

200917013A

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

LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞を用いた  
家族性 LCAT 欠損症患者に対する新規  
治療法の開発

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武城 英明

平成 22 (2010) 年 3 月

## 目次

### I. 総括研究報告

LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞を用いた家族性 LCAT 欠損症患者に対する新規治療法の開発	-----1
千葉大学大学院医学研究院	武城 英明

### II. 分担研究報告

1. 前脂肪細胞の増殖制御機構－Tenomodulin の役割－に関する報告	
東邦大学医療センター佐倉病院	白井 厚治
	-----19
2. 脂肪由来多機能前駆細胞による脂肪細胞生着の修飾に関する研究	
千葉大学大学院医学研究院	佐藤 兼重
	-----24
3. 科学的倫理的配慮に基づく遺伝子治療臨床研究の円滑な実施に関する研究	
千葉大学医学部附属病院臨床試験部	花岡 英紀
	-----28
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----33
IV. 研究成果の刊行物・別冊	-----37

# I . 総括研究報告

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）  
総括研究報告書

LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞を用いた家族性 LCAT 欠損症患者に対する  
新規治療法の開発

主任研究者 武城 英明（千葉大学大学院医学研究院 教授）

研究要旨 本研究は根本的治療法のない難治性血清蛋白欠損症に対し、持続的蛋白補充に基づく新規治療法を実用化・提案することを目的とする。本研究では、その実用化の対象疾患として家族性LCAT欠損症を選択した。今年度は、ヒトならびにマウス脂肪組織より調製した前脂肪細胞を用い、1) 遺伝子治療に使用する治療遺伝子の運び屋としての特性、2) 前脂肪細胞から分泌されたLCAT蛋白の薬効、について検討し、前脂肪細胞が遺伝子治療技術開発において優れた特性を有していること、またLCAT遺伝子導入前脂肪細胞が本移植治療で患者の病態を改善できることを明らかにした。本技術を実用化するにあたり、残される検討課題である移植細胞の生着性向上に関しては、臨床でも使用されているフィブリンゲルが足場として使用可能であることを明らかにした。また多血小板血漿の生着促進因子としての可能性を見出した。今後は、これらの因子の至適化検討を実施する予定である。本年度はこれらの検討と共に、遺伝子治療臨床研究の申請業務を行い、千葉大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会での承認を得た。その後、厚生労働省大臣官房厚生科学課への申請・照会事項に対する対応を行った。来年度は厚生科学審議会での審議を受ける予定である。

武城 英明（千葉大学大学院医学研究院教授）、白井厚治（東邦大学医療センター佐倉病院内科学講座教授）、佐藤兼重（千葉大学大学院医学研究院教授）、花岡英紀（千葉大学医学部附属病院臨床試験部長）、横手幸太郎（千葉大学大学院医学研究院教授）、黒田正幸（千葉大学大学院医学研究院特任准教授）

ライソゾーム病等の難治性遺伝病は根本的治療法が存在しないあるいは既存療法に様々な問題点を有することから欠損蛋白質の持続的補充を可能とする新規治療法の開発が求められている。主任研究者らは、この現状を打開すべく、本研究で難治性遺伝病に対する持続的蛋白補充に基づく新規治療法確立（図1）を目指す。

主任研究者らは単離・培養及び遺伝子導入の容易さに加えて、特異的に脂

A. 研究目的

肪細胞に分化しがん化などの形質転換の報告がない前脂肪細胞と、分裂細胞への遺伝子導入効率がよく、長期にわたる蛋白質発現が可能なレトロウイルスベクターとの組み合わせに着目し、本治療法のコンセプトを糖尿病モデルマウスとヒトインスリン遺伝子導入マウス前脂肪細胞を用いて証明した。

本研究成果は、根本的治療法のない蛋白質欠損を主因とする難治性遺伝病である家族性 LCAT 欠損症患者の予後の改善と QOL の向上に貢献できる。本治療法の基本コンセプトである持続的蛋白質補充療法をファブリー病、ニーマンピック病、原発性脂質異常症、糖尿病、原発性ホルモン産生障害、血友病、小人症などの難治性遺伝病、さらにはアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経難病、I 型糖尿病、慢性リウマチなど既存療法において様々な課題を有する難病に適用することで、患者の予後の改善だけでなく、自己注射・頻回来院などの患者負担からの解放あるいは軽減による治療の質や QOL の向上が期待される。

そこで、本研究ではこのコンセプトを根本的治療法のない家族性 LCAT 欠損症を対象として、世界で初めてヒトに応用し実用化することを目的とする。家族性 LCAT 欠損症に対する食事療法及び輸血による LCAT 補充療法はいずれも効果が不十分であり、また遺伝子組換え型 LCAT 製剤の研究開発は行われていない。アデノウイルス

ベクターを用いた動物での遺伝子治療法の検討が報告されているが実用化までの課題は多い。

一方、自家移植した前脂肪細胞についても、その生存が認められるとはいえ、移植後のその減少は避けられず、治療目的に応じた移植条件の最適化検討が求められる。外来遺伝子を導入した移植細胞での治療目的蛋白質の持続的発現は動物及びヒトで一部見られているが、その安定した薬効発現のためには、*in vitro* 及び *in vivo* での多面的検討が必要である。

