

2014/5020A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等実用化研究事業

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武城 英明

平成 27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等実用化研究事業

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武城 英明

平成 27 (2015) 年 3 月

目次

I. 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

東邦大学医療センター佐倉病院 武城 英明

千葉大学医学部附属病院未来開拓センター 黒田 正幸

- - - - - 1

II. 分担研究報告書

1. 原発性高脂血症予後実態調査の立ち上げと LCAT 欠損症診断基準の策定

自治医科大学内分科学講座内分泌代謝学部門 石橋 俊

- - - - - 13

2. 細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」に適した脂肪細胞の存在部位の解明 と無菌的採取法の確立

千葉大学大学院医学研究院形成外科学 佐藤 兼重

- - - - - 19

3. 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

千葉大学医学部附属病院臨床試験部 花岡 英紀

- - - - - 23

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

- - - - - 33

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等実用化研究事業）
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（東邦大学医療センター佐倉病院 教授）
分担研究者 黒田 正幸（千葉大学医学部附属病院 特任准教授）

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を患者へ早期に提供することを目指し、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）へ円滑に繋げる非臨床試験成績を収集することを目的とする。

H25年度に実施したLCAT遺伝子導入前脂肪細胞の品質に関するPMDA相談の下、H26年度は工程管理試験確立に向け、①脂肪細胞の初代培養時の幹細胞混入の評価、②規格試験に使用する標準LCATの精製、③移植用細胞懸濁製剤における細胞調製用試薬の混入評価用ELISA試験の確立、を検討した。今後GMP準拠したCPCでの模擬的な細胞製造試験とそれに付随した工程管理試験の中で、その実施可能性などの最終的な確認を進める。

また、非臨床動物試験のGLP試験への移行に向けた探索的な検討を行った。昨年度作出した薬効・薬理試験用の病態モデルマウスを用いた薬効・薬理予備試験において、LCATの血中分泌が確認され有効性評価の目処がたった。また安全性試験のモデルとして、免疫不全マウスとイヌ（ビーグル）を評価した。免疫不全マウスとしてNOD/SCIDマウスを使用し、LCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の移植によりhLCATの血中への持続分泌が認められ、生存している移植細胞においてクローナリティ異常は検出されなかった。大動物安全性は、H25年度に自家移植が可能と判断したイヌについて、LCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞と同程度の遺伝子導入コピー数を有する細胞を調製し、自家移植試験を実施した。自家移植個体で少なくとも移植14日目まで血中にhLCAT蛋白が検出され、移植前の培養上清で確認されたLCAT分泌能に依存した血中へのLCAT補充が確認された。このことからイヌは安全性のみならず有効性に関連したDose-escalation試験にも使用できる可能性が考えられた。本年度の予備探索試験成果に基づき、今後は非臨床動物試験計画に関するPMDA相談を経て、非臨床GLP試験に移行する予定である。

武城 英明（東邦大学医療センター佐倉病院）、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）、花岡 英紀（千葉大学医学部附属病院）、黒田 正幸（千葉大学医学部附属病院）

A. 研究目的

難治性遺伝病は根本的な治療法がなく欠損蛋白質を持続的に補充する新規治療法を開発することが求められてきた。申請者らは、このような医学的課題を克服することを目的に、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し、これを実用化するための研究に着手してきた。このような背景のもとに、家族性 LCAT 欠損症を対象とする 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、品質試験法を確立し、更にかん化否定試験など細胞の安全性も示した。千葉大学医学部附属病院で承認された遺伝子治療臨床研究実施計画書を厚生労働省へ申請し、厚生科学審議会における審議・指導のもとで、持続的 LCAT 産生と本細胞医薬品の有効性を確認し、現在、遺伝子治療臨床研究を実施する現況である。

本課題研究は、家族性 LCAT 欠損症患者の予後を向上するための医療技術を迅速に確立し、本細胞医薬品を患者さんへ早期に提供することを目指し、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）へ円滑に繋げることを目的とした非臨床試験を実施することを目的とする。

B. 研究方法

<工程管理試験の検討>

H25 年度に実施した薬事戦略相談については、H25 年 10 月 11 日に移植用細胞の品質に関する相談申込みを行い、書面での審査を受けた。当初対面相談が H25 年 12 月 13 日に予定されたが、相談資料の内容に関するやり取りの中で、医薬品機器総合機構（PMDA）との間で大きな意見・解釈・理解等の隔たりがなく、書面審査とその後のフォローアップ面談（H26 年 1 月 21 日）で相談を終了した。

規格決定の方針としては、①これまでの研究で得られている成果に基づく暫定規格値、②今後 GMP 製造を行う 3 ロットの規格試験結果、③遺伝子治療臨床研究で製造する家族性 LCAT 欠損症患者 3 ロットの規格試験結果、の 3 者を総合的に検討し、最終的な規格決定を行う方針について、PMDA からは特に異論はなかった。

品質試験、工程内管理試験について、いくつか PMDA からの指摘があり、抗体等の調達ができなくなっていた不純物 ELISA 試験等の再構築含めた工程管理試験の検討を行った。

<非臨床動物試験>

1) 薬効・薬理試験

昨年度導入したヒト ApoAI 遺伝子のトランスジェニックマウスと LCAT 欠損マウスの拡大交配を実施し、両方のジェノタイプをホモで有するマウスの作出、有効性に関する探索的な移植試験を実施した。

2) 安全性・体内動態試験、毒性試験

昨年度の検討において大動物自家移植試験用の動物として 3 頭のイヌを用いた自家移植試験（1 頭は無処置）を評価した。今年度は LCAT 遺伝子導入イヌ前脂肪細胞の性能を LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞のそれと同等になるような検討を実施し、その上で 6 頭のイヌを用いた自家移植探索試験を実施した。

(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（倫理研究、生命倫理研究、遺伝子組換え実験、動物実験等）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準じ実施した。

