

確認として、細胞の培養上清を用いた系を構築できないかの検討を進めているところである。コールドランに関しては、現在までに2回分が問題なく終了している。今回の結果より、治療実験においてはRPGNに対するLASCの有効性が示されたこと、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ことから、今後はLASCのin vitroにおける評価系構築についての開発を急ぐ必要がある。

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。

ADRCsによる腹圧性尿失禁治療については、平成26年度のPMDAとの薬事戦略相談、対面助言をもとに、平成27年度から多施設共同医師主導治験の実施を行う予定となり、臨床試験計画案、説明文書・同意文書案、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、他参加施設の選定を行うことができ、モニタリングや監査の方法を含め確定することができた。

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。PMDAとの対面助言を終え、多施設共同医師主導治験を平成27年度から開始する。

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、多施設共同医師主導治験を経て、保険診療を目指したい。

急性進行性糸球体腎炎については、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、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、コールドランも実施することができた。ADSCsの血管内投与においては、すでに欧州において、CelutionTM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) 山本徳則、後藤百万：腹圧性尿失禁に対する経尿道的脂肪組織由来幹細胞注入治療：臨床再生医療とTR研究. *臨床泌尿器科* 68 (6) 389-396、2014

3) 山本徳則：血流イメージング、*Jpn J Med Ultrasonics*, 41(6): 811-818, 2014

4) Kim H, Mizuno M, Furuhashi K, Katsuno T, Ozaki T, Yasuda K, Tsuboi N, Sato W, Suzuki W, Matsuo S, Itoh W, Maruyama S: Rat adipose tissue-derived stem cells attenuate peritoneal injuries in rat zymosan-induced peritonitis accompanied by complement activation. *Cytotherapy*, 2014; 0: 1e12

5) Hirose Y, Murakami M, Hayashi Y, Osako Y, Yamamoto T, Gotoh M, Nakashima M: Augmentation of Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells by Granulocyte-colony Stimulating Factor (G-CSF) Induced Mobilization. *J Stem Cell Res Transplant*, 2014;1:10-19

2. 学会発表

1) 後藤百万、山本徳則、松川宜久、舟橋康人：腹圧性尿失禁に対する脂肪由来幹細胞を用いた再生治療：男女腹圧性尿失禁に対する治療成績、第79回日本泌尿器科学会東部総会 2014/10/14 横浜

2) Gotoh M, Matsukawa Y, Funahashi Y, Yamamoto T: A novel regenerative treatment for female stress urinary incontinence: short-term outcome of three patients undergoing periurethral injection of autologous adipose-derived

regenerative cells. 44th annual meeting of the International Continence Society, 2014/10/23 ブラジル

3) 山本徳則：脂肪組織由来幹細胞を用いた腹圧性尿失禁臨床研究. 第102 回日本泌尿器科学会総会、2014/4/26、神戸

4) 山本徳則、舟橋康人、松川宜久、後藤百万：腹圧性尿失禁症例に対する脂肪組織幹細胞尿道注入療法が作り出す微小環境. 102 回日本泌尿器科学会総会、2014/4/25、神戸

5) 山本徳則、舟橋康人、松川宜久、後藤百万：腹圧性尿失禁症例に対する脂肪組織幹細胞尿道注入療法が作り出す局所微小環境. 第21回日本排尿機能学会、2014/9/18、静岡

6) 山本徳則、舟橋康人、松川宜久、後藤百万：脂肪組織由来幹細胞を用いた腹圧性尿失禁臨床研究. 第21回日本排尿機能学会、2014/9/19、静岡

7) 後藤百万：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：男女腹圧性尿失禁に対する治療成績. 第79回日本泌尿器科学会東部総会、2014/10/14、横浜

8) 稲葉 はつみ, 山本 徳則, 大熊 相子, 松原 宏紀, 松本 祐之, 松下 正, 後藤 百万 腹圧性尿失禁に対する脂

肪由来幹細胞傍尿道注入術の効果判定における造影超音波の1症例、日本超音波医学会、2014 年 11 月

9) 後藤百万：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・厚生労働省革新的医療技術創出拠点プロジェクト 平成26年度成果報告会

