

# ヒト前脂肪細胞を用いた 新しい遺伝子治療法の開発

浅田 咲世

# 目次

	頁
第 1 章 序論	1
第 2 章 遺伝子治療用細胞としての前脂肪細胞	
第 1 節 序論	13
第 2 節 材料と方法	15
第 3 節 結果	20
第 4 節 考察	31
第 5 節 小括	35
引用文献	36
第 3 章 <i>LCAT</i> 遺伝子導入前脂肪細胞の樹立と解析	
第 1 節 序論	40
第 2 節 材料と方法	45
第 3 節 結果	52
第 4 節 考察	67
第 5 節 小括	70
引用文献	71

第 4 章	<i>LCAT</i> 遺伝子導入前脂肪細胞の安全性と <i>in vivo</i> 細胞移植検討	
第 1 節	序論	74
第 2 節	材料と方法	76
第 3 節	結果	83
第 4 節	考察	93
第 5 節	小括	97
	引用文献	98
第 5 章	総括	100
謝辞		104

## 第 1 章 序論

### 第 1 節 遺伝子治療の現状と酵素補充療法

1990 年に世界初の遺伝子治療臨床研究が実施されてから 20 数年経過した。先進国においては最近になって欧州で LPL 欠損症に対する遺伝子治療が承認されたが、8 割はフェーズ I/II であり、遺伝子治療は未だ発展途上の治療法といえる。現在、遺伝子治療の対象疾患は他に治療手立てがない難病、もしくは既存治療が奏功しない重症な病態・疾病に限られている。初めて行われた遺伝子治療臨床研究はアデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損による重症免疫不全症(SCID)に対してであった。ADA-SCID では ADA 欠損により白血球が正常に生成されず、結果として重篤な免疫不全症に至る疾患である。骨髄移植が受けられない場合には、酵素補充療法を行う選択肢もあるが効果は限られている。このような患者の造血幹細胞に正常 ADA を導入して遺伝子治療を行った結果、分化した各種白血球細胞が観察され、全例ではないが酵素補充療法を必要としないまで回復し 10 年以上経過しても治療効果を維持している(Montiel-Equihua et al., 2012)。ADA-SCID に対する遺伝子治療は、最も成功した遺伝子治療の代表的な例といえる。

成功例がある一方で、重篤な副作用を伴ったケースが数例報告されている。同じ SCID でも、サイトカイン受容体共通 $\gamma$ 鎖(IL-2R $\gamma$ )の欠損が原因となる X1-SCID に対して、ADA-SCID と同様のプロトコルで *ex vivo* 遺伝子治療が実施された。効果は認められたが、数年後 5 人が遺伝子導入が原因と考えられる白血病を発症し、4 人は化学療法により治癒したが 1 名は救命できなかった。(Hacein-Bey-Abina et al., 2010)。また、1999 年にオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に対して行われた遺伝子治療では投与したベクターに対する炎症反応によって患者が死亡する事故が起きた(Raper et al., 2003)。このような事故は起きてはならないことだが、その原因を探ることでベクターや移植技術が進歩し、導入効率と安全性に配慮した新しい技術が開発、実用化されてきている(Thornhill et al., 2008, Seow et al., 2009, Wahlberg et al., 2012)。新しい技術はこれまで実施されてきた遺伝子治療法をさらに効果的にするだけでなく、適応疾患の範囲を広げることにつながる。

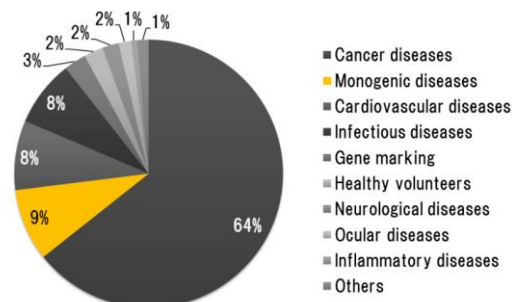
遺伝子治療の手法は *in vivo* 法、*ex vivo* 法の 2 つに分けられ、それぞれに長所と短所がありどちらがより優れているとは言えない。*In vivo* 法はベクターを直接体内へ投与する方法で、投与が比較的簡単で患者への負担が少ないが、意図しない細胞へ遺伝子導入が起こる可能性、ベクターの種類によっては激しい免疫反応を起こす危険性もある。また、導入効率が予測出来ないなどの有効性確保についての課題もある。もう一方の *ex vivo* 法は患者本人の細胞（あるいは他人の細胞）に体外で遺伝子を導入してその細胞を移植する方法で、遺伝子導入や移植細胞数においてコントロールが可能である。従ってベクターが目的以外の細胞に導入される危険は少なく、自家移植の場合には拒絶反応の心配もほとんどない。短所としては細胞培養や遺伝子導入の手間がかかること及びそのための細胞調製施設が必要になることがあげられ、さらに、適切な遺伝子導入細胞の選択、導入法を含むベクターの適切な選択、導入効率、導入遺伝子の安定性に課題がある。

これまでに実施された臨床研究のうち、遺伝性疾患は希少疾患であるがゆえに全体の 1 割を占めるだけだが、様々な先天性遺伝疾患(monogenic disease)に対して *ex vivo* または *in vivo* 遺伝子治療研究が実施されている(図表 1-1)。遺伝性疾患は多種多様で、分泌型酵素(タンパク質)の欠損を原因とする疾患も多い。酵素(タンパク質)補充療法は欠損酵素を外部から補う治療法で、血友病、ファブリー病やムコ多糖症をはじめとするライソゾーム病の一部に対して行われている(Desnick et al., 2012)。しかし、このような疾患に対する酵素補充療法は患者の生涯に亘って必要であり、半減期が短い場合には頻回投与を余儀なくされ、また、タンパク質の精製は困難である場合も多く一般にリコンビナントタンパク質製剤による継続的な治療は高価で経済的負担が大きい。これらの課題を克服するため遺伝子治療研究が行われているが(Petrus et al., 2010)、酵素補充療法を含む治療法が未だ確立されていない疾患も存在する。このような疾患に、レシチン:コレステロールアスルトランスフェラーゼ(LCAT)欠損症があげられる。LCAT 欠損症は脂質代謝異常が原因で各種臓器に脂質が蓄積し機能不全を引き起こすが、一定量の酵素補充ができれば腎不全を防ぐことができる疾患である。

前述のベクターや投与法の開発に加え、対象疾患に対してどのような標的細胞を選択するかは治療効果を左右する重要な要素であり、従来用いられてきた造血幹細胞、繊維芽細胞、肝細胞、筋細胞等に代わる新たな標的細胞を探索することは、遺伝

子治療法の選択の幅をさらに広げると考えられる。脂肪細胞は近年研究が進み、脂肪組織及びそこから豊富に採取できる間葉系細胞は様々な用途で臨床応用されてきている。我々の研究グループはマウス脂肪組織由来細胞にインスリン遺伝子を導入して糖尿病モデルマウスへ移植し、移植した細胞から分泌されたインスリンによって持続的な血糖降下作用が得られることを示した(Ito et al., 2005)。この結果から脂肪組織由来細胞が酵素補充を目的とした遺伝子治療法の標的細胞として充分機能しうることが示唆された。脂肪細胞は脂質を蓄えるだけでなくアディポカインを分泌することによって全身の脂質代謝に関わっており、また脂肪細胞そのものの寿命が長いことが知られている。この特徴は、遺伝子治療における標的細胞として有利な点となり得ると考えられる。

## a. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患



## b. 遺伝子治療臨床研究の対象となった遺伝性疾患

副腎白質ジストロフィー
$\alpha$ 1アンチトリプシン欠損症
カナバン病
慢性肉芽腫症
嚢胞性線維症
デュシェンヌ/ベッカー型筋ジストロフィー
遠位型ミオパチー(遺伝性封入体ミオパチー)
肢帯型筋ジストロフィー
網膜変性症(レチナール変性症)
レーバー先天黒内障
CNGB3色覚障害
家族性大腸腺腫症(家族性大腸ポリポース)
家族性高脂血症(LDLR欠損症)
重症貧血( $\beta$ サラセミア、鎌形赤血球貧血、ファンコニー貧血)
ライソゾーム病(ファブリー病、ゴーシェ病、ポンペ病、ハンター病、 ハーラー病、VII型ムコ多糖症)
脳回転状萎縮症
血友病A、B
ハンチントン病
接合部型表皮水泡症
神経セロイドリポフスチン症
白血球接着不全症
異染性白質ジストロフィー
リボプロテインリパーゼ欠損症
オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症
プリンヌクレオシドホスホリラーゼ欠損症
劣性栄養障害性表皮水泡症
重症免疫不全症(X1-SCID、ADA-SCID)
ウィスコット・アルドリッチ症候群
JAK3欠損による重症免疫不全症

**図表1-1 遺伝子治療臨床研究**

(a)遺伝子治療臨床研究の対象疾患の割合を示した。2012年までに1800例以上の臨床試験が承認されており、最近10年では平均して世界で年間100例前後の臨床研究が承認されている。(b)遺伝子治療臨床研究の対象となった先天性疾患(monogenic diseases)のリストを示した。(Gene Therapy Clinical Trials Worldwideより引用 [www.abedia.com/wiley](http://www.abedia.com/wiley))

## 第2節 レシチン:コレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)欠損症

LCAT 欠損症は常染色体劣性遺伝性の脂質代謝異常症で、100 万人に 1 人といわれる希少疾患である。特に北欧で多くの患者が発見されており、日本においてもこれまでに 20 家系ほどの報告がある。通常、血中コレステロールのほとんどはエステル化された状態で存在し、タンパク質、酵素や他の脂質と複合体を形成している。この脂質複合体(リポ蛋白)は血流に乗って末梢細胞へ取り込まれ、細胞内で一度遊離コレステロールになってから細胞膜の一部あるいはホルモンの原料となる。LCAT は血中において遊離コレステロールをエステル化する役割を担う酵素である。リポタンパク HDL が末梢細胞から引抜いた遊離コレステロールは LCAT によってエステル化され、他のリポ蛋白を介して間接的に、あるいは直接肝臓へ戻ることによってコレステロールの循環が起きている(図表 1-2)。したがってこの LCAT の機能が損なわれるとコレステロール代謝が滞り、臓器に脂質が沈着し、結果として、リポ蛋白異常、貧血、腎機能障害といった症状が現れる (Glomset et al., 1995, 図表 1-3-a)。

LCAT の遺伝子変異は 6 エクソン全てにわたって 100 種類以上知られており(図表 1-3-b)、その報告は現在も増え続けているが (Holleboom et al., 2011)、LCAT 欠損症を病態の面から見ると 2 種類に分けられる。LCAT は主に HDL コレステロールで機能し ( $\alpha$ 活性)、残り3割ほどが LDL コレステロールで機能しているといわれている ( $\beta$ 活性)。HDL に対する活性である  $\alpha$ 活性を欠損した場合を魚眼病(Fish Eye Disease, FED)、 $\alpha$ と  $\beta$ 活性両方を欠損した場合は家族性 LCAT 欠損症(Familial LCAT Deficiency, FLD)と呼ばれている。腎機能障害は FLD に現れる症状であり、LCAT 変異の種類、食生活など外的要因で進行度には違いがあるが、通常は 20 歳前後から、早い症例では 3 歳から蛋白尿を認め、いずれ腎不全に至ることが予測される (Miarka et al., 2011)。現在、LCAT 欠損症に対する根本的治療法がないため、血中脂質濃度をコントロールし、臓器への脂質の沈着や腎機能障害の進行を遅らせるための食事療法や薬物療法など対症療法が行われている。

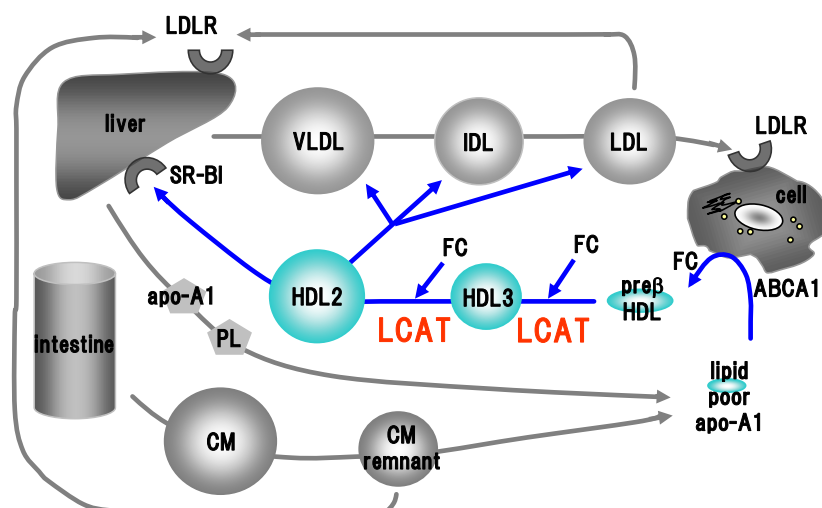
LCAT 欠損症は、臨床データから健常人の 1 割の LCAT 活性があれば、もっとも重篤な症状である腎障害を発症しないことが分かっている。過去に、輸血による LCAT 補充を試みた例があるが、効果は一時的であった (Norum et al., 1968)。しかし一時的であっても効果があったことは LCAT 欠損症に対して酵素補充療法が有効であることを



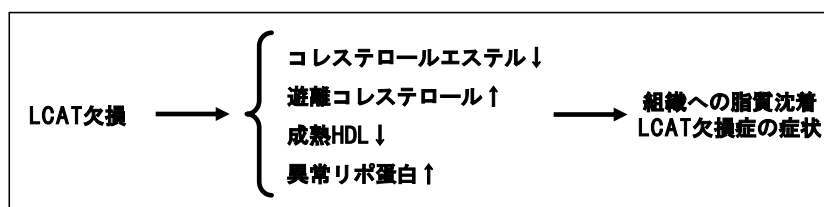
示している。Rousset らは、LCAT ノックアウト/ヒト apo-A1-TG マウスにリコンビナント LCAT (rLCAT) 製剤を投与し、マウスの脂質プロファイルの改善や HDL 増加などの効果が認められたと報告している (Rousset et al., 2010)。これらの成果をもとに、最近になってアメリカで冠動脈疾患を対象とした rLCAT 製剤の臨床試験が承認された。対象疾患は LCAT 欠損症ではないが、今後 LCAT 欠損症の治療法のひとつとなる可能性がある。しかしながら前述のマウス実験において、rLCAT の半減期が 8 時間と報告されており、先天性疾患である LCAT 欠損症を対象とした場合には長期的な患者への繰り返し投与が必要であると考えられる。またこの他に、*in vivo* 法で LCAT 遺伝子を体内へ導入する研究も行われている。これも対象疾患は LCAT 欠損症ではないが、ヒト CETP-TG、*ldlr*<sup>+/-</sup> マウスを使って LCAT 遺伝子搭載 AAV ベクターを投与し、32 週にわたって LCAT が発現、脂質プロファイルの改善が認められたと報告している (Chen et al., 2011)。将来的に LCAT 欠損症に対してこのような遺伝子治療法も可能になるかもしれないが、前述の通り *in vivo* 遺伝子治療では標的としない細胞への遺伝子導入のリスクが避けられず、また標的細胞における導入効率の予測が出来ないことから分泌タンパク質の用量のコントロールが難しいと考えられる。

以上のことから、LCAT 欠損症を対象として *ex vivo* 遺伝子治療に基づいた酵素補充療法を開発するに至った。

### a. コレステロール代謝におけるLCATの役割



### b. LCAT欠損による代謝異常



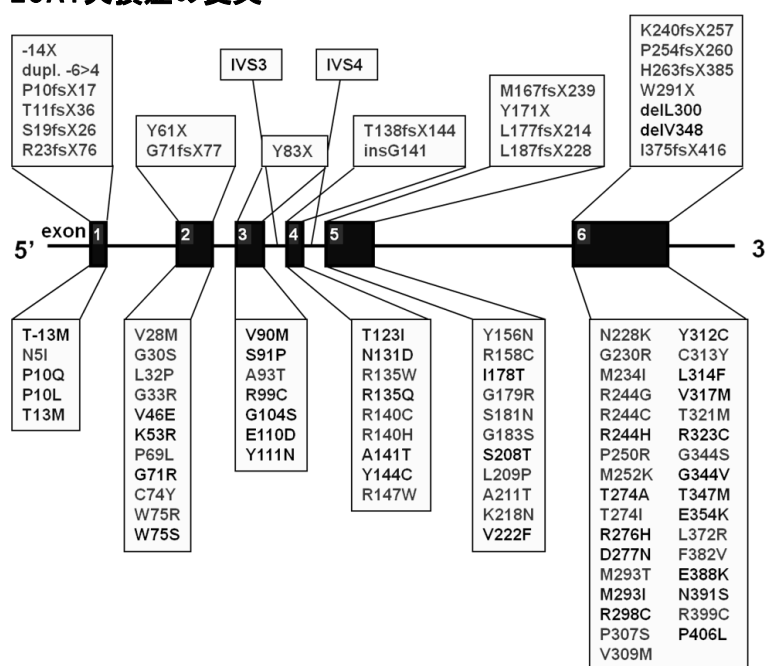
図表1-2 コレステロール代謝におけるLCATの役割

(a)LCATは血中コレステロールをエステル化する酵素である。この反応は主にHDLで行われ、生成したコレステロールエステルは他のリポ蛋白に引き渡されるか、あるいは直接肝臓に戻って循環する。LCATはコレステロール逆転送系で重要な役割を果たす酵素である。(b)LCATの機能が失われることによりコレステロールエステルが減少し、総コレステロールに占める遊離コレステロールの割合が増加する。エステル化が障害されることによりコレステロール逆転送系が破綻するため組織に脂質が蓄積する。

## a. LCAT欠損症の分類と症状

分類		LCAT活性		臨床症状			
		$\alpha$ 活性 (HDL)	$\beta$ 活性 (LDL)	角膜混濁	血中脂質異常	溶血性貧血	腎症状
家族性LCAT欠損症 (FLD)	古典型	0~9%	0~9%	+	+	+	+
	部分型	10~20%	10~20%	+	+	+	-
魚眼病(FED)		0~20%	正常	+	+	-	-

## b. LCAT欠損症の変異



図表1-3 LCAT欠損症の症状と変異

(a)LCAT欠損症の病態は2種類に大別される。 $\alpha$ 活性のみを欠損する魚眼病と $\alpha$ , $\beta$ 両活性を欠く家族性LCAT欠損症とは症状が若干異なる。(b)これまでに報告があるLCAT変異は100種類以上あり現在も増え続けている。

### 第 3 節 本研究の目的

遺伝子治療の現状や最近の開発状況を踏まえ、酵素(タンパク質)補充療法に対する遺伝子治療の観点から、生体に豊富に存在し、寿命が長く、多くの生理機能タンパク質の分泌細胞である脂肪細胞に焦点を当てた。対象疾患として血中への欠損酵素の補充によって治療が期待される希少疾病の一つである家族性 LCAT 欠損症を取り上げ、脂肪細胞を用いた遺伝子治療技術の研究に取り組むことにした。

## References

- Chen Z., Chu D., Castro-Perez J.M., Ni W., Zhang A., Krsmanovic M.L., Xie D., Shah V., Stout S.J., McLaren D.G., Stefanni A.C., Lee S.H., Roddy T.P., Plump A.S., Hubbard B.K., Vogt T.F., Zhou H.H., 2011. AAV8-mediated long-term expression of human LCAT significantly improves lipid profiles in hCETP;Ldlr(+/-) mice. *J Cardiovasc Transl Res.* 4(6):801-10.
- Desnick R.J., Schuchman E.H., 2012. Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 13:307-35.
- Fischer A., Cavazzana-Calvo M., 2008. Gene therapy of inherited diseases. *Lancet* 371(9629):2044-7.
- Giacca M., 2010. *Gene Therapy*, Springer.
- Glomset J.A., Aassmann G., Gjone E., Norum K.R., 1995. Lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency and fish eye disease. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases.* Volume II., Chap.60,1933-1951. McGraw-Hill, Inc.
- Hacein-Bey-Abina S., Hauer J., Lim A., Picard C., Wang G.P., Berry C.C., Martinache C., Rieux-Laucat F., Latour S., Belohradsky B.H., Leiva L., Sorensen R., Debré M., Casanova J.L., Blanche S., Durandy A., Bushman F.D., Fischer A., Cavazzana-Calvo M., 2010. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* 22;363(4):355-64.
- Holleboom A.G., Kuivenhoven J.A., Peelman F., Schimmel A.W., Peter J., Defesche J.C., Kastelein J.J., Hovingh G.K., Stroes E.S., Motazacker M.M., 2011. 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.* 32(11):1290-8.

- Ito M., Bujo H., Takahashi K., Arai T., Tanaka I., Saito Y., 2005. Implantation of primary cultured adipocytes that secrete insulin modifies blood glucose levels in diabetic mice. *Diabetologia*. 48(8):1614–20.
- Lombardo A., Genovese P., Beausejour C.M., Colleoni S., Lee Y.L., Kim K.A., Ando D., Urnov F.D., Galli C., Gregory P.D., Holmes M.C., Naldini L., 2007. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol*. 25(11):1298–306.
- Miarka P., Idzior-Waluś B., Kuźniewski M., Waluś-Miarka M., Klupa T., Sułowicz W., 2011. Corticosteroid treatment of kidney disease in a patient with familial lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency. *Clin Exp Nephrol*. 15(3):424–9.
- Montiel-Equihua C.A., Thrasher A.J., Gaspar H.B., 2012. Gene therapy for severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *Curr Gene Ther*. 1;12(1):57–65.
- Norum K.R., Gjone E., 1968. The effect of plasma transfusion on the plasma cholesterol esters in patients with familial plasma lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency. *Scand J Clin Lab Invest*. 22(4):339–42.
- Petrus I., Chuah M., VandenDriessche T., 2010. Gene therapy strategies for hemophilia: benefits versus risks. *J Gene Med*. 12(10):797–809.
- Raper S.E., Chirmule N., Lee F.S., Wivel N.A., Bagg A., Gao G.P., Wilson J.M., Batshaw M.L., 2003. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*. 80(1–2):148–58.
- Rousset X., Vaisman B., Auerbach B., Krause B.R., Homan R., Stonik J., Csako G., Shamburek R., Remaley A.T., 2010. Effect of recombinant human lecithin cholesterol acyltransferase infusion

on lipoprotein metabolism in mice. J Pharmacol Exp Ther. 335(1):140–8.

Thornhill S.I., Schambach A., Howe S.J., Ulaganathan M., Grassman E., Williams D., Schiedlmeier B., Sebire N.J., Gaspar H.B., Kinnon C., Baum C., Thrasher A.J., 2008. Self-inactivating gammaretroviral vectors for gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. Mol Ther. 16(3):590–8.

Seow Y, Wood M.J., 2009. Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors. Mol Ther. 17(5):767–77.

Wahlberg L.U., Lind G., Almqvist P.M., Kusk P., Tornøe J., Juliusson B., Söderman M., Selldén E., Seiger Å., Eriksdotter-Jönghagen M., Linderöth B., 2012. Targeted delivery of nerve growth factor via encapsulated cell biodelivery in Alzheimer disease: technology platform for restorative neurosurgery. J Neurosurg. 117(2):340–7.

武城英明, 斉藤康, 1998. LCAT 欠損症 The Lipid 9:79–87.

板倉広重編, 1999 年, 脂質の科学, 朝倉書店

前田 英一, 2001. 家族性 lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT)欠損症, 日本臨床 59:290–294

佐久間真樹, 1997 家族性 LCAT 欠損症の最近の進歩 医学のあゆみ(別冊:内分泌代謝疾患) 536–538

## 第2章 遺伝子治療用細胞としての前脂肪細胞

### 第1節 序論

先天性疾患に対する遺伝子治療において、遺伝子を導入する標的細胞の選択は疾病の病態と治療方針から決められる。筋ジストロフィーや網膜疾患のように特定の組織や細胞での遺伝子異常が原因となっている場合にはその細胞自身に機能回復のための治療遺伝子を導入する必要がある、先天性免疫不全症や重症貧血症の場合は異常血球細胞の元になる造血幹細胞の是正をはかるために造血幹細胞が標的とされる(O'Connor TP et al, 2006, Mendel et al, 2012)。これらの疾患とは異なり、酵素・タンパク質補充治療を目的とする場合は標的となる細胞には、特定の細胞における糖鎖修飾等が必須の場合を除き、基本的に制限はない。しかし、*ex vivo* 治療法は分泌タンパク質の用量をコントロールすることが理論的に可能であるという点で *in vivo* 法よりも優位であり、この観点から幹細胞をはじめとする増殖能を保持する細胞、なるべく寿命が長い細胞が候補となる。

これまでに *ex vivo* 遺伝子治療研究で利用または検討されている細胞は、造血幹細胞、T 細胞、線維芽細胞、肝細胞、ケラチノサイトなどが挙げられるが、特に造血幹細胞は SCID、重症貧血症の他、ムコ多糖症、慢性肉芽腫、がん治療など多様な疾患に対する治療遺伝子の標的細胞として用いられている(Naldini, 2011, Kang et al, 2012)。しかし、酵素補充療法を目的とした、ライソゾーム病の一種であるゴーシェ病を対象とした臨床研究では、移植数か月後で遺伝子導入細胞がほとんど残らず、動物実験で得られた結果から期待されるほどの効果は得られなかった。原因は遺伝子導入した造血幹細胞の移植前に骨髄抑制をしなかったことと、導入した遺伝子による細胞の生存選択が働かなかつたためではないかと考えられている(Dunbar et al., 1998, Sands et al., 2006)。治療遺伝子に対してどの細胞を選択するかは遺伝子治療の効果を左右する重要な要素であることがわかる。

かつて脂肪細胞は脂質を貯蔵するだけの役割しかないと考えられていたが、レプチン、アディポネクチンといったアディポカインを分泌する細胞として全身の脂質代謝に影響を与えていることが分かってきた(Ronti T et al., 2006)。脂肪細胞の数は成人する



とそれ以降は安定推移するが、同じ細胞が留まるわけではなく毎年 1 割がターンオーバーし約 8 年で半分が入替わることが明らかにされた。痩せ型、肥満型にかかわらず脂肪細胞の寿命は約 10 年と長い(Spalding et al., 2008)。近年、脂肪組織から採取される脂肪組織由来間葉系幹細胞が注目されている。これらの細胞は豊富に採取でき、脂肪細胞の他に骨や軟骨などに分化可能であることから再生医療や身体の損傷部位を埋める素材としても期待され、中枢神経の再生、脂肪萎縮症、クローン病などのへの研究が行われている(Lindroos et al., 2011, Miyazaki et al, 2008, Mizuno et al., 2011)。また、美容外科や形成外科において脂肪細胞の採取・移植には多くの実績があり、採取は比較的容易である。これらの点で脂肪細胞は *ex vivo* 遺伝子治療用の細胞として非常に有望である。

このような背景の下、本研究では脂肪細胞を標的細胞とした遺伝子治療法の開発を進め、脂肪組織由来の細胞として、脂肪組織由来幹細胞と成熟脂肪細胞由来細胞の、どちらがこの遺伝子治療コンセプトに対して優れているかを比較した。

## 第2節 材料と方法

### 2-1. 試薬等

#### 2-1-1. 細胞採取・培養・分化

細胞採取及び培養には、collagenase NB6 GMP Grade from Clostridium histolyticum (SERVA, Heidelberg Germany)、HBSS、DMEM-HAM F-12、TrypZean、リン酸緩衝生理食塩水[PBS] (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)、Fetal Bovine Serum[FBS] (SAFC Biosciences, Lenexa, KS, USA)、MesenPRO RS Medium、OPTI-MEM I、L-Glutamine (Gibco/Lifetechnologies, CA, USA)、硫酸ゲンタマイシン (Schering-Plough K.K., Osaka, Japan)、を使用した。分化誘導試薬として、脂肪細胞分化培地 (Lonza, Allendale, NJ, USA)、骨分化、軟骨分化試薬として、dexamethasone[DEX]、L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) TGF- $\beta$ 1 (Invitrogen/Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA)、 $\beta$ -グリセロリン酸 [ $\beta$ -GP] (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) Insulin-Transferrin-SeleniumX (Gibco/Lifetechnologies, CA, USA)を使用した。

#### 2-1-2. 細胞染色

細胞の固定に 4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液[4%PFA] (Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan)、細胞内油滴の染色に Oil Red O (Chemicon/Millipore, Billerica, MA, USA)を使用した。アルカリホスファターゼ活性検出試薬として硫酸(Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan)、メタホウ酸ナトリウム、 $\text{MgSO}_4$ 、ニトロブルーテトラゾリウム[NBT] (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸二ナトリウム[BCIP] (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)を使用した。カルシウム染色に alizarin red (Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH, Stuttgart, Germany)、コンドロイチン硫酸の染色に alcian blue (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)を使用した。

#### 2-1-3. カルシウム定量

メタロアッセイカルシウム (AKJ Global Technology, Chiba, Japan)、Bradford Dye Reagent (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)、HCl (Wako Pure Chemical Industries, Tokyo,

Japan)を使用した。

#### 2-1-4. コンドロイチン硫酸定量

Wieslab sGAG quantification kit(EuroDiagnostica, Malmo, Sweden)、proteinase K(QIAGEN, Hilden, Germany)、Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent and Kits(Invitrogen/Lifetechnologies, CA, USA)を使用した。

#### 2-1-5. フローサイトメーター用蛍光標識抗体

抗 CD31、CD90、CD73、CD29、CD44、HLA-ABC (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)、抗 CD13、CD34、CD45(Beckman-Coulter, Indianapolis, IN, USA)、抗 CD105(Ancell Corporation, Bayport, MN, USA)を使用した。

#### 2-1-6. リアルタイム PCR

トータル RNA の回収には RNeasy(QIAGEN、Hilden、Germany)、2-メルカプトエタノール(Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan)を使用した。逆転写反応には RT 試薬(TOYOBO, Tokyo, Japan)、リアルタイム PCR には TaqMan プローブセット C/EBP $\delta$ 、PPAR $\gamma$ 2、aP2(FABP4)、leptin(Applied Biosystems/Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA)を使用した。

#### 2-2. 皮下脂肪組織の採取

インフォームドコンセントを取得した 20~40 代の健常人ドナー男女 18 名から脂肪組織の提供を受けた。腹部に局部麻酔を行い、1cm ほど切開してアスπιーターで皮下脂肪を吸引採取した。

#### 2-3. 初代培養・継代培養

脂肪組織はピンセットで 1g ずつ取り分けて 50mL チューブに入れ、HBSS で溶解した 2mg/mL コラゲナーゼを加え、37°C のウォーターバスで振盪しながら 1 時間加温した。コラゲナーゼ処理した脂肪組織から 2 つの方法で細胞を採取した(図表 2-1)。

コラゲナーゼ処理脂肪組織に DMEM Ham F-12/ 20% FBS 培地 10mL を加えて遠心し(400xg、1min、25°C)、沈殿物 1m をピペットで吸引して別のチューブへ移す作業を

3 回行った。沈殿物をプールした細胞懸濁液をフラスコに播種して 1 週間培養し、培養面に接着して増殖してきた細胞を脂肪幹細胞(ASC, adipose derived stem cells)とした。

一方、遠心後チューブの上層に浮かぶ油滴を含む脂肪細胞は、培地を満たした培養フラスコへ移し入れた。空気が入らないようにさらに培地を足してキャップで密閉し、フラスコ底面を上にして静置して 1 週間培養した。天井面に接着して増殖してきた細胞を前脂肪細胞(ccdPA, ceiling culture derived proliferative adipocytes)とした。

7 日間の初代培養の後、ccdPA と ASC は、培地を MesenPRO に変えて同じ条件で週に 2 回継代した。

#### 2-4. フローサイトメーターによる細胞表面抗原の測定

ccdPA 及び ASC を回収し、2% FBS/ PBS で洗浄した後、蛍光標識抗体を加えて暗所で 30 分静置した。2 回洗浄後 1% PFA で固定し、フローサイトメーター(FACS Calibur, BD, Franklin Lakes, NJ, USA)で測定した。

#### 2-5. リアルタイム PCR

ccdPA 及び ASC の採取日(脂肪組織採取から 1 週間目を 0 日とする)、MesenPRO 培地培養開始から 1、4、7、14 日目に回収した細胞からプロトコールに従ってトータル RNA を抽出し、cDNA を調製した。同様に脂肪分化誘導した細胞からも cDNA を調製した。これらをテンプレートとしてリアルタイム PCR を実施した。

#### 2-6. 分化誘導・分化の判定

##### 2-6-1. 脂肪細胞分化及び染色

ccdPA と ASC をそれぞれ 48 ウェルプレートに 1 ウェルあたり  $3.5 \times 10^4$  個、又は 6 ウェルプレートにウェルあたり  $3.5 \times 10^5$  個播種して 3 日培養し、脂肪分化培地に交換して 2 週間分化誘導した。分化させた細胞を 4% PFA で 10 分固定した後 Oil Red O で細胞を 10 分染色した。

##### 2-6-2. 骨分化及び染色とカルシウム定量

ccdPA と ASC をそれぞれ 6 ウェルプレートに 1 ウェル当たり  $6.4 \times 10^4$  個を播種して 3 日培養し、骨分化培地(10%FBS/ 10mM  $\beta$ -GP/ 50 $\mu$ M ascorbic acid/ 10nM DEX in

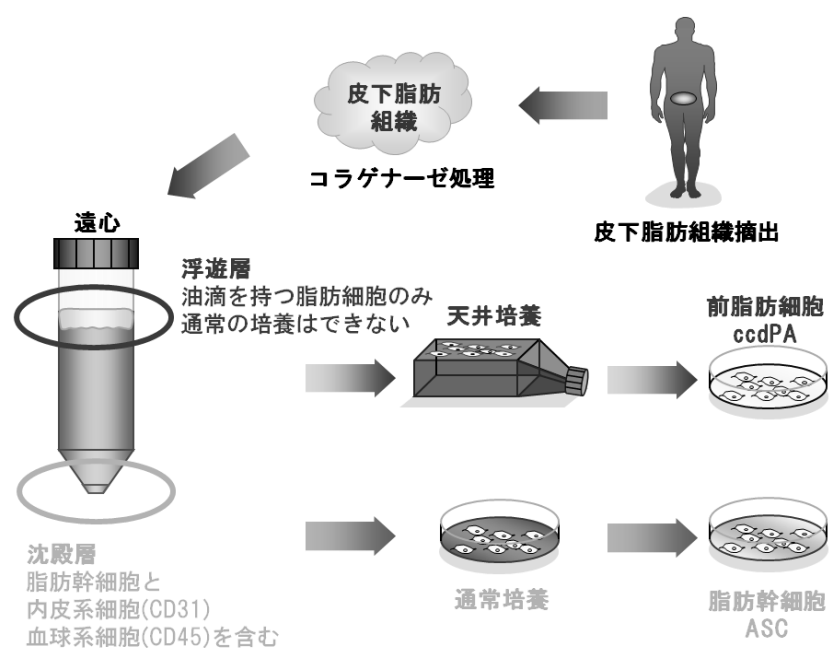
DMEM Ham F-12)に交換して2又は3週間分化誘導した。分化2週間目の細胞をPBSで洗浄しエタノールで10分固定した後、染色液(36mM メタホウ酸ナトリウム/ 8.3mM MgSO<sub>4</sub>/ 0.46mM BCIP/ 1.2mM NBT/ 7mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)で30分染色してアルカリフォスカターゼ活性を調べた。分化誘導3週目の細胞をPBSで洗浄し70%エタノールで1時間固定した後、40mM alizarin redで10分染色した。カルシウム定量用の細胞はPBSで洗浄した後、スクレーパーで剥がして回収し、細胞ペレットに0.1M塩酸を加えソニケーターで20分細胞を破碎した。4℃で一晩放置した後12000rpm・5分遠心し、上清を回収してサンプルとした。添付プロトコールにしたがってサンプル中のカルシウム濃度とタンパク質濃度を定量し、測定値はカルシウム濃度をタンパク質濃度で除算した。

#### 2-6-3. 軟骨分化及び染色とコンドロイチン硫酸(sGAG)定量

ccdPAとASCをそれぞれ8x10<sup>6</sup>個/mLに調製し、10μL(8x10<sup>4</sup>個)を24ウェルプレートのウェルの中心に播種した。2時間培養後、軟骨分化培地(1% FBS/ Insulin-Transferrin-SeleniumX/ 50μM ascorbic acid/ 10ng/mL TGF-β1 in DMEM Ham F-12)を加えて3週間培養した。粒子状の細胞塊を回収し、切片を4% PFAで15分固定した後、1% alcian blue/ 0.1N HClで30分染色した。sGAG定量用サンプルは、粒子状の細胞塊に50μg/mL proteinase K/ 30mM Tris-HCl(pH 8)を加え、56℃で16時間、90℃で10分加熱し、遠心して上清を回収した。添付プロトコールに従ってsGAGとDNA量を測定し、測定値はsGAG濃度をDNA濃度で除算した。

#### 2-7. 統計処理

平均値±SDとして表記した有意差検定はSPSS ver11.0(IBM, IL, USA)を用いてStudent's t-test または分散分析を行い、その後の検定にDunnett testを行った。 $p$ 値<0.05は統計的に有意差ありとした。



**図表2-1 前脂肪細胞と脂肪幹細胞の採取方法**

前脂肪細胞(ccdPA)は脂肪組織のなかで、油滴を含む比重の軽い脂肪細胞から天井培養法によって採取する。脂肪幹細胞(ASC)はコラゲナーゼ処理後、遠心して沈殿する細胞を培養して採取する。

### 第3節 結果

#### 3-1. 細胞形態・増殖

ccdPA 及び ASC は線維芽細胞様の形態を示し、違いは認められなかった。初代培養から7日目(0日)、脂肪組織1gから採取できた細胞数はccdPAが $5.1 \times 10^6$ 個、ASCが $2.2 \times 10^6$ 個、ともに $10^6$ 個オーダーで、ccdPAのほうが約2倍多く回収できた。両細胞を同じ条件で6週間継代培養すると倍化時間は徐々に長くなる傾向が認められ、ccdPAが1.34~1.85、ASCが1.24~1.87で増殖能に差は認められなかった(図表2-2)。

#### 3-2. 表面抗原

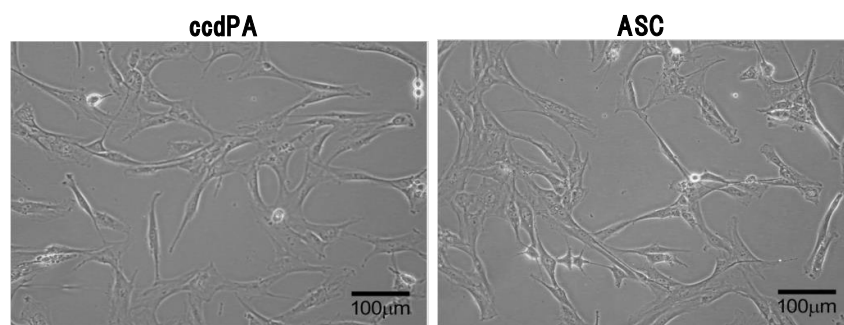
脂肪組織のコラゲナーゼ処理後、遠心して沈殿する分画(SVF、Stromal vascular fraction、ASCを含む)をフローサイトメーターで測定したところ、CD31陽性及びCD45陽性細胞が混入していた。陽性細胞は7日間の培養を経て細胞回収日(0日)には減少したが、CD31+は平均で3.2%、CD45+は1.3%の混入が認められた。ASCと同時に調製したccdPAの天井培養終了日におけるCD31、45陽性細胞は平均0.8%、0.5%であった。(図表2-3-a)。

細胞回収日及び1ヶ月継代後にCD13、29、31、34、44、45、73、105、90、HLA-ABCを測定した。ccdPA、ASCは同じパターンを示し、CD13、29、44、73、105、90、HLA-ABCは陽性、CD31、34、45は陰性で、1ヶ月継代後もパターンは変わらなかった(図表2-3-b)。

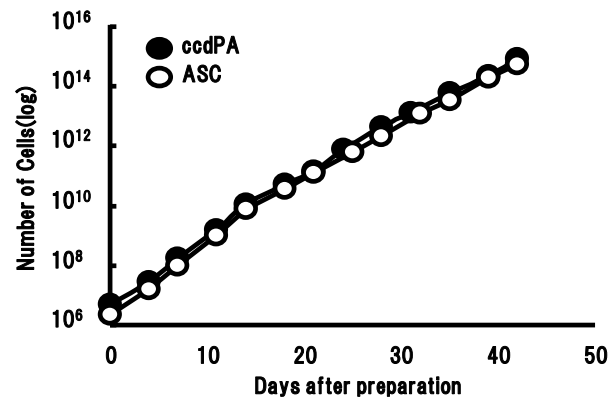
#### 3-3. 継代による脂肪分化関連遺伝子発現量の推移

成熟脂肪細胞及びccdPAとASCを継代開始から1、3、7、14日後に回収し、脂肪細胞で発現が増加するC/EBP $\delta$ 、leptin、PPAR $\gamma$ 2、aP2遺伝子の発現量を測定した。これらの遺伝子のmRNAは成熟脂肪細胞及び、ccdPAとASCの回収直後には発現が確認できたが、継代に伴って発現量が減少し14日目は検出限界以下となった(図表2-4)。

### a. 細胞形態



### b. 細胞増殖

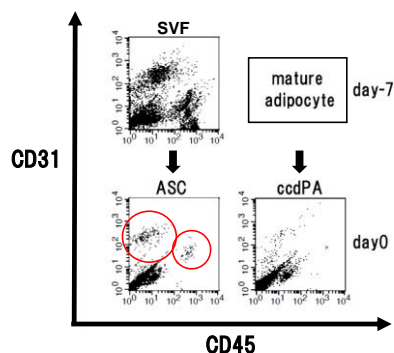


図表2-2 細胞形態と増殖

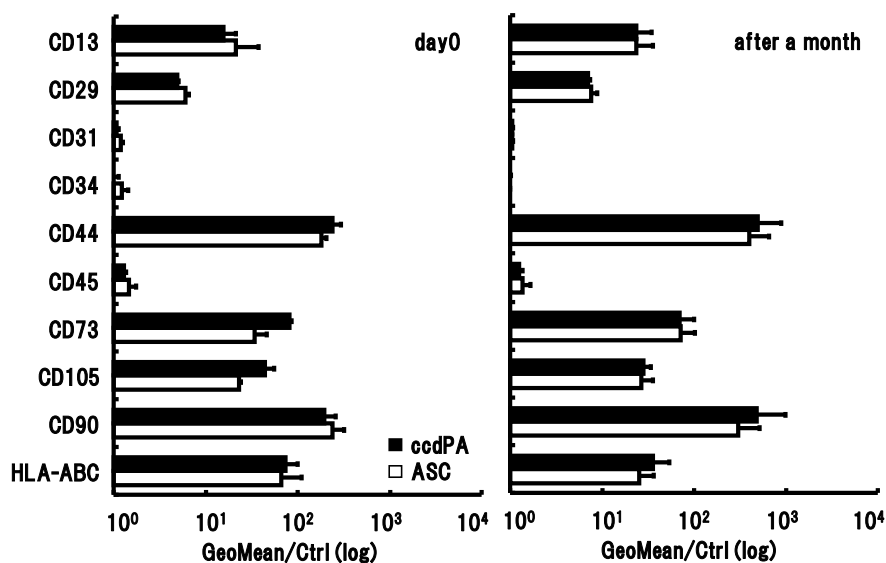
(a)前脂肪細胞(ccdPA)と脂肪幹細胞(ASC)は線維芽細胞状の似た形態を示した。  
(b)42日間の継代において増殖能に差は認められなかった。



### a. 細胞採取初期における純度

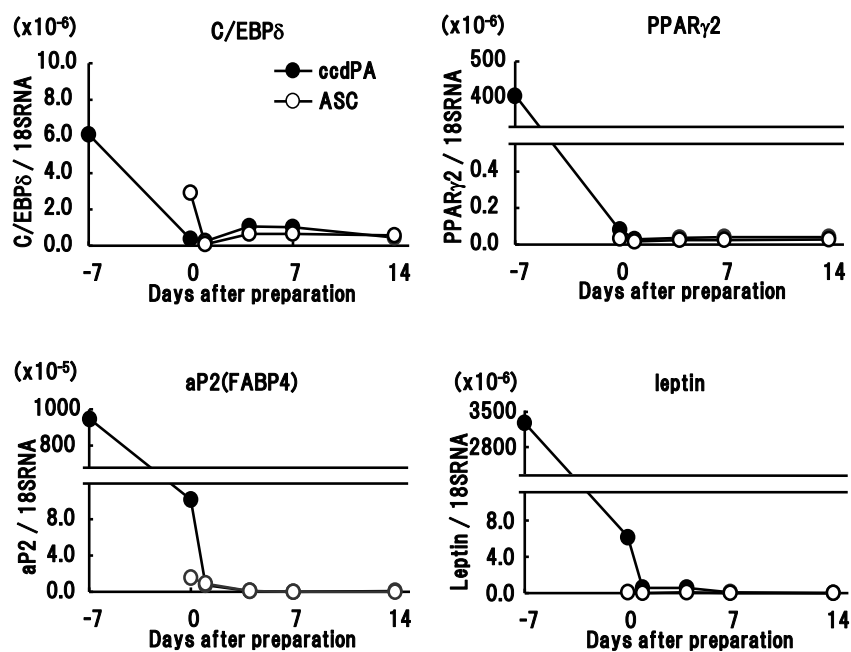


### b. 細胞採取初期と培養後の表面抗原



**図表2-3 細胞の純度と表面抗原のパターン**

(a)ccdPA及びASCの細胞表面抗原をフローサイトメーターで測定した。脂肪組織をコラゲナーゼ処理した際の沈殿層(SVF)にはCD31またはCD45陽性細胞の混入が認められ、培養1週間後に採取されたASCでは陽性細胞の割合は減少したが、ccdPAに比べると多く検出された。(b)ccdPAとASCの表面抗原は同じパターンを示し、1ヶ月培養しても性質は保たれていた。



**図表2-4 ccdPAとASCの脂肪分化関連遺伝子の発現**

天井培養前の成熟脂肪細胞(-7日)及びccdPAとASCの継代後の脂肪分化関連遺伝子の発現を調べた。培養4日目までccdPA、ASCともにaP2発現が認められ、leptinについてはccdPAの7日目まで発現が認められたが、培養14日目には検出限界以下に減少した。

### 3-4. 脂肪細胞分化能

採取から 14 日間継代培養した ccdPA と ASC を脂肪分化培地で 2 週間分化誘導した。分化開始前、1、2、4、6、8、10、12、14 日後細胞を回収して PPAR $\gamma$ 2 と aP2 の mRNA 発現の推移を調べた。PPAR $\gamma$ 2 は 8 日目前後に発現量のピークが、aP2 はその 2 日後に発現量がピークになったあと徐々に減少した。両細胞ともに脂肪細胞へ分化する能力を保持していたが、ccdPA のほうが ASC よりも脂肪細胞へ分化する細胞の割合が高く、PPAR $\gamma$ 2、aP2 の発現についても ccdPA のほうが高い値を示した(図表 2-5)。

細胞回収日、継代 1、2、6 週間後の ccdPA と ASC を 2 週間脂肪分化誘導し、aP2 の発現を調べた。両細胞は継代期間に伴って脂肪細胞への分化能が減少する傾向が認められたが、同じ培養条件にもかかわらず ccdPA のほうが脂肪細胞へ分化する細胞数が多く、6 週間継代後もその傾向は変わらなかった(図表 2-6)。

継代培養 2 週目の細胞を播種し、脂肪分化誘導試薬のうち、IBMX、DEX、IND の添加・非添加の組合せを変えて分化誘導した。培地に DEX が含まれる場合、細かい脂肪滴が観察され、ccdPA は Oil Red O で染色される細胞がいくつか観察されたが ASC には認められなかった。このときの PPAR $\gamma$ 2、aP2 の発現量を調べたところ、分化誘導試薬 4 種類全て(インスリン/DEX/IBMX/IND)添加した場合には ccdPA と ASC の差は 2 倍程度だったが、インスリン/DEX/IBMX の 3 種類の場合、PPAR $\gamma$ 2 が 14 倍、aP2 は 90 倍になった(図表 2-7)。

### 3-5. 骨分化

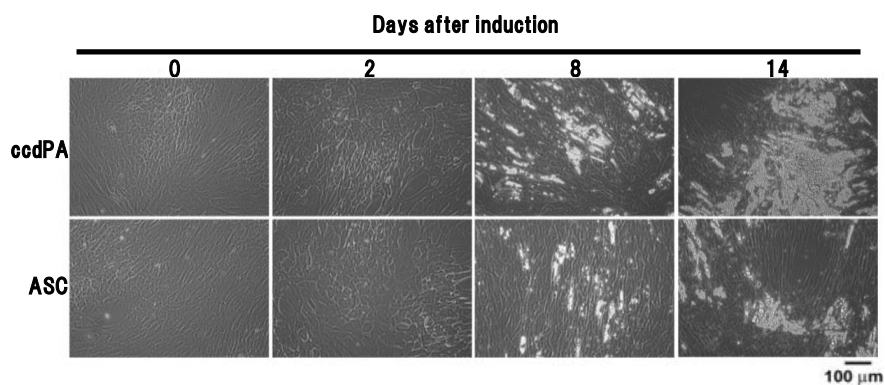
ccdPA と ASC を同じ条件で骨分化誘導した。両細胞ともに骨分化の指標であるアルカリホスファターゼ活性化とカルシウム蓄積が認められた(図表 2-8)。細胞回収日及び継代 7、14、42 日後から骨分化誘導した場合の、細胞ライセートに含まれるカルシウム量は ccdPA が 0.07、0.11、0.14、0(検出限界以下)mg/mg、ASC は 0.08、0.09、0.13、0(検出限界以下)mg/mg だった。

### 3-6. 軟骨分化

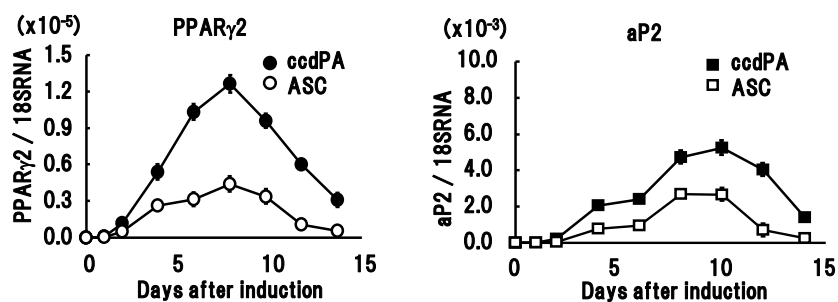
ccdPA と ASC を同じ条件で軟骨分化誘導した。細胞回収日及び継代 14、21、42 日後から 3 週間軟骨分化誘導した細胞塊の切片を alcian blue で染色したところ、全ての

サンプルが染色され、両細胞ともに軟骨分化の指標であるコンドロイチン硫酸の蓄積が認められた(図表 2-9)。また 14、21 日継代した細胞から分化させたサンプルのコンドロイチン硫酸を定量したところ、ccdPA が 9.6、10.4 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ 、ASC は 9.5、9.3 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  だった。

### a. ccdPAとASCの脂肪分化誘導

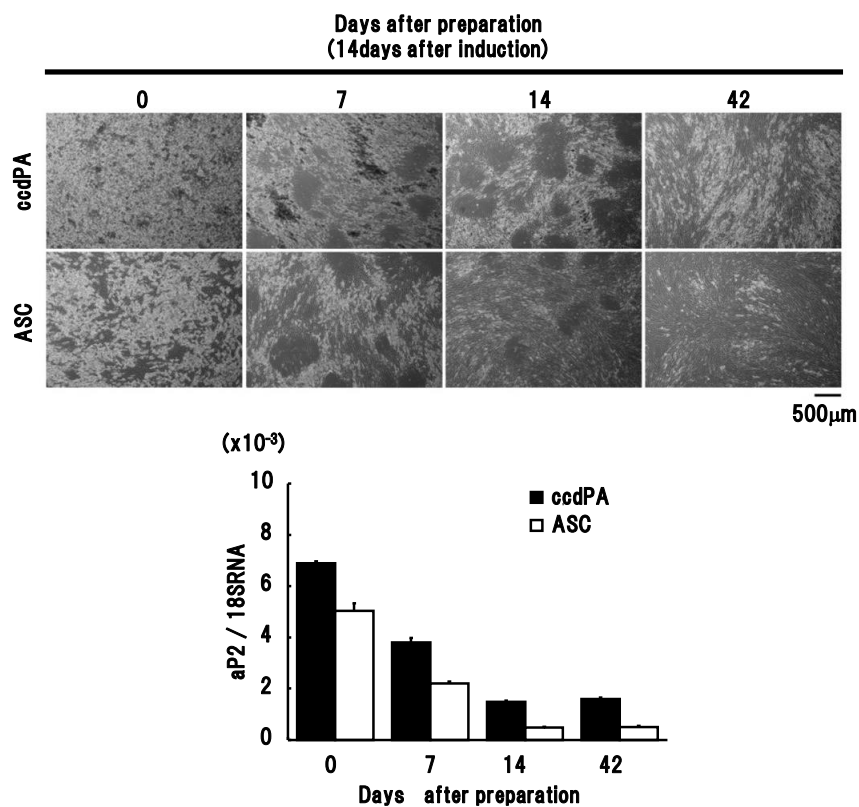


### b. 脂肪分化誘導によるPPAR $\gamma$ 2とaP2発現



図表2-5 脂肪細胞への分化能

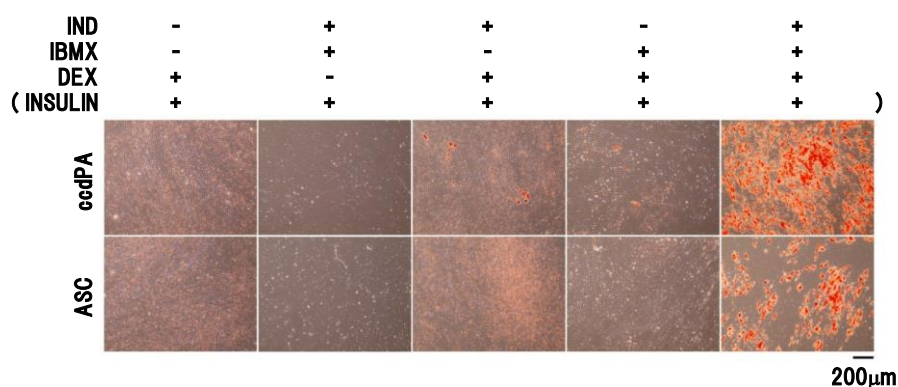
継代培養2週間後のccdPAとASCを同じ条件で2週間脂肪分化誘導した。(a)ccdPAはASCより早く細胞内油滴の蓄積が観察され、比較的高い脂肪分化能を示した。(b)分化誘導後のPPAR $\gamma$ 2とaP2の発現の推移を調べると、常にccdPAのほうが高い発現量を示した。



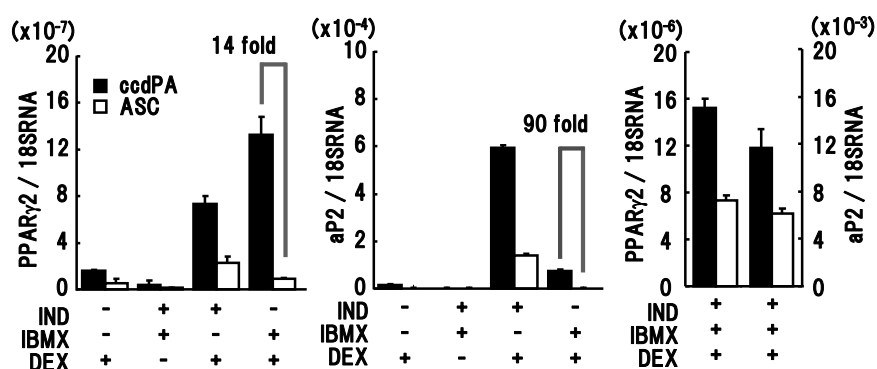
**図表2-6 継代による脂肪分化能への影響**

ccdPA及びASCを0～42日継代した後、2週間脂肪分化誘導した。両細胞ともに継代期間に伴って分化能が減少したが、42日培養後においてもccdPAはASCに比べ高い分化率を示した。

### a. 脂肪分化試薬に対する反応

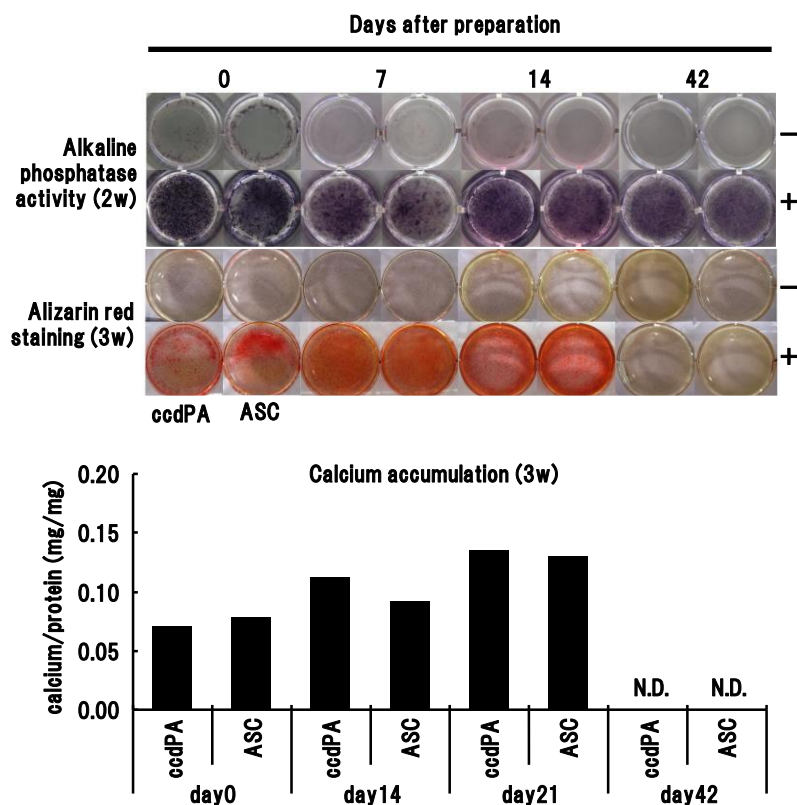


### b. 脂肪分化試薬に対するPPAR $\gamma$ 2、aP2発現



**図表2-7 脂肪分化試薬に対する反応**

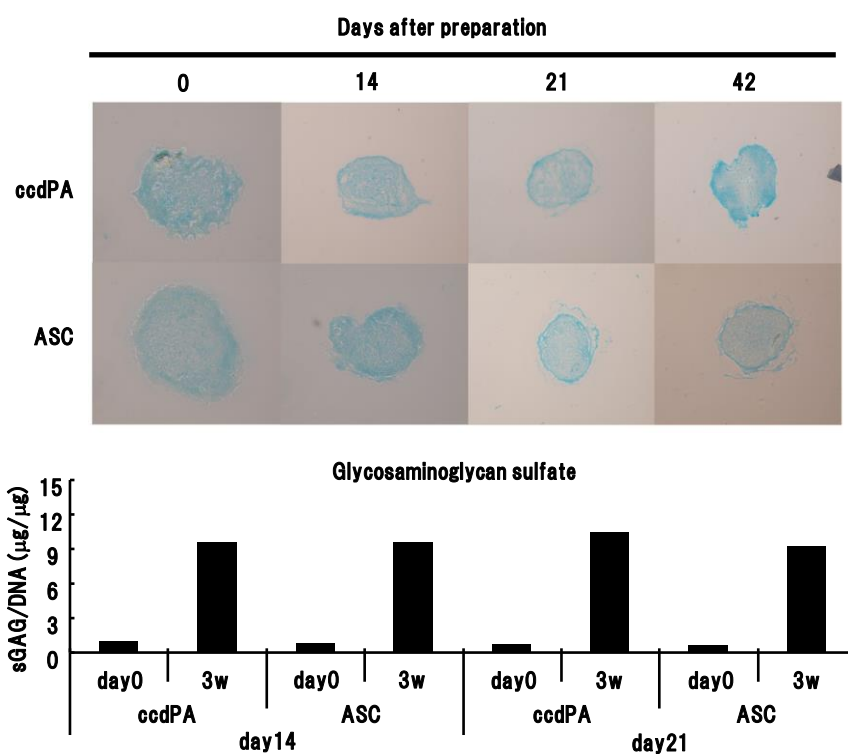
脂肪分化誘導試薬IND、IBMX、DEXの組合せを変えて分化誘導し、Oil Red O 染色した。(a)3種類のうちいずれの試薬が欠けてもccdPA、ASCともに分化する細胞が減少したが、IBMX/DEXまたはDEX/INDによる誘導ではccdPAでOil Red O染色される細胞が確認された。(b)このときのPPAR $\gamma$ 2、aP2の発現を調べるとIBMX/DEX誘導では、ASCに比べてccdPAでの発現が顕著に増加した。



**図表2-8 骨分化**

0～42日培養したccdPA、ASCを骨分化誘導した。2週目にアルカリホスファターゼ、3週目にアリザリンレッドによるカルシウム染色と定量を行った。培養21日目まではカルシウムの蓄積において両細胞に明確な差はなく、継代5～6週間前後で骨分化能が減少することが分かった。





**図表2-9 軟骨分化**

0～42日継代したccdPAとASCを軟骨分化誘導した。分化誘導3週後に細胞塊切片の染色及びコンドロイチン硫酸(sGAG)の定量を行った。培養14、21日目の細胞を分化させたサンプルに含まれるsGAG量はほぼ同じ値を示し、分化能に違いは認められなかった。

## 第 4 節 考察

*Ex vivo* 遺伝子治療に用いることのできる標的細胞の要件は、安全性と効率の良い遺伝子導入が可能な性質を持つことであり、さらに採取や移植が容易であることが望ましいと言える。遺伝子導入標的細胞として着目した脂肪細胞は全身にあって、局部麻酔と小さな切開で済むため採取に際して比較的負担が少ない。脂肪細胞は従来の損傷部位の充填や再生医療への利用に加え、遺伝子導入標的細胞としても望ましい性質を持っていると考えられる。

脂肪組織由来細胞に関する報告の多くは脂肪組織をコラゲナーゼで処理した後の遠心沈殿分画 (SVF, stromal vascular fraction) より調製された脂肪組織由来幹細胞 (ASC 又は ADSC, Adipose Derived Stem Cells) を用いたものである。ASC は間葉系細胞 (MSC, Mesenchymal stem cell) に属し、脂肪だけでなく骨、軟骨、筋肉の他に外胚葉や内胚葉系の細胞など様々な細胞に分化する能力をもつことが知られている (Zuk et al., 2001, Schäffler et al., 2007)。ASC とは別に、Sugihara らは成熟脂肪細胞から脂肪滴を持たない増殖型細胞を採取する天井培養法を開発した (Sugihara et al., 1986, Miyazaki et al., 2005, Matsumoto et al., 2008)。ASC は採取方法が簡便である反面、採取法の原理上、周皮細胞、内皮細胞、血球系細胞の混在が避けられないが、これは採取方法や培養条件の違いから論文報告毎に ASC の性質が若干異なる一因となっていると考えられる (Cawthorn et al., 2012)。遺伝子導入の標的細胞として考えた場合、その不均一性は、遺伝子導入の不均一性の原因となる可能性がある。一方で、天井培養由来細胞は、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、均一な脂肪細胞に由来する細胞である。

ASC または天井培養由来細胞を規定する特定のマーカーはみつかっておらず複数のマーカーの組合せで表され、CD34 については採取初期には陽性で *ex vivo* 培養によって発現が減少するという報告があり、CD105 については逆に採取初期には発現が弱いなど採取直後と培養後 (脂肪分化と非分化状態) とで変化するマーカーもある。本章で行った検討では ccdPA と ASC はともに CD13+/CD29+/CD31-/CD34-/CD44+/CD45-/CD73+/CD90+/CD105+ であり、CD34 は採取初期においても発現は認められなかった。ccdPA は天井培養期間が 1 週間であるが、もともと Sugihara らが開発した方法では 2 週間の天井培養期間を経て細胞を

採取する。Miyazaki ら、Matsumoto らの報告している ceiling cell、DFAT cell(Dedifferentiated fat cell)についても同じく2週間天井培養を行っているが、前述の表面マーカーに関しては ASC と同じパターンであると報告している。Ceiling cell の CD54 については moderate な発現が認められると報告され、ccdPA についても同様に弱い発現が認められた(データ非掲載)。本章で調べた限りでは ccdPA と ASC とを表面抗原で区別することはできなかった。本研究では採取した細胞の純度を規定する目的で、内皮細胞に発現が認められる CD31 と血球系細胞に発現が認められる CD45 を指標とし、採取日の ccdPA と ASC を比較したところ ccdPA のほうが純度が高いことが分かった。

ASC が多分化能を示すことは多くの論文で報告され、ccdPA についても同様に脂肪、骨、軟骨への多分化能を示したが、脂肪分化能については、ASC よりも ccdPA のほうが優れていることが分かった。他のドナーの脂肪組織から得られた ccdPA、ASC の比較においても、常に ccdPA のほうが脂肪分化能に優れた性質を示し、12 週以上長期継代した後も脂肪分化能を維持していた(データ非掲載)。ccdPA と ASC の脂肪分化関連遺伝子を比較すると、細胞回収直後には aP2、leptin の発現に違いが認められたが、継代 2 週間後には PPAR $\gamma$ 2、C/EBP $\delta$ 、aP2、leptin、4 つの遺伝子の発現は減少し、検出限界以下となった。しかしこれらの細胞を脂肪分化誘導試薬で分化させると脂肪滴を蓄積する細胞の割合と遺伝子発現には差が認められ、増殖能が同じであるにも関わらず継代するにつれて分化能の差は開く傾向が認められた(図表 2-6)。Zuk らは ASC をクローニングしそれぞれの分化能について調べ、ASC は様々な組合せの分化能を持つ細胞の集団であることを示したが(Zuk et al., 2002)、ccdPA と ASC の採取時における脂肪分化能保持細胞の割合の違いだけでは説明ができない。また、脂肪分化培地の構成成分である IBMX、DEX、IND の組合せを変えて分化誘導した場合、インスリン/IBMX/DEX で誘導すると試薬を全部添加した(インスリン/IBMX/DEX/IND)の場合に比べて PPAR $\gamma$ 2、aP2 発現の差が大きくなった。この差は ccdPA、ASC の個々の細胞内部における分化に関連した遺伝子発現やエピジェネティックな要因又は外的要因、あるいは両方に起因することが考えられる。Rodeheffer らは、SVF に含まれる細胞の表面抗原の違いから分化能を持つマウス ASC の subpopulation を識別できると報告している。マウス脂肪細胞の SVF を表面抗原で分類した subpopulation のうち Lin(CD31, 45, Ter119)-/CD29+/CD34+/Sca-1+は *in vitro* で 62%が脂肪細胞に分化するが、こ

の集団が SVF の約半分の割合を占めるにも関わらず、母集団である SVF の脂肪細胞への分化率が低い(3.2%)理由について、SVF には分化を阻害する細胞又は因子が存在するのではないかと推測している(Rodeheffer et al., 2008)。従って ccdPA が ASC に比べて脂肪へ分化しやすい理由の一つとして、ASC(SVF)の外的要因で分化率が相対的に低い可能性も考えられる。本遺伝子治療法では遺伝子導入細胞が患者自身の脂肪組織に組込まれ、長期間生着することを目指している。従って脂肪細胞への分化能を保持しているかどうかは重要な要因のひとつであり、また、脂肪細胞はがんの報告が少なく、脂肪分化能を持つ細胞はがん化しにくいことが報告されていることから(Shimizu et al., 2010)、細胞移植の安全性を考える上でも重要な性質であると考えられる。

一方で骨、軟骨分化能については ccdPA と ASC とで明確な差は認められなかった。ASC の骨分化能は継代 5~6 週間あたりで分化能が減少する傾向が認められ、分化しなくなるか、またはカルシウム蓄積に至るまでに分化誘導期間を 3 週間以上必要とするなど、サンプル間でばらつきが出始めた。ccdPA についても同様に継代 5~6 週前後で分化能が減少する傾向が認められたが、4 週以上骨分化誘導すると調べた 4 例全てにおいてカルシウムを蓄積が認められ、サンプル間で似た性質を示した(データ省略)。この結果からも ccdPA はばらつきの少ない細胞集団であることが分かった。

ASC が脂肪以外の組織へ分化する能力があることは多くの論文で示されているが、幹細胞であるとする報告(Lin et al., 2008)と、テロメラーゼ活性を持たない、stem cell ではないとする報告があり(Katz et al., 2005, Sachs et al., 2012)、ES 細胞のように本当の意味で self-renewal 可能な分化能と増殖能をもつ幹細胞といえるのか、やや見解が分かれている。ccdPA については継代に伴うテロメア長変化及びテロメア活性を調べていないため明確なことは言えないが、常に継代 3 カ月ほどで増殖停止が観察されることから、おそらくテロメラーゼ活性は保持していないか又は継代途中で失われると推測される。MSC は多分化能を持つ成体幹細胞(adult stem cell)に分類されているが、同様に分化能を持つとはいえ天井培養によって成熟脂肪細胞から脱分化させた ccdPA が成体幹細胞と呼べるのか定義できない。従って、ccdPA について現段階では多分化能を持つ、特に脂肪への分化能に優れた細胞、という表現がふさわしいと考えられる。

*Ex vivo* 遺伝子治療では、遺伝子導入を目的としてあるいは移植に必要な細胞数を確保するために標的細胞には相応の増殖能あることが望ましい。ccdPA、ASC は共に優れた増殖能を示し、1g の脂肪組織から培養 1 ヶ月で  $10^{12}$  個オーダーに増殖した。増殖能には個人差があるが他ドナーの脂肪組織から調製した細胞においても優れた増殖能を示した。増殖能に優れているため、患者から採取する脂肪組織は少量で済む利点があり、また今後の遺伝子治療計画を発展させる上で増殖させた細胞を保存し必要になった際に利用することも可能である。

天井培養法は油滴をもつ成熟脂肪細胞のみを由来とする細胞を集めることができる手法であり、遺伝子導入の標的細胞はなるべく均一な集団であることが望ましいこと、良好な増殖能を示すこと、ccdPA は脂肪への分化能に優れていることから遺伝子導入細胞としてより有望であることが示された。

## 第 5 節 小括

成熟脂肪細胞由来細胞 ccdPA と ASC はともに良好な増殖能を示し、表面抗原、細胞形態に違いは認められなかったが、ccdPA のほうが純度、脂肪細胞への分化能に優れていた。これらの性質は酵素補充を目的とした *ex vivo* 遺伝子治療用細胞としてより適していると考えられた。

## References

- Cawthorn W.P., Scheller E.L., MacDougald O.A., 2012. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res.* 53(2):227–46.
- Dunbar C.E., Kohn D.B., Schiffmann R., Barton N.W., Nolte J.A., Esplin J.A., Pensiero M., Long Z., Lockey C., Emmons R.V., Csik S., Leitman S., Krebs C.B., Carter C., Brady R.O., Karlsson S., 1998. Retroviral transfer of the glucocerebrosidase gene into CD34<sup>+</sup> cells from patients with Gaucher disease: in vivo detection of transduced cells without myeloablation. *Hum Gene Ther.* 9(17):2629–40.
- Gimble J.M., Bunnell B.A., Guilak F., 2012. Human adipose-derived cells: an update on the transition to clinical translation. *Regen Med.* 7(2):225–35.
- Kang E.M., Malech H.L., 2012. Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Methods Enzymol.* 507:125–54.
- Katz A.J., Tholpady A., Tholpady S.S., Shang H., Ogle R.C., 2005. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells.* 23(3):412–23.
- Lindroos B., Suuronen R., Miettinen S., 2011. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev.* 7(2):269–91.
- Lin G, Garcia M, Ning H, Banie L, Guo YL, Lue TF, Lin CS., 2008. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 17(6):1053–63.
- Matsumoto T., Kano K., Kondo D., Fukuda N., Iribe Y., Tanaka N., Matsubara Y., Sakuma T., Satomi A., Otaki M., Ryu J., Mugishima H., 2008. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol.* 215(1):210–22.

- Mendell J.R., Rodino-Klapac L., Sahenk Z., Malik V., Kaspar B.K., Walker C.M., Clark K.R., 2012. Gene therapy for muscular dystrophy: lessons learned and path forward. *Neurosci Lett.* 11;527(2):90–9.
- Miyazaki T., Kitagawa Y., Toriyama K., Kobori M., Torii S., 2005. Isolation of two human fibroblastic cell populations with multiple but distinct potential of mesenchymal differentiation by ceiling culture of mature fat cells from subcutaneous adipose tissue. *Differentiation* 73: 69–78.
- Miyazaki M., Zuk P.A., Zou J., Yoon S.H., Wei F., Morishita Y., Sintuu C., Wang J.C., 2008. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow for ex vivo gene therapy in rat spinal fusion model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 33(8):863–9.
- Mizuno H., Tobita M., Uysal A.C., 2012. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*. 30(5):804–10.
- Naldini L., 2011. Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet.* 12(5):301–15.
- O'Connor T.P., Crystal R.G., 2006. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nat Rev Genet.* 7(4):261–76.
- Rodeheffer M.S., Birsoy K., Friedman J.M., 2008. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell*. 135(2):240–9.
- Ronti T., Lupattelli G., Mannarino E., 2006. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 64(4):355–65.
- Sachs P.C., Francis M.P., Zhao M., Brumelle J., Rao R.R., Elmore L.W., 2012. Holt SE. Defining essential stem cell characteristics in adipose-derived stromal cells extracted from distinct



- anatomical sites. *Cell Tissue Res.* 349(2):505–15.
- Sands M.S., Davidson B.L., 2006. Gene therapy for lysosomal storage diseases. *Mol Ther.* 13(5):839–49.
- Sanz L., Compte M., Guijarro-Muñoz I., Álvarez-Vallina L., 2012. Non-hematopoietic stem cells as factories for in vivo therapeutic protein production. *Gene Ther.* 19(1):1–7.
- Schäffler A., Büchler C., 2007. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells.* 25(4):818–27.
- Shimizu T., Ishikawa T., Sugihara E., Kuninaka S., Miyamoto T., Mabuchi Y., Matsuzaki Y., Tsunoda T., Miya F., Morioka H., Nakayama R., Kobayashi E., Toyama Y., Kawai A., Ichikawa H., Hasegawa T., Okada S., Ito T., Ikeda Y., Suda T., Saya H., 2010. c-MYC overexpression with loss of Ink4a/Arf transforms bone marrow stromal cells into osteosarcoma accompanied by loss of adipogenesis. *Oncogene.* 29(42):5687–99.
- Spalding K.L., Arner E., Westermark P.O., Bernard S., Buchholz B.A., Bergmann O., Blomqvist L., Hoffstedt J., Näslund E., Britton T., Concha H., Hassan M., Rydén M., Frisén J., Arner P., 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* 453(7196):783–7.
- Sugihara H., Yonemitsu N., Miyabara S., Yun K., 1986. Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. *Differentiation* 31: 42–9.
- Sugihara H., Yonemitsu N., Miyabara S., Toda S., 1987. Proliferation of unilocular fat cells in the primary culture. *J Lipid Res* 28: 1038–45.
- Sugihara H., Funatsumaru S., Yonemitsu N., Miyabara S., Toda S., Hikichi Y., 1989. A simple culture method of fat cells from mature fat tissue fragments. *J Lipid Res.* 30(12):1987–95.

Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H., 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7(2):211–28.

Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H., 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 13(12):4279–95.

## 第3章 LCAT遺伝子導入前脂肪細胞の樹立と解析

### 第1節 序論

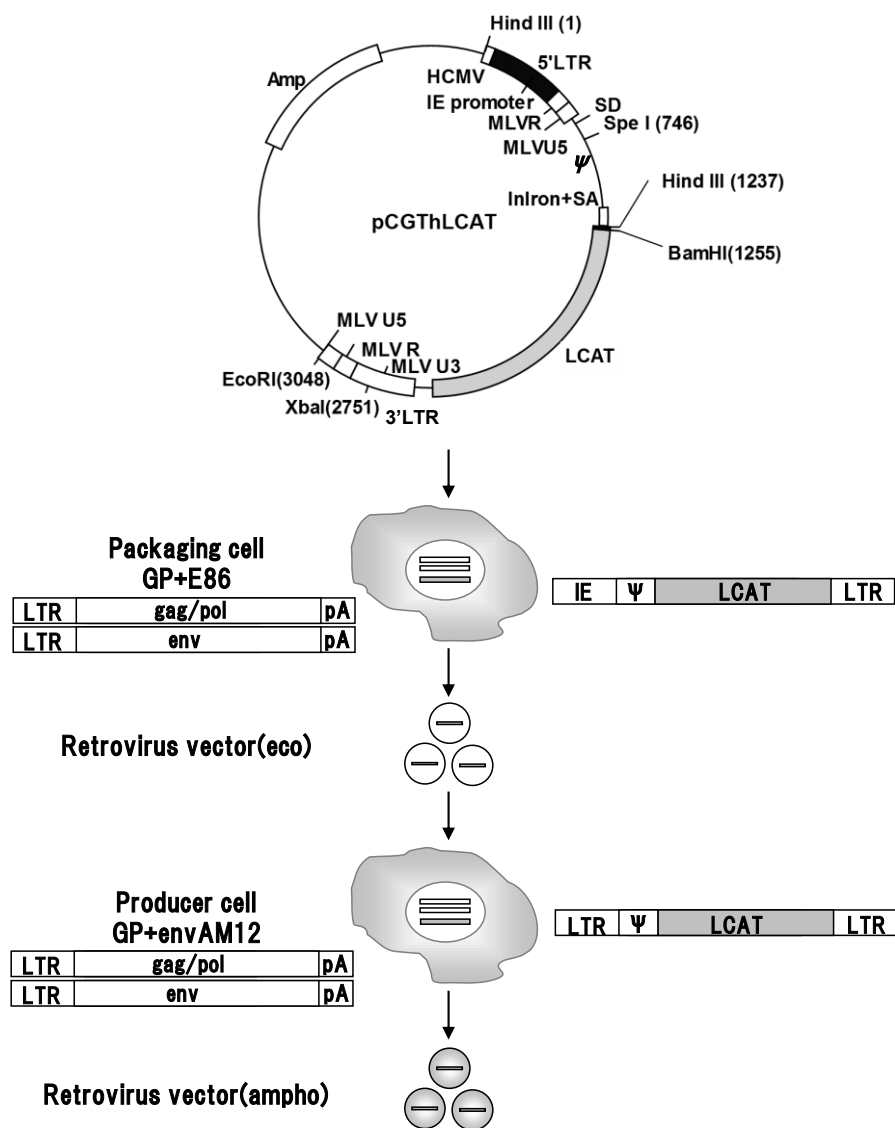
#### 1-1. ベクターの選択とその背景

2012年までに承認された遺伝子治療臨床研究は累計で1800件を超えた。使われているベクターの内訳は、アデノウイルス(23.3%)、ガンマレトロウイルス(19.7%)、アデノ随伴ウイルス(4.9%)、レンチウイルス(2.9%)などのウイルスベクターが全体の半数以上を占め、DNA(18.3%)、リポフェクション(5.9%)など非ウイルスベクターを大きく上回っている(Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, [www/wiley.com](http://www.wiley.com))。非ウイルスベクターはウイルス由来でないという意味で安全性が高く、化学的に均一で免疫原性が低い利点が挙げられるが(Mintzer et al., 2008)、細胞毒性が強い、導入効率が低く長期間の安定導入が難しいといった欠点があり、現時点ではウイルスベクターの優位性が高いことは臨床研究実施例が多いことが示している。

ウイルスベクターの選定において、対象疾患や治療方法によって最適なベクターの性質は異なり、細胞指向性、トランスジーンのサイズ、*in vivo*か*ex vivo*かなど、治療方針にあったベクターの選択が必要になる。酵素補充療法を目的とした*ex vivo*遺伝子治療では治療遺伝子をゲノムに安定導入させる必要があり、この場合に候補として挙げられるのはガンマレトロウイルスベクターとレンチウイルスベクターである。レンチウイルスベクターは近年、臨床研究において実績が増しているベクターで、利点は分裂・非分裂細胞どちらの細胞にも遺伝子導入でき、標的細胞のレンジが広いことである。HIV、がん、サラセミア、副腎白質ジストロフィーの臨床研究で実際に使われ、パーキンソン病、アルツハイマー病など後天的要因の分泌型タンパク質の欠損による疾患に対しても研究が行われている(Cartier et al., 2009)。しかしベクターを産生するマスターセルバンクの維持ができないなど課題もあり、将来的にレンチウイルスベクターを含めた新しいベクターの利用について検討が必要であるが、現時点で本邦において治療法確立の実現性の高さからガンマレトロウイルスベクターを選択した。

本遺伝子治療で用いるガンマレトロウイルスベクター(レトロウイルスベクター)はモロニー Maus 白血病レトロウイルスをベースとしたベクターで、LTR とパッケージングシ

グナル( $\Psi$ )以外のウイルス由来遺伝子を含まない(図 3-1)。利点として、約 8kb までの比較的大きなサイズの遺伝子の発現が可能で、免疫原性が低く、標的細胞への安定導入が可能であり、20 数年間の *ex vivo* 遺伝子治療臨床研究における多くの実績がある。欠点としては核膜を通過できないため分裂細胞を標的にした *ex vivo* 遺伝子治療にしか使えないこと、細胞への遺伝子導入後 LTR のシトシンメチル化によるサイレンシング(Bestor et al., 2000)といった点があげられる。前述の通り、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入には細胞分裂が不可欠であり、増殖能の低い細胞に対しては導入効率が低くなる可能性がある。第 2 章で示したように ccdPA は増殖能に優れるが、どの程度の導入効率が得られるかは実際に検討してみなければ分からない。本章では、ccdPA への *LCAT* 遺伝子導入法の検討、*LCAT* 遺伝子導入前脂肪細胞(ccdPA/*LCAT*)の特性、本来肝細胞が発現・分泌する *LCAT* が ccdPA において機能的に発現・分泌可能なのか検討した。



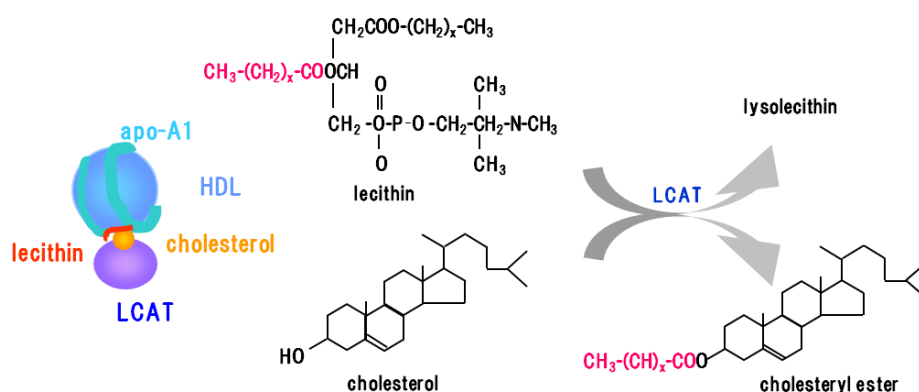
図表3-1 レトロウイルスベクターの調製

## 1-2. レシチン:コレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT)

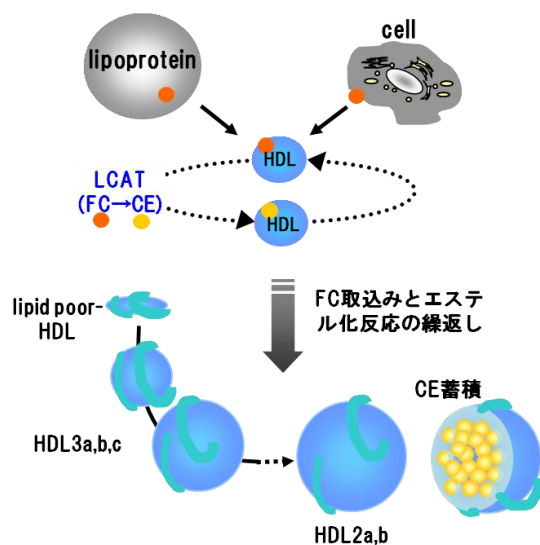
LCAT は染色体 16q22.1 に存在する 416 アミノ酸から成る分子量 65kDa の糖タンパク質で、主に肝臓で作られて血中へ分泌され、レシチンの $\beta$ 位の不飽和脂肪酸をコレステロールの 3- $\beta$ -OH へ移動しコレステロールエステル生成する酵素である(図表 3-2)。健常人の LCAT の血中濃度は 6~8 $\mu$ g/mL で、薬や食事による変動が比較的少ないとされている。リポ蛋白に対する LCAT 活性は 2 種類に分類され、HDL を対象とした場合を $\alpha$ 活性、LDL の場合を $\beta$ 活性という。LCAT の 7 割は HDL で働いていると言われており、HDL のメインアポリポタンパクであるアポリポ蛋白-A1(apo-A1)によって活性化される。アミノ酸配列から類推される LCAT の立体構造は、7 つの平行した $\beta$ シートを 4 つの $\alpha$ ヘリックスがつないでいる立体構造をとっており、active site と呼ばれる立体構造上重要なアミノ酸 Ser181、His377、Asp345 に変異が起きると活性に影響することが知られている。またエステル化反応が起きる際に LCAT の 50 から 70 アミノ酸は基質との結合、151~174 はリン脂質と apo-A1 との結合、123~228 は apo-A1 活性化と脂質との結合に重要であるとされている (Peelman et al., 1998, Santamarina-Fojo et al., 2001)。

LCAT 活性のうち $\alpha$ 活性が失われた場合を魚眼病(Fish eye disease, FED)、 $\alpha$ 及び $\beta$ 活性を欠損している場合を家族性 LCAT 欠損症(Familial LCAT deficiency, FLD)という両病態ともに $\alpha$ 活性を欠くため、患者血清リポ蛋白中には HDL 及び HDL コレステロールエステルはほとんど検出されない。また FLD においては通常は認められない形状・サイズの LDL が観察される (Norum et al., 1975)。LCAT 欠損症患者血清に対して LCAT 遺伝子を導入した ccdPA から産生されたリコンビナント LCAT が遊離コレステロールをエステル化し、リポ蛋白プロファイルを改善する活性を保持しているかどうか検討した。

### a. HDLの構造とLCATの酵素反応



### b. LCATによるHDL粒子の成熟化



図表3-2 LCATの働きとHDL成熟化

(a)HDLはトリグリセリド(TG)、コレステロールエステル(CE)を核として、親水性のリン脂質膜にapo-A1や他のタンパク質が共存した構造をしている。LCATは主にHDLで機能すると言われており、apo-A1によって活性化されたLCATは遊離コレステロール(FC)をエステル化し、疎水性となったCEがHDLの中心部へ移動する。

(b)生体内ではHDLが抹消細胞から回収したFCをLCATがエステル化する反応が繰返されることでHDL粒子はサイズが大きくなる。血清を使った*in vitro*の無細胞実験系では共存する他のリポ蛋白がFCの供給源となる。

## 第 2 節 材料と方法

### 2-1. 試薬等

#### 2-1-1. 細胞培養・遺伝子導入・分化誘導

細胞培養には DMEM-HAM F-12、L-ascorbic acid、TrypZean、リン酸緩衝生理食塩水 [PBS] (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)、Fetal Bovine Serum[FBS] (SAFC Biosciences, Lenexa, KS, USA)、MesenPRO RS Medium、OPTI-MEM I、L-Glutamine、Insulin-Transferrin-SeleniumX(Gibco/Lifetechnologies, CA, USA)、硫酸ゲンタマイシン (Schering-Plough K.K., Osaka, Japan) を使用した。遺伝子導入にはヒト *LCAT* 遺伝子搭載レトロウイルスベクター (TAKARA BIO INC., Shiga, Japan)、補助試薬として硫酸プロタミン (Mochida pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan) を使用した。分化には脂肪細胞分化培地 (Lonza, Allendale, NJ, USA) を使用した。

#### 2-1-2. 細胞染色

固定に 4% パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液 [4% PFA] (Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan)、LCAT 検出試薬として抗 LCAT 抗体 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)、Alexa Fluor568 goat anti-rabbit IgG(H+L)、Goat Serum (Invitrogen/Lifetechnologies, CA, USA)、Bovine serum albumin[BSA]、VECTASHIELD mounting medium for Fluorescence with DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)、細胞内油滴染色に Oil Red O (Chemicon/Millipore, Billerica, MA, USA) を使用した。

#### 2-1-3. トリグリセリド定量

細胞ライセート抽出試薬として Tris-HCl バッファー (Invitrogen/Lifetechnologies, CA, USA)、EDTA 溶液 (GIBCO/Lifetechnologies, CA, USA)、2-メルカプトエタノール (Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan)、Tween20 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)、トリグリセリド定量は LabAssay Triglyceride GPO/DAOS method (Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan) を使用した。



#### 2-1-4. 免疫沈降・ウェスタンブロット(培養上清)

LCAT 検出試薬として、抗 LCAT 抗体(Epitomics Inc., Burlingame, CA, USA)、抗 LCAT 抗体(Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)、Rabbit ExactaCruz F (SantaCruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)、Laemmli Sample Buffer、Precision Plus Protein Standards、10%acrylamide gel、nitrocellulose membrane 0.45 $\mu$ m、SDS-PAGE バッファ、Tris-Glycine バッファ、Tris-Buffered Saline(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)、スキムミルク(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、ECL western blotting detection reagents (Amersham Biosciences/GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)、メタノール(Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan)、LCAT の陽性コントロールとしてヒト HDL(Calbiochem/Merck Millipore, Billerica, MA, USA)を使用した。

#### 2-1-5. 免疫沈降・ウェスタンブロット(血清)

血清中 LCAT の検出試薬として Nonidet P-40 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、抗 LCAT 抗体(Epitomics Inc., Burlingame, CA, USA)、抗 LCAT 抗体(Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)、TrueBlotTM anti-Rabbit Ig IP Beads、TrueBlot anti-Rabbit IgG HRP(eBioscience, San Diego, CA)、recombinant human LCAT (Roar Biomedical, Inc., NY, USA) or human plasma HDL (Calbiochem/Merck, Darmstadt, Germany)、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific Inc., Rockford, IL, USA)を使用した。

#### 2-1-6. リアルタイム PCR

DNA 抽出には DNeasy(QIAGEN, Hilden, Germany)、リアルタイム PCR には SYBR Premix Ex Taq(perfect RealTime) kit、Retrovirus Titer Set (TAKARA BIO INC., Shiga, Japan)を使用した。

#### 2-1-7. フローサイトメーター用蛍光標識抗体

細胞表面マーカー検出用として、抗 CD31、CD90、CD10、CD73、CD59、CD29、CD106、CD44、CD146、HLA-ABC (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)、抗 CD13、CD9、CD34、CD36、CD45、CD49d、CD117、CD54、CD65 (Beckman-Coulter, Indianapolis, IN, USA)、抗 CD105(Ancell Corporation, Bayport,

MN, USA)を使用した。

#### 2-1-8. LCAT 活性測定

LCAT 活性測定試薬として、LCAT 活性測定キット”アナソルブ LCAT”(Daiichi Pure Chemicals, Tokyo, Japan)、 $[^3\text{H}]$ コレステロール(60 Ci/mmol, 1mCi/ml, ARC, Saint Louis, Mo, USA)、apolipoprotein-A1[apo-A1](Athens Research & Technology, Athens, GA, USA)、ヘキサン、酢酸、クロロホルム、メタノール(Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan)、エチルエーテル、コレステロール、コレステリルオレイン酸(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)、ヨウ素、Clear-sol II (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、TLC プレート(AL SIL-G/UV, Whatman, Kent, UK)を使用した。

#### 2-1-9. サイトカイン検出及び定量

抗体アレイは Human Cytokine Antibody Array C series 2000 (RayBio, Norcross, GA, USA)を使用した。サイトカイン定量 ELISA として、MCP-1、Pref-1、IL-6、TIMP-1、uPAR、MMP-3(R&D systems, Minneapolis, MN, USA)、Resistin(B-Bridge, Cupertino, CA, USA)、PAI-1(HYPHEN-BioMed, Neuville-Sur-Oise, France)、IL-8(RayBio, Norcross, GA, USA)、GRO $\beta$ (IBL, Gunma, Japan)、TIMP-2、MMP-1(GE Healthcare, Piscataway, NJ, US)を使用した。

#### 2-1-10. タンパク質非変性電気泳動(Native-PAGE)及びウェスタンブロット

電気泳動試薬及びウェスタンブロット試薬として、アガロース、バルビタール、スクロース(Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan)、ホウ酸、ブロモフェノールブルー(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、TrizmaBase、EDTA(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)、5-20%Acrylamide gradient gel、PVDF membrane 0.2 $\mu\text{m}$ (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)、SuperSignal(Thermo Scientific Inc., Rockford, IL, USA)、抗ヒト apo-A1 抗体((Calbiochem/Merck Millipore, Billerica, MA, USA)を使用した。

#### 2-1-11. コレステロール定量

血清コレステロール定量には HDL and LDL/VLDL Cholesterol Quantification Kit (BioVision, Inc., CA, USA)を使用した。

## 2-2. 前脂肪細胞・血清の調製

### 2-2-1. 前脂肪細胞(ccdPA)

第 2 章に従って健常人ボランティアから提供された脂肪組織から調製した。

### 2-2-2. 血清

健常人及び LCAT 欠損症患者より同意を得て採血し、室温で 30 分放置した後、3000rpm、15 分、室温で遠心して上清を回収した。

## 2-3. レトロウイルスベクターの調製

HepG2 細胞から得られた cDNA ライブラリーよりヒト *LCAT* 遺伝子をクローニングし、これをもとに *LCAT* 遺伝子搭載レトロウイルスベクター製造をタカラバイオに委託した。概略を以下に示す。pDON-AI プラスミドに *LCAT* 遺伝子を組み込み、Kozak 配列及び終止コドンを挿入し Neo 耐性遺伝子を削除した(pGCThLCAT プラスミド)。これを GP+E-86 パッケージング細胞にトランスフェクションして産生される *LCAT* 搭載エコトロピックレトロウイルスベクターを GP+envAM-12 パッケージング細胞へインフェクションし、クローニングしてマスターセルバンクとした。この細胞から得られる培養上清を *LCAT* 遺伝子搭載レトロウイルスベクターとして使用した(図表 3-1)。

## 2-4. レトロウイルスベクターによる ccdPA への *LCAT* 遺伝子導入と継代培養

第 2 章で記述した方法に従って細胞を採取した。DMEM Ham F-12/ 20%FBS 培地で播種して 24 時間培養した後、*LCAT* 遺伝子搭載レトロウイルスベクターを硫酸プロタミンとともに培地へ加えた。24 時間暴露培養後レトロウイルスベクターを除去し、培地を MesenPRO へ変えて継代した。遺伝子導入条件は図表 3-3 に記載した。

## 2-5. LCAT タンパク質免疫染色

*LCAT* 遺伝子導入 ccdPA を 8 ウェルチャンバースライドにウェル当り  $5 \times 10^3$  個播種して 1 日培養した。PBS で細胞を洗浄し 4% パラホルムアルデヒド(PFA)で固定した後、0.1% TritonX-100/ 4% PFA で細胞膜透過処理を室温で 30 分行った。6% BSA/ 50% GoatSerum/ 0.1% TritonX-100 でブロッキング処理を 4°Cで一晩行った後、抗 LCAT 抗

体を 4℃で一晩反応させ、洗浄後に蛍光色素標識抗体を室温で 30 分反応させた。DAPI を含むマウント液で細胞を保定し、蛍光顕微鏡で観察した(DM2500、Leica Microsystems、Wetzlar、Germany)。

#### 2-6. コピー数測定

プロトコールに従ってで *LCAT* 遺伝子導入 ccdPA から DNA を抽出し、100ng をテンプレートとしてリアルタイム PCR を行った(ABI7500、Applied Biosystems、CA、USA)。細胞あたりの平均 *LCAT* 遺伝子導入コピー数は、細胞ひとつの DNA 含有量を 6ng として計算した。

#### 2-7. 脂肪分化誘導・染色・トリグリセリド定量

*LCAT* 遺伝子導入 ccdPA と非導入 ccdPA をそれぞれ 48 ウェルプレートに 1 ウェルあたり  $3.5 \times 10^4$  個播種して 3 日培養し、脂肪分化培地に交換して 2 週間分化誘導した。それぞれの細胞から lysis バッファ (50mM Tris-Cl/ 1mM EDTA/1mM 2-mercaptoethanol/ 0.01% Tween20) でライセートを調製し、トリグリセリド濃度とタンパク濃度を測定した。測定値はトリグリセリド濃度をタンパク質濃度で除算してノーマライズした。また、脂肪分化させた細胞を 4% PFA で 10 分固定した後 Oil Red O で 10 分染色した。

#### 2-8. LCAT タンパク質の検出(免疫沈降-ウェスタンブロット、IP-WB)

ExtraCruz F 付属の IP マトリックスをプロトコールに従って、抗 LCAT 抗体(Epitomics)を加え 4℃で 2 時間反応させた。遠心して上清を捨て PBS で洗浄した後、*LCAT* 遺伝子導入細胞の培養上清を加えて混和しながら 4℃で一晩反応させた。遠心して上清を除いた IP マトリックスに Laemmli Sample Buffer を加え 100℃で加熱した後、遠心して上清を回収し、同様のタンパク質変性処理を行ったヒト HDL とともに 10% アクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行った。これをニトロセロース膜へ転写し、5% スキムミルク/TBS/ 0.1% Tween で 30 分ブロッキングしたあと洗浄し、抗 LCAT 抗体(Novus)を 4℃で一晩反応させた。メンブランを洗浄後、ExtraCruz F 付属の標識二次抗体を室温で 1 時間反応させた後、化学発光試薬を用いて rLCAT を検出した(LAS-1000、Fujifilm、Tokyo、Japan)。

## 2-9. 血清中 LCAT タンパク質の検出 (IP-WB)

血清は 0.2%Nonidet P-40 で希釈し、抗 LCAT 抗体(Epitomics)を加えて 4℃で一晩反応させた。これに抗ウサギ IgG IP Beads を加え、4℃で 2 時間反応させた。ビーズを回収し 0.2%NP-40/PBS で洗浄したのち、Laemmli sample buffer を加え加熱してタンパク質を変性させたのち、抗 LCAT 抗体(Novus)、HRP 標識抗ウサギ抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

## 2-10. LCAT 活性測定

[<sup>3</sup>H]Cholesterol 3.33nmol と”アナソルブ LCAT”付属の基質溶液 5mL(組成:コレステロール 2.74nmol、ジミリスチルフォスファチジルコリン 8.26nmol、EDTA-Na 溶液)を混ぜて超音波で処理し、[<sup>3</sup>H]cholesterol 含有基質溶液とした。測定サンプルは、培養上清はそのまま、血清は PBS で 10 倍希釈して 100μL を用いた。基質溶液とサンプルを等量混合し、終濃度 65mM 2-メルカプトエタノール、終濃度 36μg/mL apo-A1 になるように加え、37℃で 1 時間反応させた。反応終了後、クロロホルム:メタノール(2:1)を加えて混合した後、蒸留水を添加してさらに混合した。これを遠心(3000rpm、室温)して上清を除去し、有機層 50μL を 10 回に分けて TLC プレートにスポットした。乾燥したのち、展開液(ヘキサン:エチルエーテル:酢酸=146:50:4)で展開し、ヨウ素でコレステロールエステルを染色した。染色された部分を削り取りシンチレーションカウンターで測定した。

## 2-11. ccdPA 分泌サイトカイン測定

### 2-11-1. 抗体アレイ

ccdPA の培養上清をサンプルとして添付プロトコールにしたがって検出を行った。

### 2-11-2. ELISA 定量

ccdPA と LCAT 遺伝子導入 ccdPA の培養上清を回収し、適宜希釈して MCP-1、Resistin、Pref-1、PAI-1、IL-6、IL-8、GROβ、TIMP-1、TIMP-2、uPAR、MMP-1、MMP-3 を添付プロトコールに従って定量した。測定値は遺伝子導入細胞の値を遺伝子非導入細胞の値で除算し、パーセントで表示した。

## 2-12. LCAT 欠損症患者血清への rLCAT 添加実験

### 2-12-1. rLCAT 添加・インキュベーション実験

LCAT 遺伝子導入 ccdPA を無血清培地で 3 日間培養し、培養上清を限外ろ過にて (MWCO=50kDa) で 50 倍濃縮したものを rLCAT として使用した。陰性コントロールとして遺伝子を導入していない ccdPA の培養上清を同様に調製した。血清に rLCAT を添加し 37°C で 24 時間インキュベートした。血清は使用時まで -80°C で保存した。

### 2-12-2. タンパク質非変性ウェスタンブロット

血清 0.25 $\mu$ L をローディングダイ(7.3% sucrose/ 0.06% EDTA/ 0.01% BPB)で希釈し、5-20% グラジエントアクリルアミドゲルでタンパク質非変性条件で電気泳動した(90mM Tris/ 80mM Boric Acid/ 3mM EDTA、pH8.3、100V、4°C、16 時間)。これを PVDF 膜に転写し、抗 apo-A1 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

### 2-12-3. 二次元電気泳動-ウェスタンブロット(タンパク質非変性条件)

血清 1 $\mu$ L を 0.7% agar、50mM Barbitol-buffer、pH8.6 で泳動し(250V、4°C、18 分)、このゲルを 5-20% アクリルアミドゲルにロードして電気泳動した。これを PVDF 膜へ転写して抗 apo-A1 抗体でウェスタンブロットを行った。

### 2-12-4. コレステロールエステル定量

血清 HDL のコレステロールエステル量を添付プロトコールに従って測定した。

### 2-12-5. 血清のゲルろ過解析

健常人、LCAT 欠損症患者の血清リポ蛋白粒子をサイズごとに 20 のフラクションに分画し、各フラクションに含まれる総コレステロール、トリグリセリド、遊離コレステロール、リン脂質を測定した。

## 2-13. 統計処理

平均値 $\pm$ SD として表記した有意差検定は SPSS ver11.0(IBM, IL, USA)を用いて Student's t-test または分散分析を行い、その後の検定に Tukey test を行った。 $p$  値 $<0.05$  は統計的に有意差ありとした。

### 第 3 節 結果

#### 3-1. *LCAT* 遺伝子導入と継代培養

ccdPA 細胞数に対するベクター比(MOI、multiplicity of infection)、硫酸プロタミン(遺伝子導入補助試薬)濃度、ベクター暴露回数の条件を変えて遺伝子導入を行い(図表 3-3)、細胞あたりの平均 *LCAT* 遺伝子導入コピー数が 0.91~1.73 の細胞が得られた。細胞あたりの *LCAT* 遺伝子コピー数と *LCAT* タンパク質発現陽性細胞の割合との相関は認められなかった( $r^2=0.043$ )が、培養上清に分泌された r*LCAT* タンパク質量はコピー数と相関関係が認められ( $r=0.95$ )、少なくとも導入コピー数が 1.73 までの細胞では、コピー数増加に伴って r*LCAT* 発現量が増加した(図表 3-4)。

*LCAT* 遺伝子導入 ccdPA を継代培養し適宜回収してコピー数を測定したところ、導入 8 日目以降は平均コピー数が安定して推移した。遺伝子を導入した細胞としていない細胞を同じ条件で継代したところ、増殖能に違いは認められなかった(図表 3-5)。

#### 3-2. 脂肪分化能

*LCAT* 遺伝子を導入した ccdPA と導入していない細胞を同じ条件で脂肪分化誘導した。Oil Red O 染色による細胞内油滴の染色像、トリグリセリド量はほぼ同じで、遺伝子導入によって脂肪細胞への分化能が低下している、あるいは亢進している様子は認められなかった(図表 3-6)。

#### 3-3. 細胞表面抗原

*LCAT* 遺伝子を導入した ccdPA としていない細胞の表面抗原を調べた。陽性マーカーは CD9、10、13、29、44、59、73、90、105、146、HLA-ABC、弱陽性マーカーは CD49d、54、65、106、陰性マーカーは CD31、34、45、117 で、遺伝子導入前後で細胞表面抗原プロファイルに違いは認められなかった(図 3-7)。

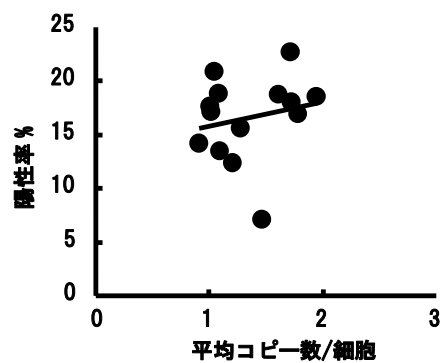
	<i>LCAT</i> 遺伝子導入時の培養条件	MOI(Multiplicity of Infection)	硫酸プロタミン μg/mL
1	基本条件	25000	8
2	培養スケール9倍	25000	8
3	基本条件	16000	8
4	基本条件	10000	8
5	細胞採取後9日目	10000	8
6	細胞採取後8、9日目	10000+10000	8
7	基本条件	25000	4
8	基本条件	16000	4
9	基本条件	10000	4
10	細胞採取後9日目	10000	4
11	細胞採取後8、9日目	10000+10000	4
12	遺伝子導入なし	0	0

**図表3-3 *LCAT*遺伝子導入条件**

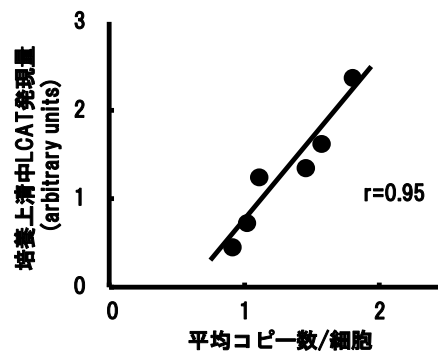
*LCAT*遺伝子導入条件を検討した。表中の基本条件とは導入日が天井培養終了翌日(8日目)、培養スケール $2.5 \times 10^5$ 個/25cm<sup>2</sup>を示している。



**a. 平均導入コピー数とLCAT発現細胞陽性率**



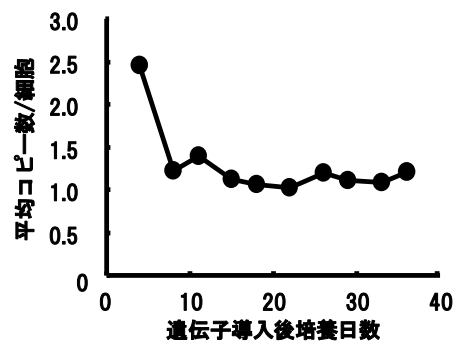
**b. 平均導入コピー数と培養上清中LCAT発現量**



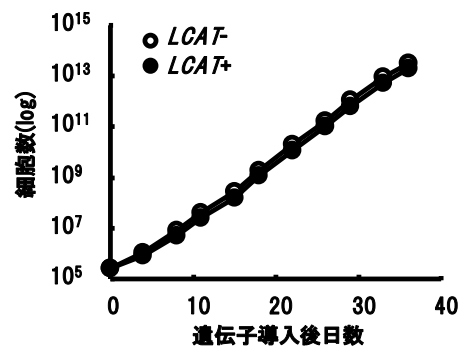
**図表3-4 *LCAT*遺伝子導入条件と陽性率及び平均コピー数**

(a)導入コピー数1～2では、LCAT発現細胞陽性率との間に相関関係は認められなかった。(b)導入コピー数と培養上清中に分泌されるrLCAT量には正の相関が認められた。

### a. 導入コピー数の推移



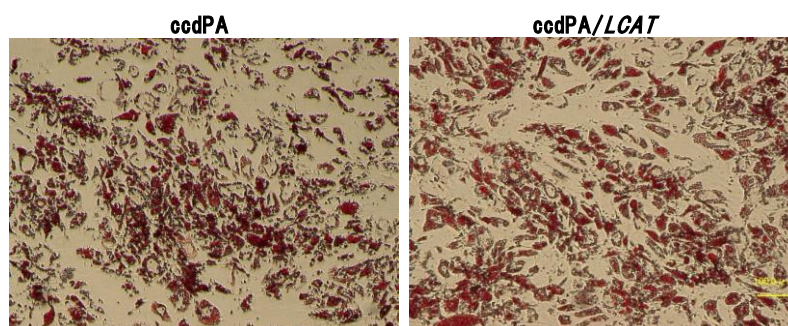
### b. 導入細胞と非導入細胞の増殖



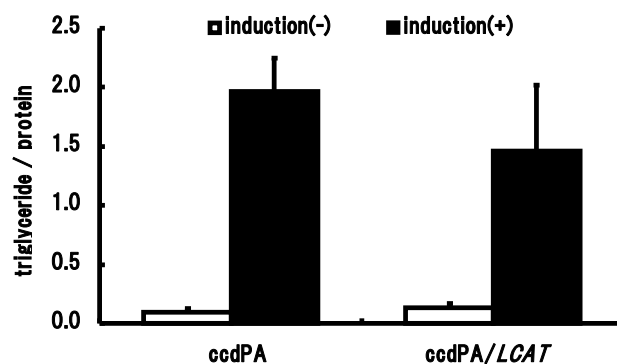
図表3-5 *LCAT*遺伝子導入細胞のコピー数と増殖

(a) 細胞あたりの*LCAT*遺伝子コピー数は導入から8日目以降は安定して推移することが分かった。(b)遺伝子非導入細胞と導入細胞との増殖能の違いは認められなかった。

**a. 脂肪分化細胞のOil Red O染色像**

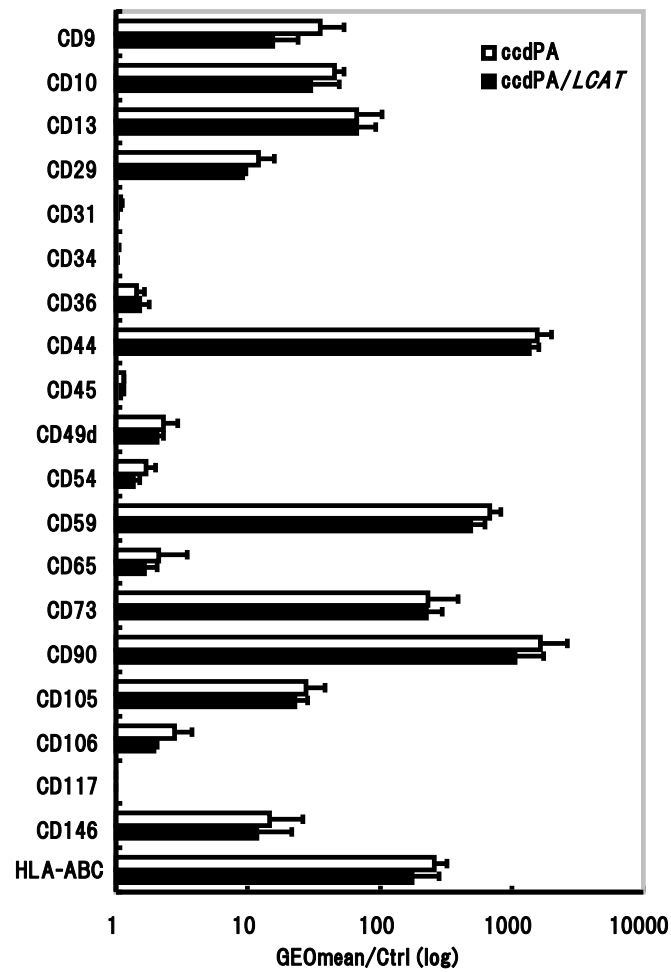


**b. 細胞内トリグリセリド量**



**図表3-6 *LCAT*遺伝子導入細胞の分化能**

(a)同じ継代数の*LCAT*遺伝子導入細胞と非導入細胞を脂肪分化誘導試薬で2週間分化した。(b)細胞ライセート中に含まれるトリグリセリド量を測定したところ、*LCAT*遺伝子導入・非導入細胞で有意差は認められなかった。



**図表3-7 遺伝子導入前後の細胞表面抗原**

*LCAT*遺伝子導入細胞と非導入細胞の表面抗原を測定した。遺伝子導入が原因と考えられる変化は認められなかった。

### 3-4. 培養上清中に分泌されるサイトカイン

ccdPA の分泌サイトカインのパターンを調べるため培養上清に含まれるサイトカインを抗体アレイで調べたところ TIMP-1、TIMP-2、IL-8、uPAR、GRO $\beta$ 、Osteoprotegerin が検出された(データ省略)。アレイで検出が確認できたもの及び既に論文で報告されているサイトカインを追加し 12 種類、MCP-1、Resistin、Pref-1、PAI-1、IL-6、IL-8、GRO $\beta$ 、TIMP-1、TIMP-2、uPAR、MMP-1、MMP-3 を ELISA で定量し、遺伝子導入前後で比較した。遺伝子導入していない ccdPA に対して遺伝子導入 ccdPA のサイトカイン発現量は 61%~180%の幅が認められたが、過剰発現又は分泌されていたサイトカインが検出されなくなったということはなく、サイトカインの分泌パターンに変化はなかった(図 3-8)。

### 3-5. rLCAT タンパク質の検出と活性

LCAT 遺伝子導入 ccdPA が培養液中に分泌した rLCAT を免疫沈降ウェスタンブロットで検出した。rLCAT は健常人血中 LCAT と同じ分子量サイズに検出され、天然 LCAT と似た糖鎖修飾を持つことが推察された。また rLCAT のコレステロールエステル化能を調べたところ、タンパク量と活性量及び導入コピー数と活性量は正の比例関係にあることが確認できた(図表 3-9)。

### 3-6. LCAT 欠損症患者血清を使った rLCAT 活性の確認

図表 3-10-a の表にある LCAT 欠損症患者 8 名の血清中の内在性 LCAT を IP-WB 法で検出した(図表 3-10-b)。これらの血清に rLCAT を添加し、HDL の主要アポリポタンパクであるアポリポプロテイン-A1(apo-A1)を、タンパク質非変性条件電気泳動-ウェスタンブロットで検出した。HDL は粒子サイズの小さい方から HDL3(c、b、a)、HDL2(a、b)サブクラスに分けられ、健常人血清では全てのサブクラスに HDL が検出された。しかし LCAT 欠損症患者血清では、粒子サイズの小さい HDL3c、HDL3b には検出されたが、粒子サイズが大きい HDL3a、HDL2b、HDL2a が欠落していることが確認できた(図表 3-11-a)。

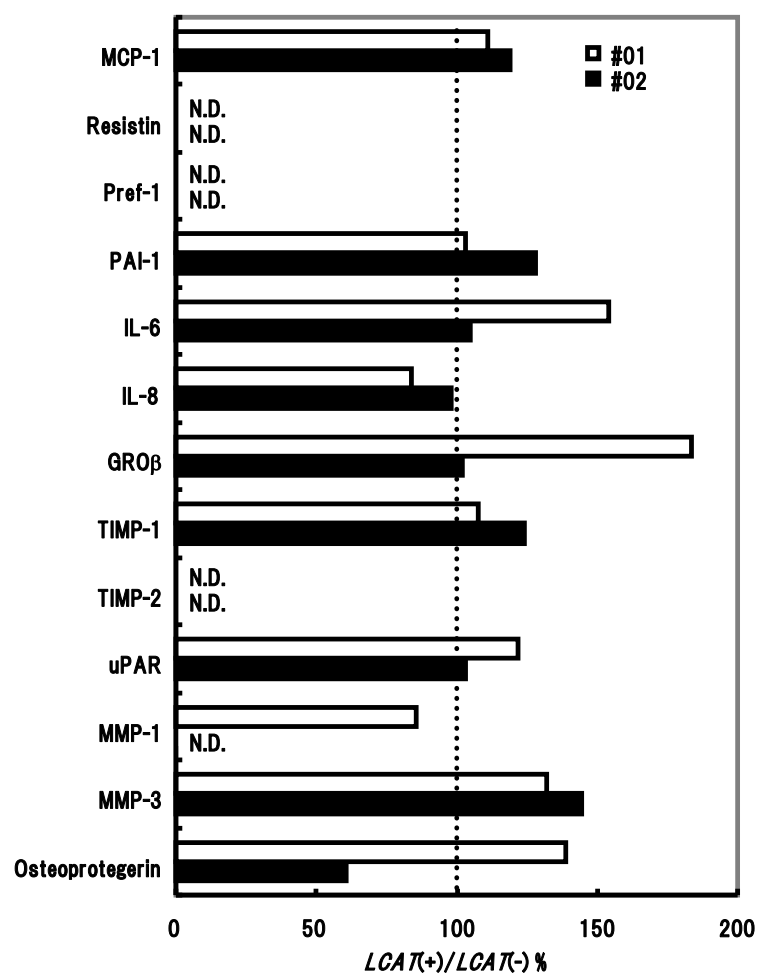
LCAT 欠損症患者血清に LCAT 遺伝子導入 ccdPA 由来の rLCAT を添加して 37°C で 24 時間インキュベーションした血清サンプルは、添加した rLCAT 量に比例して HDL2 領域に apo-A1 が検出された。この血清サンプルから HDL を分離しコレステロー

ルエステル量を測定したところ、添加した rLCAT に比例してコレステロールエステルが増加し、ウェスタンブロットによる apo-A1 の検出領域の変化と一致していた(図表 3-11-b、c)。rLCAT を予め 56°C・30 分処理して不活化した場合にはこの現象は認められなかった。

さらに、rLCAT を添加した LCAT 欠損症患者血清(FED、FLD 各 2 例)を二次元電気泳動で分離してウェスタンブロットで apo-A1 を検出した。一次元電気泳動ウェスタンブロットの場合と同様に、病態の違いとは関係なく rLCAT の作用により LCAT 欠損症患者血清にサイズの大きな HDL が検出された(図 3-12)。

健常人(n=4)、FED( $\alpha$ 活性欠損、n=4)、FLD 患者( $\alpha$ 及び $\beta$ 活性欠落、n=3)の血清のゲルろ過解析を行い、リポ蛋白粒子をサイズ毎に 20 分画に分けてそれぞれのフラクションに含まれる総コレステロール(TC)、トリグリセリド(TG)、リン脂質(PL)、遊離コレステロール(FC)を測定した(CE は TC から FC を引いた値)。FED、FLD 患者血清には HDL に相当するピークが検出されず、全体に TG が高い傾向が認められた(図表 3-13)。これらの血清に rLCAT を添加し 37°C で 24 時間インキュベーションした血清サンプルについて、同様にゲルろ過解析を行った。FED、FLD ともに HDL コレステロールエステル比が増加し、FLD は LDL コレステロールエステル比も増加した(図表 3-14-a)。

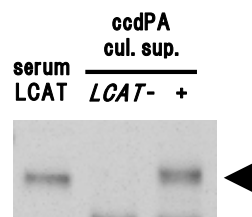
rLCAT の添加によって変化した脂質の割合を調べるため、rLCAT を添加した血清サンプルと添加していない血清サンプル値との TG、PL、FC、CE 測定値の差を各フラクション毎に計算し、総脂質量(TC + TG + PL)に対する割合で示した。FED は Fr.6-7(VLDL 領域)で脂質量の減少が認められ Fr.9-10(LDL 領域)、Fr.17-18(HDL 領域)で増加が認められた。FLD 血清では Fr.3-8(VLDL 領域全体)で脂質の減少が認められ、Fr.7-9(LDL 領域)、Fr.16-18(HDL 領域)で脂質の増加が認められた。また、FLD 血清に特徴的に検出されるフラクション 12~16 のリン脂質/遊離コレステロール豊富なピークが(図表 3-13&14-b、\* 印)が rLCAT を添加することにより有意に減少した。



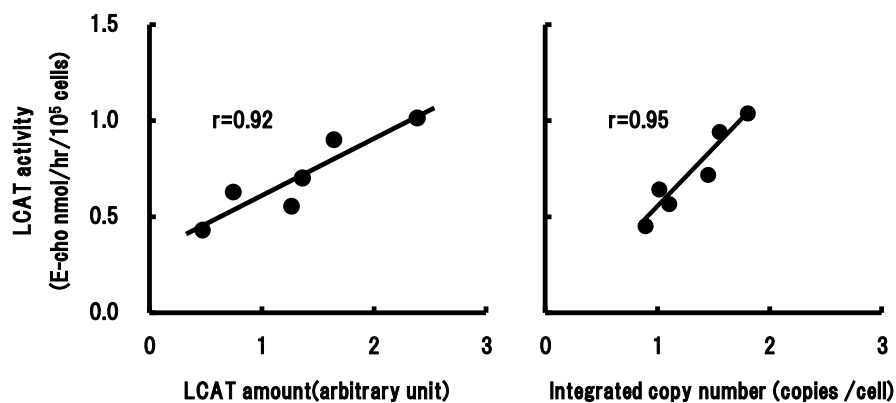
**図表3-8 培養上清中サイトカイン**

*LCA* 遺伝子導入ccdPAと導入していない細胞の分泌サイトカインを比較した。*LCA*π(+)の測定値を*LCA*π(-)測定値に対するパーセンテージで示した。健常人ccdPA #01、#02。

### a. rLCATタンパク質の検出



### b. rLCATタンパク質、導入コピー数と活性



図表3-9 ccdPA/*LCAT*由来rLCATタンパク質と活性

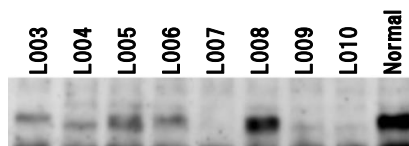
(a) ccdPA/*LCAT*由来のrLCATは血清中LCATと同じ分子量サイズに検出された。  
 (b) 人エリポソームでrLCATのコレステロールエステル化活性を測定した。  
 rLCATはエステル化活性を有し、rLCAT発現量及び細胞あたりの*LCAT*遺伝子導入コピー数と相関していた。



### a. 検討に使用したLCAT欠損症患者血清リスト

	activity		mutation	activity (%normal)	sex	age	No.
	$\alpha$	$\beta$					
魚眼病 Fish Eye Disease (FED)	-	+	T123I	3.1	M	38	L003
			T123I/V309M	1.0	F	30	L005
			W75S/T123I	3.1	M	36	L006
			T123I	2.0	M	58	L008
家族性LCAT欠損症 Familial LCAT deficiency (FLD)	-	-	G179R	1.9	F	63	L004
			C313Y	1.3	F	17	L007
			C313Y	—	F	12	L009
			C74Y	—	F	61	L010

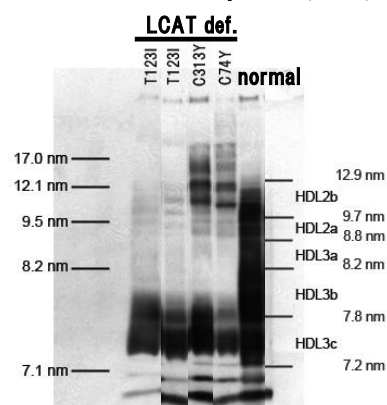
### b. LCAT欠損症患者血清中の内在性LCATの検出



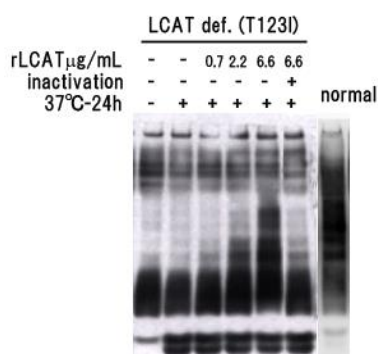
図表3-10 LCAT欠損症患者血清リスト及び血中LCAT

(a)rLCAT活性の検討に使用したLCAT欠損症患者血清リスト(b)患者血清中のLCATを免疫沈降-ウェスタンブロットで検出した。FEDは全て検出され、FLDは1検体のみLCATタンパク質を検出した。

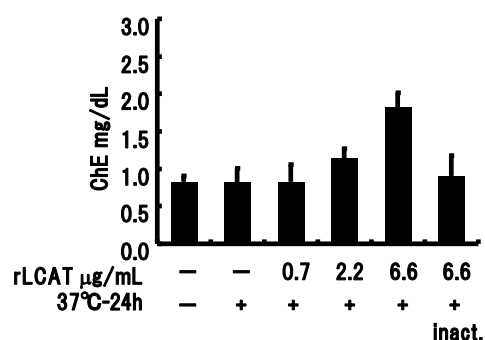
## a. LCAT欠損症患者血清のapo-A1(HDL)のパターン



## b. rLCATによるHDLの成熟化

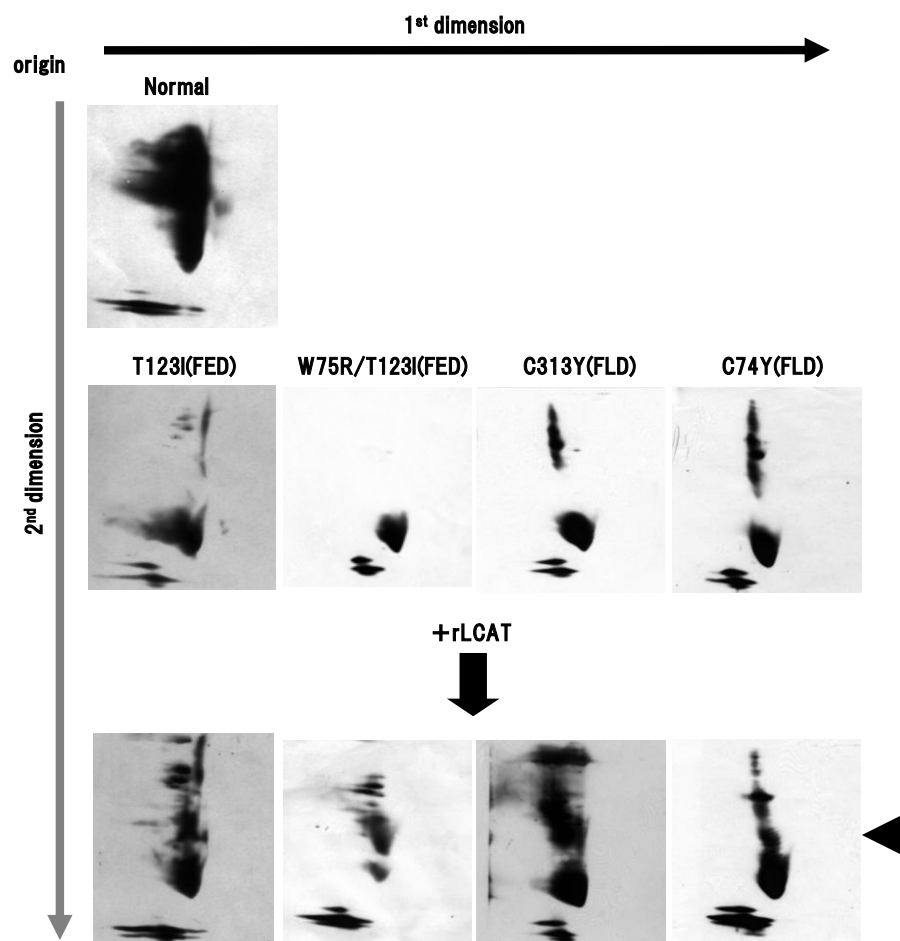


## c. HDLコレステロールエステル



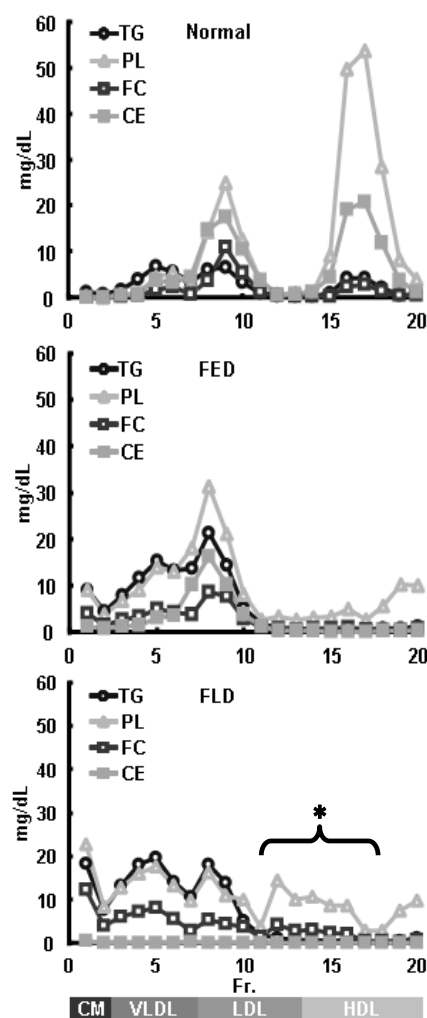
図表3-11 rLCATによるapo-A1(HDL)の変化

(a) LCAT欠損症患者及び健常人血清を非変性条件で電気泳動によりリポ蛋白を分離し、ウェスタンプロットでapo-A1を検出した(1D-WB)。マーカの位置からHDLサブクラスを推定したところ、健常人血清はapo-A1含有粒子(HDL)サイズに偏りは認められなかったがLCAT欠損症患者はHDL3c領域に集中していた。(b) FED(T123I)血清にrLCATを添加したサンプルの1D-WBを行った。患者血清中のapo-A1はrLCATによってHDL2領域に検出され、この変化には濃度依存性が認められた。(c) rLCATを添加した血清のHDLコレステロールエステル量を測定したところ濃度依存的に増加した。



**図表3-12 rLCAT添加LCAT欠損症患者血清の2D-WB**

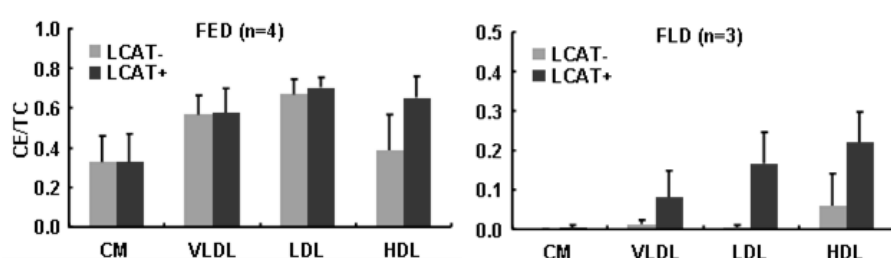
LCAT欠損症患者血清のFED2例、FLD2例にrLCATを添加した血清サンプルを二次元電気泳動で分離し、ウェスタンブロットでapo-A1を検出した。LCATの変異に関係なくFLD、FEDともにrLCATによるHDLの成熟化が確認できた。



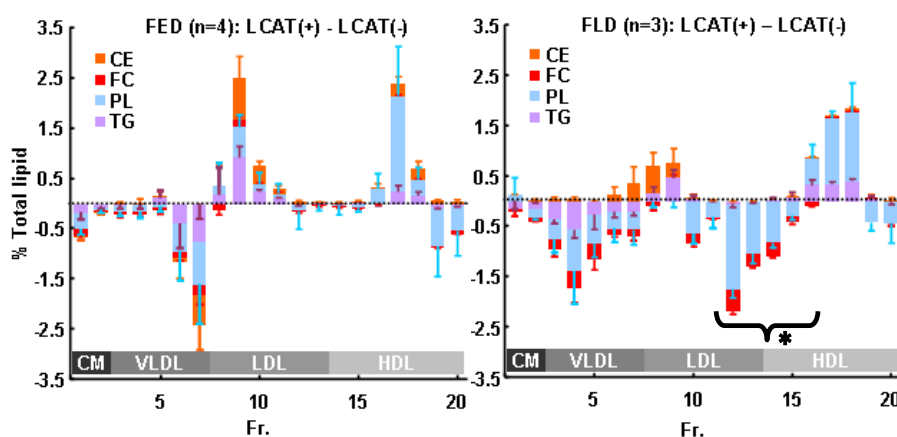
**図表3-13 血清リポ蛋白のサイズ分画解析**

健常人血清、魚眼病患者(FED,  $\alpha$ 活性欠損)血清、家族性LCAT欠損症(FLD,  $\alpha$ ,  $\beta$ 活性欠損)血清中リポ蛋白粒子のゲルろ過画解析を行った。20フラクションそれぞれに含まれるトリグリセリド(TG)、リン脂質(PL)、遊離コレステロール(FC)、コレステロールエステル(CE)を測定した。FED、FLDには全体的にTGが多く、HDL領域のピークが検出されなかった。

### a. rLCATによるコレステロールエステル比の変化



### b. FED、FLD血清に対するrLCATの影響



図表3-14 LCAT欠損症患者血清へのrLCATの影響

LCAT欠損症患者血清にrLCATを添加し37°Cで24時間インキュベーションしたサンプルのサイズ分画解析を行った。(a)FEDはHDLでコレステロールエステル比(CE比)が増加した。FLDではLDL、HDLでCE比の増加が認められた。(b)LCAT(+)サンプルとLCAT(-)サンプルとの値の差をLCAT(+)サンプルの脂質全体に対する割合で示した。FED血清ではVLDL領域で脂質の減少及びLDL領域で脂質の増加傾向が認められた。FLD血清ではVLDL領域での脂質の減少及びLDLのCE増加傾向が認められ、Fr.12~16のPL/FC-richなピークが有意に減少した(\*印)。FED、FLDともにHDL領域の脂質増加が認められた。

## 第 4 節 考察

### 4-1. ccdPA への *LCAT* 遺伝子導入

図表 3-3 の条件で行った遺伝子導入では、細胞当たり 1.73 コピーまで導入可能であり、この範囲においては導入コピー数と rLCAT タンパク質発現量との間に相関関係が認められた。最終的に細胞を移植した後、細胞が何らかの原因で失われる可能性を考慮すると、平均コピー数が同じである場合、少数の高コピー細胞よりも多数の低コピー数細胞であるほうが望ましいと言える。導入効率が低いからといって何度も遺伝子導入を行うことは、細胞へのダメージを増し、他の遺伝子の働きを阻害する可能性や、がん原遺伝子を活性化する確率を上げることになる。レトロウイルスベクターを使った *ex vivo* 遺伝子治療で代表的な例として挙げられる造血幹細胞へ遺伝子導入においては、導入効率を上げるために細胞分裂を促すサイトカインを培地に添加する。この方法によって遺伝子導入効率は改善するが、体内へ移植した遺伝子導入細胞がほとんど残らない場合があり、原因の一つとして遺伝子導入の際に使用したサイトカインが造血幹細胞の分化を促し、移植した細胞が幹細胞として定着しなかったのではないかと考えられている。(Giacca, 2010)。一方、ccdPA は増殖能に優れており複数回導入やサイトカインを添加しなくても 1 コピー前後の導入効率を得られ、さらに、たとえ移植後脂肪に分化したとしても長寿命といわれる脂肪細胞であるため、生着すれば長期発現が期待できると考えられた。

遺伝子導入方法を検討した結果、1 回の導入で平均 1 コピー/細胞となる条件を決定した。この方法で調製した *LCAT* 遺伝子導入前脂肪細胞(ccdPA/*LCAT*)は、細胞あたりのコピー数の推移が遺伝子導入 8 日目以降は安定して推移し、1 ヶ月経過しても増加・減少は認められなかった。導入した *LCAT* 遺伝子はゲノムに安定維持されていると共に、特定の遺伝子導入細胞が異常増殖能を獲得していないことが確認できた。レトロウイルスベクターはインテグレーションサイトをコントロール出来ないため、遺伝子導入による望ましくない細胞性質の変化は、実施の度に観察が必要である。しかし遺伝子導入を複数回行った結果、ccdPA/*LCAT* が異常増殖を示したり、細胞表面抗原、サイトカイン分泌、産生された rLCAT が元の細胞の性質を変えるといった現象は認められなかった。

#### 4-2. ccdPA 由来 rLCAT の活性

糖タンパク質の糖鎖修飾は発現させる細胞の種類によって異なることが知られているが、LCAT の場合は糖鎖の違いが活性に影響することが報告されている (Miller KR et al., 1998)。ccdPA/LCAT が培養上清中分泌した rLCAT は、健常人の血清 LCAT とほぼ同じサイズに検出されたことから、内在性 LCAT と似た糖鎖修飾を受けていると考えられた。

LCAT はコレステロールのエステル化反応を触媒する酵素であり、主に HDL で機能していると考えられている。HDL は apo-A1 とリン脂質からなる初期 HDL の状態から LCAT によって粒子内部にコレステロールエステルを蓄積することで成熟 HDL となり、粒子サイズが増すことが知られている (Sorci-Thomas et al., 2009)。リポ蛋白は HDL、LDL、VLDL それぞれに特徴的なアポリポタンパク質の組合せがあり、HDL のメインアポリポタンパク質は apo-A1 である。apo-A1 のほとんどは HDL に結合しているため、apo-A1 の変化は、ほぼ HDL の変化としてとらえることができる。HDL にはサブクラスがあり、アポリポ蛋白組成の違いによる分類の他、グラジエントゲル解析による粒子サイズ毎のサブクラスがあり、大きい順から HDL2b、2a、3a、3b、3c と呼ばれている (Blanche et al., 1981)。グラジエントゲルによる血清リポタンパク粒子の分離及びウェスタンブロットによる apo-A1 検出を行った結果、健常人は全てのサブクラスに HDL が検出されたが、FED、FLD とともに LCAT の  $\alpha$  活性を欠損しているため、サイズの大きな HDL2b、2a、3a を検出しなかった (図表 3-11-a)。そこでこの LCAT 欠損症患者血清を用い、ccdPA 由来 rLCAT が血中 HDL 上で機能するのか調べた。血清に rLCAT を添加し 24 時間、37°C でインキュベーションしたサンプルの apo-A1 の変化を検出したところ、粒子サイズの大きな HDL が出現した。apo-A1 の検出域の変化および HDL コレステロールエステル増加には rLCAT 濃度依存性が認められたことから、rLCAT の  $\alpha$  活性が HDL 成熟化に働いたと考えられた (図表 3-11)。二次元電気泳動による血清解析では、LCAT 欠損症患者血清のリポ蛋白プロファイルは健常人と全く違ったパターンを示すことが知られている (Asztalos BF et al., 2007)。rLCAT を添加した LCAT 患者血清を二次元電気泳動し apo-A1 を検出したところサイズの大きな HDL の出現が認められ、FLD、FED の病態に関係なく健常人のパターンに近くなった。In vitro における LCAT 活性及びリポ蛋白間のコレステロールの移動を調べた報告は既があり、カイロミクロン (CM) 又は VLDL と HDL3 に LCAT を混合してインキュベートすると HDL2 様のリポ蛋白

が出現することが報告されている (Zechner et al., 1987, von Eckardstein et al., 1995)。本章で行った rLCAT 添加実験においても、LCAT 欠損症患者血清中のリポ蛋白の間で同様の現象がおきていると考えられた。

本章で行った血清のゲルろ過解析は、血清リポタンパク粒子をサイズごとに 20 のフラクションに分け、大きい順に CM、VLDL、LDL、HDL として脂質濃度を測定する方法である。健常人と LCAT 欠損症患者血清の解析結果は全く違ったパターンを示した。通常、血中コレステロールのほとんどはエステル化された状態にあるため、健常人と比較して LCAT 欠損症患者血清のコレステロールエステル比 (CE/TC 比) は低い値を示すことが知られている。患者血清に rLCAT を添加した血清サンプルを解析したところ、HDL 分画では FLD 患者、FED 患者両方の血清で CE/TC 比の上昇、PL 増加が観察された。FLD 患者は  $\alpha$  活性欠損に加えて  $\beta$  活性をも欠損しているが、rLCAT を添加すると FLD 血清の LDL 分画で CE/TC 比の増加が認められたことから、rLCAT は  $\alpha$ 、 $\beta$  活性両方を保持していることが示された。LCAT 欠損症患者血清のゲルろ過解析を行った結果、いずれの FLD 患者血清においても、Fr.12~17 にリン脂質と遊離コレステロール豊富な特徴的なピークが検出され、これは健常人及び FED 患者では検出されなかった。Forte らは超遠心で FLD 患者の HDL を分画し電子顕微鏡で観察すると、形状が平べったく、HDL 同士が連なった構造をとっていることを報告したが (Forte et al., 1971)、この連なった HDL の幅が 15~20nm であり、Fr.12~17 のピークと粒子サイズが一致した。連鎖した HDL ではないかと推測されるピークは、rLCAT の作用によって有意に減少することが分かった。*In vitro* 検討において、rLCAT による LCAT 欠損症患者の血清プロフィールの改善が認められた。



## 第5節 小括

ccdPA への *LCAT* 遺伝子導入方法を確立し ccdPA/*LCAT* の性質を調べた結果、遺伝子導入による細胞表面抗原、サイトカイン分泌、分化能など細胞の性質に変化がないこと、本来肝臓で発現する *LCAT* を ccdPA で発現させた r*LCAT* は活性を保っており、*in vitro* 検討において *LCAT* 欠損症患者血清のコレステロールをエステル化することを確認した。臨床応用した際、患者血中において r*LCAT* はその機能を発揮できると考えられる。

## Referances

- Asztalos B.F., Schaefer E.J., Horvath K.V., Yamashita S., Miller M., Franceschini G., Calabresi L., 2007. Role of LCAT in HDL remodeling: investigation of LCAT deficiency states. *J Lipid Res.* 48(3):592–9. Epub 2006 Dec 20.
- Bestor T.H., 2000. Gene silencing as a threat to the success of gene therapy. *J Clin Invest.* 105(4):409–11.
- Blanche P.J., Gong E.L., Forte T.M., Nichols A.V., 1981. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta.* 665(3):408–19.
- Cartier N., Hacein-Bey-Abina S., Bartholomae C.C., Veres G., Schmidt M., Kutschera I., Vidaud M., Abel U., Dal-Cortivo L., Caccavelli L., Mahlaoui N., Kiermer V., Mittelstaedt D., Bellesme C., Lahlou N., Lefrère F., Blanche S., Audit M., Payen E., Leboulch P., l'Homme B., Bougnères P., Von Kalle C., Fischer A., Cavazzana-Calvo M., Aubourg P., 2009. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 326(5954):818–23.
- von Eckardstein A., Huang Y., Wu S., Funke H., Nosedá G., Assmann G., 1995. Reverse cholesterol transport in plasma of patients with different forms of familial HDL deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15(5):691–703.
- Forte T., Norum K.R., Glomset J.A., Nichols A.V., 1971. Plasma lipoproteins in familial lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency: structure of low and high density lipoproteins as revealed by electron microscopy. *J Clin Invest.* 50(5):1141–8.
- Giacca M., 2010. *Gene Therapy*, Springer.
- Grieger J.C., Samulski R.J., 2012. *Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and*

clinical applications. *Methods Enzymol.* 507:229–54.

Miller K.R., Wang J., Sorci-Thomas M., Anderson R.A., Parks J.S., 1996. Glycosylation structure and enzyme activity of lecithin:cholesterol acyltransferase from human plasma, HepG2 cells, and baculoviral and Chinese hamster ovary cell expression systems. *J Lipid Res.* 37(3):551–61.

Mintzer M.A., Simanek E.E., 2009. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem Rev.* 109(2):259–302.

Norum K.R., Glomset J.A., Nichols A.V., Forte T., Albers J.J., King W.C., Mitchell C.D., Applegate K.R., Gong E.L., Cabana V., Gjone E., 1975. Plasma lipoproteins in familial lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency: effects of incubation with lecithin: cholesterol acyltransferase in vitro. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 142:31–55.

Peelman F., Vinaimont N., Verhee A., Vanloo B., Verschelde J.L., Labeur C., Seguret-Mace S., Duverger N., Hutchinson G., Vandekerckhove J., Tavernier J., Rosseneu M., 1998. A proposed architecture for lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT): identification of the catalytic triad and molecular modeling. *Protein Sci.* 7(3):587–99.

Santamarina-Fojo S., Hoeg J.M., Assman G, Brewer H.B. Jr., 2001. Lecithin cholesterol acyltransferase deficiency and fish eye disease in: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Eds., McGraw-Hill Inc., New York, pp. 2817–2833.

Sorci-Thomas M.G., Bhat S., 2009. Thomas MJ. Activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by HDL ApoA-I central helices. *Clin Lipidol.* 4(1):113–124.

Yee M.S., Pavitt D.V., Richmond W., Cook H.T., McLean A.G., Valabhji J., Elkeles R.S., 2009. Changes in lipoprotein profile and urinary albumin excretion in familial LCAT deficiency with lipid lowering therapy. *Atherosclerosis.* 205(2):528–32.

Zechner R., Dieplinger H., Steyrer E., Groener J., Calvert D., Kostner G.M., 1987. In vitro formation of HDL-2 from HDL-3 and triacylglycerol-rich lipoproteins by the action of lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesterol ester transfer protein. *Biochim Biophys Acta*. 918(1):27-35.

## 第 4 章 *LCAT* 遺伝子導入前脂肪細胞の安全性と *in vivo* 細胞移植検討

### 第 1 節 序論

#### 1-1. *LCAT* 遺伝子導入前脂肪細胞(ccdPA/*LCAT*)の安全性

遺伝子治療の臨床応用を考える上で、安全性は第一に挙げられるべき項目と考えられる。もともと体内にあった細胞を人工的な環境で培養することで細胞の性質になんらかの影響を与える可能性があり、さらに遺伝子導入あるいは導入遺伝子産物が、細胞の性質に意図しない影響を与える危険性も考えられる。

本遺伝子治療で使用するレトロウイルスベクターに関して、深刻な事象が発生したとして X1-SCID 遺伝子治療において白血病を誘発した例があげられるが、原因として LMO2 の転写調節領域にインテグレーションが起きたため白血球の異常増殖につながったことが明らかにされた(Hacein-Bey-Abina et al., 2003)。これは造血幹細胞に対して、遺伝子導入効率を上げ増殖を促すために使ったサイトカインも少なからず影響していることが考えられる。レトロウイルスベクターによるインテグレーションはランダムであるとされているが、サイトカイン刺激した造血幹細胞では増殖に関連した遺伝子の転写開始領域に入りやすい傾向があることが分かっている(Cattoglio et al., 2007)。一方で、ADA-SCID の遺伝子治療では X1-SCID と同様のプロトコールで遺伝子治療が行われ、LMO2 遺伝子近くにインテグレーションが起きていた症例があるにも関わらずクローナル増殖は起きておらず、これまでに白血病の報告はない。これは ADA-SCID において導入した ADA 遺伝子がハウスキーピング遺伝子であるのに対し、X1-SCID において導入した共通 $\gamma$ 鎖が細胞の増殖に関する遺伝子であったことが違いを生じさせていると考えられている(Aiuti et al., 2007)。このことから同じプロトコールを用いても導入する遺伝子と標的細胞の組合せによって副作用が現れるかどうか異なることが分かる。*LCAT* 遺伝子は脂肪細胞に対して生存選択となるような性質は持たず、*LCAT* タンパク質によって発現細胞が優先的に増殖することは考えにくい。第 3 章で ccdPA/*LCAT* の特性として、増殖能、表面抗原、分泌サイトカイン、脂肪細胞分化能については元の ccdPA と変わらないことを示した。特に増殖能、継代による細胞当りのコピー数に関して変化しなかったことから、特定の遺伝子導入細胞が異常増殖能を獲得していないこ

とが確認できた。これは増殖を促進あるいは抑制する因子を活性化する場所に LTR が挿入されなかったことを示すとともに、導入した遺伝子産物(rLCAT)が周囲の ccdPA を増殖又は抑制するような変化を起こさなかったことを示している。遺伝子治療の最も重篤な副作用として最初に考えられることは遺伝子導入された細胞のがん化である。本章前半では特に細胞のがん化に着目して *in vitro*、*in vivo* 両面から安全性に関する検討を行った。

#### 1-2. *In vivo* 細胞移植検討

*LCAT* 遺伝子導入 ccdPA が培養液中に rLCAT を分泌し、活性を保持していることは第 3 章で述べたが、移植した細胞から分泌された rLCAT が効果を発揮するためには血流に乗らなければならない。そこで *LCAT* 遺伝子導入細胞を動物に移植し血中へ分泌されるかどうか *in vivo* で検討した。また、移植細胞から分泌されるタンパク質が長期に効果を持続するためには細胞が長期生着することが必須であり、これまでの動物移植実験報告から、効率的な細胞移植生着には適切な足場(scaffold)を選択することが必要である。そこで、臨床で組織接着剤として用いられているフィブリンゲルを使用して、*LCAT* 遺伝子導入細胞の移植生着に関する検討を行った。

## 第 2 節 材料と方法

特に但し書きがなければ、ヒト、マウス、サル前脂肪細胞の調製と培養及び *LCAT* 遺伝子導入は、第 2 章、第 3 章に記載した方法に従って実施した。

### 2-1. 試薬、動物等

#### 2-1-1. *ccdPA/LCAT* の軟寒天培地培養試験 (足場非依存性増殖能試験)

陽性コントロール細胞として HeLa S3 を使用した。培養には DMEM (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) に 10%FBS を追加した培地を使用した。軟寒天培地培養試験には CytoSelect 96-Well Cell Transformation Assay (CELL BIOLABS, INC., san diego, CA, USA)、DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham、7.5% Sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)、Fetal Bovine Serum (NICHIREI BIOSCIENCES INC., Tokyo, Japan) を使用した。

#### 2-1-2. *LCAT* 遺伝子導入細胞の染色体試験

細胞同調用試薬としてコルセミド (Invitrogen/Lifetechnologies, CA, USA)、細胞処理試薬として塩化カリウム、酢酸 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)、メタノール (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を使用した。

#### 2-1-3. *ccdPA/LCAT* のサザンブロット (クローナリティー否定試験)

##### 2-1-3-1. 陽性コントロール細胞の調製

遺伝子導入細胞として HEK293 細胞を使用した。培養には DMEM (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) に 10%FBS を追加した培地を使用した。ベクターは *ampho/CGThLCAT-neo* レトロウイルスベクター (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)、クローン選択用に G418 Disulfate (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を使用した。

##### 2-1-3-2. サザンブロット

DNA 抽出用に Gentra Puregene Tissue Core kit A (QIAGEN, Hilden, Germany)、制限酵素は HindIII (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) を使用した。サザンブロットに 3M Sodium acetate buffer solution、4M Sodium hydroxide solution、6M

Hydrochloric acid、5M Sodium chloride solution (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)、TE buffer、10 x Blue Juice Gel Loading Buffer、Ethidium Bromide Solution、Tris-HCl pH7.5、20 x SSC Buffer (Invitrogen/Lifetechnologies, CA, USA)、50xTAE buffer、agarose (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、DIG Easy Hyb、DIG Wash and Block Buffer Set、Anti-digoxigenin-AP、Fab fragments、CDP-Star, ready-to-use、Nylon membranes、positively charged、DNA Molecular Weight Marker II (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)を使用した。

#### 2-1-4. *in vivo* 安全性試験

##### 2-1-4-1. 動物

- (a) マウス BALB/cA Jcl-nu、メス、6 週齢、日本クレア株式会社 (Tokyo, Japan)
- (b) マウス C57BL/6J、オス(6~7 週齢)、メス(7~8 週齢)、日本チャールス・リバー株式会社 (Kanagawa, Japan)
- (c) カニクイザル、雄(2~3 歳)、雌(2~3 歳)、Primate Quality Control Center, INA RESEARCH PHILIPPINES INC.

##### 2-1-4-2. 移植細胞

- (a) ヒト *LCAT* 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞、HeLa S3 細胞 (陽性コントロール)
- (b) ヒト *LCAT* 遺伝子導入マウス前脂肪細胞 (①導入なし、②低コピー、③高コピー)
- (c) ヒト *LCAT* 遺伝子導入サル前脂肪細胞 (自家移植)

HeLa S3 細胞の培養は DMEM に 10%FBS を追加した培地を使用した。マウス前脂肪細胞及びサル前脂肪細胞の培養には DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham に 20%FBS を追加した培地を使用した。

#### 2-1-5. マウスを用いた細胞移植の検討

##### 2-1-5-1. マウス

NOG(NOD/Shi-scid, IL-2Rgamma null)、メス、6 週齢、日本クレア株式会社 (Tokyo, Japan)



#### 2-1-5-2. 移植細胞の培養・調製

マウス前脂肪細胞は DMEM/NutrientMixture F-12 Ham に 20%FBS を添加した培地を用いて継代した。移植する細胞の染色には PKH26 Red Fluorescent Cell Linger Mini Kit, for General Cell Membrane Labeling (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)を使用した。

#### 2-1-5-3. マウス血中ヒト rLCAT 検出

IP-WB による血中 rLCAT の検出試薬は第 3 章と同じものを使用した。

#### 2-1-6. 移植細胞の足場検討、残存コピー数の推移

##### 2-1-6-1. マウス

C57BL/6J、オス、7-8 週齢、日本チャールス・リバー株式会社 (Kanagawa, Japan)

##### 2-1-6-2. 移植細胞の調製・培養

マウス前脂肪細胞の培養は DMEM/NutrientMixture F-12 Ham に 20%FBS を追加した培地を、移植細胞の染色には PKH26 Red Fluorescent Cell Linger Mini Kit, for General Cell Membrane Labeling (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)を使用した。

##### 2-1-6-3. 細胞足場としてのゲル (scaffold)

フィブリンゲル[ボルヒール] (The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Kumamoto, Japan)を使用した。

##### 2-1-6-4. マウス血中ヒト rLCAT 検出、組織染色

IP-WB による血中 rLCAT の検出試薬は第 3 章と同じものを使用した。アポトーシスの検出には Apoptosis Detection Kit (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)、分裂細胞の検出に抗マウス Ki67 抗体 (Abcam plc., Cambridge, UK)を使用した。

#### 2-2. LCAT 遺伝子導入細胞の軟寒天培地培養試験 (足場非依存性増殖能試験)

ccdPA/LCAT を回収し、生細胞数が  $4 \times 10^5$  個/mL になるよう細胞懸濁液を調製した。陽性コントロール用 HeLa 細胞を、生細胞数が  $4 \times 10^5$ 、 $4 \times 10^4$ 、 $4 \times 10^3$  個/mL にな

るよう調製した。添付プロトコールに従って 96 ウェルプレートに BaseAgarLayer を、調製し、各細胞懸濁液と 0.6% agar 含有培地を 1:2 で混合したものを重層した。4°C で 15 分固め、さらに液体培地を重層し、培養器に移して 4 週間培養した (ccdPA/*LCAT* 1000 個/ウェル、HeLa 100、1000、10000 個/ウェル)。

播種 2、3、4 週間後、顕微鏡でコロニー数を計測した後、プロトコールに従って培地の寒天を溶かして細胞を破碎し、DNA 量を測定した。

#### 2-3. *LCAT* 遺伝子導入細胞の染色体試験

実験前日に ccdPA/*LCAT* 及び陰性コントロール用の *LCAT* 非導入 ccdPA 各  $1.4 \times 10^5$  個を T75 フラスコに播種した。これにコルセミドを終濃度  $0.05 \mu\text{g}/\text{mL}$  になるよう培地に加え 9 時間培養して同調処理を行った。細胞を回収してカルノア固定、ギムザ染色を行い、染色体を観察した。

#### 2-4. *LCAT* 遺伝子導入細胞のサザンブロット (クローナリティー否定試験)

##### 2-4-1. HEK293/*LCAT* 陽性コントロール細胞の調製

遺伝子導入の前日に HEK293 細胞を  $1.25 \times 10^6$  個/T25 フラスコで播種し、翌日 *LCAT* 遺伝子搭載レトロウイルスベクター (ampho/CGTh*LCAT*-neo) を用いて遺伝子導入を行った。遺伝子導入から 4 日後に細胞を継代し、培地に G418 を添加した。3-4 日おきに培地を交換して G418 濃度を徐々に上げて培養した。播種から 13 日後、形成されたコロニーをクローニングディスクを用いて単離した。継代時に細胞を回収し、細胞あたりの導入遺伝子コピー数を第 3 章に従って測定した。このなかから 2 つのクローンを陽性コントロールとして使用した。

##### 2-4-2. サザンブロット

添付プロトコールにしたがって ccdPA/*LCAT*、陽性コントロール細胞から DNA を回収した。ccdPA/*LCAT* および陽性コントロールの DNA に HindIII を加えて 37°C で一晩切断処理した。これをエタノール沈殿で回収し TE バッファで溶解した。

HindIII 処理した DNA を 0.8% agarose (1 x TAE) にアプライし、100V で電気泳動を行なった。ゲルを Ethidium bromide 染色し、0.25 M HCl 溶液で脱プリン化処理を行った後、0.5 M NaOH/1.5 M NaCl 溶液で中和した。さらに 0.5 M Tris-HCl pH 7.5/1.5 M NaCl 溶液

で振とう処理を 2 回行い、20 x SSC でゲルを平衡化した。20xSSC を浸み込ませたろ紙でゲル、メンブランをはさみ、その上に乾燥したろ紙を重ねて一晩転写した。

転写したメンブランは UV クロスリンクした後、風乾した。ローラーボトルにメンブランを入れ、DIG Easy Hyb を加え、50°C で 30 分処理した。プローブは 99°C で 10 分熱変性してから DIG Easy Hyb に溶解してローラーボトルに添加し、50°C で一晩反応させた。

メンブランを取出して 0.1% SDS/2 x SSC で 2 回洗浄を行った後、さらに 0.1% SDS/0.1 x SSC に浸して 2 回洗浄を行った。DIG Wash and Block Buffer Set の添付プロトコールに従って、メンブランを Anti-DIG antibody を加えた溶液に浸し、検出試薬でシグナルを検出した。

## 2-5. *in vivo* 安全性試験

### (a) ヒト *LCAT* 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の nude マウスへの移植

コピー数 1.02/細胞の ccdPA/*LCAT* および陽性コントロールの HeLa 細胞を必要数まで拡大培養して回収し、0.5% HSA/リンゲル液に懸濁して  $5 \times 10^7$  個/mL に調製した。図表 4-4-a にあるように、①溶媒のみ②HeLa③ccdPA/*LCAT* それぞれを nude マウスの背部皮下脂肪に 0.2mL(細胞数  $1 \times 10^7$  個)移植した(図表 4-4-a)。試験期間中は週に 1 回、マウスの一般状態の観察、体重測定、移植部位の触診を行った。3 週間及び 3 ヶ月後、全採血してから剖検を行った。

### (b) ヒト *LCAT* 遺伝子導入マウス前脂肪細胞(高・低コピー)の同系マウスへの移植

マウスの皮下脂肪からマウス前脂肪細胞を調製してヒト *LCAT* 遺伝子を導入し、投与必要数まで拡大培養した。高コピー細胞は複数回遺伝子導入を行った。移植細胞として①遺伝子非導入細胞、②低コピー細胞(0.97/細胞)、③高コピー細胞(7.9/細胞)の 3 種類をマウス背部皮下脂肪に 0.1mL(細胞数  $5 \times 10^5$  個)投与した(図表 4-4-b)。試験期間中は適時体重測定及び週に 1 回一般状態を観察し、移植部位の触診を行った。試験終了日に全採血し、剖検を行った。

### (c) *in vivo* 安全性試験(サル)

カニクイザル鼠径部皮下脂肪を採取し、第 2 章で述べた方法でサル前脂肪細胞を調製した。この細胞にヒト *LCAT* 遺伝子を導入し、投与に必要な数まで拡大培養した。採取から 5 ヶ月後、脂肪組織を採取した反対側の鼠径部の皮膚を切開して皮下脂肪を露出させ、脂肪組織内にヒト *LCAT* 遺伝子導入サル前脂肪細胞  $1 \times 10^6$  個を移植した

(図表 4-4-c)。試験期間中はカニクイザルの一般状態観察、体重、行動観察、心電図、呼吸数を測定した。剖検は投与後2週間と2ヶ月で行い、採血、投与部位を摘出し、各臓器を摘出して臓器重量測定、病理組織学的検査、投与細胞の分布を調べた。

#### 2-6. NOG マウスを用いた細胞移植の検討

ヒト *LCAT* 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞をプロトコールに従って PKH 蛍光染色し、培養フラスコへ播種した。二日培養した細胞を回収し 0.5% HSA/リンゲル液で2回洗浄した後、細胞濃度を  $3 \times 10^7$  個/mL に調製した。これらの細胞懸濁液 50 $\mu$ L ( $1.5 \times 10^6$  個) を3群各15匹ずつマウス背部肩甲骨間皮膚を切開して皮下脂肪細胞組織へ27Gシリンジで投与した。移植後1日目、1か月、3か月、6か月、8ヶ月後に3匹から採血及び組織摘出を行った。試験期間中は週に1回マウスの一般状態を観察し、体重を測定した。

#### 2-7. 細胞移植の足場の検討

マウス皮下脂肪組織から前脂肪細胞を調製し、ヒト *LCAT* 遺伝子を導入して移植必要数になるまで拡大培養し、プロトコールに従って移植前日に細胞を PKH で染色した。フィブリノゲン溶液とトロンビン溶液は DMEM-HAM/F12 でそれぞれ4倍と2倍に希釈し、移植細胞は希釈したトロンビン溶液で  $1 \times 10^7$  個/mL に調製した。シリンジのカラム部分が2つあり先端で2液が混ざらようになっている特殊なシリンジの片方にフィブリノゲン溶液、もう一方に細胞懸濁トロンビン液を入れ、マウスの左右両方の背部皮下に  $5 \times 10^6$  個ずつ細胞を移植した。移植から1、4、7、14、28日後に採血を行い、28日目に PKH 染色されている移植部位を摘出した。

マウス血清中の rLCAT を IP-WB 法で検出した。摘出組織の切片をつくり、プロトコールに従って TUNEL 染色及び抗 Ki67 抗体で染色を行い、4視野での染色細胞の数をカウントし平均を算出した。

#### 2-8. 血中 rLCAT 分泌と残存 *LCAT* コピー数の推移

ヒト *LCAT* 遺伝子を導入したマウス前脂肪細胞を PKH 染色し、 $5 \times 10^6$  個をフィブリノゲン(FG)とともに同系マウス皮下に移植した。コントロールとして細胞なし FG のみを投与した。投与後1、7、14、21、28、56日後に尾静脈採血した。血清を30又は100 $\mu$ L 使用し IP-WB で rLCAT を検出した。血中 rLCAT 濃度の推定には既知濃度の rLCAT を

用いた。細胞移植 1、14、28、56 日後にマウス移植部位から PKH 染色部分を摘出し、DNA を回収して残存 *LCAT* コピー数をリアルタイム PCR で測定した。残存コピー数は移植翌日の値を 100%とした。

#### 2-9. 統計処理

平均値±SD として表記した有意差検定は SPSS ver11.0(IBM, IL, USA)を用いて Student's t-test または分散分析を行い、その後の検定に Tukey test を行った。 $p$  値<0.05 は統計的に有意差ありとした。

### 第 3 節 結果

#### 3-1. *LCAT* 遺伝子導入 ccdPA の安全性

##### 3-1-1. ccdPA/*LCAT* の軟寒天培地培養試験 (足場非依存性増殖能試験)

播種 2、3、4 週間培養後に観察したところ陽性コントロールとしてウェルあたり 100 個播種した HeLa 細胞はそれぞれ 26、27、29 個のコロニーが観察された。一方、ccdPA/*LCAT* は 4 週間経過後もコロニーを確認できなかった。細胞が増殖していないことを確認するため、プレートの各ウェルに含まれる DNA 量を測定したところ、HeLa 細胞が培養日数に伴って増加しているのに対し、ccdPA/*LCAT* の値は増加しなかった (図表 4-1)。

##### 3-1-2. *LCAT* 遺伝子導入細胞の染色体試験

ccdPA/*LCAT* 及び同じ日数培養した遺伝子非導入 ccdPA の染色体検査 (karyotype) を行った。染色体型に異常は認められなかった (図表 4-2)。

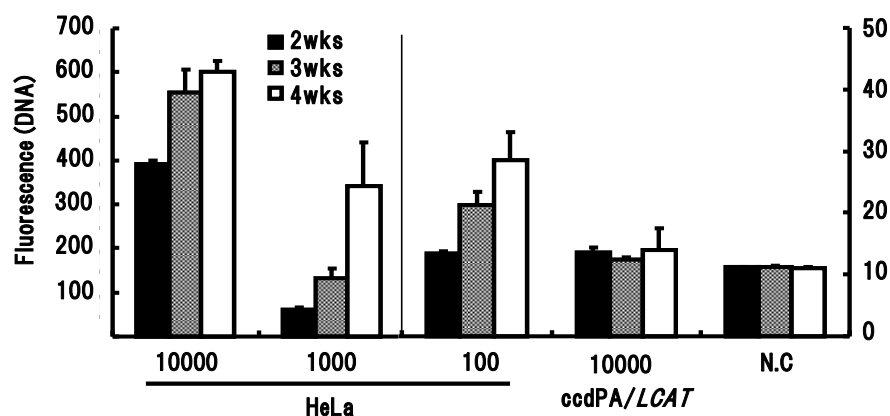
##### 3-1-3. *LCAT* 遺伝子導入細胞のサザンブロット (クローナリティー否定試験)

陽性コントロール、遺伝子導入なし、あり、全てのサンプルで、サイズマーカー 6557bp から 4361bp の間に内在性の *LCAT* 遺伝子が検出された。陽性コントロールとして使用した HEK293/*LCAT* クローンは、マーカー 1416bp 付近にバンドが検出されたが、遺伝子非導入 ccdPA はどのサイズにもバンドは検出されなかった。ccdPA/*LCAT* は内在性 *LCAT* のバンドの下にスメアが検出された (図表 4-3)。

### a. コロニー数

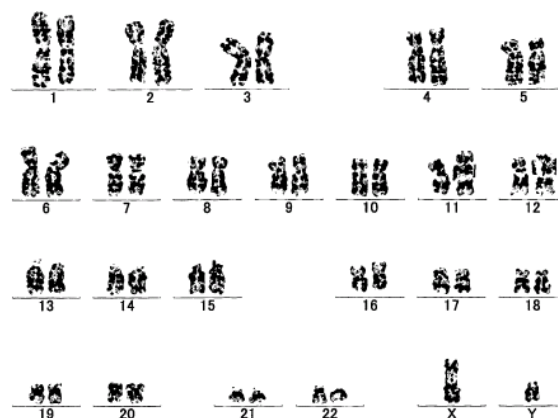
cell type	HeLa	ccdPA/ <i>LCA1</i>
seed num.	100	10000
2wks	26	0
3wks	27	0
4wks	29	0

### b. 軟寒天培地中のDNA量



**図表4-1 軟寒天培地による足場非依存性増殖能試験**

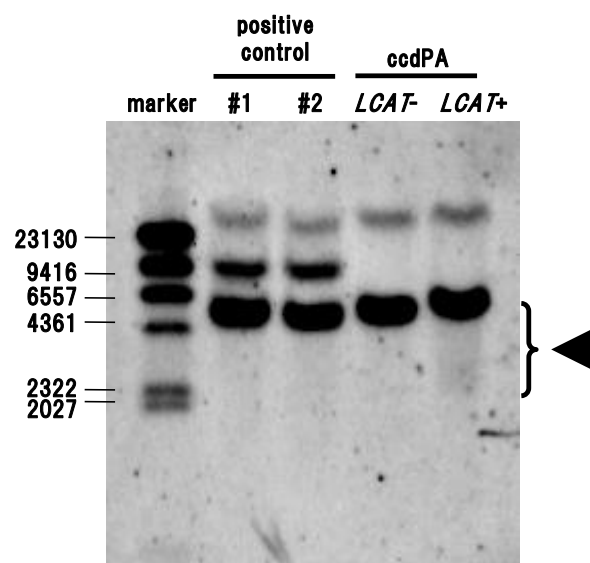
*LCA1*遺伝子導入ccdPAを軟寒天培地で培養し、足場非依存性増殖能を調べた。陽性コントロールとしてHeLaを使用した。(a)HeLa細胞にはコロニーが観察されたがccdPA/*LCA1*は認められなかった。(b)軟寒天培地に含まれるDNA量を測定したところ、HeLa細胞が培養期間にともなって増加しているのに対しccdPA/*LCA1*は変化しなかった。ccdPA/*LCA1*には足場非依存性増殖能は認められなかった。



**図表4-2 細胞の染色体検査(Gバンド法)**

ccdPA/*LCA7*及びccdPAの染色体をギムザ染色し観察した。染色体異常は認められなかった。





**図表4-3 ccdPA/*LCAT*のクローナリティー解析**

ccdPA、ccdPA/*LCAT*、*LCAT*遺伝子導入HEK293クローン細胞（陽性コントロール）からDNAを回収しサザンブロットを行った。内在性*LCAT*遺伝子のバンドは4361bpよりも少し大きめのところに検出された。陽性コントロールは9400bp付近に濃いバンドが検出されたが、ccdPA、ccdPA/*LCAT*ともに内在性*LCAT*の他に明瞭なバンドの検出は認められなかった。ccdPA/*LCAT*は非導入細胞と比較してスメアがやや濃いことが確認できた（矢印）ことから、*LCAT*遺伝子はランダムにゲノムに導入された状態にあることが分かった。

#### 3-1-4. *In vivo* 安全性試験

(a)nude マウスを用いたがん化否定試験(ヒト *LCAT* 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の nude マウスへの移植)

ccdPA/*LCAT*(コピー数 1.02/細胞)を nude マウスに移植し、3 週間及び 3 ヶ月経過観察した。試験期間中マウスの一般状態、体重、摂餌量、移植部位の触診に異常は認められなかった。また剖検においても、陽性対照である HeLa S3 細胞は移植部位でがん化が認められたのに対し、ccdPA/*LCAT* 移植群は臓器重量、各臓器・組織の肉眼所見において異常はなかった。(図表 4-4-a)。

(b) 正常マウスを用いたがん化否定試験[ヒト *LCAT* 遺伝子導入マウス前脂肪細胞(高・低コピー)を同系マウスへ移植]

マウス前脂肪細胞にヒト *LCAT* 遺伝子を導入した低コピー細胞(0.97)、高コピー細胞(7.9)、遺伝子非導入細胞を同系マウスに他家移植して経過観察を行った。7 ヶ月および 12 ヶ月の試験期間中、一般状態、体重、摂餌量、移植部位の触診に異常は認められなかった。剖検では各種臓器の重量、血液学的検査、肉眼所見について異常は認められず、3 群全てにおいてがん化は認められなかった(図表 4-4-b)。

(c) *in vivo* 安全性試験(サル)

安全性の観点から 2 週間及び 2 カ月観察を行ったが、移植全例において一般状態、体重、摂餌量に異常は認められず、行動観察、心電図、呼吸数の異常も認められなかった。剖検後の各種臓器重量、血液検査、臓器・組織の肉眼所見においても異常は観察されなかった。

### a. nudeマウスを用いたがん化否定試験

群	投与細胞	LCATコピー数	細胞数	匹数	
				観察期間	
				3週間	3ヶ月
溶媒対照	0.5%HSA/リンゲル液	—	—	5	5
陽性コントロール	HeLa S3	—	1x10 <sup>7</sup> /0.2mL	5	5
被験細胞	ヒトLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞	1.02/細胞	1x10 <sup>7</sup> /0.2mL	5	5

### b. マウスを用いたがん化否定試験

群	移植細胞のLCATコピー数	投与細胞数	匹数	
			観察期間	
			7ヶ月	12ヶ月
対照	遺伝子導入なし	5x10 <sup>5</sup> 個/0.1mL	18	25
低コピー細胞	0.97/細胞	5x10 <sup>5</sup> 個/0.1mL	25	25
高コピー細胞	7.9/細胞	5x10 <sup>5</sup> 個/0.1mL	25	25

### c. カニクイザル自家移植試験

群	投与細胞数	匹数			
		オス		メス	
		観察期間		観察期間	
		2週	2ヶ月	2週	2ヶ月
病理組織学的検査	1x10 <sup>6</sup> 個/0.2mL	1	2	1	1
移植細胞の体内分布	1x10 <sup>6</sup> 個/0.2mL	2	3	2	2

図表4-4 *In vivo* 安全性試験

(a)LCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を免疫不全マウス(nude)へ皮下移植し、3ヶ月観察した。陽性対照であるHeLa S3細胞は移植部位でがん化が認められたのに対し、ccdPA/LCAT移植群に異常所見は認められなかった。(b) LCAT遺伝子導入マウス前脂肪細胞を同系マウスへ皮下移植した。剖検では全ての群においてがん化などの異常所見は認められなかった。(c)カニクイザル鼠径部の皮下脂肪から調製したサル前脂肪細胞にヒトLCAT遺伝子を導入し、これを脂肪組織採取と反対側の鼠径部の皮下脂肪に自家移植した。試験期間中及び剖検時において異常所見は認められなかった。

### 3-2. *In vivo* 細胞移植検討

#### 3-2-1. NOG マウスへの移植

移植した細胞は 8 ヶ月経過後も残存していた。また移植した細胞から分泌された rLCAT はマウス血中に分泌されており、移植約 1 か月後においても分泌が確認できた(図表 4-5)。

#### 3-2-2. 移植細胞の足場の検討

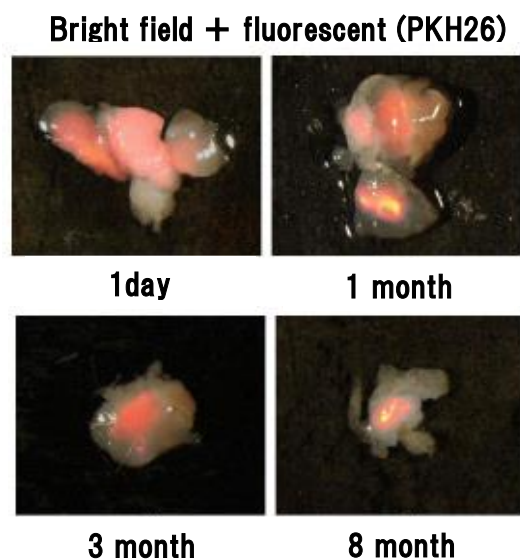
ヒト *LCAT* 遺伝子導入マウス前脂肪をフィブリンゲル(FG)とともに移植した場合、TUNEL 染色で検出される細胞が FG なしの場合に比べて少なく、アポトーシスが抑制されていることが分かった。FG あり、なしそれぞれの血中 rLCAT を比較すると FG 存在下のほうが多く検出された(図表 4-6)。

#### 3-2-3. 血中 rLCAT 分泌と残存 *LCAT* コピー数の推移

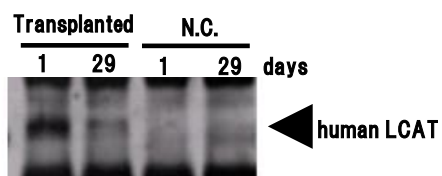
*LCAT* 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を同系マウスに移植し、血中への rLCAT の分泌と残存コピー数の推移を調べた。移植後経過時間に伴って徐々に血中分泌量が減少するが、56 日目においても rLCAT の分泌が確認でき、また、移植部位の残存 *LCAT* コピー数は 28 日目には約半分まで減少し、56 日経過しても 7% 残存していることが確認できた(図表 4-7-a)。

マウス血中 rLCAT の濃度を既知濃度の rLCAT を使ってウエスタンブロットで推定したところ、14~28 日目にかけて定常状態になり約 0.5 $\mu$ g/mL 分泌されていることが分かった(図表 4-7-b)。

**a. 移植細胞の摘出部位**



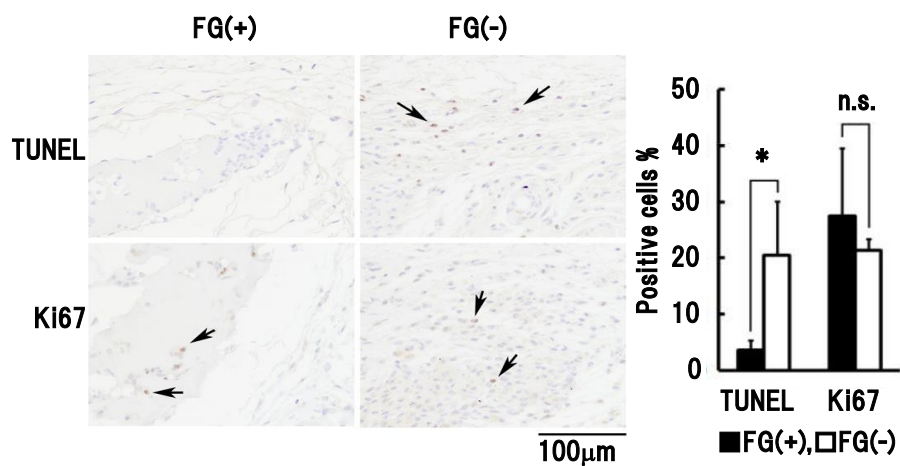
**b. 細胞移植マウス血中のヒトrLCAT**



**図表4-5 NOGマウスを使った細胞移植検討**

(a)*LCA* 遺伝子を導入したヒト前脂肪細胞を蛍光色素で染色し、NOGマウスの脂肪組織へ移植した。適時採血と翌日、1ヶ月、3ヶ月、8ヶ月後に移植部位の摘出を行った。移植後8ヶ月まで染色したヒト前脂肪細胞の残存が確認できた。(b)マウス血中に分泌されたヒトrLCATの分泌をIP-WBで検出した。移植約1ヵ月後においても血中分泌が認められた。

### a. フィブリンゲルによるアポトーシス抑制



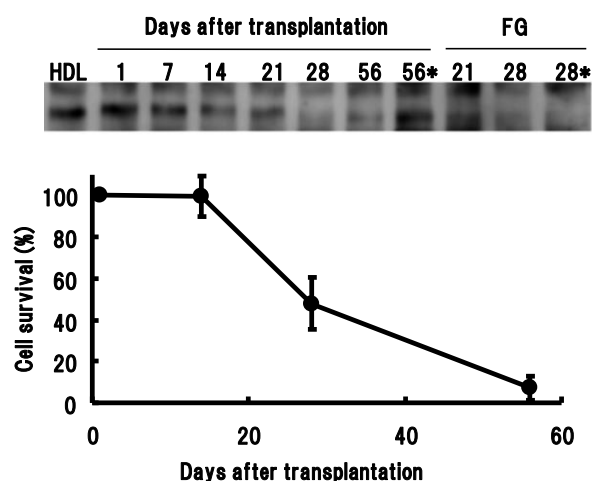
### b. 細胞移植マウス血中のLCAT



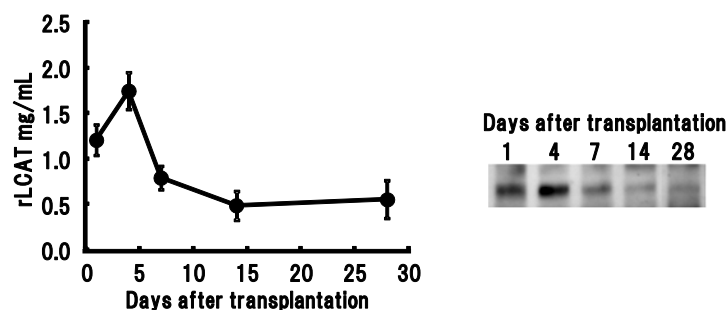
## 図表4-6 細胞移植用足場 (scaffold) のによる生着向上

ヒト *LCAT* 遺伝子導入マウス前脂肪細胞をフィブリンゲル(FG)存在下または非存在下で同系マウス皮下へ移植した。(a)4週間後に移植部位を摘出しTUNEL及びKi67染色を行った。フィブリンゲル(FG)存在下ではアポトーシスによって死滅する細胞数が有意に減少した(\* $p < 0.05$ )。(b)細胞移植マウスの血中LCATを検出した。FG存在下で細胞移植したマウスは血中LCAT分泌量が多いことが分かった。PC, Positive Control: ヒト血清由来LCAT。

## a. マウス血中rLCAT分泌及び残存移植細胞の推移



## b. マウス血中rLCATの濃度



図表4-7 移植細胞の残存率とrLCAT血中分泌

マウス前脂肪細胞にヒト*LCAT*遺伝子を導入し、フィブリンゲル(FG)とともに同系マウス皮下に移植した。(a)マウス血中に分泌されたヒトrLCATをIP-WBで検出した。移植後56日までマウス血清にrLCATが検出された。56日およびFGコントロール28日は血清を100 $\mu$ L、そのほかは30 $\mu$ L使用した。細胞移植翌日、14、28、56日後に移植部位を摘出し、残存*LCAT*コピー数をリアルタイムPCRで測定した。移植翌日の残存コピー数を100%として残存細胞数を算出した。(b)マウス血中に分泌されたrLCATをウェスタンブロットで検出し、血中濃度を既知濃度のrLCATを基準として推定した。

## 第 4 節 考察

### 4-1. *LCAT* 遺伝子導入 ccdPA の安全性

*Ex vivo* での人工的環境で細胞を長期培養することにより、細胞が不死化・悪性化する現象は骨髄由来マウス間葉系細胞(MSC)で観察されており、増殖能が増すとともに表面マーカーや分化能の変化を伴うことが報告されている(Xu S et al., 2012)。以前、ヒト ASC、骨髄由来 MSC についても長期継代により悪性化したと報告があったが、その後間違いであったことが分かり(Torsvik A et al., 2010)、いまのところ脂肪由来細胞を含め *in vitro* 継代によってヒト間葉系細胞(MSC, mesenchymal stem cell)が自発的に不死化、悪性化したという報告はない。しかし、本治療法では遺伝子導入を行うためその影響による細胞の悪性化を否定するため、*in vitro*、*in vivo* 両面から *LCAT* 遺伝子導入細胞の安全性について検討した。

細胞悪性化の指標のひとつである足場非依存性増殖能を ccdPA/*LCAT* について調べたが、増殖能を持つ細胞は検出されなかった。また ccdPA/*LCAT* の karyotype を調べたところ、人工的培養あるいは遺伝子導入に起因すると考えられる染色体異常は認められなかった。特定の細胞が異常増殖することによるクローナリティー変化を調べる目的で、サザンブロットを行った。陽性コントロールの HEK293/*LCAT* クローン細胞では、細胞がもともと持つ *LCAT* 遺伝子座由来のバンドに加えて、レトロウイルスベクターにより挿入された *LCAT* 遺伝子由来の明瞭なバンドが検出され、*LCAT* 遺伝子の挿入場所が単一の細胞集団であることが示されたのに対し、ccdPA/*LCAT* にはスメア状のバンドが検出されたことから、ゲノムの様々な位置に *LCAT* 遺伝子が挿入された細胞の集団であることが推察された。つまり遺伝子を導入したことにより特定の細胞だけが増殖している状態にはないということが分かった。造血幹細胞を使った SCID の遺伝子治療においては、白血病を発症していない成功例においても、移植後年数が経過することで限られた数の細胞に由来する細胞だけが残存していたことが報告されている(Fischer A et al., 2010)。したがって移植後たとえ特定の遺伝子導入細胞が選択的に生存しクローナリティーの変化が観察されたとしてもそれが直接がん化に結びつくとは限らないことを示している。造血幹細胞などの血球系細胞では、患者の採血によりクローナリティー解析が可能であるが、本治療法では原理的に移植細胞が移植部位にとどまることから、そのような手法は困難である。前述のようにクローナル増殖が細胞の悪性



化に直接つながるわけではないが、細胞が悪性化した場合にはクローナル増殖が認められるため、患者に移植した細胞の免疫不全動物への移植を並行して実施するなどの安全性に関する対応が必要であると考えられる。本章で行った *in vitro* 検討においては細胞の悪性化は認められなかった。

次に *in vivo* 安全性の検討として、nude マウスにヒト ccdPA/LCAT を移植した。3 週間及び 3 ヶ月経過観察したが、移植部にがん化は認められなかった。一方、陽性コントロールとして使用した HeLa では腫瘍形成が認められた。正常マウスからマウス前脂肪細胞を調製し、ヒト LCAT 遺伝子を導入して同系マウスに移植し、7 ヶ月と 12 ヶ月後に剖検を行った。移植細胞は LCAT 低コピー数細胞と高コピー細胞を使用した。移植部位に腫瘍形成は認められなかった。実際には 7.9 コピー/細胞のような高コピー細胞を使用することはないが、安全性を考える上でこのような高コピー細胞についても検討したところ前脂肪細胞のがん化は認められなかった。さらに、ヒトに近い動物としてカンクイザルを用いた移植実験を行ったが、どのサル個体においても移植による異常が認められなかったことは、ヒトへの臨床応用にむけて安全性を担保する重要なデータとなった。

#### 4-2. *In vivo* 細胞移植検討

酵素補充を目的とした遺伝子治療では移植した細胞から分泌された rLCAT が血流に乗らなければ治療効果を発揮できない。そこで、ヒト ccdPA/LCAT を NOG マウスに移植し、*in vivo* における検討を行ったところ、移植細胞は生着し、分泌された rLCAT が血流に乗ることが分かった。移植細胞は 8 ヶ月後も残存し、血中 rLCAT は移植 1 か月後においても検出されたが、移植後経過時間に伴って減少していた。長期間に亘って治療効果を発揮するには、移植細胞が生着し長期間維持される必要があるため、次に移植細胞の生着率を上げる検討を行った。

身体の損傷部位を埋める、あるいは美容整形のために自己の脂肪組織を移植することは以前から実施されており、メリットとして拒絶反応がないことがあげられるが、反面、うまく生着せず、原因が明確でないまま再吸収されてしまう問題がある (Sterodimas et al., 2010)。こういった損傷部位の再建の分野において細胞の移植には生着を促進する目的でコラーゲンビーズ、ヒアルロン酸スポンジなどの足場 (scaffold) が研究されており、生着に効果があることが分かっている (Rubin et al., 2007)。本遺伝

子治療研究における遺伝子導入細胞の移植は、より簡便に実施するためシリンジによる細胞の注入を目指した。そこで、液状で細胞移植後にゲル化する物質で、且つ既に医薬品として認可され、すぐに臨床応用可能なフィブリンゲル (FG) に着目した。FG は自己 ASC とともに患者頭部の損傷部位の修復に使用された臨床報告がある (Lendeckel S et al., 2004)。

細胞と FG を混合しマウス皮下へ移植すると、細胞のみを移植した場合に比べてアポトーシスで死滅する細胞の割合が有意に減少し、血中に分泌される rLCAT 量も増加したことから、FG は移植細胞の生着を促す効果があることが分かった。また我々のグループは多血小板血漿 (PRP, platelet rich plasma) を使った研究を行っており、PRP が前脂肪細胞の増殖を促進し、アポトーシスを抑制することを示した (Fukaya et al., 2012)。将来的にはこのような新たな方法を検討し移植法の改善をしていきたいと考えている。これらの結果を受けて LCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を FG とともに同系マウスに移植したところ 56 日目まで血中 LCAT の分泌が確認できた。

レトロウイルスベクターによる遺伝子導入ではサイレンシングが問題になることがある。ヒトへの細胞移植後においてもサイレンシングが起きない保証はないが、少なくともマウス移植実験で約 2 ヶ月に渡って分泌が確認できており、また *in vitro* での ccdPA/LCAT の培養においては 2 カ月以上長期継代しても LCAT タンパク質の発現を確認できている。マウス血中 rLCAT 濃度が減少していく原因は移植細胞が経過日数に伴って減少する他に、ヒト LCAT に対する中和抗体も関わっていると考えられる。中和抗体については、データを示していないが 2 週間ほどで血中に分泌され始めることが確認できており、マウス移植実験における血中分泌減少の原因のひとつであることがわかった。この結果はヒトへの臨床応用においても、LCAT 欠損症のうち完全欠損型の場合には同じ問題が起きる可能性があることを示しており、遺伝子治療を受ける患者の選定基準に制限が加わることが予想される。ライゾゾーム病や血友病における酵素補充療法では、中和抗体がしばしば問題になる。抗体の生じやすさはタンパク質の欠損の度合いと比例傾向にあり、部分欠損よりも完全欠損のほうがより抗体ができやすい (Wang et al., 2008)。しかし、治療の過程で抗原に対する免疫寛容が起きるケースもあることから、本遺伝子治療法の完全欠損型 LCAT 欠損症への適応も視野に入れ、今後の検討が必要である。

#### 4-3. 移植に必要な細胞数の推定

本遺伝子治療法では 30 日間で健常人 LCAT 活性量の 1 割を供給することを目標としている。*in vitro* の結果から推定した場合、第 3 章で示したように *ccdPA/LCAT* が分泌する rLCAT 活性量は導入コピー数と相関関係にあり、細胞あたり 1 コピーの *ccdPA/LCAT* が培養液中に分泌する rLCAT のコレステロールエステル化活性量は、平均で 2 E-cho nmol/hr/ $10^5$  個/6 日となった。健常人血清の LCAT 活性を同じ方法で測定すると 110 E-cho nmol/hr/mL であり、仮に一個体の血液量を 3000mL とすると 1 割供給に 33000 E-cho nmol/hr 必要となる。従って 30 日かけて 1 割の活性量を供給するためには、単純計算で  $3.3 \times 10^8$  個必要になることが分かった。

一方、本章で行った *in vivo* 検討では、細胞移植マウス血中へ分泌される rLCAT 量は移植後 14~28 日で約 0.5 $\mu$ g/mL となった(図表 4-7-b)。これはヒト血中 LCAT 濃度の約 1/10 に相当し、このときマウスに移植した細胞数を体重換算でヒトに当てはめると(3000 倍)、移植に必要な細胞数は  $1 \sim 1.5 \times 10^{10}$  個となった。しかし、ヒト *ccdPA/LCAT* と *LCAT* 遺伝子導入マウス前脂肪細胞が培養液中に分泌する rLCAT の活性量を比較すると、*ccdPA/LCAT* は 10~20 倍高い活性量を示すことが分かった。従ってヒトの場合には 1 割を供給するために、 $5 \times 10^8 \sim 1.5 \times 10^9$  個必要と考えられ、*in vitro* で推定された細胞数と大きく変わらないことが分った。*In vivo*、*in vitro* 両面から LCAT 活性量とタンパク質量を推定した結果、1 割供給には  $10^8 \sim 10^9$  個の細胞移植が必要であると考えられた。

## 第 5 節 小括

*In vitro*、*in vivo* 安全性検討において *LCAT* 遺伝子導入前脂肪細胞の悪性化・がん化は認められず、また移植細胞が対象動物に対してなんらかの異常所見を引き起こすことは認められなかった。また、マウスへの移植検討において、移植細胞から r*LCAT* が血中に分泌されること、足場としてフィブリンゲルが細胞の生着に有効であることを示した。第 2 章から本章までの結果から臨床応用への基礎ができたと考えられた。

## References

- Aiuti A., Cassani B., Andolfi G., Mirolo M., Biasco L., Recchia A., Urbinati F., Valacca C., Scaramuzza S., Aker M., Slavin S., Gazzola M., Sartori D., Ambrosi A., Di Serio C., Roncarolo M.G., Mavilio F., Bordignon C., 2007. Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy. *J Clin Invest.* 117(8):2233-40.
- Cattoglio C., Facchini G., Sartori D., Antonelli A., Miccio A., Cassani B., Schmidt M., von Kalle C., Howe S., Thrasher A.J., Aiuti A., Ferrari G., Recchia A., Mavilio F., 2007. Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells. *Blood.* 110(6):1770-8.
- Fischer A., Hacein-Bey-Abina S., Cavazzana-Calvo M., 2010. 20 years of gene therapy for SCID. *Nat Immunol.* 11(6):457-60.
- Fukaya Y., Kuroda M., Aoyagi Y., Asada S., Kubota Y., Okamoto Y., Nakayama T., Saito Y., Satoh K., Bujo H., 2012. Platelet-rich plasma inhibits the apoptosis of highly adipogenic homogeneous preadipocytes in an in vitro culture system. *Exp Mol Med.* 44(5):330-9.
- Hacein-Bey-Abina S., Von Kalle C., Schmidt M., McCormack M.P., Wulffraat N., Leboulch P., Lim A., Osborne C.S., Pawliuk R., Morillon E., Sorensen R., Forster A., Fraser P., Cohen J.I., de Saint Basile G., Alexander I., Wintergerst U., Frebourg T., Aurias A., Stoppa-Lyonnet D., Romana S., Radford-Weiss I., Gross F., Valensi F., Delabesse E., Macintyre E., Sigaux F., Soulier J., Leiva L.E., Wissler M., Prinz C., Rabbitts T.H., Le Deist F., Fischer A., Cavazzana-Calvo M., 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science.* 302(5644):415-9. Erratum in: *Science.* 302(5645):568.
- Ho W., Tawil B., Dunn J.C., Wu B.M., 2006. The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. *Tissue Eng.*

12(6):1587–95.

Kang X., Xie Y., Kniss D.A., 2005. Adipose tissue model using three-dimensional cultivation of preadipocytes seeded onto fibrous polymer scaffolds. *Tissue Eng.* 11(3–4):458–468.

Lendeckel S., Jödicke A., Christophis P., Heidinger K., Wolff J., Fraser J.K., Hedrick M.H., Berthold L., Howaldt H.P., 2004. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg.* 32(6):370–3.

Rubin J.P., Bennett J.M., Doctor J.S., Tebbets B.M., Marra K.G., 2007. Collagenous microbeads as a scaffold for tissue engineering with adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 120(2):414–24.

Sterodimas A., de Faria J., Nicaretta B., Pitanguy I., 2010. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 63(11):1886–92.

Torsvik A., Røslund G.V., Svendsen A., Molven A., Immervoll H., McCormack E., Lønning P.E., Primon M., Sobala E., Tonn J.C., Goldbrunner R., Schichor C., Mysliwicz J., Lah T.T., Motaln H., Knappskog S., Bjerkvig R., 2010. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track – letter. *Cancer Res.* 70(15):6393–6.

Wang J., Lozier J., Johnson G., Kirshner S., Verthelyi D., Pariser A., Shores E., Rosenberg A., 2008. Neutralizing antibodies to therapeutic enzymes: considerations for testing, prevention and treatment. *Nat Biotechnol.* 26(8):901–8.

Xu S., De Becker A., De Raeve H., Van Camp B., Vanderkerken K., Van Riet I., 2012. In vitro expanded bone marrow-derived murine (C57Bl/KaLwRij) mesenchymal stem cells can acquire CD34 expression and induce sarcoma formation in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Aug 3;424(3):391–7.

## 第 5 章 総括

先天性・後天性問わず分泌型タンパク質の欠損に由来する疾患に対して酵素補充療法は非常に有効な治療法であり、一部の疾患に対しては酵素(タンパク質)が製剤化され治療が可能になっているが、効果が不十分な場合や、患者の QOL 低下、経済的負担が大きいといった問題を抱えている。遺伝子治療法はこのような問題を解決する可能性があるだけでなく、有効な治療法が未だ開発されていない疾患に対しても有力な治療法候補となる。

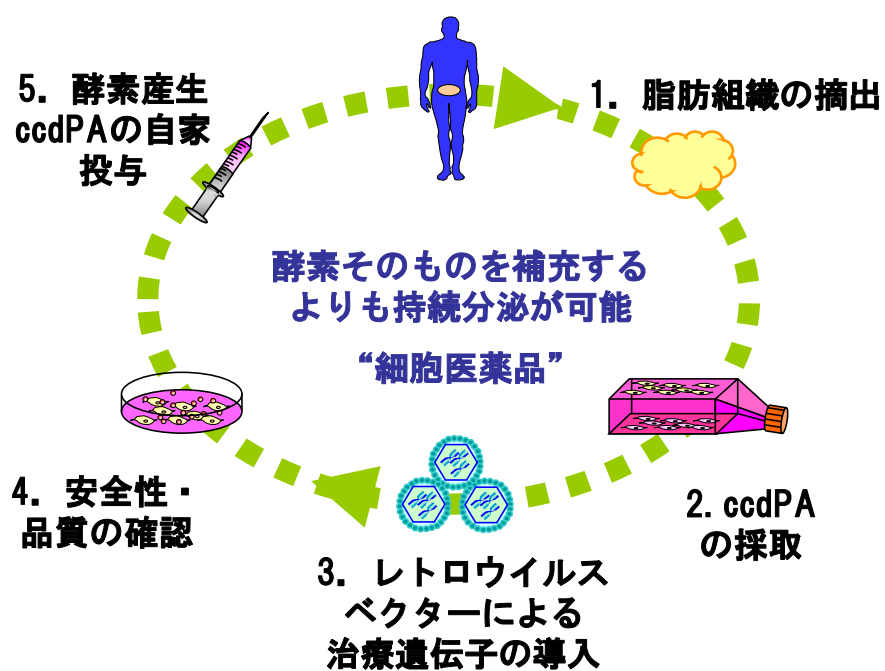
我々のグループは糖尿病モデルマウスヘインスリン遺伝子導入前脂肪細胞を移植して持続的な血糖降下作用が得られることから、脂肪細胞が遺伝子治療用細胞として機能しうることを示した。LCAT 欠損症は、健常人の 1 割程度の LCAT 活性を供給できれば効果が期待できること、これまでに過剰症の報告がないこと、遺伝子治療法を含めて治療法の開発が行われていないことから、本研究開発の対象疾患とした。ヒトへの実用化にあたり多くの課題があったが、本研究において、ccdPA の性質を明らかにし脂肪分化し易いこと、遺伝子導入法を確立し導入による細胞の性質が変化しないことを示した。レトロウイルスベクターはゲノム中の遺伝子発現の活発なところに導入され易いことが知られている。本遺伝子治療法では ccdPA への遺伝子導入を細胞採取翌日に行うが、第 2 章で述べたように天井培養直後には脂肪関連遺伝子がまだ発現しているため、LCAT 遺伝子は脂肪分化関連遺伝子近傍にも導入されている可能性がある。実際に LCAT 遺伝子の発現は脂肪分化したほうが高くなることが分っている(Aoyagi et al., 2011)。従って仮に移植後に遺伝子導入された ccdPA が脂肪細胞へ分化しても rLCAT 産生能が減少する可能性は低いと考えられる。さらに通常は肝臓で生成される LCAT が、ccdPA から分泌されても活性を保っていることを LCAT 欠損症患者血清を用いて示し、LCAT 遺伝子導入細胞を移植したマウス血中に rLCAT が分泌されることを示した。最も重要な細胞の安全性についても本研究で検討した範囲では問題点は認められなかった。遺伝子導入及びそれに伴った検討は複数回実施し同様の結果が得られているが、第 3、4 章で行った検討を以って、実際の患者から採取した細胞から作られた ccdPA/LCAT が毎回全て同じ性質を保っている確証にはならない。従って、安全性を確保するため一部の検討については遺伝子導入の度に行う必要があると考えられる。以上のことから ccdPA は分泌型酵素補充を目的とした *ex vivo* 遺伝子治

療用の標的細胞として優れた性質を持つことを明らかにした。

本研究では記載していないが、レトロウイルスベクターに関連した品質管理、RCR 否定試験や ccdPA/LCAT を調製する過程で使用した各種試薬の残存否定試験など品質管理に関する検討も別に行っている。実用化に向けた課題を克服した結果、本遺伝子治療法は図表 5-1 の手順で行われることになった。患者から脂肪組織を採取してから投与するまでに 3 週間を要し、健常人 LCAT 活性の 1 割を供給するために  $10^8 \sim 10^9$  個の細胞を移植する計画である。

脂肪細胞や脂肪幹細胞は既に臨床で使用されているが、遺伝子導入脂肪細胞及び LCAT 欠損症を対象とした遺伝子治療はまだ実施された例がない。この治療法の安全性と効果が臨床研究において証明されれば、LCAT 欠損症以外の疾患へ応用することも期待できる。ccdPA を用いた遺伝子治療法を今後さらに発展させるためには、新しいベクターを含む遺伝子導入方法、移植細胞生着に関する検討が必要である。遺伝子導入陽性率や生着の向上は、移植細胞数を減らすことで治療を受ける患者の負担を軽減し、酵素・タンパク質の供給量域を上げることで新たな疾患への適応が可能になると考えられる。





**図表5-1 ccdPAを用いた酵素補充療遺伝子治療**

脂肪組織採取から遺伝子導入細胞を移植するまでのコンセプト図。採取から細胞移植までに要する日数は3週間となっている。

## References

Aoyagi Y., Kuroda M., Asada S., Tanaka S., Konno S., Tanio M., Aso M., Okamoto Y., Nakayama T., Saito Y., Bujo H., 2011. Fibrin glue is a candidate scaffold for long-term therapeutic protein expression in spontaneously differentiated adipocytes in vitro. *Exp Cell Res.* 318(1):8–15.

Kuroda M., Bujo H., Aso M., Saito Y., 2011. Adipocytes as a vehicle for ex vivo gene therapy: novel replacement therapy for diabetes and other metabolic diseases, *J. Diabetes Invest.* 2: 333–340.

## 謝辞

本学位論文の発表及び作成にあたり、終始ご懇切なるご指導ご鞭撻を賜りました東京大学大学院 薬学系研究科 機能薬学専攻 細胞生化学大講座 衛生化学 新井 洋由教授に深く感謝申し上げます。

本研究を行う機会を与えてくださいましたセルジェンテック株式会社 麻生 雅是代表取締役社長、千葉大学大学院医学研究院 先端応用医学研究部門 先端応用医学講座 臨床遺伝子応用医学 武城 英明教授、千葉大学医学部附属病院 未来開拓センター 黒田 正幸博士に深く感謝申し上げます。

本研究を実施するにあたり、多くのご指導ご助言を賜りました千葉大学大学院 医学研究院 臨床応用医学 青柳 靖之博士、セルジェンテック株式会社の皆さまに深く感謝申し上げます。

2013 年 3 月 浅田 咲世