C&D（研究結果と考察）

<品質試験、工程内管理試験について>

PMDA からの意見を製造・品質管理工程に沿って、以下のように検討した。

1) 脂肪幹細胞混入のリスク評価

細胞は未分化であればあるほどリスクが高いと考えられることから、未分化であると考えられる脂肪組織幹細胞の混入を評価する必要がある。吸引脂肪が移植用細胞の原材料となることから、吸引脂肪が検討に必要である。H26 年度は凍結保存していた前脂肪細胞や吸引脂肪組織を用いた検討を実施した。

脂肪分化の度合いに応じて、フローサイトメトリーでの側方散乱光 (SSC) が異なるという報告、脂肪特異的な蛍光染色による脂肪細胞の染色に関する過去の論文報告を参考に同一ドナーにおける脂肪細胞とそれに混入してくる未分化細胞の混入率を評価する方法の確立を試みた。

分離培養した前脂肪細胞、Stromal vascular fraction (SVF)を用いた予備検討の結果から、トリプシン等で剥離後の浮遊状態の細胞に対する蛍光色素染色は条件設定が困難であったため、SSC を指標とした評価法の検討を進めた。コラゲナーゼ処理後の SVF と浮遊脂肪細胞分画をそれぞれフローサイトメトリーで解析し、SVF 由来細胞をほぼカバーする領域を設定することで、浮遊脂肪細胞分画における油滴非含有細胞の混入が評価可能であった。今後フレッシュな吸引脂肪組織での検討が必要であるが、SSC を用いた評価法が確立できると考えられた。

2) 過継代細胞のリスク評価、過剰導入細胞のリスク評価

患者さんに移植する細胞の品質を確保するため、過継代細胞の評価をし、移植用細胞との比較検討を実施する必要がある。本年度は過剰導入細胞のリスク評価に関する検討を免疫不全マウス移植試験により実施した。詳細は以下の非臨床試験結果の項で記載する。本年度の移植試験は、過剰導入細胞の試験であるが、追加交付により実施している追加の面栄不全マウス

試験において、過継代細胞を移植する予定であり、これらの試験成績を評価した後に効率的な免疫不全マウス移植による細胞の GLP 安全性試験に移行する予定である。

3) 工程由来不純物の設定と評価系の確立

製造工程で使用されるコラゲナーゼ、トリプシン、BSA、ゲンタマイシンに加えて、培地由来の増殖因子などの最終製剤への残存のリスクを評価するための試験系の確立が必要である。コラゲナーゼ、トリプシン、BSA、ゲンタマイシンについては ELISA 系の確立が終了し、バリデーション試験もほぼ終了していたが、コラゲナーゼ、トリプシンに対する抗体（または標識抗体）が生産中止となっており、再構築が必要であることが判明した。そこでコラゲナーゼについては市販の抗体の HRP 標識を外注し、トリプシンについてはウサギの免疫を含めた抗体作製から ELISA 系の構築を外注して進めた。年度内に ELISA 系の構築が終了予定である。

4) 細菌混入のリスク評価

PMDA からは「最初の摘出脂肪組織に菌が含まれてくることの回避が必須である。その上で、工程内管理試験として無菌試験を考慮すべきである。」との指摘であった。これに関しては分担研究者である形成外科・佐藤教授を中心として脂肪組織の採取方法を検討いただいた。（詳細は当該分担報告書参照）

5) LCAT 力価試験法の変更

現状の力価測定法はアイソトープを使い、またステップが多いアッセイ系であり、バリデーションが取りづらい。このような現状のため力価試験を LCAT 蛋白定量試験に移行することに関して助言を受けた。この力価試験を最終的に ELISA 試験に移行するには安定的に供給可能な標準 LCAT 蛋白が必要である。そこで過去の報告を参考に HEK293 細胞への LCAT 遺伝子導入と LCAT 蛋白の精製に関する検討を行った。その結果、LCAT 遺伝子導入 HEK293 細胞が樹立され、当該細胞からの rLCAT 標準品の精製が可能であった。また市販の臨床検査用 LCAT 活性測定キットにより

活性が確認された。以上のことから標準 LCAT 蛋白の自家調製が可能となった。今後活性と蛋白量の相関をとるための標準品として使用し、最終的に工程管理試験における標準品として使用することを目指した検討を予定している。

6) RCR 出現、マイコプラズマ混入のリスク評価

PMDA からは「RCR が混在することを否定する評価系の確立において、ウイルス粒子からの核酸抽出効率に関する評価が必要である。またマイコプラズマ否定のための評価検体の再検討と複数の試験の採用を考慮すべきである。」との指摘であった。これらについては大学での予備的な検討は困難であり、既に外注等で確立されている方法があることから、外注試験先との協議を進める予定である。

<非臨床動物試験>

治験に向けた GLP 非臨床動物試験計画を PMDA との相談に基づき立案することを目的として、以下の検討を進めた。

1) 薬効・薬理試験

昨年度作出した hApoA1-Tg/LCAT-KO マウスを拡大繁殖し、有効性評価に向けた探索移植試験を実施した。拡大繁殖の過程で、本マウスの特性を評価する際の対照とすべき LCAT-KO マウスに水頭症が頻度高く発生し(産仔の 10~20%)、かつ hApoA1-Tg/LCAT-KO マウスもダブルホモマウスの繁殖率も予想とは低率であった。そのため、追加交付頂いた予算により、繁殖用アイソレーターを 1 台追加して、再繁殖を年度下半期に実施した。

アイソレーターを増台する前の産仔を使用し、少数の個体で予備的な移植試験を実施した。LCAT-KO マウスで使用していた免疫抑制剤(シクロフォスファミド)を使用し、移植 28 日間の持続分泌を確認した(図 1)。また、同個体の血清を使用して hApoA1 を指標として HDL のサイズ評価を実施したところ、移植 3 日目の血清において、HDL の成熟化を示唆する結果が得られた(図 2)。



