

**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**

**原発性高脂血症の診療実態予備調査**  
**分担研究者 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**

LCAT 欠損症を含めた原発性高脂血症の診療実態調査に先立って、原発性高脂血症調査研究班の班員を対象に予備調査を実施した。のべ8例のLCAT欠損症の診療実績が報告されたが、現在も診療継続されているのは2例だけだった。

**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、原発性高脂血症調査研究班の班員を対象に、家族性LCAT欠損症を含めた原発性高脂血症診療実態の予備調査を実施した。

**B. 研究方法**

原発性高脂血症調査研究班15施設を対象に別紙に示すアンケート調査を実施した。

**C. 研究結果**

集計結果を抜粋して示す。

- Q1. 以前から用いられている原発性高脂血症という名称よりも、原発性脂質異常症という名称に変更すべきとする意見が過半数を占めた。
- Q2. 原発性高脂血症の定義について、単一遺伝子疾患に限定すべきという意見もあるが、
- 多遺伝子疾患も含むべきとする意見が過半数を占めた。
- Q3. 分類も見直すべきという意見が過半数だった。
- Q4. 家族性高コレステロール血症(FH)はLDL受容体異常症だけでなく、PCSK9異常症も含む常染色体優性遺伝形式を示す高LDLコレステロール血症とする定義が妥当と全員が考えた。
- Q5. FHの診断基準について、遺伝子診断を含めた診断基準が妥当ではないかという意見があった。
- Q6. 家族性複合型高脂血症の診断基準基準にも問題点が指摘された。
- Q7. 家族性III型高脂血症の診断基準については大きな意見はなかった。
- Q8. FH、カイロミクロン血症、FCHL、CETP欠損症等は相当数の患者が班員施設において診療を受けているが、稀少疾患も少なくない。LCAT欠損症の累積経験数は8例だったが、現時点での患者数は2例しか報告されなかった。確定診断がなされていない患者も少なからず存在した。

#### D. 考察

脂質異常症の原因遺伝子の新たな発見や診断手法の進歩を反映して永年使われてきた原発性高脂血症という名称や定義も見直しの必要性がある。

原発性高脂血症を専門的に診療している原発性高脂血症調査研究班の班員施設においてすら LCAT 欠損症は稀少疾患である。今後、調査範囲を拡げて、LCAT 欠損症の診療実態を明らかにしていく必要がある。

#### E. 結論

家族性 LCAT 欠損症を含めた原発性高脂血症診療実態の予備調査を実施した。専門施設においても LCAT 欠損症は稀少疾患であることが確認された。

#### F. 研究発表

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.* 2013 Apr;54(4):1124-34.

#### アンケート

「原発性高脂血症」の名称・定義・分類についてお尋ねします。

Q1 「原発性高脂血症」の名称について

「動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2007 年度版」の中で「高脂血症」に代わって「脂質異常症」という名称が使用されるようになってから、診療現場では「脂質異常症」の呼称が定着しました。それに伴って「原発性高脂血症」も「原発性脂質異常症」と改めるべきとお考えですか？

- a はい
- b いいえ
- c わからない

Q2 「原発性高脂血症」の定義について

「原発性」は「続発性」に対比した概念ですが、基礎疾患がなくとも脂質異常症を呈する多遺伝子(polygenic)な病態が存在します。そのような病態も「原発性」に含めるべきでしょうか？あるいは、単一遺伝子(monogenic)疾患に限定すべきでしょうか？その場合、表 1 の中の原発性 V 型高脂血症、特発性高コレステロール血症、家族性 IV 型高脂血症、特発性高トリグリセリド血症は、原発性高脂血症から外れる事になります。

- a 単一遺伝子疾患に限定すべき
- b 多遺伝子疾患も包括すべき
- c わからない

Q3 「原発性高脂血症」の分類について

これまで原発性高脂血症調査研究班の提唱した分類が行われてきました(表 1)。一方、アメリカの教科書では原因遺伝子別に疾患を列挙する表を提示しています(表 2)。原因遺伝子の解明が進んだ現在、分類を見直す

