

201415020B

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 24～26 年度 総合研究報告書

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 24～26 年度 総合研究報告書

研究代表者 武城 英明

平成 27 (2015) 年 3 月

目次

I. 総合研究報告書

1. 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
2. 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
自治医科大学内分泌学講座内分泌代謝学部門 石橋 俊
- - - - - 13
3. 細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」に最適な脂肪採取と脂肪移植の確立
千葉大学大学院医学研究院形成外科学 佐藤 兼重
- - - - - 24
4. 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
- - - - - 30

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 - - - - - 35

III. 研究成果の刊行物・別冊 - - - - - 39

I. 総合研究報告書

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）
総合研究報告書

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年度には厚生労働省より、これまでの一連の研究成果をもとに患者さんへの遺伝子治療臨床研究が認可された。このことにより患者を対象とした移植治療研究と患者脂肪組織を用いた非臨床試験を行うこととなった。

LCAT遺伝子導入前脂肪細胞の品質に関するPMDA相談の下、工程管理試験の改善と確立を行った。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。非臨床GLP試験の実施に向け、PMDAとの非臨床動物試験計画相談を目的とした探索的な試験検討を行った。薬効・薬理試験用の病態モデルマウスを作出し、その繁殖と薬効・薬理予備試験を実施した。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。大動物安全性試験については、自家移植用の動物の選択から研究を開始した。以前の試験成績と本研究での試験成績からイヌを用いた自家移植が最も効率的な自家移植モデルであることが判明した。特に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の自家移植により血中へのLCAT補充が確認され、大動物での遺伝子導入前脂肪細胞移植による酵素補充モデルが確立された。本研究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試験に移行可能な試験基盤が確立された。

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、更になんが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

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を薬効・薬理試験のモデルマウスとして作出した。SPF 繁殖と並行して、hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を調製、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

大動物自家移植試験用の動物としてそれまでに実施していたカニクイザルに加え、ミニブタ、イヌを評価した。カニクイザルについてはヒト前脂肪細胞で用いている培養液が増殖率を向上するかどうかについて検討した。それぞれの動物から脂肪組織を採取し、前脂肪細胞を天井培養により調製し、hLCAT 遺伝子導入とその後の培養を実施した。カニクイザルについてはヒト前脂肪細胞で用いている培養液による増殖率の向上は認められなかった。ミニブタは天井培養による培養が困難で、試験に用いるだけの前脂肪細胞が獲得できなかった。イヌは、天井培養が可能であり、かつヒト前脂肪細胞で用いている培養液による増殖率の向上が認められた。以上の H24 年度予備試験成果を基に H25～H26 年度にかけてイヌでの自家移植モデルの確立を行った。

もう一つの安全性試験系として免疫不全マウスへの LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞移植試験を実施した。これは過去に研究協力者であるセルジェンテック株式会社が LCAT 遺伝子過剰導入マウス前脂肪細胞の GLP 試験を実施していることを参考に、同様の考えで LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の安全性評価系の確立と GLP 試験実施を目指すものである。

(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)

<薬事戦略相談結果>

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の品質に関して、H25年10月11日付で相談申込みをし、書面審査の後、H26年1月22日付でPMDAより意見を受理した。申請資料のやり取りの中でPMDAからの意見等に意見や考え方の相違がなかったため、PMDAと相談者(千葉大学)との間で、対面助言は実施する必要がないと判断し、書面審査のみとなった。審議内容を以下に記載する。

1) LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞の規格の設定方針

規格決定の方針として、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つ

た。今後はこの方針に従って研究を進めていく予定である。

2) 品質試験、工程内管理試験について

(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。

(2) 過継代細胞のリスク評価

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。

(3) 工程由来不純物の設定と評価系の確立

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。

(4) 過剰導入細胞のリスク評価

平均1コピー、陽性率30%程度であることから、3~5コピー/細胞の混在があった時のリスク評価が必要である。

(5) RCR 出現のリスク評価

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。

(6) 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。

(7) 細菌混入のリスク評価

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。

(8) マイコプラズマ混入のリスク評価

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。

3) 移植用製剤の組成について

これまでの検討から医療用組織接着剤であるフィブリンゲルを細胞と混和して患者皮下に注入移植するプロトコルを考えている。そこで、認可されている用途以外でのフィブリンゲルの使用について意見を伺った。

