

201409053A

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（早期探索的・国際水準臨床研究事業）

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

（平成 24-実用化-国際-指定-002）

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 後藤 百万

平成 27（2015）年 5 月

目 次

I. 総括研究報告書	1
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 後藤百万	
II. 分担研究報告	
1. 前立腺手術後の男性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	23
後藤百万、舟橋康人	
2. 女性腹圧性尿失禁に対する傍尿道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	36
後藤百万、山本徳則	
3. 脂肪組織由来再生細胞を用いた腹圧性尿失禁の治療における脂肪吸引の 合併症の検討	49
亀井 譲、山本徳則、鳥山和宏、高成啓介	
4. 尿失禁モデルラットに対する非培養脂肪組織由来再生（幹）細胞（SVF） 傍尿道注入の有効性と安全性に関する基礎的検討	54
山本徳則、高橋雅英	
5. 脂肪組織由来間質細胞を用いた腹圧性尿失禁に対する効力を裏付ける 非臨床試験の検討	61
清水 忍、山本徳則	
6. 多施設共同医師主導治験実施に向けての基盤整備	68
水野正明、安藤昌彦、加藤勝義、平川晃弘、清水 忍、中山 忍	
7. 男性腹圧性尿失禁に対する脂肪組織由来再生（幹）細胞の傍尿道注入 治療の有効性及び安全性に関する多施設共同医師主導治験の 実施計画書の作成	180
後藤百万、山本徳則、平川晃弘、清水 忍、中山 忍	

8. 脂肪組織由来幹細胞を用いた急性進行性糸球体腎炎治療に関する研究	193
松尾清一、丸山彰一	
9. 非培養自己ヒト皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた一側 声帯麻痺治療の有用性に関するメカニズムの検討	203
山本徳則、藤本保志、西尾直樹、須賀研治	
10. 脂肪組織由来幹細胞の全身投与における細胞動態の検討	210
山本徳則、若林俊彦、高橋雅英、杉山裕一郎、佐藤義明、早川昌弘	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	217
IV. 研究成果の刊行物・別刷	219

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業 (早期探索的・国際水準臨床研究事業))
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「急性進行性糸球体腎炎」を取り上げ、5年以内の治験実施を目指す。平成26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、急性進行性糸球体腎炎については基礎的研究を行い、さらに多施設共同医師主導臨床治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(20症例:男性16例、女性4例)を実施し、中期・長期成績の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16例では、術後尿失禁量は継時的に減少し、平均34.4か月の経過観察において、16例中10例(62.5%)で尿失禁量が改善し、特に1例では尿失禁の完全消失を認め、5年の経過で再発を認めていない。女性4例では、術後1年の時点で2例で尿失禁の消失および著明改善が得られた。さらに、今までに**ADRCs**の傍尿道注入治療を受けた男性において、皮下脂肪吸引の合併症・安全性について検討した。肺塞栓や細菌感染などの重大な合併症はなく、腹部皮下出血・皮膚の凹凸・皮下硬結・瘢痕の合併症は軽微なものも含めれば全例にみられたが、すべて1~6か月以内に消失し、高齢男性における皮下脂肪吸引は安全な手技と考えられた。基礎的研究では、ラット皮下脂肪から**SVF (Stromal vascular fraction)**を採取し、尿失禁モデルラットの尿道粘膜下に投与したところ、尿漏出圧増加、ならびに注入細胞の平滑筋への分化が確認され、さらに局所投与された**ADRCs**が全身へ移動しないことも確認された。腹圧性尿失禁モデルラットの尿道粘膜下に、ラット**SVF**を3種類の用量で投与し、尿漏出圧の測定および病理学的検討を行ったところ、**SVF**投与群で投与細胞の平滑筋への分化を確認した。多施設共同医師主導治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行い、多施設共同医師主導治験

