

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。

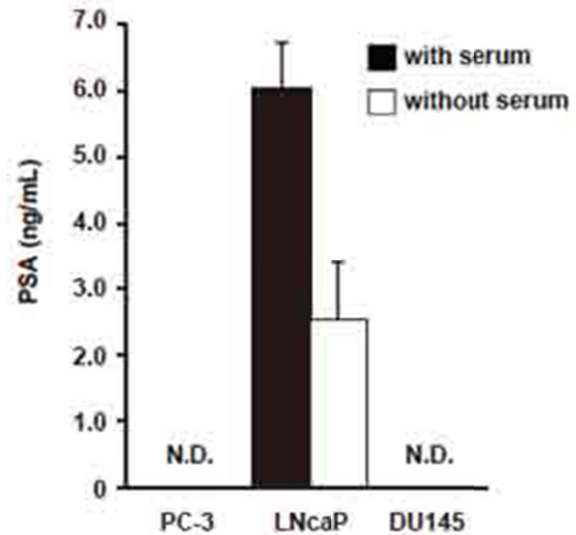


図 2 : 血清付加群と非付加群における前立腺癌細胞株 PC-3, DU145, LNCaP の培養上清の PSA の比較

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 Replacement)10%(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。

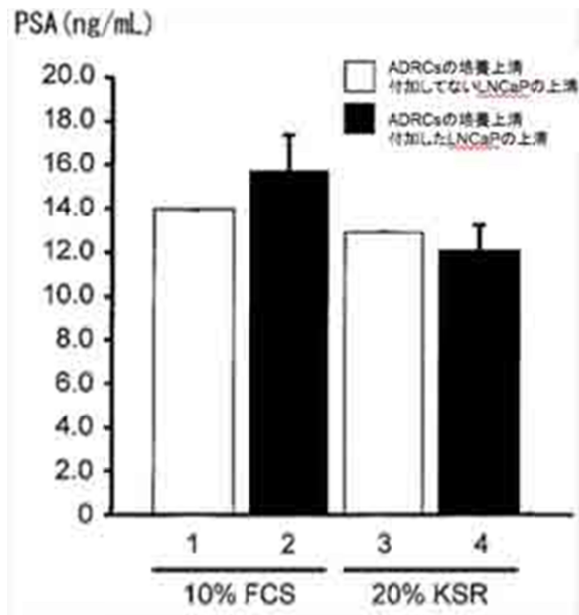


図3：PSA 産生 LNCaP への ADRCs 培養上清添加前後の上清 PSA 値（FCS と KSR における比較）

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）。

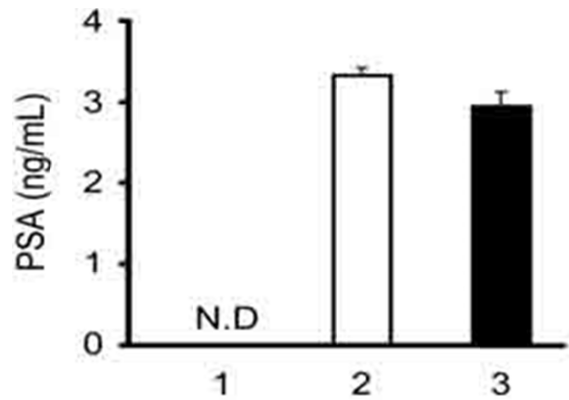


図4：培養上清の PSA 産生量の下記 3 群での比較 1：ADRCs 単独培養、2：LNCaP 単独培養、3：ADRCs とヒト LNCaP との細胞比 1：1 での混合培養