(1) フィブリンゲル（フィブリノゲンとトロンビン）の使用について

臨床での適用とは異なるため、細胞製剤キットのコンポーネントとして扱い、注射剤としての要件を満たすような検討が必要である。

<品質試験、工程内管理試験について>

PMDA からの意見を取得後、それぞれの項目につい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免疫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し、無菌的な脂肪組織採取が可能となった。

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

LCAT の活性発現の共役因子として ApoA1 が知られている。LCAT と ApoA1 との相互作用には種差があることが知られており、ヒト LCAT の機能を評価するには ApoA1 もヒト型であることが必要であると考えられる。そこでこれまで薬効試験モデルとして考えていた LCAT-KO マウスにさらにヒト ApoA1

(hApoA1) を保有するマウスを薬効・薬理作用のモデルとして作出した。

得られた産仔について血清を採取し、ApoA1 の血中濃度を測定した (図 1)。家族性 LCAT 欠損症では、ApoA1 の血中濃度が減少していることが知られている。実際に野生型 B6 マウスと比較するとマウス ApoA1 (mApoA1) の濃度が低下していることが確認された。また、hApoA1-Tg のジェノタイプを持つマウスでは hApoA1 が検出され、mApoA1 はほとんど検出されなくなっていた。hApoA1 遺伝子領域の染色体挿入部位が作出の原著論文からは不明であるため、mApoA1 遺伝子が破壊されているかどうか不明であるが、作出したマウスの血中では hApoA1 が優位に存在することが分かり、また LCAT-KO のジェノタイプを持つマウスが LCAT-WT のジェノタイプを持つマウスより hApoA1 の血中濃度が低下していたことから、家族性 LCAT 欠損症患者に類似した ApoA1 の動態を示していると考えられた。

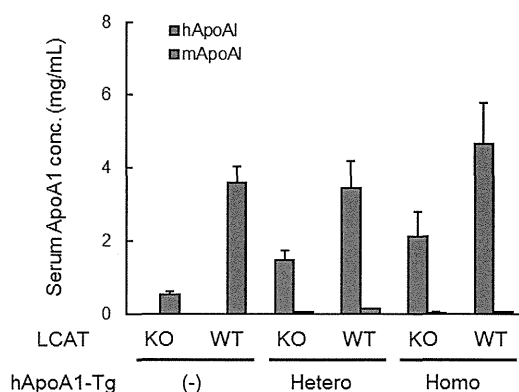


図 1. 作出した hApoA1-Tg/LCAT-KO マウス血中における hApoA1 と mApoA1 の濃度

hApoA1-Tg マウスと LCAT-KO マウスとの交配の過程において得られたマウスについて血中 hApoA1、mApoA1 濃度を ELISA により測定した。

KO, LCAT 遺伝子ノックアウト; WT, mLCAT 野生型; (-), hApoA1 遺伝子を持たないコントロール; Hetero, hApoA1 ヘテロ接合体; Homo, hApoA1 ホモ接合体

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。今後本マウスの維持には一度野生型との交配が必須であると考えられた。

このような背景の中、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 2）。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 3）。

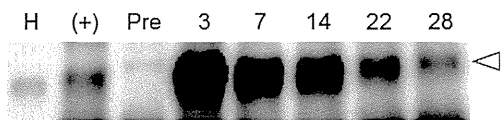


図 2. hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の hApoA1-Tg/LCAT-KO マウス移植試験における血清中 LCAT の検出

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

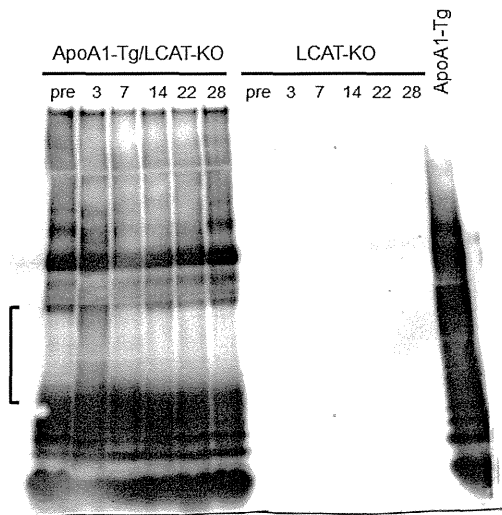


図 3. hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の hApoA1-Tg/LCAT-KO マウス移植試験における血清中 HDL の成熟評価