べきでしょうか？

- a 見直すべき
- b 見直す必要はない
- c わからない

Q4 Q3 で a とお答えになった方へ。新しい分類についてご提案があれば、ご呈示ください。

「原発性高脂血症」は本質的に遺伝性疾患ですが、遺伝子診断ではなく臨床的特徴に基づいた診断基準による診断が普及しています。特に、家族性高コレステロール血症(FH)、家族性 III 型高脂血症、家族性複合型高脂血症(FCHL)の診断基準について改良に関するご提案があればお願いします。

Q5 家族性高コレステロール血症(FH)の診断基準(表3、4)

Q6 家族性 III 型高脂血症の診断基準(表5)

Q7 家族性複合型高脂血症の診断基準(表6)

Q8 家族性高コレステロール血症(FH)を常染色体優性の高 LDL コレステロール血症と定義すると、LDL レセプター以外に PCSK9 等の変異に起因するものも含まれます。一方、LDL レセプターの異常症のみを FH と定義する考え方があります。FH の定義としてどちらが適当でしょうか？

- a LDL レセプター異常のみを FH と定義する
- b 常染色体優性の高 LDL コレステロール血症と定義する(従って PCSK9 異常症も含まれる)
- c わからない

Q9 原発性高脂血症の診療経験をお尋ねします。

表7に記載した疾患毎に、累積経験患者数、および、現在通院されているなど、直接連絡が可能な患者数をご記入いただけますか？概数で結構です。その場合「約」や「～」等でお示しください。(最終診断に至っていない症例については各表現型の最後にオレンジ色で原因未特定とある行にご記入ください。また、該当例がない場合等は空欄のまま結構です。)

Q10 これらの疾患の実態調査を計画中です。その場合、調査にご協力いただけますでしょうか？(Aと同じ質問です)

- a 協力できる(なんらかの形で)
- b 協力できない

Q11 Q10 で a(協力できる)とお答えいただいた方にお尋ねします。協力できる調査形態の種類についてご記載ください。(複数回答可)

- a 薬物介入(既存または開発中の薬剤を用いた介入)
- b レジストリー(登録後追跡し、合併症等の予後や治療実態を明らかにする)
- c 断面調査(一回だけの調査)
- d 遺伝子診断(遺伝子診断未実施の患者について変異を同定する)
- e その他

新規治療として、抗 PCSK9 モノクローナル抗体、アポ B アンチセンスオリゴヌクレオチド、MTP 阻害薬、LPL 遺伝子治療薬等が海外では承認されています。

Q12 各疾患に関して、現状の治療手段で十

分とお考えでしょうか？

表7に記載した疾患毎に「十分」が「不十分」に をご記入ください。(わからない場合は空欄のままで結構です。)

に をご記入ください。(コストがかからないと仮定してお答えください)

Q13 Q11 で不十分とお答えいただいた方にお尋ねします。海外で承認されているが日本には未導入の治療薬に加えて、具体的な治療法の提案があれば、表7に記載した疾患毎にご記入ください。

原発性高脂血症を診断には、酵素活性やLDL レセプター活性等が必要になる場合があります。

Q14 非遺伝子診断の検査の代行を希望する場合は、表7に記載した疾患毎に「外注を希望」に をご記入ください。(コストがかからないと仮定してお答えください)

Q15 他の施設から遺伝子診断の希望がある場合に、非遺伝子検査のサービスの受託が可能ですか？表7に記載した疾患毎に「受託可能」に をご記入ください。(コストがかからないと仮定してお答えください)

原発性高脂血症の診断を確定するには遺伝子診断が必要です。

Q16 遺伝子診断を代行してくれるサービスがあれば利用を希望しますか？表7に記載した疾患毎に「外注を希望」に をご記入ください。(コストがかからないと仮定してお答えください)

Q17 他の施設から遺伝子診断の希望がある場合に、遺伝子診断サービスの受託が可能ですか？表7に記載した疾患毎に「受託可能」

Q1 「原発性高脂血症」の名称について

「動脈硬化性疾患予防ガイドライン2007年度版」の中で「高脂血症」に代わって「脂質異常症」という名称が使用されるようになってから、診療現場では「脂質異常症」の呼称が定着しました。それに伴って「原発性高脂血症」も「原発性脂質異常症」と改めるべきと考えますか？

