

平成25年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担（総合研究）報告書

家族性LCAT欠損症における腎不全惹起性リポ蛋白の解明と
本症を対象とした遺伝子治療による酵素補充療法の開発
研究分担者 武城英明（東邦大学医療センター佐倉病院）
研究協力者 黒田正幸（千葉大学医学部附属病院）

研究要旨 原発性脂質異常症の1つである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（FLD）は、重篤な腎不全を合併する。LCAT酵素の補充療法が根治療法と考えられるが、その疾患の希少性などにより開発が進んでいない。本研究は腎不全に関連したリポ蛋白異常の解明と持続的LCAT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。健常人とLCAT異常を持ちながら腎機能障害を合併しない魚眼病（FED）症例を対照として、FLDの腎機能障害合併と関連するリポ蛋白の同定をリポ蛋白の分画解析とrLCATに対する反応性を指標として試みた。その結果、FLD患者ではLCAT異常により、FEDと健常人の中間的なサイズの、そして脂質組成の異常なLDLが産生され、それが腎機能障害の進展に関与していることが考えられた。一方、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、レトロウイルスベクターによりLCAT遺伝子を導入した前脂肪細胞を自家移植する新たな治療法の開発研究を進めてきた。前脂肪細胞の産生するLCAT蛋白は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し、LCAT欠損マウスモデルへの移植によりLCAT欠損マウスにおいても脂質異常を改善した。これらの研究成果を元に、遺伝子治療臨床研究の申請作業を進め、本年度5月に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）の実施承認を受けた。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。

A. 研究目的

私たちは、原発性脂質異常症の1つである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）欠損症に対して、これまで自己の脂肪組織から調製されるLCAT遺伝子導入脂肪細胞を用いた新規遺伝子細胞治療の開発研究を進めている。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。

本研究では、これまでの研究活動で入手したLCAT欠損症患者血清検体とLCAT欠損マウスを用い、その病態改善効果を検討し、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。

B & C. 研究方法と結果

1. 用いた症例

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検体を用い、国際共同研究として実施した。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. LCAT遺伝子導入前脂肪細胞が分泌するLCATの患者HDLに対する改善効果

前脂肪細胞が分泌するLCAT酵素の機能を評価する目的で、健常人ドナーの脂肪組織から天井培養法により前脂肪細胞を調製し、レトロウイルスベクターによりLCAT遺伝子を導入、その培養上清を濃縮した。

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、患者血清中のHDL粒子の成熟を指標とした治療反応性評価を行った。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1）。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。

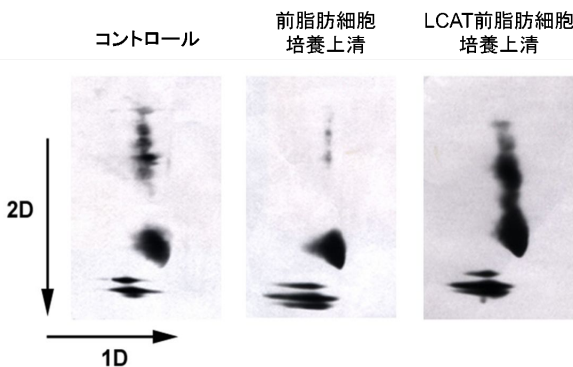


図1 .LCAT遺伝子導入前脂肪細胞の培養上清による患者HDLの成熟

培養上清を添加インキュベーションした後、二次元電気泳動を行い、HDLの主要アポリ蛋白であるApoAIに対するウェスタンブロットを行った。

3. 患者血清リポ蛋白のサイズによる分画解析

2の結果からLCAT遺伝子導入前脂肪細胞の培養上清は患者HDLの成熟に機能することが明らかになった。LCAT欠損による最も重篤な合併症は腎不全であり、本遺伝子細胞治療開発の第一目標は腎不全への移行の阻止である。

以前より家族性LCAT欠損症の腎不全合併には異常LDLが関与することが報告されているが、個々の症例の検討にとどまっておらず、詳細は不明である。そこで、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2）。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。

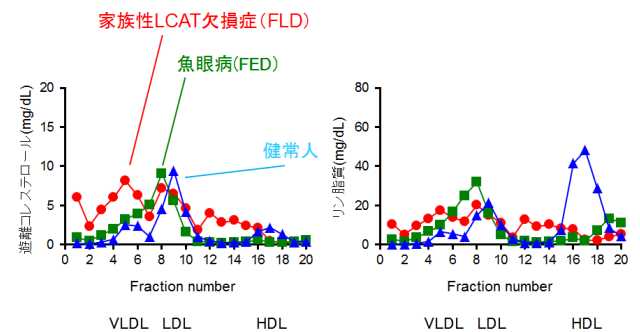


図2. FLD、FED、健常人のゲルろ過分画パターンと比較

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。

4．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3）。

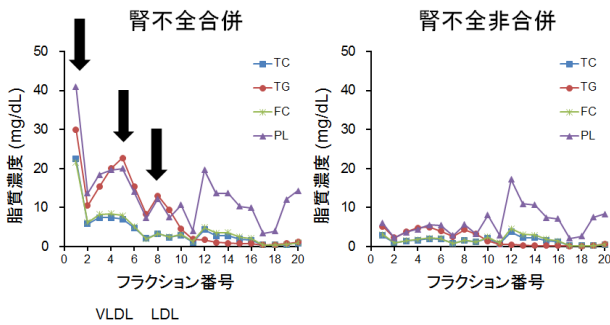


図3. 腎不全合併、非合併症例の比較

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4）。

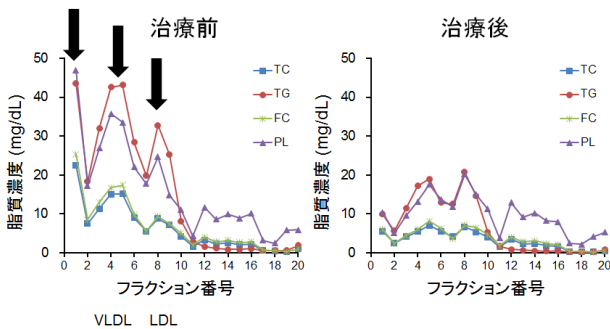


図4. FLD患者における脂肪制限食によるリポ蛋白プロファイルの変化

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。

5．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5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。

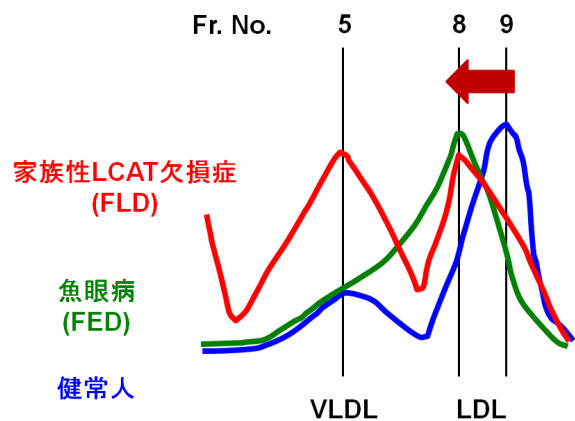


図5 FLD、FEDにおけるリポ蛋白サイズの異常

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。

6．家族性LCAT欠損症のリポ蛋白異常に対するLCATの影響

LCAT欠損症ではHDLの機能異常が認められる。前述の2の結果について同様のゲルろ過分画解析を実施した。FLD、FEDともに、LCAT遺伝子導入前脂肪細胞の培養上清の添加インキュベーションによりFCの減少とCEの増加が認められ、HDLの組成が改善することが示唆された。

次に、LCAT異常によりサイズ異常が生じ、腎不全でその量が変動するLDL分画についてその脂質組成をさらに検討した（図5）。

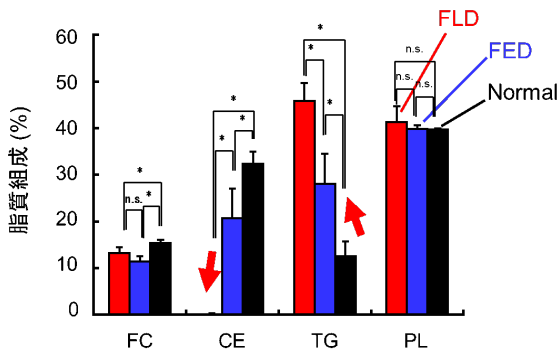


図5 FLD、FEDにおけるLDLの異常

FLD、FED、健常人の解析より、脂質組成を比較解析した。

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LDLではCEの出現とPLの減少が観察され、rLCATに反応したが、FEDのLDLはrLCAT添加に対して反応しなかった(図6)。

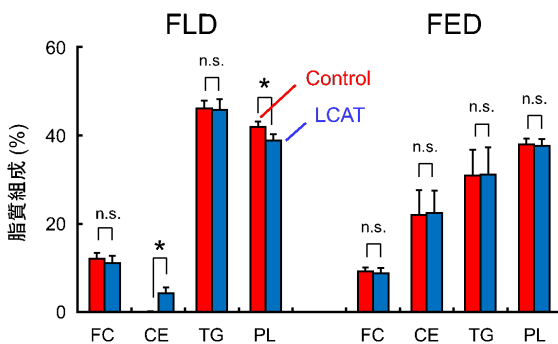


図6 FLD、FEDにおけるLDLのrLCATに対する反応性

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。

7. LCAT 欠損マウスでの有効性解析

本症の患者を対象とした遺伝子治療臨床研究を計画し、その承認に向けた審議を厚生労働省で受けた。作業委員会審査の過程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、K0 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。

K0 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 LCAT 活性(コレステロールのエステル化活性)を検出した(図 7)。その活性はヒト ApoA1 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。

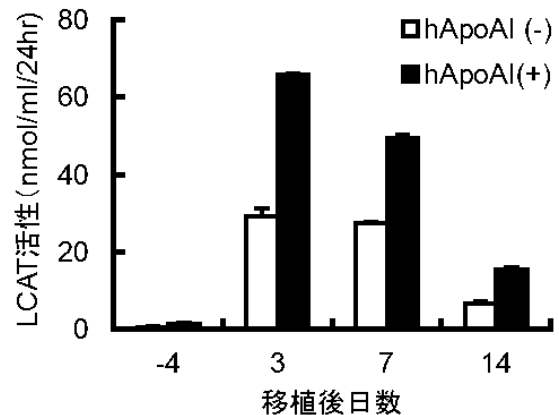


図 7. LCAT 欠損マウス血中へ分泌されたヒト LCAT の活性

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と LDL の脂質組成の改善を認め(図 8)、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を示唆している。

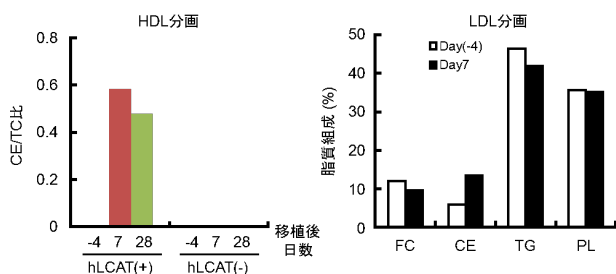


図 8. LCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞移植による LCAT 欠損マウスの脂質異常の改善

8. 遺伝子治療臨床研究の申請作業と実施承認

これらの有効性解析結果に加え、動物試験による安全性解析等の結果をまとめ、遺伝子治療臨床研究実施計画書を厚生労働省に申請し、H25年5月13日付で遺伝子治療臨床研究の実施承認を受けた。

(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。

DおよびE. 考察および結論

LCAT 欠損症は酵素補充療法が有効と考えられるが、希少疾病であることに加え、様々な制約により、その治療法開発が進んでいなかった。

本研究で家族性 LCAT 欠損症を対象とした遺伝子治療臨床研究の実施が可能となり、本遺伝子細胞治療が薬事承認を受ける第一歩を踏み出すことができた。

また、本症の腎不全発症に関与するリポ蛋白の性状が明らかになってきた。これらのリポ蛋白異常が家族性 LCAT 欠損症を対象とした遺伝子治療臨床研究における臨床評価マーカーとなる可能性がある。

今後は PMDA 薬事戦略相談等を利用し、より良い遺伝子細胞治療の開発を目指す予定である。

(謝辞)

本研究成果は患者さん検体の解析により得られたものであり、貴重な検体をご提供いただいた患者さんに感謝いたします。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Aoyagi Y, Kuroda M, Asada S, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Aso M, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Bujo H. Fibrin glue is a candidate scaffold for long-term therapeutic protein expression in spontaneously differentiated adipocytes *in vitro*. *Exp Cell Res*. 2012;318:8-15
- 2) Kuroda M, Bujo H, Aso M, Saito Y. Adipocytes as a vehicle for *ex vivo* gene therapy: Novel replacement therapy for diabetes and other metabolic diseases. *J Diabet Invest*. 2011;2:333-340.
- 3) 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. Ceiling culture-derived proliferative adipocytes

retain high adipogenic potential suitable for use as a vehicle for gene transduction therapy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;301:C181-C185.

- 4) 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.
- 5) 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; 228: 193-197.

酵素添加による改善. 日本小児脂質研究会(福井市) H25.11.9-10

H. 知的財産権の出願、登録状況

特記事項なし

学会発表

- 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
- 3) Kuroda M, Aso M, Saito Y, and Bujo H. Self-transplantation using therapeutic-enzyme secreting adipocytes for familial LCAT deficiency syndrome. 第45回日本動脈硬化学会総会・学術集会シンポジウム。(東京) H25.7.18-19
- 4) 黒田正幸、浅田咲世、青柳靖之、石橋俊、山下静也、鎌田貢壽、AG. Holleboom、武城英明. LCAT 欠損症の腎不全に関わる異常リポ蛋白の同定と