

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への脂肪組織由来
幹細胞（脂肪組織由来再生細胞）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

医師主導型治験の実施を目的として、非培養自己ヒト皮下脂肪組織由来幹細胞（脂肪組織由来再生細胞 **adipose-derived regenerative cells: ADRCs**）を用いた腹圧性尿失禁治療の有用性と安全性に関する先行臨床研究を、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。男性 14 症例、女性 4 症例の計 18 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。ADRCs 傍尿道注入治療を実施した 18 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 14 例中 10 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 4 例では、治療後 3 ヶ月で 2 例において明らかな尿失禁改善効果を認めている。

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する。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。現在、本邦での前立腺癌に対する前立腺全摘除術は年間 2 万件程度実施されていることから、毎年 2,000～8,000 人の術後腹圧性尿失禁患者が、新たに発生していることになる。また、前立腺癌は 2020 年には、本邦男性における癌発生率の第 2 位へ急増すると推計されていることから、前立腺癌術後尿失禁患者数はさらに増加することが予測される。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。腹圧性尿失禁に対する薬物療法として、 β 2 アドレナリン受容体作動薬であるクレンプテロール塩酸塩が承認されているが、無作為化試験で有効性が確認されていない。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。腹圧性尿失禁に対する低侵襲外科的治療として、傍尿道コラーゲン注入治療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ことから治療持続効果が高くない。さらに、唯一日本でコラーゲンを取り扱っていたメディコン社は平成22年12月でその取扱いを中止したため、腹圧性尿失禁に対する低侵襲的外科的治療の選択肢が無くなった。また男性における腹圧性尿失禁に対しては、2013年4月に人工尿道括約筋移植術が保険適用となったが、機器を体内に埋め込むことから、感染や機器の作動異常などが課題となる。このように、男性の腹圧性尿失禁に対しては、本邦で行い得る有効な低侵襲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（脂肪組織由来再生細胞：Adipose Derived Regeneration Cells: ADRCs）に着目し、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。

本研究事業は、世界初の傍尿道への脂肪組織由来間葉系前駆細胞（脂肪組織由来再生細胞）注入治療を、保険承認のための医師主導型治験として実施し、日本発の新再生治療として世界に普及させることを目的としており、本報告書ではその予備臨床試験の中間解析結果を報告する。

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（平成23年3月15日承認：厚生労働省発医政0315第3号）されたプロトコール（UMINID：UMIN000006116）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がある場合。

(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(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™:Cytore Therapeutics, Inc.)を用いて ADRCs を分離濃縮する($1 \times 10^6 \sim 8$ 個/5ml)。まず、滅菌済みのディスプレイ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 ADRCs 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 0.5~1.0 ml の細胞溶液、(2) 自己脂肪 20g と ADRCs の 4.0~4.5 ml 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0.5-1.0 ml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 bulking 効果による尿道内腔の閉鎖が内視鏡的に確認できるように注入する。



図1 非培養自己皮下脂肪組織由来再生細胞ADRCsの傍尿道注入治療の流れ

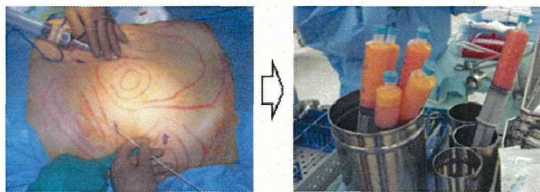


図2 皮下脂肪の採取

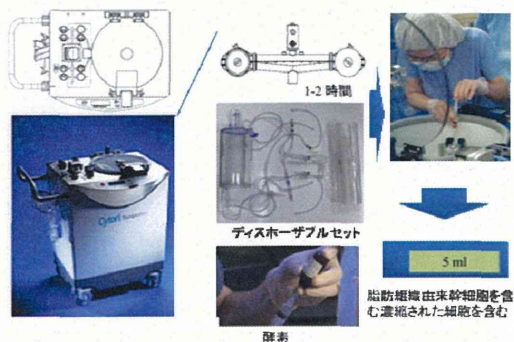
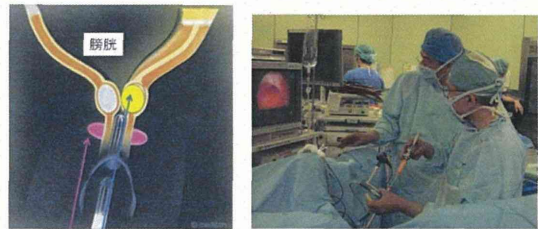


図3 皮下脂肪組織からADRCsの分離

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)
(1 ml)

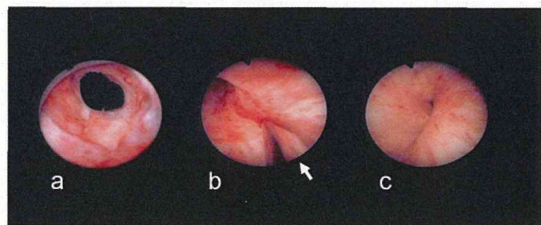


図4 ADRCsの傍尿道注入

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洩れますか(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？
(あてものを使うかわりにかわらず、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
そこなわれていますか？
- 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(平成23年3月15日承認:厚生労働省発医政0315第3号)。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14例、女性4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11例、前立腺肥大症に対する手術後の腹圧性尿失禁3例、女性患者は真性腹圧性尿失禁4例であった。

2. 治療効果に関する成績

実施した男性 14 例、女性 4 症例の治療成績、安全性について評価を行った。女性 4 例についてはフォローアップ期間が短いため、男女別に解析した。

(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、ADRCs の抽出時間は 73~118 分、平均 97.6 分、傍尿道注入時間は 17~54 分、平均 28.7 分であった (図 6)。

