

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

構造並びに機能再生を目指す脂肪組織由来幹細胞治療の開発

研究代表者 後藤百万 名古屋大学大学院医学系研究科泌尿器科学 教授

研究要旨

本事業では、体性幹細胞のひとつである脂肪組織由来幹細胞を用いて構造再生医療と機能再生医療のそれぞれを共通基盤に載せて開発することを目的とし、対象疾患として構造再生医療開発では「腹圧性尿失禁」を、機能再生医療開発では「強皮症」を取り上げ、5年以内の治験実施を目指す。平成25年度は、腹圧性尿失禁については臨床研究及び基礎的研究、強皮症については基礎的研究を行い、さらに多施設共同臨床試験実施に向けての基盤整備を行った。腹圧性尿失禁では、自己脂肪組織由来幹細胞（脂肪組織由来再生細胞 ADRCs: adipose-derived regenerative cells）の傍尿道注入による腹圧性尿失禁治療の先行臨床研究（18症例）を実施し、有効性と安全性に関する中間解析を行い、有望な臨床成績と安全性を確認した。男性14例では、術後尿失禁量は継時的に減少し、術後1年での改善例は14例中10例で尿失禁量は37.8%へ減少し、1例は術後6ヶ月で尿失禁が消失した。女性4例は、術後3ヶ月の時点で4例中2例が改善中である。基礎的研究では、ADRCsを用いた再生治療における新規・筋分化バイオマーカーとしての脂肪結合蛋白(FABP)と品質評価法の標準化の研究を行い、脂肪組織由来幹細胞からFABPが分泌され、筋分化を促進することを遺伝子解析により明らかにし、FABPが本治療のバイオマーカーとなり得る可能性を示唆した。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、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、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、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を示した。強皮症については、低血清培養法により得られる脂肪組織由来幹細胞の細胞性質の解析により、細胞の接着性・凝集性が低いことを確認し、全身性强皮症に対する静脈投与において安全性が高いことを示した。多施設共同臨床試験実施に向けての基盤整備では、ADRCs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た。まずは、腹圧性尿失禁を対象とした治験を実施するため、作成した試験計画の骨子を基に、厚生労働省医政局と医薬品医療機器総合機構(PMDA)と協議しながら、開発方針を決定した。

研究代表者

後藤百万・名古屋大学大学院医学系研究科
泌尿器科学・教授

研究分担者

山本徳則・名古屋大学大学院医学系研究科
泌尿器科学・准教授

舟橋康人・名古屋大学大学院医学系研究科
泌尿器科学・助教

亀井 謙・名古屋大学大学院医学系研究科
形成外科学・教授

水野正明・名古屋大学先端医療・臨床研究
支援センター・教授

安藤昌彦・名古屋大学先端医療・臨床研究
支援センター・准教授

加藤勝義・名古屋大学先端医療・臨床研究
支援センター・講師

平川晃弘・名古屋大学先端医療・臨床研究
支援センター・講師

清水 忍・名古屋大学先端医療・臨床研究
支援センター・講師

松尾清一・名古屋大学大学院医学系研究科
腎臓内科学・教授

丸山彰一・名古屋大学大学院医学系研究科
腎臓内科学・准教授

尾崎武徳・名古屋大学医学部附属病院腎臓
内科・助教

若林俊彦・名古屋大学大学院医学系研究科
脳神経外科学・教授

高橋雅英・名古屋大学大学院医学系研究科
腫瘍病理学・教授

療と位置づけ、その開発に鎬を削っている。海外ではすでに400件以上の臨床試験が行われており、特許やノウハウが固められつつある。そのソースの約7割が骨髄由来であることから、わが国が再生医療分野において世界を先導するには、iPS細胞による再生医療開発と並行して、骨髄以外の組織より抽出する幹細胞を活用した再生医療を、構造再生と機能再生の両分野において戦略的に確立することが喫緊の課題となっている。

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

腹圧性尿失禁は、尿道括約筋機能障害により腹圧時に尿が漏れるもので、女性では妊娠・出産・加齢などが、男性では前立腺癌に対する手術後遺症などがそれぞれ要因となっており、患者数は女性腹圧性尿失禁についてはわが国だけで約500万人、前立腺手術後の男性腹圧性尿失禁は数万人と推定されている。さらに近年、男性における前立腺癌の罹患率は急増し、2020年には男性の癌罹患率において肺癌に次いで第2位になると推計されている。実際に、前立腺癌手術は急増しており、術後尿失禁患者数も増加している現状である。尿失禁は、生活の質を著しく阻害する疾患であるにもかかわらず

