

による安全性確保のオプションを保つことが可能になるからである。我々の生体イメージングを用いた解析結果からは、フィブリン糊を用いた培養細胞の移植法は、注入直後の細胞定着が不安定な時期に細胞局在を保つことを明らかにした。長期的な局在性維持は今後の検討課題である。

E. 結論

フィブリン糊を用いて、通常確立された脂肪移植と同様に微量分割注入が可能である。また、フィブリン糊に培養細胞を懸濁して注入する方法は注入後早期の定着が不安定な時期に局在性を保つことが可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kubota Y, Mitsukawa N, Akita S, Hasegawa M, Satoh K. Postoperative patency of the retrograde internal mammary vein anastomosis in free flap transfer. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2014 Feb;67(2):205-11. doi: 10.1016/j.bjps.2013.10.013. Epub 2013 Oct 26. PubMed PMID: 24211113.

2) Kubota Y, Mitsukawa N, Uchida M, Uchida Y, Akita S, Hasegawa M, Satoh K. Low-level mesodermal somatic mutation mosaicism: Late-onset craniofacial and cervical spinal hyperostoses. *Am J Med Genet A.* 2013 Dec 19. doi:10.1002/ajmg.a.36310. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24357582.

2. 学会発表

1) 窪田吉孝、安達直樹、笹原資太郎、小泉智恵、長谷川正和、黒田正幸、三川信之、武城英明、横手幸太郎、佐藤兼重。Ex vivo 遺伝子導入した脂肪細胞移植による難治性・希少疾患治療の展望 第22回日本形成外科学会基礎学術集会、2013年11月7日、新潟

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

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25年度 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への円滑な橋渡しに関する研究
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。そこで、先進医療 B の臨床試験あるいは今後予定される医師主導治験を視野に入れながら、先行する遺伝子治療臨床研究の体制整備に取り組んだ。

A. 研究目的

治験実施計画書作成のため、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する。

B. 研究方法

本研究においては、以下の3項目につき研究に取り組んだ。

- (1) プロジェクト管理
- (2) GMP 準拠環境整備
- (3) データ管理体制
(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。実施される臨床研究は遺伝子治療臨床研究に関する倫理指針に基づいて実施される。

C. 研究結果

(1) プロジェクト管理

試験期間内の適切な症例の組み入れ等、試験遂行のためプロジェクト管理は不可欠である。臨床試験部プロジェクト

マネジメントにより、細胞調製の基礎研究者、臨床担当の内科医師、脂肪細胞摘出および移植担当の整形外科医師が合同で会議を重ね、臨床研究における具体的な手順や役割分担について検討した。

特に遺伝子を扱う治療であるため、遵守すべき法令に基づいて、手技が行われる場所や方法について多角的な検討を行った。

(2) GMP 準拠環境整備

今後先進医療 B の臨床試験あるいは医師主導治験を実施するためには GMP 対応の CPC 整備が必要となる。臨床研究では GMP 準拠の整備がまず必要であり、新たに CPC 建設を計画し、今年度末に完成予定である。設計において、先端医療振興財団及び CPC 整備企業のコンサルタントを受け、それらのアドバイスを反映した。また、遺伝子を扱う上で CPC に必要な注意事項のアドバイスを確認した。

CPCの運営管理およびSOPの整備が大きな課題であり、この点を克服するために、専任の運営管理担当者を来年度より採用予定とした。SOPの整備および作成を、専門のCPC整備企業に委託することとし、現状の説明を行い、SOPの一部については今年度内に納品予定である。

(3) データ管理体制

データの管理については、臨床試験部に新しく設置されたデータセンターにおける電子データシステムによりデータを保管する予定である。症例報告書の作成に向けて、基礎研究者、臨床担当医師、データ管理責任者等がより詳細な必要項目の精査を行った。

D. 考察

遺伝子治療臨床研究は「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。特に、安全性を確保するためにCPCにおける細胞調製においてGMP準拠の管理は不可欠であり、そのためのハードおよびソフト面の充実に向けて今年度は取り組んだ。また、臨床研究に関わる基礎研究者、内科医師、外科担当、データ管理等の連携を構築し、今後さらに関わる担当者を広げてチーム構築に取り組んで行く。

E. 結論

治験実施計画書作成のため、遺伝子治療臨床研究と今後予定される先進医療Bあるいは医師主導治験の実施体制について比較検討した。治験は薬事法のもとで実施するため、CPCはGMP対応が必須であるが、GMP準拠で行う臨床試験においてはGMP準拠のSOPの整備が必要である。そのため現在SOPの作成に取り組んでいる。今後、臨床試験および非臨床試験で得られたデータを適切に治験実施計画書に反映し、質の高いプロトコール作成を目指すものである。

F. 研究発表

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

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
黒田正幸、武城英明	家族性LCAT欠損症	日本臨床	71, 増刊号3	275-279	2013
Naito S, Kamata M, Furuya M, Hayashi M, Kuroda M, Bujori 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	228	193-197	2013
麻生雅是、黒田正幸	ヒト脂肪細胞の初代分離・培養と臨床応用	Organ Biology	21	60-65	2014
Miyamoto M, Kotani K, Okada K, Ando A, Hasegawa H, Kangai H, Ishibashi S, Yamada T, Taniguchi N.	Arterial wall elasticity measured using the phased tracking method and atherosclerotic risk factors in patients with type 2 diabetes	J Atheroscler Thromb.	20(8)	678-87	2013
Okada K, Yagyu H, Kotani K, Yamazaki H, Ozaki K, Takahashi M, Nagashima S, Osuga J, Ishibashi S	Effects of miglitol versus sitagliptin on postprandial glucose and lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus	Endocr J.	60(7)	913-922	2013

Takahashi M, Yagyu H, Tazoe F, Nagashima S, Ohshiro T, Okada K, Osuga J, Goldberg IJ, Ishibashi S	Macrophage lipoprotein lipase modulates the development of atherosclerosis but not adiposity	J Lipid Res.	54(4)	1124-34	2013
Kubota Y, Mitsukawa N, Uchida M, Uchida Y, Akita S, Hasegawa M, Satoh K	Low-level mesodermal somatic mutation mosaicism: Late-onset craniofacial and cervical spinal hyperostoses	Am J Med Genet A.	164(3)	741-7	2013
Kubota Y, Mitsukawa N, Akita S, Hasegawa M, Satoh K.	Postoperative patency of the retrograde internal mammary vein anastomosis in free flap transfer.	J Plast Reconstr Aesthet Surg.	67(2)	205-11	2014

IV. 研究成果の刊行物・別冊

IV 脂質異常症の臨床

原発性脂質異常症の病因・病態・診断・治療
 原発性低HDLコレステロール血症

家族性LCAT欠損症

Familial lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency

黒田正幸¹ 武城英明²

Key words : レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT), 低HDL, 異常LDL, 角膜混濁, 腎不全

IV

脂質異常症の臨床

はじめに

レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) は体内のコレステロール代謝に必須な酵素であり、家族性LCAT欠損症は、LCAT遺伝子の異常による常染色体劣性遺伝性疾患である。LCAT機能異常を原因とする脂質代謝異常とリポ蛋白異常を原因として様々な合併症を引き起こす。

1 LCAT

LCATは、レシチンと遊離コレステロールからコレステリルエステルとリゾレシチンを生成する反応を触媒する。LCATは、血中では主にHDLで機能し、一部がApoB含有リポ蛋白質に結合して循環する。LCATは、遊離コレステロール、リン脂質とApoA-Iを含んだプレβ-HDLに結合し、ApoA-Iによって活性化され、遊離コレステロールのエステル化反応を介してHDLの成熟に寄与する。HDL中でのエステル化活性をα活性と呼ぶ。またLCATはApoB含有リポ蛋白質の中で遊離コレステロールをエステル化する活性も有する(β活性)。HDLは末梢組織からの遊離コレステロールの引き抜きと肝臓

への転送(コレステロール逆転送, RCT)に機能し、LCATによる遊離コレステロールのエステル化反応はRCTに重要な役割を果たしている。LCATは主に肝臓で、一部は脳や精巣に発現している。LCATは分子量が約67kDaの416残基からなる糖蛋白質であり、成熟蛋白は血中に分泌される。

2 LCAT遺伝子異常による病態：
家族性LCAT欠損症と魚眼病

LCATの先天的な機能異常による病態は、家族性LCAT欠損症(FLD, MIM#245900)と魚眼病(FED, MIM#136120)の2つに大別される¹⁾。FLDは基本的に前述のα活性とβ活性がともに欠損し、FEDはα活性のみ欠損する病態である。現在までに報告されているLCAT遺伝子の変異は約100種類に上る(図1)。このうち、60種類はFLDの原因として同定され、その1/3はナンセンス変異もしくはフレームシフトにより全長のLCAT蛋白が産生されないものである。2/3の変異はミスセンス変異であり、活性が部分的に欠損している中間的な病態もあるため、その臨床症状(重症度)は多様である。

