

201244002A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

構造並びに機能再生を目指す脂肪組織由来幹細胞治療の開発

(平成 24 - 実用化 - 国際 - 指定 - 002)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 後藤 百万

平成 25 (2013) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告書	1
構造並びに機能再生を目指す脂肪組織由来幹細胞治療の開発 後藤百万	
II. 分担研究報告	
1. 尿道括約筋機能障害による腹圧性尿失禁に対する傍尿道脂肪 組織由来間葉系前駆細胞注入治療の臨床的検討	19
後藤百万、舟橋康人	
2. 脂肪由来幹細胞における新規バイオマーカーとしての 脂肪結合蛋白(FABP)と品質評価法の標準化	29
山本徳則、高橋雅英、若林俊彦	
3. 組織欠損に対する脂肪由来幹細胞付加脂肪移植についての基礎的研究	65
亀井 譲	
4. 一側声帯麻痺モデルを用いた、非培養自己ヒト皮下脂肪組織由来間葉 系前駆細胞注入による神経損傷にもとづく組織変性の回復効果の研究	71
山本徳則、藤本保志、西尾直樹、須賀研治	
5. 腹圧性尿失禁に対する傍尿道脂肪由来注入細胞の基礎的評価	77
山本徳則	
6. 脂肪由来幹細胞の強皮症治療に関する研究について	83
松尾清一、丸山彰一、尾崎武徳	
7. 多施設共同臨床試験実施に向けての基盤整備 水野正明、安藤正明、加藤勝義、平川晃弘、清水忍	90
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	93
IV. 研究成果の刊行物・別刷	95

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
総括研究報告書

構造並びに機能再生を目指す脂肪組織由来幹細胞治療の開発

研究代表者 後藤百万 名古屋大学大学院医学系研究科泌尿器科学 教授

研究要旨

本事業では、体性幹細胞のひとつである脂肪組織由来幹細胞（ADSCs: adipose-derived stem cells）を用いて構造再生医療と機能再生医療のそれぞれを共通基盤に載せて開発することを目的とし、対象疾患として構造再生医療開発では「腹圧性尿失禁」を、機能再生医療開発では「強皮症」を取り上げ、5年以内の治験実施を目指す。平成24年度は、腹圧性尿失禁については臨床研究及び基礎的研究、強皮症については基礎的研究を行い、さらに多施設共同臨床試験実施に向けての基盤整備を行った。腹圧性尿失禁では、自己ADSCsの傍尿道注入による腹圧性尿失禁治療の先行臨床研究を実施し、有効性と安全性に関する中間解析を行い、有望な臨床成績と安全性を確認した。基礎的研究では、脂肪由来幹細胞における新規バイオマーカーとしての脂肪結合蛋白(FABP)と品質評価法の標準化、組織欠損に対するADSCs付加脂肪移植の検討、一側声帯麻痺モデルを用いた非培養ADSCs注入による神経損傷にもとづく組織変性の回復効果の検討、腹圧性尿失禁において傍尿道に注入するADSCs細胞特性の検討を行い、腹圧性尿失禁に対するADSCs注入及びADSCs付加脂肪注入治療において用いるADSCs細胞特性、作用メカニズム、安全性に関する基礎的・科学的根拠を確立した。強皮症については、培養ADSCs投与による臨床治療を前提として、低血清培養ADSCsの性状・性質解析を行うとともに、その安定的かつ安全な培養法についての検討を行い、本細胞治療法が難治性疾患に対する実用的な治療法になり得ることを確認した。多施設共同臨床試験実施に向けての基盤整備では、信頼性の高い臨床試験成績を創出するため、脂肪組織由来幹細胞を用いた腹圧性尿失禁と強皮症を対象に、ICH-GCPに基づいた臨床試験の支援体制、即ち、研究責任者及び研究分担者に加え、臨床試験を実施する上で必要な臨床試験支援スタッフ、すなわちプロジェクトマネージャー、企画立案担当、生物統計家、データマネージャー、薬事担当者等からなる Design Build-up Team (DBT) を構成し、次相の臨床試験計画を検討した。

研究代表者

後藤百万・名古屋大学大学院医学系研究科
泌尿器科学・教授

研究分担者

山本徳則・名古屋大学大学院医学系研究科
泌尿器科学・准教授

舟橋康人・名古屋大学大学院医学系研究科
泌尿器科学・助教

亀井 譲・名古屋大学大学院医学系研究科
形成外科学・教授

水野正明・名古屋大学先端医療・臨床研究
支援センター・教授

安藤昌彦・名古屋大学先端医療・臨床研究
支援センター・准教授

加藤勝義・名古屋大学先端医療・臨床研究
支援センター・講師

平川晃弘・名古屋大学先端医療・臨床研究
支援センター・講師

清水 忍・名古屋大学先端医療・臨床研究
支援センター・講師

松尾清一・名古屋大学大学院医学系研究科
腎臓内科学・教授

丸山彰一・名古屋大学大学院医学系研究科
腎臓内科学・准教授

尾崎武徳・名古屋大学医学部附属病院腎臓
内科・助教

若林俊彦・名古屋大学大学院医学系研究科
脳神経外科学・教授

高橋雅英・名古屋大学大学院医学系研究科
腫瘍病理学・教授

研究協力者

藤本保志 名古屋大学医学部附属病院
耳鼻咽喉科 講師

西尾直樹 名古屋大学医学部附属病院 耳
鼻咽喉科 助教

須賀研治 名古屋大学医学部附属病院 耳
鼻咽喉科 助教

A. 研究目的

再生医療には、骨、皮膚、角膜等、身体の一部を再生する「構造再生」と、がんや膠原病など現在では完治できない病的状態の正常化をはかる「機能再生」の2つがある。そして現在、世界は再生医療を、次代を担う重要な医療と位置づけ、その開発に鎬を削っている。海外ではすでに400件以上の臨床試験が行われており、特許やノウハウが固められつつある。そのソースの約7割が骨髄由来であることから、わが国が再生医療分野において世界を先導するには、iPS細胞による再生医療開発と並行して、骨髄以外の組織より抽出する幹細胞を活用した再生医療を、構造再生と機能再生の両分野において戦略的に確立することが喫緊の課題となっている。

