓型アルカリフォスファターゼ（BLK-ALP）を指標として、高い筋分化能力を保持した細胞を識別する評価方法を確立した。そこで、今年度は実際に高齢者の筋組織中での CD56 と BLK-ALP の発現を調べ、骨格筋幹細胞の増殖・分化能を反映するマーカーとしての機能的意義について検討した。

A. 研究目的

自己骨格筋幹細胞を用いた腹圧性尿失禁に対する括約筋機能再生治療を実現するためには、移植用筋細胞の性質を確認し、治療効果および安全性を担保するための『細胞品質管理システム』を確立することが必要である。本分担研究の目的は、筋細胞の増殖・分化能を反映するマーカーを用いて、(1) 細胞集団を評価し、移植に適した筋細胞であるか否かの判断基準を確立すること、また (2) フローサイトメーターを併用して、移植に適した細胞のみを、生きたまま分離する方法を確立することにある。本分担研究の成果は、内在性筋幹細胞の増殖・分化能力の維持あるいは亢進に関わるシグナル分子を探索するために有用な実験系を提供する。

B. 研究方法

ヒト筋凍結ブロックの作成

前立腺全摘出手術時に、開腹部位の腹直筋あるいは錐体筋を約 1 g 摘出し、直ちに氷冷された。筋組織 100-500 mg を小コルク片の上に垂直に立て、水で練ったトラガカントゴムで固定した。これを液体窒素中で十分冷却

したイソペンタン内で急速に凍結させた後、-80℃の冷凍庫で保存した。

ヒト筋凍結切片の免疫染色

クリオスタット内にて、凍結切片を作成し、CD56 抗体を用いた蛍光免疫染色に供した。筋切片を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、PBS で洗浄後、1%ロバ血清でブロッキングを行った。PBS で軽く洗浄後、抗ヒト CD56 抗体 (Miltenyi Biotec, 1 : 11) および基底膜の構成成分である laminin に対する抗体、または、骨格筋幹細胞のマーカーとして知られている Pax7 抗体を加え、4℃で一晩反応させた。翌日、PBS で洗浄後、蛍光標識された二次抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。洗浄後、DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) で核を染色し、封入した後、蛍光顕微鏡にて観察した。

アルカリフォスファターゼ活性染色

ヒト筋凍結切片を作成し、-20℃で 10 分間アセトン固定を行った。風乾した後、アゾ色素法により、アルカリフォスファターゼ活性の検出を行った。染色後、切片を軽く水洗し、