

審査の結果の要旨

氏名 浅田 咲世

遺伝子治療は、従来の医学には無かった全く新しい治療法として、近年おおいに注目されている。遺伝子治療法を導入遺伝子の性質で分類すると、(1)導入産物を発現させる方法、(2)導入細胞の遺伝子発現を制御する方法に大別される。(1)の遺伝子産物が発現する方法のうち、発現蛋白質が細胞内で機能する場合は遺伝子導入の対象細胞は限定される。(2)の遺伝子発現を制御する場合にも当然対象となる細胞は限定される。一方で(1)の導入遺伝子産物が発現し、細胞外で働く場合には導入細胞は必ずしも限定されない。一方、遺伝子導入方法については、遺伝子を直接体内へ導入する *in vivo* 法、患者から細胞を採取し体外で遺伝子を導入して患者に戻す *ex vivo* 法に分類される。

浅田は、本研究において、種々の遺伝子治療アプローチの中で、全身で作用する蛋白質の供給を目的とした *ex vivo* 遺伝子治療法の開発を行った。全身で作用する蛋白質の供給を目的とした *ex vivo* 遺伝子導入細胞には、長期生着可能で、均一な細胞集団であり、簡単・豊富に採取可能、培養が容易、形質転換しにくい、といった性質が望まれる。過去実施された遺伝子治療で使われた細胞の多くは造血幹細胞で、様々な適応疾患で研究実績があり、血球細胞へ分化し長期に渡って生着する。しかし遺伝子導入効率が低く、過去の遺伝子治療例にあるようながん化の懸念といった問題がある。

浅田は、導入遺伝子の蛋白質を分泌させる細胞として脂肪細胞に着目した。脂肪細胞はターンオーバーが10年程と言われており、アディポカイン分泌細胞あること、全身に豊富で採取と移植は美容外科で多くの実績があること、悪性腫瘍の例が少なく、移植部位を限定することにより必要ならば摘出可能であることから、導入遺伝子の蛋白質を分泌させる遺伝治療用細胞に適しているのではないかと予想した結果である。さらに、脂肪細胞を使った遺伝子治療の開発において、レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) 欠損症を対象とした。LCAT は血中コレステロールをコレステロールエステルに変換する酵素である。LCAT 欠損症は常染色体劣性遺伝性疾患で、コレステロール代謝異常により貧血、角膜白濁、腎障害を発症する予後不良疾患である。人口100万人に1人の希少疾患で、現在は治療法・治療薬がない。

通常、HDL が細胞膜から回収したコレステロールを LCAT がエステル化し、それが肝臓、LDL など他のリポ蛋白に渡ることによってコレステロールが代謝される。しかし LCAT 欠損症患者はコレステロールが代謝されず細胞や組織に蓄積することで上記の症状が現れる。これらの背景を踏まえ、浅田は LCAT 欠損症に対する遺伝子治療法を実用化するための研究開発を行った。その結果以下の事を明らかにした。

1. 遺伝子治療用細胞としての脂肪細胞の性質の解析：

皮下脂肪組織から採取できる細胞は前脂肪細胞と脂肪幹細胞の2種類知られている。脂肪組織をコラゲナーゼ処理後、培地に懸濁して遠心すると、浮遊層と沈殿層に分けられる。沈殿層からは脂肪幹細胞が採取できるが、採取直後フローサイトメーターで調べると、脂肪幹細胞の他に内皮系細胞 (CD31 陽性細胞)、血球系細胞 (CD45 陽性細胞) が混入していた。これを培養すると、CD31、45 陽性細胞は減少していくが、培養初期においてはある程度の混入は避けられないことが判明した。一方、浅田は、遠心浮遊層には脂肪油滴をもつ細胞が得られる事に気がついた。この細胞は比重の軽さから通常の培養は不可能だが、培地を満たしたフラスコで培養すると天井面に張り付き、増殖過程で油が抜け、回収後は通常培養可能となる。これは天井培養という手法で、得られる細胞は前脂肪細胞と呼ばれている。この細胞をフローサイトメーターで調べたところ CD31、CD45 陽性細胞は僅かであることを突き止めた。

脂肪細胞は遺伝子治療に使われた実績がないため、浅田は、性質を明らかにする目的で前脂肪細胞と脂肪幹細胞との比較を行った。前脂肪細胞、脂肪幹細胞ともに線維芽細胞様形態を示し、外見上の違いは認められなかった。1g の脂肪組織から獲得できた細胞数は、 10^6 オーダーでほぼ同じであり、増殖能に差はなく、良好な増殖能を示した。天井培養終了日の前脂肪細胞と脂肪幹細胞の表面抗原をフローサイトメーターで調べたところ、同じプロファイルを示し、培養を1ヵ月行った後でもプロファイルに変化はないことも確認された。

次に浅田は、細胞調製日から継代過程での脂肪分化関連遺伝子の発現の推移を調べた。これらの遺伝子は脂肪分化すると発現が上昇する遺伝子であるため、油滴を持つ脂肪細胞の状態ではこれら遺伝子の発現が確認できたが、継代に伴って発現が減少していき、脱分化状態になることを明らかにした。

さらに浅田は、前脂肪細胞と脂肪幹細胞の脂肪細胞への分化能について調べた。インスリン/インドメタシン/デキサメタゾン/IBMX を加えて脂肪分化誘導したところ、両細胞とも油滴の蓄積が認められたが、前脂肪細胞は明らかにその割合が多いことが分かった。脂肪細胞で発現が上昇する PPAR γ 2、aP2 を調べたところ、前脂肪細胞は発現が高く、分化誘導刺激に対して高い反応を示した。脂肪細胞は約 10 年以内に留まることが知られており、分化しやすい性質は移植後の生着期間に有利に働くことが期待できた。

これらの結果から、浅田は採取初期の細胞集団の均一性及び脂肪細胞への分化の容易さから前脂肪細胞のほうが遺伝子治療用細胞として適していると予想した。

2. *Icat* 遺伝子導入脂肪細胞の樹立と解析：

浅田は、遺伝子導入法として染色体に安定導入する目的でレトロウイルスベクターを選択した。*Icat* 遺伝子を前脂肪細胞へ導入する最適条件を決める為、細胞数に対するベクター量比、導入用補助試薬濃度、導入回数、について条件を変えて行った。その結果、細胞あたりの *Icat* 遺伝子導入コピー数と培養上清に分泌される LCAT 蛋白量には相関関係があることを見出した。

これらの細胞を免疫染色し、LCAT 発現陽性率を調べ、10~20%以上の値が得られた。造血幹細胞へのレトロウイルスベクターの導入効率は一般に数%とされているので、比較的高い導入効率であることが分かった。これらの条件の中から最も導入効率の高かった遺伝子導入方法を選択した。*Icat* 遺伝子導入前脂肪細胞を継代したところ、導入から 8 日目以降、コピー数が安定して推移することが分かった。また、遺伝子導入細胞と非導入細胞の増殖に違いは認められなかった。さらに、遺伝子導入細胞と非導入細胞の分化能を調べた。脂肪分化誘導 2 週間後に OilRedO で細胞内油滴を染色し、さらに細胞内に蓄積したトリグリセリドを定量した。*Icat* 遺伝子を導入しても油滴とトリグリセリド蓄積量に大きな差は認めなかった。

LCAT は肝臓で合成される、分子量 60~65kDa の糖蛋白質である。浅田は、血清中 LCAT と前脂肪細胞由来リコンビナント LCAT をウェスタンブロットで検出したところ、ほぼ同じサイズに検出した。また、LCAT のコレステロールエステル化活性を、³H ラベルコレステロール含有の人工リポソームを使って測定した。前脂肪細胞由来リコンビナント LCAT はコレステロールエステル化活性有しており、LCAT 蛋白量と相関関係が認められた。LCAT は HDL が細胞膜から回収したコレステロールをエステル化する酵素であるが、*in vitro* では血清中で LCAT 反応を進行させると、他のリポ蛋白質からコレステロールの供給を受け、HDL 上でコレステロールエステルが蓄積し、結果として HDL 粒子サイズが増大する。HDL の挙動を、HDL に結合しているアポリポ蛋白 A1 (apo-A1) を検出することにより調べた。健康人の血清 apo-A1 を二次元電気泳動で検出すると、大きな粒子サイズ~小さなサイズの HDL まで満遍なく検出されたのに対し、LCAT 欠損症患者の血清では LCAT 活性が欠落しているため、サイズの大きな HDL がほとんど検出されなかった。この患者血清に前脂肪細胞由来リコンビナント LCAT を添加し 37°C でインキュベートするとサイズの大きな HDL が増えていることを見出した。以上のことから、浅田は、*Icat* 遺伝子導入前脂肪細胞由来のリコンビナント LCAT が患者の血流に乗ればリポ蛋白代謝異常の改善が期待できることを示唆した。

3. *Icat* 遺伝子導入脂肪細胞の安全性と移植：

ex vivo 調製した細胞の移植において一番懸念されるのは細胞のがん化である。そこで浅田は、悪性化の指標の一つである足場非依存性増殖能を軟寒天培地で調べた。播種から 2~4 週間後、陽性コントロールとして使用した HeLa 細胞はコロニー数が 30 個程度確認できたのに対し、*Icat* 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞は確認できなかった。このとき寒天培地に含まれる DNA 量を測定したところ、遺伝子導入細胞には検出量に変化がなく、増殖が認められなかった。以上のことから細胞のがん化は起きていないことが分かった。

遺伝子導入ヒト前脂肪細胞をマウスに移植して、*in vivo* がん化試験を行った。まず、*Icat* 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を免疫不全マウス (nude) へ移植して 3 ヶ月経過観察した。陽性コントロール HeLa 細胞は移植部位で腫瘍が認められたのに対し、遺伝子導入細胞は経過観察中及び 3 ヶ月後の剖検において異常は認

められなかった。次に、*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。遺伝子非導入細胞、低導入コピー数、高導入コピー数の3種類で移植を行い、7ヶ月及び12ヶ月経過観察と剖検を行った。剖検時までの経過観察中および剖検時に異常は認められなかった。以上のことから *in vivo* 試験における *lcat* 遺伝子導入前脂肪細胞のがん化は認められない事がわかった。

次に浅田は、細胞の生着についても調べた。遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を蛍光色素で染色し、免疫不全マウス (NOG) の脂肪組織内へ移植したところ、生着していることが確認できた。時間経過に伴って移植細胞は徐々に減少したが、8ヶ月後も残存していることが確認できた。また、マウス血中には移植細胞由来のヒト rLCAT の分泌が確認でき、少なくとも1ヶ月は持続していることが分かった。一般に動物への細胞移植では足場があることで、生着が向上することが分かっている。ヒトへの実用化を考慮し、浅田は医薬品として認可されているフィブリンゲルを使って細胞生着の検討を行った。*lcat* 遺伝子導入マウス前脂肪細胞をフィブリンゲルと混ぜて同系マウス皮下へ移植し、2週間後摘出して観察した。移植細胞が減少していく原因としてアポトーシスによる細胞死が考えられるが、移植細胞の切片で TUNEL によるアポトーシス細胞の検出を行ったところ、フィブリンゲルがあることでその割合が優位に抑えられていることが分かった。Ki67 で染色される分裂細胞の割合に違いはなかった。フィブリンゲルとともに細胞移植することで、血中に分泌される LCAT も多くなったことからフィブリンゲルが細胞の生着を促していることを明らかにした。

以上、浅田は本研究において、遺伝子治療用細胞としての前脂肪細胞の性質を解析し、最適な遺伝子導入法の検討を行い、遺伝子導入細胞としての特質を解明した。さらに LCAT 分泌細胞としての評価として LCAT の発現とその活性を評価し、マウス血中への分泌、移植細胞の生着度の検討、さらに、安全性評価として、*in vitro*、*in vivo* で遺伝子導入前脂肪細胞のがん化しないことを示した。この遺伝子治療法が成功すれば他疾患への応用も可能になると考えられ、本研究は医学薬学領域において極めて重要な研究であり、博士（薬学）に充分値するものと判断した。