A. 研究目的

再生医療には、骨、皮膚、角膜等、身体の一部を再生する「構造再生」と、がんや膠原病など現在では完治できない病的状態の正常化をはかる「機能再生」の2つがある。そして現在、世界は再生医療を、次代を担う重要な医

ならず、有効な治療法は開発されておらず、ヒューマンサイエンス振興財団・医薬基盤研究所で検討した本邦におけるアンメットメディカルニーズ (unmet medical needs) では、尿失禁は需要が高いにもかかわらず、治療開発が最も遅れている領域の一つであることが示されている。そこで、本研究事業では、自己皮下脂肪組織由来幹細胞 (脂肪組織由来再生細胞 ADRCs: adipose-derived regenerative cells) を用いた腹圧性尿失禁に対する新規治療を開発して、医師主導型治験の実施、さらには保険適応の承認を目指す。この取り組みは名古屋大学が世界初となる。一方、強皮症は、皮膚や内臓が硬くなる (硬化すること) を特徴とした疾患でわが国における患者数は1万人以上と推定されている。これらの患者では皮膚硬化が進行し、手足の皮膚に虚血性の潰瘍や壊疽を起こす。時に肺高血圧症、肺線維症、腎不全、嚥下困難などを合併し死亡することもある。この難治性疾患を治癒する機能再生医療はまだ確立されておらず、その取り組みは先駆的で独創性に富んでいる。

B. 研究方法

1. 腹圧性尿失禁治療

ADRCs を用いた腹圧性尿失禁治療においては、自己皮下脂肪組織から脂肪由来幹細胞を培養操作を行うことなく採取し、経尿道的内視鏡下に尿道括約筋に注入する新規手技を開発した。具体的には、下半身麻酔科に、腹

部あるいは臀部から皮下脂肪を脂肪吸引により採取し、採取した脂肪組織から脂肪組織由来幹細胞を含む ADRCs を Celution™ システム (米国、Cytori 社) を用いて分離・採取する。Celution™ システムは、体外培養操作を必要とせず、脂肪組織から ADRCs を短時間に分離・採取することができるシステムである。採取した ADRCs を一部は経尿道的に外尿道括約筋に注入するとともに、別に ADRCs と脂肪組織を混合したもの (ADRCs 付加脂肪組織) を経尿道的に尿道括約筋部粘膜下に注入する。これらの治療は、下半身麻酔下 (あるいは全身麻酔) で、一連の手技として、2 時間から 3 時間以内に終了することができる。平成 25 年度は、平成 24 年度に引き続き、後藤、舟橋が、自己 ADRCs の傍尿道注入による腹圧性尿失禁治療の先行臨床研究を実施し、平成 23 年 4 月にヒト幹臨床研究審査委員会に既報告の 5 症例、および平成 24 年 4 月以降に実施した 13 症例、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。また、山本、若林は、脂肪由来幹細胞を用いた再生治療の臨床研究において、細胞の活性、および安全性・品質評価法において必要となるバイオマーカに関する基礎的研究を実施し、脂肪結合蛋白 (FABP) のバイオマーカとしての可能性とその品質評価法の標準化を検討した。ADRCs の尿道粘膜下への注入の効果および作用機序に関する基礎的検討、さらに、傍尿道に注入する脂肪由来幹

細胞の特性（継代培養細胞の平滑筋分化特性、サイトカイン分泌特性など）に関する基礎、臨床の *in vitro*, *in vivo* 検討は昨年度の研究で実施したところであるが、今年度は前臨床安全性試験の一つとして、脂肪組織由来幹細胞の前立腺癌に対する影響について検討を行った。すなわち、*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）実験により、脂肪組織由来幹細胞の前立腺癌細胞に対する影響を検討した。

1-1. 尿道括約筋機能障害による腹圧性尿失禁に対する傍尿道 ADRCs 注入治療の臨床的検討（後藤、舟橋）

男性腹圧性尿失禁 14 例（前立腺癌に対する根治的前立腺全摘除術後 11 例、前立腺肥大症に対する経尿道的レーザー前立腺核出術後 3 例）、女性真性腹圧性尿失禁 4 例の計 18 例に ADRCs の傍尿道注入治療を行い、有効性と安全性の検討を行った。有効性は、尿失禁改善効果については 24 時間尿失禁量定量テストによる他覚的評価、尿失禁自覚症状・QOL 質問票（国際尿失禁会議質問票短縮版：ICIQ-SF）による自覚的評価を行い、また、尿流動態検査として尿道内圧測定を行い、最大尿道閉鎖圧、機能的尿道長を治療前、治療後 2 週間、1 か月、3 ヶ月、6 ヶ月、1 年で評価した。画像評価としては、MRI（矢状断像・脂肪強調画像）による、注入脂肪組織の

