

厚生労働科学研究補助金（厚生労働科学研究医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞を用いた家族性 LCAT 欠損患者に対する新規治療
前脂肪細胞の増殖制御機構—Tenomodulin の役割—に関する報告

研究分担者 白井厚治 齋木厚人 東邦大学医療センター佐倉病院 内科学講座

研究要旨：

LCAT 欠損症は根本的治療法の確立されていない予後不良の遺伝性疾患である。本研究は患者脂肪組織由来の前脂肪細胞に LCAT 遺伝子を導入しこれを自家移植する遺伝子細胞療法の開発を目的としている。移植細胞の生着率向上のためには、移植直後に血管新生がより促進されることが望ましいが、生着後は血管新生を抑え、脂肪細胞の異常増殖や癌化を避けることも必要であり、きめ細かい血管新生の調節が求められている。我々は新規の血管新生抑制因子 Tenomodulin 遺伝子が、ヒト脂肪細胞にほぼ特異的に発現し、肥満の病態に密接に関連していることを見出した。この Tenomodulin 遺伝子は、脂肪細胞がより分化成熟した際に発現が高くなる傾向があった。また皮下脂肪組織の Tenomodulin 遺伝子は、同部位の LCAT 遺伝子発現とは関連していなかった。Tenomodulin 遺伝子は、脂肪組織内の血管新生や脂肪細胞の増殖を抑制できる可能性が想定されるため、Tenomodulin 遺伝子を前脂肪細胞に導入することで、①それ自身が LCAT 遺伝子発現に影響を与えることなく、②また、移植直後の血管新生を阻害することなく、③遺伝子導入脂肪細胞の過剰増殖やそれに伴う LCAT 過剰発現を抑制できる可能性が期待され、今後の研究課題としていく。

A. 研究目的

家族性レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) 欠損症は、幼少期から角膜混濁、貧血が発症進行し、腎不全や血管疾患へと至る、予後不良かつ病態不明な遺伝性疾患である。根本的治療法がなく、欠損蛋白質の持続的補充を可能とする新規の治療法が求められている。これに対し本研究では、患者脂肪組織由来の初代培養細胞（前脂肪細胞）

に LCAT 遺伝子を導入しこれを自家移植する遺伝子細胞療法を開発を行っている。本研究の課題の一つは、LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞を移植した直後に、血管新生がより促進され、移植細胞の生着率が向上することである。その一方で、生着後に LCAT 遺伝子導入細胞が成熟した後も、脂肪細胞が異常増殖さらには癌化してしまう可能性も否定できない。このために LCAT の過剰発現が問題になる可能

性もある。このリスクに対しては、移植部位を摘出することで対応するが、脂肪細胞の異常増殖を治療の準備段階でコントロールできればより望ましいと思われる。さらに、移植直後の血管新生を阻害することなく、将来の異常増殖を予防できれば理想的である。

脂肪細胞の増殖には局所の血管新生が密接に関わっていることが分かってきている。近年、新規の血管新生抑制遺伝子 *Tenomodulin* が整形外科領域や眼科領域で盛んに研究されているが、一方でこの遺伝子と肥満との関連も一部で報告されている。今回、*LCAT* 遺伝子導入前脂肪細胞の異常増殖抑制を目指した基礎研究として、ヒト *Tenomodulin* 遺伝子と肥満、脂肪細胞の関連性を、マイクロアレイのデータベースを用いて明らかにすることが分担研究の目的である。

B. 研究方法

ヒト健常者 65 組織の *Tenomodulin* 遺伝子の比較検討にはマイクロアレイと *real-time PCR* (単離した脂肪細胞を含む) を用いた。ヒト内臓脂肪組織と皮下脂肪組織の比較検討 (n=10) や、肥満/やせの同胞 (BMI10 以上解離) の皮下脂肪組織の検討 (n=180)、さらに 18 週間 450kcal/日の超低エネルギー食 (VLCD) を施行した肥満症患者の皮下脂肪組織 (n=24) の *Tenomodulin* 遺伝子は、それぞれマイクロアレイのみにより解析した。検体の採取、マイクロアレイ解析、*real-time PCR* は、Sweden の Gothenburg University、Sahlgrenska Academy、Cardiovascular and Metabolic Research

Center で行われた。

(倫理面への配慮)

・ 遺伝子解析実験は、Gothenburg University の規定で定められている実験指針に従い、Gothenburg University で開催される倫理委員会で実験許可を受け実施された。

・ 臨床研究は、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則、「倫理研究に関する倫理指針」に基づく第一種使用規定を遵守し、Gothenburg University で開催される倫理委員会で研究許可を受け実施された。

・ 患者の臨床研究への参加にあたっては、事前に本臨床研究に関する概要 (目的、方法、利益と不利益、倫理的事項、個人情報保護など) について十分説明を行い、本人の臨床研究への参加同意を取得した。

C. 研究結果

Tenomodulin 遺伝子発現は脂肪組織や脂肪細胞で最も高く、他組織と比較して著明に高値 (5 倍以上) であった。*Tenomodulin* 遺伝子は内臓脂肪組織より皮下脂肪組織で高く、その傾向は肥満症例 (n = 90、p = 0.014) だけでなくやせの症例 (n = 90、p = 0.002) でも認められた。単離した皮下脂肪細胞を大小のサイズに分けたところ、*Tenomodulin* 遺伝子はサイズの大きい細胞で発現が 3 倍高かった (有意差なし)。皮下脂肪組織の *Tenomodulin* 遺伝子は、やせの症例と比較し肥満症例で 3 倍高かった (p < 0.0001)。皮下脂肪組織の *Tenomodulin* 遺伝子は BMI、ウェスト、血圧、中性脂肪、インスリン、HOMA-R、C ペプチド

と正相関し、HDL-C と逆相関した。多変量解析では BMI のみが独立した予測因子に挙げられた。皮下脂肪組織の Tenomodulin 遺伝子は、18 週の VLCD の結果 65 % 低下した ($p < 0.0001$)。皮下脂肪組織における Tenomodulin 遺伝子と LCAT 遺伝子の関連を、肥満症例とやせの症例で検討したところ、それぞれ $r = 0.123$ ($p = 0.2329$)、 $r = 0.044$ ($p = 0.6799$) と、両者の関連は見られなかった。

D. 考察

マイクロアレイと real-time PCR による包括的な遺伝子解析の結果、ヒト脂肪組織（細胞）の Tenomodulin 遺伝子は、他組織に比較して発現が非常に高く、肥満、脂肪の部位、体重減少、肥満に関連する代謝異常に強く関連していることが明らかとなった。おそらく Tenomodulin 遺伝子は、脂肪細胞にほぼ特異的に発現し、肥満や肥満がもたらす代謝異常に強く関連している遺伝子であると思われる。一般に肥満では脂肪組織内の血管新生は促進状態にあり、脂肪細胞の増殖を促す方向に働いている。一方で過剰な脂肪組織進展を抑制するために、血管新生を抑制する制御機転があることも想定されている。血管新生抑制因子としてこの Tenomodulin 遺伝子を考えた場合、過剰な肥満に対しこの遺伝子発現が高まり、過剰な脂肪細胞増殖や組織進展を抑制している可能性は十分考えられる。今後、この Tenomodulin 遺伝子に血管新生を抑制する生理活性があるかどうかを明らかにするため、HUVEC を用いた in vitro tube formation assay にヒト（前）脂肪

細胞の上清を添加し検討する予定である。また Tenomodulin 遺伝子がより肥満で、より細胞サイズの大きい状態で発現が高いことが想定されるが、ヒト（前）脂肪細胞の各分化段階で遺伝子発現を確認する必要がある。移植直後の前脂肪細胞の段階で血管新生を阻害せず、将来の異常増殖を予防するような発現パターンであれば理想的である。最終的には Tenomodulin 遺伝子を前脂肪細胞に導入することで、それ自身が LCAT 遺伝子発現に影響を与えることなく、前脂肪細胞の過剰な増殖やそれに伴う LCAT 過剰発現を抑制できる可能性に期待している。

E. 結論

新規の血管新生抑制因子 Tenomodulin 遺伝子は、脂肪細胞に特異的に発現し、肥満の病態に密接に関連しているものと思われた。この Tenomodulin 遺伝子は、脂肪組織内の血管新生や脂肪細胞の増殖を抑制できる可能性が想定された。また皮下脂肪組織の Tenomodulin 遺伝子は、同部位の LCAT 遺伝子発現とは関連していなかった。Tenomodulin 遺伝子を前脂肪細胞に導入することで、それ自身が LCAT 遺伝子発現に影響を与えることなく、前脂肪細胞の過剰な増殖やそれに伴う LCAT 過剰発現を抑制できる可能性があると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) **A Saiki**, F Watanabe, T Murano, Y Miyashita, K Shirai. Hepatocyte growth factor secreted by cultured

adipocytes promotes tube formation of vascular endothelial cells *in vitro*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 30(11): 1676-1684, 2006.

2) **A Saiki**, M Olsson, M Jernås, A Gummesson, PG McTernan, J Andersson, P Jacobson, K Sjöholm, B Olsson, S Yamamura, A Walley, P Froguel, B Carlsson, L Sjöström, PA Svensson, LM Carlsson. Tenomodulin is highly expressed in adipose tissue, increased in obesity, and down-regulated during diet-induced weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*, 94(10): 3987-3994, 2009.

2. 学会発表

1) **齋木厚人**, 渡辺房子, 村野武義, 大平征宏, 遠藤 溪, 大塚正毅, 小崎 寛, 小山朝一, 宮下 洋, 白井厚治: 脂肪細胞が血管内皮細胞の管腔形成に及ぼす影響. 第 36 回日本動脈硬化学会総会, 福岡, 2004, 7

2) **A Saiki**, K Endoh, F Watanabe, T Murano, T Oyama, Y Miyashita, K Shirai. Substrate secreted by adipocytes promotes the formation of capillary-like structure in cultured vascular endothelial cells. Drug Affecting Lipid Metabolism 2004, Venice, Italy, 2004, 10

3) **A Saiki**, F Watanabe, T Murano, Y Miyashita, K Shirai. Hepatocyte growth factor secreted by cultured adipocytes promotes tube formation of vascular endothelial cells *in vitro*.

International Congress on Obesity 2006, Sydney, Australia, 2006, 9

4) **A Saiki**, PA Svensson, A Gummesson, J Goedecke, M Jernås, J Andersson, P Jacobson, K Sjöholm, L Sjöström, L Carlsson. Tenomodulin is highly expressed in human adipocytes, down regulated during diet and increased in obesity. 16th European Congress on Obesity, Geneva, Switzerland, 2008, 5

5) **A Saiki**, PA Svensson, A Gummesson, J Goedecke, M Jernås, J Andersson, P Jacobson, K Sjöholm, B Olsson, L Sjöström, K Shirai, L Carlsson. AGTR1 is associated with adipogenic differentiation and LPL expression in human adipose tissue. 2nd World Congress on Controversies to Consensus in Diabetes, Obesity and Hypertension, Barcelona, Spain, 2008, 10

6) **A Saiki**, PA Svensson, M Olsson, A Gummesson, J Goedecke, M Jernås, J Andersson, P Jacobson, K Sjöholm, L Sjöström, B Olsson, L Carlsson. TNMD is highly expressed in human adipocytes, down regulated during diet and increased in obesity. 2nd World Congress on Controversies to Consensus in Diabetes, Obesity and Hypertension, Barcelona, Spain, 2008, 10

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特記すべきことなし

2. 実用新案登録

特記すべきことなし

3. その他

特記すべきことなし

厚生労働省科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 佐藤 兼重 深谷 佳孝（千葉大学形成美容外科）

研究要旨 形成外科領域において、脂肪組織の移植は普及している手技であるが、その生着率向上に関しては、今なお重要な検討課題の一つである。これまで我々の教室では、その生着率に寄与する因子の同定を行い、VEGF、bFGFなどが移植率向上に寄与することが明らかになってきた。これらの結果を基に、我々は新たな試みとして、これら液性因子を生理的に分泌し、臨床的にも移植生着性を向上させるとされる脂肪由来幹細胞（ASC）に着目し、遺伝子導入前脂肪細胞の生着性向上に関する検討を開始した。今年度の研究の結果、ASCと前脂肪細胞には、表面抗原と分泌タンパクに相違が認められることが明らかになった。これらの相違を検討することで、ASCの移植生着促進機能、ならびに前脂肪細胞の生着促進因子を探索できると考えられた。

研究要旨

A.研究目的

形成外科領域において行われている遊離脂肪移植は、移植後まず阻血状態に陥り、そのうち血管新生やリモデリングが起こる事で生着するが、壊死や萎縮を伴う事が多く、生着率向上は今なお重要な課題である（図1）。これまで、千葉大学形成外科の研究の中で、脂肪移植での血管新生の重要性、さらにVEGFによる血管新生作用や、bFGFによる移植率向上が示された。そして、血管新生を制御することが脂肪生着に重要であるという考えに至った。

近年、この遊離脂肪移植において、脂肪由来幹細胞（adipose derived stem-cell 以下ASCと略す）を混入し、生着率を向上させる研究や報告がみられる。これは、

ASCを混ぜる事で、阻血に強いASCが増殖し、血管新生やリモデリングの働きが強まり、生着率が向上するといったものである。ASCの作用は、成熟脂肪細胞への分化、血管内皮細胞への分化、血管新生誘導因子等の分泌、脂肪萎縮に対するターンオーバーの促進等が言われているが、詳細は明らかにはなっていない。

当研究課題において、遺伝子導入前脂肪細胞の生着は、この治療法を確立するために重要な点であり、そのためにわれわれは何らかの生着を支持する因子が必要と考えている。そこでこのような総合的なASCの利点に着目し、生着率を向上させることができるかを研究テーマとした（図2）。実際のASCはわれわれが前脂肪細胞を調整する際に生じるSVF

(stromal vascular fraction,以下 SVF と略す)の中に含まれているため、この SVF および前脂肪細胞を研究対象とした。

B.研究方法

今年度は、以下の 4 つの実験を計画し、上記 2 つについて実験を行った。

①SVF の性状解析(前脂肪細胞との比較)

②SVF 調整方法

1.培地の比較検討

培地は ① DMEM/HAM+FBS20% ② M199+FBS20% ③ Mesenchymal stem cell expansion medium (マウス幹細胞用に最適化した市販の培地) を使用し、マウスの前脂肪細胞、および SVF の増殖率の変化を調べた。DMEM 培地は、他の 2 つに比べても増殖率が劣らず、継代を続けても、増殖率の変化が比較的安定していたため DMEM 培地を今後の実験に使用する培地とした。

DMEM 培地による前脂肪細胞、SVF の増殖率の変化を調べると、前脂肪細胞は、約 1 ヶ月前後で、増殖率が徐々に低下するのに対し、SVF では 2 ヶ月後まで比較的増殖率が一定で、維持されていた。

2.形態および表面抗原プロファイリング

前脂肪細胞と SVF は、どちらも線維芽細胞様の形態をしており、形態的な差はほとんど見られず、継代をしても、形態的变化は見られなかった。SVF の表面抗原の発現を前脂肪細胞と比較したところ、SVF は、前脂肪細胞に比べて、天井培養開始後 7 日目での CD90 発現強度が低く、継代するにつれて徐々に増加し、21 日目には前脂肪細胞とほぼ同値であった。

4.サイトカイン測定

③SVF と前脂肪細胞の共培養

④GFP マウスを用いた移植

C.研究結果

研究対象とした前脂肪細胞はマウスの脂肪細胞より 7 日間の天井培養法にて採取した。SVF としてコラゲナーゼ処理した脂肪組織を遠心処理することで生じた沈澱を採取した。

天井培養後 7 日目～10 日目の培養上清を採

取し、アディポカインと呼ばれる、おもに脂肪細胞からの分泌が多いとされるサイトカイン 7 種類(MCP-1, Leptin, IL-6, TNF- α , total PAI-1, Resistin, Adiponectin) を測定した。MCP-1, IL-6 が SVF で高値であり、SVF でこの 2 つの炎症性サイトカインの分泌が多い可能性が示唆された。

D.考察

SVF と前脂肪細胞は、形態に大きな違いは認められないのにも関わらず、SVF の増殖が継代を重ねても前脂肪細胞に比べて維持される原因として、SVF 自体が、各種細胞増殖因子や、サイトカインをより分泌している可能性が考えられる。そして、今回差が明らかになった MCP-1, IL-6 は炎症性のケモカイン、サイトカインであり、細胞増殖に有利に機能していると推測する。今後、今回測定したサイトカイン以外のサイトカイン、細胞増殖因子の測定により、さらに SVF の特性が明らかになると考えられた。

今年度検討した範囲では SVF と前脂肪細胞は、表面抗原の発現強度に大きな差

がなかったが、唯一 CD90 に差が見られており、この原因には 2 つの理由が考えられた。1 つ目は、SVF 培養初期は、ASC 以外の細胞も含んだ多細胞の集団であり、継代ともに ASC の細胞集団が増加した可能性、2 つ目は、SVF 中の ASC が継代するにつれて脂肪細胞に分化が進み前脂肪細胞の多い細胞集団となった可能性、すなわち多能性を継代により失う可能性が考えられる。つまり、継代により SVF 中の ASC 細胞比、分化能がどのように変化していくかを追加検討していく事で、移

植に至適化された SVF の調整条件が明らかになると考えられた。

E. 結論

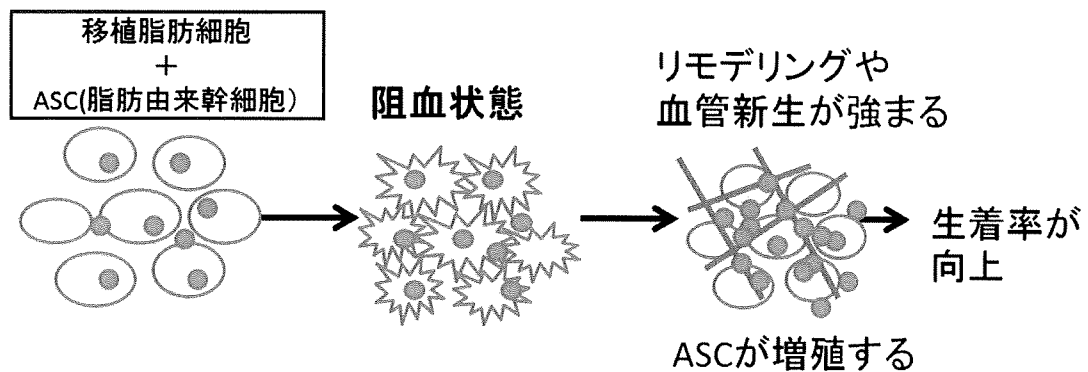
SVF は前脂肪細胞とはその性状が異なり、その特性を生かすことで前脂肪細胞移植の生着向上に寄与する可能性が高いと考えられた。

G. 研究発表

今年度は特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし



ASC(adipocyte tissue-derived stem cell)の作用

1. 成熟脂肪細胞に分化
2. 血管内皮細胞に分化
3. 低酸素(虚血)状態により、血管新生誘導因子を放出
4. 未分化な状態で存在し脂肪細胞のターンオーバーに備える
のちの脂肪萎縮に対する抑制効果

図 1. 形成外科領域で行われている脂肪幹細胞加脂肪移植術と ASC の作用

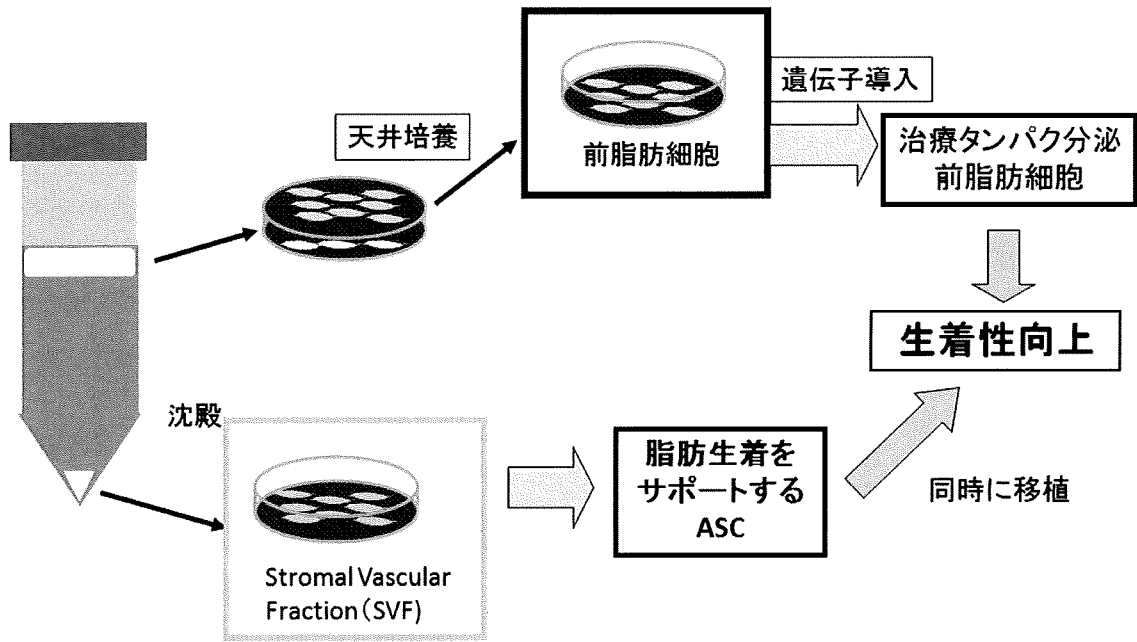


図 2. 本研究で目指す ASC+前脂肪細胞移植の方法の概略

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）
分担研究報告書

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

分担研究者 花岡英紀（千葉大学医学部附属病院臨床試験部長）

研究要旨：遺伝子治療を実施するにあたって適切な臨床研究基盤を整備する必要がある。特に、臨床試験実施のための計画書および同意説明文書その他必須文書の作成が必要である。そこで本研究では試験実施に先立ち研究に必要な各種文書の作成および実施体制の整備を行った。

A. 研究目的

臨床研究実施体制の整備

問し、手順書およびその他関連書式
および手順書を参考とした。

B. 研究方法

本研究においては、以下の検討を行った。

1. 細胞治療実施における手順の確立
2. 計画書および同意説明文書、症例報告書などの作成

（倫理面への配慮）

本研究は試験実施の準備のため、直接被験者への影響はない。実施される試験については臨床研究に関する倫理指針に基づいて実施する必要がある。

3. 以上の結果より本学未来開拓センターにおいて本研究に係る臨床試験実施のための手順書を作成した。

4. 作成するにあたって、トランスレーショナル・リサーチ実施の基本的事項を以下のように定めた。

C. 研究結果

1. 本学における自主臨床試験実施に係る手順書を参考とした。

- ① 千葉大学医学部附属病院臨床試験実施に係る手順書
- ② 自主臨床試験計画書作成ガイドライン
- ③ 同意説明文書作成ガイドライン

2. 東京大学医科学研究所細胞調整室および臨床試験の安全対策室を訪

- I. トランスレーショナルリサーチ（TR）は、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則を遵守し、「臨床研究に関する倫理指針」及び「疫学研究に関する倫理指針」、遺伝子解析を行う研究にあたっては「遺伝子治療臨床研究に関する倫理指針」及び「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準じて行わなければならない。

- II. トランスレーショナルリサーチ（TR）を開始する前に、個々の被験者及び社会にとって期待される利益と予想される危険及び不便とを比較考量するものとする。期待される利益によって危険を冒すことが正当化される場合に限り、

- トランスレーショナルリサーチ (TR) を開始し継続すべきである。
- III. 被験者の人権、安全及び福祉に対する配慮が最も重要であり、科学と社会のための利益よりも優先されるべきである。
- IV. 試験薬及び医療機器に関して、そのトランスレーショナルリサーチ (TR) の実施を支持するのに十分な非臨床試験に関する情報が得られていなければならない。
- V. トランスレーショナルリサーチ (TR) は科学的に妥当でなければならず、試験実施計画書にその内容が明確かつ詳細に記載されていなければならない。
- VI. トランスレーショナルリサーチ (TR) は、倫理審査委員会又は生命倫理審査委員会が事前に承認した試験実施計画書を遵守して実施しなければならない。
- VII. 被験者に対する医療及び被験者のためになされる医療上の決定に関する責任は、医師又は歯科医師が常に負うべきである。
- VIII. トランスレーショナルリサーチ (TR) の実施に関与する者は、教育、訓練及び経験により、その業務を十分に遂行しうる要件を満たしていなければならない。
- IX. すべての被験者から、トランスレーショナルリサーチ (TR) に参加する前に、自由意思によるインフォームド・コンセントを得なければならない。
- X. トランスレーショナルリサーチ (TR) に関するすべての情報は、正確な報告、解釈及び検証が可能なように記録し、取扱い、及び保存しなければならない。
- XI. 被験者の身元を明らかにする可能性のある記録は、被験者のプライバシーと秘密の保全に配慮して保護しなければならない。
- XII. 試験薬は倫理審査委員会及び生命倫理審査委員会が事前に承認した試験実施計画書を遵守して使用するものとする。
- XIII. トランスレーショナルリサーチ (TR) のあらゆる局面の質を保証するための手順を示したシステムが、運用されなければならない。
- D. 考察
- 本研究手順および各種書式等を作成するにあたり、トランスレーショナルリサーチ特有の問題点が存在する。特に、シーズとなる物質についての評価が重要であり、さまざまな角度からの専門的な評価が不可欠である。これについては、学内の専門家によるサポート体制が必要となった。その上で、手順書に定められた方法に従い、試験を実施する必要がある。
- E. 結論
- 本研究では、試験実施についての取り扱いにかかる手順を作成した。本研究の実施にあたりこの手順に基づいて今後実施されることとなる。また、シーズの評価にあたっては別途委員会を通して客観的な評価を行うこととしたが、今後、シーズ評価に係る手順書の作成が必要と考えられる。
- F. 研究発表
- なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	Ceiling culture-derived proliferative adipocytes are a possible delivery vehicle for LCAT protein replacement therapy.		投稿 中		
Asada S, Kuroda M, Aoyagi Y, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Machida K, Matsumoto F, Satoh K, Aso M, Saito Y.	Disturbed apolipoproteinA-I containing lipoproteins in fish eye disease is improved by lecithin: cholesterol acyltransferase produced by the gene-transduced adipocytes		投稿 中		
Aoyagi Y, Kuroda M, Asada S, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Machida K, Matsumoto F, Satoh K, Aso M, Saito Y.	Fibrin glue increases the cell survival and the transduced gene product secretion of the ceiling culture-derived adipocytes transplanted in mice		投稿 中		
Matsuo M, Ebinuma H, Fukamachi I, Jiang M, Bujo H, Saito Y.	Development of an immunoassay for the quantification of soluble LR11, a circulating marker of atherosclerosis.	Clin Chem	55	1801-1808	2009
Tashiro J, Miyazaki O, Nakamura Y, Miyazaki A, Fukamachi I, Bujo H, Saito Y.	Plasma preb1-HDL level is elevated in unstable angina pectoris.	Atherosclerosis	204	595-600	2009
A Saiki, M Olsson, M Jernäs, A Gummesson, PG McTernan, J Andersson, P Jacobson, K Sjöholm, B Olsson, S Yamamura, A Walley, P Froguel, B Carlsson, L Sjöström, PA Svensson, LM Carlsson.	Tenomodulin is highly expressed in adipose tissue, increased in obesity, and down-regulated during diet-induced weight loss.	J Clin Endocrinol Metab	94	3987-3994	2009
A Saiki, F Watanabe, T Murano, Y Miyashita, K Shirai.	Hepatocyte growth factor secreted by cultured adipocytes promotes tube formation of vascular endothelial cells in vitro.	Int J Obes Relat Metab Disord	30	1676-1684	2006

IV. 研究成果の刊行物・別冊

Ceiling culture-derived proliferative adipocytes are a possible delivery vehicle for LCAT protein replacement

Masayuki Kuroda^{1,2}, Yasuyuki Aoyagi^{1,2}, Sakiyo Asada^{1,2}, Hideaki Bujo¹, Shigeaki Tanaka², Shunichi Konno², Masami Tanio², Itsuko Ishii³, Kazuhiko Machida⁴, Fumiaki Matsumoto⁵, Kaneshige Satoh⁵, Masayuki Aso², and Yasushi Saito⁶

¹Department of Genome Research and Clinical Application, Graduate School of Medicine, Chiba University; ²CellGenTech, Inc.; ³Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University; ⁴Central Institute for Experimental Animals; ⁵Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Graduate School of Medicine, Chiba University; ⁶Chiba University

Correspondence: Masayuki Kuroda, Department of Genome Research and Clinical Application, Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1, Inohana, Chuo-ku, Chiba, 260-8670, Japan.

E-mail: kurodam@faculty.chiba-u.jp

Tel.: +81-43-2227171, or +81-43-4414121

Fax: +81-43-2262095

Short title: Proliferative adipocytes for LCAT replacement therapy

ABSTRACT

Human proliferative adipocytes propagated via ceiling culture technique from subcutaneous fat tissue (designated as ccdPA) were evaluated for their potential as a recipient for retrovirus vector mediated gene transduction for a therapeutic protein delivery vehicle. The simple exposure of *ZsGreen*-expressing vector supernatant achieved 40-50% transduced gene-positive cells with less than two integrated copies of viral genome per cell on average using a cell preparation generated by a 7-day ceiling culture. The *lcat* gene-transduced human ccdPA secreted functional LCAT protein, correlating with the integrated copy number of vector genome. The gene-transduced cells could be expanded up to nearly 10^{12} cells from 1 g of fat tissue within one month after fat tissue preparation. They also maintained the potential to differentiate into adipocytes *in vitro*. The presence of human LCAT protein in serum was immunologically identified upon transplantation of *lcat*-expressing ccdPA into adipose tissue of immune-deficient mice. These results indicated that human ccdPA has a novel therapeutic potential for the LCAT deficient patients. The clinical application in combination with cell transplantation shed a light on a development of a life-long protein replacement therapy for LCAT deficient patients.

Keywords: adipocyte, ceiling culture, protein replacement therapy, gene therapy, retrovirus vector, lecithin:cholesterol acyltransferase

INTRODUCTION

The intriguing biology of pluripotent stem or progenitor cells has now led to the possibility to develop novel approach for the sustained production of therapeutic proteins to treat serum protein deficiencies.¹⁻³ The ability of cells to self-renew at a high proliferation rate has led to the expectations that they would be ideal targets for retrovirus vector-mediated transgene delivery.^{2,3} Since the protein-producing cells are manipulated by *ex vivo* gene transduction in combination with autotransplantation to recipients in this strategy, host immune response against virus vectors can be minimized or essentially ignored. Studies along this concept have investigated the treatment of various diseases in animal models.⁴⁻¹³

Much attention has been paid to adipose tissue as a source of the cells with the above potency for therapeutic applications, since relatively large quantities, particularly a substantial number of cells capable of self-renewal, can be obtained by a simple operation with minimal risk.^{14,15} Two types of preparations have been used as sources of adipose-tissue derived proliferative cells. One is stromal-vascular fractions (SVFs) which can be obtained as sediment by centrifugation of collagenase-digested fat tissue.^{16,17} The cells obtained are pluripotent to differentiate to various cells, such as cardiomyocytes, chondrocytes, and osteoblasts in addition to adipocytes.¹⁸ The other is obtained from the mature fat cell containing floating fraction of the centrifugation, followed by a ceiling culture.¹⁹ The cultured cells maintain the ability to differentiate to mature adipocytes at a high frequency.^{12,19,20} Therefore, a ceiling culture may be the optimal method to prepare a proliferative cell population to differentiate into mature adipocytes.

Lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) is responsible for the conversion of plasma unesterified cholesterol into cholesteryl ester.²¹ Through the esterification function, LCAT plays a central role in the formation and maturation of high-density lipoproteins (HDL), which is involved in reverse cholesterol transport.²¹ Genetic LCAT deficiencies have been identified.²¹⁻²⁴ Plasma LCAT is either absent or exhibits no catalytic activity in patients with familial LCAT deficiency. Cholesterylesters in lipoproteins are markedly reduced, abnormal cholesterol deposition is observed in their tissues, and the patients often develop corneal opacity, anemia, proteinuria, and renal failure. Replacement therapy with recombinant LCAT protein has not been established mainly because this is a rare condition and the expensive of production of recombinant protein. Therefore, life-long treatment with autologous cell-based therapy could therefore positively contribute to the continuous replacement of enzymes.

In this study a target cell population for the cell-based therapy of LCAT deficiency

patients was prepared from adipose tissue using the ceiling culture technique, and designated the target cells as ceiling-culture derived proliferative adipocyte (ccdPA). This study assessed the production process and the suitability of human ccdPA as a recipient for retrovirus vector-mediated gene transduction. The efficacy and the safety of *lcat*-gene transduced ccdPA as a LCAT-secreting device for protein replacement therapy were investigated using animal transplantation model. Therefore, we have developed stable protein producing human ccdPA with both a self-renewal and high expansion capacity.

RESULTS

Preparation of gene-transduced human ccdPA

The optimization of cell-processing steps was carried out with fat tissues obtained from 16 healthy volunteers (C001-C016). Adipose-tissue derived proliferative cells were assessed for their suitability of ceiling culture, gene transduction, and cell expansion, using two culture media, DMEM/F12-HAM supplemented with 20% FBS (DMEM/FBS) and MesenPRO medium, which was originally developed for mesenchymal stem cells, respectively. The ceiling culture was performed in DMEM/FBS in comparison to MesenPRO medium. The cell yield of C012 after the ceiling culture were $7.1 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^5$ and $2.1 \times 10^5 \pm 0.2 \times 10^5$ cells in DMEM/FBS and MesenPRO medium, respectively, showing that more of cells were obtained in DMEM/FBS than in MesenPRO medium ($p < 0.05$). Flow cytometric analysis showed that cells in DMEM/FBS tended to be homogeneous in shape and size, in comparison to those in MesenPRO medium (**Figure 1a**). The gene transduction of the cells after ceiling culture was next assessed in the two media. The above cells frozen stocked after ceiling culture with DMEM/FBS were recovered, incubated for 4 days, and seeded for gene transduction in MesenPRO medium or DMEM/FBS. After transduction with the *lcat*-expressing retrovirus vector, the cells were passaged several times with the respective medium, and cell samples were subjected to copy number quantification at each time point (**Figure 1b**). DMEM/FBS was more effective than MesenPRO medium for gene transduction of human ccdPA when retrovirus vector was employed under the condition used. Finally, the effects of the incubation media on the gene-transduced cell expansion were examined. The doubling times of the cells in the MesenPRO medium were significantly shorter than those in DMEM/FBS (31.7 ± 4.8 hours vs. 119.4 ± 29.6 hours, $p < 0.05$). The transduced cell number expanded to more than 3×10^4 folds of original number in a month in MesenPRO medium (**Figure 1c**). Therefore, DMEM/FBS was chosen for the ceiling culture and gene transduction, and the MesenPRO medium for cell expansion of

ccdPA, respectively, in the subsequent experiments.

Characterization of human ccdPA

The cell surface antigen profile was analyzed by FACS for human ccdPA (**Figure 2a**). The populations of CD31⁻/CD45⁻ cells were significantly increased in ccdPA preparation, in comparison to the SVF-derived cells ($99.1 \pm 0.3\%$ vs. $95.6 \pm 0.1\%$, $p < 0.05$), thus indicating that ceiling culture technique excludes CD31-positive and/or CD45-positive cell populations in comparison with the cells prepared from SVF. The ccdPA were positive to CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD59, CD90, CD105, CD146, and HLA-ABC, and negative to CD31, CD34, CD45, CD54, and CD106. They were moderately positive to CD49d and CD65, and a substantial number of cells were CD36 positive (a marker of adipocytes).²⁵ The populations of CD36-positive cells after a 14-day *in vitro* culture of ccdPA were significantly lower than those at 7 days ($p < 0.05$, **Figure 2b**).

Retrovirus vector-mediated gene transduction and the transduced gene derived protein secretion of human ccdPA

Human ccdPA was evaluated as a recipient of MoMLV-based gene transduction in various concentrations of vector and protamine sulfate (PS) with single-round transduction using a ZsGreen expressing vector. Two types of cells were analyzed, one was just after harvesting from the ceiling culture (CF7(7)), while another was further cultured in the normal manner for a week (CF7(14)) in DMEM/FBS. The integrated copy number could be increased to about 1.7 and 2.5 copies/cell in CF7(7) and CF7(14), respectively, and a good linear correlation was observed between the integrated copy number and transduction efficiency (% ZsGreen-positive cells) (**Figure 3a**). The transduction efficiency as well as the integrated copy number, was significantly different between the cells of same batch at Day1 and Day2 of gene transduction (**Figure 3b**). These results showed that the cells with higher transduction efficiency of the transduced gene with a lower integrated copy number were obtained by the transduction for the cells which were seeded and incubated overnight following a 7-days ceiling culture (CF7(8)). The cells of CF7(8) were examined as a vehicle for delivering human *lcat* gene. The transduction analysis using *ZsGreen* vector showed that vector concentration of 2.0×10^9 RNA copies/ml resulted in a good correlation between the integrated copy number and ZsGreen-positive cells in two different cell batches (**Figure 3a**). The use of the maximum achievable concentration (3.1×10^9 RNA copies/ml) of CGT_hLCATRV was compared with that using a concentration of 2.0×10^9 RNA

copies/ml. Transduction of CF7(8) with 3.1×10^9 or 2.0×10^9 RNA copies/ml of the vector resulted in no difference in the integrated copy number (1.65 ± 0.12 vs. 1.56 ± 0.23 copies/cell). The LCAT protein produced by the *lcat* gene-transduced human ccdPA was analyzed (**Figure 3c** and **3d**). Seven days after gene transduction, 1×10^5 cells were seeded in 12-well plate, grown for three days, and the supernatant was collected for the assay. The LCAT protein production and the LCAT activity were determined by immunoprecipitation/immunoblot (IP-Western) and a cholesterol esterifying assay in the medium, respectively. The LCAT protein and activity significantly correlated with the integrated copy number ($r=0.917$ and 0.954 , respectively, $p<0.05$). Therefore, the activity of the LCAT protein produced by the gene-transduced ccdPA was estimated by the integrated copy number. The *lcat*-gene transduced ccdPA produced LCAT protein with a specific activity of 5.2 ± 0.5 fmol esterified-cholesterol/integrated copy/hr in the culture medium within 3 days.

Properties of the lcat-gene transduced human ccdPA during the manipulation process

The effect of *in vitro* manipulation was evaluated on the ccdPA characteristics with regard to the ability for adipogenic differentiation, expansion rate, cell surface marker expression, transgene stability and anchorage-independent cell growth. The cells were stimulated to differentiate and Oil Red O staining demonstrated the transduced cells had clearly changed into adipocytes (**Figure 4a-4f**), and the appearance was not obviously different from the cells without gene transduction. Triglyceride contents showed no significant difference between transduced and control cells in C014 samples (1.30 ± 0.43 vs. 1.25 ± 0.27 mg/mg protein, respectively). The proliferating cell number and the resulted doubling time showed no significant difference between the transduced cells and control cells (**Figure 4g**). In addition, no significant difference was observed in the expression levels of the cell surface markers between the transduced cells and the control cells (**Figure 4h**). The integrated copy number in the transduced ccdPA was monitored to assess the fate of the transgene during the culture period for 35 days (**Figure 4i**). The integrated copy number gradually decreased (also see **Figure 1b**), but it did not significantly change after a week from gene transduction. A Southern blot analysis using human *lcat* gene as a probe revealed that only a faint smeared signal was detected independent of the genomic *lcat* locus, indicating that no amplification of a specific clone had occurred during the expansion process (**Figure 4j**). A soft agar assay showed that no anchorage-independent colony formation was observed in the gene-transduced human ccdPA (data not shown). These results demonstrated that the effect of gene transduction was negligible (or denied) on the characteristics of the