実施の準備を完了した。すなわち、平成 26 年度は、厚生労働省医政局と医薬品医療機器総合機構（PMDA）との事前相談により開発方針を決定し、PMDA 薬事戦略相談（非臨床・対面助言）（平成 26 年 7 月 10 日）、PMDA 薬事戦略相談（臨床試験デザイン・対面助言）（平成 26 年 11 月 25 日）により医師主導治験実施の可否、および治験実施計画のデザインについて協議し、開発方針を決定した。作成した治験実施計画書（案）を基に、治験実施体制の構築を進め、平成 27 年度から多施設共同医師主導治験を実施する体制を構築した。PMDA との協議に基づいて、男性腹圧性尿失禁患者を対象とすることとし、多施設共同医師主導治験を実施するために計画を立てた。腹圧性尿失禁の疫学情報、国内外の腹圧性尿失禁に対する治療の現状、並びに過去に実施されている先行臨床試験の結果を踏まえ試験デザインを構築した上で、治験実施計画書（案）を作成し、PMDA において医療機器治験相談（対面助言）を行ったが、概ね同意が得られたため、主要な試験デザインが決定できた。また、その他の詳細な項目については、実施施設における調整を踏まえ、平成 26 年度中にほぼ確定することができた。急性進行性糸球体腎炎に対する、低血清培養脂肪由来幹細胞（LASC）による治療の開発では、急性進行性糸球体腎炎（RPGN）モデルへの治療実験の改良と、LASC の臨床応用を見据え、ヒト LASC の有効性の評価を行った。臨床用細胞作製のコールドランを Cell Processing Center（CPC）において行い、投与基準を満たす細胞を作成可能か、検討を行った。治療実験においては RPGN に対する LASC の有効性が示され、CPC においても臨床応用に適した細胞を安定して作成できることが示された。ADRCs を用いた構造再生では、ADRCs と脂肪組織混合物の局所投与を用いており、注入した ADRCs 加脂肪組織の容積効果の持続を確認する目的で、片側声帯閉鎖不全豚を対象に声帯への ADRCs 加脂肪組織の注入に関する大動物実験を行い、その有用性について検討した。吸引脂肪のみの注入群に比較して、より高濃度の ADRCs 含有脂肪を声帯内に注入することで、血流を増加させ、筋肉萎縮を抑制することによって、注入脂肪の容量が長期間にわたり持続でき、より質の高い音声をうることを示された。ADRCs の局所投与の有効性と安全性については、科学的知見が集積されつつあるものの、より低侵襲である培養脂肪由来幹細胞を用いた細胞治療を、腹圧性尿失禁や、それ以外の多彩な疾患に応用するためには、培養脂肪組織由来幹細胞の経静脈・全身投与について検討することが必要となることから、培養脂肪組織由来幹細胞の全身投与における細胞動態について動物モデルを用いて検討した。新生児虚血性脳症（HIE）について、そのラットモデルを作成し、骨髓由来幹細胞および脂肪組織由来幹細胞の静脈内投与後の体内動態や各臓器への影響について検討したところ、全身投与後の脂肪由来幹細胞は骨髓由来幹細胞に比べて、肺への残留が遷延した。

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 譲・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

中山 忍・名古屋大学先端医療・臨床研究
支援センター・薬剤師

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

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「急性進行性糸球体腎炎」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 80 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、毎年 2000 人程度の新規術後尿失禁患者数が増加している現状であ

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

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、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、急速進行性糸球体腎炎は、主として高齢者に発症し、急速に腎機能低下を来し腎不全に至る難治性の腎炎で、肺出血を来すこともある。わが国における患者数は6千人、世界では20万人と推定される。これら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. ADRCsによる腹圧性尿失禁治療（後藤・山本、舟橋、亀井、清水、高橋）

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、3時間以内に終了することができる。平成26年度は、平成25年度に引き続き、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15症例、計20症例について、有効性と安全性に関する中期・長期における中間成績を解析した。後藤・舟橋は男性16例の中期・長期成績、後藤・山本は女性4例の中期成績について検討を行った。また、亀井・山本は、ADRCsを採取するために必要な皮下脂肪吸引について、従来の実施例についての合併症の検討を行った。培養脂肪組織由来幹細胞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検討は平成24年度の研究で実施したところであるが、臨床における腹圧性尿失禁治療においては、傍尿道への非培養脂肪組織由来再生（幹）細胞（ADRCs）を投与することから、本年度の研究においては、山本・高橋は非培養ADRCsの局所投与の有効性および安全性について検討した。ラット皮下から採取したSVF（Stromal vascular fraction）、すなわちADRCsを尿失禁モデルラットの尿道粘膜下に投与し、形態学的検討、および全身への影響について検討した。また同様に、清水・山本は、株式会社LSIメディエンスに委託し、ラット皮下脂肪由来間質細胞（SVF）の尿失禁モデルラット尿道粘膜下投与による尿漏出圧（LPP）及び平滑筋への分化の影響を検討した。