申請者らは、既に、LCAT 搭載レトロウイルスベクター及び移植細胞の GMP 製造法と品質試験法を確立し、*in vitro* 及び動物でのそれらの安全性を確認したが、本治療法の実用化に必須な移植細胞の生着率の向上と薬効評価系確立の検討が依然として残っている。

従って本研究では、① 移植細胞からの LCAT 産生並びにその機能発現を検討するための薬効評価系及び生着率評価系の確立、② 移植後の持続的な LCAT 産生を確保するための、移植細胞の生着率向上を目的とする製剤化検討、を行った後、③ 本治療法の安全性並びに有効性評価及び生着性を検証する臨床研究を少数例の家族性 LCAT 欠損症患者を対象に十分な安全性配慮と法令等遵守のもと実施する。

## B. 研究方法

平成 21 年度は、上記①、②、③の

目的を遂行するため、以下のように研究を進めた。

①「移植細胞からの LCAT 産生並びにその機能発現を検討するための薬効評価系及び生着率評価系の確立」について

#### 1) 薬効評価系の確立

ボランティア脂肪組織より、ヒト前脂肪細胞を調製、薬効評価系構築の基礎検討を行った。治療用遺伝子の運び屋としての特性を遺伝子導入コピー数と発現蛋白の陽性率、発現量との相関を LCAT 遺伝子、マーカー遺伝子（本研究では ZsGreen 遺伝子）を搭載したレトロウイルスベクターを用いて精査した。その過程で薬効評価系を確立した。さらに、LCAT 欠損症患者より血清を取得し、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の培養上清を添加、脂質蛋白の変化を二次元電気泳動法とその後のウェスタンブロットを組み合わせて検討し、患者血清中での薬効評価を行った。

#### 2) 生着率評価系の確立

マウス脂肪組織より、LCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を調製、マウスへの移植実験を行い、経時的に血清および移植細胞を回収した。これらの検体を用い、生着率評価系の確立を行った。

②「移植後の持続的な LCAT 産生を確保するための、移植細胞の生着率向上を目的とする製剤化検討」について

マウス脂肪組織より調製した LCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞

を用い、移植の前処置に関する検討、移植用の細胞懸濁液組成に関する検討を実施した。移植細胞懸濁液に混合する足場素材として臨床での使用が可能なフィブリンゲルに着目し、マウス移植モデルにて LCAT 蛋白の血中への分泌を評価した。

③「本治療法の安全性並びに有効性評価及び生着性を検証する臨床研究」について

本研究期間内に、遺伝子治療臨床研究を開始することを目指し、各書類作成、申請作業を実施した。また、LCAT 欠損症について現状を把握するため LCAT 遺伝子変異について現在までの文献報告をまとめた（表 2～5）。

（倫理面への配慮）

移植細胞の薬効薬理および生着性に関する研究は、千葉大学大学院医学研究院の規定に従い、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則並びに国で定められている、ヒト生体由来細胞を用いた実験、組換え DNA 実験、動物取り扱いに関する指針に従い、千葉大学で開催される各委員会で実験許可を受けて実施した。

来年度以降の遺伝子治療臨床研究実施にあたっては、「臨床研究に関する倫理指針」、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」及び「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく第一種使用規程を遵守し、また

「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」および「その一部を改正する省令ならびにそれらの関連通知」に準拠して実施する。移植細胞の調製業務は、「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」、「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の製造管理・品質管理の考え方について」、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」に基づく「治験薬の製造管理及び品質管理基準および治験薬の製造施設の構造設備基準（治験薬 GMP）について」を満たす製造設備及び手順に遵守し製造する。

#### C&D（研究結果と考察）

今年度の研究の1つの目的は、薬効評価系と生着率評価系の確立であった。その遂行により、細胞の特性に関して以下のような成果を得た。

##### 1) ヒト前脂肪細胞の治療用遺伝子の運び屋としての特性解析

本研究ではレトロウイルスベクターによる治療用遺伝子導入の標的細胞として、成熟した脂肪細胞を標的細胞にしており、その目的のため、脂肪細胞が油滴をもち、培地に浮くという性質を利用した天井培養法を用いて細胞を調製した。脂肪組織には多様な細胞種が含まれているが、この分離・調製法の特長上、その調製の途中で脂肪組織に存在する幹細胞（ASC）を含むとされる Stromal Vascular Fraction（SVF）は除去される。本研究ではこのようにして調製した増殖

型の脂肪細胞を前脂肪細胞と呼んでいる。

天井培養法を用いた脂肪細胞の調製についてはすでにいくつかの報告があるが、これらの報告では天井培養、そしてその後、細胞を回収し研究に使用するまでの期間を2週間としている。

細胞の製造期間が長くなると、コストがかかる上に、細胞の形質が変化する可能性も出てくるのではないかと考え、患者に可能な限り短期間で移植することを目的として天井培養期間を7日とし、直後の細胞に遺伝子導入することを検討するに至った。

そこで我々は、以下の3種類の細胞集団について遺伝子導入特性を検討した。

1、7日間の天井培養を実施し、回収播種後翌日の細胞：CF7(8)

2、14日間の天井培養天井培養を実施し、回収播種後翌日の細胞：CF14(15)

3、7日間の天井培養を実施し、回収後1週間継代培養した細胞：CF7(15)

ヒトボランティア脂肪組織由来前脂肪細胞2ロットについてそれぞれ、1と2、1と3の比較検討を実施した。

その結果、細胞集団中に導入された遺伝子導入コピー数には差がないが、1の細胞集団が陽性率において2、3の細胞集団よりも高いことが明らかになった。すなわち、1の細胞集団では遺伝子導入された細胞の比率が高く、かつ2、3の細胞集団に比べて遺