経時的評価を行い、経膈または直腸的造影超音波検査により、注入部の血流変化を評価した。安全性評価として、術中・術後の有害事象、血液検査、また、分離 ADRCs の無菌試験、分画、分離試験を行った。

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

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、について検討を行った。

1-3. 脂肪組織由来幹細胞の前立腺癌細胞への影響

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として使用されていることから、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 in-vitro で検討した。使用した前立腺癌細胞は、ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP、PC-3、DU145、さらに名古屋大学医学部附属病院で治療を行った前立腺癌患者の細胞を用いた。また、混合培養における各細胞の形態変化についても、位相差顕微鏡により検討した。In -vivo 実験では、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。

2 . 強皮症 (松尾、丸山、尾崎)

分担研究者らは、ヒト皮下脂肪から分化能と増殖能の高い間葉系幹細胞を選択的分離培養法する低血清培養法を、世界に先駆けて開発した。さらに、この方法によって得られる脂肪組織由来幹細胞 (Low serum cultured adipose-derived stem cell: LASC) は、強力に T 細胞増殖を抑制すること、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、また、自然免疫に対する調整能や組織修復能を有することを示した。これらの結果から、本細胞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。

そこで本年度の研究では、全身性强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、正常マウス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。死細胞は細胞隗のコアとなるため、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。

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

本研究事業は体性幹細胞のひとつである脂肪組織由来幹細胞を用いて構造再生医療と機能再生医療のそれぞれを共通基盤に載せて開発し、5 年以内の治験実施を目的としている。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・指針を参照し、支援体制の構築を進めた。

また、保険で使用できる医療の提供を目指す開発方針の検討を行うため、研究代表者及び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、先進医療 B 又は医師主導治験のいずれで臨床試験を実

施すべきか、厚生労働省医政局及び医薬品医療機器総合機構

(Pharmaceuticals and Medical Devices Agency : PMDA) と相談を行うこととした。

(倫理面への配慮)

先行臨床研究については、ヘルシンキ宣言に則って行い、試験プロトコルは名古屋大学医学部生命倫理委員会の承認を得ると共に、平成 23 年 3 月に厚生労働省ヒト幹臨床研究審査委員会 (第 62 回厚生科学審議会科学技術部会) において承認された。また、患者には上記承認された説明書を用いて十分なインフォームド・コンセントを行い、文書にて同意を得た。

また、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。動物実験については、動物に対する愛護上の配慮を十分に行い、名古屋大学における動物実験における指針に従って実施した。

C. 研究結果

1. 腹圧性尿失禁治療

1-1. 尿道括約筋機能障害による腹圧性尿失禁に対する傍尿道 ADRCs 注入治療の臨床的検討

男性 14 例 (前立腺癌に対する根治的前立腺全摘術後の腹圧性尿失禁 11 例、前立腺肥大症に対する手術後の腹圧性尿失禁 3 例) および女性真性腹圧性尿失禁 4 例に対して、傍尿道 ADRCs 注入治療を実施した。女性 4 例についてはフォローアップ期間が短いため、男女別々に解析を行った。皮下脂肪吸引から傍尿道注入までの全行程は、全例で 3 時間以内に終了し、ADRCs の抽出時間は平均 97.6 分、傍尿道注入時間は平均 28.7 分であった。脂肪組織から分離された細胞数は $7.3 \times 10^6 \sim 7.0 \times 10^7$ 個で、viable cells 数は $6.7 \times 10^6 \sim 6.3 \times 10^7$ と治療に必要な十分量の細胞が採取された。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、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継時的に減少し、術後 1 年では (2 例は 9 か月) 平均 244.5g から 171.4g (70%) に減少した。尿失禁量は 14 例中 10 例 (71.4%) で改善し、この改善例では平均 193.8g から 73.3g (37.8%) へ減少したが、4 例では、尿失禁量の改善はみられなかった。1 例においては、術後 6 ヶ月で尿失禁が消失し、術後約 4 年の時点においても尿失禁を認めない。改善例では、尿失禁改善効果が注入術後 1 ヶ月 ~ 3 ヶ月で出現し、以後徐々に改善効果が進行した。尿失禁改善効果を、治療前の尿失禁量程度により分けて検討すると、