1-1. 尿道括約筋機能障害による男性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 16 例（前立腺癌に対する根治的前立腺全摘除術後 12 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 4 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. 尿道括約筋機能障害による女性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、山本）

腹圧性尿失禁女性 4 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、安全性の評価は、男性実施例と同様の方法で実施し、超音波血流評価は、経膣的超音波検査により実施した。

1-3. ADRCs 傍尿道注入治療における腹部皮下脂肪吸引の合併症と安全性の検討（亀井、山本）

今回治療対象となる腹圧性尿失禁の多くは高齢の男性患者であり、これらの患者においては、腹部の皮下脂肪が比較的少なく組織が脆弱であるため出血などの合併症が危惧されることから、これら患者の脂肪吸引の合併症について詳細に検討した。対象は前立腺疾患の手術後に腹圧性尿失禁が持続する 11 人の男性患者（平均年齢、76 才）で、術後の脂肪吸引に関

連する合併症について、また、肥満指数 (BMI)、腹部の脂肪厚、採取時間、ヘモグロビン (Hb) の変化について、後ろ向きにカルテにて調査し評価を行った。

1-4. 非培養脂肪組織由来再生細胞 (ADRCs) の腹圧性尿失禁治療に対する有効性と安全性に関する基礎的研究 (山本、高橋、清水)

山本・高橋はラット皮下脂肪から採取した SVF を尿失禁モデルラットの尿道粘膜下に投与し、有効性と安全性の評価を行った。7 週齢 Female F344 ラット皮下脂肪を採取し、皮下脂肪をコラゲナーゼ処理した後、遠心分離して得られた脂肪由来血管間質細胞群

(SVF: stromal vascular fraction) を採取し、傍尿道周囲局所注入を行った。有用性評価として漏出圧 (LPP: Leak Point Pressure)、免疫病理組織学的検討

[HE 染色, α smooth muscle actin (SMA), calponin I 及び myosin heavy chain (MHC)] を行った。安全性評価としては近赤外線を発する Dir を ADRCs にマーキングし、傍尿道周囲に注入し、Vehicle (20ul DMEM) (Control: Female F344 ラット) (n=6) と比較して、IVIS® Imaging System を用いて in vivo imaging 検査を行い、SVF の全身動態を経時的に検索した。

清水・山本は、下記のプロトコールを作成し、株式会社 LSI メディエンスに委託して実験を行った。すなわち、膀胱周囲及び尿道平滑筋を剥離し、腹圧性尿失禁モデルを作製 (投与) 後 28

日に LPP を確認し、また、尿道の病理的評価により平滑筋への分化を確認した[HE 染色、 α -Smooth Muscle Actin (SMA)、calponin I 及び Myosin Heavy Chain (MHC)]。SVF の投与量は 1×10^5 cell/body、 1×10^6 cell/body 及び 1×10^7 cell/body とし、対照群と腹圧性尿失禁モデルの作製を行わないシャム群を設けた。また、投与用に調製したラット皮下脂肪由来間質細胞の一部を用い、フローサイトメトリーにより投与当日に表面マーカー (CD31・CD44・CD45) の解析を行った。測定細胞数は FSC/SSC のドットプロットでゲーティングした細胞を 10,000 個以上とした。

2. 多施設共同医師主導治験実施に向けての基盤整備 (水野、安藤、加藤、平川、清水、中山、後藤)

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。

水野・安藤・加藤・平川・清水・中山は、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、細胞分離装置である Celution™ で分離した脂肪組織由来再生 (幹) 細胞 (ADRCs) を用いて男性腹圧性尿失禁患者を対象に、多施設共

同医師主導治験の支援体制を提供するための整備を進めた。腹圧性尿失禁を対象とした治験を実施するため、医薬品医療機器総合機構（PMDA）と治験実施の可否、及び治験実施計画のデザインについて協議しながら、開発方針を決定した。さらに、後藤・山本・平川・清水・中山は、男性腹圧性尿失禁患者を対象に、多施設共同医師主導治験を実施するための計画を立て、腹圧性尿失禁の疫学情報、国内外の腹圧性尿失禁に対する治療の現状、並びに過去に実施されている先行臨床試験の結果（中間解析）を踏まえ試験デザインを構築した上で、PMDAにおける治験相談を利用し、試験デザインの検討を進めることとした。以上の検討を基に治験実施計画書（案）を作成し、PMDAにおいて医療機器治験相談（対面助言）を行った