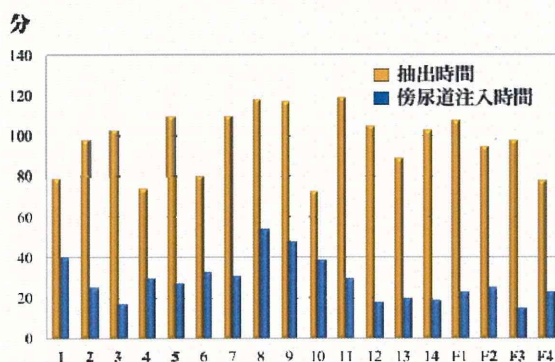


図 6 ADRCs 抽出時間と傍尿道注入時間

(2) 脂肪組織から分離された ADRC 細胞数

各例において、Celution System により抽出した細胞数は $7.3 \times 10^6 \sim 7.0 \times 10^7$ 個であり、そのうち viable 細胞数は $6.7 \times 10^6 \sim 6.3 \times 10^7$ 個であった。

(表 1)。抽出した細胞液の一般培養 (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。

症例	細胞数	viable cells数	%
1	7.5×10^6	7.0×10^6	93.8
2	7.5×10^6	7.0×10^6	93.8
3	7.3×10^6	6.7×10^6	91.3
4	2.5×10^7	2.3×10^7	94.2
5	2.4×10^7	2.2×10^7	89.7
6	3.3×10^7	3.0×10^7	90.2
7	2.2×10^7	2.0×10^7	91.2
8	2.0×10^7	1.8×10^7	90.1
9	1.8×10^7	1.6×10^7	90.0
10	2.3×10^7	2.0×10^7	88.6
11	3.3×10^7	3.0×10^7	90.8
12	7.0×10^7	6.3×10^7	90.0
13	3.2×10^7	2.9×10^7	90.6
14	3.2×10^7	3.0×10^7	93.8
F1	4.0×10^7	3.7×10^7	92.5
F2	2.5×10^7	2.3×10^7	92.0
F3	4.0×10^7	3.7×10^7	92.5
F4	4.0×10^7	3.7×10^7	92.5

表 1 : ADRCs 抽出細胞数と生存細胞数

(3) 尿失禁量の変化 (24 時間尿失禁量) (図 7、図 8、図 9、図 10)

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 14 例でのフォローアップ期間は 9 か月~3 年 10 か月であった。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。術後 1 年以上経過した症例については、1 年以上の経過では尿失禁状態は安定し、大きな変化を認めない。術後 1 年における 1 日尿失禁量評価の比較では (2 例は術後 9 ヶ月)、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経時的に減少し、術後 1 年では平均 244.5g から 171.4g (70%) に減少した (図 8)。尿失禁量は 14 例中 10 例 (71.4%) で改善し、平均 193.8g から 73.3g (37.8%) へ減少し、減少率は 62.2% であった (図 8)。他方、4 例では、尿失禁量の改善はみられなかった (図 8)。改善例中 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ていない。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9)。前述のように、尿失禁量は14例中10例(71.4%)で改善したが、尿失禁量が50%以上改善した症例は14例中9例(64.3%)であった。なお、改善例中尿失禁量が50%以上改善した症例は10例中9例(90%)であった。

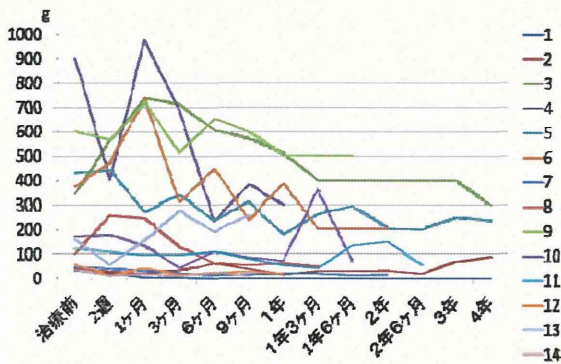


図7 男性例における尿失禁量/24時間の治療前後の経時的変化

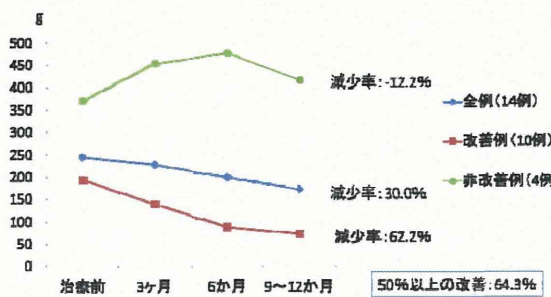


図8 男性例における尿失禁量/24時間の治療前後の経時的変化(1年までの変化)

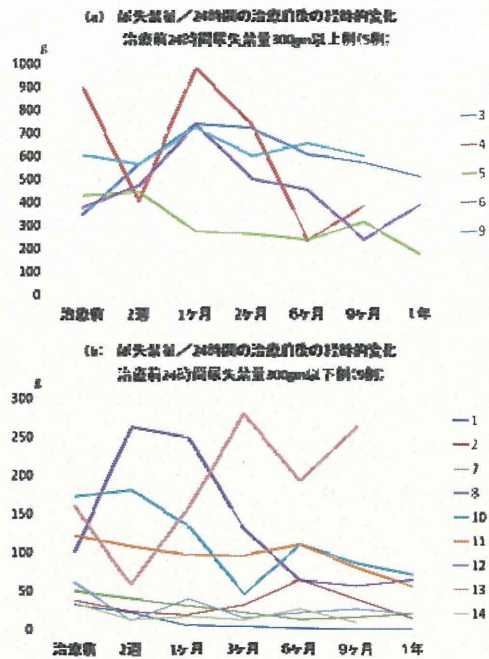


図9 男性例における治療前尿失禁量別の治療成績

女性4例については(図10)、術後経過観察期間が短く、中間評価となるが術後3ヶ月の時点で、70→95g(F1)、5.3→12.8g(F2)、19.4→2.8g(F3:3ヶ月)、25.8→0.5g(F4)と4例中2例(50%)で改善中である。

