

厚生科学審議会科学技術部会
 遺伝性疾患遺伝子治療臨床研究作業委員会 委員名簿

【 千葉大学医学部附属病院 】

「家族性LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）欠損症
 を対象としたLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究」

氏 名	所 属
あさの 浅野 茂隆	早稲田大学理工学術院 特任教授
あらと 荒戸 照世	北海道大学大学院 医学研究科教授
えとう 衛藤 義勝	東京慈恵会医科大学 遺伝病研究講座教授
おのでら 小野寺 雅史	(独)国立成育医療研究センター研究所 成育遺伝研究部長
さいとう 斎藤 泉	東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設教授
しまだ 島田 隆	日本医科大学 医学部教授
はやかわ 早川 義夫	近畿大学 薬学総合研究所所長

○

疾患専門

寺本 民生	帝京大学 医学部長
-------	-----------

○：委員長（五十音順 敬称略）

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

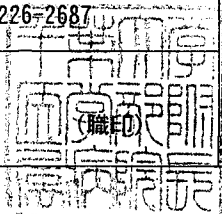
当初申請 平成22年 4月 9日

一部修正 平成24年 3月29日

一部修正 平成25年 4月16日

厚生労働大臣 殿

実 施 設	所在地	〒260-8677 千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1
	名称	千葉大学医学部附属病院 (電話番号) 043-222-7171 (FAX番号) 043-226-2687
	代表者 役職名・氏名	千葉大学医学部附属病院長 宮崎 勝



下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実施計画に対する意見を求めます。


記


遺伝子治療臨床研究の課題名	総括責任者の所属・職・氏名
家族性LCAT(レシチン:コレステロールアシルトランスフェラーゼ)欠損症を対象としたLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究	千葉大学大学院医学研究院細胞治療内科学・教授 横手 幸太郎

遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成22年4月9日	(申請年月日)
-----------	---------

研究の名称	家族性LCAT (レシチン: コレステロールアシルトランスフェラーゼ) 欠損症を対象としたLCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究
研究実施期間	厚生労働大臣による了承の日より6年間

総括責任者	所属部局の所在地	千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1 (郵便番号 260-8677)	
	所属機関・部局・職	千葉大学大学院医学研究院細胞治療内科学 教授 (千葉大学医学部附属病院 糖尿病・代謝・内分泌内科 科長)	
	氏名	横手 幸太郎	
実施の場所	所在地	千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1 (郵便番号 260-8677)	
	名称	千葉大学医学部附属病院	
	連絡先	糖尿病・代謝・内分泌内科 (電話番号 043-222-7171)	
総括責任者以外の研究協力者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	武城 英明	東邦大学医学部医学科臨床検査医学研究室 教授 (千葉大学 客員教授)	総括責任者補佐、臨床有効性、安全性に評価に関する協力および助言
	佐藤 兼重 窪田 吉孝	千葉大学大学院医学研究院形成外科学 教授 千葉大学医学部附属病院形成・美容外科 助教	脂肪組織摘出術および LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液移植
	花岡 英紀	千葉大学医学部附属病院 臨床試験部長	臨床研究の円滑な遂行に関わる業務、スケジュール、記録管理
	黒田 正幸	千葉大学医学部附属病院未来開拓センター 特任准教授	遺伝子治療臨床研究に係わる培養細胞及び実験動物を用いる研究全般ならびに LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液の調製における工程管理試験および品質管理試験の管理
	セルジェンテック株式会社	創薬研究開発部	LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液の調製 (業務委託)
外部協力者	峰野 純一	タカラバイオ株式会社 細胞・遺伝子治療センターセンター長	LCAT 遺伝子搭載レトロウイルスベクターの製造と品質に関する評価・助言 遺伝子導入前脂肪細胞の安全性試験への協力・助言

<p>審査委員会が研究計画の実施を適当と認める理由</p>	<p>「家族性 LCAT (レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ) 欠損症を対象とした LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究」について「遺伝子治療臨床研究実施計画概要書」ならびに「遺伝子治療臨床研究実施計画書」に基づき検討し、次の理由により本研究を適当と判断した。</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 根本的治療法のない、稀な常染色体劣性遺伝性疾患である家族性 LCAT 欠損症に対する有効な治療法は確立されておらず、新規治療法の確立が必要であること。 ② LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が産生、分泌する LCAT は基礎研究の結果から本来の活性を発揮し、患者血清検体中でその病態を正常化させる機能を有することが示されたこと。 ③ 動物実験において、LCAT 血中濃度が患者の治療レベルに達していることが推察できる結果が得られたこと。 ④ 用いるレトロウイルスベクターは安全性が高く、また基礎研究の結果から、遺伝子導入後の細胞において有害事象は認められなかったこと。 ⑤ 移植する生成物は GMP 準拠施設で調製されること。 ⑥ 同意の取得方法が適切であること。 ⑦ プライバシーの保護、プロトコールの遵守、プロトコールの内容変更について、適切な対応が行われる体制があること。 ⑧ 遺伝子治療臨床研究に関する指針、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律などの指針・基準を遵守した実施計画となっていること。 <p>以上の理由により本臨床研究を実施することを適当である、と判断した。</p>	
	<p>審査委員会の長の職名</p>	<p>氏 名</p>
	<p>千葉大学医学部附属病院 遺伝子治療臨床研究 審査委員会委員長</p>	<p>松 原 久 裕 </p>

研究の区分	遺伝子治療臨床研究	遺伝子標識臨床研究
研究の目的	<p>家族性 LCAT 欠損症に対して、患者の自己前脂肪細胞より調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を自家移植することにより LCAT 補充を行う方法の安全性について検証することを目的とする。また、併せて LCAT 欠損に起因する症状（低 HDL コレステロール血症、角膜混濁、腎障害、溶血性貧血）の改善効果についても探索的に検討する。</p>	
対象疾患及びその選定理由	<p>家族性 LCAT 欠損症は、稀な常染色体劣性遺伝性疾患である。本症は、古典型 LCAT 欠損症、部分型 LCAT 欠損症、魚眼病に分類され、血中コレステロールのエステル化を担うコレステロール逆転送系酵素である LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）の先天的な欠損もしくは遺伝子異常による LCAT 活性の欠失や活性低下によって、低 HDL（高比重リポ蛋白）血症、角膜混濁、腎障害および溶血性貧血など多様な臨床症状を呈するとされている。本邦でも 22 家系が報告されている。</p> <p>家族性 LCAT 欠損症のうち、古典型 LCAT 欠損症の LCAT 活性（合成基質法による HDL 分画中 αLCAT）は、正常 LCAT 活性に比較しその活性は 10%未満、部分型 LCAT 欠損症および魚眼病は正常の 20%以下であることが知られている。このことから、LCAT を安定持続的に供給し、正常な LCAT 活性の 10%に相当する LCAT 活性を増加させることによって、臨床症状の改善が期待できるものと考えた。</p> <p>最近 LCAT 補充を目的とした遺伝子組換え型 LCAT が LCAT 欠損モデルマウスにおいて短期間の薬効を示したと報告されている。しかし、一般的に欠損蛋白の補充療法は、その酵素の半減期から推定した補充頻度や通院頻度などから、患者・家族に大きな負担を強いられると言われている。またこれまでに、新鮮血（全血または血漿）輸血（LCAT 補充）が行われた報告があり、一部の症状（溶血性貧血）が速やかに改善することが報告されているが、その効果は一時的であり、加えて新鮮血輸血は感染症の危険性を拭えない。</p> <p>そこで、患者の皮下脂肪組織から分離・培養した前脂肪細胞^{注1)}を用いて、正常な LCAT の持続供給が可能な LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞^{注2)}を調製し、患者の皮下脂肪組織内に自家移植することにより LCAT 補充を行う細胞・遺伝子治療法の開発を行うこととし、千葉大学大学院医学研究院細胞治療学、臨床遺伝子応用医学、形成外科及びセルジェンテック株式会社の間で共同研究を開始した。本共同研究においては、健康成人より提供を受けた皮下脂肪組織から分離・培養した前脂肪細胞を用いて LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を調製することに成功し、また、その LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が発現・産生する LCAT は、分子サイズ、免疫学的特性および生物活性の面から正常 LCAT であることを確認した。hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞のマウス移植実験での血中ヒト LCAT 活性測定が困難なため、マウス血中に分泌される hLCAT 蛋白量を測定し、健康人の血中 LCAT 蛋白量の 10%を補充できることを確認した。</p> <p>以上より、家族性 LCAT 欠損症を対象とした LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を用いた細胞・遺伝子治療法の安全性と臨床効果の検討を、本臨床研究において実施することとした。</p> <p>^{注1)} 前脂肪細胞は脂肪油滴を持たない細胞である。天井培養法（脂肪含有細胞が低比重特性を有することを利用した方法）を用いて脂肪油滴を含有する脂肪細胞から得られる。</p> <p>^{注2)} ヒトの皮下脂肪組織から調製した前脂肪細胞に hLCAT 遺伝子搭載レトロウイルスベクターによって hLCAT 遺伝子を導入し、LCAT 蛋白質の持続発現をもたらすヒト前脂肪細胞</p>	

遺伝子の種類及び
その導入方法

1. 導入する遺伝子の構造と性質

hLCAT 遺伝子はヒト肝がん細胞株 HepG2 から全 RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作製後、PCR 法によって回収した。用いたプライマーを以下に示す。

forward primer: 5' -atcggatccaggctggaaatggggccgccc-3'
reverse primer: 5' -atcggatccgctcgacggaaggtctttattcaggaggcggggg-3'

得られた塩基配列(約 1.3kb)を hLCAT 遺伝子のオープンリーディングフレーム配列 (Accession Number M12625) と比較し、一致していることを確認した。

この遺伝子では、C 末端のグルタミン酸とストップコドンに重なった形でポリ A 付加シグナル (AATAAA) がコードされているため、ストップコドンを TAA より TGA に改変して導入遺伝子内のポリ A 付加シグナルを除いた。また、蛋白質合成の効率を上げるために開始コドン上流に Kozak 配列 (CCGCCACC) を挿入した。

2. 標的細胞とした細胞の由来および生物学的特徴ならびに標的細胞として選択した理由

酵素補充療法は生理活性を有する分泌蛋白質欠損または低下症の治療として有効であり、これには遺伝子組換え蛋白質製剤の投与あるいは遺伝子治療等がある。遺伝子治療は、遺伝子組換え蛋白質製剤に比べ、体内で持続的に蛋白質産生可能なため長期治療に適していると考えられている。

LCAT 補充療法の効率的な遺伝子導入系として、皮下脂肪組織由来ヒト前脂肪細胞を標的細胞とし、*ex vivo* でのレトロウイルスベクターによる遺伝子導入法を選択した。分泌蛋白質の補充療法には、一定レベルの血中濃度を維持するのに必要な生産・供給体制の構築が不可欠であり、当該蛋白質の高発現細胞を充分量確保できるかどうかが課題である。標的細胞とするヒト前脂肪細胞は、形成外科領域で実用化されている脂肪摘出術により皮下脂肪組織から容易に十分量採取することができ、また、体外で選別、増殖させたヒト前脂肪細胞に導入効率の高いレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入が可能である。さらに自家移植であるため、遺伝子導入されたヒト前脂肪細胞を脂肪組織内に移植した際、拒絶反応を起こさずに安定して生着するものと考えられる。なお、脂肪組織には血管網が発達しており、ヒト前脂肪細胞(脂肪細胞)より分泌された LCAT は速やかに血中に移行するものと考えられる。

ヒト前脂肪細胞が遺伝子導入の標的細胞として補充療法に有用であることは、以下の試験の結果からも推察される。

マウスを用い修飾型ヒトインスリン遺伝子および標識遺伝子をレトロウイルスベクターにより *ex vivo* でマウス前脂肪細胞へ遺伝子導入し、体内に移植後に遺伝子発現状態を組織学的に観察した結果、マウス前脂肪細胞およびその分化した脂肪細胞で導入遺伝子の良好な発現が確認された。また、糖尿病モデルマウスを用いた試験では、修飾型ヒトインスリン遺伝子導入マウス前脂肪細胞の移植後、約 2 ヶ月以上にわたり安定・持続した血糖低下作用が観察されている。

純度の高いヒト前脂肪細胞の調製には、まず皮下より摘出して得られる脂肪組織を酵素処理と遠心分離することにより、低比重脂肪細胞含有画分を得る。脂肪組織に存在する他の血液系細胞や内皮系細胞をさらに分離するために、この画分の比重特性を利用し、培養フラスコを培地で満たした天井培養を行って、フラスコの天井面に接着性の低比重細胞群を濃縮する。この

1 週間程度の天井培養で天井面に接着・増殖した細胞を初代ヒト前脂肪細胞とした。その形態は線維芽細胞様の細胞群である。最初の遠心分離により沈殿した Stromal Vascular Fraction (SVF) に多く存在する未分化間葉系細胞は、様々な細胞への分化能力を有しており、長期培養した細胞を免疫不全マウスに移植することにより細胞ががん化したことが報告されているが、天井培養にて単離・回収したヒト前脂肪細胞ではそのような形質転換は現在まで認められていない。

得られたヒト前脂肪細胞の細胞表面マーカーは、CD13⁺31⁺34⁺45⁺90⁺105⁺146⁺であり、脂肪細胞への分化能があり、かつレトロウイルスベクターによる遺伝子導入に不可欠な分裂・増殖能力を保持している。なお、ヒト体内への移植後は増殖せず脂肪細胞に成熟すると考えられる。

3. 遺伝子導入方法の概略および当該導入方法を選択した理由

ヒト前脂肪細胞への hLCAT 遺伝子の導入は、hLCAT 発現レトロウイルスベクター懸濁液を予め設定した割合 (multiplicity of infection: MOI) で、皮下脂肪組織から調製したヒト前脂肪細胞培養液に添加して培養することにより行う。遺伝子導入後、必要細胞数までに培養させ、移植用溶媒に懸濁させた細胞を採取時と同じ皮下脂肪組織内に注入移植する。皮下脂肪組織からのヒト前脂肪細胞調製より移植用 LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液(以降「細胞懸濁液」という)調製までの工程は治験薬 GMP 準拠の細胞調製室 (CPC) において行う。

遺伝子導入法としては *in vivo* での直接導入の系と、*ex vivo* での遺伝子導入の系が考えられる。*in vivo* の直接導入の系で、比較的感染効率の高いベクターとしてはアデノウイルスベクターがあるが、ヒトへの投与では免疫反応の惹起は避けがたく、長期にわたる治療で再投与も考慮せざるを得ない場合には適切とは言えない。非病原性ウイルスに由来するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) は、もととなったウイルスの性質から安全性は高く、筋細胞、神経細胞、肝細胞などの非分裂細胞に効率よく遺伝子導入ができ、そのような細胞では遺伝子発現が長期間持続する。筋細胞を標的とした AAV による蛋白質補充遺伝子治療では当初ある程度の臨床的効果が得られたとの報告があったが、その後ベクター量を増量したものの明瞭な臨床効果が得られずこの臨床研究は中止となっている。AAV はそのゲノムが一本鎖であるため、遺伝子の発現には二本鎖になる必要がある。しかしながら現行の AAV ではその効率が必ずしも高くはないため十分な発現が起きなかったためではないかと考えられる。その後肝臓への遺伝子導入に基づく臨床研究も行なわれたが、免疫反応の惹起に起因する肝細胞障害から導入遺伝子の発現が長期間持続しなかったと報告されている。最近、シュードタイプの AAV2/8 を用いた血友病 B に対する遺伝子治療の報告がなされている。高用量投与症例で改変型ベクターに対する特異的な免疫反応が認められているが、6 例中 4 例で組換え型第 IX 因子製剤の併用投与が必要でなくなり、残りの 2 例は、その投与間隔が伸びるなどこれまでの報告に比べて有効性が向上している。他にも、AAV を用いた *in vivo* の遺伝子治療法が臨床試験で検討されている。

本臨床研究では、*in vivo* での遺伝子導入ではなく、*ex vivo* でのレトロウイルスベクターによる遺伝子導入を選択した。これは、レトロウイルスベクターの分裂細胞への遺伝子導入効率が高く、効率の良い遺伝子組み込みに基づく安定した持続蛋白質発現が可能な特徴を有するためである。*ex vivo* での遺伝子導入後の遺伝子の組み込みを考えた場合、ウイルスベクターの候補としてはレトロウイルスベクターの他に AAV の使用も考えられる。しかしながら現行の

AAV は、遺伝子の挿入サイズを確保する目的で染色体への挿入に寄与する Rep 配列が除かれているため染色体への挿入効率が非常に低く、また染色体外に環状 DNA として存在することが報告されている。したがって、この AAV を用いて前脂肪細胞のような分裂時期の細胞に導入された遺伝子は細胞の増殖に伴い希釈されるため、本臨床研究のように必要細胞数まで拡大培養すると、前述の二本鎖 DNA への変換効率の低さに加えて、染色体への組み込み能の低さから、十分な薬効を保証できるだけの LCAT 遺伝子が残存しなくなるおそれがある。以上から、*ex vivo* での AAV の使用も本酵素補充療法における導入遺伝子方法としては適切ではないと考えられる。一方、レトロウイルスベクターでは増殖性ウイルス (RCR) の出現が危惧されるが、本臨床研究で用いるレトロウイルスベクターとしては、*gag*、*pol*、*env* 遺伝子配列を完全に除いた Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV) 由来の pDON-AI を使い、パッケージング細胞として *gag-pol* と *env* 遺伝子が別々の DNA 上に存在している GP+envAM-12 細胞を用いることで、相同的組換えによる増殖性ウイルス (RCR) 出現の可能性を低く抑えている。

1999 年からフランス、続いてイギリスでレトロウイルスベクターを用いた X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-linked Severe Combined Immunodeficiency : X-SCID) に対する遺伝子治療が始まり、大半の患者が免疫能を獲得して通常の生活を送れるようになった。しかし、治療を受けた患者 20 名のうちフランスで 4 名、イギリスで 1 名計 5 名に T リンパ性白血病を発症し、1 名が死亡した。これは、患者の染色体中のがん遺伝子 LMO2 のプロモーター領域近傍にレトロウイルスが組込まれ、LMO2 が恒常的に活性化された結果、白血病を発症したと考えられる (フランスの 1 例は、CCDN2 遺伝子へのベクター組み込みによる)。細胞のがん化には複数の遺伝子異常の蓄積が必要である。X-SCID の場合、治療効果の発現のためには γ_c 遺伝子が導入され、その機能が正常化された細胞により免疫系が構築される、すなわち遺伝子導入細胞のみが生き残る体内環境にあること、 γ_c 遺伝子自体が強力な T リンパ球増殖作用を持つという特殊事情が重なって白血病を発症したと考えられる。CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞とした慢性肉芽腫症 (CGD) のドイツでの遺伝子治療において、2 例中 2 例の骨髄異形成症候群 (MDS) の発症が報告されており、EVI1 遺伝子の発現亢進が原因で染色体の不安定性が誘導され、7 番染色体のモノソミーを誘発したと考察されている。一方、CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞としたアデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症のイタリアでの遺伝子治療においては、10 例中 8 例で酵素補充療法の必要がなくなり、遺伝子治療の有効性が確認されるとともに、長期フォローアップにおいて癌化が見られなかったと報告されている。本研究は X-SCID 遺伝子治療と同様にレトロウイルスベクターを用いているが、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を用いた *in vitro* 及び *in vivo* の非臨床試験では増殖能の亢進や形質転換が現在のところ認められていない。また、この治療原理においては遺伝子導入された細胞の体内での選択的増殖が LCAT 欠損症の病態からは想定されない。

ex vivo による遺伝子導入の利点は、細胞への遺伝子導入の工程を品質管理できる点にある。標的細胞をヒト前脂肪細胞に絞り込むことで、遺伝子導入した細胞を体内の脂肪組織に戻したときに、脂肪細胞以外の細胞に分化して予測外の副作用を引き起こす可能性を極力排除した。さらに、ヒトの脂肪組織 (前脂肪細胞) の状態にも個人差のあることが報告されており、投与前の LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の LCAT 活性を予め確認してから移植できることは移植細胞数のコントロール面からも大きなメリットである。

一方、脂肪細胞の体内での代謝回転が遅いことから安定した遺伝子発現が期待できるが、さらに導入遺伝子が染色体に組み込まれることは、細胞が分裂しても娘細胞に引き継がれていく点で長期間の発現には有利である。

4. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法

(1) 野生型ウイルスの生物学的特徴及びヒトに対する影響

使用するベクターは Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV) 由来のレトロウイルスベクターである。MoMLV は sarcoma37 細胞より分離された RNA ウイルスであるが、発がん遺伝子は持たない。長期間感染したマウスにリンパ性白血病を起こすことが知られているが、ヒトには感染することはない。

MoMLV のゲノムは 5' LTR、パッケージングシグナル (Ψ)、*gag*、*pol*、*env*、および 3' LTR よりなる。LTR にはエンハンサー/プロモーター活性があり、 Ψ はウイルスゲノム RNA がウイルス粒子に取り込まれるのに必要な配列である。*gag* はウイルスのコア構造蛋白質を、*pol* は逆転写酵素及びインテグラーゼを、*env* はウイルス外被蛋白質をそれぞれコードする遺伝子である。レトロウイルスはウイルス粒子外被に存在する ENV と標的細胞の表面にある特異的受容体が結合した後、膜融合によりウイルス粒子が細胞内に取り込まれる。その後、逆転写酵素によりウイルスゲノム RNA が 2 本鎖 DNA に逆転写され、核に移行してインテグラーゼにより宿主染色体に組み込まれる。宿主 DNA 上のウイルスゲノム (プロウイルス) は宿主の転写機構によってウイルス RNA へと転写されるが、一部は GAG、POL、ENV へと転写・翻訳され、ウイルス粒子を形成する。ウイルス RNA を取り込んだウイルス粒子は出芽により細胞外へと放出され、次々と周囲の細胞に感染していく。MoMLV はエトロピックウイルス (同種指向性ウイルス) のため、マウス細胞にしか感染しないが、異なる種にも感染性を示すアンフトロピックウイルス (多種指向性ウイルス) 由来の ENV を用いることで、ヒト細胞への感染も可能となる。

(2) ウイルスベクター (マスターセルバンク) の作製方法

ヒト肝がん細胞株の cDNA ライブラリーから調製した hLCAT 遺伝子を用い、pDON-AI DNA ベクターのマルチクローニングサイト (MCS) の *Bam*HI 切断部位と *Sa*II 切断部位の間に、当該制限酵素配列を含むプライマーにより増幅させた hLCAT 遺伝子を挿入した。次に、蛋白質合成効率の向上のために開始コドン ATG 上流に Kozak 配列 (CCGCCACC) を挿入し、また、hLCAT 遺伝子ストップコドン近傍に存在する poly A 付加配列の AATAAA (TAA がストップコドン) を別のストップコドン TGA に改変した。さらに、目的以外の不用な遺伝子の発現を避けるために、*Sa*II 切断部位から *Xho*I 切断部位までを切り出して、Minimal SV40 promoter 配列及び *Neo*^r (ネオマイシン耐性遺伝子配列) を除去し、レトロウイルス産生用プラスミド (pCGThLCAT) を構築した。

MoMLV の *gag-pol* 遺伝子とエトロピックエンベロープ遺伝子を発現するパッケージング細胞 GP+E-86 細胞に、レトロウイルスベクター産生用プラスミド (pCGThLCAT) をハイグロマイシン耐性遺伝子と同時に、Lipofectamine2000CD (ライフテクノロジー ジャパン株式会社) を用いてトランスフェクションした。これらについて Hygromycin B 選択を行うことにより薬剤耐性細胞プールを獲得し、この細胞の培養上清から調製した hLCAT 発現エトロピックレ

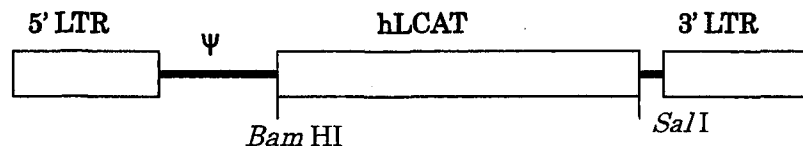
トロウイルスベクターを、RetroNectin (タカラバイオ株式会社) を用いて、同じく MoMLV の *gag-pol* 遺伝子およびマウスウイルス 4070A 由来アンフォトロピックエンベロープ遺伝子を発現する GP+envAM-12 細胞 (マウス由来細胞) に接種させた。

遺伝子導入細胞をプレートに限界希釈して播種し、ウイルスベクター産生細胞のスクリーニングを行い、シングルクローンと考えられるウェルについてその上清をリアルタイム RT-PCR で分析して得た陽性クローンの中から、最も高タイターのウイルス産生細胞を選択した。この細胞を hLCAT 発現アンフォトロピックレトロウイルスベクター産生細胞としてプレマスターセルバンクを作製し、さらにこのプレマスターセルバンクよりマスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) を作製した。

(3) ウイルスベクターの遺伝子構造と性質

hLCAT 発現レトロウイルスベクターの塩基配列の基本骨格は、pDON-AI プラスミド (タカラバイオ株式会社) に由来しているが、マスターセルバンクを作製する際に GP+envAM-12 細胞にエコトロピックウイルスベクターを感染させてアンフォトロピック hLCAT 発現レトロウイルスベクターを構築する過程で、宿主染色体に組み込まれる時に、逆転写酵素によりウイルスゲノム上の 3' LTR 配列が 5' LTR 領域へとコピーされるため、5' LTR 領域塩基配列はオリジナルの MFG ベクターと同一となる。従って、MCB により生産されるウイルスベクターでは、hLCAT 遺伝子の発現は元の MoMLV 由来の LTR エンハンサー/プロモーターにより誘導されることになる。ウイルスゲノム RNA をウイルス粒子に取り込むのに必要なパッケージングシグナルとしての Ψ 配列を有するが、ウイルス粒子形成に必須な *gag*、*pol*、*env* が除かれているため、*gag*、*pol*、*env* のすべての遺伝子を発現しているパッケージング細胞 (GP+envAM-12 細胞) でのみ感染性ウイルス粒子を形成することが出来る。従って、細胞内で組換えを起こしてこれらの遺伝子を全てウイルスゲノムに取り込まない限り、通常の細胞でも増殖可能な増殖性ウイルス (RCR) が出現することはない。

以下に hLCAT 発現レトロウイルスベクター遺伝子の構造概略を示す。



LTR : Long terminal repeat、 Ψ : パッケージング配列

hLCAT 発現レトロウイルスベクター遺伝子の構造概略図

(4) ウイルスベクター (マスターセルバンク) の生物学的特徴

hLCAT 発現レトロウイルスベクター作製には、パッケージング細胞として GP+envAM-12 を用いた。GP+envAM-12 細胞は野生型 MoMLV の *gag-pol* 及びマウスアンフォトロピックウイルス 4070A 由来の *env* を効率よく発現する NIH3T3 由来のマウス細胞株である。 Ψ 配列を持たないためウイルス粒子中に RNA を取り込むことが出来ず、単独で野生型ウイルスを産生することはない。上記 hLCAT 発現レトロウイルスベクター製造用マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) から産生されるウイルスベクターの遺伝子導入可能宿主は広範囲のもの (アンフォトロピック) になり、マウス、ラットのみでなくヒト、サル等にも遺伝子導入可能である。なお、

	<p>レトロウイルスの特質として、細胞への遺伝子導入には標的細胞が増殖期にあることが必要であるが、一度染色体に組み込まれた遺伝子は安定して娘細胞へと伝えられ、長期にわたる発現が期待できる。パッケージング細胞内で hLCAT 発現ベクター遺伝子が宿主遺伝子と組換えを起こす可能性は否定できないが、GP+envAM-12 細胞では <i>gag-pol</i> と <i>env</i> が独立して存在していることから、野生型の増殖性レトロウイルス (RCR) が出現するには複数回の組換えが同時に必要であること、また、このウイルスベクターは <i>gag</i>, <i>pol</i>, <i>env</i> が完全に欠落しているため、相同的組換えに必要な元のウイルス由来配列はより少なくなっていることから、RCR 出現の可能性は極めて低いと考えられる。RCR が出現しない限り、体内で周囲の細胞や他の臓器へ伝播することはない。</p> <p>5. 導入遺伝子からの生成物の構造および生物活性</p> <p>LCAT は、血中コレステロールのエステル化を担うコレステロール逆転送系 (コレステロールの末梢組織から肝臓へ転送) の最初の段階を支配する重要な酵素である。肝臓で合成され、血中では HDL と結合して存在し、遊離コレステロールにレシチンの脂肪酸を転移してコレステロールエステルを生成するコレステロールエステル化酵素である。N 末端にシグナル配列をもつ分泌型蛋白質 (440 アミノ酸残基) として合成されるが、分泌された成熟 LCAT はアミノ酸 416 個よりなる分子量約 63,000 の糖蛋白質 (糖鎖含量約 25%) である。血中半減期は約 4 日と報告されている。ヒトでの LCAT 欠損症については低 HDL コレステロール血症はじめ全ての血中リポ蛋白分面に異常がみられるが、臨床症状としては、角膜混濁や腎機能障害などがみられている。LCAT を過剰発現させたトランスジェニックマウスではコレステロール逆転送の亢進や高 HDL コレステロール血症が報告されている。</p>
<p>安全性についての 評価</p>	<p>1. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の特性</p> <p>健康成人より提供された腹部皮下脂肪から天井培養法によってヒト前脂肪細胞を分取し、硫酸プロタミンを補助試薬としてレトロウイルスベクターを用いて hLCAT 遺伝子を導入して調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の特性評価の結果は、以下のとおりである。</p> <p>(1) 形態</p> <p>ヒト前脂肪細胞は、顕微鏡下で線維芽細胞用の形態を示した。遺伝子導入の有無に係わらず細胞形態に差は認められなかった。培養期間が 1.5 ヶ月程度までは形態的には大きな変化は示さなかった。</p> <p>(2) 細胞プロファイル</p> <p>上記方法で調製した LCAT 遺伝子導入ヒト脂肪細胞について、腹部皮下脂肪採取後 28 日目に、20 種の膜蛋白質プロファイリングを行った結果、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞は CD31⁻CD45⁻ (血球系マーカー及び血管系マーカーがともに陰性) 細胞であり、その他の特徴として以下のことが判明した。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ CD45 及び CD34 が陰性であることから血球系幹細胞の混入はないと考えられる ・ CD105, CD146 が陽性であることから、線維芽細胞ではない ・ CD36 (脂肪酸トランスポーター) は培養初期には moderate な発現が見られ、培養により徐々に低下していく ・ 間葉系幹細胞マーカーとして知られる CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 が陽性であり、未分化な多能性幹細胞や全細胞系統の造血前駆細胞に発現が認められる CD34 は陰

性であり、また、すべての組織に幅広く発現されているとされる CD59 (補体による細胞溶解を防ぐ膜蛋白質) は陽性である

これらより、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞は、CD13⁺31⁻34⁻45⁻90⁺105⁺146⁺ と表され、この細胞プロファイル結果は、天井培養法により分取したヒト前脂肪細胞の性質に関する宮崎らの報告と概ね一致していた。また、吉村らが示した脂肪由来細胞の細胞プロファイルでは CD34 の発現は陽性を示したが、この相違は天井培養法の利用の有無や培養期間の相違によるものと考えられる。

(3) 増殖速度

上記方法で調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の腹部皮下脂肪採取後 9 日目 (遺伝子導入翌日) から 21 日目 (移植予定日) までの倍加時間は 1.4~2.0 日であった。増殖速度は遺伝子導入の有無で影響を受けなかった。

(4) 前脂肪細胞の分化能：脂肪幹細胞との比較

同一のドナーからヒト前脂肪細胞と脂肪幹細胞を調製し、脂肪、骨、軟骨分化能についてそれぞれの分化誘導刺激下で比較検討を実施した。その結果、脂肪分化能はヒト前脂肪細胞が優れており、骨、軟骨分化能は脂肪幹細胞と同等であった。

(5) hLCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の脂肪細胞への分化能

上記方法で調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞について、腹部皮下脂肪採取後 21 日目 (移植時) の細胞を播種し、3 日間の前培養の後に分化誘導した。その 2 週間後、約 50% の LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞に、脂肪細胞への分化が認められた。分化能は LCAT 遺伝子導入の有無で影響を受けなかった。移植時に scaffold として用いるフィブリンゲルを使用した *in vitro* 3 次元培養を行った結果、培養フィブリンゲルの収縮と細胞密度の増加と共に、培養 28 日目から Oil Red O による染色される細胞が出現した。少なくともこの条件においては外部からの刺激を必要とせず、前脂肪細胞は自発的な脂肪細胞への分化能を有することが確認された。

(6) hLCAT 遺伝子導入コピー数と導入遺伝子の安定性

上記方法で調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞について、hLCAT 遺伝子の導入を行い、経時的に細胞を回収し、導入遺伝子コピー数を測定したところ、導入後 8 日目の導入遺伝子コピー数は 1 細胞あたり 1~2 コピーであり、移植予定日 (遺伝子導入 14 日後、脂肪組織 21 日後) を 3 週間程度経過しても安定に推移することが確認された。

また、導入後 19 日目 (脂肪採取後 34 日目) に抽出したゲノム DNA 中の導入 hLCAT 遺伝子塩基配列を解析したところ、その塩基配列に変化は見られなかった。

(7) hLCAT 遺伝子搭載レトロウイルスベクターのヒト前脂肪細胞への導入効率

上記方法で調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞について、hLCAT 遺伝子を導入後 12 日目 (脂肪採取後 20 日目) に固定し、抗ヒト LCAT ウサギ抗体にて免疫染色を行ったところ、LCAT 発現陽性細胞の割合はおおよそ 30% であった。

(8) LCAT の発現性および発現した LCAT の活性

上記方法で調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞について、hLCAT 遺伝子を導入後 12 日目 (脂肪採取後 20 日目) から 3 日間 (脂肪採取後 23 日まで) までの期間において、培地交換を行わず培養した培養液を回収しその LCAT 活性を合成基質法で測定した。また、ウエス

タンブロットにより、培養上清中への LCAT 蛋白質の分泌を確認した。

LCAT の分子サイズはヒト HDL 由来のものと同様 (60~65kDa) であることから、糖鎖修飾された LCAT と考えられる。また、培養液の LCAT 活性測定結果から、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞 (10^6 cells、平均導入コピー数 0.37 コピー/細胞) は、3 日間でおよそ 1.31 nmol E-Cho/h の酵素活性相当の LCAT を生産・分泌することができるものと考えられた。

(9) アポA1 蛋白分布変化による LCAT 活性の評価

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が分泌する LCAT 蛋白質は用量依存的に魚眼病 (FED) 患者血清中のアポ A1 蛋白含有粒子のサイズを高分子側にシフトする活性を有していることが分かった。この検討結果から、FED 患者血清の状態が、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が培養上清中に分泌する LCAT 蛋白質の作用により、健常人の血清状態により近づくことが確認された。この分布変化は血清中コレステロールのエステル化活性と関連していた。すなわち、分泌された LCAT 蛋白質は患者血清中で所望する薬効を発揮することが示された。

同じ培養上清検体を用い、コレステロールのエステル化活性を測定した。PA/LCAT 濃縮培養上清中の hLCAT は rLCAT (市販品) の 2~3 倍のエステル化活性を示した。すなわち市販の rLCAT と同等以上の活性を示すことが明らかになった。

(10) 家族性 LCAT 欠損症における腎機能障害関連異常リポ蛋白の解析

家族性 LCAT 欠損症の予後を規定する合併症として腎機能障害が知られている。腎機能障害は LCAT 活性の著しい低下により生じる異常リポタンパクが原因であるとされている。本遺伝子治療の一つの目的は患者の腎不全への進展を阻止することであることから、腎機能障害と連動する異常リポタンパクの同定は臨床研究の臨床評価に不可欠である。国内外の症例についてリポタンパク異常の解析を進め、同じ変異を持ちながら腎不全を発症した症例と未発症の症例、また、脂肪制限食による食事療法により腎機能の改善が見られた症例を経験し、その血清リポ蛋白のゲルろ過分画解析を元に、ゲル濾過で粒子サイズが大きく、健常人において VLDL 粒子、LDL 粒子が分離される分画に腎機能と連動するリポ蛋白の存在を見出した。

(11) 家族性 LCAT 欠損症患者血清における LCAT 機能の評価

FED 患者血清に加えて、本臨床研究の対象とする病態である家族性 LCAT 欠損症 (FLD) 患者について HDL の機能を改善するかどうかを検討したところ、FLD 患者血清においても LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が分泌する hLCAT 蛋白質はアポ A1 蛋白含有粒子のサイズを高分子側にシフトする活性を有していることが分かった。脂質組成解析の結果、LCAT の添加により HDL の生成に機能していることがわかった。同様の手法により LDL 分画を解析した結果、FLD 血清中では LCAT 添加により脂質組成が変化し、コレステロールエステルの増加とリン脂質の低下が認められた。すなわち LDL 分画の組成に異常を認める FLD 患者血清において脂質組成の改善を認めた。また、腎機能障害に関連して濃度が上昇する VLDL 関連粒子の濃度が LCAT 添加により減少することがわかった。

(12) 長期培養による形質変化の有無 (軟寒天培地でのコロニー形成能の検討)

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を hLCAT 遺伝子の導入後、継代培養を実施し、移植予定日の細胞について 96 well plate に 1 well あたり 10,000 個の細胞を軟寒天培地に播種しコロニー形成能の有無を確認したところ、移植実施予定日までにコロニー形成能を獲得することはなかった。*in vitro* での形質変化の有無を確認するため、長期培養を実施すると 130~150

日で増殖を停止することが分かった。すなわち長期培養を実施しても不死化、がん化などの形質変化は認められなかった。一方、陽性対照として HeLa 細胞を 100 個/well となるように播種したものをういたところ、平均約 30 個のコロニーが検出された。

(13) 遺伝子導入細胞における染色体異常の有無

天井培養終了後の初期段階での細胞と、移植予定日を経過した細胞（脂肪組織摘出約 40 日後）には、細胞の *in vitro* での培養と加工に伴う染色体異常は認められなかった。

(14) hLCAT 遺伝子導入による前脂肪細胞の特性変化

上記(1)～(3)及び(11)～(12)の各検討項目に関して、LCAT 遺伝子非導入ヒト前脂肪細胞についても検討を行ったが、いずれの検討項目でも hLCAT 遺伝子導入による細胞の特性変化は観察されなかった。

2. 実験動物を用いた研究の成果

(1) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の *in vivo* における LCAT の発現性

C57B6J マウス前脂肪細胞をヒトと同様な方法で皮下脂肪より調製し、hLCAT 遺伝子を導入後、同系マウスの皮下に移植した。移植後 28 日目の剖検で、hLCAT の発現が免疫染色で確認された。以上のことより、hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞は *in vivo* においても hLCAT を発現していることが確認できた。

(2) LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の NOG マウス皮下移植における生着性と生体への影響

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を免疫不全 (NOG) マウスの皮下組織内に移植し、投与 28 日後に PKH26 による細胞表面蛍光標識法により観察したところ、移植部位と考えられる皮下組織内に蛍光を確認した。また、他の臓器には PKH26 由来と考えられる蛍光は検出されなかった。

(3) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の皮下移植によるがん化

C57B6J マウス前脂肪細胞をヒトと同様な方法で皮下脂肪より分取し、hLCAT 遺伝子を導入後（低コピー群：0.97 コピー/細胞、高コピー群：7.90 コピー/細胞）、同系マウスの皮下に移植した。細胞移植されたマウスの一般状態、体重、摂餌量、移植部位の触診に異常は確認されなかった。移植後約 7 ヶ月及び 1 年後の剖検では、臓器重量、血液学的検査、各臓器、組織の肉眼所見について、異常は認められなかった。導入コピー数に関わらずがん化は認められず、遺伝子導入を行っていないマウス前脂肪細胞を移植したマウスにおいてもがん化は認められなかった。

(4) hLCAT 遺伝子導入サル前脂肪細胞の自家移植による生体への影響

カニクイザル前脂肪細胞をヒトと同様な方法で皮下脂肪より分取し、hLCAT 遺伝子を導入して調製した hLCAT 遺伝子導入サル前脂肪細胞の hLCAT 遺伝子の導入コピー数は 0～5 コピー程度であった。

hLCAT 遺伝子の検出できた細胞を自家移植した個体（4 個体）の内、移植 2 週間後の個体（3 個体）において、 $12.8 \pm 5.0\%$ の hLCAT 遺伝子の残存が確認された。2 ヶ月後に剖検した個体（1 個体）では hLCAT 遺伝子は検出限界以下であった。移植後の全例において、一般状態、体重、摂餌量に異常は見られなかったことに加え、行動観察、心電図、呼吸数といった薬理

的異常所見も観察されなかった。また、剖検後の各臓器重量、血液学的変化、各臓器、組織の肉眼所見においても異常は観察されなかったことより、hLCAT 遺伝子導入サル前脂肪細胞のサルへの自家移植では、移植後 2 ヶ月において安全性の観点から異常は認められなかった。

(5) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の脂肪組織内他家移植における生着性と生体に対する影響

LCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を C57BL/6J マウスの腰部脂肪組織内に移植し、移植後 1 日、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、7 ヶ月後に移植細胞の生着性と試験期間内の投与動物の健康状態を観察した。PKH26 蛍光組織染色観察より移植細胞は移植部位内に残存していることが確認された。LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の投与群では観察期間を通して一般状態、体重推移、生化学検査値に異常は認められなかった。

(6) LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞のNOGマウス脂肪移植における生着性と生体に対する影響、およびhLCAT蛋白質の分泌

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞をNOGマウスの肩甲骨間脂肪組織内に移植し、移植後 1 日、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、8 ヶ月後に移植細胞の生着性と試験期間内の動物の一般状態を観察した。PKH26 蛍光組織染色観察より移植細胞は移植部位内に残存していることが確認され、当該組織への傷害は認められなかった。LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の投与群では一般状態、体重変化に観察期間中、異常は認められなかった。また、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が少なくとも 1 ヶ月 (29 日) までNOGマウスで分泌する能力を有することが確認された。

(7) LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞のNudeマウス皮下移植によるがん化

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞をNudeマウス皮下に移植した。細胞移植されたマウスの一般状態、体重、摂餌量、移植部位の触診に異常は確認されなかった。移植後約 3 ヶ月の剖検では、臓器重量、各臓器、組織の肉眼所見について、異常は認められなかった。陽性対照群である HeLaS3 細胞投与群ではがん化を認めた。

(8) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞のB6マウス皮下移植による足場の評価

hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を用い、マウス実験で生着促進効果の知られているマトリゲルと臨床への適応を目指した足場素材フィブリンゲルとの比較を実施した。評価は hLCAT の血中への分泌能により実施した。経時的に採取したマウス血清について hLCAT 蛋白質の分泌を確認した。移植した細胞は移植 28 日後まで、hLCAT 蛋白質を血中に分泌することを確認した。この結果から hLCAT 分泌に対してフィブリンゲルがマウス体内でマトリゲルとほぼ同等の効果を発揮することを確認した。同時に移植した細胞の残存率をリアルタイム PCR 法により測定し、28 日後には投与翌日の 30 %程度が残存していることが分かった。

(9) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞のNudeマウス皮下移植による血中へのhLCATの分泌

hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞をフィブリンゲルとしてNudeマウス皮下に移植した。経時的に採取したマウス血漿について hLCAT 蛋白質の分泌を確認した。移植した細胞は移植 28 日後まで、hLCAT 蛋白質を血中に分泌することを確認した。

(10) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞のLCAT欠損マウス皮下移植により分泌されたhLCATの機能評価

hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を免疫抑制剤投与下、マトリゲルを足場としてLCAT欠

損マウス皮下に移植した。経時的に採取したマウス血清について hLCAT 蛋白質の分泌を確認した。血清にコレステロールのエステル化活性が確認され、それはヒト ApoAI 添加により促進された。

(11) 移植細胞から供給された hLCAT の LCAT 欠損マウスにおける薬効評価

hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を免疫抑制剤投与下、マトリゲルを足場として LCAT 欠損マウス皮下に移植した。移植したマウスの血清についてゲルろ過によるリポ蛋白解析を行ったところ、野生型マウスで HDL が検出される分画にコレステロールとコレステロールエステル (CE) 比の上昇を認めた。また LDL 分画中にコレステロールエステル比の上昇を認めた。

(12) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の LCAT 欠損マウス皮下移植による血中への hLCAT の持続補充効果

hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を免疫抑制剤投与下、マトリゲルを足場として LCAT 欠損マウス皮下に移植した。経時的に採取したマウス血清について hLCAT 蛋白質の分泌を確認した。移植した細胞は移植 56 日後まで、hLCAT 蛋白質を血中に分泌することを確認した。移植部位において hLCAT の発現と脂肪細胞への分化が認められた。細胞 (hLCAT 遺伝子) の残存率は、移植 1 日後の残存 hLCAT 遺伝子数を 100%とすると、移植 28、56 日後でそれぞれ、 $10.2 \pm 7.0\%$ 、 $14.3 \pm 10.2\%$ (平均値 \pm 標準偏差、各 3 例)であった。移植 56 日後まで、hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞移植群と遺伝子非導入マウス前脂肪細胞移植群において移植部位の剖検、組織学的評価、血清生化学検査を実施したところ異常を認めなかった。

3. 遺伝子導入方法の安全性

(1) 遺伝子導入に使用するレトロウイルスベクターの品質および安全性

hLCAT 発現レトロウイルスベクター製造用マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) は、タカラバイオ株式会社において GMP 製造されたものである。1 パリアルにウイルスベクター産生細胞を 4×10^6 個/mL 含み、液体窒素タンクにて保存されている。マスターセルバンクの品質試験結果は、Viability 98.2%、無菌試験にて適合、*in vivo* ウイルス試験、Bovine virus 試験、Isoenzyme 試験、抗体産生試験 (MAP 試験) はいずれも陰性を示した。

遺伝子導入に使用するレトロウイルスベクターは、本マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) より、タカラバイオ株式会社において GMP 製造されたものである。

マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) より 3 本を融解して培養を開始し、2 回の継代培養を行った後、セルスタック (10 チャンバー 2 個及び 5 チャンバー 1 個) でセミコンフルエントまで培養後、ウイルスハーベスト培地に交換し、24 時間後に培地上清を回収した。回収後新たなウイルスハーベスト培地に交換し、次の 24 時間培養後に培地上清を回収し、同じ操作をさらにもう一度行った。回収したウイルス液はそれぞれ無菌ろ過を行った後、4 mL ずつ分注し -80°C にて凍結保存した。

hLCAT 発現レトロウイルスベクター溶液 2 ロットの品質試験概要 (参考実測値) は下表の通りであった。

試験項目	CRV07-1	CRV07-2	試験項目	CRV07-1	CRV07-2
無菌試験	適合	適合	エンドトキシン (EU/mL)	<0.02	<0.05

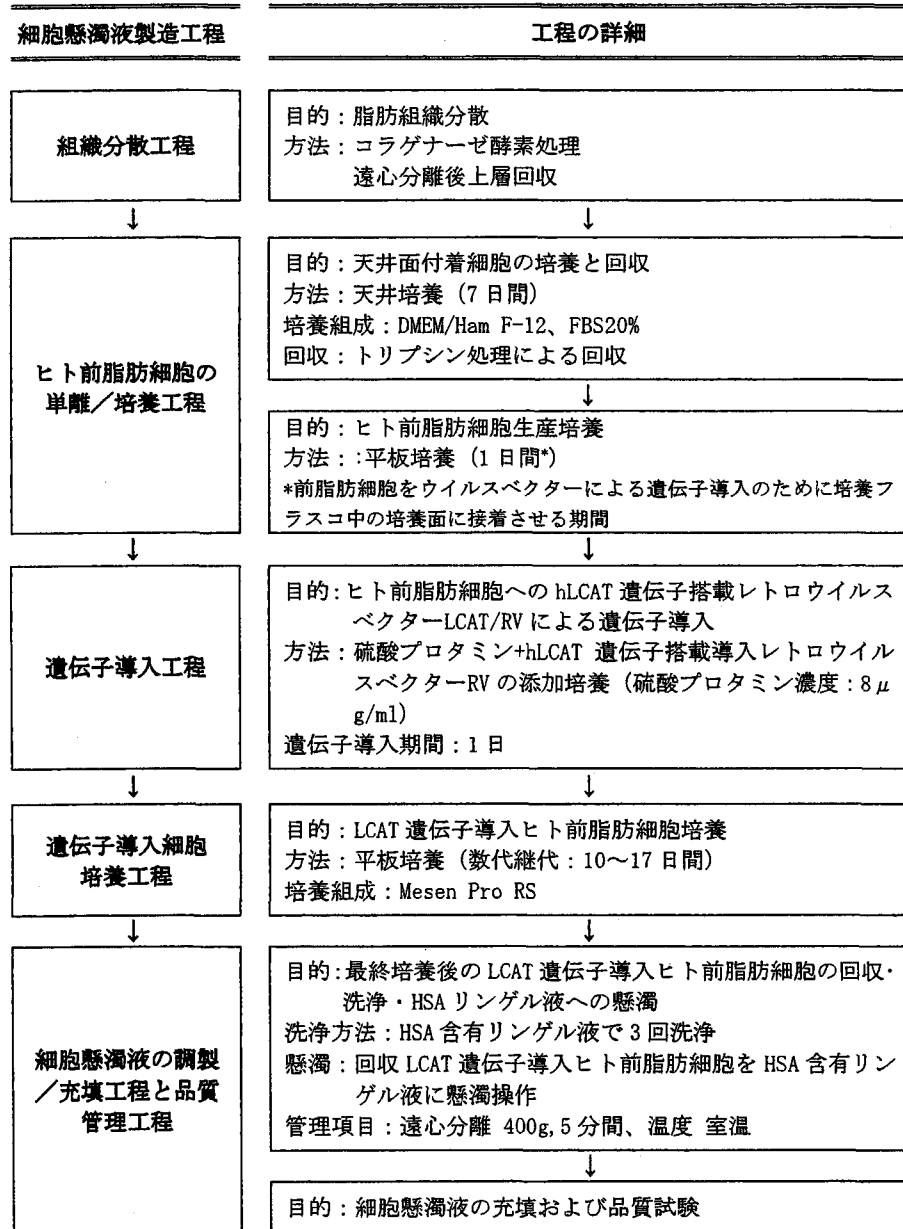
マイコプラズマ否定試験	陰性	陰性	ウイルスタイター (copies/mL)	3.63x10 ⁹	3.91x10 ⁹
RCR 簡易培養法	陰性	陰性	遺伝子産物発現試験 (copies/10 ngRNA)	4.99x10 ⁵	7.96x10 ⁵

(2) 被験者に移植するLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液（細胞懸濁液）の品質および安全性

1) 細胞懸濁液製造フローチャート

以下に細胞懸濁液製造方法を示した。本製造方法は、千葉大学医学部倫理委員会承認の下、健康成人の皮下脂肪組織を用いて確立したものである。

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液製造フローチャート



予想される製造工程日数

工 程		日数	採取から細胞懸濁液の調製
ヒト前脂肪細胞 単離・培養工程	天井培養～継代培養	8日 (天井培養：7日)	18～25日
遺伝子導入工程		(1日)	
LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞培養 ・細胞懸濁液調製工程		10～17日	
細胞懸濁液の 調製／充填工程 と品質管理工程	細胞懸濁液の調製 ～移植まで	3時間以内（推定）	
	移植後の品質試験項目	30日以内	

2) 品質及び安全性

被験者に移植する成分は、被験者自身の脂肪組織より調製された LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞と懸濁溶媒に含まれるヒト血清アルブミン (HSA) 及び生理的組織接着剤 (いずれも既承認市販品) である。皮下脂肪組織より調製した細胞を再び自己組織に戻す試みは、美容形成外科で多く試みられており、安全性の面で特に問題とはなっていない。自家移植であることから、組織適合性や内源性ウイルス等についての考慮は不要と考えられる。

被験者体外での培養・遺伝子導入工程で混入する可能性のある不純物などについても品質試験を行い、安全性の確認を行う。細胞懸濁液での試験結果が移植予定日までに間に合わない項目については、工程途中の試料での検査結果を参考に細胞懸濁液の安全性を判断し、安全と判断した場合には、遅延なく細胞懸濁液を被験者に移植できることとする。そのために、細胞懸濁液の試験結果の一部を事後確認項目とし、もし事後確認項目において問題が生じた場合には、移植した細胞の除去の可能性も含め個別に対応する。

(3) 増殖性ウイルス出現の可能性

hLCAT 発現レトロウイルスベクター作製には pDON-AI を用いており、野生型ウイルス由来の *gag*, *pol* および *env* を完全に排除したことで、これまで RCR の出現が報告されていたパッケージング細胞「PA317 細胞」においてもその出現が否定されている。また、パッケージング細胞である GP+envAM-12 細胞においても、*gag-pol* と *env* とが別々の DNA 断片上に別れて存在しているため、相同的組換えにより野生型・増殖性ウイルス (RCR) が出現する可能性は極めて少ないと考えられる。本マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC Lot. CM06-1) およびそれから作製されたウイルスベクターロットにおいても RCR は検出されていない。細胞懸濁液である LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞においても RCR が出現していないことの確認を行うが、被験者への移植後に定期的実施する検査において血液中の RCR 検出検査を実施し、万一の RCR 発現に備え継続的なモニターを行う。

(4) 遺伝子導入に使用するウイルスベクターの細胞傷害性

本研究に用いる遺伝子導入用ウイルスベクターは、その遺伝子構造の骨格やウイルス外被構造において、現在までに遺伝子治療で使用されてきたレトロウイルスベクターと大きく異なるものではない。今まで、レトロウイルスベクターによる細胞性傷害の報告はないことから、本ウイルスベクターによる細胞傷害の危険性は低いものと考えられる。

