

図32 代謝物経路図に描画されなかった代謝物質
 HMT代謝物ライブラリに登録されてが、代謝経路に描画されなかった物質を示す。
 グラフは左から順にコントロール(青色)、C-FABP添加(緑色)、A-FABP添加(橙色)の相対面積値を示す。

4-2-4. LC-TOFMS 解析

本試験では、ポジティブモード、ネガティブモードのLC-TOFMS 測定を以下に示す条件で行った。得られたピーク強度から判断して、注入量は1 μ Lとした。陽イオン性代謝物質 (ポジティブモード) 装置

LC system : Agilent 1200 series RRLC system SL (Agilent Technologies 社)
 Column : ODS column, 2 \times 50 mm, 2 μ m
 MS system : Agilent LC/MSD TOF (Agilent Technologies 社) 4 号機

測定条件

Column temp. : 40 $^{\circ}$ C
 Mobile phase : A : H₂O / 0.1% HCOOH
 Mobile phase : B : Isopropanol:
 Acetonitrile: H₂O (65:30:5) / 0.1%
 HCOOH, 2 mM HCOONH₄
 Flow rate : 0.3 mL / min
 Run time : 20 min
 Post time : 6 min
 Gradient condition : 0-0.5 min : B 1%,
 0.5-13.5 min : B 1-100%, 13.5-20 min :
 B 100%
 MS ionization mode : ESI Positive
 MS Nebulizer pressure : 40 psi

MS dry gas flow : 10 L / min
 MS dry gas temp : 350 $^{\circ}$ C
 MS capillary voltage : 4,000 V
 MS scan range : m/z 100-1,700

陰イオン性代謝物質(ネガティブモード)装置

LC system : Agilent 1200 series RRLC system SL (Agilent Technologies 社)
 Column : ODS column, 2 \times 50 mm, 2 μ m
 MS system : Agilent LC/MSD TOF (Agilent Technologies 社) 4 号機

測定条件

Column temp. : 40 $^{\circ}$ C
 Mobile phase : A : H₂O / 0.1% HCOOH
 Mobile phase : B : Isopropanol:
 Acetonitrile: H₂O (65:30:5) / 0.1%
 HCOOH, 2 mM HCOONH₄
 Flow rate : 0.3 mL / min
 Run time : 20 min
 Post time : 6 min
 Gradient condition : 0-0.5 min : B 1%,
 0.5-13.5 min : B 1-100%, 13.5-20 min :
 B 100%
 MS ionization mode : ESI Negative
 MS Nebulizer pressure : 40 psi
 MS dry gas flow : 10 L / min
 MS dry gas temp : 350 $^{\circ}$ C
 MS capillary voltage : 4,000 V
 MS scan range : m/z 100-1,700

a. データ処理

検出されたピークは、自動積分ソフトウェアのMasterHands ver. 2.13.0.8.h (慶應義塾大学) を用いて、シグナル/ノイズ (S/N) 比が3 以上のピークを自動抽出し、質量電荷比 (m/z)、ピーク面積値、保持時間 (Retention time: RT)を得た。得られたピーク面積値は下記の式を用いて相

対面積値に変換した。また、これらのデータにはNa⁺やK⁺などのアダクトイオン及び、脱水、脱アンモニウムなどのフラグメントイオンが含まれているので、これらの分子量関連イオンを削除した。しかし、物質特異的なアダクトやフラグメントも存在するため、すべてを精査することはできなかった。精査したピークについて、*m/z* とRT の値をもとに、各試料間のピークの照合・整列化を行った。

$$\text{相対面積値} = \frac{\text{目的ピークの面積値}}{\text{内部標準物質の面積値} \times \text{細胞数}}$$

b. 候補代謝物質検索

検出されたピークに対して *m/z* とRT の値をもとに代謝物質ライブラリに登録された全物質との照合、検索を行った。検索のための許容誤差は RT で ± 0.5 min、*m/z* で ± 10 ppmとした。

$$\text{質量誤差 (ppm)} = \frac{\text{実測値} - \text{理論値}}{\text{実測値}} \times 10^6$$

培養細胞 3 検体についてLC-TOFMS によるメタボローム解析を行った。HMT 代謝物質ライブラリに登録された物質の*m/z* 及びRT の値から20 ピークに候補化合物が付与された (表8)。

表8. 候補化合物が絞り込まれた代謝物質

ID	Compound name	HMT DB†	
		C-FABP添加LCvsコントロールLC	A-FABP添加LCvsコントロールLC
P_0005	Oleoyl ethanolamide	1.1	1.3
P_0017	Triaurin	1.0	0.9
P_0006	Stearoyl ethanolamide	1.0	0.9
N_0008	Stearic acid	1.5	1.4
N_0004	Palmitic acid	1.9	1.4
P_0003	Palmitoyl ethanolamide	1.0	0.9
N_0024	1-Palmitoyl-glycerol-3-phosphoethanolamine	1.1	1.2
P_0014	1-Oleoyl-glycerol-3-phosphocholine	0.8	1.3
P_0021	1,2-Distearoyl-glycerol-3-phosphocholine	1.0	0.7
P_0010	Palmitoyl carnitine	1.6	0.8
P_0002	Sphingosine	0.8	0.9
P_0015	1-Hexadecyl-2-acetyl-glycerol-3-phosphocholine	1.0	0.9
P_0012	1-Hexadecyl-glycerol-3-phosphocholine	0.9	1.1
P_0013	1-Palmitoyl-glycerol-3-phosphocholine	0.9	1.0
P_0018	Sphingomyelin(d18:1/18:0)	0.8	0.8
N_0026	Cholesterol sulfate	0.9	0.9
P_0016	1-Stearoyl-glycerol-3-phosphocholine	1.0	0.9
P_0019	Sphingomyelin(d18:1/18:0)	0.8	0.7
P_0008	Cholesterol	0.8	0.7
N_0007	Oleic acid	0.9	1.2

c. 候補化合物の描画

描画にはVANTED (Visualization and Analysis of Networks containing Experimental Data) 4)を用いた。絞り込まれた候補化合物をアシルカルニチン、脂肪酸及びその他の物質に分類し、描画した (図33~35)

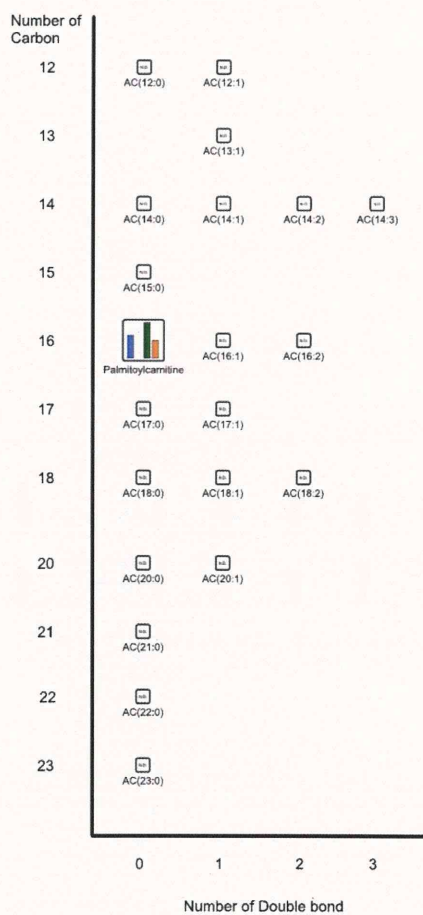


図33 代謝物質の分類図(アシルカルニチン) グラフは左から順にコントロールLC(青色)、C-FABP添加LC(緑色)、A-FABP添加LC(橙色)の相対面積値を示す。N.D.:Not Detected.