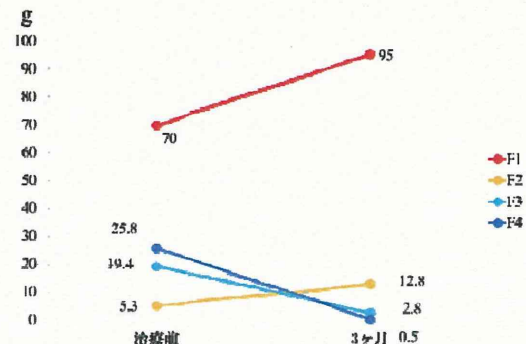


図10 女性例における尿失禁量/24時間の治療前後の経時的変化

(5) 他覚的外尿道括約筋機能の変化
(図 11、12、13、14)

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 (図 11、12)。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 35.9cm から 46.4 cmH₂O ($p<0.01$)、尿失禁改善群では平均 36.9 から 49.9 cmH₂O ($p<0.01$)、尿失禁非改善群で平均 33.5 から 37.5 cmH₂O (n.s.) といずれも改善 (増加) した (図 13)。また、機能的尿道長は、全例では平均 16.9 から 24.0mm ($p<0.01$) と改善、尿失禁改善群では平均 16.2 から 24.7mm ($p<0.01$)、尿失禁非改善群では平均 18.8 から 23.3 mm (n.s.) と改善した (図 14)。

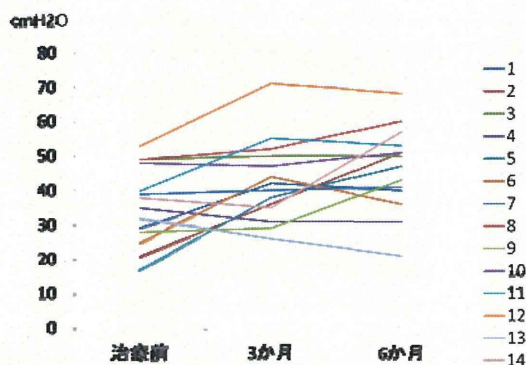


図 11 男性例における MUCP (最大尿道閉鎖圧) の変化

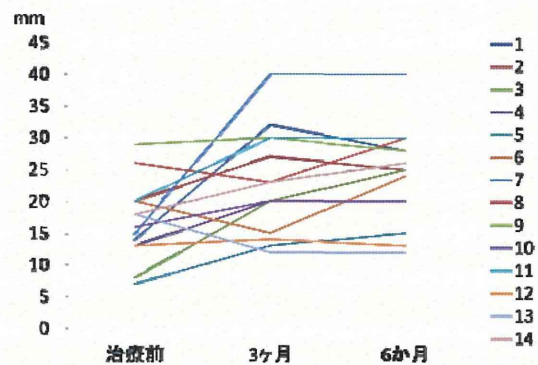


図 12 男性における FPL (機能的尿道長) の変化

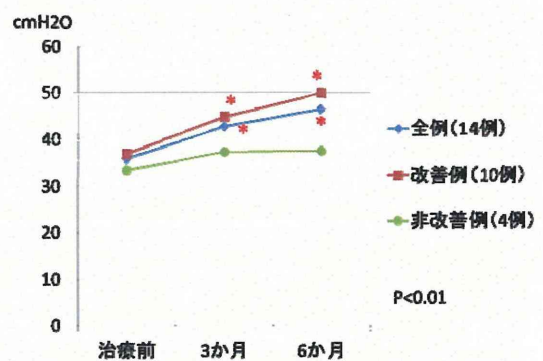


図 13 男性における尿失禁量改善の有無による MUCP の変化

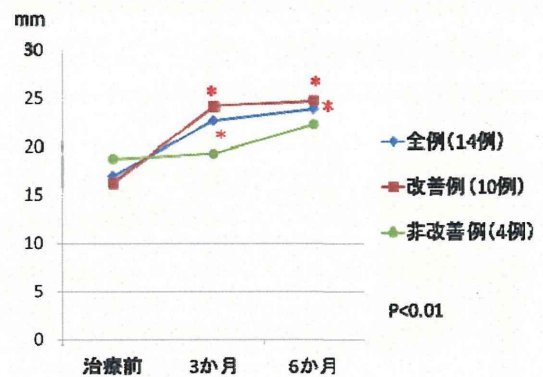


図 14 男性における尿失禁量改善の有無による FPL の変化

女性例では、最大尿道閉鎖圧／機能的尿道長は、23→34cmH₂O／25→26.3mm (F1)、47→46cmH₂O／28.0→30.2mm (F2)、42→55cmH₂O／26→30mm (F3)、23→47cmH₂O／25→26.3mm (F4) と最大尿道閉鎖圧(図15)は4例中3例、機能的尿道長(図16)は全例で改善中である。