10) Nobuhide Endo, Naotake Tsuboi, Kazuhiro Furuhashi, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama.: Association of glomerular macrophage phenotypes and urine soluble CD163 with disease activity in human lupus nephritis. 9th International Congress on Autoimmunity; Nice(France)

11) 丸山 彰一：脂肪由来間葉系幹細胞、第26回腎と脂質研究会

12) 遠藤信英、坪井直毅、松尾清一、丸山彰一：CD163 陽性マクロファージ系球体浸潤ならびに尿中可溶性CD163 のループス腎炎活動性指標としての有用性、第57回日本腎臓学会学術総会

13) 丸山 彰一：強力な免疫抑制作用を有する脂肪組織由来幹細胞の新規調整法;平成26年度新技術説明会 中部地区医療・バイオ系シーズ発表会

14) 堀之内明日花、神村豊、杉山豊、坪井直毅、丸山彰：ヒト脂肪由来間葉系細胞培養における培養条件がもたらす影響についての検討、第 14 回日本再生医療学会総会

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

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、刈真悟、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 2013-222630

7) 尿路感染症の予防又は治療 山本徳則、柴田玲、刈真悟、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、刈真悟、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)

1 0) 「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

1 1) 脂肪組織由来多分化能幹細胞を
含有する細胞製剤 国内: 取得済み

(特許第 5240715 号) PCT 出願:

特願 PCT/JP2007/065431

(米国 審査中)

1 2) 脂肪組織由来間葉系幹細胞を
含有する免疫抑制剤及びその用途

PTC 出願:

特願 PCT/JP2010/064682

(日本、米国 審査中)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告書

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）)
分担研究報告書

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

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 名古屋大学医学部附属病院泌尿器科 助教

研究要旨

医師主導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。前立腺手術後の外尿道括約筋不全による腹圧性尿失禁を有する男性 16 症例について、中・長期成績を検討し、有効性と安全性を解析した。全例で、問題となる合併症を認めておらず、最終評価時において、男性症例 16 例中 10 例（62.5%）で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、5 年の経過で再発を認めていない。

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、男性腹圧性尿失禁の罹患者は 80 万人程度と推計されているが、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、 $\beta 2$ アドレナリン受容体作動薬であるクレンブ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、男性腹圧性尿失禁に対する人工尿道括約筋植え込み術が、2013 年 4 月から保険適応となったが、人工物を移植することから低侵襲治療とは言えず、再手術率が 25%程度という欠点があり、また、高度尿失禁が適応となる。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。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、特に長期成績についても検討した。

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治験として実施し、日本発の新しい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、本報告書ではその先行臨床試験の結果を報告する。

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。

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して判断された場合(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™:Cytori Therapeutics, Inc.)を用いてADRCsを分離濃縮する($1 \times 10^6 \sim 8$ 個/5ml)。まず、滅菌済みのディスポーザ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 0.5~1.0mlの細胞溶液、(2)自己脂肪20gとADRCsの4.0~4.5ml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0.5~1.0ml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。