Q1 名称について



表6 家族性III型高脂血症の診断基準

大項目	項目
大項目	①血漿トリグリセロール値、血中TG値がともに高値を示す
	②血漿リポ蛋白の電気泳動でVLDLからLDLへの連続的のbroad βパターンを示す
	③アポリポ蛋白の電気泳動で、アポリポ蛋白Eの異常 (E2/E2, E2/E4など) を証明する
小項目	①(狭義) 遺伝子診断で異常
	②血漿アポリポ蛋白の電気泳動で異常 (アポリポ蛋白Eのbroad βパターン)
	③VLDLトリグリセロール値が0.25以上
診断	①LDLコレステロール値の減少
	④家族性動脈硬化症、虚血性心疾患などの動脈硬化性疾患を伴う

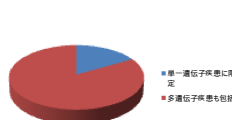
大項目の3項目すべてを満足する場合は確定  
大項目のうち2項目および小項目のうち1項目以上を満足すれば疑診

※この基準は本邦医師会高脂血症診断基準 第3版(2012)を参照してください

Q2 「原発性高脂血症」の定義について

「原発性」は「続発性」に對比した概念ですが、基礎疾患がなくとも脂質異常症を呈する多遺伝子(polygenic)な病態が存在します。そのような病態も「原発性」に含めるべきでしょうか？あるいは、単一遺伝子(monogenic)疾患に限定すべきでしょうか？

Q2 定義について



動脈硬化性疾患予防ガイドライン2012年度版

<アンケート意見>

- 項目③「電気泳動もしくは遺伝子検査でアポリポ蛋白Eの異常 (E2/E2, E2/E4欠損など) を証明する

Q3 「原発性高脂血症」の分類について

これまで原発性高脂血症調査研究班の提唱した分類が行われてきました(表1)。一方、アメリカの教科書では原因遺伝子別に疾患を列挙する表を提示しています(表2)。原因遺伝子の解明が進んだ現在、分類を見直すべきでしょうか？

Q3 分類について



表5 家族性複合型高脂血症(FCHL)の診断基準

項目	項目
項目	①LDL値を基準とするが、IIa, IV型の表現型もとり得る
	②アポB含有小LDLコレステロール>1.0またはsmall dense LDL (LDL粒子数<25.5nm)の存在を証明する
	③家族性高コレステロール血症や、糖尿病などの二次性高脂血症を排除
	④家族歴者にも、IIa, IV型のいずれかの表現型の高脂血症が少なくとも1人に2回または3回以上認めらる
診断	①-④のうちすべてを満足しない診断とするが、①-③のみでも白濁部における脂質組成検査をして見直しを要する

※この基準は本邦医師会高脂血症診断基準 第3版(2012)を参照してください

動脈硬化性疾患予防ガイドライン2012年度版

<アンケート意見>

問題点として、IIb, IIa, IVのどの表現型もとりうるので、診断が困難である。Small dense LDLの測定が一般臨床医では簡単にできない。DMに伴うものとの鑑別も現実には困難である。もう少し確立診断につながる診断法も必要ではないか。

- 項目②「アポ蛋白B/LDLコレステロール>1.0は厳しすぎないか。海外の診断基準は0.8程度が多い。

表1 原発性高脂血症の分類

分類	特徴
原発性I型高脂血症	家族性I型高脂血症、アポリポ蛋白A5欠損
原発性II型高脂血症	家族性II型高脂血症、アポリポ蛋白B495欠損
原発性III型高脂血症	家族性III型高脂血症、アポリポ蛋白E2/E2欠損
原発性IV型高脂血症	家族性IV型高脂血症、アポリポ蛋白E2/E4欠損
原発性V型高脂血症	家族性V型高脂血症、アポリポ蛋白A5欠損