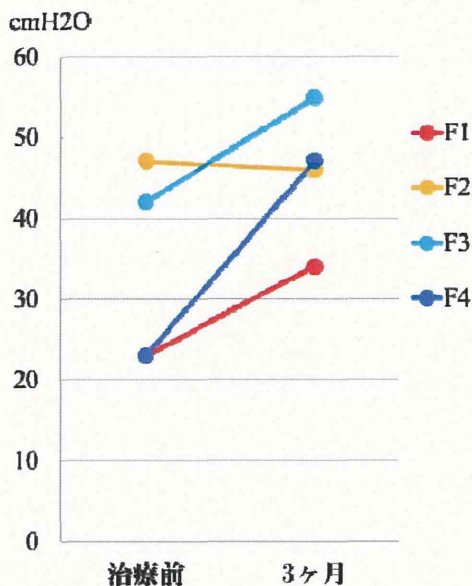


図15 女性例での最大尿道閉鎖圧の変化

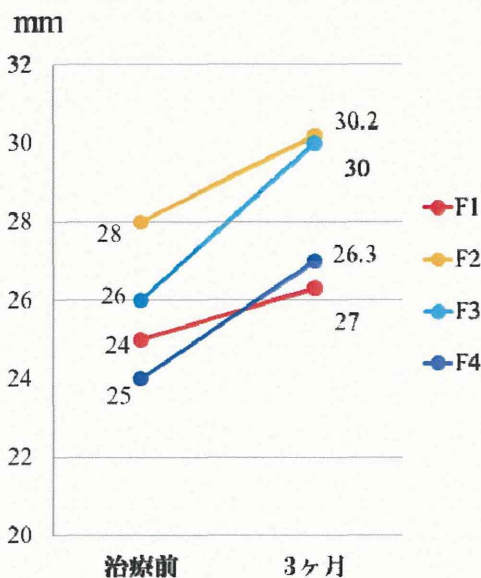


図16 女性例での機能的尿道長の変化

(6) 自覚症状・QOLの変化(図17、18、19、20)

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、男性では、全14例で、治療前と治療1年後評価時(2例は9ヶ月)において、平均総スコアが14.6から12.4ポイントへ減少(改善)した。尿失禁量の改善した10例では平均総スコア13.3から10.6ポイントへ減少(改善)したが、尿失禁量改善のない4例については平均総スコア18.0から18.0ポイントと変化がみられなかった(図17)。

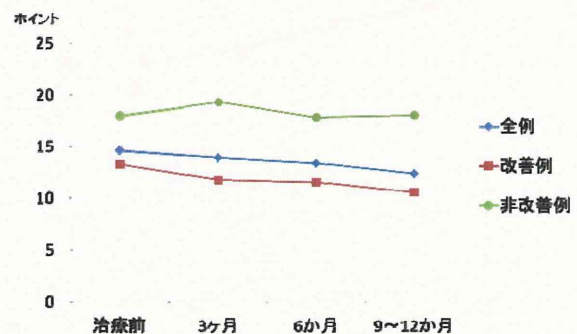


図17 尿失禁量改善の有無による自覚症状・QOL質問票 (ICIQ-SF) 総スコアの変化

ICIQ-SFの個別項目については、尿失禁頻度の項目では、全14例で平均スコアが4.7から3.6ポイントへ減少(改善) ($p<0.05$)、尿失禁量の改善した10例では平均スコア4.6から3.3ポイントへ減少(改善) ($p<0.05$)したが、尿失禁量改善のない4例については平均スコア5.0から4.7ポイントと改善は軽度であった(図18)。尿失禁程度の項目では、全14例で平均スコアが4.2から3.8ポイント、尿失禁量の改

善した 10 例では平均スコア 3.8 から 3.2 ポイントへ減少（改善）したが、尿失禁量改善のない 4 例については平均スコア 5.3 から 5.7 ポイントと改善はみられなかった（図 19）。QOL の項目では、全 14 例で平均スコアが 5.7 から 4.9 ポイント、尿失禁量の改善した 10 例では平均スコア 4.9 から 3.8 ポイントへ減少（改善）したが、尿失禁量改善のない 4 例については平均スコア 7.8 から 8.3 ポイントと改善はみられなかった（図 20）。

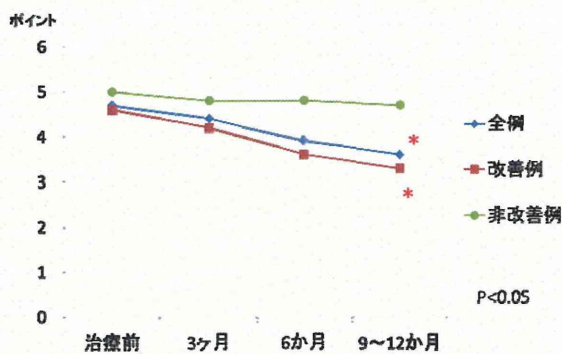


図 18 尿失禁量改善の有無による ICIQ-SF 尿失禁頻度スコアの変化

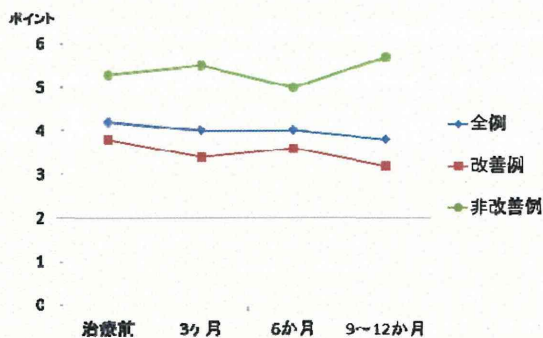


図 19 尿失禁量改善の有無による ICIQ-SF 尿失禁程度スコアの変化

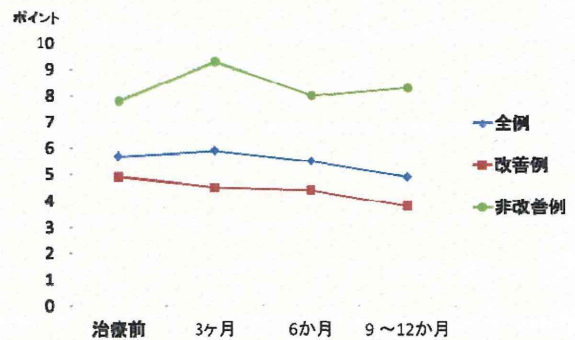


図 20 尿失禁量改善の有無による ICIQ-SF 尿失禁 QOL スコアの変化

女性例 4 例では、尿失禁量が改善中である 2 例（F3 と F4 症例）では、ICIQ-SF（頻度/程度/QOL/総スコア）は、それぞれ術前 4/4/7/15 から術後 3 ヶ月 4/2/2/8、術前 4/4/5/13 から術後 2 週間 0/0/0/0 へ改善中である。また、尿失禁量の改善のみられていない F1 症例では、ICIQ-SF は術前 4/2/8/14 から術後 3 ヶ月 5/4/10/19 と改善がみられていないが、尿失禁量改善のない F2 症例では、術前 4/4/7/15 から術後 3 ヶ月 4/2/4/10 と改善中である。

