

20123/166A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業

家族性 LCAT 欠損症患者に対する細胞加工
医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」
の早期実用化にむけた非臨床試験

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武城 英明

平成 25 (2013) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

家族性 LCAT 欠損症患者に対する細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」の早期
実用化にむけた非臨床試験

-----5

千葉大学大学院医学研究院

武城 英明

II. 分担研究報告

1. 新規遺伝子変異に起因する家族性 LCAT 欠損症家系の解析

自治医科大学内科学講座内分泌代謝学部門 石橋 俊

-----17

2. 皮下脂肪組織内の部位特異的機能差を考慮し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

-----20

3. 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

-----24

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

-----29

IV. 研究成果の刊行物・別冊

-----35

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
総括研究報告書

家族性 LCAT 欠損症患者に対する細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」の早期実用化にむけた非臨床試験
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細胞医薬品の患者への早期提供を目指し、遺伝子治療技術の有効性と安全性にかかわる臨床研究、臨床試験（治験）を経て、国内での医薬品製造・販売承認（薬事承認）へと円滑に繋げるための非臨床試験成績を得ることを目的とする。今年度は、移植国内外の研究機関の協力の下で集められたLCAT欠損症例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異常を同定し、本治療法適応前後のリポ蛋白病態像の変化と薬効出現様式を把握し、今後の非臨床試験の評価マーカーとなりうる可能性を見出した。また第1回遺伝性疾患遺伝子治療臨床研究作業委員会からの本細胞医薬品の遺伝子治療臨床研究に向けた主要な指摘事項に関する『LCAT欠損モデル動物での薬効解析、安全性解析に関する研究成果』を第2回遺伝性疾患遺伝子治療臨床研究作業委員会において報告し審議を受けた。また、詳細な安全性解析としてLCAT欠損モデル動物移植細胞のクローナリティー解析を追加実施した。その結果、hLCAT遺伝子導入マウス前脂肪細胞の移植後、リポ蛋白異常の是正効果を認めた。移植28日後以降移植細胞のクローナリティーは移植個体ごとに異なる変化を示し、調製した細胞、もしくは本皮下移植治療実験に特異的なクローンの出現は認めなかった。また自家移植安全性試験を目的として、大動物での実施可能性を検討するため、イヌ、ミニブタ脂肪組織からのhLCAT遺伝子導入前脂肪細胞の調製を行ったところ、LCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞と類似の方法でイヌ脂肪組織から自家移植試験が可能な細胞数のhLCAT遺伝子導入イヌ前脂肪細胞が獲得できることを明らかにした。一方ミニブタでは獲得細胞数が極端に少なく、ミニブタでの自家移植安全性試験は困難であると考えられた。これらの成果を基にPMDAとの薬事戦略相談の下、試験パッケージを決定し、随時各種試験への移行を進める予定である。

武城 英明（千葉大学大学院医学研究院教授）、石橋 俊（自治医科大学）、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）、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）

難治性遺伝病は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治療法の開発が求められている。申請者らは、この現状を打破することを目指し、患者脂肪組織由来の初代培養細胞（前脂肪細胞）に治療目的遺伝子を導入しこれを自家移植する遺伝子細胞治療法の開発、実用化研究を世界に先駆けて開始した。現在まで、家族性 LCAT 欠損症を対象とする

A. 研究目的

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の調製に成功し、移植細胞の GMP 製造法、品質試験法を確立、更になんが否定試験など細胞の安全性を実証した。同時に、遺伝子治療臨床研究実施計画書の附属病院承認後、厚生労働省へ本計画を申請し、厚生科学審議会での審議・指導を受け、持続的 LCAT 産生と本細胞医薬品の有効性を確認し、遺伝子治療臨床研究実施への移行段階にある。

本課題研究では、家族性 LCAT 欠損症患者の予後の向上に資する医療技術の迅速な確立と本細胞医薬品の患者への早期提供を目指し、遺伝子治療技術の有効性と安全性にかかわる臨床研究、臨床試験（治験）そして国内での医薬品製造・販売承認（薬事承認）へと円滑に繋げることを目的とした効率的な非臨床試験を実施する。

B. 研究方法

<薬事戦略相談および臨床研究申請状況>

平成 24 年度は、本課題とともに遂行する予定である「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」医薬品の患者自家移植による遺伝子治療臨床研究（課題名：家族性 LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）欠損症を対象とした LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究）実施承認に向け、遺伝子治療作業委員会課題とされていた LCAT 欠損モデルにおける「hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞」移植の有効性と安全性の同時評価を行い、改訂した実施申請資料の提出と第 2 回遺伝子治療作業委員会での審議を受けた。その議事内容を精査し、治験・薬事承認に向け、PMDA との戦略相談に関する資料を作成準備した。

<患者調査・登録>

家族性 LCAT 欠損症患者の実態把握調査について、プロトコール作成と登録病院の選定を行った。原発性高脂血症に関する調査研究班（代表研究者：石橋俊）に検討して頂いた。

<治療の臨床評価指標の検討>

これまで各診療機関の先生方のご協力のもと収集した患者血清を用い病態進行に関する異常リポ蛋白と本治療に対する反応性を評価した。

<非臨床試験の予備検討>

1) LCAT 欠損モデルマウスにおける細胞移植治療の有効性と安全性を同時に検討し、病態モデルにおける移植細胞のクローナリティー解析、さらに遺伝子挿入部位についてシーケンス解析を行った。

2) 有効性向上検討として、移植用細胞のスフェロイド培養条件の検討を行った。

3) 昨年度までの検討においてサルにおける移植試験は困難であることが判明したため、代替えの大動物における移植試験の可能性を検討するためイヌ、ミニブタから採取した脂肪組織を用いた細胞培養、遺伝子導入検討を行った。

（倫理面への配慮）

移植細胞の薬効薬理、生着性、毒性に関する研究は、国で定められている、ヒト生体由来細胞を用いた実験、組み換え DNA 実験、動物取り扱いに関する指針ならびに千葉大学大学院医学研究院の規定に従い、千葉大学で開催される各委員会で実験許可を受けて実施した。

移植細胞の調製は、「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について」、「ヒト(自己)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」、「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」に準拠し研究を実施した。

C & D (研究結果と考察)

<薬事戦略相談および臨床研究申請状況>

H24年度は、作業委員会からの質問事項・意見への回答と改訂した臨床研究実施計画書を8月に厚生労働省に提出し、第2回作業委員会(H24年12月5日)での審議を受けた。その後、H24年12月21日に作業委員会後の意見を受領、その意見に対する回答書ならびに計画書修正版をH25年1月25日に厚生労働省に提出した。本修正版に対し、H25年2月27日に厚生労働省より追加の意見を受領した。その後、追加意見に対する回答書ならびに計画書修正版をH25年3月6日に提出した。作業委員会後の修正に関しては、患者さんへの同意説明文書に関する修正と重大事象発生時の連絡体制に関する修正であり、追加で基礎実験が必要となっていない。