表2 primary hyperlipoproteinemiaの分類

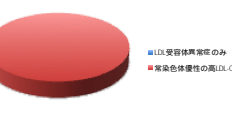
Gene	Protein	Enzyme	Clinical Feature	Genetic	Estimated Prevalence
Lipoprotein lipase deficiency	LPL	LPL	Chylomicronemia	Autosomal recessive	1/1,000,000
Apolipoprotein A-II deficiency	ApoA-II	Chylomicronemia	Chylomicronemia	Autosomal recessive	<1/1,000,000
Apolipoprotein A-I deficiency	ApoA-I	Chylomicronemia	Chylomicronemia	Autosomal recessive	<1/1,000,000
Chylomicron retention disease	apoB	Chylomicronemia	Chylomicronemia	Autosomal recessive	<1/1,000,000
familial hypertriglyceridemia	apoB	Chylomicronemia	Chylomicronemia	Autosomal recessive	1/10,000
familial hypercholesterolemia	LDL receptor	LDL	Tendon xanthomas, CAD	AD	1/500
familial hypercholesterolemia	LDL receptor	LDL	Tendon xanthomas, CAD	AD	<1/1000
familial hypercholesterolemia	PCSK9	LDL	Tendon xanthomas, CAD	AD	<1/1,000,000
familial hypercholesterolemia	LDLR	LDL	Tendon xanthomas, CAD	AD	<1/1,000,000
familial hypercholesterolemia	LDLR	LDL	Tendon xanthomas, CAD	AD	<1/1,000,000

Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th Edition

Q8 家族性高コレステロール血症(FH)を常染色体優性の高LDLコレステロール血症と定義すると、LDLレセプター以外にPCSK9等の変異に起因するものも含まれます。

一方、LDLレセプターの異常のみをFHと定義する考え方がありますが、FHの定義としてどちらが適当でしょうか？

Q8 FHの定義について



疾患	原因遺伝子	所属部門として表積経路数	所属部門として患者数	
原発性高HDLコレステロール血症	CETP欠損症	CETP	30	29
	家族性肝性リパーゼ欠損症	HL	212	58
	家族性内皮リパーゼ欠損症	EL		
	遺伝子未特定		105	66
家族性リポタンパク低下症	家族性リポタンパク血症	APOB	26	2
	家族性リポタンパク血症	PCSK9	21	
	家族性無リポタンパク血症	WTP	2	1
	家族性無リポタンパク血症(不確実)	SARA		
	アポリポ蛋白B495欠損症	APOBEC1		
家族性低HDL血症	遺伝子未特定		50	6
	Tanaka病	ABCA1	8	
	LCAT欠損症	LCAT	8	2
	アポリポ蛋白A1欠損症	APOA1	1	
	アポリポ蛋白A1欠損症	APOA1		
その他	遺伝子未特定		42	10
	シタステロール血症	ABCG5またはABCG8	6	9
	血縁黄色腫症(CX)	CYP27A1	7	4
	中性脂質蓄積病	ATGLまたはCG1-F8	3	3

表3 成人FHヘテロ接合体診断基準

項目	項目
表3-1 成人(15歳以上)FHヘテロ接合体診断基準	1. 血LDL-C値(中央値)がLDL-C 190mg/dL以上
	2. 家族性FH(文字、計、母などの親族血縁者あるいはアフェリス腫瘍)あるいは2名親戚関係性黄色腫
	3. FHはるいは原発性動脈硬化性疾患の家族歴(2親戚以上の血縁)
表3-2 小児FHヘテロ接合体診断基準	1. 血コレステロール値(中央値)がLDL-C 140mg/dL、LDL-C 200mg/dLの値を測定する)
	2. FHはるいは原発性動脈硬化性疾患の家族歴(2親戚以上の血縁)
	3. FHはるいは原発性動脈硬化性疾患の家族歴(2親戚以上の血縁)
	4. FHはるいは原発性動脈硬化性疾患の家族歴(2親戚以上の血縁)

動脈硬化性疾患予防ガイドライン2012年度版

<アンケート意見>

- 大項目として遺伝子診断を入れる(Simon Broomeやオランダ基準同様)
- LDL受容体やPCSK9遺伝子異常がないFH症例の中に田子遺伝の例が含まれている可能性があり、FHの定義を再考する必要がある