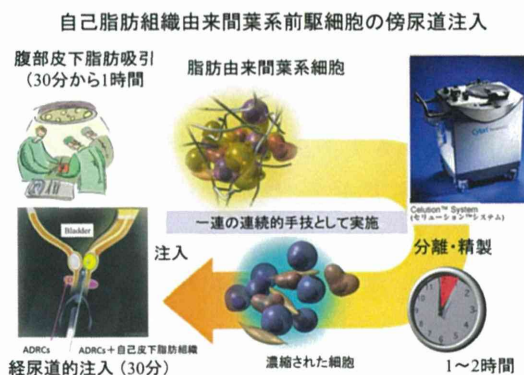


図 1 非培養自己皮下脂肪組織由来再生細胞 ADRCs の傍尿道注入治療の流れ

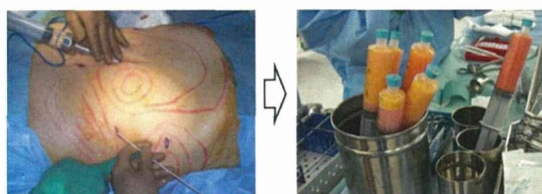


図 2 皮下脂肪の採取

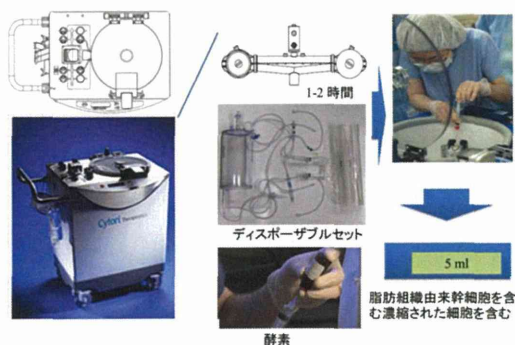


図 3 皮下脂肪組織から ADRCs の分離

脂肪組織由来間葉系前駆細胞 (ADRCs) の注入

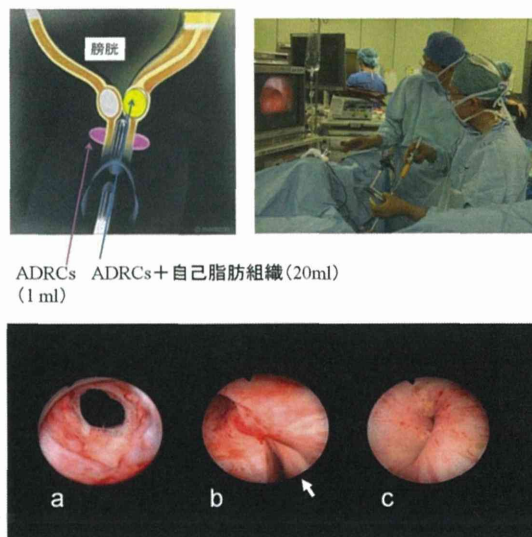


図 4 ADRCs の傍尿道注入

ADRCs 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 : ADRCs 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もれますか(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？
(あてものを使う使わないにかかわらず、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
そなわられていますか？

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

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。

2. 治療効果に関する成績

(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73～119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（図6）。

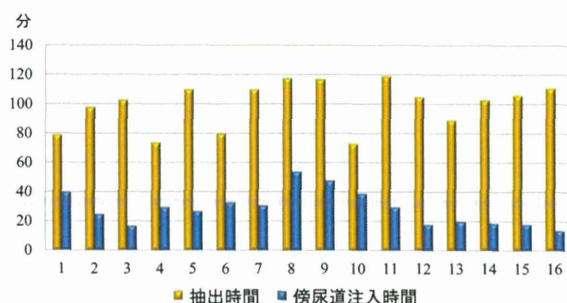


図6 ADRCs抽出時間と傍尿道注入時間

(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 細胞は 87.0%～93.8% 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。

Case	No. cells	No. viable cells	%
1	7.5×10^6	7.0×10^6	93.3
2	7.5×10^6	7.0×10^6	93.3
3	7.3×10^6	6.7×10^6	91.8
4	2.5×10^7	2.3×10^7	92.0
5	2.4×10^7	2.2×10^7	91.7
6	3.3×10^7	3.0×10^7	91.0
7	2.2×10^7	2.0×10^7	91.0
8	2.0×10^7	1.8×10^7	90.0
9	1.8×10^7	1.6×10^7	88.9
10	2.3×10^7	2.0×10^7	87.0
11	3.3×10^7	3.0×10^7	91.0
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
15	3.4×10^7	3.2×10^7	94.1
16	3.2×10^7	3.0×10^7	93.8

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）

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。尿失禁量の経時的推移を図7、尿失禁改善率の経時的推移を図8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、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%）（図9）。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(図9)。他方、4例では、尿失禁量の改善はみられなかった(図9)。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(71.4%)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。

