

201015006A

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 22 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武城 英明

平成 23 (2011) 年 3 月

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 22 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武城 英明

平成 23 (2011) 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. 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

LCAT 欠損症の合併症としての動脈硬化評価と遺伝子治療による改善のフォローアップ法

東邦大学医療センター佐倉病院

白井 厚治

-----15

2. 多血小板血漿（PRP）を用いた脂肪細胞移植技術の開発

千葉大学大学院医学研究院

佐藤 兼重

-----19

3. インスリン遺伝子導入脂肪細胞の検討

千葉大学大学院医学研究院

横手幸太郎

-----25

4. 多血小板血漿（PRP）を用いた脂肪細胞移植技術の開発

千葉大学医学部附属病院臨床試験部

花岡 英紀

-----32

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

-----37

IV. 研究成果の刊行物・別冊

-----43

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、遺伝子導入前脂肪細胞の移植生着率向上に向けて、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) 移植scaffold素材の細胞特性に対する影響、2) 移植scaffoldを用いたマウス移植実験でのLCAT持続補充について検討した。その結果、前脂肪細胞がフィブリンscaffold内で高率に脂肪細胞に成熟すること、またフィブリンscaffoldが前脂肪細胞の生存に寄与し、安定なLCAT補充が可能となることを明らかにした。さらにそれを向上させた自己血由来フィブリンscaffoldの使用に向け、多血小板血漿（PRP）ゲルの可能性を見出した。また*in vitro*検討においてLCAT遺伝子導入前脂肪細胞の分泌するLCAT蛋白が患者血清中で病態を改善できることを明らかにし、その評価系が患者の治療反応性評価システムとして使用可能であることを見出した。本年度はこれらの検討と共に、遺伝子治療臨床研究実施に向けた厚生労働省への申請業務を行った。5月に厚生科学審議会での審議が開始され、6月に第1回遺伝性疾患遺伝子治療臨床研究作業委員会（作業委員会）において審議を受けた。その後、作業委員会への照会事項に関する回答書提出と共に追加検討課題について精査検討を開始した（現在継続中）。来年度は2回目の作業委員会での審議、厚生労働大臣による承認を受け、遺伝子治療臨床研究を開始する予定である。

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、特異的に脂肪細胞に

A. 研究目的

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高く、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 22 年度は、21 年度に進めた研究内容を継続した。上記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」については 21 年度にその目的を達成しており、22 年度は残る②、③の目的を遂行するため、以下のように研究を進めた。

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

ヒト脂肪組織より調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を用い、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、*in vitro*、*in vivo*での評価系において LCAT 蛋白の分泌機能を含む細胞の機能評価を実施した。

また、生着促進剤としての自己血由来多血小板血漿の生着促進効果について形成・美容外科学（佐藤兼重）との共同研究を実施した。

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。その経緯を表 1 に示した。厚生科学審議会・作業委員会における審議の結果、新たに課題として検討が必要となった事項について追加検討を開始した（2011 年度まで継続予定）。具体的検討内容については以下に記載する。

（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にて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）

I. 「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

本検討事項について以下のような成果を得た。

1) *in vitro*での製剤化検討：ヒト前脂肪細胞の治療用遺伝子の運び屋としての特性

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、成熟した脂肪細胞より天井培養法を用いて調製した前脂肪細胞を用いている。

21 年度の結果から、7 日間の天井培養法で調製した細胞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いることを明らかにした（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」、PCT/JP2011/050919)。また、導入遺伝子コピー数に相関して培地中に LCAT 蛋白を分泌することを明らかにした (Kuroda *et al.* TOGTJ 2011)。