¹Masayuki Kuroda, ²Hideaki Bujo: ¹Center for Advanced Medicine, Chiba University Hospital 千葉大学医学部附属病院 未来開拓センター ²Department of Genome Research and Clinical Application, Graduate School of Medicine, Chiba University 千葉大学大学院医学研究院 臨床遺伝子応用医学

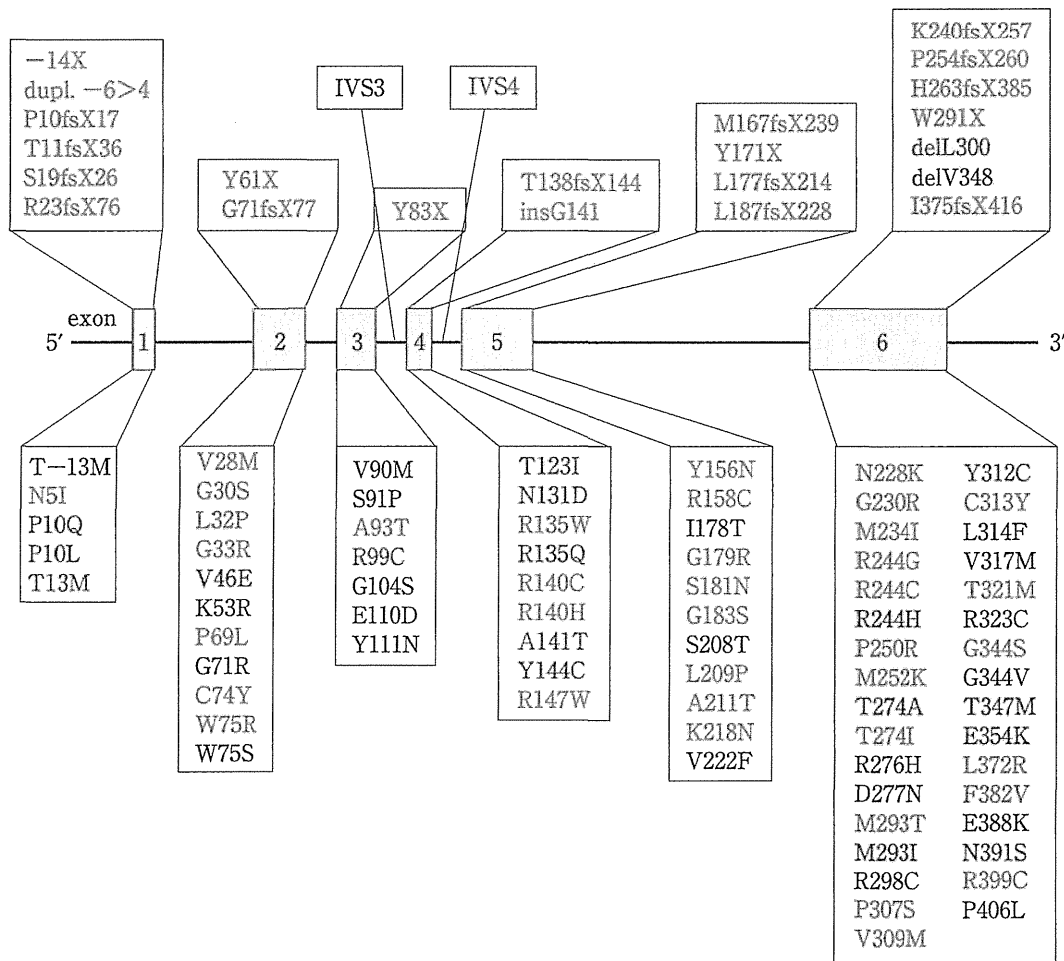


図1 これまでに報告されている LCAT 遺伝子変異

ヒトの LCAT 遺伝子領域(約 4.5kb)は 16 番染色体(16q22 領域)に存在し 6つのエクソンから構成されており、すべてのエクソンにおいて LCAT 機能に異常をきたす変異が同定されている。上側にフレームシフト、ナンセンス変異を、下側にミスセンス変異を示した。(赤: FLDの原因となる変異, 青: FEDの原因となる変異, 黒: 機能が明確でないもの)

3 LCAT 機能異常に伴うリポ蛋白異常

LCATの機能に異常が生じると、LCATの基質である体内の遊離コレステロールやリン脂質の代謝が障害され、血中リポ蛋白の濃度、組成や形態に異常が生じる(図2-a, b)。FLDとFEDは共通してLCATのHDL上での活性(α活性)が欠損した一次的な原因により低HDL血症を呈する。ほとんどの症例のHDL-C濃度は10mg/dL未満である。α活性の欠損によりHDL粒子の成熟が障害され、患者HDL分画に認められる粒子の多くはプレβ-HDLと類似の形態を示し(discoidal HDL)、連銭形成が認められる。

HDLの障害に伴い、ApoA-I、A-IIも低下する。

典型的なFLDは、β活性を欠損するため血漿中にコレステリルエステルはほとんど存在しない。遊離コレステロールがすべての血漿リポ蛋白分画に蓄積し、とりわけ遊離コレステロールリッチなVLDLが増加する。更に患者LDL粒子はサイズが大きく、遊離コレステロール、リン脂質、トリグリセライドに富む。LDL分画にはアガロースゲル上で異常な移動度を示すLpXが検出される¹⁾。

このようなりポ蛋白代謝異常により標的臓器に通常ではみられない脂質蓄積が生じることで、重篤な臓器障害や合併症が引き起こされる(図

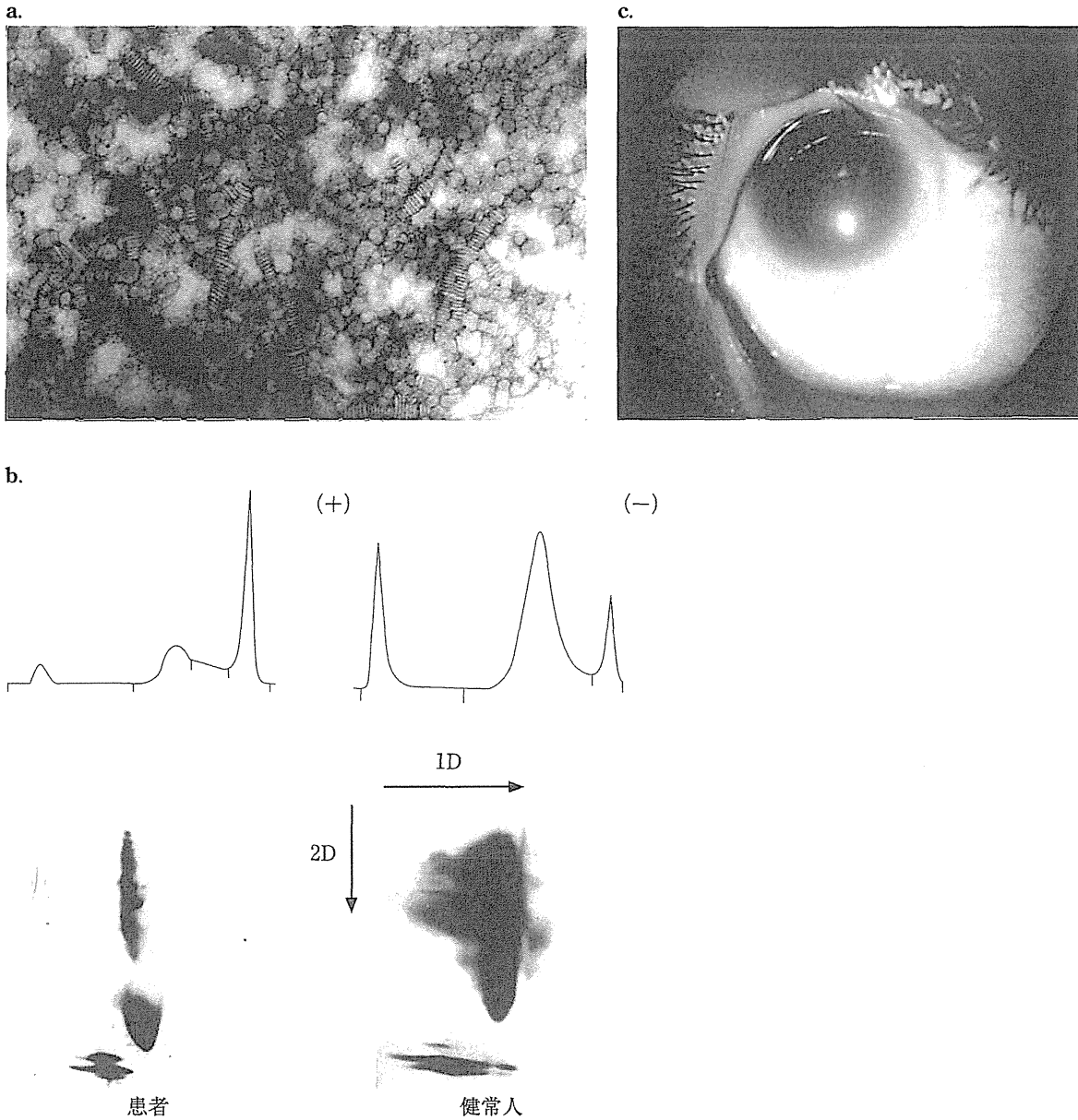


図2 患者臨床所見

a. HDL異常, b. リポ蛋白異常(上段: リポ蛋白分画(ポリアクリルアミドゲル), 下段: 二次元電気泳動後のApoA-Iに対するウェスタンブロット), c. 角膜混濁

IV

脂質異常症の臨床

3). 以下に主な臨床所見について述べる.

