

令和元年5月17日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11046

研究課題名(和文) 脂肪由来再生細胞による尿失禁再生治療の作用機序と前立腺癌細胞に対する影響の検討

研究課題名(英文) A study on mechanism of action of treatment of stress urinary incontinence using adipose-derived regenerative cells (ADRCs) and effect of ADRCs on prostate cancer cells

研究代表者

後藤 百万 (GOTOH, Momokazu)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10186900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腹圧性尿失禁に対する、医師主導治験中の非培養自己皮下脂肪由来再生細胞(ADRCs)の傍尿道注入治療の有効性に関するメカニズムの基礎的検討、および前立腺癌細胞に対する影響の検討を行い、ADRCsのラット傍尿道注入が細胞数(用量)依存性に尿道抵抗増加効果を示すこと、注入細胞が平滑筋に分化すること、ADRCsが多彩な再生サイトカインを分泌すること、前立腺癌細胞の増殖抑制効果を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

男性腹圧性尿失禁に対しては、低侵襲外科的治療がなく、低侵襲再生治療の開発が期待されている。我々はPMDAとの対面助言を実施し、男性腹圧性尿失禁を対象に自己非培養ADRCsの経尿道的傍尿道注入治療の多施設共同医師主導治験を実施中で、2018年度までに45例の組み入れを終了し、現在薬事承認・保険収載を目指している。他方、PMDAから保険収載にあたりADRCs作用メカニズムの解明と前立腺癌症例に投与する際の安全性の基礎的検討を求められており、本研究で得られた成果により、本治療の薬事承認、保険収載が早期に実現されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：No minimally invasive surgical treatment is available for male stress urinary incontinence (SUI), and development of minimally invasive regenerative treatment has been expected. We have been conducting a prospective, multicenter investigator-initiated clinical trial of periurethral injection of non-cultured autologous adipose-derived regenerative cells for male SUI with an approval of the PMDA and completed an enrollment of all 45 patients by 2018. On the other hand, PMDA requested to investigate the mechanism of action of the treatment and the safety of ADRCs, in terms of their effects on prostate cancer cells, which were clarified in the present study. The outcome of the present study should accelerate an approval by PMDA and coverage of health insurance of this world-first regenerative treatment for male SUI.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：再生治療 脂肪由来再生細胞 尿失禁 尿道括約筋障害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療の開発は、「再生医療の実用化ハイウェイ構想」に基づく重要な施策であり、我々は体性幹細胞の一つである ADRCs(adipose-derived regenerative cells)を用いた腹圧性尿失禁治療の開発を行っている。臨床応用されている再生治療の多くの細胞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、骨髄以外の組織より抽出する体性幹細胞を活用した再生医療を戦略的に確立することが喫緊の課題である。

本邦では女性腹圧性尿失禁の罹患者は 400 万人以上で、また男性では前立腺手術、特に前立腺癌に対する根治的前立腺全摘除術後の合併症として腹圧性尿失禁が発生し、約 82 万人の男性腹圧性尿失禁患者がいると推定されている。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、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。

男性における腹圧性尿失禁に対しては、低侵襲外科的治療がないのが現状であり、重度の尿失禁に対しては平成 24 年 4 月に人工尿道括約筋植込・置換術が保険適応となったが、異物である機器を体内に植込むことが欠点であり、また長期的には植込機器の動作不良・故障が問題となり、再手術率は 25% に及ぶ。また、軽度から中等度の尿失禁に対しては有効な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脂肪由来幹細胞に注目した。我々は、尿失禁ラットモデルを用いて培養脂肪由来幹細胞を傍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、(1)尿道粘膜下への投与細胞による尿道閉鎖効果 (bulking effect) が得られること、(2)投与細胞が平滑筋へ分化すること、(3)投与細胞から尿道括約筋細胞の分化増殖や血管新生を促進する肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor : HGF) や血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth factor : VEGF) が産生されること、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 (Celution™800/CRS : Cytori Therapeutics, Inc.) を用いて ADRCs を抽出し、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 (以下、本治療) により、腹圧性尿失禁の治療を行うことを計画し、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 (2011 年 3 月 15 日承認 : 厚生労働省発医政 0315 第 3 号) 本治療法の一定の有効性及び安全性を確認した。当該治療の開発では、2014 年度に PMDA との対面助言を実施し、2015 年 9 月より男性腹圧性尿失禁を対象に多施設共同医師主導治験を実施中であり、2018 年度までに 45 例の組み入れを終了し、現在保険収載を目指している。他方、PMDA から保険収載にあたり ADRCs 作用メカニズムの解明と前立腺癌症例に投与する際の安全性の基礎的検討を求められており、本研究では非培養 ADRCs 傍尿道注入の尿失禁改善メカニズムの探索、前立腺癌細胞に対する ADRCs の安全性の基礎的検討を行う。PMDA との対面助言、医師主導治験開始前までに、低血清培養により培養した脂肪組織由来幹細胞については、傍尿道注入による尿道抵抗増大効果、注入された脂肪由来幹細胞の平滑筋への分化やサイトカイン産生による血流増加効果などは確認したものの、ADRCs、特にヒト ADRCs に関する基礎的検討が不足していた。

### 2. 研究の目的

本研究では医師主導臨床治験が終了する 2018 年度までに、ADRCs の傍尿道注入治療の有効性に関するメカニズムの基礎的検討、および前立腺癌細胞に対する影響に関する基礎的検討を行い、治験による臨床データと合わせ、本再生治療の薬事承認と保険収載を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) ADRCs 傍尿道注入治療の有効性に関するメカニズムの基礎的検討については、ラット皮下脂肪から ADRCs を含む SVF(stromal vascular fraction)を採取し、腹圧性尿失禁ラットモデルの傍尿道に ADRCs を注入し尿漏出圧 (leak point pressure) を測定することによる尿道抵抗上昇の検討、組織学的及び免疫組織学的検討による ADRCs の平滑筋細胞への分化について検討する。

(2) ADRCs 細胞特性の検討として、医師主導治験にて治療を行う患者から採取したヒト ADRCs について、細胞数及び生存率の測定、フローサイトメトリーによる表面マーカーの測定、Luminex によるサイトカイン分泌能の測定、コロニー形成能の測定、平滑筋へ分化能を検討する。

(3) 前立腺癌への影響の検討ではヒト ADRCs、ヒト前立腺癌細胞株 (LNCaP) 及びヒト ADRCs+LNCaP の混合物を培養し、48 時間後の培養上清中の PSA 値を測定し比較検討するとともに、培養細胞を位相差顕微鏡で観察し、ADRCs の前立腺癌細胞に対する影響を形態学的も検討する。またヌードラットに LNCaP 単独、又は LNCaP+ADRCs 混合物を背部皮下に移植し、腫瘍サイズの経時変化を測定する。

### 4. 研究成果

(1) 尿失禁モデルラットでのラット ADRCs (脂肪組織由来再生細胞) 傍尿道注入による尿漏出圧測定と注入 ADRCs の平滑筋分化の検討を行った。ラット皮下より ADRCs を含む SVF を採取し、コラゲナーゼ処理後、ADRCs 懸濁液を作成した。ラット (10 週齢) を麻酔後、腹部正中切開にて膀胱周囲および尿道を剥離し (腹圧性尿失禁モデル)、ADRCs 懸濁液を尿道粘膜下に投与

した(シャム手術群、PBS コントロール投与群、細胞数  $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$  生細胞数/mL 各投与群)。手術後 28 日目に尿漏出圧(膀胱内圧)を測定した。漏出圧 (cmH<sub>2</sub>O) は PBS コントロール群(n=6)  $28.2 \pm 3.7$ 、 $10^5$  群(n=6)  $32.5 \pm 8.5$ 、 $10^6$  群(n=6)  $42.1 \pm 8.0$ 、 $10^7$  群(n=6)  $32.9 \pm 5.0$  で、 $10^5$  群、 $10^6$  群においてコントロールに対して細胞数依存的に漏出圧が上昇した(図 1)。 $10^7$  群ではコントロールに対しては漏出圧が高い傾向だったが細胞依存的効果は認められず、SVF 注入は尿道括約機能改善効果を示し、有効細胞数は  $10^5 \sim 10^6$  個と考えられた。尿漏出圧測定実験終了後、ADRCs 注入部尿道を摘出し、ADRCs の平滑筋への分化確認のため免疫染色を行った。摘出尿道の  $\alpha$ -SMA (smooth muscle actin)(図 2)、calponin 1、MHC(myosin heavy chain)免疫染色により尿道筋層から粘膜下層に筋原性染色用生細胞が存在し、注入細胞の平滑筋への分化が確認された。

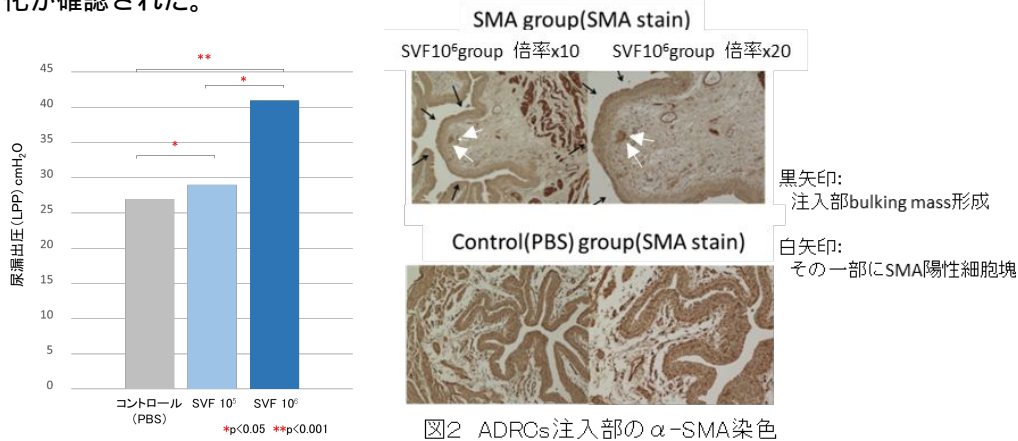


図1 SVF細胞数と尿漏出圧

図2 ADRCs注入部の  $\alpha$ -SMA染色

(2) 5 例の患者から採取した脂肪組織から ADRCs を分離後、細胞数及び生存率の測定、表面マーカー測定、サイトカイン分泌能測定、コロニー形成能測定及び平滑筋への分化能測定を行った。分離 ADRCs は約  $4 \times 10^6$  個得られ、CD31、CD34、CD44、CD45 の表面マーカー発現が認められたが、Stro-1 の発現はほとんど認められなかった(図 3)。

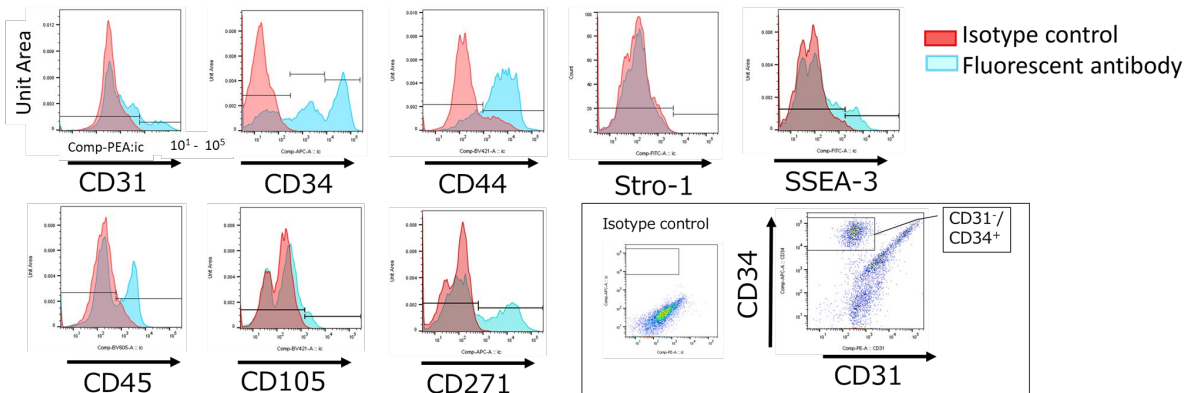


図3 ADRCsの表面マーカー(一例)

Hoechst33342で核の存在が認められない領域、並びに7-AADで死細胞を除去後、BD FACSria IIで測定した

平滑筋分化培地培養では SMA、Calponin 等の平滑筋マーカー発現が認められ、約 1.5% の細胞がコロニーを形成した。ADRCs は様々な細胞から構成され、平滑筋への分化能があることが確認された。さらに、3 例の患者から採取した ADRCs、培養脂肪幹細胞において付着細胞と浮遊細胞培養を行い、総合的に数十種類のサイトカインをマルチプレックス法で測定評価した。培養脂肪幹細胞では検出限界以下であったサイトカインが ADRCs で多数検出された。また、ADRCs で有意に高く検出されているサイトカイン (IL-6, GRO, MCP-1)、有意差はないが培養脂肪幹細胞、ADRCs とともに検出されたサイトカイン (EOTAXIN, FLT-3L, IL-7, INF, RANTES, VEGF, FGF-2, Fractalkine) に分けられた(図 4)。測定した 41 種類のサイトカインの中では、培養脂肪幹細胞で有意に高く検出されたサイトカインはなかったことから、ADRCs は培養脂肪幹細胞と比較して有意に多彩な再生サイトカインを分泌する可能性が示唆された。

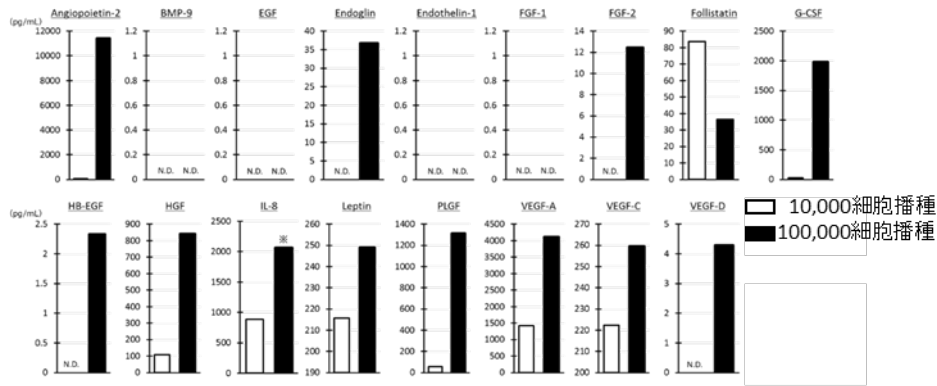


図4 ADRCsのサイトカイン分泌 (一例)  
ADRCsを10,000及び100,000個、それぞれ播種し、7日後に培養上清を回収し、Luminexで測定した

(3) Celution™で分離したヒト脂肪由来再生細胞 (ADRCs) ヒト前立腺癌細胞株、及びADRCsとヒト前立腺癌細胞株の細胞比1対1での混合培養で、それぞれ上清の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とヒト前立腺癌細胞株・ADRC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ず、むしろ前立腺癌細胞単独培養上清中PSAに比べて低下傾向を示した (図5)

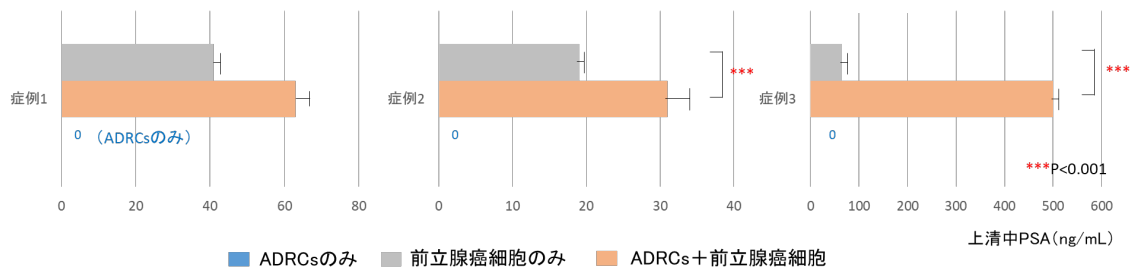


図5 前立腺癌症例からの癌細胞とADRCs共培養による上清PSA産生抑制効果 (症例1:GS 3+3 症例2:GS 3+4 症例3:GS 4+4)

さらにADRCsとPSA産生能を持つLNCaP細胞混合培養(48時間)時の細胞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、前立腺癌細胞増殖促進の所見は見られなかった。

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、48時間、96時間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。

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ところ、単独群はヌードマウスの皮下に明らかな腫瘍を形成した。それに対して混合移植群は腫瘍サイズが小さく、壊死を伴う潰瘍形成を示した。移植28日後の腫瘍サイズの比較では、混合群は単独群と比較して、明らかに腫瘍サイズの減少を認め、ADRCsの前立腺癌に対する増殖抑制効果を認めた(図6)。以上より、ADRCsおよび脂肪由来幹細胞は前立腺癌細胞増殖促進作用を有せず、むしろ抑制する可能性が示唆された。

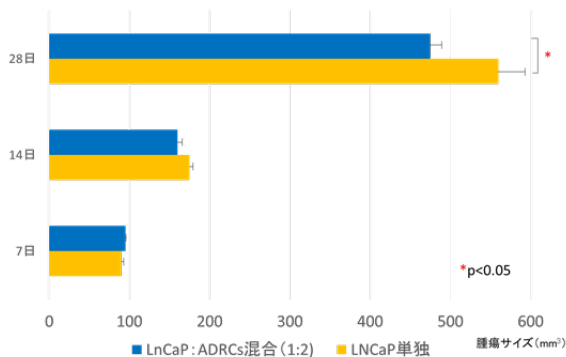


図6 ADRCsによるヌードマウス皮下移植LNCaP細胞増殖の抑制効果

< 引用文献 >

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 7, 2001,211-28

Watanabe T, Maruyama S, Yamamoto T, Kamo I, Yasuda K, Saka Y, Ozaki T, Yuzawa Y, Matsuo S, Gotoh M. Increased urethral resistance by periurethral injection of low serum cultured adipose-derived mesenchymal stromal cells in rats. Int. J. Urol.18,2011, 659-666.

Yamamoto T, Gotoh M, Kato M, Majima T, Toriyama K, Kamei Y, Iwaguro H, Matsukawa Y, Funahashi Y. Periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells for the treatment of male stress urinary incontinence: report of 3 initial cases. Int. J. Urol. 19, 2012, 652-659

Gotoh M, Yamamoto T, Kato M, Majima T, Toriyama T, Kamei Y, Matsukawa Y, Hirakawa 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. 21, 2014, 294-300

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Gotoh M, Yamamoto T, Shimizu S, Matsukawa Y, Kato, Majima T, Takai S, Funahashi Y, Toriyama K: Treatment of male stress urinary incontinence using autologous adipose-derived regenerative cells: Long-term efficacy and safety. Int J Urol, 査読有、26, 2019, 400-405 doi: 10.1111/iju.13886.

Hirose Y, Funahashi Y, Matsukawa Y, Majima T, Yamaguchi M, Kawabata S, Gotoh M, Yamamoto T. Comparison of trophic factors secreted from human adipose-derived stromal vascular fraction with those from adipose-derived stromal/stem cells in the same individuals. Cytotherapy. 査読有, 20, 2018, 589-591 doi: 10.1016/j.jcyt.2018.02.001.

Shimizu S, Yamamoto T, Nakayama S, Hirakawa A, Kuwatsuka Y, Funahashi Y, Matsukawa Y, Takanari K, Toriyama K, Kamei Y, Narimoto K, Yamanishi T, Ishizuka O, Mizuno M, Gotoh M. Design of a single-arm clinical trial of regenerative therapy by periurethral injection of adipose-derived regenerative cells for male stress urinary incontinence in Japan: the ADRESU study protocol. BMC Urol. 査読有, 7, 2017, 89-94. doi:10.1186/s12894-017-0282-7.

[学会発表](計7件)

後藤百万、極意の伝承: Translational Research 実現への道(シーズから臨床応用へ) 第68回日本泌尿器科学会中部総会、2018年

後藤百万、腹圧性尿失禁に対する再生治療の展望: 自己皮下脂肪組織由来再生(幹)細胞を用いた細胞治療、第59回日本老年医学会学術集会 2017年

後藤百万、ADRCsを用いた各疾患の治療・再生医療の可能性、第16回日本再生医療学会総会、2017年

後藤百万、腹圧性尿失禁に対する再生治療の展望: 自己皮下脂肪組織由来再生(幹)細胞を用いた細胞治療、第59回日本老年医学会学術集会、2017年

鳥山和宏, 高成啓介, 山本徳則, 後藤百万, 清水忍, 水野正明, 亀井譲、腹圧性尿失禁に対する脂肪組織由来再生幹細胞の臨床応用と臨床検体解析、第26回日本形成外科学会基礎学術集会、2017年

清水忍, 後藤百万、腹圧性尿失禁における脂肪由来再生(幹)細胞分離装置の開発、平成29年度中部地区医療・バイオ系シーズ発表会、2017年

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 山本 徳則

ローマ字氏名: (YAMAMOTO Tokunori)

所属研究機関名: 名古屋大学

部局名: 大学院医学系研究科

職名: 特任教授

研究者番号(8桁): 20182636

(2)研究分担者

研究協力者氏名: 舟橋 康人

ローマ字氏名: (FUNAHASHI Yasuhito)

所属研究機関名: 名古屋大学

部局名: 医学部附属病院

職名: 病院講師

研究者番号(8桁): 70534824

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。