

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。

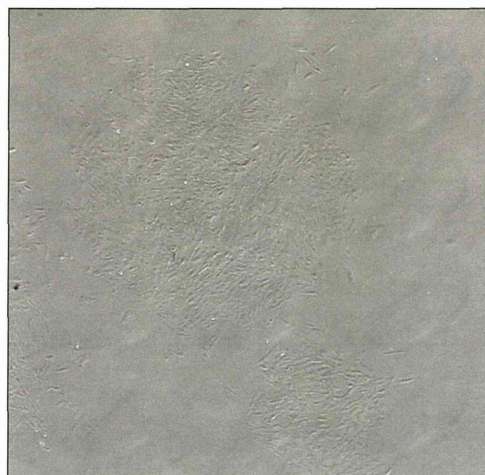
(実験5) 非培養ラット、豚 ADRCs 傍尿道周囲注入後 28 日病理組織

ADRCs 注入傍尿道周囲組織をヘマトキシニンエオシン染色(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。

C. 研究結果

(実験1) 豚 ADRCs コロニーアッセイと α SMA 陽性細胞

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 が共に陽性であった。また、その細胞を 2 継代培養後観察すると、細胞が密集した領域を有するいわゆるコロニーを形成した。そのコロニーを形成する割合は、1.0 から 2.3%あり、骨髓幹細胞の約 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。従って、豚皮下脂肪から細胞分離装置から抽出した細胞は平滑筋に分化し易い ADRCs の特徴を有していることが確認された。



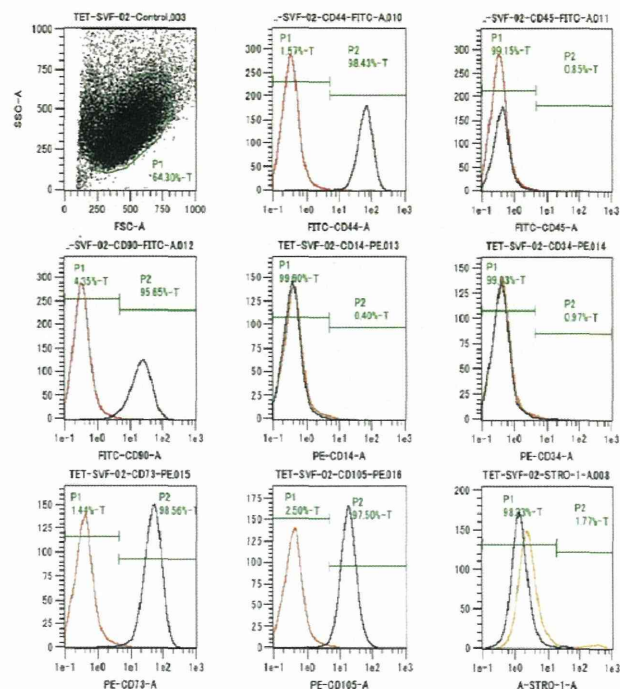
コロニーアッセイ		α SMA陽性細胞割合
93 / 5000	1.9%	76.8%
116 / 5000	2.3%	81.9%
46 / 5000	1.0%	67.9%
73 / 5000	1.5%	72.8%

(実験2) 臨床で注入した ADRCs コロニーアッセイと α SMA 陽性細胞

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 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。

従って、細胞分離装置により抽出した細胞は ADRCs の特徴を有していることが確認された。また、豚の実験と同様に、臨床で抽出した細胞を 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、細胞が密集した領域を有するいわゆるコロニーを形成した。そのコロニーを形成する割合は、0.8 から 2.2%あり、骨髓幹細胞の約 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を明らかにした。これらの結果より、ヒト皮下脂肪から細胞分離装置により抽出した細胞は、平滑筋に分化し易い ADRCs の特徴を有していることが確認された。



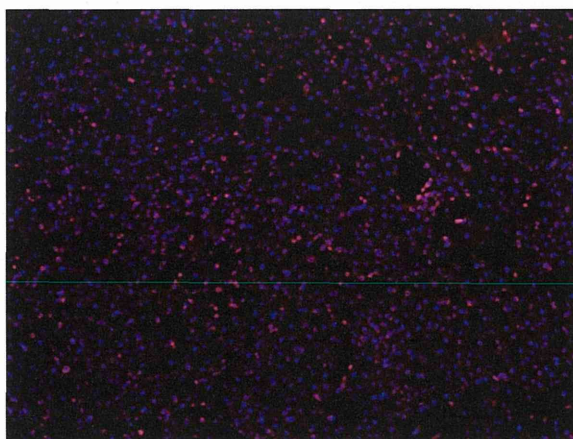
コロニーアッセイ

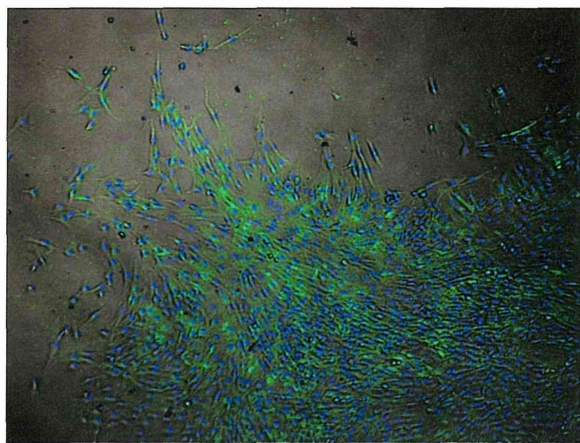
44/5000 0.8%
55/5000 1.1%
110/5000 2.2%
89/5000 1.8%
112/5000 2.3%