3. 急性進行性糸球体腎炎（松尾・丸山）

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。急性進行性糸球体腎炎に対する脂肪組織由来幹細胞（Adipose-derived stem cell: ASC）を用いた再生治療の開発では、従来の検討で、腎臓の炎症性疾患である急速進行性糸球体腎炎（RPGN）動物モデルに対し、免疫系、特にマクロファージの機能再生を介し、その主症状を緩和することを確認している。今年度の研究においては松尾・丸山は、RPGN モデルへの治療実験の改良と、低血清培養脂肪組織由来幹細胞（LASC）の臨床応用を見据え、ヒト LASC の有効性を評価するための新規判別法の確立を目指した。臨床用細胞作製のコールドランを Cell Processing Center (CPC)において行い、投与基準を満たす細胞を作成可能かの検討を行った。

4. ADRCs の局所・全身投与に関する有効性・安全性に関する追加研究（山本、若林、高橋）

山本は、藤本・西尾・須賀（研究協力者）と協力し、ADRCs と脂肪組織混合物の容積効果の持続を確認する目的で大動物実験を行った。大動物としてブタ 2 頭を対象とした。全身麻酔下にて頸部外切開により右反回神経を確認し切離することで一側反回神経麻痺モデルを作成した。30 日後に麻痺している右声帯にそれぞれ、片方には 0.5ml ADRCs+ 自家脂肪 1ml (ADRCs-pig)、もう片方には 0.5ml 乳酸リンゲル液 + 自家脂肪 1ml (control-pig)を注入し、60 日後、120 日

後に、内視鏡、超音波検査、血流計、音声解析、CTにて解析を行い、その効果を評価した。120日後に喉頭を摘出し、HE染色し比較検討した。また、全臓器摘出病理組織での安全性の検討を行った。

ADRCsの局所投与の有効性と安全性については、科学的知見が集積されつつあるものの、より低侵襲である培養脂肪由来幹細胞を用いた細胞治療を、腹圧性尿失禁や、それ以外の多彩な疾患に応用するためには、培養脂肪組織由来幹細胞の経静脈・全身投与について検討することが必要となる。そこで、山本・若林・高橋は、培養脂肪組織由来幹細胞の全身投与における細胞動態について動物モデルを用いて検討し、具体的には新生児虚血性脳症(HIE)について、そのラットモデルを作成し、骨髄由来幹細胞および脂肪組織由来幹細胞の静脈内投与後の体内動態や各臓器への影響について検討した。新生児HIEモデルにおいて低酸素負荷後、4時間後および24時間後にASCまたはBM-MSCC1×10⁵を個静脈内投与し、投与後24時間以内の死亡率を算出した。新生児HIEモデルに対し、低酸素負荷後24時間に、イソフルレン吸入麻酔下においてPBS0.1mlまたはASC、BM-MSCC1×10⁵個投与し、その後低酸素負荷48時間で、サクリファイスし、脳パラフィン切片を作成、免疫組織学的に患側(左側)海馬におけるアポトーシスマーカーであるactive caspase-3の陽性細胞数を評価した。また同時に右心から直接血液を採

取してすぐに氷冷・遠心分離を行い、血清を分離し、MILLIPLEX Rat Cytokine/Chemokine Panel (Millipore社)を用いて血清中のサイトカイン・ケモカインを測定した。低酸素負荷による脳受傷から24時間後に、蛍光色素DiRで標識したASC、BM-MSCC1×10⁵個、右外頸静脈から投与した。その後の体内動態をex vivoでIVIS® Imaging Systemにより28日間経時的に評価した。さらに各臓器への影響を検討するため、死亡率の高い低酸素負荷から4時間後にASCまたはBM-MSCC1×10⁵~10⁶個投与し、投与15分後に安楽死させた後、肺・肝・腎のパラフィン切片を作製してHE染色し病理学的に検討した。

(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男性腹圧性尿失禁に対する傍尿道 ADRCs 注入治療の臨床的検討

対象患者は、男性 16 例で、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 12 例、前立腺肥大症に対する手術後の腹圧性尿失禁 4 例であった。手術時間は、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 73~119 分、平均 99.7 分、傍尿道注入時間は 17~54 分、平均 28.9 分であった。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 細胞は 87.0%~93.8% 個であった。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。

