

201114004B

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 21～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 武城 英明

平成 24 (2012) 年 3 月

目次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----25
III. 研究成果の刊行物・別冊	-----31

I. 総合研究報告

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）
総合研究報告書

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。*Ex vivo*遺伝子治療法の標的細胞として、脂肪組織から天井培養法によって調製される前脂肪細胞を選択した。前脂肪細胞は、純度が高く、脂肪細胞への分化能を高度に維持した細胞であり、皮下脂肪組織への移植に適した細胞であることが示された。さらに治療遺伝子であるLCAT遺伝子を安定持続発現する細胞であり、そのレトロウイルスベクターによる遺伝子導入様式は安全性の高いものであることが示された。前脂肪細胞の産生するLCAT蛋白はLCAT欠損マウスモデルにおいて機能し、LCAT欠損症患者血清において障害されているリポ蛋白代謝異常を改善する機能を保持していた。すなわち、異所性に前脂肪細胞が分泌するLCATが血中に補充されることによりLCAT欠損症の病態を改善することが示唆された。多血小板血漿（PRP）ゲルが前脂肪細胞のアポトーシスを抑制することを見出し、薬効の持続・向上の観点から、遺伝子導入前脂肪細胞の臨床移植カクテルとして有用であると考えられた。今後、安全性を精査した上で本治療法への応用を考慮する。本治療の臨床導入に向けて、LCATの生理学的機能に関連した臨床評価指標を見出し、患者の病態や予後、並びに移植治療前後の効果安全性の評価に有用であることが示された。これらの研究成果を元に、遺伝子治療臨床研究の承認・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。本研究での評価により、前脂肪細胞を用いた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）

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。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実用化・提案することである。

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

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。

現在までに世界中で実施されている遺伝子治療臨床試験（又は臨床研究）の内、約1割は先天性もしくは後天性の遺伝性疾患を対象としている。その内、半数の疾患は病態やその欠損酵素の特性から血中への持続的酵素補充療法が有効な治療法となり得る。本研究で実用化を目指す脂肪細胞遺伝子治療技術は、そのような患者の新規治療法として医療現場、さらには社会全体に大きく還元できると考えられる。具体的には、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。

本研究で実用化を目指す遺伝子細胞移植技術に基づく持続的酵素補充療法は、患者皮下脂

肪組織から採取した脂肪組織から増殖可能な前脂肪細胞を調製、それにレトロウイルスベクターで治療遺伝子を導入し、遺伝子導入前脂肪細胞を拡大培養した後に患者皮下脂肪組織に移植することで治療蛋白を血中に供給する治療法である（図1）。この治療法をより効果的かつ安全性の高いものとするためには、前脂肪細胞が、効率良くかつ安定に遺伝子を発現し、そして、移植部位で安定に生着することが必須である。

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。また、前脂肪細胞の詳細な特性解析も同時に必要とされる。

同時に、品質試験の一つとして*in vitro*においてLCAT遺伝子導入前脂肪細胞からLCATが培養上清中に分泌され、そのコレステロールエステル化活性を人工的なアッセイ系で確認しているが、元々LCATを産生しない前脂肪細胞が作り出す組換え型LCAT蛋白がLCAT欠損によってリポ蛋白代謝が障害されている患者血清中に補充された際に、真に病態の改善を引き起こすのかは不明である。

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*での多面的検討が求められる。

これまで、脂質代謝関連酵素の欠乏症に対する遺伝子治療研究は原発性高コレステロール

血症とりポ蛋白リパーゼ欠損症以外には知られていない。これらの疾患と LCAT 欠損症はその病態が臨床的に明らかに異なる。従って、本治療法の臨床導入には LCAT 蛋白の機能異常を反映できる臨床評価指標の確立も重要な課題である。

従って本研究では、LCAT 欠損症に対する遺伝子治療臨床研究実施に向け、LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞の機能評価と臨床研究開始後の臨床評価指標を以下の観点から精査・検討すると同時に、遺伝子治療臨床研究実施計画の申請・改訂作業を進めた。

- ① LCAT の分泌特性と薬効に関する検討
- ② 移植生着性の向上に関する検討
- ③ 移植後の有効性・安全性に関する検討
- ④ 他疾患への治療応用に関する検討
- ⑤ LCAT の生理的機能と関連した臨床有効性・安全性評価指標の検討

B. 研究方法

前述の課題を遂行するため、さらに他疾患への応用を目指して、以下のように検討を進めた。

臨床研究に向けて細胞特性、薬効（治療効果）、安全性を評価する目的で以下のように検討を行った。

1) 遺伝子導入細胞特性評価系の確立

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。

2) 三次元培養評価系の確立

品質試験系の確立を通じて、平面培養での特性解析はある程度進めているが、患者移植後の組織内で LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞が