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。Day3 の検体において、hApoA1 を含む粒子のサイズ上昇が認められる。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 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 4) とともに、採材し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 5) と LAM-PCR 法によるクローナリティ解析を実施した (図 6)。

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

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。

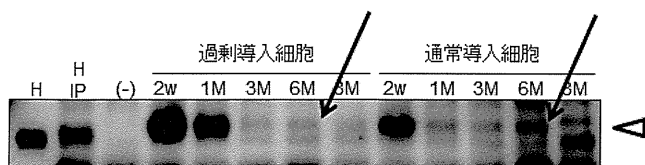


図 4. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の NOD/SCID マウス移植試験における血清中 LCAT の検出

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

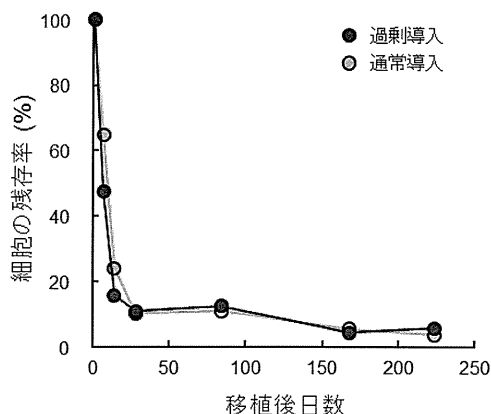


図 5. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の NOD/SCID マウス移植試験における残存率

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。

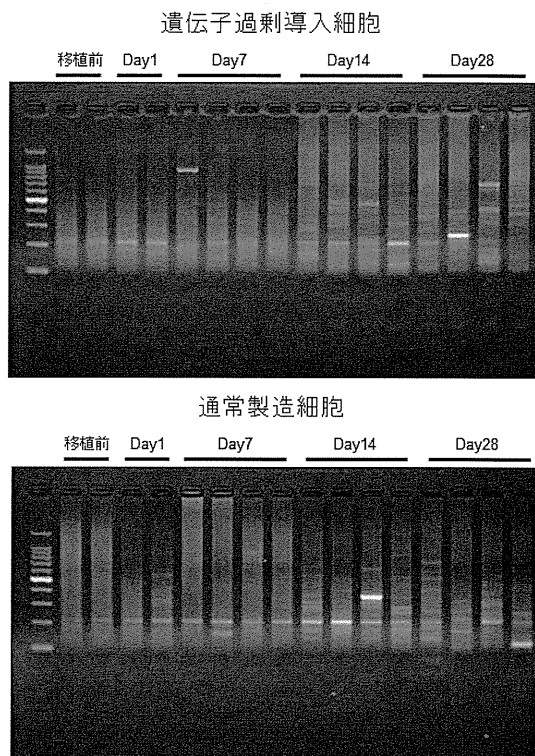


図 6. NOD/SCID マウスに移植された LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を用いたクローナリティ解析

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研究期間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、作業を進めており研究期間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、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。

研究初年度の予備的な検討によりイヌを用いた自家移植モデルの確立を研究2年目から実施した。H25年度はLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞と同じ調製法によりhLCAT遺伝子導入イヌ前脂肪細胞を調製し、移植日に試験施設（日本バイオリサーチセンター）で細胞の剥離・回収作業を実施し、2頭のイヌに移植した（合計3頭の試験とし、もう1頭は無処置）。その結果、自家移植で血中へのhLCAT分泌が確認されたものの、hLCAT遺伝子導入イヌ前脂肪細胞における導入コピー数が低く、また試験施設の設備では2頭以上の試験規模の自家移植用細胞は調製できないと考えられた。

以上の背景からH26年度に前述の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～ 1×10^9 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。イヌのフィブリンゲル製剤はないため、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ゲ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）。H25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 10^6 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
	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7）。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。