伝子が導入された細胞における導入コピー数が低いことが明らかになった。

この結果から、CF7(8)が遺伝子治療における遺伝子導入標的細胞として最も優れており、かつ、培養初期に遺伝子導入できることから、遺伝子導入用のウイルスベクターの使用量が低減され、かつ移植までの培養期間を短縮できることが示唆された。(特許出願済、「遺伝子治療用脂肪細胞の調製のための外来遺伝子の導入に適した細胞集団かどうかを判定する方法」、特願 2010-011248 号)

また、これらの遺伝子導入によって得られた LCAT 遺伝子導入細胞の培養上清を使用し、LCAT 蛋白の分泌量と遊離型コレステロールのエステル化活性を検討したところ、導入遺伝子コピー数に良く相関していることが分かった。さらに移植予定日を経過しても遺伝子導入コピー数に変化はなく、また Southern Blot によるクローナリティ解析でも異常は観察されなかった。

このことから少なくとも検討した範囲では導入コピー数に依存して治療用蛋白の発現が実現できる治療用遺伝子の運び屋としての優れた特性が明らかになった。(投稿中、参考文献として添付)

## 2) LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が分泌した LCAT 蛋白の薬効解析

ヒト前脂肪細胞が分泌した LCAT 蛋白が患者の病態を改善できるのか

どうかを評価するため、LCAT 欠損症患者より得た血清を用いた薬効解析を実施した。LCAT 欠損症患者では血中 HDL の成熟不全が観察され、それは HDL 粒子のサイズを電気泳動で分画することにより確認が可能である。そこで、この系を前脂肪細胞が分泌した LCAT 蛋白の薬効解析に応用した。

LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞の培養上清を濃縮し、ウェスタンブロットによる定量後、患者血清に添加、その後の HDL サイズの分布を解析した。HDL 粒子中に存在する ApoA1 に着目し、HDL サイズを評価した。健常人血清の血中濃度と同等の LCAT 蛋白を加えると、二次元電気泳動上 ApoA1 のシグナルが高分子域に移動することが確認できた(図 2、3)。このことは前脂肪細胞から分泌された LCAT 蛋白が患者の病態を改善することを強く示唆している。

次に、移植用の製剤化に関しては、今年度は、移植細胞の事前処理、並びに移植用細胞懸濁液に加える細胞生着のための促進因子について検討し以下の結果を得た。その過程でマウスでの移植実験を実施し、マウス血清中の LCAT 蛋白の高感度検出法(免疫沈降-ウェスタンブロット法)、移植細胞の残存率測定法(Real-time PCR 法)を確立した。

1) 前処置による適応能力強化の検討  
これまでの報告から、他の細胞種では移植前の Hypoxia 処理ないしは低



栄養処理が、移植後の生着性を向上させるといことが知られている。そこでこれらの処理が細胞にどのような影響を与えるかを検討した。Hypoxia 処理では、血管新生を促進するとされている VEGF mRNA の上昇が認められたが、その一方で LCAT mRNA の低下が観察された。従って Hypoxia 処理にはあまり効果がないのではないかと考えられた。低栄養処理をした場合、獲得できる生細胞が翌日から減少し始め、細胞の viability の低下が認められた。従って事前の低栄養処理は不適と判断した。

この治療法の概念が確立された Ito らの実験においては、脂肪細胞への分化誘導刺激を施した前脂肪細胞をマウスに移植している。そこで分化誘導刺激を加えた細胞とそうでない細胞について移植実験を行い、LCAT 蛋白の血中への分泌を検討した。その結果、少なくとも 1 カ月の観察期間では、双方に有意な分泌量の差は認められなかった。分化誘導刺激を加えることによる有意性が認められなかったこと、また、分化誘導試薬の 1 つである IBMX に関しては承認済みの医薬品がないことから、細胞に対して分化誘導刺激は行わないこととした。

## 2) フィブリンゲルに含まれるフィブリノゲンの濃度に関する検討

昨年度の検討結果、フィブリンゲルで細胞を投与した場合、マトリゲルで投与した場合とほぼ同等の LCAT 蛋白分泌能があることをマウス移植実

験で明らかにし、本成果を以って千葉大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会への申請書に記載した。そこでフィブリンゲルを足場として使用するにあたって、フィブリンゲルに含まれるフィブリノゲンの濃度の至適化検討を実施した。組織接着剤として承認されているフィブリンゲル(本研究ではボルヒールを使用した)中のフィブリノゲンの最終濃度は 80mg/mL であるが、実際には皮下脂肪内への移植を実施するため、その操作性が重要であると考え、更に低濃度のフィブリノゲンについて検討した。具体的には 40、16、4 mg/mL とした。フィブリンゲルで固めた細胞を *in vitro* で培地交換をしながら継続培養し、LCAT の分泌の持続性を検討した。

その結果、どの条件でも少なくとも 56 日間の継続分泌が認められたが、フィブリノゲンの濃度が 4 mg/mL の場合、他の 2 条件に比べて分泌量が低い傾向にあった。この結果を受けて現在は LCAT 遺伝子導入ヒト細胞を免疫不全マウスに移植し、血中への分泌に関する検討を実施している。また、フィブリンゲル内に生存している細胞について組織学的な検討を行ったところ、分化誘導試薬を添加しなくても脂肪細胞に成熟していることを示唆する成績を得た。