(5) 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本研究では、被験者の腹部皮下脂肪組織より採取し、天井培養等により選別・調製されたヒト前脂肪細胞を標的細胞として、ウイルスベクターを用いて *ex vivo* で遺伝子導入を行うものである。血管系や血管内皮系の細胞の混在のない比較的均一なヒト前脂肪細胞分画を用いているが、ヒト前脂肪細胞以外の未分化な間葉系細胞の混入の可能性は否定できない。従って、移植後の遺伝子導入細胞の脂肪組織内での生着、遺伝子発現等については、同じ脂肪組織由来であっても標的以外の細胞へ遺伝子が導入されたケースも想定して、移植部位の観察を含め各種臨床検査値の推移などを注意深く観察し、異常が発生していないか否かを確認していく予定である。また、ウイルスベクターによる遺伝子導入から細胞移植までにはかなりの日数があることから、細胞に取り込まれなかったレトロウイルスベクターが細胞移植時までには全て失活すると考えられ、感染力のあるウイルスベクターが細胞とともに体内に持ち込まれる可能性はなく、RCR が出現しない限り遺伝子導入された細胞から他の細胞へと体内で遺伝子導入がなされることはないと考えられる。

(6) 被験者以外の人への遺伝子導入の可能性

本研究における遺伝子導入レトロウイルスベクターの使用、移植細胞の被験者への投与、保管、運搬および廃棄ならびにこれらに付随する行為等は、全て「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法:平成15年法律第97号)」第一種使用規程を遵守して行うため被験者以外の人へ遺伝子導入されるおそれはないと考えられる。すなわち、本研究における遺伝子導入作業は、治験薬 GMP 準拠の P2 レベルの拡散防止措置のとることができる細胞調製室 (Cell processing center:CPC) 内において、十分に教育を受け、経験のある担当者によって行われる。標的細胞へのレトロウイルスベクターの暴露は CPC 内においてのみ行われ、レトロウイルスベクターは細胞外にあっては非常に不安定であること、および CPC 内の作業は手順書に則り常時ゴム手袋及びマスクを着用していることから操作中に感染することは考えられない。また、ウイルスベクターを含む廃液等はすべてオートクレーブ処理後廃棄されるので、外部に漏出する危険性はない。二重に密閉された容器で運搬された移植用細胞は拡散防止措置のとられた個室で被験者に投与されるので、移植後の被験者に対して実施する定期的な検査において RCR の出現が認められない限り、細胞懸濁液を被験者へ組織内移植する操作過程も含め、被験者を介して他の人へ感染するおそれはないと考えられる。

(7) 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

レトロウイルスベクターが宿主 DNA に組み込まれる位置は決まっているわけではないので、その組み込まれた部位により細胞に大きな影響の出る可能性は否定できない。ヒト前脂肪細胞の染色体 DNA へのウイルスベクターの組み込みはランダムに起こると考えられ、遺伝子導入後は染色体の様々な部位に hLCAT 遺伝子の挿入された細胞の集合となる。外来遺伝子の挿入がその細胞の増殖に特にプラスに働かない場合、細胞集団内でのその細胞の影響は小さく生体に影響を与えることはないが、挿入がその細胞の増殖優位性をもたらす場合、細胞集団の中でそのクローンが増大し(クローナリティーの出現)、状況によってはがん化する可能性も否定はできない。

ヒト前脂肪細胞調製の条件及およびウイルスベクター感染の条件をコントロールすること

で、細胞あたりの平均導入コピー数を一定にして染色体 DNA への過剰な組み込みを抑え、導入後の細胞の導入コピー数を確認し、さらに、患者移植用に調製した細胞の免疫不全マウスへの移植を実施し、移植後も長期にわたってクローナリティー出現のチェックを行う。

(8) がん原性の有無

レトロウイルスベクターの宿主 DNA への組み込みがその細胞の増殖優位性をもたらす場合、幾つかの変異が重なってその細胞ががん化していく可能性は否定できない。フランス、イギリスにおける X-SCID の遺伝子治療においては、がん遺伝子 *LMO2*、*CCND2*、*BMI1* の近傍にレトロウイルスが挿入されることでこのがん遺伝子が活性化され、細胞のがん化の引き金になった可能性があることが報告されている。他にもドイツにおける慢性肉芽腫症の遺伝子治療においては *EVII* の近傍にレトロウイルスベクターが挿入されてがん化とともに染色体異常の引き金になった可能性があることが報告されている。本研究の標的細胞であるヒト前脂肪細胞は X-SCID 遺伝子治療で用いられた造血系細胞とは由来が異なり移植後の環境も違うが、脂肪細胞または本プロトコールに特異的な有害事象の発現が否定できない。現在まで *LCAT* 遺伝子導入ヒト脂肪細胞のがん化に関する検討は、*in vitro* で継代培養した移植細胞の細胞学的観察、遺伝子導入細胞における染色体異常試験、マウスでの *hLCAT* 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の皮下移植によるがん化および *Nude* マウスでの *LCAT* 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の皮下移植によるがん化試験にて検討を行っているが、がん化所見は認められていない。

4. 遺伝子産物の安全性

導入遺伝子により発現する遺伝子産物は正常の *LCAT* のみである。遺伝子導入したヒト前脂肪細胞で、天然型と変わらないサイズと活性をもつ *LCAT* の発現を *in vitro* で確認している。*LCAT* 欠損または変異をもつ患者で発現した場合には、異物と認識される可能性もあるので、移植後には血中抗ヒト *LCAT* 抗体の出現の有無をモニターする。なお、ヒト前脂肪細胞からの分泌蛋白質プロファイルは *hLCAT* 遺伝子導入前後で変化は認められていない。

5. 細胞の安全性

(1) 培養細胞の純度

移植される細胞は GMP に準拠し十分にコントロールされた状態で製造される。移植細胞の純度はフローサイトメトリーおよび導入 *hLCAT* 遺伝子陽性率にて調査し、規格に適合する場合にのみ移植される。また、被験者以外の細胞の汚染を防ぐため、被験者の脂肪組織の搬入から細胞懸濁液調製までのプロセスが細胞調製室で終了するまで、別の被験者の脂肪組織等を扱わないこととする。また、遺伝子導入時に使用するウイルスベクター等の使用する原料や培地に関して、無菌性（好気性菌、嫌気性菌、真菌）、マイコプラズマ、増殖性レトロウイルス、その他迷入する恐れのあるウイルス汚染について検査を行い陰性のものを使用するため、微生物等による汚染の可能性も極めて低い。

(2) 細胞の遺伝子型、表現型の安定性

ヒト前脂肪細胞は培養時に遺伝子型、表現型に大きな変化は観察されていない。レトロウイルスベクターによる導入 *hLCAT* 遺伝子はゲノム DNA にランダムに挿入されるため、特定の遺伝子型や表現型に変化をあたえる可能性予測することは難しいが、健康成人からのヒト前脂肪細胞を用いた検討では遺伝子導入による細胞の形質変化は観察されていない。被験者へ

	<p>の移植前に、移植する細胞に関して、膜表面抗原マーカーに変化のないことを確認する。</p> <p>(3) 被験者に投与する細胞の安全性</p> <p>LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞は、<i>ex vivo</i>にて必要量の hLCAT 遺伝子が導入され、導入遺伝子コピー数、細胞の表現型、発現する LCAT の活性を移植前に確認することで、移植細胞の安全性や有効性を最大限確保する。また、無菌性、マイコプラズマ、増殖性レトロウイルス、迷入ウイルスをはじめ、細胞培養に使用した FBS やトリプシンの混入など不純物試験も実施し、最大限の安全性確保を行う。</p>
<p>遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する理由</p>	<p>本臨床研究の計画に当たり、細胞・遺伝子工学、細胞遺伝子治療、遺伝子関連医薬品および細胞薬品製造等に精通している専門家の協力体制が出来ており、以下、4点の理由より遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した。</p> <p>1. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の移植組成物の調製と移植</p> <p>皮下脂肪摘出と LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の脂肪組織内移植において</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) ヒト前脂肪細胞の単離・調製のため必要な皮下脂肪摘出量は、およそ 20 g 程度であり、外観上も摘出によるくぼみは生じず、摘出は約 15 分程度で完了する。(健康成人ボランティア研究より) 2) 脂肪組織内への LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の細胞懸濁液*の移植量は生理的組織接着剤(既承認市販品の血漿分画製剤)を含め 30 mL 以下である(細胞数で $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$)。 <ul style="list-style-type: none"> * 細胞懸濁液は 500 mL リンゲル液に献血アルブミン 25% 静注 12.5 g/50 mL 「ベネシス」(旧名: 献血アルブミン-Wf) 10 mL を加えたものである。ベネシスとして 2 %v/v、ヒトアルブミンとして 0.5% を含む。 3) ヒト前脂肪細胞の足場材料として等量の生理的組織接着剤を細胞と混合し、直ちに脂肪組織内へ注入することにより高い生着性と hLCAT の持続的分泌が得られる。 <p>2. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の特徴</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 皮下脂肪組織から一定以上のヒト前脂肪細胞の調製が可能である。 2) hLCAT 遺伝子導入後に安定した持続発現(培地中での LCAT 活性の蓄積)が認められている。 3) 2) の理由により、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の移植細胞数が決定可能である。 4) 自己ヒト前脂肪細胞を用いるため、脂肪組織内への移植による拒絶反応は生じないことが推察され、安定した生着が得られる。 <p>3. ベネフィットの予測</p> <p>家族性 LCAT 欠損症患者は、古典型 LCAT 欠損症で血中 LCAT が正常の 10% 未満、部分型 LCAT 欠損症で正常の 10~20% とされている。魚眼病で血中 α LCAT 活性(合成基質法)が、正常の 0~20% とされており、角膜混濁、溶血性貧血、血中リポ蛋白異常、特に HDL コレステロールの低下が顕著である。また古典型 LCAT 欠損症では、さらに腎障害を併発するケースが多く、そのほとんどが予後として人工透析治療を余儀なくされる。また幼少期より発症する角膜混濁についても青年期で視力障害、40 歳以降で角膜移植が必要とされる。</p> <p>治療法としては、低脂肪食による食事療法、薬物による腎機能保護治療の一時的な対処療法しかなく、腎機能障害を併発した場合の人工透析治療もしくは腎移植、あるいは一時的な LCAT 補充療法としての新鮮血(全血または血漿)輸血などが施行されている。家族性 LCAT 欠損症の</p>

うち、古典型 LCAT 欠損症、部分型 LCAT 欠損症、魚眼病の発症および進展阻止の LCAT 活性の境界線は、正常の 10%未満（部分型 LCAT 欠損症では 20%以下、魚眼病では α LCAT 活性が 0~20%もしくは完全欠失）であり、家族性 LCAT 欠損症患者に対して正常の 10%程度の LCAT 活性量を付加補充するか否かによってその予後を左右することが推察される。

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞は、安定持続した正常 LCAT を供給し、分泌された rLCAT は家族性 LCAT 欠損症患者血清の脂質異常を改善する機能を示すことから、古典型 LCAT 欠損症の血中 LCAT 完全欠損による幼少期からの角膜混濁、青年期からの腎機能障害、魚眼病の α LCAT 活性の完全欠損による幼少期からの角膜混濁および部分型 LCAT 欠損症の角膜混濁など、家族性 LCAT 欠損症の予後（腎機能障害による腎不全、人工透析への移行、角膜混濁による視力障害と角膜移植）に好影響を与えると推察される。

4. リスクの予測と対応

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞のリスクとその対応については、以下のように分析している。

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞のリスクとその対応

リスク予測	対応
移植後、治療効果を充足する血中 LCAT 活性レベルが補充し得なかった場合（被験者毎の状態により、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の生着が不十分もしくは LCAT 発現量が不十分な場合）には再投与が必要となる可能性	臨床研究において LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の移植後、高感度測定法 ^{注)} により、血中 LCAT 活性のモニタリングを行い、その活性推移により判断を行う
LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞のがん化に関する危険性	画像診断、がんマーカー検査を含めた定期的観察を行う。同時に患者移植細胞の免疫不全マウスへの移植を行い、遺伝子挿入クローンの変動および組織学的な安全性評価を実施する。これらの結果に基づき因果関係を調査し、その対応をはかる。
上記に伴い LCAT が過剰発現した場合の移植部位の摘出での対応の可能性	がんマーカー検査を含めた定期的観察を行い、因果関係を調査し、その対応をはかる
産出された LCAT の抗原性の有無と免疫反応の可能性	抗 LCAT 抗体を含めた定期的観察を行い、その対応をはかる
細胞移植時は細胞懸濁液とするため、経時的な劣化の可能性ある その一方で品質試験に時間を要するため、移植前は迅速試験にて品質確認を行い移植可否判定を行うが、移植後に規定の試験方法での結果が規格外として得られる可能性	総括責任者へ即時情報伝達を行い、移植を受けた被験者の全身状態を十分に観察し、移植部位の摘出など必要に応じて処置を行う

^{注)} 高感度測定法は、正常 LCAT 活性の 0~20%の低値域の測定方法として開発した。

実施計画

1. 遺伝子治療臨床研究概要

本遺伝子治療臨床研究（以下「本臨床研究」という）は、特定疾患に指定されている原発性高脂血症の疾患群のひとつである家族性 LCAT 欠損症の確定診断を受けた患者に対して、hLCAT 発現遺伝子を導入した自己のヒト前脂肪細胞を移植した場合の、安全性について検証し、また有効性については探索的な検討を行う。

本臨床研究における方法としては、局部麻酔下で被験者腹部から摘出した脂肪組織より分離、調製したヒト前脂肪細胞に hLCAT 発現遺伝子を導入し、移植に必要な細胞数まで培養した後に洗浄などの精製処理を施し、注射用に調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液（以下「移植用細胞」という）と生理的組織接着剤（既承認市販品の血漿分画製剤）を混合し、直ちに被験者皮下脂肪組織内に注射移植する。この一連の手順は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（カルタヘナ法：平成 15 年法律第 97 号）の第一種使用規程に基づいて実施する。

移植用細胞の移植後においては、6 ヶ月間にわたり、被験者の移植部位における異常な細胞増殖の有無などの所見及び臨床検査・がんマーカー検査・RCR 検査結果をもとにした全身状態についての観察を慎重に行ない、本臨床研究の方法の安全性を評価する。また併せて、血中 LCAT 活性・血中 HDL コレステロール濃度・コレステロールエステル比などの疾病関連因子についての測定結果の推移および本疾患に起因する低 HDL コレステロール血症・角膜混濁・腎機能障害・溶血性貧血など臨床症状の経過観察結果から、その有効性についても探索的に検討する。

これら評価が適正になされるために、この観察期間中においては従来から受けている治療（食事療法）の内容についての変更は行わず、また新たな治療および他の治療は行わないこととする。

また、移植用細胞の移植後における長期フォローの目的で、予後調査として移植 6 ヶ月後以降においても移植後 5 年間にわたり、3 ヶ月に 1 回の頻度で移植部位・全身状態などの安全性についての観察を行うと同時に、疾病関連因子の測定結果を含む臨床症状の経過観察を行うなど本法の有効性についての調査を行う。移植後 5 年間の経過観察終了後も、定期的に症状の把握に努め必要であれば適切な処置を行う。

なお、本臨床研究においては、3 症例の被験者に対して本法を施行することを計画しているが、各症例の移植後 3 ヶ月時点での 1 次評価が終了し、以下に記載する遺伝子治療臨床研究審査委員会における審議結果をもとに総括責任者が次の症例への施行を行うこととする。

症例における臨床研究スケジュールを表 1 に示した。

2. 遺伝子治療臨床研究審査委員会

遺伝子治療臨床研究審査委員会は本臨床研究の医療上の安全性、有用性、および倫理性を総合的に審査し、臨床研究の安全性および有効性を科学的小および医学的妥当性の観点から判定する。

3. 実施期間

厚生労働大臣による了承の日より 6 年間

4. 臨床研究実施症例数

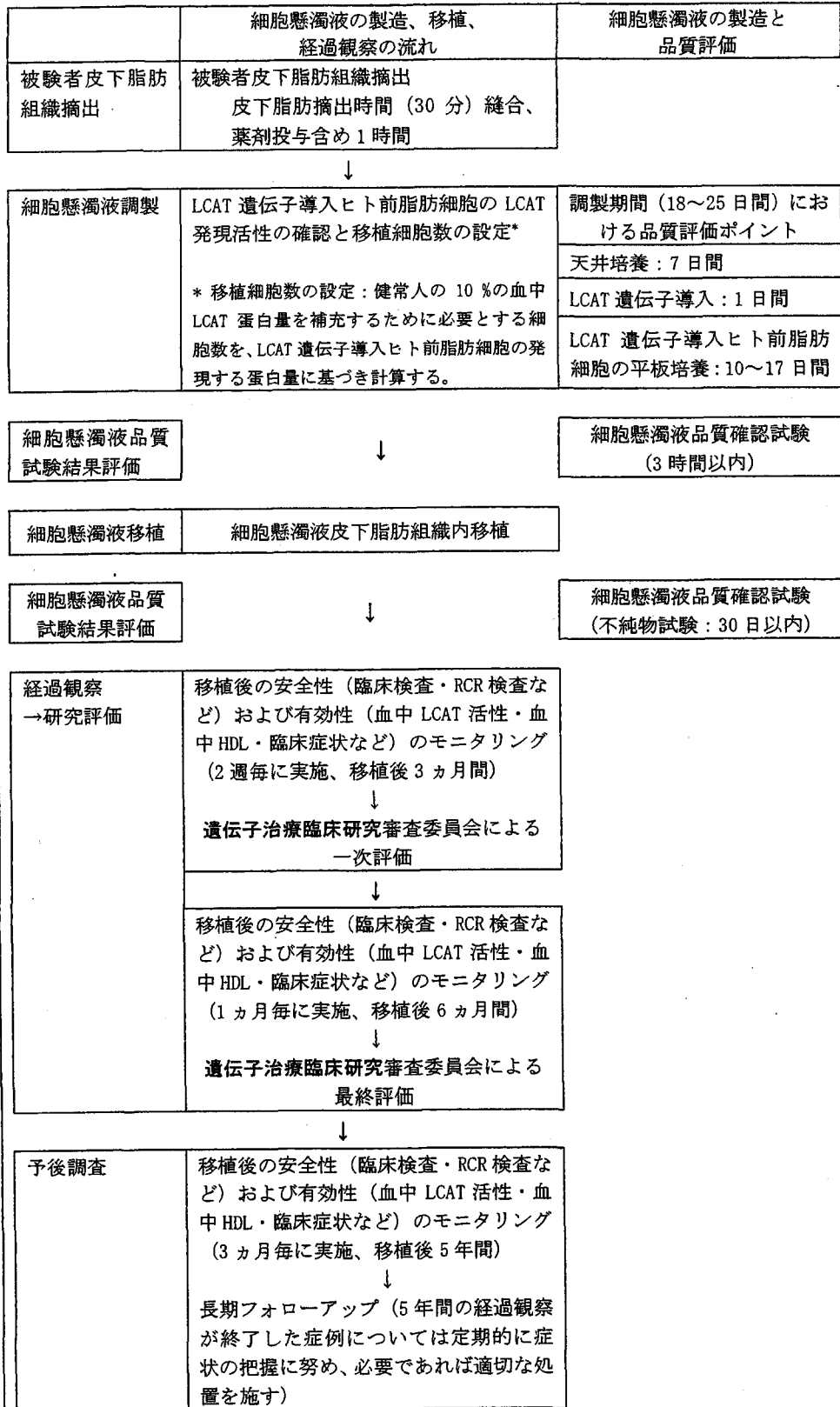
3 症例

5. 被験者の治療計画

(1) 被験者の登録から適格性判定までの流れ

実施事項	家族性 LCAT 欠損症の被験者スクリーニングから適格性判定まで	留意点
スクリーニング	家族性 LCAT 欠損症の確定診断がなされた被験者もしくは低 HDL コレステロール血症、角膜混濁を認める被験者（16 歳以上、40 歳以下）	B 型肝炎・C 型肝炎・ヒト免疫不全症・成人型 T 細胞白血病・パルボウイルス B19 感染症ウイルスの陽性患者であることが事前に診断されている場合、細胞調製技術者の安全性確保のため除外する
↓		
同意取得	同意取得（臨床研究の意義・目的・方法・リスク／ベネフィット・参加条件・個人情報保護・倫理的配慮・費用負担・実施体制など）について詳細説明	特に個人情報保護および被験者保護の面から倫理面に配慮を行う
↓		
適格性調査	<p>家族性 LCAT 欠損症の確定診断</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 遺伝子診断（遺伝子異常（完全欠損、部分欠損、変異）が確認されている。） ・ 臨床症状（低 HDL コレステロール血症、角膜混濁、腎機能障害、溶血性貧血） ・ 血中 LCAT 活性 自己基質法では基準下限値未満 高感度測定法 古典型 LCAT 欠損症： 正常域の 10%未満 （α、β LCAT 活性） 部分型 LCAT 欠損症： 正常域の 20%以下 （α、β LCAT 活性） 	<p><除外基準></p> <ol style="list-style-type: none"> ① LCAT 変異から完全長 LCAT 蛋白が発現されない患者または血中に LCAT 蛋白が検出できない患者 ② LCAT 産生に影響を及ぼす高度な肝疾患（劇症肝炎、肝硬変）及び腎不全 ③ 不・低栄養、悪液質 ④ アポ A1 異常症、Tangier 病 ⑤ ウイルス感染症（B 型肝炎、C 型肝炎、ヒト免疫不全症、成人型 T 細胞白血病、パルボウイルス B19 感染症）検査陽性 ⑥ 皮下脂肪摘出（20 g 程度）が困難な被験者 ⑦ 治療歴：1 ヶ月以内の新鮮血輸血等による LCAT 補充療法 ⑧ 妊娠中、授乳中あるいは妊娠希望
↓		
遺伝子治療臨床研究審査委員会にて判定		

(2) 被験者からの皮下脂肪抽出、移植用 LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液 (細胞懸濁液) の製造、移植、経過観察の流れ



備	考

表 1. 症例における臨床研究スケジュール

	同意説明 ～適格性調査			脂肪組 織抽出	脂肪組織抽出後観 察				移 植	移植直後観察 (1週間)							移植3ヵ月後 観察					移植後6ヵ月後 観察			予後調査 (移植後5年間調査)
	同意 説明	同意 取得	調査 検査	21 日前	20 日前	14 日前	1 日前	0日	1 日後	2 日後	3 日後	4 日後	5 日後	6 日後	7 日後	2 週後	4 週後	6 週後	8 週後	10 週後	12 週後	16 週後	20 週後	24 週後	3ヵ月毎 260週まで
入院			○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○							○			○	○
外来	○	○				○										○		○	○	○		○	○		
同意説明	●																								
同意取得		●																							
適格性調査 (病歴調査など)			●																						
診察	一般診察		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	胸部 X 線・心電図		●																		●			●	
	臨床所見観察		●	●		●								●		●					●			●	●
検査 (採血・採尿)	ウイルス検査		●																						
	臨床検査		●	●		●		●		●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	RCR・悪性腫瘍検査						●		●												●			●	●*
	抗 FBS 抗体検査						●							●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	抗 LCAT 抗体検査						●							●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	血中 LCAT 活性測定			●	●		●		●		●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
脂肪組織抽出術			●																						
脂肪抽出部位観察			●	●	●																				
移植用細胞調製							● (21日間)																		
移植用細胞品質試験								●																	
移植用細胞移植								●																	
移植部位の所見観察 (MRI 検査 ^{*)})								● ^{&}	●	●	●	●	●	●	●	● ^{&}	●	●	●	●	● ^{&}	●	●	● ^{&}	● ^{&}
クローナリティー検査 ^{#1}								● ^{#2}																	
採血量 (mL)	—	—	40	30	—	—	50	—	40	—	—	30	—	—	30	30	30	30	30	30	50	30	30	50	50
研究評価・判定	◎			◎				◎							◎			◎							
	患者選択判定			移植用細胞移植可否判定				1次評価							最終評価			予後評価							

* 移植後 48 週、96 週、144 週、192 週、240 週に RCR 検査 (NAT 法及び培養法) と悪性腫瘍検査を実施する。ただし、96 週以降の RCR 検査は、NAT 法のみ実施し、培養法は検体を凍結保存する。

* 予後調査 (移植後 5 年間調査) を終了した症例については定期的に症状の把握に努め、必要であれば適切な処置を行う。

#1 移植用細胞移植部位観察 (MRI 検査)、RCR・悪性腫瘍検査、血中 LCAT 活性測定、マウスにおける移植細胞のクローナリティー検査等を総合的に勘案のうえ、必要に応じて移植部位を生検し LAM-PCR 検査および病理学的検査を実施する。

#2 移植細胞をマウスに移植後、経時的に LAM-PCR 検査を実施し、クローナリティーならびにがん化の有無を観察する。クローナリティーならびにがん化が否定できない場合には、移植部位観察 (MRI 検査)、RCR・悪性腫瘍検査、血中 LCAT 活性測定等を総合的に勘案のうえ、必要に応じて移植部位を生検し LAM-PCR 検査及び病理学的検査を実施する。

遺伝子治療臨床研究 実施計画書

研究の名称

家族性 LCAT（レシチン：コレステロールアシル
トランスフェラーゼ）欠損症を対象とした
LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する
臨床研究

千葉大学医学部附属病院

版番号 : 第 2 版

目 次

I.	遺伝子治療臨床研究の名称.....	8
II.	総括責任者およびその他の研究者の氏名ならびに当該遺伝子治療臨床 研究において果たす役割.....	8
	総括責任者.....	8
	総括責任者以外の研究者.....	8
	研究協力者.....	8
	(1) リサーチナース.....	8
	(2) データマネジメント責任者.....	8
	(3) 統計解析責任者.....	8
	(4) 資料保管責任者.....	8
	移植用細胞調製担当者および品質管理担当者.....	9
	(1) 移植用細胞調製管理者.....	9
	(2) 細胞調製担当責任者.....	9
	(3) 品質管理担当責任者.....	9
	千葉大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会.....	9
	千葉大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会安全・効果評価・適応判定小委員会.....	9
III.	実施施設の名称及びその所在地.....	9
IV.	遺伝子治療臨床研究の目的.....	9
V.	遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由（治療を直接の目的とした遺伝子治療臨床研究を行う場合）.....	10
	対象疾患に関する現時点での知見—家族性 LCAT 欠損症に関する知見.....	10
	(1) リポ蛋白代謝の概略.....	10
	(2) 家族性 LCAT 欠損症の分類と病態.....	12
	(3) 家族性 LCAT 欠損症の患者数.....	14
	(4) 家族性 LCAT 欠損症の治療の現状と今後.....	15
	本申請の家族性 LCAT 欠損症に対する遺伝子治療臨床研究の概要.....	17
	(1) LCAT 遺伝子治療プログラム概要.....	17
	(2) LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞（その細胞懸濁液）の施設内実施場所および製造工程概要.....	18
	(3) 家族性 LCAT 欠損症に対する LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の臨床研究概要.....	19
	他の治療法との比較及び本遺伝子治療を選択した理由.....	21
	(1) 治療方法の現状.....	21
	(2) 本遺伝子治療の選択.....	21
VI.	遺伝子及びその導入方法.....	23
	1. 導入する遺伝子の構造と性質.....	23
	2. 標的細胞とした細胞の由来、生物学的特徴ならびに標的細胞とした選択理由.....	25
	3. 遺伝子導入方法の概略及び当該導入方法を選択した理由.....	25
	4. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法.....	27
	(1) 野生型ウイルスの生物学的特徴及びヒトに対する影響.....	27
	(2) ウイルスベクターの作製方法.....	28
	(3) ウイルスベクターの遺伝子構造と性質.....	33
	(4) ウイルスベクター（マスターセルバンク）の生物学的特徴.....	33
	5. 導入遺伝子からの生成物の構造及び生物活性.....	34

VII.	当該遺伝子治療臨床研究に関する培養細胞、実験動物を用いた研究成果	35
1.	培養細胞を用いた研究の成果	35
(1)	形態	35
(2)	細胞プロファイル	36
(3)	増殖速度	37
(4)	前脂肪細胞の分化能：脂肪幹細胞との比較	37
(5)	hLCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の脂肪細胞への分化能	39
(6)	hLCAT 遺伝子導入コピー数と導入遺伝子の安定性	40
(7)	hLCAT 遺伝子搭載レトロウイルスベクターのヒト前脂肪細胞への導入効率	41
(8)	hLCAT の発現性及び発現した LCAT の活性	42
(9)	アポ A1 蛋白分布変化による LCAT 活性の評価	42
(10)	家族性 LCAT 欠損症における腎機能障害関連異常リポ蛋白の解析	44
(11)	家族性 LCAT 欠損症患者血清における LCAT 機能の評価	45
(12)	長期培養による形質変化の有無（軟寒天培地でのコロニー形成能の検討）	48
(13)	遺伝子導入細胞における染色体異常の有無	48
(14)	hLCAT 遺伝子導入による前脂肪細胞の特性変化	49
2.	実験動物を用いた研究の成果	50
(1)	hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の <i>in vivo</i> における hLCAT の発現性	50
(2)	LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の NOG マウス皮下移植における生着性と生体への影響	51
(3)	hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の皮下移植によるがん化	52
(4)	hLCAT 遺伝子導入サル前脂肪細胞の自家移植による生体への影響	52
(5)	hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の脂肪組織内他家移植における生着性と生体に対する影響	53
(6)	LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の NOG マウス脂肪移植における生着性と生体への影響、および hLCAT 蛋白質の分泌	53
(7)	LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の Nude マウス皮下移植によるがん化	55
(8)	hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の B6 マウス皮下移植による足場の評価	55
(9)	hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の Nude マウス皮下移植による血中への hLCAT の分泌	56
(10)	hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の LCAT 欠損マウス皮下移植により分泌された hLCAT の機能評価	57
(11)	移植細胞から供給された hLCAT の LCAT 欠損マウスにおける薬効評価	58
(12)	hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の LCAT 欠損マウス皮下移植による血中への hLCAT の持続補充と安全性の評価	59
VIII.	安全性についての評価	63
1.	遺伝子導入方法の安全性	63
(1)	遺伝子導入に使用するレトロウイルスベクターの品質および安全性	63
(2)	被験者に移植する LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液（細胞懸濁液）の品質および安全性	65
(3)	増殖性ウイルス出現の可能性	67
(4)	遺伝子導入に使用するウイルスベクターの細胞傷害性	67
(5)	体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性	67
(6)	被験者以外の人への遺伝子導入の可能性	68
(7)	染色体内へ遺伝子が組込まれる場合の問題点	68
(8)	がん原性の有無	68
2.	遺伝子産物の安全性	69

3.	細胞の安全性	69
(1)	培養細胞の純度	69
(2)	細胞の遺伝子型、表現型の安定性	69
(3)	被験者に投与する細胞の安全性	69
IX.	遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する根拠	70
1.	LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の移植組成物の調製と移植	70
2.	LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の特徴	70
3.	ベネフィットの予測	70
4.	リスクの予測と対応	71
X.	遺伝子治療臨床研究の計画	72
1.	遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画	72
2.	千葉大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会	72
3.	被験者の選択基準及び除外基準	75
(1)	選択基準	75
(2)	除外基準	75
4.	患者の同意の取得方法	76
5.	適格性の調査	76
6.	被験者の登録および適格性の判定	76
(1)	被験者の登録	76
(2)	被験者の適格性判定	77
7.	実施期間及び目標症例数	77
8.	本臨床研究の実施方法	78
(1)	対照群の設定方法	78
(2)	遺伝子導入前脂肪細胞の調製方法	78
(3)	研究実施期間中の併用療法	78
(4)	臨床検査項目及び観察項目	79
(5)	有害事象	83
(6)	本臨床研究の評価方法、評価基準および中止判定基準、症例の取扱基準	86
(7)	データの集計および統計解析	88
(8)	本臨床研究の倫理的実施及び被験者の安全性確保	92
(9)	健康被害補償	93
(10)	症例記録に関する記録用紙等の様式	93
(11)	記録の保存および成績の公表方法	93
XI.	当該遺伝子治療臨床研究の実施施設の状況	93
XII.	当該遺伝子治療臨床研究に関連する国内外の研究状況	94
XIII.	研究者の略歴、研究業績	95

別添資料 1	「同意説明用文書」
別添資料 2	「臨床研究参加同意書」
別添資料 3	「被験者登録票」
別添資料 4	「被験者適格性調査票」
別添資料 5	「被験者適格性判定連絡票」
別添資料 6	「未投与症例報告書」
別添資料 7	「遺伝子治療臨床研究重大事態等報告書」
別添資料 8	「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の安全性・有効性評価通知票」
別添資料 9	「細胞調製室見取図」
別添資料 10	「病院棟 1 F 見取図」

- 別添資料 11 「新病院棟 1 F 見取図」
- 別添資料 12 「重篤な有害事象発生時の報告手順」
- 参考資料 1 「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞 (CGT-HPAC-LCAT) 製造に関する手順書」
- 参考資料 2 「遺伝子治療臨床研究審査委員会」
- 参考資料 3 「ヘルシンキ宣言」
- 参考資料 4 「遺伝子治療臨床研究に関する指針」
- 参考資料 5 「遺伝子治療臨床研究賠償責任保険骨子」
- 参考資料 6 「千葉大個人情報保護に関する基本方針」

略語一覧表

略語	英語	日本語
AAV	Adenoassociated Virus	アデノ随伴ウイルス
ALP	Alkaline Phosphatase	アルカリホスファターゼ
ALT	Alanine Aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AMY	Amylase	アミラーゼ
AST	Aspartate Aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
BUN	Blood Urea Nitrogen	血中尿素窒素
CE	Cholesterol Ester	コレステロールエステル
CPC	Cell Processing Center	細胞調製室
CRP	C-reactive Protein	C反応性蛋白質
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	ジアミジノフェニルインドール
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	酵素免疫定量法
FBS	Fetal Bovine Serum	牛胎児血清
FC	Free Cholesterol	遊離型コレステロール
FED	Fish Eye Disease	魚眼病
GCP	Good Clinical Practice	医薬品の臨床試験の実施の基準
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GMP	Good Manufacturing Practice	医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準
γ -GTP	γ -Glutamyl Transpeptidase	γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ
HDL	High-density Lipoprotein	高密度リポ蛋白質
HE	Hematoxylin-Eosin	ヘマトキシリン・エオシン
HSA	Human Serum Albumin	ヒト血清アルブミン
IP	Inorganic Phosphorus	無機リン
LAM-PCR	linear amplification-mediated PCR	直鎖増幅触媒型ポリメラーゼ連鎖反応
LCAT	Lecithin:Cholesterol Acyltransferase	レシチン:コレステロールアシルトランスフェラーゼ
LDH	Lactate Dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
LDL	Low-density Lipoprotein	低密度リポ蛋白質
LTR	Long Terminal Repeat	末端反復配列
MCB	Master Cell Bank	マスターセルバンク
MoMLV	Moloney Murine Leukemia Virus	モロニーマウス白血病ウイルス
MOI	Multiplicity of Infection	細胞に対する感染性粒子の比
MRI	Magnetic Resonance Imaging	磁気共鳴画像
NAT	Nucleic Acid Amplification Test	核酸増幅検査
PCR	Polymerase Chain Reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
QOL	Quality of Life	クオリティオブライフ (生活の質)
RCR	Replication Competent Retrovirus	増殖性レトロウイルス
X-SCID	X-linked Severe Combined Immunodeficiency	X連鎖重症複合免疫不全症

I. 遺伝子治療臨床研究の名称

家族性 LCAT (レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ) 欠損症を対象とした LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究

II. 総括責任者およびその他の研究者の氏名ならびに当該遺伝子治療臨床研究において果たす役割

総括責任者

千葉大学大学院医学研究院細胞治療内科学 教授 横手 幸太郎
遺伝子治療臨床研究の実施における総合判断および臨床研究全体の統括。及び、患者選択から移植用細胞移植後における被験者の診療、観察および評価に至る臨床研究全般担当。ただし、脂肪組織摘出術、移植用細胞移植および移植用細胞調製に係る担当部分は除く

総括責任者以外の研究者

東邦大学医学部医学科臨床検査医学研究室 教授 (千葉大学 客員教授)
武城 英明
総括責任者補佐、臨床有効性、安全性に評価に関する協力および助言
千葉大学大学院医学研究院形成外科学 教授 佐藤 兼重
脂肪組織摘出術および移植用細胞移植担当
千葉大学講師・医学部附属病院 臨床試験部長 花岡 英紀
臨床研究の円滑な遂行に関わる業務、スケジュール、記録管理
千葉大学医学部附属病院形成・美容外科 助教 窪田 吉孝
脂肪組織摘出術および移植用細胞移植担当
千葉大学医学部附属病院未来開拓センター 特任准教授 黒田 正幸
遺伝子治療臨床研究に係わる培養細胞及び実験動物を用いる研究全般担当

外部協力者

タカラバイオ株式会社 細胞・遺伝子治療センター センター長 峰野 純一
LCAT 遺伝子搭載レトロウイルスベクターの製造と品質に関する評価・助言
遺伝子導入前脂肪細胞の安全性試験への協力・助言

研究協力者

(1) リサーチナース

千葉大学医学部附属病院臨床試験部 黄野 麻子
患者への同意説明補助および臨床研究実施に係るスケジュール管理、記録、資料保管等の補助

(2) データマネジメント責任者

千葉大学講師・医学部附属病院 臨床試験部長 花岡 英紀

(3) 統計解析責任者

千葉大学医学部附属病院臨床試験部 講師 佐藤 泰憲

(4) 資料保管責任者

千葉大学大学院医学研究院細胞治療内科学 教授 横手 幸太郎

移植用細胞調製担当者および品質管理担当者

(1) 移植用細胞調製管理者

千葉大学大学院医学研究院細胞治療内科学 教授 横手 幸太郎
移植用細胞の調製業務全般（業務委託を含む）の統括管理

(2) 細胞調製担当責任者

セルジェンテック株式会社 創薬研究開発部 田中 重明
被験者より摘出された脂肪組織からの脂肪細胞の抽出、培養、遺伝子導入、
および移植用細胞の調製業務の管理

(3) 品質管理担当責任者

千葉大学医学部附属病院未来開拓センター 特任准教授 黒田 正幸
移植用細胞の調製における工程管理業務および品質管理業務の管理

千葉大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会

千葉大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会規定に基づき設置する。
千葉大学医学部附属病院長の諮問に基づき、以下の事項を科学的妥当性及び倫理性
について総合的に審議し、結果を速やかに病院長ならびに総括責任者に報告する。

- ・ 遺伝子治療臨床研究の実施についての審査に関すること。
- ・ 遺伝子治療臨床研究の実施に関する重大な変更についての審査に関すること。
- ・ 遺伝子治療臨床研究の進行状況及び結果についての調査に関すること。
- ・ その他遺伝子治療臨床研究に関すること。

千葉大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会安全・効果評価・適応判定小委員会

千葉大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会規定第12条の規定に基づき設置する。

千葉大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会の諮問に基づき、臨床研究の実際の施行に当たり、安全性及び効果並びに被験者の適応性に関する具体的事項について評価及び判定を行い、その実施の適否及び留意点、改善点等について同審査委員会に意見を提出する。

III. 実施施設の名称及びその所在地

名 称：千葉大学医学部附属病院
所在地：〒260-8677 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1
電 話：043-222-7171

IV. 遺伝子治療臨床研究の目的

本研究は、家族性 LCAT 欠損症に対して、患者の自己前脂肪細胞より調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植による LCAT 補充療法の安全性について検証することを目的とする。また、併せて LCAT 欠損に起因する症状（低 HDL コレステロール血症、角膜混濁、腎障害、溶血性貧血）の改善効果についても探索的に検討する。

V. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由（治療を直接の目的とした遺伝子治療臨床研究を行う場合）

対象疾患に関する現時点での知見—家族性 LCAT 欠損症に関する知見

(1) リポ蛋白代謝の概略

1) リポ蛋白分類

生体内において、脂質成分は、リポ蛋白（＝脂質成分＋アポ蛋白）の形で運搬されている。リポ蛋白は、

- ・ 小腸で吸収された脂質を運搬するカイロミクロン
- ・ 肝臓で合成された脂質（コレステロールなど）を運搬する VLDL（超低比重リポ蛋白）
- ・ コレステロールを組織や細胞へ運搬する LDL（低比重リポ蛋白）
- ・ コレステロールを組織や細胞から引抜き肝臓へ運搬したり VLDL に再配分する逆転送系リポ蛋白である HDL（高比重リポ蛋白）
- ・ 中間体 IDL（比重が LDL と HDL の中間）

に分類される（図 1）。

2) リポ蛋白代謝とコレステロール代謝

小腸にて生成したカイロミクロンや肝臓で生成した VLDL は、血中においてリポ蛋白リパーゼの作用によって異化され、中間体 IDL（比重が LDL と HDL の中間）を経て LDL（低比重リポ蛋白）へと代謝される。LDL は、LDL 受容体を介して肝臓へ移行または末梢組織へ移行し、コレステロール（コレステロールエステル：CE）を供給する働きを持つ。供給されたコレステロールは細胞膜構成成分（遊離型コレステロール：FC）、ステロイドホルモンや胆汁酸の原料として利用される。

一方、HDL は、カイロミクロンや VLDL が血中リポ蛋白リパーゼ（LPL）の作用で異化される過程において、原始型 HDL（discoidal HDL：円盤状高比重リポ蛋白）として生まれる。HDL は、生体組織の細胞膜に過剰に蓄積した遊離型コレステロールを受け取ることにより、組織からコレステロールを引抜き、逆転送するリポ蛋白として知られ、HDL は SR-BI 受容体を介して肝臓へ取り込まれる他、CETP（コレステロールエステル転送蛋白）を介し、VLDL、IDL、LDL へコレステロールエステルの逆転送がなされる（図 1）。

3) コレステロール逆転送系を司る HDL と LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）

LCAT は、血中コレステロールのエステル化を担うコレステロール逆転送系（コレステロールの末梢組織から肝臓へ転送／異化排泄系）の最初の段階を支配する重要なコレステロールエステル化酵素である。その作用様式は、遊離型コレステロールを基質として、リポ蛋白中のアポ蛋白 AI によって活性化され、レシチン由来の脂肪酸とのエステル化反応を促し、コレステロールエステルの生成反応を司る（図 2）。

LCAT は、分子量 59,000～68,000 で、416 個のアミノ酸より形成されている糖蛋白質で構造上 α -helix が 21%、 β -sheet が 24% 占める。

末梢組織や細胞からのコレステロールの逆転送は、HDL 粒子と主に肝臓で生成・分泌された LCAT によってなされる。その起点は HDL 粒子による細胞膜からの遊離型コレステロールの引抜きである。引抜かれた遊離型コレステロールは、HDL 上において LCAT の作用によりコレステロールエステルと変化し、より疎水性の増したコレステロールエステルは、HDL 粒子の中心部に移動し、コレステロールエステルとして保持される。その移動に伴い HDL 粒子表面のコレステロール濃度は低下し、HDL 粒子は、さらに細胞表面よりコレステロールを引抜き易くなる

とされている。このコレステロールの引抜きとエステル化の過程を繰り返し、原始型 HDL は、球状 HDL へ変化する。球状 HDL は、コレステロールエステルを他のリポ蛋白へ再配分する他、肝臓へコレステロールエステル運搬する (図 1)。

HDL と LCAT は、組織生体膜から過剰となった遊離型コレステロールを引抜き・運搬する逆転送系において重要な役割を果たしており、HDL 中の主要アポ蛋白の欠失や異常、LCAT の先天性欠損もしくは遺伝子異常は、この逆転送系の障害の原因であり、特に LCAT の遺伝子異常に起因する代表的な疾患として家族性 LCAT 欠損症が知られている。その他 LCAT 欠損症以外で LCAT が低値を認める疾患には、重篤な肝障害が知られている。

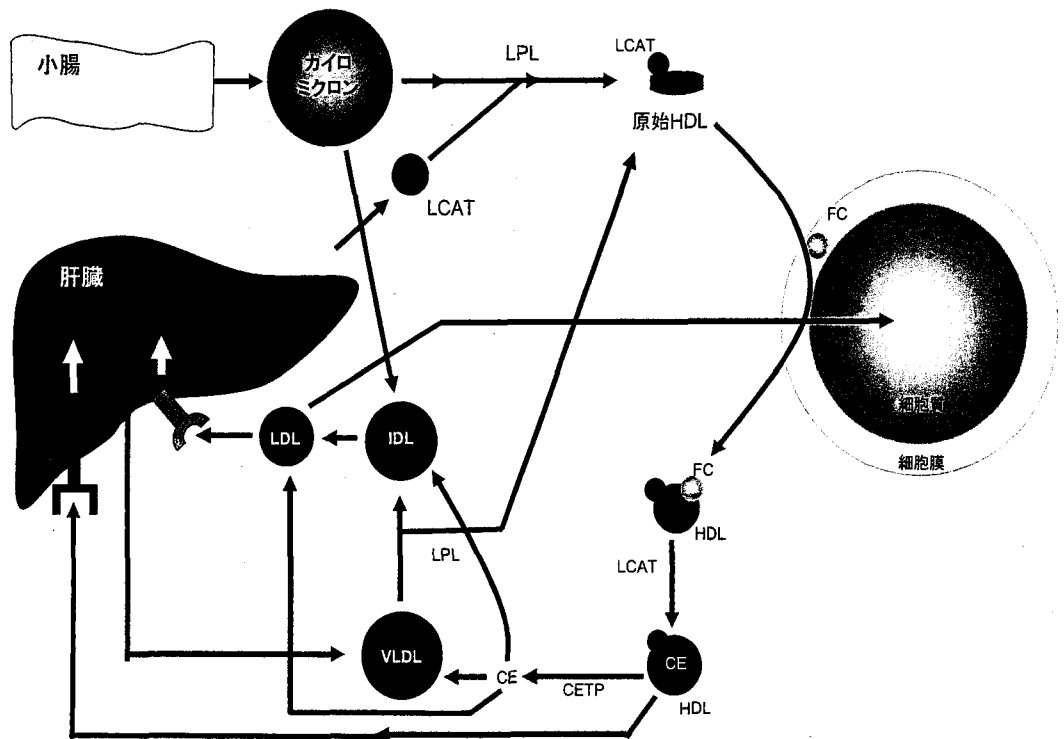


図 1. リポ蛋白代謝と LCAT の位置づけ

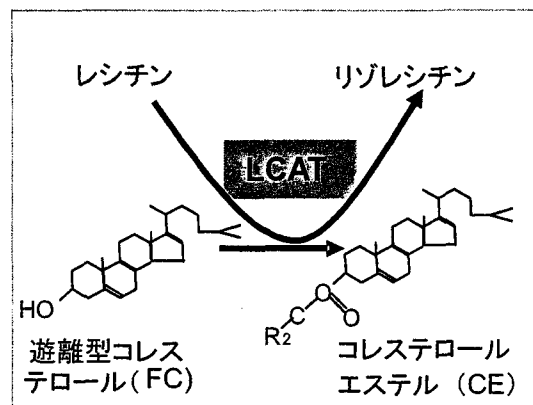


図 2. LCAT の作用

(2) 家族性 LCAT 欠損症の分類と病態

本疾患は、稀な常染色体劣性遺伝性疾患であり、人口 100 万人に 1 人とされている¹⁾。1967 年にノルウェイにて最初の症例が報告され、本邦でも 22 家系が報告されている^{1) 2)}。患者はいずれも血中リポ蛋白異常を呈し、特に HDL コレステロールの低下が著明である。

ヒト LCAT 遺伝子は、16 番染色体の q22 の位置に存在し、約 4200 塩基対にわたり、6 個のエクソンより構成されている。LCAT 遺伝子の完全欠失あるいは突然変異によるアミノ酸置換にともなう LCAT 遺伝子異常は、HDL に対する LCAT の結合能低下・消失、あるいは LCAT 活性の欠失を生じさせると考えられる。一部のミスセンス変異による分類不能もあるが、ミスセンス部位と診断/臨床症状は密接な関係を有している³⁾ (

図 3)。

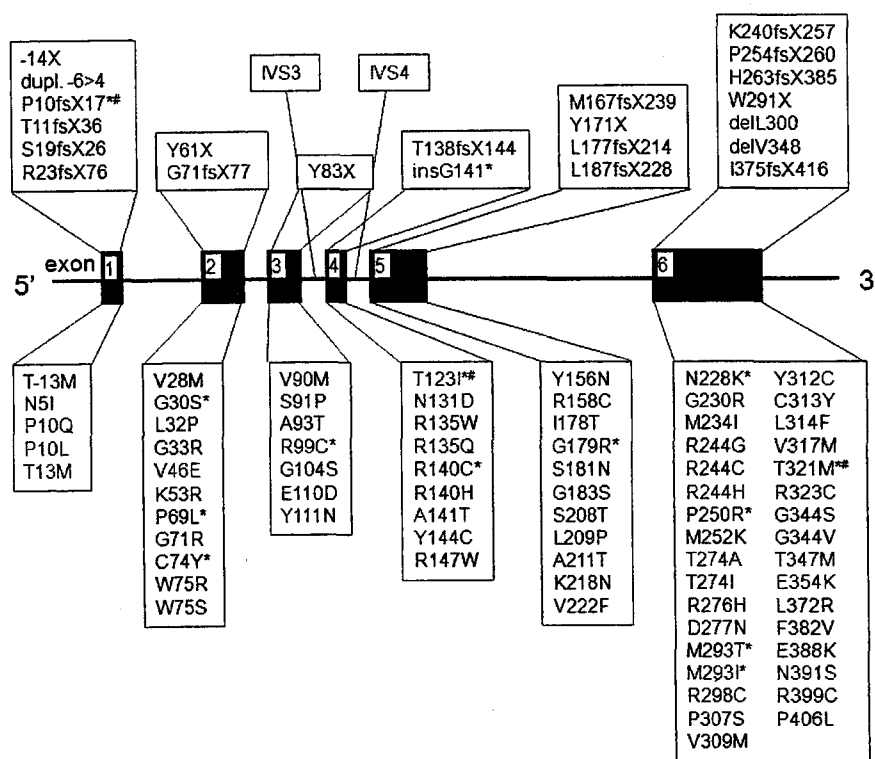


図 3. LCAT 遺伝子において同定されている変異

LCAT 遺伝子領域は 6 個のエクソンより構成される。赤字は古典型 LCAT 欠損症 (部分型を含む)、青字は魚眼病で同定されている変異である。*印は本邦で報告された家系を、#印は本邦および外国で同定された共通の変異部位を示す。各変異はホモ接合体に加え、ヘテロ接合体で同定されたものでもあり、個々の遺伝子異常がその病態の直接の原因遺伝子であるかについて確認されていないもの (黒字) も含む。

家族性 LCAT 欠損症は、LCAT 遺伝子異常 (遺伝子欠損、欠失/挿入、ミスセンス変異) によって、古典型 LCAT 欠損症、部分 LCAT 欠損症および魚眼病に分類される (表 1)^{4) 5)}。

特に、古典型 LCAT 欠損症は、血中全 LCAT 活性が正常の 10%未満と報告されており⁶⁾、本遺伝性疾患の典型的な症状を示す疾患である。

表 1. 家族性 LCAT 欠損症（古典型、部分型、魚眼病）の分類

分類	血中 LCAT 活性		血中 LCAT 蛋白量	血清・各リポ蛋白中でのコレステロールエステル濃度 (CE)	臨床症状				遺伝子異常
	α LCAT 活性	β LCAT 活性			角膜混濁	溶血性貧血	腎症状	低 HDL コレステロール血症	
古典型 LCAT 欠損症	完全欠失 0~9%	完全欠失 0~9%	正常の 0~10%	血清 CE : 著減 HDL : FC 増加, CE 著減 VLDL および LDL : FC 増加, CE 著減 CER : 著減	+	+	+	+	a)ヌル対立遺伝子 b) 欠失、挿入によるフレームシフト c) ミスセンス変異
部分型 LCAT 欠損症	正常の 10~20% (古典型の垂型)	正常の 10~20% (古典型の垂型)	正常の 10~20%	血清 CE : 低下 HDL : FC 増加, CE 低下 VLDL および LDL : FC 増加, CE 低下 CER : 正常の 20~50%	+	+	-	+	ミスセンス変異
魚眼病	正常の 0~20% もしくは完全欠失	正常	正常	血清 CE : 正常または軽度低下 HDL : FC 増加, CE 著減 VLDL および LDL : CE 正常 CER : 正常または軽度低下	+	-	-	+	ミスセンス変異

α LCAT : HDL 上での FC のエステル化活性 (真鍋-板倉法 : α LCAT 活性)

β LCAT : apoB 含有リポ蛋白上の FC のエステル化活性 (長崎-赤沼法 : α , β LCAT 活性)

FC : free cholesterol : 遊離型コレステロール、CE : cholesterol ester : コレステロールエステル、CER : cholesterol esterification rate : コレステロールエステル化率

1) 古典型 LCAT 欠損症⁶⁾

古典型 LCAT 欠損症は、常染色体性劣性遺伝性疾患 (遺伝子は染色体 16 番に局在) であり、世界で約 30 家系が報告 (1993 年) されている。LCAT 活性の完全欠失 (正常の 0~9%) のため、全般的なリポ蛋白代謝異常 (著明な低 HDL コレステロール血症 5 mg/dL 以下、HDL 粒子の著明な減少とコレステロールエステル化障害による原始型 HDL の滞留と出現、大分子 LDL の出現、血中コレステロールエステル比 * の著しい低下)、組織における遊離 (非エステル) コレステロールの組織における異常蓄積 (泡沫細胞の骨髄、脾臓などへの浸潤) を呈し、幼少期より角膜輪・角膜混濁を併発する。また遊離型コレステロールの赤血球膜への蓄積による膜脂質組成異常に伴い、標的赤血球の出現、溶血性貧血が発症する。さらに本疾患では、他の家族性 LCAT 欠損症とは異なり、その予後を決定的にする重要な因子として腎障害を併発する (アルブミンを主とした蛋白尿が出現し、蛋白尿として 0.5~1.5 g/日)。その病態は、腎細動脈硬化、泡沫細胞の出現やボーマン囊の肥厚、血管内皮下および腎糸球体基底膜への遊離型コレステロールやリン脂質の沈着を特徴とする (表 1)。