図 1. hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の hApoA1-Tg/LCAT-KO マウス移植試験における血清中 LCAT の検出

hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を hApoA1-Tg/LCAT-KO マウスに移植し、移植前 (Pre)、移植 3、7、14、22、28 日後の血清を採取し、LCAT 蛋白を免疫沈降ウェスタンブロットにより検出した。H, HDL; (+), HDL から LCAT を免疫沈降ウェスタンブロットにより検出

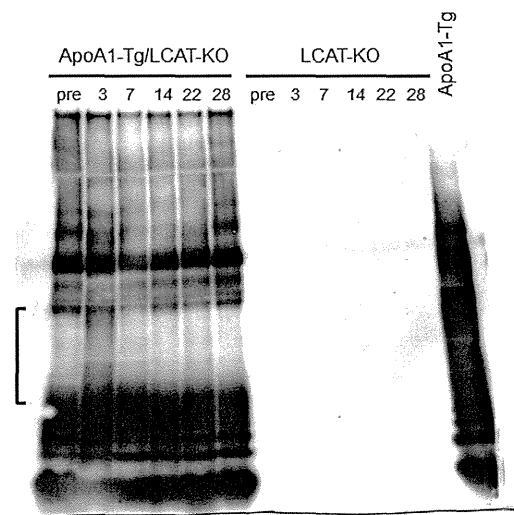


図 2. hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の hApoA1-Tg/LCAT-KO マウス移植試験における血清中 HDL の成熟評価

hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を hApoA1-Tg/LCAT-KO マウスに移植し、移植前 (Pre)、移植 3、7、14、22、28 日後の血清を採取し、非還元ポリアクリルアミド電気泳動後 HDL の成熟を hApoA1 を指標としてウェスタンブロットにより評価した。LCAT-KO, LCAT ノックアウトマウスに移植した検体、ApoA1-Tg, ApoA1-Tg マウスの血清

継時的に採取した血清では、継時的な変化は評価できるが、コレステロール等の脂質測定は量的に困難である。現在、移植 3 日後、7 日後のマウスを Sacrifice し、LCAT 濃度 (活性)、コレステロール濃度 (エス

テル比)、HDLのサイズ変化(成熟度)等のパラメーターの相関を解析し、有効性の指標となり得るパラメーターを、確立・選択するDATAを取る探索試験を年度内に終了する予定である。その上で、有効性本試験計画の立案に繋げる。

2) 安全性・体内動態試験、毒性試験

この試験に向けて、免疫不全マウスとイヌを動物として用いる方針の下検討を行った。

A) LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の免疫不全マウス移植による安全性評価試験

PMDA からの指摘の1つである過剰導入した細胞の評価を実施するため、昨年度ヒト前脂肪細胞で LCAT 遺伝子を過剰に導入した細胞の調製を行い、NOD/SCID マウスへの移植と長期安全性試験を開始した。本研究の本年度への継続中間評価において、有効性試験と大動物安全性試験を優先すべきとの指示があり、本検討はマウスからの採材のみ実施した上で一時的に中止していた。今年度下半期で追加交付を受けることが可能となり、これらの採材検体の解析評価と新たな移植試験を実施することとした。継時的に採取していたマウス血清について LCAT の分泌を評価する(図3)とともに、採材し凍結保存していた移植細胞検体について DNA を抽出し、Real-time PCR による LCAT 遺伝子の残存率(図4)と LAM-PCR 法によるクローナリティ解析を実施した(図5)。

その結果、NOD/SCID マウスの移植において、マウス血中への LCAT 分泌が少なくとも6か月確認され、LCAT 遺伝子の残存率評価から移植細胞は観察期間終了時(8か月)まで確認された。これらの移植検体においてクローナリティの異常な変化は観察されなかった。

図3. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の NOD/SCID マウス移植試験における血清中 LCAT の検出

LCAT 遺伝子を過剰導入した細胞と通常の製造法に準じて調製した細胞を NOD/SCID マウスに移植し、2週間(2w)、1、3、6、8か月(1M、3M、6M、8M)後継時的に血清を採取し、LCAT 蛋白を免疫沈降ウェスタンブロットにより検出した。

H, HDL; H-IP, HDL から LCAT を免疫沈降ウェスタンブロットにより検出; (-), 陰性コントロール

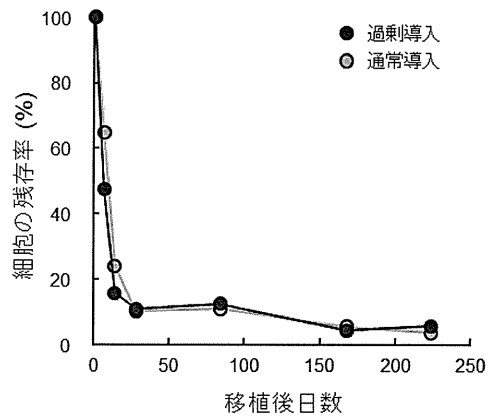
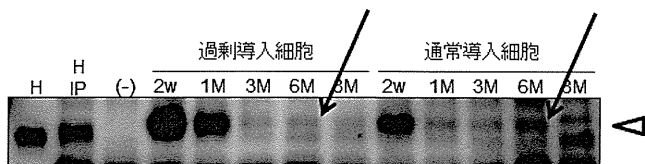
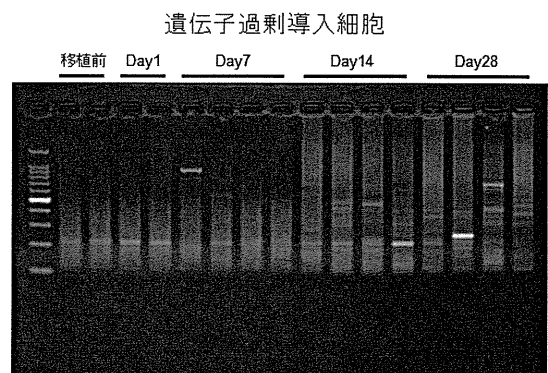


図4. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の NOD/SCID マウス移植試験における残存率

