

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」か「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。）

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」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）

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ける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。

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？

Q8 FHの定義について

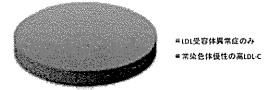


表3 成人FHヘテロ接合体診断基準

項目	成人 (15歳以上) FHヘテロ接合体診断基準
1. 脂質	LDL-C 値 (非HDL-C値) $\geq 190$ mg/dL
2. 家族性	1親、2親、3親のいずれか1人以上がFHと診断されているか、あるいは臨床的に疑われる
3. FH発症年齢	45歳未満に発症しているか
4. 診断的検査	① LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ② LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ③ LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ④ LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ⑤ LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ⑥ LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ⑦ LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ⑧ LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ⑨ LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ⑩ LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる
項目	小児FHヘテロ接合体診断基準
1. 脂質	LDL-C 値 (非HDL-C値) $\geq 140$ mg/dL LDL-C値 $\geq 220$ mg/dL (LDL-C値を決定する)
2. 家族性	1親、2親、3親のいずれか1人以上がFHと診断されているか
3. FH発症年齢	10歳未満に発症しているか
4. 診断的検査	① LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ② LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ③ LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ④ LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ⑤ LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ⑥ LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ⑦ LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ⑧ LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ⑨ LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる ⑩ LDL受容体遺伝子変異の有無を調べる

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症例の中に田因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

表6 家族性III型高脂血症の診断基準

項目	家族性III型高脂血症の診断基準
大項目	① 脂質 ② 家族性 ③ 脂質 ④ 脂質 ⑤ 脂質 ⑥ 脂質 ⑦ 脂質 ⑧ 脂質 ⑨ 脂質 ⑩ 脂質
小項目	① 脂質 ② 脂質 ③ 脂質 ④ 脂質 ⑤ 脂質 ⑥ 脂質 ⑦ 脂質 ⑧ 脂質 ⑨ 脂質 ⑩ 脂質
診断	大項目のいずれか1項目以上を満たすか、小項目のいずれか2項目以上を満たすか

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(アポB脂質)もしくは遺伝子検査でアポB脂質E2/E2、E2/E2欠損などを証明する

表5 家族性複合型高脂血症(FCHL)の診断基準

項目	家族性複合型高脂血症 (FCHL) の診断基準
大項目	① 脂質 ② 脂質 ③ 脂質 ④ 脂質 ⑤ 脂質 ⑥ 脂質 ⑦ 脂質 ⑧ 脂質 ⑨ 脂質 ⑩ 脂質
小項目	① 脂質 ② 脂質 ③ 脂質 ④ 脂質 ⑤ 脂質 ⑥ 脂質 ⑦ 脂質 ⑧ 脂質 ⑨ 脂質 ⑩ 脂質
診断	大項目のいずれか1項目以上を満たすか、小項目のいずれか2項目以上を満たすか

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>

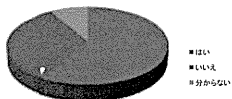
問題点として、IIb, IIa, IVのどの表現型もとりうるので、診断が困難である。Small dense LDLの測定が一般臨床医では簡単にはできない。DMIに伴うものの鑑別も現実には困難である。もう少し確定診断につながる診断法も必要ではないか。

- 項目②(アポB/DL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。

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？

Q1 名称について



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？

Q2 定義について



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1 原発性高脂血症の分類

原発性高脂血症の分類	特徴
LDLコレステロール血症	LDL受容体遺伝子変異
VLDLコレステロール血症	LDL受容体遺伝子変異
LDLコレステロール血症	LDL受容体遺伝子変異
VLDLコレステロール血症	LDL受容体遺伝子変異
LDLコレステロール血症	LDL受容体遺伝子変異
VLDLコレステロール血症	LDL受容体遺伝子変異

