

Ⅱ. 分担研究報告書

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)
分担研究報告書

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

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 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

研究要旨

非培養自己ヒト皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた腹圧性尿失禁治療の有用性と安全性に関する臨床研究を、平成 23 年 3 月ヒト幹臨床研究審査委員会により承認されたプロトコールに準拠して実施した。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。自己皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞の傍尿道注入治療を実施した 13 症例においては、問題となる合併症を認めておらず、効果判定可能な経過観察期間を経た男性症例 11 例中 8 例で明らかな尿失禁の改善効果を認めた。特に男性 1 例では、尿失禁の完全消失を認めた。フォローアップ期間の短い女性 1 例、男性 1 例を含め、有効性と安全性についてさらに経過観察を行う。

A. 研究目的

腹圧性尿失禁は、尿道括約筋機能障害により腹圧負荷時に尿が漏れるもので、直接生命に関わることはないが、生活の質を著しく阻害する QOL 疾患である。妊娠・出産・加齢などが要因となる女性の腹圧性尿失禁は、本邦では約 400 万人が罹患していると推定されている。男性における腹圧性尿失禁は、前立腺肥大症や前立腺癌の手術後合併症として発生し、特に近年急増する前立腺癌に対する根治的前立腺摘除術を受けた患者の 10~40%程度に発生すると報告されている。本疾患

の治療では、理学療法(骨盤底筋訓練)が初期治療として行われ、問題となる合併症はないものの、中等症以上の例には無効である。外科的治療としては、尿道スリング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、異物を体内に留置するという欠点があり、異物としてのスリング素材による膣びらん発生が副作用として報告されている。また男性における腹圧性尿失禁に対しては、本邦で行い得る有効な外科的治療がないのが現状である。そこで我々は、2001 年に発見同定された多分化能を

有する皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞 (Adipose Derived Regeneration Cells: ADRCs) に注目し、本研究では、細胞供給源としての皮下脂肪組織から採取される自己 ADRCs を用いた腹圧性尿失禁に対する新しい治療、すなわち経尿道的内視鏡下 ADRCs 傍尿道注入治療を開発し、その有用性と安全性を検証した。

B. 研究方法

患者選択、治療方法、有効性および安全性の評価は、平成 23 年 3 月厚生労働省ヒト幹臨床研究審査委員会により承認されたプロトコールに準拠して実施した。

1. 被験者の選定基準

細胞移植で生じる効能 (治療効果)・副作用・手技による合併症・利益・不利益を文書により十分に説明し、患者自らの意志および家族の理解と承諾に基づいて、細胞移植治療を希望する場合のみ施行し、以下のいずれかの患者を対象とした。

(1) 限局性前立腺癌に対して根治的前立腺摘除術を行った男性患者で、根治手術が施行され、再発・転移がなく (術後 1 年以上前立腺特異抗原:PSA が測定感度以下)、術後 1 年以上続く腹圧性尿失禁を有する患者。

(2) 前立腺肥大症に対する経尿道的前立腺切除術後またはレーザー切除後の難治性腹圧性尿失禁患者。

(3) 真性腹圧性尿失禁を有する 40 歳以上の妊娠を希望しない女性患者

で、薬物治療および理学療法が無効で、従来の手術治療を希望しない患者、あるいは、手術治療無効の患者。尿道スリング手術適応例で、手術材料に対するアレルギーを有する、あるいはアレルギーが予測される患者。

2. 除外基準

(1) 選定基準を満たしていても、患者からインフォームド・コンセントの得られない場合。

(2) 他の合併症により余命が 1 年以内と考えられる場合。

(3) 悪性新生物を有する、もしくは 5 年以内にその既往がある場合。または、諸検査により悪性腫瘍の可能性があると判断された場合 (前立腺癌に対する根治手術施行後の患者は除く)。

(4) 前立腺癌マーカー (血中 PSA) の上昇があり、前立腺癌の存在または再発がある、あるいは予測される患者。

(5) 重大な感染症を有している場合、または Wa-R, HCV, HBV, HIV いずれかが陽性で細胞注入により増悪する可能性がある症例。

(6) 重篤な肝機能障害、腎機能障害が存在する場合。

(7) 白血球減少症、血小板減少症など重篤な血液疾患および輸血を必要とする重度貧血が存在する場合。

(8) 妊娠中および妊娠の可能性のある場合。

(9) その他、主治医が不適切と判断した場合。

3. 治療方法 (治療手技の流れを図 1

に示す)

(1) 皮下脂肪組織の採取：(図2)

全身麻酔、あるいは局所および腰椎麻酔下に、患者腹部または臀部皮下脂肪組織に混合液[成分：生理食塩水1000ml+1%リドカイン(キシロカイン)2ml+0.1%アドレナリン(ボスミン)1.5ml+8.4%メイロン10ml]を適量注入し十分膨満させる。通常形成外科領域で使用される専用シリンジで脂肪組織を含む懸濁液を陰圧吸引する。

(2) 皮下脂肪組織の処理(皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞：ADRCsの分離)：(図3)

上記で得た脂肪組織約250~300gから、ADRCs分離装置(Celution®:Cytori Therapeutics, Inc.)を用いてADRCsを分離濃縮する($1 \times 10^6 \sim 8$ 個/5ml)。まず、滅菌済みのディスポーザブルセットへ採取した脂肪組織を注入し洗浄する。その後、脂肪組織の融解処理を行ない、細胞を分離する。

(3) 傍尿道周囲への脂肪組織由来間葉系前駆細胞移植：(図4)

5mlに分離されたADRCs(約 $1 \times 10^6 \sim 8$ 個)を用いて2種類の注入細胞溶液を準備する[(1)ADRCs 0.5~1.0mlの細胞溶液、(2)自己脂肪20gとADRCsの4.0~4.5mlを混和した細胞溶液]。全身麻酔、あるいは局所および腰椎麻酔下に、尿道より内視鏡を挿入し、準備した2種類の注入細胞溶液を18Gの針注射器を用いて内視鏡下に注入する。すなわち、外尿道括約筋内へ(1)溶液0.5~1.0mlを左右各々2カ所、(2)溶液を膜様部尿道粘膜下(4, 8, 6

