

effect of exercise and postprandial hyperglycemia on circadian variation of CAVI. The 42th Japan Atherosclerosis Society, Gifu, 2010. 7

- 3) Daiji Nagayama, Na Lu, Atsuhito Saiki, Takashi Yamaguchi, Noriko Ban, Hidetoshi Kawana, Ayako Nagumo, Masahiro Ohira, Kei Endo, Tomokazu Oyama, Yoh Miyashita, Kohji Shirai. CAVI is a candidate marker of vascular damage in patients with

metabolic syndrome. The 42th Japan Atherosclerosis Society, Gifu, 2010. 7

⑥ 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

多血小板血漿（PRP）を用いた脂肪細胞移植技術の開発

分担研究者 佐藤 兼重（千葉大学形成美容外科）

研究協力者 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。細胞移植においてその生着率向上に scaffold が寄与することが知られており、本研究が課題とする遺伝子導入脂肪細胞の移植技術向上についても、現在フィブリンゲルを用いた製剤化検討が実施されている。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。これらの研究実績から臨床応用可能な scaffold とサイトカインを移植時に添加することで更なる移植技術向上が期待できると考えられる。われわれは、両方の機能を持つ生体素材として多血小板血漿（PRP）に着目し、その培養脂肪細胞に対する影響を検討した。その結果、PRPに含まれるサイトカイン混合物は培養脂肪細胞の増殖を促進し、薬剤により誘導したアポトーシスに対して抵抗性を付与することを明らかにした。以上のことから培養脂肪細胞移植において PRP が生着促進因子として使用可能であることが示唆された。

A.研究目的

これまでのわれわれの研究で、培養脂肪細胞移植においては、移植早期にある程度の頻度で移植細胞が死滅することが分かっている。当研究課題における遺伝子導入前脂肪細胞の生着率の向上は、この治療法の成否を決める最重要課題の1つであり、そのためには細胞懸濁液単独の移植ではなく、何らかの生着を支持する因子の添加が必要である。

細胞移植率の向上維持には scaffold が必要であることがこれまでの多くの研究より明らかにされており、臨床で使用可能な scaffold の開発・検討は移植技術開発には欠かせない。また、移植部位で機能するサ

イトカインなど移植後の細胞環境因子も細胞移植後の組織構築に大きく寄与すると考えられる。現在、われわれはフィブリンゲルを scaffold とした細胞移植を考えているが、フィブリンゲルには scaffold としての機能はあるが、組織再構築に寄与するサイトカインは含まれていない。また患者にとっては非自己の血液由来製剤であることから、予測不能の感染症リスクが残される。

そこで、私たちは、形成外科領域でも近年注目されている多血小板血漿（PRP）の利点に着目した。PRPにはPDGFをなどのサイトカインが多数含まれ、自己血から調製できる。また自己のトロンビンによりフィブリンゲルと同様のゲルを生成する。今

年度は PRP が培養脂肪細胞の生着率を向上させることができるかを *in vitro* 実験で検討した。

## B. 研究方法

今年度は前脂肪細胞を用いた PRP の移植生存率促進効果とそのメカニズムの解析を中心に、1) PRP (多血小板血漿) が前脂肪細胞の増殖に与える影響、2) PRP のアポトーシス抑制効果、3) PRP 添加による遺伝子発現の変化の3つについて実験を行った。

1) PRP (多血小板血漿) が前脂肪細胞の増殖に与える影響

ヒト前脂肪細胞に対する、FBS、PRP の細胞増殖に対する効果を調べた。コントロール (血清添加なし)、FBS 群 (FBS1%, 2%, 5%, 10%, 20%) PRP 群 (PRP0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%) に対して、3 日間培養後の細胞増殖を Cyquant を用いて蛍光マイクロプレートリーダーで測定した。

2) PRP のアポトーシス抑制効果

アポトーシス誘導剤としてシクロヘキシミドを使用し、シクロヘキシミド添加 24 時間後の FBS、PRP 添加群それぞれのヒト前脂肪細胞に対する死細胞率を Nucleo Counter にて測定した。

3) PRP 添加による遺伝子発現の変化

FBS2% 添加、PRP2% 添加でそれぞれ 3 日間培養した前脂肪細胞の遺伝子解析をアポトーシス関連の遺伝子に関して PCR array を用いて行った。

## C. 研究結果

FBS と PRP の細胞増殖効果は、PRP で有意に高く、特に PRP は低濃度から濃度依

存性に細胞増殖効果が見られた。しかし、今回使用した PRP では、PRP5% までは細胞増殖が見られたが、PRP10% では細胞増殖が抑制され、PRP の細胞増殖効果を最大限得るには、適切な濃度が存在することが示唆された (図 1)。シクロヘキシミド添加によるアポトーシス誘導に対しては、PRP 添加群は、FBS 添加群に対し、死細胞率の低下を認め (図 2)。PRP 添加による前脂肪細胞の遺伝子発現を、FBS 添加の細胞の遺伝子発現と比較したところ、PRP 群で BCL2L11, DAPK1 の 2 つの遺伝子の発現低下を認めた (図 3)。

