

信州大学医学部附属病院

番号	所属	分担	氏名
30	泌尿器科	治験責任医師	石塚修
31	泌尿器科	治験分担医師	石川雅邦
32	泌尿器科	治験分担医師	横山仁
33	泌尿器科	治験協力者	今村哲也
34	臨床研究支援センター	治験事務局	松本和彦
35	臨床研究支援センター	治験事務局	松本未樹
36	臨床研究支援センター	CRC	伊藤美栄
37	臨床研究支援センター	CRC	朝倉久子

株式会社CTD

番号	所属など	分担	氏名
38	代表取締役社長	調整事務局	小林史明
39	医薬推進部	調整事務局	森山麻衣

DOTインターナショナル株式会社

番号	所属など	分担	氏名
40	代表取締役社長	モニタリング	折戸哲也
41	モニタリング部	モニタリング	飯島寛子
42	モニタリング部	モニタリング	鈴木佑治
43	モニタリング部	モニタリング	伊藤はづき

サイトリ・セラピューティクス株式会社

番号	所属など	分担	氏名
44	代表取締役社長	治験機器提供者	白浜靖司郎

Kickoff Meeting の風景





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

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

研究代表者

後藤百万 名古屋大学医学部附属病院泌尿器科 教授

研究分担者

山本徳則 名古屋大学医学部附属病院泌尿器科 准教授

平川晃弘 名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センター 講師

清水 忍 名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センター 病院講師

中山 忍 名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センター 薬剤師

研究要旨

新たな治療方法の実用化を目指し、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 (中間解析) を踏まえ試験デザインを構築した上で、医薬品医療機器総合機構 (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。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に諮る準備を概ね整えることができた。

A. 研究目的

尿失禁は、直接生命に関わることはないものの、Quality of Life (QOL) を著しく阻害する疾患であり、本邦では 1993 年時点に約 400 万人が罹患していると推定されている (尿失禁にどう対処するか: 保険・医療・福祉関係者のためのガイドライン, 1993)。尿失禁を呈する疾患のうち、腹圧性尿失禁は尿道括約筋機能の障害により腹圧負荷時に尿が漏れるもので、女性では妊娠・出産・加齢等が要因となり、一方、男性では前立腺肥大症や前立腺癌の手術後合併症として発生し、特に近年急増する前立腺癌に対する根治的前立腺全摘除術後に長期間持続する尿

失禁の発生率は 1.6~65%と報告されている (World J Urol 31(3): 529-34, 2013 ; BJU Int 110(11 Pt C): E985-90, 2012 ; J Urol 173(5): 1701-5, 2005 ; J Urol 186(1): 204-8, 2011)。前立腺癌は、10 年後には本邦の男性における癌発生率の第 2 位へと急増することが推定されていることから、今後、前立腺癌に対する手術件数は非常に増加し、それに伴う術後の腹圧性尿失禁患者数もさらに増えることが予測される。

腹圧性尿失禁の治療としては、行動療法、薬物療法、外科治療があるが、行動療法及び薬物療法は十分な効果が期待できず、外科治療は異物を体内に留置するという欠点があり、侵襲性も高いことが

問題である。本邦は、超高齢化社会に突入し、QOLの向上が問われるため、仕事、家事、社会的活動等の日常生活の多くの領域で支障を及ぼす尿失禁に対する治療開発は、極めて重要かつ喫緊の課題であり、世界に先駆けた新規治療の開発を行う必要があると考えられる。そのような状況であるにも拘わらず、腹圧性尿失禁に対する医薬品の開発は、現在行われていないため（政策研ニュース：No.41：11-13，2014）、新たな治療法の開発が望まれていると考えられる。

一方、海外では、培養自己骨格筋細胞を使用する女性腹圧性尿失禁に対する再生治療が行われているが、培養過程における安全性の問題は大きなハードルとなり得る。そこで研究代表者の後藤らは、新たな再生材料として、2001年に発見・同定された多分化能を有する脂肪由来幹細胞に注目し、尿失禁ラットモデルを用いて間質血管細胞群（Stromal Vascular Fraction：SVF）を膀胱尿道部に投与することにより、尿道内圧の上昇と尿失禁の改善が得られることを示した。また、尿道粘膜下への投与細胞による尿道粘膜下の膨隆による尿道閉鎖効果（bulking effect）が得られること、投与したSVFが平滑筋へ分化する可能性を確認した。そこで、非臨床試験で認められた効果を期待し、皮下脂肪組織を脂肪吸引法で採取後、採取した脂肪組織から細胞分離装置であるCelution（Cytori Therapeutics, Inc.：サイトリ社）を用いてADRCsを分離し、経尿道内視鏡下に尿道括約筋及び尿道粘膜下にADRCsを投与すること（本治療法）により、腹圧性尿失禁の治療を行うことを計画した。現在、腹圧性尿失禁患者（目標症例数30例）を対象に非盲検非対照試験を実施している（平成23年3月15日承認：厚生労働省発医政0315第3号）（先行臨床試験）。

先行臨床試験で一定の効果が確認できたため、平成25年度に当該治療方法をどのように実用化に結びつけるのかについ

て、細胞分離装置の販売元であるサイトリ社を交え、今度の開発方針の検討も行った。その開発方針について、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2回に亘り先進医療Bとしての臨床試験の実施について相談したところ、実用化のためには細胞分離装置であるCelutionの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、実用化を見据えた開発を進めるために医師主導治験を実施する準備を進めることとし、まずは治験デザインの検討を進めることとした。

B. 研究方法

1. 治験実施計画の立案

2011年に腹圧性尿失禁における医療機器の臨床試験ガイダンスが米国食品医薬品局（Food and Drug Administration：FDA）から発出されている（Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff “Clinical Investigation of Devices Indicated for the Treatment of Urinary Incontinence”（March 8, 2011）：FDAガイダンス）。このFDAガイダンス、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、治験実施計画の骨子（案）を作成した。