## 3) 免疫不全マウスでの生着性及び安全性

2) の検討結果を受け、Nude マウスに LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細

胞を移植し生体での血中への分泌と生着率について経過観察中である。

#### 4) 生着促進因子の探索

血小板は、PDGFをはじめとするサイトカインを放出、細胞増殖、組織修復、血管新生を促進する作用を持つことが知られており、それを濃縮した多血小板血漿（PRP）は、現在創傷治癒や再生医療分野で注目されている生体材料である。そこで前脂肪細胞の移植時に自己の PRP を添加することで生着性向上が期待できるかどうかを検討することとした。

マウス血液より PRP を調製し、マウス前脂肪細胞の増殖に与える影響を検討した。マウス前脂肪細胞を 1%FBS 存在下で培養しその増殖率を測定した。それに PRP を加えたものは増殖率が有意に増加した。また、PRP は凍結しても新鮮なものを使用しても増殖促進効果に違いは認められなかった。以上のことから、PRP が生着率を向上させる可能性が示唆された。今後はマウスでの移植実験によりその効果を検証する必要がある。

自己 PRP を使用することで、血液製剤による感染のリスクが低くなると考えられることからフィブリンゲルに代わる生着促進の可能性も同時に検討する予定である。

#### E. 結論

本年度の検討から、本研究で実用化を実現する LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞は LCAT 欠損症患者の病態を改

善し得る機能を持つ LCAT 蛋白を遺伝子導入コピー数に依存して分泌することが明らかとなった。

また、本年度の最も重要な成果として、前脂肪細胞が分泌した LCAT 蛋白が患者血清中で HDL の成熟に機能することが明らかになったことが挙げられる。例数はこなしていないが、移植用細胞を GMP 調製しながら、この機能を確認し、患者に提示することが可能となれば、移植治療直前の患者にとって、大きな心の支えとなるのではないかと考える。

本年度の製剤化検討の結果、現時点では移植細胞数を  $5 \times 10^8$  個とした。これまでのボランティア由来脂肪組織での検討実績から、この細胞数はおおよそ 1g の脂肪組織採取により到達できる細胞数である（図 4）。このことは前脂肪細胞が本研究で実用化する蛋白補充療法の治療用遺伝子の導入標的細胞として非常に優れていることを意味している。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kuroda M, Aoyagi Y, Asada S, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Machida K, Matsumoto F, Satoh K, Aso M, Saito Y. (2010) Ceiling culture-derived proliferative adipocytes are a possible delivery vehicle for enzyme replacement therapy of lecithin:cholesterol

- acyltransferase deficiency (submitted).
2. Asada S, Kuroda M, Aoyagi Y, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Aso M, Saito Y. (2010) Disturbed electrophoresed pattern of apolipoprotein A-I containing lipoproteins in Fish eye disease is improved by lecithin:cholesterol acyltransferase produced by the gene-transduced adipocytes (submitted).
  3. Aoyagi Y, Asada S, Kuroda M, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Aso M, Saito Y. (2010) Fibrin glue increases the cell survival and the transduced gene product secretion of the ceiling culture-derived adipocytes transplanted in mice. (submitted)
  4. Matsuo M, Ebinuma H, Fukamachi I, Jiang M, Bujo H, Saito Y. (2009) Development of an immunoassay for the quantification of soluble LR11, a circulating marker of atherosclerosis. *Clin Chem.* 55, 1801-1808.
  5. Tashiro J, Miyazaki O, Nakamura Y, Miyazaki A, Fukamachi I, Bujo H, Saito Y. (2009) Plasma pre $\beta$ 1-HDL level is elevated in unstable angina pectoris. *Atherosclerosis.* 204, 595-600.
2. 学会発表
1. Aoyagi Y, Kuroda M, Asada S, Tanaka S, Konno S, Ishii I, Bujo H, Saito Y, Aso M. Successful lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) supplementation in mice by transplantation of human *lcat*-gene transduced mouse preadipocytes., International federation for adipose therapeutics and science, 7th annual meeting (10/15-17, 2009)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得  
「遺伝子治療用脂肪細胞の調製のための外来遺伝子の導入に適した細胞集団かどうかを判定する方法」  
出願番号：特願 2010-011248 号  
出願日：平成 22 年 1 月 21 日
  2. 実用新案登録  
特になし
  3. その他  
特になし

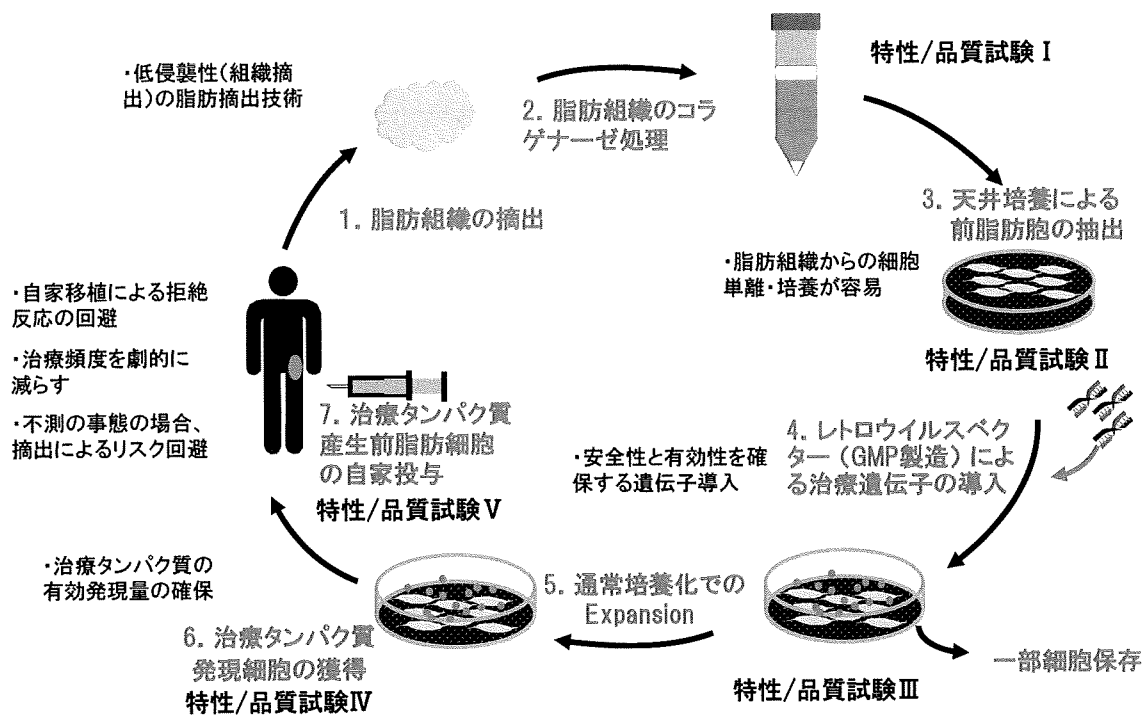


図 1. 治療目的遺伝子導入ヒト前脂肪細胞による治療の概要

表 1. 遺伝子導入脂肪細胞移植治療の応用と展望

疾患名	候補遺伝子	背景
家族性LCAT欠損症 1st Project	LCAT (レシチン: コレステロールアシルトランスフェラーゼ)	国内100名 日米欧承認医薬品は無い
ゴーシェ病	セレザイム (グルコセレブロンダーゼ)	国内患者 100人 日米欧承認 (ジェンザイム)
ファブリー病	ファブラザイム (αガラクトシダーゼ)	国内患者 1000人 日米欧承認 (ジェンザイム)
ニーマンピックB	酸性スフィンゴミエリナーゼ	日米欧承認なし
ムコ多糖 I 型	アルドラザイム (α-L-イズロニダーゼ)	国内患者 20人 日米欧承認 (ジェンザイム)
ポンペ病	マイオザイム (α-グルコシダーゼ)	国内30名 日米欧承認 (ジェンザイム)
ハンター病	エラブレース (イズロン酸サルファターゼ)	日米欧承認 (ジェンザイム)
ムコ多糖VI型	ナグラザイム (N-アセチルガラクトサミン-4-サルファターゼ)	国内患者 6人 日米欧承認 (アンジェスMG)
血友病A	凝固因子 (FVIII)	国内患者 5000人 日米欧承認 (複数社)
糖尿病	インスリン	国内患者 200万人 日米欧承認 (複数社)

表 2、 家族性 LCAT 欠損症で同定されている変異-1

Mutation	Genotype	Location	Ref
c.31 G deletion	Homozygote	exon 1	1
N5I A to T	Homozygote	exon 1	2
P9 C insertion	Homozygote	exon 1	3, 4, 5, 6, 7, 8
c.102 G deletion	Homozygote	exon 1	9
G30S G to A	Homozygote	exon 2	10, 11, 12
Y83Stop C to A	Homozygote	exon 3	13, 14
A93T G to A	Homozygote	exon 3	15, 13, 16, 17
R140H G to A	Homozygote	exon 4	18
R140C C to T	Homozygote	exon 4	19
G141 GGC insertion	Homozygote	exon 4	20
R147W C to T	Homozygote	exon 4	15, 17, 21, 22, 1
R158C C to T	Homozygote	exon 5	15, 13
I178 A insertion	Homozygote	exon 5	23
S208T T to A & L372R T to G	Homozygote	exon 5 & 6	24
L209P T to C	Homozygote	exon 5	15, 13, 17, 25
K218N G to C	Homozygote	exon 5	1
N228K C to A	Homozygote	exon 6	20
G230R G to C	Homozygote	exon 6	26
M234I G to A	Homozygote	exon 6	7
R244G C to G	Homozygote	exon 6	5, 7, 27
P250R C to G	Homozygote	exon 6	28
M252K T to A	Homozygote	exon 6	29, 30, 31, 32, 33
V264 G deletion	Homozygote	exon 6	34
T274I C to T	Homozygote	exon 6	1
M293I G to A	Homozygote	exon 6	5, 20, 35, 36, 37, 38
V309M G to A	Homozygote	exon 6	39
T321M C to T	Homozygote	exon 6	5, 13, 40, 41, 42
G344S G to A	Homozygote	exon 6	34
T347M C to T*	Compound heterozygote	exon 6	15, 43, 44
L372R T to G	Homozygote	exon 6	1
R399C C to T	Homozygote	exon 6	3, 26

\*Originally identified by compound heterozygote, later *in vitro* experiment showed FLD phenotype (44)

表 3、家族性 LCAT 欠損症で同定されている変異-2

Mutation	Genotype	Location	Ref
L7 30bp insertion	Compound heterozygote	exon 1	45
G33R C to A		exon 2	45
Y83Stop C to A	Compound heterozygote	exon 3	14
Y156N T to A		exon 5	14
R135W C to T	Compound heterozygote	exon 4	13, 17, 46, 47
Q376 A insertion		exon 6	13, 17, 46, 47
R147W C to T	Compound heterozygote	exon 4	48
Y171Stop T to G		exon 5	48
H168 C deletion	Compound heterozygote	exon 5	42
T321M C to T		exon 6	42
Y120Stop A to T & C deletion	Compound heterozygote	exon 4	15, 5
G183S G to A		exon 5	5, 49
L32P T to C	Compound heterozygote	exon 2	15, 5
T321M C to T		exon 6	5
P9 C insertion	Compound heterozygote	exon 1	3, 4, 5, 6, 50, 8
R399C C to T		exon 6	3, 26
g.131-157 deletion	Compound heterozygote	exon 1	1
R140C C to T		exon 4	1
c141-145 deletion	Compound heterozygote	exon 1	1
S181N G to A		exon 5	1
L212 G insertion	Compound heterozygote	exon 5	51
c.794-801 deletion		exon 6	51
T321M C to T	Compound heterozygote	exon 6	52
F382V T to G & S208T T to A		exon 5 & 6	52
c.141-145 deletion	Compound heterozygote	exon 1	53
S181N G to A		exon 5	53
G71R G to C	Compound heterozygote	exon 2	54
R140H G to A		exon 4	54

表 4、魚眼病患者で同定されている変異-1

Mutation	Genotype	Location	Ref
P10L C to T	Homozygote	exon 1	15, 55, 56, 57
T13M C to T	Homozygote	exon 1	58
V46E T to A	Homozygote	exon 2	1
R99C C to T	Homozygote	exon 3	59
T123I C to T	Homozygote	exon 4	15, 60, 61, 62
N131D A to G	Homozygote	exon 4	63
L300 (CTC) deletion	Homozygote	exon 6	64, 65

表 5、魚眼病患者で同定されている変異-2

Mutation	Genotype	Location	Ref
T123I C to T	Compound heterozygote	exon 4	44, 66, 67
T347M C to T**		exon 6	15, 43, 44
P10Q C to T	Compound heterozygote	exon 1	68
R135Q G to A		exon 4	68
T123I C to T	Compound heterozygote	exon 4	44, 66, 67
Y144C A to G		exon 4	66
T123I C to T	Compound heterozygote	exon 4	44, 66, 67
IVS4:T-22C intron defect		intron 4	67, 69
Y83Stop C to A	Compound heterozygote	exon 1	1
T274A A to G		exon 6	1
S91P T to C	Compound heterozygote	exon 3	1
A141T G to A		exon 4	1

\*\*T347M homozygote mutation results in FLD phenotype (15, 43).

表 2～4 の参考文献

1. Calabresi L. et al. (2005). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**:1972-1978.
2. Okubo M. et al. (1996). *Int J Clin Lab Res* **26**:250-254.
3. Miettinen H. et al. (1995). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**:460-467.
4. Bujo H. et al. (1991). *Biochem Biophys Res Commun* **181**:933-940.
5. McLean J. (1992). In High Density Lipoproteins and Atherosclerosis III. N. E. Miller and A. Tall, editors. Excerpta Medica, Amsterdam. 59-65.
6. Ohta Y. et al. (1986). *Am J Kidney Dis* **7**:41-46.
7. McIntyre N. (1988). *J Inherit Metab Dis Suppl* **1**:45-56.

8. Murano S. et al. (1987). *Scand J Clin Lab Invest* **47**:775-783.
9. Baass A. et al. (2009). *Atherosclerosis* in press.
10. Yang X.P. et al. (1997). *J Lipid Res* **38**:585-591.
11. Owen J.S. et al, (1996). *Hum Mutat* **8**:79-82.
12. Bron A.J. et al. *Lancet* **1**:928-929.
13. Funke H et al. (1993). *J Clin Invest* **91**:677-683.
14. Klein H.G. et al. (1993). *J Lipid Res* **34**:49-58.
15. Qu S.J. et al. (1995). *J Lipid Res* **36**:967-974.
16. Hill J.S. et al. (1993). *Biochim Biophys Acta* **1181**:321-323.
17. Assmann G. et al. (1991) *Curr Opin Lipidol* **2**:110-117.
18. Steyrer E. et al. (1995). *Hum Genet* **96**:105-109.
19. Maruyama T. et al. (2004). *J Atheroscler Thromb* **11**:131-145.
20. Gotoda T. et al. (1991). *Lancet* **338**:778-781.
21. Vergani C. et al. (1983). *Acta Med Scand* **214**:173-176.
22. Taramelli R. et al. (1990). *Hum Genet* **85**:195-199.
23. Bender B.U. et al. (2007). *Clin Chem Lab Med* **45**:483-486.
24. Gigante M. et al. (2006). *J Nephrol* **19**:375-381.
25. Dorval I. et al. (1994). *Atherosclerosis* **105**:251-252.
26. Miettinen H.E. et al. (1998). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**:591-598.
27. Vrabec M.P. et al. (1988). *Arch Ophthalmol* **106**:225-229.
28. Jimi S. et al. (1999). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**:794-801.
29. Norum K.R. and Gjone E. (1967). *Scand J Clin Lab Invest* **20**:231- 243
30. Skretting G. et al. (1992). *FEBS Lett* **309**:307-310.
31. Gjone E. et al. (1981). *Acta Med Scand* **210**:3-6.
32. Gjone E. et al. *Scand J Clin Lab Invest* **33**:101-105
33. Frohlich J. et al. (1987). *Acta Med Scand* **221**:291-298.
34. Moriyama K. et al. (1995). *J Lipid Res* **36**:2329-2343.
35. Sakuma M. et al. (1982). *Acta Med Scand* **212**:225-232.
36. Maeda E. et al. (1991). *Biochem Biophys Res Commun* **178**:460-466.
37. Albers J.J. et al. (1982). *Hum Genet* **62**:82-85.
38. Albers J.J. et al. (1985). *Biochim Biophys Acta* **835**:253-257.
39. Idzior-Walúś B. et al. (2006). *Atherosclerosis* **185**:413-420.
40. Utermann G. et al. (1972). *Humangenetik* **16**:295-306.
41. Utermann G. et al. (1981). *Clin Genet* **19**:448-455.
42. Miller M. et al. (1995). *J Lipid Res* **36**:931-938.
43. Klein H.G. et al. (1995). *J Biol Chem* **270**:9443-9447.



44. Klein H.G. et al. (1992). *J Clin Invest* **89**:499-506.
45. Wiebusch H. et al. (1995). *Hum Mol Genet* **4**:143-145.
46. Frohlich J. et al. (1978). *Scand J Clin Lab Invest* **38**:156-161.
47. Frohlich J. et al. (1982). *Am J Hum Genet* **34**:65-72.
48. Guerin M. et al. (1997). *Atherosclerosis* **131**:85-95.
49. Bethell W. et al. (1975). *Can J Ophthalmol* **10**:494-501.
50. Miettinen H. et al. (1995). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**:460-467.
51. Park C.W. et al. (2009). *Atherosclerosis* **206**:346-348.
52. Nanjee M.N. et al. (2003). *Atherosclerosis* **170**:105-113.
53. Frascà G.M. (2004). *Nephrol Dial Transplant* **19**:1622-1624.
54. Hörl G. et al. (2006). *Atherosclerosis* **187**:101-109.
55. Skretting G. and Prydz H. (1992). *Biochem Biophys Res Commun* **182**:583-587.
56. Carlson L.A. and Philipson B (1979). *Lancet* **2**:922-924.
57. Carlson LA (1982). *Eur J Clin Invest* **12**:41-53.
58. Miida T. et al. (2004). *Clin Chim Acta* **343**:201-208.
59. Blanco-Vaca F. et al. (1997). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**:1382-1391.
60. Funke H. et al. (1991). *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:4855-4859.
61. Karmin O. et al. (1993). *J Lipid Res* **34**:81-88.
62. Kastelein J.J. et al. (1992). *J Intern Med* **231**:413-419.
63. Kuivenhoven J.A. et al. (1995). *J Clin Invest* **96**:2783-2791.
64. Klein H.G. et al. (1993). *J Clin Invest* **92**:479-485.
65. Clerc M. et al. (1991). *Eur J Clin Invest* **21**:616-624.
66. Contacos C. et al. (1996). *J Lipid Res* **37**:35-44.
67. Kuivenhoven J.A. et al. (1996). *J Clin Invest* **98**:358-364.
68. Kuivenhoven J.A. et al. (1996). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**:294-303.
69. Li M. et al. (1998). *Biochim Biophys Acta* **1391**:256-264.

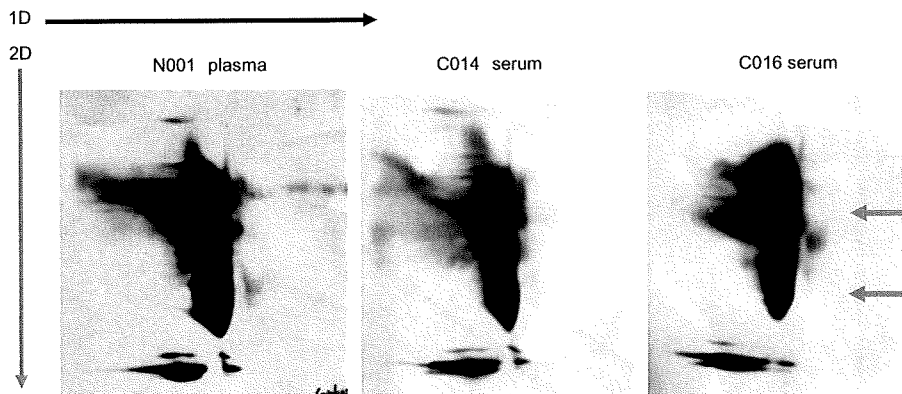


図 2. 健常人血漿または血清の 2 次元電気泳動解析

健常人血漿または血清を二次元電気泳動にて展開し、ApoA1 を指標に HDL の粒子サイズの分布を解析した。健常人検体では過去の論文報告と同様、高分子域(写真の上側)にシグナルが観察された。

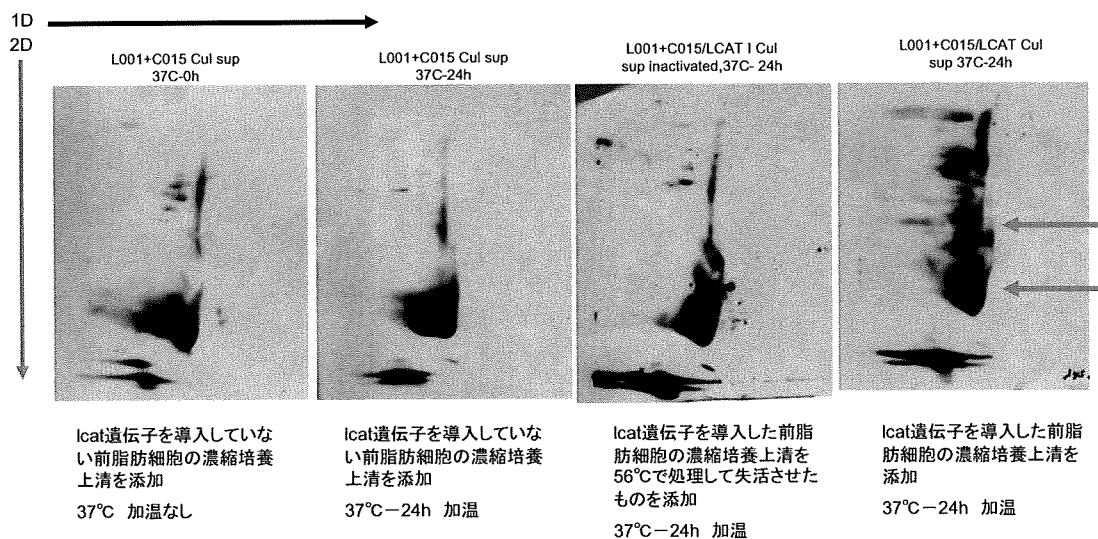


図 3. LCAT 蛋白添加による患者血清リポ蛋白プロファイルの正常化

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の培養上清が健常人及び魚眼病患者血清のリポ蛋白プロファイルに及ぼす影響を図 1 と同様の方法で評価した。過去の論文報告と同様、患者血清では高分子域にシグナルが観察されなかった。この患者血清に LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の培養上清を添加し、インキュベートすることにより、リポ蛋白プロファイルが健常人のそれに近づくことが明らかになった。

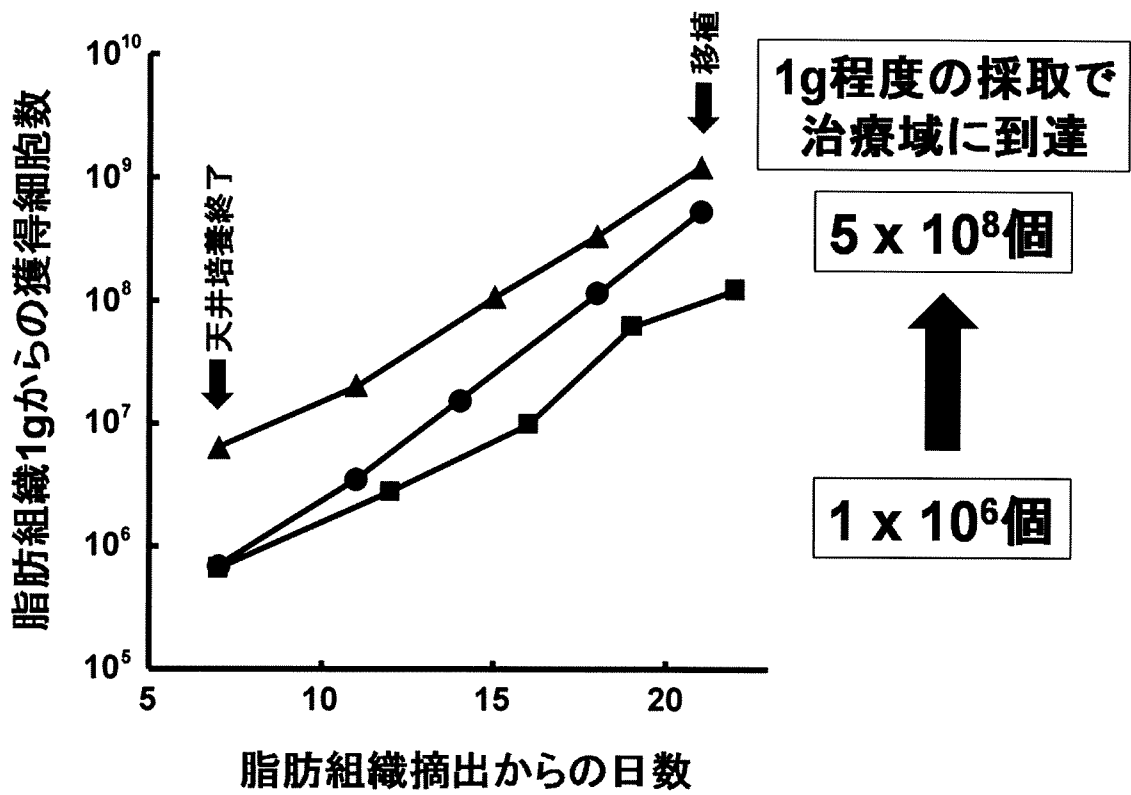


図 4. ヒト前脂肪細胞の増殖

GMP 製造法を確立後の健常人ボランティア 3 ロットについて脂肪組織 1g あたりで示した。

## Ⅱ. 分担研究報告