## D. 考察

今年度実施した検討結果によって、PRP が前脂肪細胞に対し細胞増殖効果と細胞死抑制効果を示すことが明らかとなった。細胞死抑制の効果により、移植初期の細胞死を抑制でき、生着率の向上に寄与すると考えられる。

PRP (多血小板血漿) は、自己の末梢血から採取可能な、いわば growth factor のカクテルであり、主に PDGF、TGF- $\beta$  などが含まれている。また、PRP 中に含まれるフィブリンは自己のトロンビンと反応することでフィブリンゲルを形成する。細胞移植を考えた場合、growth factor の供給と足場の供給は移植細胞の生着に重要な要素であり、PRP の使用により両方の効果が期待できる。さらに今回発現低下を認めた 2 つの遺伝子 BCL2L11 (BIM)、DAPK1 (Death-associated protein kinase 1) は、いずれもアポトーシス誘導遺伝子として知られており、今回の実験結果と矛盾しないと考えている。

今後、さらなるメカニズムの解析と、マウスを用いた動物移植実験を行っていく予定である。

#### E. 結論

PRP (多血小板血漿) の使用によって、前脂肪細胞の増殖を促進し、細胞死を抑制した。PRP は自己トロンビンとの反応によりゲル化し、scaffold としても機能すると考えられることから、自己血由来の生着促進因子として有用であることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yokoyama T, Tosa Y, Kadomatsu K, Sato K, Hosaka Y. A novel approach for preventing the development of persistent vasospasms after microsurgery for the extremities: intermittent topical lidocaine application. *J Reconstr Microsurg.* 2010;26:79-85.
- 2) Koizumi T, Negishi M, Nakamura S, Oguro H, Satoh K, Ichinose M, Iwama A. Depletion of Dnmt1-associated protein 1 triggers DNA damage and compromises the proliferative capacity of hematopoietic stem cells. *Int J Hematol.* 2010;91:611-619.
- 3) Mitsukawa N, Satoh K, Morishita T. Le Fort I distraction using internal devices for maxillary hypoplasia in patients with cleft lip, palate, and alveolus: complications and their prevention and management. *J*

*Craniofac Surg.* 2010;21:1428-1430.

- 4) Mitsukawa N, Satoh K. Midfacial distraction using a transfacial pinning technique for syndromic craniosynostosis with obstructive respiratory disorders. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010;63:1990-1994.
- 5) Mitsukawa N, Satoh K. Maxillomandibular distraction osteogenesis for Marshall-Smith syndrome. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010;63:e611-614.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

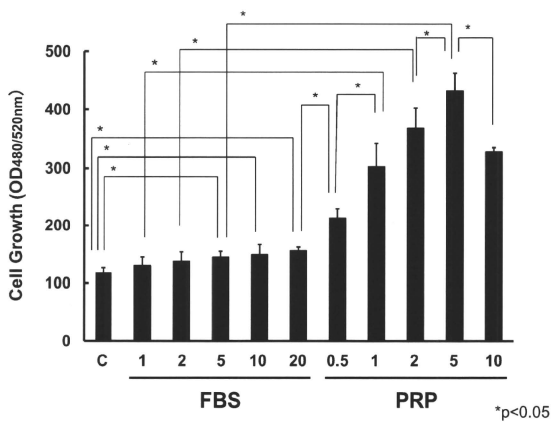
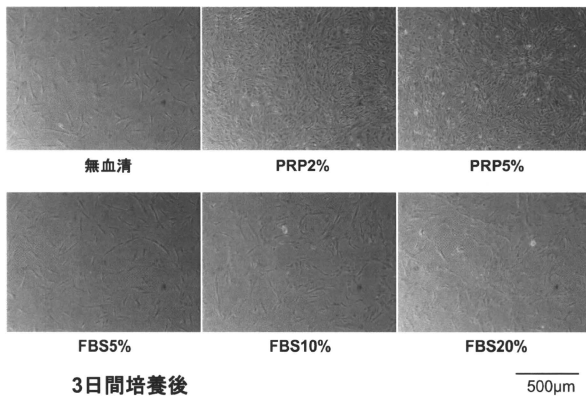
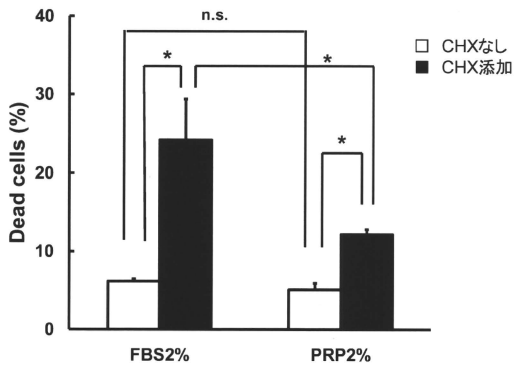
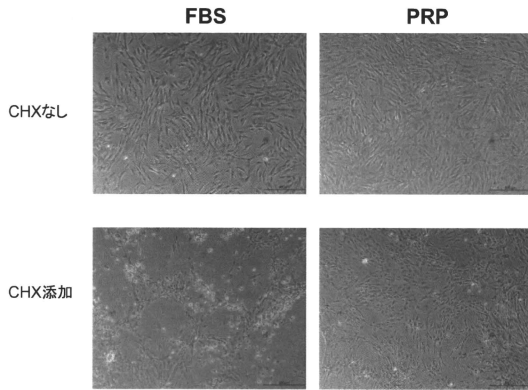