疾患	原因遺伝子	所属部門として表積経路数	所属部門として患者数	
原発性高LDLコレステロール血症	家族性I型高LDLコレステロール血症	LPL	22	14
	家族性II型高LDLコレステロール血症	APOB	6	1
	家族性III型高LDLコレステロール血症	APOA1	40	40
	家族性IV型高LDLコレステロール血症	LDLR	1	1
	家族性V型高LDLコレステロール血症	LDLR	24	20
	家族性VI型高LDLコレステロール血症	LDLR	112	101
	家族性VII型高LDLコレステロール血症	LDLR	100	100
	家族性VIII型高LDLコレステロール血症	LDLR	2	2
	家族性IX型高LDLコレステロール血症	LDLR	1	1
	家族性X型高LDLコレステロール血症	LDLR	1	1
原発性高トリグリセリド血症	家族性I型高トリグリセリド血症	LDLR	29	13
	家族性II型高トリグリセリド血症	LDLR	19	12
	家族性III型高トリグリセリド血症	LDLR	270	54
	家族性IV型高トリグリセリド血症	LDLR	67	57
	家族性V型高トリグリセリド血症	LDLR	1	1
	家族性VI型高トリグリセリド血症	LDLR	9	8
原発性高アポリポ蛋白B100血症	家族性I型高アポリポ蛋白B100血症	LDLR	333	271
	家族性II型高アポリポ蛋白B100血症	LDLR	36	40
	家族性III型高アポリポ蛋白B100血症	LDLR	9	9
	家族性IV型高アポリポ蛋白B100血症	LDLR	24	12
原発性高アポリポ蛋白E2/E4血症	家族性I型高アポリポ蛋白E2/E4血症	APOE	207	100
	家族性II型高アポリポ蛋白E2/E4血症	APOE	57	24
	家族性III型高アポリポ蛋白E2/E4血症	APOE	9	6
	家族性IV型高アポリポ蛋白E2/E4血症	APOE	10	10

**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**

**遺伝子治療に適した脂肪細胞移植技術の開発**

**分担研究者 佐藤兼重（千葉大学大学院医学研究院 形成外科学 教授）**  
**研究協力者 窪田吉孝、安達直樹、笹原資太郎**

**研究要旨**

細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」の移植は、培養細胞をフィブリン糊を足場として移植する点から、通常行われている確立された脂肪移植とは異なる要素がある。フィブリン糊を用いた移植において通常の脂肪移植に準じた微量分割注入法が行いいうること、また、生体イメージングを用いて、移植した培養細胞が移植初期の定着が不安定な時期に局在性を維持すること、が明らかになった。これらの結果は、細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」を用いた治療に特化した最適な移植法の確立に繋がる。

**A. 研究目的**

脂肪細胞移植は、歴史的には組織増量を目的とした治療に用いられたことから始まり、現在では、創傷治癒の質の改善や組織統合性の改善などの効果が明らかになり、移植材料としての応用性が広がりつつある。脂肪細胞移植による優れた効果の一部は脂肪細胞の高い分泌能によると考えられており、脂肪細胞は生着の過程で周囲の細胞や基質に積極的に働きかけることが可能である。家族性 LCAT 遺伝子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」は脂肪細胞の分泌性能を生かした画期的な遺伝子治療である。細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」においては、これまでに形成外科学領域で確立された脂肪採取と脂肪移植の原理及び手法が用いられ、安全性の高い手技と考えられる。しかし、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を用いた遺伝子治療においては、通常行われている確立された脂肪移植とは異なる点がある。すなわち、

・通常の脂肪移植では細切した脂肪組織を移植するが、細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」では、培養細胞を用いる

・通常の脂肪移植では足場を必要としないが、単離された培養細胞を用いる細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」では、足場としてフィブリン糊を用いる

遺伝子導入用ヒト前駆脂肪細胞は、ヒト皮下組織からカニューレを用いた陰圧吸引法または切除採取した脂肪組織から天井培養法によって精製される。通常の脂肪移植では脂肪組織を細切するのみで注入するため、脂肪細胞は小さな組織塊として脂肪細胞周囲の結合組織や線維芽細胞・血管内皮細胞・周細胞等の構造中に埋め込まれたまま移植されることになる。よって、脂肪組織としての構造を保ちやすく、また、周囲組織との接着・統合も自然に行われると推定される。一方、細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」においては、コラゲナーゼ処理と遠心分離、天井培養にて細胞レベルに単

離された脂肪細胞を培養後に移植する。よって、生着の様態は通常の脂肪移植とは異なる。通常の状態では組織として生体内に存在している細胞を、細胞レベルに単離して培養し移植した場合、細胞周囲結合織などが存在しないことによる脆弱性が生着の障害となることはこれまで培養表皮移植などで指摘されている。そこで、細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」では細胞定着の足場としてフィブリン糊を用いる。

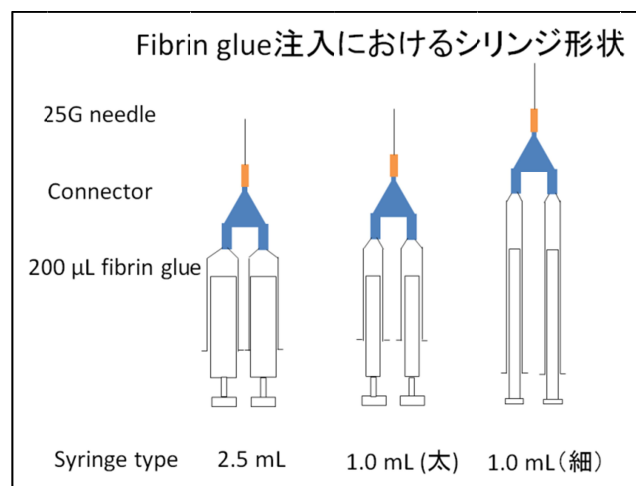
本研究の目的は、フィブリン糊を足場として用いた細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」の最適な移植法を明らかにすることである。

## B. 研究方法

### ・ フィブリン糊を用いた細胞移植における微量分割注入法の検討

かつての脂肪移植においては、一箇所大量注入法が行われ嚢腫形成、感染、硬化などの合併症を多発し、脂肪移植そのものが禁忌的の手技とみなされた時期があった。脂肪移植が現在のように安全な、幅広く受け入れられる確立した手技とみなされるようになったのは、微量分割注入法が登場してからである (Coleman et al. *Plast Reconstr Surg*, 2007)。微量分割注入法を用いて極少量ずつ注入された脂肪組織は周囲からの血管新生を受けやすく生着しやすい。フィブリン糊にて培養細胞を混和して移植する細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」においても微量分割注入法が有用であると考えられる。微量分割注入法においては、シリンジサイズ、針径、注入物の粘稠度などが可能な最小微量を規定する。しかし、細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」では、アダプターで連結された二連筒を用いること、シリンジサイズが通常の脂肪移植で最も良いとされる 1 mL シリンジがコネクターの一部に適合しないこと、注

射筒内容物の粘稠度が通常の脂肪移植とことなることなどから、微量分割注入法の実行可能性と最少注入量を検討した。



比較するシリンジには、2.5 mL, 1.0 mL(太) (ポルヒール®1.0 mL キットに付属), 1.0 mL(細) (ツベルクリン針) を用いた。フィブリン糊(ポルヒール®) A 液、B 液をそれぞれ 200 μL 充填し、フォークコネクターで連結したのち 25G 針を装着した。100 μL を分割注入し、最少注入量を測定した。

### ・ フィブリン糊を用いた細胞移植後の細胞局在解析

細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」の移植においては、遺伝子治療であることから移植培養細胞が移植後、移植した場所にとどまることについて、通常の脂肪移植よりも、厳密に求められる。細胞膜を標的分子とする蛍光試薬で標識した培養細胞をフィブリン糊で移植した後、生体イメージシステム (IVIS® Imaging system) で経時的観察を行った。

培養 3T3-L1 (P10) 細胞  $3 \times 10^6$  個を 1,1'-dioctadecyltetramethylindotricarbocyanine iodide (XenoLight DiR®) で標識した後、フィブリン糊 1 mL に懸濁し、balb/c nude マウスの背部皮下に