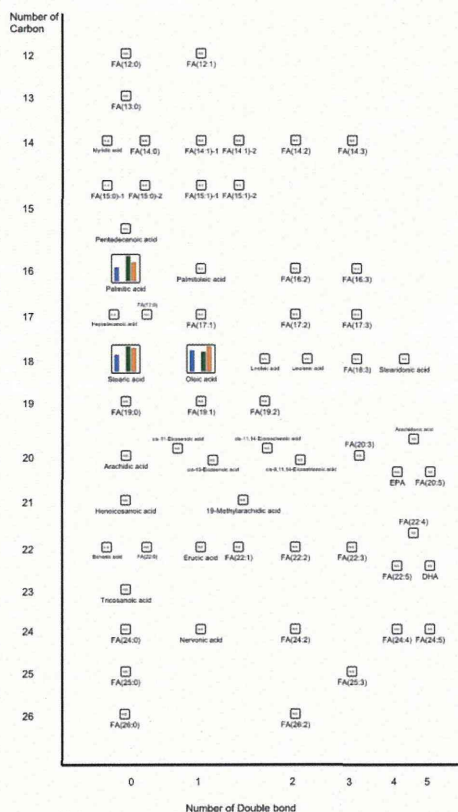


図34 代謝物質の分類図(脂肪酸)
グラフは左から順にコントロールLC(青色)、C-FABP添加LC(緑色)、A-FABP添加LC(橙色)、C-FABP添加のみを示す。N.D.:Not Detected.

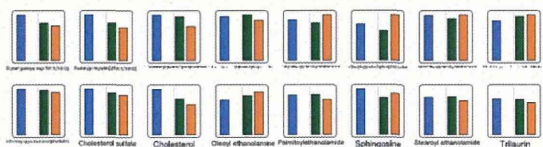


図35 その他の代謝物質
HMT代謝物質ライブラリに登録されているが、アシルカルニチン及び脂肪酸に分類されない物質を示す。
グラフは左から順にコントロールLC(青色)、C-FABP添加(緑色)、A-FABP添加(橙色)の相対面積値を示す。N.D.:Not Detected.

4-3. メタボローム解析の考察

CE-TOFMS と LC-TOFMS 測定の有差検定による群間比較解析の結果、アミノ酸及びその代謝中間体の多くが A-FABP 添加群で高値であった。また、FABP 添加に共通した特徴として、(Glycerol 3-phosphate)G3P や(Dihydroxyacetone phosphate)DHAP の高値が確認されたことから、脂質(主にトリグリセリド)の分解、取り込みの亢進が推測された。また、A-FABP 添加では Choline や Ethanolamine も高値であることから、あわせてリン脂質の分解、取り込みが亢進した可能性も上げられる(図 36, 37)。

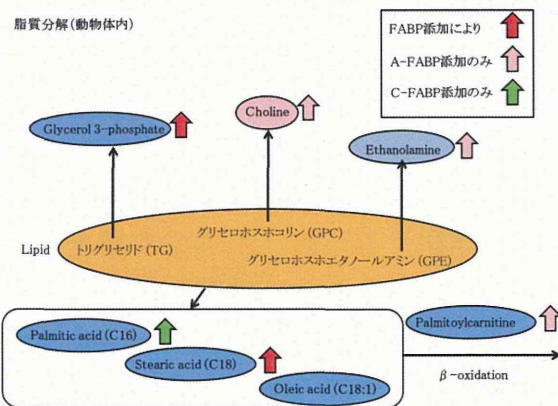


図36. 脂質分解(動物体内)

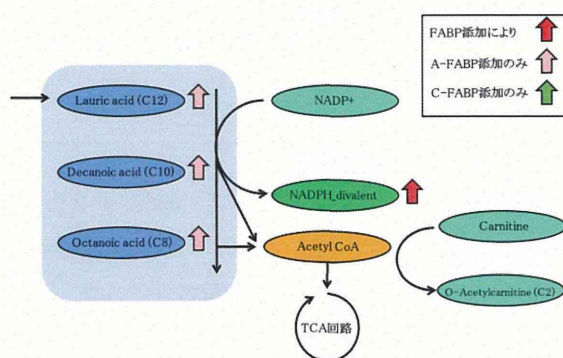


図37. 脂肪酸のβ酸化

さらに、核酸代謝においては、C-FABP 添加群では核酸プールが低値を示しており、C-FABP 添加では DNA 複製や転写活性化によりヌクレオチドの消費が激しくなり、それを補充する役割としてペントースリン酸回路が亢進される可能性が考えられた。さらに、C-FABP 添加群では糖代謝では解糖系上流中間体の蓄積が大きかった。この現象は今回の結果だけで論じるのは困難だが、仮説としては G3P が上昇していることから、解糖系への糖リン酸の供給はこの G3P 由来で補われていることや、ペントースリン酸回路を経由しての NADPH 産生などが考えられる。またグルタチオンの挙動として、GSH と GSSG の量比から GSH が優勢に傾いており、細胞内の酸化還元状態はコントロールとも異なる挙動を示した(図 38)。

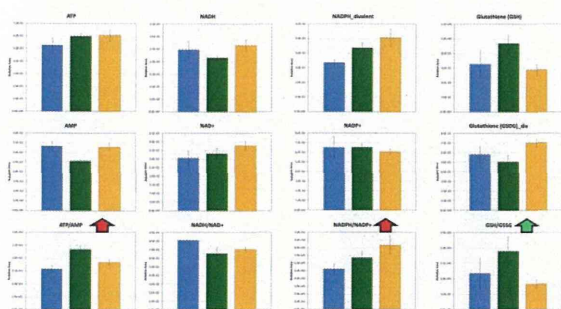


図38. 細胞内のエネルギー状態
 青色棒はコントロール、緑色棒はC-FABP添加群、オレンジ棒はA-FABP添加群を示す。
 上段には左からATP、NADH、NADPH、Glutathione (GSSG)を示し、
 中段には左からATP、NAD⁺、NADP⁺、Glutathione (GS)を示す。
 下段には上段/中段の因子の比を示す。

以上の結果から、本試験では FABP 添加により、脂質、糖、アミノ酸など広範囲な代謝変化が誘導されることを確認した。C-FABP 添加と A-FABP 添加は異なる特徴が観察されており、β酸化の亢進や阻害を断定するためには、Acetyl CoA、Malonyl CoA などの産物・前駆体の挙動を変化条件の強度や時間等のプロファイリング比較を行い、更なる解析が望まれる。

C. 考察

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

5株のハイブリドーマと4種の抗C-FABPモノクローナル抗体を取得した。抗体量としてはそれぞれ数十mgの抗体を確認し、以降の評価に十分な量の取得に成功した。

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

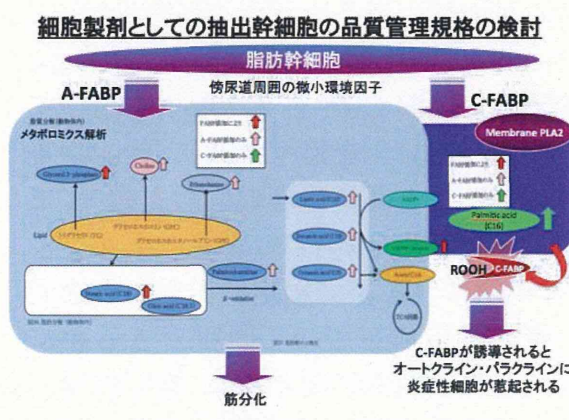
2組のC-FABP検出ELISA系の構築に成功し、試料を測定することでC-FABP特異的なシグナルを確認した。しかし、値付けや感度の問題があるため更なる検