男性 16 例でのフォローアップ期間は 6 か月~5 年 10 か月、平均 34.4 か月であった。術後 1 年以上経過した

14 例における 1 日尿失禁量評価の比較では、全例においては、術後 1 年では平均 244.5g から 176g に減少した(減少率 28.1%)。尿失禁量は 14 例中 10 例(71.4%)で改善し、平均 250.8g から 122.8g へ減少し、減少率は 51.1%であった。他方、4 例では、尿失禁量の改善はみられなかった。改善例中 1 例においては、術後 9 ヶ月で尿失禁が消失し、術後約 5 年の時点においても尿失禁を認めていない。前述のように、尿失禁量は 14 例中 10 例(71.5%)で改善したが、尿失禁量が 50%以上改善した症例は 14 例中 8 例(57.1%)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 8 例(80%)であった。

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 36.5 cmH₂O から 46.4 cmH₂O ($p<0.01$)、尿失禁改善群では平均 36.7cmH₂O から 47.6 cmH₂O ($p<0.01$)、尿失禁非改善群で平均 36.0 cmH₂O から 41.0 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 20.2 mm から 27.9 mm ($p<0.01$)と改善、尿失禁改善群では平均 21.6 mm から 29.9mm ($p<0.01$)、尿失禁非改善群では平均 16.0 mm から 21.8 mm (n.s.)と改善した。

妥当性の検証された尿失禁症状・QOL 質問票により、1 年間経過した 14 例で、自覚的症状変化と QOL 変化

を検討した。自覚的尿失禁頻度、自覚的尿失禁程度、および QOL については、それぞれ尿失禁量改善群では経時的な改善傾向を示したが、尿失禁量非改善群では改善傾向がみられなかった。

経直腸的造影超音波検査では、注入 2 週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、全例で認められた。

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 MRI では、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、6 例で皮下脂肪吸引後の明らかな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、16 例中 15 例で最新観察時までには異常な上昇を認めていない。

1・2. 尿道括約筋機能障害による女性腹圧性尿失禁に対する傍尿道 ADRCs 注入治療の臨床的検討

対象患者は、女性腹圧性尿失禁 4 例で、全例、薬物治療及び骨盤底筋訓練治療の無効例であった。3 例では腹圧性尿失禁に対する前手術治療はなかったが、1 例は腹圧性尿失禁に対して

2 回の尿道中部スリング手術を行ったが効果のみられない症例であった。

各例において、Celution™ System により抽出した細胞数は $2.5 \times 10^7 \sim 4.5 \times 10^7$ 個であり、そのうち viable 細胞数は $2.3 \times 10^7 \sim 3.7 \times 10^7$ 個であった。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。

手術時間は、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 78~108 分、平均 94.8 分、傍尿道注入時間は 15~25 分、平均 21.5 分であ

4 例でのフォローアップ期間は 12 か月~24 ヶ月、平均 15.8 か月であった。治療前から治療後 1 年の時点までの尿失禁量は、2 例で改善し、1 例は完全に尿失禁が消失し (19.4 g → 0g : 減少率 100%)、他の 1 例では、ほぼ尿禁制となった (25.8g → 2g : 減少率 92%)。他方、2 例では、尿失禁量の改善はみられず、やや悪化傾向であった (5.3g → 17g、70g → 192.3g)

他覚的外尿道括約筋機能の変化は、24 時間尿失禁量の顕著に改善した 2 例では、MUCP はそれぞれ、42cmH₂O から 55cmH₂O、23cmH₂O から 52cmH₂O と経時的に改善したが、尿失禁改善の見られなかった 2 症例では、症例 1 では、23cmH₂O から 31cmH₂O と改善したが、症例 2 では 47cmH₂O から 46cmH₂O と改善がみられなかった。また、同様に FPL は、24 時間尿失禁量の顕著に改善した 2

例では、それぞれ、26mm から 30mm、24mm から 30mm と経時的に改善し、尿失禁改善の見られなかった2症例でも、症例1では、25mm から 35cmH₂O、症例2では 28mm から 30.5mm へと改善がみられた。

ICIQ-SF での、自覚的尿失禁頻度および QOL については、それぞれ尿失禁量改善症例ではすべての領域で、経時的に改善傾向を示したが、尿失禁量非改善症例では改善不良であった。

経腔的造影超音波検査では、注入2週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、4 例中 3 例で認められた。