注入した。Day 3, 10 に IVIS で観察した。

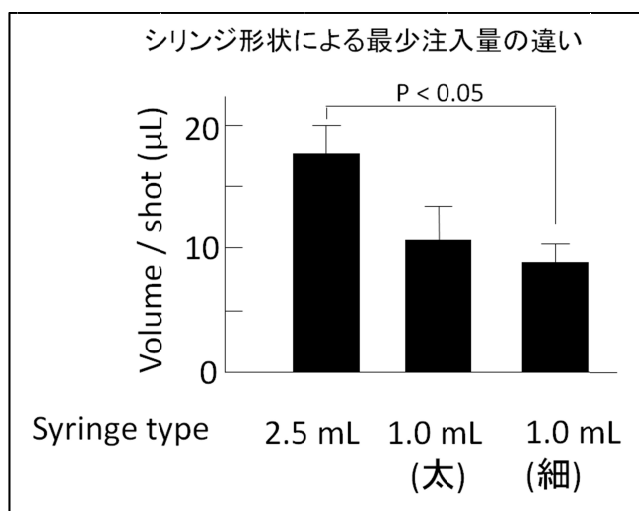
(倫理面への配慮)

研究内容は千葉大学動物実験委員会の承認の下、動物の福祉と人道的取り扱いに細心の注意を払い行われた。

### C. 研究結果

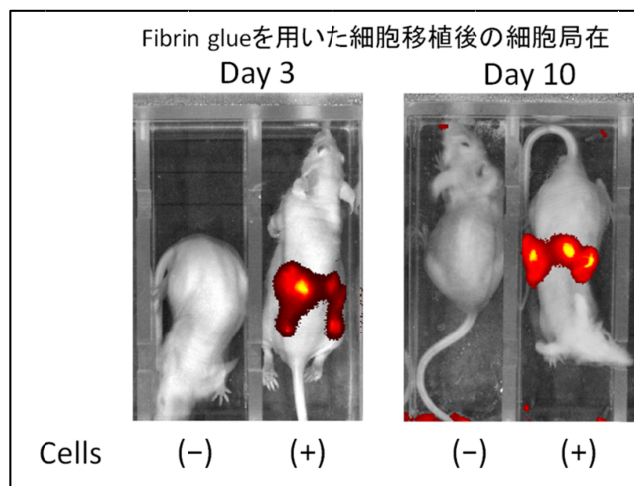
シリンジ形状による最少注入量の違い

シリンジ形状において径が細いほど最少注入量が少なくなる傾向があり、2.5 mL シリンジと 1.0 mL シリンジとの間では有意な差がみられた ( $17.0 \pm 2.9$  vs  $8.7 \pm 1.5$   $\mu\text{L}$  / shot,  $P < 0.05$ )。



フィブリン糊を用いた細胞移植後の細胞局在

Day 3 で、注入部位に一致して蛍光が観察された。注入部位以外へ細胞移動を示す蛍光はみられなかった。Day 10 において、蛍光は day3 より減少していたが、注入部位に一致して蛍光が観察された。注入部位以外では蛍光はみられなかった。



### D. 考察

脂肪移植の臨床では、脂肪を注入する際、1ショットごとの注入量をなるべく少なくして、広い範囲に分割して注入する方法の有効性と安全性が明らかになっている (Coleman et al., *PlastReconstrSurg*, 2007)。これは、少量ずつ広い範囲に注入することにより、個々の注入された脂肪組織塊に血管新生がしやすくなるためと考えられている。細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」においても、少量ずつ場所をずらしながら注入するのが望ましいと考えられる。我々の結果からは、フィブリン糊と連結管を用いた注入においても微量分割注入は可能であり、用いるシリンジは径が細い方が最少注入量が少なく望ましいことが明らかになった。しかし、今回最も最少注入量が少なく望ましいと考えられた 1.0 mL ツベルクリンシリンジは、市販されているフィブリン糊のキットにて、コネクタの一部が装着できないため、今後の検討を要する。

細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」の注入においては、遺伝子治療であるため、移植細胞が移植後に想定される分布範囲にとどまることが、通常の脂肪移植と比較して、とりわけ重要である。想定される分布範囲にとどまることで切除



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。

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。

**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。

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。

**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

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