LCAT 遺伝子を過剰導入した細胞と通常の製造法に準じて調製した細胞を NOD/SCID マウスに移植し、一定期間の飼育後 Sacrifice して、移植細胞を摘出した。それぞれの検体より DNA を抽出し、Real-time PCR により LCAT 遺伝子のコピー数を指標として移植細胞の残存率を評価した。



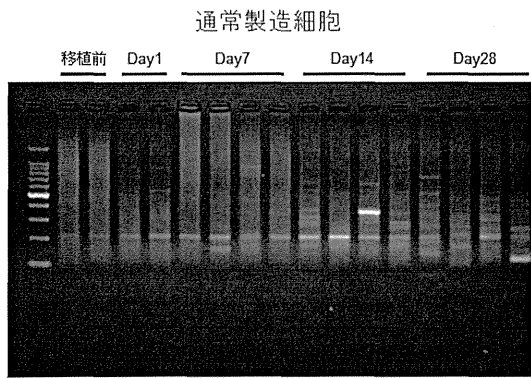


図 5. NOD/SCID マウスに移植された LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を用いたクローナリティ解析 LCAT 遺伝子を過剰導入または通常導入した細胞について、移植前と、移植 7 日、14 日、28 日後の移植部位より摘出した細胞についてゲノム DNA を調製し、LAM-PCR 解析を行った。3、6、8 か月後の検体については年度内に解析が終了する予定である。

現在は、PMDA からの指摘に対して多面的に対応する必要があると考え、この移植試験系において幹細胞混入のリスクを同時に評価する試験を進めている。すなわち現在同一ドナーから調製される脂肪幹細胞 (ASC) への遺伝子導入と移植を実施するべく、作業を進めており年度内に移植を実施する。このような検討は半年以上の長期飼育と評価が必要であると考えられるため、年度内に終了することはできないが、来年度以降も試験を継続する予定である。

本研究では大動物における安全性評価が重要な課題である。昨年度までの検討結果からイヌの脂肪細胞がヒトの脂肪細胞と類似した培養特性を示すことを確認し、イヌを用いた自家移植試験が可能であることが示唆された。その一方で、イヌ前脂肪細胞がヒト前脂肪細胞と比較して遺伝子が効率よく導入できないなどの相違点も明らかとなった。

今年度は、自家移植モデル試験系の確立を目的として、前述の NOD/SCID 移植試験において過剰導入ヒト前脂肪細胞を調製した方法を応用し、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞と同等の LCAT 遺伝子導入コピー数を持つイヌ前脂肪細胞を獲得し、移植する自家移

植試験系の構築を試みた脂肪組織からの脂肪細胞培養、hLCAT 遺伝子導入、移植用細胞の調製は千葉大学で実施し細胞の移植、その後の経過観察を日本バイオリサーチセンターで実施した。移植用細胞の調製は千葉大学で担当者が実施し、保冷した状態で試験施設まで千葉大学担当者が輸送した。

この試験では 6 頭のイヌ (ビーグル、雌、約 10 か月齢、約 10kg) より前脂肪細胞を調製し、自家移植用の拡大培養と並行して遺伝子導入条件の検討を行った。投与細胞数として、低用量と高用量の群を設け、移植細胞数に依存した血中への hLCAT 分泌が認められるかどうかを評価することとした。低用量群はヒトで想定している臨床投与量 (5×10^8 個 $\sim 1 \times 10^9$ 個) から体重換算で同等と考えられる 1×10^8 個/個体、高用量群はその 4 倍量の 1×10^9 個/個体で自家移植を行った。イヌのフィブリングル製剤はないため、クエン酸加自家血漿と 1%自家血清、トロンビンを含むリンゲル液で懸濁した細胞懸濁液を二筒性シリンジに充填し、臨床で使用されているフィブリングル製剤と同様の方法で鼠蹊部に注入移植した。

6 頭の個体から 7 日間の天井培養により、獲得された前脂肪細胞を示す (表 1)。昨年度と FBS を変更しているため比較はできないが、1g の脂肪組織から 106 個オーダーの細胞が獲得された。

表 1. イヌ脂肪組織からの天井培養による前脂肪細胞の獲得細胞数

	個体番号	天井培養に用いた脂肪組織 (g)	獲得総細胞数	脂肪組織 1g 由来の獲得細胞数
低用量	1	5	1.73E+07	3.46E+06
	2	5	5.46E+06	1.09E+06
	3	5	7.03E+06	1.41E+06
	4	8	8.62E+06	1.08E+06
高用量	5	8	1.56E+07	1.95E+06
	6	8	9.87E+06	1.23E+06
H25年度	1	7	2.71E+07	3.87E+06
	2	13	5.14E+07	3.95E+06

それぞれの個体から調製した前脂肪細胞に 3 種類の遺伝子導入条件下、hLCAT 遺伝子を導入した。遺伝

子導入後移植に向けた拡大培養と Real-time PCR による導入コピー数の測定を行った (図 6)。その結果、2 種類の条件で、LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞と同等の導入効率 (1~1.5 コピー/細胞) で遺伝子導入が可能であった。遺伝子導入時の細胞増殖率低下が高導入-1 の条件で認められたため、高導入-2 の条件で遺伝子導入した細胞を自家移植用に拡大培養を継続した。

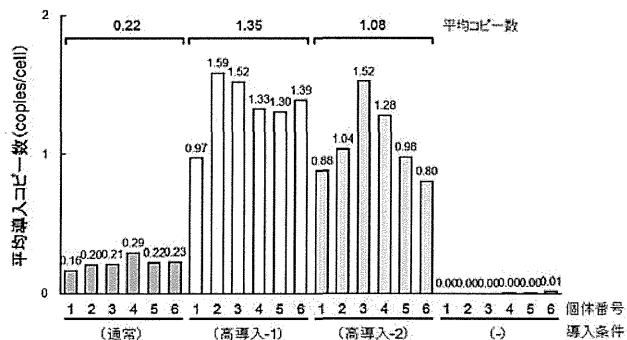


図 6. イヌ前脂肪細胞における遺伝子導入条件の検討
ヒト前脂肪細胞と同じ条件 (通常)、ヒト前脂肪細胞で通常条件よりも効率に導入できることが確認されている2つの条件(高導入-1、高導入-2)で遺伝子導入を行い、Real-time PCR により LCAT 遺伝子の導入コピー数を評価した。