（7）注入部における血流の変化（図 21、22）

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、12 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、男性 14 例中 13 例で認められた。女性 3 例中 2 例で改善傾向が見られた。1 例は術後評価未である。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 11、症例 F1 以外では血流の増加がみられた。

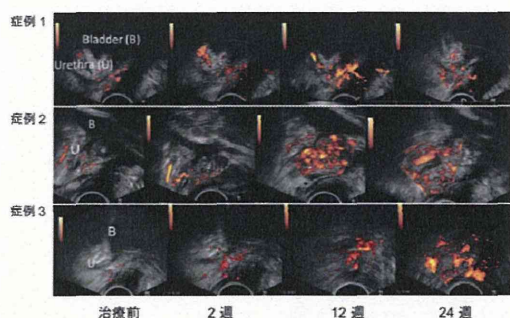


図 21 経直腸的造影超音波検査による、注入部の血流の評価

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。

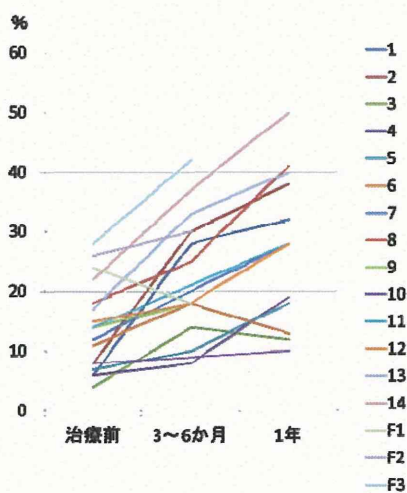


図 22 超音波検査による注入部血流の数値化による変化

(8) 注入した脂肪組織の MRI による確認 (図 23)

MRI は ADRCs 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。

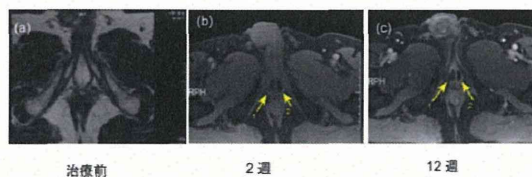


図 23 MRI による傍尿道注入脂肪組織
注入された脂肪組織は 12 週後も存在し、増加傾向は認めない。

(9) 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、11 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、14 例中 13 例で最新観察時まで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。

前立腺癌術後尿失禁に対する治療例 1 例において、術後 PSA が生化学的再発基準を超える 0.471ng/ml となったが、MRI では臨床的局所再発は認めず、また、治療前に基準値以下ではあるが PSA の継続的上昇がみられたことから (0.020→0.037→0.049)、前立腺癌治療後の自然経過における再発で、本治療との直接的因果関係はないものと考えられる。上昇が続くようであれば、標準的内分泌治療を行う予定で、生命予後は問題ないと考えられる。なお、本事象については、学内倫

理委員会、厚生省に報告済であり、因果関係はないものとの判断を得ている。また、内分泌治療開始後2ヶ月でPSAは測定感度以下に低下している。

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

現在までに実施した 18 症例においては、特に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 14 例中 10 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。女性 4 例ではフォローアップ期間が短いため有効性については、さらに経過観察が必要であるが、3 ヶ月までの経過観察では 2 例で尿失禁量の改善がみられ、4 例で尿道機能の改善がみられている。尿失禁改善効果は、注入直後ではなく、注入後 1～3 ヶ月程度で出現し、以後徐々に増強し 6 ヶ月～1 年に最大に達する傾向であり、再生治療効果によるものと考えられる。

尿失禁改善効果は、尿道括約筋機能の改善によるが、ADRCs 傍尿道注入治療による尿道括約筋機能改善のメカニズムとしては、preclinical study として行った動物実験の結果も合わせ、(1) 脂肪・ADRCs 混合液の尿道粘膜下注入による bulking 効果、(2) 尿道括約筋に注入した ADRCs の平滑筋への分化、(3) ADRCs により産生されるサイトカインによる paracrine effect、特に局所の血流増加による括約筋機能改善、によるものと推定される。

世界初の本 ADRCs 傍尿道注入による腹圧性尿失禁治療は安全で有望な再生治療と考えられる。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 ADRCs 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。現在、医師主導型試験のために PMDA と事前相談中であり、次年度は PMDA との本相談を経て、多施設

による医師主導型治験の実施を計画している。

F. 研究発表

1. 論文発表

Gotoh M, Yamamoto T, Kato M, Majima T, Toriyama K, Kamei Y, Matsukawa Y, Hirakawa A, Funahashi Y:

Regenerative treatment of male stress urinary incontinence by periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells: 1-year outcomes in 11 patients.

Int J Urol. 21(3):294-300, 2014

2. 学会発表

(1) Gotoh M: Regenerative treatment of stress urinary incontinence using autologous adipose-derived stem cells. Annual meeting of European Urological Association, 2013/3/15、ミラノ、イタリア

(2) Gotoh M, Yamamoto T, Matsukawa Y, Funahashi Y: Regenerative treatment of stress urinary incontinence using adipose-derived regenerative cells: outcome at 1-year follow-up 2013 Annual meeting of American Urological Association, 2013/5/5、サイディエゴ、米国

(3) Gotoh M, Yamamoto T, Matsukawa Y, Toriyama K, Kamei Y, Funahashi Y: Periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells for the treatment of male stress incontinence: outcome of preliminary clinical trial.

2013 ICS meeting, 2013/8/28, バルセロナ、スペイン

(4) Gotoh M: Male and female stress urinary

incontinence treatment using ADRCs.