図1、PRPによる培養脂肪細胞の増殖促進効果



\*p<0.05

図2、PRPによるシクロヘキシミド誘導アポトーシスの抑制効果

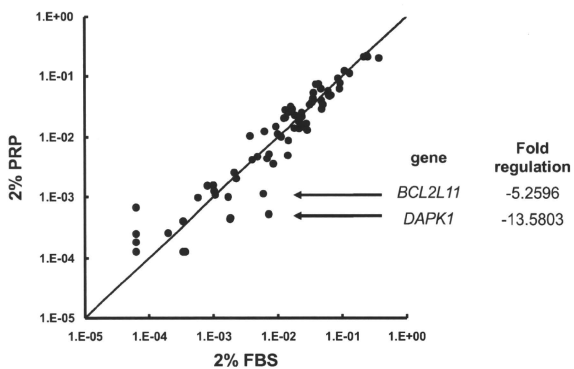


図3、PRPにより発現変化を受ける遺伝子の探索

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

インスリン遺伝子導入脂肪細胞の検討

分担研究者 横手幸太郎

研究協力者 藤本昌紀

（千葉大学大学院医学研究院細胞治療内科）

（千葉大学医学部附属病院 糖尿病・代謝・内分泌内科）

**研究要旨** 本研究は、患者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。前脂肪細胞を用いた遺伝子導入療法は、導入遺伝子を変えることにより、LCAT 欠損症のみならず、種々の蛋白欠乏症への全く新しい治療法となる可能性がある。本分担研究では、最も頻度の高い蛋白欠乏症である糖尿病（インスリン欠乏症）を対象とし、LCAT 欠損症以外の蛋白欠乏症でも、前脂肪細胞を用いた遺伝子導入療法が有効である事を検証する。本年度は、マウス初代脂肪細胞を用いて、ヒトへの応用可能なレトロウイルスを用いて、インスリン発現を確認した。今後は、ヒト前脂肪細胞にインスリン遺伝子を導入し、生理作用を有するレベルまで発現させることを課題としていく。

**A. 研究目的**

LCAT 欠損症や血友病を始めとする種々の蛋白欠乏症や相対的欠乏症は、現在の所、治療法が存在しないか、不完全な補充療法で治療されている。現在の補充療法の多くは、頻回の投与を必要とし、患者の QOL を著しく制限する。中でも、インスリン欠乏症である糖尿病は国内患者約 200 万人と他を圧倒した最も頻度の高い蛋白欠乏症である。インスリンの分泌パターンは、定常状態で分泌されている基礎分泌と食後の高血糖を抑制するための追加分泌がある。基礎インスリン分泌が不足すると、糖尿病性ケトアシドーシスにより、意識不明、死に至る病である。今後、我が国は超高齢化社会を迎え、自己注射の出来ない糖尿病患者

者の増大が見込まれ、より簡便な基礎インスリン補充療法の確立が求められる(1)。主任研究者らは、これまでに脂肪細胞株のマウスへの移植技術を確認し(2)、移植片からの蛋白分泌を達成し(3)、移植片からのインスリン分泌により生理作用の発現を確認してきた(4)。本研究の目的は、これまでの主任研究者らの成果を受け、実際のヒトへの臨床応用を意識し、レトロウイルスベクターを選定し、ヒト前脂肪細胞にヒトインスリン遺伝子をレトロウイルスで導入し、最終的にはヒトへのインスリン導入前脂肪細胞を移植することで、糖尿病患者に対する新たな基礎インスリン補充療法を確立することである。

**B. 研究方法**



本研究の目的のために、今年度は、①ヒトインスリン遺伝子を導入したレトロウイルスを作成する。②代表的な培養脂肪細胞株である 3T3-L1 細胞に感染させ、インスリンを分泌させる。③マウスより初代脂肪細胞を採取し、インスリンを分泌させることとした。

インスリンはプレプロインスリンとして翻訳され、シグナルペプチダーゼで切断され、プロインスリンとなる。プロインスリンは分泌顆粒内で膵β細胞特異的に発現するプロホルモンコンバーターゼ (PC) によりプロセッシングを受け、A 鎖と B 鎖がジスルフィド結合する事により、成熟インスリンとなる (図 1)。その際、切り出される C 鎖は脱離する (図 1)。