* コレステロールエステル/総コレステロール

2) 部分型 LCAT 欠損症

部分型 LCAT 欠損症は、LCAT 活性が正常値の 10~20% 残存している古典型 LCAT 欠損症の垂型で、ホモ接合体による劣性遺伝形式をとる。通常、HDL コレステロール濃度は 10 mg/dL 程度であり、血中コレステロールエステル比は 30~50% 程度である。部分型 LCAT 欠損症は、主に角膜輪・角膜混濁や溶血性貧血、低 HDL コ

レステロール血症の臨床症状を認める (表 1)。

3) 魚眼病 (FED: Fish Eye Disease)

魚眼病は、 α LCAT 活性 (HDL や合成基質を用いて測定した LCAT 活性) の消失が特徴であり、LCAT の HDL 結合領域における突然変異により HDL との結合がなされないため HDL 分画の LCAT 活性 (α LCAT) の欠失が生じることによるとされている。血中 LCAT 活性が低下 (内因性 LCAT: β LCAT 活性は正常) し、主に角膜輪・角膜混濁と著明な低 HDL コレステロール血症の臨床症状を認める (表 1)。角膜に生じる病態は、角膜移植時の角膜分析より細胞外コレステロールとリン脂質の増加と組織学的には大小の小胞を認め、角膜実質全層にわたる微細な灰白色の点状の集簇を特徴とし、通常周辺部で強くなって角膜輪を形成する。

(3) 家族性 LCAT 欠損症の患者数

国内論文および学会調査では、LCAT 欠損症 25 例 (18 家系) および魚眼病 5 例 (4 家系) の報告がなされている (表 2)。しかし、本邦における家族性 LCAT 欠損症 (古典型 LCAT 欠損症、部分型 LCAT 欠損症、魚眼病) は、患者実態調査および家系調査は十分に行われていないために潜在患者数は未知であるが、希少疾病として取り扱われる可能性が高いと考える。

表 2. 国内家族性 LCAT 欠損症の国内症例報告数

	家系	報告症例数	遺伝子診断	型
LCAT 欠損症	1	3	G141 挿入	古典型
	2	2	M293I	分類不能
	3	2	N228K	古典型
	4	1	G344S	古典型
	5	1	C 挿入	古典型
	6	2	M293I	分類不能
	7	1	M293I	分類不能
	8	1		古典型
	9	2	T321M	古典型
	10	1	G30S	古典型
	11	1	P250R	古典型
	12	1	R140C	部分型
	13	1	N5I	部分型?
	14	1	G 欠失	古典型
	15	1		部分型
	16 (不明)	2		疑い
	17	1		古典型
	18	1		部分型
計	18 家系	25 症例		
魚眼病	1	1	T123I	魚眼病
	2	2	R99C	魚眼病
	3	1		魚眼病
	4	1	T13M	魚眼病
計	4 家系	5 症例		

(4) 家族性 LCAT 欠損症の治療の現状と今後

1) 現状の治療方法とその効果^{3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)}

家族性 LCAT 欠損症の治療は、通常、脂質代謝異常抑制もしくは腎機能障害進展抑制を目的とした低脂肪食・低蛋白質食を中心とした食事療法がなされているが、その効果については不明であり、また過去新鮮血輸血による LCAT 補充療法がなされたが、その効果の持続性と輸血による感染症の危険性のため現在施行されているケースはない。

①低脂肪食および低蛋白質食

低脂肪食および低蛋白質食の食事療法については、血中脂質、貧血症状や合併症の進展に及ぼす影響については現在定かではない。

②LCAT 補充を目的とした新鮮血（全血または血漿）輸血療法

LCAT 補充を目的とした新鮮血（全血または血漿）輸血療法が過去に行われた。その結果として、LCAT 活性の輸血後上昇は認められるが、その半減期が短いことからほぼ 1 週間程度で輸血開始時の値に戻り、効果を継続させることは困難であることが報告されている。

また、血中脂質への影響については新鮮血血漿を 3 週間に計 9 回施行したところ、コレステロールエステル比は輸血期間中一過性の上昇は認めるものの、輸血終了後は輸血開始時の値に戻ったと報告されている。その裏づけとして LCAT 欠損患者の血清に精製 LCAT を添加すると、原始型 HDL 粒子は速やかに球状 HDL へと変化し、コレステロールエステルの増加も確認されている。

一方、溶血性貧血症状は、新鮮血輸血後、ヘマトクリット値の上昇維持が 9 ヶ月継続したとの報告もある。また 10 日間の連続輸血（総量 2200ml）によって、LCAT 活性を正常の 8%まで回復させ、赤血球の形状および赤血球膜脂質成分の改善を認めた報告もある。角膜混濁、腎機能障害などの合併症状への影響は定かではない。

以上より、新鮮血輸血による LCAT 補充療法は、輸血後、貧血症状の改善、コレステロールエステル化能、LCAT 活性上昇を認めるが、長期にわたる施行は輸血後感染の危険性もあり、現在は実施されていない。

③薬剤治療

薬剤治療に関しては、脂質代謝改善薬と高用量のアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の 5 年間の併用投与で、投与前後の腎生検所見に変化が認められなかったことから、本併用投与は家族性 LCAT 欠損症患者の腎不全の進行を遅らせることが示唆されている⁴²⁾。しかしながら、1 症例のみでの観察であり臨床所見の更なる蓄積が必要である。

2) 現行治療における家族性 LCAT 欠損症患者の予後

家族性 LCAT 欠損症の予後を左右する重要な因子に腎障害とそれによる腎不全への移行と人工透析療法の実施がある。特に古典型 LCAT 欠損症の予後を決定づける重要な因子として腎障害を併発するものが多く、腎不全、人工透析へと移行する。家族性 LCAT 欠損症症例で 6 年間に 2 度、腎臓への脂質沈着を腎生検にて観察したところ、食事療法のみでは緩徐な脂質沈着の進展が確認され、その進展を抑制することは出来なかった。また腎不全の治療のため、腎移植を受けた症例は数例（1983 年段階で 4 例）報告されている。しかし、移植成功例では腎不全症状の改善は認めるが、血中脂質構成やリポ蛋白質代謝異常は正常化しないため、移植後 6~14 ヶ月で腎への脂質の再蓄積が確認されており⁷⁾、腎移植が予後に対して一時的対処方法であることが推察される。

また家族性 LCAT 欠損症で 20 歳前後から視力障害が生じるため、その対症療法として 40~50 歳で角膜移植を施すが、根本治療でないことから再発の可能性も

ある⁸⁾。さらに眼底所見で、乳頭への脂質沈着による失明の危険性も報告されている。

3) 今後の治療方法

今後の治療方法としては、遺伝子組換え型ヒト LCAT の医薬品開発が期待されており、LCAT 欠損モデルマウスへの静注試験が行われている。しかしながら一時的な血中への供給に基づく治療法であるため⁴³⁾、LCAT の半減期 (3~7 日間) から推定した補充頻度や通院頻度などから、患者・家族に大きな負担を強いると考えられる。

また遺伝子治療の面からは、ヒトアポ A1 蛋白発現トランスジェニックマウスに LCAT 遺伝子搭載アデノウイルスベクターを静注することにより、LCAT 活性および HDL コレステロールの上昇を認めたとの報告がある⁹⁾。また、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた研究結果が最近報告されている⁴⁴⁾。これらのベクターは、*ex vivo* での遺伝子治療にはその特性上不向きであると考えられるが、*in vivo* での遺伝子治療の選択肢として考えられる。肝臓に指向性の高いウイルス型を骨格としたベクターの開発が行われているが、これらのベクターによる異所性の遺伝子導入は避けられないと考えられる。またこれらのウイルスの既感染者においては免疫系による排除とその効果の減弱の可能性がある。この理由から薬効が減弱した場合の繰返し投与が困難である。このような安全性の観点などから、実用化面での更なる検討が必要と考えられる。本遺伝子治療臨床研究で実施する治療法は *ex vivo* での前脂肪細胞への遺伝子導入とその自家移植に基づくものであり、上記の原理とは異なっているため、患者に新たな治療法の可能性を提示できると考えられる。

本申請の家族性 LCAT 欠損症に対する遺伝子治療臨床研究の概要

(1) LCAT 遺伝子治療プログラム概要

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞及び LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液（以下「細胞懸濁液」という）は、被験者由来皮下脂肪組織から以下のプロセスで調製し、被験者へ自家移植する⁴⁶⁾（図 4）。

- ① 被験者より皮下脂肪組織を摘出する。
- ② 脂肪組織を細断化・酵素処理（②-1）し、ヒト前脂肪細胞を天井培養法^{注)}を用い、比重特性（脂肪含有細胞と非含有細胞）によるヒト前脂肪細胞の単離（②-2）・培養（②-3）を行う。
- ③ LCAT 遺伝子搭載レトロウイルスベクターによって LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の調製を行う。
- ④ LCAT 活性の必要レベルまでの増加を充足する LCAT 産生ヒト前脂肪細胞数を確保するため、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の培養を行う。
- ⑤ 被験者皮下脂肪組織内に自家移植するための適切な細胞数（ $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 個）を含む細胞懸濁液の調製を行う。
- ⑥ 被験者に対して自家移植を行う。

^{注)} 天井培養法とは、培養器を培養液で充填し細胞群の比重特性による分離・培養を可能とする方法である。

なお、上記工程における皮下脂肪組織から LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を調製する工程（②～④）は、細胞調製室内（CPC 内）にて無菌操作下、GMP 適合条件下で製造する。

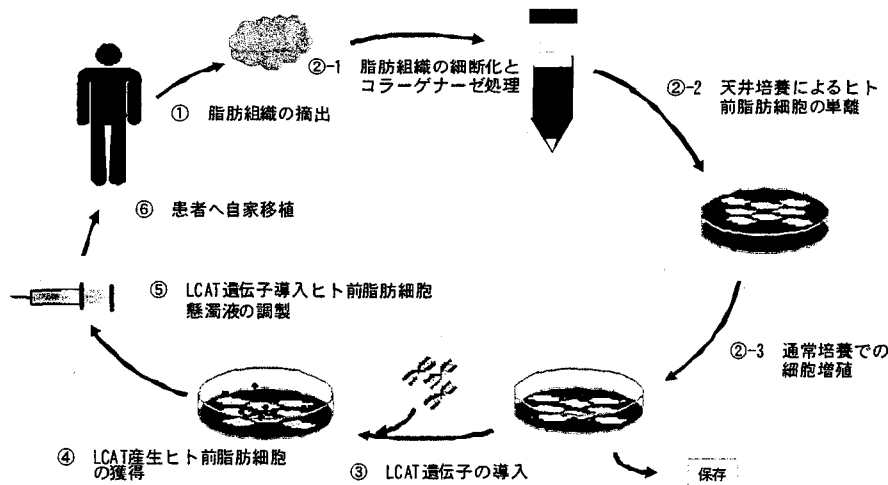


図 4. LCAT 遺伝子治療プログラム概要

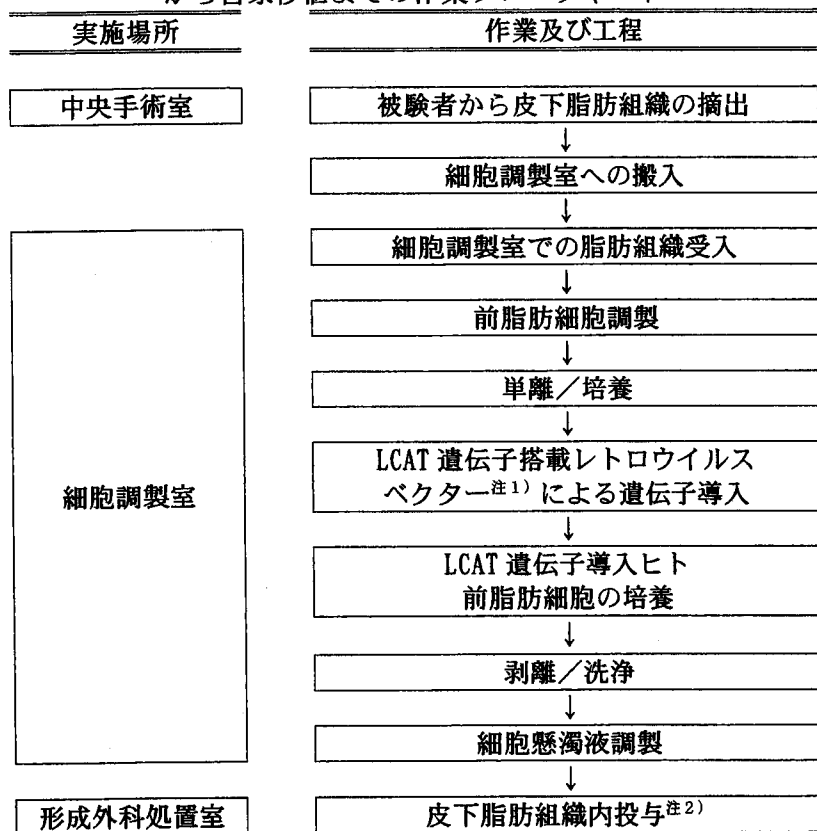
(2) LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞（その細胞懸濁液）の施設内実施場所および製造工程概要

家族性 LCAT 欠損症の被験者の皮下脂肪組織の摘出、その脂肪組織を用いた LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液の調製およびその自家移植は、以下の実施場所・作業フローチャートに示した通り実施する（表 3）。

被験者からの皮下脂肪摘出は、中央手術室（クラス 10,000）にて行う。摘出した皮下脂肪組織は、細胞調製室（無菌操作クリーンベンチ内：クラス 100）に搬入して前脂肪細胞を調製し、LCAT 遺伝子を導入する。

適切な濃度に調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液を形成外科処置室へ搬入し、形成外科処置室にて被験者の皮下脂肪組織内に移植する。この一連の手順は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（カルタヘナ法：平成 15 年法律第 97 号）の第一種使用規程に基づいて実施する。

表 3 LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞（その細胞懸濁液）製造から自家移植までの作業フローチャート



注1) 遺伝子導入用ベクター：

ここで用いる非増殖型レトロウイルスベクター（CGT_hLCAT RV）はタカラバイオ株式会社において構築され、GMP 製造されたものであり、その品質はすでに確認済みである。細胞調製室にて凍結保存しているものを用時融解して用いる。

注2) 皮下脂肪組織内投与：

適切な拡散防止装置の執られた個室で、別途定める品質規格に適合していることが確認された LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液と生理的組織接着剤（既承認市販品の血漿分画製剤）を混合し、直ちに被験者の皮下脂肪内に注射器で注入する。増殖性ウイルス（RCR）出現の可能性を完全に排除できないことから、移植後 1 日目の RCR 検査（NAT 法）で陰性を確認した後、被験者を個室から通常の病室に移動させる。以後、RCR 検査を継続する。

(3) 家族性 LCAT 欠損症に対する LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の臨床研究概要

1) 患者の同意取得から適格性判定までの流れ

本臨床研究を実施するに際しての、患者の同意取得から適格性調査、適格性判定に至る流れを示した (表 4)。

表 4. 患者の同意取得 (登録) から適格性判定までの流れ

家族性 LCAT 欠損症の患者	
↓	
同意取得	同意取得 (臨床研究の意義・目的・方法・リスク/ベネフィット・参加条件・個人情報保護・倫理的配慮・費用負担・実施体制など) について詳細説明。特に個人情報保護および被験者保護の面から倫理面に配慮を行う
↓	
適格性調査	<p>適格性を判定するために、以下の診察、調査、検査を実施する。</p> <p><選定基準></p> <p>① 家族性 LCAT 欠損症の確定診断</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 遺伝子診断 遺伝子異常 (完全欠損、部分欠損、変異) が確認されている。 ・ 臨床症状 低 HDL コレステロール血症、角膜混濁、腎機能異常、溶血性貧血 ・ 血中 LCAT 活性 自己基質法では基準下限値未満 高感度測定法 古典型 LCAT 欠損症 : 正常域の 10%未満 (α、β LCAT 活性) 部分型 LCAT 欠損症 : 正常域の 20%以下 (α、β LCAT 活性) <p>② 年齢 : 16~40 歳</p> <p>③ 病状調査 : 生命予後および QOL への障害が強く推察される</p> <p><除外基準></p> <p>① LCAT 変異から完全長 LCAT 蛋白が発現されない患者または血中に LCAT 蛋白が検出できない患者</p> <p>② LCAT 産生に影響を及ぼす高度な肝疾患 (劇症肝炎、肝硬変) および腎疾患 (腎不全)</p> <p>③ LCAT 産生に影響を及ぼす全身性の栄養失調 (不・低栄養、悪液質)</p> <p>④ 低 HDL 血症を認める類似疾患 (アポ A1 異常症、Tangier 病)</p> <p>⑤ ウイルス感染症 (B 型肝炎、C 型肝炎、ヒト免疫不全症、成人型 T 細胞白血病、パルボウイルス B19 感染症) 検査陽性</p> <p>⑥ 皮下脂肪摘出 (20 g 程度) の施行困難</p> <p>⑦ 治療歴 : 1 ヶ月以内の新鮮血輸血などによる LCAT 補充療法</p> <p>⑧ 妊娠中、授乳中あるいは妊娠希望</p>
↓	
遺伝子治療臨床研究審査委員会	被験者の適格性調査結果をもとに適否の判定を行う

2) 被験者からの皮下脂肪摘出、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞 (その細胞懸濁液) 製造、移植、経過観察の流れ

以下、被験者からの皮下脂肪摘出、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞およびその細胞懸濁液の製造、移植および経過観察の流れを示した (表 5)。

表 5. 皮下脂肪摘出、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞 (その細胞懸濁液) の製造 (品質評価)、移植、経過観察の流れ

	LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞 (その細胞懸濁液) 製造、移植、経過観察の流れ	細胞懸濁液の製造と品質評価
被験者皮下脂肪組織摘出	皮下脂肪摘出 皮下脂肪摘出時間 (30 分) 縫合、薬剤投与 含め 1 時間	
	↓	
LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞およびその細胞懸濁液製造	LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の LCAT 発現活性の確認と移植細胞数の設定 * 移植細胞数の設定: 健常人の 10% の血中 LCAT 蛋白量を補充するために必要とする細胞数を、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の発現する蛋白量に基づき計算する。	製造期間: 18~25 日間
		天井培養: 7 日間
		LCAT 遺伝子導入: 1 日間
		LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の平板培養: 10~17 日間
細胞懸濁液品質試験結果評価	↓	細胞懸濁液品質確認試験 (3 時間以内)
細胞懸濁液移植	細胞懸濁液皮下脂肪組織内移植	
細胞懸濁液品質試験結果評価	↓	細胞懸濁液品質確認試験 (不純物試験: 30 日以内)
経過観察→研究評価	移植後の安全性 (臨床検査・RCR 検査など) および有効性 (血中 LCAT 活性・血中 HDL・臨床症状など) のモニタリング (2 週間毎に実施、移植後 3 ヶ月間) ↓ 遺伝子治療臨床研究審査委員会による一次評価	
	移植後の安全性 (臨床検査・RCR 検査など) および有効性 (血中 LCAT 活性・血中 HDL・臨床症状など) のモニタリング (1 ヶ月毎に実施、移植後 6 ヶ月間) ↓ 遺伝子治療臨床研究審査委員会による最終評価	
↓		
予後調査	移植後の安全性 (臨床検査・RCR 検査など) および有効性 (血中 LCAT 活性・血中 HDL・臨床症状など) のモニタリング (3 ヶ月毎に実施、移植後 5 年間) ↓ 長期フォローアップ (5 年間の経過観察が終了した症例については定期的に症状の把握に努め、必要であれば適切な処置を施す)	

他の治療法との比較及び本遺伝子治療を選択した理由

家族性 LCAT 欠損症は、稀な常染色体劣性遺伝性疾患である。本症は、古典型 LCAT 欠損症、部分型 LCAT 欠損症、魚眼病に分類され、血中コレステロールのエステル化を担うコレステロール逆転送系酵素である LCAT (レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ) の先天的な欠損もしくは遺伝子異常による LCAT 活性の欠失や活性低下によって、低 HDL (高比重リポ蛋白) コレステロール血症、腎障害、溶血性貧血および角膜混濁など多様な臨床症状を呈する^{2) 3)}とされている。本邦でも 10 数家系が報告されている。

家族性 LCAT 欠損症のうち、古典型 LCAT 欠損症の LCAT 活性 (合成基質法による HDL 分画中の LCAT 活性： α LCAT 活性) は、正常な LCAT 活性に比較しその活性は 10%未満、部分型 LCAT 欠損症および魚眼病は正常の 20%以下であることが知られている。このことから、LCAT を安定持続的に供給し、正常な LCAT 活性の 10%相当分の LCAT 活性を増加させることによって、臨床症状の改善が期待できるものと考えた。

(1) 治療方法の現状

現在、家族性 LCAT 欠損症の治療は低脂肪食および低蛋白食による食事制限が主であり、一部に LCAT 供給を目的とした新鮮血 (全血または血漿) 輸血療法がなされた報告もある。この報告は、組換え型 LCAT 酵素を含む酵素補充療法が、家族性 LCAT 欠損症患者の病態を改善させる効果があることを示唆している。血友病を初め、数多くの先天性代謝性疾患に酵素 (蛋白) 補充療法が臨床導入されている。特に、ライソゾーム病などの希少疾患に対する組換え型薬剤はすでに医薬品となっているものだけでなく、臨床試験が行われているものを含めて、現在でも多くの研究開発が進められているところである⁵⁵⁾。組換え型 LCAT 酵素製剤についてはアメリカのバイオベンチャー企業が開発中であり、LCAT 欠損モデルマウスにおいて短期間の薬効を確認したとの報告がなされている⁴⁹⁾。しかしながら、一般的に欠損蛋白の補充療法はその酵素の半減期から推定した補充頻度や通院頻度が高いことなどから、患者・家族に大きな負担を強いると言われている。一方、新鮮血 (全血または血漿) 輸血では、溶血性貧血などの一部の症状が速やかに改善されることも報告されているが、感染症の危険性を拭えないことに加え、その補充効果は一過性にしか得られなかったことなどから、その後においてほとんど行われていない。そこで、持続的な LCAT 補充を可能とする遺伝子治療を以下の理由にて選択した。

(2) 本遺伝子治療の選択

家族性 LCAT 欠損症への正常なヒト LCAT 補充を長期にわたり可能とする方法を模索し、遺伝子治療による補充、すなわち LCAT 遺伝子導入細胞の移植による補充を考えた。遺伝子治療を模索する場合、最も重要なことは遺伝子を導入する標的細胞の性質である。

1) 遺伝子導入標的細胞の選定

遺伝子を導入する標的細胞の選択は、

- ①拒絶反応を回避するため、患者自身より比較的低侵襲的に摘出可能な組織・細胞であり、また移植が容易であること
- ②導入遺伝子産物の持続的発現をもたらす細胞であること
- ③②の実現のため遺伝子導入方法としては、多くの遺伝子治療臨床研究で使用されているレトロウイルスベクターを用いる方法が適していると考え、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入が可能な細胞であること
- ④遺伝子導入細胞の調製中や移植後のがん化のリスクが低いこと
- ⑤一定の均一性を確保出来ること

を考慮し、上記を満たす細胞の調査を行った。

その結果、皮下脂肪組織より比重特性を活かした天井培養法で単離可能な「ヒト前脂肪細胞」を、遺伝子導入の標的細胞とすることとした。ヒト前脂肪細胞を標的細胞とした背景は以下の通りである。

- ①分裂・増殖型細胞¹⁰⁾¹¹⁾であり遺伝子導入が容易である¹²⁾
- ②長期培養した間葉系細胞ではがん化することが報告されている¹³⁾が、天井培養法で単離・回収したヒト前脂肪細胞ではがん化などの形質転換が現在まで認められていない
- ③皮下脂肪組織を構成する細胞のうち、脂肪を含有しない間葉系由来細胞は他の細胞への分化能力を有するがその分化制御は困難であることに対して、天井培養法で単離・回収したヒト前脂肪細胞は分化培地に交換することにより成熟脂肪細胞へ容易に分化する¹¹⁾
- ④ヒト前脂肪細胞は、皮下脂肪組織の酵素処理/遠心分離後得られる低比重の脂肪細胞分画を天井培養することにより他の脂肪組織構成細胞から容易に単離できる(天井面から簡便に採取可能できる)¹⁰⁾¹¹⁾

2) 選定した遺伝子治療の実現可能性

千葉大学大学院医学研究院細胞治療学、臨床遺伝子応用医学、形成外科および薬学研究院病院薬学並びにセルジェンテック株式会社は、患者の皮下脂肪組織から分離、培養したヒト前脂肪細胞^{注1)}を用いて、正常なLCATの安定持続供給が可能なLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞^{注2)}を調製し、患者の皮下脂肪組織内に自家移植することによりLCAT補充を行う細胞・遺伝子治療法の開発を行うため共同研究を開始した。

本共同研究においては、健康成人より提供を受けた皮下脂肪組織から分離、培養したヒト前脂肪細胞にhLCAT遺伝子搭載レトロウイルスベクターを用いて、LCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を調製することに成功した⁴⁷⁾。また、そのLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が発現・産生するLCATは、分子サイズ、免疫学的特性及び生物活性の面から正常hLCATであることを確認した。hLCAT遺伝子導入マウス前脂肪細胞のマウス移植実験での血中ヒトLCAT活性測定が困難なため、マウス血中に分泌されるhLCAT蛋白量を測定し、健常人の血中LCAT蛋白量の10%を補充できることを確認した⁴⁸⁾。

以上より、家族性LCAT欠損症を対象とした、安定持続的なLCAT補充を目的とするLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を用いた細胞・遺伝子治療法の安全性と臨床効果の検討を、本遺伝子治療臨床研究において実施することとした。

- 注1) 前脂肪細胞は脂肪油滴を持たない細胞である。天井培養法(脂肪含有細胞が低比重特性を有することを利用した方法)を用いて脂肪油滴を含有する脂肪細胞から得られる。
- 注2) 皮下脂肪組織から調製した前脂肪細胞にhLCAT遺伝子搭載レトロウイルスベクターによってhLCAT遺伝子を導入し、LCAT蛋白質の持続発現をもたらすヒト前脂肪細胞。

VI. 遺伝子及びその導入方法

1. 導入する遺伝子の構造と性質

hLCAT 遺伝子は、ヒト肝がん細胞株 HepG2 から全 RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作製後、PCR 法によって回収した。用いたプライマーを以下に示す。

forward primer: 5' -atcggatccagggctggaaatggggccgccc-3'
reverse primer: 5' -atcggatccgtcgacggaaggtctttattcaggaggcggggg-3'

得られた塩基配列 (約 1.3kb) を hLCAT 遺伝子のオープンリーディングフレーム配列 (Accession Number M12625)¹⁵⁾ と比較し、一致していることを確認した^{14) 15)}。

この遺伝子では、C 末端のグルタミン酸とストップコドンに重なった形でポリ A 付加シグナル (AATAAA) がコードされているため、ストップコドンを TAA より TGA に改変して導入遺伝子内のポリ A 付加シグナルを除いた。また、蛋白質合成の効率を上げるために開始コドン上流に Kozak 配列 (CCGCCACC) を挿入した。

次にレトロウイルスベクター産生用プラスミドに導入された hLCAT 遺伝子配列と蛋白質のアミノ酸配列を示す (改変部分 2 箇所を図中の下線で示した)¹⁴⁾。(図 5)

GCTCACCGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCGCCACCATGGGG
METGly

CCGCCCCGCTCCCCATGGCAGTGGGTGACGCTGCTGCTGGGGCTGCTGCTCCCTCCTGCC
ProProGlySerProTrpGlnTrpValThrLeuLeuLeuGlyLeuLeuLeuProProAla

GCCCCCTTCTGGCTCCTCAATGTGCTCTTCCCCCGCACACCACGCCAAGGCTGAGCTC
AlaProPheTrpLeuLeuAsnValLeuPheProProHisThrThrProLysAlaGluLeu

AGTAACCACACACGGCCCGTCATCCTCGTGCCCGGCTGCCTGGGGAATCAGCTAGAAGCC
SerAsnHisThrArgProValIleLeuValProGlyCysLeuGlyAsnGlnLeuGluAla

AAGCTGGACAAACCAGATGTGGTGAAGTGGATGTGCTACCGCAAGACAGAGGACTTCTTC
LysLeuAspLysProAspValValAsnTrpMetCysTyrArgLysThrGluAspPhePhe

ACCATCTGGCTGGATCTCAACATGTTCTACCCCTTGGGGTAGACTGCTGGATCGATAAC
ThrIleTrpLeuAspLeuAsnMetPheLeuProLeuGlyValAspCysTrpIleAspAsn

ACCAGGGTTGTCTACAACCGGAGCTCTGGGCTCGTGTCCAACGCCCTGGTGTCCAGATC
ThrArgValValTyrAsnArgSerSerGlyLeuValSerAsnAlaProGlyValGlnIle

CGCGTCCCTGGCTTTGGCAAGACCTACTCTGTGGAGTACCTGGACAGCAGCAAGCTGGCA
ArgValProGlyPheGlyLysThrTyrSerValGluTyrLeuAspSerSerLysLeuAla

GGGTACCTGCACACACTGGTGCAGAACCTGGTCAACAATGGCTACGTGCGGGACGAGACT
GlyTyrLeuHisThrLeuValGlnAsnLeuValAsnAsnGlyTyrValArgAspGluThr

GTGCGCGCCGCCCTATGACTGGCGGCTGGAGCCCGCCAGCAGGAGGAGTACTACCGC
ValArgAlaAlaProTyrAspTrpArgLeuGluProGlyGlnGlnGluGluTyrTyrArg

AAGCTCGCAGGGCTGGTGGAGGAGATGCACGCTGCCTATGGGAAGCCTGTCTTCCTCATT
LysLeuAlaGlyLeuValGluGluMetHisAlaAlaTyrGlyLysProValPheLeuIle

GGCCACAGCCTCGGCTGTCTACACTTGCTCTATTTCTGCTGCGCCAGCCCCAGGCCTGG
GlyHisSerLeuGlyCysLeuHisLeuLeuTyrPheLeuLeuArgGlnProGlnAlaTrp

AAGGACCGCTTTATTGATGGCTTCATCTCTCTTGGGGCTCCCTGGGGTGGCTCCATCAAG
LysAspArgPheIleAspGlyPheIleSerLeuGlyAlaProTrpGlyGlySerIleLys

CCCATGCTGGTCTTGGCCTCAGGTGACAACCCAGGGCATCCCCATCATGTCCAGCATCAAG
ProMetLeuValLeuAlaSerGlyAspAsnGlnGlyIleProIleMetSerSerIleLys

CTGAAAGAGGAGCAGCGCATAACCACCACCTCCCCCTGGATGTTTCCCTCTCGCATGGCG
LeuLysGluGluGlnArgIleThrThrThrSerProTrpMetPheProSerArgMetAla

TGGCCTGAGGACCACGTGTTCATTTCCACACCCAGCTTCAACTACACAGGCCGTGACTTC
TrpProGluAspHisValPheIleSerThrProSerPheAsnTyrThrGlyArgAspPhe

CAACGCTTCTTTGACAGCTGCACCTTTGAGGAAGGCTGGTACATGTGGCTGCAGTCACGT
GlnArgPhePheAlaAspLeuHisPheGluGluGlyTrpTyrMetTrpLeuGlnSerArg

GACCTCCTGGCAGGACTCCCAGCACCTGGTGTGGAAGTATACTGTCTTTACGGCGTGGGC
AspLeuLeuAlaGlyLeuProAlaProGlyValGluValTyrCysLeuTyrGlyValGly

CTGCCCAGCCCCGCACCTACATCTACGACCACGGCTTCCCCCTACACGGACCCTGTGGGT
LeuProThrProArgThrTyrIleTyrAspHisGlyPheProTyrThrAspProValGly

GTGCTCTATGAGGATGGTGTGACACGGTGGCGACCCGACGACCCGAGCTCTGTGGCCTG
ValLeuTyrGluAspGlyAspAspThrValAlaThrArgSerThrGluLeuCysGlyLeu

TGGCAGGGCCGCCAGCCACAGCCTGTGCACCTGCTGCCCCCTGCACGGGATACAGCATCTC
TrpGlnGlyArgGlnProGlnProValHisLeuLeuProLeuHisGlyIleGlnHisLeu

AACATGGTCTTCAGCAACCTGACCCTGGAGCACATCAATGCCATCCTGCTGGGTGCCTAC
AsnMetValPheSerAsnLeuThrLeuGluHisIleAsnAlaIleLeuLeuGlyAlaTyr

CGCCAGGGTCCCCCTGCATCCCCGACTGCCAGCCCAGAGCCCCCGCCTCCTGAATGAGTC
ArgGlnGlyProProAlaSerProThrAlaSerProGluProProProProGlu

GAGGATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCAC

図 5. 導入 hLCAT 遺伝子配列と翻訳アミノ酸配列

2. 標的細胞とした細胞の由来、生物学的特徴ならびに標的細胞とした選択理由

酵素補充療法は生理活性を有する分泌蛋白質欠損または低下症の治療として有効であり、これには遺伝子治療や遺伝子組換え蛋白質製剤の投与等があげられる。遺伝子治療は、遺伝子組換え蛋白質製剤の投与に比べ、体内で持続的な蛋白質産生が可能のため長期治療に適していると考えられている。

LCAT 補充療法の効率的な遺伝子導入系として、皮下脂肪組織由来ヒト前脂肪細胞を標的細胞とし、*ex vivo*でのレトロウイルスベクターによる遺伝子導入法を選択した¹⁶⁾。分泌蛋白質の補充療法には、一定レベルの血中濃度を維持するために必要な生産・供給体制の構築が不可欠であり、当該蛋白質の高発現細胞を充分量確保できるかどうか課題である。標的細胞とするヒト前脂肪細胞は、形成外科領域で実用化されている脂肪摘出術により皮下脂肪組織から容易に充分量採取することができ、また、体外で選別、増殖させたヒト前脂肪細胞に導入効率の高いレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入が可能である。さらに自家移植であるため、遺伝子導入されたヒト前脂肪細胞を脂肪組織内に移植した際、拒絶反応を起こさずに安定して生着するものと考えられる。なお、脂肪組織には血管網が発達しており、ヒト前脂肪細胞（脂肪細胞）より分泌されたLCATは速やかに血中に移行するものと考えられる¹⁷⁾。

ヒト前脂肪細胞が遺伝子導入の標的細胞として補充療法に有用であることは、以下の試験の結果からも推察される。

マウスを用い修飾型ヒトインスリン遺伝子及び標識遺伝子をレトロウイルスベクターにより *ex vivo* でマウス前脂肪細胞へ遺伝子導入し、体内に移植後に遺伝子発現状態を組織学的に観察した結果、マウス前脂肪細胞およびその分化した脂肪細胞で導入遺伝子の良好な発現が確認された。また、糖尿病モデルマウスを用いた試験では、修飾型ヒトインスリン遺伝子導入マウス前脂肪細胞の移植後、約2ヵ月以上にわたり安定・持続した血糖低下作用が観察されている¹²⁾。

純度の高いヒト前脂肪細胞の調製には、まず皮下より摘出して得られる脂肪組織を酵素処理と遠心分離することにより、低比重脂肪細胞含有画分を得る。脂肪組織に存在する他の血液系細胞や内皮系細胞をさらに分離するために、この画分の比重特性を利用し、培養フラスコを培地で満たした天井培養を行って、フラスコの天井面に接着した低比重細胞群を濃縮する¹⁰⁾。この1週間程度の天井培養で天井面に接着・増殖した細胞を初代ヒト前脂肪細胞とした。その形態は軽度脂肪含有線維芽細胞様の細胞群である。最初の遠心分離により沈殿した Stromal Vascular Fraction (SVF) に多く存在する未分化間葉系細胞は、様々な細胞への分化能力を有しており¹⁸⁾、長期培養した細胞を免疫不全マウスに移植することにより細胞ががん化したことが報告されているが¹³⁾、天井培養にて単離・回収したヒト前脂肪細胞に関してはそのような形質転換は現在まで認められていない。また、近年、癌抑制遺伝子の1つ *ink4a* 遺伝子を欠損した骨肉腫モデルマウスにおいて、脂肪細胞への分化能を有する幹細胞は分化能を失った細胞よりもがん化しにくいことが報告された⁴⁵⁾。このことは脂肪細胞への分化能が細胞に対してがん化しにくい形質を与えることを示唆している。

得られたヒト前脂肪細胞の細胞表面マーカーは、 $CD13^+31^+34^+45^+90^+105^+146^+$ であり、脂肪細胞への分化能があり、かつレトロウイルスベクターによる遺伝子導入に不可欠な分裂・増殖能力を保持している^{19) 47)}。なお、ヒト体内への移植後は増殖せず脂肪細胞に成熟すると考えられる。

3. 遺伝子導入方法の概略及び当該導入方法を選択した理由

ヒト前脂肪細胞への hLCAT 遺伝子の導入は、hLCAT 発現レトロウイルスベクター懸濁液を予め設定した割合 (multiplicity of infection:MOI) で、皮下脂肪組織から調製

したヒト前脂肪細胞培養液に添加して培養することにより行う。遺伝子導入後、必要細胞数までに培養させ、移植用溶液に懸濁させた細胞を皮下脂肪組織内に注入移植する。皮下脂肪組織からのヒト前脂肪細胞調製より移植用 hLCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液（細胞懸濁液）調製までの工程は治験薬 GMP 準拠の細胞調製室（CPC）において行う。

遺伝子導入法としては *in vivo* での直接導入の系と、*ex vivo* での遺伝子導入の系が考えられる。*in vivo* の直接導入の系で、比較的感染効率の高いベクターとしてはアデノウイルスベクターがあるが、ヒトへの投与では免疫反応の惹起は避けがたく、長期にわたる治療で再投与も考慮せざるを得ない場合には適切とは言えない²⁰⁾。非病原性ウイルスに由来するアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）は、もとなつたウイルスの性質から安全性は高く、筋細胞、神経細胞、肝細胞などの非分裂細胞に効率よく遺伝子導入ができ、そのような細胞では遺伝子発現が長期間持続する。筋細胞を標的とした AAV による蛋白質補充遺伝子治療では当初ある程度の臨床的効果が得られたとの報告があった³⁴⁾ が、その後ベクター量を増量したものの明瞭な臨床効果が得られずこの臨床研究は中止となっている³⁵⁾。AAV はそのゲノムが一本鎖であるため、遺伝子の発現には二本鎖になる必要がある。しかしながら現行の AAV ではその効率が必ずしも高くないため十分な発現が起きなかったためではないかと考えられる。その後肝臓への遺伝子導入に基づく臨床研究も行なわれたが、免疫反応の惹起に起因する肝細胞障害から導入遺伝子の発現が長期間持続しなかったと報告されている³⁶⁾。最近、シールドタイプの AAV2/8 を用いた血友病 B に対する遺伝子治療の報告がなされている。高用量投与症例で改変型ベクターに対する特異的な免疫反応が認められているが、6 例中 4 例で組換え型第 IX 因子製剤の併用投与が必要でなくなり、残りの 2 例は、その投与間隔が伸びるなどこれまでの報告に比べて有効性が向上している⁵⁶⁾。他にも、AAV を用いた *in vivo* の遺伝子治療法が臨床試験で検討されている⁵⁷⁾。

本臨床研究では、*in vivo* での遺伝子導入ではなく、*ex vivo* でのレトロウイルスベクターによる遺伝子導入を選択した。これは、レトロウイルスベクターの分裂細胞への遺伝子導入効率が高く、効率の良い遺伝子組み込みに基づく安定した持続蛋白質発現が可能な特徴を有するためである。*ex vivo* での遺伝子導入後の遺伝子の組み込みを考えた場合、ウイルスベクターの候補としてはレトロウイルスベクターの他に AAV の使用も考えられる。しかしながら現行の AAV は、遺伝子の挿入サイズを確保する目的で染色体への挿入に寄与する Rep 配列が除かれているため染色体への挿入効率が非常に低く、また染色体外に環状 DNA として存在することが報告されている^{37) 38)}。したがって、この AAV を用いて前脂肪細胞のような分裂時期の細胞に導入された遺伝子は細胞の増殖に伴い希釈されるため、本臨床研究のように必要細胞数まで拡大培養すると、前述の二本鎖 DNA への変換効率の低さに加えて、染色体への組み込み能の低さから、十分な薬効を保証できるだけの LCAT 遺伝子が残存しなくなるおそれがある。以上から、*ex vivo* での AAV の使用も本酵素補充療法における導入遺伝子方法としては適切ではないと考えられる。一方、レトロウイルスベクターでは増殖性ウイルス（RCR）の出現が危惧されるが、本臨床研究で用いるレトロウイルスベクターとしては、*gag*、*pol*、*env* 遺伝子配列を完全に除いた Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV) 由来の pDON-AI を用い、パッケージング細胞として *gag-pol* と *env* 遺伝子が別々の DNA 上に存在している GP+envAM-12 細胞を用いることで、相同的組換えによる RCR 出現の可能性を低く抑えている^{22) 23)}。

1999 年からフランス、続いてイギリスでレトロウイルスベクターを用いた X 連鎖重症複合免疫不全症（X-linked Severe Combined Immunodeficiency: X-SCID）に対する遺伝子治療が始まり、大半の患者が免疫能を獲得して通常の生活を送れるようになった。しかし、治療を受けた患者 20 名のうちフランスで 4 名、イギリスで 1 名計 5 名に

Tリンパ性白血病を発症し、1名が死亡した^{39) 40)}。これは、患者の染色体中のがん遺伝子 *LMO2* のプロモーター領域近傍にレトロウイルスが組込まれ、*LMO2* が恒常的に活性化された結果、白血病を発症したと考えられる^{32) 39) 37)} (フランスの1例は、*CCDN2* 遺伝子へのベクター組み込みによる⁴¹⁾)。細胞のがん化には複数の遺伝子異常の蓄積が必要である。X-SCID の場合、治療効果の発現のためには *γc* 遺伝子が導入され、その機能が正常化された細胞により免疫系が構築される、すなわち遺伝子導入細胞のみが生き残る体内環境にあること、*γc* 遺伝子自体が強力なTリンパ球増殖作用を持つという特殊事情が重なって白血病を発症したと考えられる。CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞とした慢性肉芽腫症 (CGD) のドイツでの遺伝子治療において、2例中2例の骨髄異形成症候群 (MDS) の発症が報告されており、*EVI1* 遺伝子の発現亢進が原因で染色体の不安定性が誘導され、7番染色体のモノソミーを誘発したと考察されている^{52, 53)}。一方、CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞としたアデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症のイタリアでの遺伝子治療においては、10例中8例で酵素補充療法の必要がなくなり、遺伝子治療の有効性が確認されるとともに、長期フォローアップにおいて癌化が見られなかったと報告されている⁵⁴⁾。本研究はX-SCID 遺伝子治療と同様にレトロウイルスベクターを用いているが、*LCAT* 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を用いた *in vitro* 及び *in vivo* の非臨床試験では増殖能の亢進や形質転換は現在のところ認められていない。また、この治療原理においては遺伝子導入された細胞の体内での選択的増殖が *LCAT* 欠損症の病態からは想定されない。

ex vivo による遺伝子導入の利点は、細胞への遺伝子導入の工程を品質管理できる点にある。標的細胞をヒト前脂肪細胞に絞り込むことで、遺伝子導入した細胞を体内の脂肪組織に戻したときに、脂肪細胞以外の細胞に分化して予測外の副作用を引き起こす可能性を極力排除した。さらに、ヒトの脂肪組織 (前脂肪細胞) の状態にも個人差のあることが報告されており²¹⁾、移植前の *LCAT* 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の *LCAT* 活性を予め確認してから移植できることは移植細胞数のコントロール面からも大きなメリットである。

一方、脂肪細胞の体内での代謝回転が遅いことから安定した遺伝子発現が期待できるが、さらに導入遺伝子が染色体に組み込まれることは、細胞が分裂しても娘細胞に引き継がれていく点で長期間の発現には有利である。

4. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法

(1) 野生型ウイルスの生物学的特徴及びヒトに対する影響

使用するベクターは MoMLV 由来のレトロウイルスベクターである。MoMLV は sarcoma37 細胞より分離された RNA ウイルスであるが、発がん遺伝子は持たない。長期間感染したマウスにリンパ性白血病を起こすことが知られているが、ヒトには感染することはない²⁴⁾。

MoMLV のゲノムは 5' LTR、パッケージングシグナル (Ψ)、*gag*、*pol*、*env*、及び 3' LTR よりなる。LTR にはエンハンサー/プロモーター活性があり、 Ψ はウイルスゲノム RNA がウイルス粒子に取り込まれるのに必要な配列である。*gag* はウイルスのコア構造蛋白質を、*pol* は逆転写酵素及びインテグラーゼを、*env* はウイルス外被蛋白質をそれぞれコードする遺伝子である。レトロウイルスはウイルス粒子外被に存在する ENV と標的細胞の表面にある特異的受容体が結合した後、膜融合によりウイルス粒子が細胞内に取り込まれる。その後、逆転写酵素によりウイルスゲノム RNA が 2 本鎖 DNA に逆転写され、核に移行してインテグラーゼにより宿主染色体に組み込まれる。宿主 DNA 上のウイルスゲノム (プロウイルス) は宿主の転写機構によってウイルス RNA へと転写されるが、一部は GAG、POL、ENV へと転写・翻訳され、ウイルス粒子を形

成する。ウイルス RNA を取り込んだウイルス粒子は出芽により細胞外へと放出され、次々と周囲の細胞に感染していく。MoMLV はエコトロピックウイルス（同種指向性ウイルス）のため、マウス細胞にしか感染しないが、異なる種にも感染性を示すアンフォトロピックウイルス（多種指向性ウイルス）由来の ENV を用いることで、ヒト細胞への感染も可能となる。

(2) ウイルスベクターの作製方法

ヒト前脂肪細胞への hLCAT 遺伝子の導入の際に使用する hLCAT 発現レトロウイルスベクターおよびベクター製造用マスターセルバンク作製までの工程の概略は次のとおりである（表 6）。

表 6 hLCAT 発現レトロウイルスベクター製造用マスターセルバンク作製工程の概要

Step 1	ヒト肝がん細胞株 total RNA から RT-PCR により LCAT 遺伝子を回収
	↓
Step 2	pDON-AI プラスミドの <i>Bam</i> HI- <i>Sa</i> II 間に hLCAT 遺伝子を挿入
	↓
	Kozak 配列・終止コドン (TAA→TGA) を導入
	↓
Step 3	プラスミドの <i>Neo</i> 耐性遺伝子領域の除去
	↓
Step 4	GP+E-86 細胞（エコトロピックエンベロープ発現細胞）にトランスフェクション
	↓
	hLCAT 発現エコトロピックレトロウイルスベクターを回収
	↓
Step 5	GP+envAM-12 細胞（アンフォトロピックエンベロープ発現細胞）に接種
	↓
	アンフォトロピックレトロウイルスベクター産生細胞の作製
	↓
Step 6	hLCAT 発現レトロウイルスベクター産生細胞株の単離（クローニング）
	↓
	pre-MCB の作製/検疫*
	↓
	マスターセルバンク (MCB) 作製/品質試験

* hLCAT 発現レトロウイルスベクター産生細胞株を GMP 製造施設へ受け入れる前に実施する無菌試験及びマイコプラズマ否定試験。

1) プラスミドの構築 (Step 1 ~ Step 3)

hLCAT 遺伝子発現プラスミドの構築には、MoMLV 由来のレトロウイルスベクターである MFG ベクターを改良した pDON-AI (タカラバイオ株式会社) を使用した。このベクターは、LTR とパッケージングシグナル (Ψ 配列) 以外の MoMLV 由来遺伝子 (*gag*, *pol*, *env*) を含まず、かつ 5' LTR の U3 領域がより強力なサイトメガロウイルス由来のプロモーターに置換されている^{22) 25)}。このベクターの特徴は MoMLV の構造遺伝子を完全に除くことで相同的組換えによる増殖性ウイルスの

出現を抑え、プロモーター領域を改変して導入遺伝子の発現効率の向上を図ったことにある（

図 6）。

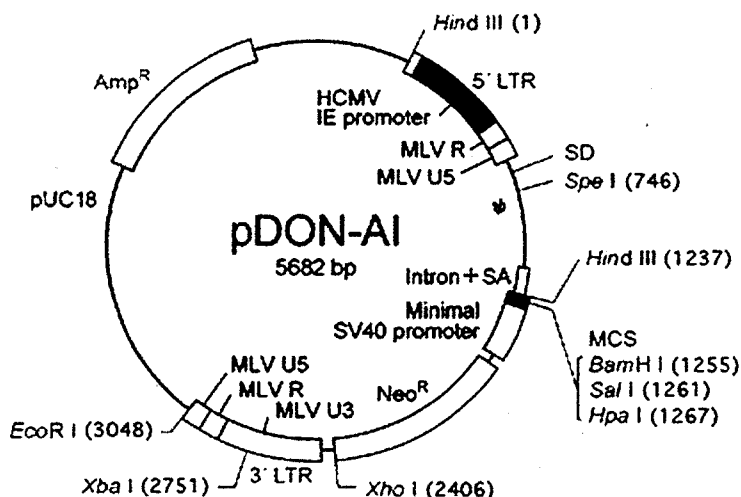


図 6 pDON-AI DNA ベクターの構造

本レトロウイルスベクター産生用プラスミド pCGThLCAT の構築過程は以下のとおりである（図 7）。

[Step 1] hLCAT 遺伝子は、IV. 1. に記載されている通り、ヒト肝がん細胞株の cDNA ライブラリーから調製した。

[Step 2] pDON-AI DNA ベクターのマルチクローニングサイト (MCS) の *Bam*HI 切断部位と *Sa*I 切断部位の間に、当該制限酵素配列を含むプライマーにより増幅させた hLCAT 遺伝子 (1.3kb) を挿入した。次に、蛋白質合成効率の向上のために開始コドン ATG 上流に Kozak 配列 (CCGCCACC) を挿入した。また、hLCAT 遺伝子ストップコドン近傍に存在する ポリ A 付加配列の AATAAA (TAA がストップコドン) を別のストップコドン TGA に改変した。

[Step 3] さらに、目的以外の不要な遺伝子の発現を避けるために、*Sa*I 切断部位から *Xho*I 切断部位までを切り出して、Minimal SV40 promoter 配列及び *Neo*^r (ネオマイシン耐性遺伝子配列) を除去した。

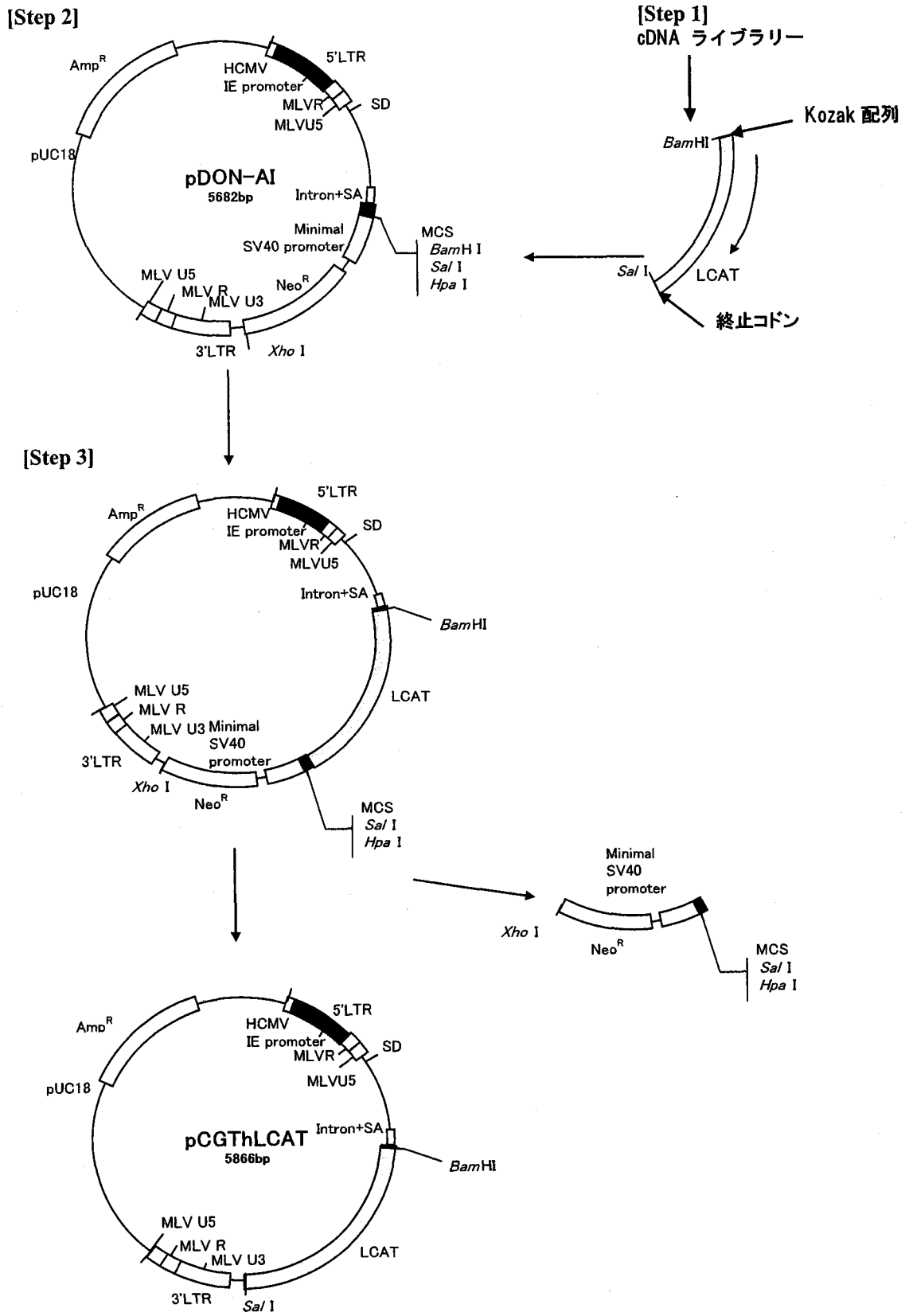


図 7. レトロウイルスベクター産生用プラスミド pCGThLCAT の構築

2) ウイルスベクター調製からマスターセルバンク作製 (Step 4 ~ Step 6)