αSMA陽性細胞割合

76.2%
78.9%
82.2%
68.8%
73.4%

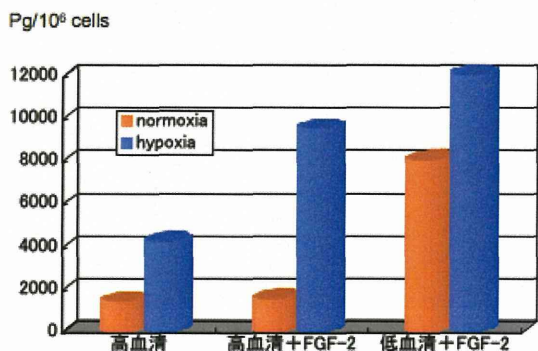
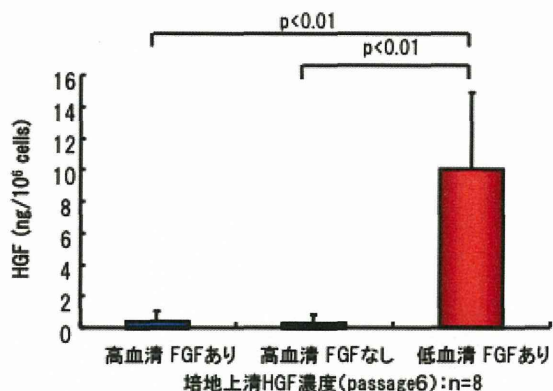
ヒト ADRCs は下記 CD44 と STRO-1 で染色された。





(実験3) ヒト ADRCs 培養上清サイトカイン測定

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。

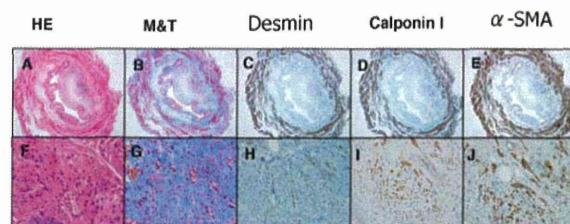


(実験4) 非培養ラット、豚 ADRCs 傍尿道周囲注入後 28 日病理組織

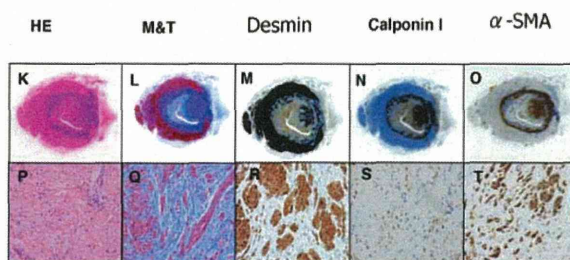
傍尿道周囲への ADRCs 注入部位が膨

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。

ラット ADRCs 注入部位平滑筋抗体免疫染色



豚 ADRCs 注入部位平滑筋抗体免疫染色



(実験5) 傍尿道周囲 ADRCs 注入部位病理組織

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。

D. 考察

腹圧性尿失禁に対する傍尿道注入治療に用いる脂肪由来幹細胞の基礎的評価を行っ

た。注入した豚、ヒト ADRCs を 2 継代培養すると、著明なコロニーを形成することが確認され、細胞全体の 0.8 から 2.2% を占めていた。そのコロニーを形成した細胞で α SMA 染色される細胞は 6 割から 8 割を占めており、注入する ADRCs は、よ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。

体内に移植された後、手術または後天的原因で損傷を受けた括約筋組織または、その周囲組織（傍尿道周囲組織）に注入した ADRCs は幹細胞を数%有しており、その 6-8 割は筋原性性格を有していることが明らかとなり、サイトカインを分泌し、容量効果を発現することが確認された。

E. 結論

腹圧性尿失禁に対する脂肪由来幹細胞の傍尿道注入治療の有用性に関して、その重要な作用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。今後、この治療においてバイオマーカーとして ADRCs のコロニーアッセイの意義結果が応用される可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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)

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

Yamamoto T, Gotoh M Editioial comment to regenerative therapy, tissue engineering, urology, lower urinary tract , stem cells 2013 in press

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

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.2012.09.008. Epub 2012 Nov 30.

Matsukawa Y, Hattori R, Sassa N, Yamamoto T, Gotoh M. Neurorol 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 Aug 20. doi: 10.1002/nau.22286. [Epub ahead of print]

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.

Yamamoto T, Gotoh M, Kato M, Majima T, Toriyama T, Kamei Y, Iwaguro H, Mastukawa 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. 2012 Jul;19(7):652-9.