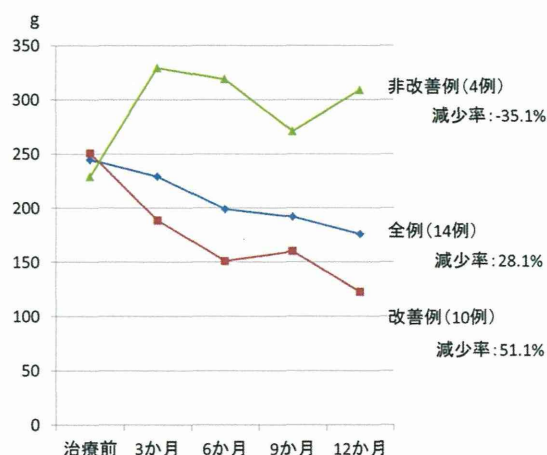


図9 男性例における尿失禁量/24時間の治療前後の経時的変化(1年までの変化)

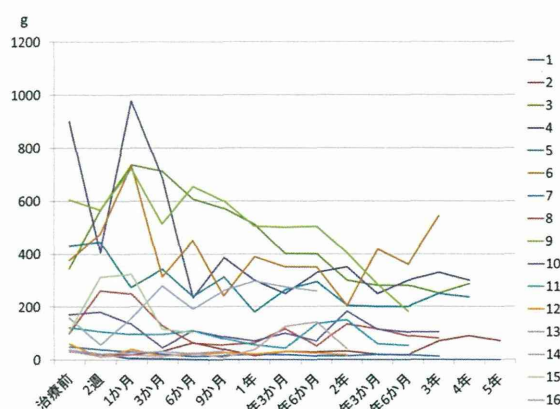


図7 尿失禁量/24時間の治療前後の経時的変化

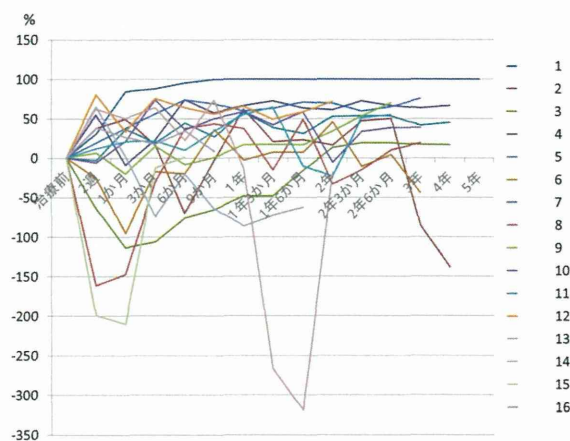


図8 治療前に比較した尿失禁量改善率の経時的変化

(5) 他覚的外尿道括約筋機能の変化(図10、11、12、13)

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10、11)。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(図12)。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 (図 13)。