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。

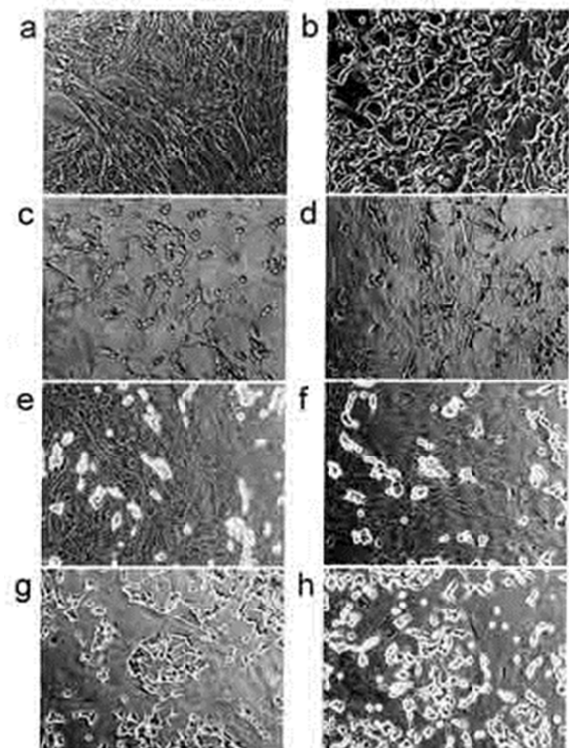


図5：前立腺癌細胞株と ADRCs 混合培養後の位

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。

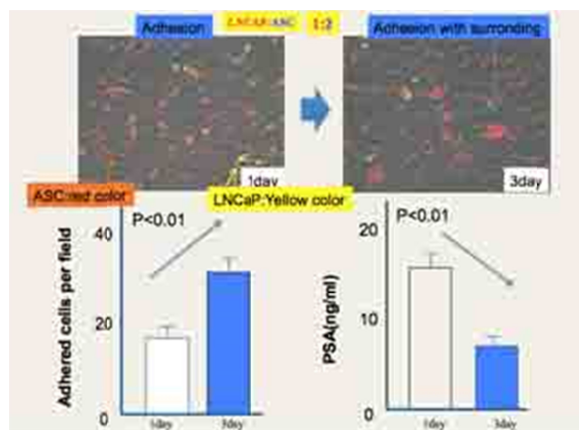


図 6: 混合培養後の LNCaP と ADRCs の接着率、および培養上清中 PSA 濃度
e,f の位相差顕微鏡条件 LNCaP : ADRCs = 1:2 でタイムラプスを行い、1日、3日での LNCaP (黄

色マーク) と ADRCs (赤マーク) 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)。

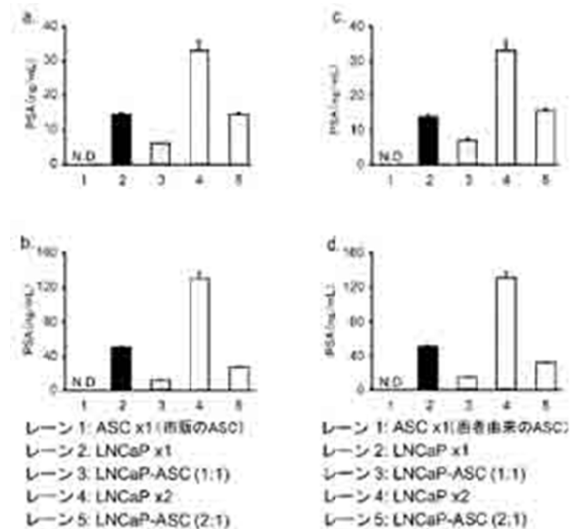


図 7: 前立腺癌細胞株培養と前立腺癌細胞・ADRCs 混合培養における上清 PSA 値の比較
a: 市販 ADRCs との混合培養 (48 時間培養)。レーン 1 は ADRCs のみの培養 (細胞数 1.8 培養⁵)、レーン 2 は LNCaP 細胞のみの培養、(細胞数 1.8 みの培⁵)、レーン 3 は LNCaP 細胞と ADRCs の混合培養 (細胞数の比 1:1、各細胞数 1.8 胞数⁵)、レーン 4 は LNCaP 細胞のみの培養 (細胞数 3.6 みの培⁵)、レーン 5 は LNCaP 細胞と ADRCs の混合培養 (細胞数の比 2:1、LNCaP 細胞数 3.6aP⁵)。

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)。

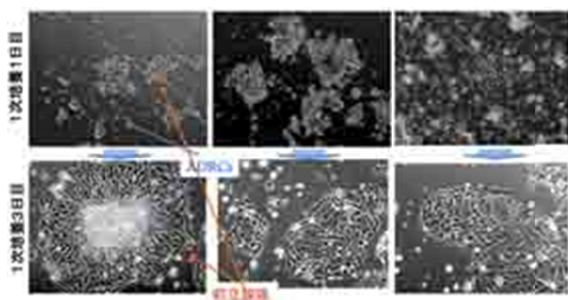


図 8: 臨床前立腺癌組織と ADRCs の混合 1 次培養: 1 日目と 3 日目の細胞形態の位相差顕微鏡所見

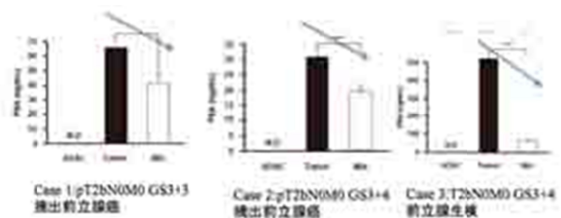


図 9: 臨床前立腺癌組織と ADRCs の混合 1 次培養における、3 日目の培養上清 PSA: ADRCs 混和群(Mx)と前立腺癌単独群(Tumor)での比較