Watanabe T, Maruyama S, Yamamoto T, Kamo T, Yasuda K, Saka K, Ozaki T, Matsuo S, Gotoh M. Increased urethral resistance by periurethral injection of low serum cultured adipose-derived mechanical

stromal cell in a rat Int J Urol. 2011 Sep;18(9):659-66

G. 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、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)

3) 細胞製剤及び細胞の活性を高める方法 山本徳則、瀧真悟、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

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

脂肪由来幹細胞強皮症治療に関する研究について

研究分担者 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 病院助教

研究要旨

我々が開発した脂肪由来幹細胞 (ASC) の低血清培養法は、高血清培養法と比較して優れた機能再生能をもつ細胞 (LASC) を採取・増殖させることが示されている。自己免疫疾患である強皮症に対し、LASC が免疫系の機能再生を介し、その主症状を緩和することを動物実験で確認している。そこで本事業においてこの LASC の臨床応用を見据え、LASC 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った。培養液に使用するサプリメントの一部を実験用試薬から医療用医薬品に変更したところ、従来の LASC と同等の性状・性質を示す細胞を培養することに成功した。さらに LASC 投与の安全性を確認するため、投与量の検討、軟寒天培地における細胞の増殖能、投与後の長期トレース実験による細胞毒性についての検討を行った。いずれの実験においても LASC の安全性が示され、LASC による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えることが示唆された。

A. 研究目的

強皮症は皮膚や内臓が硬くなる変化 (硬化) を特徴とし、慢性に経過する疾患である。本邦での強皮症患者は一万人以上いると推定されている。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皮膚潰瘍や皮膚壊疽をきたすと、難治性となることが多い。また、肺高血圧症や肺線維症による呼吸不全、腎クリーゼによる腎不全、食道蠕動低下による嚥下困難などで致死的事となることもある。

全身性強皮症の治療としては (1) ステロイド少量内服 (皮膚硬化に対して)、(2) シクロホスファミド (肺線維症に

対して)、(3) プロトンポンプ阻害剤 (逆流性食道炎に対して)、(4) プロスタサイクリン (血管病変に対して)、(5) ACE 阻害剤 (強皮症腎クリーゼに対して)、(6) エンドセリン受容体拮抗剤 (肺高血圧症に対して) などが挙げられる。しかしながら、これらの効果は限定的であり、重症の強皮症を改善させうる薬剤は現時点では未だなく、新たな治療法の開発は急務である。

近年、骨髄由来幹細胞 (MSC) は免疫抑制作用を有することが明らかとなってきた [1]。骨髄移植後の移植片対宿主病 (GVHD) に対する治療としてすでに臨床応用され効果を挙げている。そ

の機序のひとつに T 細胞に対する増殖抑制作用がある[2], [3]。

我々は、ヒト皮下脂肪へ、分化能と増殖能の高い MSC の選択的分離培養法 (=低血清培養法) を世界に先駆けて開発した[4]。2%血清を含む培養液を用いて、1g の脂肪組織から 2 週間で 10^9 個の LASC を得ることが可能である。また我々は、LASC が強力に T 細胞増殖を抑制することを見出した。更に LASC の B 細胞系に対する効果についても検討を行ったところ、LASC には T 細胞制御を介して B 細胞の抗体産生を抑制する効果があることも見出した[5]。また、自然免疫に対する調整能や組織修復能を有していることも示されており、種々の疾患モデルに対して LASC の有効性を報告している[6], [7]。これらの結果から、LASC による細胞治療は強皮症を始め、多くの免疫関連疾患の治療法として非常に有望であると考えられる。

そこで本研究事業では全身性強皮症への LASC 治療を確立するため、LASC の培養法の確立と安全性の確認を行った。臨床応用可能な LASC 培養法として、従来使用していた培養試薬から GMP 準拠試薬、あるいは医療用医薬品へ変更し、従来通りの能力を保持した LASC を採取、培養可能であるか検討を行った。また、安全性の確認として最大細胞投与量の検討、軟寒天培地を用いた *in vitro* の系における細胞の腫瘍形成能の評価、ヌードラットを用いた *in vivo* における腫瘍形成能、細胞毒性の検討を行った。

B. 研究方法

培養法の確立

従来の LASC 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

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。細胞の回収・調整については以下の手順で行った。

1. PBS EDTA(+)で培養皿を洗浄
 2. トリプシン 1ml で乖離
 3. 10% FBS 入り DMEM で酵素反応を止める
 4. 70 μ m cell strainer に通して細胞を回収
 5. 遠心(1200rpm, 5min)して細胞を回収
 6. PBS EDTA(-) 20ml に希釈
 7. 細胞数のカウント
 8. 遠心
 9. 2ml/body で投与できるようにラクトリックで細胞を懸濁
 10. 2ml をラットの尾静脈から投与
- ### 腫瘍形成能

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った。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。

C. 研究結果

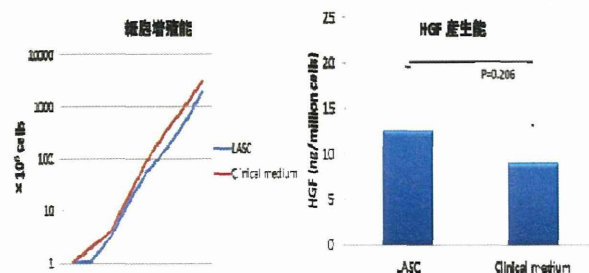
培養法の確立

従来の LASC 培地、臨床用培地 (Clinical medium) をそれぞれ作成(図 1)し、同一 donor から分離した MSC を各培地で培養した。Clinical medium に関しては初代培養 (SVF の代) においては FBS 濃度を 10% とし、その後の代からは 2% で培養を行った。フィブラストスプレーは添付の溶解液で溶かし、 $1 \mu\text{g}$ ずつシリコナイズドチューブに分注して -30°C で保存した。凍結したフィブラストスプレーの使用期限は 1 か月以内とした。