図1

インスリンの生成にはプロセッシングが必要である。



全身に存在するpreprotein convertaseの一種であるフェーリンを用いることとした。

移植前脂肪細胞によるインスリン分泌を達成する際、前脂肪細胞に PC が発現していないため、プロインスリンが成熟インスリンへとプロセッシングされず、インスリンが分泌されない可能性がある。そのため、①導入インスリンの B 鎖 10 番目のアミノ酸のヒスチジンからアスパラギン酸へ変異する。本変異は高プロインスリン血症の原因変異として報告(5)されており、プロインスリンから成熟インスリンへのプロセッシングが行われなくても、細胞外への分泌を

可能とする。

②導入インスリン遺伝子の C 鎖の両端部分をフェーリン切断サイトに改変する。フェーリンはプロセッシングプロテアーゼの一種でユビキタスに発現し、脂肪細胞にも豊富に存在し、本改変によりインスリンが HEK-293 細胞より分泌させうることが報告されている(6)。

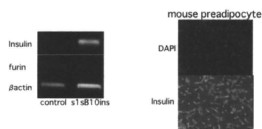
## C. 研究結果

1. 代表的な培養脂肪細胞株である 3T3-L1 細胞に、pcDNA3 ベクターでインスリン遺伝子をリポフェクションにより導入し、免疫染色及び RT-PCR 法でインスリン遺伝子が発現していることを確認した。残念ながら、ELISA 法では、発現を確認できなかった。

2. pDONA12 レトロウイルスベクターを用いて、インスリン遺伝子導入レトロウイルスを作成し、初代マウス前脂肪細胞に遺伝子導入した。RT-PCR 法で、インスリン及びフェーリンの発現を確認し、免疫染色でインスリン蛋白が発現していることを確認した (図 2)。

図2

マウス前脂肪細胞でpDONA12レトロウイルスによるインスリン発現が確認された。



ELISA 法で、プロインスリンが分泌されていることは確認できたが、成熟インスリンはほとんど分泌されていなかった。本インスリン遺伝子導入細胞からの分泌インスリ

ンが生理作用を有していることを確認するため、培養細胞上清を CHO 細胞へ添加し、インスリンシグナル分子である Akt のリン酸化の同定を試みたが、残念ながら、観察できなかった。(図 3)

図3

分泌されているインスリンは mature insulin ではなく、proinsulin であった。

3T3-L1 cell		mouse preadipocyte	
・insulin ELISA測定			
(1)insulin		(1)insulin	
Supernatant(μU/ml/24hr)	insulin	Supernatant(μU/ml/24hr)	insulin
control	0	control	0
s1sB10ins	0	s1sB10ins	0
(2)insulin-proinsulin		(2)insulin-proinsulin	
Supernatant(μU/ml/24hr)	insulin	Supernatant(μU/ml/24hr)	insulin
control	0	control	0
MIN6	754.6	MIN6	844.38
s1sB10ins	17.76	s1sB10ins	130.16

以上をまとめると、マウス初代前脂肪細胞へ pDONA12 レトロウイルスベクターを用いて、本インスリン遺伝子を導入することに成功し、細胞内でインスリン蛋白が発現していることを確認した。プロインスリンが分泌されており、残念ながら、成熟インスリンは分泌されてはいなかった。

#### D. 考察

今年度の研究で、マウス初代前脂肪細胞からプロインスリンの分泌に成功した。しかしながら、成熟インスリン分泌が確認できなかった原因として、①レトロウイルスの感染効率、②発現効率、③導入インスリン遺伝子改変により成熟インスリンへのプロセッシング前に分泌される可能性が考えられた。今回用いたインスリンの変異は、元々高プロインスリン血症を伴う糖尿病患者で発見された変異である(7)。その為、導入インスリンの蛋白分泌の点においては利点が認められたものの、分泌されたインスリンの生理作用の点では、不利益を来した可能性がある。

今現在までの成果では、マウス初代前脂肪細胞に蛋白を発現させ、分泌させる段階までは一定の成果が得られたと考えられた。今後は、生体内でインスリンとしての生理作用を発揮させるために、インスリンの分泌効率を向上させる事を次年度の目的とする。その為に、①前脂肪細胞にインスリン遺伝子と共にフェーリン遺伝子を同時に導入する方法や②1細胞当たりのレトロウイルス感染量を上げ、発現コピー数を増加させる事を検討する予定としている。

#### E. 結論

マウス初代前脂肪細胞にプロインスリンを発現させる事に成功した。残念ながら、生理活性を確認するには至らなかったが、インスリン遺伝子導入レトロウイルスの感染効率を改善し、今後はヒト前脂肪細胞への導入を行う。

#### 参考文献

1. Barnett AH: A review of basal insulins. *Diabet Med* 20:873-885, 2003
2. Shibasaki M, Takahashi K, Ito T, Miyazawa S, Ito M, Kobayashi J, Bujo H, Saito Y: Alterations of insulin sensitivity by the implantation of 3T3-L1 cells in nude mice. A role for TNF-alpha? *Diabetologia* 45:518-526, 2002
3. Kitagawa Y, Bujo H, Takahashi K, Shibasaki M, Ishikawa K, Yagui K, Hashimoto N, Noda K, Nakamura T, Yano S, Saito Y: Impaired glucose tolerance is accompanied by decreased insulin sensitivity in tissues of mice implanted with cells that overexpress resistin. *Diabetologia* 47:1847-1853, 2004
4. Ito M, Bujo H, Takahashi K, Arai T,

Tanaka I, Saito Y: Implantation of primary cultured adipocytes that secrete insulin modifies blood glucose levels in diabetic mice. *Diabetologia* 48:1614-1620, 2005

5. Gross DJ, Halban PA, Kahn CR, Weir GC, Villa-Komaroff L: Partial diversion of a mutant proinsulin (B10 aspartic acid) from the regulated to the constitutive secretory pathway in transfected AtT-20 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:4107-4111, 1989

6. Groskreutz DJ, Sliwkowski MX, Gorman CM: Genetically engineered proinsulin constitutively processed and secreted as mature, active insulin. *J Biol Chem* 269:6241-6245, 1994

7. Chan SJ, Seino S, Gruppuso PA, Schwartz R, Steiner DF: A mutation in the B chain coding region is associated with impaired proinsulin conversion in a family with hyperproinsulinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:2194-2197, 1987

#### F. 研究発表

##### 1. 原著

1. Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, Lokshin M, Hosokawa H, Nakayama T, Suzuki Y, Sugano S, Sato E, Nagao T, Yokote K, Tatsuno I, Prives C. (2010) Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 7461-7466.

2. Iose S, Misawa S, Sakurai K, Kanai K,

Shibuya K, Sekiguchi Y, Nasu S, Noto Y, Fujimaki Y, Yokote K, Kuwabara S. (2010) Mexiletine suppresses nodal persistent sodium currents in sensory axons of patients with neuropathic pain. *Clin Neurophysiol.* 121: 719-724.

3. Ogiwara Y, Mori S, Iwama M, Sawabe M, Takemoto M, Kanazawa N, Furuta K, Fukuda I, Kondo Y, Kimbara Y, Tamura Y, Chiba Y, Araki A, Yokote K, Maruyama N, Ito H. (2010) Hypoglycemia due to ectopic secretion of insulin-like growth factor-I in a patient with an isolated sarcoidosis of the spleen. *Endocr J.* 57: 325-330.

4. Kimura K, Shimano H, Yokote K, Urashima M, Teramoto T. (2010) Effects of Pitavastatin (LIVALO Tablet) on the Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) in Hypercholesterolemic Patients with Chronic Kidney Disease. *J Atheroscler Thromb.* 17: 601-609

5. Shimoyama T, Hiraoka S, Takemoto M, Koshizaka M, Tokuyama H, Tokuyama T, Watanabe A, Fujimoto M, Kawamura H, Sato S, Tsurutani Y, Saito Y, Perbal B, Koseki H, Yokote K. (2010) CCN3 Inhibits Neointimal Hyperplasia Through Modulation of Smooth Muscle Cell Growth and Migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30: 675-682.

##### 3. 症例・治験・手技

1. Ohnishi S, Fujimoto M, Oide T, Nakatani Y, Tsurutani Y, Koshizaka M, Mezawa M, Ishikawa T, Takemoto M,

- Yokote K. (2010) Primary lung cancer associated with Werner syndrome. *Geriatr Gerontol Int.* 10,,319-323.
2. 横手幸太郎 (2010) Werner 症候群,今日の診断指針,6,1219-1221.
  3. 山本恭平、柳本沙奈美、久保田暁彦、寺野隆、服部憲幸、森田泰正、横手幸太郎 (2010) 糖尿病性ケトアシドーシスで発症し、併発した著名な高中性脂肪血症と重度急性膵炎の治療に血漿交換が有用であった一例。糖尿病、第 53 巻、第 8 号、613-618.
  4. 山本恭平、柳本沙奈美、久保田暁彦、寺野隆、服部憲幸、森田泰正、横手幸太郎 (2010) 糖尿病性ケトアシドーシスで発症し、併発した著名な高中性脂肪血症と重度急性膵炎の治療に血漿交換が有用であった一例。糖尿病、53, 8, 613-618.
  5. 佐久間一基、橋本直子、陶山佳子、永野秀和、今田映美、間山貴文、吉田知彦、田中知明、龍野一郎、横手幸太郎 (2010) 中枢性尿崩症を呈したサルコイドーシスの 1 例。日本サルコイドーシス、肉芽腫性疾患学会雑誌、30, 59-65.
4. 総説
1. Teramoto T, Shimano H, Yokote K, Urashima M. (2010) New evidence on pitavastatin: efficacy and safety in clinical studies. *Expert Opin Pharmacother* 5:817-28.
  2. Iose S, Misawa S, Sakurai K, Kanai K, Shibuya K, Sekiguchi Y, Nasu S, Noto Y, Fujimaki Y, Yokote K, Kuwabara S.(2010) Mexiletine suppresses nodal persistent sodium currents in sensory axons of patients with neuropathic pain. *Clin Neurophysiol*,121,719-724.
  3. 横手幸太郎 (2010) 動脈硬化と脂質管理。ドクターサロン, 54, 49-53
  4. 横手幸太郎 (2010) 肥満症。今日の治療指針, 2010 年版, 599-600.
  5. 横手幸太郎 (2010) 脂質異常症・動脈硬化。NHK きょうの健康大百科, 2010 年 4 月 25 日発行, 44-49.
  6. 横手幸太郎 (2010) HDL トレンド 炎症による HDL 逆転送系障害の作用点とメカニズム。The Lipid, 21, 82-83.
  7. 藤本昌紀, 横手幸太郎 (2010) 脂質異常症 (高脂血症) 循環器疾患 最新の治療, 2010~2011, 455-460.
  8. 目澤守人, 藤本昌紀, 横手幸太郎 (2010) 抗肥満薬の現状。Heart View, 14, 78-83.
  9. 横尾英孝, 櫻井健一, 横手幸太郎 (2010) メタボリックシンドロームと脂質代謝異常。糖尿病, 2, 42-49.
  10. 横手幸太郎 (2010) 脂質異常症 (高脂血症)。高齢者に対する薬の安全処方, 6, 95-98.
  11. 藤本昌紀, 横手幸太郎 (2010) エネルギー代謝の視点から。脳心血管抗加齢研究会機関誌 Anti-aging Science, 2, 73-77.
  12. 目澤守人, 横手幸太郎 (2010) 脂質異常症治療薬 (スタチン、その他)。循環器治療薬ファーストブック, 2010 年 3 月 10 日発行, 51-55.
  13. 竹本稔, 横手幸太郎 (2010) 生活習慣病の管理。循環器治療薬ファーストブック, 2010 年 3 月 10 日発行, 173-184.
  14. 横手幸太郎 (2010) 包括的治療としてのメタボリックシンドローム対策。循環 plus, 10, 10-12.
  15. 越坂理也、横手幸太郎 (2010) リポ蛋白

- 異常の診断アプローチ。動脈硬化予防, 9, 12-18.
16. 横手幸太郎 (2010) 動脈硬化生疾患予防のための高齢者に対する脂質異常症の治療。Medico, 41, 4, 128-132.
17. 横手幸太郎 (2010) 喫煙は脂質代謝に影響を及ぼすか? Life Style Medicine, 4, 2, 37-42.
18. 石川崇広、藤本昌紀、竹本稔、横手幸太郎 (2010) これからの治療と診療体制 3 薬物療法: ②抗肥満作用のある各種薬剤。治療学, 2010年4月10日発行, 44, 4, 78-81.
19. 佐久間一基、竹本稔、横手幸太郎 (2010) 治療法①「生活週間の改善」について。脂質異常症 こう診る・こう考える, 27-38.
20. 鶴谷悠也、藤本昌紀、竹本稔、横手幸太郎 (2010) 脂質代謝改善薬としての抗肥満薬の可能性。Mebio, 27, 5, 128-135.
21. 横手幸太郎 (2010) CKD と動脈硬化。循環 plus, 10, 7, 2-6.
22. 横手幸太郎 (2010) LDL コレステロールの測定: 直接法か計算法か? 千葉県医師会雑誌, 62, 806, 187-188.
23. 北原綾、藤本昌紀、横手幸太郎 (2010) 特集: 運動と生活習慣病のかかわりにせまる。運動継続の達成方法にせまる。Life Style Medicine, 4, 3, 40-47.
24. 本城聡、横手幸太郎 (2010) Werner 症候群における軟部組織石灰化について。老年医学 update 2010-11, 68-72
25. 藤本昌紀、横手幸太郎 (2010) 新規エネルギー代謝抑制因子 Twist1 の活性調節機構およびクロマチン会合分子群網羅的解析。THERAPEUTIC RESEARCH, 31, 6, 776-780.
26. 横手幸太郎 (2010) 糖尿病患者への脂質コントロールは早期から抗動脈硬化作用が得られる。日経メディカル, 7, 54-55
27. 横手幸太郎 (2010) 血小板由来増殖因子 (PDGF) 日本臨床, 68, 増刊号 7, 110-113.
28. 横手幸太郎 (2010) 脂質管理。月刊糖尿病, 2, 9, 115-122.
29. 竹本稔、横手幸太郎 (2010) メタボリックシンドロームにおけるリポ蛋白代謝異常の分子機構。医学のあゆみ, 234, 7, 8, 769-774.
30. 間山貴文、龍野一郎、横手幸太郎 (2010) 高脂血症。GUIDELINE 膠原病・リウマチ・治療ガイドラインをどう読むか。改訂第2版, 172-178
31. 横手幸太郎 (2010) 薬物治療による HDL 上昇の臨床的有用性・ナイアシンを中心に。The Lipid, 21, 3, 90-91.
32. 鶴谷悠也、藤本昌紀、横手幸太郎 (2010) 基礎疾患なく、後天的に LCAT 欠損症様の著しい低コレステロール血症を来した1例。PM 基礎・治療, 30, 7, 214-221.
33. 横手幸太郎 (2010) 細胞増殖・代謝制御と動脈硬化症。The Lipid, 21, 4, 68-75.
34. 横手幸太郎 (2010) 動脈硬化とメタボリックシンドローム。メディコピア 51, 動脈硬化をめぐって 予防と治療の新しい展開, FUJIREBIO INC, 28-39.
35. 横手幸太郎 (2010) 糖尿病・IGT におけるスタチンの役割: 臨床的立場から。Medical View Point, 31, 第11号, 5.
36. 北本匠、横手幸太郎、江草玄士、大内尉義 (2010) 日常診療における高齢者の脂質管理と今後の課題。Geriat. Med. 48(9): 1223-1235.
37. 王子剛、竹本稔、横手幸太郎 (2010) 高血圧合併症としての脂質異常症の治療。

- 心血管リスクを防ぐ！高血圧診療ガイド，南山堂，194-201.
38. 櫻井健一、横手幸太郎 (2010) I. 糖尿病網膜症 持論 糖尿病網膜症と心血管イベント。糖尿病性細小血管症 (第2版) - 発症・進展制御の最前線-, 日本臨床, 68, 9, 354-357.
39. 滝口朋子、竹本稔、横手幸太郎 (2010) 糖尿病・高血圧合併例の脂質異常コントロール。日本医事新報, 4505, 36-38.
40. 横手幸太郎 (2010) 【脂質異常症】プロブコール。治療、南山堂、92, 2699-2703.
41. 横手幸太郎 (2010) 特集：血管細胞のシグナリング機構 細胞増殖制御分子と動脈硬化。細胞 The CELL、ニューサイエンス社、42, 13, 4 (530) -7 (533) .
42. 竹本稔、横手幸太郎 (2010) メタボリックシンドロームにおけるリポ蛋白代謝異常の分子機構。医学のあゆみ、医歯薬出版株式会社、234, 7, 8, 769-774.
43. 竹本稔、Christer Betsholtz、横手幸太郎 (2010) 糖尿病性腎症の機序解明に向けた大規模な糸球体特異的遺伝子の同定と機能解析。糖尿病、医学出版、53, 221-223.
44. 横手幸太郎 (2010) Werner 症候群。今日の診断指針, 6, 1219-1221

## 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。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てきた。試験実施にあたり、研究者とともにこれを行う組織の構築が必要であり、オペレーション、プロジェクトリーダー、リサーチナース、モニタリング、監査、安全管理者などを配置し、実施に向けての体制整備を行った。また、このための SOP の整備も同時に行った。

### A. 研究目的

臨床研究実施体制の整備

### B. 研究方法

本研究においては、以下の検討を行った。

1. 実施体制の整備
2. SOP の整備

（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。

### C. 研究結果

1. 試験実施のための組織の構築を行った。
  - ① オペレーションの配置
  - ② プロジェクトリーダーの配置
  - ③ リサーチナースの配置
  - ④ モニターの配置
  - ⑤ 監査の配置

### ⑥ 安全管理者の配置

### 2. SOP の整備

- ① 上記組織の整備とともにこれらを適切に運営するための各種 SOP の整備を行った。
- ② CPC 使用のための SOP も整備した。

### D. 考察

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組織の整備とこれに伴う SOP の整備を実施した。本研究はいわゆるトランスレーショナルリサーチに相当し、基礎研究を臨床へ持っていきための過程が必ずしも容易ではなくこれを支える体制が重要である。また、今後のデータの信頼性についてはデータマネージメントを適切に行うためのシステムを利用することも必要である。

E. 結論

試験実施にあたり、研究者とともにこれを行う組織の構築が必要であり、オペレーション、プロジェクトリーダー、リサーチナース、モニタリング、監査、安全性管理者などを配置し、実施に向けての

体制整備を行った。また、このための SOP の整備も同時に行った。

F. 研究発表

なし

標準業務手順書

千葉大学医学部附属病院

No.	改訂回数	タイトル	作成年月日
001	01	治験調整医師の業務に関する手順書	2011/2/28
002	01	治験調整医師への業務委嘱に関する手順書	2011/2/28
003	01	治験実施計画書の作成に関する手順書	2011/2/28
004	01	治験薬概要書の作成に関する手順書	2011/2/28
005	01	同意説明文書の作成に関する手順書	2011/2/28
006	01	記録の保存に関する手順書	2011/2/28
007	01	安全性情報の収集に関する手順書	2011/2/28
008	01	モニタリングに関する手順書	2011/2/28
009	01	監査に関する手順書	2011/2/28
010	01	データマネジメント業務に関する手順書 010-1 データマネジメント業務に関する手順 010-2 症例報告書の見本等の作成に関する手順 010-3 DM 計画書及びDM 報告書の作成に関する手順	2011/2/28
011	01	被験者の登録に関する手順書	2011/2/28
012	01	総括報告書の作成に関する手順書	2011/2/28
013	01	統計解析に関する手順書	2011/2/28
014	01	治験薬の割付に関する手順書	2011/2/28
015	01	緊急コードの開封に関する手順書	2011/2/28
016	01	被験者の健康被害補償に関する手順書	2011/2/28
017	01	効果安全性評価委員会の設置に関する手順書	2011/2/28
018	01	効果安全性評価委員会の審議に関する手順書	2011/2/28
019	01	コード開鍵（キーオープン）に関する標準業務手順書	2011/2/28
020	01	治験薬の管理に関する手順書	2011/2/28
021	01	治験薬の提供及び管理に関する標準業務手順書	2011/2/28



### 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
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.	In press		2011
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.	In press		2011
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.	102	229-231	2011
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.	30	28-32	2010
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.	17	1177-1181.	2010
Takahashi M, Bujo H, Jiang M, Noike H, Saito Y, Shirai K. 2010; 210: 581-584.	Enhanced circulating soluble LR11 in patients with coronary organic stenosis.	Atherosclerosis.	210	581-584	2010
Shirai K, Song M, Suzuki J, Kurosu T, Oyama T, Nagayama D, Miyashita Y, Yamamura S, Takahashi M.	Contradictory Effects of $\beta$ 1- and $\alpha$ 1-Adrenergic Receptor Blockers on Cardio-Ankle Vascular Stiffness Index (CAVI).	J Atheroscler Thromb.	18	49-55	2011

Yokoyama T, Tosa Y, Kadomatsu K, Sato K, Hosaka Y.	A novel approach for preventing the development of persistent vasospasms after microsurgery for the extremities: intermittent topical lidocaine application.	J Reconstr Microsurg.	26	79-85	2010
Koizumi T, Negishi M, Nakamura S, Oguro H, Satoh K, Ichinose M, Iwama A.	Depletion of Dnmt1-associated protein 1 triggers DNA damage and compromises the proliferative capacity of hematopoietic stem cells.	Int J Hematol.	91	611-619	2010
Mitsukawa N, Satoh K, Morishita T	Le Fort I distraction using internal devices for maxillary hypoplasia in patients with cleft lip, palate, and alveolus: complications and their prevention and management.	J Craniofac Surg.	21	1428-1430	2010
Mitsukawa N, Satoh K.	Midfacial distraction using a transfacial pinning technique for syndromic craniosynostosis with obstructive respiratory disorders.	J Plast Reconstr Aesthet Surg.	63	1990-1994	2010
Mitsukawa N, Satoh K.	Maxillomandibular distraction osteogenesis for Marshall-Smith syndrome.	J Plast Reconstr Aesthet Surg.	63	e611-614	2010
Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, Lokshin M, Hosokawa H, Nakayama T, Suzuki Y, Sugano S, Sato E, Nagao T, Yokote K, Tatsuno I, Prives C.	Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species.	Proc Natl Acad Sci USA	107	7461-7466	2010
Isose S, Misawa S, Sakurai K, Kanai K, Shibuya K, Sekiguchi Y, Nasu S, Noto Y, Fujimaki Y, Yokote K, Kuwabara S.	Mexiletine suppresses nodal persistent sodium currents in sensory axons of patients with neuropathic pain.	ClinNeurophysiol.	121	719-724	2010
Ogiwara Y, Mori S, Iwama M, Sawabe M, Takemoto M, Kanazawa N, Furuta K, Fukuda I, Kondo Y, Kimbara Y, Tamura Y, Chiba Y, Araki A, Yokote K,	Hypoglycemia due to ectopic secretion of insulin-like growth factor-I in a patient with an isolated sarcoidosis of the spleen.	Endocr J.	57	325-330	2010

Maruyama N, Ito H.					
Kimura K, Shimano H, Yokote K, Urashima M, Teramoto T.	Effects of Pitavastatin (LIVALO Tablet) on the Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) in Hypercholesterolemic Patients with Chronic Kidney Disease.	J Atheroscler Thromb.	17	601-609	2010
Shimoyama T, Hiraoka S. Takemoto M, Koshizaka M, Tokuyama H, Tokuyama T, Watanabe A, Fujimoto M, Kawamura H, Sato S, Tsurutani Y, Saito Y, Perbal B, Koseki H, Yokote K.	CCN3 Inhibits Neointimal Hyperplasia Through Modulation of Smooth Muscle Cell Growth and Migration.	Arterioscler Thromb Vasc Biol.	30	675-682	2010