Cell Society Europe Meeting, 2013/11/1, マルセイユ、フランス

(5) 後藤百万 皮下脂肪組織由来再生(幹)細胞の傍尿道注入による腹圧性尿失禁治療 第13回日本再生医療学会総会, ランチョンセミナー, 2014/3/4、京都

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、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) 脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有する細胞製剤(国立大学法人名古屋大学、特許第5240715号)

(3) 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(国立大学法人名古屋大学、特許第5035737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

腹圧性尿失禁に対する脂肪組織由来幹細胞を用いた再生治療に
おける新規・筋分化バイオマーカの開発
-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
亀井 譲 名古屋大学大学院医学系研究科 形成外科学 教授

研究要旨

前年度は腹圧性尿失禁の再生治療に用いる脂肪由来幹細胞 (ASCs) から FABP が分泌され、オートクリーン、パラクリーンに作用して、筋分化を促進することを遺伝子解析 (カスケード解析) を用いて *in vitro* で明らかにした。今回は、筋分化について、さらにネットワーク解析及び Expression profile 解析を用いて確認した。次に、メタボローム解析を行い、この現象は、ASCs が脂質の分解、取り込み、TCA 回路亢進を介して行っていることを明らかにした。In vivo において FABP は、代謝亢進を介した ASCs の新規・筋分化バイオマーカとなる可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究は、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を (再生細胞 : Adipose Derived Regenerative Cells : ADRCs) 分離採取し、経尿道的内視鏡下に膀胱尿道に注入・移植することで、尿道括約筋再生により尿失禁の改善を図ることを目標とする。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ことが明らかとなり、ASCs 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 (E 型とも呼ばれる) 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 を用いた A-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。

本報告書では、下記内容について述べる

- 1) ヒト脂肪由来幹細胞に関連する微小環境因子・脂肪酸結合蛋白 (FABP) を検出する抗体の大量調製
- 2) ヒト脂肪由来幹細胞に関連する微小環境因子・脂肪酸結合蛋白 (FABP) の検出系構築
- 3) ヒト脂肪由来幹細胞に関連する微小環境因子・脂肪酸結合蛋白 (FABP) の高次構造解析
- 4) ヒト脂肪由来幹細胞に関連する微小環境因子・脂肪酸結合蛋白 (FABP) に対する特異抗体を用いた発現解析

B. 研究方法と結果

1. ヒト脂肪由来幹細胞に関連する微小環境因子・脂肪酸結合蛋白 (FABP) を検出する抗体の大量調製

1-1. マウスへの C-FABP 免疫

取得したヒト C-FABP 組換え蛋白質を用いて3匹の MRL/MpJ マウスに免疫を行った。免疫スケジュールを図1に示す。

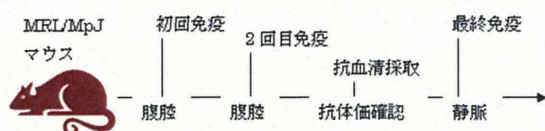


図1. 免疫スケジュール

1-2. 抗体価確認

2 回目免疫の 10 日後に採取した免疫マウス血清に対して、ELISA アッセイとドットブロット及びウエスタンブロットを用いて、C-FABP に対する抗体価を確認した。

a. ELISA アッセイ

タンパク質固相化用プレートに C-FABP 及び L-FABP を固相化したプレートを作製した。一方、得られた3匹のマウスからそれぞれ血清を採取し (A, B, C)、3倍から100倍希釈の系列を作製し、本固相化プレートに添加して反応性を確認した。図2に血清の抗体価確認の結果を示す。グラフはマウス A, B, C をそれぞれ青, 緑, 赤のラインで示し、コントロールとして Normal Mouse Serum (NMS) を評価した。

その結果、C-FABP に対しては3匹ともほぼ同等の抗体価上昇が確認された。L-FABP に対しては、マウス A のみ抗体価が低く、他の2匹は同様の抗体価が確認された。

b. ドットブロット

精製した C-, L-FABP と市販の I-, H-, B-FABP を親水化した PVDF 膜上に任意の濃度で液滴を作成した (メンブレン上の FABP 配置図は図3の上に示す)。膜上の液滴が乾燥したことを確認後、5% スキムミルクを含んだ TBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20) で30分間ブロッキングを行った。ブロッキング後、メンブレンを TBS-T で3回洗浄し、Can Get Signal (Wako) Solution 1 で1000倍に希釈したマウス抗血清 A, B, C をそれぞれ反応させ、室温で1時間静置した。反応後、メンブレンを TBS-T で3回洗浄を行い、Can Get Signal Solution 2 で2000倍に希釈した Anti mouse IgG, HRP linked Antibody を反応させ、室温で1時間静置した。反応後、メンブレンを TBS-T で3回洗浄を行い、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents

を用いて発光させバンドを検出した(図3の最下段)。なお、メンブレンへのFABPの固定の確認のため弊社保持のC-FABP pAbを用いて検出を行った(図3の中段)。その結果、マウスA, B, Cどの抗血清においてもC-FABPに対するドットが確認された。一方L-FABPに対してはどの血清も反応性を示していたが、強度としてはマウスB, C > Aとなっており、これはELISAの結果と一致した傾向となった。また、I-, H-, B-に対しても共通して反応性が確認されており強度としてはB>C>Aであった。