討が必要である。本検討で構築した系をASCsの筋細胞分化の品質管理に利用することを検討する。

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

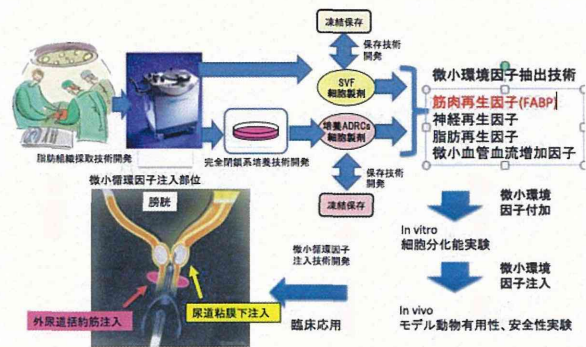
C-FABP 組換え蛋白質を酸化させることで2個のメチオニンが酸化されることが確認された。また、C-FABPが酸化されることでC-FABP ELISA反応性が上昇したことから、抗体認識性に影響を及ぼすC-FABPの高次構造変換が生じた可能性が示唆された。生体内においても同様の酸化修飾が起こりうる場合、C-FABPの高次構造変換が生理機能に影響を及ぼす可能性が考えられた。以上のことから、ASCsの筋細胞分化の品質管理において酸化C-FABPがどのように影響するのかということにも焦点を当てながら検討を行う必要があると考える。

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) を用いた発現解析



カスケード解析のデータを用いたPPIネットワーク解析及びExpression profile解析の結果から、ADSCにA-FABPを添加する事象に筋細胞に発現が確認

される因子を再度確認することができた。また、メタボローム解析の結果から、FABP 添加に共通した現象としては、糖リン酸（解糖系中間体）、長鎖脂肪酸の上昇が確認されたことから、脂質（主にトリグリセリド）の分解、取り込み亢進が推測された。A-FABP 添加特異的な現象としてはアミノ酸や TCA 回路中間体、核酸（三リン酸化）、Choline や Ethanolamine も上昇が確認されことから、リン脂質の分解取り込みも亢進したと推測された。C-FABP 添加特異的な現象としてはプリンヌクレオチド類の減少が確認され、細胞内の GSH/GSSG 比も異なる挙動が確認されたことから、細胞増殖亢進や細胞内酸化還元状態の偏りが推測された。今回の結果だけでは前年度の報告にある ASCs への A-FABP 添加による筋細胞への分化という現象を評価することができなかったが、FABP 添加による脂質の取り込み亢進が起きることや、A-FABP 添加と C-FABP 添加で TCA 回路の依存度が異なる可能性が考えられるため、2 者の間にエネルギー獲得経路の異なる特性をもつ細胞に分化している可能性も考えられた。今後はさらに A-FABP 添加による分化を添加量や共培養時間を検討し、オミクス解析を用いて筋細胞への分化を追うと共に、代謝物質の解析からも品質管理の検討を行う。また、A-FABP 及び C-FABP のオートクライン、パラクラインに細胞に作用する機能を特異的抗体を用いて阻害できるかについての検討も必要となる。腹圧性尿失禁に対する ADRCs が作り出す微小環境因子を活用した治療法、診断法の開発について下記の図に示す。



腹圧性尿失禁症例において、傍尿道周囲に注入する ADRCs から分泌され、筋分化を促進する FABP を測定することによって、FABP が ADRCs を作り出す微小環境を反映する臨床バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

D. 結論

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ーの可能性が示唆された。

E. 研究発表

論文発表

1. Yamamoto T, Gotoh M
Editorial comment to Sacral Neuromodulation Effective Option for Non-Obstructive Urinary Retention In Men with Cerebral Palsy Int J Urol. 2013 in press
2. Funahashi Y, Yoshida M, Yamamoto T, Majima T, Takai S, Gotoh M.
Intravesical Application of Rebamipide Suppresses Bladder Inflammation in a Rat Cystitis Model. J Urol. 2013 Nov 18. doi:pii: S0022-5347(13)05979-X. 10.1016/j.juro.2013.11.026. [Epub ahead of print]

3. Hamasaki Y, Doi K, Maeda-Mamiya R, Ogasawara E, Katagiri D, Tanaka T, Yamamoto T, Sugaya T, Nangaku M, Noiri E, A 5-hydroxytryptamine receptor antagonist sarpogrelate reduces renal tubulointerstitial fibrosis by suppressing PAI-1 *AJP Renal* 2013 Dec 15;305(12):F1796-803.
4. Gotoh M, Yamamoto T, Kato M, Majima T, Toriyama T, Kamei Y, Hirakawa, A, Mastukawa Y, 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.* 2013 Aug 29. doi: 10.1111/iju.12266. [Epub ahead of print]
5. Yamamoto T, Gotoh M. Editorial Comment to Regenerative medicine as a new therapeutic strategy for lower urinary tract dysfunction. *Int J Urol.* 2013 Jul;20(7):675. doi: 10.1111/iju.12173. Epub 2013 May 15.
6. Yamamoto T Editorial Comment to Contrast-enhanced transrectal ultrasonography for the measurement of prostate cancer tumor size in the peripheral zone and correlation with radical prostatectomy specimens *Int J Urol.* 2013 May 20. doi: 10.1111/iju.12164. [Epub ahead of print] No abstract available.
7. Yamamoto T, Funahashi Y, Mastukawa Y, Kato M, Yoshino Y, Gotoh M
NPRETREATMENT OF RENAL SUPSCAPULAR ADMINISTRATION OF ADIPOSE TISSUE-DERIVED STEM CELLS AMELIORATE ISCHEMIA-REPERFUSION-INDUCED ACUTE KIDNEY INJURY *Hirosaki Med. J.* 64 (Suppl.) : S1—S3, 2013
- F. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 - 1) 高濃度脂肪組織由来間葉系幹細胞含有脂肪による声門閉鎖不全の治療 発明者 藤本保志、鳥山和宏、西尾直樹、須賀研治、亀井 譲、高成啓介、後藤百万、山本徳則、岩田義弘、内藤健晴 特許願人 名古屋大学 出願日平成26年2月4日特願2014-019425
 - 2) 精子活性化方法及びその用途 山本 徳則、鈴木 哲、松川 宣久、舟橋 康人、佐藤 義朗、後藤 百万、村瀬 哲磨 特許願人 名古屋大学 出願日平成25年10月25日特願2013-222630
 - 3) 尿路感染症の予防又は治療 山本徳則、柴田玲、瀧 真悟、鈴木哲、舟橋康人、後藤百万 特許願人 名古屋大学 出願日平成25年10月21日特願2013-215980
 - 4) 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25年1月21日特願2013-008355 国際出願2014年1月18日 (PCT/JP2014/050862)

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

脂肪組織由来幹細胞を用いた腹圧性尿失禁治療における
前臨床安全性試験
-脂肪組織由来幹細胞の前立腺癌細胞への影響-

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
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

研究要旨

前年度は腹圧性尿失禁治療に対する脂肪組織由来幹細胞の傍尿道注入治療について、その有効性と安全性を大動物、小動物モデルにおいて確認した。本再生治療においては、対象として前立腺癌術後腹圧性尿失禁症例が含まれることから、今年度は脂肪組織由来幹細胞（脂肪組織由来再生細胞：Adipose-derived regenerative cells: ADRCs）の前立腺癌細胞に対する影響を、in vitro（ADRCs・前立腺癌細胞混合培養上清中の前立腺特異抗原測定）および in vivo（ヌードマウスへの ADRCs と前立腺癌株移植実験）により検討した。その結果、ADRCs は、in vitro 実験における前立腺癌細胞による前立腺特異抗原産生、および in vivo 実験における移植前立腺癌細胞の増殖、いずれも抑制効果を示した。ADRCs 傍尿道注入は前立腺癌術後腹圧性尿失禁症例に対して安全に実施できる臨床治療であることが示唆された。

A. 研究目的

現在、括約筋機能障害による腹圧性尿失禁に対して、脂肪組織由来幹細胞を用いた再生治療を開発中である。本治療は、ヒト脂肪組織由来幹細胞として自己皮下脂肪組織由来再生細胞（ADSCs：adipose-derived regenerative cells）を Celution™ system を用いて分離し、経尿道的内視鏡下に傍尿道に注入・移植し、尿道括約筋再生による尿失禁の改善を図るものである。本治療の対象に前立腺癌術後腹圧性尿失禁症例が含まれるた