また、臨床研究実施計画とともに、第一種使用規程承認申請書についても申請を進めている。H25年1月29日に第一種使用規程承認申請書に関する意見を受領した。これについても回答書、申請書類の修正版を作成、H25年2月4日に厚生労働省に提出した。なお、環境省にも厚生労働省を通じて申請資料が提出されている。

その議事内容を精査し、治験・薬事承認に向け、PMDAとの戦略相談に関する資料を作成準備し、戦略相談の申請を行った。PMDAからの指示のもと速やかに対応し、戦略相談を受ける予定である。

<患者調査・登録>

作成した患者調査プロトコール案について原発性高脂血症に関する調査研究班で審議いただき、動脈硬化学会のご了承のもと、来年度以降、低HDL血症患者の全国調査から本治療法の対象である家族性

LCAT欠損症患者の全国調査に発展させることとなった。

<治療の臨床評価指標の検討>

今回の解析に用いた症例は、国内4症例(千葉大、自治医大、北里大、大阪大)、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13検体で実施した。LCAT欠損症症例の内訳は家族性LCAT欠損症(FLD)5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。

1)患者血清リポ蛋白のサイズによる分画解析

腎機能障害を合併しないFED症例と健常人を対照としてFLD症例のリポ蛋白異常を解析した(図1)。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FLDに特徴的なリポ蛋白異常として、フラクション11~16にFCとPLに富んだ不均一なサイズのリポ蛋白が認められた。FLD、FEDに共通して、すなわちLCAT欠損に共通してLDL分画のピークが9から8になっている、すなわちLDLの粒子サイズが健常人に比べて大きいことがわかった。

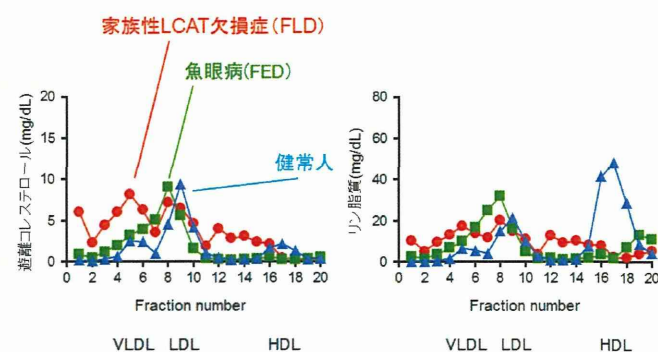


図1 FLD、FED、健常人のゲルろ過分画パターンの比較

分画後、それぞれのフラクションについて総コレステロール、トリグリセリド、遊離コレステロール、リン脂質の濃度を測定した。図には遊離コレステロール(左)とリン脂質(右)の結果を示した。

2)腎不全に関連したリポ蛋白の解析

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ついて2と同様の解析を行い、粒子サイズの大きな分画(VLDL、LDL相当分画)において、明瞭な相違を認めた(図2)。

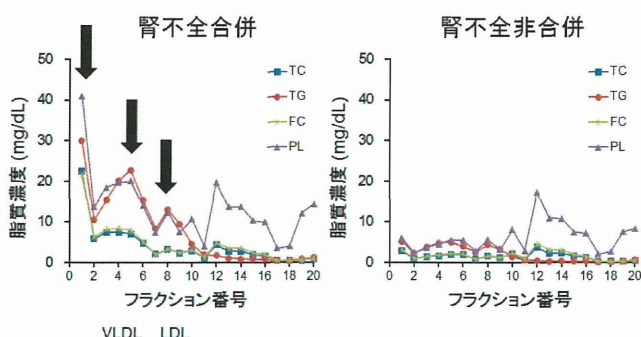


図2 腎不全合併、非合併症例の比較

C313Y変異を有する姉妹症例についてリポ蛋白ゲル濾過分画解析を実施した。

次に、C313Yとは異なる変異を有する患者について脂肪食制限による食事療法の効果について検討した。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3)。

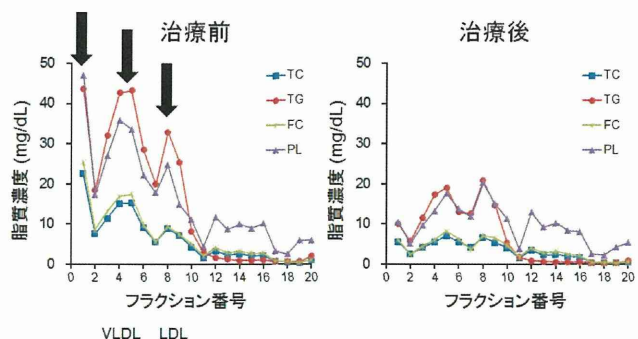


図3 FLD患者における脂肪制限食によるリポ蛋白プロファイルの変化

C74Y変異を有する症例について食事療法前後でリポ蛋白ゲル濾過分画解析を実施し比較した。

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。

3)家族性LCAT欠損症に認められるリポ蛋白異常

以上の結果を元に、FLD、FED、健常人において粒子サイズの大きな分画に図4のような相違が認められることが考えられた。

この結果、フラクション11までのフラクションについて、健常人では5と9にピークを持つリポ蛋白粒子(それぞれVLDLとLDL)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にピークを持ち、それまでのフラクションにはっきりとしたピークが認められないこと、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。

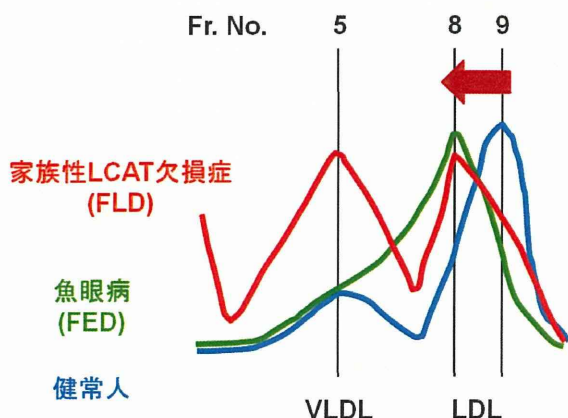


図4 FLD、FEDにおけるリポ蛋白サイズの異常

FLD、FED、健常人の解析より、健常人におけるVLDL、LDL分画付近について比較し、その傾向を図示した。

4)LDL粒子の異常とLCATに対する反応性解析

腎不全でその量の変動し、LCAT異常によりサイズ異常が生じるLDL分画についてそのサイズと脂質組成をさらに検討した(図5)。

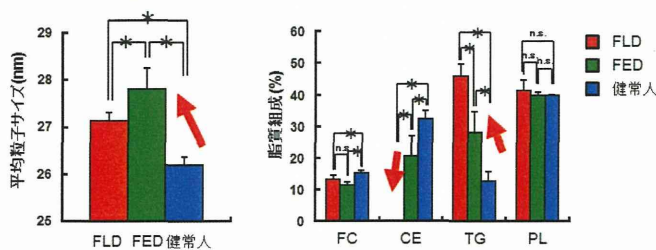


図5 FLD、FEDにおけるLDLの異常

FLD、FED、健康人の解析より、LDLの平均粒子サイズ、脂質組成を比較解析した。

詳細なサイズ解析の結果、健康人でLDLが検出されるフラクションに存在するリポ蛋白のサイズが、FED > FLD > 健康人であること、さらにその脂質組成はFLDではCEが低値であり、TGが高値であった。