4 家族性LCAT欠損症の病態と臨床像

1) 眼科所見

比較的幼少期から角膜混濁が認められる(図2-c). 患者角膜には顕著な遊離コレステロールとリン脂質の蓄積が観察される. FLDよりもFEDにおいてより顕著である. 角膜移植の必要

となる視力障害の症例も報告されている. 角膜混濁はApoA-IやABCA1の欠損による低HDL血症でも認められることから鑑別が必要である.

2) 血液系異常

赤血球膜の脂質組成異常により標的赤血球が出現し貧血が認められる. 赤血球の半減期が健康人の半分程度である. 遊離コレステロールの増加による二次性のsea-blue histiocytosisが骨髓, 脾臓に認められる(シーブルー組織球症候

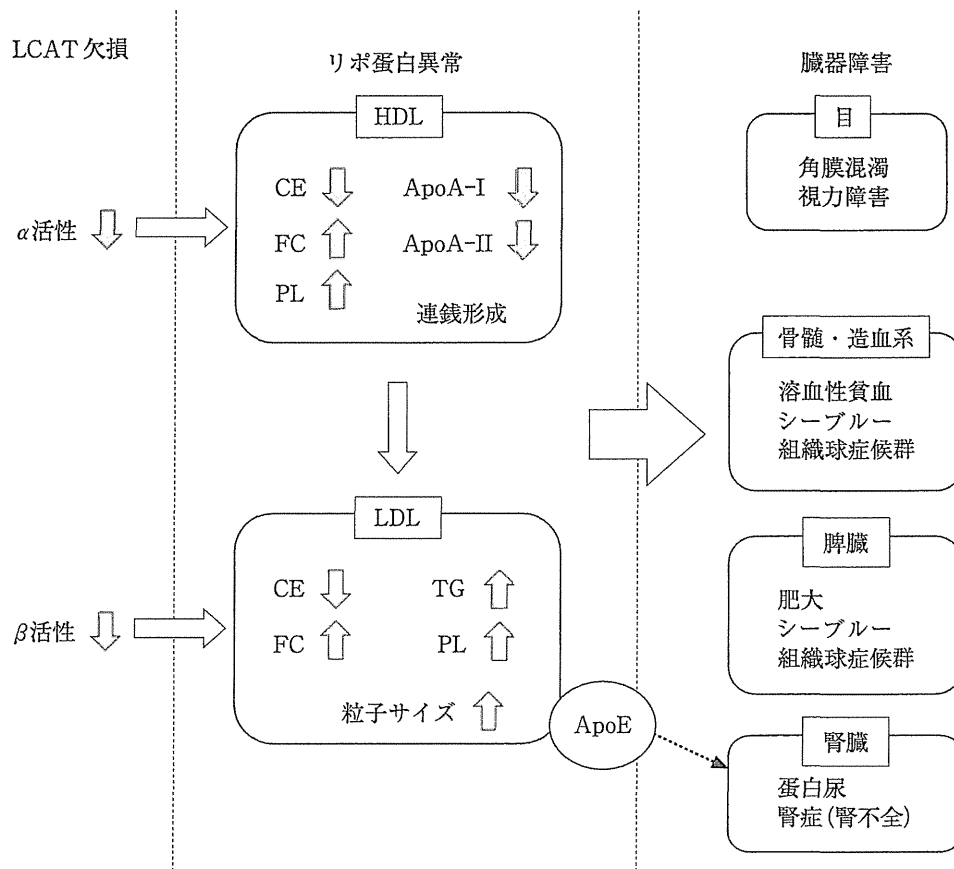


図3 家族性 LCAT 欠損症 (FLD) の病態

LCAT 活性 (α 活性) の異常により, HDL の機能が障害される. その結果, LDL を初めとする他のリポ蛋白に異常が生じる. 更に FLD では β 活性も障害されるため, LDL の異常が更に進行する. これらのリポ蛋白異常と代謝されずに蓄積された脂質により臓器障害が引き起こされる. 魚眼病 (FED) では β 活性は保持されているため LDL は健常人と FLD の中間的な脂質組成異常を示す.

群)^{1,2)}と報告されている. しかしながら, 骨髓, 脾臓の所見まで検討されている報告は少なく機序は不明である.

3) 蛋白尿, 腎機能障害

幼少期から重篤になるケースは報告されていないが, 蛋白尿を早期に認め, 進行性の腎不全を 40-50 歳で発症する. 魚眼病では一般に認められない. FLD が疑われる症例では腎生検が有用である. 糸球体基底膜, 血管内皮下への遊離コレステロールとリン脂質の沈着が認められる. 患者血中には遊離コレステロール, リン脂質, トリグリセライドに富むサイズの大きな異常 LDL が認められ, これが腎機能障害の原因であると考えられている. LDL 分画中に検出される

LpX は脂肪制限食により低下し腎機能障害の程度と関連すると報告されている. LpX がメサングウム細胞において NF- κ B を介して MCP-1 遺伝子の発現を亢進し, 腎組織の炎症を引き起こすこと³⁾, 患者 LDL 中の酸化型フォスファチジルコリンが関連している⁴⁾という腎機能障害のメカニズムにかかわる報告がある. 腎臓メサングウム細胞に ApoE を含むリポ蛋白が取り込まれ, それが過剰な脂質の沈着を引き起こすことにより腎機能障害を発症するという報告もあることから, 近年腎機能障害と ApoE 遺伝子型との関連が注目されている. ApoE は LDL 粒子における β 活性の共役分子であり, 異常リポ蛋白の生成に影響を及ぼす可能性がある^{5,6)}.

5 治療と予後

FLDの生命予後を規定する因子は腎不全の進行である。腎移植は一時的な腎機能改善には効果があるが、再発のリスクがある⁷⁾。腎機能障害のある症例は、腎機能の保護を目的として、低脂肪食による食事療法、アンジオテンシンII受容体拮抗薬、アンジオテンシン転換酵素阻害薬などの薬物療法が行われている。いずれも対症療法であり腎機能障害の原因とされる異常リポ蛋白の改善が期待できないことから、長期の進展予防効果や再発の可能性は明らかでない。

根治療法としてLCAT蛋白の持続補充療法が望まれる。組換えLCAT蛋白製剤が開発され、臨床試験が進められている(NCT01554800)。より長期的な改善を期待できる遺伝子治療の対象疾患の一つであり、米国でアデノ随伴ウイルス

をベクターとした遺伝子治療⁸⁾、我が国で脂肪細胞を用いた*ex vivo* 遺伝子細胞治療法の開発が進められている⁹⁾。

おわりに

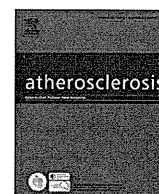
FLDとFEDの病態が発見されたのは1960-70年代にさかのぼるが、原因となる新規変異は最近になって引き続き報告されている。家族歴のない複合ヘテロ接合体症例も多く報告されていることから、この疾患を有する患者数は当初考えられていたよりも多いことが考えられ、患者の診断と病態把握には遺伝子解析、リポ蛋白異常、臨床所見から総合的に評価する必要がある。近年LCAT変異のヘテロ接合体が動脈硬化の危険因子であることが報告され¹⁰⁾、患者の近親者のフォローアップも重要である。

IV

脂質異常症の臨床

文 献

- 1) Santamarina-Fojo S, et al: Lecithin cholesterol acyltransferase deficiency and fish eye disease. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed (ed by Scriver CR, et al), p2817-2833, McGraw-Hill, New York, 2001.
- 2) Naghashpour M, Cualing H: Splenomegaly with sea-blue histiocytosis, dyslipidemia, and nephropathy in a patient with lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency: a clinicopathologic correlation. *Metabolism* 58: 1459-1464, 2009.
- 3) Zhu X, et al: A novel in vivo lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT)-deficient mouse expressing predominantly LpX is associated with spontaneous glomerulopathy. *Am J Pathol* 165: 1269-1278, 2004.
- 4) Jimi S, et al: Possible induction of renal dysfunction in patients with lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency by oxidized phosphatidylcholine in glomeruli. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 794-801, 1999.
- 5) Baass A, et al: Characterization of a new LCAT mutation causing familial LCAT deficiency (FLD) and the role of APOE as a modifier gene in FLD phenotype. *Atherosclerosis* 207: 452-457, 2009.
- 6) Katayama A, et al: Two novel mutations of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) gene and the influence of APOE genotypes on clinical manifestations. *NDT Plus* 4: 299-302, 2011.
- 7) Strøm EH, et al: Lecithin:Cholesterol Acyltransferase (LCAT) Deficiency: renal lesions with early graft recurrence. *Ultrastruct Pathol* 35: 139-145, 2011.
- 8) Chen Z, et al: AAV8-mediated long-term expression of human LCAT significantly improves lipid profiles in hCETP:Ldlr(+/-) mice. *J Cardiovasc Transl Res* 4: 801-810, 2011.
- 9) Kuroda M, et al: Adipocytes as a vehicle for ex vivo gene therapy: Novel replacement therapy for diabetes and other metabolic diseases. *J Diabet Invest* 2: 333-340, 2011.
- 10) Duivenvoorden R, et al: Carriers of lecithin cholesterol acyltransferase gene mutations have accelerated atherogenesis as assessed by carotid 3.0-T magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* 58: 2481-2487, 2011.