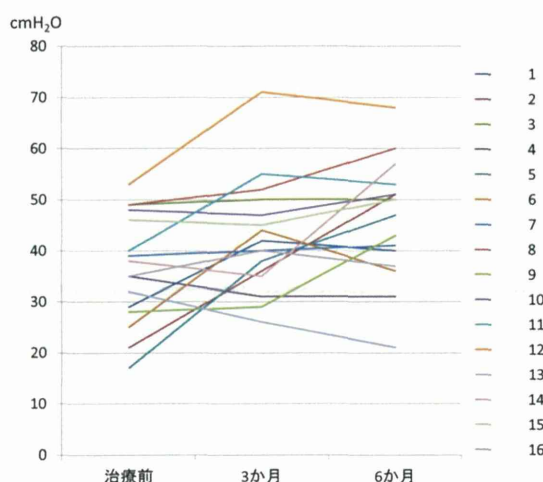


図 10 MUCP (最大尿道閉鎖圧) の変化

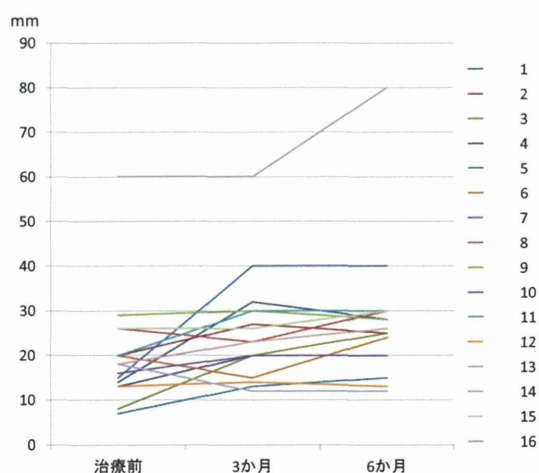


図 11 FPL (機能的尿道長) の変化

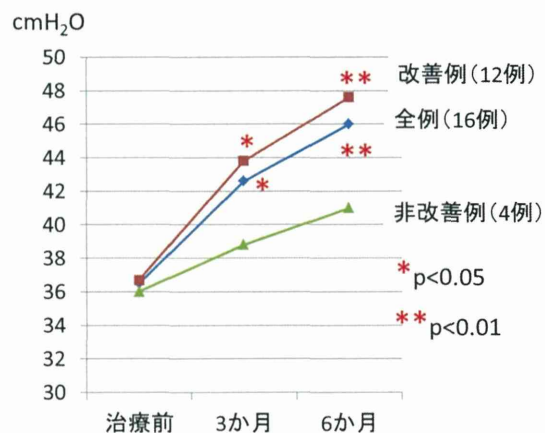


図 12 尿失禁量改善有無による MUCP の変化

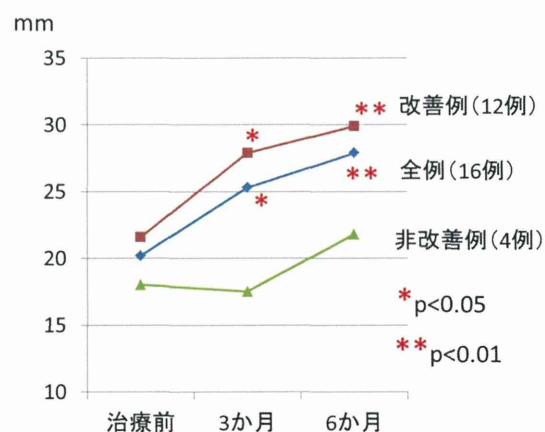


図 13 尿失禁量改善有無による FPL の変化

(6) 自覚症状・QOL の変化 (図 14、15、16)

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 (図 14)、自覚的尿失禁程度 (図 15)、および QOL (図 16) 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。