Step1~Step3 で構築したプラスミドを用いたウイルスベクターの調製からマスターセルバンクの作製過程は以下のとおりである (図 8)。

[Step 4] MoMLV の *gag-pol* 遺伝子とエコトロピックエンベロープ遺伝子を発現するパッケージング細胞 GP+E-86 細胞²⁶⁾ に、レトロウイルスベクター産生用プラスミド (pCGThLCAT) をハイグロマイシン耐性遺伝子と同時にトランスフェクションした。トランスフェクションには Lipofectamine 2000CD (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) を用いた。Hygromycin B 選択により薬剤耐性細胞プールを獲得し、この細胞の培養上清から hLCAT 発現エコトロピックレトロウイルスベクターを調製した。

[Step 5] 次に当該エコトロピックレトロウイルスベクターを、RetroNectin (タカラバイオ株式会社) を用いて、同じく MoMLV の *gag-pol* 遺伝子及びマウスウイルス 4070A 由来アンフォトロピックエンベロープ遺伝子を発現する GP+envAM-12 細胞 (マウス由来細胞) に接種した²³⁾。

[Step 6] 遺伝子導入細胞を 96 穴プレート 50 枚に限界希釈して播種し、ウイルスベクター産生細胞のスクリーニングを行った。シングルクローンと考えられる 201 ウェルについてその上清をリアルタイム RT-PCR で分析し、陽性クローン 9 個を得た。この中から最も高タイターのウイルス産生株を 1 ライン (GP+envAM-12/CGThLCAT A_17_4) 選択し、hLCAT 発現アンフォトロピックレトロウイルスベクター産生細胞としてプレマスターセルバンク (pre-MCB) を作製した。pre-MCB より継代を 3 回実施し、マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) の作製を行った。

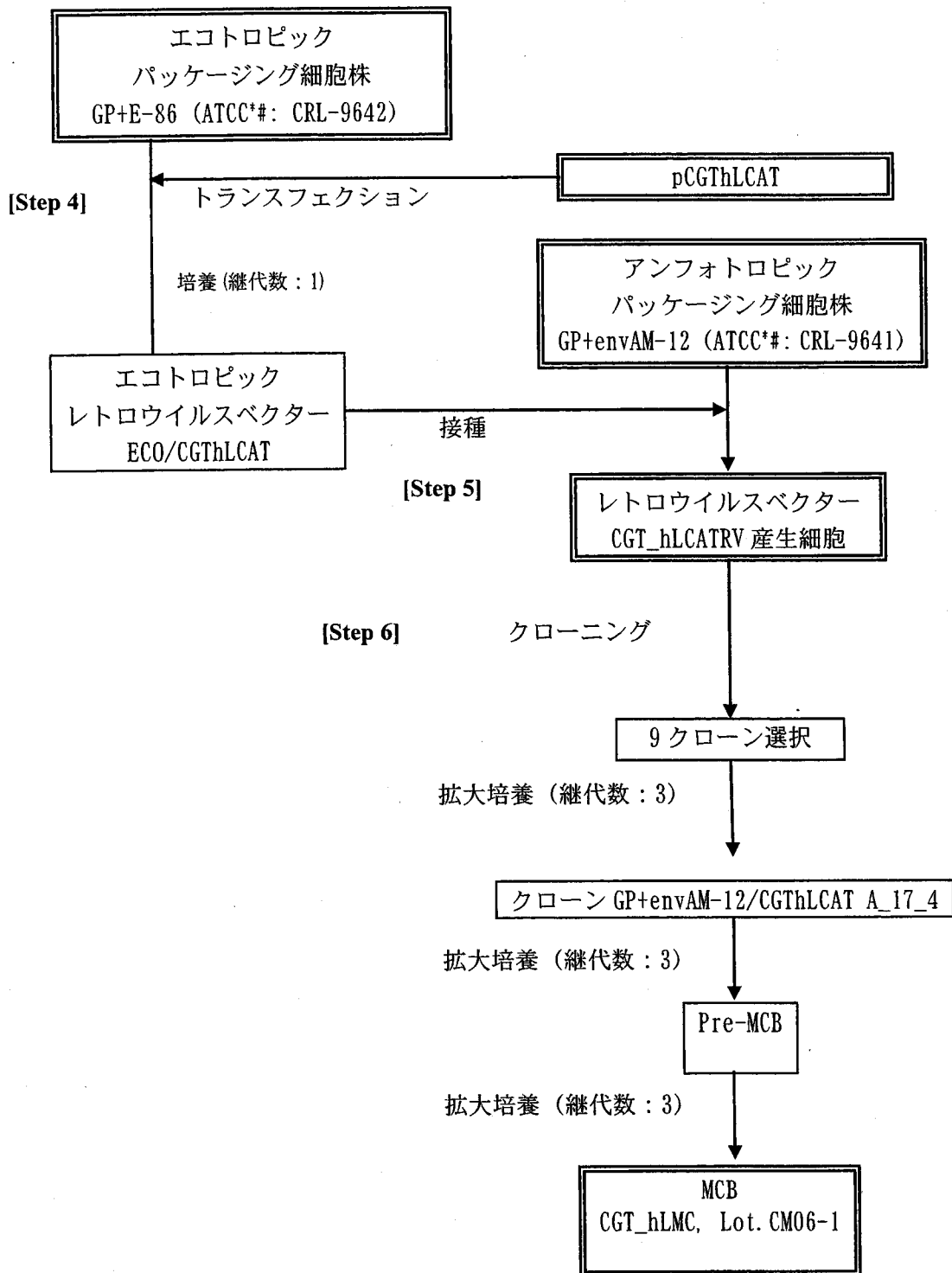
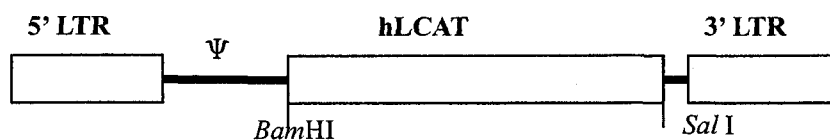


図 8. hLCAV 発現レトロウイルスベクター産生マスターセルバンクの作製概略図

* ATCC: American Type Culture Collection

(3) ウイルスベクターの遺伝子構造と性質

hLCAT 発現レトロウイルスベクターの塩基配列の基本骨格は、pDON-AI プラスミド (タカラバイオ株式会社) に由来しているが、マスターセルバンクを作製する際に GP+envAM-12 細胞にエコトロピックウイルスベクターを感染させてアンフォトロピック hLCAT 発現レトロウイルスベクターを構築する過程で、宿主染色体に組み込まれる時に、逆転写酵素によりウイルスゲノム上の 3' LTR 配列が 5' LTR 領域へとコピーされるため、5' LTR 領域塩基配列はオリジナルの MFG ベクターと同一となる。従って、MCB により生産されるウイルスベクターでは、hLCAT 遺伝子の発現は元の MoMLV 由来の LTR エンハンサー/プロモーターにより誘導されることになる。ウイルスゲノム RNA をウイルス粒子に取り込むのに必要なパッケージングシグナルとしての Ψ 配列を有するが、ウイルス粒子形成に必須な *gag*, *pol*, *env* が除かれているため、*gag*, *pol*, *env* のすべての遺伝子を発現しているパッケージング細胞 (GP+envAM-12 細胞) でのみ感染性ウイルス粒子を形成することが出来る。従って、細胞内で組換えを起こしてこれらの遺伝子を全てウイルスゲノムに取り込まない限り、通常の細胞でも増殖可能な増殖性ウイルス (RCR) が出現することはない。以下に hLCAT 発現レトロウイルスベクター遺伝子の構造概略を示す (図 9)。



LTR : Long terminal repeat, Ψ : パッケージング配列

図 9. hLCAT 発現レトロウイルスベクター遺伝子の構造概略図

(4) ウイルスベクター (マスターセルバンク) の生物学的特徴

hLCAT 発現レトロウイルスベクター作製には、パッケージング細胞として GP+envAM-12 を用いた。GP+envAM-12 細胞は野生型 MoMLV の *gag-pol* およびマウスアンフォトロピックウイルス 4070A 由来の *env* を効率よく発現する NIH3T3 由来のマウス細胞株である。 Ψ 配列を持たないためウイルス粒子中に RNA を取り込むことが出来ず、単独で野生型ウイルスを産生することはない²³⁾。VI. 4. (2) で記載した工程により作製された hLCAT 発現レトロウイルスベクター製造用マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) から産生されるウイルスベクターの遺伝子導入可能宿主は広範囲のもの (アンフォトロピック) になり、マウス、ラットのみでなくヒト、サル等にも遺伝子導入可能である。

なお、レトロウイルスの特質として、細胞への遺伝子導入には標的細胞が増殖期にあることが必要であるが、一度染色体に組み込まれた遺伝子は安定して娘細胞へと伝えられ、長期にわたる発現が期待できる。パッケージング細胞内で hLCAT 発現ベクター遺伝子が宿主遺伝子と組換えを起こす可能性は否定できないが、GP+envAM-12 細胞では *gag-pol* と *env* が独立して存在していることから、野生型の増殖性レトロウイルス (RCR) が出現するには複数回の組換えが同時に必要であること、また、このウイルスベクターは *gag*, *pol*, *env* が完全に欠落しているため²²⁾、相同的組換えに必要な元のウイルス由来配列はより少なくなっていることから、RCR 出現の可能性は極めて低いと考えられる。RCR が出現しない限り、体内で周囲の細胞や他の臓器へ伝播することはない。

5. 導入遺伝子からの生成物の構造及び生物活性

LCAT は、血中コレステロールのエステル化を担うコレステロール逆転送系（コレステロールの末梢組織から肝臓へ転送）の最初の段階を支配する重要な酵素である。肝臓で合成され、血中では HDL と結合して存在し、遊離コレステロールにレシチンの脂肪酸を転移してコレステロールエステルを生成するコレステロールエステル化酵素である。N 末端にシグナル配列をもつ分泌型蛋白質（440 アミノ酸残基）として合成されるが、分泌された成熟 LCAT はアミノ酸 416 個よりなる分子量約 63,000 の糖蛋白質（糖鎖含量約 25%）である¹⁴⁾²⁷⁾。血中半減期は約 4 日と報告されている。ヒトでの LCAT 欠損症については低 HDL コレステロール血症はじめ全ての血中リポ蛋白分画に異常がみられるが、臨床症状としては、角膜混濁や腎機能障害などがみられている³⁾。LCAT を過剰発現させたトランスジェニックマウスではコレステロール逆転送の亢進²⁸⁾ や高 HDL コレステロール血症²⁹⁾ が報告されている。

VII. 当該遺伝子治療臨床研究に関する培養細胞、実験動物を用いた研究成果

1. 培養細胞を用いた研究の成果

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の特性に関する評価として、以下の項目を実施した。

1. 形態
2. 細胞プロファイル
3. 増殖速度
4. 前脂肪細胞の分化能：脂肪幹細胞との比較
5. hLCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の脂肪細胞への分化能
6. hLCAT 遺伝子導入コピー数と導入遺伝子の安定性
7. hLCAT 遺伝子搭載レトロウイルスベクターのヒト前脂肪細胞への遺伝子導入効率
8. hLCAT の発現性及び発現した LCAT の活性
9. アポ A1 蛋白分布変化による LCAT 活性の評価
10. 家族性 LCAT 欠損症における腎機能障害関連異常リポ蛋白の解析
11. 家族性 LCAT 欠損症患者血清における LCAT 機能の評価
12. 長期培養による形質変化の有無（軟寒天培地でのコロニー形成能の検討）
13. 遺伝子導入細胞における染色体異常出現の有無
14. hLCAT 遺伝子導入によるヒト前脂肪細胞の特性変化

(1) 形態

[要約] ヒト前脂肪細胞は、顕微鏡下で線維芽細胞様の形態を示した。遺伝子導入の有無に係わらず細胞形態に差は認められなかった（図 10）。培養期間が 1.5 ヶ月程度までは形態的には大きな変化は示さなかった。

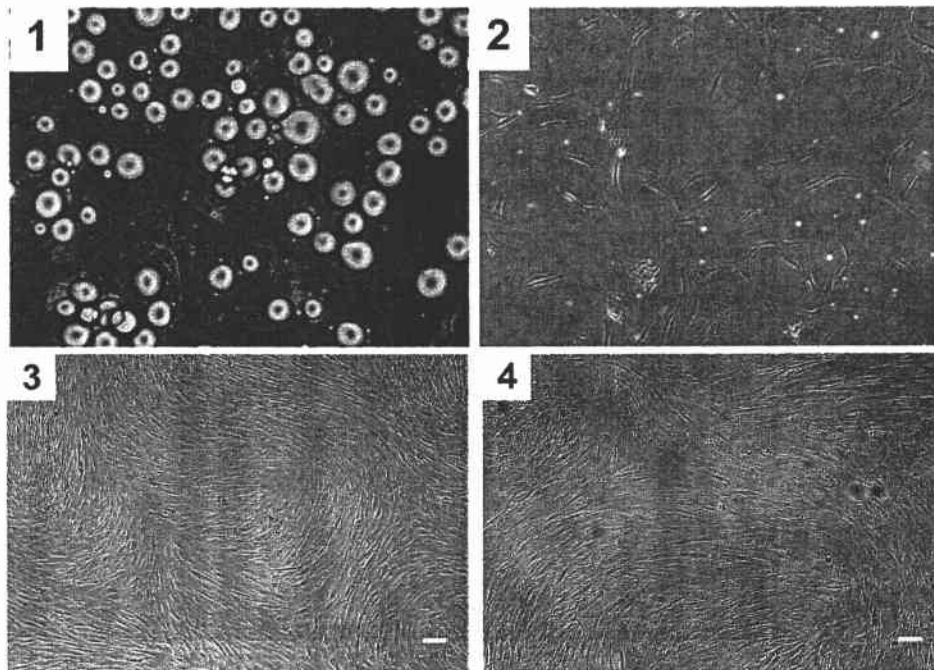


図 10. ヒト前脂肪細胞形態 (x100)

天井培養終了時は脂肪の油滴に混じって前脂肪細胞が観察される。

1: 天井培養終了時 (7 日目)、 2: 遺伝子導入直前 (8 日目)

3: 遺伝子導入 (22 日目)、 4: 遺伝子非導入 (22 日目)

(2) 細胞プロファイル

[要約] 20種の膜蛋白質に関して実施し、その結果を図11に示した。LCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞はCD31⁻CD45⁻（血球系マーカー及び血管系マーカーがともに陰性）細胞であり、その他の特徴として以下のことが判明した。

- CD45、CD34が陰性であることから血球系幹細胞の混入はないと考えられる。
- CD105、CD146が陽性であることから、線維芽細胞ではない
- CD36（脂肪酸トランスポーター）は培養初期には moderate な発現が見られ、培養により徐々に低下していく
- 間葉系幹細胞マーカーとして知られるCD13、CD29、CD44、CD73、CD90が陽性であり、未分化な多能性幹細胞や全細胞系統の造血前駆細胞に発現が認められるCD34は陰性である。
- すべての組織に幅広く発現されているとされるCD59（補体による細胞溶解を防ぐ膜蛋白質）も陽性である。

よって、LCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞は、CD13⁺31⁻34⁻45⁻90⁺105⁺146⁺と表される。この細胞プロファイル結果は、天井培養法により分取したヒト前脂肪細胞の性質に関する宮崎らの報告¹¹⁾と概ね一致していた。また、吉村らが示した脂肪由来細胞の細胞プロファイル³⁰⁾ではCD34の発現は陽性を示したが、この相違は天井培養法の利用の有無や培養期間の相違によるものと考えられる。また遺伝子非導入ヒト前脂肪細胞の結果から、検討した20種の膜蛋白質発現に関して、遺伝子導入が特に影響を与えないことが判明した⁴⁷⁾。

(実験方法)

健康成人より提供された腹部皮下脂肪からヒト前脂肪細胞を分取し、硫酸プロタミンを補助試薬としてレトロウイルスベクターを用いてhLCAT遺伝子を導入した後、腹部皮下脂肪採取21日後のヒト前脂肪細胞の膜蛋白質プロファイリングを行った。フローサイトメトリーはBecton Dickinson社のFACS Caliburを用いた。また抗体はBecton Dickinson社、もしくはBeckman Coulter社にて販売されているものを用い、定法に従い染色した。また、天井培養終了直後のヒト前脂肪細胞、脂肪組織採取21日後のLCAT遺伝子非導入細胞についても、同様の方法で細胞プロファイリングを実施し3種類の細胞のプロファイルを比較した。

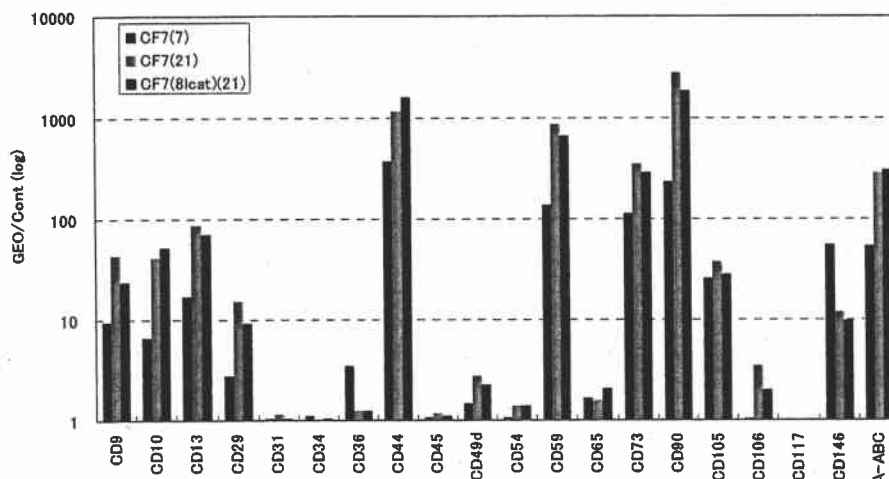


図 11. LCAT 導入ヒト前脂肪細胞の膜蛋白質発現プロファイル

CF7(7)：天井培養終了直後のヒト前脂肪細胞、CF7(21)：脂肪組織摘出21日後のLCAT遺伝子非導入ヒト前脂肪細胞、CF7(8lcat)(21)：脂肪組織摘出8日後にLCAT遺伝子を導入し、21日後まで拡大培養を実施したヒト前脂肪細胞（LCAT遺伝子

導入ヒト前脂肪細胞)

(3) 増殖速度

[要約] 腹部皮下脂肪採取 9 日目 (遺伝子導入翌日) から 21 日目 (移植予定日) までの LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の倍加時間は 1.4~2.0 日であった。増殖速度は遺伝子導入の有無で影響を受けなかった⁴⁷⁾ (図 12)。

(実験方法)

健康成人 3 例より提供された腹部皮下脂肪からヒト前脂肪細胞を分取し、硫酸プロタミンを補助試薬としてレトロウイルスベクターを用いて hLCAT 遺伝子を導入した後、移植を想定した拡大培養を行った。培地は MesenPRO 培地 (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) を使用した。継代を行うたびに細胞数を測定し、長期間の増殖曲線を作成し、倍加時間を求めた。

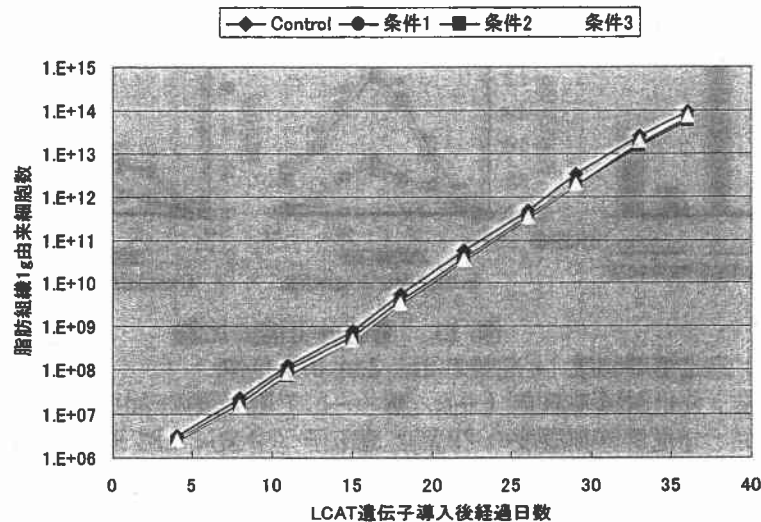


図 12. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の増殖速度

Control: 遺伝子非導入、条件 1: 1.3×10^9 RNA copies/mL、条件 2: 2.0×10^9 RNA copies/mL、条件 3: 3.1×10^9 RNA copies/mL の濃度のウイルスベクターを 24 時間暴露した。

(4) 前脂肪細胞の分化能: 脂肪幹細胞との比較

[要約] 同一のドナーからヒト前脂肪細胞と脂肪幹細胞を調製し、脂肪、骨、軟骨分化能についてそれぞれの分化誘導刺激下で比較検討を実施した。その結果、脂肪分化能はヒト前脂肪細胞が優れており⁴⁹⁾ (図 13)、骨、軟骨分化能は脂肪幹細胞と同等であった (図 14, 図 15)。

(実験方法)

健康成人より提供された腹部皮下脂肪をコラゲナーゼ処理し、遠心後の浮遊層 (成熟脂肪細胞層) と沈殿画分 (stromal vascular fraction, SVF) を分取した。浮遊層から天井培養法により前脂肪細胞を、SVF よりフラスコへの接着細胞を回収し脂肪幹細胞とした。脂肪組織採取後から同じ日数継続培養した細胞に対して分化誘導刺激を施し、脂肪、骨、軟骨分化能をそれぞれ Oil Red O 染色、アリザリンレッド染色、アルシアンブルー染色により評価した。脂肪分化について、AdipoRed 染色強度、分化マーカー遺伝子発現 (PPAR γ 2、aP2 遺伝子 mRNA)、骨分化について Ca²⁺の蓄積、軟骨分化について硫酸グルコサミノグリカン (sGAG) の定量

比較を実施した。

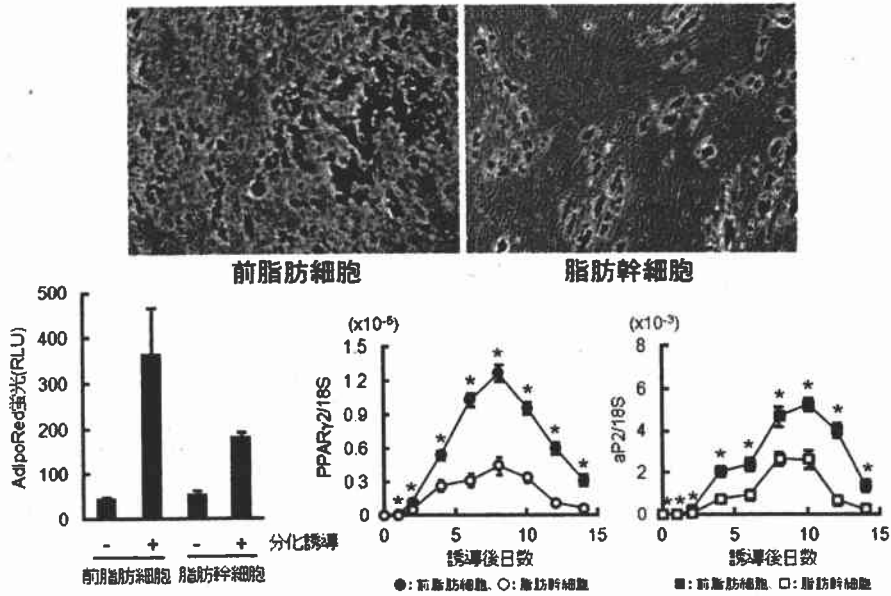


図 13. 脂肪分化能の比較

上段：分化誘導刺激 14 日後の Oil Red O 染色像
 下段左：分化誘導刺激有 (+)、無 (-) で培養後の AdipoRed 染色強度、下段中央、右：分化誘導刺激後の PPAR γ 2 遺伝子 (中央)、aP2 遺伝子 (右) の mRNA 定量結果。*p<0.05.

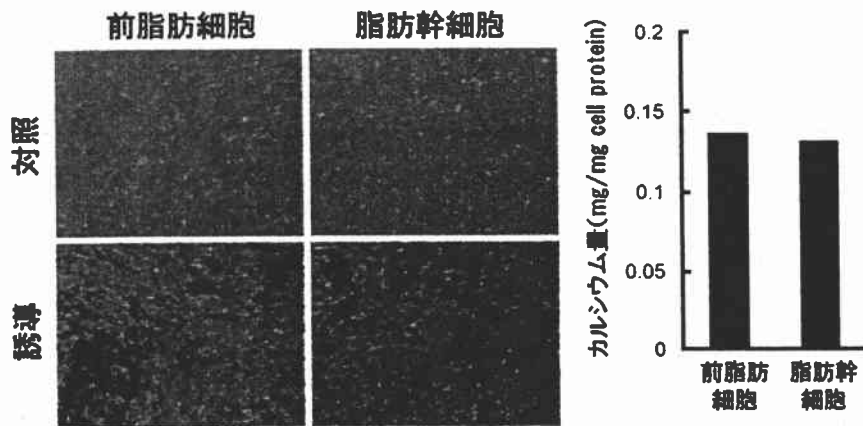


図 14. 骨分化能の比較

写真：対照 (分化誘導刺激なし)、誘導 (分化誘導刺激有) で 3 週間培養後のアリザリンレッド染色像、グラフ：分化誘導刺激後のカルシウム定量結果

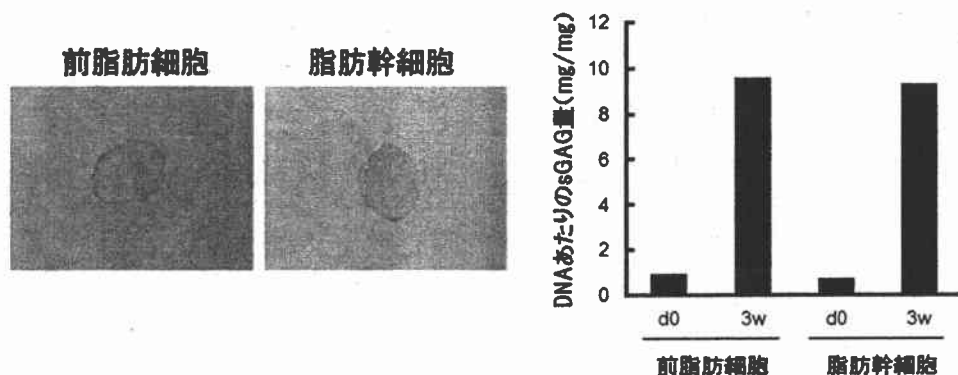


図 15. 軟骨分化能の比較

写真：micromass 培養下、分化誘導刺激 3 週間後のアルシアンブルー染色像、グラフ：分化誘導刺激前 (d0) 後 (3w) の硫酸グルコサミノグリカン (sGAG) 定量結果

(5) hLCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の脂肪細胞への分化能

[要約] 組織採取 24 日目のヒト前脂肪細胞を脂肪細胞への分化誘導を行った結果、約 50% の LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が Oil Red O にて染色され、脂肪細胞への分化が認められた。分化能は LCAT 遺伝子導入の有無で影響を受けなかった (図 16)。遺伝子導入細胞と非導入細胞の間で蓄積されたトリグリセリド量に差は認められなかった⁴⁷⁾ (1.30 ± 0.43 vs. 1.25 ± 0.27 mg/mg protein (平均値±標準偏差))。移植時に scaffold として用いるフィブリンゲルを使用した in vitro 3 次元培養を行った結果、培養フィブリンゲルの収縮と細胞密度の増加と共に、培養 28 日目から Oil Red O による染色される細胞が出現した。少なくともこの条件においては外部からの刺激を必要とせず、前脂肪細胞は自発的な脂肪細胞への分化能を有することが確認された⁵⁰⁾ (図 17)。

(実験方法)

健康成人より提供された腹部皮下脂肪からヒト前脂肪細胞を分取し、硫酸プロタミンを補助試薬としてレトロウイルスベクターを用いて LCAT 遺伝子を導入した後、T25 フラスコにて培養を行った。腹部皮下脂肪採取 21 日目にコラーゲンコートした培養プレートに播種した。3 日後 (脂肪採取 24 日目) に以下の組成の培地 * に交換し、分化誘導を行った。その 2 週間後、Oil Red O にて油滴を染色することにより、脂肪細胞への分化を確認した。

LCAT 遺伝子を導入したヒト前脂肪細胞を含むフィブリンゲル細胞塊を調製し、MesenPRO 培地において持続培養を行った。経時的に細胞塊を回収し、切片を作製、Oil Red O、HE による染色を行った。

* 脂肪細胞培地：DMEM に 10%FBS、Insulin、Dexamethason、IBMX、Indomethacin を加えた培地

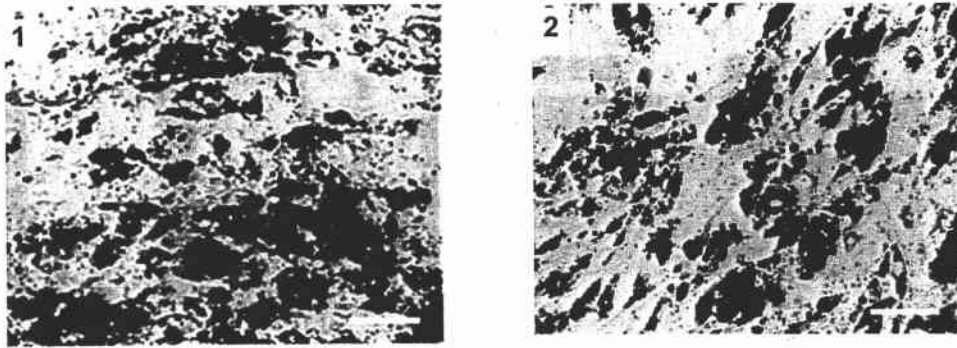


図 16. LCAT 導入ヒト前脂肪細胞の脂肪細胞への分化能
 (脂肪採取 24 日目に分化開始し、38 日目の細胞の Oil Red O 染色像)
 1:LCAT 遺伝子導入細胞、2:LCAT 遺伝子非導入細胞、白線は 100 μ m を示す。

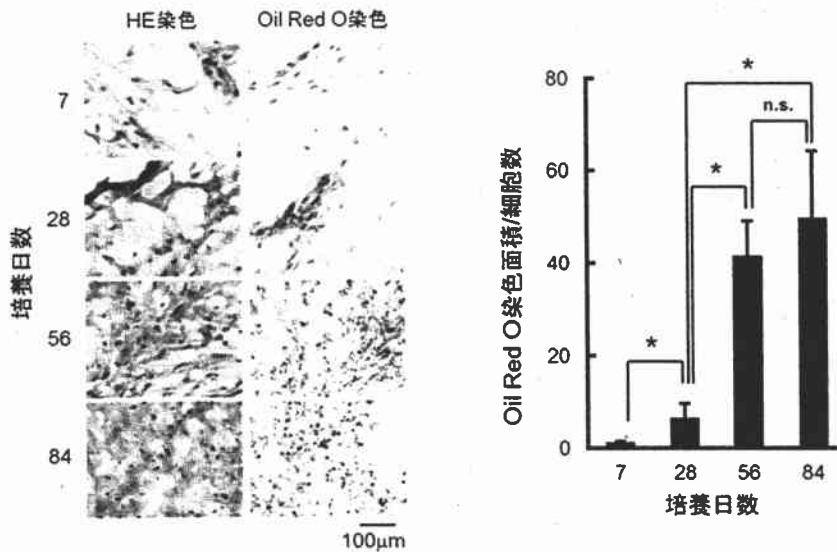


図 17. 3次元培養下での LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自発的脂肪分化
 左:細胞塊の切片の HE 染色および Oil Red O 染色像、右:観察視野内の Oil Red O 染色面積を観察視野内の細胞数で割ったものをグラフ化した。

(6) hLCAT 遺伝子導入コピー数と導入遺伝子の安定性

[要約] hLCAT 遺伝子導入 8 日後の導入遺伝子コピー数は 1 細胞あたり 1~2 コピーであり、移植予定日 (遺伝子導入 14 日後、脂肪組織摘出 21 日後) を 3 週間程度経過しても安定に推移することが確認された⁴⁷⁾ (図 18)。

また、hLCAT 遺伝子導入 19 日後 (脂肪採取 34 日後) の抽出したゲノム DNA 中の導入 hLCAT 遺伝子塩基配列に変化は見られなかった。

(実験方法)

健康成人より提供された腹部皮下脂肪からヒト前脂肪細胞を分取し、T25 フラスコにて培養を行った。腹部皮下脂肪採取 8 日後に、硫酸プロタミンを補助試薬としてレトロウイルスベクターを用いて hLCAT 遺伝子導入を行い、経時的に細胞を回収し、導入遺伝子コピー数を測定した。

導入遺伝子コピー数はリアルタイム PCR 法により、レトロウイルスベクター部

位のプライマーである RV-I-F 及び RV-I-R (タカラバイオ株式会社) を用いて測定した。また hLCAT 遺伝子導入 19 日後 (脂肪採取 34 日後) の抽出したゲノム DNA 中の導入 hLCAT 遺伝子塩基配列を解析した。

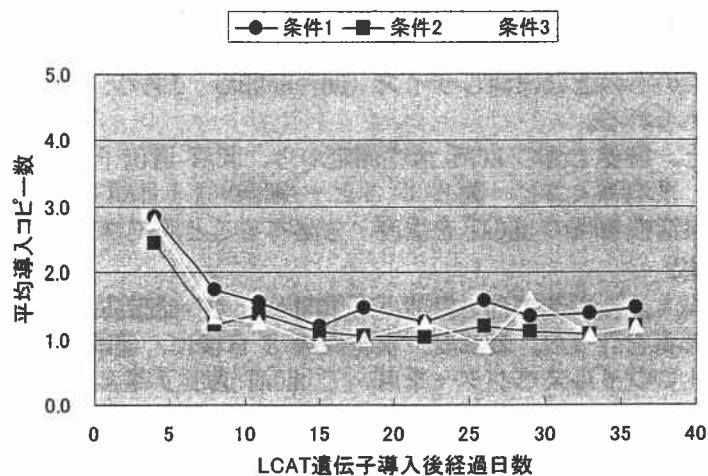


図 18. ヒト前脂肪細胞の LCAT 遺伝子導入効率と平均導入コピー数の推移
条件 1: 1.3×10^9 RNA copies/mL、条件 2: 2.0×10^9 RNA copies/mL、条件 3: 3.1×10^9 RNA copies/mL の濃度のウイルスベクターを 24 時間暴露した。

(7) hLCAT 遺伝子搭載レトロウイルスベクターのヒト前脂肪細胞への導入効率

[要約] 免疫染色法で hLCAT 発現陽性細胞の割合は、遺伝子導入 12 日目でおおよそ 30% であった (図 19)。

(実験方法)

健康成人より提供された腹部皮下脂肪からヒト前脂肪細胞を分取し、T25 フラスコにて培養を行った。腹部皮下脂肪採取 8 日後に、硫酸プロタミンを補助試薬としてレトロウイルスベクターを用いて hLCAT 遺伝子導入を行い、その 12 日後 (脂肪採取 20 日後) に細胞を固定し、抗ヒト LCAT ウサギ抗体にて免疫染色を行った。



図 19. hLCAT 陽性細胞の免疫染色像
赤色蛍光が LCAT のシグナル、青色蛍光が細胞核の染色シグナル (DAPI 染色) である。

(8) hLCAT の発現性及び発現した LCAT の活性

[要約] ウェスタンブロットの結果 (図 20) から、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の培養上清中に hLCAT が発現していることが確認された。サイズはヒト HDL 由来のものと同様サイズ (60~65kDa) であり、糖鎖修飾された hLCAT と考えられる。

また、培養上清の LCAT 活性測定から、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞 (10^5 個、平均導入コピー数 0.37 コピー/細胞) は 3 日間で、1.31 nmol E-Cho/h の酵素活性相当の hLCAT を生産・分泌することができると考えられる。

(実験方法)

健康成人より提供された腹部皮下脂肪からヒト前脂肪細胞を分取し、T25 フラスコにて培養を行った。腹部皮下脂肪採取 8 日後に、硫酸プロタミンを補助試薬としてレトロウイルスベクターを用いて hLCAT 遺伝子導入を行い、その 12 日後 (脂肪採取 20 日後) から 3 日間 (脂肪採取 23 日まで)、培地交換を行わず培養した。培養液を回収し、hLCAT の発現確認用に、抗ヒト LCAT ウサギモノクローナル抗体で免疫沈降反応を行ったのち、抗ヒト LCAT ウサギポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを行った。また、トリチウム標識コレステロールのアシル化反応を原理とした合成基質法による LCAT 活性測定法により、培養液の LCAT 活性を測定した。

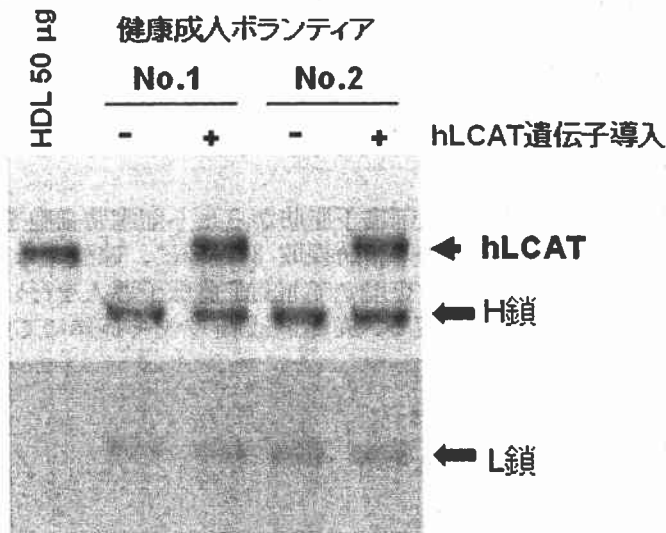


図 20. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の産生する hLCAT のウェスタンブロット

(9) アポ A1 蛋白分布変化による LCAT 活性の評価

[要約] LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が培養上清中に分泌する hLCAT 蛋白質の薬効を魚眼病 (FED) 患者血清を用いて評価した。LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が分泌する hLCAT 蛋白質は用量依存的に FED 患者血清中のアポ A1 蛋白含有粒子のサイズを高分子側にシフトする活性を有していることが分かった (図 21)。この検討結果から、FED 患者血清の状態が、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が培養上清中に分泌する hLCAT 蛋白質の作用により、健康人の血清状態により近づくことが確認された。この分布変化は血清中コレステロールのエステル化活性と相関していた。すなわち、分泌された hLCAT 蛋白質は患者血

清中で所望する薬効を発揮することが示された⁵⁾。

同じ培養上清検体を用い、コレステロールのエステル化活性を測定した。PA/LCAT 濃縮培養上清中の hLCAT は市販の遺伝子組換え型ヒト LCAT (rLCAT) の 2~3 倍のエステル化活性を示した。すなわち市販の rLCAT と同等以上の活性を示すことが明らかになった (図 22)。

(実験方法)

健康成人より提供された腹部皮下脂肪からヒト前脂肪細胞を分取し、腹部皮下脂肪採取 8 日後に、硫酸プロタミンを補助試薬としてレトロウイルスベクターを用いて hLCAT 遺伝子導入を行った。OPTI-MEM 培地 (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) に培地を交換後、7 日間培養し、培養上清を回収した。限外ろ過法により LCAT 蛋白質を濃縮し、FED 患者血清と 37°C で 24 時間インキュベートした。サンプルを未変性ポリアクリルアミドゲルで分離後、抗アポ A1 ヤギポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットを行なった。濃縮培養上清中の LCAT 蛋白質濃度は rLCAT (市販品) とウエスタンブロット上で比較することにより定量した。また同様のウエスタンブロットを健康人ボランティア血清についても実施した。トリチウム標識コレステロールのアシル化反応を原理とした合成基質法による LCAT 活性測定法により、濃縮培養上清の LCAT 活性を測定した。

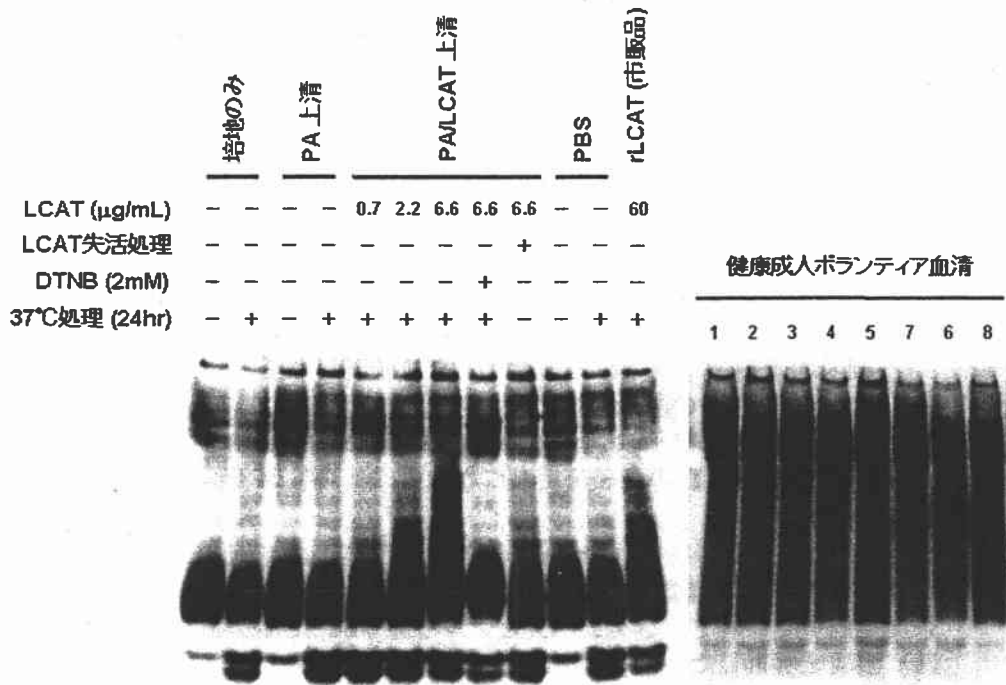


図 21. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が分泌する hLCAT 蛋白質の活性評価 1 (写真左側) PA: LCAT 遺伝子非導入ヒト前脂肪細胞、PA/LCAT: LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞、rLCAT: 組換え型 LCAT、DTNB: 5, 5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)、(写真右側) 健康成人ボランティア 8 人から採取した血清における ApoA1 のウエスタンブロット結果である。

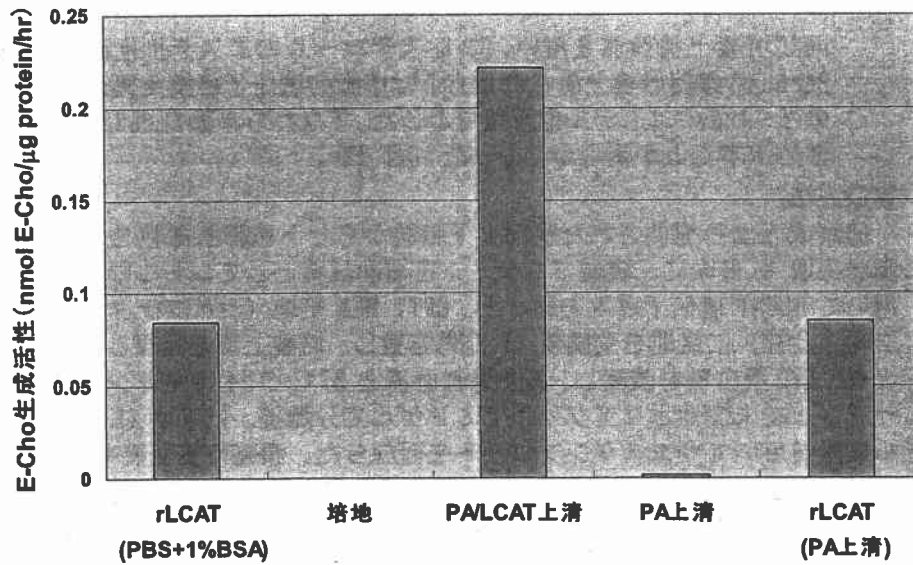


図 22. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が分泌する hLCAT 蛋白質の活性評価 2
 PA: LCAT 遺伝子非導入ヒト前脂肪細胞、PA/LCAT: LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞、
 rLCAT: 遺伝子組換え型ヒト LCAT、BSA: ウシ血清アルブミン (安定化剤として使用)

(10) 家族性 LCAT 欠損症における腎機能障害関連異常リポ蛋白の解析

[要約] 家族性 LCAT 欠損症の予後を規定する合併症として腎機能障害が知られている。腎機能障害は LCAT 活性の著しい低下により生じる異常リポタンパクが原因であるとされている。本遺伝子治療の一つの目的は患者の腎不全への進展を阻止することであることから、腎機能障害と連動する異常リポタンパクの同定は臨床研究の臨床評価に不可欠である。国内外の症例についてリポタンパク異常の解析を進め、同じ変異を持ちながら腎不全を発症した症例と未発症の症例 (図 23)、また、脂肪制限食による食事療法により腎機能の改善が見られた症例 (図 24) を経験し、その血清リポ蛋白のゲルろ過分画解析を元に、ゲル濾過で粒子サイズが大きく、健常人において VLDL (フラクション番号 4-5)、LDL 粒子 (フラクション番号 8-9) が分離される分画に腎機能と連動するリポ蛋白の存在を見出した (図 23、図 24 矢印)。

(実験方法)

C313Y の同じ変異を持ちながら、腎不全を発症した症例と未発症の症例 (オランダ姉妹症例)、脂肪制限食による食事療法により腎機能の改善が見られた症例 (神奈川症例) についてリポタンパクをゲルろ過分画し、各分画の脂質 (TC、FC、TG、PL) 濃度を解析した。

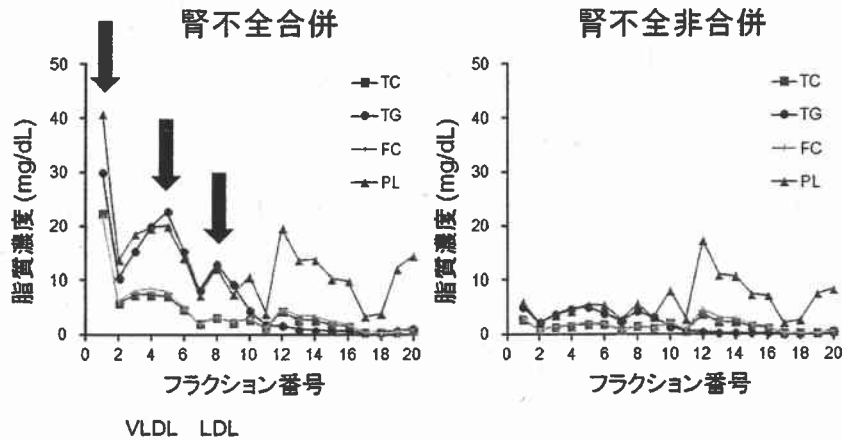


図 23 C313Y 変異を有する姉妹症例のリポタンパク解析
 TC：総コレステロール、TG：トリグリセリド、FC：遊離コレステロール、PL：リン脂質

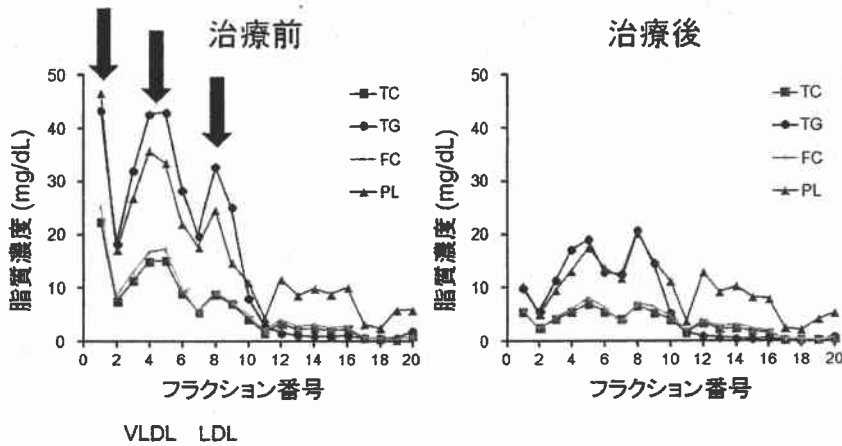


図 24. C74Y 変異を有する症例の脂肪制限による食事療法前後のリポタンパク解析
 TC：総コレステロール、TG：トリグリセリド、FC：遊離コレステロール、PL：リン脂質

(1 1) 家族性 LCAT 欠損症患者血清における LCAT 機能の評価

[要約] FED 患者血清に加えて、本臨床研究の対象とする病態である家族性 LCAT 欠損症 (FLD) 患者について HDL の機能を改善するかどうかを検討したところ、FLD 患者血清においても LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が分泌する hLCAT 蛋白質はアポ A1 蛋白含有粒子のサイズを高分子側にシフトする活性を有していることが分かった (図 25.)。脂質組成解析の結果、LCAT の添加により HDL の生成に機能していることがわかった (図 26)。同様の手法により LDL 分画を解析した結果、FLD 血清中では LCAT 添加により脂質組成が変化し、コレステロールエステルの増加とリン脂質の低下が認められた (図 27)。すなわち LDL 分画の組成に異常を認める FLD 患者血清において脂質組成の改善を認めた。また、腎機能障害に関連して濃度が上昇する VLDL 関連粒子の濃度が LCAT 添加により減少することがわかった (図 28)。

(実験方法)

患者血清 (FLD 4 人、FED 4 人) に LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が分泌する hLCAT 蛋白質を添加し、37℃で 24 時間インキュベートした。サンプルを 2 次元電気泳動後、抗アポ A1 ヤギポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットを行なった。rLCAT を含む培養上清を反応させた血清と、コントロールの培養上清を反応させた血清についてゲルろ過によるリポ蛋白のサイズ分画 (20 分画) を行い、それぞれの分画について脂質濃度を定量した。その定量結果を元に、脂質組成を算出した。

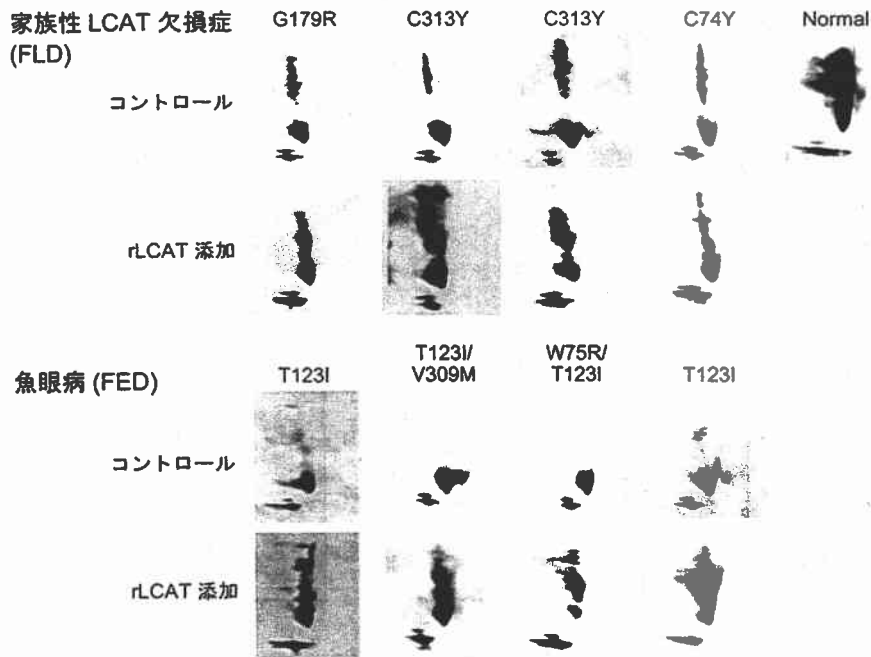


図 25. 家族性 LCAT 欠損症、魚眼病患者血清への rLCAT 添加による HDL の成熟 LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞培養上清 (rLCAT 添加) と前脂肪細胞培養上清 (コントロール) を患者血清に添加し、反応後血清を 2 次元電気泳動後、ApoA1 に対するウエスタンブロットを行った。

