

2011/4004A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武城 英明

平成 24 (2012) 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自家移植後の臨床的評価の検討	
東邦大学医療センター佐倉病院	白井 厚治
	-----13
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
	-----16
3. TGF- β /Smad3 シグナルによる脂肪細胞分化抑制機構	
千葉大学大学院医学研究院	横手幸太郎
	-----23
4. 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
	-----29

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

研究代表者 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である家族性LCAT欠損症に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。今年度は、昨年度遺伝性疾患遺伝子治療臨床研究作業委員会（作業委員会）において指摘を受けた追加検討課題について検討を実施した。LCAT欠損マウスモデルの繁殖・飼育体制を整え、主要な指摘事項であったモデル動物での薬効解析を開始した。検討の結果、hLCAT遺伝子導入マウス前脂肪細胞の移植により、hLCATに対する免疫反応が惹起され、抗体の出現を確認した。免疫抑制剤の投与により、マウス血中へのhLCAT分泌をウェスタンブロット、活性測定により確認することが可能となった。また、hLCATが機能する血中HDL分画においてコレステロールエステル比の上昇を認めた。国内外の研究機関の協力の下で集められたLCAT欠損症例全ての血清でヒト前脂肪細胞の産生するLCAT蛋白がHDLの成熟化へ作用した。血清リポ蛋白解析から、家族性LCAT欠損症の予後を規定する腎機能障害に関連したリポ蛋白の変動を同定し、本治療法適応前後の病態把握、薬効評価に有用と考えられた。遺伝子導入前脂肪細胞の移植生着率向上に向けて、多血小板血漿（PRP）ゲルが移植細胞のアポトーシスを抑制することから、移植カクテルとして移植効率を向上することに有用と考えられた。これらの研究成果を元に、遺伝子治療臨床研究実施に向け、現在厚生労働省において審議中の遺伝子治療臨床研究実施計画書の改訂を行う。本遺伝子細胞治療技術はさまざまな酵素欠損症の移植技術に有用であることが明らかになり、今後さまざまな酵素補充療法に応用する予定である。

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
医学部附属病院未来開拓センター特任准教授）

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。本研究の目的は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を確立することである。

これまでの一連の研究成績から、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

A. 研究目的

ライソゾーム病等の難治性遺伝病は根本的

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、本治療法の有用性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示した。

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 の向上に貢献することが期待される。さらにこの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では合併症の進展を十分に抑制できない難病に適用することで、患者予後を改善し、自己注射・頻回来院などの患者負担を軽減し治療の質や QOL を向上することが期待される。

本研究はこの技術を根本的治療法がなく腎不全に至る家族性 LCAT 欠損症を対象として、世界で初めて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至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* での多面的検討が求められる。

これまでの研究において 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 23 年度は、22 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、23 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

平成 22 年度の結果より、臨床で使用される組織接着剤であるフィブリンゲルがマウス移植モデルにおいて細胞の移植生着を促進することを明らかにした。フィブリンゲルは既承認の医薬品であるが、自己血由来ではないこと、また過去の研究成果から VEGF、bFGF など増殖因子の添加が移植細胞のさらなる生着促進に寄与すると期待できる。LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞移植後の薬効の向上を目指し、その移

植生着への応用研究として各種増殖因子を含有する多血小板血漿ゲル (PRP ゲル) の使用可能性について形成外科学 (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

昨年度の厚生科学審議会・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行った。また、国内外の研究機関のご協力の下、LCAT 欠損症の症例について、本治療法の治療反応性、効果評価のための基礎検討を実施した。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。

遺伝子治療臨床研究実施に向けて、「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」に準拠研究を実施した。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実施した。

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) 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、その生着促進に働くと思われる自己のサイトカインを豊富に含有する PRP を添加することで生着率向上が可能かどうかを検討した。

平成 22 年度から継続してきた *in vitro* でのフィブリンゲルを用いた三次元培養を細胞の生存率検討に応用した。この検討により、前脂肪細胞の 12 週間の継続培養評価が可能となった。フィブリンゲルの縮小度と細胞の生存率に相関が認められ、細胞の密度の増加とともに自発的な脂肪細胞分化を確認した (Aoyagi et al. *ECR 2012*)。

この検討結果を元に、まず三次元培養で PRP の添加による細胞生存率の評価を行った。その結果 PRP は有意にフィブリンゲルの縮小と細胞死を抑制した。PRP はヒト前脂肪細胞の増殖を 5% まで濃度依存的に、かつ同濃度の FBS に比べて、有意に亢進した。また、低血清条件、または TNF- α /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した。その作用機序を検討した結果、PRP は種々の細胞でアポトーシス誘導に機能する DAPK1、BIM 遺伝子の発現を抑制した（詳細は佐藤兼重分担研究報告書参照）。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（Fukaya et al. *EMM in press*）。

以上のことから、自己 PRP gel を細胞移植に使用することで、scaffold 供給、growth factor 供給の多面的な効果が得られ、遺伝子導入前脂肪細胞の薬効発現の向上が期待できる。

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

平成 22 年度から厚生労働省への申請段階に入り、本年度は作業委員会からの主な指摘事項に対する以下の検討を実施した。

- 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 サル脂肪組織を含めた大動物試験の可能性についての検討

2) 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、前脂肪細胞が脂肪細胞以外に分化する能力を有しているかどうかを検討した。その結果、分化刺激を加えることにより、骨芽細胞への分化能を、細胞の染色および、遺伝子発現解析により確認した。脂肪細胞と骨芽細胞は細胞 lineage が近いことが知られているが、前脂肪細胞は三次元培養により自発的に脂肪細胞に分化することから、脂肪細胞 lineage に入った