2. 医薬品医療機器総合機構（Pharmaceuticals and Medical Devices Agency：PMDA）との対面助言

医師主導治験の実施の可否については、平成26年7月10日の薬事戦略相談（対面助言）（第機戦P56号）において、PMDAと議論したが、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。その際に治験の対象患者について、女性を組み入れることの適切性、外科治療を含めた既存治療との位置づけを踏まえた対象患者の選定の適切性について、整理する

ように指導を受けた。この指導を踏まえ、治験デザインについては、再度、医療機器治験相談（対面助言）の相談項目を整理するための事前面談を実施した上で、行うこととした。

3. 治験実施計画書の作成

平成26年11月25日の医療機器治験相談（対面助言）（第機 P1048 号）を踏まえ、試験デザインの修正を行った。

また、「ヘルシンキ宣言」（2013 年 10 月 フォルタレザ修正）、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」（昭和 35 年 8 月 10 日 法律第 145 号）（医薬品医療機器等法）及び「医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 17 年 3 月 23 日 厚生労働省令第 36 号）（医療機器 GCP 省令）等の各種関連省令・指針を参照し、各項目の記載の修正を行うこととした。

（倫理面への配慮）

医師主導治験実施のために、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・指針に基づいた実施計画書の作成を進めた。

C. 研究結果

1. 治験実施計画の立案

FDA ガイダンス、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、治験実施計画の骨子（案）を作成した。

ADRCs の投与は再生医療であり、一定のリスクを勘案する必要があるため、既存治療が無効又は効果不十分、あるいは実施困難な患者を対象とすることとした。また、20 歳以上で、男性の前立腺手術後 1 年以上続く腹圧性尿失禁患者、あるいは女性の真性腹圧性尿失禁患者と計画した。主要評価項目は、投与 52 週後の 24 時間尿パッドテストによる尿失禁量の減少率が 50%以上であった患者（レスポ

ナー）の割合とした。また、先行臨床試験をサブグループ解析し、当該対象患者の試験成績を基に症例数を設計した。

しかし、治験を実施する上で必要な非臨床試験の充足性を確認した平成 26 年 7 月 10 日の薬事戦略相談（対面助言）（第機戦 P56 号）で、女性を組み入れることの適切性、外科治療を含めた既存治療との位置づけを踏まえた対象患者の選定の適切性について、整理するように指導を受けた。この指摘を踏まえ、先行臨床試験のデータや国内外のガイドラインを再度精査した。

女性については、腹圧性尿失禁の原因が男性とは異なること、先行臨床試験の検討数が少ないことから、男性のみを対象とすることとした。また、既存治療の外科治療としては、人工尿道括約筋植込・置換術があるが、欧米の総説やガイドライン（Eur Urol, 63(4): 681-9, 2013 ; Guidelines on Urinary Incontinence: European Association of Urology 2013 ; CanUrol Assoc J 6(5): 354-63, 2012 ; Eur Urol 55(2): 322-33, 2009）も改めて確認したところ、必ずしも完全な尿禁制が得られないことから、一般的には高度（多量）の尿失禁への実施が推奨されている治療であることを確認した。また、先行臨床試験の本治療法の成績を確認すると、尿失禁量が高度の患者の成績は低い傾向が確認できたこと、中等度以下の患者に推奨される外科治療は存在していないことから、対象患者を中等度以下の患者とすることとした。

以上を踏まえた治験実施計画書の骨子を作成し、以下の点について、医療機器治験相談（対面助言）でPMDAの意見を求めることとした。

相談事項：試験デザインについて

- ① 主な組入れ基準について
- ② 主要評価項目について
- ③ 評価期間について
- ④ 対照群の設定について
- ⑤ 症例数設定根拠について

2. PMDA との対面助言

平成 26 年 10 月 10 日に実施した医療機器治験相談の事前面談において、対面助言の論点の整理、並びに対面助言資料に追加説明を加えておくよう要求された。

事前面談における PMDA からの要求を踏まえ、対面助言資料を作成し、平成 26 年 11 月 25 日に医療機器治験相談（対面助言）（第機 P1048 号）が実施された。

「C. 研究結果 1. 治験実施計画の立案」の項に記載したとおり、①主な組入れ基準について、②主要評価項目について、③評価期間について、④対照群の設定について、⑤症例数設定根拠について、の 5 項目について相談を実施したところ、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。ただし、主要評価項目が尿失禁量の減少率が 50%以上であったことを指標としているため、結果的に組み入れられた患者が軽度の患者に偏ってしまった場合、中等度の患者への効果を確認することはできず、試験全体としての主要評価項目の結果の解釈が困難になり、臨床的意義があると判断できるか明確にならない可能性も生じることを懸念された。そのため、主要評価項目の変更、あるいは組み入れられる患者の重症度が偏らないよう工夫すること等が提案されたため、組み入れられる患者の重症度が偏らないように、患者の重症度に応じた組入れ症例数の制限をかける対応を執ることとした。

以上の指摘を踏まえ、治験実施計画書の作成を進めることとした。

3. 治験実施計画書の作成

平成 26 年 11 月 25 日の医療機器治験相談（対面助言）（第機 P1048 号）を踏まえ、試験デザインの修正を行った。

また、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。添付資料 1 として、治験計画の概要を添付する。

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。

D. 考察

本研究課題においては、男性腹圧性尿失禁を対象に、細胞分離装置である Celution の製造販売承認申請を目指し、サイトリ社と協同し、医師主導治験を実施することを目的としている。これまで名古屋大学医学部附属病院では、泌尿器科と先端医療・臨床研究支援センターが協力し、医師主導治験を支援するための体制を組織した上で、厚生労働省や PMDA と相談し、開発方針を確認しながら、開発を進めてきた。今回、治験実施計画書の主な試験デザインについて、PMDA と議論を行い、概ね合意が得られた。このように承認審査を行う規制当局と議論しながら開発を進めることで、今後得られる研究成果を確実に国民に広め、恒常的に提供できる体制も構築することができると考えられる。

これまで、医師主導治験開始のための準備を進めており、今後、多施設共同研究を実施するための適切な多施設共同医師主導治験を実施する体制がほぼ構築できたと考える。今後、治験実施計画書、説明文書・同意文書、治験機器概要書を固定に向け進め、平成 27 年 4 月にまずは名古屋大学で IRB に諮り、平成 27 年度第一四半期に初回治験届を提出する予定としている。

平成 27 年度以降は、信頼性の高いデータを得るために、作成した治験実施計画書に基づき、選定した他の施設と協同し、適切に治験を遂行することが必要である。

E. 結論

腹圧性尿失禁に対する新たな医療の創出に向けて、今回、治験を実施するために、治験実施計画書を PMDA と議論しながら作成した。

今後、本研究課題について質の高い臨床試験成績が得られるよう、医療機器 GCP に準じ、適切な臨床試験が実施できるよう進めていくこととする。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 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－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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

治験計画の概要

治験調整医師： 名古屋大学医学部附属病院 泌尿器科 教授 後藤百万		
課題名： 男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再生（幹）細胞の傍尿道注入治療の有効性及び安全性を検討する多施設共同非盲検非対照試験（ADRESU試験） Open-label, Multi-center, Single Arm Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Periurethral Injection of Autologous Adipose Derived Regenerative Cells (ADRCs) for the Treatment of Male Stress Urinary Incontinence		
治験機器： 1. 一般的名称：未定 2. 治験識別記号： Celution-SUI 3. 治験機器提供者：サイトリ・セラピューティクス株式会社、Cytori Therapeutics, Inc.		
投与細胞： 1. 一般的名称：（日本名）脂肪組織由来再生（幹）細胞 （英名） Adipose Derived Regenerative Cells (ADRCs) 2. 原材料：腹部又は臀部皮下脂肪組織 約250～300g 3. 原材料採取方法：50mLシリンジによる陰圧吸引 4. 細胞分離方法：細胞分離装置である治験機器により、分離濃縮 5. 剤形1： 1.0mLあたり2.0×10^5個以上のADRCsを含有する懸濁液1.0mL 剤形2： 1.0mLあたり2.0×10^5個以上のADRCsを含有する懸濁液4.0mLと皮下脂肪組織20gを混和したもの		
治験実施計画書番号： CAMCR-005		プロジェクト番号： TR11-N01
治験実施医療機関数： 約 4 医療機関		
デザイン： 多施設共同非盲検非対照試験		
主な目的： 男性の腹圧性尿失禁患者において、皮下脂肪組織から分離されるヒト皮下脂肪組織由来再生（幹）細胞（ADRCs）を経尿道的内視鏡下で単回傍尿道投与した時の有効性と安全性を評価する。		
対象疾患： 腹圧性尿失禁		
目標症例数： 45 例 （尿失禁量の多い患者の評価も可能となるよう、スクリーニング期の 24 時間パッドテストによる 1 日平均尿失禁量が 30g 以上 200g 未満の患者は最大 35 例程度までとする）		

選択基準：

1. 行動療法及び薬物療法が無効又は効果不十分¹、あるいは薬物療法が実施困難²で、かつ、以下のいずれかの基準を満たす術後 1 年以上継続する腹圧性尿失禁に罹患している男性患者
 - 1) 限局性前立腺癌（グリソンスコア 7 以下）に対して根治的前立腺全摘除術後（全摘標本の切除断端が陰性）に腹圧性尿失禁を生じ、術後 1 年以上再発・転移がなく、かつ術後 1 年以上前立腺特異抗原（PSA）が 0.1ng/mL 以下の患者
 - 2) 前立腺肥大症に対する経尿道的前立腺切除術後又はレーザー切除術後に腹圧性尿失禁を生じ、かつ術後 1 年以上前立腺特異抗原（PSA）が 4.0ng/mL 以下の患者
2. 同意取得時に 20 歳以上の患者
3. スクリーニング期の 24 時間パッドテストによる 1 日平均尿失禁量が 30g 以上 300g 未満の患者
4. 排尿日誌を正確に記載できると治験責任医師又は治験分担医師が判断した患者
5. 本治験について十分な説明を受けた後、患者本人の自由意思による文書同意が得られた患者

〔設定根拠〕

1. 高齢者尿失禁ガイドライン（平成12年度 厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業））における治療体系を勘案し、適応となる治療が存在しない男性患者を対象とした。男性の場合は、人工尿道括約筋植込・置換術が適応になる場合があるものの、必ずしも完全な尿禁制が得られないことから、一般的には高度（多量）の尿失禁への実施が推奨されている。そのため、3. で24時間パッドテストによる1日平均尿失禁量が300g未満の患者にすることで、人工尿道括約筋植込・置換術の対象となりうる患者を除外した。
 - 1) については、前立腺癌の再発リスクが高いと考えられる患者を除外するための、グリソンスコア及び全摘標本の切除断端の状態、PSA値を規定した。
2. 患者本人による同意を取得可能で、評価項目を評価しうる年齢を考慮した。
- 3.及び4. 有効性への評価に影響すると考えられるため。
5. 「世界医師会ヘルシンキ宣言」（2013年10月改訂版）（ヘルシンキ宣言）や「医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令」の原則を遵守して実施するため。

除外基準：

1. 切迫性尿失禁、溢流性尿失禁、機能性尿失禁又は反射性尿失禁の患者、あるいはこれらの尿失禁を合併している患者
2. 同意取得前 6 ヶ月以内に泌尿器や生殖器の手術を施行された患者
3. 同意取得前 3 ヶ月以内に行動療法や薬物療法を開始した患者
4. 尿崩症を合併している患者
5. 下部尿路に局所放射線療法を受けたことがある患者
6. 腹圧性尿失禁の治療のために ADRCs の傍尿道部への投与を受けたことがある患者
7. 同意取得前 6 ヶ月以内に他の細胞治療を受けた患者
8. 同意取得前 3 ヶ月以内に他の臨床試験へ参加した又は参加中である患者
9. 下部尿路閉塞性疾患（前立腺肥大症等）を合併している患者
10. 尿路結石（尿管結石、尿道結石、膀胱結石等）、尿路感染症（前立腺炎、膀胱炎等）又は間質性膀胱炎を合併している患者
11. 再発性尿路感染症（同意取得前 6 ヶ月以内に 3 回以上の発症）の既往がある患者

¹ 行動療法及び薬物療法を 3 ヶ月程度実施しても、尿失禁の十分な改善が認められない場合

² 薬物療法の禁忌に該当する患者等

12. 悪性新生物を有している又は同意取得前5年以内にその既往がある患者、あるいは、諸検査により悪性腫瘍の可能性があるとは判断された患者（ただし、限局性前立腺癌に対する根治的前立腺全摘除術後の患者は、同意取得前1年以上再発・転移がなければ、組入れ可能）
13. 同意取得時に余命が1年以内と考えられる患者
14. 重大な感染症を有している又は疑われる患者
15. スクリーニング検査時に梅毒血清反応陽性、HCV抗体陽性、HBs抗原陽性又はHIV抗体陽性の患者
16. 重篤な合併症（肝疾患、腎疾患、心疾患、肺疾患、血液疾患、自己免疫不全等）を有する患者
17. 血栓塞栓症の既往がある、あるいは合併している患者
18. ペルフルブタン製剤及びリドカイン注射液の成分、あるいはアミド型局所麻酔薬に対し過敏症の既往がある、あるいは卵又は卵製品にアレルギーのある患者
19. ブチロフェノン系、フェノチアジン系等の抗精神病薬、 α 遮断薬、あるいはイソプロテレノール等のカテコールアミン製剤、アドレナリン作動薬を投与中の患者
20. その他、治験責任医師又は治験分担医師が不適当と判断した患者

〔設定根拠〕

- 1.～11. 有効性への評価に影響すると考えられるため
- 6.～20. 被験者の安全性を確保するため

治療方法：

1. 皮下脂肪組織の採取
形成外科領域で用いられる専用の50mL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
皮下脂肪組織約250～300gから、細胞分離装置である治験機器を用いてADRCsを分離濃縮する（ 1×10^6 個以上/5mL）。
3. 傍尿道周囲へのADRCsの投与
分離したADRCs及び脂肪組織を用いて以下の2種類の投与細胞溶液を準備する。
 - ・ ADRCs 1.0mL
 - ・ 脂肪組織20gとADRCs 4.0mLを混和したもの

尿道より内視鏡を挿入し、左右の外尿道括約筋内（5時、7時の方向）へADRCs 1.0mLを2カ所ずつ分割して投与し、また、膜様部尿道粘膜下（4時、8時の方向、必要があれば6時にも追加）へ脂肪組織20gとADRCs 4.0mLを混和したものを尿道内腔の閉鎖が内視鏡的に確認できる程度に分割して投与する。

〔投与量の設定根拠〕

- ・ ADRCs
 - ① ラットの傍尿道部に 1×10^6 個のADRCsを投与したところ、尿漏出圧の上昇が認められ、平滑筋に分化していることが示唆されたため、合計 1×10^6 個程度以上のADRCsを傍尿道部に投与することで、有効性が期待できると考えられたため
 - ② 多くの臨床試験において、同様の投与量範囲内の局所投与（傍尿道部、乳房、心筋）や冠動脈内投与の経験があるが、ADRCsとの因果関係が否定できない中枢神経系、心血管系及び呼吸器系にかかる重篤な有害事象は報告されていないため

・ 脂肪組織

- ① 自己皮下脂肪組織の傍尿道注入治療の報告^{13) ~17), 26)} では、注入量は5~40mL（尿道閉鎖が得られるまで注入を行う報告における脂肪注入量は 14.8 ± 4.8 mL又は 12.1 ± 3.3 mL）であり、20mL程度で十分な尿道閉鎖効果が得られると考えられたため
- ② 名古屋大学で実施している臨床研究（本治験と同様の投与方法）において、平成26年12月20日時点までにおいて、全例で尿道内腔の閉鎖が得られており、また、術後尿閉が認められていないため
- ③ 脂肪組織にADRCsを混合することで移植した脂肪組織がより残存することが示唆されたため²¹⁾

観察期間：

53~56 週間（スクリーニング期間：約 1~4 週間、投与後観察期間 52 週間）

評価項目：

1. 主要評価項目

- ・ ベースラインから投与 52 週後*の 24 時間パッドテストによる尿失禁量の減少率が 50%以上であった患者（レスポnder）の割合
- * 投与 52 週後のデータが得られなかった患者については、最終評価時のデータを用いることとする。

24 時間パッドテスト

評価期間中（来院前日を含む連続 7 日間）に使用した総てのパッドの使用前後の重量を患者が計測、排尿日誌に記録し、1 日あたりの尿失禁量を平均して算出する。

2. 副次評価項目

- 1) ベースラインから投与 2 週後、4 週後、12 週後、26 週後、38 週後及び 52 週後の 24 時間パッドテストによる尿失禁量の減少率が 50%以上であった患者（レスポnder）の割合
- 2) ベースライン、投与 2 週後、4 週後、12 週後、26 週後、38 週後、52 週後及び最終評価時の 24 時間パッドテストによる尿失禁量
- 3) ベースラインから投与 2 週後、4 週後、12 週後、26 週後、38 週後、52 週後及び最終評価時の 1 日あたりの尿失禁回数の減少率が 50%以上であった患者（レスポnder）の割合

尿失禁回数

評価期間中（来院前日を含む連続 7 日間）の尿失禁回数を患者が排尿日誌に記録し、1 日あたりの尿失禁回数を平均して算出する。

- 4) ベースライン、投与 2 週後、4 週後、12 週後、26 週後、38 週後、52 週後及び最終評価時の 1 日あたりの尿失禁回数
- 5) ベースライン、投与 2 週後、4 週後、12 週後、26 週後、38 週後、52 週後及び最終評価時の 1 日あたりの尿パッド枚数

尿パッド枚数

評価期間中（来院前日を含む連続 7 日間）の使用尿パッド枚数を患者が排尿日誌に記録し、1 日あたりの使用尿パッド枚数を平均して算出する。

- 6) ベースライン、投与 26 週後、52 週後、最終評価時の尿失禁症状 QOL スコア

- ① International Consultation on Incontinence Questionnaire-Short Form (ICIQ-SF)
- ② King's Health Questionnaire (KHQ)
- 7) ベースライン、投与 26 週後、52 週後及び最終評価時の治療満足度
- 8) ベースライン、投与 2 週後、4 週後、12 週後、26 週後、52 週後及び最終評価時の以下の尿流動態検査値
 - ① 最大尿道閉鎖圧 (Maximum Urethral Closing Pressure : MUCP)
 - ② 機能的尿道長 (Functional Profile Length : FPL)
 - ③ 腹圧時尿漏出圧 (Abdominal Leak Point Pressure : ALPP)

尿道内圧測定

カテーテルで膀胱に蒸留水又は生理食塩水を注入しつつ、一定の速度で引き抜きながら尿道内圧を経時的に測定し、MUCP (尿道内圧と膀胱内圧との圧差の最大値) と FPL (尿道内圧が膀胱内圧より高い部分の尿道長) を算出する。

ALPP

腹圧をかけて膀胱内圧を上昇させ、尿道から尿が漏れ始めた時点での膀胱内圧を腹圧時尿漏出圧という。尿道括約筋機能の強さを計測する指標。

- 9) ベースライン、投与 12 週後、26 週後、52 週後及び最終評価時の経直腸的造影超音波検査による投与領域の血流
- 10) ベースライン、投与 2 週後、26 週後、52 週後及び最終評価時の骨盤 MRI による投与した脂肪組織の確認

主要評価項目の設定根拠：

腹圧性尿失禁は、QOL が著しく障害される疾患であるものの、その原因は尿が漏れることであるため、尿失禁を評価することが重要と考えている。2011 年に米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration : FDA) から発出されている腹圧性尿失禁における医療機器の臨床試験ガイダンス (Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff “Clinical Investigation of Devices Indicated for the Treatment of Urinary Incontinence” (March 8, 2011)) では、主要評価項目とする候補として、「尿失禁量の減少」を評価するよう勧めており、ベースラインから 50%以上の改善が臨床的に意義のある改善レベルであるとしている。

また、先行臨床試験成績 (中間解析) において、本治験の対象と同様の 1 日あたりの尿失禁量が 300g 未満の腹圧性尿失禁に罹患している男性患者における 6 ヶ月、9 ヶ月及び 12 ヶ月時点の「ベースラインからの尿失禁量の減少率が 50%以上となる患者の割合」は、それぞれ 3/9 例 (33.3%)、4/9 例 (44.4%) 及び 6/9 例 (66.7%) であった。少数例での検討ではあるが、尿失禁量減少率の推移を確認すると、3 ヶ月以降に有効性が高くなる傾向が認められ、その後、2 年時点まで、一定の範囲で有効性が推移していた。この傾向を勘案すると、現時点の試験成績からは、12 ヶ月 (52 週) 時点までの本治療法の有効性を確認することで、本治療法による効果を確認することが可能と考える。

したがって、「ベースラインから投与 52 週後の 24 時間パッドテストによる尿失禁量の減少率が 50%以上であった患者 (レスポnder) の割合」を主要評価項目とすることとした。

統計解析方法：

- 1. 主要評価項目 (主な解析対象集団 : Full Analysis Set)
 - ・ ベースラインから投与 52 週後*の 24 時間パッドテストによる尿失禁量の減少率が 50%以上であった患者 (レスポnder) の割合

* 投与 52 週後のデータが得られなかった患者については、最終評価時のデータを用いることとする。

ベースラインと投与 52 週後の尿失禁量から、尿失禁量の減少率を以下のように算出し、尿失禁量の減少率が 50%以上であった患者の割合とその 95%信頼区間を算出する。95%信頼区間は Clopper-Pearson 法を用いて算出する。

$$\frac{(\text{ベースラインの尿失禁量} - \text{投与 52 週後の尿失禁量})}{\text{ベースラインの尿失禁量}} \times 100 (\%)$$

2. 副次評価項目

1) ベースラインから投与 2 週後、4 週後、12 週後、26 週後、38 週後及び 52 週後の 24 時間パッドテストによる尿失禁量の減少率が 50%以上であった患者（レスポnder）の割合
ベースラインと投与後各時点の尿失禁量から、尿失禁量の減少率を算出し、尿失禁量の減少率が 50%以上であった患者の割合とその 95%信頼区間を算出する。95%信頼区間は Clopper-Pearson 法を用いて算出する。

2) ベースライン、投与 2 週後、4 週後、12 週後、26 週後、38 週後、52 週後及び最終評価時の 24 時間パッドテストによる尿失禁量
各時点における尿失禁量の要約統計量（平均値、標準偏差、中央値、最小値、最大値）を算出する。また、ベースラインから各時点の尿失禁量減少率の要約統計量（平均値、標準偏差、中央値、最小値、最大値）を算出する。

3) ベースラインから投与 2 週後、4 週後、12 週後、26 週後、38 週後、52 週後及び最終評価時の 1 日あたりの尿失禁回数の減少率が 50%以上であった患者（レスポnder）の割合
ベースラインと投与後各時点の尿失禁回数から、尿失禁回数の減少率を以下のように算出し、尿失禁回数の減少率が 50%以上であった患者の割合とその 95%信頼区間を算出する。95%信頼区間は Clopper-Pearson 法を用いて算出する。

$$\frac{(\text{ベースラインの尿失禁回数} - \text{投与後各時点の尿失禁回数})}{\text{ベースラインの尿失禁回数}} \times 100 (\%)$$

4) ベースライン、投与 2 週後、4 週後、12 週後、26 週後、38 週後、52 週後及び最終評価時の 1 日あたりの尿失禁回数
各時点における尿失禁回数の要約統計量（平均値、標準偏差、中央値、最小値、最大値）を算出する。また、ベースラインから各時点の尿失禁回数減少率の要約統計量（平均値、標準偏差、中央値、最小値、最大値）を算出する。

5) ベースライン、投与 2 週後、4 週後、12 週後、26 週後、38 週後、52 週後及び最終評価時の 1 日あたりの使用尿パッド枚数
各時点における使用尿パッド枚数の要約統計量（平均値、標準偏差、中央値、最小値、最大値）を算出する。また、ベースラインから各時点の使用尿パッド枚数減少率の要約統計量（平均値、標準偏差、中央値、最小値、最大値）を算出する。

6) ベースライン、投与 26 週後、52 週後及び最終評価時の尿失禁症状 QOL スコア

① International Consultation on Incontinence Questionnaire-Short Form (ICIQ-SF)

② King's Health Questionnaire (KHQ)

各時点における各 QOL スコアの要約統計量（平均値、標準偏差、中央値、最小値、最大値）を算出する。また、ベースラインから各時点の QOL スコア減少率の要約統計量（平均値、標準偏差、中央値、最小値、最大値）を算出する。

7) ベースライン、投与 26 週後、52 週後及び最終評価時の治療満足度

10cm の Visual Analog Scale (VAS) を用いて、各時点における治療満足度の要約統計量（平均値、標準偏差、中央値、最小値、最大値）を算出する。また、ベースラインから各時点の治療満足度改善率の要約統計量（平均値、標準偏差、中央値、最小値、最大値）を算出する。

8) ベースライン、投与 2 週後、4 週後、12 週後、26 週後、52 週後及び最終評価時の以下の尿流動態検査値

① 最大尿道閉鎖圧 (Maximum Urethral Closing Pressure : MUCP)

② 機能的尿道長 (Functional Profile Length : FPL)

③ 腹圧時尿漏出圧 (Abdominal Leak Point Pressure : ALPP)

各時点における MUCP、FPL 及び ALPP の要約統計量（平均値、標準偏差、中央値、最小値、最大値）を算出する。また、ベースラインから各時点の MUCP、FPL 及び ALPP 改善率の要約統計量（平均値、標準偏差、中央値、最小値、最大値）を算出する。

9) ベースライン、投与 12 週後、26 週後、52 週後及び最終評価時の経直腸的造影超音波検査による投与領域の血流

各時点における経直腸造影超音波検査によるパワードップラーでカラー表示された関心領域における矢状断面積あたりの血流割合の要約統計量（平均値、標準偏差、中央値、最小値、最大値）を算出する。また、ベースラインから各時点の関心領域における矢状断面積あたりの血流割合改善率の要約統計量（平均値、標準偏差、中央値、最小値、最大値）を算出する。

10) ベースライン、投与 2 週後、26 週後、52 週後及び最終評価時の骨盤 MRI による投与した脂肪組織の確認

各時点における骨盤 MRI による横断・矢状断・3D 画像 (T1 強調画像) により脂肪組織の体積の要約統計量（平均値、標準偏差、中央値、最小値、最大値）を算出する。また、ベースラインから各時点の脂肪組織の体積の減少率の要約統計量（平均値、標準偏差、中央値、最小値、最大値）を算出する。

症例数設定根拠：

本治験の対象患者における治験に組み入れる前の行動療法及び薬物療法の経過から、自然回復する可能性は非常に低い患者であると考えられるため^{27) ~31)}、尿失禁量における閾値レスポonder割合を10%とする。また、先行試験の中間解析における12ヵ月時点の尿失禁量におけるレスポonder割合は66.7% (6/9例) であったものの、6ヵ月時点のレスポonder割合が33.3% (3/9例) であったことから、やや保守的に見積もり期待レスポonder割合を30%とする。

したがって、尿失禁量における閾値レスポonder割合を 10%、期待レスポonder割合を 30% とし、有意水準 (両側) 5%、検出力 90% とすると必要症例数は 41 例となる。中止・脱落を 10% 程度見積もって、目標症例数を 45 例とする。

なお、先行試験の中間解析において 12 ヶ月時点の尿失禁量におけるレスポonderであった 6 例について、ベースラインから投与 52 週後の ICIQ-SF スコア減少率 (平均値) は 25.4% であっ

た。腹圧性尿失禁は QOL を阻害する疾患であることから、本治療のレスポonderの ICIQ-SF スコアが少なくとも減少すること（QOL が改善したこと）を確認するために、レスポonderの ICIQ-SF スコア減少率の点推定値が 0%を超えていること確認する。

評価スケジュール：

	同意 取得	スクリーニング		手術日 (0 日)	観察期間								
		仮登録 (~8日)	本登録 (~1日)		1日後	退院時	2週後	4週後	12週後	26週後	38週後	52週後	中止時 ^{注1}
許容範囲(日)		~8	~7~1	-	0	-1	±3	±7	±14	±14	±14	±14	±14
同意取得	●												
登録 ^{注2}		●	●										
背景（生年月日、性別、体重）		●											
原疾患・前治療の状況		● ^{注3}	● ^{注3}										
既往歴・合併症の確認		●	●										
バイタルサイン（血圧、脈拍数、体温）				● ^{注4}	●	●	●						
血中酸素飽和度				● ^{注4}	●	●	●						
血液検査（感染症検査 ^{注5} ）			● ^{注6}										
血液検査（血液学的、血液生化学、炎症反応、血液凝固）			●		●	●	●	●	●	●		●	●
臨床検査（尿）			●		●	●	●	●	●	●		●	●
PSA測定			● ^{注6}						●	●		●	●
12誘導心電図検査			● ^{注6}		●	●	●						
単純胸部レントゲン			● ^{注6}										
排尿日誌 ^{注7} （尿失禁量、尿失禁回数、尿パッド枚数）			●				●	●	●	●	●	●	●
QOL調査（ICIQ-SF、KHQ）			●							●		●	●
治療満足度調査			●							●		●	●
尿流動態検査（MUCP、FPL、ALPP）			●				●	●	●	●		●	●
経直腸的造影超音波検査			●						●	●		●	●
骨盤MRI			● ^{注8}				●			●		●	●
脂肪組織採取				●									
ADRCs、ADRCs+脂肪組織注入				●									
併用薬・併用療法	←												●
有害事象の確認 ^{注9}				←									●

注1：中止日から14日前以内の結果がある場合は、中止時の結果として利用可能

注2：一次スクリーニング、二次スクリーニング実施後に各登録を行う

注3：限局性前立腺癌に対する根治的前立腺摘除術後の患者場合、グリソンスコア、全摘標本の切除断端、PSA値の結果は本登録時に確認することも可

注4：術前、2種類の投与細胞投与終了1時間後（±15分）、投与終了4時間後（±30分）に実施

注5：HBs抗原、HCV抗体、HIV抗体、梅毒血清反応

注6：手術日前4週以内（-28日～-1日）の結果がある場合はスクリーニング時の結果として利用可能

注7：来院前日を含む連続7日間

注8：手術日前4週以内（-28日～-1日）での実施を許容する

注9：手術開始以降

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

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

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 教授
丸山彰一 名古屋大学大学院医学系研究科 腎臓内科 准教授

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。この細胞は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。そこで本事業においては 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 の有効性を評価するための新規判別法の確立を目指した。ヒト LASC はドナーごとでその性能に差があるため、臨床応用において投与前にその性能を確保する技術は必須であるといえる。有効性に関してはヒト LASC とラットマクロファージによる *in vitro* の系を想定したが、異種細胞同士のため、有効な系を構築することができなかった。また T 細胞への作用効果の判定系についても検討を継続している。さらに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。

A. 研究目的

急速進行性糸球体腎炎 (Rapidly Progressive Glomerulonephritis, RPGN) 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腎炎で、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。進行により透析導入に至る例も少なくなく、特に GBM 抗体型 RPGN では生命予後も悪く、免疫抑制療法が進歩している現在においても感染症による死亡率の改善は見られていない。RPGN は副腎皮質ステロイド、免疫抑制剤 (シクロホスファミド等) による薬物療法が中心となるが、罹患患者の多くが高齢であることから、こ

れら薬剤を十分に使用できずに血液透析などの血液浄化療法を導入し、維持透析となるケースがある。血液浄化療法は患者の社会的状況に大きな制約をもたらし、長期の透析は感染症や動脈硬化をはじめとする種々の合併症のリスクファクターとなる。RPGN に対する機能再生医療は現在においてまだ確立されておらず、新規治療法の開発は急務であるといえる。

近年、間葉系由来幹細胞 (MSC) は免疫抑制作用を有することが明らかとなっており、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[1]-[3]。その機序のひとつに T 細胞に対する増殖抑制作用があり、この作用が MSC のもつ免疫調整能の大部分を占めていると考えられていたが、近年では T 細胞への作用以外にも樹状細胞[4]、NK 細胞[5]、[6]などの免疫細胞全般への作用が報告されている。

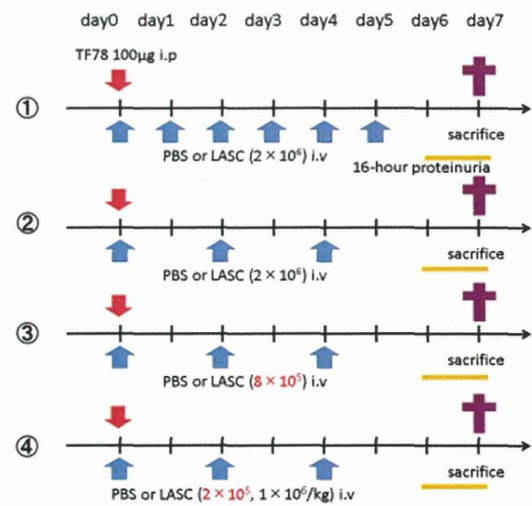
我々は、ヒト皮下脂肪から分化能と増殖能の高い MSC の選択的分離培養法 (=低血清培養法) を世界に先駆けて開発した[7]。2%血清を含む培養液を用いて、1g の脂肪組織から 2 週間で 10^9 個の低血清培養 ASC (LASC) を得ることが可能である。また我々は、LASC が高血清培養 ASC (HASC) や骨髄由来 MSC (BM-MSC) に対して、より強力な T 細胞の増殖抑制能を有することを見出した。更に LASC の B 細胞系に対する効果についても検討を行ったところ、LASC には T 細胞制御を介して B 細胞の抗体産生を抑制する効果があることも見出した[8]。また LASC は自然免疫を担っているマクロファージに対し、炎症性の M1 マクロファージを抗炎症性の M2 マクロファージに分化させ、腎炎に対して有効な治療効果があることも示している[9]。免疫制御作用以外にも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[10], [11]。これらの結果から、LASC による細胞療法は RPGN 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 RPGN に対する治療法を確立するために、RPGN モデルへの治療実験の改良とヒト LASC

の安全性の判定マーカーの探索を行った。治療実験は、従来は 6 日間連続投与により改善を認めていたが、投与回数、投与量をより臨床試験プロトコルに近づけるよう改良を行った。有効性については、M1/M2 分化能と T 細胞への増殖抑制能を指標として検討を行った。CPC でのコールドランは投与可能な製剤を作成可能か、実際のプロトコルに沿って実施し、検討を行った。

B. 研究方法
治療実験

従来の治療プロトコルのラット LASC 2×10^6 /body を 6 日間連続投与 (下表①) から 3 回 (day 0, 2, 4) 投与 (下表②)、さらには投与量を 8×10^5 (下表③), 2×10^5 /body (下表④) に減らして治療効果の判定を



行った。

治療効果は尿素窒素 (BUN)、血清クレアチニン (sCr) 値、尿たんぱくの比較で行った。

マクロファージへの作用判定 ラッ

トマクロファージとラット HASC, LASC, ヒト HASC, LASC それぞれとの共培養を 48 時間行い、ラット M2 マーカー (ED2) の発現をフローサイトメトリーにて確認した。

1. WKY ラットの腹腔内よりマクロファージを採取
2. 4% FBS, DMEM (high glucose) でインキュベートし、dish に接着させる。
3. 24 時間後、浮遊細胞を除去し、ターゲット : LASC が 20:1 になるように LASC を播種した。培養には 10%FBS, DMEM (high glucose) を使用した。
1. 48 時間後に細胞を回収し、CD11b/c と CD163 (ED2) の二重染色を行い、フローサイトメトリーにて M2 細胞の検出を行った。

T 細胞への作用判定

末梢血単核球 (Peripheral blood mononuclear cell; PBMC)、あるいは Jurkat 細胞をターゲットとし、CFSE 染色による増殖抑制試験を行った。PBMC への増殖刺激として CD3/CD28、rIL-2 を使用した。

1. PBMC を新鮮血よりヒストパックを使用して濃度勾配法により採取した。
2. PBMC あるいは Jurkat を 24well plate に播種し、1/5 から 1/20 の量のヒト HASC/LASC を播種して 72 時間共培養を行った。培養には 10%FBS 入り RPMI を使用した。

また、この共培養で得られた上清中
Th cytokine13 項目

(IL-2, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 17A, 17F, 21, 22, IFN-gamma, TNF-alpha)、および proinflammatory chemokine (IL-8, IP-10, Eotaxin, TARC, MCP-1, MIG, RANTES, MIP-1alpha, ENA-78, MIP-3alpha, GRO-alpha, I-TAC, MIP-1beta) の測定を行った。

コールドラン

当院 CPC にて LASC 作成のコールドランを実施し、製造した細胞の検定を行った。検定項目は LASC 臨床試験プロトコルに則り、細胞増殖能、表面マーカー、サイトカイン、無菌試験 (エンドトキシン、マイコプラズマ、真菌) 及びウイルス検査 (HBV、HCV、HIV-1) について実施した。

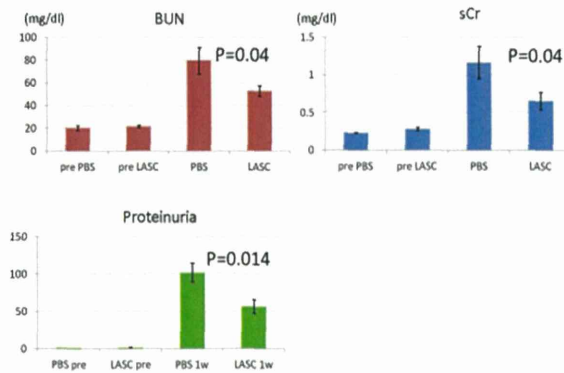
性状(外観)		乳白色～淡赤色の懸濁液
細胞表面マーカー	CD14	≤10%
	CD34	
	CD45	
	CD44	≥70%
	CD73	
	CD90	
サイトカイン分泌能	HGF	≥400pg/10 ⁶ cells
	VEGF	≥200pg/10 ⁶ cells
総細胞数		≥1×10 ⁶ /kg
生細胞率		≥70%
無菌試験		陰性
エンドトキシン試験		1.0 pg/ml以下
β-Dグルカン(真菌)		20 pg/ml以下
マイコプラズマ試験		陰性
ウイルス検査(PCR法)	HBV	陰性
	HCV	陰性
	HIV-1	陰性

C. 研究結果

治療実験の改良

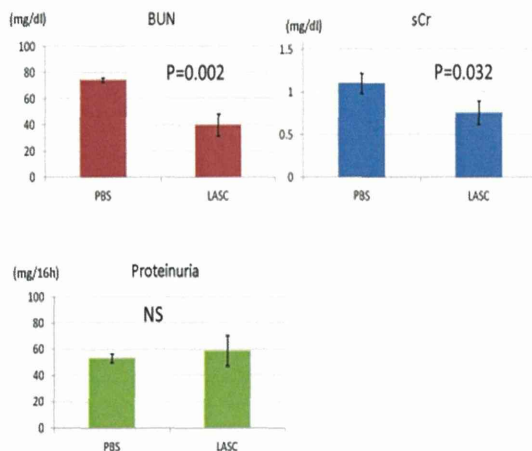
従来の 2×10⁶/body、連続 6 回投与の治療効果について再度確認実験を行った。BUN、sCr 値、尿たんぱくのいずれの項目においても改善が確認された。

① 6回投与結果



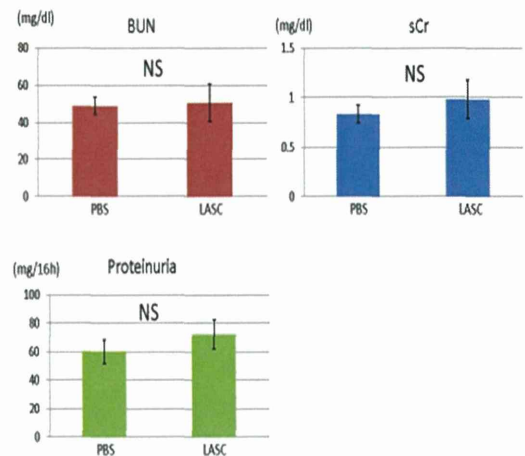
続いて投与回数を6回から3回隔日に変更して検討を行ったところ、回数を減らしても BUN、sCr 値の改善が認められた。尿たんぱくについては差が認められなかった。

② 3回投与結果

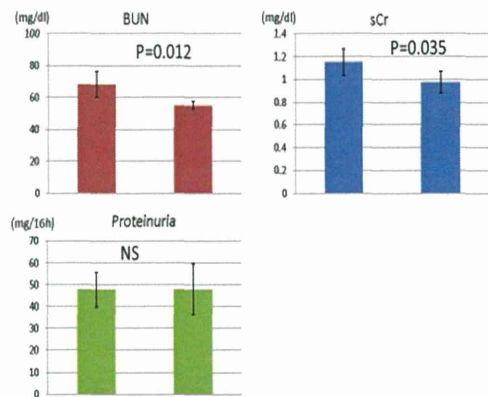


3 回投与でも十分な治療効果があることが示されたことから、さらに投与細胞数を 8×10^5 , 2×10^5 /body に減らして検討を行った。

③ 8×10^5 /body, 3回投与結果



④ 2×10^5 /body, 3回投与結果



2×10^5 /body の投与量においても十分な治療効果を認めた。検討ごとにモデルの重症度に差がみられるため、現在も引き続き検討を継続中である。

マクロファージ分化能試験 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。