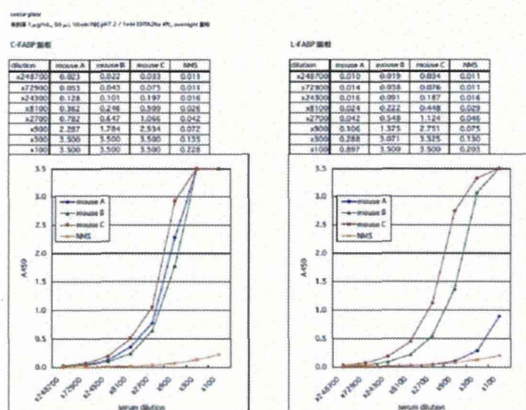


図2. マウス抗血清のELISA検定

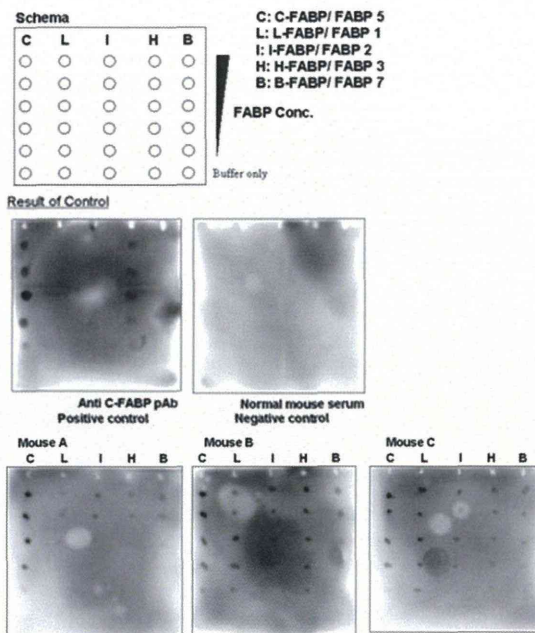


図3. マウス抗血清のドットプロット検定

c. ウェスタンブロット

上記ドットプロットと同様に各種 FABP を任意の濃度で NuPAGE 4-12%ビス-トリ スゲルにアプライし、NuPAGE MES SDS ランニングバッファーにて 200 V, 35 分間電気泳動を行った。泳動後、ゲルを PVDF 膜に転写した。以下の作業は上記ドットプロットと同様のプロトコルにて検出を行った(図4)。その結果、どのマウス抗血清においても C-FABP に対する反応性が確認された。一方 L-FABP に対してはどの血清も反応性を示していたが、強度としてはマウス B, C > A となっており、これは ELISA, ドットプロットの結果と一致した傾向となった。また、マウス B, C においては I-, H-, B-に対しても共通して反応性が確認されており、マウス A は僅かに B-FABP への反応性が確認された。

以上より、C-FABP に比較的強く反応するマウス A と、他の FABP タイプにも広

く反応するマウス B を次の工程に進めることとした。

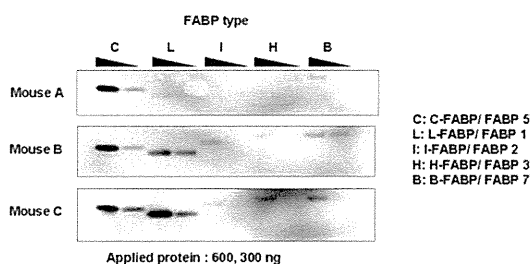


図4. マウス抗血清のウェスタンブロット検定

1-3. 細胞融合

マウス A, B から脾臓を採材し、B 細胞を取得した。本細胞を標準的な PEG 法を用いてミエローマ細胞と細胞融合させ、抗体産生細胞を作製した。得られた細胞について ELISA 及び、ドットブロットを用いて抗体のスクリーニングを行った。上記と同様の方法で ELISA, ドットブロットを実施したまとめを表 1 に示す。その結果 C-FABP に特異的に反応する抗体産生細胞を 9 クローン、様々な FABP タイプに広く反応する抗体産生細胞を 10 クローン取得した。

表1. 抗C-FABP抗体産生融合細胞スクリーニング

Clone No	ELISA screening (OD value)			Dot Blot						
	C-FABP	L-FABP	Empty	L-	A-	C-	I-	H-	B-	
TA-A	3.500	0.018	0.014	-	-	-	-	-	-	
TA-B	0.294	1.627	0.014	-	-	-	-	-	-	
TA-C	0.323	3.114	0.012	-	+	-	-	-	-	
TA-D	0.223	2.696	0.014	++	+	-	-	-	-	
TA-E	0.220	2.696	0.013	-	+	-	-	-	-	
TA-F	0.187	3.114	0.014	-	+	-	-	-	-	
TA-G	0.016	0.026	0.015	-	-	-	-	-	-	
TA-H	3.074	0.018	0.013	-	+	++	-	+	-	
TA-I	0.018	2.578	0.014	-	-	-	-	-	-	
TA-J	0.064	3.209	0.015	-	++	+	-	-	-	
TA-K	3.500	0.035	0.015	-	-	++	-	-	-	
TA-L	0.040	0.027	0.013	-	-	-	-	-	-	
TA-M	0.039	0.021	0.013	-	-	-	-	-	-	
TA-O	0.252	3.446	0.013	-	+	-	-	-	-	
TA-P	3.272	0.029	0.012	-	-	++	-	-	-	
TA-Q	0.034	0.039	0.012	-	-	-	-	-	-	
TA-R	3.500	0.026	0.013	-	-	++	-	+	-	
TA-S	2.739	0.025	0.013	-	-	-	-	-	-	
TA-T	3.15	0.028	0.012	-	-	-	++	-	-	
TA-U	0.022	0.307	0.013	-	-	-	-	-	-	
TA-V	3.444	0.026	0.017	-	-	++	-	-	-	
TA-W	3.500	0.023	0.014	-	-	++	-	-	-	
TA-X	3.110	0.028	0.013	-	-	-	-	-	-	
TA-Y	0.466	0.026	0.014	-	-	-	-	-	-	
TA-Z	0.036	0.025	0.014	-	-	-	-	-	-	
TA-AA	3.500	0.026	0.013	-	-	++	-	-	-	
TA-AB	0.032	0.018	0.013	-	-	-	-	-	-	