表2 primary hyperlipoproteinemiaの分類

Primary hyperlipoproteinemia	Genetics	Prevalence	Triglycerides	LDL cholesterol
LDL receptor defect (FH)	Autosomal recessive	1:250	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 2 defect (LRP2)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 1 defect (LRP1)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 3 defect (LRP3)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 4 defect (LRP4)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 5 defect (LRP5)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 6 defect (LRP6)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 7 defect (LRP7)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 8 defect (LRP8)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 9 defect (LRP9)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 10 defect (LRP10)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 11 defect (LRP11)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 12 defect (LRP12)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 13 defect (LRP13)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 14 defect (LRP14)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 15 defect (LRP15)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 16 defect (LRP16)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 17 defect (LRP17)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 18 defect (LRP18)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 19 defect (LRP19)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 20 defect (LRP20)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 21 defect (LRP21)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 22 defect (LRP22)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 23 defect (LRP23)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 24 defect (LRP24)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 25 defect (LRP25)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 26 defect (LRP26)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 27 defect (LRP27)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 28 defect (LRP28)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 29 defect (LRP29)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high
LDL receptor-related protein 30 defect (LRP30)	Autosomal recessive	1:100,000	Normal	Very high

Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th Edition

	原因遺伝子	所属部門として 登録総数	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	ホモ接合体 90 28
			ヘテロ接合体 212 58
家族性肝性リパーゼ欠損症	HL	HL	
家族性肉状リパーゼ欠損症	EL		
原形未特定			105 65
家族性βリポタンパク低下症	家族性βリポ蛋白血症	APOB	26 2
		PCSK9	21
		MTP	2
	Anderson病(カリロミロン貯留病)	SART	
	アポリポ蛋白B-10欠損症	APOBEC1	
			50 5
家族性低HDL血症	Tanner病	ABCA1	6
	LCAT欠損症	LCAT	白異約 8 2
			白異約 1
	アポリポ蛋白A-欠損症	APOA1	
	アポリポ蛋白A-異常症	APOA1	
	原形未特定		42 19
その他	シタズチロール血症	ABCS5またはABCS8	6 5
	脂質黄色腫(CX)	CYP27A1	7 4
	中鎖脂肪酸蓄積症	ATGLまたはACGL-5B	3 3

	原因遺伝子	所属部門として 登録総数	所属部門として 患者数
原発性高カイロミクロン血症	家族性リポ蛋白リパーゼ欠損症	LPL	22 14
	アポリポ蛋白E欠損症	APOE2	3 1
	アポリポ蛋白A-II欠損症	APOA5	40 40
	原形未特定	CPHBP1	
	家族性肝性リパーゼ欠損症	HL	
	原形未特定		112 24 20
原発性高コレステロール血症	家族性高コレステロール血症	LDLR	ホモ接合体 28 15
			複合ヘテロ接合体 18 17
			2704 145
	家族性アポリポ蛋白A-II欠損症	APOA2	67 57
	家族性高コレステロール血症	PCSK9	
	家族性低密度脂蛋白コレステロール血症	LDLRAP	
	シタズチロール血症	ABCS5またはABCS8	9 8
	原形未特定		333 271
	原形未特定		50 40
	原形未特定		5 5
肉質性高アグリセリド血症	家族性立位高脂血症		24 17
	特発性高アグリセリド血症		207 105
	家族性Ⅲ型高脂血症	APDE	E2/E2 57 24
	原形未特定		8 8
			E2/E2型 10

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。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。

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。

## A. 考察

プロジェクト 1)

1967 年以降 60 種類以上の LCAT 遺伝子異常が報告されている。臨床症状から古典的 LCAT 欠損症と魚眼病の 2 種類に分類される。古典的 LCAT 欠損症は低 HDL コレステロール血症、角膜混濁、溶血性貧血、腎障害を認める一方、魚眼病では前 2 者は認めるが、貧血と腎障害は認められない。本症例は古典的 LCAT 欠損症と診断された。

G179R 変異はセリン 181、アスパラギン

345 とヒスチジン 377 によって形成される LCAT の酵素活性中心の近傍に位置し、G179 は GX SXG、 $\alpha/\beta$  hydrolase family のモチーフ、 $\beta$  シート 5 の構成要素である。従って、本変異は酵素蛋白の適正な折りたたみに支障を来すのみでなく、活性にも影響が予想された。事実、セリン 181 とグリシン 183 の変異を有する LCAT 欠損症が報告されている。