そこで本事業では、体性幹細胞のひとつである脂肪組織由来幹細胞（ADSCs: adipose-derived stem cells）を用いて構造再生医療と機能再生医療のそれぞれを共通基盤に載せて開発する。対象疾患として構造再生医療開発では「腹圧性尿失禁」を、機能再生医療開発では「強皮症」をそれぞれ取り上げ、5年以内の治験実施を目指す。

腹圧性尿失禁は、尿道括約筋機能障害により腹圧時に尿が漏れるもので、女性では妊娠・出産・加齢などが、男性では前立腺癌に対する手術後遺症などがそれぞれ要因となっており、患者数はわが国だけで約500万人と推定されている。生活の質を著しく阻害

する疾患であるにもかかわらず、有効な治療法は開発されていない。そこで、自己皮下 ADSCs を用いた腹圧性尿失禁に対する新規治療を開発して先進医療、さらには治験の実施を目指す。この取り組みは名古屋大学が世界初となる。一方、強皮症は、皮膚や内臓が硬くなる（硬化する）ことを特徴とした疾患でわが国における患者数は1万人以上と推定されている。これらの患者では皮膚硬化が進行し、手足の皮膚に虚血性の潰瘍や壊疽を起こす。時に肺高血圧症、肺線維症、腎不全、嚥下困難などを合併し死亡することもある。この難治性疾患を治癒する機能再生医療はまだ確立されておらず、その取り組みは先駆的で独創性に富んでいる。

B. 研究方法

1. 腹圧性尿失禁治療

自己皮下脂肪由来幹細胞を用いた腹圧性尿失禁治療においては、自己皮下脂肪組織から脂肪由来幹細胞を培養操作を行うことなく採取し、経尿道的内視鏡下に尿道括約筋に注入する新規手技を開発した。具体的には、下半身麻酔科に、腹部あるいは臀部から皮下脂肪を脂肪吸引により採取し、採取した脂肪組織から脂肪組織由来幹細胞を含む間葉系前駆細胞（脂肪組織由来間葉系前駆細胞、adipose-derived regenerative cells: ADRCs）を Celution™ システム（米国、Cytosol社）を用いて分離・採取する。Celution™ システムは、体外培養操作

を必要とせず、脂肪組織から ADRCs（ADSCs を含む）を短時間に分離・採取することができるシステムである。採取した ADRCs を一部は経尿道的に外尿道括約筋に注入するとともに、別に ADRCs と脂肪組織を混合したもの（ADRCs 付加脂肪組織）を経尿道的に尿道括約筋部粘膜下に注入する。これらの治療は、一連の手技として、2時間から3時間以内に終了することができる。平成24年度は、本研究事業の初年度の研究として、後藤、舟橋が、自己 ADRCs の傍尿道注入による腹圧性尿失禁治療の先行臨床研究を実施し、平成23年4月にヒト幹臨床研究審査委員会に既報告の5症例、および平成24年4月以降に実施した8症例、計13症例について、有効性と安全性に関する中間成績を解析した。また、山本、高橋、若林は、脂肪由来幹細胞を用いた再生治療の臨床研究において、細胞の活性、および安全性・品質評価法において必要となるバイオマーカに関する基礎的研究を実施し、脂肪結合蛋白（FABP）のバイオマーカとしての可能性とその品質評価法の標準化を検討した。腹圧性尿失禁に対する ADRCs の傍尿道注入治療においては、前述のように、ADSCs の外尿道括約筋への注入と、ADSCs 付加脂肪組織の尿道括約筋部尿道粘膜下への注入を行う。これらの ADSCs 注入の効果および作用機序について基礎的検討を行い、亀井は、欠損組織への ADSCs 付加脂肪組織注入の効果マイクロブタでの顔面皮下

欠損モデルを用いて行い、山本、藤本、西尾、須賀は、ブタにおいて右反回神経を切断することで一側声帯麻痺モデルを作成し、ADSCs 注入による変化を検討した。さらに、山本は、傍尿道に注入する脂肪由来幹細胞の特性を基礎、臨床の *in vitro*, *in vivo* で検討し、継代培養細胞の平滑筋分化特性、サイトカイン分泌特性について検討を行った。

1-1. 尿道括約筋機能障害による腹圧性尿失禁に対する傍尿道脂肪組織由来間葉系前駆細胞注入治療の臨床的検討 (後藤、舟橋)

男性腹圧性尿失禁 12 例 (前立腺癌に対する根治的前立腺全摘除術後 10 例、前立腺肥大症に対する経尿道的レーザー前立腺核出術後 2 例)、女性腹圧性尿失禁 2 例の計 13 例に ADSCs の傍尿道注入治療を行い、有効性と安全性の検討を行った。有効性は、尿失禁改善効果については 24 時間尿失禁量定量テストによる他覚的評価、尿失禁自覚症状・QOL 質問票による自覚的評価を行い、また、尿流動態検査として尿道内圧測定を行い、最大尿道閉鎖圧、機能的尿道長を治療前、治療後 2 週間、1 か月、3 ヶ月、6 ヶ月、1 年で評価した。画像評価としては、MRI (矢状断像 脂肪強調画像) による、注入脂肪組織の経時的評価を行い、経膣または直腸的造影超音波検査により、注入部の血流変化を評価した。安全性評価として、術中・術後の有害事象、血液検査、また、分離 ADSCs の

無菌試験、分画、分離試験を行った。

1-2. 脂肪由来幹細胞における新規バイオマーカーとしての脂肪結合蛋白 (FABP) と品質評価法の標準化 (山本、高橋、若林)

1) ヒト脂肪由来幹細胞に関連する脂肪酸結合タンパク (FABP) の精製・機能解析、2) ヒト脂肪由来幹細胞に関連する脂肪酸結合タンパク (FABP) に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの取得、3) ヒト脂肪由来幹細胞に関連するヒト完全長脂肪酸結合タンパク (FABP) を用いた発現解析、4) ヒト脂肪由来幹細胞の分化誘導と特異性解析、5) 単離ヒト脂肪由来幹/前駆細胞の品質評価法の標準化検討を行った。

