

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592066

研究課題名（和文） 皮下脂肪細胞由来幹細胞を用いた勃起不全治療法の開発

研究課題名（英文） The studies with adipose-derived stem/stromal cells therapeutic development of erectile dysfunction

研究代表者 西松 寛明（NISHIMATSU HIROAKI）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60251295

研究成果の概要（和文）：【緒言】急速に高齢化社会に構造転換している日本において、男性の生活の質を向上させる取り組みが医学的にも重要である。メタボリック症候群の初期症状として勃起不全（Erectile Dysfunction, 以下 ED と略す。）が認められ、逆に ED 男性の 90% は糖尿、高血圧、高脂血症、肥満を有しており、陰茎海綿体内での海綿体平滑筋・内皮、神経の異常が全身の心臓血管系異常に先立って現れてくる。ED に対する治療は、現状では実質的に、勃起改善治療薬の処方のみであり、糖尿病、動脈硬化症例での機能回復は限定的であることから有効な再生医療が期待される。

【研究方法と結果】我々はラットから皮下脂肪由来幹細胞；adipose tissue-derived stem cells (ASC) を安定的に誘導することに成功し、研究を行っている。ラット勃起 vivo モデルを用いて、勃起状態の定量化（海綿体内圧と動脈圧の測定）を行っている（Nishimatsu H et al. *Peptides* 2001; 22: 1913-8）。STZ による 1 型糖尿病ラットを用いて、 $5.0 \times 10^5$  個の SVF/MC 幹細胞（刺激因子による内皮誘導型；EGM、平滑筋誘導型；EBM）を亀頭部海綿体から類洞静脈洞に注入。①勃起機能が幹細胞により改善することを示した。②糖尿病によってもたらされる海綿体構造の破綻に対して、ASC 投与はこれを改善することを示した。VE-Cadherin やコラーゲンやエラスチン繊維の増生（再生）を認めた。③ASC が分泌する paracrine factor として我々は Adrenomedullin (AM) に以前から注目していたが、ASC 培養上清に非常に多く存在することを確認し、AM 産生を抑制させる siRNA 投与で ASC からの分泌が抑制されることを示した。AM の作用機序は、1.細胞の遊走（マクロファージ）、分化制御、2.血管内皮細胞再生、抗炎症作用、血管新生の調整、3.体液量調節作用、強心作用といった多彩な生理活性を示す。この様な AM の作用が、我々の誘導した ASC の海綿体再生能にどの程度関与しているかを検討するために AM のノックダウンや過剰発現が海綿体構造に与える変化を評価したところ、海綿体再生に AM が paracrine factor として大きく関与していることを確認した。

【考察】再生医療における ASC の利点について列挙すると、1) 低侵襲で大量・効率的に幹細胞を回収可能（キースライド参照）2) 自家細胞での治療が可能、感染・拒絶リスク回避（安全性）3) iPS 細胞と異なり、発癌の危険性はない 4) 細胞分泌 paracrine factors の組織修復促進効果が期待可能 5) iPS 細胞は技術的、倫理的、特許の観点からまだまだハードルが高いなどが考えられる。我々はラット ASC が血管再生、海綿体構造再構築、勃起機能改善に有効であることを見出した。ASC の作用機序の更なる解明のために、AM 以外の血管新生、神経再生を効率的に促進するサイトカインや細胞老化制御についての研究を今後も進めていきたい。

研究成果の概要（英文）：INTRODUCTION AND OBJECTIVES: Diabetic patients are more refractory to the treatment with phosphodiesterase type 5 inhibitors (PDE-5I) because of severe damage in their cavernous body. We have previously reported that acute administration of Adrenomedullin (AM) into the cavernous body enhances erectile function in rats. During the screening of cytokines that adipose tissue-derived stem cells (ASC) produce, we found that ASC produced AM especially when

ASC were cultured in medium containing growth factors for vascular endothelial cells (VEC). In this study, we examined whether AM would be implicated in ASC-induced restoration of erectile function. METHODS: ASC isolated from the subcutaneous adipose tissue of a Wister rat was cultured for one week in either EBM or EGM medium which contains vascular endothelial cell growth factor such as VEGF-A, IGF with 5% FBS. Streptozotocin (STZ) was injected into a male Wister rat. Stem cells cultured using the two methods above were injected into the corpus spongiosum penis of the model rat and a normal rat in the ninth week after STZ administration. The mean arterial blood pressure (MAP) and the intracavernosal pressure (ICP) were measured. We used lentivirus(LV) expressing rat AM siRNA and AdAM, and examined whether AM produced by ASC played pivotal roles in ASC-induced restoration of erectile function. RESULTS: 1. ASC administration restores ICP; Administration of ASC significantly increased ICP/MAP and AUC. 2. ASC administration restores the structure of cavernous body; When ASC were injected, the trabeculae of cavernous body became larger and were distributed more densely. 3. ASC produce AM; The ASC secreted AM in the culture medium in a time-dependent fashion. When ASC were infected with LV that expresses AM siRNA and cultured for 1 week, AM secretion by ASC was significantly suppressed. 4. Effects of AM knockdown and forced expression of AM; ASC were infected with LV expressing AM siRNA (LV\_AM siRNA) or its negative control NC siRNA (LV\_NC siRNA), cultured for 1 week, and injected in the cavernous body. When ASC were infected with LV\_NC siRNA, ASC significantly restored erectile function, as assessed by ICP/MAP and AUC. In contrast, when ASC were infected with LV\_AM siRNA, ASC-induced restoration of ICP/MAP and AUC was significantly diminished. CONCLUSIONS: These results suggested that ASC have potentials to restore erectile function and that AM produced by ASC when cultured especially in EGM plays a major role in the restoration of erectile function

#### 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,000,000 | 600,000   | 2,600,000 |
| 2010年度 | 1,400,000 | 420,000   | 1,820,000 |
| 2011年度 | 200,000   | 60,000    | 260,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：(1)勃起不全、(2)皮下脂肪由来幹細胞、(3)糖尿病ラット、(4) アドレノメジュリン

#### 1. 研究開始当初の背景

日本の勃起不全 (Erectile Dysfunction,以下EDと略す。)を訴える患者数は、約1,100万人と推計されているが、治療を受けた患者は5%程度と考えられる。EDが様々な疾患に合併して起こり複雑な病態を呈し、患者の肉体的および精神的な健康状態に密接に関係していることを念頭に、高齢化社会を迎えるにあたり、中高年男性のQOL向上のため積極的に治療していく必要があると考える。EDの原因は多様であるが、加齢以外の危険因子としては高血圧、糖尿病、高脂血症、喫煙、肥満などがあげられている。実際に虚血性心

疾患有病者の性機能不全は50-75%の患者に認められる。喫煙と糖尿病もEDの発症促進因子である。例えば心疾患を有する男性のEDの頻度は喫煙者で56%なのに対し、非喫煙者では21%である。糖尿病に関しては、60歳以上の男性の糖尿病患者の75%がEDとの報告もある。

#### 2. 研究の目的

1. 急速に高齢化社会に構造転換している日本において、男性の生活の質を向上させる取り

組みが医学的にも重要である。メタボリック症候群の初期症状として勃起不全 (Erectile

Dysfunction,以下 ED と略す。)が認められ、逆に ED 男性の 90%は糖尿、高血圧、高脂血症、肥満を有しており、陰茎海綿体内での海綿体平滑筋・内皮、神経の異常が全身の心臓血管系異常に先立って現れてくる。

2. ED に対する治療は、現状では実質的には、勃起改善治療薬の処方のみである。

3. 我々はラットの皮下脂肪から幹細胞を安定的に誘導することに成功し、血管内皮障害モデルで血管再生に有効であることを確認した。

4. 自分の皮下脂肪から抽出した幹細胞による海綿体平滑筋、内皮、神経に対する再生医療を勃起不全治療に応用したい。

### 3. 研究の方法

1. 勃起障害モデルでの SVF/MC 幹細胞注入と勃起機能解析、PDE5 阻害剤併用効果の確認

2. GFP 遺伝子導入幹細胞による分化誘導細胞の組織的解析

3. 幹細胞の paracrine effect の解析

### 4. 研究成果

急速に高齢化社会に構造転換している日本において、男性の生活の質を向上させる取り組みが医学的にも重要である。メタボリック症候群の初期症状として勃起不全 (Erectile Dysfunction, 以下 ED と略す。)が認められ、逆に ED 男性の 90%は糖尿、高血圧、高脂血症、肥満を有しており、陰茎海綿体内での海綿体平滑筋・内皮、神経の異常が全身の心臓血管系異常に先立って現れてくる。科研費研究で、我々はラットから皮下脂肪由来幹細胞 ; adipose tissue-derived stem cells (ASC) を安定的に誘導することに成功し、ASC が血管再生、海綿体構造再構築、勃起機能改善に有効であることを見出して特許を申請も行った。

再生医療における ASC の利点について ; 1) 低侵襲で大量・効率的に幹細胞を回収可能、2) 自家細胞での治療が可能、感染・拒絶リスク回避 (安全性)、3) iPS 細胞と異なり、発癌の危険性はない、4) 細胞分泌 paracrine factors の組織修復促進効果が期待可能、5) iPS 細胞は技術的、倫理的、特許の観点からまだまだハードルが高い、が挙げられる。STZ による 1 型糖尿病ラットを用いて、 $5.0 \times 10^5$  個の SVF/MC 幹細胞 (刺激因子による内皮誘導型 ; EGM、平滑筋誘導型 ; EBM) を亀頭部海綿体から類洞静脈洞に注入。①勃起機能が幹細胞により改善することを示した。②糖尿病によってもたらされる海綿体構造の破綻に対して、ASC 投与はこれを改善することを示した。VE-Cadherin やコラーゲンやエラスチン

繊維の増生 (再生) を認めた。③ASC が分泌する Paracrine Factor として我々は Adrenomedullin (AM)

に以前より注目していたが、ASC 培養上清に

非常に多く存在することを確認し、AM 産生を抑制させる siRNA によりこの分泌が抑制されることを示した。AM の作用機序を大まかに列挙すると、1. 細胞の遊走 (マクロファージ)、分化制御、2. 内皮細胞再生、抗炎症作用、血管新生の調整、3. 体液量調節作用、強心作用等の多彩な生理活性を示す。我々は Adrenomedullin (AM) に以前から注目していたが、ASC 培養上清に非常に多く存在することを確認し、AM 産生を抑制させる siRNA 投与で ASC からの分泌が抑制されることを示した。AM の作用機序は、1. 細胞の遊走 (マクロファージ)、分化制御、2. 血管内皮細胞再生、抗炎症作用、血管新生の調整、3. 体液量調節作用、強心作用といった多彩な生理活性を示す。このような AM の作用が、我々の誘導した ASC の海綿体再生能にどの程度関与しているかを検討するために AM のノックダウンや過剰発現が海綿体構造に与える変化を評価したところ、海綿体再生に AM が paracrine factor として大きく関与していることを確認した。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線) [雑誌論文] (計 8 件)

1. Nishimatsu H., Suzuki E., Kumano S., Nomiya A., Liu M., Kume H. and Homma Y. Adrenomedullin Mediates Adipose Tissue-Derived Stem Cell-induced Restoration of Erectile Function in Diabetic Rats. (査読有り)

J Sex Med. 9: 482-493, 2012

2. Fujimura T., Nishimatsu H., Sugihara T., Nomiya A., Homma Y. et al. Assessment of lower urinary tract symptoms in men by international prostate symptom score and core lower urinary tract symptom score. BJU Int. Epub ahead of print. 2011 (査読有り)

3. Nomiya A., Nishimatsu H., Homma Y. Interstitial cystitis symptoms associated with ketamine abuse: The first Japanese case. Int J Urol. 18:735, 2011(査読有り)

4. Kiyose K., Nishimatsu H., Hirata Y., Nagano T. et al. Hypoxia-sensitive fluorescent probes for in vivo real-time fluorescence imaging of acute ischemia. J Am Chem Soc. 17:15846-8, 2010(査読有り)

5. Hirata Y., Nagata D., Suzuki E., Nishimatsu H., Suzuki J., Nagai R. Diagnosis and treatment of endothelial dysfunction in cardiovascular disease. Int Heart J. 51: 1-6, 2010 (査読有り)

6. Takahashi M., Suzuki E., Oba S., Nishimatsu H., Hirata Y., et al. Adipose tissue-derived stem cells inhibit neointimal formation in a paracrine

fashion in rat femoral artery. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 298: 415-423, 2010(査読有り)

7. Oba S, Suzuki E, Nishimatsu H, Homma Y, Hirata Y, Fujita T., et al. miR-200b precursor can ameliorate renal tubulointerstitial fibrosis. PLoS One. 5: e13614, 2010(査読有り)

8. 野宮明、本間之夫【Annual Review 腎臓】  
間質性膀胱炎：最新の知見 東京. 中外医学社 234-244, 2011(査読無し)

〔学会発表〕(計1件)

1. Adrenomedullin mediates adipose tissue - derived stem cells - induced restoration of erectile function in diabetic rats

Nishimatsu H.1, Suzuki E.2, Kumano S.1, Nomiya A.1, Niimi A.1, Suzuki M.1, Fujimura T.1, Fukuhara H1, Enomoto Y1, Ishikawa A1, Kume H.1, Igawa Y.3, Hirata Y.4, Homma Y.1

1University of Tokyo, Dept. of Urology, Tokyo, Japan, 2St. Marianna University, Institute of Medical Science, Tokyo, Japan, 3University of Tokyo, Dept. of Continence Medicine, Tokyo, Japan, 4University of Tokyo, Dept. of Internal Medicine, Tokyo, Japan

27<sup>th</sup> EAU Annual Congress, Paris, 2012/2/26

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：皮下脂肪由来幹細胞を用いた勃起障害に対する新規細胞治療法の開発

発明者：鈴木越、西松寛明、本間之夫、平田恭信

権利者：鈴木越、西松寛明、本間之夫、平田恭信

種類：知財

番号：出願番号：特願2009-199951

東大番号：21-114. 知財部管理番号：12B096002-1

出願年月日：平成21年6月9日

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.h.u-tokyo.ac.jp/urology/Kyou>

[situShoukai/info\\_achievements.html](http://www.h.u-tokyo.ac.jp/urology/Kyou)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西松 寛明 (NISHIMATSU HIROAKI)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60251295

(2) 研究分担者

大庭 成喜 (OOBA SHIGEYOSHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80361492

野宮 明 (NOMIYA AKIRA)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30372379

平田 恭信 (HIARATA YASUNOBU)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70167609

(3) 研究連携者

鈴木 越 (SUZUKI ETSU)

聖マリアンナ医科大学・難病治療研究センター・講師

研究者番号：40313134