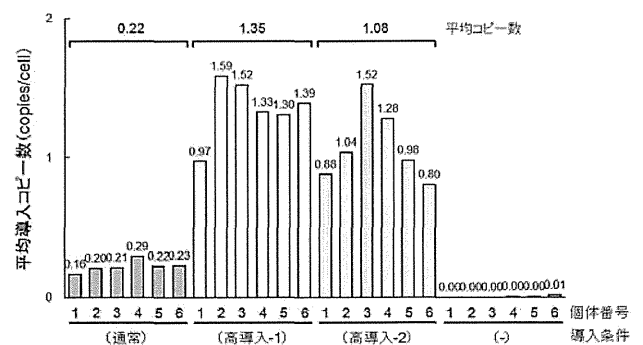


図7. イヌ前脂肪細胞における遺伝子導入条件の検討
ヒト前脂肪細胞と同じ条件（通常）、ヒト前脂肪細胞で通常条件よ

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。昨年度の実験から、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8)。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。

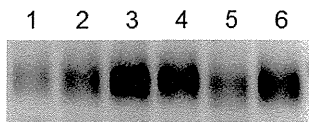


図8. hLCAT 遺伝子導入イヌ前脂肪細胞におけるhLCATの分泌

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9)。

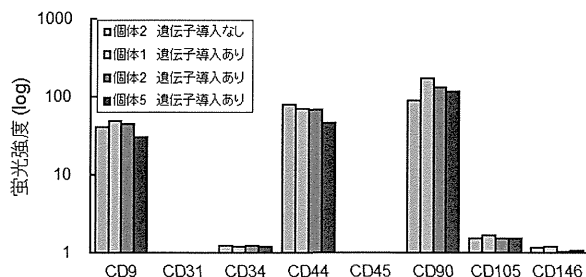


図9. イヌ前脂肪細胞、hLCAT 遺伝子導入イヌ前脂肪細胞の表面抗原プロファイル

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10)。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。

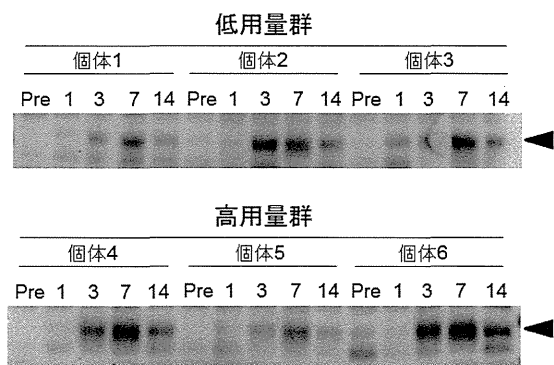


図10. hLCAT 遺伝子導入前脂肪細胞の自家移植イヌモデルにおける血清中hLCATの検出

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

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重ねてきた。GMP 基準書（製品標準書以下の基準書）はほぼ完成しており、今後は改善された工程管理試験を組み合わせて、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。

薬効・薬理試験用については、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ことが今後の課題である。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。

研究期間内で LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞と動物由来の hLCAT 遺伝子導入前脂肪細胞は、遺伝子導入特性が明らかに異なることが判明し、各動物由来前脂肪細胞での遺伝子導入条件の検討が必要であった。マウス、イヌの前脂肪細胞の特性が本研究で明らかとなり、薬事承認を目指した GLP 試験への移行が可能となった。

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, 228; 193-197.

- 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 *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34, 1756-1762.

2. 総説

- 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
- 2) 黒田正幸、武城英明. 家族性 LCAT 欠損症, 日本臨牀増刊、2013, 71; 275-279.
- 3) 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*、2014, 21; 60-65.
- 4) 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.
- 5) 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) 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、2012.11-12. 川越.

- 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. 2012.11-12. 川越.
- 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. 2013. 7. 東京.
- 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酵素添加による改善. 日本小児脂質研究会. 2013. 11. 福井.
- 5) 青柳靖之、黒田正幸、浅田咲世、麻生雅是、横手幸太郎. 遺伝子導入脂肪細胞のファブリー病治療への展開. 日本小児脂質研究会. 2013. 11. 福井.
- 6) 黒田正幸. 分泌型タンパク質の欠損による先天性遺伝病を対象とした脂肪細胞による *ex vivo* 遺伝子治療の実用化. 立命館大学薬学部セミナー. 2013. 11. 滋賀.
- 7) Kuroda M, Bujo H, Yokote K, Asada S, Aoyagi Y, Aso M, and Saito Y. Novel enzyme replacement therapy for LCAT deficiency syndromes through transplantation of *ex vivo* gene-transduced autologous adipocytes. 3rd Chiba-Uppsala Academia Joint Workshop. 2014. 2. 千葉.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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) .
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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

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

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

LCAT 欠損症は稀な遺伝性疾患であり、本邦でも少数の報告しか無い。根本的治療法開発のためには、症例の発掘と本邦での治療実態を知る必要がある。しかし、その治療実態や予後調査は十分とは言いがたかった。

初年度は、新規変異 LCAT (Gly179Arg) に起因する LCAT 欠損症を報告した。

次年度は「原発性高脂血症の調査研究」の一環として、班員・動脈硬化学会会員および全国基幹病院における原発性高脂血症の診療実態の把握を行った。その結果、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。未診断例が少なくないと推測された。

3年度は、我が国の原発性高脂血症の病態および治療実態調査の立ち上げを行った。日本動脈硬化学会と共同事業である JAS コホート研究の一環として、国立循環器病センターの Electric Data Capture システム (REDCap) を用いる。登録開始を平成 27 年 4 月と予定であり、実態把握の体制が整備できた。また、LCAT 欠損症の診断基準を見直すとともに、指定難病として登録申請中である。

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。最初に、われわれの経験した家族性 LCAT 欠損症疑い家系を対象に、その臨床像と LCAT 遺伝子異常を同定し、変異 LCAT の機能解析を行った。次に、本邦で確定診断された LCAT 欠損症の頻度調査を実施した。3年次には、JAS コホート研究と共同して予後調査の基盤整備を行うと同時に、難治性の本

疾患を指定難病として登録すべく活動した。

B. 研究方法

プロジェクト 1) 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

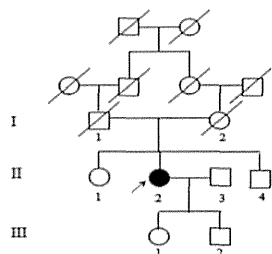


図1 LCAT 欠損症の家系

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。

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

ID	II-1	II-2	II-4	III-2
	(proband)			
Sex	F	F	M	M
Age	68	63	26	29
HbA1c	20.6	22.0	24.9	24.9
CBC				
RBC ($\times 10^6$)	380	378	507	
Hb (g/dl)	11.2	10.2	14.7	14.7
Hct (%)	33.7	30.0	43.9	46.4
WBC	4,500			
PLT ($\times 10^3$)	14.9			
Chemistry				
Creatinine (mg/dl)	0.52	0.64	0.73	0.8
Urine				
Protein	-	+	-	-
Lipids				
Total cholesterol (mg/dl)	155	76	225	188
Triglyceride (mg/dl)	80	89	118	195
HDL-cholesterol (mg/dl)	26	6	34	31

The data of II-1, II-4 and III-2 were adapted from the results of regular health check. IDs are indicated in Fig. 1.

プロジェクト 2) 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。

プロジェクト 3) 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。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並びに指定難病としての登録申請。

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。

C. 研究結果

プロジェクト 1) 発端者と家族の家系図(図 1) と臨床データ(表 1) 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 エキソンに 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。

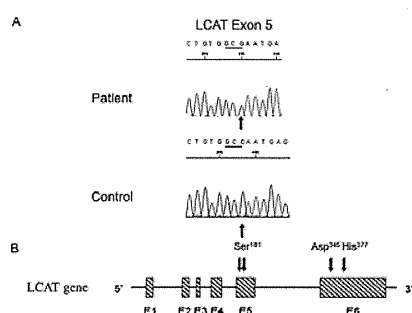


図2 発端者の LCAT 遺伝子変異(A)と遺伝子上の位置 (B)

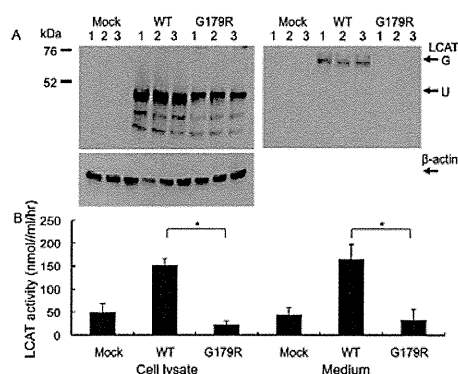


図3 HEK293細胞を用いた発現実験。
A. Western blot、B. LCAT 活性

プロジェクト2)

アンケート内容とその集計結果を抜粋し

て示す。

アンケート

「原発性高脂血症」の名称・定義・分類に関してお尋ねします。

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の中での原発性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でも結構です。)

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