時)に症例に応じてbulking効果による尿道内腔の閉鎖が内視鏡的に確認できる程度に注入する。

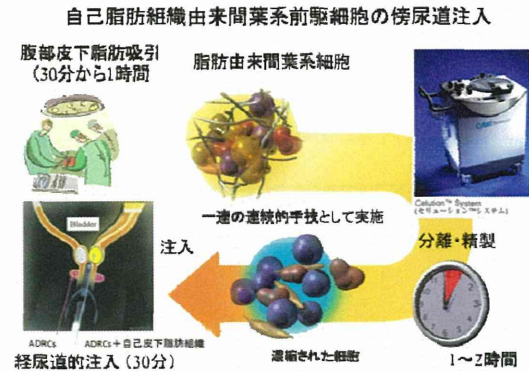


図1 非培養自己ヒト皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞の傍尿道注入治療の流れ

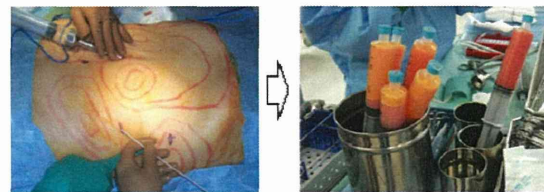


図2 皮下脂肪の採取

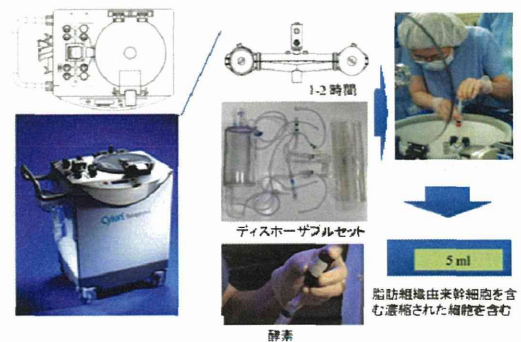
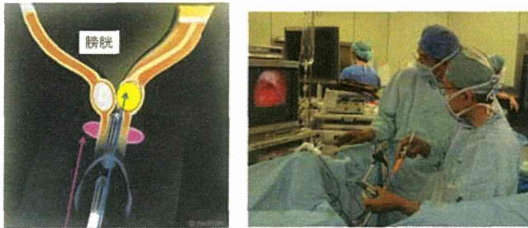


図3 皮下脂肪組織から脂肪組織由来間葉系細胞の分離

脂肪組織由来間葉系前駆細胞 (ADRCs) の注入



ADRCs ADRCs+自己脂肪組織 (20ml)
(1ml)

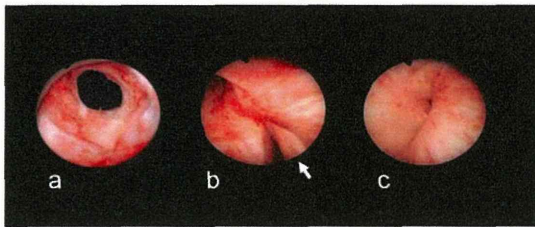


図4 脂肪組織由来間葉系前駆細胞の傍尿道注入

脂肪組織由来前駆細胞を外尿道括約筋へ注入し、細胞と脂肪組織の混合を外尿道括約部尿道粘膜下に注入する。a: 注入前、b: 右粘膜下に針 (矢印) を穿刺して注入、c: 脂肪組織由来前駆細胞と脂肪組織注入により、括約筋部尿道が閉鎖した。

4. 観察項目

(1) 治療効果、安全性の評価:

<主要評価項目>

尿失禁改善効果として、自己記入式自覚症状・QOL スコアを用いて、治療前、治療後2週、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、15ヶ月、18ヶ月、21ヶ月、24ヶ月、以後6ヶ月ごとに5年間評価を行う。スコアとしては、尿失禁症状・QOL スコア (International Consultation on Incontinence Questionnaire-Short Form) (図5) を用いる。

1. どれくらいの頻度で尿がもれますか(ひとつの口をチェック)

- なし=0
- おおよそ1週間に1回あるいはそれ以下=1
- 1週間に2~3回=2
- おおよそ1日に1回=3
- 1日に数回=4
- 常に=5

2. あなたはどれくらいの量の尿もれがあると思いますか?

(あてものを使うわないにかかわらず、通常はどれくらいの尿もれがありますか?)

- なし=0
- 少量=2
- 中等量=4
- 多量=6

3. 全体として、あなたの毎日の生活は尿もれのためにどれくらい
そなわれていますか?

- 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
まったくない 非常に

図5 スコア化 ICIQ-SF (0~21点)

他覚所見としては24時間パットテストによる尿失禁量測定を治療前、治療後2週、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、15ヶ月、18ヶ月、21ヶ月、24ヶ月、以後6ヶ月ごとに5年間評価する。また、尿流動態検査として尿道内圧測定、最大尿道閉鎖圧、機能的尿道長を治療前、治療後2週間、3ヶ月、6ヶ月、1年に評価する。

<安全性評価>

皮下脂肪吸引後の痛み・出血の有無と程度を随時評価する。血液検査としては、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、白血球数、血小板数、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、AST、ALT、ALP、CK、BUN、Cr、電解質Na、K、Cl、Ca、CRPを治療前、治療翌日、治療後1週間、1か月に評価する。根治的前立腺摘除術後の患者については、前立腺特異抗原 (PSA) 測定を3か月~6か月毎に10年間行う。また、分離 ADRCs の安全性検査として、無菌試験、分画、分離試験を行

う。

<副次評価項目>

画像評価として、MRI（矢状断像脂肪強調画像）（治療前、治療後 2 週間、3 か月、6 か月、1 年）、経膈または直腸的造影超音波検査（治療前、治療後 2 週間、3 ヶ月、6 ヶ月、1 年）を行う。超音波検査は、超音波造影剤（ソナゾイド[®]）を静脈投与 5 分後、パワードップラーにて細胞注入部近傍の微小血管血流信号を画像表示した。さらに、定量的評価として、注入部近傍に関心領域を設定し、関心領域に対するパワードップラー表示されたピクセル比率を算出した。

5. 倫理面への配慮

本臨床試験は、ヘルシンキ宣言に則って行い、試験プロトコー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。

C. 研究結果

1. 対象患者は、男性 12 例、女性 1 例。男性患者は、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、女性患者は既治療抵抗性の腹圧性尿失禁 1 例であった。
2. 治療効果に関する成績

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 例について行い、平成 24 年 10 月に実施した女性 1 症例、平成 24 年 11 月に施行した男性 1 症例は、フォローアップ期間が短いため、短期の安全性評価のみを解析した。

（1）手術時間

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。

（2）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。

（3）尿失禁量の変化（24 時間尿失禁量）（図 6、図 7）

24 時間パッドテストにより 24 時間の尿失禁量を 4 日間測定した。4 日間の尿失禁量の平均を各評価時期における尿失禁量とした。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（図 6）。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（図 7）。他方、3 例では、尿失禁量の改善はみられなかった（図 6）。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。尿失禁量の経時的推移を図7に示すが、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。

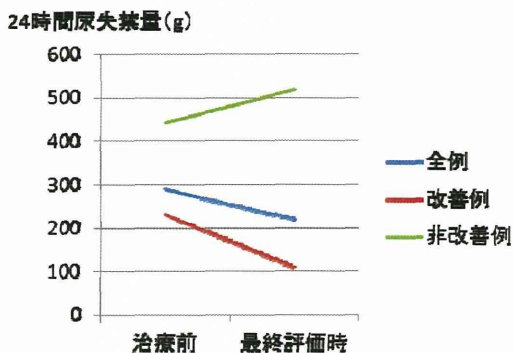


図6 治療前および最終評価時における1日尿失禁量の変化

全例(11例)、改善例(8例)、非改善例(3例)別に治療前後の1日尿失禁量の変化を示す。治療後、全例では治療前の76%、改善例では治療前の47%に尿失禁量が減少した。

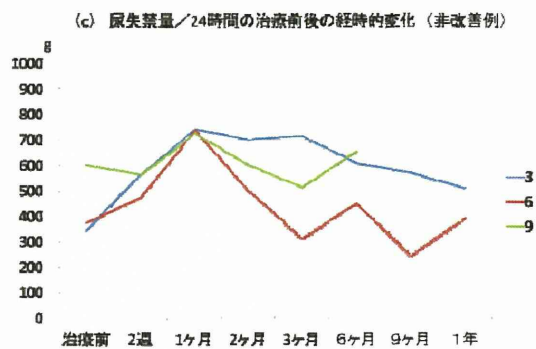
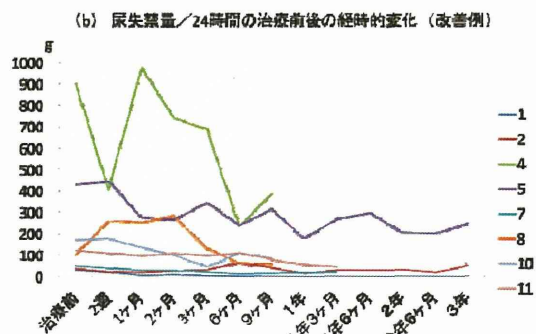
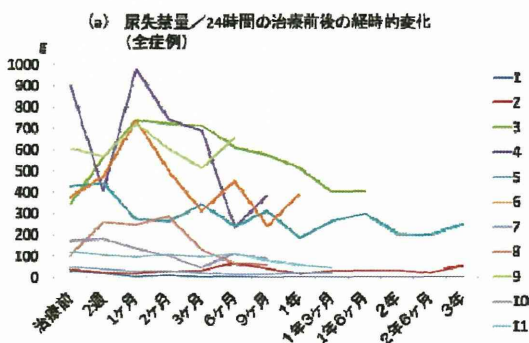


図7 治療前後の1日尿失禁量の推移

aは全例、bは尿失禁量改善例(8例)、cは尿失禁量不変例(3例)での変化を示す。

(4) 自覚症状・QOLの変化(図8)

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(図8)。

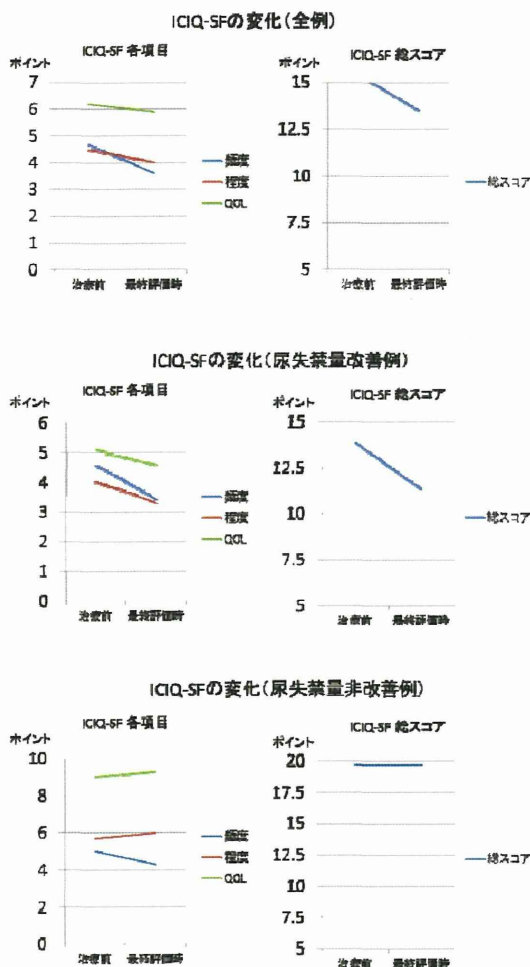


図 8 ICIQ-SF による症状・QOL の治療による変化
ICIQ-SF 総スコア、各項目スコアとも、尿失禁量改善例では改善がみられるが、尿失禁量非改善例では改善がみられない。

(5) 他覚的外尿道括約筋機能の変化 (図 9)

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。

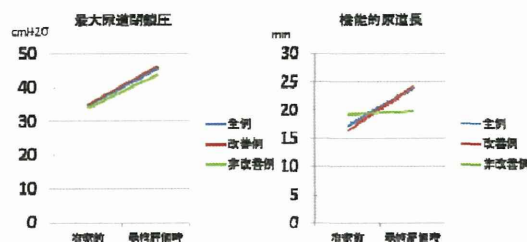


図 9 尿道括約筋機能の変化

最大尿道閉鎖圧は、全例、尿失禁量改善例、尿失禁量非改善例ともに増加 (改善) したが、機能的尿道長は、全例、尿失禁量改善例では改善したが、尿失禁量非改善例では改善がみられなかった。

(6) 注入部における血流の変化 (図 10、図 11)

経直腸的造影超音波検査では、注入 2 週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。

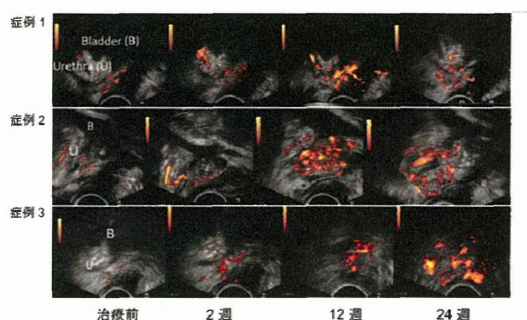


図10 経直腸的造影超音波検査による、注入部の血流の評価

注入後2週から6か月にわたり、経時的な血流増加がみられる。

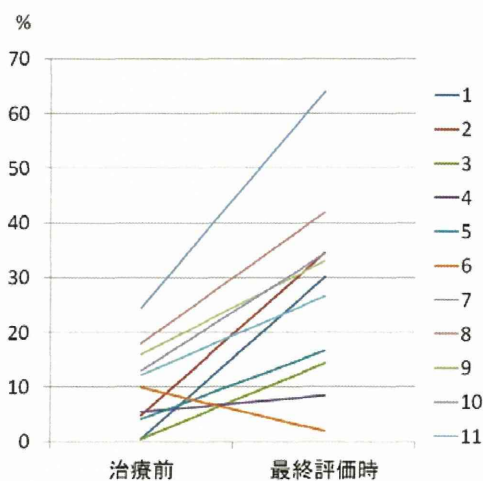


図11 超音波検査による注入部血流の数値化による変化

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の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。

(7) 注入した脂肪組織のMRIによる確認(図12)

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、経時的なサイズ増大は認めなかった。

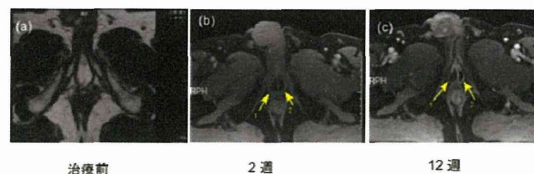


図12 MRIによる傍尿道注入脂肪組織

注入された脂肪組織は12週後も存在し、増加傾向は認めない。

(8) 副作用・安全性

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。

D. 考察

腹圧性尿失禁の病態は括約筋機能障害であり、女性では尿道過可動と内因性括約筋不全の両因子が関与する。尿道過可動は尿道支持機構の脆弱化に基づく解剖学的な要因で、スリング手術などにより修復するが、近年、腹圧性尿失禁における内因性括約筋不

全の重要性が指摘されている。また、男性腹圧性尿失禁は、その多くが根治的前立腺摘除術あるいは経尿道的前立腺手術に伴う医原性括約筋障害によるものである。女性腹圧性尿失禁の括約筋機能障害の病態として、括約筋骨格筋細胞の減少、尿道平滑筋細胞の減少、血流障害、除神経などが示唆されており、これらの病態因子は男性の医原性括約筋障害においても同様である。したがって、内因性括約筋障害の治療には、平滑筋・骨格筋細胞数の増加、血管新生の促進、神経支配の再構築などが必要となり、幹細胞を用いた再生治療は理想的な根本治療となる可能性を有する。

中胚葉性幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) は多能性を有する細胞で、培養下に増殖し、様々な中胚葉性細胞表現型に分化し得る。実地臨床では、通常骨髄から採取する自己組織由来 MSCs が用いられ、化学療法後の血液細胞再生をはじめとして、心筋再生、下肢虚血における血管再生などにおいて様々な臨床応用が行われている。他方、骨髄採取は侵襲的で、細胞ソースとして様々な制限を有し、採取量も限界があり、さらに健常者では、MSCs は有核骨髄細胞の 0.01% 以下である。また治療に必要な幹細胞数を得るためには体外培養を必要とするといった欠点がある。

近年、脂肪組織が骨髄に比べて 100 倍以上の MSCs 類似の多能性幹細胞を含むことが示された。脂肪組織は骨髄に比べて採取が低侵襲で容易であ

ること、人体には大量の脂肪組織 (通常体重の 15~20% 以上) が存在することから、細胞治療のための細胞ソースとして脂肪組織が注目されるようになった。以降、ASCs による括約筋機能障害治療のための基礎実験が行われ、多くの研究は、培養 ASCs を尿道に注入し、注入部の組織学的検討、尿道閉鎖圧、尿漏出圧、膀胱機能などを検討したもので、いずれも ASCs の腹圧性尿失禁治療への有用性を示唆するものである。

ASCs は培養下に、骨、軟骨、脂肪、神経、血管、また平滑筋、骨格筋に分化することが示され、さらに、培養下で肝細胞増殖因子 HGF、血管内皮増殖因子 VEGF などの様々なサイトカインを産生することも示されている。我々の基礎的検討 (Watanabe T, Maruyama S, Yamamoto T, Kamo I, Yasuda K, Saka Y, Ozaki T, Yuzawa Y, Matsuo S, and Gotoh M: Int J Urol, 18:659-666, 2011) でも、ラット皮下脂肪組織の培養によって得られた ASCs が平滑筋に分化すること、また VEGF や HGF などのサイトカインを多量に分泌すること、尿道への注入により尿道抵抗を上昇させることを確認した。さらに大動物 (ブタ) による検討でも、Celution™ system を用いて自己皮下脂肪から抽出した ASCs を含む脂肪由来再生細胞の傍尿道注入により、平滑筋組織への分化を確認している。

尿失禁ラットモデルによる基礎的検討結果から、本法の尿失禁改善機序として 1) 尿道粘膜下への注入細胞による尿道閉鎖効果 (bulking effect)、

2) 注入細胞の平滑筋への分化、3) 注入細胞から分泌されるサイトカインによる尿道括約筋細胞の分化増殖や血流促進、が考えられる。今回の臨床試験における検討では、最大尿道閉鎖圧や機能的尿道長の改善（尿道括約筋機能改善あるいはbulking効果による尿道括約筋機能改善）、および造影超音波検査による注入部の血流改善が確認され、本治療の臨床治療としての有効性を示すと同時に、動物基礎実験で推測された有効性メカニズムを臨床的側面から支持する所見が得られたものと考えられる。

E. 結論

自己皮下脂肪由来間葉系前駆細胞を用いた腹圧性尿失禁に対する細胞治療は、自己組織由来細胞を用いること、体外での細胞培養操作を必要としないことから、脂肪吸引・幹細胞抽出・尿道注入までを3時間以内の一連の操作で実施でき、低侵襲、安全な有望な治療法と考えられる。

F. 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, Funahash 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. 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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（国立大学法人名古屋大学、特許第495333号）

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
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
分担研究報告書

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

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
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
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

研究要旨

脂肪由来幹細胞を用いた再生治療の臨床研究において、脂肪幹細胞のバイオマーカは、細胞の活性をみるばかりでなく、安全性・品質評価法において重要である。本研究事業はヒト脂肪由来幹細胞として自己皮下脂肪組織由来幹細胞(ADSCs)を分離採取し、経尿道的内視鏡下に傍尿道に注入・移植して、尿道括約筋再生により尿失禁の改善を図る新規再生治療の開発を目標としている。そこで本分担研究では、脂肪結合蛋白(FABP)のバイオマーカの可能性とその品質評価法の標準化を検討した。

A. 研究目的

本研究事業においては、ヒト脂肪由来幹細胞として自己皮下脂肪組織由来幹細胞(ADSCs)を分離採取し、経尿道的内視鏡下に傍尿道に注入・移植して、尿道括約筋再生により尿失禁の改善を図る新規再生治療の開発を目標としている。近年、脂肪前駆細胞は炎症性マクロファージにも分化しうる事が明らかとなり、ADSCsを炎症細胞ではなく、組織間葉系細胞へ分化・再生させるための品質評価法の確立が求められている。その際、脂肪由来幹細胞の分化マーカーとして注目されるのが、脂肪酸結合蛋白質(Fatty Acid Binding Protein; FABP)である。FABPは、細胞質内の脂肪酸と結合し、

ミトコンドリアやペルオキシソームへ輸送することにより β 酸化を促し、エネルギー産生・恒常性の維持に寄与すると考えられる分子量約14KDaの蛋白質である。脂肪細胞やマクロファージにはA型(aP2とも呼ばれる)、腎臓の近位尿細管上皮細胞にはL型、内皮細胞や転移性の癌細胞にはC型のFABPが発現することが知られている。近年、脂肪細胞由来A-FABPがオートクライン、あるいはパラクラインに働き、炎症性マクロファージの活性化、分化誘導を引き起こすことが報告された。そこで本研究では、移植した脂肪由来幹細胞が適切に組織間葉系細胞へ分化・再生し得ることを検証するため、ADSCsを用いてA-FABP,

L-FABP, C-FABP の発現パターンの標準化を品質管理可能な評価法として採用できるのではないかと考えた。下記内容について以下に述べる

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

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

2) 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

3) ヒト脂肪由来幹細胞の分化誘導と特異性解析

4) 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

B. 研究方法と結果

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

1-1. C-FABP の精製

1-1-1. 培養

発現させた標的タンパク質を菌体外に放出させる菌株を用い、30℃ 72時間の条件でジャーファーマンターを用いて C-FABP を発現させた菌体を培養した。得られた培養液は遠心分離とフィルトレーション (0.22 μm) によって菌体を除去し Cell Free Broth (CFB) を得た。得られた CFB は凍結させ-80℃にて保存した。CFBの一部を SDS-PAGE 及び SYPRO Ruby により解析した結果を図 1 に示

す。

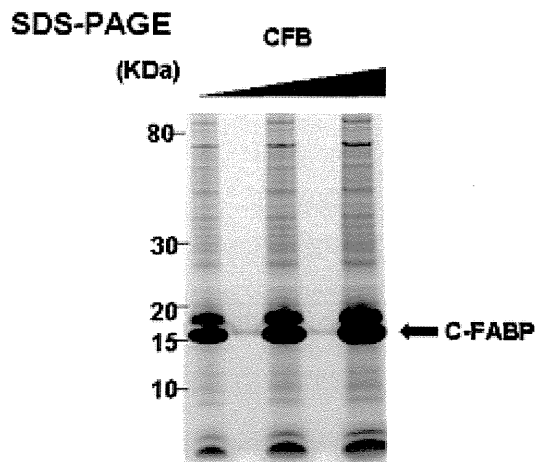


図 1. CFB における C-FABP の発現解析。

1-1-2. 粗精製 (エタノール沈殿、硫酸アンモニウム沈殿)

CFB を用いて、終濃度 25%となるように予め冷やしておいたエタノールを添加し、-20℃で 30 分間静置させた。静置後、15,000rpm で 30 分間、4℃で遠心分離を行い、上清を新しい 50mL 遠心管に保存した。本上清に飽和硫酸アンモニウム溶液 (3.2 M 硫酸アンモニウム溶液) を終濃度 20%となるように添加し、室温で 1 時間静置した。静置後、15,000rpm, 30 分間, 4℃にて遠心分離を行い、上清を新しい 50mL 遠心管に保存した。本上清を 50 mM Tris-HCl (pH8.5), 0.01 mM DTT に対して一晩透析を行った。透析後回収したサンプルを次の精製工程に使用した。それぞれの画分を SDS-PAGE 及び Quick CBB によって解析した結果を図 2 に示す。その結果、25%エタノール処理により C-FABP は上清に存在し、沈殿には夾雑物が確認された。

さらに、20%硫酸アンモニウム沈殿では C-FABP は上清に存在し、沈殿には夾雑物も確認されなかった。しかし、今回は硫酸アンモニウム添加により C-FABP に嚙んでいる脂肪酸の脱脂効果を期待して本ステップを精製工程に取り入れた。

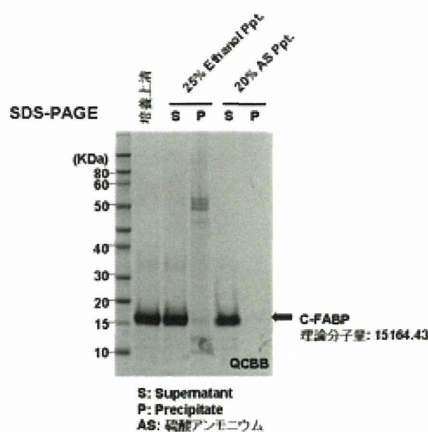


図 2. エタノール沈殿及び硫酸アンモニウム沈殿による粗精製。

1-1-3. 陰イオン交換クロマトグラフィー

陰イオン交換 Buffer に透析後回収したサンプルを 0.45 μ m のフィルターに通して浮遊物を除去し、このサンプルを予め陰イオン交換 Buffer A (50 mM Tris-HCl pH8.5, 0.01 mM DTT) で洗浄した HiTrap Q FF 20mL カラムにサンプルループ経由で流速 1 mL/min にて送液し添加した。その後、陰イオン交換 Buffer A を用いて A280 のチャートが安定するまでカラムを流速 2 mL/min で洗浄した。次に、陰イオン交換 Buffer B (50 mM Tris-HCl pH8.5, 0.01 mM DTT, 1 M NaCl) を用いて 10, 10 \rightarrow 50, 100% の Buffer B 条件で溶出を行い、フラクションを 1 mL ずつ回収した。得ら

れた A280 のプロファイルを図 8A に示す。図 3A に示される各ピークを SDS-PAGE 及び Quick CBB 染色により解析を行った結果を図 3B に示す。図 3 より 10% Buffer B 溶出条件までは C-FABP はほぼシングルバンドで溶出されるが、それ以上の Buffer B 溶出条件では 30-40 kDa の位置に夾雑物が溶出されてきた。よって C-FABP 溶出条件は 10% Buffer B で行うこととした。なおレーン 1 のフロースルーにも C-FABP と考えられるバンドが確認されたことから、カラムのオーバーフローであると考えた。また 10%以上の Buffer B 溶出条件でも一部 C-FABP が溶出され、精製によるロスは少なからず存在することが確認された。

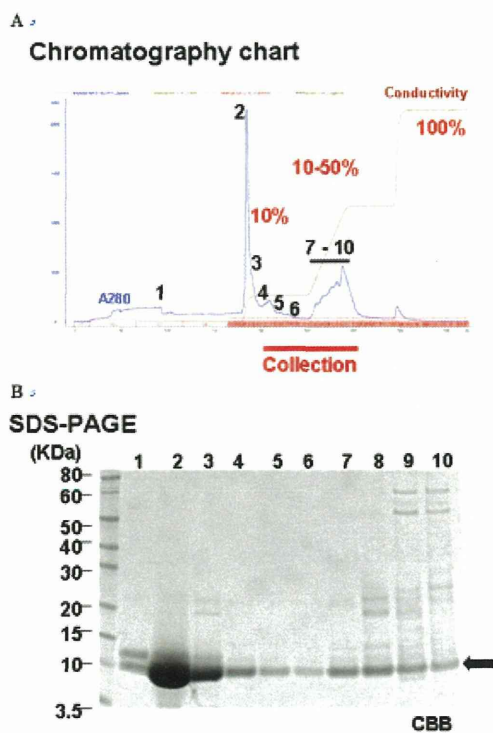


図 3. 陰イオン交換クロマトグラフィーの解析結果。

得られた精製 C-FABP を 4-12%

SDS-PAGE に展開し、銀染色及び抗 C-FABP ウサギポリクローナル抗体 (Hycult 社) を用いたウエスタンブロットによって解析を行った結果を図 4 に示す。その結果、C-FABP を銀染色レベルでほぼシングルバンドの純度に精製することができた。なお今回の精製品のタンパク質濃度を BCA assay を用いて測定したところ、4.2 mg/mL であることが確認された。よって今回の精製で得られた総タンパク質量は 153 mg であった。

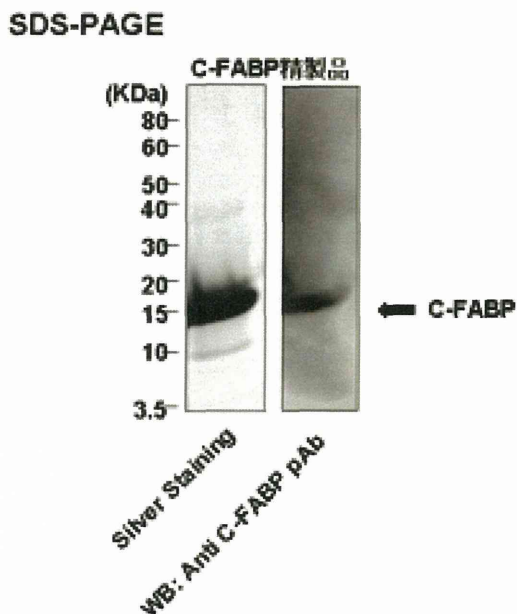


図 4. 精製 C-FABP の純度解析。

1-2. A-FABP の精製

1-2-1. 培養

発現させた標的タンパク質を菌体外に放出させる菌株を用い、30°C 72 時間の条件でジャーファーマンターを用いて A-FABP を発現させた菌体を培養した。得られた培養液は遠心分

離とフィルトレーション (0.22 μ m) によって菌体を除去し Cell Free Broth (CFB) を得た。得られた CFB は凍結させ -80°C にて保存した。CFB の一部を SDS-PAGE 及び SYPRO Ruby により解析した結果を図 5 に示す。

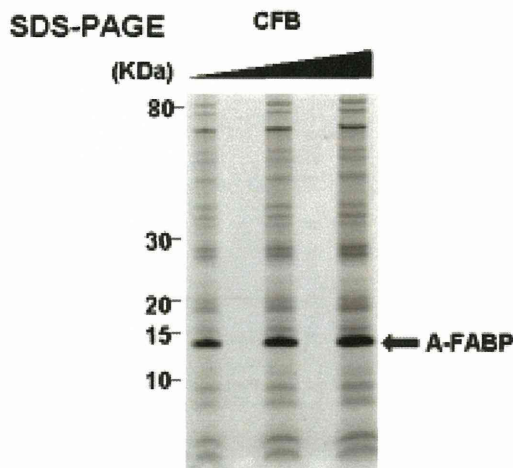


図 5. CFB における A-FABP の発現解析。

1-2-2. 粗分画 (エタノール沈殿)

得られた CFB に終濃度 50% となるように予め冷やしておいたエタノールを添加し、-30°C で 60 分間沈殿を形成させた。沈殿が確認された遠心管を 34,000 x g で 60 分間遠心分離を行い、上清を別試験管に移した。得られた沈殿は溶解 Buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0) に溶解して次の精製工程のサンプルとした。

1-2-3. 陰イオン交換クロマトグラフィー

溶解回収したサンプルを 0.45 μ m のフィルターに通して浮遊物を除去し、このサンプルを予め陰イオン交換

Buffer A (20 mM Tris-HCl pH8.0) で洗浄した HiTrap Q-FF 20mL カラムにサンプルスーパーloop 経由で流速 2 mL/min にて送液し添加した。その後、陰イオン交換 Buffer A を用いて A280 のチャートが安定するまでカラムを流速 2 mL/min で洗浄した。次に、陰イオン交換 Buffer B (20 mM Tris-HCl pH8.0, 2 M NaCl) を用いて 5, 10, 100% の Buffer B 条件で順次溶出を行い、フラクションを 1 mL ずつ回収した。得られた A280 のプロファイルを図 2A に示す。図 6A に示される各ピークフラクションに SDS-PAGE を行い Quick CBB 染色と抗 A-FABP 抗体 (Abcam: ab13979) を一次抗体に、抗 rabbit IgG, HRP-linked 抗体 (Cell Signaling: 7074S) を二次抗体に用いたウェスタンブロットを行った結果を図 6B に示す。図 6 より 5 - 10% BufferB 溶出において A-FABP が確認され、100% BufferB 溶出においては夾雑物が確認された。そのため 5 - 10% BufferB 溶出画分を回収して次の精製工程のサンプルとした。なおカラム添加サンプル中の A-FABP の大半は素通り画分として TH3 - TH7 に確認された。

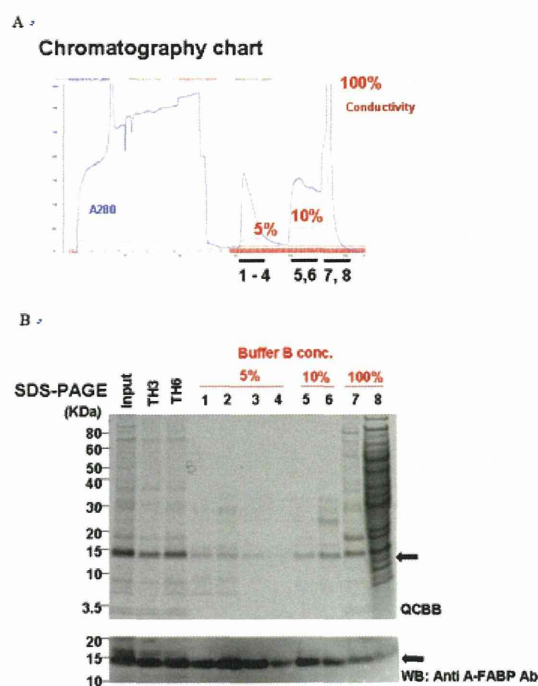


図 6. 陰イオン交換クロマトグラフィー (pH8.0) の解析結果。

1-2-4. 陰イオン交換クロマトグラフィー; 条件 2

1-2-3. の pH8.0 の陰イオン交換にて A-FABP の大半が素通り画分に確認されたことから、タンパク質がより陰イオン交換カラムに結合し易くなる条件として pH8.5 の条件での陰イオン交換を検討した。

50%エタノール処理により回収した沈殿を溶解 BufferA2 (20 mM Tris-HCl pH8.5) に溶解し、0.45 μ m のフィルターに通して浮遊物を除去し、このサンプルを予め陰イオン交換 Buffer A2 (20 mM Tris-HCl pH8.5) で洗浄した HiTrap Q-FF 20mL カラムにサンプルスーパーloop 経由で流速 2 mL/min にて送液し添加した。その後、陰イオン交換 Buffer A2 を用いて A280 のチャートが安定するまで

カラムを流速 2 mL/min で洗浄した。次に、陰イオン交換 Buffer B2 (20 mM Tris-HCl pH8.5, 2 M NaCl) を用いて 10, 10-50%; 40mL グラジエント, 100%の Buffer B 条件で順次溶出を行い、フラクションを 1 mL ずつ回収した。得られた A280 のプロファイルを図 7A に示す。図 7A に示される各ピークフラクションに SDS-PAGE、Quick CBB 染色を行った結果を図 7B に示す。図 7 より素通り画分 TH2 における A-FABP の割合が僅かに減弱したが、素通り画分への A-FABP のロスには完全には防ぐことが出来なかった。

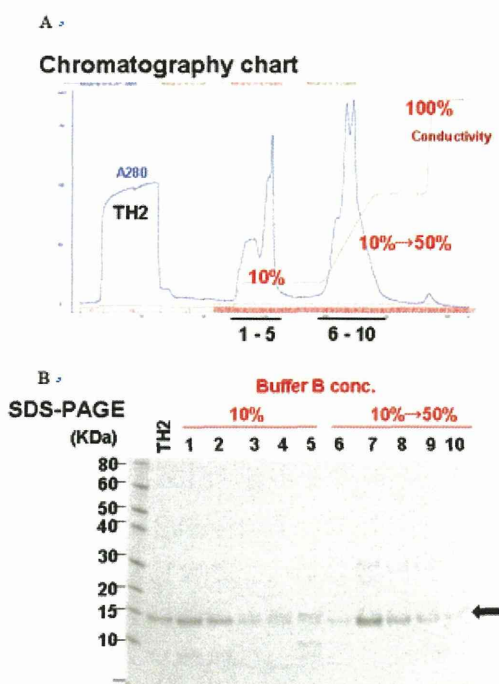


図 7. 陰イオン交換クロマトグラフィー (pH8.5) の解析結果。

1-2-5. 疎水性相互作用クロマトグラフィー

陰イオン交換により精製した溶出画分に終濃度 50% (1.6 M) となるように飽和硫酸アンモニウム溶液を添

加し 25°Cにて 60 分間静置した。なお飽和硫酸アンモニウム溶液は 3.2 M として計算した。本サンプルを 15,000 rpm で遠心分離し、その上清を 0.45 μ m のフィルターに通して浮遊物を除去した。このサンプルを予め平衡 Buffer (20 mM Tris-HCl pH7.1, 1.6 M 硫酸アンモニウム) で洗浄した HiPrep Phenyl FF (high sub) 20mL カラムにサンプルスーパーloop 経由で添加した。次に、AKTA purifier にカラムを接続し、洗浄 Buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5) にて 40%, 90%, 100%の条件で溶出を行い各フラクション 1 mL で回収した。得られた A280 のプロファイルを図 8A に示す。図 8A に示される各ピークフラクションに SDS-PAGE と Quick CBB 染色を行った結果を図 8B に示す。その結果、90% 溶出条件のフラクションに A-FABP が確認され、40%及び 100%溶出条件のフラクションには夾雑物が確認された。今回は本 90%溶出画分を精製品として回収した。一方、疎水性相互作用クロマトグラフィーにおいても素通り画分 TH1, TH2 に A-FABP の存在が確認されたことから、A-FABP のロスが起こっていることが確認された。

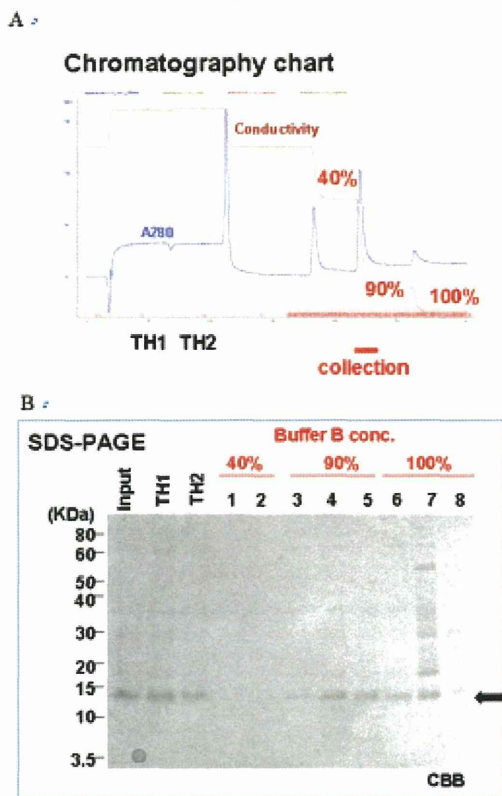


図8 疎水性相互作用クロマトグラフィーの解析結果。

1-2-6. 精製純度

得られた精製 A-FABP を 4-12% SDS-PAGE ゲルで展開し、CBB 染色及び抗 A-FABP ウサギポリクローナル抗体 (abcam 社) を用いたウエスタンブロットによって解析を行った結果を図 9 に示す。その結果、A-FABP を CBB 染色レベルで A-FABP と考えられるバンドがメインバンドの純度に精製することができた。しかし、未だ 30 kDa 及び 10 kDa に不純物が確認できるため、更なる純度向上が必要であると考えられる。なお今回の精製品のタンパク質濃度を BCA assay にて測定したところ、130.0 ug/mL であることが確認された。よって今回の精製で得られた総タンパク質量は 1.4

mg であった。今回想定収量より少ない量の A-FABP しか取得できなかった。この結果はほとんどの A-FABP がカラム非結合画分に存在しており、精製することが出来なかったことに起因していると考えられる。粗精製溶液中の A-FABP が均一な性質ではない可能性やカラム結合条件が詰めきれていないなど原因が考えられる、中でも粗精製工程のエタノール処理はタンパク質にダメージを与える可能性を大きく含んでいるため、再考の余地があると考えられる。

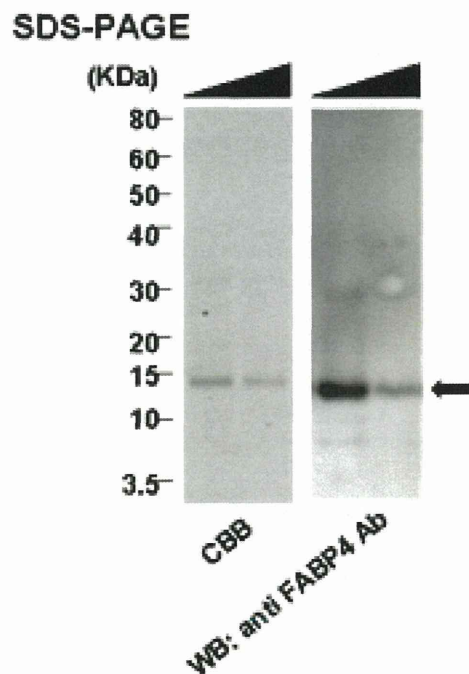


図9. 精製 A-FABP の純度解析。

1-3. 脂肪酸結合能解析

1-3-1. 序論

蛍光プローブである ANS (1-anilinonaphthalene-8-sulfonate)

は球状及び膜タンパク質の異なる部位の性質を観察するために生体膜研究に普遍的に使用されるプローブである(図 10)。ANS の蛍光はプローブの環境変化に非常に敏感であり、脂質と同様に膜タンパク質に非共有結合的に結合する。この膜との微弱な相互作用と利便性の高い吸収特性により ANS は *in vitro* 実験における蛍光プローブとして古くから利用されている。また、ANS は FABP (Chuang et al. (2008) J. Med. Chem. 51, 3755-3764) や BSA (Denisio M et al. (2008) J Fluoresc 18; 519-526) の内部の空洞に結合し、ANS 特有の蛍光の変化を測定することでタンパク質-ANS 結合をモニターすることが可能である。この方法を利用して FABP と脂肪酸の親和性を解析することとした。

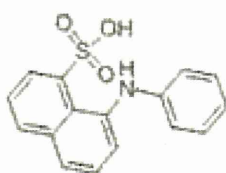


図 10. 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate

1-3-2 条件設定

ANS とタンパク質の結合シグナルが非特異的にどのタンパク質にでも得られるものなのかを検討するために、ANS と結合する報告が無く FABP (MW: 14 kDa) と同程度の分子量である Cytochrome c (MW:12 kDa) を陰性コントロールとして ANS-Protein 結合条件を模索した。

96 well プレートに PBS 緩衝液条件で $1 \mu\text{M}$ L-FABP、BSA、Cytochrome c をそれぞれ添加し、ANS 濃度を $0 - 70 \mu\text{M}$ で添加し、室温で 3 分間反応させた。その後 $\text{Ex}=370 \text{ nm}$, $\text{Em}=470 \text{ nm}$ の蛍光を測定し結合飽和曲線を作成した(図 11)。

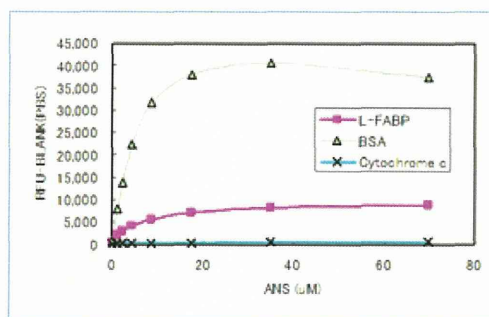


図 11. 各種タンパク質と ANS の結合飽和曲線

図 11 の結果から、同モル数のタンパク質に対する ANS の結合シグナルは $\text{BSA} > \text{L-FABP} > \text{Cytochrome c}$ で強度に差があった。既存の報告で BSA 中の ANS 結合部位は最大 5 箇所存在し、L-FABP には 2 箇所存在すると言われていたことから、タンパク質 1 分子に対して結合できる ANS 分子数の違いがシグナルの強度の差となって表現されたのではないかと考えられる。また、Cytochrome c に対しては ANS との結合シグナルはほとんど観察されなかった。

さらに、同条件のアッセイプレートの測定を $\text{Ex}=370 \text{ nm}$ で蛍光波長のスキヤニングを行った結果を図 12 に示す。

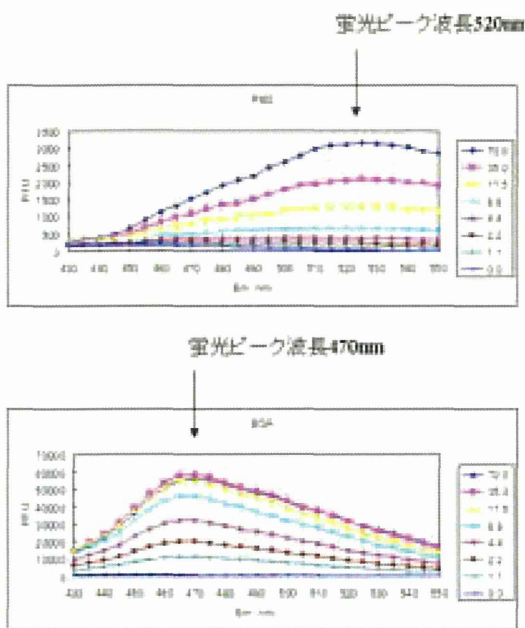


図 12. 蛍光波長のスキャン解析

図 12 の結果から、PBS 中 ANS 単独存在下では ANS 濃度を $0 - 70 \mu\text{M}$ と増加させると 520 nm 最大蛍光ピークの蛍光シグナルは濃度依存的な増大が観察され、同様に Cytochrome c-ANS 存在下では最大蛍光ピークは 520 nm に観察され、僅かに 465 nm 程度のピークも確認された。一方 BSA-ANS 及び L-FABP-ANS 存在下では最大蛍光ピークは 470 nm に観察され、 520 nm の蛍光ピークは観察されなかった。以上の結果から、Cytochrome c-ANS 間の非特異的結合は僅かに検出されるが、それは L-FABP-ANS 結合シグナルに比して微弱なため無視することが可能であると考えられる。よって L-FABP-ANS、BSA-ANS 間のシグナルは特異的な結合を検出していると考えた。

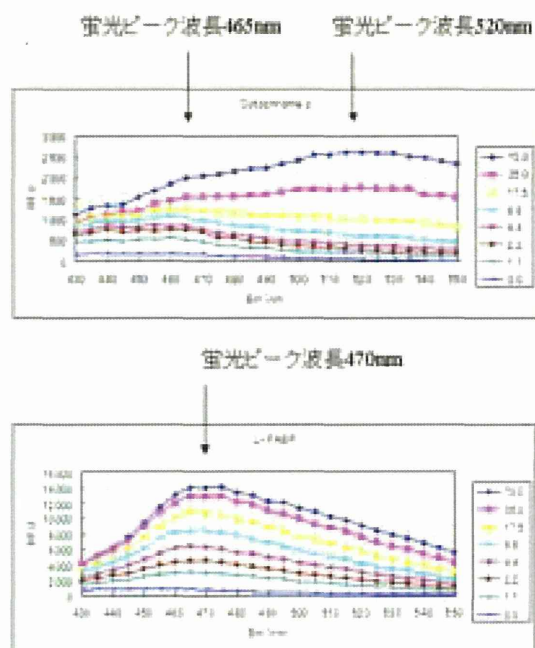


図 12. 蛍光波長のスキャン解析

反応溶液の検討

反応溶液中の塩の存在が ANS-タンパク質結合に影響を及ぼすかを確認するために NaCl 濃度の検討を行った。96 well プレートに 20 mM Tris-HCl pH7.5 緩衝液条件で $1 \mu\text{M}$ L-FABP、BSA をそれぞれ添加し、NaCl 濃度が $0, 15, 150, 1500 \text{ mM}$ となるように添加し、プレートシェイカーで混和した。その後 ANS を $0 - 70 \mu\text{M}$ で添加し室温で 3 分間反応させた。本アッセイプレートを $\text{Ex}=375 \text{ nm}$, $\text{Em}=490 \text{ nm}$ の蛍光を測定し NaCl 濃度ごとの結合飽和曲線を作成した (図 13)。