1-3. 組織欠損に対する脂肪由来幹細胞付加脂肪移植についての基礎的研究 (亀井)

大動物としてマイクロミニブタを対象に実験を行った。顔面皮下欠損を作成し、自己吸引脂肪から細胞分離装置 (Cellution™, Cytori therapeutics, USA) を用いて ADSCs を抽出し、脂肪と混和して欠損部に注入した。細胞注入 28 日後に組織を採取し Hematoxylin & Eosin、Masson Trichrome、Alcian Blue、Von Kossa 染色により評価を行った。また、全臓器摘出病理組織での安全性の検討を行った。

1-4. 一側声帯麻痺モデルを用いた、

非培養自己ヒト皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞注入による神経損傷にもとづく組織変性の回復効果の研究 (山本、藤本、西尾、須賀)

大動物としてブタを対象に、臨床と同様自己吸引脂肪を細胞分離装置で ADRCs を抽出し、一側反回神経を切断することによって、一側反回神経麻痺モデルを作成し、一側声帯筋内に注入した。細胞注入 28 日後に喉頭を摘出し、HE 染色を行い比較検討した。また、全臓器摘出病理組織での安全性の検討を行った。

1-5. 腹圧性尿失禁に対する傍尿道脂肪由来注入細胞の基礎的評価 (山本)

豚 ADRCs コロニーアッセイと α SMA 陽性細胞の検討のため、豚において臨床治療におけると同様に、自己吸引脂肪を細胞分離装置(Celution™)を用いて ADRCs を抽出し、2 継代培養を行い、培養細胞のコロニーカウントとその細胞の α smooth muscle(α SMA)染色で陽性細胞の割合を算出した。

ヒト ADRCs コロニーアッセイと α SMA 陽性細胞の検討のため、臨床研究でヒト吸引脂肪から分離した ADRCs について flow cytometry を行い、表面抗原を検討した。また、ADRCs の 2 継代培養を行い、培養細胞のコロニーカウントとその細胞の α SMA 染色で陽性細胞の割合を検討した。

筋原性の組織構造が構築されているかどうかを確認するため、ADRCs

注入傍尿道層周囲組織を平滑筋抗体で特性の高い myosin heavy chain (MHC)で染色した。

ヒト ADRCs 培養上清サイトカイン測定のため、臨床でヒト吸引脂肪から分離した ADRCs を低血清状態と低酸素状態で培養し、培養上清サイトカインを測定し検討した。

非培養ラット、豚 ADRCs 傍尿道周囲注入後 28 日の病理組織の検討において、ADRCs 注入傍尿道周囲組織をヘマトキシンエオシン染色(HE)、筋肉構造を染色するマッソン・トリクローム (MC)、デスミン (Desmin)、平滑筋構造を染色する α SMA、未熟から中等度成熟した平滑筋細胞を染色する calponin type 1(CP) で染色した。

2. 強皮症 (松尾、丸山、尾崎)

培養法の確立を目的として、従来の LASC (低血清培養脂肪由来幹細胞) 培地に使用していた試薬のうち、MilliQ 水、DMEM(粉末培地)、アスコルビン酸、basic-FGF についてそれぞれ注射用蒸留水 (医療用医薬品)、DMEM(液体培地・GMP)、アスコルビン酸注(医療用医薬品)、フィブラストスプレー (医療用医薬品) へ変更した培地を作成し、脂肪組織から従来の LASC と同等な細胞を採取できるかどうかの検討を行った。また実際の臨床現場では、増殖能が通常より劣る強皮症患者の自己脂肪使用を想定しているため、初代培養に限り培地中の血清濃度を 10%にあげて検討を行った。細胞の同等性については細胞増殖能、

HGF産生能で比較検討を行った。

安全投与量の検討においては、Wistarラットを対象に、LASCの致死量実験を行った。WistarラットのLASCをそれぞれ 5×10^7 (N=8), 7×10^7 (N=7), 1×10^8 (N=6), 5×10^8 (N=4)/kgの濃度で投与し、致死量を検討した。

腫瘍形成能については、In vitroの系として、軟寒天培地中での細胞増殖能について確認を行い、Positive controlとしてHeLa細胞を用いた。In vivoの系として、ヒトLASCをヌードラットの両腎皮膜下にそれぞれ 1×10^7 cells投与し、さらに 5×10^6 /bodyのヒトLASCを3回尾静脈から投与して6か月間の経過観察を行った。

3. 多施設共同臨床試験実施に向けての基盤整備(水野、安藤、加藤、平川、清水)

本研究事業は体性幹細胞のひとつである脂肪組織由来幹細胞を用いて構造再生医療と機能再生医療のそれぞれを共通基盤に載せて開発し、5年以内の治験実施を目的としている。本事業達成のために、多施設共同臨床研究実施に向けての基盤整備は、重要かつ必須な事項であるため、名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センターによりヘルシンキ宣言、薬事法及びICH-GCPに準拠するために制定された各種関連省令を参照し、支援体制の整備を行った。

(倫理面への配慮)

先行臨床試験研究については、ヘルシンキ宣言に則って行い、試験プロトコルは名古屋大学医学部生命倫理委員会の承認を得ると共に、平成23年3月に厚生労働省ヒト幹臨床研究審査委員会(第62回厚生科学審議会科学技術部会)において承認された。また、患者には上記承認された説明書を用いて十分なインフォームド・コンセントを行い、文書にて同意を得た。動物実験については、動物に対する愛護上の配慮を十分に行い、名古屋大学における動物実験における指針に従って実施した。