術前の24時間尿失禁量が300g以下の比較的軽症例の方が良好な傾向がみられた。女性4例については、術後3ヶ月の時点で、70 95g、5.3 12.8g、19.4 2.8g、25.8 0.5gと4例中2例(50%)で改善中である。

妥当性の検証された尿失禁症状・QOL 質問票 ICIQ-SF 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、平均総スコアが減少(改善)した。尿失禁頻度の項目では、全14例で平均スコアが有意に減少(改善)($p<0.05$)、尿失禁程度の項目、QOL では、全14例で平均スコアが有意差はないものの減少(改善)した。女性例4例では、尿失禁量が改善中である2例では、ICIQ-SF ではすべての項目で改善中であり、尿失禁量の改善のみされていない症例では、1例では改善なく、1例では改善中である。

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(MUCP:maximum urethral closing pressure)および機能的尿道長(FPL:functional profile length)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。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。女性例では、最大尿道閉鎖圧は4例中3例、機能的尿道長は全例で改善中である。

経直腸的造影超音波検査では、注入2週間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。

MRI は脂肪組織由来間葉系前駆細胞と共に注入した脂肪組織の、注入部での存続効果を確認するために施行したが、全例において最新観察日までの検査において注入脂肪組織の残存を認めたが、経時的なサイズの増大は認めなかった。

術中の副作用は全例で認めなかった。術後早期の合併症については、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、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。標準的内分泌治療を行い、PSA は速やかに測定感度以下に低下しており、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、厚生省に報告済みであり、因果関係はないとの判断を得ている。

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

1) ヒト脂肪組織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では、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、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) ヒト脂肪組織由来幹細胞に関連する微小環境因子・脂肪酸結合蛋白(FABP)の検出系構築では、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。

3) ヒト脂肪組織由来幹細胞に関連する微小環境因子・脂肪酸結合蛋白(FABP)の高次構造解析では、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。

4) ヒト脂肪組織由来幹細胞に関連する微小環境因子・脂肪酸結合蛋白(FABP)に対する特異抗原を用いた発現解析では、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、脂肪組織由来幹細胞に 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。

1-3. 脂肪組織由来幹細胞の前立腺癌細胞への影響

前立腺癌細胞株における PSA 遺伝子発現の比較をヒト前立腺癌細胞株 PC-3、DU145、LNCaP にて行ったところ、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ため、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。

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 Replacement)10% (v/v) 添加培地(ウシ胎児血清代用物)で比較したところ、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。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。

他方、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ところ、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。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、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。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、それぞれの細胞をマーキングして観察を行ったところ、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。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。

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 値を比較検討したところ、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。

さらに、ADRCs (1×10^6 個)と実際の前立腺癌症例の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ところ、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。また 3 日目の上清 PSA をヒト前立腺癌と ADRCs 混和群とヒト前立腺癌単独群で比較したところ、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。

確認のために、2 種類の異なる性質のヒト大腸癌株を用いて実験を行い、ヒト大腸腺癌 LoVo (tumor necrosis factor- α against human colon cancer line)、ヒト結腸腺癌 LS-180 と ADSCs を混合培養し、上清中のヒト大腸癌の臨床バイオマーカー CEA を比較したところ、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。

In-vivo 実験では、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。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。

2 . 強皮症

LASC は抗血清培養にて得た脂肪由来幹細胞に比べて肺塞栓によるマウスの死亡率を低下させ、細胞凝集能も低いことが示された。また、これらの性質に關与していると考えられる因子についても網羅的に解析を行い、候補となる遺伝子を抽出することができた。実際の臨床応用を想定した検討を行うことで、最適な細胞懸濁液の作成方法を示すことができた。

3 . 多施設共同臨床研究試験実施に向けての基盤整備

腹圧性尿失禁に対する当該臨床試験成績(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)を踏まえ、臨床試験計画書の骨子を作成した(主な検討項目としては、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)。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を行い、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ところ、先進医療 B として、臨床試験を実施し、保険承認を目指す開発方針とすることとした。

その開発方針について、平成 25 年 4 月 9 日に厚生労働省医政局研究開発振興課の担当官と、さらに、平成 25 年 6 月 7 日には厚生労働省医政局研究開発振興課及び医薬食品局審査管理