1-4. 作製抗体の大量調製

1-3 で取得したクローンのうち、C-FABP に対する反応特異性の強い Clone No. TA-A, TA-K, TA-W と、他のアイソタイプ

にも反応する TA-J, TA-R について再度クローニングを行った後、マウス腹水化し精製を行うことで抗体の大量調製を行った。

マウス腹水化は 7~8 週齢のヌードマウスにプリスタン を 0.5mL/匹で腹腔内接種した。2~3 週間後、マウスに抗体産生細胞を 1×10^7 個腹腔内に接種した。さらに約 2 週間後、マウスが腹水化されたところで腹水を採取し、得られた腹水は硫酸塩析法により抗体の精製を行った。精製された抗体の IgG クラスはマイクロオクタニー法によって同定した。その結果、表 2 に示すように IgG1 の TA-A, TA-R と、IgG2a の TA-K, TA-W 及び、IgM の TA-J のモノクローナル抗体を取得した。

これらの抗体の反応性を確認するために、C-FABP 抗原を用いたタイトレーションアッセイを行った。各種抗原 (C-FABP, L-FABP) を $1 \mu\text{g/mL}$ (10mM PBS, 1mM EDTA1Na, pH7.2) $50 \mu\text{L/well}$ でプレートに分注し、 4°C で一晩静置して抗原固相化プレートを作製した。本固相化プレートを用い、洗浄及びブロッキングを行った後、1 次反応として抗体濃度 $3 \mu\text{g/mL} \times 3$ 倍希釈系列、 $50 \mu\text{L/well}$ で分注し、室温にて 1 時間反応させた。反応プレートを洗浄後、次いで 2 次反応として、HRP 標識抗マウス IgG+M ポリクローナル抗体を $50 \mu\text{L/well}$ で室温にて 1 時間反応させた。反応プレートを洗浄後、TMB 試薬 (ScyTek) を分注し、室温にて 30 分間発色反応を行った。本タイトレーションアッセイの結果を図 5 に示す。その結果、IgM である TA-J は L-FABP に特異的な抗体であることが判明し、その他 4 種類は C-FABP 特異的な親和性を持つ抗体であることが確認された。さらに

上記4種の抗体については図6においてC-FABPのSDS-PAGE後ウエスタンブロットすることで反応を確認した。

表2. 精製モノクローナル抗体のIgクラス

No.	Clone No.	Ig class
1	TA-A	IgG1 (κ)
2	TA-J	IgM (κ)
3	TA-K	IgG2a (κ)
4	TA-R	IgG1 (κ)
5	TA-W	IgG2a (κ)

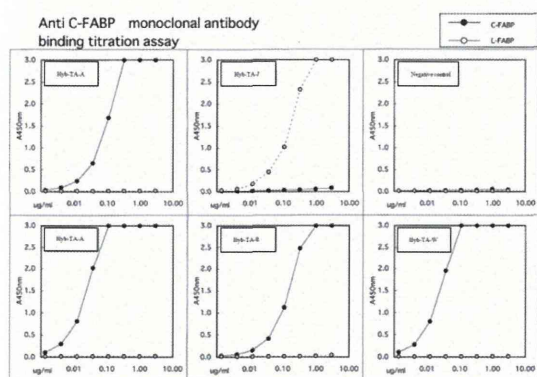


図5. 精製モノクローナル抗体を用いた比活性検定

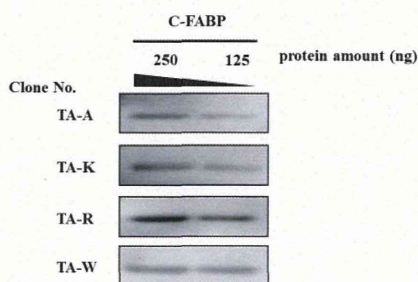


図6. 精製モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット
1st anti-body : Anti C-FABP mAb (x 2000 dilution)
2nd anti-body : Anti mouse IgG-HRP (x 2500 dilution)

2. ヒト脂肪由来幹細胞に関連する微小環境因子・脂肪酸結合蛋白(FABP)の検出系構築

2-1. サンドイッチ ELISA 系の設計

上記「1. ヒト脂肪由来幹細胞に関連する微小環境因子・脂肪酸結合蛋白(FABP)

を検出しようとする抗体の大量調製」の項で得られた抗ヒト C-FABP マウスモノクローナル抗体 4 種を用い、サンドイッチ ELISA 法によって試料中 C-FABP 量を測定する系を構築した。今回は感度の上昇を図るためビオチン-アビジン反応系を用いた検出系を設計した(図7)。

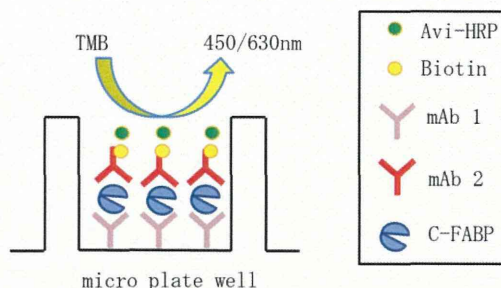


図7. C-FABP検出ELISA系の設計

2-2. アッセイ構築条件検討

a. ビオチン標識検出抗体の調製

4 種のモノクローナル抗体それぞれに対して Biotin Labeling kit-NH2 (DOJINDO, LK03) を用いて抗体のビオチン化を行った。方法はキット添付操作マニュアルに従って行った。

得られたビオチン化抗体のビオチン化を確認するために、C-FABP 直接固相化 ELISA を行った。50 mM 炭酸・炭酸水素緩衝液, pH9.6 を希釈液として、C-FABP を 100ug, 10ug, 1ug, 100ng, 10ng, 1ng, 0.1ng, 0ng /well となるように C8 MAXISORP NUNC-IMMUNOMODULE (Thermo SCIENTIFIC, 445101) に分注し、4°Cで一晩固相化反応を行った。抗原固相化プレートを PBS-T (0.1 M リン酸緩衝液, pH7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) 300 μL/well x 3 回洗浄を行った。次にブロッキングバッファー (0.1 M リン酸緩衝液, pH7.6, 150 mM NaCl, 2% BSA) を 200 μL/well で添加し、25°Cにて 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、PBS-T を用いて 3 回洗浄を行い、