HDL コレステロールが軽度低値の家族が認められた。LCAT 活性測定や遺伝子異常の検索を行っていないが、G179R 変異をヘテロに保有する可能性が高い。

本症例の腎障害は比較的軽度であった。同一家系内の同一変異であっても、腎障害の程度は様々であることが知られている。本症例は菜食主義者に近い食生活のため、腎障害が進行しなかった可能性がある。

Lp(a) が感度以下であった。一般に、Lp(a) の血中濃度はアポ(a) の遺伝型によって規定されているため、そのような遺伝型であった可能性がある。また、Lp(a) の形成には LCAT の作用を必要とするという報告もある為、LCAT 欠損が Lp(a) の直接的原因となっている可能性もある。

近年、LCAT 欠損症の脂質はアポ E の遺伝型によっても規定されると報告された。本症例は  $\epsilon 3/\epsilon 3$  であり、血清 TG 値が比較的  
低値であった理由であろう。

プロジェクト 2)

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。

### プロジェクト3)

昭和 58 年に発足した「原発性高脂血症の調査研究」研究班は、原発性高脂血症に関する重要な発見や診療向上へ資する実績を積み上げてきたが、合併症や予後に関する系統的調査体系を持たなかった。また、難病としての指定を受けたのは FH ホモ接合体だけであり、その蔭に適正に診療されず苦しんでいる患者が少なくなかった。そのような患者の生き難い生を、少しでも生き易くするような診療体系の整備を期待したい。

### E. 結論

新規の LCAT 変異 G179R に起因する古典的 LCAT 欠損症を経験した。LCAT 欠損症の実態調査を行った。調査対照施設を極力広汎に設定したが、既診断例は 8 例で、その中で現在も診療を受けている症例は 2 例しかおらず、未診断例が少なからず存在する可能性が示唆された。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

#### 1. 論文発表

1) Wang XL, Osuga J, Tazoe F, Okada K, Nagashima S, Takahashi M, Ohshiro T, Bayasgalan T, Yagyu H, Okada K, Ishibashi S. Molecular analysis of a novel LCAT mutation (Gly179→Arg) found in a patient with complete LCAT deficiency. *J Atheroscler Thromb* 2011;18:713-719.

2) Nagashima S, Yagyu H, Ohashi K, Tazoe F, Takahashi M, Ohshiro T, Bayasgalan T, Okada K, Sekiya M, Osuga J, Ishibashi S.

Liver-specific deletion of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase causes hepatic steatosis and death.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(8):1824-31.

3) Takase S, Osuga J, Fujita H, Hara K, Sekiya M, Igarashi M, Takanashi M, Takeuchi Y, Izumida Y, Ohta K, Kumagai M, Nishi M, Kubota M, Masuda Y, Taira Y, Okazaki S, Iizuka Y, Yahagi N, Ohashi K, Yoshida H, Yanai H, Tada N, Gotoda T, Ishibashi S, Kadowaki T, Okazaki H.

Apolipoprotein C-II deficiency with no rare variant in the APOC2 gene. J Atheroscler Thromb. 2013;20(5):481-93.

4) Sakai K, Igarashi M, Yamamuro D, Ohshiro T, Nagashima S, Takahashi M, Enkhtuvshin B, Sekiya M, Okazaki H, Osuga J, Ishibashi S. Critical role of neutral cholesteryl ester hydrolase 1 in cholesteryl ester hydrolysis in murine macrophages. J Lipid Res. 2014;55(10):2033-40.

5) Sekiya M, Yamamuro D, Ohshiro T, Honda A, Takahashi M, Kumagai M, Sakai K, Nagashima S, Tomoda H, Igarashi M, Okazaki H, Yagyu H, Osuga J, Ishibashi S. Absence of Nceh1 augments 25-hydroxycholesterol-induced ER stress and apoptosis in macrophages. J Lipid Res. 2014;55(10):2082-92.

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

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

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

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、小坂健太郎

#### 研究要旨

吸引による脂肪採取と脂肪注入は形成外科領域で広く普及した一般的な手技である。細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」を用いた治療法ではこれらの基本手技が用いられる。しかし、細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」を用いた治療では一般的な脂肪移植法とは大きく異なる点があり、通常の方法の延長線上に捉えることは必ずしも適切ではない。われわれは、細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」に最適化された脂肪採取・移植を衛生面、採取部位、細胞特性、足場などの点から研究した。結果、外科的衛生手順を徹底することで無菌的採取が可能であること、皮下組織の浅層からの採取が望ましいこと、フィブリン糊は足場として細胞を良く保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

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」による治療プロトコールには、ヒト皮下脂肪の採取と脂肪移植が含まれている。吸引による脂肪採取は組織減量や移植用脂肪採取を目的に普及している手技である。また、脂肪移植は、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。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り、同一線上に捉えることは必ずしも適切ではない。すなわち、

- ・衛生面では細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」では通常の脂肪採取・移植に比べて極めて高い水準が要求される。

- ・細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」に適した採取法や部位が必ずしも明らかではない。

- ・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。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。

本研究の目的は、細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」の最適な脂肪採取法および移植法を明らかにすることである。

## B. 研究方法

### ① 無菌的脂肪採取について

細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」に用いられる脂肪細胞について衛生水準を満たすため以下の方法で、開腹・開頭・開胸手術と同等の外科的衛生を行い可能な限り最大限の清潔を保って脂肪吸引を行い結果を検証した。

- 術前外来診察の時点で腹部・臍部の診察を行い、オイルと綿棒を用いた臍部清掃を1日1回手術前日まで行うよう指導した。
- 脂肪採取を外来処置室でなく大学病院中央手術室で行った
- 術者は手術用ウェア、帽子、マスクを着用したうえで7.5%ポピドンヨード液で2回外科手洗いをを行い滅菌ガウンを着用した。滅菌手袋を二重に着用した。
- 患者側の処置として脂肪吸引管の挿入予定部位である臍傍部を中心に10%ポピドンヨード液で2回消毒後5分間待機した。滅菌ドレープで腹部以外の体表面を完全に覆った。採取予定部位である腹部をイソジンドレープを貼付した。
- 局所浸潤麻酔注射の後、脂肪吸引管を皮下に挿入し手動で陰圧をかけて採取した。採取した脂肪はシリンジから出さずシリンジに栓をした。
- シリンジごと清潔手術野からおろし、シ

リンジ内の脂肪組織を外注微生物検査で調査した。

### ② 採取部位の検討

皮下脂肪組織は浅筋膜または肉様膜と呼ばれる構造によって、それらより浅い層に存在する皮下脂肪組織（浅層脂肪組織）と、それらより深い層に存在する皮下脂肪組織（深層脂肪組織）の2層に分けられる。ヒトでは皮下組織2層構造は体の部位により明瞭な部位と不明瞭な部位が存在するが、体幹では明瞭であり、特に細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」で用いられる腹部では肉眼的にもはっきりと区別できる解剖学的構造差がある。

われわれは腹部皮弁を用いた手術時に通常廃棄される脂肪組織の浅層と深層各々から別個に天井培養法を行い回収効率の比較を行った。また、浅層と深層それぞれから回収された天井培養脂肪細胞の脂肪分化能を比較した。

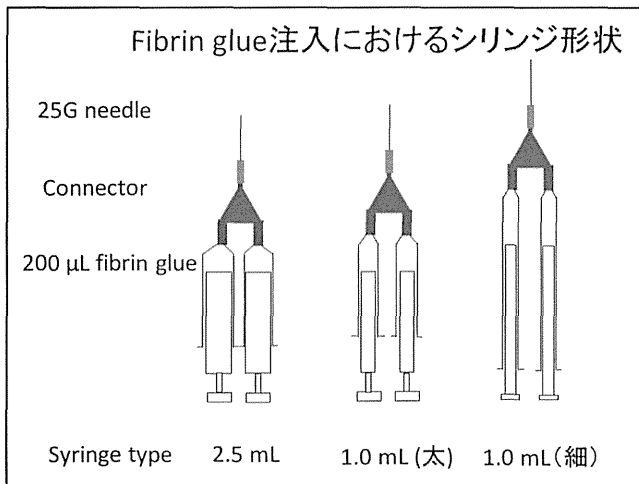
#### （倫理面への配慮）

千葉大学倫理委員会の承認の下、患者に対し、術前に文書を併用した説明を十分に行い、書面での同意が得られた患者のみを対象とした。

### ③ 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

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。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。



100  $\mu$ L を分割注入し、最少注入量を測定した。

#### ④ 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。

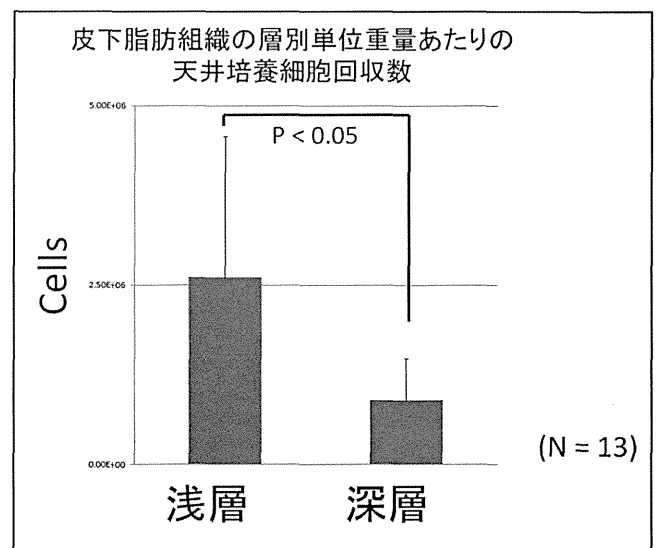
### C. 研究結果

#### ①無菌的採取法

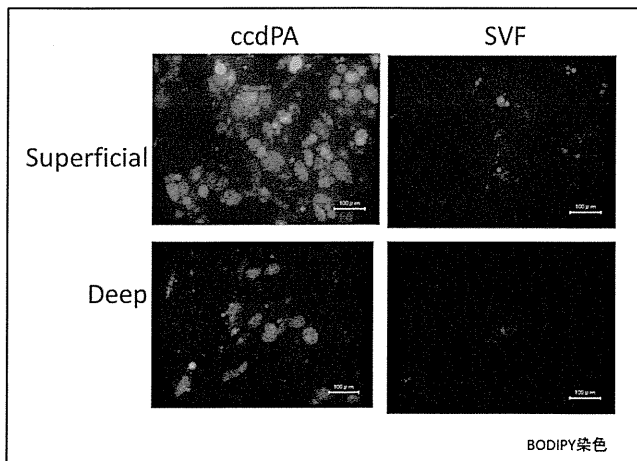
微生物は検出されなかった

#### ②採取部位

採取脂肪組織 1 g あたりの 天井培養由来増殖性脂肪細胞の回収数は浅層皮下脂肪由来のものが深層皮下脂肪由来のものに比べて有意に高値だった。

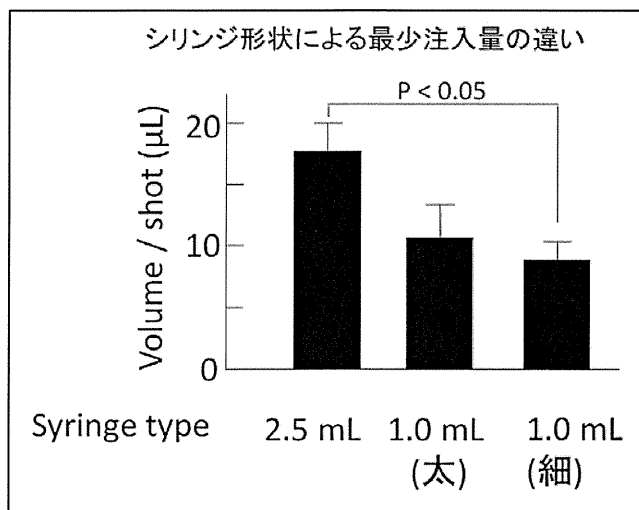


浅層皮下脂肪由来の天井培養由来増殖性脂肪細胞は深層皮下脂肪由来のそれと比較し、高い脂肪分化能を示した。また、天井培養由来増殖性脂肪細胞と Stromal vascular fraction (SVF) の脂肪分化能の比較では浅層、深層ともに天井培養由来増殖性脂肪細胞が SVF と比べて高い脂肪分化能を示した。



### ③シリンジ形状による最少注入量の違い

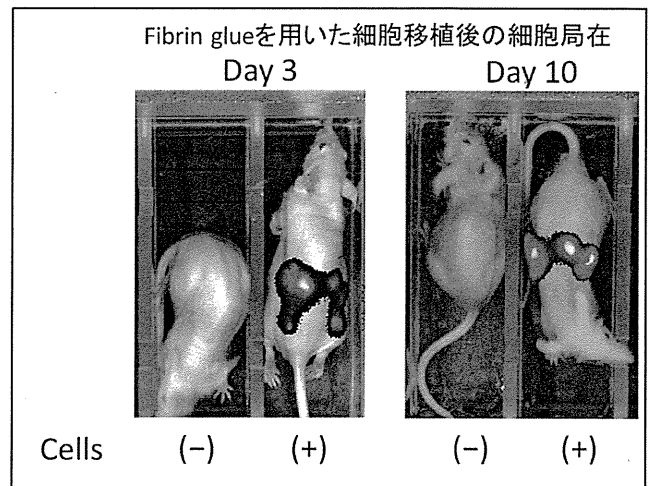
シリンジ形状において径が細いほど最少注入量が少なくなる傾向があり、2.5 mL シリンジと 1.0 mL シリンジとの間では有意な差がみられた ( $17.0 \pm 2.9$  vs  $8.7 \pm 1.5$   $\mu\text{L}$  / shot,  $P < 0.05$ )。



### ④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つた。

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

外科的衛生手順を遵守し最大限の清潔操作を行うことで臍傍部から無菌的に吸引脂肪組織を採取できた。細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」では細胞は単離されて数週間培養されるため培養液中の抗生物質を除けば有害微生物に対抗する力は細胞自身にはほとんどない。よって、採取時点から微生物を混入させないことが衛生管理上最大の目標となる。今回、無菌的採取が可能であることを確認できたことで細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」の衛生面での大きな課題の一つがクリアできたことになる。

浅層脂肪組織からは深層脂肪組織と比べて有意に多くの天井培養由来増殖性脂肪細胞が回収できた。脂肪吸引時に浅層からの吸引を心がけることで細胞加工医薬品「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞」用の細胞の回収効率を向上できる可能性が示された。また、浅層脂肪組織から回収された天井培養由来増殖性脂肪細胞は深層脂肪組織から回収された

それと比べて脂肪分化能が高いことが明らかになった。遺伝治療の安全性の点から脂肪分化能が高い方が良いと考えられており、この点からも浅層脂肪組織からの脂肪採取の方が深層脂肪組織からの回収と比べて望ましいと考えられた。

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。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。

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。

## E. 結論

外科的衛生操作を徹底することで無菌的な脂肪採取が可能である。皮下脂肪組織内の浅層から採取が望ましいと考えられる。フィブリン糊を用いた微量注入が可能であり、また、フィブリン糊は足場として細胞を良く保持する。

## 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: 330-9.
- 2) 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 ;67(2):205-11.
- 3) 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.* 2014 ;164A(3):741-7.

### 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
- 2) 窪田吉孝、三川信之、小坂健太郎、安達直樹、笹原資太郎、小泉智恵、長谷川正和、黒田正幸、武城英明、佐藤兼重。皮下脂肪組織由来細胞の部位特異的機能差とエピジェネティクス解析 第23回日本形成外科学会基礎学術集会、2014

年10月9、10日、松本

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

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

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）

協力者 永井栄一（千葉大学医学部附属病院臨床試験部）

片山加奈子（千葉大学医学部附属病院臨床試験部）

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。

指針に基づいて実施される。

B. 研究方法

本研究においては、以下につき研究に取り組んだ。

- (1) プロジェクト管理（H24～26）
- (2) 安全性評価（H24）
- (3) モニタリング（H24）
- (4) GMP 準拠環境整備（H25～26）
- (5) データ管理体制（H24～26）

（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

C. 研究結果

(1) プロジェクト管理

平成 24 年度から継続的に、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、移植担当の整形外科医師及び千葉大学発ベンチャー（セルジェンテック）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) 安全性評価

先行研究では安全性が未確立のため、安全性情報の収集、報告・評価の対応が試験の要といえる。医師主導治験においては安全性情報の収集に関する手順書があり、先行研究もその手順書に準じて実施することとした。

## (3) モニタリング

遺伝子治療臨床研究に関する倫理指針ではモニタリングに関する特に記載はないが、正しいデータ取得等の品質管理のためにはモニタリングが重要である。医師主導治験においてはモニタリングに関する手順書があり、先行研究も中央モニタリングだけでなく、当該手順書に準じ出張モニタリング等も検討することとした。

## (4) GMP 準拠環境整備

GMP 準拠の整備がまず必要であるため、平成 24 年度に新たに CPC 建設を計画した。また設計において、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するとともにまた、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。

平成 25 年度には新たに 1 ユニット CPC を創設したが、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平成 26 年

度より採用した。組織体制の見直し、責任者群の見直し SOP の整備および作成を行い、その結果 CPC 施設としてバリデーションもでき、施設として可動が可能となった。

## (5) データ管理体制

平成 24 年度は、CRF について、電子的又は書面による取得方法がある。医師主導治験においては、①データマネジメント業務に関する手順書、②データマネジメント業務に関する手順書、③アカウント管理および eDC トレーニングに関する手順書、④DM 計画書及び DM 報告書の作成に関する手順書（以上 EDC）、⑤データマネジメント業務に関する手順書、⑥データマネジメント業務に関する手順、⑦症例報告書の見本等の作成に関する手順、⑧DM 計画書及び DM 報告書の作成に関する手順（以上紙ベース）、及び⑨被験者の登録に関する手順書があり、先行研究はこれら SOP に準じ実施を検討することとした。

平成 25 年度は、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。

#### F. 研究発表

なし

#### 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ます。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。



## Ⅱ. 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
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.	44	330-9	2012
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	228	193-7	2013
Kuroda M, Hollebom 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.	34	1756-62	2014

Nagashima S, Yagyu H, Ohashi K, Tazoe F, Takahashi M, Ohshiro T, Bayasgalant T, Okada K, Sekiya M, Osuga J, Ishibashi S.	Liver-specific deletion of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase causes hepatic steatosis and death.	Arterioscler Thromb Vasc Biol.	32(8)	1824-31	2012
Sakai K, Igarashi M, Yamamuro D, Ohshiro T, Nagashima S, Takahashi M, Enkhtuvshin B, Sekiya M, Okazaki H, Osuga J, Ishibashi S.	Critical role of neutral cholesteryl ester hydrolase 1 in cholesteryl ester hydrolysis in murine macrophages.	J Lipid Res.	55(10)	2033-40	2014
Sekiya M, Yamamuro D, Ohshiro T, Honda A, Takahashi M, Kumagai M, Sakai K, Nagashima S, Tomoda H, Igarashi M, Okazaki H, Yagyu H, Osuga J, Ishibashi S.	Absence of Nceh1 augments 25-hydroxycholesterol-induced ER stress and apoptosis in macrophages.	J Lipid Res.	55(10)	2082-92	2014
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.	164A(3)	741-7	2014

### Ⅲ. 研究成果の刊行物・別冊