1-7) 大腸癌株との ADSCs 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 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 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。

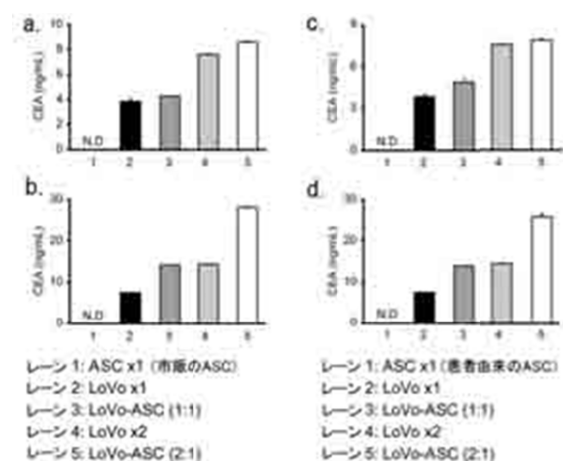


図 10: ヒト大腸腺癌株培養 LoVo と ADRCs 混合培養における上清 CEA 値の比較

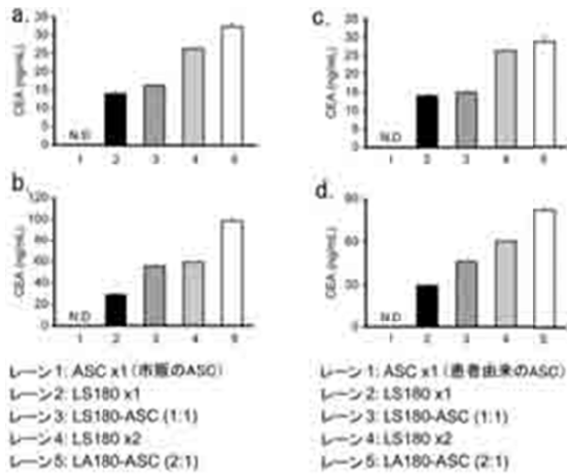


図 11：ヒト大腸腺癌株培養 LS180 と ADRCs 混合培養における上清 CEA 値の比較

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

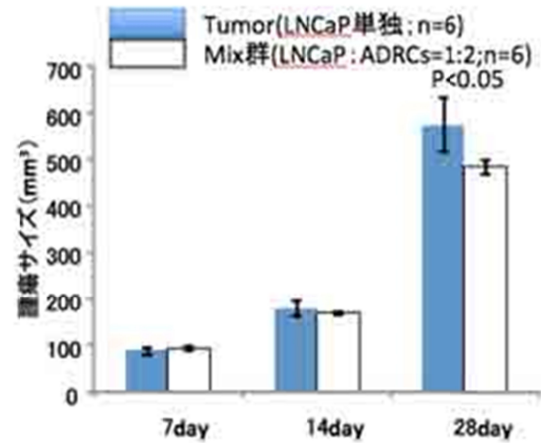


図 13：前立腺癌細胞単独および前立腺癌細胞・ADRCs 混合移植による腫瘍サイズ推移の比較

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) の膀胱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率が肺癌に次いで第 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が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。

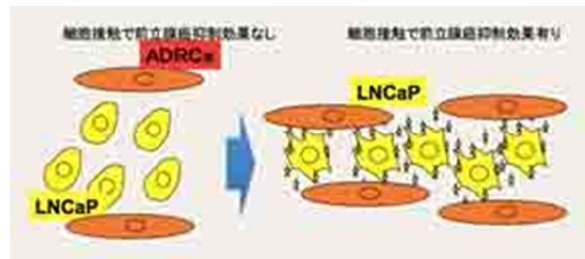


図 14：ADRCs による LNCaP 抑制効果

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 (Supl.) : 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、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 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、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 2 1 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