

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト前脂肪細胞を用いた新しい遺伝子治療法の開発

氏名 浅田 咲世

【1. 序論】

遺伝性疾患のうち分泌型酵素・タンパク質の欠損が原因となる疾患に対しては、欠損酵素を外部から補充する酵素補充療法(ERT)は非常に有効な治療法である。しかし ERT が可能な疾患であっても、生涯に亘る投与が必要であり、十分な効果を得られない場合や経済的負担が大きい、といった課題がある。これらの課題を克服すべく遺伝子治療研究が行われているが、遺伝性疾患は多種多様であるため ERT を含め治療法が未だ確立されていない疾患が多く存在する。

レシチン:コレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)欠損症は常染色体劣性遺伝性の脂質異常症で、腎不全や角膜混濁を合併する疾患である。現在、LCAT 欠損症に対する根本的治療法がなく食事療法や薬物療法など対症療法が行われているが、臨床データから健常人の 1 割の LCAT 活性があれば、最も重篤な合併症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り、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 ERT が有効であることを示している。

遺伝子治療法を発展させる上で、ベクターや投与法の開発に加え、どのような遺伝子導入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る。脂肪細胞はアディポカイン分泌によって脂質代謝に影響を与え細胞自身の寿命が長いことに加えて、美容・形成外科分野で脂肪細胞の採取と移植には多くの実績がある。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ことから、LCAT 欠損症を対象とした *ex vivo* 遺伝子治療法の開発に至った。

【2. 遺伝子治療用細胞としての前脂肪細胞】

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患病態と治療方針から決められる。ERTを目的とした *ex vivo* 遺伝子治療法の場合は増殖能を保持し、なるべく寿命が長い細胞が候補となる。造血幹細胞は先天性免疫不全症や重症貧血のような血球系細胞自身の機能異常による疾患だけでなく、多様な疾患において標的細胞として用いられている。アデノシンデアミンナーゼ欠損症(ADA-SCID)遺伝子治療は最も成功した事例のひとつであるが、同様に造血幹細

胞を用いて酵素補充を目的として行われた研究では期待されたほどの効果が得られない事例もあった。このことから治療遺伝子に対する標的細胞の選択は治療効果を左右する重要な要素であることがわかる。遺伝子治療法の開発を進めるうえで、標的細胞となる脂肪組織由来細胞の性質について比較検討を行った。

脂肪組織をコラゲナーゼ処理した後、遠心沈殿分画より調製された細胞を脂肪幹細胞(ASC)とし、一方、遠心後チューブ上層に浮かぶ油滴を含む脂肪細胞から天井培養法によって調製した細胞を前脂肪細胞(ccdPA)とした。細胞表面抗原はこれまでに報告のある ASC 及び天井培養由来細胞と同じ発現パターンを示したが、本来陰性である CD31、CD45 を指標として細胞の純度を調べたところ、ccdPA のほうが純度が高いことが分かった。両細胞を採取から 14 日間継代すると、脂肪細胞で発現している分化関連遺伝子の発現は検出限界以下まで減少したが、脂肪分化試薬によって分化し、ccdPA のほうが高い分化率を示した。骨分化、軟骨分化能については ASC と ccdPA とで差は認められなかった。ccdPA と ASC は細胞形態、増殖能、表面抗原、骨・軟骨分化能は同じ性質を示したが、脂肪分化能に関しては ccdPA が優れた性質を示した。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、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こと、ccdPA は脂肪への分化能に優れ移植後の長期維持が期待でき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。

【3. lcat 遺伝子導入前脂肪細胞の樹立と解析】

酵素補充を目的とした *ex vivo* 遺伝子治療では遺伝子を安定導入する必要がある。本遺伝子治療で用いるガンマレトロウイルスベクターは標的細胞への安定導入が可能であり、20 数年間の *ex vivo* 遺伝子治療で多くの実績がある。ccdPA への lcat 遺伝子導入法の検討を行い、1 回の導入で 1 コピー前後の導入効率が得られる方法を決定した。lcat 遺伝子導入前脂肪細胞(ccdPA/lcat)は、1 か月継代しても lcat 遺伝子を安定維持し、遺伝子導入による増殖能、表面抗原パターン、脂肪細胞分化能、分泌サイトカインに変化はなかった。

ccdPA/lcat が培養上清中に分泌した rLCAT は、健常人の血清 LCAT とほぼ同じサイズに検出され、コレステロールエステル化活性があることを確認した。さらにリポ蛋白に対する rLCAT 活性を調べる目的で LCAT 欠損症患者血清を使った検討を行った。HDL は平板状の初期 HDL 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粒子サイズが増すことが知られている。血清に rLCAT を添加してインキュベーションし、rLCAT による血清 HDL の変化を apo-A1 を指標として検出したところ、粒子サイズの大きな HDL が出現した。HDL 粒子サイズの変

化と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 が HDL 成熟化に働いたと考えられた。rLCAT を作用させた患者血清の脂質解析を行ったところ、HDL 分画では総コレステロールに対するコレステロールエステル比(CE/TC)の上昇が観察された。また、LDL に対する LCAT 活性を欠損する病態の血清で LDL 分画での CE/TC 比の増加が認められたことから rLCAT は血清リポタンパクに対する活性を保持していることが示された。*in vitro* 検討において、rLCAT による LCAT 欠損症患者の血清プロファイルの改善が認められた。

【4. lcat 遺伝子導入前脂肪細胞の安全性と *in vivo* 細胞移植検討】

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であり、遺伝子治療の最も重篤な副作用として考えられることは細胞のがん化である。ccdPA/lcat について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調べたところ、増殖能を持つ細胞は検出されなかった。また ccdPA/lcat の染色体異常は認められず、クローナリティー変化を調べる目的で行ったサザンブロットにおいて特定の細胞が増殖している状態にはないことが分かった。次に *in vivo* 安全性の検討として nude マウスにヒト ccdPA/lcat を移植したが、移植部にがん化は認められなかった。低コピー数又は高コピー数の lcat 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を同系マウスに移植したところ、腫瘍形成は認められなかった。さらに、ヒトに近い動物としてカニクイザルを用いた自家移植試験を行ったが、全ての個体において移植による異常は認められなかった。本章で行った *in vitro*、*in vivo* 検討において細胞の悪性化は認められなかった。

移植した細胞から分泌された rLCAT は血流に乗らなければ治療効果を発揮できないため、血中分泌されるかを *in vivo* で検討した。ヒト ccdPA/lcat を NOG マウスに移植したところ、血中にヒト rLCAT を検出した。移植細胞は 8 ヶ月後も残存し、血中 rLCAT は移植 1 ヶ月後においても検出された。さらに長期間に亘って治療効果を発揮するための細胞の足場(scaffold)の検討を行った。移植細胞の生着率を上げる目的で足場として、フィブリンゲル(FG)を用いた検討を行った。細胞を FG とともに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。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。

【5. 総括】

分型タンパク質の欠損に由来する疾患に対して、遺伝子治療法は、酵素補充療法が抱える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。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、これまでに過剰症の報告がなく、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、本研究によって ccdPA の性質を明らかにし、遺伝子導入法を確立し、遺伝子導入による細胞の性質が変化しないことを示した。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、*in vivo* 検討において細胞移植したマウス血中に rLCAT が分泌されることを示した。ccdPA/lcat 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。以上の検討から本遺伝子治療法は細胞採取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となった。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。