注入した脂肪組織の MRI による確認 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。

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、2 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。

1-3. ADRCs 傍尿道注入治療における腹部皮下脂肪吸引の合併症と安全性の検討

脂肪吸引は腹部で通常通り行われ、約 250mL の脂肪組織が採取された。脂肪の採取時間は、平均 56.5 分で（範

囲 28 - 88 分）であった。血液検査では、術後1日目に Hb がわずかに減少し、減少量は平均 0.7 g/dl（範囲 0.2 から 1.7 g/dl）であった。また、Hb 低下と採取時間の間には相関する傾向がみられた。一方で、Hb 低下と腹部の脂肪厚、Hb 低下と BMI との間には相関関係がみられなかった。

細菌感染や肺塞栓症などのような重症な合併症は、脂肪吸引後に観察されなかった。皮下出血、知覚鈍麻、皮膚の凹凸、皮下の硬結、肥厚性瘢痕などの若干の合併症がみられ、皮下出血は、大なり小なり全症例でみられたが、すべての皮下出血は、2 から 3 週間で消失した。

8 人の患者において、腹部の知覚麻痺は、手術後1週以内に目立つようになったが、術後6ヵ月以内でおさまった。5 例では、腹部の凸凹が手術後に2、3 週以内に観察されて、術後数週後に最も目立った。しかし、すべての凸凹は術後6ヵ月以内に目立たなくなった。3 人の患者で腹部硬結の訴えがあったが、術後6ヵ月以内に軽快した。術後6ヵ月の時点で2人の患者で目立つ瘢痕を認めた。

1-4. 非培養脂肪組織由来再生細胞（ADRCs）の腹圧性尿失禁治療に対する有効性と安全性に関する基礎的研究

腹圧性ラットモデルの傍尿道周囲に、Dir でラベルした SVF を局所注入し、その全身の in vivo imaging を経時的に検索した実験では、注入直後6時

間後、1日後、3日後、7日後共にDirの集積は傍尿周囲に局限し、多臓器（肺、肝臓、脾臓）の集積はなかった。また、同時に行ったHE染色でも全身臓器の循環障害、腫瘍の発生はなかった。また、GFPラットのSVFを傍尿道周囲局所投与後のGFP免疫染色でも全身臓器の集積はなかった。

腹圧性尿失禁モデルラットにおけるLPPの比較では、4週間ではVehicle群(n=6)の尿漏出圧は、SVF注入群(n=6)に比べて有意に低かった。すなわち、SVF注入群では尿道抵抗の増加が4週後認められた。

傍尿道周囲注入の平滑筋原性免疫病理組織では、注入部は α -SMA、Desmin、Carponin-I陽性で、さらに最も特異性が高い平滑筋原性の免疫染色であるMHC (myosin heavy-chain)による染色も陽性であり、ADRCsの平滑筋への分化が示唆された。傍尿道断面のbulking massにおけるSVF投与後(28日目)筋原性多重免疫染色を行ったところ、存在するはずのない、SVFを注入したbulking mass内に平滑筋原性細胞(α SMA陽性細胞)を認めた。

株式会社LSIメディエンスへの委託実験では、シャム群のLPPは34.3mmHgで、対照群のLPPは23.4mmHgであり、有意なLPPの低下が認められ、モデルの作製は確認できた。しかし、SVF 1×10^5 cell/body、 1×10^6 cell/body 及び 1×10^7 cell/body群と対照群との間に有意なLPPの差は認められなかった。一方、尿道の病理組織学的評価において、 α Smooth Muscle Actin (SMA) 及び

Calponin I 染色による発現面積はSVF投与群でいずれも対照群より高値を示したが、Myosin Heavy Chain (MHC) 発現面積に各群の明らかな差は認められなかった。表面マーカーの解析では、CD44の陽性率は平均0.6%、CD31の陽性率は平均12.0%、CD45の陽性率は平均20.6%であった。本実験では、SVF採取から尿道注入まで9時間の時間が経過していることが判明し、表面マーカー陽性率が低下していたことと合わせ、時間経過による幹細胞活性が低下していたことが、LPP増加が不良であったものと考えられた。

2. 多施設共同医師主導治験実施に向けての基盤整備

平成25年度に実施した厚生労働省との相談を踏まえ、CelutionTMで分離したADRCsを用いた腹圧性尿失禁患者に対する治験を実施する方針を固め、平成25年度に2回実施したPMDAとの薬事戦略相談（事前面談）も踏まえ、まずは治験実施の可否について、PMDAとの薬事戦略相談を行うこととした。