どのような分泌特性、分化特性を示すのかについては情報が無い。移植後の組織内での挙動と平面培養との間には隔たりがあり、その中間的な評価系が必要である。そこで、移植用の scaffold としての可能性を考え、臨床で組織接着剤として使用されているフィブリンゲルを用いた三次元培養を行い、細胞の長期培養評価系の確立を行った。

3) 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。

4) 患者治療反応性、臨床評価系の確立

国内外の研究機関のご協力の下、LCAT 欠損症患者血清を収集し、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が産生する LCAT の機能（薬効）評価を行った。同時にこれらの血清のリポ蛋白解析を実施し、家族性 LCAT 欠損症の病態との相関を検討した。これら 2 つを実際の患者リクルート時、および治療前後の評価項目として確立する検討を行った。

また、このような患者では全身の血管も動脈硬化障害が進んでいる可能性がある。また、ヘテロ接合型 LCAT 欠損が動脈硬化のリスクであることが近年報告された。本治療法を実用化するにあたって、LCAT 活性の部分的な回復が、このようなリスクを上げる可能性も考えられる。以上のことから移植治療前後の臨床評価法として、血管障害を定量的に評価できる心臓踝血管弾性指数（Cardio-ankle Vascular stiffness index=CAVI）の導入に関する検討を実施した。

以上に加えて、LCAT 欠損症について患者の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。

5) 移植細胞の生着率向上を目的とする製剤化検討

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 scaffold 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。

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。そこで、LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞移植後の移植生着率と薬効のさらなる向上を目指した検討を進め、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検討を実施した。

6) 遺伝子治療臨床研究実施申請

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。厚生科学審議会・作業委員会における審議の結果、主に以下の課題の追加検討が必要となったため、前述の検討と合わせて実施した。

- a. 細胞分化特性解析の実施
- b. 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
- c. 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

7) 他疾患への応用研究

本治療法の実用化により、他疾患への応用が期待されるが、その実用化には克服すべき課題が多く残されている。LCAT 欠損症の場合、過

剰症の報告はないが、糖尿病などへの応用には過剰分泌への対策が特に不可欠である。また、重篤な合併症を幼児・小児期から発症する疾患に対しては少量の脂肪組織からの移植細胞の調製が必要であると想定される。そこで、糖尿病への技術応用を目指し、ヒト LCAT 遺伝子と同じ骨格を持つレトロウイルスベクターに改変型インスリン遺伝子を搭載し、その遺伝子導入特性を検討した。

(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の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)

前述の検討を進め、以下のような成果を得た。

I. ヒト前脂肪細胞の特性について

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・調製法の特性上、その調製の途中で脂肪組織に存在する幹細胞 (ASC) の調製に用いられる Stromal Vascular Fraction (SVF) は除去される。実際に天井培養により、有意に内皮細胞、血球細胞のコンタミが減少した。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または天井培養由来増殖型脂肪細胞 (Ceiling culture-derived proliferative adipocyte, ccdPA) と呼ぶ。

1) 前脂肪細胞の分化特性

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 は再生医療研究で盛んに研究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 のそれに比べて高く、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 2A)。分化能に対する継代日数の影響を比較したところ、継代を重ねても脂肪細胞に分化する細胞比率が

前脂肪細胞において ACS のそれよりも有意に高かった (図 2B) (Asada et al. 2011. AJP-CP)。

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、前脂肪細胞は後述のように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ディファレンシエーションを起こしたと考えられる。

以上のことから前脂肪細胞は ASC よりも均一でありかつ成熟脂肪細胞に近い細胞であることが明らかになった。

2) ヒト前脂肪細胞の治療用遺伝子の運び屋としての特性

天井培養法を用いた脂肪細胞の調製についてはすで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考えられる。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目指し、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（陽性率）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（図 3A）。

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）

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することが分かった（図 3B）。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（Kuroda et al. TOGTJ 2011）。

以上のことから移植細胞の調製における、遺伝子導入の至適条件を決定し、前脂肪細胞の治療用遺伝子の運び屋としての優れた特性を明らかにした。

3) LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の持続培養評価

1)、2)の結果を総合的に評価するため、より移植後の細胞状態を反映すると考えられる三次元培養による細胞の特性評価を行った。三次元培養の scaffold として、臨床で組織接着剤として使用され、かつ動物実験で移植用 scaffold として報告実績のあるフィブリンゲルを用い

た。LCAT 遺伝子導入ヒト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。この培養法により少なくとも3ヵ月の継続培養評価が可能となり、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 4A）。また、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た。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 4B）。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り、細胞の密度に依存することを見出した。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 4C）（Aoyagi et al. ECR 2012）。

以上の特性評価から、天井培養法により調製されるヒト前脂肪細胞は純度の高いより成熟脂肪細胞に近い細胞であること、レトロウイルスベクターによる治療遺伝子の安定発現が可能な細胞であることが分かった。さらに本治療法で体内に移植された場合には、比較的容易に脂肪組織構築に組み込まれ脂肪細胞に成熟することが示唆された。移植後の細胞死は避けられないと考えられるが、脂肪細胞への分化と共に導入遺伝子の発現が上昇することは、少なくとも本治療法での移植細胞の体内での細胞死による細胞数減少を補完する可能性が考えられる。

II. 前脂肪細胞の分泌する LCAT 蛋白の機能評価

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 (図 5) 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患者リクルートもしくは移植治療前に事前評価する必要がある。また、前述の LCAT 活性測定のみでは本治療実施後の患者の病態改善が期待できるかどうかの評価は十分とは言えない。

LCAT 欠損症患者血清と健常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 の成熟の度合いを二次元電気泳動と HDL の主要アポリポ蛋白である ApoAI に対するウェスタンブロット法を組み合わせることで評価した。その結果、腎障害を合併しない部分欠損病態である魚眼病 (T123I 変異、千葉大症例) 患者血清において、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、すなわち患者において著しく障害されていた HDL の成熟が改善されることを明らかにした (図 6, Asada et al. MGM 2011)。さらに、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) について検討でき、HDL 粒子の成熟を指標とした同様の治療反応性評価を実施した。腎機能障害を合併する家族性 LCAT 欠損症症例を含め、全ての患者血清において、ApoAI 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 の成熟に機能することを確認した (図 6)。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 蛋白は、患者血清中に補充された際には患者の病態を改善できることが示唆された。

III. 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

1) フィブリン scaffold の移植性能評価

前述の特性解析においてフィブリンゲルによる三次元培養が LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞の機能発現を少なくとも支持することが考えられる。そこで、フィブリンゲルを臨床での移植用 scaffold の候補として検討を行った。hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を調製し、マウスにおける移植実験用 scaffold であるマトリゲルを対照としてフィブリンゲルによる細胞移植評価を実施した。フィブリンゲルで細胞を B6 マウスに皮下移植した場合、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、有意に 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同等であった (図 7A)。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 (図 7B) (Aoyagi et al. EMM 2011)。このことから、臨床導入時には、フィブリンゲルが 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示唆された。

2) 生着促進因子の探索

フィブリンゲルがマウス前脂肪細胞の移植成績を向上させることから、フィブリンゲルは臨床における移植用 scaffold と考えられるが、他の疾患への応用を含め、本移植治療実施後の更なる薬効発現を目指すには、移植部位の組織再構築を念頭に置いたより高度な移植生着率の向上が求められる。そこで、これまで移植研究を行ってきた実績から移植に適したサイトカインを含有する移植カクテルの検討を行った。

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性向上が可能かどうかを検討した。

前述の三次元培養を本検討に応用し、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 (図 8A)。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 (図 8B)。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 ゲル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と考えられた。今後、動物実験による精査を行い、本治療法への導入を考慮する予定である。

また、これらサイトカインの血管新生誘導機能は組織修復と前脂肪細胞の生着には必須であるが、過剰な血管新生は、移植した前脂肪細胞の異常増殖のリスクにもなり得る。前述の解析と合わせて、*in vitro* で疑似的な移植後の細胞特性評価が可能となったことから、今後、血管内皮細胞等との混合三次元培養も検討し、PRP に含まれるサイトカインの機能を評価する予定である。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いる。本研究において同定した Tenomodulin

遺伝子は、脂肪細胞特異的に発現する血管新生抑制因子であることが考えられ、その発現を指標とした評価系の確立を考慮する。

IV. 他疾患への応用に関する基礎検討

本研究の目的は、多くの酵素欠乏症に対する遺伝子導入前脂肪細胞移植技術を提案することである。

中でも、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り、これまでの糖尿病モデルマウスにおける検討の結果から、その有効性が期待できる。本技術の実用化は糖尿病に対する新たな治療法としての可能性を提示できる。

臨床への導入を目指した基礎検討として、現在遺伝子治療臨床試験で使用され、かつ本研究で *lcat* 遺伝子搭載レトロウイルスベクターの骨格として用いている pDON-AI を骨格としたインスリン発現レトロウイルスベクターを構築し、マウス前脂肪細胞を用いた遺伝子導入検討を実施した。その結果これまで用いてきたベクターよりもインスリンの発現が低い可能性が示唆された。今後のヒト前脂肪細胞への導入についても精査が必要であると考えている。

本治療技術は現在のところ、成人患者からの脂肪組織摘出を想定しているが、さらに小児・乳幼児期から重篤な合併症を引き起こす酵素欠乏症に対しては、少量の脂肪組織からの移植用細胞の獲得が必須である。モデルマウスでの TGF- β /Smad3 シグナルの解析から、Smad3 の機能抑制により、脂肪細胞増殖の亢進が認められた。Smad3 の特異的阻害剤が見出されていることから、少量の脂肪組織からの前脂肪細胞獲得法の可能性の一つが示唆された。

V. モデル動物での薬効解析

平成 22 年度から厚生労働省への遺伝子治療

臨床研究申請を行った。その作業委員会審査結果において必要となったモデル動物での薬効解析を実施した。

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（以下、KO マウス）を入手し、本解析に向けた繁殖を平成 22 年度 8 月より実施し、平成 23 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 9A）。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 9B）。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 9C）、免疫排除機構を抑制した実験系において脂質代謝異常の改善を認めた。生理学的に

LCAT を産生する臓器は肝臓であるが、以上の結果は、前脂肪細胞が異所性に産生する LCAT が、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。前述の研究成果から 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。このように KO マウスでの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。

VI. カニクイザルにおける細胞調製の検討

作業委員会での指摘事項として、サルでの移植試験の可能性を追加検討した。

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。過去の検討実績から 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。

VII. 本遺伝子治療の臨床における効果、安全性評価について

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。

現時点では、HDL における活性のみを欠損する魚眼病 (FED) と HDL、LDL における活性の両方を欠損する家族性 LCAT 欠損症の2つに大別される。しかしながら、それぞれの原因変異を有するヘテロ接合体症例も存在し、患者によって病態に多様性がある。これまでの報告から家族性 LCAT 欠損症では腎不全を合併するとされているが、その腎障害発生のメカニズムは LCAT が主に存在・機能する HDL の成熟障害が直接の原因ではなく、LCAT 欠損による異常リポ蛋白の出現と関連している。この治療技術の目指す臨床効果の一つは予後を最も規定する腎不全の発症阻止である。以上のことから LCAT 欠損状態とリポ蛋白の状態を比較し、治療前後または合併症のリスクに関する臨床評価法の検討を行った。

国内外の研究機関関連病院のご協力の下、病態の異なる LCAT 欠損症患者血清についてリポ蛋白を中心とした解析を行った。

1) 用いた症例について

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ンター) 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 欠損症症例は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10A) 。

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の形成に必須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10B) 。

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10C) 。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10D）。

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变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。

5) 心臓踝血管弾性指数（Cardio-ankle Vascular stiffness index=CAVI）の導入に関する検討

LCAT欠損症患者では全身の血管も動脈硬化障害が進んでいる可能性がある。また、ヘテロ接合型LCAT欠損が動脈硬化のリスクであることが近年報告された。本治療法を実用化するにあたって、LCAT活性の部分的な回復が、このようなリスクを上げる可能性も考えられる。従って移植治療後の安全性評価法の一つとして心臓踝血管弾性指数（Cardio-ankle Vascular stiffness index=CAVI）の導入を検討した。

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やeGFRと相関がみられた。

動脈硬化性疾患である脳血管障害、心血管障害、腎硬化症、透析患者でCAVIは有意に高値を示し、動脈硬化危険因子としてすでに臨床的に立証されている高血圧、糖尿病、脂質異常、喫煙、加齢、男性などの因子において

も有意に高値を示した。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。

以上のことから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と考えられる。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。CAVIは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ことから、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。

VIII. 本遺伝子治療の臨床導入体制の構築

研究期間を通じて、分担研究者とのディスカッション、班会議を行い、前述の研究成果が得られた。それに伴い、臨床導入に向けた実施体制の構築を行った。千葉大学医学部附属病院・臨床試験部と未来開拓センターを中心とし、臨床研究に関連した手順書の策定を進めた。現在は本研究成果をまとめ、遺伝子治療臨床研究実施計画書に反映させる作業を進めている。

E. 結論

本研究は根本的治療法のないLCAT欠損症に対してLCAT遺伝子導入前脂肪細胞の移植技術を実用化し、患者の病態、予後の改善に貢献することを目的とする。

本研究で解析評価してきたヒト前脂肪細胞について図11に示す技術基盤が確立された。

前脂肪細胞はLCAT遺伝子を安定に長期発現し、その遺伝子導入様式は、*ex vivo* 遺伝子治療法で求められる標的細胞の要件を満たし

ていると考えられた。また、前脂肪細胞は脂肪組織から高純度に調製でき、その分化特性は脂肪細胞に近い状態にあることが考えられた。これらの性質により、がん化等のリスクは低く抑えられていると考えられた。

前脂肪細胞の分泌する LCAT 蛋白は LCAT 欠損モデルマウスにおいて機能し、かつ、LCAT 欠損症患者血清への添加によりその機能が認められた。このことは前脂肪細胞が異所性に発現する LCAT 蛋白が患者血清への補充により LCAT 欠損により引き起こされた代謝異常を改善し得ることを示唆している。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た。

前脂肪細胞の移植生着向上に自己血液から調製可能な PRP ゲルの使用が示唆され、個々の患者にとって全て自己由来の移植カクテルが提案できると考えられた。この PRP ゲルは他の細胞移植技術にも貢献できると考えられた。

本治療法の臨床導入に向けて LCAT の機能と密接に関連した新たな臨床指標が見出された。これらは低侵襲的な手技で評価ができるため患者にとって負担が少ない方法であると考えられた。

現在、遺伝子治療臨床研究実施計画書の改訂に向けた最終段階の検討を実施している。今後は、本研究において確立できた前脂肪細胞調製移植技術を他の疾患へ応用すべく研究を進めていく予定である。

謝辞)

本研究は、貴重な検体を提供頂いた患者様、ボランティア様、さらには国内外の研究機関の関係者のご協力の下、進めることができたものであり、ここに感謝致します。

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.
- 6) Aoyagi Y, Asada S, Kuroda M, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Aso M, Saito Y. *Exp Mol Med*. 2011;43:161-167.
- 7) 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. *The Open Gene Ther. J*. 2011;4:1-10.
- 8) Asada S, Kuroda M, Aoyagi Y, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Aso M, Saito Y. *Mol Genet Metab*. 2011; 102: 229-231.
- 9) Suzuki J, Sakakibara R, Shirai K. J

- Stroke Cerebrovasc Dis. 2011; in press.
- 10) Namekata T, Suzuki K, Ishizuka N, Shirai K. *BMC Cardiovasc Disord.* 2011;11:51.
 - 11) 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;18:924-938.
 - 12) Shirai K, Song M, Suzuki J, Kurosu T, Oyama T, Nagayama D, Miyashita Y, Yamamura S, Takahashi M. *J Atheroscler Thromb.* 2011;18:49-55.
 - 13) Shirai K. *Hypertens Res.* 2011;34:684-685.
 - 14) 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;17:517-525.
 - 15) Nagayama D, Saiki A, Endo K, Yamaguchi T, Ban N, Kawana H, Ohira M, Oyama T, Miyashita Y, Shirai K. *Int J Clin Pract.* 2010;64:1796-1801.
 - 16) Nakamura K, Iiduka T, Takahashi M, Shimizu K, Shirai K, Noike H. *J Atheroscler Thromb.* 2009;16:371-379.
 - 17) Saiki A, Olsson M, Jernäs M, Gummesson A, McTernan PG, Andersson J, Jacobson P, Sjöholm K, Olsson B, Yamamura S, Walley A, Froguel P, Carlsson B, Sjöström L, Svensson PA, Carlsson LM. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:3987-3994.
 - 18) Kubota Y, Kuroki T, Akita S, Koizumi T, Hasegawa M, Rikihisa N, Mitsukawa N, Satoh K. *Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2012;65:372-378.
 - 19) Akita S, Kuroki T, Yoshimoto S, Rikihisa N, Satoh K. *J Plast Surg Hand Surg.* 2011;45:294-299.
 - 20) Yokoyama T, Tosa Y, Kadomatsu K, Sato K, Hosaka Y. *J Reconstr Microsurg.* 2010;26:79-85.
 - 21) Koizumi T, Negishi M, Nakamura S, Oguro H, Satoh K, Ichinose M, Iwama A. *Int J Hematol.* 2010;91:611-619.
 - 22) Mitsukawa N, Satoh K. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010;63:e611-e614.
 - 23) Tsurutani Y, Fujimoto M, Takemoto M, Irisuna H, Koshizaka M, Ohnishi S, Ishikawa T, He P, Honjo S, Maezawa Y, Saito Y, Yokote K. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;407:68-73.
 - 24) Yokote K., Shimano H, Urashima M, Teramoto T. (2011) *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2011;9:555-562.
 - 25) Takeda Y, Nakaseko C, Tanaka H, Takeuchi M, Yui M, Saraya A, Miyagi S, Wang C, Tanaka S, Ohwada C, Sakaida E, Yamaguchi N, Yokote K., Hennighausen L, Iwama A. *Br J Haematol.* 2011;153:589-598.
 - 26) 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:7461-7466.
 - 27) Iose S, Misawa S, Sakurai K, Kanai K, Shibuya K, Sekiguchi Y, Nasu S, Noto Y, Fujimaki Y, Yokote K, Kuwabara S. *Clin Neurophysiol.* 2010;121:719-724.
 - 28) 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. *Endocr J*. 2010;57:325-330.
- 29) Kimura K, Shimano H, Yokote K, Urashima M, Teramoto T. *J Atheroscler Thromb*. 2010;17:601-609
- 30) 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:675-682.
2. 総説
- 1) 黒田正幸、武城英明. *医学のあゆみ* 2010;233:1246-1247.
3. 著書
- 1) 黒田正幸、武城英明. *Curr Ther*. 2012;30: 264-265
4. 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.
- 2) 深谷佳孝、黒田正幸、武城英明、窪田吉孝、秋田新介、力久直昭、三川信之、佐藤兼重 (2011) 遺伝子導入前脂肪細胞による蛋白質欠損症の治療法開発に向けた移植細胞生着率向上に関する研究. 日本形成外科学会基礎学術集会、東京
- 3) 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
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Aoyagi Y, Kuroda M, Asada S, Tanaka S, Konno S, Ishii I, Bujo H, Saito Y, Aso M. (2009) 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.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
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を判定する方法」
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
3. その他
- 特になし

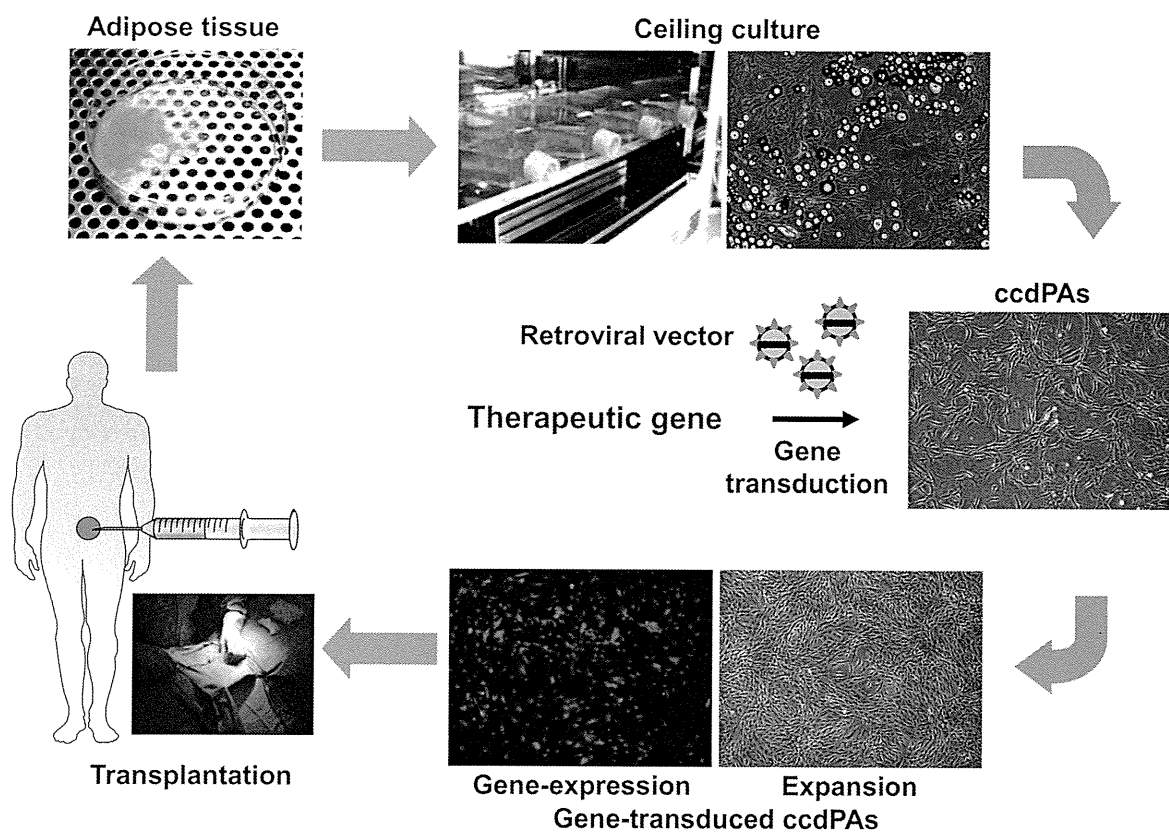


図1. LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞による治療法概略

患者腹部脂肪組織より天井培養法により前脂肪細胞 (ccdPA) を獲得、*lcat* 遺伝子をレトロウイルスベクターにより導入する。拡大培養の後、患者腹部に再移植する。

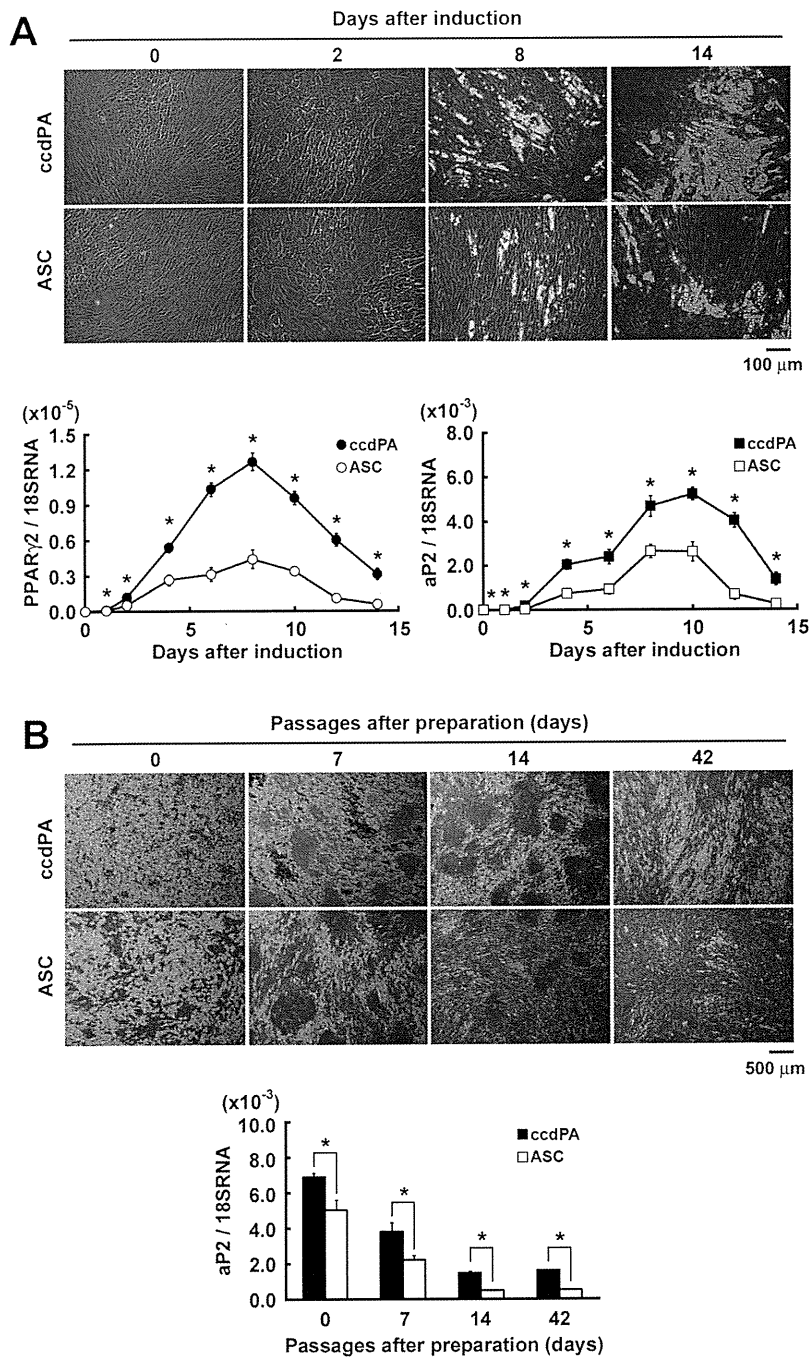


図 2. ヒト前脂肪細胞と脂肪幹細胞の脂肪分化能の比較

ヒト前脂肪細胞 (ccdPA) と脂肪幹細胞 (ASC) を同一ドナーより調製し、脂肪細胞への分化誘導を行い、脂肪細胞への分化能を比較した。

(A) 分化誘導刺激後、経時的に写真撮影と分化マーカー遺伝子 (PPAR γ 2、aP2) の発現を比較した。

(B) 調製後、継代培養を続け、0、7、14、42 日後の細胞について分化誘導を行い、aP2 遺伝子発現を比較した。

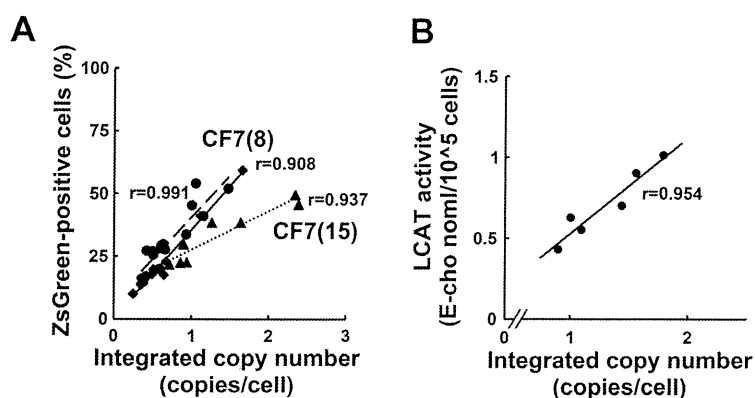


図 3. ヒト前脂肪細胞への遺伝子導入様式

(A) ヒト前脂肪細胞について ZsGreen 遺伝子搭載レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入条件の最適化検討を行った。7 日間の初代培養後の細胞 (CF7(8)) が 14 日間の初代培養細胞 (CF7(15)) よりも低い平均導入コピー数で高い陽性率を示した。

(B) 導入コピー数を変えた LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞を調製し、培養上清中に分泌される LCAT の活性を測定した。導入コピー数に相関した LCAT の分泌が認められた。

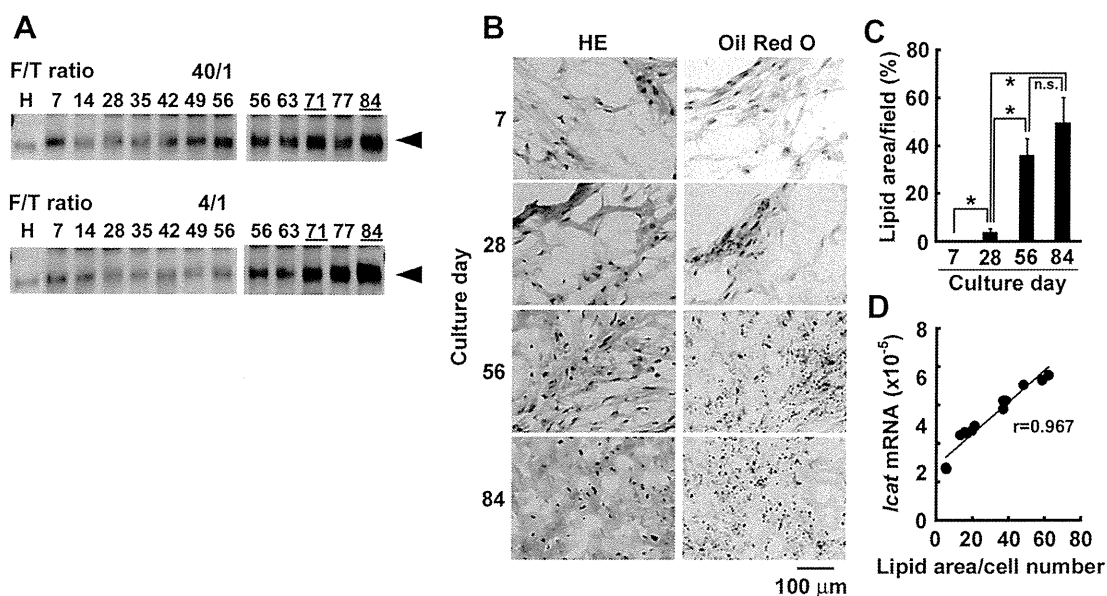


図 4. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の三次元培養評価

(A) 三次元培養を行い経時的に培養上清に含まれる LCAT 蛋白 (矢印) を検出した。71 と 84 の培養上清はそれぞれ 4 日、7 日間の培養上清であり、その他は 3 日間の培養上清を用いた。観察期間中 LCAT 蛋白の持続産生が認められた。

(B、C) 三次元培養フィブリングル内での前脂肪細胞を HE 染色、Oil Red O 染色により評価した。Day28 から Oil Red O による染色が認められた。

(D) 三次元培養中の細胞における Oil Red O 染色度合いと *lcat* mRNA 量の相関が認められた。