3 人の異なる donor から皮下脂肪を採取し、細胞増殖能(図 2)、HGF 産生能(図 2)、表面マーカー(図 3)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。

LASC medium	Clinical medium
MilliQ	注射用蒸留水 (医療用医薬品)
DMEM (powder)	DMEM (liquid) (GMP grade)
リアソルビン酸 2-リン酸セスキマグネシウム塩水和物	アソルビン酸注 (医療用医薬品)
Basic-FGF	フィブラストスプレー (医療用医薬品) (-30°C 凍結保存)

(図 1) LASC 培地と臨床用培地の組成



(図 2) LASC 培地と臨床用培地の細胞増殖能と HGF

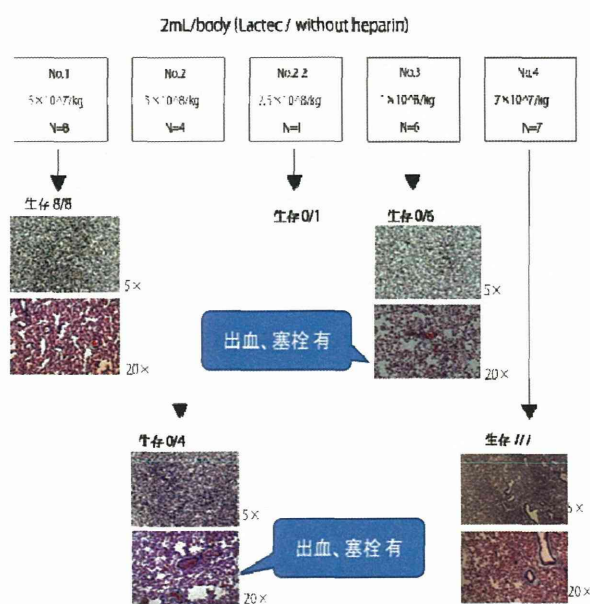
産生能の比較

Cell surface marker				
ドナー (%)				
規格	CD antigen	donor1	donor2	donor3
<10%	CD14	2.11	1.44	1.6
	CD34	3.25	2.78	2.91
	CD45	1.79	1.71	1.81
>70%	CD44	100	100	99.9
	CD73	100	100	99.8
	CD105	96.7	96.2	95.6

(図 3) LASC 培地と臨床用培地による細胞表面マーカーの比較

安全投与量の検討

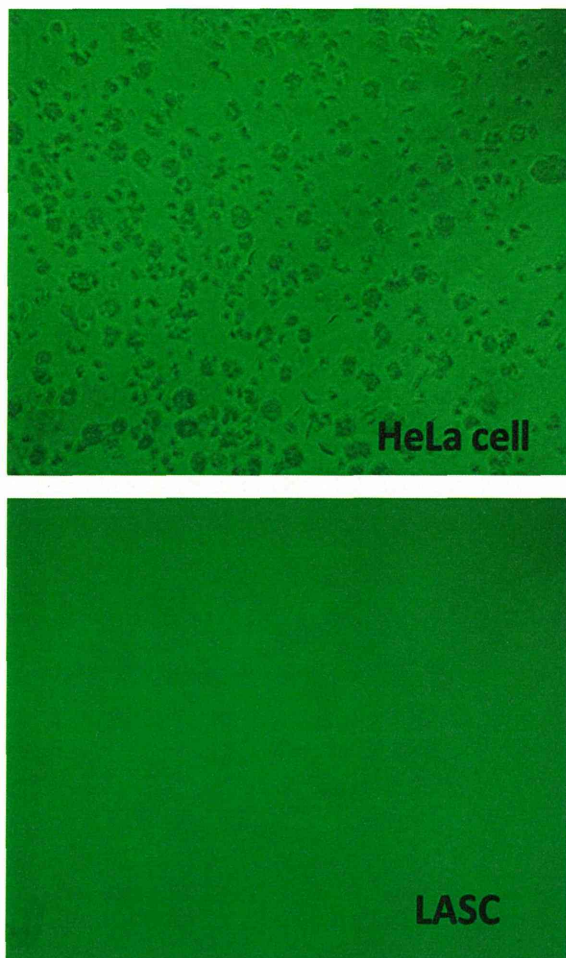
実際の臨床応用の場においては 1×10^6 /kg を予定しているが、ラットを用いて安全な最大投与細胞量の検討を行った。 1×10^8 /kg 以上の投与量では、ラットは細胞投与中から投与後 4 時間にかけて吐血し、死亡した。肺を採取して HE 染色にて確認したところ、塞栓や出血が確認され、LASC が肺静脈にトラップされたことが死亡の原因であると考えられた。安全な最大細胞投与量としては臨床で投与する量の 70 倍にあたる 7×10^7 /kg 程度と推測された(図 4)。



(図 4) LASC 安全投与量の検討

腫瘍形成能 (in vitro)

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(図 5)。

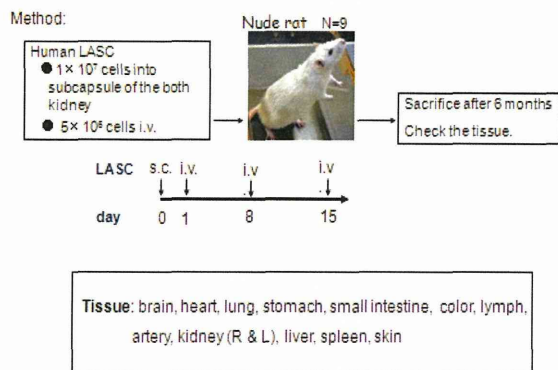


(図 5) HeLa 細胞と LASC の軟寒天培地中の増殖能

腫瘍形成能 (in vivo)

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、腫瘍形成の有無について確認を行った(図 6)。

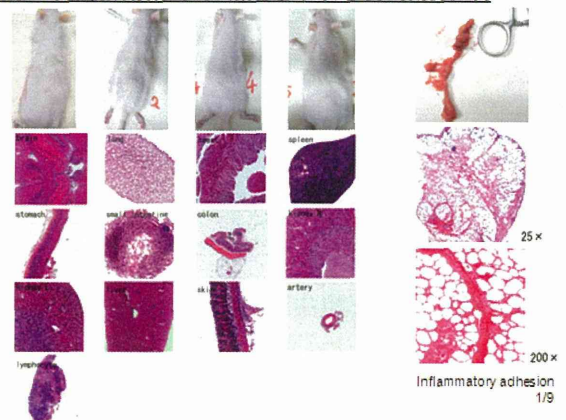
Analysis for tumorigenesis after LASC transplantation



(図 6) LASC 投与による in vivo 腫瘍形成能実験プロトコール

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。腎皮膜下に細胞を投与する際の外科的処置の過程においてできたと考えられる炎症性の腫瘍の形成を卵管付近に確認した(9 個体中 1 個体)(図 7)。

Result: Histological assessment of major organs from LASC-treated animals



(図 7) LASC 投与 6 ヶ月経過後の主要臓器の組織学的検討

D. 考察

本事業研究において、臨床現場で使用できるようモディファイした培地でも従来の LASC と同等の増殖能、HGF 産生能を保持する細胞を採取・培養できることが確認された。今後は免疫抑制能などについてもリンパ球増殖抑制実験等で詳しく解析していくことが重要であると考えられる。現在は細胞増殖能、サイトカイン産生能、細胞表面マーカーの 3 点で LASC を定義づけているが、今後 LASC 投与を治療法として確立していくにあたり、LASC を定義・特徴づける確定的なマーカー・因子の探索が必要であると考えられる。

MSC の投与は危険性が少ないといわれているが、それを検討した実験データはまだまだ少ないのが現状である。今回我々は致死量・細胞毒性・腫瘍化という点から LASC の安全性について検討を行った。ラットを用いた小動物実験ではあるが、LASC による細胞治療は十分に安全な治療法であることが示唆された。今後は大動物を用いた安全性試験を進めていくことが重要であるといえる。

E. 結論

今回我々は強皮症をターゲットとした LASC の臨床応用を目指し、臨床用 LASC の開発とその安全性について検討を行った。臨床用 LASC は従来の LASC との同等性が示された。安全性に関しても投与細胞の致死濃度が示され、腫瘍形成能についても *in vitro*, *in vivo* の両系において否定され、安全な治療法であることが示された。

F. 参考文献

[1] K. Le Blanc, I. Rasmusson, B. Sundberg,

C. G. G: the effects of a periurethral in al mesenchymal stem cells.,” *Lancet*, vol. 363, no. 9419, pp. 1439

- [2] Sundeburg, C.E. Klyushnenkova, J. D. Mosca, V. Zernetkina, M. K. Majumdar, K. J. Beggs, D. W. Simonetti, R. J. Deans, and K. R. McIntosh, “T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression.,” *Journal of biomedical science*, vol. 12, no. 1, pp. 47-57, Jan. 2005.
- [3] X. Chen, M. A. Armstrong, and G. Li, “Mesenchymal stem cells in immunoregulation.,” *Immunology and cell biology*, vol. 84, no. 5, pp. 413-21, Oct. 2006.
- [4] S. Iwashima, T. Ozaki, S. Maruyama, Y. Saka, M. Kobori, K. Omae, H. Yamaguchi, T. Niimi, K. Toriyama, Y. Kamei, S. Torii, T. Murohara, Y. Yuzawa, Y. Kitagawa, and S. Matsuo, “Novel culture system of mesenchymal stromal cells from human subcutaneous adipose tissue.,” *Stem cells and development*, vol. 18, no. 4, pp. 533-43, May 2009.
- [5] Y. Saka, K. Furuhashi, T. Katsuno, H. Kim, T. Ozaki, K. Iwasaki, M. Haneda, W. Sato, N. Tsuboi, Y. Ito, S. Matsuo, T. Kobayashi, and S. Maruyama, “Adipose-derived stromal cells cultured in a low-serum medium, but not bone marrow-derived stromal cells, impede xenoantibody production.,”

Xenotransplantation, vol. 18, no. 3, pp. 196–208, 2011.

- [6] T. Watanabe, S. Maruyama, T. Yamamoto, I. Kamo, K. Yasuda, Y. Saka, T. Ozaki, Y. Yuzawa, S. Matsuo, and M. Gotoh,
“Increased urethral resistance by periurethral injection of low serum cultured adipose-derived mesenchymal stromal cells in rats.,” *International journal of urology*: official journal of the Japanese Urological Association, vol. 18, no. 9, pp. 659–66, Oct. 2011.
- [7] K. Furuhashi, N. Tsuboi, A. Shimizu, T. Katsuno, H. Kim, Y. Saka, T. Ozaki, Y. Sado, E. Imai, S. Matsuo, and S. Maruyama,
“Serum-Starved Adipose-Derived Stromal Cells Ameliorate Crescentic GN by Promoting Immunoregulatory Macrophages.,” *Journal of the American Society of Nephrology*: JASN, vol. 24, no. 4, pp. 587–603, Mar. 2013.

G. 業績

1. Low Serum Cultured Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Ameliorate Rat Model with Zymosan Induced Severe Peritonitis. ; Hangsoo Kim, MD, Masashi Mizuno, MD, PhD, Kazuhiro Furuhashi, MD, Takayuki Katsuno, MD, PhD, Takenori Ozaki, MD, Kaoru Yasuda, Waichi Sato, MD, PhD, Naotake Tsuboi, MD, PhD, Yasuhiko Ito, MD, PhD, Enyu Imai, MD, PhD, Shoichi Maruyama, MD, Seiichi Matsuo, MD ; 45rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology
2. Serum Starved Adipose-Derived Stromal Cells Ameliorate Rat Crescentic Glomerulonephritis by Promoting the Generation of M2 Immunoregulatory Macrophages. ; Kazuhiro Furuhashi, MD, Naotake Tsuboi, MD, PhD, Hangsoo Kim, MD, Takayuki Katsuno, MD, PhD, Waichi Sato, MD, PhD, Enyu Imai, MD, PhD, Seiichi Matsuo, MD, Shoichi Maruyama, MD. ; 45rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology.
3. Low serum cultured adipose-derived mesenchymal stromal cells ameliorate rat model with unilateral ureteral obstruction. ; Tomoko Abe, Asuka Horinouchi, Hangsoo Kim, Kazuhiro Furuhashi, Shinichi Aiyama, Takayuki Katsuno, Kaoru Yasuda, Takinori Ozaki, Naotake Tsuboi, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama. ; The World Congress of Nephrology 2013.
4. Potential of adipose tissue-derived stem cells and low temperature physical plasma for use in regenerative medicine. ; Shoichi Maruyama, Asuka Shimizu, Takenori Ozaki, Tomoko Abe, Kazuhiro Furuhashi, Shin'ichi Akiyama, Naotake Tsuboi, And Seiichi Matsuo. ; ISPlasma 2013.
5. Rat adipose tissue-derived stromal cells attenuate peritoneal injuries in rat zymosan-induced peritonitis accompanied by complement activation. ; Hangsoo Kim, Masashi Mizuno, Kazuhiro Furuhashi, Takayuki Katsuno, Takenori Ozaki, Kaoru Yasuda, Naotake Tsuboi, Yasuhiko Ito, Shoichi Maruyama, Matsuo

Seiichi.; The World Congress of Nephrology 2013

6. 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；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；第 56 回日本腎臓学会学術総会
7. 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；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；第 56 回日本腎臓学会学術総会
8. 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；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；第 56 回日本腎臓学会学術総会

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有する細胞製剤」

特願 PTC/JP2007/065431

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

多施設共同臨床試験実施に向けての基盤整備

分担研究者

水野正明 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 教授
安藤昌彦 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 准教授
加藤勝義 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 講師
平川晃弘 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 講師
清水 忍 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 講師

研究要旨

名古屋大学医学部附属病院における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、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を提供するための整備を進め、一定の成果を収めた。具体的には、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。

A. 研究目的

人を対象にした臨床試験においては、安全性が十分担保された環境で実施する必要がある。その規範となるのが1964年に世界医師会総会で採択されたヘルシンキ宣言である。この宣言はその後、数回の改定が加わり、現在に至っている。ここでは、1) 科学的・倫理的に適正な配慮を記載した臨床試験実施計画書を作成すること、2) 倫理審査委員会で臨床試験計画の科学的・倫理的な適正さが承認されること、3) 被験者に、事前に説明文書を用いて臨床試験計画

について十分に説明し、臨床試験への参加について自由意思による同意を文書にて得ることが基本原則に掲げられている。この宣言に則り、我が国においては1997年に「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成9年3月27日 厚生省令第28号）(ICH-GCP省令)が発行され、国際基準に則った臨床試験の基盤が整備された。

一方、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、我が国における第一線の臨床研究実施施設を目指している。

本研究ではこの流れに沿って、脂肪組織由来幹細胞を用いた腹圧性尿失禁と強皮症における新たな治療方法の提供にあたり、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の整備を進めた。

B. 研究方法

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、支援体制づくりを進めた。

(倫理面への配慮)

臨床試験計画の作成に際しては、ICH-GCPをはじめ、臨床研究に関する倫理指針(平成20年7月31日全部改正)、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の改正等について」(平成22年11月1日医政発1101第6号)、厚生労働大臣の定める先進医療及び施設基準の制定等に伴う実施上の留意事項及び先進医療に係る届出等の取扱いについて(平成24年7月31日)等、必要な省令、指針等に対応するよう配慮している。

C. 研究結果

本研究のうち、腹圧性尿失禁に対する治療については、現在、非盲検非対照試験を、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の改正等について」(平成22年11月1日医政発1101第6号))に則り、実施している。開発を継続的、かつスムーズに進めるために、次相の臨床試験計画を可能な限り早期に検討する必要がある。そこで、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¹⁾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

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 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

今回、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た。今回、臨床試験計画作成のために DBT を組織し、試験計画の骨

子を作成した。今後、本研究の質の高い臨床試験成績を得られるよう、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を目指す。

また、今後の開発方針については、厚生労働省や医薬品医療機器総合機構と相談しながら開発を進めていきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

I. References

- 1) Int J Urol 19: 652-659, 2012

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Yamamoto T, Gotoh M, Kato M, Majima T, Toriyama K, Kamei Y, Iwaguro H, Matsukawa Y, Funahashi Y	Periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells for the treatment of male stress urinary incontinence: Report of three initial cases	Int J Urol	19	652-659	2012
Mine S, Yamamoto T, Mizuno H, Endo K, Matsukawa Y, Funahashi Y, Kato M, Hattori R, Gotoh M	Effect of tamsulosin on bladder microcirculation in rat model of bladder outlet obstruction using pencil lens charge-coupled device Microscopy System	Urology	81	155-159	2013
Furuhashi K, Tsuboi N, Shimizu A, Katsuno T, Ozaki T, Matsuo S, Maruyama S, et al.	Serum-starved adipose-derived stromal cells ameliorate crescentic GN by promoting immunoregulatory macrophages	J Am Soc Nephrol	doi: 10.1681/ASN.2012030264		2013
Katsuno T, Ozaki T, Yamamoto T, Sato W, Matsuo S, Maruyama S, et al.	Low Serum Cultured Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Ameliorate Acute Kidney Injury in Rats	Cell Transplantation	22	287-297	2013
Yamamoto T, Funahashi Y, Matsukawa Y, Kato M, Gotoh M, et al.	Pretreatment of renal subcapsular administration of adipose tissue-derived stem cells ameliorate ischemia reperfusion-induced acute kidney injury	Hirosaki Med. J.	64	S1-S3 Suppl	2013
Yasuda K, Ozakii T, Yamamoto T, Gotoh M, Matsuo S, Maruyama S, et al.	Autologous cell therapy for cisplatin-induced acute kidney injury by using non-expanded adipose tissue-derived cells	Cytotherapy	DOI: 10.3109/14653249.2012.693157		2012
Iwata N, Koike M, Kamei Y, Fujiwara M, Kodera Y, et al	Antethoracic pedicled jejunum reconstruction with the supercharge technique for esophageal cancer	World J Surg	36	2622-2629	2012

IV. 研究成果の刊行物・別冊

Original Article: Clinical Investigation**Periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells for the treatment of male stress urinary incontinence: Report of three initial cases**Tokunori Yamamoto,¹ Momokazu Gotoh,¹ Masashi Kato,¹ Tsuyoshi Majima,¹ Kazuhiro Toriyama,² Yuzuru Kamei,² Hideki Iwaguro,³ Yoshihisa Matsukawa¹ and Yasuhito Funahashi¹Departments of ¹Urology and ²Plastic and Reconstructive Surgery, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan; and ³Cytori Therapeutics, Inc., San Diego, California, USA**Abbreviations & Acronyms**

ADRC = adipose-derived regenerative cells
ASC = adipose-derived stem cells
CFU-F = colony forming unit-fibroblast
FPL = functional profile length
GFP = green fluorescent protein
HoLEP = holmium laser enucleation of the prostate
ICIQSF-SF = International Consultation on Incontinence Questionnaire-Short Form
MRI = magnetic resonance imaging
MSC = mesenchymal stem cells
MUCP = maximum urethral closing pressure
Qmax = maximum flow rate
QOL = quality of life
SMA = smooth muscle actin
SUI = stress urinary incontinence

Objectives: To report a novel cell therapy using autologous adipose tissue-derived regenerative cells for male stress urinary incontinence caused by urethral sphincteric deficiency, and the outcomes in the initial cases undergoing periurethral injection of adipose tissue-derived regenerative cells.

Methods: Three patients with moderate stress incontinence after radical prostatectomy and holmium laser enucleation of the prostate were enrolled. Adipose tissue-derived regenerative cells were isolated from the abdominal adipose tissue by using the Celution system. Subsequently, the isolated adipose tissue-derived regenerative cells, and a mixture of adipose tissue-derived regenerative cells and adipose tissue were transurethraly injected into the rhabdosphincter and submucosal space of the urethra, respectively. Short-term outcomes during a 6-month follow up were assessed by a 24-h pad test, a validated patient questionnaire, urethral pressure profile, transrectal ultrasonography and magnetic resonance imaging.

Results: Urinary incontinence progressively improved after 2 weeks of injection up to 6 months in terms of decreased leakage volume, decreased frequency and amount of incontinence, and improved quality of life. Both maximum urethral closing pressure and functional profile length increased. Magnetic resonance imaging suggested a sustained presence of the injected adipose tissue. Enhanced ultrasonography showed a progressive increase in the blood flow to the injected area. No significant adverse events were observed peri- and postoperatively.

Conclusion: These preliminary findings suggest that periurethral injection of the autologous adipose tissue-derived regenerative cells is a safe and feasible treatment modality for male stress urinary incontinence.

Key words: adipose-derived regenerative cells, adipose-derived stem cells, injection, prostatectomy, stress urinary incontinence.

Correspondence: Momokazu Gotoh M.D., Ph.D., Department of Urology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showaw-ku, Nagoya 466-855, Japan. Email: gotoh@med.nagoya-u.ac.jp

Received 5 January 2012;
accepted 26 February 2012.
Online publication 21 March
2012

Introduction

Urinary incontinence is a distressing complication of radical prostatectomy and transurethral surgery of the prostate, and is associated with the functional impairment of the external urethral sphincter. Although the incidence of male stress incontinence is not high, a substantial number of patients are known to suffer from long-lasting moderate to severe incontinence after radical prostatectomy.^{1–3} Although a variety of treatment modalities have been attempted,⁴ there has been no established treatment for male stress incontinence. Hence, there is an excessive need for developing a new minimally invasive and effective treatment modality for male stress incontinence.

Cell therapy for the regeneration of injured tissues has recently been extensively investigated at an experimental level, and its clinical application in a variety of fields has also been in progress. MSC are multipotent adult stem cells that can proliferate in culture, and

are able to differentiate into a variety of mesenchymal cell phenotypes.⁵⁻⁸ Thus far, MSC have mainly been harvested from bone marrow, a tissue source that has many limitations. These include donor-site morbidity in the bone marrow, which limits the amount of marrow that can be obtained,⁹ MSC represent less than 0.01% of all nucleated bone marrow cells in healthy volunteers,^{10,11} and an extended culture time is required to obtain therapeutic cell doses of MSC by using the *ex vivo* cell expansion method.

It has recently been shown that adipose tissue contains multipotent cells that are similar to MSC,^{12,13} and the abundance of stem cells in the adipose tissue is 100-fold higher than that in the bone marrow. This finding has generated major interest because, unlike bone marrow cells, adipose tissue can be easily and safely harvested in large quantities with minimal morbidity, making it an appealing source for cell therapy. It has been shown that ASC differentiate into several cell types,^{5,8,14} such as bone, cartilage, fat, nerves, blood vessels and contractile cells with striated muscle cell⁷ or cardiomyocyte features.^{7,15} In addition, cultured ASC secrete a variety of angiogenesis-related cytokines, such as hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor.¹⁶

The Celution system (Cytori Therapeutics, San Diego, CA, USA) is commercially available equipment that allows the isolation of stromal, vascular-derived, adipose stem and regenerative cells from human adipose tissue in a short time.¹⁷ This instrument allows the isolation of therapeutic doses of autologous ADRC after liposuction, obviating the need for culture. We developed a novel cell therapy for SUI caused by urethral sphincter deficiency; the cell therapy included periurethral injection of autologous ADRC. We report our experience of three initial patients with SUI after prostatectomy undergoing this therapy, focusing on the procedure and short-term outcomes.

Methods

The present study was approved by the Ethics Committee of the Nagoya University Graduate School of Medicine, and also by the committee of the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare according to the Guideline on Clinical Research using Human Stem Cells. Written informed consent was obtained from the patients.

Patients

In the present study, three patients with SUI after radical prostatectomy and HoLEP were enrolled. The inclusion criteria for the patients with prostate cancer was as follows: persistence of moderate to severe urinary incontinence for more than 2 years after surgery, no evidence of recurrence or metastasis of prostate cancer with undetectable levels of prostate-specific antigen (<0.008 ng/mL), localized prostate

cancer of good risk with preoperative prostate-specific antigen of less than 10 ng/mL and a Gleason score of 6 points or less negative surgical margin on pathological examination of the resected prostate specimen. The first patient (case 1) was 77 years-of-age, and underwent radical prostatectomy 4 years earlier with a pathological stage of T2N0M0, and had an undetectable level of prostate-specific antigen at enrolment and moderate SUI without urgency. The second patient (case 2) was 69 years-of-age, and underwent HoLEP for benign prostatic hyperplasia 2 years earlier, and had persisting SUI after surgery. The third patient (case 3) was 75-years-of-age with moderate SUI, and underwent radical prostatectomy 3 years earlier with a pathological stage of T2N0M0, and had undetectable levels of prostate-specific antigen at enrolment.

Harvesting adipose tissue (liposuction)

Under spinal anesthesia, 250 mL of adipose tissue was harvested from the anterior abdominal wall by making two 3-mm incisions. An 18-G Becker cannula with a 50-mL syringe was used as a collecting device; Ringer's Lactate was first infused in the subcutaneous layer then the adipose tissue was harvested. The suctioned adipose tissue contained in the saline was allowed to stand for settling the blood and cellular debris; adipose tissue floated to the top of the mixture.

Isolation of ADRC

ADRC were isolated from the harvested adipose tissue by using the Celution system.¹⁸ Briefly, adipose tissue was introduced into the Celution cell-processing device, which automatically and aseptically extracts and concentrates the mononuclear fraction of adipose tissue and removes unwanted or deleterious cells, and matrix fragments. It required approximately 1 h to process 250 mL of liposuction tissue. The final concentrated cell output collected using the Celution system was counted using a NucleoCounter (Chemometec, Allerød, Denmark), which exclusively detected nucleated cells. By using the Celution system, we could finally obtain a 5 mL solution containing concentrated ADRC.

Periurethral injection of ADRC

Subsequent to liposuction and isolation of ADRC, transurethral endoscopic injection of ADRC was carried out. For periurethral injection of ADRC, two distinct formulations were produced: 1 mL of the isolated ADRC fraction alone was preserved for direct injection, and another 4 mL of the fraction was mixed with intact autologous adipose producing a total of 20 mL of this combined solution.