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



Shokichi Naito^{a,*}, Mariko Kamata^a, Masako Furuya^a, Miyuki Hayashi^a, Masayuki Kuroda^{b,c}, Hideaki Bujo^b, Kouju Kamata^a

^a Department of Nephrology in Internal Medicine, Kitasato University Hospital and Kitasato University School of Medicine, 1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-0375, Japan

^b Department of Genome Research and Clinical Application, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan

^c Center for Advanced Medicine, Chiba University Hospital, Chiba University, Chiba, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 September 2012

Received in revised form

31 January 2013

Accepted 26 February 2013

Available online 14 March 2013

Keywords:

Familial LCAT deficiency

Novel gene mutation

Cys74Tyr

Fat-restriction diet

Circulating lipoprotein profile

Renal function

ABSTRACT

Familial lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency is a hereditary disease characterized by an abnormal lipid profile, corneal opacity, anemia and progressive renal disease. We report a patient with complete loss of LCAT activity due to a novel *lcat* gene mutation of Cys74Tyr in the lid region of LCAT protein. Esterification of cholesterol in this patient was disturbed by disruption of a substrate binding loop of Cys50-Cys74 in LCAT protein. She had progressive renal dysfunction, proteinuria, corneal opacity, anemia and an abnormal lipid profile. Her serum lipids showed a significant increase in abnormal lipoproteins at the original position in agarose gel electrophoresis and VLDL-cholesterol, and a severe decrease in serum HDL-cholesterol. Lipoprotein analyzes also revealed the presence of an abnormal midband lipoprotein, and a maturation disturbance of HDL particles. Renal function and proteinuria improved following the adoption of a fat-restricted diet and administration of an angiotensin II receptor blocker. The abnormal lipoproteins also decreased after this treatment.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency is an uncommon autosomal recessive disorder which results from a gene mutation of LCAT. Since the first identification of LCAT as a unique plasma enzyme [1], 86 mutations in the LCAT gene have been described. Patients with LCAT deficiency show an abnormal circulating lipoprotein profile as a result of the disturbed esterification of free cholesterol incorporated into high-density lipoproteins. Increased plasma concentrations of unesterified cholesterol, triglyceride (TG) and phosphatidylcholine result in lipid deposition in the tissue. LCAT deficiency develops as two clinically distinct syndromes, familial LCAT deficiency (FLD) and fish eye disease (FED). Patients with FLD show corneal opacities, hemolytic anemia, and progressive renal disease [2]. Renal disease occurs as a result of the loss of enzyme activity against β -lipoproteins rather than against

α -lipoproteins. Meanwhile, FED patients develop corneal opacities as a result of a partial deficiency in LCAT activity.

A number of approaches to the treatment of LCAT deficiency have been proposed. LCAT replacement therapy by plasma transfusion produced a marked improvement in the deranged composition of TG-rich lipoproteins and Apo-E concentrations [3,4]. Recent advances in gene therapy have allowed the transplantation of *ex vivo* *lcat* gene-transduced adipocytes and subsequent production of human LCAT protein in circulating plasma [5,6]. Further, a clinical trial of synthetic LCAT in patients with coronary arterial disease is also currently underway at NIH (NCT01554800). In contrast, a fat-restriction diet improves the hypertriglyceridemia in these patients by reducing TG-rich lipoproteins. The lipid-lowering drugs nicotinic acid and fenofibrate have been shown to ameliorate renal function and proteinuria [7], and corticosteroids and renin-angiotensin-aldosterone (RAA) system blockers such as ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers (ARB) also decreased proteinuria [8–10].

Here, we report a novel LCAT gene mutation in a patient which resulted in disruption of the disulfide bridges essential to the

* Corresponding author. Tel.: +81 42 7788111; fax: +81 42 7789371.

E-mail address: s-naito@med.kitasato-u.ac.jp (S. Naito).

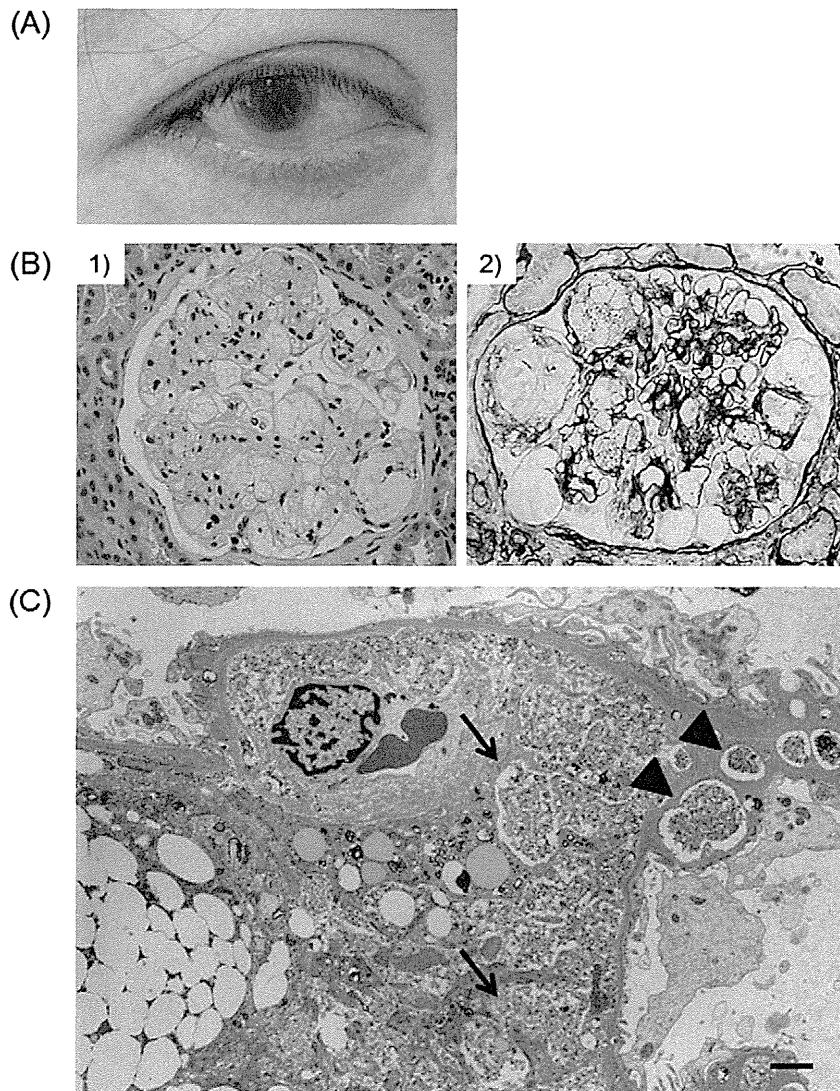


Fig. 1. Ocular and renal pathology (A) Corneal opacity in the patient. (B)-1) PAS staining of a renal biopsy specimen. 400 \times . An increase in cell number and matrix expansion are seen in the mesangial area of the glomerulus. Foam cell infiltration into capillary loops and the mesangial area are seen in the glomerulus. (B)-2) PAM staining shows irregular thickening and double contours in the glomerular basement membrane (GBM). Foam cells within granular structures are present in the capillary lumen. (C) Electron micrograph of the glomerulus shows the presence of clear vacuoles containing granular structures in the mesangium (\uparrow) and within the GBM (\blacktriangledown). 3000 \times . Bar = 2 μ m.

enzyme lid region. This patient had a complete deficiency in LCAT activity and renal insufficiency. We also investigated the effects of a fat-restriction diet and administration of an ARB on plasma lipoprotein profiles and proteinuria in this patient.

2. Materials and methods

2.1. Biochemical and genetic analysis

Biochemical and urine samples were analyzed by enzymatic methods using a chemical autoanalyzer (Hitachi Co., Tokyo, Japan). Esterified cholesterol concentrations were calculated as the difference between total and free cholesterol. LDL-cholesterol was determined a Determiner-L LDL-C (Kyowa Medex, Tokyo, Japan). LCAT activity in serum was measured using a colorimetric method for analyzing cholesterol esterification rate (CER) with synthetic dipalmitoyl lecithin sol [11]. Alpha-LCAT activity was also measured using Anasolb LCAT[®] (Sekisui Medical, Tokyo, Japan). Genomic DNA was purified from plasma with a QIAamp DNA kit (QIAGEN, Hilden,

Germany). Genomic fragments were amplified by PCR, followed by agarose gel purification and direct sequencing. The entire sequence of the *lcat* gene locus thereby obtained was compared with a reference sequence (NM_000229) to identify nucleotide substitution. The study was approved by the Ethics Committee of Chiba University School of Medicine, and informed consent was obtained from the patient. Both parents were deceased, and informed consent for genetic analysis was not obtained from her younger sister, who shows corneal opacity.