実施した効力を裏付ける非臨床試験、サイトリ社が保有するCelutionTMで分離されたADRCsの特性や非臨床試験成績の情報を、平成26年5月21日にPMDAの薬事戦略相談（事前面談）において検討し、平成26年7月10日に薬事戦略相談（対面助言）（第機戦P56号）が実施された。当該薬事戦略相談においては、医師主導治験の実施の可否について相談を行ったが、

PMDA からは大きな異論はなく、治験を実施する上で必要な非臨床試験の充足性については、特段の問題はない旨の回答が得られた。

そのため、現在、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（平成 23 年 3 月 15 日承認：厚生労働省発医政 0315 第 3 号）非盲検非対照試験（目標症例数 30 例）を踏まえ、試験計画骨子（案）を作成し、試験デザインの妥当性を説明するための根拠を検討した。その根拠を基に、平成 26 年 10 月 10 日に医療機器対面助言（治験相談）のための事前面談を実施し、相談事項の確認が行われた。平成 26 年 11 月 25 日に実施された医療機器治験相談（対面助言）（第機 P1048 号）では、PMDA からは大きな異論はなく、主な試験デザインについて、了解が得られた。

そこで、PMDA との議論を踏まえた治験実施計画書（案）の作成をさらに進め、また、並行して説明文書・同意文書（案）、治験機器概要書（案）の整備を行った。

さらに、治験実施のため Celuion™ を保有する米国サイトリ社と、守秘義務契約、および Investigator Initiated Research Agreement、及び Loaner Agreement の契約を締結した。

先行臨床試験のデータの更新を行い、背景、症例数設定根拠等の修正を行った。さらに、関係する治験協力者

の意見も踏まえ、検査項目や評価方法の再確認を行い、加えて、医薬品医療機器等法、医療機器 GCP 省令、その他各種関連省令・指針の再確認を行い、治験実施計画書全体の修正を行い、平成 26 年度中にほぼ確定することができた。平成 27 年度 4 月に治験実施計画書を確定する予定で、名古屋大学の治験審査委員会（Institutional Review Board：IRB）に諮る準備を概ね整えることができた。

3. 急性進行性糸球体腎炎

治療実験の改良では、従来の $2 \times 10^6/\text{body}$ 、連続 6 回投与の治療効果について再度確認実験を行い、BUN、sCr 値、尿たんぱくのいずれの項目においても改善が確認された。続いて投与回数を 6 回から 3 回隔日に変更し、回数を減らしても BUN、sCr 値の改善が認められた。3 回投与でも十分な治療効果があることが示されたことから、さらに投与細胞数を 8×10^5 、 $2 \times 10^5/\text{body}$ に減らして検討を行ったところ、 $2 \times 10^5/\text{body}$ の投与量においても十分な治療効果を認めた。

マクロファージ分化能試験では、マクロファージとの共培養ではラットマクロファージーラット ASC 間では M2 誘導が認められるものの、ラットマクロファージーヒト ASC 間においては、明らかな M2 誘導を起こすことは困難であった。Jurkat 細胞との共培養を行ったところ、増殖抑制は認められなかった。

次に CD3/CD28+rIL-2 で刺激を加

えた PBMC に対する増殖抑制試験を行ったところ、PBMC のドナーにより増殖能自体に差があるため判定が困難ではあったが、増殖抑制能を確認することに成功した。この時の上清中サイトカインおよびケモカインを測定し、炎症環境に関して検討を行った。

名古屋大学付属病院にて採取された皮下吸引脂肪を用いてコールドランを二回実施 (LASC TR-1, LASC TR-2) した。CPC にて培養し、その性状・性能に関して確認を行った。臨床プロトコールとして passage4, 5, 6 の細胞の使用を想定しているため、P4, P5, P6 の細胞上清を回収し、サイトカイン分泌能について検討を行った。

各 passage における細胞表面マーカーの測定では、陰性マーカーとして CD14, 34, 45、陽性マーカーとして CD44, 73, 105 を測定するプロトコールを作成していたが、LASC の特性上 CD105 に比べ CD90 の方がマーカーとして優れているとの基礎データが得られたため、TR-1 の P4 以外では CD90 を陽性マーカーとして測定した。

無菌試験 (エンドトキシン試験、マイコプラズマ試験、真菌)、ウイルス試験を、細胞培養培地を検体として外注して測定を行い、問題を認めなかった。

4. ADRCs の局所・全身投与に関する有効性・安全性に関する追加研究

声帯麻痺モデルブタでの、麻痺側右声帯への ADRCs 加脂肪組織注入実験

では、2 頭とも左声帯については動きも良好で、萎縮所見も認められなかった。control-pig では 60 日後、120 日後ともに右声帯萎縮し、ADRCs-pig では 60 日後、120 日後ともに右声帯は膨隆し、声帯間隙の減少が認められた。

血流計による血流測定では、ADRCs-pig の右声帯では 60 日後に血流計値の増加を認めた。CT・超音波検査では、control-pig では右声帯の萎縮が残存しているのに比べ、ADRCs-pig では右声帯筋の萎縮が改善している所見を認めた。病理学的評価において、ADRCs-pig では注入した部位に脂肪組織は十分量残存を認め、大小不同の脂肪組織とその周囲に線維化や膠原線維の増生が認められた。Sonogram と Voice waveform では、ADRCs-pig ではフォルマンの形成は明瞭で、音声の連続性は control-pig よりも保たれており、右反回神経切断前の音声とほぼ同程度の音声を再獲得していると判断できた。また、ADRCs-pig ではより密に波形が見られ、高い周波数が安定して見られ、振幅の乱れの少ない音声が見られ、再獲得できていた。Sacrifice 後の全身臓器の病理所見では、異常所見を認めなかった。

新生児虚血性脳症 (HIE) モデルラットへの骨髓由来幹細胞および脂肪組織由来幹細胞の静脈内投与後の体内動態に関する検討では、ex vivo imaging による各種細胞種の体内動態の検討において、投与後 1.3 日目までの肺における蛍光度の組織/背景比は $ASC138 \pm 22$ 、 $BMSC277 \pm 72$ と BMSC

の方が肺への集積が多かったが

($p<0.05$)、7,14日目以降は $ASC66\pm5$ 、 63 ± 16 、 $BMSC24\pm8$ 、 29 ± 10 とASCの方が有意に高く、ASCは肺への集積が4週間後まで遷延していた($p<0.05$)。

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。

平成 24 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。今回の腹圧性尿失禁に対する再生治療では、培養脂肪由来幹細胞ではなく、非培養の ADRCs および ADRCs 加自己皮下脂肪を、外尿道括約筋および尿道粘膜下に投与するため、今年度はラット SVF を腹圧性尿失禁モデルラットの尿道粘膜下に投与する基礎研究を行ったが、漏出圧の増加、および注入した細胞が平滑筋に分化することが確認された。LSI への委託実験では、SVF 採取から尿道粘膜下注入までに 9 時間を要したため、細胞活性の低下により有意な結果を得ることができなかったが、少なくとも平滑筋への分化が示すことができた。今後、再度注入細胞数に関する用量を試験を行う必要がある。しかし、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、声帯麻痺モデルを用いたブタでの実験においても、ADRCs 加脂肪組織の局所投与が、脂肪組織の容量維持以外に、血流改善、萎縮防止などの効果を発揮することが示された。

急性進行性糸球体腎炎に対する培養脂肪由来幹細胞を用いた治療の開発研究では、LASC が RPGN モデルに対して従来よりも少量の投与でも効果があることが示され、より臨床プロトコルに近い形で結果を得ることができた。治療実験において今回差が認められなかった項目においても (3 回投与の尿たんぱくや投与細胞数減少群での判定項目)、モデル自体の重症度が安定しないため、そもそも悪化を認めていないことが要因としてあるのではないかと考えられる。BUN、sCr 値の改善は認めているため LASC の治療効果は示されていると考えられるが、今後もより安定した動物モデルでの治療実験を継続していくこととしている。一方 in vitro における LASC の免疫細胞への作用を、細胞の有効性評価のシステムとして構築することは臨床応用にあたり重要であるといえるが、今回の検討では PBMC への増殖抑制能は安定して結果を示せたものの、マクロファージへの作用はラットーラット間でしか確認できなかった。今後は、ヒト単球細胞を用いた M1/M2 分化能の確認、株化 T 細胞あるいはプールした T 細胞での増殖抑制試験について検討を行っていき、さらに簡便な免疫抑制能の