移植日を患者への移植日と同じ脂肪組織摘出から 21 日目に設定し、1 継代前に PKH26 を用いて移植用細胞を蛍光染色した。昨年度の経験から、試験施設での細胞回収作業は困難が予想されたため、今年度は 6 個体分の細胞回収・調製を千葉大学で実施し、細胞懸濁液として試験施設に持ち込み、自家移植した。移植日の培養上清中の hLCAT 量を評価したところ、全ての移植用細胞の培養上清に hLCAT の分泌が確認された (図 7)。どの個体由来の前脂肪細胞も増殖能に大きな違いは認められなかった。

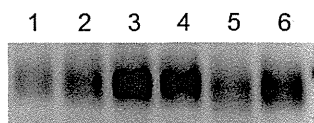


図 7. hLCAT 遺伝子導入イヌ前脂肪細胞における hLCAT の分泌

高導入-2 の条件で調製、拡大培養、移植した細胞における hLCAT の分泌を免疫沈降ウェスタンブロットにより評価した。

移植日当日の細胞についてフローサイトメトリーで表面抗原解析を実施したところ、遺伝子導入による影響は認められず、個体間での違いも認められなかった (図 8)。

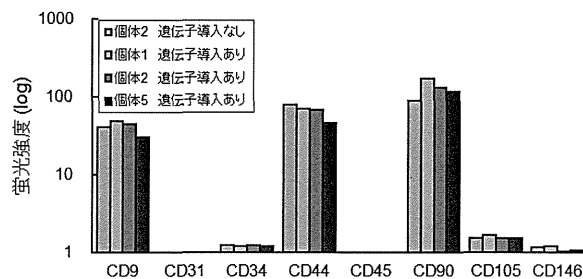


図 8. イヌ前脂肪細胞、hLCAT 遺伝子導入イヌ前脂肪細胞の表面抗原プロファイル

個体 2 について遺伝子導入の有無の比較を行った。遺伝子導入による影響は認められなかった。また hLCAT 遺伝子導入イヌ前脂肪細胞を 3 個体 (個体 1、2、5) で比較したところ相違は認められなかった。

移植個体から経時的に血清を採取し、免疫沈降ウェスタンブロットにより hLCAT 蛋白を検出したところ、6 個体全てにおいて明瞭な hLCAT のバンドが移植 14 日まで観察された (図 9)。特に LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞と同等の LCAT 遺伝子コピー数を持つ hLCAT 遺伝子導入イヌ前脂肪細胞の患者での移植用量を外挿した移植条件 (低用量群) において、hLCAT の補充が検出できたことは、今後の安全性 GLP 試験実施に向けて非常に重要な知見である。さらに移植細胞の培養上清での hLCAT 分泌量と移植後の血中 hLCAT 量に相関する傾向が認められ、詳細な解析は必要であるが、dose-escalation 試験も自家移植モデルで可能であると考えられた。一方マウス移植においては移植 3 日後に血中 LCAT 濃度のピークがあるが、イヌにおいては移植 3 日後、7 日後の間で個体差が認められた。

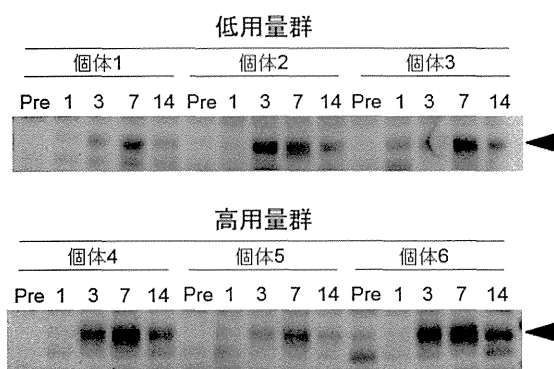


図 9. hLCAT 遺伝子導入前脂肪細胞の自家移植イヌモデルにおける血清中 hLCAT の検出

今後イヌでの持続分泌が可能かどうか、もしくは抗体が出現しているかどうかを精査し、GLP 試験へと進める予定である。

E. 結論

本年度 LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞の品質に関する PMDA 相談に基づいた工程管理試験の検討を行った。GMP 基準書（製品標準書以下の基準書）はほぼ完成しているので、今後は改善された工程管理試験を組み合わせ、CPC における健常人脂肪組織を用いた模擬製造を行いながら、作業者の訓練とともに GMP 製造体制を確立する。

本年度の検討により、薬効・薬理試験用のモデルマウスにおける有効性評価マーカーを見出し、以後の薬効・薬理試験へと繋げていく予定である。一方で水頭症の発症が多くなっており、系統維持のためには野生型との交配も同時並行する必要性があると考えられる。

安全性評価試験に関しては NOD/SCID マウス、イヌを継続して評価し、それぞれの動物が今後の GLP 試験に使用できることが確認された。検討した範囲では異常所見は認められなかった。今後はこれらの予備探索試験の結果に基づき非臨床試験デザインに関する PMDA 相談を行い、順次 GLP 試験へ移行する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuroda M, Holleboom AG, Stroes E, Asada S, Aoyagi Y, Kamata K, Yamashita S, Ishibashi S, Saito Y, Bujo H. Lipoprotein subfractions highly associated with renal damage in familial LCAT deficiency *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34, 1756-1762.

2. 総説

- 1) 黒田正幸、武城英明. LCAT 欠損症の診断と治療, 腎と透析 (特集、腎のたまり病)、東京医学社、2014, 77; 226-230.
- 2) 黒田正幸、武城英明. 脂質異常症の遺伝子細胞治療—LCAT 欠損症患者への真意治療法の開発—, *Annual Review 2015 糖尿病・代謝・内分泌*、中外医学社、2015, 128-132.