課の担当官と、腹圧性尿失禁における先進医療 B としての臨床試験の実施について相談したところ、本細胞分離装置 (Celution[®]800/CRS: サイトリ・セラピューティクス株式会社) について、製造販売承認を取得するためには、先進医療 B で臨床試験を実施することは差し支えないものの、最終的には、治験を実施することが必要であるとの指導を受けた。

そのため、平成 25 年 11 月 12 日に PMDA と薬事戦略相談 (事前面談) を実施したが、PMDA から、臨床試験の議論に入る前に、非臨床試験に係る対面助言を実施し、その後、臨床試験に係る対面助言に移行して行くことが望ましいとの助言を受けたため、名古屋大学及びサイトリ・セラピューティクス株式会社が保有しているデータを改めて精査し、平成 26 年 3 月 25 日に PMDA と薬事戦略相談 (事前面談) を再度実施した。

また、並行して、医師主導治験に必要な標準業務手順書の雛形の整備も行い、以下の標準業務手順書の素案を作成した。さらに、名古屋大学が保有している腹圧性尿失禁に対する有効性及び安全性に係る非臨床試験及び臨床試験成績の概要をまとめて治験薬 (機器) 概要書の素案を作成した。

1) 試験調整委員会への業務委嘱に関する手順書、2) 試験調整委員会の業務に関する手順書、3) 臨床試験実施計画書及び症例報告書の見本の作成に関する手順書、4) 試験薬概要書作成に関する手順書、5) 説明文書及

び同意文書の作成に関する手順書、6) 被験者の健康被害補償に関する手順書、7) 安全性情報の取扱いに関する手順書、8) 記録の保存に関する手順書、9) 試験薬の管理に関する手順書、10) 効果安全性評価委員会に関する手順書、11) モニタリングの実施に関する手順書、12) 監査の実施に関する手順書、13) 総括報告書の作成に関する手順書、14) 統計解析に関する標準業務手順書、15) 開発業務受託機関への業務委託に関する標準業務手順書

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 が用いられているが、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、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、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。脂肪組織由来幹細胞は培養下に、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脂肪組織由来幹細胞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脂肪組織由来幹細胞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。

昨年度の本研究事業で行った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。

また、本治療では、女性の真性腹圧性尿失禁以外に、男性においては前立腺癌術後の尿失禁を対象としている。幹細胞、特に iPS 細胞では、癌化、癌細胞増殖促進作用が危惧されている。体性幹細胞、特に脂肪組織由来幹細胞については癌化のリスクは低いとされているが、本年度の研究では、前臨床安全性試験として、ADRCs の前立

腺癌細胞に対する影響を検討した。ADRCsは前立腺癌細胞によるPSA産生を抑制することが示され、また実際にin-vivo実験では前立腺癌細胞成長を抑制する効果が示され、この点についても安全な治療法であることが示唆される。

今年度の研究において、脂肪由来幹細胞からFABPが分泌され、筋分化を促進することを遺伝子解析により明らかにし、本治療のバイオマーカーとなる可能性を示唆した。実際の治療においては、治療の有効性、注入細胞の生物学的動態を評価するためのサロゲートマーカーは有用であり、脂肪組織由来幹細胞を用いた治療においてFABPが新規・筋分化のバイオマーカーになり得る可能性が示唆された。

強皮症に対する脂肪由来幹細胞を用いた治療に関する本年度の研究では、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。

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。本研究課題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。

一方、平成25年度には、先進医療Bでの臨床試験又は医師主導治験を実施するため、厚生労働省医政局との事前相談、並びにPMDAと薬事戦略相談で議論しながら、最終的に開発方針として、医師主導治験を行うことを決定することができた。また、今後、多施設共同研究を実施するために、これまでに得られた臨床試験成績を踏まえて、臨床試験計画の作成を行う。さらに、説明文書・同意文書(見本)

の作成、治験薬(機器)概要書の作成、
電子的臨床試験情報収集 (Electronic
Data Capture : EDC) システムの構
築、各種標準業務手順書の作成等を行
い、他の施設の選定方法、モニタリン
グや監査の方法を含め、継続して検討
し、適切な臨床試験が実施できる体制
を構築することを目指す。

E. 結論

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 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、医師主導型治験のために 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。

以上より、腹圧性尿失禁に対する
ADRCs傍尿道注入治療は有効かつ安
全な細胞治療として有望であり、今後、
適切な臨床研究プロトコールを作成
し、医師主導型治験、あるいは先進医
療Bの制度に基づいて、保険診療を目
指したい。

強皮症については、培養ADSCsの全
身投与による治療を念頭に研究を進
めているが、今回の基礎的検討により、
我々が実施する低血清培養法の有効
性と安全性を確認することができた。
ADSCsの血管内投与においては、すで
に欧州において、Celution™システム

により採取したADSCsの急性心筋梗
塞に対する冠動脈内投与に関して、プ
ラセボ対照無作為比較試験が終了し、
心筋機能保護に関する有効性と安全
性が報告されている。今後、さらに基
礎的研究を進め、治験実施を目指した
い。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) Yamamoto T, Gotoh M. Editoial
comment to sacral neuromodulation
effective option for non-obstructive
urinary retention in men with
cerebral palsy *Int J Urol.* 2013 in
press
- 3) 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.* 191:1147-1152, 2014
- 4) 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.
 - 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]
 - 7) 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
 - 8) Kim H, Mizuno M, Furuhashi K, et al. Rat adipose tissue-derived stem cells attenuate peritoneal injuries in rat zymosan-induced peritonitis accompanied by complement activation. *Cytotherapy.* 2014;16(3):357–68
- ## 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
 - 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
 - 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

- 4) Gotoh M: Male and female stress urinary incontinence treatment using ADRCs. Cell Society Europe Meeting, 2013
- 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、2014
- 6) 構造並びに機能再生を目指す脂肪組織由来幹細胞治療の開発 - 腹圧性尿失禁に対する構造再生医療の開発 - . 文部科学省 橋渡し研究加速ネットワークプログラム 厚生労働省 早期・探索的臨床試験拠点整備事業/臨床研究中核病院整備事業 平成25年度成果報告会
- 7) Serum-starved adipose-derived stromal cells ameliorate rat crescentic glomerulonephritis by promoting immunoregulatory macrophages. ; Kazuhiro Furuhashi, Naotake Tsuboi, Asuka Shimizu, Yiqin Shi, Hangsoo Kim, Takayuki Katsuno, Yosuke Saka, Takenori Ozaki, Waichi Sato, Enyu Imai, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama ; ISSCR 11th Annual Meeting
- 8) Serum-starved Adipose-derived Stromal Cells Ameliorate Rat Crescentic Glomerulonephritis By Promoting Immunoregulatory Macrophages. ; Naotake Tsuboi, Kazuhiro Furuhashi, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama : Forefronts in Nephrology Florence
- 9) Low Serum Cultured Adipose Tissue-derived Stromal Cells Ameliorate Acute Kidney Injury In Rats. ; Takayuki Katsuno, Naotake Tsuboi, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama ; Forefronts in Nephrology Florence
- 10) 脂肪由来間葉系幹細胞を用いた急性呼吸窮迫症候群への治療戦略; "三村哲史, 坪井直毅, 橋本直純, 清水明日花, 金恒秀, 古橋和拡, 松尾清一, 丸山彰一; 第34回日本炎症再生医学会
- 11) 低血清培養脂肪由来間葉系幹細胞の創傷治癒促進効果についての検討; 阿部 智子, 尾崎 武徳, 堀之内明日花, 金 恒秀, 古橋 和拡, 秋山 真一, 勝野 敬之, 安田 香, 坪井 直毅, 松尾 清一, 丸山 彰一; 第34回日本炎症再生医学会
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 1) 脂肪組織由来間葉系幹細胞を含有する、勃起不全または尿意障害の細胞製剤、山本徳則、小出直史、後藤百万、武井佳史、国立大学法人名古屋大学、特許第495333号

2013-222630

2) 脂肪組織由来間葉系幹細胞を含有する、前立腺癌治療用細胞製剤 発明者 山本徳則、小出直史、後藤百万、武井佳史 特許願人 名古屋大学 出願日平成 21 年 12 月 7 日(特願 2009-277437)

3) 脂肪組織由来間葉系幹細胞を含有する、勃起不全または尿意障害の細胞製剤発明者 山本徳則、後藤百万 特許願人 名古屋大学 出願日平成 21 年 10 月 6 日(特願 2009-232068)

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

5) 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

6) 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

7) 尿路感染症の予防又は治療 山本徳則、柴田玲、淵真悟、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

8) 細胞製剤及び細胞の活性を高める方法 山本徳則、淵真悟、竹田美和、鈴木哲、柴田玲、舟橋康人、後藤百万、大山力、飛澤悠葵 特許願人 名古屋大学 出願日平成25年 1 月 21 日特願 2013-008355 国際出願2014年1月18日 (PCT/JP2014/050862)

9) 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) (PCT/JP2010/071633)

10) 「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