2.2. Lipoprotein analysis

The serum lipoprotein profile was determined by polyacrylamide gel disc electrophoresis [12]. Two-dimensional electrophoresis was performed as described previously [13]. Lipoproteins were also evaluated by agarose gel electrophoresis using the rapid electrophoresis system [14–17]. After electrophoresis, cholesterol and triglycerides in the plates were separately stained and analyzed with a Cho/Trig COMBO kit according to the

manufacturer's instructions (Helena Laboratories, Saitama, Japan). Using the serum total cholesterol and TG concentrations in the blood samples, concentrations of cholesterol and TG in each fraction were determined using the detected ratio of cholesterol and TG after automatic densitometric analysis.

3. Results

3.1. Patient

A 61-year-old Japanese woman was transferred to the Department of Nephrology, Kitasato University Hospital. She complained of dyspnea on walking for the preceding five months, and eyelid and pretibial edema for one month. Family history showed her married parents were cousins, and that her younger sister had corneal opacity and mental retardation. She had anemia (Hemoglobin 9.5 g/dl) bilateral corneal opacities (Fig. 1A) and pitting edema. Urinalysis revealed proteinuria at 2 g/day, 1 + microscopic hematuria, and an N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) level of 29.1 unit/L (normal range: 1–4.2). Blood chemistry showed total protein 6.4 g/dL, albumin 3.4 g/dL, total cholesterol 235 mg/dL, TG 235 mg/dL, HDL-cholesterol 22 mg/dL, LDL-cholesterol 39 mg/dL, urea nitrogen 40 mg/dL, creatinine 1.83 mg/dL, and uric acid 8.2 mg/dL. CER of normal sera without heat inactivation was 96.3 ± 10.4 nmol/ml/h ($n = 3$), indicating normal LCAT activity. In contrast, CER of patient sera without heat-inactivation was 16.3 nmol/ml/h, which was below the CER of heat-inactivated normal sera (21.3 ± 1.8 nmol/ml/h, $n = 3$), indicating the total loss of LCAT activities in the patients. The 84 units of alpha-LCAT activity in patient serum measured by Anasorb LCAT[®] was also markedly low as compared with a standard level of 382–512 units. No abnormalities on chest X-ray, electrocardiography or echography findings were detected in either kidney. The renal biopsy specimen showed glomerular mesangial expansion, and foam cell infiltrates into glomerular tufts and mesangium. PAM staining revealed irregular thickening, double contouring, and vacuolation of the glomerular basement membrane (GBM) (Fig. 1B). Electron microscopic findings revealed numerous small vacuoles and granular structures within the vacuoles in the GBM and mesangial matrix (Fig. 1C). Immunofluorescence revealed negative staining for immunoglobulins of IgG, IgA and IgM, and for complement components of C1q, C4 and C3. These findings are consistent with the findings of LCAT deficiency.

3.2. Gene analysis

Direct sequencing of the *lcat* gene and comparison with a reference sequence (NM_000229) showed that the proband had a novel homozygous G to A nucleotide substitution in exon 2 resulting in Cys74Tyr [c.293 G > A (p.Cys74Tyr)]. The amino acid substitution was a novel mutation in the lid region of the LCAT protein. The substituted cysteine was one of four cysteine amino acid residues which formed the disulfide bonds in construction of the enzyme lid structure [23].

3.3. Lipid and lipoprotein profiles

Serum TG and free cholesterol values were higher than normal, while cholesterol ester, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol values appeared lower (Table 1). Densitometric analysis for lipid staining of lipoproteins on disc polyacrylamide gel electrophoresis of serum showed a significant decrease in α and pre β - β positions, and a tiny abnormal "midband" localized on pre β - β position (Fig. 2A). Two-dimensional gel electrophoresis followed by immunodetection for apoprotein showed that distribution of apoprotein was shifted to

Table 1

Lipid profiles in a patient with LCAT deficiency following a fat-restriction diet and administration of losartan for 8 months. Lipid profiles at admission and after adoption of a fat-restriction diet consisting of 10 g fat, 45 g protein and 1570 kcal energy per day and administration of losartan 50 mg for 8 months on lipid profile in a patient with LCAT deficiency.

Lipid fraction		Normal value	At admission	At 8 months of treatment
Total cholesterol	(mg/dl)	120–220	235	80
Triglyceride	(mg/dl)	30–150	235	142
LDL-cholesterol	(mg/dL)	70–139	39	33
HDL-cholesterol	(mg/dL)	40–96	22	19
Free cholesterol	(mg/dL)	30–65	205	71
Cholesterol ester	(mg/dL)	90–200	30	9
Free/total cholesterol	(%)	70–80	87	88

the smaller HDL particles, indicating that the maturation of HDL particles was impaired (Fig. 2B). The production of LDL particles was thus severely disturbed, as evidenced by the presence of an abnormal "midband" lipoprotein and the disturbed maturation of HDL particles resulting in a severe decrease in HDL lipoprotein.

Cholesterol and TG staining for lipoproteins which migrate to the α -position on agarose gel electrophoresis could not be seen in the serum at admission (Fig. 3A). Lipoproteins which migrate to the pre β -position were also decreased on both cholesterol and TG staining at admission (Fig. 3A), whereas lipoproteins which migrate to the β -position showed broad bands in both cholesterol and TG staining. The amount of cholesterol and TG in each lipoprotein fraction of serum at admission is shown in Table 2. Apolipoproteins AI and AII, which are predominantly contained in HDL-lipoprotein,

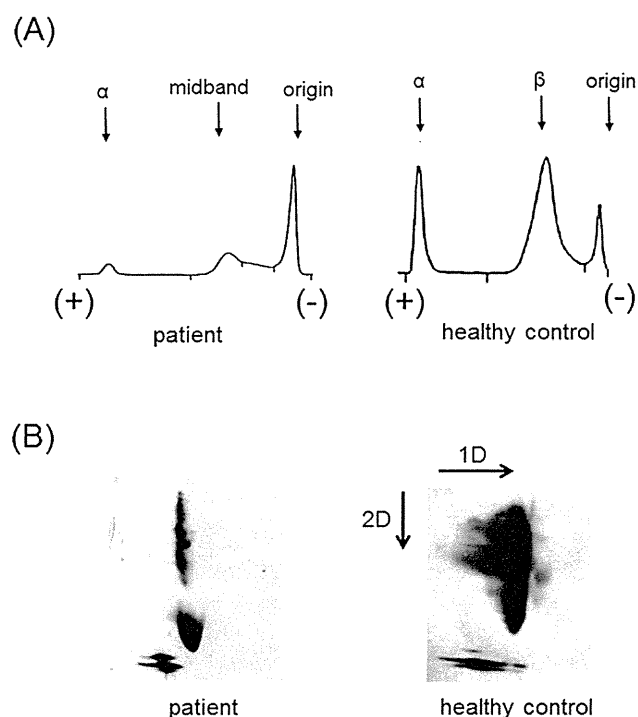


Fig. 2. Densitometric analysis of lipoproteins on disc polyacrylamide gel electrophoresis in the patient and a healthy control. (A) Serum at admission shows an increase in original position lipoproteins, a decrease in α -position lipoproteins, and the appearance of midband lipoproteins instead of β -position lipoproteins. (B) Two-dimensional disk electrophoresis consisting of charge separation for the first dimension and molecular weight separation for the second dimension followed by immunostaining for apolipoprotein. Apolipoprotein distribution was shifted towards the smaller HDL particles, indicating that the maturation of HDL particles in this patient was impaired.

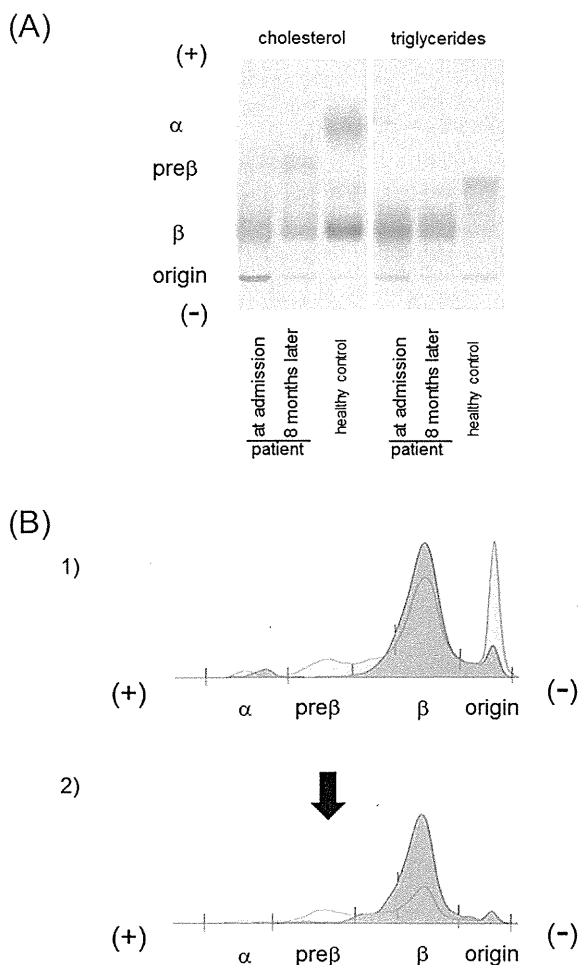


Fig. 3. Staining patterns for cholesterol and triglycerides in lipoproteins on agarose gel electrophoresis. (A) In cholesterol staining, the lipoproteins at original position increased, while the lipoproteins at α - and β -position decreased in the patient at admission compared with those of a healthy control. After 8 months on a fat-restriction diet and administration of losartan 50 mg, a decrease in original position lipoproteins is seen. In triglyceride staining, the serum sample at admission shows a decrease in pre β -position lipoproteins and increase in β -position lipoproteins compared with levels of a healthy control. (B) Densitometric analyzes for staining pattern. Cholesterol staining is shown as a red area, and triglycerides staining as a blue area. (B)-1 Staining patterns for lipoproteins in the patient's serum at admission. (B)-2 Staining patterns for lipoproteins in the patient's serum at 8 months after a fat-restriction diet and administration of losartan 50 mg. Original and β -position lipoproteins stained for cholesterol at admission have decreased after treatment for 8 months.

were decreased at admission (Table 2), whereas apolipoprotein CII and E were increased (Table 2).

3.4. Effects of a fat-restriction diet on LCAT deficiency-induced lipid profile and kidney disease

The patient was prescribed a fat-restricted diet consisting of meals containing 10 g of fat, 45 g of protein and 1570 kcal of energy during admission, and treatment with losartan, an ARB, was started by single daily administration at 50 mg from 14 days after admission. This treatment was continued following discharge, and follow-up at 8 months showed that compliance with both the diet and medication was good. Her body weight decreased from 64 to 52 kg at 6 month after the start of the fat-restricted diet, and was thereafter maintained. At one year of treatment, her proteinuria had decreased from 2.04 g/g·creatinine (Cr) to 0.62 g/g·Cr, and her serum Cr level had decreased from 1.83 mg/dl to 1.10 mg/dl.

Table 2

Apolipoprotein profile in a patient with LCAT deficiency before and after treatment with a fat-restriction diet and administration of losartan for 8 months. Apolipoprotein profile at admission, and effect of a fat-restriction diet consisting of 10 g fat, 45 g protein, and 1570 kcal energy per day for 8 months on apolipoproteins in a patient with LCAT deficiency.

Apolipoprotein fraction	Normal values	At admission	After 8 months of treatment
apoA-I (mg/dL)	126–165	39	34
apoA-II (mg/dL)	24–33.3	5.1	3.3
apoB (mg/dL)	66–101	63	55
apoC-II (mg/dL)	1.5–3.8	5.6	1.3
apoC-III (mg/dL)	5.4–9.0	8.6	3.5
apoE (mg/dL)	2.8–4.6	10.8	5.4

Changes in lipid and apolipoprotein fractions in sera samples collected at admission and 8 months of treatment are shown in Tables 1 and 2, respectively. Surprisingly, adoption of the fat-restriction diet resulted in a decrease in cholesterol, while TG contents and abnormal lipoproteins migrated to their original position (Table 2, Fig. 3A&B). The cholesterol content of lipoprotein at the β -position was also substantially decreased (Table 2, Fig. 3A&B). These data showed that the decrease in abnormal lipoproteins at the original position and change in lipid content in β -lipoproteins were the result of the fat-restriction diet and administration of an ARB.

4. Discussion

In this study, we report a patient with LCAT deficiency who experienced progressive renal dysfunction, proteinuria, anemia and corneal opacity. Her renal biopsy specimen showed many foam cell infiltrates into glomerular capillary tufts and mesangium, and numerous clear vacuoles containing granular structures within the GBM and mesangial matrix. Glomerular foam cells infiltrates are a characteristic feature of LCAT deficiency [18–20]. The numerous clear vacuoles within the GBM and mesangial matrix are also consistent with the findings of a previous study of LCAT deficiency [21]. However, the findings in our patient were not consistent with the structures of odd-shaped electron-dense materials with a membranous profile within clear vacuoles described in that study [21]. Differences in structure in clear vacuoles may be related to patient age or lipid composition in the vacuoles. It is conceivable that the glomerular lipid deposits are fully or partially composed of LpX, a cationized lipoprotein [22]. The glomerular charge barrier is composed of negatively-changed proteins and may be influenced by deposited cationized lipoproteins, resulting in the exacerbation of proteinuria. Indeed, agarose gel electrophoresis of serum from our patient at admission revealed a substantial amount of abnormal cationized lipoproteins suggestive of LpX at the original position (Fig. 3B-1). Proteinuria in this patient might have been induced by the deposition of this abnormal cationized lipoprotein into glomeruli.

Our patient had a novel mutation of Cys74Tyr in the lid region of LCAT protein. LCAT protein contains two functional disulfide bridges, Cys50–Cys74 and Cys313–Cys356 [23]. It appears likely that the Cys50–Cys74 bond was disrupted in our patient. In previous study, disruption of the Cys313–Cys356 bond by an amino acid substitution was shown to result in LCAT deficiency and early onset renal disease [10,24]. The former loop region in the LCAT protein, consisting of Tyr51–Asp73, has binding capacity for HDL- and LDL-cholesterol [25], and truncation of Lys53–Gly71 or Asp56–Leu68 from LCAT protein abolished the ability of LCAT protein to bind HDL- and LDL-cholesterol *in vitro* [26,27]. Our patient also showed a complete loss of LCAT activity, indicating that the former loop

region spanned by Cys50–Cys74 is essential for substrate recognition of LCAT in the esterification process [28]. Further *in vitro* and *in vivo* investigation of the effect of partial transformation of the Tyr51–Asp73 loop region on the cholesterol esterification process may contribute to our understanding of the biochemistry of enzyme–lipid interactions as well as the pathophysiology of LCAT deficiency.

Although sequential ultracentrifugation is a standard method in lipoprotein analysis, we applied agarose gel electrophoresis to detect abnormal LpX and LDL-like lipoproteins and for visualization of lipoproteins. Our patient had a significant increase in abnormal lipoproteins at the original position and a severe decrease in HDL-lipoprotein. Her serum also showed an abnormal midband lipoprotein and a disturbance in the maturation of HDL particles. We suggest that these lipoprotein abnormalities were due to the disturbance in esterification resulting from the loss of LCAT activity.

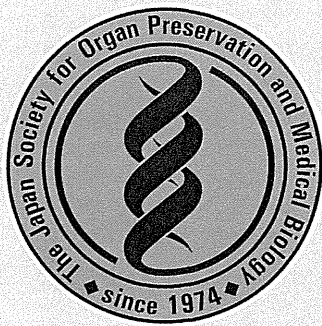
We also evaluated the effect of a fat-restriction diet and administration of an ARB on lipid profile, proteinuria and renal function in this patient. This treatment decreased proteinuria and resulted in a delay in the deterioration of renal function. A fat restriction diet obviously decreased her serum total-cholesterol and TG, except HDL-cholesterol and LDL-cholesterol at 8 months of treatment. The abnormal cationized lipoproteins at original positions, suggestive of LpX, disappeared after treatment. This disappearance of abnormal cationized lipoproteins in her serum after treatment may have induced a decrease in the amount of deposited cationized lipoproteins within the GBM, thereby resulting in restoration of the charge barrier in the GBM and decrease in proteinuria. The lipid content of lipoproteins at the β -position and the cholesterol content of the midband lipoprotein decreased also after treatment. Lipoproteins accumulating in the kidney are thought to be abnormal apoprotein E-rich lipoproteins which have migrated from the β -position [29], suggesting that the decrease in serum apoprotein E after treatment may be associated with the decrease in accumulated lipoproteins in the kidney. A fat-restriction diet in combination with ARB treatment may contribute to decrease in proteinuria and result in a delay in the deterioration of renal function in patients with LCAT deficiency.

Acknowledgments

We thank Yasuyuki Aoyagi and Sakiyo Asada for their genetic and biochemical analyzes. This study was supported in part by Health and Labour Sciences Research Grants for Translational Research for the research of primary hyperlipidemia, and by Nichibei Japan (H. B.).

References

- [1] Glomset J. The mechanism of the plasma cholesterol esterification reaction: plasma fatty acid transferase. *Biochim Biophys Acta* 1962;65:128–35.
- [2] Santamarina-Fojo S, Hoeg JM, Assman G, Brewer Jr HB. Lecithin cholesterol acyltransferase deficiency and fish eye disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al., editors. *In the metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill Inc.; 2001. p. 2817–33.
- [3] Norum KR, Gjone E. The effect of plasma transfusion on the plasma cholesterol esters in patients with familial plasma lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;22:339–42.
- [4] Murayama N, Asano Y, Kato K, et al. Effects of plasma infusion on plasma lipids, apoproteins and plasma enzyme activities in familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Eur J Clin Invest* 1984;14:122–9.
- [5] Kuroda M, Aoyagi Y, Asada S, et al. Ceiling culture-derived proliferative adipocytes are a possible delivery vehicle for enzyme replacement therapy in lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Open Gene Ther* 2011;4:1–10.
- [6] 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 Diabetes Invest* 2011;2:333–40.
- [7] Yee MS, Pavitt DV, Richmond W, et al. Changes in lipoprotein profile and urinary albumin excretion in familial LCAT deficiency with lipid lowering therapy. *Atherosclerosis* 2009;205:528–32.
- [8] Aranda P, Valdivielso P, Pisciotto L, et al. Therapeutic management of a new case of LCAT deficiency with a multifactorial long-term approach based on high doses of angiotensin II receptor blockers (ARBs). *Clin Nephrol* 2008;69:213–8.
- [9] Miarka P, Idzior-Waluś B, Kuźniewski M, Waluś-Miarka M, Klupa T, Sułowicz W. Corticosteroid treatment of kidney disease in a patient with familial lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency. *Clin Exp Nephrol* 2011;15:424–9.
- [10] Holleboom AG, Kuivenhoven JA, van Olden CC, et al. Proteinuria in early childhood due to familial LCAT deficiency caused by loss of a disulfide bond in lecithin:cholesterol acyl transferase. *Atherosclerosis* 2011;216:161–5.
- [11] Nagasaki T, Akanuma Y. A new colorimetric method for determination of plasma lecithin-cholesterol acyltransferase activity. *Clinica Chim Acta* 1977;75:371–5.
- [12] Narayan KA, Narayan S, Kummerou FA. Disk electrophoresis of human serum lipoproteins. *Nature* 1965;205:246–8.
- [13] Asada S, Kuroda M, Aoyagi Y, et al. 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* 2011;102:229–31.
- [14] Winkler K, Nauck M, Siekmeier R, März W, Wieland H. Determination of triglycerides in lipoproteins separated by agarose gel electrophoresis. *J Lipid Res* 1995;36:1839–47.
- [15] Contois JH, Gillmor RG, Moore RE, Contois LR, Macer JL, Wu AH. Quantitative determination of cholesterol in lipoprotein fractions by electrophoresis. *Clin Chim Acta* 1999;282:1–14.
- [16] Kido T, Kurata H, Matsumoto A, et al. Lipoprotein analysis using agarose gel electrophoresis and differential staining of lipids. *J Atheroscler Thromb* 2001;8:7–13.
- [17] Zhang B, Matsunaga A, Saku K, Nakano S, Yamada T. Associations among plasma lipoprotein subfractions as characterized by analytical capillary isotachopheresis, apolipoprotein E phenotype, Alzheimer disease, and mild cognitive impairment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:e144–146.
- [18] Chevet D, Ramee MP, Le Pogamp P, et al. Hereditary lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. Report of a new family with two afflicted sisters. *Nephron* 1978;212:212–9.
- [19] Gjone E. Familial LCAT deficiency. *Acta Med Scand* 1973;194:353–6.
- [20] Hovig T, Gjone E. Familial plasma lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency. Ultrastructural aspects of a new syndrome with particular reference to lesions in the kidneys and the spleen. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 1973;81:681–97.
- [21] Magil A, Chase W, Frohlich J. Unusual renal biopsy findings in a patient with familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Hum Pathol* 1982;13:283–5.
- [22] Hovig T, Blomhoff JP, Holme R, et al. Plasma lipoprotein alterations and morphologic changes with lipid deposition in the kidneys of patients with hepatorenal syndrome. *Lab Invest* 1978;38:540–9.
- [23] Yang CY, Manoogian D, Pao Q, et al. Lecithin:cholesterol acyltransferase. Functional regions and a structural model of the enzyme. *J Biol Chem* 1987;262:3086–91.
- [24] Holleboom AG, Kuivenhoven JA, Peelman F, et al. High prevalence of mutations in LCAT in patients with low HDL cholesterol levels in the Netherlands: identification and characterization of eight novel mutations. *Hum Mutat* 2011;32:1290–8.
- [25] Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:245–56.
- [26] Jin L, Shieh JJ, Grabbe E, Adimoolam S, Durbin D, Jonas A. Surface plasmon resonance biosensor studies of human wild-type and mutant lecithin cholesterol acyltransferase interactions with lipoproteins. *Biochemistry* 1999;38:15659–65.
- [27] Peelman F, Vanloo B, Perez-Mendez O, et al. Characterization of functional residues in the interfacial recognition domain of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT). *Protein Eng* 1999;12:71–8.
- [28] Adimoolam S, Jonas A. Identification of a domain of lecithin-cholesterol acyltransferase that is involved in interfacial recognition. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232:783–7.
- [29] Gröne EF, Walli AK, Gröne HJ, Miller B, Seidel D. The role of lipids in nephrosclerosis and glomerulosclerosis. *Atherosclerosis* 1994;107:1–13.



ヒト脂肪細胞の 初代分離・培養と臨床応用

麻生 雅是^{*1)}, 黒田 正幸^{*2)}

TECHNICAL SERIES 48

ヒト組織からの初代細胞分離法シリーズ

Isolation, primary culture, and clinical application of human adipocytes

[Abstract] Subcutaneous adipose tissue, normally found throughout body, has been used as a biological material for correction of various tissue defects in plastic, cosmetic and reconstructive surgery fields. Lipoaspiration or resection of adipose tissue and fat grafting are routinely carried out in clinic with minimal risk. Adipose tissue is well-vascularized, and fat cells have a relatively long lifespan. Adipose tissue is now recognized as an important endocrine and secretory organ of various bioactive cytokines to regulate homeostasis of human body. The accumulated evidence attracts much attention in regenerative medicine as cell source for gene/cell therapy. There are two methods in the preparation of adipose tissue-derived proliferative cells. One method is preparation from stromal vascular fraction, which is obtained as sediment by the centrifugation of collagenase-digested fat tissue and is the most common technique. The other is from the floating fraction after the centrifugation to obtain mature fat cells. The cells are further purified by ceiling culture. In this review, we introduce the outline of preparation of primary adipocytes and our therapeutic approach of an adipose tissue-based lifelong and risk-manageable treatment for patients with intractable serum protein deficiencies.

key words : ceiling culture, proliferative adipocyte, gene therapy, regenerative medicine

(天井培養, 増殖型脂肪細胞, 遺伝子治療, 再生医療)

Masayuki Aso^{*1)}, Masayuki Kuroda^{*2)}

脂肪細胞(adipocyte)は、細胞質内に脂肪滴を有する細胞のことであり、単胞性脂肪細胞(白色脂肪細胞)と多胞性脂肪細胞(褐色脂肪細胞)とに分類される。

本篇では、皮下脂肪組織由来の白色脂肪細胞について言及する。皮下脂肪組織は、美容・形成外科領域において摘出術が頻繁になされ、また乳房再建術をはじめとする再生医療の生体試料として従来より用いられてきた。近年の分子生物学研究の進展に伴い、脂肪細胞は、脂肪蓄積に加え、多くの生理活性物質を分泌する細胞であり、肥満や生活習慣病との関連に関わる生体の恒常性維持に深く関わっていることが明らかにされてきた。このような脂肪組織、脂肪細胞、脂肪由来間葉系幹細胞などの研究成果により、生体材料としての脂

肪関連組織や細胞の理解が深まりつつある。

また、筆者らは、脂肪細胞が分泌細胞であること、がん化しづらい特性を有すること、寿命が長いことから、疾病治療のための蛋白質遺伝子を導入した遺伝子治療用脂肪細胞の研究を進めており、その臨床応用についても述べる。

皮下脂肪組織由来の脂肪細胞と間葉系幹細胞

これまでの報告によると、脂肪組織より前駆脂肪細胞を採取する方法は主に2種類が知られている(図1)。

一つ目は、コラゲナーゼ処理した皮下脂肪組織を遠心し、その沈殿分画(stromal vascular fraction, SVF)を通常培養に供し、培養面に接着した細胞を得る方法である。この方法によって調製された細胞は、現在は脂肪組織由来幹細胞(adipose tis-

^{*1)} CellGenTech, Inc; セルジェンテック株式会社

^{*2)} Center for Advanced Medicine, Chiba University Hospital; 千葉大学医学部附属病院未来開拓センター

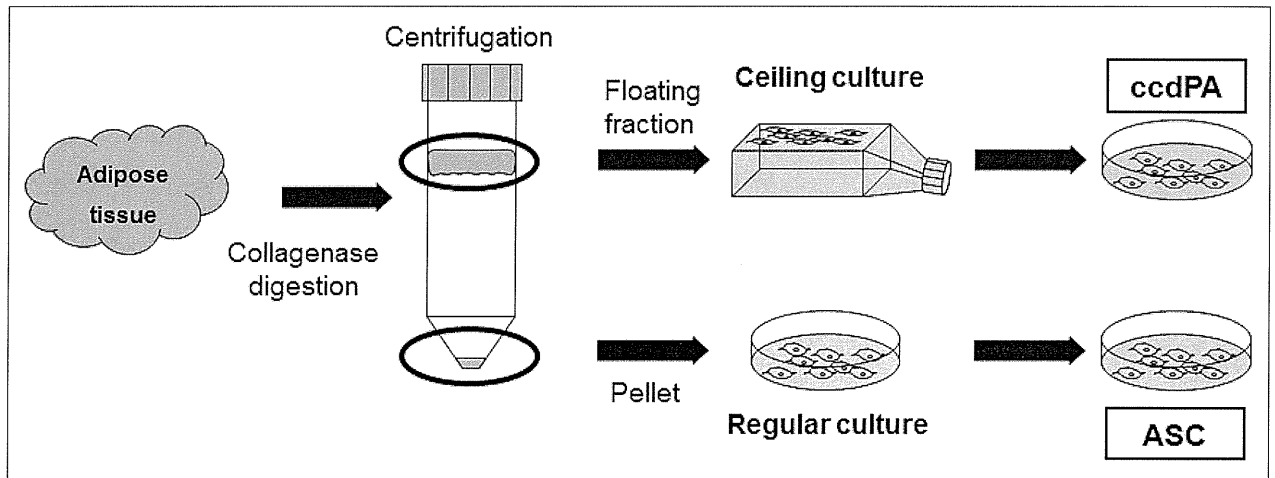


図1 Procedures for preparation of adipose tissue-derived proliferative cells

After collagenase digestion and centrifugation, ccdPA is prepared from floating mature adipocyte fraction by ceiling culture, and ASC is prepared from pellet (SVF) by regular culture.

sue-derived stem cells, ASC)とよばれており、これまで発表されている論文で記述されている preadipocyte とはこの方法で調製した細胞である。ASC は間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell) に属し、脂肪だけでなく骨、軟骨、筋肉などのさまざまな細胞に分化する能力をもつことが知られている^{1,2)}。

一方、成熟脂肪細胞から油滴を持たない増殖型細胞を採取する天井培養法が知られている³⁻⁵⁾。この方法では、前述のコラゲナーゼ処理脂肪組織を遠心分離したあとの、油滴を持つ浮遊画分(成熟脂肪細胞画分)を、培地で一杯に満たしたフラスコ中で培養し、天井面に付着する前駆脂肪細胞を得る方法である。天井面にはまず油滴含有脂肪細胞が生着・増殖し、そのあと、油滴を持たない前駆脂肪細胞が一定期間後に調製される。

天井培養由来前駆脂肪細胞は、油滴を含む脂肪細胞が培地中で浮遊する性質を利用して回収することから、ASC に比較して均一な脂肪細胞に由来する細胞であると考えられるが、Miyazaki ら、Matsumoto らは、天井培養由来前駆脂肪細胞 (ceiling cell, DFAT cell) は ASC と同じ表面抗原プロファイルを示すと報告している^{4,5)}。

皮下脂肪組織からの初代脂肪細胞の単離・培養と増殖型脂肪細胞の採取とその特性

筆者らは、以下に述べる *ex vivo* 遺伝子治療用のすぐれた前駆脂肪細胞を探索する過程で、従来実施されてきた 14 日間の初代培養ではなく、短期間で患者に移植するための細胞を得ようと、7 日間の初代培養後の前駆脂肪細胞の特性検討を行った。7 日間の天井培養により調製した前駆脂肪細胞を、筆者らは天井培養由来増殖型脂肪細胞 (ceiling culture-derived proliferative adipocyte, ccdPA) とよんでいる。

同一ドナー由来の皮下脂肪組織より、ASC と ccdPA を 7 日間の初代培養で調製し、その性質を比較した。両者の形態は類似しており(図 2)、増殖能に差異は認められなかったが、ccdPA の一部は ASC とは異なり CD36 (脂肪酸トランスポーター)陽性であることを見出した⁶⁾。このことは天井培養により調製した前駆脂肪細胞が成熟脂肪細胞由来であることを示唆している。さらに継代すると CD36 は陰性となり、表面抗原上の差異は認められなくなったが、ccdPA は ASC に比較して有意に高い脂肪分化能を示すことを明らかにした(図 3)⁷⁾。ccdPA は、脂肪細胞のほかに骨、軟骨への分化能を ASC と同程度に有している(未発表 DATA)。

ccdPA は、フィブリンキャフールドを用い

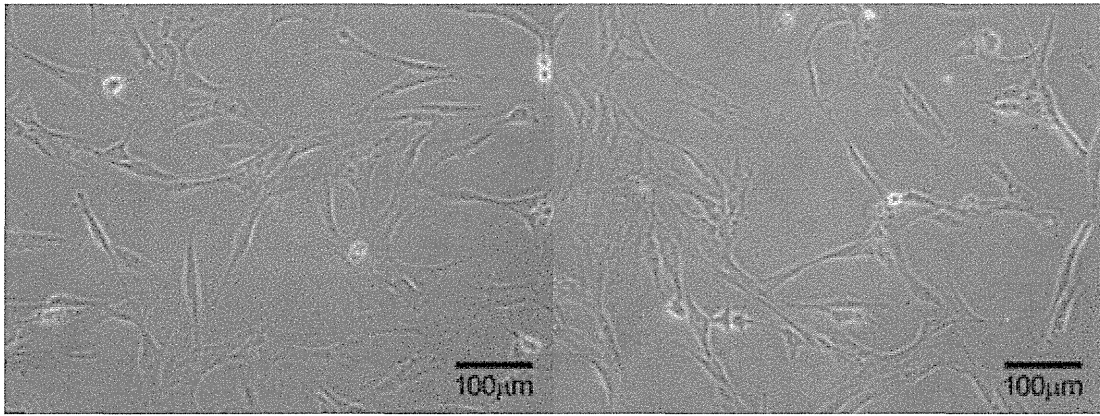


図2 Morphology of ccdPA (left) and ASC (right)

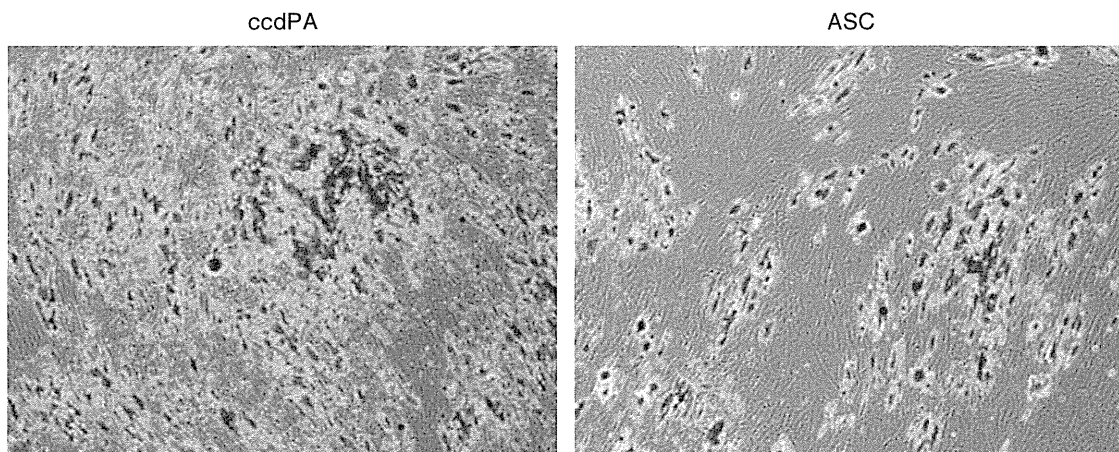


図3 Comparison of adipogenic potential between ccdPA and ASC

Cells were cultured to confluency and adipogenic differentiation was induced. Cells were subjected to Oil Red O staining.

て約3カ月の *in vitro* 培養が可能である。このような三次元培養環境では、薬剤などの人工的な脂肪分化刺激を加えなくても、培養28日目から Oil Red O で染色される所見が得られ、ccdPA が成熟脂肪細胞にコミットした細胞であることを示唆する⁸⁾。

事実、脂肪分化マーカーの遺伝子はASCにくらべて、脂肪分化刺激後、速やかにかつ高度に発現する⁷⁾。調製過程でSVFを遠心除去することに加え天井培養法により油滴を含有する細胞を選択的に培養できることから、血球系細胞や血管内皮細胞などの混入が低く抑えられ、均一性の高い細胞集団であると考えられる⁶⁾。

増殖型脂肪細胞の臨床応用—難病治療用の遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞

脂肪細胞数は、成人以降は安定的に推移し、毎年1割がターンオーバーし約8年で半分が入替わり、細胞寿命は約10年と長い⁹⁾ことが報告されている。脂肪細胞は脂質の貯蔵細胞としての認識はあったものの、メタボリックシンドロームの病態解明研究の過程で、TNF α 、レプチン、アディポネクチンといった多彩な機能蛋白質を分泌する細胞として脂質代謝や生体の恒常性維持に重要な役割を担っていることが明らかにされてきた¹⁰⁾。それと同時に、脂肪組織が遺伝子細胞治療用の細胞採取のための生体材料として期待されるようになった。

近年、特にASCは骨髄より得られる間葉系幹細胞よりも簡便にしかも多く採取できることか