3. 学会発表等

- 1) Kuroda M, Yokote K, Bujo H, Asada S, Aoyagi Y, Aso M, and Saito Y. Translational clinical research for treatment of familial LCAT deficient patients through transplantation of *ex vivo* gene-transduced autologous adipocytes. The 18th International Vascular Biology Meeting. 2014. 4 京都.
- 2) 黒田正幸、武城英明、青柳靖之、浅田咲世、麻生雅是、齋藤康、横手幸太郎. 遺伝子導入脂肪細胞の移植による酵素補充療法 第 19 回アディポサイエンス・シンポジウム. 2014. 8 大阪.
- 3) Kuroda M, Holleboom AG, Stroes E, Asada S, Aoyagi Y, Kamata K, Yamashita S, Ishibashi S, Saito Y, Bujo H. Lipoprotein subfractions highly associated with renal damage in familial LCAT deficiency. The 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress. 2014.9 京都.
- 4) Aoyagi Y, Kuroda M, Asada S, Aso M, Yokote K,

- Saito Y, and Bujo H. Treatment of familial LCAT deficiency syndrome by self-transplantation of therapeutic-enzyme secreting adipocytes. The 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress. 2014.9 京都.
- 5) Kuroda M, Aoyagi Y, Asada S, Aso M, Bujo H, Saito Y, and Yokote K. Development of ex vivo gene therapy for familial LCAT deficiency syndrome by self-transplantation of therapeutic-enzyme secreting adipocytes. The XXIInd Annual ESCGT Congress in collaboration with the NVGCT. 2014. 10 ハーグ (オランダ) .
- 6) 青柳靖之、黒田正幸、武城英明、浅田咲世、麻生雅是、齋藤康、横手幸太郎. 加工脂肪細胞自家移植による持続的酵素補充療法の臨床導入. 第 35 回 日本肥満学会. 2014. 10. 宮崎.
- 7) 黒田正幸、浅田咲世、青柳靖之、横手幸太郎、齋藤康、武城英明. LCAT 欠損症特異的な異常リポ蛋白の同定と LCAT 酵素補充による改善. 第 28 回 小児脂質研究会. 2014.11 千葉.
- 8) 黒田正幸、浅田咲世、青柳靖之、横手幸太郎、齋藤康、武城英明. LCAT 欠損によって生ずる血清異常リポ蛋白の LCAT 酵素補充による改善. 第 56 回 日本先天代謝異常学会総会. 2014.11 仙台.
- 9) 浅田咲世、黒田正幸、武城英明、青柳靖之、麻生雅是、齋藤康、横手幸太郎. 家族性 LCAT 欠損症に対する遺伝子細胞治療法の臨床導入. 第 56 回 日本先天代謝異常学会総会. 2014.11 仙台.
- 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. 分担研究報告書

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患等実用化研究事業）

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26年度 分担研究報告書

原発性高脂血症予後実態調査の立ち上げと LCAT 欠損症診断基準の策定

分担研究者 石橋 俊 自治医科大学内分泌代謝科 教授

研究協力者 倉科智行 自治医科大学内分泌代謝科 助教

研究要旨

本研究年度は、我が国の原発性高脂血症のうち、とくに FH（ホモ・ヘテロ接合体含む）、家族性Ⅲ型高脂血症、高カイロミクロン血症患者の病態および治療実態の調査である「家族性高コレステロール血症・家族性Ⅲ型高脂血症・高カイロミクロン血症の予後実態調査」研究の立ち上げを行った。本研究は、患者登録後より前向きに各種イベントの発生および死亡を追跡することにより、上記疾患患者におけるイベント発生率・死亡率を明らかにし、予後改善への貢献、診療ガイドラインの改訂を目的としている。登録開始を平成27年4月と予定しており、来年度以降に登録症例の実態調査を開始していく予定である。

また、「難病の患者に対する医療等に関する法律」の成立に伴い新規指定難病として「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」の診断基準および重症度を策定し、厚生労働省へと申請を行った。新規に策定した診断基準は、必須項目：血中 HDL コレステロール値 10mg/dl 未満、A 症状：蛋白尿、1. 腎機能障害、2. 角膜混濁、B 検査所見：1. 血液・生化学的検査所見 (1) 貧血（ヘモグロビン値<11g/dl）、(2) 赤血球形態の異常、(3) コレステロールエステル比の低下（正常 70%）、C 鑑別診断として以下の疾患を鑑別：遺伝性低 HDL コレステロール血症（タンジール病、アポリポタンパク A-I 異常症）、肝疾患（肝硬変・劇症肝炎）、胆道閉塞、低栄養、悪液質など蛋白合成低下を呈する病態、D 遺伝学的検査：LCAT 遺伝子の変異または LCAT 活性・LCAT 蛋白の欠如を証明する。必須項目を満たし、A・B のうち 1 項目以上を満たし C の鑑別すべき疾患を除外し、D を満たすものを Definite。必須項目を満たし A・B のうち 1 項目以上を満たし C の鑑別すべき疾患を除外したものを Probable と診断することと定めた。

A. 研究目的

1. 家族性高コレステロール血症・家族性Ⅲ型高脂血症・高カイロミクロン血症の予後実態調査

家族性高コレステロール血症（Familial Hypercholesterolemia: FH）は、low density lipoprotein (LDL)受容体およびその関連遺伝子の変異による遺伝子疾患であ

り、常染色体優性遺伝形式をとる。ホモ接合体患者は100万人に1人の頻度で認められ、わが国における患者数は、約120人と推定される。FHホモ接合体は、生下時より著明な高LDLコレステロール血症を示し、幼児期より動脈硬化症による冠動脈疾患や大動脈弁狭窄症、大動脈弁上狭窄症などを引き起こし、未治療では30歳まで生きられないとされている。FHホモ接合体の治療として、現在は定期的なLDLアフェレシスが行われ、患者の予後を大きく改善している。平成21年10月より、FHホモ接合体は特定疾患に認定されている。一方ヘテロ接合体は日本人の500人に1人の頻度で存在するといわれており、ホモ接合体ほどではないものの比較的若年より高コレステロール血症を発症し、冠動脈疾患や脳梗塞などの動脈硬化性合併症のハイリスク群と考えられている。