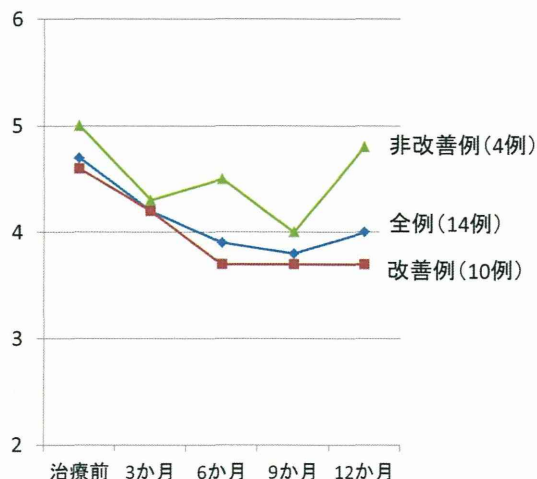


図 14 尿失禁量改善の有無による自覚症状・QOL 質問票 (ICIQ-SF) における尿失禁頻度スコアの変化

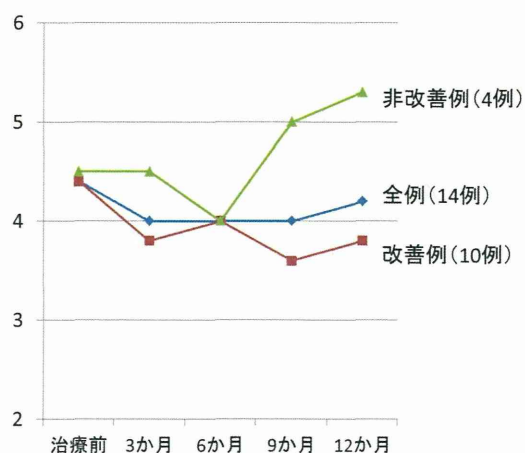


図 15 尿失禁量改善の有無による ICIQ-SF 尿失禁程度スコアの変化

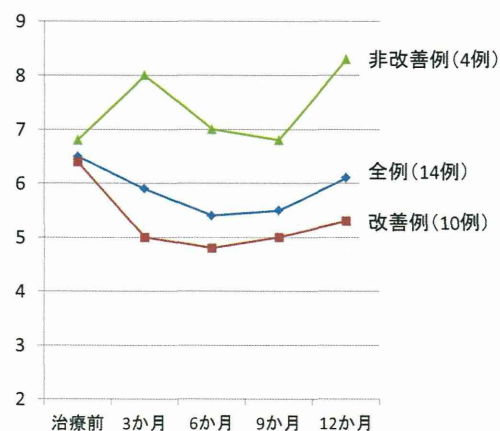


図 16 尿失禁量改善の有無による ICIQ-SF 尿失禁 QOL スコアの変化

(7) 注入部における血流の変化 (図 17、18)

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。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。

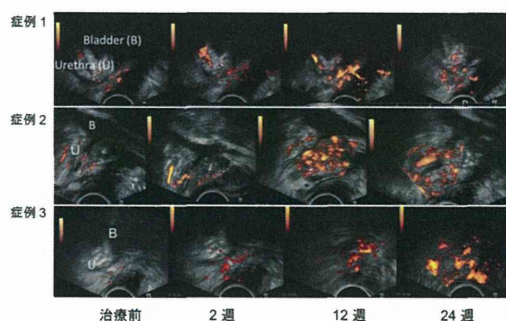


図 17 経直腸的造影超音波検査による、注入部の血流の評価

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。

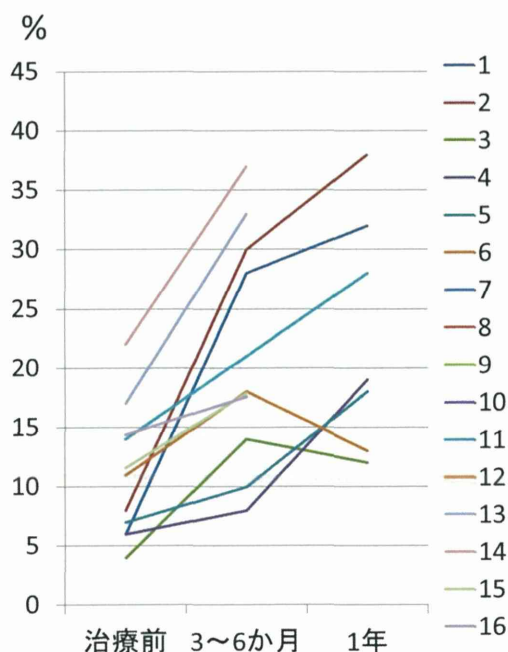


図 18 超音波検査による注入部血流の数値化による変化

(8) 注入した脂肪組織の MRI による確認 (図 19)

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。

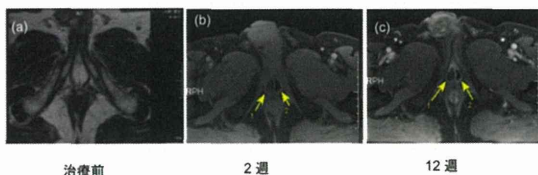


図 19 MRI による傍尿道注入脂肪組織
注入された脂肪組織は 12 週後も存在し、増加傾向は認めない。

(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、6 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、16 例中 15 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い、PSA は 0.008 以下 (測定感度以下) に低下し、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、厚生労働省に報告済みであり、因果関係はないものとの判断を得ている。

D. 考察

腹圧性尿失禁の病態は括約筋機能障害であり、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源性括約筋障害によるものである。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、通常骨髓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、骨髓採取は侵襲的で、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 は有核骨髓細胞の 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、脂肪組織が骨髓に比べて 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。脂肪組織は骨髓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。脂肪組織を collagenase 処理して遠心分離をすると、成熟脂肪細胞と脂肪組織由来幹細胞（ASCs: adipose-derived stem cells）を含む

様々な細胞からなる細胞群（ADRCs）に分けられ。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 ADRCs 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 16 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 例で尿失禁量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、5 年以上の経過観察でも尿失禁の再発を認めていない。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。平成 26 年度に、PMDA と事前相談、および非臨床と臨床プロトコールに関する対面助言を終了し、平成 27 年度から多施設共同医師主導治験を開始する。

F. 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）山本徳則、後藤百万：腹圧性尿失禁に対する経尿道的脂肪組織由来幹細胞注入治療：臨床再生医療と TR 研究。臨床泌尿器科 68 (6) 389-396, 2014

(3) 山本徳則：血流イメージング、Jpn J Med Ultrasonics, 41(6): 811-818, 2014

2. 学会発表

(1) 後藤百万、山本徳則、松川宜久、舟橋康人：腹圧性尿失禁に対する脂肪由来幹細胞を用いた再生治療：男女腹圧性尿失禁に対する治療成績、第79回日本泌尿器科学会東部総会 2014/10/14 横浜

(2) Gotoh M, Matsukawa Y, Funahashi Y, Yamamoto T: A novel regenerative treatment for female stress urinary incontinence: short-term outcome of three patients undergoing periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells. 44th annual meeting of the International Continence Society, 2014/10/23 ブラジル

(3) 山本徳則：脂肪組織由来幹細胞を用いた腹圧性尿失禁臨床研究. 第102回日本泌尿器科学会総会、2014/4/26、神戸

(4) 山本徳則、舟橋康人、松川宜久、後藤百万：腹圧性尿失禁症例に対する脂肪組織幹細胞尿道注入療法が作り出す微小環境. 102回日本泌尿器科学会総会、2014/4/25、神戸

(5) 山本徳則、舟橋康人、松川宜久、後藤百万：腹圧性尿失禁症例に対する脂肪組織幹細胞尿道注入療法が作り出す局所微小環境. 第21回日本排尿機能学会、2014/9/18、

静岡

(6) 山本徳則、舟橋康人、松川宜久、後藤百万：脂肪組織由来幹細胞を用いた腹圧性尿失禁臨床研究. 第21回日本排尿機能学会、2014/9/19、静岡

(7) 後藤百万：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：男女腹圧性尿失禁に対する治療成績. 第79回日本泌尿器科学会東部総会、2014/10/14、横浜

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
(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))
分担研究報告書

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

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

研究要旨

女性腹圧性尿失禁に対する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。腹圧性尿失禁を有する女性 4 症例について、中期成績を検討し、有効性と安全性を解析した。全例で、問題となる合併症を認めず、最終評価時において、4 例中 2 例で尿失禁の消失が得られ、自覚的症状・QOL の顕著な改善がみられた。他の 2 例では明らかな改善を認めなかった。

A. 研究目的

女性における腹圧性尿失禁は、妊娠・出産・加齢、あるいは婦人科的手術などの要因により、尿道括約筋機能が障害され、腹圧負荷時に尿が漏れる疾患である。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おり、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。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ているが、有効性については十分な科学的根拠が得られておらず、バイオフィードバックを

併用した骨盤底筋訓練についても、有用性については議論のあるところであり、まだ理学療法として保険収載はされていない。また、一般に骨盤底筋訓練は、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ことが多い。腹圧性尿失禁に対する薬物療法として、 $\beta 2$ 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保険承認されているが、無作為化試験による有効性は確認されていない。外科的治療としては、人工のメッシュを用いた尿道中部スリング手術が保険承認されて広く実施されてお