状態ではあるが、骨分化試薬によりトランスジェンファレンションを起こしたと考えられる。

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昨年度 8 月より実施し、今年度から移植実験への使用が可能となった。繁殖維持を繰り返しながら、薬効試験を実施した。

マウスでの薬効評価のため、マウス LCAT 遺伝子 (mLCAT) を搭載したレトロウイルスベクターを作製し、マウス前脂肪細胞への mLCAT 遺伝子導入とその後の細胞特性を解析した。その結果、hLCAT に比べて細胞外への分泌が低く、培養上清中に免疫学的にはわずかに検出されるものの、活性を検出することができなかった。このため移植実験において薬効解析には使用できないと判断し、hLCAT 遺伝子を使用することとした。

KO マウスへの移植実験の結果、移植 7 日後までは、血中に hLCAT を検出したが、その後検出できなくなり、検討の結果 hLCAT に対する抗体の出現を確認した。そこで、免疫抑制剤（シクロフォスファミド）を併用する薬効試験を実施した。その結果、移植 7 日以降も、血中に hLCAT を検出することが可能となった（図 1A）。さらに血中に LCAT 活性（コレステロールのエステル化活性）を検出した（図 1B）。その活性はヒト ApoAI の存在下で活性化されることから、血中に検出された hLCAT は活性体としてマウス血中に分泌されていることが分かった。移植 7 日後の血清検体についてリポ蛋白の分画解析を実施したところ、HDL 分画の

コレステロールエステル比の上昇を認め(図2)、免疫排除機構を抑制した実験系において薬効を認めた。生理学的に LCAT を産生する臓器は肝臓であるが、以上の結果により前脂肪細胞が異所性に産生する LCAT は、本研究が目的とする LCAT 欠損症の病態の改善に機能し得ることが示唆された。昨年度までの研究成果から B6 マウスにおいて 1 ヶ月の持続分泌を確認しており、免疫抑制剤を用いることでの KO マウスでの最終的な長期薬効が十分に期待できると考えられる。薬効評価には免疫抑制剤の使用が必須であり、免疫抑制を確保できる用量はすなわちリンパ球の増殖を抑制する用量であることから、安全性は免疫抑制剤を使用せずに実施した B6 マウスでの移植検討結果も合わせて慎重に評価する予定である。

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、薬効評価系の確立

LCAT 欠損症は現在まで報告されているだけでも 70 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。

国内外の研究機関関連病院のご協力の下、LCAT 欠損症患者血清(魚眼病、家族性 LCAT 欠損症それぞれ 4 症例)について、HDL 粒子の成熟を指標とした治療反応性評価を実施した。昨年度は腎機能障害を合併しない魚眼病 1 症例のみであったが、腎機能障害を合併する家族性 LCAT 欠損症症例を含め合計 8 症例の検討をすることができた。その結果、全ての患者血清において、ApoA-I 含有 HDL が前脂肪細胞の産生する rLCAT の添加により高分子側にシフトすること、すなわち HDL の成熟が起こることを確認した(図3)。少なくとも検討できた症例については、前脂肪細胞が分泌する LCAT 蛋白

が、患者の病態を改善できることを示唆している。

4) カニクイザルにおける細胞調製の検討

II-1) 項で記載した指摘事項③に関して、2 個体のカニクイザルより鼠蹊部の脂肪組織を入手し、前脂肪細胞の調製と遺伝子導入、その後の継代培養を行った。過去の検討結果から 20%FBS を含む DMEM/HAM-F12 培地での培養では 1 ヶ月以内に移植細胞数に到達しないことが分かっていたため、ヒト前脂肪細胞と同様の MesenPRO 培地での培養法を検討した。その結果、MesenPRO を用いてもヒト前脂肪細胞で認められた増殖性能の向上は認められなかった。従って、ヒト前脂肪細胞とは増殖特性が異なることが明らかとなった。今後、カニクイザル等での安全性試験を実施するには、培養条件の改良、もしくは他家移植を考慮する必要がある。

5) LCAT 欠損症の病態に関与するリポ蛋白の解析

LCAT 欠損症は希少疾病であると共に、原因となる LCAT 遺伝子変異が多数同定されており、その病態にも多様性がある。特に患者の予後を規定する腎不全とその原因となるリポ蛋白を同定解析することは、LCAT 欠損症の病態解析のみならず、本研究の目的とする臨床導入時の患者診断や治療実施後の臨床評価に不可欠である。自治医科大学、北里大学、オランダアムステルダム大学アカデミックメディカルセンターから提供頂いた症例検体を解析した。

1. 用いた症例

今回の解析に用いた症例は、前述の魚眼病、家族性 LCAT 欠損症それぞれ 4 検体で、国内 3 症例(千葉大、自治医大、北里大)、オランダ 5 症例(アムステルダム大学アカデミックメディ

カルセナー)であり、それに健常人の4検体を加えた合計12検体で実施した。LCAT欠損症例の内訳は家族性LCAT欠損症 (FLD) 4症例、魚眼病 (FED) 4症例である。いずれも血清におけるLCAT α 活性は健常人の1~2%程度であった。また、リポ蛋白二次元電気泳動とApoAIウェスタンブロット解析においてHDLの著しい成熟障害が認められた。

2. 腎不全合併、非合併症例のリポ蛋白ゲル濾過分画解析

LCAT欠損症の病態とリポ蛋白異常との相関を検討するため、リポ蛋白の粒子サイズに着目し、それぞれの血清検体をゲル濾過で20個に分画し、それぞれの分画における総コレステロール (TC)、遊離コレステロール (FC)、トリグリセリド (TG)、リン脂質 (PL) の定量を行った。その結果、同じ変異 (C313Y) を持ちながら、腎不全の合併症例と非合併症例において、粒子サイズの大きな分画 (VLDL、LDL相当分画) に明瞭な相違を認めた (図4)。

3. 新規国内症例の同定と脂肪制限食事治療の効果

国内で新規家族性LCAT欠損症症例を経験した。61歳の女性。全身浮腫とネフローゼ症候群の疑いで北里大学病院腎臓内科に入院し、一週間の蛋白制限食による食事療法による腎機能の改善が認められず、その後LCAT欠損を疑い、脂肪制限食での食事療法に変更、腎機能 (クレアチニン、尿蛋白値) に改善が認められた。遺伝子解析を実施し、本症例においてC74Yという新規変異を同定した。LCAT蛋白においてHDL、LDLの認識を担うLid regionの形成に必要なジスルフィド結合を欠損する変異体であった。

脂肪制限食による食事療法の効果について

検討した。脂肪制限食による食事療法の前後の血清についてリポ蛋白ゲル濾過分画解析を実施した。その結果、粒子サイズの大きな分画 (VLDL、LDL相当分画) においてリポ蛋白の減少を認めた (図5)。

以上の解析から、腎機能障害の発現には、フラクション11までに認められる比較的サイズの大きいリポ蛋白が関与することが示唆された。

4. FLD、FED症例のリポ蛋白サイズ異常に関する解析

他の症例についても同様に解析を進め、健常人血清との相違に傾向が認められるかどうかを検討した (図6A)。この結果、フラクション10までについて、健常人では5と9にピークを持つリポ蛋白粒子が存在しているのに対して、腎機能障害を合併しない病態であるFEDでは8にピークが移動し、さらに5のピークが不明瞭になること、腎機能障害を合併するFLDでは、5と8にピークを持つ粒子が存在していることが分かった (図6B)。

TG、PLの含有率も健常人とは異なり、これらの異常リポ蛋白が腎機能障害を含めたLCAT欠損症の病態と予後に関与することが考えられた。今後、異なる症例を検討すると共に、前脂肪細胞の産生するLCAT蛋白がこのリポ蛋白プロファイルにどのような質的変化をもたらすかを検討し、治療後の臨床評価法として発展させる予定である。

E. 結論

本年度の検討から、厚生労働省・遺伝子治療作業委員会からの指摘事項の中で最も重要な課題であったLCAT欠損モデルマウスでの薬効検出ができた。現在、再申請に向けた最終段階の検討を実施している。

また、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 蛋白は検討した全ての 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。

しかしながら、LCAT 欠損モデルマウスで抗体出現を認めたことから、LCAT 蛋白を全く血中に分泌しない病態への適応は困難であると考えられる。

現在実施申請中の遺伝子治療臨床研究における治療適応患者については、患者血清に対する LCAT 蛋白の反応性評価による患者選択とともに LCAT を全く血中に分泌しない病態は除外することを考慮する。

前脂肪細胞の移植カクテルとして自己のフィブリンゲルである PRP ゲルの有用性を明らかにした。最終的な動物移植実験での製剤化検討を経て、臨床研究プロトコールへの適応を考慮したい。

国内外の LCAT 欠損症患者血清のリポ蛋白ゲルろ過解析から、腎機能障害に關与する異常リポ蛋白を同定した。この方法で患者の詳細な病態把握と臨床薬効評価が可能であり、遺伝子治療臨床研究における病態・治療効果評価法として導入を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukaya Y, Kuroda M, Aoyagi Y, Asada S, Kubota Y, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Satoh K, Bujo H. *Exp Mol Med*. 2012; in press.
- 2) Aoyagi Y, Kuroda M, Asada S, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Aso M, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Bujo H. *Exp Cell Res*. 2012;318:8-15.
- 3) Kuroda M, Bujo H, Aso M, Saito Y. *J*

Diabet Invest. 2011;2:333-340.

- 4) Katayama A, Wada J, Usui-Kataoka H, Yamasaki H, Teshigawara S, Terami T, Inoue K, Kanzaki M, Murakami K, Nakatsuka A, Sugiyama H, Koide N, Bujo H, Makino H. *NDT Plus*. 2011;4:299-302
- 5) Asada S, Kuroda M, Aoyagi Y, Fukaya Y, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Aso M, Satoh K, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Bujo H. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;301:C181-C185.

2. 著書

- 1) 黒田正幸、武城英明. *Curr Ther*. 2012;30:264-265

3. 学会発表等

- 1) Kuroda M, Asada S, Aoyagi S, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Aso M, Saito Y, Bujo H. (2011) Proliferative Adipocytes as Therapeutic Gene Vehicle toward Sustained Protein Replacement Therapy. The American Society of Gene & Cell Therapy (ASGCT) 14th Annual Meeting. Seattle. WA.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

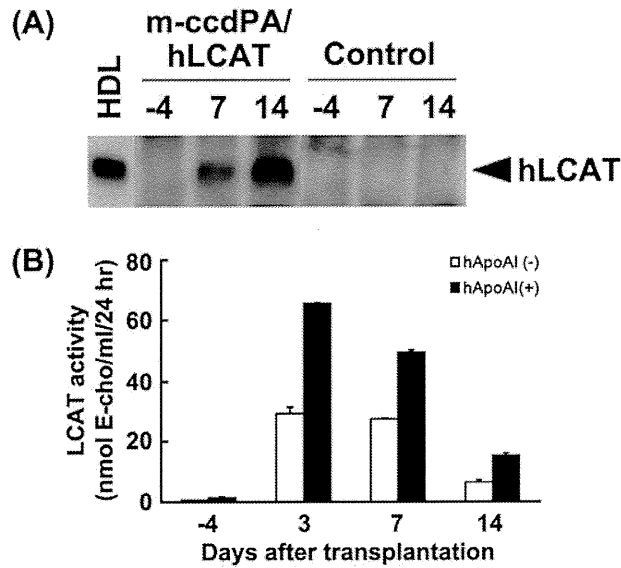


図 1. LCAT-KO マウス移植モデルにおける hLCAT の分泌

免疫抑制剤の投与下、hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞 (m-ccdPA) を LCAT-KO マウスに移植し、移植前 4 日前 (-4)、移植 3 日後 (3)、移植 7 日後 (7)、14 日後 (14) の血清を採取、血中への分泌 (A、IP-Western Blot) と血中での LCAT 活性 (B) を測定した。

(A) IP-Western に用いた血清量は 14 日後の検体は 100 μ l、その他は 10 μ l である。HDL を hLCAT ポジティブコントロールとして使用した。

(B) ヒト ApoAI の存在下 (□)、非存在下 (■) で活性を測定し、ヒト ApoAI 存在下での活性増強を認めた。

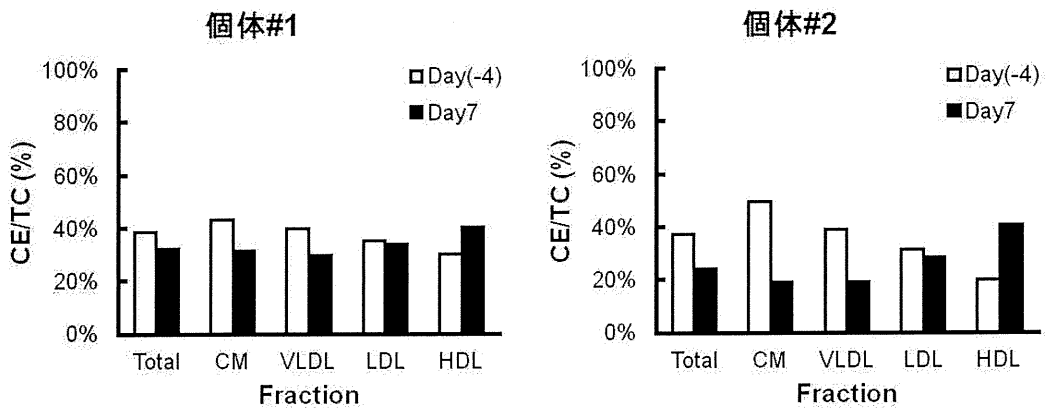


図 2. LCAT-KO マウス移植モデルにおけるコレステロールエステル比の変化

図 1 と同条件で移植実験を実施し、移植 4 日前と移植 7 日後の血清についてリポ蛋白ゲルろ過解析を実施し、CM、VLDL、LDL、HDL の 4 分画について総コレステロールと遊離コレステロール濃度を定量し、コレステロールエステル比 (CE/TC) を算出した。検討した 2 個体についていずれも HDL 分画における CE/TC 比の上昇を認めた。

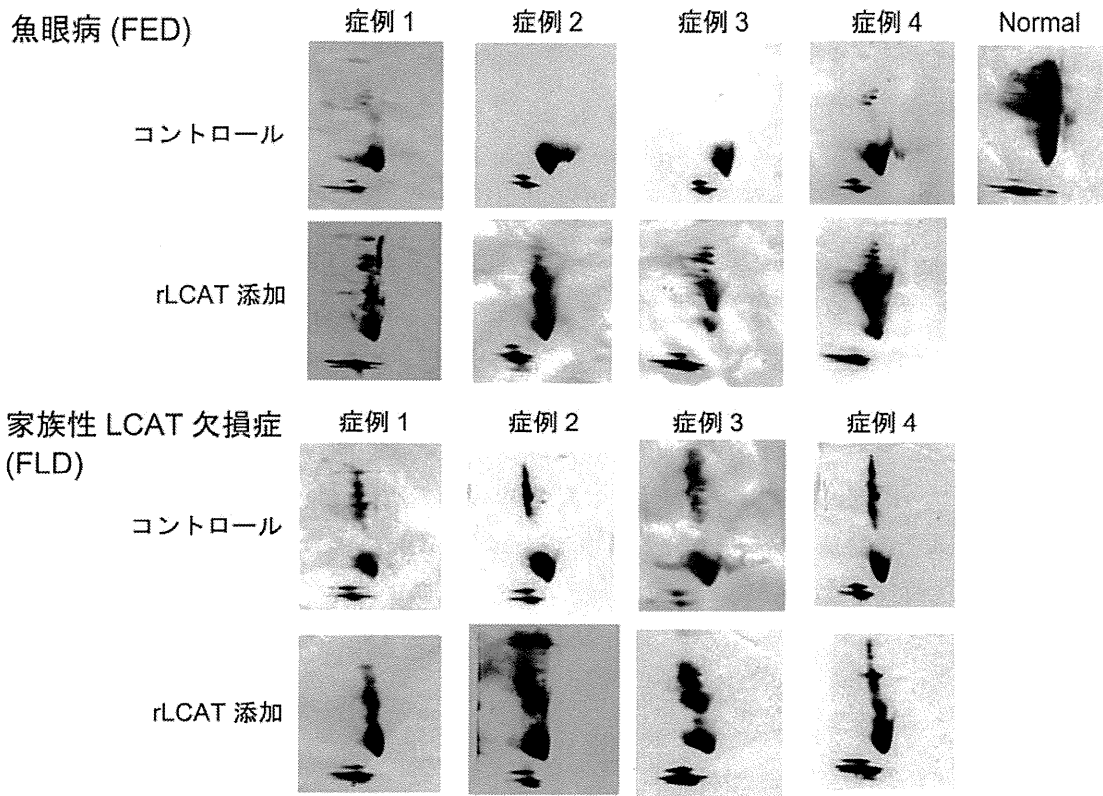


図 3. LCAT 欠損症患者血清への rLCAT 添加による患者 HDL の成熟化
 魚眼病 4 症例、家族性 LCAT 欠損症 4 症例について患者血清に前脂肪細胞が産生した rLCAT
 を添加インキュベーション後、HDL の成熟を二次元電気泳動後の ApoAI の検出により行った。

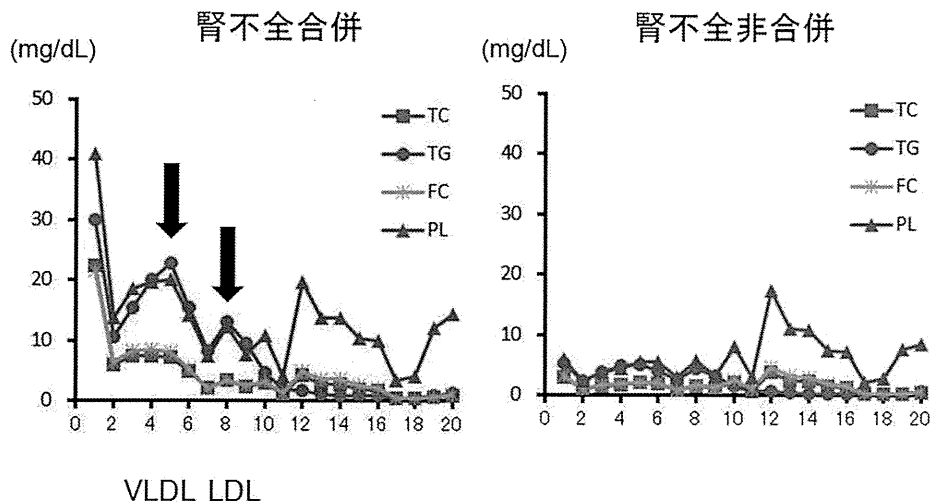


図 4. 腎不全合併の有無によるリポ蛋白分画への影響
 C313Y変異を有する姉妹症例（オランダ症例）についてリポ蛋白ゲル濾過分画解析を実施し
 た。

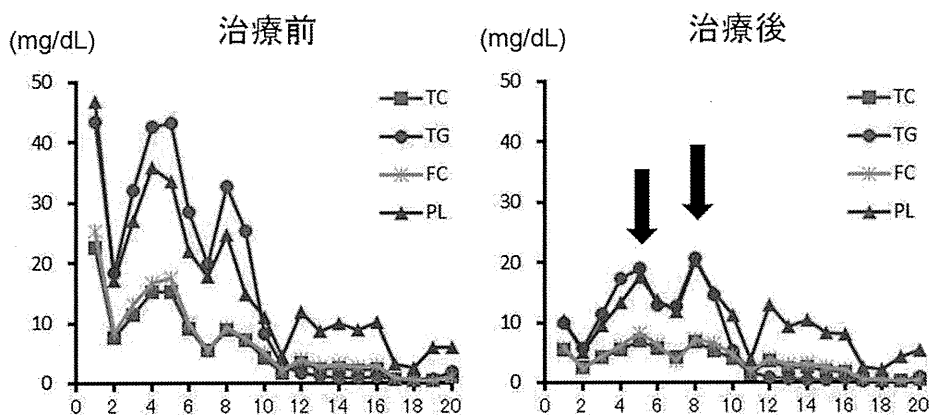


図5. C74Y変異を保持する患者における脂質制限食の効果

脂質制限による食事療法実施前後の患者血清についてリポ蛋白ゲルろ過分画解析を実施した。治療後、矢印で示すりポ蛋白の減少が認められた。

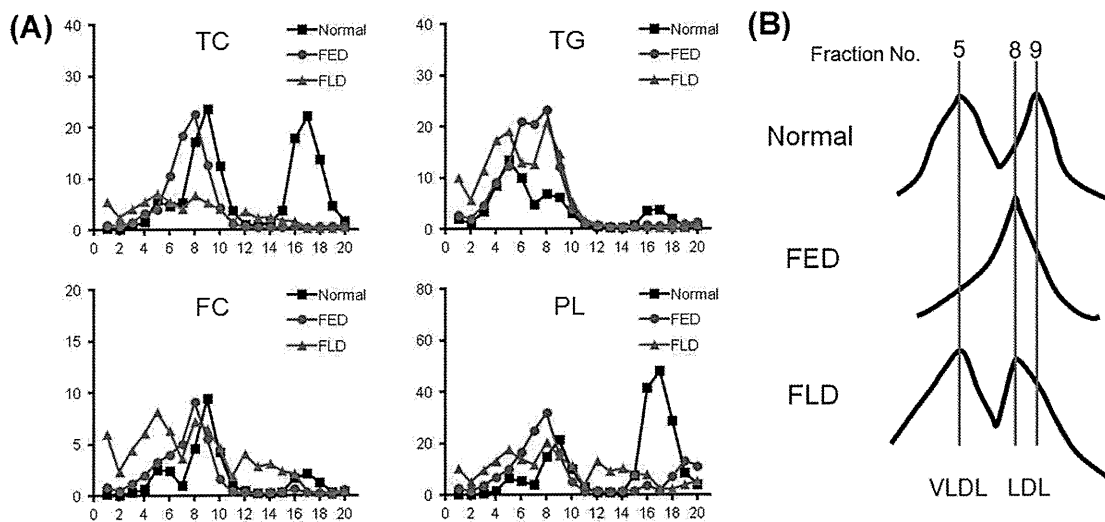


図6. FED、FLD症例におけるリポ蛋白の異常

(A) 総コレステロール (TC)、トリグリセリド (TG)、遊離コレステロール (FC)、リン脂質 (PL) について、FED、FLDの典型的な検体と健常人検体とを比較した。(B) 健常人ではVLDL、LDL分画のピークが分画5と9に認められるが、魚眼病 (FED) では5のピークが不明瞭になり、8にピークが出現する。家族性LCAT欠損症 (FLD) では、FEDに認められた8のピークに加えて、5にピークが認められた。FLDにおける5のピークを持つリポ蛋白は、健常人のその脂質組成とは明らかに異なっていた。

II. 分担研究報告

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）
分担研究報告書

LCAT遺伝子導入前脂肪細胞自家移植後の臨床的評価の検討
分担研究者：白井厚治（東邦大学医療センター佐倉病院、血管機能学）
研究協力者：齋木厚人、大平征宏、高橋真生、清水寛一

研究要旨 前脂肪細胞に遺伝子導入し、これを自家移植し欠損蛋白を発現させる方法を今回、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）欠損症患者を対象に検討を進めている。本治療の臨床効果を見ることの一つには、LCATの血中への分泌動態をみることにともなひ合併症の改善の有無をみる必要がある。LCAT欠損症の合併症の一つには、血管障害が指摘されている。この動脈への障害を定量的に見ることが出来る検査法として、心臓踝血管弾性指数（Cardio-ankle Vascular stiffness index=CAVI）が考えられる。本研究では、LCATの脂質異常と動脈硬化の関連、さらに血管障害の指標としてのCAVIの適切性を検証する

A. 研究目的

LCAT欠損症の臓器障害の一原因とされるリポ蛋白異常があり、それは、低HDLに加えて、中間型リポ蛋白の存在であり、すでにいくつかの症例で観察されている。これが存在すると腎障害などが起こりやすい事例も推測されている。一般に腎硬化症では全身の血管も動脈硬化障害が進んでおり、LCAT欠損症でも進展している可能性がある。これを定量的に計測する指標で、十分な感度、安定性、簡便、非侵襲性などの特性を持ち、経時的観測のできるものはこれまでなかった。近年開発された、心臓踝血管弾性指数（Cardio-ankle Vascular stiffness index=CAVI）は、これに当てはまる検査法と有望視されている。本研究では、CAVIが、動脈血管障害をどのくらい感知し、進展、あるいは退縮の指標となる可能性を種々な動脈硬化危険因子との関わりなどから検証した我々のこれまでの研究を再検討し、また心血管イ

ントを発症した症例について検証し、CAVIの持つ特性から、血管拘縮の果たす動脈硬化の新たな進展因子の可能性を、LCAT欠損症での血管障害に関連させ検証する。

B. 研究方法

CAVIは、すでに報告した方法に従い（1）図1参照、フクダ電子社製、VaSera1500を用い測定する。

（倫理面への配慮）

本検査法は、非侵襲的であり、かつ観察研究であり、特に倫理的に問題はない。

C.結果

1. 動脈硬化性疾患でのCAVI

我々は、脳血管障害（2）、心血管障害（3）腎硬化症（4）さらに透析患者（1）でCAVIは有意に高値を示すことを明らかにし、報告した。CAVIがいわゆる動脈硬化で高値を示すことを直

接証明することは、困難であるが、臨床的観察から、上記の種々動脈硬化性疾患で高値を示したことから、CAVIは、動脈硬化を反映すると推測された。

2. 動脈硬化危険因子とCAVI

動脈硬化危険因子については、すでに高血圧、糖尿病、脂質異常、喫煙、加齢、男性などの因子が確立されたものとして指摘されている。

CAVIは、これらいずれでも有意に高値を示した(1, 6, 7)。これらからCAVIに反映される血管弾性には、これらリスクファクターとして知られているもののほとんどすべてが、亢進的に作用していることが明らかにされた(図3)。

このことは、CAVI上昇に働く作用があるものは、動脈硬化促進因子としての側面がある可能性がある。よってCAVIによって、まだ知られていない動脈硬化危険因子を検出できる可能性があると考えられた。

LCAT欠損症の動脈硬化促進ありはその機序についてはまだ十分明らかでないが、血中にフリーコレステロールが増加した場合、一般にフリー型は細胞膜障害などを起こすとされており、その障害性をCAVIが観察できる可能性が示唆される。今後LCAT欠損症患者で計測を計画したい。

3. 血管イベント発生例でのCAVI推移

経時的にCAVIを測定してゆくと、CAVIが急に上昇する例が散見され、それらの中には、数か月後に、心筋梗塞、脳出血、解離性動脈瘤が発生した例を経験した(図4、5)。この詳細については、現在、300例を分析、上昇あるいは、低下

要因の分析を進めている。

しかし、 Δ CAVI0.7以上の増加では、動脈硬化危険因子の増悪がほとんどでみられ、この血管拘縮のもつ、血管イベント発生要因としての意味は、今後検証されねばならない。

D. 結論

CAVIは、動脈硬化の状況を反映するとともに、血管拘縮を示しており、これが心血管イベントの発生につながる可能性がうかがえる。

本法を用いて、今後LCAT欠損状態の血管障害の詳細を明らかにし、LCAT補充療法の効果についても検討する意味があるかを、LCAT欠損患者で検証することは、十分意味のあることと思われる

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Shirai K, Utino J, Otsuka K, Takata M. J Atheroscler Thromb. 2006;13:101-7.
2. Suzuki J, Sakakibara R, Shirai K. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2011 Aug 19. [Epub ahead of print]
3. Nakamura K, Tomaru T, Yamamura S, Miyashita Y, Shirai K, Noike H. Circ J, 2008;72:598-604.
4. Nakamura K, Iizuka T, Takahashi M, Shirai K, Noike H. J Atheroscler Thromb. 2009;16:371-9.
5. Noike H, Nakamura K, Sugiyama Y, Iizuka T, Shimizu K, Takahashi M, Hirano K, Suzuki M, Mikamo H, Nakagami T, Shirai K. J Atheroscler Thromb. 2010;17:517-25.

6. Namekata T, Suzuki K, Ishizuka N, Shirai K. BMC Cardiovasc Disord. 2011;11:51.
7. Shirai K, Hiruta N, Song M, Kurosu T, Suzuki J, Tomaru T, Miyashita Y, Saiki A, Takahashi M, Suzuki K, Takata M. J Atheroscler Thromb. 2011;18:924-38.

H. 知的財産権の出願、登録状況
なし

図 1

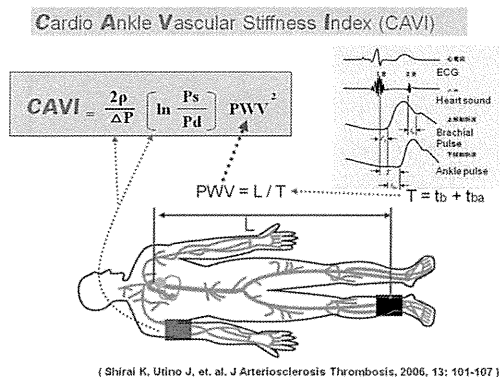


図 2

CAVIを上げる諸因子と改善因子

- | | | |
|---|------------------------|--|
| <ul style="list-style-type: none"> 1. 加齢、 男性 2. 動脈硬化性疾患
腎透析、
脳梗塞、
冠動脈疾患
慢性腎硬化症 3. 動脈硬化リスク
糖尿病、
高血圧、
脂質異常
肥満・メタボリック
症候群 4. 喫煙 5. ストレス | <p>↑ CAVI</p> <p>↓</p> | <ul style="list-style-type: none"> 1. 減量
フォーミュラ食 2. 血糖管理、
??? 3. 血圧管理
ARB, Ca拮抗
EPA 4. 脂質管理
スタチン、 5. 禁煙 |
|---|------------------------|--|

図 3

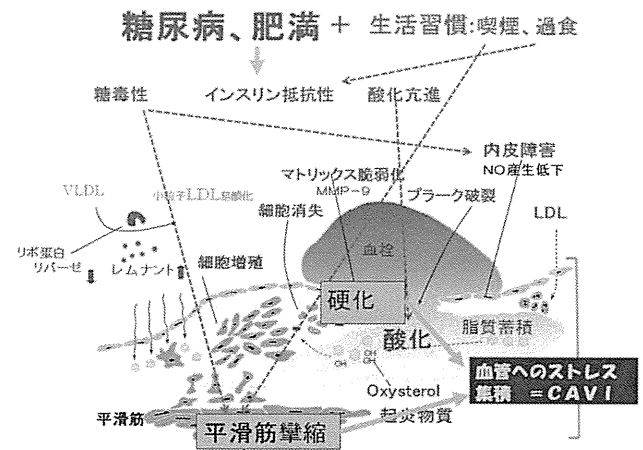


図 4

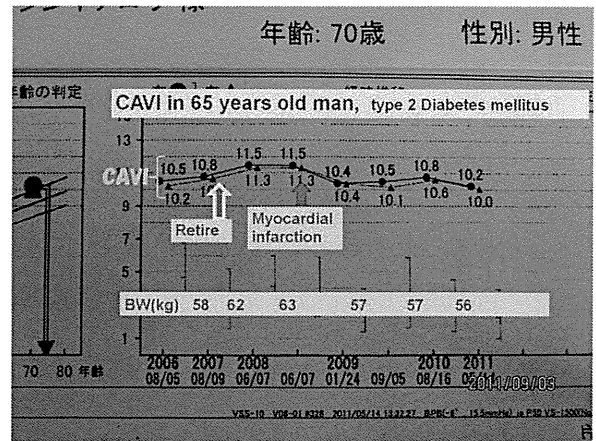
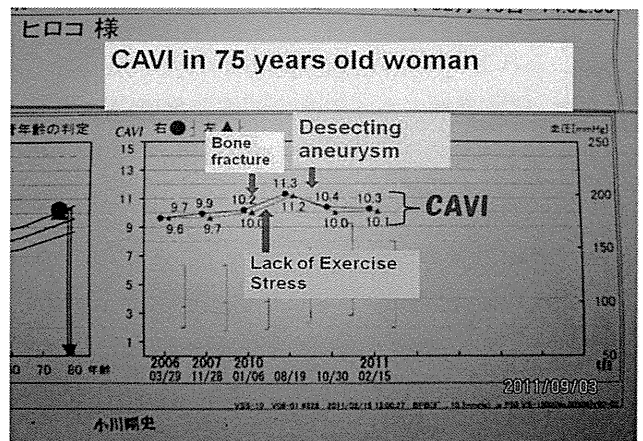


図 5



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 とサイトカイン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を明らかにしてきた。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。本研究では、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、血清飢餓状態、または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。また、その機序として、ERK1/2 のリン酸化等の抑制により、BIM, DAPK1 というアポトーシス促進に働く遺伝子の発現を抑制している可能性が考えられた。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。これまでの検討でフィブリンゲルを 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、形成外科領域でも近年注目されている多血小板血漿（PRP）が細胞移植効率を上げ、LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞移植技術にさらに貢献できるのではないかと考え検討を進めてきた。PRPには PDGF、TGF-βに代表されるサイトカインが多数含まれ、自己血から調製できる。また、含有するフィブリンによって、容易にフィ

ブリンゲルと同様のゲルを生成することが可能である。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

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。前述したように、PRP の機能としては、各種サイトカインと、フィブリンによる scaffold 形成の2つの効果が期待できるが、今回は実験による PRP の放出するサイトカインの効果の判定を明確にするため、PRP を事前にトロンビン処理し、足場を付与する機能としてのフィブリンノーゲンを除いた状態にし、サイトカインの機能のみを保持した PRP serum を調製して検討に使用した。

1) 3次元培養法による前脂肪細胞への PRP の効果

フィブリンゲルを用いた3次元培養法(青柳ら、2012)を用いて、前脂肪細胞を培養し、PRP がゲルに与える影響を FBS と比較検討した。

2) PRP 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、PPP の細胞増殖に対する効果を比較検討した。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。

3) PRP のアポトーシス抑制効果

無血清、または各種2%FBS,PRP,PPP で細胞培養し、8時間培養後のアポトーシス細胞の割合を、AnnexinV 染色を用いて、フローサイトメーター (Invitrogen, Tali) で、測定した。

さらに、アポトーシス誘導剤として

cycloheximide と TNF- α を添加し、アポトーシスを誘導した場合の FBS、PRP、PPP2%それぞれの培地での Caspase-3 活性を測定した。また、細胞の増殖とアポトーシスの制御に重要なシグナルとされる MAPK/Erk 経路の中で、ERK1/2 のリン酸化の有無を Western blotting 法にて調べた。

4) 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84個に関して PCR array を用いて行った。差のあった代表的な遺伝子を、Real time PCR により定量した。

C.研究結果

フィブリンゲルを用いた3次元培養による実験では、PRP2%では、24時間の培養でゲルの縮小が全く見られなかったが、無血清、FBS2%では、大きくゲルが縮小していた(Fig.1-A)。細胞死を反映するとされる、LDH 活性を、培地中より測定したところ、PRP2%添加細胞では、有意に LDH 活性が低く、PRP の添加による細胞死の抑制が示唆された(Fig.1-B)。

FBS と PRP の細胞増殖に対する効果を検討したところ、PRP で有意に増殖が促進され、特に PRP は低濃度から濃度依存性に細胞増殖促進効果が見られた。また、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(Fig.2)。この結果より、最も FBS と PRP の細胞増殖に差が見られる、FBS2%と PRP2%を用い、後の比較実験を行った。

FBS、PRP、PPP を含む培地で8時間培養した前脂肪細胞について AnnexinV 陽性/PI 陰性細胞(アポトーシス細胞)の割合を測定したところ、2%PRP では、有意にアポトーシス細胞の減少を

認めた(Fig.3-A)。

さらに、TNF- α と cycloheximide によるアポトーシスの誘導に対して、PRP 添加群は、FBS、PPP 添加群に対し、Caspase-3 活性の低下を認めた(Fig.3-B)。細胞の増殖、アポトーシス制御に重要なシグナルとされる、MAPK/Erk 経路の中で、アポトーシスの刺激により FBS 群では ERK2 のリン酸化が早期に見られたが、PRP 添加群では、ERK2 のリン酸化が有意に低下していた(Fig4)。

PRP 添加による前脂肪細胞の遺伝子発現を、FBS 添加細胞と比較したところ、PRP 群で BIM, DAPK1 遺伝子に著明な発現低下を認めた(Fig.5)。この2つの遺伝子に関して、その mRNA 量を Real-time PCR により定量した。コントロール(serum-)に対し、DAPK1 は FBS2%で 20.4%、PRP2%は 93.6%の発現低下を認めた。BIM も同様にコントロールに対し、FBS2%で 54.1%、PRP2%は 87.2%の低下を認めた(Fig.6)。

D. 考察

本研究によって、PRP が前脂肪細胞に対し細胞増殖効果と細胞死(アポトーシス)抑制効果を示すことが明らかとなった。移植カクテルに PRP を添加することにより、移植初期の前脂肪細胞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- β など多種のサイトカインが含まれている。このような自己のサイトカインを使用することは、移植における感染リスクの軽減にも非常に有用であると考えている。

ERK1/2 のリン酸化は、細胞の増殖、分化およびアポトーシスを制御すると考えられているが、われわれの用いている前脂肪細胞に関しては、詳しい研究は行われていなかった。本研究により、

アポトーシス刺激(血清飢餓、または薬剤など)が、前脂肪細胞において ERK1/2 のリン酸化を引き起こし、それがアポトーシス誘導因子である BIM, DAPK1 の発現を増加させていること、また PRP はその ERK1/2 のリン酸化を抑制し、BIM, DAPK1 の発現を低下させることで、アポトーシスを抑制している可能性が示された。

E. 結論

PRP (多血小板血漿)は、前脂肪細胞の増殖を促進し、細胞死を抑制した。フィブリンゲルが移植細胞の Scaffold として機能することが示されていることから、自己血由来の PRP ゲルは本研究の目指す前脂肪細胞移植治療における移植カクテルとして適していることが考えられる。今後動物実験における検証を行い、移植用カクテルの確立を目指す予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukaya Y, Kuroda M, Aoyagi Y, Asada S, Kubota Y, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Satoh K, Bujo H. Platelet-rich plasma inhibits the apoptosis of highly adipogenic homogeneous preadipocytes in an *in vitro* culture system. *Exp Mol Med*. 2012; in press.
- 2) Kubota Y, Kuroki T, Akita S, Koizumi T, Hasegawa M, Rikihisa N, Mitsukawa N, Satoh K. Association between platelet location and plate removal following facial fracture repair. *Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2012;65:372-378.
- 3) Akita S, Kuroki T, Yoshimoto S, Rikihisa N, Satoh K. Reconstruction of a fingertip with a thenar perforator island flap. *J Plast Surg Hand Surg*. 2011;45:294-299.