C. 研究結果

1. 腹圧性尿失禁治療

1-1. 尿道括約筋機能障害による腹圧性尿失禁に対する傍尿道脂肪組織由来間葉系前駆細胞注入治療の臨床的検討

男性12例(前立腺癌に対する根治的前立腺全摘術後の腹圧性尿失禁10例、前立腺肥大症に対する手術後の腹圧性尿失禁2例)、および既治療抵抗性の腹圧性尿失禁1例に対して、傍尿道脂肪組織由来間葉系前駆細胞注入治療を実施した。有効性に関する解析は、有効性評価可能なフォローアップ期間を経過した11例(男性)について行い、フォローアップ期間の短い女性1症例、男性1症例については、短期の安全性評価のみを解析した。皮下脂肪吸引から傍尿道注入までの全行程は、全例で3時間以内に終了し、脂

脂肪組織由来間葉系前駆細胞の抽出時間は平均 98 分、傍尿道注入時間は平均 34 分であった。脂肪組織から分離された間葉系前駆細胞数 $7.3 \times 10^6 \sim 3.3 \times 10^7$ 個の細胞が抽出され、viable cells の割合は 88.6%~94.2%と治療に必要な十分量の細胞が採取された。男性 11 例でのフォローアップ期間は 7 か月~3 年 10 か月で、全例においては術前から術後最終評価時までの尿失禁量は平均 288.1g から 219.4g (76%) に減少した。尿失禁量は有効性評価可能な 11 例中 8 例で改善し、平均 230.4g から 107.3g (47%) へ減少したが、3 例では、尿失禁量の改善はみられなかった。1 例においては、術後 6 ヶ月で尿失禁が消失し、術後約 4 年の時点においても尿失禁を認めない。改善例では、尿失禁改善効果が注入術後 1 ヶ月~3 ヶ月で出現し、以後徐々に改善効果が進行した。尿失禁改善効果を、治療前の尿失禁量程度により分けて検討すると、術前の 24 時間尿失禁量が 300g 以下の比較的軽症例の方が良好な傾向がみられた。妥当性の検証された尿失禁症状・QOL 質問票による自覚症状・QOL の改善では、有効性評価可能な 11 例では、治療前と最終評価時において、平均総スコアが 15.4 から 13.5 ポイントへ減少 (改善) した。尿失禁量の改善した 8 例では平均総スコア 13.8 から 11.3 ポイントへ減少 (改善) したが、尿失禁量改善のない 3 例については平均総スコア 19.7 から 10.7 ポイントと変化がみられなかった。尿失禁量、尿失禁頻度、

QOL の項目における点数の変化も同様であった。他覚的外尿道括約筋機能の変化は、尿道内圧測定による最大尿道閉鎖圧 (Maximum Urethral Closing Pressure: MUCP) および機能的尿道長 (Functional Profile Length: FPL) により評価した。いずれのパラメーターも経時的に増加し、外尿道括約筋機能の増強が認められた。外尿道括約筋機能については、尿失禁非改善例においても改善傾向がみられた。治療前と最終評価時の変化については、最大尿道閉鎖圧は全例で平均 34.5 cm から 45.5 cmH₂O、尿失禁改善群では平均 34.8 から 46.1 cmH₂O、尿失禁非改善群で平均 34 から 43.7 cmH₂O といずれも改善 (増加) した。また、機能的尿道長は、有効性評価可能な 11 例では平均 17.1 から 24 mm と改善、尿失禁改善群では平均 16.4 から 24.1mm と改善、尿失禁非改善群では平均 19 から 19.7 mm と改善を認めなかった。経直腸的造影超音波検査では、注入 2 週間後より注入部の血流増加効果が認められ、6 ヶ月まで経時的な血流増加が認められた。血流増加効果については、11 例中 10 例で認められた。細胞注入部 (傍尿道) を中心に、造影約 5 分後のパワードップラーでカラー表示される矢状断面積の関心領域の血流表示割合%を計測した。症例 6 以外では血流の増加がみられた。MRI は脂肪組織由来間葉系前駆細胞と共に注入した脂肪組織の、注入部での存続効果を確認するために施行したが、全例において最新観察日

までの検査において注入脂肪組織の残存を認めたが、経時的なサイズの増大は認めなかった。術中の副作用は全例で認めなかった。術後早期の合併症については、4例で皮下脂肪吸引後の皮下出血を認めたが、全例で1週間から1ヶ月以内に消失した。血液検査のフォローでは、全例で検査値の異常を認めていない。男性例におけるPSA（前立腺特異抗原）についても、最新観察時までには異常な上昇を認めていない。また、抽出細胞液の一般培養（好気性・嫌気性）、真菌培養、マイコプラズマ（PCR、培養）、エンドトキシンは全例陰性であった。

1-2. 脂肪由来幹細胞における新規バイオマーカーとしての脂肪結合蛋白(FABP)と品質評価法の標準化

自己皮下脂肪組織由来幹細胞(ADSCs)の傍尿道注入治療における、治療・安全性バイオマーカーとして、脂肪細胞関連 FABP について各種検討を行ったところ、L-FABP, A-FABP 及び C-FABP は培養細胞から培養上清に放出されていることが確認された。また、ADSCs においては脂肪細胞分化刺激によって特異的に A-FABP の培養上清中濃度が上昇することから、細胞培養上清を ELISA 測定することでヒト皮下脂肪組織由来幹細胞(ADSCs)の脂肪細胞への分化を簡便にモニタリングできることが示唆された。一方 ADSCs の腫瘍化等への不測の分化をモニタリングする目的で培養上清中 C-FABP 濃度も測定した

が、濃度が薄く、明らかな不測の組織への分化を確認することができなかった。そのため、今後は ADSCs を長期培養若しくは、何かしらの刺激によって細胞をがん化させ、その培養上清中 C-FABP を測定する必要があると考えた。また、市販の ELISA kit の性能からバックが非常に高く、検量線のバラツキも大きく再現性のある正確なデータを取ることが難しいと考えられた。そこで、今回取得した C-FABP モノクロー抗体を用い、独自の体外診断用医薬品であるレナプロ L-FABP ELISA kit のノウハウを活用して C-FABP の ELISA kit を開発することで、上記分化モニタリングの標準化に寄与できると考えられた。