め、安全性に関する前臨床研究として、ADRCs の前立腺癌に対する影響を検討した。前立腺癌の腫瘍マーカーである前立腺特異抗原（PSA: prostatic specific antigen）は、前立腺癌の臨床病期、腫瘍悪性度、および予後に相関し、実地臨床において診断、治療効果判定の指標として、最も特異性と感受性の高い臨床バイオマーカーとして使用されている。そこで、in vitro の検討として、PSA 産生ヒト前立腺癌細胞株（LNCap）と Celution™ system で分離した ADRCs（実際臨床で

使用する 1×10^6 個)を用いて、混合培養を行い、培養上清中の PSA 測定により、前立腺癌細胞の PSA 産生への影響を検討した (特許 5)。下記の条件下で培養した。In -vivo 検討では、前立腺癌細胞株と ADRCs をヌードマウスに移植し、前立腺癌細胞増殖に対する ADRCs の影響を検討した。

B. 方法と結果

1. in vitro 実験

1-1) 前立腺癌細胞株における PSA 遺伝子発現の比較

ヒト前立腺癌細胞株 PC-3, DU145 においては、PSA の遺伝子発現が認められなかったが、LNCaP には明らかな遺伝子発現を認めた (図 1)。このことから、前立腺癌細胞株の中でも前立腺癌バイオマーカーである PSA を産生する LNCaP を今回の実験に用いた。

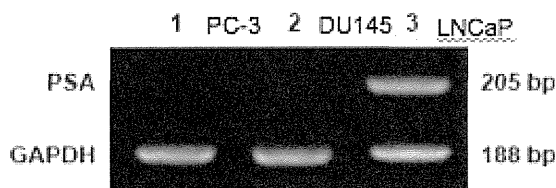


図 1 : 前立腺癌細胞株株 PC-3, DU145, LNCaP の P S A 遺伝子発現にの比較

1-2) 前立腺癌細胞株培養における血清の影響

血清付加群と非付加群で、前立腺癌細胞株 PC-3, DU145 は共に PSA を産生しなかった。一方、LNCaP においては、血清付加群と非付加群、両群で PSA を産生し、付加群の方が非付加群よりも高い産生値を示した。

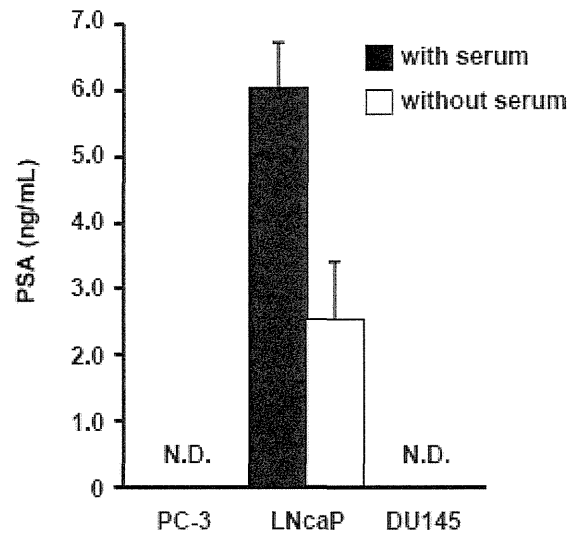


図 2 : 血清付加群と非付加群における前立腺癌細胞株 PC-3, DU145, LNCaP の培養上清の PSA の比較

1-3) ヒト前立腺癌細胞株のヒト ADRCs 上清添加による培養

PSA 産生 LNCaP に ADRCs の上清を添加し、添加前後の培養上清 PSA 値を、FCS (Fetal calf serum)10%(v/v)添加培地 (ウシ胎児血清) と KSR (Knockout Serum Replacement10%(v/v)添加培地 (ウシ胎児血清代用物) で比較した。その結果、FCS, KRS 付加培養条件、いずれも上清中の PSA の抑制は認められなかった (図 3)。したがって、いずれの培養条件でも ADRCs 産生液性因子による LNCaP の抑制効果は認められなかった。

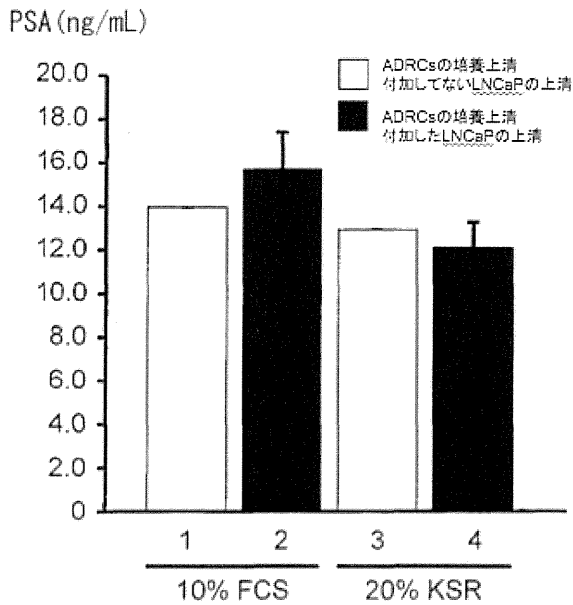


図3：PSA 産生 LNCaP への ADRCs 培養上清添加前後の上清 PSA 値 (FCS と KSR における比較)

1-4) ヒト前立腺癌細胞株とヒト ADRCs 混合培養

Celution™ system で分離した ADRCs の培養、ヒト前立腺癌細胞株の培養、および ADRCs とヒト前立腺癌細胞株の細胞比 1 対 1 での混合培養において、それぞれの上清の PSA 産生量を比較検討した。ADRCs 上清には PSA は検出されず、ヒト前立腺癌細胞株培養上清とヒト前立腺癌細胞株・ADRCs との混合培養上清中の PSA を比較すると、混合培養上清での上昇は認められず、むしろ前立腺癌株単独培養上清中 PSA に比べて低下傾向を示した (図 4)。

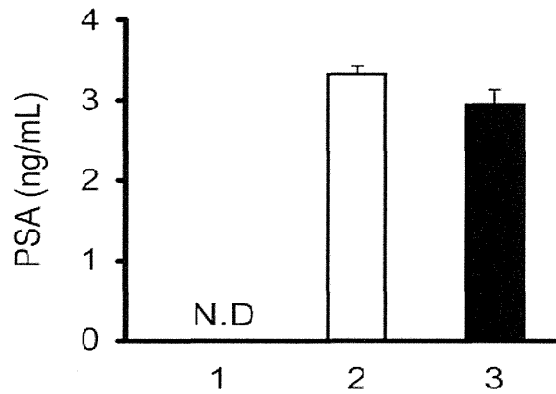


図4：培養上清の PSA 産生量の下記 3 群での比較 1：ADRCs 単独培養、2：LNCaP 単独培養、3：ADRCs とヒト LNCaP との細胞比 1：1 での混合培養

さらに ADRCs と LNCaP を混合培養 (48 時間) した時の細胞の形態的变化を位相差顕微鏡で観察したところ (図 5)、LNCaP 周辺を ADRCs が取り囲み LNCaP 増殖の抑制が示唆され、ヒト前立腺癌株の細胞増殖促進の所見は見られなかった。

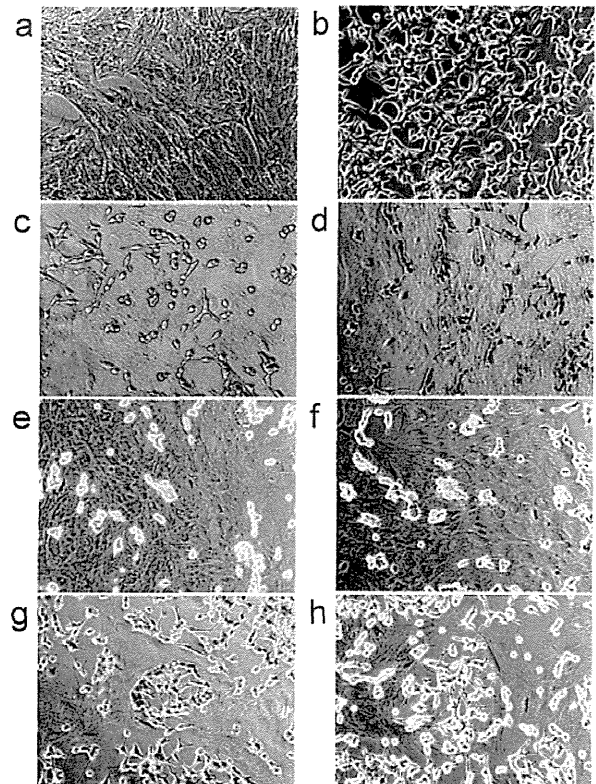


図 5: 前立腺癌細胞株と ADRCs 混合培養後の位相差顕微鏡所見

LNCaP 細胞と ADRCs の混合培養 (48 時間) 時の細胞の状態を位相差顕微鏡で観察した。a: ADRCs 単独培養時の位相差顕微鏡像、b: LNCaP 細胞単独培養時の位相差顕微鏡像、c,d: LNCaP 細胞と ADRCs の混合培養 (細胞数の比 1:1) 時の位相差顕微鏡像、e, f: LNCaP 細胞と ADRCs の混合培養 (細胞数の比 1:2) 時の位相差顕微鏡像、g,h: LNCaP 細胞と ADRCs の混合培養 (細胞数の比 2:1) 時の位相差顕微鏡像。

さらに、この位相差顕微鏡所見における腫瘍抑制所見を確認するために e,f の位相差顕微鏡条件 LNCaP : ADRCs = 1:2 でタイムラプスを行い、1 日、3 日でそれぞれをマーキング (LNCaP : 黄色) と (ADRCs : 赤) し観察を行った。1 日から 3 日目になるにつれて LNCaP を ADRCs が取り囲むような所見を認め、LNCaP との接着率が上昇するほど、培養上清中の PSA は低下した (図 6)。すなわち LNCaP と ADRCs の接着率が高いほど、LNCaP の上清の PSA 産生が低下し、細胞間接触による LNCaP 抑制の所見が示された。

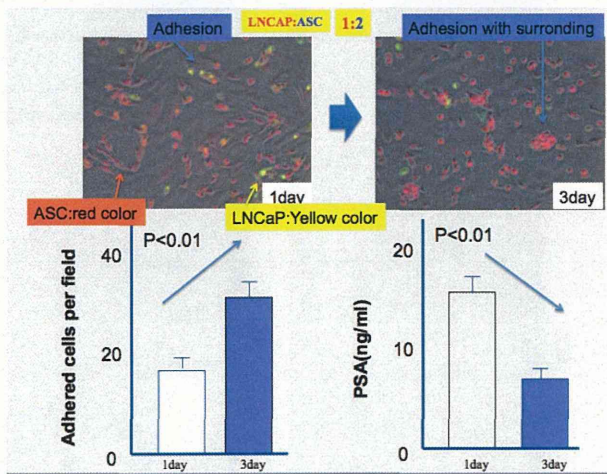


図 6: 混合培養後の LNCaP と ADRCs の接着率、および培養上清中 PSA 濃度

e,f の位相差顕微鏡条件 LNCaP : ADRCs = 1:2 でタイムラプスを行い、1 日、3 日での LNCaP (黄色マーク) と ADRCs (赤マーク) を示す。

1-5) ヒト前立腺癌細胞株と ADRCs との混合培養による PSA の変化

前立腺癌細胞株 (LNCaP) を、市販のヒト ADRCs (インビトロジェン社)、および Celution™ system で分離した患者由来の ADRCs と混合培養し、上清 PSA 値を比較検討した。48 時間、96 時間で、いずれの培養においても、前立腺癌細胞と ADRCs との混合培養により、前立腺癌細胞単独培養に比較して、ADRCs 細胞比率依存的に、上清 PSA は減少する傾向が認められた (図 7)。

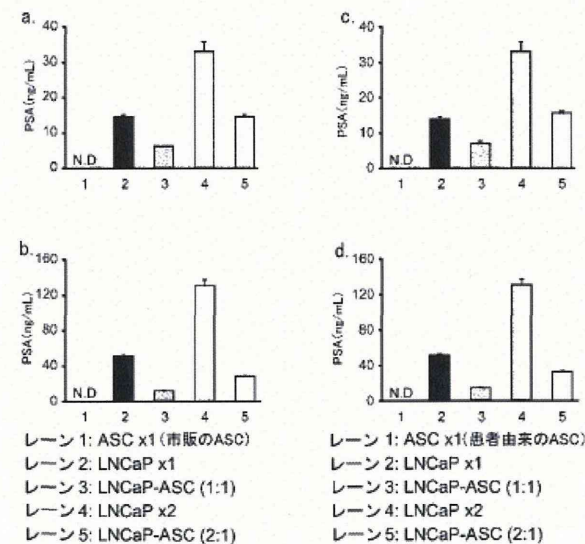


図 7: 前立腺癌細胞株培養と前立腺癌細胞・ADRCs 混合培養における上清 PSA 値の比較

a: 市販 ADRCs との混合培養 (48 時間培養)。レーン 1 は ADRCs のみの培養 (細胞数 1.8 培養⁵⁾、レーン 2 は LNCaP 細胞のみの培養 (細胞数 1.8 みの培養⁵⁾、レーン 3 は LNCaP 細胞と ADRCs の混合培養 (細胞数の比 1:1、各細胞数 1.8 胞数⁵⁾、レーン 4 は LNCaP 細胞のみの培養 (細胞数 3.6 みの培養⁵⁾、レーン 5 は LNCaP 細胞と ADRCs の混合培養 (細胞数の比 2:1、LNCaP 細胞数 3.6⁵⁾。

b: 市販の ADRCs との混合培養 (96 時間培養)。各レーンの条件は a と同様。

c: 患者由来 ADRCs との混合培養 (48 時間培養)。レーン 1 は ADRCs のみの培養 (細胞数 1.8 培養 (細)、レーン 2 は LNCaP 細胞のみの培養 (細胞数 1.8 みの培⁵)、レーン 3 は LNCaP 細胞と ADRCs の混合培養 (細胞数の比 1:1、各細胞数 1.8 胞数⁵)、レーン 4 は LNCaP 細胞のみの培養 (細胞数 3.6 みの培⁵)、レーン 5 は LNCaP 細胞と ADRCs の混合培養 (細胞数の比 2:1、LNCaP 細胞数 3.6aP⁵)。

d: 患者由来 ADRCs との混合培養 (96 時間培養)。各レーンの条件は c と同様。

1-6) 患者由来 ADRCs と臨床前立腺癌の混合一次培養の上清 PSA の比較

ADRCs (1x10⁶ 個) と摘出前立腺癌または前立腺生検の組織を、混合 1 次培養を行い、1 日目と 3 日目の細胞形態を位相差顕微鏡で観察した。ADRCs と LNCaP の位相差顕微鏡、タイムラプスでの観察と同様に、ヒト前立腺癌細胞周囲を ADRCs が取り囲み、増殖を抑制するような所見を示し、臨床検体でも同様な所見が確認された (図 8)。また 3 日目の上清 PSA をヒト前立腺癌と ADRCs 混和群 (Mix) とヒト前立腺癌単独群 (Tumor) で比較した。明らかに ADRCs 混和群が単独群に比して低下しており、上清中の PSA を抑制する所見を確認した (図 9)。

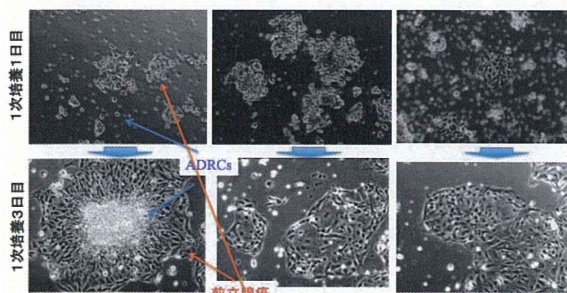


図 8: 臨床前立腺癌組織と ADRCs の混合 1 次培養: 1 日目と 3 日目の細胞形態の位相差顕微鏡所見

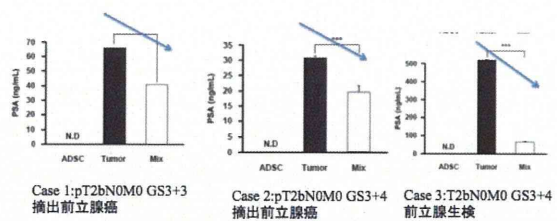


図 9: 臨床前立腺癌組織と ADRCs の混合 1 次培養における、3 日目の培養上清 PSA: ADRCs 混和群 (Mix) と前立腺癌単独群 (Tumor) での比較

1-7) 大腸癌株との ADRCs の混合培養の上清バイオマーカ (CEA: Carcino-Embryonic-Antigen) の比較

2 種類の異なる性質のヒト大腸癌株を用いて実験を行った。ヒト大腸腺癌 LoVo (tumor necrosis factor- α against human colon cancer line) (図 10)、ヒト結腸腺癌 LS-180 (図 11) と ADRCs を混合培養し、上清中のヒト大腸癌の臨床バイオマーカ CEA を比較した。ADRCs によるヒト大腸癌の抑制効果は認められなかった。したがって、前立腺癌以外の腫瘍においても、その増殖を ADRCs が抑制するとは限らないことが示唆された。

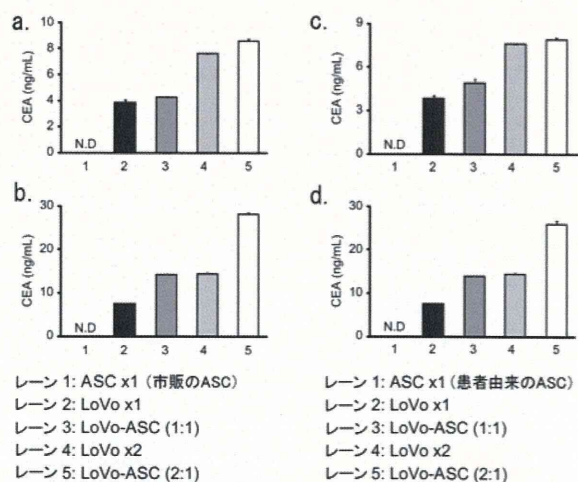


図 10: ヒト大腸腺癌株培養 LoVo と ADRCs 混合培養における上清 CEA 値の比較

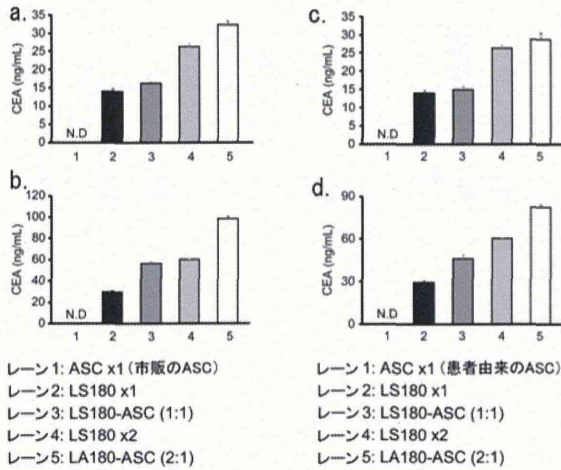


図 11：ヒト大腸腺癌株培養 LS180 と ADRCs 混合培養における上清 CEA 値の比較

2. In-vivo 実験：LNCaP 移植腫瘍に対する ADRCs の影響

2-1) ADRCs の移植実験における腫瘍サイズの比較

ヌードマウスに LNCaP を単独、あるいは ADRCs と混合して移植を行った (Tumor 群=LNCaP 単独、Mix 群=1: LNCaP と ADRCs 1×10^6 個の混合移植、2: LNCaP と ADRCs 2×10^6 個の混合移植) ところ、Tumor 群はヌードマウスの皮下に明らかな腫瘍を形成した。それに対して Mix 群は腫瘍サイズが小さく、壊死を伴う潰瘍形成を示していた (図 12)。移植 28 日後に腫瘍サイズを比較すると、Mix 群は Tumor 群と比較して、明らかに腫瘍サイズの減少を認めた。すなわち ADRCs の前立腺癌に対する増殖抑制効果を認めた (図 13)



図 12：前立腺癌単独および前立腺癌・ADRCs 混合移植による腫瘍サイズ観察所見の比較

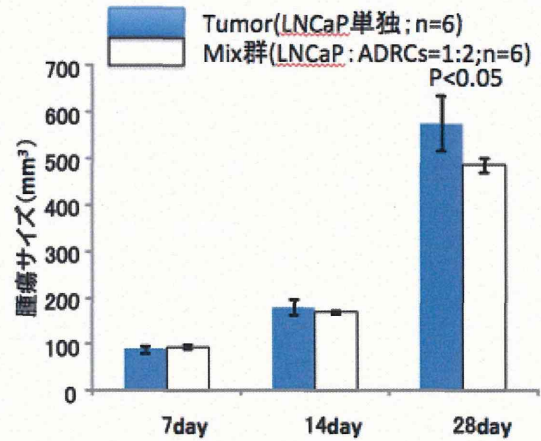


図 13：前立腺癌細胞単独および前立腺癌細胞・ADRCs 混合移植による腫瘍サイズ推移の比較

C. 考察

今回、我々が開発中のヒト自己皮下脂肪組織由来再生細胞 (ADRCs) の傍尿道注入による腹圧性尿失禁治療は、自己細胞を用い、体外培養を必要とせず、3 時間程度の一連の操作によって完遂できる低侵襲で有望な再生治療である。分担研究者の後藤が報告しているように、すでに 18 症例に実施し、有効な結果がえられつつあり、また問題となる有害事象もなく、体性幹細胞を用いた有望な再生治療として、医師主導型治験の実施を目指している。本治療は、本邦で 600 万人以上の罹患者がいると推計されている女性腹圧性尿失禁、また数十万以上と考えられる男性における前立腺手術後の腹圧性尿失禁が適応となる。前立腺手術後の括約筋障害は、前立腺肥大症に対する経尿道的前立腺切除術と、前立腺癌に対する根治的前立腺全摘除術後にみられるが、男性における癌罹患者が肺癌に次いで第 2 位となる前立腺癌

については、手術の増加に伴い、今後も術後尿失禁患者が増加すると考えられる。従って、今後益々患者数の増加が予測される中、今回我々が開発中の再生治療は、尿失禁に悩む患者の QOL の改善につながる重要な治療であると考えている。他方、iPS 細胞などの多能細胞については、癌化あるいは癌細胞増殖に対する促進作用が危惧されている。我々が用いる脂肪組織由来幹細胞は、成熟した体性幹細胞であり、本来、癌化、癌細胞増殖促進作用は問題ないものと考えられているが、前立腺癌術後患者、あるいは前立腺癌発症の可能性のある男性患者を対象とするという点で、脂肪組織由来幹細胞の前立腺癌細胞に対する作用を検証することは重要な課題である。今回、我々が行った基礎実験においては、in-vitro、in-vivo いずれにおいても、脂肪組織由来幹細胞が前立腺癌細胞増殖を促進する作用は見られず、むしろ前立腺癌細胞の増殖を抑制することが示唆された。すなわち、ヒト皮下脂肪から分離した ADRCs と ヒト前立腺癌株を混合培養し、細胞間の相互作用による影響を前立腺癌腫瘍マーカーである PSA を指標として市販検体そして臨床検体を用いて検討したところ、PSA の上昇はなく、むしろ混合培養により PSA の低下傾向が認められた (図 14)。また、ヌードマウスに前立腺癌細胞と ADRCs を同時に移植すると腫瘍サイズの減少が認められ、ADRCs の増殖抑制作用が認められた。

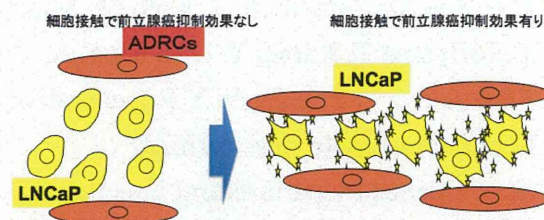


図 14 : ADRCs による LNCaP 抑制効果

D. 結論

ADRCs のヒト前立腺癌細胞に対する増殖促進所見は認められず、むしろ増殖抑制傾向がみられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto T, Gotoh M. Editorial comment to Sacral Neuromodulation Effective Option for Non-Obstructive Urinary Retention in Men with Cerebral Palsy Int J Urol. 2013 in press
2. Funahashi Y, Yoshida M, Yamamoto T, Majima T, Takai S, Gotoh M. Intravesical application of rebamipide suppresses bladder inflammation in a rat cystitis model. J Urol. 2013 Nov 18. doi:pii: S0022-5347(13)05979-X. 10.1016/j.juro.2013.11.026. [Epub ahead of print]
3. Hamasaki Y, Doi K, Maeda-Mamiya R, Ogasawara E, Katagiri D, Tanaka T, Yamamoto T, Sugaya T, Nangaku M, Noiri E. A 5-hydroxytryptamine receptor antagonist sarpogrelate reduces renal tubulointerstitial fibrosis by suppressing PAI-1 AJP Renal 2013 Dec 15;305(12):F1796-803.

4. Gotoh M, Yamamoto T, Kato M, Majima T, Toriyama T, Kamei Y, Hirakawa, A, Mastukawa Y, 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. 2014 Mar;21(3):294-300

5. Yamamoto T, Gotoh M. Editorial Comment to Regenerative medicine as a new therapeutic strategy for lower urinary tract dysfunction. Int J Urol. 2013 Jul;20(7):675. doi: 10.1111/iju.12173. Epub 2013 May 15.

6. Yamamoto T. Editorial Comment to Contrast-enhanced transrectal ultrasonography for the measurement of prostate cancer tumor size in the peripheral zone and correlation with radical prostatectomy specimens Int J Urol. 2013 May 20. doi: 10.1111/iju.12164. [Epub ahead of print] No abstract available.

7. Yamamoto T, Funahashi Y, Mastukawa Y, Kato M, Yoshino Y, Gotoh M. NPRETREATMENT OF RENAL SUPSCAPULAR ADMINISTRATION OF ADIPOSE TISSUE-DERIVED STEM CELLS AMELIORATE ISCHEMIA-REPERFUSION-INDUCED ACUTE KIDNEY INJURY Hirosaki Med. J. 64 (Suppl.) : S1—S3, 2013

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1)高濃度脂肪組織由来間葉系幹細胞含有脂肪による声門閉鎖不全の治療 発明者

藤本 保志、鳥山和宏、西尾直樹、須賀 研治、亀井譲、高成啓介、後藤百万、山本 徳則、岩田義弘、内藤健晴 特許願人 名古屋大学 出願日平成26年2月4日特願2014-019425

2)精子活性化方法及びその用途

山本 徳則、鈴木 哲、松川 宣久、舟橋 康人、佐藤 義朗、後藤 百万 村瀬 哲磨 特許願人 名古屋大学 出願日平成 25 年 10 月 25 日特願 2013-222630

3)尿路感染症の予防又は治療

山本徳則、柴田玲、瀧真悟、鈴木哲、舟橋康人、後藤百万 特許願人 名古屋大学 出願日平成 25 年 1 0 月 2 1 日特願 2013-215980

4)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25年1月21日特願 2013-008355 国際出願2014年1月18日 (PCT/JP2014/050862)

5)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 2 1 年 1 2 月 7 日(特願 2009-277437) (PCT/JP2010/071633)

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

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。一方、比較的大量の ASC を静脈内投与した後の死亡例が報告され、その安全性が大きな課題となっている。そこで本事業においてこの LASC の臨床応用を見据え、LASC の安全性について検討を行った。細胞の静脈内投与を行った際の重要な死亡原因である肺塞栓について、LASC はその頻度を低下させることを見出した。さらにこの細胞性質について解析を進めたところ、細胞の接着性・凝集性が低いことが LASC の高い安全性に寄与していることが示された。本検討で LASC の安全性が確認されたことで、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約二万人と推定されている。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。

我々は、ヒト皮下脂肪から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³。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⁴。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 が有効であることを報告している⁵⁻⁷。これらの結果から、LASC による細胞療法は強皮症を始め、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に対する治療法を確立するために、LASC の安全性の確認及びその基礎的検討を行った。安全性に関しては細胞の全身性投与時に最も懸念される肺への影響を検討するために normal

mouse に対して高濃度の細胞溶解液を尾静注より投与し、肺塞栓による LASC の致死量について検証を行った。また培養容器からの細胞剥離後、時間とともに細胞同士が凝集することが肺塞栓の大きな要因と考えられているため、細胞の凝集性についても検討を行った。死細胞は細胞隕のコアとなるため、細胞懸濁液を作成する際の溶媒についても細胞保護の点から検討を行った。基礎的検討としては、マイクロアレイを実施し、細胞接着因子や細胞外マトリックスなどについて LASC の遺伝子発現量の解析を行った。

B. 研究方法

安全投与量の検討

C57/BL6 マウスに対して尾静脈より高血清で培養したマウス脂肪由来間葉系幹細胞 (HASC) あるいは LASC を 1, 2, 3, 4×10^6 /body の dose で投与して肺塞栓による死亡率を比較した。具体的な投与方法を以下に示す。

1. PBS EDTA(+) で培養皿を洗浄
2. トリプシン 1ml で細胞を剥離
3. 10% FBS 入り DMEM で酵素反応を止める
4. 70 μ m cell strainer に通して細胞隕を除去してシングルセルの状態になった細胞を回収
5. 遠心 (1200rpm, 5min) して細胞を回収
6. PBS EDTA(-) に希釈
7. 細胞数のカウント
8. 遠心

9. 200 μ L/body で投与できるように PBS EDTA(-), 25U/ml ヘパリン(+) で細胞を懸濁
10. 200 μ L をマウスの尾静脈から投与。5sec 程度の速さで投与した。生存率は投与後 24 時間で評価を行った。

細胞凝集率の検討

マウスの HASC (N=5), LASC(N=4)および骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC) (N=2) を 1×10^7 /mL (PBS EDTA(-), 25U/ml ヘパリン(+)) に調整し、シリンジ内で 30 分静置させた後ポアサイズ 70 μ m のフィルターを通してフィルターを通過した細胞の数を計測した。細胞数の計測には BioRad 社のオートセルカウンターを用いた。

マイクロアレイ

ヒトの HASC, LASC(3 ドナーより樹立。各群 N=12) の遺伝子発現について、アジレント社のマイクロアレイで解析を行った。検体は 6cm dish で培養した細胞を以下の手順で処理し、作成した。

1. PBS(-) で細胞を洗浄
2. 細胞溶解液を 600 μ L 添加
3. 細胞が溶解したのを確認してから液をスピンカラムに入れ、15000rpm, 2 分間遠心分離機にかける
4. サンプルをチューブに移し、-80 $^{\circ}$ C で保存する

マイクロアレイの結果は GeneSpring を使用して解析を行った。

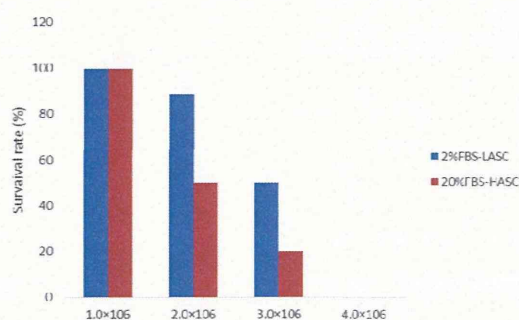
溶媒が細胞の生存率に及ぼす影響について

ヒトの LASC を生理食塩水、1%アルブミン含有生理食塩水、ラクテック、ラクテック D(各群 N=3)に懸濁し、1時間静置したのちポアサイズ 70 μ m のフィルターを通してフィルターを通過した生細胞の割合を算出した。細胞数の計測には BioRad 社のオートセルカウンターを用いた。

C. 研究結果

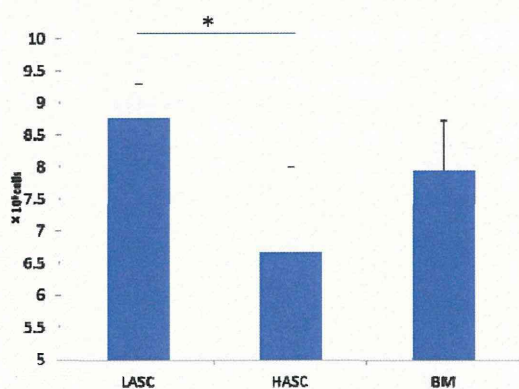
安全投与量の検討

細胞種にかかわらず 1×10^6 /body の投与では全マウスが生存し、 4×10^6 /body の投与で全マウスが死亡した。しかしながら、 $2, 3 \times 10^6$ /body の投与で HASC 投与群の半数以上のマウスが死亡したのに対し、LASC 投与群ではその死亡率が明らかに低下していることが示された。このことから、LASC は HASC よりも投与安全域が広いことが示唆された。死亡したマウスはほとんどが投与中、少なくとも投与後 10 分以内に死亡していることから、死亡の原因は投与した細胞が肺に詰まったことによる肺塞栓であると考えられた。HASC が LASC よりも肺にトラップされやすい原因として、細胞の大きさあるいは細胞の接着性が関与しているのではないかと考えられた。



細胞凝集率の検討

肺に詰まる原因として HASC が接着しやすい細胞なのではないかと考え、細胞凝集率について検討を行った。細胞調整後 (1×10^7 /ml)、シリンジ内で 30 分静置し、フィルターを通して細胞数を計測した。凝集した細胞はフィルターにトラップされるため、フィルターを通過した細胞が少ないほど凝集しやすいと考えられた。検討に LASC, HASC に加え、BM-MSK も加えて行ったところ、HASC は明らかにフィルターによってロスする細胞が多かった (p-value: 0.023)。



このことから、HASC は細胞が凝集し、大きな細胞塊となることで肺にトラップされ、肺塞栓を起こしているのではないかと考えられた。細胞塊を形成

する原因としては死細胞が多く、死細胞に生細胞が結合して細胞塊を形成する、あるいは接着因子を多く発現しているということが考えられた。そこで次に我々は LASC, HASC のマイクロアレイを行い、接着因子の遺伝子発現について網羅的に解析を行った。

マイクロアレイ

解析は GeneSpring を用いて行った。まずデータの正規化を行い、データの信頼性をあげるための quality control を行った。

1. Filtered on Expression

◇ Row data における発現量が低いものを解析から除去【発現量 20-100th percentile に設定】
50739→49944

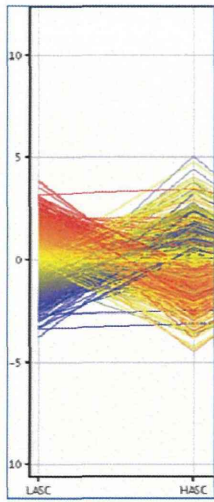
2. Filtered on Flags

◇ Flag がついているもの (測定結果が安定していないもの) を解析から除去 49944 → 38076

3. Filtered on Error

◇ 同一グループ内における変動が激しいもの (ドナー差が大きいもの) を解析から除去
◇ 【Standard Deviation (SD) < 0.5 に設定】 38076→28275

抽出の結果、以下の図に示す通り HASC と LASC の遺伝子発現プロファイルは正反対であることが示された (LASC で高発現の遺伝子は HASC での発現レベルは低い)。



抽出された 28275 の遺伝子に対して T 検定を行い、 $P < 0.05$ で発現頻度に差がある遺伝子を抽出し、さらに発現量に 2 倍以上の差がある (Fold Change ≥ 2.0) 遺伝子を抽出した。これらの遺伝子に対して、細胞接着に関与していると考えられる【adhesion】、【collagen】、【extracellular matrix】の 3 つのキーワードで変動遺伝子を抽出した。

Adhesion	
Gene Symbol	LASCで
AMIGO2	Down
MCAM	Down
CHL1	Up
PEACAM1	Up
SDK1	Up
NRCAM	Up

Extracellular Matrix	
Gene Symbol	LASCで
SPON2	Up
ECM2	Up
EFEMP1	Up
SPON1	Up

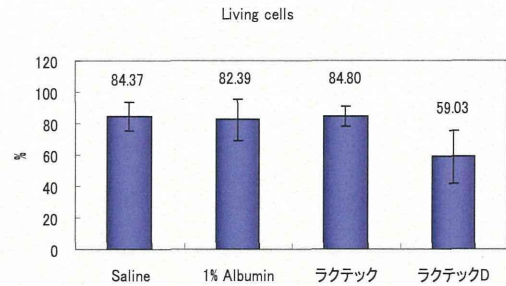
Collagen	
Gene Symbol	LASCで
MMP1	Down
COLQ	Up
COL14A1	Up
COL21A1	Up
COL8A1	Down
COL5A1	Down
COL8A2	Up
COL22A1	Down
PLOD2	Down
COL22A1	Down

抽出された遺伝子が LASC の高い安全性に関与していると考え、現在解析を進めている。

溶媒が細胞の生存率に及ぼす影響について

最後に実際の臨床応用を想定し、ヒト LASC を投与する際の細胞懸濁液の溶媒について検討を行った。細胞剥離から投与まで 1 時間程度かかることが予想されるため、懸濁液の状態を細胞を保護できる溶媒がふさわしいと考えられる。そこで、4 種類の溶媒を用意

し、1 時間静置後の細胞の生存率を検討した。



ラクテック D は浸透圧の影響で細胞の半数近くが死滅 (トリパンブルー陽性) してしまったが、他の溶媒については 80% 以上の高い生存率を得ることができた。

D. 考察

本研究において、LASC が通常培養される間葉系幹細胞よりも高い安全性を持つ細胞であることが示唆された。細胞の経静脈的投与による治療法は全身への有効性を期待できる一方、肺への影響が懸念される。本検討において、我々が臨床応用を目指す LASC は肺への負担が小さいというメリットを持つことが予想された。この要因として、細胞の接着性の違いが関与している可能性が示されたが、網羅的な遺伝子解析では接着因子の中でも LASC で発現頻度が減少しているものと増加しているものの双方が確認された。今後はこれらの遺伝子がどのような細胞性質に関与しているのか、個別の解析を行っていく必要がある。

E. 結論

今回我々は LASC の臨床応用を目指