このFLD、FEDの間でサイズ、組成に違いの認められたLDLについてLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が産生・分泌するrLCATの反応性を評価した。その結果FLDの異常LDLではCEの出現とPLの減少が観察され、rLCATに応答すると考えられたが、FEDの異常LDLはrLCAT添加に対して反応しなかった (図6)。

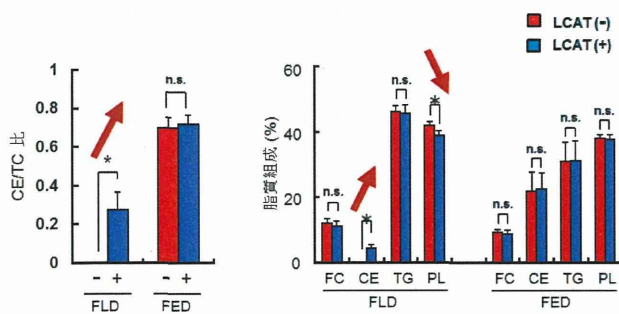


図6 FLD、FEDにおけるLDLのrLCATに対する反応性

FLD、FEDの血清にrLCATを添加反応させ、反応前後の脂質組成を比較した。

LCAT欠損症は希少疾病でありながら、その原因となるLCAT遺伝子異常は80種類にも及ぶ。そのため、病態が多岐にわたり、その網羅的リポ蛋白解析は実施されていない。本研究で用いたゲル濾過分画による解析法では、健康人との比較により、FLD、FEDのリ

ポ蛋白プロファイルに統一的な見解が得られる可能性が示唆された。さらにFLDのLDLはFEDのLDLとは異なり、サイズがFEDに比べて小さく、さらにrLCATに対して反応性を有していた。以上のことからFLDではLCATの重篤な機能不全によりFEDと健康人の中間的なLDLが出現し、それが腎機能障害の原因となっている可能性があると考えられた。

このように臨床患者検体解析の結果、リポ蛋白の組成変化のみならずサイズ変化がLCAT欠損マウスモデルにおける重要な有効性評価の指標となることが示唆された。モデル動物での有効性・薬理試験の遂行にフィードバックする予定である。

<非臨床試験の予備検討>

1) LCAT 欠損モデルマウス (LCAT-KO マウス) における細胞移植治療の有効性と安全性の評価

LCAT-KO マウスへの hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の移植実験の結果、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。シクロフォスファミドの用量設定を行ったあと、LCAT-KO マウスへの移植治療実験を実施した。その結果移植した hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞は移植 56 日後には油滴含有脂肪細胞として確認された (図 7)。

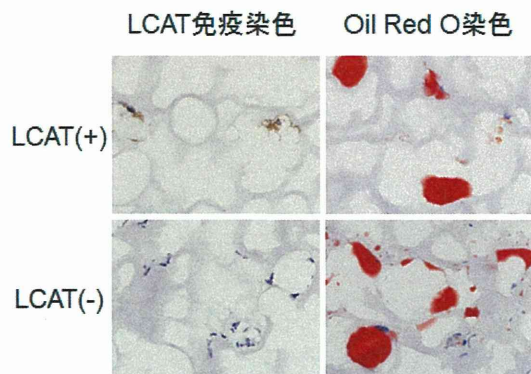


図7 LCAT-KOマウスに移植されたhLCAT遺伝子導

入マウス前脂肪細胞の組織染色結果

hLCAT遺伝子導入 (LCAT(+))、非導入 (LCAT(-)) マウス前脂肪細胞をLCAT-KOマウスに移植し、56日後の移植部位標本についてLCAT免疫染色とOil Red O染色を行った。

少なくとも56日間の血中へのhLCAT持続分泌を確認し (図7)、LCAT-KOマウスで障害されていたHDLの生成と異常LDLの組成改善を認めた (図8)。

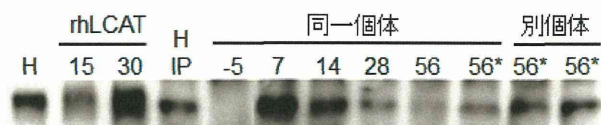


図8 hLCAT遺伝子導入マウス前脂肪細胞を移植したLCAT-KOマウスにおけるhLCAT血中持続分泌

移植されたマウスより血清を採取し、血清50μl (56*は100μl) を用いて免疫沈降ウェスタンブロットによりhLCATを検出した。

H: HDL、rhLCAT; 組換え型ヒトLCAT

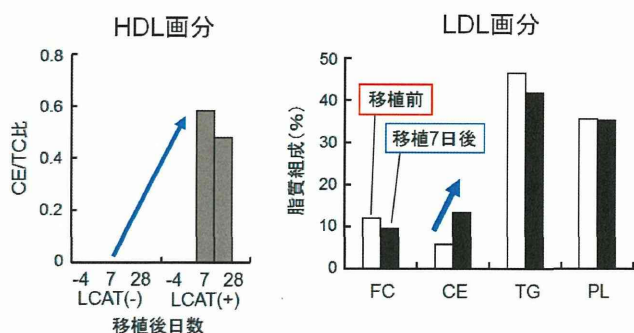


図9 hLCAT遺伝子導入マウス前脂肪細胞を移植したLCAT-KOマウスにおける脂質異常の改善

移植されたマウスより血清を採取し、血清リポ蛋白をゲルろ過により分画、各フラクションにおける脂質濃度を測定し、HDL、LDLにおける脂質濃度変化を評価した。

以上の結果により前脂肪細胞が異所性に産生するLCATは、本細胞医薬品が治療対象とするLCAT欠損症の病態の改善に機能し得ることが示唆された。

この病態モデルでの脂質異常の改善とともに血中にLCAT活性を検出した。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 (図10)。

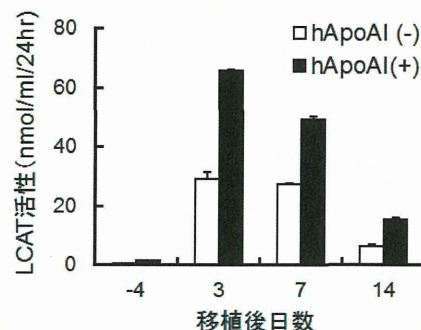


図10 hLCAT遺伝子導入マウス前脂肪細胞を移植したLCAT-KOマウス血清におけるhLCATの活性

移植されたマウスより血清を採取し、血清中LCAT活性 (遊離コレステロールのエステル化活性) をhApoAI存在下、非存在下で測定した。

LCATの機能発現には共役因子であるApoAIが必須であり、これまでの論文報告等からLCATとApoAIとの相互作用には種特異性があることが知られている。この結果は、少なくともマウスApoAIの存在下ではhLCATが十分に機能し得ない可能性を示唆するものであり、今後の非臨床薬効・薬理試験の遂行に影響を与えると考えられた。以上のことからヒトApoAIトランスジェニック (hApoAI-Tg) マウスとLCAT-KOマウスの交配によるhApoAI-Tg/LCAT-KOマウスの作出とモデル動物としての評価を予備検討として実施する予定である。

また、hLCAT持続分泌の観察が可能な免疫抑制剤用量は、KOマウスに致死的ではないが体重減少がほぼ全例に認められており、どれだけ長期に薬効を評価できるかについても今後の課題である。

本移植治療実験実施LCAT-KOマウスより得られた移植部位からDNAを抽出し、移植細胞のクローナリティー経時変化を、LAM-PCR法により検討した (図11)。クローナリティーの変化は移植14日目までは認められないが、移植28日後からの検体で一部の移植個体でバンドパターンに変化が認められた。移植56日目の検体まで、200bp程度のサイズに比較的明瞭なバンドが認められているが、この

挿入部位を解析したところマウス細胞がもともとゲノム中に有する内在性レトロウイルス配列由来のバンドが含まれていることがわかった。

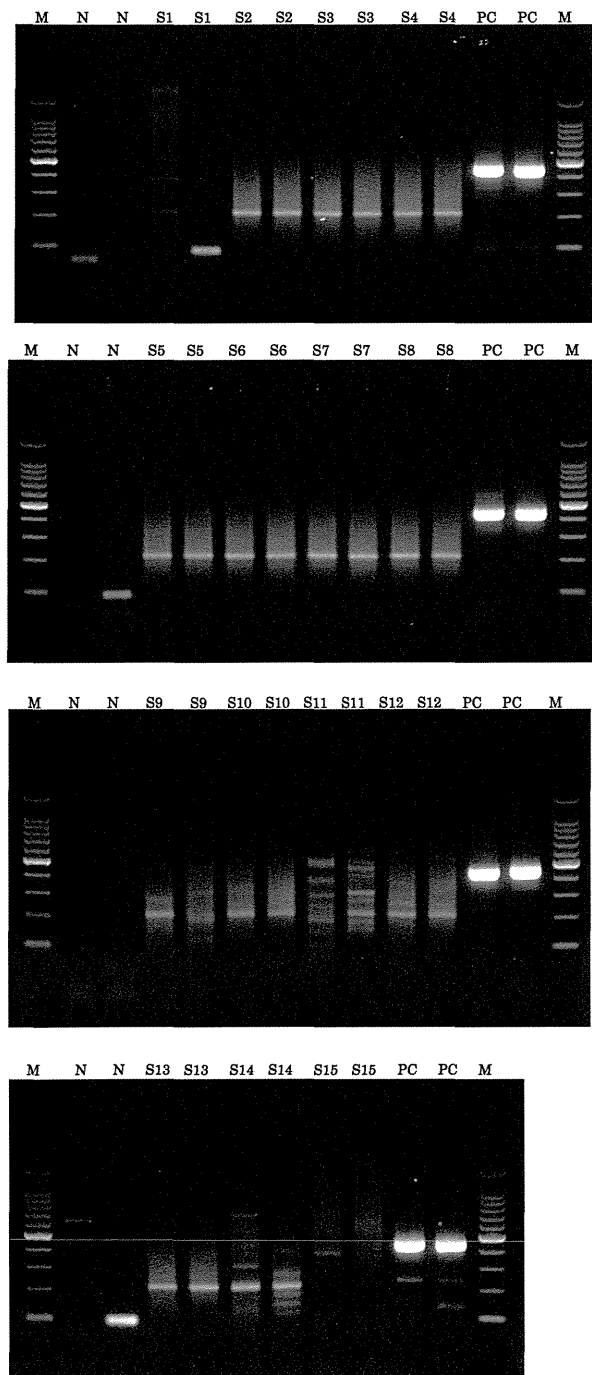


図11 hLCAT遺伝子導入マウス前脂肪細胞を移植したLCAT-KOマウスにおける移植細胞のクローナリティー変化解析

移植されたマウスより血清を採取し、血清中 LCAT 活性（遊離コレステロールのエステル化活性）を hApoAI 存在下、非存在

下で測定した。

S1, 遺伝子非導入マウス前脂肪細胞（移植前）

S2, hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞（移植前）

S3～S5, hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞（移植翌日）

S6～S8, hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞（移植 14 日後）

S9～S11, hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞（移植 28 日後）

S12～S14, hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞（移植 56 日後）

S15, 遺伝子非導入マウス前脂肪細胞（移植 56 日後）

今後 LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞のクローナリティー解析を安全性試験において進める予定であるが、その効率化を図る上でも、ヒト細胞のクローナリティー変化に多様性の認められ始める時期を予備実験で把握・精査する必要がある。

2) 移植用細胞のスフェロイド培養条件の検討

これまでの論文報告から、移植前のコンディショニングが細胞の生着に影響を与えることが知られている。本細胞医薬品開発においても有効性を向上させるための検討は引き続き行う必要があると考えられる。その一つとして移植前にスフェロイド化する培養検討を行った。その結果、複数の方法でスフェロイド培養が可能となった。今後動物移植実験によりどの方法が本細胞に適しているかを評価し、その後の試験に反映させる予定である。

3) サル自家移植試験の代替えとなる大動物試験の検討

昨年度までの検討においてサルにおける自家移植試験は困難であることが判明した（遺伝子治療臨床研究作業委員会報告済み）。そこで、代替えの大動物における移植試験の可能性を検討するためイヌ、ミニブタから採取した脂肪組織を用いた細胞培養、遺伝子導入検討を行った。

今後、最終的な非臨床試験の委託先として考えている日本バイオリサーチセンターより、ビーグル犬、ミニブタ (NIBS) の脂肪組織を取得し、その天井培養、遺伝子導入、培養実験を行った。皮下脂肪組織をほと

んど認めないサルと比較した場合、ビーグル犬(メス)、ミニブタ(メス)はいずれも皮下に採取に十分な脂肪組織を保有しており、構造的にもヒト脂肪組織に近いものであった。浅筋膜下の脂肪組織を採取し、7日間の天井培養を実施したところ、ビーグル犬からは1gの脂肪組織あたり $2.21 \times 10^5 \pm 1.80 \times 10^4$ 個 (N=3) の前脂肪細胞が獲得できた。これまでの実績から健常人の場合に比べて 1/10 程度であった。ミニブタの場合はほとんど細胞を獲得できなかったため、その後の検討は行うことができなかった。

イヌ前脂肪細胞について遺伝子導入の検討を行った。ヒト前脂肪細胞への遺伝子導入と同一条件(遺伝子導入補助試薬としてプロタミンを使用)では 0.5 copy/cell 程度、および、マウス前脂肪細胞で導入効率の上昇が認められたレトロネクチンでの遺伝子導入では、1 copy/cell 程度の遺伝子導入効率であった。

増殖性の検討では、ヒト前脂肪細胞と同様、MesenPRO 培地による増殖能が 20%FBS を添加した DMEM/F12-HAM 培地でのそれに比較して高いことがわかった(図12)。

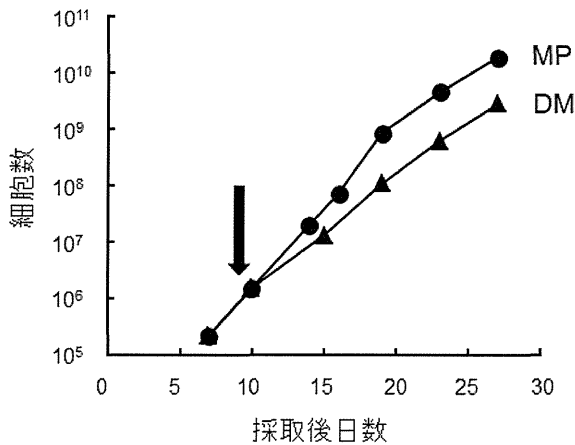


図12 hLCAT遺伝子導入イヌ前脂肪細胞の増殖能

7日間の天井培養により調製したイヌ前脂肪細胞(CF7)にhLCAT遺伝子を導入した細胞についてDay8での遺伝子導入後、Day9(矢印)にMesenPRO培地(MP)、20%FBSを添加したDMEM/F12-HAM培地(DM)に培地交換しその後継代培養を行った。細胞数は、1g脂肪組織由来の細胞数として示した。

hLCAT 遺伝子イヌ前脂肪細胞の培養上清には免疫沈降ウェスタンブロットでhLCATの分泌が確認された(図13)。

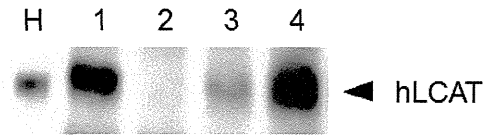


図13 hLCAT遺伝子導入イヌ前脂肪細胞の培養上清に分泌されたhLCATの検出

それぞれの細胞の培養上清についてIP-WBによりhLCATを検出した。

H, HDL;

- 1, hLCAT遺伝子導入マウス前脂肪細胞
- 2, イヌ前脂肪細胞(遺伝子導入なし)
- 3, hLCAT遺伝子導入イヌ前脂肪細胞(プロタミンによる)
- 4, hLCAT遺伝子導入マウス前脂肪細胞(レトロネクチンによる)

臨床での患者の移植細胞数は現在 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 個を想定している。ヒト体重を 60kg と考えると、ビーグル犬は体重が 10kg 程度であることから $8 \times 10^7 \sim 1.7 \times 10^8$ 個が移植用量となる。この検討から、1gの脂肪組織から3週間以内に所定量以上の細胞数が獲得できることがわかった。

E. 結論

本年度の検討から、LCAT-KO マウス移植実験において脂質異常の改善効果が認められたが、免疫抑制剤投与下での成果であることからマウスへの影響を考えると長期観察が困難である可能性がある。本モデルマウスの血中に認められたhLCATはhApoAIの共存下で活性増強が認められることから、hApoAI-Tg/LCAT-KO マウスの作出により薬効・薬理解析が容易になる可能性が考えられた。

家族性 LCAT 欠損症患者の血清検体の解析から異常 LDL は脂質組成だけでなくサイズの異常も有していた。LCAT-KO マウスは家族性 LCAT 欠損症患者の合併症である角膜混濁や腎機能障害の進行を評価できないモデルであるため、このような臨床検体のリポ

蛋白異常の解析結果を今後進める薬効・薬理試験の評価マーカーとしてフィードバックする検討を進める。

現在審議中の遺伝子治療臨床研究での投与量はマウス移植実験における血中到達濃度から決定したものであり、よりヒトに近い大動物での用量反応性も今後の検討課題とする予定である。

hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の移植前後の経時的なクローナリティー解析においては、細胞調製法を含め、この治療法に由来するクローンの出現は認めなかった。今後はヒト由来細胞について免疫不全動物をレシピエントとした安全性試験（クローナリティー解析を含む）を進める予定である。

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; 44: 330-339.
- 2) Naito S, Kamata M, Furuya M, Hayashi M, Kuroda M, Bujo H, Kamata K. Amelioration of circulating lipoprotein profile and proteinuria in a patient with LCAT deficiency due to a novel mutation (Cys74Tyr) in the lid region of LCAT under a fat-restricted diet and ARB treatment. *Atherosclerosis* 2013, in press.

2. 著書

- 1) 黒田正幸、武城英明. 家族性 LCAT 欠損症, 先天代謝異常ハンドブック (遠藤文夫他 編集)、中山書店、発刊日 2013/2/20

3. 学会発表等

- 1) 浅田咲世、黒田正幸、青柳靖之、石橋 俊、鎌田貢壽、山下静也、John J.P. Kastelein、武城英明. 家族性レシチンコレステロールアシルトランススフェラーゼ欠損症における腎不全を惹起する異常リポ蛋白、日本小児脂質研究会 (川越市) H24.11.30-12.1
- 2) 青柳靖之、黒田正幸、浅田咲世、麻生雅是、武城英明. 前脂肪細胞を用いた遺伝子細胞治療による家族性 LCAT 欠損症モデルの病態改善効果、日本小児脂質研究会 (川越市) H24.11.30-12.1

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

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
家族性LCAT欠損症患者に対する細胞加工医薬品
「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」の早期実用化にむけた非臨床試験
平成24年度 分担研究報告書

新規遺伝子変異に起因する家族性 LCAT 欠損症家系の解析
石橋 俊 自治医科大学内科学講座内分泌代謝学部門

研究要旨

新規の LCAT (Gly179Arg) 変異に起因する家族性 LCAT 欠損症家系を経験した。HEK293 細胞を用いた発現実験の結果、変異 LCAT は酵素活性を欠損するのみならず、培養液中に分泌されなかった。

A. 研究目的

家族性 LCAT 欠損症の細胞加工医薬品を開発する為には、本邦における家族性 LCAT 欠損症の臨床像等に関する疫学調査に基づいた、新規治療に対するニーズと適応を明らかにする必要がある。本研究では、家族性 LCAT 欠損症が疑われた家系を対象に、その臨床像と LCAT 遺伝子異常を同定し、変異 LCAT の機能解析を目的とした。

B. 研究方法

症例：63歳の女性。8年前に左半月板手術の際に低コレステロール血症を指摘された。その時、角膜混濁、貧血、蛋白尿を指摘された。2年前に甲状腺機能低下症と診断され、レボサイロキシンの投与を受けていた。虚血性心疾患の既往歴はない。両親がいとこ婚である以外には特記すべき家族歴はない。両側の角膜混濁と軽度の難聴以外に異常な身体所見は認めない。

同意取得後、末梢血を採血し、血球成分からゲノム DNA を調整し、LCATcDNA の塩基配列を決定した。更に、pcDNA3.1/myc-HisA®を用いて野生型と変異 LCATcDNA の発現ベクターを作成し、

HEK293 に SuperFect®を用いて遺伝子導入した。24 時間後に FCS 非含有培地に培地を交換し、更に 72 時間後に培地と細胞を回収し、LCAT 活性と Western blotting を行った。抗 Myc 抗体を一次抗体、horseradish peroxidase で標識した二次抗体を用いた。

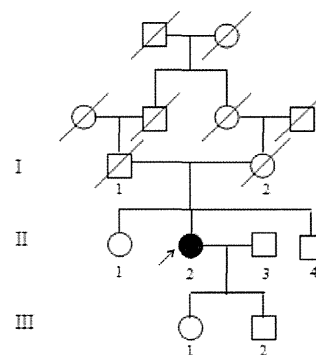


図1 LCAT 欠損症の家系

Table 1. Clinical and laboratory data of the patient and her family members

ID	II-1 II-2 II-4 II-2				
	(grandchildren)				
Sex	F	F	M	M	
Age	68	63	56	39	
BMI	29.6	22.8	24.9	21.6	
CBC	RBC ($\times 10^9$)	380	358	507	
	Hb (g/dl)	11.2	10.5	14.7	14.9
	Hct (%)	33.7	30.0	43.9	46.4
	WBC	5,100			
Plt ($\times 10^9$)	14.9		23.6		
	Chemistry	Creatinine (mg/dl)	0.52	0.64	0.72
Urine	Protein				
	Lipids	Total cholesterol (mg/dl)	155	76	225
	Triglyceride (mg/dl)	50	89	133	195
	HDL-cholesterol (mg/dl)	36	6	34	31

The data of II-1, II-4 and II-2 were adopted from the results of regular health check.

IDs are indicated in Fig. 1

C. 研究結果

発端者と家族の家系図(図1)と臨床データ(表1)を示す。発端者は軽度の貧血と蛋白尿を呈した。血液塗抹標本では標的細胞が観察された。血清ハプトグロビン濃度は52mg/dlと低値であり、溶血が示唆された。総コレステロールもHDLコレステロールも著明に低下し、総コレステロールに対するコレステロールエステルの比率も0.105と著減していた。Lp(a)は検出感度以下であったがLpXは陽性だった。LCAT活性も検出感度以下だった。ヘパリン静注後のリポタンパクリパーゼ蛋白量は85ng/mlと低下した。抗サイログロビン抗体陽性。

LCAT遺伝子の第5エクソンにc.607G>Cの塩基置換をホモに認めた。その結果、アミノ酸配列の179番目のグリシン(GGC)がアルギニン(CGC)に置換されると予想された(図2)。

発現実験では、LCAT G179Rの細胞内の蛋白量が低下し、培養液中にはLCAT蛋白を検出できなかった(図3)。また、細胞内と培養液中とのLCAT活性は野生型LCATに比して有意に低値であり、遺伝子導入を行わなかった対照細胞と同等だった。

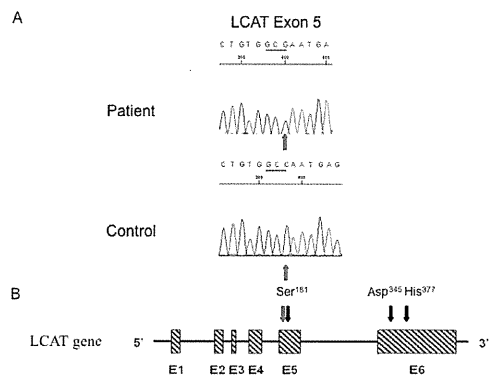


図2 発端者のLCAT遺伝子変異(A)と遺伝子上の位置(B)

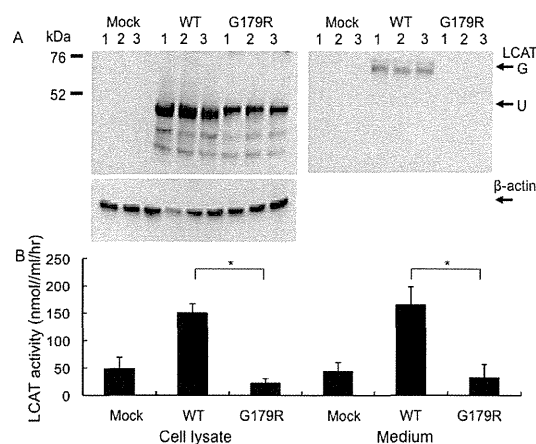


図3 HEK293細胞を用いた発現実験。

A. Western blot、B. LCAT活性

D. 考察

1967年以降60種類以上のLCAT遺伝子異常が報告されている。臨床症状から古典的LCAT欠損症と魚眼病の2種類に分類される。古典的LCAT欠損症は低HDLコレステロール血症、角膜混濁、溶血性貧血、腎障害を認める一方、魚眼病では前2者は認めるが、貧血と腎障害は認められない。本症例は古典的LCAT欠損症と診断された。G179R変異はセリン181、アスパラギン345とヒスチジ

ン 377 によって形成される LCAT の酵素活性中心の近傍に位置し、G179 は GX SXG、 α/β hydrolase family のモチーフ、 β シート 5 の構成要素である。従って、本変異は酵素蛋白の適正な折りたたみに支障を来すのみでなく、活性にも影響が予想された。事実、セリン 181 とグリシン 183 の変異を有する LCAT 欠損症が報告されている。

HDL コレステロールが軽度低値の家族が認められた。LCAT 活性測定や遺伝子異常の検索を行っていないが、G179R 変異をヘテロに保有する可能性が高い。

本症例の腎障害は比較的軽度であった。同一家系内の同一変異であっても、腎障害の程度は様々であることが知られている。本症例は菜食主義者に近い食生活のため、腎障害が進行しなかった可能性がある。

Lp(a) が感度以下であった。一般に、Lp(a) の血中濃度はアポ(a) の遺伝型によって規定されているため、そのような遺伝型であった可能性がある。また、Lp(a) の形成には LCAT の作用を必要とするという報告もある為、LCAT 欠損が Lp(a) の直接的原因となっている可能性もある。

近年、LCAT 欠損症の脂質はアポ E の遺伝型によっても規定されうると報告された。本症例は $\epsilon 3/\epsilon 3$ であり、血清 TG 値が比較的 low 値であった理由であろう。

E. 結論

新規の LCAT 変異 G179R に起因する古典的 LCAT 欠損症を経験した。LCAT 活性がほとんど欠損しているにも関わらず、63 歳の比較的高齢まで腎障害が軽症にとどまっており、合併症の発症に食事の影響が示唆された。

F. 研究発表

Wang XL, Osuga J, Tazoe F, Okada K, Nagashima S, Takahashi M, Ohshiro T, Bayasgalan T, Yagyu H, Okada K, Ishibashi S. Molecular analysis of a novel LCAT mutation (Gly179→Arg) found in a patient with complete LCAT deficiency. J Atheroscler Thromb 2011;18:713-719

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
家族性LCAT欠損症患者に対する細胞加工医薬品
「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」の早期実用化にむけた非臨床試験
平成24年度 分担研究報告書

皮下脂肪組織内の部位特異的機能差を考慮した脂肪細胞移植技術の開発

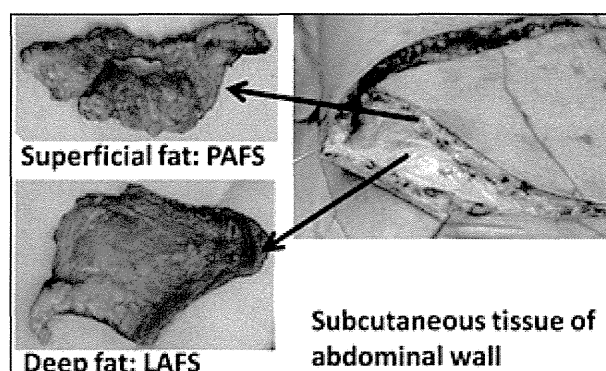
研究分担者 佐藤兼重（千葉大学大学院医学研究院 形成外科学 教授）
研究協力者 窪田吉孝、安達直樹、小坂健太郎

研究要旨

LCAT 遺伝子導入に用いるヒト前駆脂肪細胞を採取するヒト腹部皮下脂肪組織内には、浅筋膜を挟んで浅層・深層の2層構造が存在する。浅層・深層の脂肪細胞を比較したところ、(1)脂肪分化マーカーは深層と比較して浅層で高い (2)天井培養法による脂肪細胞回収数は深層と比較して浅層で多い、ことが明らかになった。すなわち、皮下脂肪組織の浅層・深層間には部位特異的機能差があり、その機能差を詳細に検討することが脂肪細胞移植技術や遺伝子導入移植治療技術の向上に資する可能性がある。

A. 研究目的

LCAT 遺伝子導入に用いるヒト前駆脂肪細胞は、ヒト皮下組織から採取した脂肪組織から天井培養法によって精製される。ヒト皮下組織は、浅筋膜によって浅層と深層の2層に分けられ、両者は解剖学的に構築が異なっている。浅層皮下脂肪組織は厚く強固な隔壁に分けられた立方体形の脂肪小葉から成り、protective adipofascial system (PAFS)と呼ばれる。一方、深層脂肪組織は薄く可動性に富む隔壁に分けられた扁平な脂肪小葉から成り、lubricative adipofascial system (LAFS)と呼ばれる。皮下組織浅層の脂肪細胞と、皮下組織深層の脂肪細胞の間には、部位特異的機能差があると推定されるが詳細は明らかではない。



本研究の目的は、遺伝子導入ヒト前駆脂肪細胞移植における、皮下組織浅層・深層それぞれの脂肪細胞の移植適合性を明らかにすることである。

B. 研究方法

①. ブタ皮下脂肪における2層構造の検討

ブタは各種臓器サイズや生理的機能がヒトと類似していることが知られている。ブタ皮下脂肪の組織学的解析および天井培養法による前駆脂肪細胞

回収数をおこなった。天井培養においては皮下組織浅層・深層を分離し、浅層脂肪組織・深層脂肪組織それぞれをコラゲナーゼ処理の後、遠心し、天井培養を7日間行い前駆脂肪細胞(ceiling culture derived proliferative adipocyte, ccdPA)を得た。

②. ヒト皮下脂肪における浅層・深層の機能的差異の検討

ヒト腹部皮弁移植術を用いた形成外科的再建手術時の廃棄脂肪組織、皮下組織浅層・深層を分離した。浅層・深層それぞれの脂肪分化関連遺伝子発現を測定した。浅層脂肪組織・深層脂肪組織それぞれをコラゲナーゼ処理の後、遠心し、天井培養を7日間行い前駆脂肪細胞(ceiling culture derived proliferative adipocyte, ccdPA)を得た。遠心の沈殿分画からはstromal vascular fraction (SVF)を7日間培養した。

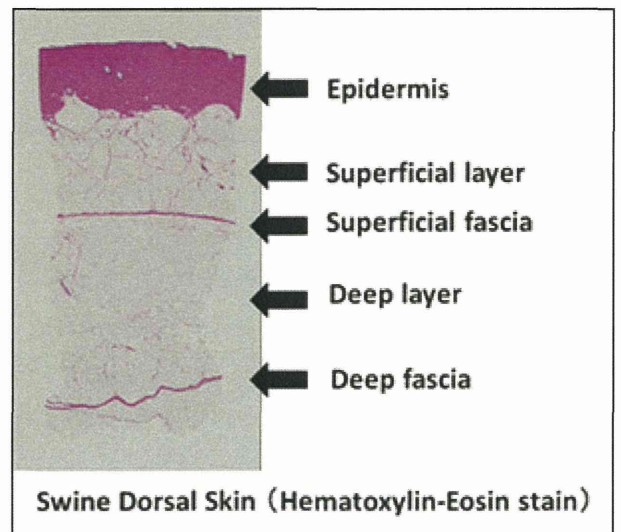
(倫理面への配慮)

研究内容は手術時廃棄脂肪組織の回収によるもので、侵襲を生じるものではない。また、千葉大学倫理委員会の承認の下、ヒト腹部皮弁移植術を用いた形成外科的再建手術対象患者に対し、術前に文書を併用した説明を十分に行い、書面での同意が得られた患者のみを対象とした。

C. 研究結果

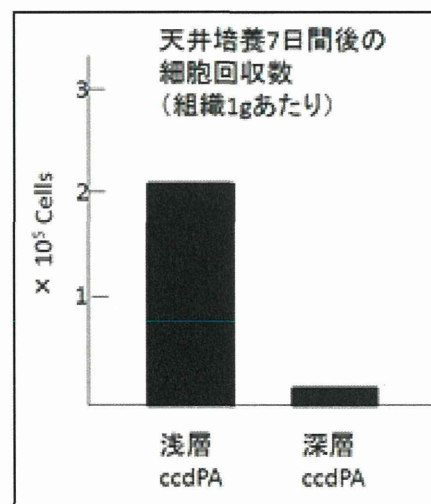
①-1 ブタ皮下組織の組織像

ブタ背部皮下組織の HE 染色像において脂肪組織内で明瞭な浅筋膜および、浅筋膜を挟んだ脂肪組織の上下2層構造がみられた。脂肪小葉間隔壁は皮下脂肪浅層のものの方が深層のものより厚かった。



①-2 ブタ皮下組織の浅層・深層から天井培養法によって得られる脂肪細胞数の比較

腹部皮下組織の浅層・深層の各層から得た脂肪組織を鋏で細切のち、コラゲナーゼ処理して遠心した。浮遊細胞群を天井培養法で7日間培養したのち、トリプシン処理により細胞を回収し、数を測定した。同一脂肪組織重量からの天井培養法による前駆脂肪細胞(ccdPA)の回収数は、浅層と比較し深層で少ない傾向があった。

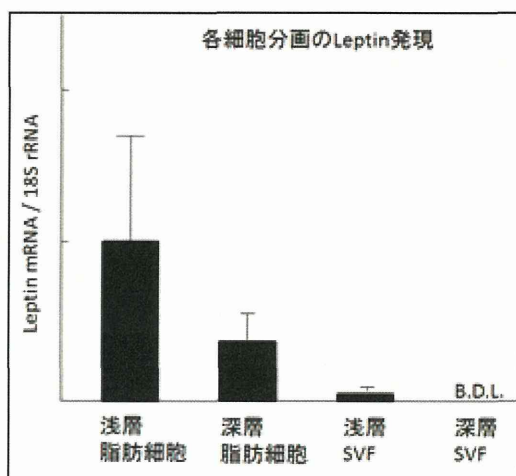


②-1. ヒト腹部皮下組織の浅層・深層の脂肪分化関連遺伝子発現解析

ヒト腹部皮下組織(n=4)の浅層・深層の各層から

得た脂肪組織を鋏で細切ののち、コラゲナーゼ処理して遠心した。上層に浮遊した脂肪細胞、および沈殿した細胞群(Stromal vascular fraction: SVF)を回収し、mRNAを精製し、定量した。

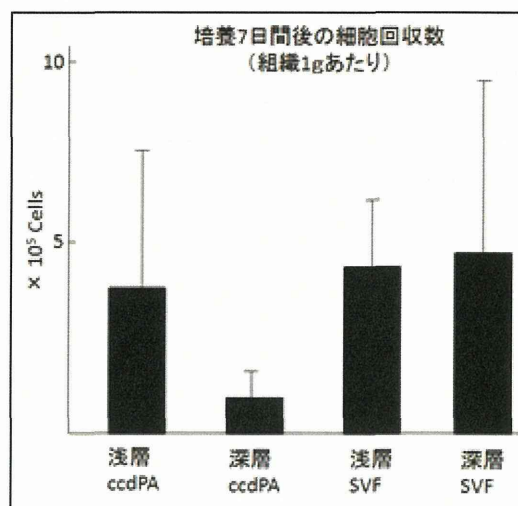
Leptin、PPAR-gamma (省略) の mRNA 発現は浅層脂肪細胞と比較し、深層脂肪細胞で低い傾向があった。



②-2. ヒト腹部皮下組織の浅層・深層から天井培養法によって得られる細胞数の比較

ヒト腹部皮下組織(n=4)の浅層・深層の各層から得た脂肪組織を鋏で細切ののち、コラゲナーゼ処理して遠心した。浮遊細胞群を天井培養法で7日間培養したのち、トリプシン処理により細胞を回収し、数を測定した。また、SVFを7日培養したのち、同様に数を測定した。

同一脂肪組織重量からの天井培養法による前駆脂肪細胞(ccdPA)の回収数は、浅層と比較し深層で少ない傾向があった。



D. 考察

細胞移植治療においては、移植細胞の形質転換等による望ましくない増殖が生じないことが、移植細胞に求められる大事な条件である。脂肪分化能が高い細胞ほど発がん性が低いことが明らかになっており、天井培養法により分離された前駆脂肪細胞は、stromal vascular fraction と比較して、長期培養後も高い脂肪分化能を維持しており、安全性に優れている (Shimizu, *Oncogene*, 2010; Asada, *Am J Physiol, Cell Physiol*, 2011)。ヒト浅層脂肪組織・深層脂肪組織それぞれから分離した脂肪細胞は異なる脂肪分化傾向を示し、遺伝子導入治療法における適合性を今後比較解析する予定である。また、天井培養法による前駆脂肪細胞回収数は浅層と比較して深層で少ない傾向があり、脂肪組織中の細胞数や性質の違いを反映している可能性が考えられた。

E. 結論

ヒト腹部皮下組織の浅層・深層には脂肪細胞の部位特異的機能差が存在し、その機能差を詳細に検討することが脂肪細胞移植技術や遺伝子導入移植治療技術の向上に資する可能性がある。

F. 研究発表

メント業務に関する手順書、⑥データマネジメント業務に関する手順、⑦症例報告書の見本等の作成に関する手順、⑧DM 計画書及び DM 報告書の作成に関する手順（以上紙ベース）、及び⑨被験者の登録に関する手順書があり、先行研究はこれら SOP に準じ実施を検討することとした。

D. 考察

先行する遺伝子治療臨床研究の適切な遂行は、後の治験計画において設定根拠を明確化することにつながる。

先行研究は「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に従い実施されるが、正しいデータを取得し、正しい評価を行うため、プロジェクトマネジメント、モニタリング、データマネジメント、CRC 業務等を取り入れ、可能な限り治験の実施体制と同様とすべきであると考える。特に、先行研究ではヒトに対する安全性が確立されていないため、有害事象の処置、安全性情報の収集・報告・評価がスムーズに行われることが重要であるといえる。

E. 結論

治験実施計画書作成のため、先行する遺伝子治療臨床研究と今後予定される医師主導治験の実施体制について比較検討した。可能な限り治験実施体制と同様に研究を遂行し、得られたデータを適切に設定根拠として治験実施計画書に反映し質を高めることとなる。また、平行する非臨床試験実施の計画にも反映され、薬剤プロファイルの裏付けを強固なものとする事となる。

F. 研究発表

なし