22 年度は同様に調製した細胞について移植用 scaffold として使用予定のフィブリンゲル (糊) を使用し、フィブリンゲルが細胞にどのような影響を与えるかを検討した。まず、LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞をフィブリンゲルで固め、それを *in vitro* で継続培養する三次元培養法を確立した。この培養法では少なくとも 3 ヶ月の継続培養が可能であり、少なくともその期間は LCAT を持続的に分泌することを見出した (図 2)。更にゲル内の細胞について組織染色、mRNA 定量を実施した。Oil Red O 染色の結果、培養 28 日から、細胞が油滴を蓄積し、さらに日を追って油滴含有度が上昇することを見出した (図 3)。この結果は、前脂肪細胞がフィブリンゲル内において分化刺激を必要とせず、自発的に脂肪細胞に分化し得ることを示しており、その分化レベルが成熟脂肪細胞に近い細胞であることを示唆している。また油滴の蓄積度合いはフィブリノゲンの濃度を低くすることによって高まることを見出した。治療遺伝子 (*lcat* 遺伝子) の mRNA 量を検討したところ、油滴の蓄積度合いと相関しており、細胞の脂肪細胞への分化に伴って *lcat* mRNA 量が増加することが示唆された (図 4)。

2) *in vivo*での製剤化検討：フィブリンゲルの細胞生着に対する影響評価

昨年度の検討の結果、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た。その結果についてフィブリンゲルの細胞生存に対する影響と共に、マウス皮下移植試験を実施し、その持続分泌を評価した。その結果、フィブリンゲル無しで細胞懸濁液を皮下移植した場合に比べて、明らかに LCAT 分泌の向上が認められ、その分泌維持効果はマウス移植実験で汎用される scaffold であるマトリゲルとほぼ同等であった (図 5)。このフィブリン scaffold の分泌向上効果は主に移植細胞のアポトーシス抑制によることを見出した (Aoyagi *et al.* EMM 2011)。このことから、臨床導入時には、フィブリン糊が scaffold として移植後の生着促進剤として使用可能であることが強く示唆された。

3) 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。

ヒト血液より PRP を調製し、ヒト前脂肪細胞の増殖に与える影響を検討した。ヒト前脂肪細胞を 0.5、1、2、5、10% の PRP を含む培地で培養しその増殖率を測定した。0.5%PRP を加えたものから 5%まで濃度依存的に増殖率が上昇し、同一濃度の FBS に比べても有意に増殖亢進が認められた。また、シクロヘキシミドにより誘導したアポ

トーシスを有意に抑制することが明らかとなった。以上のことから、PRP が移植後の生着率向上に寄与す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。

現在はフィブリン糊を scaffold として同時に検討を進めているが、自己 PRP gel を使用することで、scaffold 供給、growth factor 供給の多面的な効果が期待できると共に感染症リスクも回避できると考えられる。

II. 「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

1) 遺伝子治療臨床研究申請状況

研究開始から 22 年度までの経過について表 1 にまとめた。22 年度は厚生労働省への申請段階に入った。作業委員会からの主な指摘事項は以下の 4 項目であった。現在は、作業委員会からの指摘事項に関して、精査検討を実施している。

- ① 細胞分化特性解析の実施
- ② LCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の LCAT ノックアウトマウスへの移植実験における有効性、安全性に関する実験の実施
- ③ hLCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞のクローン検出法の変更・向上
- ④ サルの詳細な試験成績の提出、及びサルを含めた大動物試験の必要性について

2) LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞移植治療法の適合性評価システムの確立

LCAT 欠損症は現在まで報告されている

だけでも 80 種類以上の遺伝子変異が存在するが、この治療技術を臨床応用するためには、本治療法による効果が期待できるかどうかを評価し得る薬効解析システムを構築する必要がある。

われわれは、LCAT 欠損症患者血清と健康人血清のリポ蛋白分布の違いに着目し、患者血清に前脂肪細胞が分泌した LCAT 蛋白を添加し、添加後の HDL の成熟の度合いを 2 次元電気泳動と ApoA-I に対するウェスタンブロット法を組み合わせ評価した。その結果、魚眼病 (T123I 変異) 患者血清において、ApoA-I 含有 HDL が添加した LCAT の用量依存的に高分子側にシフトすること、すなわち HDL の成熟に寄与することを明らかにした (図 6、*Asada et al. MGM 2011*)。このことは、前脂肪細胞が分泌する LCAT 蛋白が、患者血清中に補充された際に薬効が期待できることを示している。現在、この解析系を患者適合性評価試験として、LCAT 欠損症 15 症例を有するアムステルダム大学アカデミックメディカルセンター (Kastelein 教授) との国際共同研究を進めている。また 22 年度の申請業務遂行に伴い、栃木、長野、岡山、鹿児島 of 医療機関からの照会があり、同時に適合性評価を進めている。

3) 前脂肪細胞の分化特性に関する検討

II-1) 項で記載した指摘事項①に関して、前脂肪細胞の分化レベルに関する解析を実施した。まず、前脂肪細胞の脂肪細胞への分化特性について評価した。対照の細胞としてコラゲナーゼ処理・遠心後の沈殿 (Stromal vascular fraction、SVF) より回収した脂肪幹細胞 (ASC) を用いた。SVF

由来の ASC は近年再生医療研究で注目されている多分化能を有する細胞である。前脂肪細胞と ASC を同じボランティア脂肪組織検体より調製し、インスリン、デキサメサゾン、インドメタシン、IBMX を含有する培地で脂肪細胞への分化を誘導し、その分化度の違いを評価した。分化誘導後の Oil Red O 染色の結果、前脂肪細胞の脂肪細胞への分化度が ASC のそれに比べて高いこと、また、脂肪細胞特異的 PPAR γ 2、aP2 遺伝子の発現が前脂肪細胞で有意に高かった (図 7)。

3) LCAT 欠損モデルマウスでの薬効・安全性評価

II-1) 項②の指摘事項に関して、名古屋市立大学・横山信治教授、群馬大学・佐藤幸市先生のご協力の下、LCAT 欠損モデルマウスを入手し、本解析に向けた繁殖を 22 年度 8 月より実施した。2 回の体外受精繁殖を経て、22 年度 2 月現在 60 匹程度の個体が得られている。一部の個体を使用し、薬効評価試験を実施中である。

4) その他の検討について

II-1) 項で記載した指摘事項③については現在解析準備中 (検体採取中) である。また、④については過去の実験結果を考察し、作業委員会からの照会事項に対する回答書に記載した。サルでの自己移植試験について検討したが、LCAT 欠損モデルが使用できないこと、更には、細胞獲得数が少ないこと、移植部位のサイズが小さいことなどにより、困難であると判断した。

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が分泌する LCAT 蛋白は LCAT 欠損症患者の代謝異常状態を改善し得る機能を有していることを明らかにした。この評価系は今後の本治療法適応患者選定の方法として使用できる可能性が示された。現在国内外の医療施設から患者血清を入手し、その評価システムを確立中である。

前脂肪細胞は SVF 由来細胞よりも成熟脂肪細胞に近い分化レベルにあることが明らかになった。この治療法のコンセプトでは、移植後細胞が移植部位 (皮下脂肪内) に生着し、脂肪組織を再構築することが望ましい。前脂肪細胞は移植に使用予定の scaffold であるフィブリンゲル内で自発的に脂肪細胞に成熟することを明らかにした。また、フィブリンゲルは血中への LCAT 分泌にも寄与することが示された。以上のことから少なくともフィブリンゲルは前脂肪細胞の脂肪細胞への自発的成熟を可能とし、細胞の移植生着率を向上させることにより、LCAT 分泌を向上させることが明らかになった。これらの結果はフィブリンゲルが本治療法に用いる移植 scaffold として優れていることを示唆している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aoyagi Y, Asada S, Kuroda M, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, 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. *Exp Mol Med*.

- 2011; in press.
- 2) 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 in enzyme replacement therapy in lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *The Open Gene Ther. J.* 2011; in press.
 - 3) Asada S, Kuroda M, Aoyagi Y, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Aso M, Saito Y. Disturbed apolipoprotein A-I-containing lipoproteins in fish-eye disease are improved by the lecithin:cholesterol acyltransferase produced by gene-transduced adipocytes in vitro. *Mol Genet Metab.* 2011; 102: 229-231
 - 4) Ikeuchi T, Hirayama S, Miida T, Fukamachi I, Tokutake T, Ebinuma H, Takubo K, Kaneko H, Kasuga K, Kakita A, Takahashi H, Bujo H, Saito Y, Nishizawa M. Increased levels of soluble LR11 in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2010; 30: 28-32.
 - 5) Unoki-Kubota H, Yamagishi S, Takeuchi M, Bujo H, Saito Y. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation end product (AGE) formation ameliorates insulin resistance in obese, type 2 diabetic mice. *Protein Pept Lett.* 2010; 17: 1177-1181.
 - 6) Takahashi M, Bujo H, Jiang M, Noike H, Saito Y, Shirai K. Enhanced circulating soluble LR11 in patients with coronary organic stenosis. *Atherosclerosis.* 2010; 210: 581-584.
2. 総説
 - 1) 黒田正幸、武城英明 (2010) 脂肪細胞による新規蛋白質補充療法—LCAT 欠損症遺伝子治療臨床研究—. *医学のあゆみ* 233, 1246-1247.
 3. 学会発表等
 - 1) Kuroda, M., Bujo, H., Satoh, K., Nakayama, T., Okamoto, Y., Aso, M., Saito, Y. (2011) Adipocyte-based gene therapy for intractable serum protein deficiencies. 千葉大学・ウィーン大学間交流シンポジウム
 - 2) 武城英明、麻生雅是、齋藤 康(2010) 前脂肪細胞移植による新規遺伝子治療の開発.第 31 回日本肥満学会 シンポジウム.
 - 3) Bujo, H. (2010) Novel gene therapy using the autologous preadipocyte transplantation for the patients with LCAT deficiency. Amsterdam University Academic Medical Center (AMC) Vascular Medicine Symposium. Special lecture.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許

「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 3.その他
を判定する方法」 特になし

出願番号：PCT/JP2011/050919

出願日：平成 23 年 1 月 20 日

2. 実用新案登録

特になし

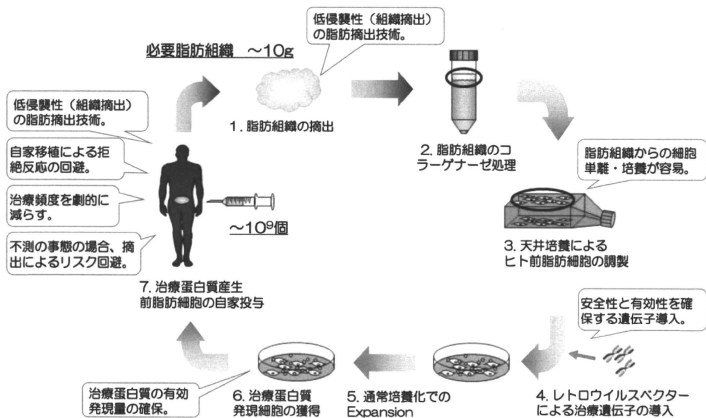


図 1. 治療目的遺伝子導入ヒト前脂肪細胞による治療の概要

表 1. 遺伝子治療臨床研究申請状況（H21 年度以降）

平成	月	
21	6	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開催
	7	同承認
	8	厚生労働大臣官房厚生科学課への事前提出
22	10	同計画書に対する事前照会事項回答書提出
	4	遺伝子治療臨床研究実施計画書を厚生労働省に提出
	5	第 57 回厚生科学審議会科学技術部会開催（審議開始）
	6	第 1 回遺伝性疾患遺伝子治療臨床研究作業委員会開催
	11	作業委員会照会事項に対する回答書提出
12	12	第一種使用規程承認申請書の事前照会事項に対する回答書提出
	12	第 9 回遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する作業委員会開催

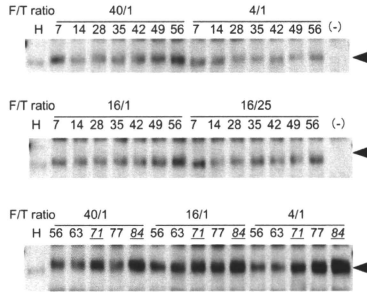


図 2、フィブリンゲルからの培地中への LCAT の分泌

フィブリン (mg/mL) とトロンピン (U/mL) の濃度比 (F/T ratio) を変え、細胞含有フィブリンゲル (細胞濃度 1×10^7 cells/mL) を作製、培養を継続、経時的に培養上清を回収した。7、14、28、35、42、49、56、63、77 については 3 日間、71 については 4 日間、84 については 7 日間の培養上清を解析に使用した。回収した培養上清 30 μ L を免疫沈降/ウェスタンブロットにより解析した。H: 15 μ g HDL、(-): フィブリンゲルのみ、矢印は hLCAT を示す。

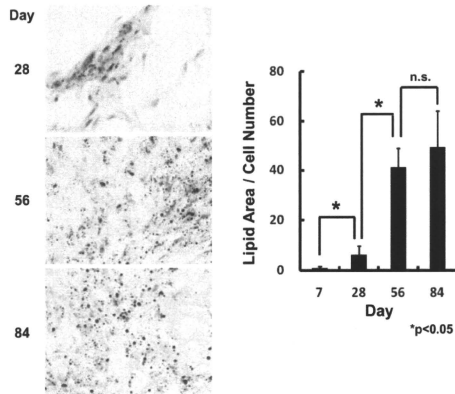


図 3、フィブリンゲルにおける LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞の自発的な脂肪細胞への分化
細胞含有フィブリンゲル (細胞濃度 1×10^7 cells/mL) を作製、培養を継続、経時的にゲルを回収した。回収したゲルについて切片を作製、Oil Red O 染色を実施した (左)。視野内の Oil Red O 染色面積 (Lipid area) と細胞数 (HE 染色) を計測し、その比 (Lipid area/cell number) を経時的にプロットした (右)。

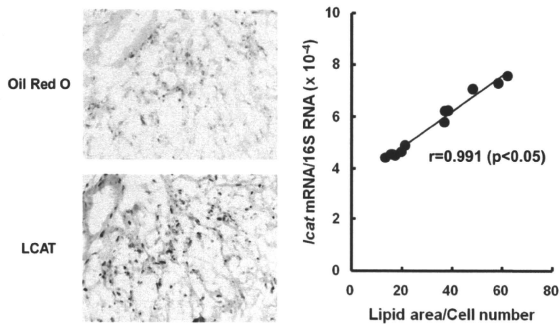


図4、フィブリンゲルにおける *lcat* 遺伝子の発現と細胞分化度との相関
細胞含有フィブリンゲル（細胞濃度 1×10^7 cells/mL）を作製、培養を継続、経時的にゲルを回収した。回収したゲルについて連続切片を作製、Oil Red O 染色と LCAT に対する免疫染色を実施した（左）。Oil Red O のシグナル陽性の領域で LCAT のシグナルが強い傾向が認められた。種々の条件下で培養後、ゲルから total RNA し、*lcat* mRNA を定量した。視野内の Oil Red O 染色面積(Lipid area)と細胞数(HE 染色)の比(Lipid area/cell number)に対して *lcat* mRNA 量をプロットしたところ両者に強い相関が認められた（右）。r: ピアソンの相関係数

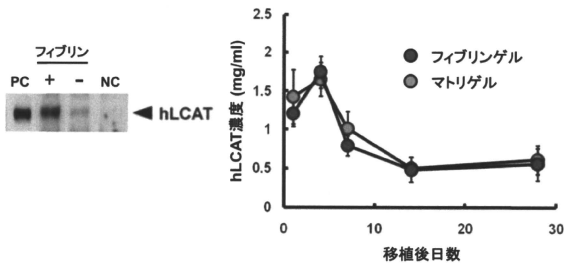


図5、フィブリンゲルによる LCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の移植と LCAT の分泌
フィブリンゲルで LCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞をマウスに皮下移植し、LCAT 蛋白の血中への補充を評価した。フィブリンゲルを移植に使用することで LCAT 分泌が有意に向上し（左）、マウス移植実験で汎用されるマトリゲルと同等の生着促進効果が得られた（右）。

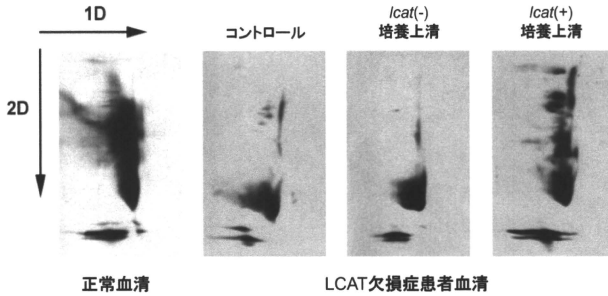


図 6. LCAT 蛋白添加による患者血清リポ蛋白プロファイルの正常化

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二次元電気泳動とその後の ApoAI 検出により評価した。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。

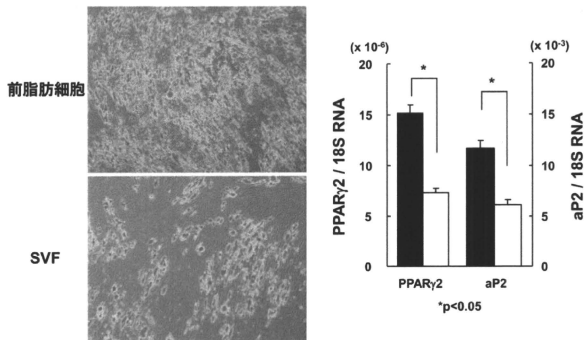


図 7. 前脂肪細胞と SVF 由来細胞の脂肪分化効率の比較

前脂肪細胞と SVF 由来細胞について分化誘導刺激 14 日後、Oil Red O 染色を実施した(左)。Oil Red O シグナルが前脂肪細胞で高かった。また同時に脂肪分化マーカーである PPAR γ 2、aP2 遺伝子発現も SVF に比べ有意に高いことが明らかになった。Closed bar: 前脂肪細胞、open bar: SVF。

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究補助金（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 欠損症患者に対する新規治療法の開発
LCAT 欠損症の合併症としての動脈硬化評価と遺伝子治療による改善のフォローアップ法

分担研究者 齋木厚人 東邦大学医療センター佐倉病院 内科学講座助教
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

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 遺伝子を導入後、血中 LCAT 活性が上昇することで腎障害の進展が抑えられることが期待されている。腎障害進展の背景には動脈硬化があるが、これを検出するよい指標が必要であった。Cardio Ankle Vascular Index (CAVI) は血圧依存性のないことを特徴とする血管機能検査で、動脈硬化性疾患の検出に優れているため、LCAT 遺伝子導入前後の動脈硬化評価に有用と思われる。今回は事前の検討として、CAVI の日内変動の評価と、腎障害と CAVI の関連について検討を行った。日内変動の検討では、時間や血圧、食後血糖の変動に関わらず CAVI は一定であった。また、CAVI は血清 cystatin C ($r=0.414$, $p<0.001$) や eGFR ($r=-0.315$, $p<0.01$) と相関がみられた。CAVI を外来で測定しても安定したデータを収集することができる点や、家族性 LCAT 欠損症の症例に対し、LCAT 遺伝子導入前後に CAVI を測定することで、動脈硬化進展の把握と、腎障害の病態理解に有用である可能性を見出すことができた。

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の開発を行っている。

家族性 LCAT 欠損症の生命予後には、腎不全の進行が大きく寄与している。LCAT 遺伝子を導入し、血中の LCAT 活性が上昇することによって、結果的に腎障害の進展が抑えられることが期待されている。しかし、LCAT 欠損が腎障害を来す機序は十分解明されておらず、また LCAT 活性と腎障害を介在する（主に血管障害の）マーカーの出現が望まれてきた。

Cardio Ankle Vascular Index (CAVI) は血管機能検査の一つである。これまで主流であった PWV が、血圧依存性の問題で本

来の血管機能を測定できなかつた一方で、CAVIは血圧依存性がなく^{1,2)}、かつ簡便に測定可能である。また CAVIは動脈硬化の指標として有用であることは、多くの報告が裏付けている^{3,4,5)}

家族性LCAT欠損症にLCAT遺伝子を導入したあとの動脈硬化を評価する目的で、このCAVIを測定する価値があるのか検討するため、今回、①CAVIの測定値の安定性(日内変動の評価)と、②腎障害とCAVIの関連について、分担研究を行った。

B. 研究方法

① CAVIの日内変動について

当院入院中の糖尿病症例30名。下肢閉塞性動脈硬化症、心房細動を有する症例は除外した。7:30、10:00、11:30、14:00、17:30、20:00にCAVIの測定を行った。同時に、血圧、脈拍、血糖の測定を行った。なお、食事は8:00、12:00、18:00に摂取した。

② CAVIと腎障害の関連について

冠動脈危険因子を有する206名の外来通院の症例。CAVIと同時に、腎機能障害の指標である血清cystatin Cとestimated glomerular filtration rate (eGFR)を測定した

(倫理面への配慮)

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、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

① CAVIの日内変動について

CAVIは6回のtime pointにおいて、変動は見られなかった(one-way ANOVAにて $p=0.938$)。CAVIの各point間の変化量と収縮期/拡張期血圧、脈拍、血糖のそれの相関関係を検討したが、相関は認められなかった。CAVIは日中の血圧の変化や、食事による血糖上昇に影響を受けず一定である可能性が示された。

② CAVIと腎障害の関連について

全症例の平均としては、血清cystatin Cは 0.81 ± 0.21 mg/L、eGFRは 65.8 ± 15.5 mL/min/1.73m²であった。CAVIは血清cystatin Cと有意に相関し($r=0.414$ 、 $p<0.001$)、eGFRとも負の相関を認めた($r=-0.315$ 、 $p<0.01$)。CAVIは動脈硬化の指標である一方で、腎障害とも密接に関連したマーカーである可能性が示された。

③ 考察

家族性LCAT欠損症における腎不全の進行は、組織学的にみると糸球体基底膜や血管内皮下に脂質沈着が関与しているため、おそらく血管障害の関連もあるものと思われる。一方で、家族性LCAT欠損症はその症例数が少ないこともあり、動脈硬化そのものに対して促進的か否かの評価も明確になっていない。よってCAVIを、腎障害に関連するマーカーとして、そして家族性LCAT欠損症の動脈硬化マーカーとして、両面から活用できることを狙っている。まず日内変動の検討では、時間や血圧、食

後血糖の変動に関わらず、一定であることが示された。これにより、外来で測定する CAVI のデータが信頼できるものとなった。測定は簡便で、施設間のデータ誤差がないことも確認されており、遠方の症例に対し他施設で CAVI を follow-up することも可能と考えられる。

CAVI が腎障害のマーカーである血清 cystatin C や eGFR と関連があったことで、腎障害というものが改めて動脈硬化と関連し、また CAVI がそういう病態を包括的に検出するツールであることが分かった。

家族性 LCAT 欠損症の症例に CAVI を測定することで、家族性 LCAT 欠損症における動脈硬化促進の是非を検討することができ、さらに LCAT 遺伝子を導入したあとの測定では、治療により動脈硬化や、その腎障害への関連を調べることができると思われる。

④ 結論

血圧依存性のない新しい血管機能検査 CAVI は、日内変動がなく、動脈硬化に関連した腎障害のマーカーになりうることを証明した。家族性 LCAT 欠損症の症例に対し、治療前後に CAVI を測定することは、動脈硬化進展の把握と、腎障害の病態理解に有用であり、今後の検討課題となった。

⑤ 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shirai K, Utino J, Otsuka K, Takata M. A novel blood pressure-independent arterial wall stiffness parameter; cardio-ankle vascular index (CAVI). *J Atheroscler Thromb.* 2006 ; 13(2): 101-7.

- 2) Nakamura K, Tomaru T, Yamamura S, Miyashita Y, Shirai K, Noike H. Cardio-ankle vascular index is a candidate predictor of coronary atherosclerosis. *Circ J.* 2008 72(4): 598-604.
- 3) Shirai K, Song M, Suzuki J, Kurosu T, Oyama T, Nagayama D, Miyashita Y, Yamamura S, Takahashi M. Contradictory Effects of β_1 - and α_1 -Adrenergic Receptor Blockers on Cardio-Ankle Vascular Stiffness Index (CAVI). *J Atheroscler Thromb.* 2011 18: 49-55.

2. 学会発表

- 1) Y Miyashita, K Suzuki, S Yamamura, N Ban, T Yamaguch, H Kawana, D Nagayama, M Ohira, K Endo, A Saiki, T Oyama, K Shirai. The clinical significance of measurement of CAVI in subjects who had a health examination, and the effect of metabolic syndrome on CAVI. The 3rd International Congress on Prediabetes and the Metabolic Syndrome, Nice, France, 2009, 4
- 2) Atsuhito Saiki, Na Lu, Takashi Yamaguch, Noriko Ban, Hidetoshi Kawana, Daiji Nagayama, Ayako Nagumo, Masahiro Ohira, Kei Endo, Tomokazu Oyama, Yoh Miyashita, Kohji Shirai. The