1-3. 組織欠損に対する脂肪由来幹細胞付加脂肪移植についての基礎的研究

術後 28 日において血液データおよび全身所見において明らかな異常を認めなかった。術後 28 日目の注入部位超音波所見では、コントロール側は low echo、実験側は high echo であった。超音波 Power Doppler にて周囲の血流を確認したところ、コントロール側に比べ、実験側では癒痕周囲の血管数およびその血流の増加を認めた。注入部位のマクロ所見では、コントロール側では線状の癒痕を認め、実験側では注入した脂肪の残存を確認できた。HE 染色所見では、コントロール側では強い癒痕組織が見られたのに対して実験側では脂肪の残存が

見られた。また、強拡大では脂肪滴を含む幼弱な細胞が見られた。これは脂肪前駆細胞と考えられ、脂肪組織再生が示唆された。また、癒痕周囲での単位面積あたりの血管数を測定したところ、コントロール側に比べて実験側では血管数が増加していた。Masson Trichrome 染色所見でも、HE 所見と同様に、コントロール側では膠原繊維を多く含み癒痕化が見られ、実験側では脂肪組織の残存が見られた。Oil-O-Red 染色による脂肪染色では、HE、Masson 染色と同様にコントロール側が癒痕が多かったのに対し、実験側の脂肪組織が保たれていることが確認された。ADSCs は In Vitro で多分化能が確認されているため、実験側の検体にて Alcian Blue, Von Kossa 両染色にてそれぞれ軟骨、骨への分化をみたが、これらの組織への分化は認めなかった。

注入した脂肪の体積は 2 ml から 1.2 ml へと約 4 割の減少を認めた。組織学的には実験側において脂肪の残存、脂肪再生、血管数の増加などの所見を認め、血管数の増加は超音波検査においても支持された。また、懸念された腫瘍化や目的以外の組織への分化は認められず、他の報告にもあるように安全な手技であると考えられた。

1-4. 一側声帯麻痺モデルを用いた、非培養自己ヒト皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞注入による神経損傷にもとづく組織変性の回復効果の研究

術後 28 日血液データおよび全身所見では、異常所見を認めなかった。両声帯を超音波パワードップラー法にて血流を測定したところ、右声帯周囲の血流の増加を認めた。甲状披裂筋の厚みを左右で測定したところ、右甲状披裂筋の厚みは 3.8mm であり、左甲状披裂筋の厚みの 6.2mm と比較して、明らかな萎縮が認められた。声帯内 ADRCs 注入部位病理組織所見としては、右甲状披裂筋は左甲状披裂筋に比較して、筋線維の密度が低下して、筋の萎縮が認められた。HE 染色では右甲状披裂筋内に注入した際生じた挫滅とその修復と考えられる筋線維が線状に認められ、ADRCs を注入した部位が推定できた。注入部位には明らかな腫瘍形成は認めなかったが、萎縮した甲状披裂筋周辺から筋内にかけて膠原線維の増生と著明な血管の増殖像が認められた。注入部やその周囲にも癌などの悪性腫瘍病変の所見は認めなかった。MC 染色、EVG 染色では注入部位には著名な膠原線維の増生が確認できた。コッサ染色・アルシアン青染色では注入部位は染色されず、ヒアルロン酸や骨などへの分化を示す所見は認められなかった。

1-5. 腹圧性尿失禁に対する傍尿道脂肪由来注入細胞に関する基礎的評価

実験で抽出した細胞を 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、その細胞を 2 継代培養後観察するとコロニーを形成し (1.0 から 2.3%)、骨髄

幹細胞の約 10-100 倍の幹細胞を有していた。またそのコロニー形成した α SMA 染色される細胞は 6 割から 8 割を占めており、平滑筋細胞分化する性質を有していた。臨床ヒト症例で抽出し、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、間葉系幹細胞のマーカーが陽性で、その細胞を脂肪誘導培地と平滑筋誘導培地で培養すると、それぞれ Olin Red で染色される脂肪細胞と α SMA 染色される平滑筋細胞に分化した。また、同細胞を FACS で解析したところ、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 2 継代培養後観察すると、コロニーを形成し (0.8 から 2.2%)、骨髄幹細胞の約 10-100 倍の幹細胞を有していた。またそのコロニー形成した α SMA 染色される細胞は 6 割から 8 割を占めており、平滑筋細胞分化する性質を有していることが明らかとなった。

ヒト ADRCs を培養すると低血清状態でのみ抗線維化作用を有する培養上清の HGF が上昇した。また同様に VEGF も上清中で上昇し、さらにその効果は低酸素で増強された。

傍尿道周囲への ADRCs 注入部位が膨隆し、容量効果を有することを確認した(HE:ヘマトキシニンエオシン染色)。マッソン・トリクローム(MC)、デスミン (Desmin) で筋肉構造として染色された。さらに α SMA、と CP で 2 種類以上の平滑筋抗体で染色された。注入部が隆起し(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。

2. 強皮症

培養法の確立では、従来の LASC 培地、臨床用培地 (Clinical medium) を作成し、同一 donor から分離した MSC を各培地で培養し、3 人の異なる donor から皮下脂肪を採取して、細胞増殖能、HGF 産生能、表面マーカーについて確認を行ったところ、培養液の違いによる差は認めなかった。

安全投与量の検討では、ラットを用いて安全な最大投与細胞量の検討を行った。1×10⁸/kg 以上の投与量では、ラットは細胞投与中から投与後 4 時間にかけて吐血し、死亡した。肺を採取して HE 染色にて確認したところ、塞栓や出血が確認され、LASC が肺静脈にトラップされたことが死亡の原因であると考えられた。安全な最大細胞投与量としては臨床で投与する量の 70 倍にあたる 7×10⁷/kg 程度と推測された。

腫瘍形成能 (in vitro) では、腫瘍細胞にみられる足場非依存的増殖能を確認するために、軟寒天培地中で LASC あるいは HeLa 細胞を 6 日間培養し、顕微鏡下で細胞の増殖能を確認した結果、HeLa 細胞は軟寒天培地中でも増殖能を示したが、LASC は増殖能を示さなかった。腫瘍形成能 (in

vivo)では、ヌードラットの両腎皮膜下へ、あるいは経静脈的にヒト LASC を投与し、腫瘍形成能の有無について確認を行った。6 か月間にわたり経過観察したが、ラットの外見に異常な所見は見受けられず、主要臓器（脳、肺、心臓、脾臓、胃、小腸、大腸、腎臓、肝臓、皮膚、動脈、リンパ節）にも悪性腫瘍形成を認めなかった。

3. 多施設共同臨床研究試験実施に向けての基盤整備

研究責任者及び研究分担者に加え、臨床試験を実施する上で、必要な臨床試験支援スタッフとして、プロジェクトマネージャー、企画立案担当、生物統計家、データマネージャー、薬事担当からなる Design Build-up Team (DBT) を構成し、次相の臨床試験計画を検討した。平成 24 年度は、試験計画書の作成について、DBT において打合せを複数回行い、上記の臨床試験（中間解析）に加え、それ以前に実施した探索的な臨床試験の成績を踏まえ（当該臨床試験成績：中間解析は、科学技術部会 ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会に平成 25 年 1 月 21 日に報告）、臨床試験計画書の骨子を作成した。そして、試験デザイン、選択基準・除外基準、用法・用量、観察期間、評価項目、統計解析方法、目標症例数についての方針を決定した。また、細胞分離装置の販売元であるサイトリ・セラピューティクス株式会社を交え、今度の開発方針の検討も行い、治験を実施すべきか、先進医療 B とし

て臨床試験を実施すべきかの検討も行った。その結果、先進医療 B として、臨床試験を実施し、保険承認を目指すことになった。

D. 考察

再生医療には、骨、皮膚、角膜等身体の一部を再生する「構造再生」と、がんや膠原病など現在では完治できない病的状態を正常にもっていく「機能再生」の 2 つがある。そして今世界は再生医療を、次代を担う重要な医療と位置づけ、その開発に鎬を削っている。海外ではすでに 400 件以上の臨床試験が行われており、特許やノウハウが固められつつある。そのソースの約 7 割が骨髄由来であることから、わが国が再生医療分野において世界を先導するには、iPS 細胞による再生医療開発と並行して、骨髄以外の組織より抽出する幹細胞を活用した再生医療を、構造再生と機能再生の両分野において戦略的に確立することが喫緊の課題となっている。そこで本事業では、体性幹細胞のひとつである脂肪組織由来幹細胞 (ADSCs) を用いて構造再生医療と機能再生医療のそれぞれを共通基盤に載せて開発する。対象疾患として構造再生医療開発では「腹圧性尿失禁」を、機能再生医療開発では「強皮症」をそれぞれ取り上げ、5 年以内の治験実施を目指している。

腹圧性尿失禁は、尿道括約筋機能障害により腹圧時に尿が漏れるもので、女性では妊娠・出産・加齢などが、男性では前立腺癌に対する手術後遺症

などがそれぞれ要因となっており、患者数はわが国だけで約 400 万人と推定されている。生活の質を著しく阻害する疾患であるにもかかわらず、有効な治療法は開発されていない。そこで、自己皮下 ADSCs を用いた腹圧性尿失禁に対する新規治療を開発して高度医療、さらには治験の実施を目指す。この取り組みは名古屋大学が世界初となる。一方、強皮症は、皮膚や内臓が硬くなる（硬化する）ことを特徴とした疾患でわが国における患者数は 1 万人以上と推定されている。これらの患者では皮膚硬化が進行し、手足の皮膚に虚血性の潰瘍や壊疽を起こす。時に肺高血圧症、肺線維症、腎不全、嚥下困難などを合併し死亡することもある。この難治性疾患を治癒する機能再生医療はまだ確立されておらず、その取り組みは先駆的で独創性に富んでいる。

平成24年度の研究では、腹圧性尿失禁治療に関する先行臨床研究、および基礎的研究を行い、強皮症については基礎的研究を行い、さらに名古屋大学医学部付属病院先端医療・臨床研究支援センターを中心に多施設共同臨床研究試験実施に向けての基盤整備を実施した。

腹圧性尿失禁では、皮下脂肪から Celution™ システムを用いて体外培養を用いることなく ADSCs (ADRCs) を採取し、一連の手術において、内視鏡下に尿道括約筋に ADRCs を、また尿道粘膜下に ADRCs 付加脂肪組織を注入する治療を行う。本年度の腹圧性尿

失禁治療に関する基礎的検討では、Celution™ システムにより採取された ADRCs (ADSCs) の細胞特性の基礎的検討を行い、これらの細胞が間葉系幹細胞の特性を有し、平滑筋に分化する傾向のあること、さらに様々なサイトカイン分泌能を有することが示され、本治療における作用メカニズムや有効性を確認することができた。また実際に、組織欠損に対する ADSCs 付加脂肪移植の基礎的検討、一側声帯麻痺モデルを用いた非培養 ADSCs 注入による神経損傷にもとづく組織変性の回復効果の基礎的検討により、ADSCs および ADSCs 付加脂肪組織を用いた傍尿道注入治療の尿道括約筋機能障害改善における有効性が示唆されたのみならず、作用機序についても多岐の要因が関与することが示唆された。実際に、13 例の前立腺手術後の男性腹圧性尿失禁に対する先行臨床研究では、長期経過観察ができた 11 例中 8 例で平均 57% の尿失禁量改善、自覚症状・QOL の改善、さらに尿道的抗の増加が認められ、本治療の有効性が示唆された。また、尿道閉鎖圧や機能的尿道長の増加、ADRCs 注入部の血流増加は、基礎的検討で確認された本治療の括約筋機能改善メカニズムを臨床的に示唆するものであった。また、先行臨床研究では、問題となる合併症や副作用は認められず、特に前立腺癌の鋭敏な腫瘍マーカーである前立腺特異抗原の増加も認めず、安全性についても、本先行臨床研究において確認された。以上より、腹圧性尿失禁に対する皮下

脂肪由来脂肪由来幹細胞の傍尿道注入治療は有効かつ安全な細胞治療として有望であり、今後、適切な臨床研究プロトコールを作成し、医師主導型治験、あるいは先進医療Bの制度に基づいて、保険診療を目指したい。

強皮症については、培養ADSCsの全身投与による治療を念頭に研究を進めているが、今回の基礎的検討により、我々が実施する低血清培養法の有効性と安全性を確認することができた。ADSCsの血管内投与においては、すでに欧州において、Celution™システムにより採取したADSCsの急性心筋梗塞に対する冠動脈内投与に関して、プラセボ対照無作為比較試験が終了し、心筋機能保護に関する有効性と安全性が報告されている。今後、さらに基礎的研究を進め、治験実施を目指したい。

新たな治療方法の提供を推進するにあたり、信頼性の高い臨床試験成績を創出するため、ICH-GCPに基づいた臨床試験の支援体制を提供するための整備を進めることは、文部科学省・厚生労働省の「臨床研究・治験活性化5か年計画2012」（平成24年3月30日）においても求められている。名古屋大学医学部附属病院は、2012年度から文部科学省「橋渡し研究加速ネットワークプログラム」及び厚生労働省「臨床研究中核病院整備事業」にそれぞれ採択され、質の高い臨床研究を実施できる体制の整備を、病院長を中心に、先端医療・臨床研究支援センターにおいて進めている。本研究の臨

床試験を支援するために、DBTを組織し、臨床試験計画の骨子を作成した。また、細胞分離装置の販売元であるサイトリ・セラピューティクス株式会社とも連携を図ることにより、今後得られる研究成果を国民に広め、恒常的に提供できる体制も構築することができた。今後、多施設共同研究を実施するために、他の施設の選定方法、モニタリングや監査の方法を含め、臨床試験計画の作成を継続して検討し、適切な臨床試験が実施できる体制の構築を目指す。また、先進医療B（あるいは医師主導型治験）として臨床試験を実施する開発方針について、平成25年4月9日に厚生労働省医政局研究開発振興課と面談を実施する予定である。

E. 結論

平成24年度の研究では、腹圧性尿失禁治療に関する先行臨床研究、および基礎的研究を行い、強皮症については基礎的研究を行い、さらに名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センターを中心にプロジェクトマネージャー、企画立案担当、生物統計家、データーマネージャー、薬事担当からなるDesign Build-up Team (DBT)を構成し多施設共同臨床研究試験実施に向けての基盤整備を実施した。腹圧性尿失禁治療については、名古屋大学医学部附属病院において次年度より、前向き臨床治験のためのプロトコールを作成し、厚生労働省医政局研究開発振興課と面談しながら、

医師主導型治験、あるいは先進医療 B として臨床研究を進める。また、強皮症については、低血清培養脂肪組織由来幹細胞の細胞特性と安全性が確認され、臨床研究を目指して、次年度の研究を進める。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto Y, Gotoh M, Kato M, Majima T, Toriyama K, Kamei Y, Hideki Iwaguro H, Matsukawa Y, Funahashi Y: Periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells for the treatment of male stress urinary incontinence: report of 3 initial cases. *Int J Urol*, 19(7):652-659, 2012
2. 山本 徳則, 後藤 百万: 画像診断 Imaging Approach, 腎血管性高血圧と腎内微小循環イメージング、*Nephrology Frontier*(1346-9630)、11 巻 4 号 Page362-366、2012
3. 山本 徳則、後藤 百万: 画像診断 Imaging Approach 腎血管性高血圧と腎内微小循環イメージング、*Nephrology Frontier*(1346-9630)11 巻 4 号 Page362-366、2012
4. 山本 徳則、後藤 百万: 画像診断 Imaging Approach 腎交差血管イメージングと間歇的側腹部痛、*Nephrology Frontier*(1346-9630)、11 巻 3 号 Page272-274、2012
5. 山本 徳則: 知っておきたい内科症候群、腎臓《泌尿器科系およびその他の症候群》閉塞性利尿症候群内科(0022-1961)109 巻6号 Page1411-1412、2012
6. 山本 徳、大藪 真理子、後藤 百万: 画像診断 Imaging Approach、IgG4関連腎炎症性腫瘍血管イメージングと鑑別診断、*Nephrology Frontier* (1346-9630)、page 175-177, 2012
7. 山本 徳則、小松 智徳、後藤 百万: 画像診断 Imaging Approach、腎血管筋脂肪腫の血管イメージングとその治療、*Nephrology Frontier*(1346-9630)11巻1号、page 78-81, 2013
8. Yamamoto T, Funahashi Y, Mastukawa Y, Kato M, Yoshino Y, Gotoh M: Pretreatment of renal subcapsular administration of adipose tissue-derived stem cells ameliorate ischemia-reperfusion induced acute kidney injury. *Hirosaki Med. J.* 64 (Suppl.) : S1-S3, 2013
9. Yamamoto J, Sato W, Kosugi T, Yamamoto T, Kimura T, Taniguchi S, Maruyama S, Matsuo S, Yuzawa Y, Niki I: Distribution of Hydrogen Sulfide (H₂S) Producing Enzymes and the Roles of H₂S in Diabetic Nephropathy. *Clin Exp Nephrol*. 2012 [Epub ahead of print]
10. Yasuda K, Ozaki T, Saka Y, Yamamoto T, Gotoh M, Ito Y, Yuzawa Y, Matsuo S, Maruyama S: Autologous cell therapy for cisplatin induced acute kidney injury by using non-expanded

- adipose tissue derived cells
Cytotherapy. 2012 Oct;14(9):1089-100.
doi: 10.3109/14653249.2012.693157.
Epub 2012
11. Yamamoto T: Editorial Comments to Hair follicle stem cells can be driven into urothelial-like phenotype, an experimental study Int J Urol. 2012 Dec 2. doi: 10.1111/iju.12013. [Epub ahead of print]
 12. Mine S, Yamamoto T, Mizuno H, Endo S, Matsukawa Y, Funahashi Y, Hattori R, Gotoh M: Effect of Tamsulosin on Bladder Microcirculation in a Rat Bladder Outlet Obstruction Model, evaluated by a Pencil Lens Charge-coupled Device Microscopy System Urology. Urology. 2013 Jan;81(1):155-9. doi: 10.1016/j.urology.2012.09.008. Epub 2012
 13. Katsuno T, Ozaki T, Furuhashi K, Kim H, Yasuda K, Yamamoto T, Sato W, Tsuboi N, Mizuno M, Ito Y, Imai E, Matsuo S, Matuyama S: Low serum cultured adipose tissue-derived stromal cells ameliorate acute kidney injury in rats Cell Transplantation 2013;22(2):287-97. doi: 10.3727/096368912X655019. Epub 2012
 14. Funahashi Y, Hattori R, Yamamoto T, Sassa N, Fujita T, Gotoh M: Effect of warm ischemia on renal function during partial nephrectomy: assessment with new 99mTc-mercaptoacetyltriglycine scintigraphy parameter. Urology. 2012, 79(1):160-4.
 15. Funahashi Y, Hattori R, Yamamoto T, Sassa N, Fujita T, Gotoh M: Effect of Warm Ischemia on Renal Function During Partial Nephrectomy: Assessment with New (99m)Tc-Mercaptoacetyltriglycine Scintigraphy Parameter. Urology. 2012, 79(1):160-4.
 16. 四肢癱瘓拘縮の治療 亀井 讓 形成外科 2012, 55:1275-1398
 17. Fujimoto KL, Tobita K, Guan J, Hashizume R, Takanari K, Alfieri CM, Yutzey KE, Wagner WR: Placement of an elastic biodegradable cardiac patch on a subacute infarcted heart leads to cellularization with early developmental cardiomyocyte characteristics. J Card Fail. 2012, 18(7):585-95.
 18. Hong Y, Takanari K, Amoroso NJ, Hashizume R, Brennan-Pierce EP, Freund JM, Badylak SF, Wagner WR: An elastomeric patch electrospun from a blended solution of dermal extracellular matrix and biodegradable polyurethane for rat abdominal wall repair. Tissue Eng Part C Methods. 2012, 18(2):122-32.
 19. 山本 徳則, 後藤 百万 : 尿失禁に対する再生医療—高年齢、難治性腹圧性尿失禁症例への応用— 日本老年学会雑誌 2013年掲載予定

20. 山本 徳則, 後藤 百万: 自己吸引脂肪組織由来幹細胞臨床研究 高年齢、難治性腹圧性尿失禁症例への応用 杏林医学会雑誌(0368-5829)43巻3号 P49-54, 2012.10
21. 山本徳則、後藤百万: 排尿障害の再生分担 再生医療叢書 後藤 満一、大橋 一夫 (編集) 朝倉書店 pp176—188 東京 2012
22. Mine S, Yamamoto T, Mizuno H, Endo S, Matsukawa Y, Funahashi Y, Hattori R, Gotoh M: Effect of Tamsulosin on Bladder Microcirculation in a Rat Bladder Outlet Obstruction Model, evaluated by a Pencil Lens Charge-coupled Device Microscopy System. *Urology*, 2013 Jan; 81(1):155-9. doi:10.1016/j.urology.2012.10.012, Epub 2012 Nov 30.
23. Matsukawa Y, Hattori R, Sassa N, Yamamoto T, Gotoh M: Neurourol Urodyn. What are the factors contributing to failure in improvement of subjective symptoms following silodosin administration in patients with benign prostatic hyperplasia? investigation using a pressure-flow study. 2012, 20. doi: 10.1002/nau.22286. [Epub ahead of print]
24. Katsuno T, Ozaki T, Furuhashi K, Kim H, Yasuda K, Yamamoto T, Sato W, Tsuboi N, Mizuno M, Ito Y, Imai E, Matsuo S, Matuyama S: Low serum cultured adipose tissue-derived stromal cells ameliorate acute kidney injury in rats *Cell Transplantation* 2013;22(2):287-97. doi: 10.3727/096368912X655019. Epub 2012 Sep 7.
2. 学会発表
1. Gotoh M, Yamamoto T, Matsukawa Y, Hattori R: Periurethral injection of adipose-derived stem cells for the treatment of male stress incontinence: outcome of a preliminary clinical trial. 2012 Annual Meeting of American Urological Association. 2012/5/20 Atlanta
 2. 後藤百万: 尿道括約筋機能障害に対する再生治療の展望: 脂肪組織由来幹細胞を用いた細胞治療の基礎と臨床、第 19 回日本排尿機能学会 2012/8/29 名古屋
 3. 阿部 智子、堀之内 明日花、金 恒秀、古橋 和弘、秋山 真一、勝野 敬之、安田 香、尾崎 武徳、坪井 直毅、松尾 清一、丸山 彰一; 片側尿管結紮モデルラットに対する低血清培養脂肪由来間葉系幹細胞の効果; 第 56 回日本腎臓学会学術総会 2012
 4. 金 恒秀、水野 正司、古橋 和弘、勝野 敬之、安田 香、尾崎 武徳、坪井 直毅、伊藤 恭彦、松尾 清一、丸山 彰一; Zymosan 投与により誘導される補体依存性腹膜炎モデルに対する脂肪由来間葉系幹細胞の有用性; 第 56 回日本腎臓学会学術総会、2012
 5. 古橋 和弘、坪井 直毅、清水 明日花、金 恒秀、勝野 敬之、安田 香、尾崎 武徳、佐藤 和一、松尾 清一、丸山 彰一; ラット anti-GBM 腎炎に対する脂肪

由来間葉系幹細胞治療で誘導されるマクロファージフェノタイプの詳細検討 ;第56回日本腎臓学会学術総会、2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 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、小出直史、後藤百万、武井佳史、国立大学法人名古屋大学、特許第495333号

2) 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)

3) 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)

4) 細胞製剤及び細胞の活性を高める方法、山本徳則、淵真悟、竹田美和、鈴木哲、柴田玲、舟橋康人、後藤百万、大山力、飛澤悠葵 特許願人 名古屋大学 出願日平成23年1月21日特願2013-008355

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし