

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6865933号
(P6865933)

(45) 発行日 令和3年4月28日(2021.4.28)

(24) 登録日 令和3年4月9日(2021.4.9)

(51) Int. Cl. F 1
A 6 1 K 35/28 (2015.01) A 6 1 K 35/28
A 6 1 K 45/00 (2006.01) A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 15/10 (2006.01) A 6 1 P 15/10

請求項の数 7 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2018-31340 (P2018-31340)	(73) 特許権者	520032136
(22) 出願日	平成30年2月23日 (2018.2.23)		株式会社 Meis Technology
(65) 公開番号	特開2019-142831 (P2019-142831A)		愛知県名古屋市千種区千種2丁目2番8号
(43) 公開日	令和1年8月29日 (2019.8.29)	(74) 代理人	100202120
審査請求日	令和3年1月19日 (2021.1.19)		弁理士 丸山 修
早期審査対象出願		(72) 発明者	松本 成史
			北海道旭川市緑が丘東2条1丁目1番1号
			国立大学法人旭川医科大学内
		(72) 発明者	山本 徳則
			北海道旭川市緑が丘東2条1丁目1番1号
			国立大学法人旭川医科大学内
		(72) 発明者	堀田 祐志
			愛知県名古屋市千種区仲田2-16-2
			グランジャリオ池下701
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 勃起不全治療剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脂肪組織由来幹細胞又は骨髄由来幹細胞が凍結融解処理又は超音波処理によって破碎された破碎液の遠心処理後の上清を、フィルター処理して得られた濾液を含有する、勃起不全治療剤。

【請求項 2】

器質性勃起障害又は混合型勃起障害の治療に用いられる、請求項 1 に記載の勃起不全治療剤。

【請求項 3】

器質性勃起障害が神経性、血管性又は糖尿病性の勃起障害である、請求項 2 に記載の勃起障害治療剤。

【請求項 4】

PDE-5阻害薬及び/又はプロスタグランジン製剤が併用される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の勃起不全治療剤。

【請求項 5】

以下のステップ(1)~(3)を含む、勃起不全治療剤の製造方法：

- (1) 脂肪組織由来幹細胞又は骨髄由来幹細胞を破碎するステップ、
- (2) ステップ(1)で得られた破碎液、又は該破碎液を遠心処理して得られた上清をフィルター処理し、濾液を得るステップ、及び
- (3) ステップ(2)で得られた濾液を製剤化するステップ。

【請求項 6】

ステップ(1)を超音波処理で行う、請求項5に記載の製造方法。

【請求項 7】

勃起不全の患者の陰茎海綿体、尿道海綿体、外尿道括約筋、又は外尿道括約筋部の尿道粘膜下に投与されることを含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の勃起不全治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は勃起不全(ED)治療剤及びその用途に関する。

【背景技術】

10

【0002】

「勃起不全(Erectile Dysfunction; ED)」とは、男性の性機能障害の一種であり、「性交時に十分な勃起が得られないため、あるいは十分な勃起が維持できないため、満足な性交が行えない状態」をいう。勃起不全(以下、「ED」とも呼ぶ)は「勃起機能障害」や「勃起障害」ともよばれる。EDはその程度によって軽症、中等度、完全型に分類される。また、原因によって器質性(動脈硬化や神経の損傷などに起因)、心因性(精神的なストレスに起因)、混合型(器質性と心因性の両者の要素が組み合わさって生ずる)に大別される。

【0003】

高齢化社会の到来によって勃起不全の罹患率は上昇傾向にある。ED罹患率は1995年に1億5,200万人であり、2025年には3億2,200万人に増加すると予想されている(非特許文献1)。勃起不全に対しては、薬物療法(PDE-5阻害薬。例えば特許文献1～3を参照)や心理療法の他、外科的手術等の治療が行われている。PDE-5阻害薬に対する無効症例も多く、他に有効な薬剤がないのが現状である。海外ではPDE-5阻害薬無効症例等に対し、プロスタグランジン(PG)E1の海綿体注射(局所注射)が実施されているが、効果は限定的である。また、海外では幹細胞療法(stem cell therapy)の有効性の報告はあるものの癌化リスクがある。尚、Albersen Mらは、海綿体神経損傷モデルに対し脂肪由来幹細胞(ADSC)及びその溶解液(ライセート)によって勃起機能の改善が見られたことを報告している(非特許文献2)。

20

【先行技術文献】

30

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】国際公開第98/053819号パンフレット

【特許文献2】国際公開第00/033845号パンフレット

【特許文献3】国際公開第99/43674号パンフレット

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Ayta IA, McKinlay JB, Krane RJ. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. BJU Int 1999; 84: 50-56.

40

【非特許文献2】Albersen M, Fandel TM, Lin G, Wang G, Banie L, Lin CS, Lue TF. Injections of adipose tissue-derived stem cells and stem cell lysate improve recovery of erectile function in a rat model of cavernous nerve injury. J Sex Med 2010;7(10):3331-40.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

現在、EDの治療における第1選択の治療法はPDE-5阻害剤の投与であるが、EDの原因が様々であることから、十分な治療効果が得られない症例も多く、副作用や併用禁忌の点から使用できない場合もある。そのため、有効性の高い新たな治療法に対するニーズは依然

50

として大きい。当該要望に応えるべく、本発明はEDに対する新規な治療戦略を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記課題を解決すべく本発明者らは、成体幹細胞（組織幹細胞、体性幹細胞とも呼ばれる）に着眼し、その有効性を詳細に検討した。その結果、二種類のEDモデル動物（血管性EDモデルと糖尿病性EDモデル）において、脂肪組織由来幹細胞（Adipose-derived stem cells: ASC、Adipose-derived regeneration cells: ADRC、Adipose-derived mesenchymal stem cells: AT-MSC, AD-MSCなどと呼ばれる）の破碎液をフィルター処理して得られた「濾液」が優れた治療効果を示した。一方、神経性EDモデルにおいて骨髄由来幹細胞（BM-
MSC）から同様に調製した濾液が優れた治療効果を示した。また、細胞破碎液を調製する際の手段として超音波処理を採用したところ、凍結融解処理に比べ、濾液による治療効果が高まることが判明した。

10

【0008】

以上の成果は、ADS又はBM-MSCから調製した濾液（細胞破碎液をフィルター処理したもの）がED治療剤として有効であることに加え、その適用範囲が広いことを示す。また、細胞自体ではなく、細胞破碎液から調製される濾液が薬効を示したことは、使用するタイミングを見計らって細胞培養を開始する必要がなく、その調製や取扱いが容易であることや、事前に材料（即ちASC又はBM-MSC）を準備しておけるため使用時の調製時間が短くて済むこと、更には副作用の懸念の少ない施術が可能になる等、臨床上の利点を考えれば、その意義は極めて大きい。

20

【0009】

ところで、上掲の通り、Albersen Mらは、海綿体神経損傷モデルに対し脂肪由来幹細胞（ADSC）の溶解液に勃起機能改善効果が認められたことを報告している。Albersen Mらが使用する細胞溶解液は、浸透圧を利用して細胞を破裂させた後、凍結融解処理を3回繰り返し、遠心分離によって不要物を除去したものである。対照的に、本発明者らが用いた濾液は、細胞（ASC又はBM-MSC）を凍結融解処理又は超音波処理によって破碎した後、遠心処理し、得られた上清をフィルターで濾過することで得られるものであり、特にフィルター処理によって細胞片や他の夾雑物がより確実に除去されている点において、Albersen Mらの細胞溶解液とは明確に区別される。また、Albersen MらはADSC（ASC）以外の細胞に
。言及せず、また、実験に使用したモデル（実験系）も海綿体神経損傷モデルに限定される。

30

【0010】

以下の発明は、主として上記の成果及び考察に基づき完成した。

[1] 脂肪組織由来幹細胞又は骨髄由来幹細胞が凍結融解処理又は超音波処理によって破碎された破碎液の遠心処理後の上清を、フィルター処理して得られた濾液を含有する、勃起不全治療剤。

[2] 器質性勃起障害又は混合型勃起障害の治療に用いられる、[1]に記載の勃起不全治療剤。

[3] 器質性勃起障害が神経性、血管性又は糖尿病性の勃起障害である、[2]に記載の勃起障害治療剤。

40

[4] PDE-5阻害薬及び/又はプロスタグランジン製剤が併用される、[1]～[3]のいずれか一項に記載の勃起不全治療剤。

[5] 以下のステップ(1)～(3)を含む、勃起不全治療剤の製造方法：

(1) 脂肪組織由来幹細胞又は骨髄由来幹細胞を破碎するステップ、

(2) ステップ(1)で得られた破碎液、又は該破碎液を遠心処理して得られた上清をフィルター処理し、濾液を得るステップ、及び

(3) ステップ(2)で得られた濾液を製剤化するステップ。

[6] ステップ(1)を超音波処理で行う、[5]に記載の製造方法。

[7] 勃起不全の患者の陰茎海綿体、尿道海綿体、外尿道括約筋、又は外尿道括約筋部の

50

尿道粘膜下に投与されることを含む、1 ~ [3] のいずれか一項に記載の勃起不全治療剤。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】血管性EDに対する幹細胞濾液の効果。脂肪幹細胞（ASC）濾液を投与することで勃起機能の改善が見られる。Sham: 対照群、Ligation+PBS: 血管性ED + PBS投与群、Ligation+Adipose: 血管性ED + ASC濾液投与群。各群n=3。

【図 2】糖尿病性EDに対する幹細胞濾液の効果。脂肪幹細胞（ASC）濾液を投与することで勃起機能の改善が見られる。CP: 対照群(n=3)、STZ+PBS: 糖尿病性ED + PBS投与群(n=3)、STZ+Adipose: 糖尿病性ED + ASC濾液投与群(n=2)。

【図 3】神経性EDに対する幹細胞濾液の効果。骨髄由来幹細胞（BM-MSC）濾液を投与することで勃起機能の改善が見られる。Sham: 対照群、BCNI+PBS: 神経性ED + PBS投与群、BCNI+Bone: 神経性ED + BM-MSC濾液投与群。各群n=3。ANOVA及びボンフェローニ多重t検定による。 $**P<0.01$

【図 4】非凍結破砕（超音波破砕）による幹細胞濾液の効果（神経性EDモデル）。Sham: 対照群、BCNI+PBS: 神経性ED + PBS投与群、BCNI+BoneFoezn: 神経性ED + BM-MSC濾液（凍結融解破砕）群、BCNI+BoneSonication: 神経性ED + BM-MSC濾液（超音波破砕）群。各群n=3。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 2 】

本発明は勃起不全治療剤（以下、「本発明の治療剤」とも呼ぶ）に関する。本発明の治療剤は勃起不全（ED）の治療又は予防に用いられる。「治療剤」とは、標的疾患（ED）に対する治療的又は予防的効果を示す医薬のことをいう。治療的効果には、標的疾患に特徴的な症状（病態）又は随伴症状を緩和すること（軽症化）、症状の悪化を阻止ないし遅延すること等が含まれる。後者については、重症化を予防するという点において予防的効果の一つと捉えることができる。このように、治療的効果と予防的効果は一部において重複する概念であり、明確に区別して捉えることは困難であり、またそうすることの実益は少ない。予防的効果の典型的なものは、標的疾患に特徴的な症状の再発を阻止ないし遅延することである。尚、標的疾患に対して何らかの治療的効果又は予防的効果、或いはこの両者を示す限り、標的疾患に対する治療剤に該当する。

【 0 0 1 3 】

本発明の治療剤では、脂肪組織由来幹細胞（ASC）又は骨髄由来幹細胞（BM-MSC）の破砕液をフィルター処理して得られた濾液（換言すれば、ASC又はBM-MSCの細胞破砕液をフィルターを過することで得られる抽出液）が用いられ、それに含まれる成分が特有の作用効果、即ち、勃起機能の改善をもたらす。

【 0 0 1 4 】

典型的には、本発明の治療剤は、脂肪組織由来幹細胞（ASC）又は骨髄由来幹細胞（BM-MSC）を破砕処理して得られた破砕液をフィルター処理して得られた濾液を含有する。但し、フィルター処理の前に破砕液を遠心処理し、不溶成分を除去することにしてもよい。即ち、細胞破砕液から遠心処理によって得られた上清をフィルター処理したもの（濾液）を用いることにしてもよい。遠心処理の条件を例示すると、200～300gで5分～10分である。

【 0 0 1 5 】

例えば、 1×10^6 個/ml～ 1×10^7 個/mlの濃度で用意した細胞懸濁液を破砕処理に使用する。ASC又はBM-MSCの破砕液を得るためには、ASC又はBM-MSCを破砕処理、例えば凍結融解処理（凍結の後、融解する処理）、超音波処理、フレンチプレスやホモジナイザーによる処理等に供すればよい。非物理的な処理によって細胞を破砕することにしてもよい。また、破砕処理に供する細胞として、生細胞に限らず、死細胞や障害を受けた細胞を用いることにしてもよい。各種破砕処理の中でも凍結融解処理は簡便であり、また、器械と細胞の接触による汚染を回避でき、衛生的である点から特に好ましい。凍結融解処理を複数回（例

10

20

30

40

50

えば2回～5回)繰り返すことにしてもよい。凍結融解処理における凍結の条件は特に限定されないが、例えば、-20～-196で凍結すればよい。融解の条件も特に限定されない。例えば、湯煎(例えば35～40)での融解、室温での融解等を採用することができる。

【0016】

一方、超音波処理を採用すれば、後述の実施例が裏付けるように、治療効果の向上を期待できる。即ち、超音波処理は、治療効果の高い治療薬を得るために有効な破碎処理といえる。超音波処理の条件の例を挙げると、200W～300Wの出力で30分間の処理(10秒間の破碎と20秒間の休止を繰り返す)である。

【0017】

フィルター処理によって不要成分が除去される。また、適切な孔径のフィルターを使用すれば、不要成分の除去と滅菌処理を同時に行うことができる。フィルター処理に使用するフィルターの材質、孔径などは特に限定されない。但し、好ましい材質としてセルロースアセテートを例示することができる。金属製のフィルターを使用することにしてもよい。孔径の例は0.2 μ m～0.45 μ mである。

【0018】

本発明の治療剤に、製剤上許容される他の成分、例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水などを含有させてもよい。

【0019】

本発明の治療剤に用いられるASC又はBM-MSCの由来、即ち生物種は限定されないが、免疫拒絶の問題等を考慮すれば、ヒトの細胞を用いることが好ましい。

【0020】

以上の説明からも明らかな通り、本発明の治療剤は、以下のステップ(1)～(3)によって製造することができる。

(1) 脂肪組織由来幹細胞又は骨髄由来幹細胞を破碎するステップ

(2) ステップ(1)で得られた破碎液、又は該破碎液を遠心処理して得られた上清をフィルター処理し、濾液を得るステップ

(3) ステップ(2)で得られた濾液を製剤化するステップ

【0021】

ステップ(1)に使用する細胞(ASC又はBM-MSC)の調製は常法に従えばよい。ASC及びBM-MSCは各種用途に広く用いられており、当業者であれば文献や成書を参考にして容易に調製することができる。公的な細胞バンクから分譲された細胞や市販の細胞などを用いることにしてもよい。以下、細胞の調製方法の例として、ASCの調製法(一例)を説明する。

【0022】

<ASCの調製法>

本発明において「脂肪組織由来幹細胞(ASC)」とは、脂肪組織に含まれる体性幹細胞のことをいうが、多能性を維持している限りにおいて、当該体性幹細胞の培養(継代培養を含む)により得られる細胞も「脂肪組織由来幹細胞(ASC)」に該当するものとする。通常、ASCは、生体から分離された脂肪組織を出発材料とし、細胞集団(脂肪組織に由来する、ASC以外の細胞を含む)を構成する細胞として「単離された状態」に調製される。ここでの「単離された状態」とは、その本来の環境(即ち生体の一部を構成した状態)から取り出された状態、即ち人為的操作によって本来の存在状態と異なる状態で存在していることを意味する。尚、ASCはADRC(Adipose-derived regeneration cells)、AT-MSC(Adipose-derived mesenchymal stem cells)、AD-MSC(Adipose-derived mesenchymal stem cells)等とも呼ばれる。本明細書では以下の用語、即ち、脂肪組織由来幹細胞、ASC、ADRC、AT-MSC、AD-MSC、を相互に置換可能に使用する。

【0023】

ASCは、脂肪基質からの幹細胞の分離、洗浄、濃縮、培養等の工程を経て調製される。A

10

20

30

40

50

SCの調製法は特に限定されない。例えば公知の方法 (Fraser JK et al. (2006), Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. Trends in Biotechnology; Apr;24(4):150-4. Epub 2006 Feb 20. Review.; Zuk PA et al. (2002), Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Molecular Biology of the Cell; Dec;13(12):4279-95.; Zuk PA et al. (2001), Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Engineering; Apr;7(2):211-28.等が参考になる)に従ってASCを調製することができる。また、脂肪組織からASCを調製するための装置(例えば、Celution(登録商標)装置(サイトリ・セラピューティクス社、米国、サンディエゴ))も市販されており、当該装置を利用してASCを調製することにしてもよい。当該装置を利用すると、脂肪組織より、ASCを含む細胞集団を分離できる(K. Lin. et al. Cytotherapy(2008) Vol. 10, No. 4, 417-426)。以下、ASCの調製法の具体例を示す。

10

【0024】

(1) 脂肪組織からの細胞集団の調製

脂肪組織は動物から切除、吸引などの手段で採取される。ここでの用語「動物」はヒト、及びヒト以外の哺乳動物(ペット動物、家畜、実験動物を含む。具体的には例えばサル、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター等)を含む。免疫拒絶の問題を回避するため、本発明の治療剤を適用する患者(レシピエント)から脂肪組織(自己脂肪組織)を採取することが好ましい。但し、同種の動物の脂肪組織(他家)又は異種動物の脂肪組織の使用を妨げるものではない。

20

【0025】

脂肪組織として皮下脂肪、内臓脂肪、筋肉内脂肪、筋肉間脂肪を例示できる。この中でも皮下脂肪は局所麻酔下で非常に簡単に採取できるため、採取の際のドナーへの負担が少なく、好ましい細胞源といえる。通常は一種類の脂肪組織を用いるが、二種類以上の脂肪組織を併用することも可能である。また、複数回に分けて採取した脂肪組織(同種の脂肪組織でなくてもよい)を混合し、以降の操作に使用してもよい。脂肪組織の採取量は、ドナーの種類や組織の種類、或いは必要とされるASCの量を考慮して定めることができ、例えば0.5~500g程度である。但し、ドナーへの負担を考慮して一度に採取する量を約10~20g以下にすることが好ましい。採取した脂肪組織は、必要に応じてそれに付着した血液成分の除去及び細片化を経た後、以下の酵素処理に供される。尚、脂肪組織を適当な緩衝液や培養液中で洗浄することによって血液成分を除去することができる。

30

【0026】

酵素処理は、脂肪組織をコラゲナーゼ、トリプシン、ディスパーゼ等の酵素によって消化することにより行う。このような酵素処理は当業者に既知の手法及び条件により実施すればよい(例えば、R.I. Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4th Edition, A John Wiley & Sones Inc., Publication参照)。以上の酵素処理によって得られた細胞集団は、多能性幹細胞、内皮細胞、間質細胞、血球系細胞、及び/又はこれらの前駆細胞等を含む。細胞集団を構成する細胞の種類や比率などは、使用した脂肪組織の由来や種類に依存する。

40

【0027】

(2) 沈降細胞集団(SVF画分:stromal vascular fractions)の取得

細胞集団は続いて遠心処理に供される。遠心処理による沈渣を沈降細胞集団(本明細書では「SVF画分」ともいう)として回収する。遠心処理の条件は、細胞の種類や量によって異なるが、例えば1~10分間、800~1500rpmである。尚、遠心処理に先立ち、酵素処理後の細胞集団をろ過等に供し、その中に含まれる酵素未消化組織等を除去しておくことが好ましい。

【0028】

ここで得られた「SVF画分」はASCを含む。従って、SVF画分を、精子との共培養に使用する細胞として用いることもできる。尚、SVF画分を構成する細胞の種類や比率などは、使用した脂肪組織の由来や種類、酵素処理の条件などに依存する。また、国際公開第20

50

06/006692A1号パンフレットにはSVF画分の特徴が示されている。

【0029】

(3) 接着性細胞(ASC)の選択培養及び細胞の回収

SVF画分にはASCの他、他の細胞成分(内皮細胞、間質細胞、血球系細胞、これらの前駆細胞等)が含まれる。そこで本発明の一態様では以下の選択培養を行い、SVF画分から不要な細胞成分を除去する。そして、その結果得られた細胞をASCとして本発明に用いる。

【0030】

まず、SVF画分を適当な培地に懸濁した後、培養皿に播種し、一晚培養する。培地交換によって浮遊細胞(非接着性細胞)を除去する。その後、適宜培地交換(例えば2~4日に一度)をしながら培養を継続する。必要に応じて継代培養を行う。継代数は特に限定されないが、多能性と増殖能力の維持の観点からは過度に継代を繰り返すことは好ましくない(5継代程度までに留めておくことが好ましい)。尚、培養用の培地には、通常の動物細胞培養用の培地を使用することができる。例えば、Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM)(日水製薬株式会社等)、 α -MEM(大日本製薬株式会社等)、DMEM:Ham's F12混合培地(1:1)(大日本製薬株式会社等)、Ham's F12 medium(大日本製薬株式会社等)、MCDB201培地(機能性ペプチド研究所)等を使用することができる。血清(ウシ胎仔血清、ヒト血清、羊血清など)又は血清代替物(Knockout serum replacement(KSR)など)を添加した培地を使用することにしてもよい。血清又は血清代替物の添加量は例えば5%(v/v)~30%(v/v)の範囲内で設定可能である。

【0031】

以上の操作によって接着性細胞が選択的に生存・増殖する。続いて、増殖した細胞を回収する。回収操作は常法に従えばよく、例えば酵素処理(トリプシンやディスパーゼ処理)後の細胞をセルスクレイパーやピペットなどで剥離することによって容易に回収することができる。また、市販の温度感受性培養皿などを用いてシート培養した場合は、酵素処理をせずにそのままシート状に細胞を回収することも可能である。このようにして回収した細胞(ASC)を用いることにより、ASCを高純度で含有する細胞集団を調製することができる。

【0032】

(4) 低血清培養(低血清培地での選択的培養)及び細胞の回収

本発明の一態様では、上記(3)の操作の代わりに又は上記(3)の操作の後に以下の低血清培養を行う。そして、その結果得られた細胞をASCとして本発明に用いる。

【0033】

低血清培養では、SVF画分((3)の後にこの工程を実施する場合には(3)で回収した細胞を用いる)を低血清条件下で培養し、目的の多能性幹細胞(即ちASC)を選択的に増殖させる。低血清培養法では用いる血清が少量で済むことから、本発明の方法で得られた活性化精子を治療目的に使用する場合、対象(患者)自身の血清を使用することが可能となる。即ち、自己血清を用いた培養が可能となる。ここでの「低血清条件下」とは5%以下の血清を培地中に含む条件である。好ましくは2%(V/V)以下の血清を含む培養液中で細胞培養する。更に好ましくは、2%(V/V)以下の血清と1~100ng/mlの線維芽細胞増殖因子-2(bFGF)を含有する培養液中で細胞培養する。

【0034】

血清はウシ胎仔血清に限られるものではなく、ヒト血清や羊血清等を用いることができる。本発明の方法で得られた活性化精子をヒトの治療に使用する場合には、好ましくはヒト血清、更に好ましくは治療対象の血清(即ち自己血清)を用いる。

【0035】

培地は、使用の際に含有する血清量が低いことを条件として、通常の動物細胞培養用の培地を使用することができる。例えば、Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM)(日水製薬株式会社等)、 α -MEM(大日本製薬株式会社等)、DMEM:Ham's F12混合培地(1:1)(大日本製薬株式会社等)、Ham's F12 medium(大日本製薬株式会社等)、MCDB201培地(機能性ペプチド研究所)等を使用することができる。

【0036】

以上の方法で培養することによって、多能性幹細胞（ASC）を選択的に増殖させることができる。また、上記の培養条件で増殖する多能性幹細胞（ASC）は高い増殖活性を持つので、継代培養によって、本発明に必要とされる数の細胞を容易に調製することができる。尚、国際公開第2006/006692A1号パンフレットには、SVF画分を低血清培養することによって選択的に増殖する細胞の特徴が示されている。

【0037】

続いて、上記の低血清培養によって選択的に増殖した細胞を回収する。回収操作は上記（3）の場合と同様に行えばよい。回収した細胞（ASC）を用いることにより、ASCを高純度で含有する細胞集団を得ることができる。

10

【0038】

以上の方法では、SVF画分を低血清培養して増殖した細胞が利用に供されることになるが、脂肪組織から得た細胞集団を直接（SVF画分を得るための遠心処理を介することなく）低血清培養することによって増殖した細胞をASCとして用いることにしてもよい。即ち本発明の一態様では、脂肪組織から得た細胞集団を低血清培養したときに増殖した細胞をASCとして用いる。また、選択的培養（上記（3）及び（4））によって得られる多能性幹細胞ではなく、SVF画分（脂肪組織由来間葉系幹細胞を含有する）をそのまま用いることにしてもよい。尚、ここでの「そのまま用いて」とは、選択的培養を経ることなく本発明に用いること、を意味する。

【0039】

20

< 適用疾患・投与方法 >

本発明の治療剤はEDの治療・予防に用いられる。従って、通常、EDの患者に対して本発明の治療剤が投与されることになる。但し、その効果を確認・検証することなどの実験ないし研究目的で本発明の治療剤を使用することもできる。

【0040】

器質性、心因性及び混合型のいずれのEDも治療対象になり得るが、好ましくは器質性（特に神経性、血管性又は糖尿病性）の勃起障害又は混合型の勃起障害の治療に本発明の治療剤が用いられる。

【0041】

既存薬のPDE-5阻害薬はサイクリックGMPの分解を阻害することで陰茎海綿体平滑筋の弛緩を助け、勃起を促す。PDE-5阻害薬は一般に血管性ED、神経性ED、糖尿病性EDといった器質性EDに効果が十分でないことが多い。また、PDE-5阻害薬は全身作用を有しており、ほてり、頭痛、紅潮といった副作用が見られることがある。本発明の治療剤はPDE-5阻害薬が抱えるこれらの問題を解消し得るものであり、その臨床上の意義、利用価値は大きい。

30

【0042】

本発明の治療剤は好ましくは患部への局所注入により投与される。注入部位は、典型的には陰茎海綿体又は尿道海綿体である。但し、外尿道括約筋又は外尿道括約筋部の尿道粘膜下に注入することにしてもよい。また、二以上の注入部位に同時又は時間間隔をおいて投与することにしてもよい。

40

【0043】

本発明の治療剤の投与量（注入量）の例を示すと、例えば0.5ml～10ml、好ましくは1ml～5mlである。1回の注射で全量を投与するのではなく、注入箇所をずらし、複数回に分けて投与するとよい。

【0044】

投与スケジュールは、対象（患者）の性別、年齢、体重、病態などを考慮して作成すればよい。単回投与の他、連続的又は定期的に複数回投与することにしてもよい。複数回投与する際の投与間隔は特に限定されず、例えば1日～1月である。また、投与回数も特に限定されない。投与回数の例は2回～10回である。

【0045】

50

本発明の治療剤の適用にあたって、既存の薬剤（例えば、PDE-5阻害薬、プロスタグランジン製剤）を併用投与することにもよい。即ち、本発明の治療剤に既存の薬剤を併用することにもよい。このような併用によれば、治療効果の増大を望める。尚、PDE-5阻害薬の例はシルデナフィルクエン酸塩錠（商品名：バイアグラ錠）、バルデナフィルクエン酸塩水和物錠（商品名：レビトラ錠）、タダラフィル（商品名：シアリス錠）であり、プロスタグランジン製剤の例はプロスタグランジンE1製剤（商品名：プロスタンディン注射用）である。

【実施例】

【0046】

1. 幹細胞濾液の調製

10

(1) ASC濾液の調製

皮下脂肪から常法でヒトASCを調製し、濃度調整後(1×10^6 個/ml PBS)、-30 で1晩以上保存した（直ぐに使用しない場合は-80 で保存する）。細胞液を38 の湯煎又は室温で融解した。このようにして細胞を破碎後、遠心分離（1200rpm、5分）し、上清を回収した。次に、上清をセルロースアセテート膜のフィルター（ポアサイズ0.2 μ m）で濾過し、ASC濾液とした。

【0047】

(2) BM-MSC濾液（凍結融解破碎）の調製

常法で調製し、凍結保存しておいたヒト骨髄由来幹細胞（BM-MSC）を38 の湯煎又は室温で融解した後、遠心処理（1200rpm、5分）した。上清をセルロースアセテート膜のフィルター（ポアサイズ0.2 μ m）で濾過し、BM-MSC濾液（凍結融解破碎）とした。

20

【0048】

(3) BM-MSC濾液（超音波破碎）の調製

常法で調製し、凍結保存しておいたヒト骨髄由来幹細胞（BM-MSC）を超音波処理（250W出力、10秒間の破碎と20秒間の休止を30分間繰り返す）（コスモバイオ社のBIORUPTOR(UC D-250)を使用）した後、遠心処理（1200rpm、5分）した。上清をセルロースアセテート膜のフィルター（ポアサイズ0.2 μ m）で濾過し、BM-MSC濾液（超音波破碎）とした。

【0049】

2. 血管性EDモデルでの幹細胞濾液の効果

8週齢、雄性、Wistar-STラット（SLCから購入）に対して、イソフルラン麻酔下（導入3%、維持1.5%~2%）で下腹部を切開、内腸骨動脈を同定し糸で二重結紮し、陰茎海綿体への血液流入を遮断した血管性EDモデルを作成した。対照群には開腹縫合のみのsham手術を行ったラットを用いた。結紮手術の直後に、ASC濾液（100 μ l）もしくはvehicle（PBS 100 μ l）を血管性EDモデルの陰茎海綿体へ注射した。術後（濾液投与後）4週間後に勃起機能を評価した。勃起機能の評価は陰茎海綿体内圧測定法を用いた。イソフルラン麻酔下（導入3%、維持1.5%~2%）で、左頸動脈から全身血圧を、陰茎脚部から陰茎海綿体内圧をモニターした。海綿体神経を同定し、双極電極で電気刺激（5V, pulse width 5 msec, 1, 2, 4, 8, 16 Hz）を行い、変動を記録した。陰茎海綿体内圧を平均血圧で除した値（ICP/MAP）を勃起機能として用いた。血管性ED+PBS群（Ligation+PBS群）では対照群Sham群に比べてICP/MAPが低下し勃起機能の低下が見られた（図1）。一方、血管性ED+脂肪幹細胞濾液群（Ligation+Adipose群）では、Ligation+PBS群に比べてICP/MAPの値が高く、勃起機能の改善が見られた（図1）。

30

40

【0050】

3. 糖尿病性EDモデルでの幹細胞濾液の効果

8週齢、雄性、Wistar-STラット（SLCから購入）に対して、イソフルラン麻酔下（導入3%、維持1.5%~2%）でストレプトゾトシン（STZ）40 mg/kgをラットに腹腔内投与することで糖尿病性EDモデルを作成した。STZ投与後1週目に血糖値を測定し250mg/dL以上の個体のみ使用した。糖尿病を発症した個体に対して、ASC濾液（100 μ l）もしくはvehicle（PBS 100 μ l）を陰茎海綿体へ注射した。海綿体注射（濾液投与後）4週間後に勃起機能を評価した。STZ+PBS群では対照群（CP）群に比べてICP/MAPが低下し勃起機能の低下が見ら

50

れた(図2)。一方、STZ+ASC濾液群(STZ+Adipose群)では、STZ+PBS群に比べてICP/MAPの値が高く、勃起機能の改善が見られた(図2)。

【0051】

4. 神経性EDモデルでの幹細胞濾液の効果

8週齢、雄性、Wistar-STラット(SLCから購入)に対して、イソフルラン麻酔下(導入3%、維持1.5%~2%)で海綿体神経を露出し、逆作動性ピンセットで両側共クランプし両側海綿体神経損傷モデル(BCNIモデル)を作成した。対照群にはsham手術を行ったラットを用いた。手術直後にBM-MSC濾液(凍結融解破砕)(100 μ l)もしくはvehicle(PBS 100 μ l)を陰茎海綿体へ注射した。投与後4週目に勃起機能を評価した。BCNI+PBS群ではsham群に比べ有意にICP/MAPが低下し、勃起機能の低下が見られた。一方、BCNI+BM-MSC濾液群(BCNI+Bone群)ではBCNI+PBS群に比べてICP/MAPが有意に改善し勃起機能の改善が見られた(図3)。

10

【0052】

5. 非凍結破砕(超音波破砕)で調製した幹細胞濾液の効果(神経性EDモデル)

8週齢、雄性、Wistar-STラット(SLCから購入)に対して、イソフルラン麻酔下(導入3%、維持1.5%~2%)で海綿体神経を露出し、逆作動性ピンセットで両側共クランプし両側海綿体神経損傷モデル(BCNIモデル)を作成した。対照群にはsham手術を行ったラットを用いた。手術直後にBM-MSC濾液もしくはvehicle(PBS)を陰茎海綿体へ注射した。濾液は、上記の通り、幹細胞回収後に凍結融解破砕もしくは超音波破砕し、フィルターをかけることで作成した。投与後2週目に勃起機能を評価した。BCNI+PBS群ではsham群に比べICP/MAPが低下し、勃起機能の低下が見られた。一方、BCNI+BM-MSC濾液(凍結融解破砕)群(BCNI+BoneFoezn群)、BCNI+BM-MSC濾液(超音波破砕)群(BCNI+BoneSonication群)ではBCNI+PBS群に比べてICP/MAPが改善し勃起機能の改善が見られた(図4)。また、2Hz、4Hzの低刺激頻度時においては超音波破砕(BCNI+BoneSonication群)の方が、凍結融解破砕(BCNI+BoneFoezn群)よりも改善の程度が高かった(図4)。

20

【0053】

6. まとめ

以上の通り、幹細胞濾液はEDの予防または治療薬として極めて有用であることが実証された。幹細胞自体ではなく、非細胞製剤である幹細胞濾液を用いることは、既報の幹細胞治療に比べ格段に高い安全性の治療を可能にする。特に、幹細胞濾液を海綿体注射で投与することにすれば、全身性の副作用のおそれは大幅に軽減される。

30

【産業上の利用可能性】

【0054】

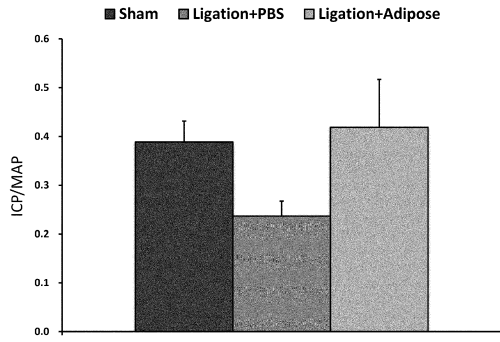
本発明の治療剤は勃起不全の治療・予防のために使用される。本発明の治療薬は特定の幹細胞の濾液(細胞破砕液をフィルター処理して得られたもの)を有効成分とし、現在主流の治療薬(PDE-5阻害薬)とは異なる作用機序によって薬効を示す。従って、従来の治療法では効果が見られなかった患者に対しても治療効果を発揮することを期待できる。

【0055】

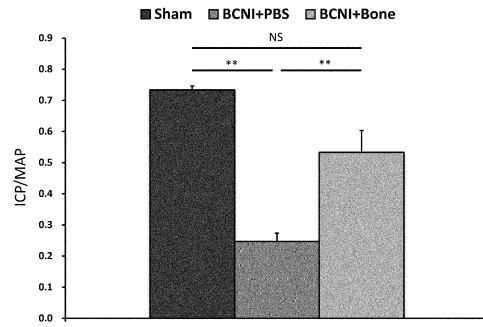
この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

40

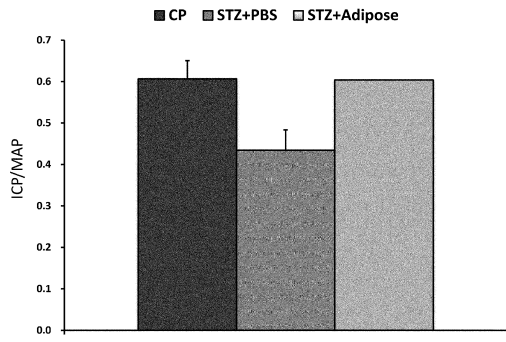
【 1 】



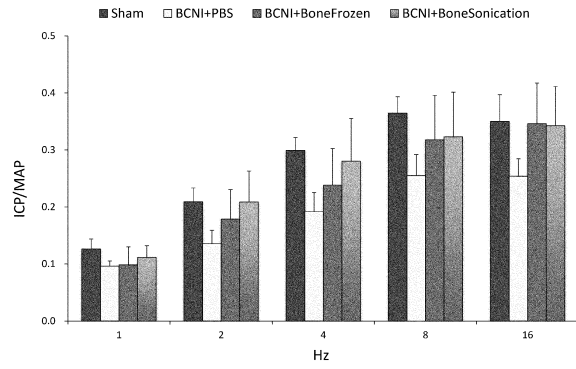
【 3 】



【 2 】



【 4 】



フロントページの続き

(72)発明者 木村 和哲

愛知県名古屋市昭和区御器所3 - 28 - 14 ハイロースコート203

審査官 横田 倫子

(56)参考文献 European Journal of Cell Biology, 2018 Feb 7, Vol.97 No.3 Page.180-189

Andrologia, 2017 Oct, Vol.50 No.2 Article.12871 (p.1-9)

Andrology, 2014, Vol.2, p.244-251

UROLOGY, 2013, Vol.81 No.1, p.104-110

Am J Physiol Heart Circ Physiol., 2007, Vol.292, p.H1278-H1290

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/00

A61P 15/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)