家族性III型高脂血症 (Familial type III hypelipoproteinemia, broad β disease) の背景には、アポリポ蛋白 (アポ)E (apolipoprotein E, apoE) の異常、すなわちアポE2/E2あるいはアポE欠損が存在する。アポEには野生型のE3とアイソフォームであるE2, E4が存在し、E3/E3が大半である。E2/E2はLDL受容体との結合能を持たない異常であり、カイロミクロンレムナントやVLDLレムナントが肝臓へと取り込まれず血中に蓄積する。E2/E2は我が国で0.2%程度存在すると推察されているが、家族性III型高脂血症と診断されている例は0.01-0.02%と考えられている。本症

例においては、高VLDLレムナント・カイロミクロンレムナント血症を示し、結節性黄色腫や手掌線状黄色腫が出現することがあり、また動脈硬化症による冠動脈疾患や腎動脈狭窄による腎血管性高血圧・下肢動脈狭窄による閉塞性動脈硬化症を引き起こすことが多いとされ、迅速な診断と治療介入が必要となる。通常の脂質採血では総コレステロール値、LDLコレステロール (LDL-C) 値や中性脂肪 (TG) 値は必ずしも多くない場合もあり、特にLDL-C値はむしろ低下する。血清のポリアクリルアミドゲル電気泳動によるbroad β patternの証明やアポリポ蛋白の等電点電気泳動によりアポE phenotypeの確認を参考に、家族性III型高脂血症の診断は原発性高脂血症調査研究班 (垂井班) で定められている診断基準を用いて診断がなされている。

高カイロミクロン血症は脂質異常症WHO分類でのI型およびV型を指し、カイロミクロン代謝に関与する種々の蛋白の欠損・機能異常を背景として発症する。例としてリポ蛋白リパーゼ (LPL) 欠損症やアポリポ蛋白C-II欠損症などがあるが、いずれも診断には遺伝子検査が必要である。高カイロミクロン血症は他の脂質異常症と異なり、急性膵炎を惹起する。しかし高カイロミクロン血症患者のなかでも膵炎を起こさない患者もいれば、重症膵炎を繰り返す患者もおり、予測することが現時点では困難である。高カイロミクロン血症は他疾患や薬剤により生じることもある点、一般検査では中性脂肪高値の中に含まれること

から診断が困難な点、患者数が稀少である点などから、高カイロミクロン血症と予後の関連は明らかになっていない。

我が国の原発性高脂血症のうち、とくにFH（ホモ・ヘテロ接合体含む）、家族性Ⅲ型高脂血症、高カイロミクロン血症患者の病態および治療実態の調査を行い、その後前向きに各種イベントの発生および死亡を追跡することにより、上記疾患患者におけるイベント発生率・死亡率を明らかにし、予後改善への貢献、診療ガイドラインの改訂を目的とする。

2. LCAT 欠損症の診断基準の確立

LCAT 欠損症は、幼少時より進行する腎障害、角膜混濁により長期にわたり日常生活に支障をきたす。「難病の患者に対する医療等に関する法律」の成立に伴い新規指定難病として「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」の診断基準および重症度を策定し、厚生労働省へと申請を行った。

B. 研究方法

1. 家族性高コレステロール血症・家族性Ⅲ型高脂血症・高カイロミクロン血症の予後実態調査

本研究への参加に同意した全国の国公立病院、大学病院関連施設および日本動脈硬化学会の会員が所属する医療機関において、研究期間中に来院した原発性高脂血症患者を登録する前向きコホート研究である。

本研究の参加に同意した各研究協力施設

は、各施設の倫理委員会承認後、患者登録を開始する。協力施設が独自の倫理委員会を有しない場合は、所属長の許可を得たうえで自治医科大学の倫理審査委員会にて審査する。各研究協力施設の担当者は、本研究への参加について研究対象者から文書による同意を取得できた患者を登録する。一部の症例が多い施設に関しては過去に遡り、症例を登録する。

登録は、Electronic Data Capture システム（以下、EDC）の一つである Research Electronic Data Capture (REDCap) を用いる。（REDCap：米国で NIH の援助によりヴァンダービルト大学が開発し、アカデミアを中心に世界で広く使われているデータ管理システム。）REDCap 上には個人情報に含まれず、互いの研究者間に個人情報が漏れることはない。各研究協力施設の医師は、本研究に該当する患者が来院した際に、患者を登録し、ベースライン調査項目（後述）を入力する。EDC 上には氏名、住所など個人を特定する情報は含めず、研究 ID のみを用いる。患者の氏名、住所および家族などの連絡先といった個人情報は各研究協力施設の個人情報担当者が保有し、住民票による追跡を必要とする場合にのみ研究全体の個人情報担当者からの照会を行う。過去の患者を本研究に登録する際は、担当医師が REDCap 登録するか、あるいは REDCap に登録する項目を CD-R、または USB にて収集し、データマネジメント担当者が REDCap に情報入れる。

登録終了後、1 年毎にアウトカム調査を

行う。各協力施設の担当者は、イベント発症および死亡の有無を報告する。アウトカム調査時に通院していない患者は、本人または登録時に本人以外の連絡先として申請されている家族に郵送、または電話にて問い合わせる。本研究参加施設以外の医療機関に転院していた場合は、各協力施設担当者が、該当する医療機関にイベント発症時の状況を問い合わせる。

各協力施設で追跡不可能な場合は、各協力施設から全体の個人情報担当者に報告する。研究者は定期的に（4年に1度）患者や登録時に本人以外の連絡先として申請されている家族に直接連絡を取るか、医療機関や公的機関（保健所、都道府県・市町村等）に問い合わせ、診療・介護・転出入・死亡等に関する情報について一定の請求手続き（閲覧、転記、写しの交付等：例、住民票請求、死亡小票請求）を経てアウトカムを把握する。追跡手続きについては研究参加時に説明の上で同意を取得する。