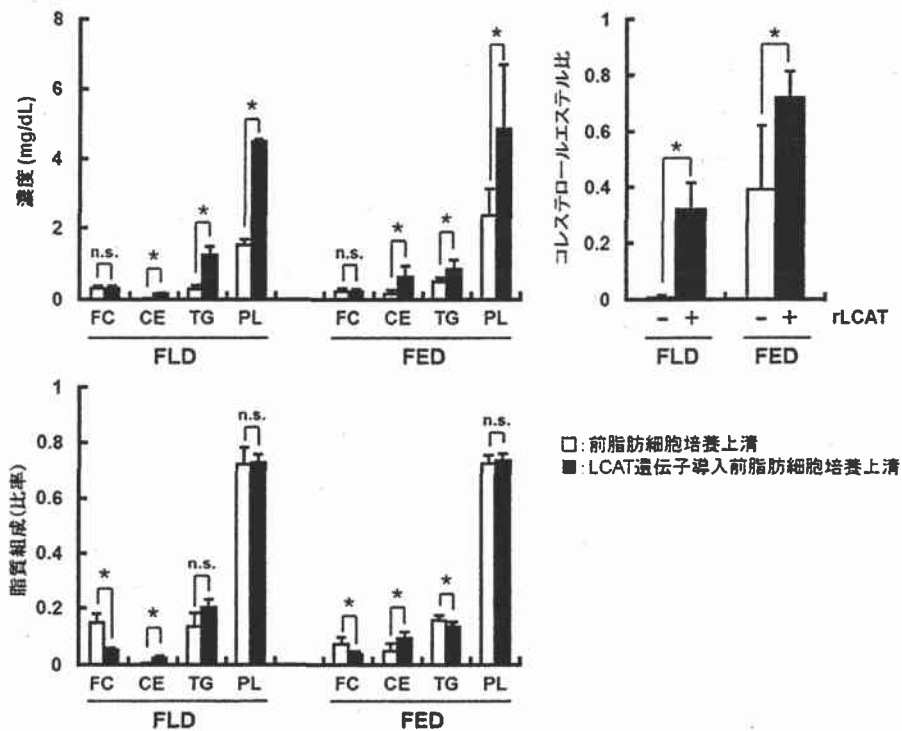


図 26. HDL 分画に対する効果

図 25 の反応後血清をゲルろ過により 20 分画し、健常人で HDL の認められる分画について TC (総コレステロール)、TG (トリグリセリド)、FC (遊離コレステロール)、PL (リン脂質) の濃度を定量し、組成を解析した。CE (コレステロールエステル) は TC 値から FC 値を引いて求めた。

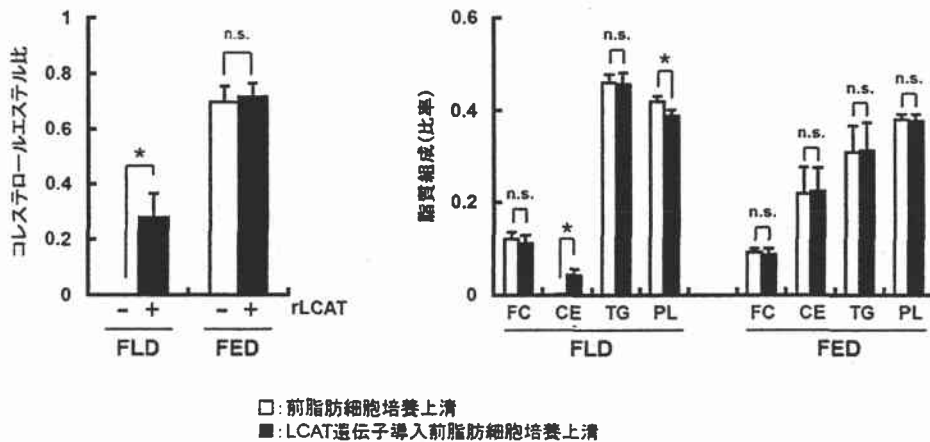
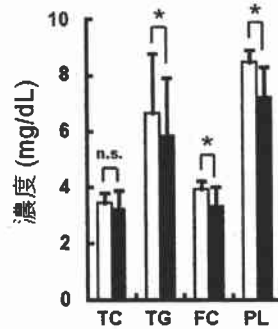


図 27. 異常 LDL 分画に対する効果

図 25 の反応後血清をゲルろ過により 20 分画し、LCAT 欠損症血清の異常 LDL 分画について TC (総コレステロール)、TG (トリグリセリド)、FC (遊離コレステロール)、PL (リン脂質) の濃度を定量し、組成を解析した。CE (コレステロールエステル) は TC 値から FC 値を引いて求めた。腎機能障害を合併しない FED の LDL 分画には LCAT 添加の効果は認められなかった。



□: 前脂肪細胞培養上清
■: LCAT遺伝子導入前脂肪細胞培養上清

図 28 異常 VLDL 分画に対する効果

図 25 の反応後血清をゲルろ過により 20 分画し、LCAT 欠損症血清の異常 VLDL 分画について TC (総コレステロール)、TG (トリグリセリド)、FC (遊離コレステロール)、PL (リン脂質) の濃度を定量し LCAT 添加の効果を検討した。

(1 2) 長期培養による形質変化の有無 (軟寒天培地でのコロニー形成能の検討)

[要約] 陽性対照とした HeLa 細胞は、100 個/well になるように播種した場合、平均約 30 個のコロニーが検出されたが、ヒト前脂肪細胞の場合、hLCAT 遺伝子導入、非導入のいずれのヒト前脂肪細胞も、移植実施予定日までコロニー形成能を獲得することはなかった。*in vitro* での形質変化の有無を確認するため、長期培養を実施すると 130~150 日で増殖を停止することが分かった。すなわち長期培養を実施しても不死化、がん化などの形質変化は認められなかった。

(実験方法)

健康成人 4 例より提供された腹部皮下脂肪からヒト前脂肪細胞を分取し、LCAT 遺伝子を導入した後、T25 フラスコにて培養を行った。その後、継代培養を実施し、移植予定日の細胞について 96 well plate に 1 well あたり 10,000 個の細胞を軟寒天培地に播種し、コロニー形成能の有無を確認した。また、遺伝子非導入ヒト前脂肪細胞についても同様にコロニー形成能試験を実施した。陽性対照には HeLa 細胞を 100 個/well となるように播種したものをを用いた。長期培養後の形質変化の有無を確認する目的で約 6 ヶ月 (168 日) まで培養を試みた。

(1 3) 遺伝子導入細胞における染色体異常の有無

[要約] 天井培養終了後の初期段階での細胞と、移植予定日を経過した細胞 (脂肪組織摘出約 40 日後) には、細胞の *in vitro* での培養と加工に伴う染色体異常は認められなかった (図 29)。

(実験方法)

健康成人 3 例より提供された腹部皮下脂肪からヒト前脂肪細胞を分取し、LCAT 遺伝子導入操作を実施した細胞と未処理の細胞を準備した。細胞移植予定日から約 20 日を経過した (脂肪組織摘出約 40 日後) 細胞について、遺伝子導入操作による染色体異常出現の有無を検討した。また天井培養終了後早期の非導入細胞とも比較し、*in vitro* での継代培養による影響があるかどうかを検討した。検査は

G-band 法に基づいて実施した。

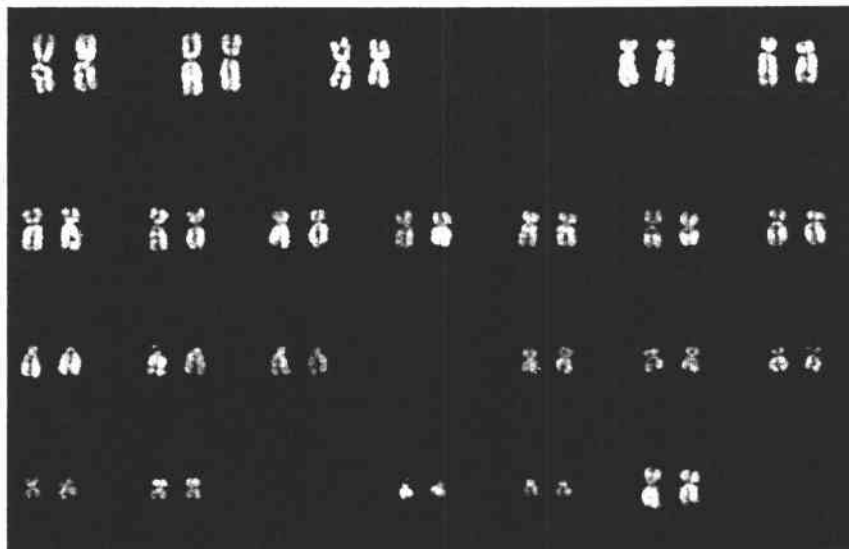


図 29. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の染色体検査結果

(1 4) hLCAT 遺伝子導入による前脂肪細胞の特性変化

[要約] 上記(1)～(3)及び(11)～(12)の各検討項目に関して、hLCAT 遺伝子非導入ヒト前脂肪細胞についても検討を行ったが、いずれの検討項目でも遺伝子導入による細胞の特性変化は観察されなかった。

2. 実験動物を用いた研究の成果

hLCAT 遺伝子導入前脂肪細胞の実験動物を用いた評価として、以下の項目を実施した。

1. hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の *in vivo*における hLCAT の発現性
2. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の NOG マウス皮下移植における生着性と生体への影響
3. hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の皮下移植によるがん化
4. hLCAT 遺伝子導入サル前脂肪細胞の自家移植による生体への影響
5. hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の脂肪組織内他家移植における生着性と生体への影響
6. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の NOG マウス脂肪移植における生着性と生体への影響、および hLCAT 蛋白質の分泌
7. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の Nude マウス皮下移植によるがん化
8. hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の B6 マウス皮下移植による足場の評価
9. hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の Nude マウス皮下移植による血中への hLCAT の分泌
10. hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の LCAT 欠損マウス皮下移植により分泌された hLCAT の機能評価
11. 移植細胞から供給された hLCAT の LCAT 欠損マウスにおける薬効評価
12. hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の LCAT 欠損マウス皮下移植による血中への hLCAT の持続補充と安全性の評価

(1) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の *in vivo*における hLCAT の発現性

[要約] マウス前脂肪細胞をヒトと同様な方法で皮下脂肪より調製し、hLCAT 遺伝子を導入後、同系マウス皮下に移植した。また移植した細胞の導入コピー数は 3.41 コピー/細胞であった。移植後 28 日目の剖検で、hLCAT の発現が免疫染色で確認された (図 30)。以上のことより、hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞は *in vivo*においても hLCAT を発現していることが確認できた。

(実験方法)

C57BL/6J マウスより皮下脂肪を採取し、ヒト前脂肪細胞の調製法と同様な方法で、マウス前脂肪細胞を調製した。皮下脂肪採取 13、14 日目に硫酸プロタミンを補助試薬として hLCAT 遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、その後拡大培養を行った。移植の 1 継代前に PKH26 蛍光試薬による細胞の蛍光標識を施した。皮下脂肪採取 22 日後にマウス血清含有 DMEM/F12-HAM 培地 (細胞懸濁用溶媒) に細胞を分散させ、C57BL/6J マウス (9 例) の皮下に約 5×10^6 個/マウスにてフィブリンゲルとともに他家移植し、対照群 (3 例) にフィブリンゲルのみを投与した。移植 28 日後に剖検を実施し、実体蛍光顕微鏡下 PKH26 蛍光に基づいて移植細胞塊と考えられる部位を切り取り、凍結保存した。後日移植細胞塊について連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色と抗ヒト LCAT ウサギ抗体による免疫染色を実施した。

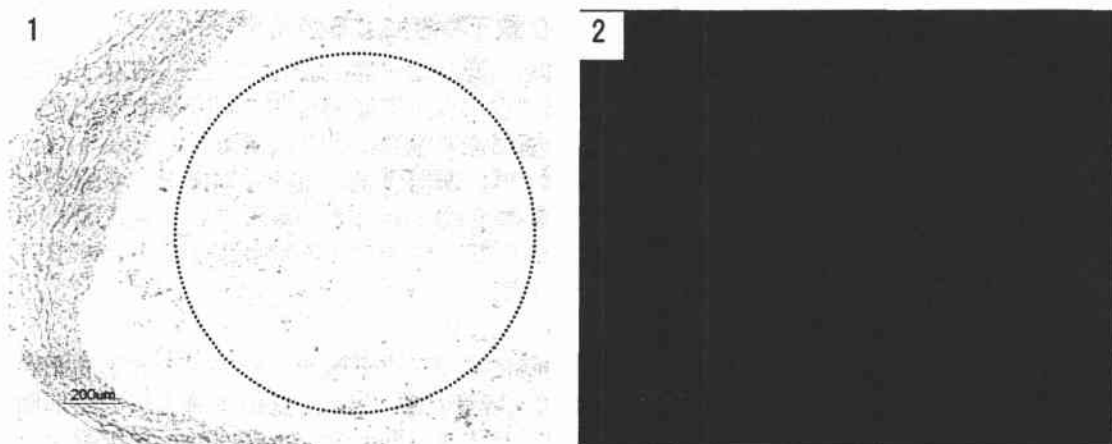


図 30. hLCAT 導入マウス前脂肪細胞のマウス皮下移植 28 日後の移植部位免疫染色像
 1: HE 染色 (紫部分が核)、2: hLCAT 免疫染色 (緑色蛍光 (Alexa Fluor 488) は hLCAT 陽性部分を示す)、赤の破線部分は移植部位を示す。

(2) LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の NOG マウス皮下移植における生着性と生体への影響

【要約】 LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を免疫不全 (NOG) マウスの皮下組織内に移植し、移植 28 日後に観察したところ、移植部位と考えられる皮下組織内に蛍光を確認した。観察は、PKH26 による細胞表面蛍光標識法により実施した。また、他の臓器には PKH26 由来と考えられる蛍光は検出されなかった (図 31)。

(実験方法)

健康成人より提供された腹部皮下脂肪から前脂肪細胞を分取し、T25 フラスコにて培養を行った。腹部皮下脂肪採取 8 日後に、硫酸プロタミンを補助試薬としてレトロウイルスベクターを用いて hLCAT 遺伝子導入を行い、脂肪採取 27 日後にリンゲル液またはマトリゲル (Becton Dickinson 社) に細胞を分散させ、 5×10^6 個/マウスにて NOG マウス皮下に移植した。LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞は PKH26 試薬を用いて細胞膜表面を投与の 1 継代前に蛍光標識し、*in vivo* で実体蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。



図 31. LCAT 導入ヒト前脂肪細胞の NOG マウス皮下移植 28 日後における移植部位の蛍光顕微鏡像

(3) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の皮下移植によるがん化

[要約] hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞 (低コピー群: 0.97 コピー/細胞、高コピー群: 7.90 コピー/細胞) を同系マウス皮下に移植した。細胞移植されたマウスの一般状態、体重、摂餌量、移植部位の触診に異常は確認されなかった。移植後約 7 ヶ月及び 1 年後の剖検では、臓器重量、血液学的検査、各臓器、組織の肉眼所見について、異常は認められなかった。導入コピー数に関わらずがん化は認められず、遺伝子導入していないマウス前脂肪細胞投与マウスにおいてもがん化は認められなかった。

(実験方法)

本実験動物を用いた研究成果 1. と同時にマウス皮下脂肪よりマウス前脂肪細胞を調製し、hLCAT 遺伝子を導入した。拡大培養の後、hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞は皮下脂肪採取 34~39 日後にマトリゲル (Becton Dickinson) に細胞を分散させ、約 5×10^5 個/マウスにて同系マウス皮下に移植した。移植後剖検時まで、一般状態は毎日観察し、体重および摂餌量は 1~2 週に 1 度測定した。また、週に 1 度、移植部位付近を触診にて腫瘍の有無を確認した。それぞれの群は 2 つのタイミング (移植後約 7 ヶ月及び 1 年) で剖検することとした。剖検時は全例に関して、各臓器の重量、血液学的検査、各臓器、組織の肉眼所見および病理組織学的検査を行った。

(4) hLCAT 遺伝子導入サル前脂肪細胞の自家移植による生体への影響

[要約] hLCAT 遺伝子導入サル前脂肪細胞の hLCAT 遺伝子の導入コピー数は 0~5 コピー程度であった。hLCAT 遺伝子の検出できた細胞を自家移植した個体 (4 個体) の内、移植 2 週間後の個体 (3 個体) において、 $12.8 \pm 5.0\%$ の hLCAT 遺伝子の残存が確認された。2 ヶ月後に剖検した個体 (1 個体) では hLCAT 遺伝子は検出限界以下であった。移植全例において、一般状態、体重、摂餌量に異常は見られなかった。また、行動観察、心電図、呼吸数といった薬理的異常所見も観察されなかった。剖検後の各臓器重量、血液学的変化、各臓器、組織の肉眼所見においても、異常は観察されなかった。

本検討より、hLCAT 遺伝子を導入したサル前脂肪細胞の自家移植サルでは、移植後 2 ヶ月において安全性の観点から異常は認められなかった。

(実験方法)

カニクイザルから皮下脂肪を採取し、ヒト前脂肪細胞の調製法と同様の方法で、サル前脂肪細胞を調製した。皮下脂肪採取 14~18 日目に硫酸プロタミンを補助試薬として hLCAT 遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、その後拡大培養を行った。hLCAT 遺伝子は、マウスでの検討時の高コピー群と同様の MOI にて導入した。hLCAT 遺伝子導入サル前脂肪細胞は皮下脂肪採取 5 ヶ月後に、生理食塩液に細胞を分散させ、 $1.1 \times 10^6 \sim 1.4 \times 10^7$ 個/サルにて皮下脂肪内に自家移植した。サルは移植された細胞数がおおよそ均等になるよう 2 群にわけ、剖検を移植 2 週及び 2 ヶ月のタイミングで行った。移植後剖検時まで、一般状態は毎日観察し、体重および摂餌量は 1~2 週に 1 度測定した。また、全例剖検前に行動観察、心電図、呼吸数を測定し、安全性薬理学的変化の有無を確認した。剖検時は全例に関して、各臓器の重量、血液学的検査、各臓器、組織の肉眼所見および病理組織学的検査を行った。

(5) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の脂肪組織内他家移植における生着性と生体に対する影響

[要約] LCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を腰部脂肪組織内に移植し、移植後 1 日、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、7 ヶ月後に移植細胞の生着性と試験期間内の投与動物の健康状態を観察した。PKH26 蛍光組織染色観察より移植細胞は移植部位内に残存していることが確認された。LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の投与群では観察期間を通して一般状態、体重推移、生化学検査値に異常は認められなかった。

(実験方法)

C57BL/6J マウスより皮下脂肪を採取し、ヒト前脂肪細胞の調製法と同様の方法で、マウス前脂肪細胞を調製した。皮下脂肪採取 9 日目に硫酸プロタミンを補助試薬として hLCAT 遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、その後拡大培養を行った。移植の 1 継代前に PKH26 蛍光試薬による細胞の蛍光標識を施した。皮下脂肪採取 29 日後にマウス血清アルブミン含有リンゲル液（細胞懸濁用溶媒）に細胞を分散させ、同系マウス（36 例）の腰部脂肪組織内へ約 1.5×10^6 個/マウスにて他家移植し、対照群（18 例）に溶媒を投与した。移植後 1、14 日、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、7 ヶ月後に PKH26 蛍光観察による残存観察と試験期間中の動物状態を観察した。また動物血液検体について一般生化学検査（AST、ALT、ALP、T-Cho、TG、TP、UN、Glu、IP、Ca）を実施した。

(6) LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の NOG マウス脂肪移植における生着性と生体への影響、および hLCAT 蛋白質の分泌

[要約] LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を免疫不全（NOG）マウスの肩甲骨間脂肪組織内に移植し、移植後 1 日、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、8 ヶ月後に移植細胞の生着性と試験期間内の動物の一般状態を観察した。PKH26 蛍光組織染色観察より移植細胞は移植部位内に残存していることが確認され（図 32）、当該組織への傷害は認められなかった。LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の投与群では一般状態、体重変化に観察期間中、異常は認められなかった。また、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が少なくとも 1 ヶ月（29 日）まで NOG マウスで分泌する能力を有することが確認された⁴⁷⁾（図 33）。

(実験方法)

健康成人 2 例から提供された腹部皮下脂肪から前脂肪細胞を分取し、脂肪採取 8 日後に、硫酸プロタミンを補助試薬としてレトロウイルスベクターを用いて hLCAT 遺伝子導入を行った。拡大培養の後、移植の 1 継代前に PKH26 蛍光試薬による細胞の蛍光標識を施した。脂肪採取 21 日後にヒト血清アルブミン含有リンゲル液に細胞を懸濁した。 1.5×10^6 個/マウスにて NOG マウス（30 匹）の肩甲骨間脂肪組織内に移植し、対照群（15 匹）には溶媒を投与した。移植後 1 日、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、8 ヶ月後に細胞投与群 6 匹、対照群 3 匹について、PKH26 蛍光観察により移植細胞の残存を確認すると共に、試験期間中の動物の一般状態を記録した。投与翌日および 1 ヶ月（29 日）後の血清検体について抗ヒト LCAT ウサギモノクローナル抗体で免疫沈降反応を行ったのち、抗ヒト LCAT ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

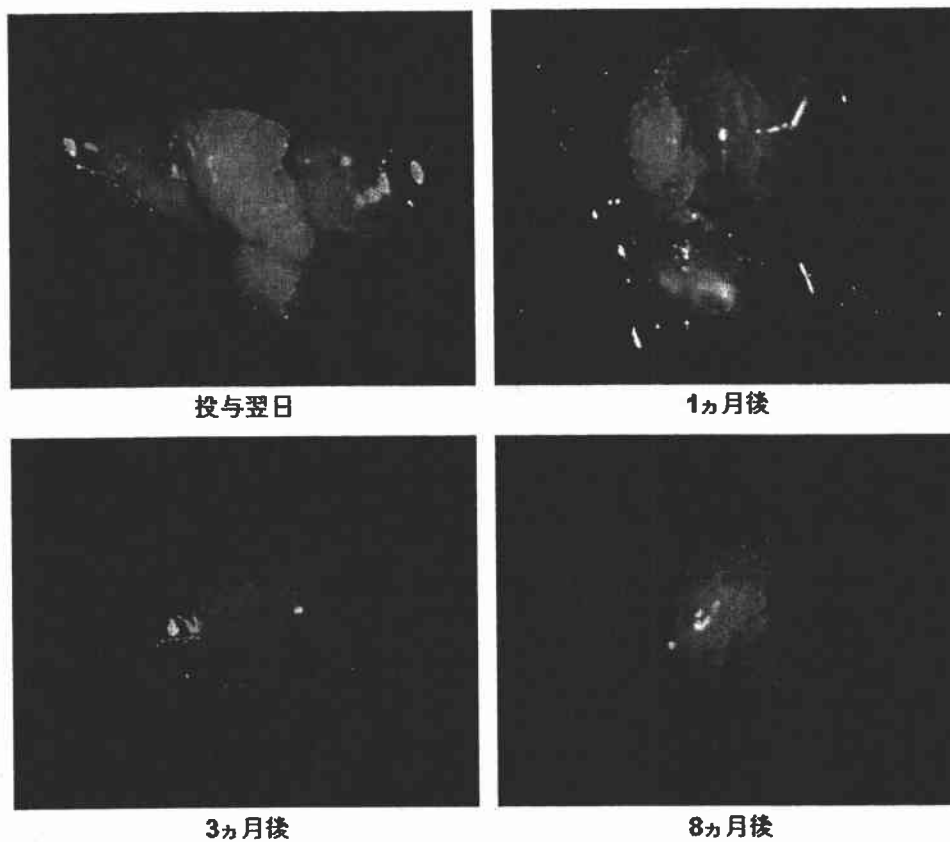


図 32. LCAT 導入ヒト前脂肪細胞の NOG マウス脂肪内移植剖検組織写真 (PKH26 蛍光画像と可視光画像の合成)

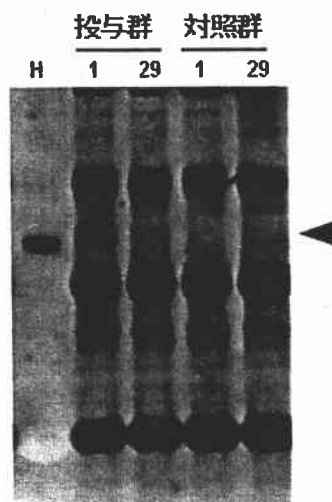


図 33. LCAT 導入ヒト前脂肪細胞を脂肪内移植した NOG マウスにおける hLCAT 蛋白質の分泌

H: HDL 15 μ g, 1, 29: 移植後 1, 29 日後の血清検体について実施した。血清検体は 100 μ L を用い免疫沈降を実施したもの。

(7) LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の Nude マウス皮下移植によるがん化

[要約] LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を Nude マウス皮下に移植した。細胞移植されたマウスの一般状態、体重、摂餌量、移植部位の触診に異常は確認されなかった。移植後約 3 ヶ月の剖検では、臓器重量、各臓器、組織の肉眼所見について、異常は認められなかった。陽性対照である HeLaS3 細胞投与群ではがん化を認めた。

(実験方法)

健康成人より提供された腹部皮下脂肪から前脂肪細胞を分取し、脂肪採取 8 日後に、硫酸プロタミンを補助試薬としてレトロウイルスベクターを用いて hLCAT 遺伝子導入を行った。拡大培養の後、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞をヒト血清アルブミン含有リング液に懸濁し、 1×10^7 個/マウスにて Nude マウス皮下に移植した。LCAT 遺伝子のヒト前脂肪細胞における平均導入コピー数は 1.02 コピー/細胞であった。がん化の陽性対照として HeLaS3 細胞を使用した。移植後剖検時まで、体重、一般状態を週に 1 度観察し、週に 1 度、移植部位付近を触診にて腫瘍の有無を確認した。移植 3 ヶ月後に剖検を実施し、全例に関して、各臓器の重量、各臓器、組織の肉眼所見を行った。

(8) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の B6 マウス皮下移植による足場の評価

[要約] hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を用い、マウス実験で生着促進効果の知られているマトリゲルと臨床への適応を目指した足場素材フィブリンゲルとの比較を実施した。評価は hLCAT の血中への分泌能により実施した。経時的に採取したマウス血清について hLCAT 蛋白質の分泌を確認した。移植した細胞は移植 28 日後まで、hLCAT 蛋白質を血中に分泌することを確認した (図 34)。この結果から hLCAT 分泌に対してフィブリンゲルがマウス体内でマトリゲルとほぼ同等の効果を発揮することが確認された⁴⁸⁾。同時に移植した細胞の残存率をリアルタイム PCR 法により測定し、28 日後には投与翌日の 30 %程度が残存していることが分かった。

(実験方法)

C57BL/6J マウスより皮下脂肪を採取し、ヒト前脂肪細胞の調製法と同様の方法で、マウス前脂肪細胞を調製した。皮下脂肪採取 12、13 日目に硫酸プロタミンを補助試薬として hLCAT 遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、その後拡大培養を行った。移植の 1 継代前に PKH26 蛍光試薬による細胞の蛍光標識を施した。皮下脂肪採取 23 日後にマウス血清含有 DMEM/F12-HAM 培地 (細胞懸濁用溶媒) に細胞を分散させ、同系マウス (12 例) の皮下へ 5.0×10^6 個/マウスにてフィブリンゲルとして他家移植し、対照群 (3 例) にフィブリンゲルのみを投与した。移植 1、7、14、21、28 日後にマウス血清を採取した。血清検体について抗ヒト LCAT ウサギモノクローナル抗体で免疫沈降反応を行ったのち、抗ヒト LCAT ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットを行った。移植細胞の残存率検討のため、移植 1、14、28 日後に剖検を実施し、実体蛍光顕微鏡下 PKH26 蛍光に基づいて投与細胞を回収した。残存率は定法に従って組織 DNA を抽出し、hLCAT 遺伝子の残存をリアルタイム PCR 法により検討した。

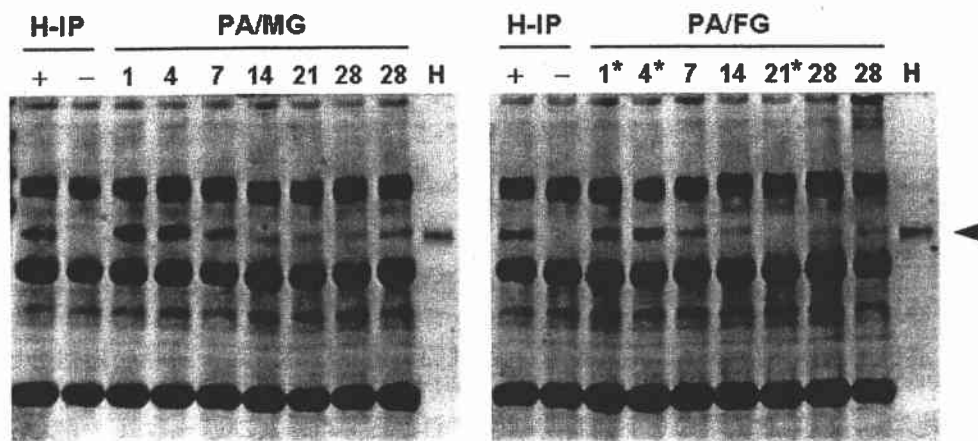


図 34. hLCAT 導入マウス前脂肪細胞の B6 マウス皮下移植による血中への hLCAT 蛋白質の分泌 (マトリゲルとフィブリンゲルの比較)

PA: hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞, MG:マトリゲル, FG:フィブリンゲル, H: HDL 15 μ g, H-IP: HDL 15 μ g をマウス血清 30 μ L に添加したもの (+)、添加していないもの (-) について実際の検体と同様の免疫沈降操作を実施したもの。

1, 4, 7, 14, 21, 28: 移植後 1, 4, 7, 14, 21 及び 28 日後の血清検体について実施した。血清検体は 30 μ L を標準量として用いた。28 (赤色) は免疫沈降用の血清として 100 μ L を使用したもの、*を付した検体は 30 μ L に満たなかった検体を示している (1*: 27 μ L, 4*: 29 μ L, 21*: 12 μ L)。

(9) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の Nude マウス皮下移植による血中への hLCAT の分泌

[要約] hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞をフィブリンゲルとして Nude マウス皮下に移植した。経時的に採取したマウス血漿について hLCAT 蛋白質の分泌を確認した。移植した細胞は移植 28 日後まで、hLCAT 蛋白質を血中に分泌することを確認した (図 35)。

(実験方法)

C57BL/6J マウスより皮下脂肪を採取し、ヒト前脂肪細胞の調製法と同様の方法で、マウス前脂肪細胞を調製した。皮下脂肪採取 12、13 日目に硫酸プロタミンを補助試薬として hLCAT 遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、その後拡大培養を行った。移植の 1 継代前に PKH26 蛍光試薬による細胞の蛍光標識を施した。皮下脂肪採取 22 日後に細胞を 2 群に分け、1 群は通常の培地、もう 1 群は脂肪細胞への分化誘導用培地に置換した。皮下脂肪採取 25 日後にマウス血清含有 DMEM/F12-HAM 培地 (細胞懸濁用溶媒) に細胞を分散させ、Nude マウス (10 例) の皮下へ 5.0×10^6 個/マウスにてフィブリンゲルとして他家移植し、対照群 (5 例) にフィブリンゲルのみを投与した。移植 1、7、14、21、28 日後にマウス全血から血清を採取した (各ポイントで 2 匹ずつ)。血清検体について抗ヒト LCAT ウサギモノクローナル抗体で免疫沈降反応を行ったのち、抗ヒト LCAT ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットを行った。移植細胞の残存率検討のため、移植 15、28 日後に剖検を実施し、実体蛍光顕微鏡下 PKH26 蛍光に基づいて投与細胞を回収した。残存率は定法に従って組織 DNA を抽出し、hLCAT 遺伝子の残存をリアルタイム PCR 法により検討した。

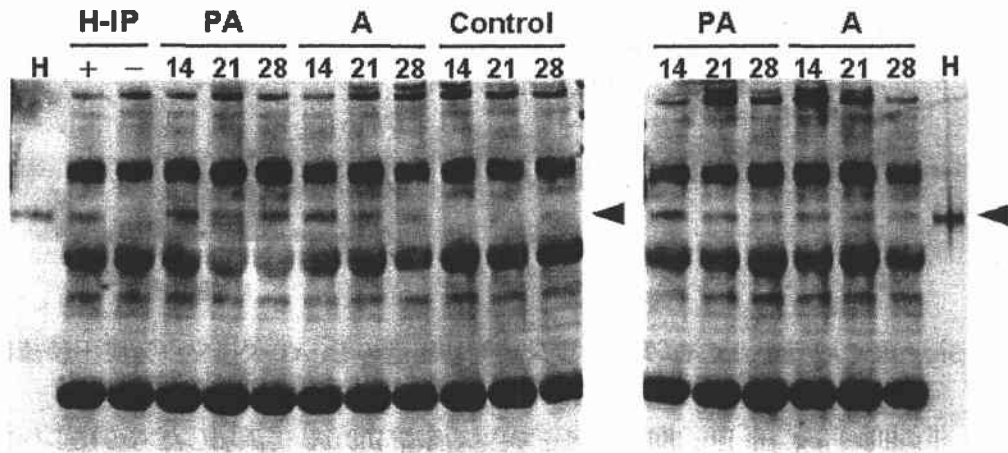


図 35. hLCAT 導入マウス前脂肪細胞の Nude マウス皮下移植による血中への hLCAT 蛋白質の分泌

H: HDL 15 μ g、H-IP: HDL 15 μ g をマウス血清 100 μ L に添加したもの (+)、添加していないもの (-) について実際の検体と同様の免疫沈降操作を実施したものの、PA: 分化誘導刺激をしていない細胞の投与群、A: 分化誘導刺激をした細胞の投与群、Control: フィブリンゲルのみでの投与群、移植 14、21、28 日後の血清検体の結果を示す。

(10) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の LCAT 欠損マウス皮下移植により分泌された hLCAT の機能評価

[要約] hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を免疫抑制剤投与下、マトリゲルを足場として LCAT 欠損マウス皮下に移植した。経時的に採取したマウス血清について hLCAT 蛋白質の分泌を確認した (図 36 左)。血清にコレステロールのエステル化活性が確認され、それはヒト ApoAI 添加により促進された (図 36 右)。

(実験方法)

B6 マウスより皮下脂肪を採取し、ヒト前脂肪細胞の調製法と同様の方法で、マウス前脂肪細胞を調製した。皮下脂肪採取 7、9、19 日目に hLCAT 遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、その後拡大培養を行った。移植の 1 継代前に PKH26 蛍光試薬による細胞の蛍光標識を施した。皮下脂肪採取 46~49 日後に LCAT 欠損マウス血清 (1%) 含有 DMEM/F12-HAM 培地 (細胞懸濁用溶媒) に細胞を分散させ、LCAT 欠損マウス (2 例) の皮下へ 1.0×10^7 個/マウスにてマトリゲルを足場として他家移植した (4 日連続投与)。レシピエントの LCAT 欠損マウスは移植 4 日前、移植前日に免疫抑制剤 (シクロフォスファミド) を 250mg/kg 用量で腹腔内投与した。移植個体について移植 5 日前 (-4)、移植 3、7、14 日後に血清を採取した。血清検体について抗ヒト LCAT ウサギモノクローナル抗体で免疫沈降反応を行ったのち、抗ヒト LCAT ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットを行った。同じ血清を用い、ヒト ApoAI の存在下と非存在下で LCAT 活性を測定した。

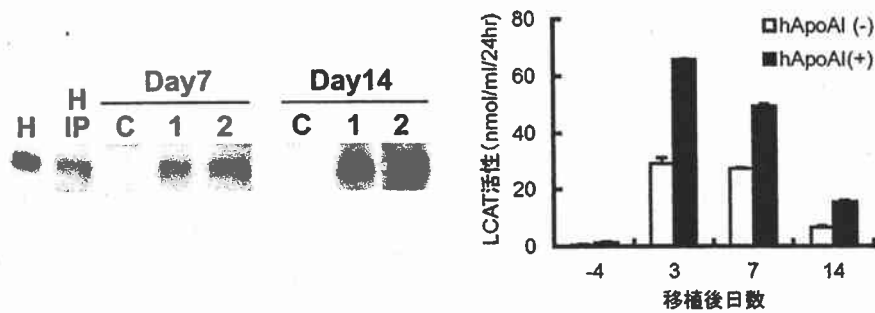


図 36. hLCAT 導入 LCAT 欠損マウス前脂肪細胞の LCAT 欠損マウス皮下移植による血中への hLCAT 蛋白質の分泌とエステル化活性の評価

H: HDL 1 μ g, H-IP: HDL 1 μ g をマウス血清 100 μ L に添加したものについて実際の検体と同様の免疫沈降操作を実施したもの、Day7: 血清検体 10 μ L、Day14: 血清検体 100 μ L を使用した。12 μ L の血清を用い反応容量 120 μ L で 3 H-コレステロールを含む合成基質に対する反応を行った。ヒト ApoAI 添加時は最終濃度 40 μ g/mL とした。

(11) 移植細胞から供給された hLCAT の LCAT 欠損マウスにおける薬効評価

[要約] hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を免疫抑制剤投与下、マトリゲルを足場として LCAT 欠損マウス皮下に移植した。移植したマウスの血清についてゲルろ過によるリポ蛋白解析を行ったところ、野生型マウスで HDL が検出される分画にコレステロールエステル (CE) 比の上昇を認めた (図 37 左)。また LDL 分画中のコレステロールエステルの上昇を認めた (図 37 右)。

(実験方法)

B6 マウスより皮下脂肪を採取し、ヒト前脂肪細胞の調製法と同様の方法で、マウス前脂肪細胞を調製した。皮下脂肪採取 7、9 日目に hLCAT 遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、その後拡大培養を行った。移植の 1 継代前に PKH26 蛍光試薬による細胞の蛍光標識を施した。LCAT 欠損マウス血清含有 DMEM/F12-HAM 培地 (細胞懸濁用溶媒) に細胞を分散させ、LCAT 欠損マウス (2 例) の皮下へ 2.0×10^7 個/マウスにてマトリゲルを足場として他家移植した (3 日連続投与)。対照群として hLCAT 遺伝子を導入していない細胞を移植した。レシピエントの LCAT 欠損マウスは移植 4 日前、移植前日、移植 14 日後に免疫抑制剤 (シクロフォスファミド) を 150mg/kg 用量で腹腔内投与した。移植個体について移植 4 日前 (-4)、移植 7、28 日後に血清を採取した。血清検体についてゲルろ過によるリポ蛋白の分画を行い、分画ごとに総コレステロール (TC)、中性脂肪 (TG)、遊離型コレステロール (FC)、リン脂質 (PL) の定量を行った。

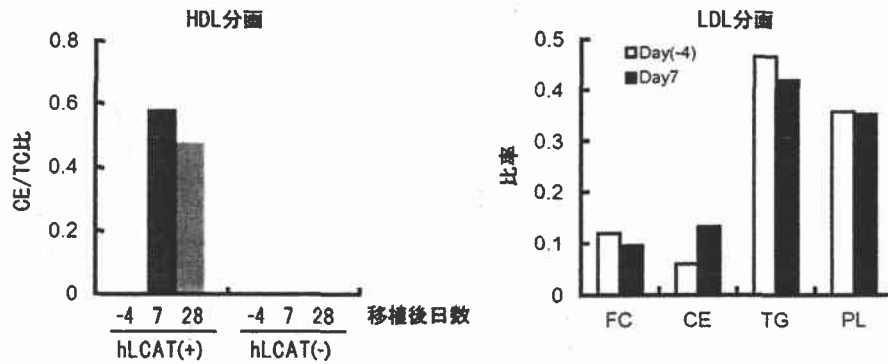


図 37. hLCAT 導入 LCAT 欠損マウス前脂肪細胞の LCAT 欠損マウス皮下移植によるリポタンパク異常の改善効果

血清検体の分画定量解析に基づき、HDL 分画のコレステロールエステル比をコントロール細胞の移植群、さらに移植前血清と比較した (左図)。同様に移植後の LDL 分画について脂質組成の変化を検討した (右図)。

(1 2) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の LCAT 欠損マウス皮下移植による血中への hLCAT の持続補充と安全性の評価

[要約] hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を免疫抑制剤投与下、マトリゲルを足場として LCAT 欠損マウス皮下に移植した。経時的に採取したマウス血清について hLCAT 蛋白質の分泌を確認した。移植した細胞は移植 56 日後まで、hLCAT 蛋白質を血中に分泌することを確認した (図 38)。移植部位において hLCAT の発現と脂肪細胞への分化が認められた (図 39)。細胞 (hLCAT 遺伝子) の残存率は、移植 1 日後の残存 hLCAT 遺伝子数を 100% とすると、移植 28、56 日後でそれぞれ、 $10.2 \pm 7.0\%$ 、 $14.3 \pm 10.2\%$ (平均値 \pm 標準偏差、各 3 例) であった (図 42)。移植 56 日後まで、hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞移植群と遺伝子非導入マウス前脂肪細胞移植群において移植部位の剖検 (図 40)、組織学的評価 (図 41)、血清生化学検査 (表 7) を実施したところ異常を認めなかった。

(実験方法)

自家移植のモデルとして、LCAT 欠損マウスより皮下脂肪を採取し、ヒト前脂肪細胞の調製法と同様の方法で、マウス前脂肪細胞を調製した。皮下脂肪採取 11、13、21 日目に hLCAT 遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、その後拡大培養を行った。移植の 1 継代前に PKH26 蛍光試薬による細胞の蛍光標識を施した。皮下脂肪採取 35 日後に LCAT 欠損マウス血清含有 DMEM/F12-HAM 培地 (細胞懸濁用溶媒) に細胞を分散させ、LCAT 欠損マウス (12 例) の皮下へ 5.0×10^6 個/マウスにてマトリゲルを足場として他家移植した。遺伝子導入未実施の細胞を対照群として (3 例) 同様に移植した。レシピエントの LCAT 欠損マウスは移植 4 日前、移植前日、移植 14、28、42 日後に免疫抑制剤 (シクロフォスファミド) を 175mg/kg 用量で腹腔内投与した。移植個体について移植 5 日前 (-5)、移植 7、14、28、56 日後に血清を採取した。血清検体について抗ヒト LCAT ウサギモノクローナル抗体で免疫沈降反応を行ったのち、抗ヒト LCAT ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットを行った。移植細胞の残存率検討のため、移植 1、14、28、56 日後に剖検を実施し (hLCAT 遺伝子導入細胞移植個体について各ポイント 3 個体ずつ)、実体蛍光顕微鏡下 PKH26 蛍光に基づいて投与組織を摘出した。剖検時の観察と共に投与組織切片を作成、hLCAT 免疫染色、Oil Red O 染色、HE 染色を実施した。残

存率は定法に従って組織 DNA を抽出し、hLCAT 遺伝子の残存をリアルタイム PCR 法により検討した。採取した血清について生化学検査を実施した。

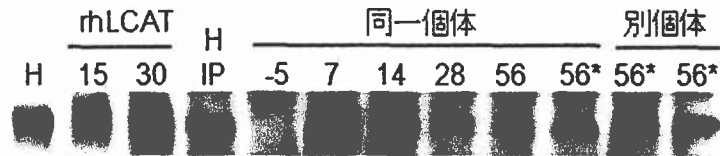


図 38. hLCAT 導入 LCAT 欠損マウス前脂肪細胞の LCAT 欠損マウス皮下移植による血中への hLCAT 蛋白質の持続分泌

H : HDL 1 μ g、rhLCAT : 組換え型 hLCAT、15 ng、30 ng、H IP : HDL 1 μ g を LCAT 欠損マウス血清 50 μ L に添加したもの (+)、添加していないもの (-) について実際の検体と同様の免疫沈降操作を実施したもの、同一個体について移植 5 日前、移植 7、14、28、56 日後の血清 50 μ L について免疫沈降ウェスタンブロットを行った。56* の検体は血清 100 μ L を使用した。

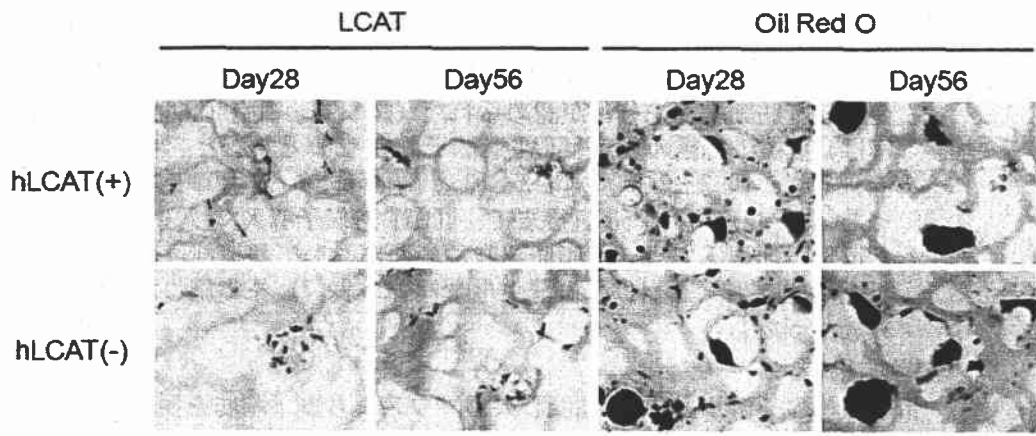


図 39. hLCAT 導入 LCAT 欠損マウス前脂肪細胞移植後の免疫組織学的検討
hLCAT 遺伝子導入 (hLCAT (+))、非導入 (hLCAT (-)) マウス前脂肪細胞の移植個体について移植 28、56 日後の移植部位を摘出し、LCAT 免疫染色、Oil Red O 染色を行った。スケールは 50 μ m。

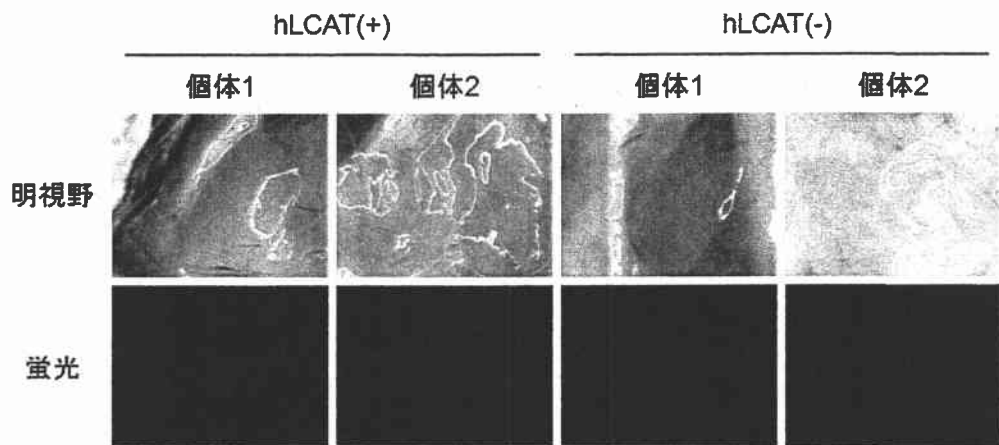


図 40 移植部位の剖検

hLCAT 遺伝子導入 (hLCAT (+))、非導入 (hLCAT (-)) マウス前脂肪細胞の移植個体における移植 56 日後の移植部位剖検結果を示す。摘出時の細胞の確認を目的として、細胞は蛍光色素である PKH26 で染色後、移植した。

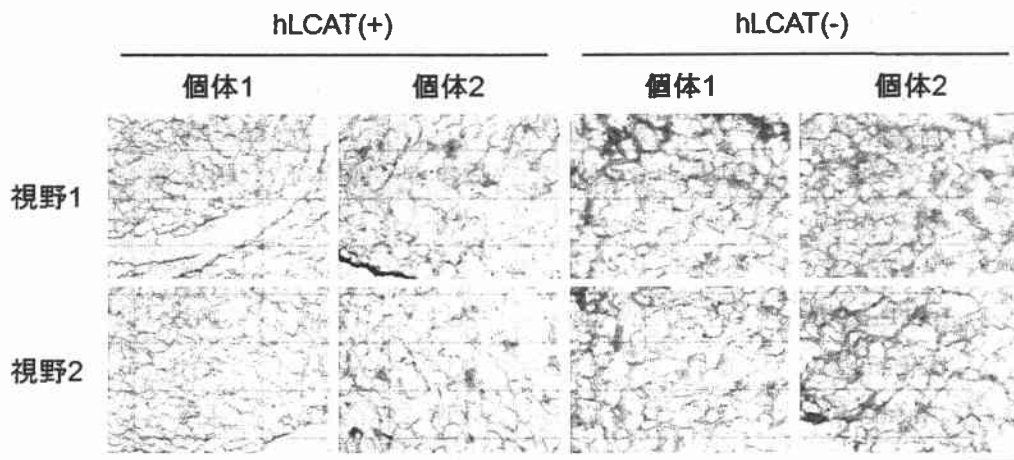


図 41 移植部位の HE 染色結果

hLCAT 遺伝子導入 (hLCAT (+))、非導入 (hLCAT (-)) マウス前脂肪細胞の移植個体について移植 56 日後の移植部位を摘出し、HE 染色を行った。スケールは 200 μ m。

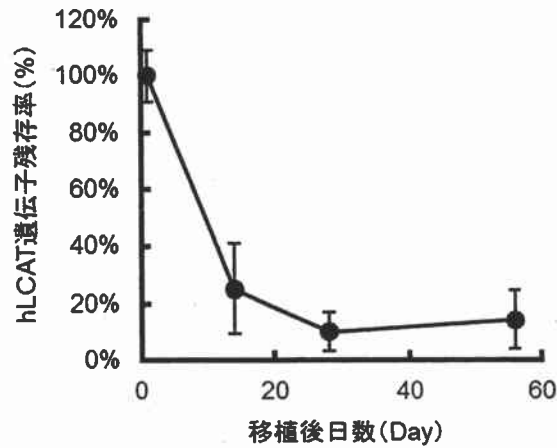


図 42. hLCAT 導入 LCAT 欠損マウス前脂肪細胞の移植後残存率評価

移植翌日、14、28、56 日後のマウスについて 3 個体ずつ移植組織を摘出し、DNA を抽出した。リアルタイム PCR 法により移植細胞に導入した hLCAT 遺伝子を定量した。

表 7 hLCAT 遺伝子導入による影響

hLCAT 遺伝子導入 (hLCAT (+))、非導入 (hLCAT (-)) マウス前脂肪細胞の移植個体について移植 56 日後の血清を採取し、血清生化学検査を実施した。

血清生化学 項目	hLCAT(+)			hLCAT(-)		
	個体 1	個体 2	個体 3	個体 1	個体 2	個体 3
TP(g/dL)	4.9	4.7	4.6	4.7	4.8	4.6
ALB(g/dL)	3.2	3.1	2.9	3.1	2.8	2.9
BUN(mg/dL)	27.1	24.8	30.3	26.6	29.6	30.1
CRE(mg/dL)	0.13	0.12	0.14	0.15	0.12	0.12
Na(mEq/L)	157	157	159	157	156	157
K(mEq/L)	5.0	4.3	3.9	3.5	3.7	4.3
Cl(mEq/L)	111	112	114	105	109	106
Ca(mg/dL)	9.4	9.1	9.2	8.9	9.1	9.1
IP(mg/dL)	11.6	10.0	9.4	8.2	10.6	10.8
AST(IU/L)	61	48	49	85	52	53
ALT(IU/L)	20	26	23	29	24	31
LDH(IU/L)	597	303	267	889	441	831
AMY(IU/L)	2967	3370	2551	3140	3200	3530
T-BIL(mg/dL)	0.08	0.05	0.05	0.06	0.06	0.08

IP; 無機リン、AMY; アミラーゼ

VIII. 安全性についての評価

1. 遺伝子導入方法の安全性

(1) 遺伝子導入に使用するレトロウイルスベクターの品質および安全性

hLCAT 発現レトロウイルスベクター製造用マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) は、タカラバイオ株式会社において GMP 製造されたものである。1 バイアルにウイルスベクター産生細胞を 4×10^6 個/mL 含み、液体窒素タンクにて保存される。以下にマスターセルバンクの品質試験項目と結果を示す (表 8)。

表 8. 品質試験結果 MCB (CGT_hLMC Lot. CM06-1)

試験項目	実施施設	測定値
Viability (トリパンブルーアッセイ)	タカラバイオ株式会社	98.2 %
ウイルスタイター (real time PCR 法)	タカラバイオ株式会社	4.03×10^9 copies/mL
遺伝子産物の発現性試験 (real time PCR 法)	タカラバイオ株式会社	1.61×10^6 copies/ 10 ng RNA
組み込まれたベクター遺伝子のコピー数試験 (サザンプロット法)	タカラバイオ株式会社	1 コピー
hLCAT 遺伝子の塩基配列試験 (PCR ダイレクトシーケンス)	タカラバイオ株式会社	hLCAT 遺伝子の塩基配列と一致適合
無菌試験 (培養法)	株式会社 エスアールエル	適合
RCR 試験 [上清] (培養法)	株式会社 エスアールエル	陰性
RCR 試験 [細胞] (培養法)	株式会社 エスアールエル	陰性
マイコプラズマ否定試験 (培養法及び指標細胞を用いた DNA 染色法)	株式会社 エスアールエル	陰性
XC プラークアッセイ	株式会社 エスアールエル	陰性
<i>in vitro</i> ウイルス試験	株式会社 エスアールエル	陰性
<i>in vivo</i> ウイルス試験	チャールズリバー株式会社	陰性
Bovine virus 試験	チャールズリバー株式会社	陰性
Isoenzyme 試験	チャールズリバー株式会社	陰性
抗体産生試験 (MAP 試験)	チャールズリバー株式会社	陰性

遺伝子導入に使用するレトロウイルスベクターは、上記マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) より、タカラバイオ株式会社において GMP 製造される。

マスターセルバンクからのレトロウイルスベクター (Lot. CRV07-1) の製造は次の方法にて行った。

- ① MCB (CGT_hLMC Lot. CM06-1) より 3 本を融解して培養を開始した。
- ② 2 回の継代培養後、CellSTACK (10 チャンバー 2 個および 5 チャンバー 1 個) で

セミコンフルエントまで培養した。

- ③ 培養後、ウイルスハーベスト培地に交換し、24 時間後に培地上清を回収した。
- ④ 回収後新たなウイルスハーベスト培地に交換し、次の 24 時間培養後に培地上清を回収し、同じ操作をさらにもう一度行った。
- ⑤ 回収したウイルス液はそれぞれ無菌ろ過を行った後、4 mL ずつ分注し-80 °C にて凍結保存した。

また、レトロウイルスベクター (Lot. CRV07-2) は、Lot. CRV07-1 と同一のマスタースセルバンク (CGT_hLMC Lot. CM06-1) 7 本から培養し、最終的に得られたウイルス液を無菌ろ過した後、フローズバック (100 mL 用、50 mL 用) 及びクライオバイアル (4 mL 用) に分注して-80 °C にて凍結保存した。

以下に hLCAT 発現レトロウイルスベクター溶液 (Lot. CRV07-1 及び CRV07-2) の品質試験結果を示す (表 9)。

表 9. 組換えレトロウイルス品質試験 (CGT_hLCAT RV)

試験項目	実施施設	暫定規格値	参考実測値	
			CRV07-1	CRV07-2
① 無菌試験	株式会社 エスアールエル	適合	適合	適合
② マイコプラズマ否定試験 (培養法)	株式会社 エスアールエル	陰性	陰性	陰性
③ エンドトキシン	タカラバイオ 株式会社	<0.5 EU/mL	<0.02 EU/mL	<0.05 EU/mL
④ ウイルスタイター (real time PCR)	タカラバイオ 株式会社	Report	3.63x10 ⁹ copies/mL	3.91x10 ⁹ copies/mL
⑤ 遺伝子産物の発現性試験	タカラバイオ 株式会社	Report	4.99x10 ⁵ copies/ 10 ngRNA	7.96x10 ⁵ copies/ 10 ngRNA
⑥ RCR 試験(上清)	株式会社 エスアールエル	陰性	陰性	陰性
⑦ RCR 試験(細胞)	株式会社 エスアールエル	陰性	陰性	陰性
⑧ <i>in vivo</i> ウイルス試験	チャールズリバー 株式会社	陰性	陰性	陰性
⑨ <i>in vitro</i> ウイルス試験	株式会社 エスアールエル	陰性	陰性	陰性
⑩ hLCAT 遺伝子の塩基配列 試験	タカラバイオ 株式会社	hLCAT 遺伝子 の塩基配 列に一致	一致	一致
(参考) RCR 簡易培養法	タカラバイオ 株式会社	陰性	陰性	陰性

試験項目		試験方法	判定基準	
不純物試験	製造工程 混入不純物	コラゲナーゼ混入否定試験	ELISA	実測値をもとに 範囲を設定
		トリブシン混入否定試験		
		BSA 混入否定試験		
		ゲンタマイシン混入否定試験		
	ウイルス 混入試験	<i>in vitro</i> ウイルス検出試験	<i>in vitro</i> ウイルス試験	陰性
	RCR 確認試験	RCR 検出試験培養法	培養法 (S ⁺ L ⁻ フォーカスアッセイ)	陰性
	無菌試験		第 15 改正日本薬局方	陰性
	マイコプラズマ 否定試験	DNA 染色法	第 15 改正日本薬局方	陰性
培養法		生物学的製剤基準	陰性	
エンドトキシン試験		第 15 改正日本薬局方	<5.0 EU/kg	

(3) 増殖性ウイルス出現の可能性

hLCAT 発現レトロウイルスベクター作製には pDON-AI を用いており、野生型ウイルス由来の *gag*、*pol* および *env* を完全に排除したことで、これまで RCR の出現が報告されていたパッケージング細胞「PA317 細胞」においてもその出現が否定されている²⁵⁾。また、パッケージング細胞である GP+envAM-12 細胞においても、*gag-pol* と *env* とが別々の DNA 断片上に別れて存在しているため²⁶⁾、相同的組換えにより野生型・増殖性ウイルス (RCR) が出現する可能性は極めて少ないと考えられる。本 MCB (CGT_hLMC Lot. CM06-1) およびそれから作製されたウイルスベクターロットにおいても RCR は検出されていない。細胞懸濁液である LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞においても RCR が出現していないことの確認を行うが、被験者への移植後に定期的実施する検査においても血液中の RCR 検出検査を実施し、万一の RCR 発現に備え継続的なモニターを行う。

(4) 遺伝子導入に使用するウイルスベクターの細胞傷害性

本研究に用いる遺伝子導入用ウイルスベクターは、その遺伝子構造の骨格やウイルス外被構造において、現在までに遺伝子治療で使用されてきたレトロウイルスベクターと大きく異なるものではない。今まで、レトロウイルスベクターによる細胞傷害性の報告はないことから、本ウイルスベクターによる細胞傷害の危険性は低いものと考えられる。

(5) 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本研究では、患者の腹部皮下脂肪組織より採取し、天井培養等により選別・調製されたヒト前脂肪細胞を標的細胞として、ウイルスベクターを用いて *ex vivo* で遺伝子導入を行うものである。血管系や血管内皮系の細胞の混在のない比較的均一なヒト前脂肪細胞分画を用いてはいるが、ヒト前脂肪細胞以外の未分化な間葉系細胞の混入の可能性は否定できない。従って、移植後の遺伝子導入細胞の脂肪組織内での生着、遺伝子発現等については、同じ脂肪組織由来であっても標的以外の細胞へ遺伝子が導入されたケースも想定して、移植部位の観察を含め各種臨床検査値の推

移などを注意深く観察し、異常が発生していないか否かを確認していくこととする。また、ウイルスベクターによる遺伝子導入から細胞移植までにはかなりの日数があることから、細胞に取り込まれなかったレトロウイルスベクターは細胞移植時までには全て失活すると考えられ、感染力のあるウイルスベクターが細胞と共に体内に持ち込まれる可能性はなく、RCRが出現しない限り遺伝子導入された細胞から他の細胞へと体内で遺伝子導入がなされることはないと考えられる。

(6) 被験者以外の人への遺伝子導入の可能性

本研究における遺伝子導入レトロウイルスベクターの使用、移植細胞の被験者への投与、保管、運搬および廃棄ならびにこれらに付随する行為等は、全て「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法:平成15年法律第97号)」第一種使用規程を遵守して行うため被験者以外の人へ遺伝子導入されるおそれはないと考えられる。すなわち、本研究における遺伝子導入作業は、治験薬 GMP 準拠の P2 レベルの拡散防止措置のとることができる細胞調製室 (Cell processing center: CPC) 内において、十分に教育を受け、経験のある担当者によって行われる。標的細胞へのレトロウイルスベクターの暴露は CPC 内においてのみ行われ、レトロウイルスベクターは細胞外にあっては非常に不安定であること、および CPC 内の作業は手順書に則り常時ゴム手袋及びマスクを着用していることから操作中に感染することは考えられない。また、ウイルスベクターを含む廃液等はすべてオートクレーブ処理又は次亜塩素酸処理後廃棄されるので、外部に漏出する危険性はない。二重に密閉された容器で運搬された移植用細胞は拡散防止措置のとられた個室で被験者に投与されるので、移植後の被験者に対して実施する定期的な検査において RCR の出現が認められない限り、細胞懸濁液を被験者へ組織内投与する操作過程も含め、被験者を介して他の人へ感染するおそれはないと考えられる。

(7) 染色体内へ遺伝子が組込まれる場合の問題点

レトロウイルスベクターが宿主 DNA に組み込まれる位置は決まっているわけではないので、その組み込まれた部位により細胞に大きな影響の出る可能性は否定できない³¹⁾。ヒト前脂肪細胞の染色体 DNA へのウイルスベクターの組み込みはランダムに起こると考えられ、遺伝子導入後は染色体の様々な部位に hLCAT 遺伝子の挿入された細胞の集合となる。外来遺伝子の挿入がその細胞の増殖に特にプラスに働かない場合、細胞集団内でのその細胞の影響は小さく生体に影響を与えることはないが、挿入がその細胞の増殖優位性をもたらす場合、細胞集団の中でそのクローンが増大し(クローナリティーの出現)、状況によってはがん化する可能性も否定はできない。

ヒト前脂肪細胞調製の条件およびウイルスベクター感染の条件をコントロールすることで、細胞あたりの平均導入コピー数を一定にして染色体 DNA への過剰な組み込みを抑え、導入後の細胞の導入コピー数の確認し、さらに、患者移植用に調製した細胞の免疫不全マウスへの移植を実施し、移植後も長期にわたってクローナリティー出現のチェックを行なう。

(8) がん原性の有無

レトロウイルスベクターの宿主 DNA への組み込みがその細胞の増殖優位性をもたらす場合、幾つかの変異が重なってその細胞ががん化していく可能性は否定できない。フランスにおける X-SCID の遺伝子治療においては、がん遺伝子 *LMO2* の近傍に

外来遺伝子が挿入されることでこのがん遺伝子が活性化され、細胞のがん化の引き金になった可能性がある」と報告されている^{32) 36) 37)}。レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療において、X-SCID 以外にこのようながん化の事例は報告されていないこと³³⁾、および本研究の標的細胞である前脂肪細胞は X-SCID 遺伝子治療で用いられた造血系細胞とは細胞の性質がまったく異なることや移植後の環境も違うことから、この例をそのまま本研究のケースに当てはめることはできない。現在までに、*in vitro* で継代培養した移植細胞の細胞学的観察、遺伝子導入細胞における染色体異常、マウスでの hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の皮下移植によるがん化および Nude マウスでの LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の皮下移植によるがん化などの検討を行っているが、がん化所見は認められていない。

2. 遺伝子産物の安全性

導入遺伝子により発現する遺伝子産物は正常の LCAT のみである。遺伝子導入したヒト前脂肪細胞で、天然型と変わらないサイズと活性をもつ LCAT の発現を *in vitro* で確認している。LCAT 欠損または変異をもつ患者で発現した場合には、異物と認識される可能性があるため、移植後には血中抗ヒト LCAT 抗体の出現の有無をモニターする。なお、ヒト前脂肪細胞からの分泌蛋白質プロファイルは hLCAT 遺伝子導入前後で変化は認められていない。

3. 細胞の安全性

(1) 培養細胞の純度

移植される細胞は GMP に準拠し十分にコントロールされた状態で製造される。移植細胞の純度はフローサイトメトリーおよび導入 hLCAT 遺伝子陽性率にて調査し、規格に適合する場合にのみ移植される。また、被験者以外の細胞の汚染を防ぐため、被験者の脂肪組織の搬入から LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の細胞懸濁液調製までのプロセスが細胞調製室で終了するまで、別の被験者の脂肪組織等を扱わないこととする。また、遺伝子導入時に使用するウイルスベクター等の使用する原料や培地に関して、無菌性（好気性菌、嫌気性菌、真菌）、マイコプラズマ、増殖性レトロウイルス、その他迷入する恐れのあるウイルス汚染について検査を行い陰性のものを使用するため、微生物等による汚染の可能性も極めて低い。

(2) 細胞の遺伝子型、表現型の安定性

ヒト前脂肪細胞は培養時に遺伝子型、表現型に大きな変化は観察されていない。レトロウイルスベクターによる導入 hLCAT 遺伝子はゲノム DNA にランダムに挿入されるため、特定の遺伝子型や表現型に変化をあたえる可能性予測することは難しいが、健康成人からのヒト前脂肪細胞を用いた検討では hLCAT 遺伝子導入による細胞の形質変化は観察されていない。被験者への移植前に、移植する細胞に関して膜表面抗原マーカーに変化のないことを確認する。

(3) 被験者に投与する細胞の安全性

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞は、*ex vivo* にて必要量の hLCAT 遺伝子が導入され、導入遺伝子コピー数、細胞の表現型、発現する LCAT の活性を移植前に確認することで、移植細胞の安全性や有効性を最大限確保する。また、無菌性、マイコプラズマ、増殖性レトロウイルス、迷入ウイルスをはじめ、細胞培養に使用した FBS やトリプシンの混入など不純物試験も実施し、最大限の安全性確保を行う。

IX. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する根拠

本臨床研究の計画に当たり、細胞・遺伝子工学、細胞遺伝子治療、遺伝子関連医薬品および細胞薬品製造等に精通している専門家の協力体制が出来ており、以下、4点の理由より遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した。

1. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の移植組成物の調製と移植

皮下脂肪摘出と LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の脂肪組織内移植において

- 1) ヒト前脂肪細胞の単離・調製のため必要な皮下脂肪摘出量は、およそ 20 g 程度であり、外観上も摘出によるくぼみは生じず、摘出は約 15 分程度で完了する（健康成人ボランティア研究より）。
- 2) 脂肪組織内への細胞懸濁液の移植量は生理的組織接着剤（既承認市販品の血漿分画製剤）を含め 30 mL 以下である（細胞数で $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ ）。
- 3) ヒト前脂肪細胞の足場材料として等量の生理的組織接着剤を細胞懸濁液と混合し、直ちに脂肪組織内へ注入することにより高い生着性と hLCAT の持続的分泌が得られる。

2. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の特徴

- 1) 皮下脂肪組織から一定以上のヒト前脂肪細胞の調製が可能である。
- 2) hLCAT 遺伝子導入後に安定した持続発現（培地中での LCAT 活性の蓄積）が認められている。
- 3) 2) の理由により、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の移植細胞数が決定可能である。
- 4) 自己ヒト前脂肪細胞を用いるため、脂肪組織内への移植による拒絶反応は生じないことが推察され、安定した生着が得られる。

3. ベネフィットの予測

家族性 LCAT 欠損症患者は、古典型 LCAT 欠損症で血中 LCAT が正常の 10% 未満、部分型 LCAT 欠損症で正常の 10~20% とされている。魚眼病で血中 α LCAT 活性（合成基質法）が、正常の 0~20% とされており、角膜混濁、溶血性貧血、血中リポ蛋白異常、特に HDL コレステロールの低下が顕著である。また古典型 LCAT 欠損症では、さらに腎障害を併発する場合が多く、そのほとんどが予後として人工透析治療を余儀なくされる。また幼少期より発症する角膜混濁についても青年期で視力障害、40 歳以降で角膜移植が必要とされる。

治療法としては、低脂肪食による食事療法、薬物による腎機能保護治療の一時的な対症療法しかなく、腎機能障害を併発した場合の人工透析治療もしくは腎移植、あるいは一時的な LCAT 補充療法としての新鮮血（全血または血漿）輸血などが施行されている。家族性 LCAT 欠損症のうち、古典型 LCAT 欠損症、部分型 LCAT 欠損症、魚眼病の発症および進展阻止の LCAT 活性の境界線は、正常の 10% 未満（部分型 LCAT 欠損症では 20% 以下、魚眼病では α LCAT 活性が 0~20% もしくは完全欠失）であり、家族性 LCAT 欠損症患者に対して正常の 10% 程度の LCAT 活性量を付加補充するか否かによってその予後を左右することが推察される。

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞は、安定持続した正常 LCAT を供給し、分泌された rLCAT は家族性 LCAT 欠損症患者血清の脂質異常を改善する機能を示すことから、古典型 LCAT 欠損症の血中 LCAT 完全欠損による幼少期からの角膜混濁、青年期からの腎機能障害、魚眼病の α LCAT 活性の完全欠損による幼少期からの角膜混濁および部分型

LCAT 欠損症の角膜混濁など、家族性 LCAT 欠損症の予後（腎機能障害による腎不全、人工透析への移行、角膜混濁による視力障害と角膜移植）に好影響を与えると推察される。

4. リスクの予測と対応

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞のリスクとその対応については以下のように分析している（表 13）。

表 13. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞のリスクとその対応

リスク予測	対応
1) 移植後、治療効果を充足する血中 LCAT 活性レベルが補充し得なかった場合（被験者毎の状態により、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の生着が不十分もしくは LCAT 発現量が不十分な場合）には再投与が必要となる可能性	臨床研究において LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の移植後、高感度測定法 ^{注)} により、血中 LCAT 活性のモニタリングを行い、その活性推移により判断を行う。
2) LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞のがん化に関する危険性	画像診断、がんマーカー検査を含めた定期的観察を行う。同時に患者移植細胞の免疫不全マウスへの移植を行い、遺伝子挿入クローンの変動および組織学的な安全性評価を実施する。これらの結果に基づき因果関係を調査し、その対応をはかる。
3) 上記 2) に伴い LCAT が過剰発現した場合の移植部位の摘出での対応の可能性	がんマーカー検査を含めた定期的観察を行い、因果関係を調査し、その対応をはかる
4) 産出されたヒト LCAT の抗原性の有無と免疫反応の可能性	抗 LCAT 抗体測定を含めた定期的観察を行い、その対応をはかる
5) 細胞移植時は細胞懸濁液とするため、経時的な劣化の可能性がある その一方で品質試験に時間を要するため、移植前は迅速試験にて品質確認を行い移植可否判定を行うが、移植後に規定の試験方法での結果が規格外として得られる可能性	総括責任者へ即時情報伝達を行い、移植を受けた被験者の全身状態を十分に観察し、移植部位の摘出など必要に応じて処置を行う。

注) 高感度測定法は、正常 LCAT 活性の 0～20%の低値域の測定方法として開発した

X. 遺伝子治療臨床研究の計画

1. 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

本遺伝子治療臨床研究（以下「本臨床研究」という）は、特定疾患に指定されている原発性高脂血症の疾患群のひとつである家族性LCAT欠損症（魚眼病を含む）の確定診断を受けた患者に対して、hLCAT発現遺伝子を導入した自己のヒト前脂肪細胞を移植した場合の、安全性を検証するとともに有効性を探索的に検討する。

本臨床研究における方法としては、局部麻酔下で被験者腹部から摘出した脂肪組織より分離、調製したヒト前脂肪細胞に hLCAT 発現遺伝子を導入し、移植に必要な細胞数まで培養した後に洗浄などの精製処理を施し、注射用に調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液（以下「移植用細胞」という）を被験者皮下脂肪組織内に注射移植する。

移植用細胞の移植後においては、6 ヶ月間にわたり、被験者の移植部位における異常な細胞増殖の有無などの所見及び臨床検査・がんマーカー検査・RCR 検査結果をもとにした全身状態についての観察を慎重に行ない、本臨床研究の方法の安全性を評価する。また併せて、血中 LCAT 活性・血中 HDL コレステロール濃度・コレステロールエステル比などの疾病関連因子についての測定結果の推移及び本疾患に起因する低 HDL コレステロール血症・角膜混濁・腎機能障害・溶血性貧血など臨床症状の経過観察結果から、その有効性についても探索的に検討する。

これら評価が適正になされるために、この観察期間中においては従来から受けている治療（食事療法）の内容についての変更は行わず、また新たな治療および他の治療は行わないこととする。

また、移植用細胞の移植後における長期フォローの目的で、予後調査として移植 6 ヶ月後以降においても移植後 5 年間にわたり、3 ヶ月に 1 回の頻度で移植部位・全身状態などの安全性についての観察を行うと同時に、疾病関連因子の測定結果を含む臨床症状の経過観察を行うなど本法の有効性についての調査を行う（表 14）。5 年間の経過観察を終了した症例については定期的に症状の把握に努め、必要であれば適切な処置を行うこととする。

なお、本臨床研究においては、3 症例の被験者に対して本法を施行することを計画しているが、各症例の移植後 3 ヶ月時点での 1 次評価が終了し、次項（X. 2 項）に記載する千葉大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会における審議結果をもとに総括責任者が本臨床研究継続の判断を行った後に、次の症例への施行を行うこととする（表 15）。

2. 千葉大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会

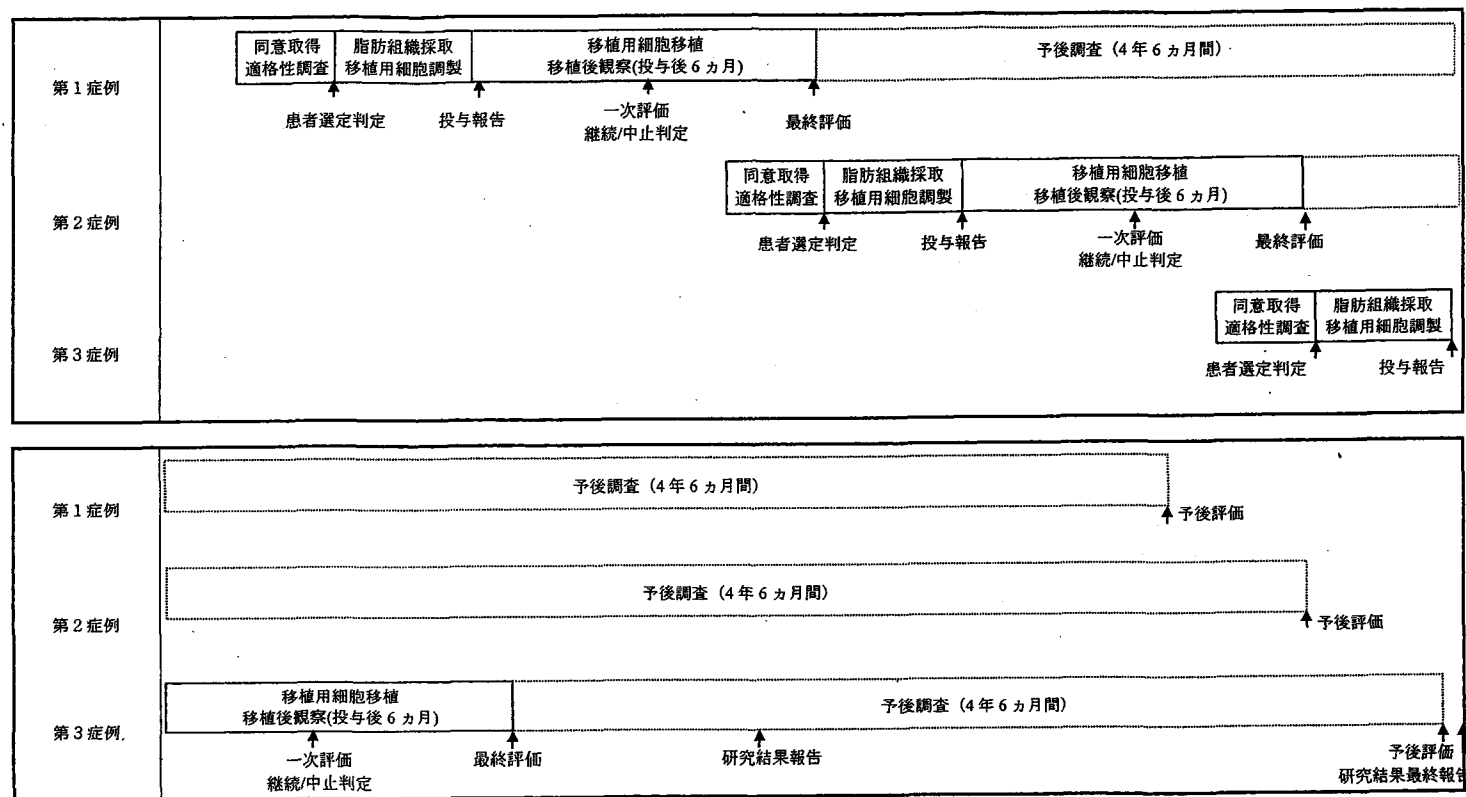
本臨床研究の科学的妥当性及び倫理性については、千葉大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会（以下「審査委員会」という。）により総合的に審査される。（参考資料 2）。

表 14. 症例における臨床研究スケジュール

	同意説明 ~適格性調査			脂肪 組織 摘出	脂肪組織摘出後観察				移植	移植直後観察 (1週間)							移植3ヵ月後観察					移植後6ヵ月後観察			予後調査 (移植後5年間調査)
	同意 説明	同意 取得	調査 検査	21 日前	20 日前	14 日前	1 日前	0日	1 日後	2 日後	3 日後	4 日後	5 日後	6 日後	7 日後	2 週後	4 週後	6 週後	8 週後	10 週後	12 週後	16 週後	20 週後	24 週後	3ヵ月毎 260週後まで
入院			○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○		○					○			○	○
外来	○	○				○									○		○	○	○			○	○		
同意説明	●																								
同意取得		●																							
適格性調査 (病歴調査など)			●																						
診察	一般診察		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	胸部 X 線・心電図		●																		●			●	
	臨床所見観察 (眼科検診含む)		●	●			●								●		●				●			●	●
検査 (採血・採尿)	ウイルス検査		●																						
	臨床検査 (血液・生化学・尿)		●	●			●		●		●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	RCR・悪性腫瘍検査					●		●													●			●	●*
	抗 FBS 抗体検査						●							●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	抗 LCAT 抗体検査						●							●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
血中 LCAT 活性測定			●	●		●		●		●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
脂肪組織摘出術			●																						
脂肪摘出部位観察				●	●	●																			
移植用細胞調製						●																			
移植用細胞品質試験								●																	
移植用細胞移植								●																	
移植部位の所見観察 (MRI 検査*)								● ^{#1}	●	●	●	●	●	●	●	● ^{#1}	●	●	●	●	● ^{#1}	●	●	● ^{#1}	● ^{#1}
クローナリティー検査 ^{#1}								● ^{#2}																	
採血量 (mL)	-	-	40	30	-	-	50	-	40	-	-	30	-	-	30	30	30	30	30	30	50	30	30	50	50
研究評価・判定			◎				◎														◎			◎	◎
			患者選択判定				移植用細胞移植可否判定														1次評価			最終評価	予後評価

* 移植後 48 週、96 週、144 週、192 週、240 週に RCR 検査 (NAT 法及び培養法) と悪性腫瘍検査を実施する。ただし、96 週以降の RCR 検査は、NAT 法のみ実施し、培養法は検体を凍結保存する。
 * 予後調査 (移植後 5 年間調査) を終了した症例については定期的な症状の把握に努め、必要であれば適切な処置を行う。
 #1 移植用細胞移植部位観察 (MRI 検査)、RCR・悪性腫瘍検査、血中 LCAT 活性測定、マウスにおける移植細胞のクローナリティー検査等を総合的に勘案のうえ、必要に応じて移植部位を生検し LAM-PCR 検査および病理学的検査を実施する。
 #2 移植細胞をマウスに移植後、経時的に LAM-PCR 検査を実施し、クローナリティーならびにがん化の有無を観察する。クローナリティーならびにがん化が否定できない場合には、移植部位観察 (MRI 検査)、RCR・悪性腫瘍検査、血中 LCAT 活性測定等を総合的に勘案のうえ、必要に応じて移植部位を生検し LAM-PCR 検査及び病理学的検査を実施する。

表 15. 臨床研究全体スケジュール



各症例の所要期間： ① 同意取得～脂肪組織採取：1週間～2週間 ② 脂肪組織採取～移植用細胞調製：3週間～5週間
 ③ 移植用細胞移植～観察期間終了：6ヵ月間 ④ 予後調査期間：5年間

* 移植後5年間調査を終了した症例については定期的(年1回)に症状の把握に努め、必要であれば適切な処置を行う。

3. 被験者の選択基準及び除外基準

(1) 選択基準

- 1) 本臨床研究における以下の診断基準から、家族性 LCAT 欠損症の確定診断がなされた患者
 - ・ 遺伝子診断において、LCAT 遺伝子異常（完全欠損、部分欠損、変異）が確認されている（ただし変異が終始コドン出現、フレームシフトなどの完全長 LCAT 蛋白が発現されないと想定される患者を除く）
 - ・ 臨床症状として、低 HDL コレステロール血症・角膜混濁・腎機能障害（蛋白尿）・溶血性貧血が認められる
 - ・ 血中 LCAT 活性（自己基質法：ネスコート®LCAT キット-S）が基準下限値（男性 67.3 U、女性 53.3 U）未満である（参考 基準値 男性：67.3～108.2 U、女性：53.3～95.5 U (nmol/mL/hr/37°C)）
- 2) 臨床症状（特に角膜混濁、腎機能障害など）の進行により、生命予後及び QOL への障害が強く推察される患者
- 3) 16 才以上 40 才以下の患者（注）
- 4) 臨床研究開始にあたり本人からの文書同意が得られている、または未成年の場合は本人および親権者の文書同意が得られている患者

(注) 本疾患は進行性の症状を呈するため、臨床的にはできるだけ若年齢からの治療が望ましいと考えられるが、成長過程にある被験者においては LCAT 補充量を確定できない。従って、成長過程が概ね終了すると考えられる、小児科担当と内科担当の境界年齢である 16 才を下限年齢とした。

また、これまでの移植用細胞の調製研究において、研究対象としたヒト前脂肪細胞提供者の最高年齢が 41 歳であったことから、細胞の特性評価の実績のある年齢を踏まえ、上限を 40 才とした。

(2) 除外基準

- 1) LCAT 変異から完全長 LCAT 蛋白が発現されない患者または血中に LCAT 蛋白が検出できない患者
- 2) 脂質代謝に影響する高度な肝疾患（劇症肝炎・肝硬変など）および腎疾患（腎不全など）を併発している患者
- 3) 不・低栄養、悪液質など全身性の栄養失調が認められる患者
- 4) 1 ヶ月以内に全血または血漿輸血による LCAT 補充療法を受けた患者
- 5) 重篤なウイルス感染症（B 型肝炎・C 型肝炎・ヒト免疫不全症・成人型 T 細胞白血病・パルボウイルス B19 感染症）の検査において陽性が判明した患者
- 6) 皮下脂肪摘出術の施行が困難と判断される患者
- 7) 妊婦、授乳中あるいは妊娠を希望している患者
- 8) 低 HDL コレステロール血症を認める LCAT 欠損に起因しない他の類似疾患患者（アポ A-1 異常症・Tangier 病）
- 9) その他、総括責任者および審査委員会が不相当と認めた患者

【設定根拠】

- 1)～4) 本臨床研究の効果に影響を与える可能性があることから除外
- 5) 臨床研究業務関係者の安全性確保の観点から除外
- 6) 本臨床研究の施行に支障があるため除外
- 7) 安全性の観点から除外
- 8) 対象疾患外であるため除外
- 9) 一般的な除外項目

4. 患者の同意の取得方法

本臨床研究を開始するにあたり、研究者は先ず当該遺伝子治療の概略およびその具体的方法について患者（患者が未成年の場合はその代諾者^注同席のもと）に説明する。

患者（及びその代諾者）が当該治療の概略と具体的方法を十分に理解したことを研究者が確認した後に、本臨床研究者以外の第三者（施設の臨床試験コーディネーター（CRC）など）が以下の項目を含む「同意説明用文書」（別添資料1）に則って説明を行い、患者（およびその代諾者）の自由意思による本臨床研究参加の同意の意向を聴取する。

患者（およびその代諾者）が参加同意の意向を表明した場合、研究者が本人（およびその代諾者）より本臨床研究参加の同意を文書で得る。（「臨床研究参加同意書」：別添資料2）
注）両親もしくは法的保護者

- ・ 臨床研究、遺伝子治療について
- ・ 臨床研究の目的
- ・ 臨床研究の方法（被験者の選択基準、実施方法、評価方法など）
- ・ 臨床研究の予定参加期間
- ・ 臨床研究への予定参加人数
- ・ 臨床研究において起こるかもしれない副作用と予想される治療の効果
- ・ 臨床研究に参加しない場合の他の治療方法
- ・ 臨床研究中に健康被害が発生した場合について
- ・ 臨床研究への参加は被験者の自由意思によること、不参加や中止により被験者が不利を受けないこと
- ・ 臨床研究に関する情報は随時、速やかに被験者に伝えられること
- ・ 臨床研究への参加を中止させる場合があること
- ・ 臨床研究に参加した場合、カルテなどの原医療記録が調査される場合があること
- ・ 臨床研究の結果が公表される場合であっても、被験者の秘密は保全されること
- ・ 臨床研究の参加に際して、被験者が守るべき事項
- ・ 臨床研究に関する被験者の費用負担
- ・ 臨床研究において特許権等が生み出された場合の帰属先
- ・ 臨床研究に携わる医師の氏名、職名および連絡先
- ・ 臨床研究に関して被験者が連絡をとる場合の実施医療機関の相談窓口

5. 適格性の調査

前記4.により本臨床研究参加の同意が得られた患者（被験者）に対して、ウイルス検査を含む臨床検査、病歴調査および診察を実施する。

6. 被験者の登録および適格性の判定

(1) 被験者の登録

研究者は、同意を取得した被験者について「被験者登録票」（別添資料3）に、被験者識別番号、被験者氏名および同意取得日を記入し、以後、適格性判定結果（適 or 否）、判定日、および移植用細胞移植（有 or 無）、移植日を、随時記入する。

全被験者の臨床研究スケジュールが全て終了した後、研究者は「被験者登録票」の記載内容について確認を行い、署名後、総括責任者に提出する。

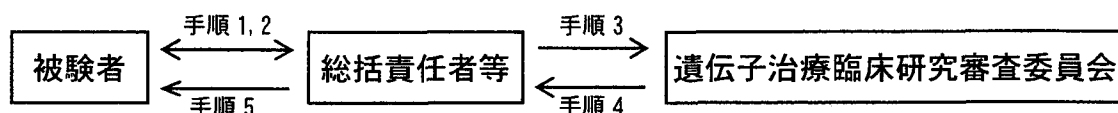
(2) 被験者の適格性判定

前記3. の選択・除外基準に則り、研究者が本臨床研究の対象患者であると判断し、かつ研究参加への本人（及びその親権者）の同意が得られた患者（被験者）で、審査委員会が本臨床研究の対象として適格と判断した被験者が、本臨床研究に参加することができる。

総括責任者は、患者からの文書同意の取得が得られた後、被験者の適格性を確認し、審査委員会に対して本臨床研究への当該被験者の参加適否について判定を依頼する。この際、被験者の同意書及び必要項目を記入した「被験者適格性調査票」（別添資料4）を提出する。

審査委員会は、総括責任者から提出された被験者の同意書及び「被験者適格性調査票」をもとに、本臨床研究の対象被験者としての適格性を判定し、その判定結果を「被験者適格性判定連絡票」（別添資料5）でもって総括責任者へ通知する。

審査委員会において、本臨床研究の対象被験者として適格でないと判定された患者については、総括責任者等は、「未投与症例報告書」（別添資料6）に必要事項を記入し、当該被験者の臨床研究を終了する。



手順1：患者の同意取得

手順2：適格性調査の実施

手順3：被験者から取得した同意書及び被験者適格性調査票を審査委員会へ提出

手順4：本臨床研究への参加の適否について、総括責任者へ通知

手順5：適格と判定された場合、皮下脂肪組織摘出術を施行し、移植用細胞を調製し、移植を行う。

7. 実施期間及び目標症例数

本臨床研究の実施期間は、本臨床研究の実施について病院長の承認が得られた日より6年間とする。

長期フォローアップの目的で実施する5年間の経過観察終了後も定期的（年1回）に症状の把握に努め、必要であれば適切な処置を行う。

また、本臨床研究は、希少疾患である家族性LCAT欠損症患者を対象とすることから、臨床研究の実施可能性を考慮して目標症例数（移植症例数）は3例と設定する。ただし、審査委員会において、本臨床研究の目的が十分に評価されたと判断された場合には、目標症例数が未達成の時点であっても本臨床研究を終了することができる。

8. 本臨床研究の実施方法

(1) 対照群の設定方法

本臨床研究においては、特に対照群は設定しない。

(2) 遺伝子導入前脂肪細胞の調製方法

1) 脂肪組織の摘出

局部麻酔下で腹部に小切開を行ない、脂肪摘出術（脂肪吸引術式など）により、腹部皮下脂肪組織の約 20 g を採取する。

2) 脂肪組織からの前脂肪細胞の分離・培養

採取した脂肪組織をコラゲナーゼで処理を行ない、十分洗浄した後、DMEM/Ham F-12 20%FBS 培養液（以下「培養液」）にて 7 日間天井培養法にて培養を行なう。培養終了後、天井培養面から剥離採取し、ヒト前脂肪細胞を得る。

3) 遺伝子導入

天井培養で得られたヒト前脂肪細胞に、培養液で希釈した hLCAT 搭載レトロウイルスベクター溶液を加え硫酸プロタミンを添加した後、24 時間培養し、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を得る。

4) 遺伝子導入細胞の培養

得られた LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を培養液で継代培養を行ない、移植に必要な細胞数* が得られるまで繰り返す。

5) 移植用細胞の調製及び移植

継代培養にて細胞数が移植必要数まで増殖したことを確認した後、TrypZean 溶液を添加し、細胞を培養面より剥離する。剥離した細胞を収集し、生理食塩液で十分に洗浄した後、移植に必要な細胞数* となるよう適量の HSA 含有リンゲル液で調製し、移植用細胞を得る。

この調製された移植用細胞について、細胞数・細胞形態（性状）・生細胞率・細胞表現型・純度（細胞種）・LCAT 力価の確認およびコラゲナーゼ混入否定試験・トリプシン混入否定試験・BSA 混入否定試験・ゲンタマイシン混入否定試験・*in vitro* ウイルス検出試験・RCR 検出試験・無菌試験・マイコプラズマ否定試験・エンドトキシン試験を実施する。

適切な拡散防止措置が執られた個室で、調製された移植用細胞と生理的組織接着剤（既承認市販品の血漿分画製剤）を混合し、直ちに被験者の皮下脂肪組織内に注射移植する。

投与後 3 日まで、被験者を個室内にて管理する。被験者の血清において RCR 検査（NAT 法）が陰性であることを確認後、個室における管理を解除する。RCR が万一確認された場合、個室内の管理を継続する。管理解除後に被験者の血清から RCR が検出された場合は、直ちに個室における管理下に移し、上記の措置を執る。

* : 健康成人の血中 LCAT 蛋白質量の 10% を補充することができる細胞数

(3) 研究実施期間中の併用療法

本臨床研究の実施期間においては、実施前より継続している食事療法（低脂肪・低蛋白食）については併用を認めるが、その療法の内容については変更を行なわない。

それ以外の治療に関しては、臨床研究の実施期間中においては、併用を認めない。

(4) 臨床検査項目及び観察項目

本臨床研究の実施期間における臨床検査項目及び観察項目とその実施時期を表16に示す。

1) 適格性調査における臨床検査項目及び観察項目

本臨床研究への参加同意日以降脂肪組織採取日の1週間前までに（可能であれば同意取得日）に本臨床研究への参加の適格性を調査するための以下のウイルス検査を含む臨床検査と臨床所見観察を実施する。

なお、これら臨床検査（血中 LCAT 活性測定を含む）は空腹時において実施すること、また1日拘束検査の項目（尿蛋白量検査）が含まれることから1泊入院にて実施する。

- ・ 病歴調査、遺伝子診断（結果調査）
- ・ ウイルス検査：
 - B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、成人型 T 細胞白血病ウイルス、パルボウイルス B19
- ・ 診察：
 - 体重、身長、血圧、脈拍、体温、胸部 X 線、心電図、
 - 本疾患関連以外の異常所見
- ・ 臨床検査：
 - 血液学的検査：
 - 白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、
 - 血小板数、白血球像（分画）、赤血球像（形状）
 - 血液生化学的検査（一般）：
 - 総蛋白、アルブミン、ハプトグロビン、総ビリルビン、
 - 間接ビリルビン AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、クレアチニン、尿酸、BUN、Na、Cl、K、Ca、CRP
 - 血液生化学的検査（脂質関連）：
 - 中性脂肪、総コレステロール、コレステロールエステル、
 - LDL コレステロール、HDL コレステロール、リポ蛋白分画、
 - アポリポ蛋白（A-I、A-II、B、C-II、C-III、E、E フェノタイプ）
 - 尿検査：
 - 潜血、ウロビリノーゲン、沈渣、尿クレアチニン、
 - 尿蛋白量（もしくは尿中アルブミン排泄量）*
 - * 顕性蛋白尿の場合は尿蛋白量、早期腎障害の場合は尿中アルブミン排泄量を一日蓄尿にて測定
- ・ 血中 LCAT 活性測定
- ・ 臨床所見観察：
 - 角膜混濁症状（視力、視野、角膜輪所見：眼球写真）
 - 腎機能症状（尿蛋白量もしくは尿中アルブミン排泄量）
 - 溶血性貧血症状（間接ビリルビン、LDH、ハプトグロビン）

2) 脂肪組織採取前後における臨床検査項目及び観察項目

脂肪組織の採取は、適格性調査結果により総括責任者及び審査委員会が本臨床研究への参加が適格と判断した日以降に実施する。

脂肪組織採取部位に関しては、採取日当日の採取前後観察と採取翌日の直後観察及び採取1週間後の経過観察を実施する。

なお、脂肪組織採取当日から翌日にかけては、採取部位の術後観察のために1泊の入院観察を行うこととする。

- ・ 診察：

体重、身長、体温、血圧、脈拍、本疾患関連以外の異常所見

- ・ 採取部位の所見観察（異常の有無）

また、採取した脂肪組織より調製した移植用細胞の移植に備えて、移植までの期間における症状把握のため、臨床検査と臨床所見観察を入院期間中に実施する。

- ・ 臨床検査：

血液学的検査：

白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、
血小板数、白血球像（分画）、赤血球像（形状）

血液生化学的検査（一般）：

総蛋白、アルブミン、ハプトグロビン、総ビリルビン、
間接ビリルビン AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、クレアチニン、尿酸、BUN、Na、Cl、K、Ca、CRP

血液生化学的検査（脂質関連）：

中性脂肪、総コレステロール、コレステロールエステル、
LDL コレステロール、HDL コレステロール、リポ蛋白分画、
アポリポ蛋白（A-I、A-II、B、C-II、C-III、E）

尿検査：

潜血、ウロビリノーゲン、沈渣、尿クレアチニン、
尿蛋白量（もしくは尿中アルブミン排泄量）

- ・ 血中 LCAT 活性測定

- ・ 臨床所見観察：

角膜混濁症状（視力、視野、角膜輪所見：眼球写真）

腎機能症状（尿蛋白量もしくは尿中アルブミン排泄量）

溶血性貧血症状（間接ビリルビン、LDH、ハプトグロビン）

3) 移植用細胞移植前後における臨床検査項目及び観察項目

本移植用細胞の移植に際しては、その事前・事後の経過観察のために移植前日から移植後1週間の期間は入院させることとし、以後、2週間間隔の観察を移植後3ヵ月間、1ヵ月間隔の観察を投与後6ヵ月間まで外来診察にて実施する。ただし、臨床所見観察は、1日拘束検査を伴うことから1泊入院において実施する。

また、これら観察期間終了後においても、更に3ヵ月間隔で予後の調査としての観察を移植後5年間まで継続する。5年間の観察が終了した症例については定期的に症状の把握に努め、必要と認められる場合には適切な検査を実施する。

- ・ 診察：

体重、身長、体温、血圧、脈拍、胸部X線*、心電図*、
本疾患関連以外の異常所見

【実施日：移植前日、移植当日（移植後）、毎移植後入院観察時、
毎外来観察時、毎予後調査時

* 胸部X線と心電図については、移植後3ヵ月・6ヵ月
観察時においてのみ実施する】

- ・ 移植部位の所見観察（異常の有無）

腹部MRI検査

【実施日：移植当日（移植後）、毎移植後入院観察時、毎外来観察時、
毎予後調査時】

- ・ 臨床検査：

血液学的検査：

白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、
血小板数、白血球像（分画）、赤血球像（形状）

血液生化学的検査（一般）：

総蛋白、アルブミン、ハプトグロビン、総ビリルビン、
間接ビリルビン AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、クレアチニン、尿酸、BUN、Na、Cl、K、Ca、CRP

血液生化学的検査（脂質関連）：

中性脂肪、総コレステロール、コレステロールエステル、
LDL コレステロール、HDL コレステロール、リポ蛋白分画、
アポリポ蛋白（A-I、A-II、B、C-II、C-III、E）

尿検査：

潜血、ウロビリノーゲン、沈渣、尿クレアチニン**
尿蛋白量（もしくは尿中アルブミン排泄量）**

【実施日：移植前日、移植後入院観察時（翌日・4日後・7日後）、
毎外来観察時、毎予後調査時

** 尿蛋白量（もしくは尿中アルブミン排泄量）および尿
クレアチニン検査については、臨床所見観察時（移植
前日、移植後7日観察時、移植後1ヵ月・3ヵ月・6ヵ
月観察時、毎予後調査時）に実施する】

・ RCR 検査：NAT 法、培養法***

【実施日：移植前日、移植後入院観察時（翌日）、移植後12週・24
週、毎予後調査時（48週・96週・144週・192週・240週）】

*** 培養法による RCR 検査は、移植前日、移植後12週・24
週、毎予後調査時（48週）観察時において NAT 法と併
用で実施する。ただし、毎予後調査時（96週・144週・
192週・240週）に培養法のため採取した検体は凍結保
存し、NAT 法で陽性と判定された場合にのみ実施する。

・ 悪性リンパ腫マーカー検査：チミジンキナーゼ（TK）活性

【実施日：移植前日、移植後12週・24週観察時、毎予後調査時（48
週・96週・144週・192週・240週）】

・ 抗 FBS 抗体検査

【実施日：移植前日、移植後入院観察時（7日後）、毎外来観察時、
毎予後調査時】

・ 抗 LCAT 抗体検査

【実施日：移植前日、移植後入院観察時（7日後）、毎外来観察時、
毎予後調査時】

・ 血中 LCAT 活性測定（自己基質法・高感度検出法）

【実施日：移植前日、移植後入院観察時（翌日・4日後・7日後）、
毎外来観察時、毎予後調査時】

・ 臨床所見観察：

角膜混濁症状（視力、視野、角膜輪所見：眼球写真）

腎機能症状（尿蛋白量もしくは尿中アルブミン排泄量）

溶血性貧血症状（間接ビリルビン値、LDH 値、ハプトグロビン量）

【実施日：移植前日、移植後7日観察時、移植後1ヵ月・3ヵ月・
6ヵ月観察時、毎予後調査時】

・ クローナリティー検査：LAM-PCR 法

【実施日：移植部位観察、RCR・悪性腫瘍検査、血中 LCAT 活性測定、
マウスにおける移植細胞のクローナリティー検査等を総
合的に勘案のうえ、必要と判断された場合、移植部位を
生検し、検査を行う。】

表 16. 臨床検査・観察項目

	適格性 調査	移植用細胞調製					移植直後観察(入院管理)							移植3ヵ月後観察(2週毎)						移植6ヵ月後観察 (1ヵ月毎)			予後調査 [移植後 5年間調査] (3ヵ月毎)	
		脂肪組 織抽出	脂肪組織抽出後観察				移植	移植直後観察(入院管理)							移植3ヵ月後観察(2週毎)						移植6ヵ月後観察 (1ヵ月毎)			
			21日前 Day-21	20日前 Day-20	14日前 Day-14	1日前 Day -1		0日 Day 0	1日後 Day 1	2日後 Day 2	3日後 Day 3	4日後 Day 4	5日後 Day 5	6日後 Day 6	7日後 Day 7	2週後 2W	4週後 4W	6週後 6W	8週後 8W	10週後 10W	12週後 12W	16週後 16W		20週後 20W
診察 *1	◎	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	◎	○	○	◎	○
ウイルス検査 *2	○																							
脂肪採取部位観察		○	○	○																				
移植部位の所見観察 *10 (MRI 検査*)						○*	○	○	○	○	○	○	○	○	○*	○	○	○	○	○*	○	○	○*	○*
臨床 検査	血液学的検査 *3	○	○		○		○			○			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	血液生化学的検査 *4	○	○		○		○			○			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	尿検査 *5	◎	◎		◎		○			○			◎	◎	○	○	○	○	◎	○	○	◎	◎	◎
RCR・悪性腫瘍検査 *6				◎		○													◎		◎	◎*	◎*	
抗 FBS 抗体検査 *7				○										○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
抗 LCAT 抗体検査 *7				○										○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
血中 LCAT 活性測定 *8	○	○		○		○				○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
臨床所見観察 *9	○	○		○										○	○				○			○	○	○
クローナリティー検査 *11						○**																		
採血量 (mL)	40	30	—	—	50	—	40	—	—	30	—	—	30	30	30	30	30	30	30	50	30	30	50	50

*1 : 体重, 身長, 体温, 血圧, 脈拍, 本疾患関連以外の異常所見 (◎の時期については, 胸部X線と心電図を付加する)

*2 : B型肝炎ウイルス, C型肝炎ウイルス, ヒト免疫不全ウイルス, 成人型T細胞白血病ウイルス, ハルボウイルス B19

*3 : 白血球数, 赤血球数, ヘモグロビン量, ヘマトクリット値, 血小板数, 白血球像(分画), 赤血球像(形状)

*4 : 総蛋白, アルブミン, ハプトグロビン, 総ビリルビン, 間接ビリルビン, AST, ALT, LDH, ALP, γ -GTP, クレアチニン, 尿酸, BUN, Na, Cl, K, Ca, CRP, 中性脂肪, 総コレステロール, コレステロールエステル, LDLコレステロール, HDLコレステロール, リポ蛋白分画, アポリポ蛋白(A-I, A-II, B, C-II, C-III, E)

*5 : 潜血, ウロビリノーゲン, 沈渣 (◎の時期については, 24時間尿蛋白量あるいは尿中アルブミン排泄量および尿クレアチニンを付加する。)

*6 : RCR 検査: NAT 法

◎の時期については, RCR 検査(培養法)と悪性腫瘍検査(TK 活性検出法)を付加する。

* 移植後48週, 96週, 144週, 192週, 240週にRCR検査(NAT法及び培養法)と悪性腫瘍検査を実施する。ただし, 96週以降のRCR検査はNAT法のみ実施し, 培養法のため採取した検体は凍結保存し, NAT法で陽性と判定された場合にのみ実施する。

*7 : ELISA 法

*8 : 自己基質法(ネスコートLCATキット-S), 高感度検出法

*9 : 角膜混濁(視力・視野, 角膜輪所見: 眼球写真), 腎機能障害(尿蛋白量), 溶血性貧血(間接ビリルビン, LDH, ハプトグロビン)

*10 : 移植部位の所見観察(MRI 検査), RCR・悪性腫瘍検査, 血中LCAT活性測定, マウスにおける移植細胞のクローナリティー検査等を総合的に勘案のうえ, 必要に応じて移植部位を生検しLAM-PCR法にて検査および病理学的検査を実施する。

*11 : 移植細胞をマウスに移植後, 経時的にLAM-PCR検査を実施し, クローナリティーならびにがん化の有無を観察する。クローナリティーならびにがん化が否定できない場合には, 移植部位観察(MRI 検査), RCR・悪性腫瘍検査, 血中LCAT活性測定等を総合的に勘案のうえ, 必要に応じて移植部位を生検しLAM-PCR検査及び病理学的検査を実施する。

(5) 有害事象

1) 有害事象の定義

有害事象とは、皮下脂肪摘出（吸引）術や移植用細胞との因果関係の有無に関わらず、移植用細胞の移植中あるいは移植後に発現する好ましくない、あるいは異常な所見をいい、次のようなものが含まれる。

- ・ 新たに発現した疾患及び症状
- ・ 合併症の悪化
- ・ 事故
- ・ 検査値の異常変動
- ・ 移植終了後に発現した好ましくない所見
- ・ 薬剤相互作用による好ましくない所見
- ・ 過剰投与（医師の判定による）の影響
- ・ 濫用の影響
- ・ 依存性の発現

有害事象の発現の有無に関しては診察時の問診および診察時以外の被験者からの自発報告に基づいて研究者等が判断する。

2) 有害事象の評価

有害事象が発現した場合には、有害事象名、発現日（臨床検査異常変動の場合は検査日）、重篤度（【重篤度の判定基準】を参照）、移植用細胞の移植状況〔継続、摘出〕、処置〔なし、あり（ありの場合はその内容）〕、有害事象の転帰（【有害事象の転帰】を参照）、移植用細胞との因果関係（【移植用細胞との因果関係の判定基準】を参照）を症例報告書の有害事象欄に記載する。また、原則として症状が消失する（臨床検査値に関しては移植前値に復する）まで追跡調査する。

重篤度は、下記の判定基準で研究者が判断する。重篤度とは、薬事法施行規則第64条の5の2に定められた基準であり、具体的には下記の判定基準の3～8が「重篤」に該当する。

【重篤度の判定基準】

- ・ 非重篤
 1. 軽微：特別な治療なしに軽快するもの
 2. 中等度：重篤でなく且つ、軽微でないもの
- ・ 重篤
 3. 死亡
 4. 障害
永続的または顕著な障害若しくは機能不全に陥る症例
 5. 死亡又は障害につながるおそれのある症例
死亡につながるおそれとは、患者が死の危険にさらされていた状態があり、その後に脱却した場合
 6. 治療のための入院または入院期間の延長
検査目的および有害事象が治癒または軽快しているものの経過観察のための入院・入院期間の延長を除く
 7. 3から6までに掲げる症例に準じて重篤である症例
3から6の結果に至らぬように処置を必要としたような重大事象
 8. 後世代における先天性の疾病または異常
妊娠前または妊娠中の移植用細胞の移植により出生児に異常をきたしたと疑われる場合

【有害事象の転帰】

1. 回復：有害事象が消失した場合。消失日を記入する。

2. 軽快：有害事象は消失していないが、その程度が減じた場合
3. 未回復：有害事象が消失せず、その程度も減じていない、あるいは悪化した場合
4. 後遺症：有害事象に起因して日常生活に支障を来たす程度の機能不全が起きたと判断した場合
5. 死亡：死亡日を記入する

【移植用細胞との因果関係】

有害事象と移植用細胞との因果関係は、被験者の状態、原疾患、合併症、既往歴、使用薬剤、移植用細胞の移植と有害事象発現までの時間的關係等を勘案して、下記の基準を参考に判定し、必ず判定理由をコメント欄に記載する。有害事象のうち移植用細胞との因果関係が否定できないもの（因果関係：あり、疑いあり）を副作用、移植用細胞との因果関係が否定できるもの（因果関係：なし）を偶発症として扱う。

[判定基準]

1. なし：移植開始から有害事象発現までの時間的な経過から移植用細胞との関係はないと考えられる、または有害事象が移植用細胞以外の原疾患、来院時合併症、他の薬剤等の影響と考えられる場合等
2. 疑いあり：移植開始から有害事象発現までの時間的な経過から移植用細胞との関係が疑われるが、原疾患、来院時合併症、他の薬剤等の影響も否定できない場合等
3. あり：移植開始から有害事象発現までの時間的な経過から移植用細胞との関係があると考えられ、原疾患、来院時合併症、他の薬剤等の影響はない、またはこれらに比較して明らかに移植用細胞の影響が大きいと考えられる場合等

3) 予測される有害事象（副作用）ならびにその対処方法

① 脂肪組織採取時における危険性

脂肪組織採取は被験者の侵襲を最小限に止めるために、局部麻酔下にて小切開での脂肪摘出術により実施するが、術後に、術部に違和感や痛みが残る場合があるので、この場合は鎮痛薬の服用などの適切な処置を行なう。また、術後の術部に細菌感染が発生する可能性もあるので、術後における術部管理の指導を行なうとともに、感染が疑われる場合には、抗生剤などの投与を行なう。

② 移植用細胞の移植における危険性

移植用細胞の調製工程は、細菌・真菌をはじめとする不純物を含まない無菌的な管理のもとに実施されるが、細菌・真菌などが混入するリスクを完全に否定することはできないことから、移植用細胞の移植後においては、血液・尿検査結果などをもとに被験者の経過を注意深く観察し、これら感染の疑われる場合は、抗生剤、抗真菌剤などの投与を行なう。牛胎児血清、MesenPRO RS、ヒト血清アルブミン及び生理的組織接着剤（既承認市販品の血漿分画製剤）は、その製造に際して感染症伝播を防止のための安全対策を講じており、本製剤の使用による感染症の危険性は極めて低いと考えられる。しかし、ウシ及びヒト血液を原材料としていることに由来する感染症伝播のリスクを完全には排除できないため、本製剤の危険性を患者に十分説明のうえ使用するとともに、移植後の患者の経過を十分に観察する。

また、移植用細胞として移植するヒト前脂肪細胞は分化能を有する細胞であるため、移植後の体内における異常な分化・増殖の可能性も否定できないこ

とから、移植部位の所見 (MRI 検査)、RCR・悪性腫瘍検査、血中 LCAT 活性測定、マウスにおける移植細胞のクローナリティー検査結果などをもとに被験者の経過を注意深く観察し、そのような事象 (移植部位の腫脹、LCAT の過剰産出など) が発現した場合は、移植部位の組織を生検し、病理組織学的検査および LAM-PCR 検査を行い、その結果により異常な分化・増殖が認められれば、移植細胞の摘出などの適切な処置を行なう。

③ RCR の危険性

本臨床研究において、RCR が出現する可能性は極めて低い。また、たとえ RCR が PCR 検査等で検出されても、マウス由来のパッケージ細胞株より産出されるレトロウイルスはヒト補体により破壊されるので、血液中でウイルスが一過性に検出される可能性はあっても、特に悪性リンパ腫を誘引することはないと考えられている。

しかし、万が一ヒト細胞から RCR が出現した場合には、悪性リンパ腫を発症する可能性を完全に否定できないことから、悪性リンパ腫検査結果などをもとに被験者の経過を注意深く観察し、悪性リンパ腫などの発症が疑われるような事象が発現した場合は、直ちに精密検査などを実施するなど十分な症状の把握を行った後、適切に対処する。

④ 過敏症等の危険性

LCAT 欠損マウスへの移植用細胞の移植実験においてヒト LCAT 抗体に対する抗体の発現が確認されており、家族性 LCAT 欠損患者への自家移植においても抗体が発現し過敏症や効果減弱が推定される。このため本臨床研究では、LCAT 遺伝子にミスセンス変異を持ち、かつ血中に LCAT 蛋白が免疫学的に検出される患者を対象とする。しかし、LCAT 遺伝子変異によっては異常な高次構造をとる可能性が考えられ、正常な LCAT にもかかわらずこれを抗原として認識し、アナフィラキシーショック、過敏症などの免疫応答異常を発現する可能性は否定できない。このため、移植後は観察を十分行くとともに抗 LCAT 抗体検査を行い、万一免疫応答異常などの所見が認められた場合には直ちに移植部の摘出を含め適切な処置を行い、その後の経過観察を行う。また、このような症状の発現に備え、緊急処置の取れる準備を行う。

4) 重篤な有害事象 (副作用) に関する報告の手順

臨床研究の進行中に、被験者が死亡した場合、被験者に重篤な副作用が生じた場合、内外の情報から臨床研究の実施に影響を及ぼす可能性のある知見を発見した場合、以下の連絡手順 (別添資料 12 参照) による速やかな対応を行い、実施施設の長 (「病院長」) は、指針第 3 章第 4 の 4 に基づき、「遺伝子治療臨床研究重大事態等報告書」(別添資料 7) により、厚生労働大臣および文部科学大臣に報告を行う。

厚生労働大臣および文部科学大臣宛の連絡先は、以下の通りである。

厚生労働省 大臣官房厚生科学課 〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2 TEL : 03-3595-2171 FAX : 03-3503-0183	文部科学省 研究振興局ライフサイエンス課 生命倫理・安全対策室 〒100-8966 東京都千代田区霞が関 1-3-2 TEL : 03-5253-4113 FAX : 03-5252-4114
--	---

- 1) (第一報) 重篤な有害事象が発生した場合、総括責任者又は代理の者は認知してから 24 時間以内に病院長に口頭または電話で連絡する。また、総括責任者又は代理の者は速やかに厚生労働省、文部科学省に連絡する(第一報)。
- 2) (一次報告) 第一報を受けて、病院長は遺伝子治療臨床研究審査委員会(以下「審査委員会」)委員長(安全・効果評価・適応判定小委員会(以下「小委員会」)の主査を兼務)に有害事象対応を依頼する。審査委員会委員長が兼務する小委員会主査は小委員会を招集する。小委員会は、総括責任者からのデータにもとづき当該時点までに把握できている情報を記載した一次報告書(別添資料 7)をもって審査委員会に答申し、審査委員会は病院長に報告する。病院長は一次報告書を厚生労働省、文部科学省に FAX にて送付する(一次報告)。一次報告は認知してから 72 時間以内に完了する。
- 3) (緊急対策協議) 小委員会は、重篤な有害事象について引き続き緊急対策の協議を行い、その結果を審査委員会に答申する。当該答申を受け審査委員会は審議し、審査委員会は病院長にその結果を報告する。
- 4) (緊急対策指示と処置) 病院長は、審査委員会及び小委員会による緊急対策に関する協議結果を総括責任者に報告・指示する。総括責任者と実施担当医師はそれに基づき患者に処置を行う。
- 5) (総括責任者による二次報告書作成) 総括責任者は、認知してから 7 日以内に、4) の患者の処置、経緯および追加詳細データにもとづき二次報告書(別添資料 7)を作成し、病院長に報告する。
- 6) (小委員会による二次報告書の評価) 病院長は二次報告書を以て、審査委員会での評価を審査委員会委員長に依頼する。審査委員会からの諮問により、小委員会は二次報告書を受けて評価を行い、審査委員会に答申する。
- 7) (審査委員会による二次報告書の評価) 審査委員会は、小委員会からの答申を受け、評価された二次報告書にもとづき審議を行い評価した二次報告書を病院長に文書報告する。
- 8) (二次報告) 病院長は二次報告書を厚生労働省、文部科学省に認知してから 15 日以内に報告する(二次報告)。
- 9) (最終報告) 総括責任者は、重篤な有害事象の転帰確定後「重篤な有害事象に関する報告書」を完成させ(最終報告)、病院長に報告する。病院長は、審査委員会委員長に、審査委員会での最終報告書の評価を依頼する。審査委員会は、病院長の依頼に基づき、最終報告書に関する評価・審議を行い、評価した最終報告書を病院長に文書報告する。病院長は最終報告を厚生労働省、文部科学省に提出・報告する。

(6) 本臨床研究の評価方法、評価基準および中止判定基準、症例の取扱基準

1) 遺伝子治療臨床研究審査委員会(審査委員会)における評価

本臨床研究に関する安全性および有効性などに関する評価については、審査委員会で行ない、その結果は総括責任者に報告する。

① 1次評価

審査委員会は、移植 3 ヶ月後の各パラメータの結果から症例毎の安全性および有効性についての中間評価（一次評価）を行い、その評価結果を総括責任者に通知する（「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の安全性・有効性評価通知票」別添資料 8）とともに審査委員会委員長に報告する。なお、審査委員会ではこの評価にもとづき、次の症例の組入れの可否を判断する。

② 最終評価

審査委員会は、移植 6 ヶ月後の各パラメータの結果から症例毎の安全性および有効性についての評価を行い、その評価結果を総括責任者に通知する（「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の安全性・有効性評価通知票」別添資料 8）とともに審査委員会委員長に報告する。

なお、この評価結果を、本臨床研究における症例の最終評価と位置づける。

③ 予後評価

審査委員会は、移植後 5 年間ににおける予後調査が終了後、各パラメータの結果から症例毎の安全性および有効性についての評価を行い、委員長がその評価結果を病院長に報告するとともに総括責任者に通知する（「LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の安全性・有効性評価通知票」別添資料 8）。

また、特に予期せぬ重大な副作用の発現、不測の事態の発生などが生じた場合は、研究者を含めた審査委員会にて速やかに評価し、その対応を検討する。病院長はその結果を厚生労働省及び文部科学省に報告する。

2) 臨床研究の中止判定基準

審査委員会が、症例観察終了時に本臨床研究に関する安全性および有効性について評価、分析した結果、または経過観察中において発生した副作用について評価、分析した結果、以下の判断に至った場合は本臨床研究を中止する。

- ・ 副作用等の発生により安全性に重大な問題があると判断した場合
- ・ 臨床研究継続が倫理上問題であると判断した場合
- ・ その他、中止が妥当であると判断した場合

3) 症例の取扱基準

本臨床研究の実施中において以下の事象が発生した場合は、中止、脱落もしくは未処置として取り扱う。

① 中止

- ・ 移植用細胞の移植後、症状の増悪をきたし、他の治療へ変更する必要がある、本臨床研究の継続が困難と判断された場合
- ・ 移植用細胞の移植後、有害事象の発現を認め、本臨床研究の継続が困難と判断された場合
- ・ 移植用細胞の移植後に、選択基準の逸脱、除外基準への抵触などの本臨床研究実施計画書からの重大な逸脱が判明し、その逸脱内容により審査委員会が中止すべきと判断した場合
- ・ その他、総括責任者あるいは審査委員会が中止すべきと判断した場合

② 脱落

- ・ 移植用細胞の移植後、被験者が臨床研究参加の同意を撤回した場合
- ・ 移植用細胞の移植後、被験者との連絡が不通となったため、あるいは被験者の都合により来院しなくなったために、移植後の観察、検査の実施継続が困難となった場合
- ・ その他、被験者の都合により臨床研究の継続が困難と判断された場合

③ 未処置（移植せず）

- ・ 移植用細胞の調製に必要な量の脂肪組織が採取できなかった場合

- ・ 移植用細胞の調製過程でその品質が損なわれる事態が発生し、移植用細胞の移植に至らなかった場合
 - ・ 脂肪組織の採取後、移植用細胞移植後の観察期間終了までの間に、被験者が臨床研究参加の同意を撤回した場合
 - ・ 脂肪組織の採取後、移植用細胞の移植までの間に、被験者の容態が変化し、選択基準の逸脱もしくは除外基準に抵触することが判明した場合
 - ・ その他、脂肪組織の採取後に、研究者が移植用細胞の移植を中止すべきと判断した場合
- ④ 中止、脱落及び未処置時の対応
- ・ 症例が未処置で終わった場合には、脂肪組織採取部位の観察を十分に行い、脂肪組織採取の影響が排除されたことを確認する。
 - ・ 症例が中止、脱落と判断された場合は、その時点で得られているデータにより可能な限りの評価を行うとともに、被験者の意思を確認した上で、移植用細胞の移植部位周辺の脂肪組織を十分に摘出し、移植による影響が排除されたことが確認されるまで観察を続ける。
 - ・ 被験者の都合により来院しなくなった脱落症例については、可能な限り追跡調査を実施し、その理由、有害事象の有無、症状の経過などを聴取する。

(7) データの集計および統計解析

1) データの集計

① 安全性評価対象データ

ア) 皮下脂肪組織採取

i) 診察：体重、身長、体温、血圧、脈拍、本疾患関連以外の異常所見

【実施日：採取当日（採取前後）、採取翌日、採取1週後】

ii) 採取部位の所見観察（異常の有無）

【実施日：採取当日（採取前後）、採取翌日、採取1週後】

イ) 移植用細胞の移植後より6ヵ月間（一次評価：移植3ヵ月後、最終評価：移植6ヵ月後）

i) 診察：体重、身長、体温、血圧、脈拍、胸部X線*1、心電図*1、
本疾患関連以外の異常所見

【実施日：移植前日、移植当日（移植後）、毎移植後入院観察時、毎外来観察時、毎予後調査時

*1 胸部X線と心電図については、移植後3ヵ月・6ヵ月観察時においてのみ実施する】

ii) 移植部位の所見観察（異常の有無）

腹部MRI検査

【実施日：移植当日（移植後）、毎移植後入院観察時、毎外来観察時、毎予後調査時】

iii) 臨床検査：

(a) 血液学的検査：

白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、
血小板数、白血球像（分画）、赤血球像（形状）

(b) 血液生化学的検査（一般）：

総蛋白、アルブミン、ハプトグロビン、総ビリルビン、
間接ビリルビン AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、クレアチニン、尿酸、BUN、Na、Cl、K、Ca、CRP

- (c) 血液生化学的検査 (脂質関連) :
 中性脂肪、総コレステロール、コレステロールエステル、
 LDL コレステロール、HDL コレステロール、リポ蛋白分画、
 アポリポ蛋白 (A-I、A-II、B、C-II、C-III、E)
- (d) 尿検査 :
 潜血、ウロビリノーゲン、沈渣、尿クレアチニン*²、
 尿蛋白量 (もしくは尿中アルブミン排泄量) *²、
 【実施日 : 移植後入院観察時 (翌日・4 日後・7 日後)、毎外
 来観察時、毎予後調査時
 *² 尿蛋白量 (もしくは尿中アルブミン排泄量) お
 よび尿クレアチニン検査については、臨床所見
 観察時 (移植後 7 日観察時、移植後 1 ヶ月・3
 ヶ月・6 ヶ月観察時および毎予後調査時) に実
 施する】
- iv) RCR 検査 : NAT 法、培養法*³
 【実施日 : 移植後入院観察時 (翌日)、移植後 12 週・24 週、
 毎予後調査時 (48 週・96 週・144 週・192 週・240
 週)
 *³ 培養法による RCR 検査については移植前日、移植後 12
 週・24 週、毎予後調査時 (48 週) 観察時において、NAT
 法と併用で実施する。ただし、毎予後調査時 (96 週・
 144 週・192 週・240 週) に培養法のため採取した検体
 は凍結保存し、NAT 法で陽性と判定された場合にのみ
 実施する。】
- v) 悪性リンパ腫マーカー検査 : チミンジキナーゼ (TK) 活性
 【実施日 : 移植後 12 週・24 週観察時、毎予後調査時 (48 週・
 96 週・144 週・92 週・240 週)】
- vi) 抗 FBS 抗体検査
 【実施日 : 移植後入院観察時 (7 日後)、毎外来観察時、毎予
 後調査時】
- vii) 抗 LCAT 抗体検査
 【実施日 : 移植後入院観察時 (7 日後)、毎外来観察時、毎予
 後調査時】
- viii) 血中 LCAT 活性測定 (自己基質法・高感度検出法)
 【実施日 : 移植後入院観察時 (翌日・4 日後・7 日後)、毎外
 来観察時、毎予後調査時】
- ウ) 移植用細胞の移植 6 ヶ月後より 54 ヶ月 (毎予後調査時安全性評価)
- i) 診察 : 体重、身長、体温、血圧、脈拍、胸部 X 線、心電図、
 本疾患関連以外の異常所見
- ii) 移植部位の所見観察 (異常の有無)
- iii) 臨床検査 :
- (a) 血液学的検査 :
 白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、
 血小板数、白血球像 (分画)、赤血球像 (形状)
- (b) 血液生化学的検査 (一般) :
 総蛋白、アルブミン、ハプトグロビン、総ビリルビン、
 間接ビリルビン AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、
 クレアチニン、尿酸、BUN、Na、Cl、K、Ca、CRP

(c) 血液生化学的検査 (脂質関連) :

中性脂肪、総コレステロール、コレステロールエステル、
LDL コレステロール、HDL コレステロール、リポ蛋白分画、
アポリポ蛋白 (A-I、A-II、B、C-II、C-III、E)

(d) 尿検査 :

潜血、ウロビリノーゲン、沈渣、尿クレアチニン、
尿蛋白量 (もしくは尿中アルブミン排泄量)、

- iv) RCR 検査 : NAT 法、培養法
- v) 悪性リンパ腫マーカー検査 : チミンジキナーゼ (TK) 活性
- vi) 抗 FBS 抗体検査
- vii) 抗 LCAT 抗体検査
- viii) 血中 LCAT 活性測定 (自己基質法・高感度検出法)

② 有効性評価対象データ

ア) 移植用細胞の移植後より 6 ヶ月間 (一次評価 : 移植 3 ヶ月後、最終評価 : 移植 6 ヶ月後)

有効性評価項目の解析で対象とするデータは、移植用細胞の移植開始前、移植 1 日後、4 日後、1 週後、2 週後、1 ヶ月後、6 週後、2 ヶ月後、10 週後、3 ヶ月後、4 ヶ月後、5 ヶ月後、6 ヶ月後の測定データとする。移植開始前データは、移植前における適格性調査時、脂肪組織採取時、移植前日の 3 時点の測定データの平均値 (要約値) とする。

- i) 血中 LCAT 活性 (自己基質法・高感度活性測定法)
- ii) 血液生化学的検査 (脂質代謝関連) :
総コレステロール、中性脂肪、コレステロールエステル、
LDL コレステロール、HDL コレステロール、リポ蛋白分画、
アポリポ蛋白 (A-I、A-II、B、C-II、C-III、E)
- iii) 尿蛋白量 (尿蛋白量もしくはアルブミン排泄量) *
顕性蛋白尿の場合は総蛋白排泄量、早期腎障害の場合は微量アルブミン排泄量 (一日蓄尿にて測定)
- iv) 溶血性貧血指標
間接ビリルビン、LDH、ハプトグロビン
- v) 視力、視野 (視野検査値) *
- vi) 角膜混濁 (角膜輪所見の変遷 : 眼球写真による) *

* 本項目については、移植 1 週後、1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後にのみ実施する

イ) 移植用細胞の移植 6 ヶ月後より 54 ヶ月 (毎予後調査時有効性評価)

予後調査時有効性評価の解析で対象とするデータは、移植用細胞の移植開始前、移植 6 ヶ月以降 3 ヶ月毎、移植 60 ヶ月後までの合計 18 測定データ (検査入院) とする。移植開始前データは、移植前における適格性調査時、脂肪組織採取時、移植前日の 3 時点の測定データの平均値 (要約値) とする。

- i) 血中 LCAT 活性 (自己基質法・高感度活性測定法)
- ii) 血液生化学的検査 (脂質代謝関連) :
総コレステロール、中性脂肪、コレステロールエステル、
LDL コレステロール、HDL コレステロール、リポ蛋白分画、
アポリポ蛋白 (A-I、A-II、B、C-II、C-III、E)
- iii) 尿蛋白量 (尿蛋白量もしくはアルブミン排泄量)
顕性蛋白尿の場合は総蛋白排泄量、早期腎障害の場合は微量アルブミン

- ン排泄量（一日蓄尿にて測定）
- iv) 溶血性貧血指標
間接ビリルビン、LDH、ハプトグロビン
- v) 視力、視野（視野検査値）
- vi) 角膜混濁（角膜輪所見の変遷：眼球写真による）

2) 統計解析

① 安全性の評価

- ア) 有害事象発現および副作用発現に関する評価
皮下脂肪組織摘出前後の臨床データ、LCAT 遺伝子導入ヒト脂肪細胞および移植用細胞の品質試験データ（症例報告書記載）、移植部位の所見、体重、身長、体温、血圧、脈拍および本疾患関連以外の異常所見および臨床検査値の推移より症例毎に評価を行う。
- イ) 血中 LCAT 活性および臨床検査値の推移図からの評価
症例毎に移植前と移植後各観察時期における「血中 LCAT 活性および安全性評価に関する各臨床検査値の時系列推移図」を作成し、その推移様式より症例毎に安全性を判定する。

② 有効性の評価

移植用細胞の有効性は、家族性 LCAT 欠損症に伴う以下の臨床所見（検査値および眼底所見など）の個々の推移を観察し、以下の基準を参考に探索的に検討する。

- ・血中 LCAT 活性（自己基質法・高感度活性測定法）
- ・血液生化学的検査（脂質代謝関連）：
総コレステロール、中性脂肪、コレステロールエステル、LDL コレステロール、HDL コレステロール、リポ蛋白分画より、以下の有効性評価指標を求める。
 - i) コレステロールエステル比
=コレステロールエステル／総コレステロール
 - ii) HDL-コレステロール
 - iii) HDL-コレステロール／LDL-コレステロール
 - iv) α リポ蛋白比
 - v) 総コレステロール
 - vi) 中性脂肪
- ・尿蛋白量（尿蛋白量もしくはアルブミン排泄量）
顕性蛋白尿の場合は、総蛋白排泄量を指標とし、早期腎障害の場合は、微量アルブミン排泄量を指標とし、一日蓄尿にて測定する。
- ・溶血性貧血指標
間接ビリルビン、LDH、ハプトグロビン
- ・視力、視野（視野検査値）
- ・角膜混濁（角膜輪所見の変遷：眼球写真による）
- ア) 血中 LCAT 活性と各有効性評価項目の移植前後の分散図からの評価
症例毎に移植前と移植後各観察時期における、「血中 LCAT 活性と各有効性評価項目の移植前後の分散図」を作成し、その分散様式より有効性を探索的に検討する。
- イ) 血中 LCAT 活性と各有効性評価項目の移植前後の推移図からの評価
症例毎に移植前と移植後各観察時期における、「血中 LCAT 活性および各

有効性評価項目の時系列推移図」を作成し、その推移様式より各症例毎に有効性を探索的に検討する

(8) 本臨床研究の倫理的実施及び被験者の安全性確保

・ 遺伝子治療臨床研究に関する関連指針の遵守

本臨床研究は、ヘルシンキ宣言（参考資料3）に基づく倫理的原則、「遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成14年3月27日制定、平成16年12月28日全部改正 文部科学省・厚生労働省告示第2号）」（参考資料4）、「臨床研究に関する倫理指針（平成15年7月30日制定、平成16年12月28日全部改正 厚生労働省告示第459号）」を遵守し、また「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成9年3月27日付、厚生省令28号）および「その一部を改正する省令ならびにそれらの関連通知」に準拠して実施する。また、本臨床研究に供する移植用細胞の製造は、その品質、有効性および安全性を確保すべく、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成9年厚生省令第28号）」に基づく「治験薬の製造管理及び品質管理基準および治験薬の製造施設の構造設備基準（治験薬 GMP）について（平成9年3月31日薬発第480号厚生省薬務局長通知）」を満たす製造施設において製造する。

これらに加え、本臨床研究は以下の法令及び省令を遵守して実施される。

- ① 遺伝子組換え微生物の使用等による医薬品等の製造における拡散防止措置等について（平成16年2月19日薬食発第0219011号）
- ② 遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について（平成7年11月15日薬発第1062号）
- ③ 遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針の改正について（平成14年3月29日医薬発第329004号）
- ④ 遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針の一部改正について（平成16年12月28日薬食発第1228004号）
- ⑤ ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について（平成20年2月8日薬食発第0208003号）
- ⑥ 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成15年法律第97号）
- ⑦ ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成18年7月3日健発第0703003号）

・ 千葉大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会（審査委員会）等による審議

本臨床研究実施に先立ち、審査委員会において、本臨床研究実施申請書、本臨床研究実施計画書及び被験者への説明・同意文書の記載内容および本臨床研究実施の適否に関して、科学的、倫理的観点より審議される。更に審査委員会において承認を得た後、厚生労働省厚生科学審議会科学技術部会において、科学的、倫理的観点より審議される。

また、本研究実施計画書の変更等についても、同様の手続きを行う。

・ 副作用発生時の対応

本臨床研究において発生した副作用に関しては、その症状が消失または軽

快するまで追跡調査を行う。また、その症状に対する治療が必要となった場合には、速やかにその旨を被験者に伝えると同時に、適切な処置を施し、被験者の安全確保に留意し、その原因究明に努める。

予期せぬ重大な副作用の発現、不測の事態の発生などが生じた場合は、研究者を含めた審査委員会にて速やかにその対応を検討すると同時に、審査委員会にて評価を行ない、病院長が 15 日以内に厚生労働省および文部科学省に報告する。

(9) 健康被害補償

本臨床研究において発生した健康被害に対しては、千葉大学医学部附属病院で医療費の負担なしに、必要かつ適切な治療が受けられることとする。ただし、金銭的な補償はしない。

また、以下の場合においては、被験者の臨床研究への参加中止に同意した時点から、通常の保険診療となるものとする。

- ・ 健康被害と本臨床研究との因果関係が明らかに否定できる場合
- ・ 臨床研究中でなくても発生したと考えられる事故によって健康被害が発生した場合
- ・ 症状が悪化して治療方法を変える必要がある場合
- ・ 被験者の故意または重大な過失によって健康被害が生じた場合

なお、被験者より賠償請求を受けた場合などに備えて、臨床研究に対する賠償責任保険の付保を行うものとする（参考資料5）。

(10) 症例記録に関する記録用紙等の様式

一般患者と同様に、カルテに被験者の容態、治療内容、検査内容と結果などを記載するが、本臨床研究に関する被験者情報については、別途「症例記録用紙」の書式に準じて記録し、カルテに添付する。

(11) 記録の保存および成績の公表方法

本臨床研究に関する記録については、一般患者と同様にカルテの保存に準じて保存する。

また、成績の公表に関しては、本臨床研究の総括責任研究者の判断により行われるが、事前に遺伝子治療臨床研究審査委員会の了解を得ることとする。

これらの場合を含め、本臨床研究を通して取得された個人情報に関しては、プライバシー保護の観点より慎重に取り扱い、文部科学省・厚生労働省の「遺伝子治療臨床研究に関する指針」（平成 14 年 3 月 27 日制定、平成 16 年 12 月 28 日全部改正）個人情報保護法（平成 15 年 5 月 30 日制定）および「千葉大学医学部附属病院の個人情報保護に関する基本方針」（参考資料6）を遵守し、決して本臨床研究以外の目的で利用することはせず、また公表も行なわない。

XI. 当該遺伝子治療臨床研究の実施施設の状況

本遺伝子治療臨床研究は千葉大学医学部附属病院 1 階 細胞調製室及び同新病院棟 1 階 未来開拓医療センター 遺伝子治療室 1 において実施する。なお、前脂肪細胞への遺伝子の組み込み作業は、病院内にある細胞調製室（クラス 10,000 かつ P2 レベル対応）に設置した安全キャビネット内（クラス 100）において担当者が行う。

- 「細胞調製室見取図」 (別添資料 9)
「病院棟 1 F 見取図」 (別添資料 10)
「新病院棟 1 F 見取図」 (別添資料 11)

XII. 当該遺伝子治療臨床研究に関連する国内外の研究状況

本遺伝子治療臨床研究で実施しようとしている家族性 LCAT 欠損症患者を対象としたヒト前脂肪細胞を用いた遺伝子治療に関しては、現在のところ、国内外において研究を実施した、あるいは実施している報告はない。

XIII. 研究者の略歴、研究業績

横手 幸太郎

略歴 : 昭和63年 千葉大学医学部卒業
昭和63年 千葉大学医学部附属病院研修医
平成1年 東京都老人医療センター医員
平成4年 ルードウィック癌研究所 (スウェーデン) 客員研究員
平成8年 スウェーデン国立ウプサラ大学大学院博士課程修了 (PhD)
平成10年 千葉大学大学院博士課程修了 (医学博士)
平成10年 日本学術振興会特別研究員
平成11年 千葉大学医学部附属病院 糖尿病代謝内分泌内科 助手
平成18年 千葉大学医学部附属病院 糖尿病代謝内分泌内科 講師
平成18年 千葉大学大学院医学研究院細胞治療学 講師
平成21年 千葉大学大学院医学研究院細胞治療学 (現 細胞治療内科学)

教授

千葉大学医学部附属病院 糖尿病代謝内分泌内科科長

専門 : 内科学、老年医学

研究業績 :

- 1) Efficacy and safety of pitavastatin in Japanese patients with hypercholesterolemia: LIVES study and subanalysis. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 9:555-562; 2011.
- 2) The roles of transforming growth factor- β and Smad3 signaling in adipocyte differentiation and obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 407:68-73; 2011.
- 3) Dysadipocytokemia in Werner syndrome and its recovery by treatment with pioglitazone. *Diabetes Care.* 27:2562-2563; 2004.
- 4) Metabolic improvement and abdominal fat redistribution in Werner syndrome by pioglitazone. *J. Am. Geriatr. Soc.* 52:1582-1583; 2004.
- 5) Bone Marrow-derived Vascular Cells in Response to Injury. *J. Atheroscler. Thromb.* 10:205-210; 2003.
- 6) Identification of Tyr-762 in the platelet-derived growth factor α -receptor as the binding site for Crk proteins. *Oncogene.* 16:1229-1239; 1998.

武城 英明

略歴 : 昭和58年 千葉大学医学部卒業
昭和61年 京都大学大学院医学研究科分子遺伝子学
平成 2年 千葉大学医学部内科学第二講座
平成 4年 ウィーン大学バイオセンター分子遺伝子学教室
平成 7年 千葉大学医学部内科学第二講座
平成 8年 千葉大学医学部附属病院第二内科 助手
平成13年 千葉大学大学院医学研究院臨床遺伝子応用医学 教授
平成25年 東邦大学医学部医学科臨床検査医学研究室 教授
千葉大学 客員教授

専門 : 動脈硬化・高脂血症・肥満症、分子遺伝学

研究業績 :

- 1) Background to discuss guidelines for control of plasma HDL-cholesterol in Japan. *J Atheroscler Thromb.* 19:207-212; 2012.
- 2) Two novel mutations of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) gene and the influence of APOE genotypes on clinical manifestations. *MDT Plus.* 4:299-302; 2011.
- 3) Ang II-stimulated migration of vascular smooth muscle cells is dependent on LR11 in mice. *J Clin Invest.* 118:2733-2746; 2008.
- 4) Implantation of primary cultured adipocytes that secrete insulin modifies blood glucose levels in diabetic mice. *Diabetologia.* 48:1614-1620; 2005.
- 5) Clinical features of familial hypercholesterolemia in Japan in a database from 1996-1998 by the research committee of the ministry of health, labour and welfare of Japan. *J Atheroscler Thromb.* 11:146-151; 2004 and *J Hum Genet.* 48:447-450; 2003.
- 6) Hypertriglyceridemia associated with amino acid variation Asn985Tyr of the RP1 gene. *J Hum Genet.* 48:305-308; 2003.
- 7) Elevated serum vascular endothelial growth factor is associated with visceral fat accumulation in human obese subjects. *Diabetologia* 46:1483-8; 2003
- 8) Alterations of insulin sensitivity by the implantation of 3T3-L1 cells in nude mice. A role for TNF-alpha? *Diabetologia* 45:518-26; 2002

佐藤兼重

略歴 : 昭和51年 千葉大学医学部卒業
昭和51年 昭和大学形成外科学教室入局
昭和56年 前橋赤十字病院形成外科医長
昭和58年 昭和大学形成外科講師
昭和59年 自治医大整形外科講師
昭和60年 フランス政府給費留学生・パリ大学附属サンルイ病院形成外科
昭和61年 昭和大学形成外科講師
平成8年 昭和大学形成外科助教授
平成14年 昭和大学形成外科教授
平成21年 千葉大学大学院医学研究院形成外科学教授

専門 : 形成外科・美容外科・頭蓋顔面外科・移植外科

研究業績 :

- 1) Platelet-rich plasma inhibits the apoptosis of highly adipogenic homogeneous preadipocytes in an in vitro culture system. *Exp Mol Med.* 44:330-339; 2012.
- 2) Reconstruction of a fingertip with a thenar perforator island flap. *J Plast Surg Hand Surg.* 45:294-299; 2011.
- 3) Marionette traction for Le Fort I maxillary Halo distraction in cleft patients. *J. Plast. Reconstr. Aesth. Surg.* 61:984-986; 2008.
- 4) Clinical success of mandibular distraction for obstructive sleep apnea resulting from micrognathia in 10 consecutive Japanese young children. *J. Craniofac. Surg.* 18:948-953, 2007.
- 5) Sinus pericrani associated with craniosynostosis. *J. Craniofac. Surg.* 18:78-84; 2007.
- 6) Le Fort III midfacial distraction using an internal distraction device for syndromic craniosynostosis: device selection, problems, indications and a proposal for use of a parallel bar for device-setting. *J. Craniofac. Surg.* 17:1050-1058; 2006.

花岡 英紀

略歴 : 平成 5年 千葉大学医学部卒業
平成12年 国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センター
(臨床医学審査官)
平成15年 千葉大学医学部附属病院第二内科助手
治験管理・支援センター(兼務)
平成19年 千葉大学医学部附属病院 臨床試験部副部長
平成20年 千葉大学講師・医学部附属病院 臨床試験部長

専門 : 内科学、医薬品評価学

研究業績 :

- 1) Selective Reduction and Recovery of Invariant V α 24J α Q TCR T Cells in Correlation with Disease Activity in Patients with Chronic Graft-versus-Diseases *千葉医学* 85:113-124; 2009
- 2) A phase I-II study of alpha-galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J Immunol.* 182:2492-2501; 2009.
- 3) 臨床開発の新たな地平 研究,教育と実践の調和を目指して-千葉大学における実践と経験を踏まえ新たな提案と展望-, 25 (12), 2009
- 4) 欧州における臨床試験の安全な実施と被験者保護体制, *医薬ジャーナル*, in press

窪田 吉孝

略歴 : 平成11年 千葉大学医学部卒業
平成11年 千葉大学医学部附属病院 形成外科
平成20年 深谷赤十字病院形成外科 形成外科部副部長
平成22年 千葉大学医学部附属病院 形成・美容外科 助教

専門 : 乳房再建、脂肪移植術、腹部形成術、美容外科、熱傷

研究業績 :

- 1) Fronto-parietal osteoblastoma with secondary aneurysmal bone cyst: A case report. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*
- 2) Association between plates location and plates removal following facial fracture repair. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 65:372-378; 2012.
- 3) Bidirectional fascia graft for congenital unilateral lower lip palsy in an adult. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 62:e121-e122; 2009.
- 4) Low-dose GH supplementation reduces the TLR2 and TNF-alpha expressions in visceral fat. *Biochem Biophys Res Commun.* 368:81-87; 2008.
- 5) Prevention of tourniquet pain by subcutaneous injection into the posterior half of the axilla. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 61:595-597; 2008.
- 6) Vastus medialis muscle flap and hemi V-Y skin flap for knee extensor and soft tissue reconstruction. *Ann Plast Surg* 56:196-199; 2006.

黒田 正幸

略歴 : 昭和58年 岡山大学薬学部卒業
平成5年 岡山大学大学院自然科学研究科 博士課程 修了
平成5年 岡山大学遺伝子実験施設 助手
平成6年 アメリカ合衆国ウェイン州立大学医学部 研究員
平成9年 高知医科大学医学部微生物学講座 助手
平成19年 セルジェンテック株式会社 マネージャー
平成19年 千葉大学附属病院細胞治療医薬寄附研究部門 客員准教授
平成21年 千葉大学大学院医学研究院臨床遺伝子応用医学 特任准教授
平成22年 千葉大学医学部附属病院未来開拓センター 特任准教授

専門 : ウイルス学

研究業績 :

- 1) Platelet-rich plasma inhibits the apoptosis of highly adipogenic homogeneous preadipocytes in an in vitro culture system. *Exp Mol Med.* 44:330-339; 2012.
- 2) Fibrin glue is a candidate scaffold for long-term therapeutic protein expression in spontaneously differentiated adipocytes *in vitro*. *Exp Cell Res.* 318:8-15; 2012.
- 3) Adipocytes as a vehicle for *ex vivo* gene therapy: Novel replacement therapy for diabetes and other metabolic diseases. *J. Diabetes Invest.* 2:333-340; 2011.
- 4) Ceiling culture-derived proliferative adipocytes retain high adipogenic potential suitable for use as a vehicle for gene transduction therapy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301:C181-C185; 2011.
- 5) Fibrin glue increases the cell survival and the transduced gene product secretion of the ceiling culture-derived adipocytes transplanted in mice. *Exp. Mol. Med.* 43:161-167; 2011.
- 6) Ceiling culture-derived proliferative adipocytes are a possible delivery vehicle in enzyme replacement therapy in lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *The Open Gene Ther. J.* 4:1-10; 2011.
- 7) Disturbed apolipoprotein A-I-containing lipoproteins in fish-eye disease are improved by the lecithin:cholesterol acyltransferase produced by gene-transduced adipocytes *in vitro*. *Mol. Genet. Metab.* 102:229-231; 2011.

引用文献

- 1) 前田 英一： 家族性 lecithin-cholesterol acyltransferase(LCAT)欠損症 日本臨牀 2001； 59： 290-294
- 2) 佐久間真樹：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) 1997； 536-538
- 3) 武城 英明、齋藤 康： LCAT 欠損症 *The Lipid* 1998； 9： 79-87
- 4) 後藤田真也： レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) 欠損症と魚眼病 日本臨牀別冊、先天代謝異常症候群 (下巻) 1998； 100-103
- 5) 武城 英明、齋藤 康： LCAT 異常の遺伝子診断 *The Lipid* 1997； 8： 77-84
- 6) 後藤田真也、山田信博： 家族性 LCAT 欠損症の遺伝子解析 動脈硬化症研究の進歩 1993； 14： 79-88
- 7) 木下 誠、寺本民生： 家族性 LCAT 欠損症 日本臨牀 1983； 41： 1832-1837
- 8) 西岡謙二、木下 誠、寺本民生： 魚眼病 日本臨牀 2001； 59： 341-343
- 9) Séguret-Macé S, Latta-Mahieu M, Castro G, Luc G, Fruchart JC, Rubin E, Denèfle P, and Duverger N: Potential gene therapy for lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT)-deficient and hypoalphalipoproteinemic patients with adenovirus-mediated transfer of human LCAT gene. *Circulation* 1996; 94:2177-2184
- 10) Sugihara H, Yonemitsu N, Miyabara S, and Yun K: Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. *Differentiation* 1986; 31:42-49
- 11) Miyazaki T, Kitagawa Y, Toriyama K, Kobori M, and Torii S: 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* 2005; 73:69-78
- 12) Ito M, Bujo H, Takahashi K, Arai T, Tanaka I, and Saito Y: Implantation of primary cultured adipocytes that secrete insulin modifies blood glucose levels in diabetic mice. *Diabetologia* 2005; 48:1614-1620
- 13) Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, and Bernad A: Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation. *Cancer Res.* 2005; 65: 3035-3039
- 14) Mammalian Gene Collection (MGC) Program Team: Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002； 99: 16899-16903
- 15) Mclean J, Fielding C, Drayna D, Dieplinger H, Bear B, Kohr W, Henzel W, and Lawn R: Cloning and expression of human lecithin-cholesterol acyltransferase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83:2335-2339
- 16) Reiser J, Zhang X-Y, Hemenway CS, Mondal D, Pradhan L, and La Russa VF: Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 2005; 5:1571-1584.
- 17) Matsumoto D, Sato K, Gonda K, Takaki Y, Shigeura T, Sato T, Aiba-Kojima E, Iizuka F, Inoue K, Suga H, and Yoshimura K: Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng.* 2006; 12:3375-3382

- 18) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, and Hedrick MH: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001; 7:211-218
- 19) 社内資料
- 20) 塙 秀樹, 島田 隆: レトロウイルスベクターによる遺伝子治療 *ウイルス* 2003; 53 : 177-183
- 21) Bakker AH, Van Dielen FM, Greve JW, Adam JA, and Buurman WA: Preadipocyte number in omental and subcutaneous adipose tissue of obese individuals. *Obes Res.*2004;12:488-498
- 22) Yu SS, Kim J-M, and Kim S: High efficiency retroviral vectors that contain no viral coding sequences. *Gene Therapy* 2000; 7: 797-804
- 23) Markowitz D, Goff S, and Bank A: Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 1988; 167:400-406
- 24) Moloney JB: Biological studies on a lymphoid-leukemia virus extracted from sarcoma 37. I. Origin and introductory investigations. *J Natl Cancer Inst.* 1960;24: 933-951
- 25) Kim SH, Yu SS, Park JS, Robbins PD, An CS, and Kim S: Construction of Retroviral Vectors with Improved Safety, Gene Expression, and Versatility. *J Virology* 1998; 72:994-1004
- 26) Markowitz D, Goff S, and Bank A: A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *Journal of Virology* 1988; 62: 1120-1124
- 27) 武城 英明 : Lecithin : cholesterol acyltransferase *動脈硬化* 1996 ; 23 : 397-402
- 28) Francone OL, Haghpassand M, Bennett JA, Royer L, and McNeish J: Expression of human lecithin:cholesterol acyltransferase in transgenic mice: effects on cholesterol efflux, esterification, and transport. *J Lipid Res.* 1997;38:813-822
- 29) Vaisman BL, Klein HG, Rouis M, Berard AM, Kindt MR, Talley GD, Meyn SM, Hoyt RF, Marcovina SM, Albers JJ, et al.: Overexpression of human lecithin cholesterol acyltransferase leads to hyperalphalipoproteinemia in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1995; 270: 12269-12275
- 30) Kotaro Yoshimura , Tomokuni Shigeura , Daisuke Matsumoto , Takahiro Sato , Yasuyuki Takaki , Emiko Aiba , Katsujiro Sato , Keita Inoue , Takashu Nagase , Isao Koshima and Koichi Gonda: *J Cell Physiol* 2006; 208: 64-76,
- 31) Baum C, Düllmann J, Li Z, Fehse B, Meyer J, Williams DA, and von Kalle C: Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood.* 2003; 101:2099-2114
- 32) Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, 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 LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, and Cavazzana-Calvo M: LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003; 302: 415-419
- 33) Kohn DB, Sadelain M, Dunbar C, Bodine D, Kiem HP, Candotti F, Tisdale J, Rivière I, Blau CA, Richard RE, Sorrentino B, Nolta J, Malech H, Brenner M, Cornetta K, Cavagnaro J, High K, and Glorioso J: American Society of Gene Therapy (ASGT) ad hoc subcommittee on retroviral-mediated gene transfer to hematopoietic stem cells. *Mol Ther.* 2003; 8:180-187
- 34) Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, Glader B, Chew AJ, Tai SJ, Herzog RW, Arruda V, Johnson F, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, High KA: Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with

an AAV vector. *Nat Genet* 2000, 24: 257-261.

- 35) Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, Tai SJ, Ragni MV, Thompson A, Ozelo M, Couto LB, Leonard DG, Johnson FA, McClelland A, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, Kay MA, High KA, Glader B., AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood*. 2003, 101: 2963-72
- 36) Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, Ozelo MC, Hoots K, Blatt P, Konkle B, Dake M, Kaye R, Razavi M, Zajko A, Zehnder J, Rustagi PK, Nakai H, Chew A, Leonard D, Wright JF, Lessard RR, Sommer JM, Tigges M, Sabatino D, Luk A, Jiang H, Mingozzi F, Couto L, Ertl HC, High KA, Kay MA., Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med*. 2006, 12:342-7
- 37) 小澤 敬也、AAV を利用した遺伝子治療、ウイルス 2007, 57, 47-56
- 38) Bruce C. Schnepf, K. Reed Clark, Dori L. Klemanski, Christina A. Pacak, and Philip R. Johnson., Genetic Fate of Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Genomes in Muscle., *J. Virol*, 2003, 77:3495–3504
- 39) Pike-Overzet K, van der Burg M, Wagemaker G, van Dongen JJ, Staal FJ. New insights and unresolved issues regarding insertional mutagenesis in X-linked SCID gene therapy. *Mol Ther*. 2007, 15:1910-1916
- 40) Thrasher A, Gaspar B. Severe adverse event in clinical trial of gene therapy for X-SCID. Letter to the American Society of Gene Therapy, 2007 (December 18, 2007, <http://www.asgt.org/UserFiles/XSCIDstatement.pdf>)
- 41) Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey-Abina S, Garrigue, Hauer J, Bokhard A, Soulier J, Delabesse E, Macintyre E, Radford I, Romana P, Wang G, Bushman F, Fischer A. Gene Therapy for SCID-X1. The 15th Annual Meeting of European Society of Gene and Cell Therapy, Rotterdam, The Netherlands, 2007 (Abstract Inv. 8, 2007)
- 42) Aranda P, Valdivielso P, Pisciotta L, Garcia I, Garcã A-Arias C, Bertolini S, Martã N-Reyes G, Gonzã Lez-Santos , Calandra S. Therapeutic management of a new case of LCAT deficiency with a multifactorial long-term approach based on high doses of angiotensin II receptor blockers (ARBs). *Clin Nephrol*. 2008; 69: 213-8
- 43) Rousset X, Vaisman B, Auerbach B, Krause BR, Homan R, Stonik J, Csako G, Shamburek R, Remaley AT. Effect of recombinant human lecithin cholesterol acyltransferase infusion on lipoprotein metabolism in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010; 335: 140-8
- 44) Chen Z, Chu D, Castro-Perez JM, Ni W, Zhang A, Krsmanovic ML, Xie D, Shah V, Stout SJ, McLaren DG, Stefanni AC, Lee SH, Roddy TP, Plump AS, Hubbard BK, Vogt TF, Zhou HH. AAV8-mediated long-term expression of human LCAT significantly improves lipid profiles in hCETP;Ldlr(+/-) mice. *J Cardiovasc Transl Res*. 2011; 4: 801-10
- 45) 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. c-MYC overexpression with loss of Ink4a/Arf transforms bone marrow stromal cells into osteosarcoma accompanied by loss of adipogenesis. *Oncogene*. 2010; 29: 5687-99
- 46) Kuroda M, Bujo H, Aso M, Saito Y. Adipocytes as a vehicle for ex vivo gene therapy: Novel replacement therapy for diabetes and other metabolic diseases. *J Diabet Invest*. 2011; 2: 333-40.
- 47) Kuroda M, Aoyagi Y, Asada S, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Machida K, Matsumoto F, Satoh K, Aso M, Saito Y. Ceiling culture-derived proliferative adipocytes are a possible delivery vehicle in enzyme replacement therapy in lecithin:cholesterol acyltransferase

- deficiency. *The Open Gene Ther. J.* 2011; 4: 1-10.
- 48) Aoyagi Y, Asada S, Kuroda M, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Aso M, Saito Y. Fibrin glue increases the cell survival and the transduced gene product secretion of the ceiling culture-derived adipocytes transplanted in mice. *Exp Mol Med.* 2011; 43: 161-7.
 - 49) Asada S, Kuroda M, Aoyagi Y, Fukaya Y, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Aso M, Satoh K, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Bujo H. Ceiling culture-derived proliferative adipocytes retain high adipogenic potential suitable for use as a vehicle for gene transduction therapy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011; 301: C181-C185.
 - 50) Aoyagi Y, Kuroda M, Asada S, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Aso M, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Bujo H. Fibrin glue is a candidate scaffold for long-term therapeutic protein expression in spontaneously differentiated adipocytes in vitro. *Exp Cell Res.* 2012; 318: 8-15.
 - 51) Asada S, Kuroda M, Aoyagi Y, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Aso M, Saito Y. Disturbed apolipoprotein A-I-containing lipoproteins in fish-eye disease are improved by the lecithin:cholesterol acyltransferase produced by gene-transduced adipocytes in vitro. *Mol Genet Metab.* 2011; 102: 229-31.
 - 52) Dunbar CE, Larochelle A. Gene therapy activates EVI1, destabilizes chromosomes. 2010; *Nat Med.* 16:163-165.
 - 53) Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, Jauch A, Burwinkel B, Kinner A, Schmidt M, Krämer A, Schwäble J, Glimm H, Koehl U, Preiss C, Ball C, Martin H, Göhring G, Schwarzwaelder K, Hofmann WK, Karakaya K, Tchatchou S, Yang R, Reinecke P, Kühlcke K, Schlegelberger B, Thrasher AJ, Hoelzer D, Seger R, von Kalle C, Grez M. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med.* 2010; 16:198-204.
 - 54) Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, Benninghoff U, Cassani B, Callegaro L, Scaramuzza S, Andolfi G, Mirolo M, Brigida I, Tabucchi A, Carlucci F, Eibl M, Aker M, Slavin S, Al-Mousa H, Al Ghonaium A, Ferster A, Duppenhaler A, Notarangelo L, Wintergerst U, Buckley RH, Bregni M, Marktel S, Valsecchi MG, Rossi P, Ciceri F, Miniero R, Bordignon C, Roncarolo MG. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. 2009; *N Engl J Med* 360:447-458.
 - 55) Hoffmann B, Mayatepek E. Lysosomal storage diseases to date. 2011; *J Pediatr Sci.* 3:e72.
 - 56) Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, Chowdary P, Riddell A, Pie AJ, Harrington C, O'Beirne J, Smith K, Pasi J, Glader B, Rustagi P, Ng CY, Kay MA, Zhou J, Spence Y, Morton CL, Allay J, Coleman J, Sleep S, Cunningham JM, Srivastava D, Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F, High KA, Gray JT, Reiss UM, Nienhuis AW, Davidoff AM. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. 2011; *N Engl J Med.* 365:2357-2365.
 - 57) Mingozzi F, High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. 2011; *Nat Rev Genet.* 12:341-355.

別添資料 1

患者さんへの説明文書

家族性 LCAT 欠損症を対象とした
LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞
の自家移植に関する臨床研究

識別コード：LCAT-TRO1

版番号：第 2 版

患者さんへ

遺伝子治療臨床研究の説明文書と同意書

1. はじめに

当病院では最善の治療を患者さんに提供するとともに、新しい治療法の開発を目指した研究を行っております。

この文書は当病院で研究を進めている「遺伝子治療」の手法を用いた「家族性 LCAT (レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ) 欠損症」に対する新しい治療法に関する「臨床研究」について説明したものです。

研究名称 : 家族性 LCAT (レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ) 欠損症を対象とした LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究

実施施設 : 千葉大学医学部附属病院

総括責任者 : 横手幸太郎 (千葉大学医学部医学研究院細胞治療内科学教授)

研究者 : 横手幸太郎、武城英明、佐藤兼重、窪田吉孝

連絡先 : 千葉大学医学部医学研究院細胞治療内科学講座
TEL 043-222-7171 (内線 5253)
TEL 090-1426-1583 (夜間休日)

千葉大学医学部附属病院臨床試験部
連絡先 : TEL 043-222-7171 (内線 6460)

この臨床研究の内容について研究者 (以下「担当医師」という) の説明をお聞きになり、十分に理解され、納得されたうえで、この臨床研究に参加するかどうかを、あなたの自由意志で決めてください。そのうえで、この臨床研究にご協力いただける場合は、同意書に署名をお願いします。この判断をされるにあたりましては、あなたの考え方が尊重され、もし参加をお断りになられても、これからの治療などにおいて、なんら不利益を受けることはありません。また、一旦参加された後でも、途中で参加を止めたいと思われた場合は、いつでも止めることができます。この場合においても、なんら不利益を受けることはありませんのでご安心ください。

更に、担当医師の説明をお聞きになった後や、以下の文章を読まれた後に、あなた

がこの臨床研究についてもっと知りたいこと、わかりにくいこと、心配なことがありましたら遠慮なくどんなことでも担当医師にお尋ね下さい。

なお、この臨床研究を行うことについては、当病院の遺伝子治療臨床研究審査委員会で審査され認められており、更に厚生労働省厚生科学審議会科学技術部会で承認を受けた後に、病院長の許可を得て実施するものであります。

(1) 臨床研究とは

病気の治療や予防あるいは診断の方法については、医療に関する技術や病気の原因や状態の理解の進歩とともに、これまで使われてきた方法が改善されたり、またいろいろな新しい方法が開発されたりしています。このため、その時々で、その病気に合った、あるいは患者さんに合った最善の治療法や予防法あるいは診断法がどの方法であるかを調べて、病気の治療や予防や診断に役立てる必要があります。そのために、患者さんに参加して頂き、実際の病気の治療や予防あるいは診断をする中で、改善されたあるいは新しく開発された方法を含めたいろいろな方法についての安全性や効果などのデータを集めて、それぞれの方法についての評価を行います。

このようにして、実際に患者さんに参加して頂いて、患者さんの病気の治療や予防や診断を行う中で、安全性や効果のデータを集める研究のことを「臨床研究」と言います。

臨床研究では、時には、これまでに行われたことのない新しい治療法や予防法や診断法などが行われることもあります。この場合は、事前に動物などで安全性や効果については調べてはいますが、今までに多くの患者さんで行われ、その安全性や効果についてよく分かっている治療法や予防法や診断法などとは違い、予想できない副作用が発生したり、期待している効果が得られなかったりする場合があります。そのため、このような場合も考えて、新しい治療法や予防法や診断法についての臨床研究を行う際には、国が定めた厳しい決まりや基準を守りながら、また、病院や専門家の間で十分に検討され、審査された後に、認められた「計画書」にもとづいて行われます。

(2) 遺伝子と病気について

「遺伝」とは、「親の体質が子に伝わること」です。「体質」には、顔かたち、

体つきのほか、病気にかかりやすいことなどが含まれます。人の体の状態は、遺伝とともに、生まれ育った環境によって決まりますが、遺伝は基本的な部分で人の体や性格の形成に重要な役割を果たしています。

「遺伝」に「子」という字が付き「遺伝子」となると、「遺伝を決定する小単位」という科学的な言葉になります。遺伝子の本体は「DNA」という物質です。この「DNA」は、A（アデニン）、T（チミン）、G（グアニン）、C（シトシン）という四つの構成成分（塩基）の連続した鎖です。この構成成分（塩基）がいくつもつながって遺伝子になります。1つの細胞の中には数万種類の遺伝子が散らばって存在しています。人体は約60兆個の細胞から成り立っていて、細胞の一つ一つに全ての遺伝子が含まれています。

ほとんど全ての病気は、その人の生れながらの体質（遺伝素因＝遺伝子の違いに基づくもの）と病原体、生活習慣などの影響（環境素因＝生活環境の違いに基づくもの）の両者が合わさって起こりますが、最近の病気の原因に関係するいろいろな研究の結果、病気の中には、遺伝子が欠けているとか、遺伝子がうまく働かないために体のはたらきを正常に維持できず病気になってしまうといった遺伝素因だけによる病気があることが分かってきました。このような病気は、人が生まれながらに持っている遺伝子に問題があることから、なかなか根本的な治療が難しいものが多いことが知られています。

(3) 遺伝子治療とは

遺伝子治療とは、もともとあるはずの遺伝子が欠けているとか、遺伝子が正常な状態でないためにうまく働かないことが原因で起こる病気に対して、患者さんから取り出した細胞に正常な遺伝子を組込んで患者さんの体内に戻す、または正常な遺伝子そのものをお薬として体に投与することにより、その正常な遺伝子が患者さんの体の中で本来のはたらきをすることで、体のはたらきを正常に働くように修正して、病気を治療しようとする治療法です。つまり、親から子へと伝わる患者さんの持っている遺伝子そのものに手を加えることによって、病気を治療しようとするものではありません。したがって、将来生まれる患者さんのお子さまやあるいはその子孫に影響を与えることはなく、またこれらのお子さま達が親と同じ病気にかからないようにする治療法でもありません。

(4) 家族性 LCAT 欠損症とは

食事などで体内にとり込まれた脂肪はコレステロールとなり、体のはたらきを維持するために使われますが、脂肪のとり過ぎにより余ったコレステロールなどの不要となったコレステロールは、体に蓄積されにくい「善玉コレステロール」と言われている HDL-コレステロールに変換された後に肝臓に送られ分解処理されます。この不要となったコレステロールを HDL-コレステロールに変換し肝臓に送り込むには、LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）という酵素が必要であり、この酵素のはたらきがなければ不要となったコレステロールが分解処理されずに体のいろいろな組織に蓄積されてしまい、病気を引き起こす原因となります。

家族性 LCAT 欠損症とは、この LCAT を作り出す遺伝子（以下「LCAT 遺伝子」という）が生まれつき欠けていたり、遺伝子に異常があったりして正常に働かず、LCAT を体内に作り出すことができない、または十分な量が作り出せないために、不要なコレステロールを HDL-コレステロールに変換し肝臓で処理することができず、血液中の HDL-コレステロールが異常に減少するとともに処理できなくなったコレステロールが目や腎臓などに蓄積することによって、角膜混濁（角膜に濁りが生じ、目が見えにくくなったりする）や腎機能障害（腎臓のはたらきが悪くなり、血液から老廃物を取り除けなくなる）、溶血性貧血（動悸、息切れ、めまいなどの貧血症状に加えて、黄疸が起こったりする）などの障害を起こす病気のことを言います。特に、腎機能障害が進行すると、体内に不必要な物質あるいは有害な物質がたまり体に様々な悪影響（血圧の上昇、貧血症状、心不全、尿毒症、血液中のイオンバランスの異常など）を及ぼし、最悪の場合、生命に危険が及びます。

現在のところ、この病気に対する根本的な治療法はなく、低脂肪食などの食事療法により、食事からの脂肪のとり込みを制限し、体内のコレステロールの量を抑えることで、不要なコレステロールの組織への蓄積を抑え、角膜混濁、腎機能障害あるいは溶血性貧血などといった障害の発生などの病状の進行を遅らせる治療がなされています。最近、体内のコレステロール量を下げる薬と血圧を下げる薬を同時に服用することで腎機能障害の進行を遅らせたとの論文が公表されましたが、個々の患者さんで得られた結果であり、他の多くの患者さんでも同様な効果が得られる

かを確認しなくてはなりません。また、これまで、全血または血液成分である血漿輸血による LCAT の補充治療が行われた例がまれにありますが、その補充効果は 1 週間程度しか維持できなかつたとの報告があります。腎不全に対しては人工透析を行うことで症状を改善できますが、これは根本的な治療ではなく一生続けなくてはなりません。また、腎移植は人工透析の欠点を補うものですが、これも根本的な治療ではなく移植後には腎臓のはたらきの低下が起こったり、また拒絶反応を抑えるために投与される免疫抑制剤によって患者さんの免疫のはたらきが低下し感染症にかかりやすくなったりします。

(5) この臨床研究に用いる細胞について

皮下脂肪組織などの脂肪組織を構成している細胞の大部分が脂肪細胞と言われる細胞であり、そのほとんどは成熟した脂肪細胞（成熟脂肪細胞）であり、一部に未成熟で脂肪細胞になる一歩手前の脂肪細胞（未熟脂肪細胞）が含まれていることが知られています。

成熟脂肪細胞は、肥大し、また数が増えることによって脂肪組織の量を増加させ、肥満の原因となることでよく知られています。

一方、未熟脂肪細胞は、増殖力が強く、そのほとんど全ての細胞が成熟して脂肪細胞になることが確認されており、脂肪組織を作り上げる過程で重要な役割を果たしている細胞であることが知られています。この遺伝子治療臨床研究では、脂肪細胞の一歩手前の、増殖力が強く脂肪細胞に成熟しやすい未熟脂肪細胞の一つである「前脂肪細胞」を用います。

(6) 今回の臨床研究で実施する新しい試みについて

この臨床研究で実施しようとしている新しい試みとは、患者さんから取り出した前脂肪細胞に LCAT 遺伝子を組み込み、その前脂肪細胞を培養して細胞数を増やした後に患者さん本人の皮下脂肪組織に戻すことにより、患者さんの体内で LCAT が作り出されるようにすることです。そして、その安全性やコレステロールの処理をする機能を含め、病状（角膜混濁や腎機能障害、溶血性貧血）の進行にどのような影響をおよぼすかを調べる遺伝子治療臨床研究です。

2. この臨床研究の目的

現在、この臨床研究で実施しようとしている新しい試み（LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞を用いた遺伝子治療）は、世界で行われた例はまだありません。

患者さんから取り出した細胞に正常な遺伝子を組込んで患者さんの体内に戻す遺伝子治療の手法は、これまで国内においても幾つかの実施例はありますが、その場合に使用された細胞は患者さんから取り出された血液細胞（リンパ球など）であり、前脂肪細胞などの脂肪細胞を使用した例はありません。また、LCAT 遺伝子を用いた遺伝子治療臨床研究については、これまで世界でも実施例はありません。

このことより、今回の臨床研究の目的は、新しい試み（前脂肪細胞に LCAT 遺伝子を組み込んだ遺伝子治療）を行った場合の、副作用があるかないか、重いか軽いかなどの安全性を調べることです。またそれにあわせて、患者さんの体に戻した前脂肪細胞に組み込んだ LCAT 遺伝子が正常に働いて、LCAT が作り出されているかどうかを、血液検査などを行って調べたり、患者さんの病気の症状の経過を調査してこの試みによる影響を調べたりもします。

3. この臨床研究の方法

(1) 対象となる患者さん

この臨床研究では、16 歳から 40 歳までの家族性 LCAT 欠損症と診断された患者さんで、その病気の症状が進行していて将来において生活するうえで支障が出る可能性が高いと担当医師が判断した患者さんを対象とします。

またさらに、参加いただくためには、この臨床研究についての説明を受けられた後にご自身の判断で臨床研究への参加の同意を文書にて表明していただくことと、その後（あるいは直後）に行う検査などの結果をもとに「遺伝子治療臨床研究審査委員会（以下「審査委員会」という）」という専門家が集まった委員会で参加が妥当と判断されることが条件です。このため、あなたがこの臨床研究への参加に同意された場合でも、委員会での判断により参加できないことがありますのでご了承ください。

(2) この臨床研究の進め方

この臨床研究についての説明を受けられ、その内容を十分に理解されたうえであなたご自身の判断で文書にて参加することに同意された後に、以下の手順で治療を行います。

① 臨床研究参加のための条件を満たしているか調査します

この臨床研究への参加について文書で同意をいただきましたら、できるだけ早い時期に事前検査（ウイルス検査と血液検査、尿検査）を受けていただきます。また、あなたのこれまでの病歴や病状などをカルテなどの記録から調べさせていただきます。この検査と調査によって、あなたの身体の状態や病気の状態を調べ、臨床研究に参加いただけるかどうかを審査委員会で判断します。

なお、ウイルス検査と血液検査のために採血を行います。それぞれの検査に必要な採血量は5 mlと35 mlです。また、検査項目の中に24時間の尿を集めて行う項目が含まれているため、検査のために1日入院（1泊2日）をしていただくこととなります。

② 皮下脂肪組織を取り出します

臨床研究への参加が決まりましたら、LCAT 遺伝子を組み込む前脂肪細胞を取るために、皮下脂肪組織を取り出す手術を受けていただきます。手術は、腹部に局所麻酔を行った後、メスで臍部（へそ）の周辺部を約3mm程度切り開き、手動の脂肪吸引器具を用いて約20gの皮下の脂肪組織を吸引して取り出します。この際、あなたの腹部の脂肪が少なかったり硬かったりして脂肪吸引による手術ができない場合は、腹部の適当な場所を3~5cm程切り開いて皮下の脂肪組織を切り取る手術を行います。どちらの手術の場合でも、終了後は切開部を糸で縫い合わせ、手術翌日と1週間後に手術部位に問題がないかを診察します。また1週間後の診察時に手術部の抜糸を行います。

なお、手術日から翌日にかけて、手術後の診察と身体の状態を診るために1日入院（1泊2日）をしていただきます。また、この間のあなたの身体の状態を調べるために検査（血液検査、尿検査）を受けていただきます。

③ LCAT 遺伝子を導入した前脂肪細胞を製造し、注射で皮下に戻します

取り出した皮下脂肪組織から脂肪細胞を分離し、更に特殊な培養法（天井培養法）を用いて前脂肪細胞のみを選別し、選別した前脂肪細胞に LCAT 遺伝子を組み込みます。LCAT 遺伝子を前脂肪細胞に組み入れるために、LCAT 遺伝子を組み込んだベクターといわれる遺伝子の運び屋が必要で、この臨床研究ではレトロウイルスベクターを使用します（レトロウイルスベクターについては、この説明文の 6. (1) 1) に説明があります）。このレトロウイルスベクターを用いて LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞を、あらかじめ定められた細胞数になるまで培養しますが、この間に、この前脂肪細胞の性質が変わったりしていないか、この細胞を体内に戻す際に副作用などをおこすような不純物が含まれていないかどうかについて、厳重に検査を行います。

これらの検査に合格し、また必要な細胞数まで増やされた前脂肪細胞は、培養液などを除くために十分に洗った後、あなたの腹部の皮下脂肪組織の中に注射により戻されます。なお、前脂肪細胞を皮下脂肪組織内に定着させるため医療用として広く用いられている生理的組織接着剤（血液を凝固させるフィブリノゲンを主成分とする製剤で、手術などの際の組織の接着や閉鎖に用います）と混ぜた後、注射します。

あなたの脂肪組織を取り出してから、LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞をあなたの体に戻すまでの期間は、おおよそ 3 週間から 4 週間かかります。

④ 細胞を戻したあとフォローアップ（検査や調査）します

この LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞をあなたの体に戻したあと、あなたの体に対して副作用などの悪い影響が出ないかどうか、また体に戻した前脂肪細胞に組み込んだ LCAT 遺伝子をはたらき、あなたの病気にどのような影響があるかについて調べるために、LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞を体内に戻す前と戻した後の 5 年間、決められた時期に来院して検査や調査を受けていただきます。

そのスケジュールについては別紙に示す通りですが、これら検査のほとんどは採血を伴う血液検査であります（採血量は 1 回当たり、30 ml から 50 ml）。また、24 時間の尿を集めて行う検査も含まれているため入院して検査を行っていただくこともあります。LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞をあなたの体に戻

す前後におけるあなたの体の様子を慎重に観察し、血液中に増殖性ウイルス（「自己を複製し、増殖することのできるウイルス」のことをさします。詳しくは、この説明文の 6.（1）1）① に説明があります）が存在しないことが確認されるまで、個室に入院する必要があります。その期間は、投与前日から投与 1 週間（7 泊 8 日）程度と予想されますが、個室入院期間中には個室外に出る自由が制限されます。また、排泄物等は消毒薬などを使用して特別なウイルス不活性化処理（ウイルスを死滅させる処理）を行います。増殖性ウイルスの現れる危険性は極めて低いと考えられていますが、これらは増殖性ウイルスが環境中に散らばって自然界の生物及び微生物に影響を与える可能性を最小限に抑えるための予防的措置ですので、ご協力をお願いいたします。

この臨床研究の評価は LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞を体に戻した後の 6 ヶ月間で行いますが、体に戻した前脂肪細胞の長期における安全性や効果の持続性を調べるために、更に 4 年 6 ヶ月（合計 5 年間）にわたり、検査や調査を行う予定です。

これ以降も、担当医師から定期的（年 1 回）に連絡をとり、症状の把握に努めます。また必要と判断した場合は来院していただき適切な検査・処置を行う場合があります。

可能な限りの別紙のスケジュールに従って、通院診察あるいは入院診察（1 泊 2 日）にて検査や調査を行っていただきます。

⑤ この臨床評価期間中における注意事項

この臨床評価期間中（前脂肪細胞を体に戻した後から 6 ヶ月）は、この病気の治療のために新しい治療を始めたり、新しいお薬を飲み始めたりはしないでください。必ず、それらを始められる前に、担当医師に相談をしてください。また、熱が出たり、下痢を起こしたり、頭痛が起きたりして、その症状の治療のためにお薬を飲まれた場合には、薬を飲んだ後の最初の診察の時に、必ず担当医師に連絡してください。

また、この臨床研究に参加する前から、低脂肪食や低蛋白食などの食事療法を行っておられる場合は、担当医師とも相談しながらその治療内容を変えないで、この臨床評価期間の間も続けてください。

4. この臨床研究の予定参加期間

この臨床研究に参加された場合の予定参加期間は、あなたがこの臨床研究への参加に文書にて同意された日から脂肪組織を取り出す手術を受けるまで最低 1 週間、手術を受けられてから LCAT 遺伝子が組み込まれた前脂肪細胞があなたの体に戻されるまで 3 週間から 4 週間を要します。その後、この試みの影響をみるための検査や調査を行う観察期間が 6 ヶ月間設定されていますので、合計で臨床研究の評価を終えるまでには 7 ヶ月から 7 ヶ月半の期間を要します。また、あなたの体に戻された前脂肪細胞の長期にわたる影響をフォローアップする目的で、臨床研究の評価後、さらに 4 年半にわたって検査や調査を行います。これら期間を全て含めて、5 年と 2 ヶ月の参加期間となります。これ以降も、担当医師が定期的(年 1 回)に連絡をとり、症状や健康状態の把握に努めます。また必要と判断した場合は来院していただき適切な検査・処置を行う場合があります。

5. この臨床研究への予定参加人数

この臨床研究では、3 名の家族性 LCAT 欠損症の患者さんに参加いただくことを予定しております。

6. この臨床研究において起こるかもしれない危険性と予想される影響

この臨床研究で実施しようとしている新しい試み(LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞を用いた遺伝子治療)は、まだ実際の患者さんに行われたことがありませんので、その危険性や影響などについては、わかっていません。この臨床研究において起こるかもしれない危険性についていくつかの注意しなければならない点、またこの試みによる LCAT 欠損症状への予想される影響について以下に説明いたします。

(1) この臨床研究において起こるかもしれない危険性

1) レトロウイルスベクターを用いることにもなる危険性について

LCAT 遺伝子を前脂肪細胞に組込むためにはベクターといわれる遺伝子の運び屋

が必要です。この臨床研究ではモロニーマウス白血病ウイルスと呼ばれ、マウスに白血病を引き起こすレトロウイルスベクターを用いています。このベクターは、安全性を高めるための種々の工夫が施され、細胞の中で単独で増えることができません。また、LCAT 遺伝子を含むベクターを患者さんが直接服用したり、患者さんに直接注射するようなことは行わず、前脂肪細胞に LCAT 遺伝子を取り込ませた後で患者さんの皮下脂肪組織へ戻します。したがって、前脂肪細胞以外の細胞にこのベクターが組込まれることはなく、また前脂肪細胞が皮下脂肪組織以外の組織へ移動することはないと考えられています。このようにこのベクターに伴う危険性は極めて低いと考えられますが、予想できない副作用が起こる可能性は否定できません。

① 増殖性ウイルス（自己を複製し、増殖することのできるウイルス）に関する危険性について

この遺伝子治療に用いるレトロウイルスベクターは単独で増殖できないよう設計され、安全性や品質検査に合格したものを用いています。また、LCAT 遺伝子を導入した前脂肪細胞は安全性を確認した後、患者さんの皮下脂肪組織に戻しており、今までに行われた動物実験や基礎研究において増殖性ウイルスの発現は認められていません。さらに、1987年から欧米を中心に、すでに3000人を超える患者さんの遺伝子治療として類似のレトロウイルスベクターが使用されていますが、これまでのところ、増殖性ウイルスの発生、それが原因となる副作用ともに認められていません。これらのことから、このベクターの特性および使用経験から増殖性ウイルスが現れる可能性は極めて低いと考えられます。しかし、なんらかの理由により患者さんの体内で増殖性ウイルスが長期間にわたって発生した場合、がんを発症する可能性が考えられます。このため、この臨床研究では定期的に検査を行い、あなたを注意深く観察します。万が一増殖性ウイルスの発現が疑われる場合には、精密検査などを実施するなど十分な症状の把握を行った後、適切に対処いたします。

② 遺伝子が細胞の染色体に組み込まれることによる危険性について

レトロウイルスベクターは遺伝子を染色体に組み込むため長期間の治療効果が期待できます。反面、染色体の思い通りの位置に遺伝子を組み込むことができず、また一度組み込まれた遺伝子は取り除くことができません。レトロウイルスの組み込み位

置によっては、他の遺伝子をこわしたり、あるいは他の遺伝子に悪い影響を与えるなどして、細胞ががん化する危険性があり、実際、このような症例がフランスとイギリスで起きたことが報告されました。以下にこの報告について説明いたします。

I. X連鎖重症複合免疫不全症で報告された白血病の発症について

ある種の白血球が足りず、細菌やウイルスに全く抵抗力を持たないX連鎖重症複合免疫不全症という遺伝病に対して、1999年からフランスでレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療が始まり、十分な治療効果が得られました。ところが、その後、フランスで治療を受けた10名の患者さんのうち4名が白血病(リンパ球のがん)を発症しました。これらの患者さんは化学療法を受け、3名の症状は改善されましたが、残念ながら1名は死亡しました。また、イギリスで行われた同様な治療では10名の患者さんのうち1名が白血病を発症しましたが、化学療法で症状は改善されました。がん化の引き金となるがん遺伝子の近くにレトロウイルスが組み込まれたことに加え、この治療はある種の白血球を増やす作用を期待した遺伝子治療であるという特殊な事情が重なり、白血病になってしまったと考えられます。

II. 慢性肉芽腫症で報告された前白血病症状の発症について

好中球などの食細胞が働かないため重症な細菌・真菌性感染症を繰り返して発症する先天性免疫不全症(慢性肉芽腫症)に対して、レトロウイルスベクターを用いて、欠けている遺伝子を血液のもとになる造血幹細胞に導入するドイツでの遺伝子治療では、遺伝子導入細胞を投与された2例の患者さまで、特定のがん遺伝子の近くにレトロウイルスベクターの遺伝子が挿入された細胞が多く認められており、骨髄異形成症候群という前白血病状態の発症が報告されています。

III. この臨床研究で行われる遺伝子治療で白血病様の症状が起こる可能性について

フランス、イギリス、ドイツでの遺伝子治療で用いられた遺伝子は免疫という生存に直接関わる遺伝子であるのに対して、この臨床研究で用いるLCATは不要なコレステロールを処理するために必要な酵素です。フランス、イギリス、ドイツの場合は造血幹細胞という骨髄に存在し血液をつくる働きをもつ細胞に遺伝子を導入しますが、この臨床研究では脂肪細胞のもととなる前脂肪細胞を用いています。また、この

臨床研究で用いるベクターは、今までに行われた研究においてがん化は認められていません。

現時点では、この臨床研究で同様な副作用が起こる可能性は低いと考えられますが、それを完全には否定できません。そこで、この臨床研究では定期的に検査を行い、あなたを注意深く観察します。万が一、がんの発症が疑われる場合、精密検査を実施します。これでがん化が認められた場合、周辺部位を含むがん化部位を取り出すなどして、適切に対処いたします。

2) 手術にともなう危険性

脂肪組織を取り出す手術は形成外科および美容整形科で広く行われており、その安全性は十分確認されております。しかしながら、まれに下記のような症状があらわれることがあります。

① 痛み

脂肪組織を取り出す手術は局所麻酔を注射した後で行いますが、術後において、違和感や痛みが残る場合があります。この場合に鎮痛薬を飲んでいただくなど適切な処置を行います。

② 感染症の可能性

LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞の製造は細菌などの不純物や不要物が混ざらないよう細心の注意を払って作業を行い、しかもこれらの物質が含まれていないことを検査で確認した後で治療に用いるため、この前脂肪細胞は完全に無菌的です。また、切開部の処置を含め手術は細菌感染が起こらないように慎重に行います。このようなことからこの治療に伴う感染の危険性は非常に低いと考えられます。また、この前脂肪細胞をあなたの皮下脂肪組織へ戻す際に血清アルブミンや生理的組織接着剤を加えますが、これはヒトの血液を原材料として用いているため製造工程において感染症の原因となる細菌やウイルスの不活性化・除去またこれらの混入防止などの様々な安全対策が講じられています。今までにこれらの使用による感染症は報告されておらず、これらを使用することでの感染症の危険性は非常に低いと考えられます。前脂肪細胞を培養する際に牛の血清を用いますが、狂牛病の発生が報告されていない国

(オーストラリア等)で飼育された牛の血清に放射線を照射し、細菌やウイルスの不活性化を確認した血清を用いております。したがって、この使用にともなう感染症の危険性は非常に低いと考えられます。

この臨床研究では、前脂肪細胞を体に戻した後のあなたの経過を十分に観察するとともに、万が一、感染症が疑われるような症状が発生した場合には、抗生物質などの投与を行うなど適切な処置を行います。

3) 子孫（お子さん）への影響の可能性

この臨床研究は LCAT 遺伝子を体外で導入した前脂肪細胞を体に戻すものであり、服用や注射などで遺伝子を直接体内へ取り込むようなことは行いません。卵子や精子などの生殖細胞に遺伝子を直接入れることはなく、親から子へと伝わる遺伝子そのものに直接手を加えることもありません。この臨床研究で行う遺伝子治療はこのような特徴を持つため、この治療が将来生まれる子またはその子孫に影響を与えることはありません。しかし、この遺伝子治療はまだ実際の患者さんを対象に行われたことがなく、現在の段階では子孫への影響を完全に否定することができません。このため、あなたが現在妊娠またはお子さんに授乳している場合、あるいは妊娠を希望している場合は、この臨床研究に参加できませんのでご了承ください。

4) 免疫反応（体内に入ってきた異物を除去する生体反応）が起きる危険性について

今までに実施した研究から、LCAT 遺伝子が組み込まれた前脂肪細胞は正常な LCAT を作り出すことが確認されています。しかし、家族性 LCAT 欠損症の患者さんでは、血中に LCAT が存在しないあるいは量が少ないため、この前脂肪細胞が作り出す LCAT を異物として認識しこれを除去しようとする反応（免疫反応）が起きる可能性が考えられます。LCAT を生まれながらもたないマウスの実験でもこのような免疫反応がみとめられています。したがって、この研究では、事前に検査を行い、血中に LCAT が存在しない患者さんは対象から外します。一方、LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞の製造においては、細菌などの不純物や不要物が混ざらないよう細心の注意を払って作業を行い、またこれらの物質が含まれていないことを検査で確認した後で治療に用いますが、万が一、製造工程において細菌などの不純物や不要物が混ざった場合には、これら不純物を異物として除去しようとする反応（免疫反

応) が起きる可能性が考えられます。免疫反応が起きていないか定期的な検査や観察を行い、免疫反応が疑われた場合には適切な処置を行います。

5) その他、予想できない危険性

上記以外にも予想できない重い副作用が現れる可能性があります。その一部は個人差によるものと考えられます。予想できない副作用の中には回復不可能なものが含まれる可能性があります。このような場合、できる限り適切な処置を速やかに行います。

(2) この臨床研究において予想される LCAT 欠損症状に対する影響

これまでに行った以下の研究結果から考えますと、LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞を体に戻すことで、血中に LCAT が作り出され、LCAT が欠損していることによって引き起こされる HDL-コレステロールの異常な減少を改善する可能性があることが推察されます。

- ヒトの前脂肪細胞を使った培養実験で、培養液中に LCAT を作り出すこと、作り出した LCAT を家族性 LCAT 欠損症の患者さんの血液に加えることで、不要となったコレステロールを HDL-コレステロールとして処理することが確認されている。
- LCAT を生まれながらもたないマウスに LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞を移植したところ、約 2 ヶ月にわたり LCAT が血中に作り出され、一時的に、不要となったコレステロールを HDL-コレステロールとして処理し、血中の HDL-コレステロールが増加改善した。

しかし、LCAT を生まれながらもたないマウスは、家族性 LCAT 欠損症の患者さんと同じように、HDL-コレステロールが異常に減少しますが、角膜混濁や腎機能障害、溶血性貧血などの症状を起こさないため、このマウスを用いた実験ではこれらの症状に対する影響は、今のところ調べる事ができていません。このように動物実験からは、家族性 LCAT 欠損症の諸症状に対する影響は、一部の症状を除いて、今のところ調べる事ができず、今回この臨床研究で初めて安全であるかを含めどのような影響があるかについて調べる事になります。以上のことを十分ご理解ください。

なお、この試みにより効果が認められない場合、効果が得られた場合、またその後

効果が消えた場合でも、安全性に関する十分な観察を 5 年にわたって行うこととなりますので、臨床研究期間内では、再度この試みを受けることはできません。

7. この臨床研究に参加しない場合の他の治療法

現在のところ、あなたの病気に対する根本的な治療法はありませんが、コレステロールの組織への蓄積を抑え、角膜や腎臓への障害の発生などの病状の進行を遅らせるために、低脂肪食などの食事療法により脂肪の取り込みを制限する治療がなされています。また、これまで、全血または血液の成分である血漿輸血による LCAT の補充治療が行われた例がありますが、その補充効果は 1 週間程度しか維持できなかったとの報告があります。腎機能悪化の防止を目的とした薬の投与がされ、腎機能の改善が認められたという報告があります。

8. この臨床研究への参加中にあなたの健康に被害が生じた場合について

この臨床研究は、これまでの報告に基づいて科学的に計画され、慎重に行われますが、もし臨床研究の期間中あるいは終了後に、あなたに副作用などの健康被害が生じた場合には、医師が適切な診療と治療を行います。

9. この臨床研究への参加はあなたの自由意思によるものです

この臨床研究へ参加するかどうかは、あなたご自身が決めることであり、あなたの自由です。あなたご自身の意思を大切にしますので自由な判断で決めて下さい。また、一度参加を決められた後でも、いつでもどんな理由であっても途中で参加を止めることができます。

たとえば、参加することに同意されない場合や途中で止められる場合、担当医師に悪いのではないだろうか、適切な治療が行われなくなるのではないだろうかといったような心配をされるかもしれませんが、決してそのようなことはありません。あなたがこの臨床研究に参加しなくても、あるいは途中で参加を止められても、今後の治療

において何ら不利益を受けることはありません。いずれの場合もあなたの治療には最善を尽くします。

10. この臨床研究に関する情報は速やかにお伝えします

この臨床研究の計画が変更される場合や、研究期間中に副作用などの新しい情報があつた場合など、あなたの臨床研究への参加する意思に影響を与える可能性がある情報が得られた場合は、担当医師が速やかに詳細な説明を行います。あなたが不安を覚えるような重要な情報が得られた時には、このまま臨床研究を続けるかどうかについてあなたの意思を、その時点で再度確認いたします。

1.1. この臨床研究への参加を途中で中止させていただく場合があります

当病院の審査委員会が、この臨床研究の実施中に、あなたを含めた患者さんにおいて重い副作用が発生しこの臨床研究の安全性に問題があると判断した場合、あるいは効果が全く認められず臨床研究を継続すること自体に問題があると判断した場合などにおいて、この臨床研究全体が中止されます。

また、あなたの病気の症状が進行し他の治療法に変更する必要性が生じた場合、重い副作用が起こり臨床研究の継続が難しくなった場合あるいはあなたの臨床研究への参加がこの臨床研究へ参加するための条件を満たしていないことが LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞を体に戻して以降にわかった場合など、担当医師あるいは審査委員会の判断であなたの参加を中止することがあります。

なお、いずれの場合においても、臨床研究への参加を中止した以降においても、担当医師が必要な適切な処置を行います。また、それと同時に、中止後の経過を引続き調べさせていただき、今後の治療のための資料としてまとめさせていただくこともありますことをご了承ください。

1.2. この臨床研究に参加された場合、あなたのカルテなどの臨床研究に係る資料などが臨床研究中あるいは臨床研究終了後に調査されることがあります

この臨床研究が、当病院の審査委員会で認められ病院長が許可した臨床研究計画書

にもとづいて行われているか、患者さんの人権が守られて進められているかなどを確認するために、担当医師以外のこの臨床研究の関係者（病院の職員など）、審査委員会委員および厚生労働省担当官（厚生科学審議会員を含む）が、あなたのカルテなどの医療記録をみることがあります。しかし、どの場合においても、あなたから得られたデータが、報告書などにおいてあなた自身のデータであると特定されるようなことはありませんのでご安心ください。

13. この臨床研究結果が公表される場合においてもあなたの身元が明らかになることはありません

あなたがこの臨床研究への参加に同意をされた時から、あなたに関するデータやこの臨床研究で得られたあなたに関するデータは、コード番号などで匿名化されます。従いまして、この臨床研究で得られたデータが今後報告書などにまとめられ、またその結果が医学雑誌や学会において公表されることがありますが、いずれの場合においても、あなたの情報やデータ（診察や検査結果）を使用する際には、あなたの名前はコード番号などで置き換えられ、あなたの個人的な情報は一切分からないようにしますので、プライバシーは守られます

また、この臨床研究で得られたデータは、この臨床研究以外の目的で使用されることはありません。

なお、あなたがこの臨床研究への参加同意書にご署名されますと、あなたに関するこれまでの診察記録や検査結果などのデータも使用させていただくことに同意されたこととなりますので、そのことをご了解ください。

14. この臨床研究への参加に同意された場合に守っていただきたい事項

あなたがこの臨床研究に参加いただく場合は、次のことを守ってくださるようお願いいたします。もし、守っていただけなかった場合、せっかく参加していただいているいろいろな検査や診察を行っていただいていたデータが使えなくなることになってしまいます。また、守っていただけなかった結果、副作用が起こったり、その発見が遅れたりして重大な状況になってしまう可能性や、効果が得られなかったりする可能性もあります。

- あなたが臨床研究を中断あるいは中止したくなった場合は、担当医師に相談してください。あなたの意思を十分に尊重して対応します。
- あなたが他の医師あるいは他の病院などで治療を受けている場合、あるいはこれから受けようとする場合は、担当医師に相談してください。あなたに同意をしていただいたうえで、担当医師から他の医師あるいは病院に、あなたがこの臨床研究に参加していることをお知らせします。
- もし、あなたが担当医師に相談しないで他の医師あるいは病院で治療を受けた場合は、その後でも結構ですので、必ず担当医師にそのことを伝えてください。
- この臨床研究ではいろいろな検査や診察を受けていただきますが、その実施する時期が決まっていますので、決められた日に必ず来院するようにしてください。可能な範囲で日程の調整を行いますので、あなたに不都合などがある場合は、担当医師にお知らせください。
- 受けていただいた検査や診察の結果によりましては、追加の検査や診察を受けていただくことがあります。その際にはご協力ください。
- その他、各種検査、診察、処置などを受けていただく際には、担当医師あるいはこの臨床研究の関係者の指示を守ってくださるようお願いいたします。あなたに不都合などがある場合は、遠慮なく、担当医師あるいは臨床研究の関係者に相談をしてください。
- 本臨床研究での LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞による生殖器や胎児への影響に関する検討はなされておられません。このため、現在、あなたが妊娠しているあるいはその可能性がある場合、お子さんに授乳している場合、あるいは妊娠を希望されている場合はこの臨床研究に参加できません。
- その他、この臨床研究に関する質問やあなたにとって不都合なことなどがありましたら、必ず担当医師に問合せあるいは相談してください。

15. あなたの費用負担について

この臨床研究で受けていただく検査、診察および処置などは、この臨床研究のために特別に行われることから、この臨床研究で発生する費用に関しましては、研究費が

ら支払われますので、あなたの費用負担はありません。

この臨床研究に要する期間中の休業補償、後遺障害に対する補償や医療手当てなどの金銭的な補償は受けることはできません。

臨床研究が終了しあるいは中止された後に、通常の治療に戻った場合は、これまで通りの通常の保険診療となります。

また、あなたの故意または重大な過失によって健康に被害が生じた場合、病状が悪化して治療方法を変える必要が生じた場合や明らかにこの臨床研究と関係のない原因で健康に被害が生じた場合には、あなたがこの臨床研究への参加を中止した以降の診療と同様に治療の費用は、通常の保険診療となります。

16. この臨床研究の結果から生じる知的財産権について

本臨床研究結果より、学会あるいは論文発表に伴うものやその他の知的財産権等が生じる可能性が考えられます。その権利は臨床研究を実施する研究機関や研究者に属し、本臨床研究に参加していただいたあなたにはその権利を持つことはないことをご了承ください。

17. この臨床研究を実施する責任者と担当医師（研究者）

この臨床研究を行うにあたっての責任者（総括責任者）と実際にあなたの治療を担当する担当医師（研究者）は次の通りです。

総括責任者：横手幸太郎（千葉大学医学部医学研究院細胞治療内科学教授）

担当医師：横手幸太郎

同意説明・取得、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の調製・品質確認作業管理、および患者の診察（検査・診察）全般を担当

連絡先：千葉大学医学部医学研究院細胞治療内科学講座

TEL 043-222-7171（内線 5253）

TEL 090-1426-1583（夜間休日）

佐藤兼重（千葉大学医学部医学研究院形成外科学教授）

窪田吉孝（千葉大学医学部附属病院形成・美容外科助教）

脂肪組織採取およびLCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の移植

連絡先：千葉大学医学部医学研究院形成外科学講座

TEL 043-222-7171 (内線 6257)

武城英明 (東邦大学医学部医学科臨床検査医学研究室 教授
(千葉大学 客員教授))

総括責任者補佐、臨床有効性、安全性に関する協力および助言
TEL 043-462-8811 (内線 2495)

18. この臨床研究に関する相談窓口

この臨床研究へ参加することは、あなたの自由意思によるものですので、あなたの意思を尊重して臨床研究が行われます。そのことから、あなたがこの臨床研究について知りたいこと、わからないこと、心配なことあるいはご相談などがありましたら、どんな些細なことでも構いませんので、いつでも遠慮なく、担当医師または相談窓口
に申し出てください。

実施施設：千葉大学医学部附属病院

千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1

代表電話 043-222-7171

総括責任者：横手幸太郎 (千葉大学医学部医学研究院細胞治療内科学教授)

担当医師：横手幸太郎

連絡先：千葉大学医学部医学研究院細胞治療内科学講座

TEL 043-222-7171 (内線 5253)

TEL 090-1426-1583 (夜間休日)

佐藤兼重 (千葉大学医学部医学研究院形成外科学教授)

窪田吉孝 (千葉大学医学部附属病院形成・美容外科助教)

連絡先：千葉大学医学部医学研究院形成外科学講座

TEL 043-222-7171 (内線 6257)

武城英明 (東邦大学医学部医学科臨床検査医学研究室 教授
(千葉大学 客員教授))

TEL 043-462-8811 (内線 2495)

相談窓口：臨床試験部 (月曜～金曜 8:30～17:00)

連絡先：TEL 043-222-7171 (内線 6460)

以上の内容をよくお読みになり、ご理解いただき、この臨床研究にご参加されることに同意される場合は、次の同意書に署名、日付を記入して、担当医師にお渡しく
ださい。

(別紙) 臨床検査・観察項目

	適格性 調査	移植細胞製造					移植直後観察(入院管理)							
		脂肪 組織 抽出	脂肪組織抽出後観察				移植							
			21 日前 Day-21	20 日前 Day-20	14 日前 Day-14	1日前 Day-1		0日 Day 0	1日後 Day 1	2日後 Day 2	3日後 Day 3	4日後 Day 4	5日後 Day 5	6日後 Day 6
診察 *1	◎	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
ウイルス検査 *2	○													
脂肪採取部位観察		○	○	○										
移植部位の所見観察 *10 (MRI 検査 ^a)						○ ^b	○	○	○	○	○	○	○	○
臨床 検査	血液学的検査 *3	○	○		○		○			○				○
	血液生化学的検査 *4	○	○		○		○			○				○
	尿検査 *5	◎	◎		◎		○			○				◎
RCR・悪性腫瘍検査 *6						◎			○					
抗 FBS 抗体検査 *7					○									○
抗 LCAT 抗体検査 *7					○									○
血中 LCAT 活性測定 *8	○	○			○		○			○				○
臨床所見観察 *9	○	○			○									○
クローナリティー検査 *11						○ ^{c11}								
採血量 (mL)	40	30	—	—	50	—	40	—	—	30	—	—	—	30

	移植後 3ヵ月観察 (2 週毎)						移植後 6ヵ月観察 (1 月毎)			移植後 5 年間予後調査 (3 月毎)
	2 週後 2W	4 週後 4W	6 週後 6W	8 週後 8W	10 週後 10W	12 週後 12W	16 週後 16W	20 週後 20W	24 週後 24W	25 週後~260 週後 25W~260W
診察 *1	○	○	○	○	○	◎	○	○	◎	○
ウイルス検査 *2										
脂肪採取部位観察										
移植部位の所見観察 *10 (MRI 検査 ^a)	○	○ ^b	○	○	○	○ ^b	○	○	○ ^b	○ ^b
臨床 検査	血液学的検査 *3	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	血液生化学的検査 *4	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	尿検査 *5	○	◎	○	○	○	◎	○	◎	◎
RCR・悪性腫瘍検査 *6						◎		◎	◎*	
抗 FBS 抗体検査 *7	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
抗 LCAT 抗体検査 *7	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
血中 LCAT 活性測定 *8	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
臨床所見観察 *9		○				○		○		○
クローナリティー検査 *11										
採血量 (mL)	30	30	30	30	30	50	30	30	50	50

*1 : 体重, 身長, 体温, 血圧, 脈拍, 本疾患関連以外の異常所見 (◎の時期については, 胸部X線と心電図を付加する)
 *2 : B型肝炎ウイルス, C型肝炎ウイルス, ヒト免疫不全ウイルス, 成人型T細胞白血病ウイルス, パルボウイルス B19
 *3 : 白血球数, 赤血球数, ヘモグロビン量, ヘマトクリット値, 血小板数, 白血球像 (分画), 赤血球像 (形状)
 *4 : 総蛋白, アルブミン, ハプトグロビン, 総ビリルビン, 間接ビリルビン, AST, ALT, LDH, ALP, γGTP, クレアチニン, 尿酸, BUN, Na, Cl, K, Ca, CRP, 中性脂肪, 総コレステロール, コレステロールエステル, LDL コレステロール, HDL コレステロール, リポ蛋白分画, アポリポ蛋白 (A-I, A-II, B, C-II, C-III, E)
 *5 : 潜血, ウロビリノーゲン, 沈渣 (◎の時期については, 24 時間尿蛋白量あるいは尿中アルブミン排泄量を付加する)
 *6 : RCR 検査: NAT 法
 ◎の時期については, RCR 検査 (培養法) と悪性腫瘍検査 (TK 活性検出法) を付加する。
 * 移植後 48 週, 96 週, 144 週, 192 週, 240 週に RCR 検査 (NAT 法及び培養法) と悪性腫瘍検査を実施する。ただし, 96 週以降の RCR 検査は NAT 法のみ実施し, 培養法のため採取した検体は凍結保存し, NAT 法で陽性と判定された場合のみ実施する。
 *7 : ELISA 法
 *8 : 自己基質法 (ネスコート@LCAT キット-S), 高感度検出法
 *9 : 角膜混濁 (視力・視野, 角膜輪所見: 眼球写真), 腎機能障害 (尿蛋白量), 溶血性貧血 (間接ビリルビン, LDH, ハプトグロビン)
 *10 : 移植部位の所見観察 (MRI 検査), RCR・悪性腫瘍検査, 血中 LCAT 活性測定, マウスにおける移植細胞のクローナリティー検査等を総合的に勘案のうえ, 必要に応じて移植部位を生検し LAM-PCR 法にて検査および病理学的検査を実施する。
 *11 : 移植細胞をマウスに移植後, 経時的に LAM-PCR 検査を実施し, クローナリティーならびにがん化の有無を観察する。クローナリティーならびにがん化が否定できない場合には, 移植部位観察 (MRI 検査), RCR・悪性腫瘍検査, 血中 LCAT 活性測定等を総合的に勘案のうえ, 必要に応じて移植部位を生検し LAM-PCR 検査及び病理学的検査を実施する。

ID(カルテ)番号: _____

千葉大学医学部附属病院院長殿

遺伝子治療臨床研究参加の同意書

私は、「家族性LCAT (レシチン: コレステロールアシルトランスフェラーゼ) 欠損症を対象としたLCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究について」(説明文書:平成 21 年 月 日作成 第 版)による下記の項目について十分な説明を受け、内容を理解したうえで、この臨床研究に参加することに同意いたしました。

ただし、研究参加の途中でお断りすることがあることを申し添えます。

- はじめに (臨床研究、遺伝子治療とは)
- 臨床研究の目的
- 臨床研究の方法
- 予定参加期間と予定参加人数
- 起こるかもしれない副作用と予想される治療効果
- 他の治療法
- 健康被害が生じた場合の対応
- 自由意思による臨床研究への参加
- 臨床研究に関する情報の伝達
- 臨床研究における参加中止
- 臨床研究に関する資料 (カルテなど) の調査
- 個人情報の保護
- 臨床研究参加中に守って頂きたい事項
- 費用負担
- 知的財産の権利
- 臨床研究の責任者と担当者
- 相談窓口

本人	氏名			
	同意年月日	年	月	日
代 諾 者	氏名		続柄	
	同意年月日	年	月	日

(備考)「代諾者」とは、本人が未成年者の場合に、本人とともに同意いただける親権者の方です。

なお、代諾者の方が署名いただく場合においても、ご本人の署名もお願いします。

説明文書等を手渡した日 _____ 年 月 日 手渡者: _____

説明文書等を説明した日 _____ 年 月 日

説明者 所属: _____ 担当医: _____

説明補助者 所属: _____ 協力者: _____

同意取得日 _____ 年 月 日

同意取得者 所属: _____ 担当医: _____

同意取得者 所属: _____ 協力者: _____

同意文書控を手渡した日 _____ 年 月 日 手渡者: _____

ID(カルテ)番号: _____

千葉大学医学部附属病院院長殿

遺伝子治療臨床研究参加の同意書

私は、「家族性LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）欠損症を対象としたLCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究について」（説明文書：平成21年 月 日作成 第 版）による下記の項目について十分な説明を受け、内容を理解したうえで、この臨床研究に参加することに同意いたしました。

ただし、研究参加の途中でお断りすることがあることを申し添えます。

- はじめに（臨床研究、遺伝子治療とは）
- 臨床研究の目的
- 臨床研究の方法
- 予定参加期間と予定参加人数
- 起こるかもしれない副作用と予想される治療効果
- 他の治療法
- 健康被害が生じた場合の対応
- 自由意思による臨床研究への参加
- 臨床研究に関する情報の伝達
- 臨床研究における参加中止
- 臨床研究に関する資料（カルテなど）の調査
- 個人情報の保護
- 臨床研究参加中に守って頂きたい事項
- 費用負担
- 知的財産の権利
- 臨床研究の責任者と担当者
- 相談窓口

本人	氏名			
	同意年月日	年	月	日
代諾者	氏名		続柄	
	同意年月日	年	月	日

（備考）「代諾者」とは、本人が未成年者の場合に、本人とともに同意いただける親権者の方です。
なお、代諾者の方が署名いただく場合においても、ご本人の署名もお願いします。

説明文書等を手渡した日 _____ 年 月 日 手渡者: _____

説明文書等を説明した日 _____ 年 月 日

説明者 所属: _____ 担当医: _____

説明補助者 所属: _____ 協力者: _____

同意取得日 _____ 年 月 日

同意取得者 所属: _____ 担当医: _____

同意取得者 所属: _____ 協力者: _____

同意文書控を手渡した日 _____ 年 月 日 手渡者: _____

平成 25 年 3 月 29 日

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する
法律に基づき申請のあった第一種使用規程に係る意見について

遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性
影響評価に関する作業委員会
委員長代理 島田 隆

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成
15 年法律第 97 号)に基づき申請のあった下記の遺伝子組換え生物等の第一種使用規
程について、本作業委員会で検討を行い、その結果を別紙のとおりとりまとめたので
報告いたします。

記

1. ヒト レシチン: コレステロールアシルトランスフェラーゼ (hLCAT) を発現し、
マウスアンフォトロピックウイルス 4070A の env 蛋白質をエンベロープに持つ
非増殖性の遺伝子組換えモロニーマウス白血病ウイルス (CGT_hLCAT RV)
申請者: 千葉大学医学部附属病院 病院長 宮崎 勝
申請日: 平成 22 年 4 月 9 日

【作業委員会の評価結果（千葉大学医学部附属病院）】

1. ヒト レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ（hLCAT）を発現し、マウスアンフォトロピックウイルス 4070A の env 蛋白質をエンベロープに持つ非増殖性の遺伝子組換えモロニーマウス白血病ウイルス（CGT_hLCAT RV）
第一種使用等の内容：治療施設におけるヒトの治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
申請者：千葉大学医学部附属病院 病院長 宮崎 勝
(1) 生物多様性影響評価の結果について ① 他の微生物を減少させる性質 申請されている第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、本遺伝子組換え生物（CGT_hLCAT RV）の環境中への拡散は極力抑えられており、拡散したとしてもその量は極めて微量と考えられる。また、本遺伝子組換え生物は、マウス、ラット等のげっ歯類に加え、ヒト、サル、イヌ等の幅広い動物種に感染しうるが、増殖能を失っているため、gag、pol 及び env 遺伝子を発現する細胞に感染した場合等を除いて増殖することはない。したがって、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、本遺伝子組換え生物は環境中に拡散したとしてもやがて消滅すると考えられる。 また、本遺伝子組換え生物及び RCR は、微生物には感染せず、また、競合、有害物質の産生により他の微生物を減少させることはないと考えられる。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、他の微生物を減少させる性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
② 病原性 本遺伝子組換え生物及び RCR は、幅広い動物種に感染し、挿入変異によってはがん化を引き起こす可能性がある。しかし、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、環境中への拡散は極力抑えられており、拡散したとしてもその量は微量であると考えられる。また、マウス由来の産生細胞により産生された本遺伝子組換え生物は、ヒト血清により速やかに不活化されるとともに、本遺伝子組換え生物は増殖能を欠損しており、通常の細胞に感染してもウイルス粒子を産生することはないと考えられる。さらに、RCR 出現の可能性が極めて低い第三世代のパッケージング細胞を使用して製造されていること等から、患者体内に RCR が侵入する可能性も極めて低く、RCR が万一患者体内に侵入したとしても、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、RCR が環境中に放出される可能性は極めて低い。 導入遺伝子である LCAT は、遊離型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として機能するが、ヒトでの LCAT 過剰症にともなう有害な臨床症状はなく、本遺伝子が発現することにより本遺伝子組換え生物がヒトに病原性を示す可能性は非常に低い。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、病原性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
③ 有害物質の産生性 本遺伝子組換え生物の有害物質の産生性は知られておらず、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
④ 核酸を水平伝達する性質 本遺伝子組換え生物及び RCR が患者体外に排出された場合には、幅広い動物種に感染し、その核酸がゲノム中に組み込まれる可能性がある。しかし、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、本遺伝子組換え生物の環境中への拡散は極力抑えられており、拡散したとしてもその量は微量と考えられ、野生動物に核酸が伝達される可能性は非常に低い。RCR が多量に出現した場合には、血液、体液等を通じてその核酸が伝達される可能性はあるが、RCR 出現の可能性は極めて低い。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、核酸を水平伝達する性質に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
(2) 生物多様性影響評価書を踏まえた結論 以上を踏まえ、本遺伝子組換え生物を第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であると判断した。

厚生科学審議会科学技術部会
 遺伝子治療臨床研究に係る
 生物多様性影響評価に関する作業委員会 委員名簿

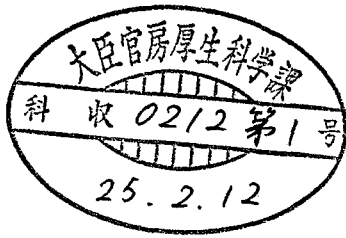
【 千葉大学医学部附属病院 】

「家族性LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）欠損症
 を対象としたLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究」

氏 名	所 属
いわさき かずひろ 岩崎 一弘	内閣府 政策統括官付参事官
かんだ ただひと 神田 忠仁	(独)理化学研究所 新興・再興感染症研究ネットワーク推進センター 業務展開チーム チームリーダー
さいとう いずむ 斎藤 泉	東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設教授
しまだ たかし 島田 隆	日本医科大学 医学部教授
はやかわ たかお 早川 義夫	近畿大学 薬学総合研究所所長
やまぐち てるひで 山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部研究員

○

○：委員長代理（五十音順 敬称略）



第一種使用規程承認申請書

平成22年4月9日

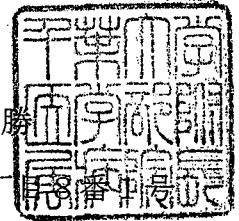
一部修正 平成25年2月7日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

申請者 千葉大学医学部附属病院長

宮崎 勝

千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目



第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第4条第2項の規定により、次のとおり申請します。

<p>遺伝子組換え生物等の種類 の名称</p>	<p>ヒト レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ（hLCAT）を発現し、マウスアンフォトロピックウイルス4070Aのenv蛋白質をエンベロープに持つ非増殖性の遺伝子組換えモロニーマウス白血病ウイルス（CGT_hLCAT RV）</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>治療施設におけるヒトの治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>治療施設の所在地 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 治療施設の名称 千葉大学医学部附属病院</p> <p>(1) CGT_hLCAT RV溶液は、容器に密閉後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内のP2レベルの拡散防止措置を執ることのできる細胞調製室（以下「細胞調製室」という。）の施錠可能な前室に設置した冷凍庫に保管する。</p> <p>(2) 凍結状態のCGT_hLCAT RV溶液の溶解、希釈及び分注操作は、細胞調製室内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。被験者の前脂肪細胞へのCGT_hLCAT RV導入操作、CGT_hLCAT RV導入細胞の培養その他のCGT_hLCAT RV希釈溶液及びCGT_hLCAT RV導入細胞の取扱いも同様に細胞調製室内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。CGT_hLCAT RV希釈溶液及びCGT_hLCAT RV導入細胞の保管は、細胞調製室内の冷蔵庫、冷凍庫又は培養器にて行う。なお、CGT_hLCAT RV希釈溶液若しくはその凍結品又はCGT_hLCAT RV導入細胞を開放系区域を通過して他のP2レベル区域に運搬する場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。</p> <p>(3) CGT_hLCAT RV溶液（希釈溶液を含む。以下同じ。）又はCGT_hLCAT RV導入細胞を廃棄する際には、ウイルス不活化を行った後、千葉大学医学部附属病院で定められた医療廃棄物管理規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。</p> <p>(4) 細胞調製室内の安全キャビネット内でCGT_hLCAT RV導入細胞懸濁液を注射器に充填し、それを二重に密閉した後、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（以下「個室」という。）に運搬する。</p> <p>(5) 被験者に対するCGT_hLCAT RV導入細胞の投与は、個室において、被験者の皮下脂肪組織内に注射移植する。</p> <p>(6) 上記(5)で用いた、CGT_hLCAT RV導入細胞に直接接触する</p>

注射針、注射器及びチューブ等の器具等並びに布及びガーゼ類等は使い捨てとし、使用後、ウイルスの不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。これらのウイルスの不活化を他の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(7) 投与後3日まで、被験者を個室で管理し、検査等の理由で被験者が一時的に個室外の開放区域に出る場合には、マスク及びガウン着用等のウイルス漏出予防措置を義務付ける。

(8) 個室における管理期間中の被験者の排泄物は、投与翌日以降に行われる患者の血液を用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）にて自己増殖能を獲得したレトロウイルス（以下「RCR」という。）の存在が否定されるまで、ウイルスの不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。

なお、臨床検体として使用する患者の血液及び尿の取扱いは、CGT_hLCAT RV溶液及びCGT_hLCAT RV導入細胞の取扱いに準じる。

(9) 個室における管理期間中、患者に対して侵襲的に使用した器具等並びに患者の血液、体液及び排泄物等に接触した器具等は、ウイルスの不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分に洗浄する。これらのウイルスの不活化を他の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(10) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の血清においてRCRが陰性であることを確認する。RCRが確認されたときは、個室における管理を継続する。

(11) 個室における管理解除後に被験者の血清からRCRが検出された場合は、直ちに被験者を上記個室における管理下に移し、上記(7)から(10)までと同様の措置を執る。