2-3) 測定項目

1) ベースライン調査…患者イニシャル、生年月日（重複登録の確認目的）、性別、満年齢、身長、体重、ウエスト周囲径、血圧、特徴的身体所見の有無（アキレス腱肥厚、その他の腱黄色腫、結節性黄色腫、扁平黄色腫、手掌線状黄色腫、発疹性黄色腫、角膜輪、その他）の有無、登録時血液検査データ（検査日、採血条件、総コレステロール、HDLコレステロール、トリグリセリド、LDLコレステロール（総コレステロールがない場合のみ）、血糖値、インスリン、BUN、

クレアチニン、GOT (AST)、（以降はデータがあれば入力）GPT (ALT)、 γ -GTP、アルブミン、HbA1c、ヘモグロビン、アミラーゼ、膵型アミラーゼ、リパーゼ、尿酸、apoB、apoC-II、apoC-III、apoE、apoA-I、apoA-II、Lp(a)、レムナントリポ蛋白コレステロール (RLP-C)、リポ蛋白リパーゼ (LPL)（ヘパリン前後）、血中脂肪酸分画（EPA、AA、EPA/AA比）、リポ蛋白分画 HPLC 法 (HDL、LDL、IDL、VLDL、Other、その他)、生理学的検査 (PWV、ABI 検査値、12 誘導心電図異常の有無、頸動脈エコーでの狭窄の有無、心エコーでの弁膜症有無)、血族結婚の有無、2 親等以内の家族歴（若年性冠動脈疾患・家族性高コレステロール血症・高中性脂肪血症）、合併症の有無（耐糖能障害、糖尿病（病型）、慢性腎臓病 (CKD)、末梢動脈疾患 (PAD)、冠動脈疾患（発症年齢、治療内容）、高血圧症、脳梗塞・TIA・脳出血、大動脈弁狭窄症、大動脈弁上狭窄、胸・腹部大動脈瘤、甲状腺機能低下症、急性膵炎、肝腫大、脾腫、血液疾患、自己免疫疾患）、現在の投薬状況（降圧薬、経口糖尿病薬、糖尿病注射薬、抗血小板薬・抗凝固薬）、服用中の脂質異常症治療薬の種類と用量および開始時期、LDL アフェレシスの有無と開始時期および施行頻度、生活習慣（喫煙・飲酒・運動習慣）、栄養士による栄養指導の有無、診断的検査（LDL-R 遺伝子変異、PCSK9 遺伝子変異、ARH 遺伝子変異、その他の遺伝子変異、アポ E 遺伝型、アポ E 表現型、その他の遺伝子検査）、リポ蛋白電気泳動パターン、アポ E 表現型）、アキレス腱軟線撮影でのアキレス腱

厚

2) アウトカム調査…冠動脈疾患の有無(急性心筋梗塞、狭心症)とその発症年月日・入院年月日とその関連項目(発症時の症状、心電図変化の有無、心筋逸脱酵素上昇の有無、経皮的冠動脈インターベンションの有無、経皮的冠動脈血栓溶解療法の有無、冠動脈バイパス術の有無、冠動脈CT/MRI検査の有無。)脳血管疾患の有無(脳梗塞・脳出血)とその発症年月日・入院年月日とその関連項目(発症時の神経症状、画像検査の有無とその所見)、心房細動の有無、塞栓源の有無、大動脈弁狭窄症および閉鎖不全症・大動脈弁上狭窄の有無、僧房弁狭窄・三尖弁狭窄および閉鎖不全症の有無、大動脈瘤の有無、末梢血管疾患の有無、急性膵炎の有無

主要評価項目は心血管および脳血管イベント、大動脈瘤、末梢動脈疾患、急性膵炎で、副次的評価項目は全死亡としている。

2. LCAT 欠損症の診断基準の確立

国内外の文献や確定診断患者の情報をもとに、原発性高脂血症に関する調査研究班での協議を経て本邦での LCAT 欠損症の診断基準を策定した。

C&D. 研究結果と考察

1. 家族性高コレステロール血症・家族性Ⅲ型高脂血症・高カイロミクロン血症の予後実態調査

本研究年度は、研究班全体での会合を重ねて上記研究の計画・準備を行った。主管

となる自治医科大学で、平成 26 年 12 月 9 日付で疫学研究倫理審査委員会の研究許可を得ている。平成 27 年 4 月からの開始を予定している。

2. LCAT 欠損症の診断基準の確立

以下に策定した LCAT 欠損症の診断基準を示す。

必須項目：血中 HDL コレステロール値 10mg/dl 未満

A 症状

1. 蛋白尿、腎機能障害
2. 角膜混濁

B 検査所見

1. 血液・生化学的検査所見

- (1) 貧血 (ヘモグロビン値<11g/dl)
- (2) 赤血球形態の異常 (いわゆる「標的赤血球」「大小不同症」「奇形赤血球症」「口状赤血球」)
- (3) コレステロールエステル比の低下 (正常 70%)

C 鑑別診断

以下の疾患を鑑別する。

遺伝性低 HDL コレステロール血症 (タンジール病、アポリポタンパク A-I 異常症) 肝疾患 (肝硬変・劇症肝炎)、胆道閉塞、低栄養、悪液質など蛋白合成低下を呈する病態

D 遺伝学的検査

LCAT 遺伝子の変異、LCAT 活性・LCAT 蛋白の欠如

<診断のカテゴリー>

必須項目を満たした例において、以下のよ
うに判定する。

Definite : A・Bのうち1項目以上を満たし
Cの鑑別すべき疾患を除外し、Dを満たす
もの

Probable : A・Bのうち1項目以上を満たし
Cの鑑別すべき疾患を除外したもの

Definite、Probable を対象とする。

E. 結論

診断基準策定・指定難病登録申請を行い、
類縁疾患の前向き実態調査の体制整備を行
った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

**H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含
む）。**

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし