

**遺伝子治療臨床研究実施計画の申請及び遺伝子治療臨床
研究に係る生物多様性影響評価に関する申請について
(千葉大学医学部附属病院)**

【遺伝子治療臨床研究実施計画の申請】

- 諮問・付議. P1
- 遺伝子治療臨床研究実施計画申請書・概要書. P3
- 同意説明文書. P28

【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申請】

- 諮問・付議. P53
- 第一種使用規程承認申請書. P55
- 生物多様性影響評価. P58
- 厚生科学審議会科学技術部会遺伝子治療臨床研究作業委員会
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. P77

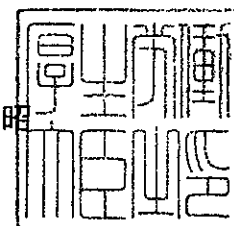


厚生労働省発科 0430 第 1 号
平成 22 年 4 月 30 日

厚生科学審議会会長

垣 添 忠 生 殿

厚生労働大臣 長 妻



諮 問 書

下記の遺伝子治療臨床研究実施計画について、その医療上の有用性及び倫理性に関し、厚生労働省設置法（平成 11 年法律第 97 号）第 8 条第 1 項第 1 号イ及び遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成 14 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号）の規定に基づき、貴会の意見を求めます。

記

平成 22 年 4 月 9 日に千葉大学医学部附属病院長から提出された「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」計画

厚 科 審 第 4 号

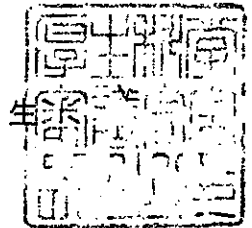
平成 22 年 4 月 30 日

科学技術部会部会長

永 井 良 三 殿

厚生科学審議会会長

垣 添 忠



遺伝子治療臨床研究実施計画について（付議）

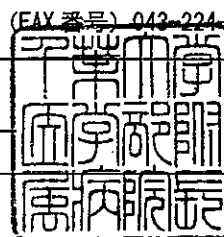
標記について、平成 22 年 4 月 30 日付け厚生労働省発科 0430 第 1 号をもって厚生労働大臣より諮問があったので、厚生科学審議会運営規程第 3 条の規定に基づき、貴部会において審議方願いたい。

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成 22 年 4 月 9 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) 043-224-3830
	代表者 役職名・氏名	千葉大学医学部附属病院長 河野 陽 (職印)



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	医学研究院臨床遺伝子応用医学・教授 武城 英明

遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成22年4月9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2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臨床遺伝子応用医学 教授	
	氏名	武城 英明	 (印)
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	氏名	所属機関・部局・職	役割
	佐藤 兼重 松本 文昭	医学研究院形成外科学 教授 医学研究院形成外科学 非常勤講師	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
	横手 幸太郎	医学研究院細胞治療学 教授	被験者の診療、移植後の観察および評価
	花岡 英紀	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	医学研究院臨床遺伝子応用医学 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）	

<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> <ul 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。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評価することを目的とする。</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>現在、LCAT 補充を目的とした遺伝子組換え型 LCAT を用いた医薬品開発は世界的に行われていない。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>	

<p>遺伝子の種類及び その導入方法</p>	<p>1. 導入する遺伝子の構造と性質</p> <p>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。</p> <p>forward primer: 5' -atcggatccagggtggaaatggggccgccc-3' reverse primer: 5' -atcggatccgctcgacggaaggtctttattcaggaggcggggg-3'</p> <p>得られた塩基配列 (約 1.3kb) を以下の文献に発表されている hLCAT 遺伝子のオープンリーディングフレーム配列と比較し、一致していることを確認した。</p> <p>【Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83 (8), 2335-2339 (1986) ACCESSION M12625】</p> <p>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。</p> <p>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</p> <p>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。</p> <p>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、<i>ex vivo</i>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。</p> <p>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。</p> <p>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 <i>ex vivo</i>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。</p> <p>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</p>
----------------------------	--

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、もとも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。したがって、ある程度の発現量を必要とする酵素補充療法における導入遺伝子方法としては *in vivo* での AAV の使用は適切ではないと考えられる。

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、相対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 LM02 のプロモーター領域近傍にレトロウイルスが組込まれ、LM02 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)。これまでに全世界でレトロウイルス遺伝子治療を受けた数千名以上の患者のうち実際に発がんにいたったのはこれらの X-SCID 遺伝子治療例のみで、またフランス及びイギリス以外で実施された X-SCID に対するレトロウイルス遺伝子治療では安全性上の問題は報告されていない。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、 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。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* の非臨床試験では形質転換が現在のところ認められていない。以上より、本臨床研究におけるがん化の危険性は極めて低いと考えられる。

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 (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、 μ DON-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、目的以外の不都合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、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 (μ CGThLCAT) を構築した。

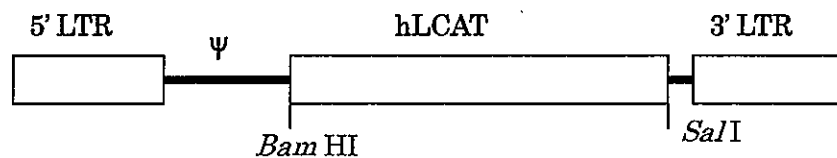
MoMLV の *gag-pol* 遺伝子とエコトロピックエンベロープ遺伝子を発現するパッケージング細胞 GP+E-86 細胞に、レトロウイルスベクター産生用プラスミド (μ CGThLCAT) をハイグロマイシン耐性遺伝子と同時に、Lipofectamine2000CD (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) を用いてトランスフェクションした。これらについて Hygromycin B 選択を行うことにより薬剤耐性細胞プールを獲得し、この細胞の培養上清から調製した hLCAT 発現エコトロピックレトロウイルスベクターを、RetroNectin (タカラバイオ株式会社) を用いて、同じく MoMLV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

	<p>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。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 <p>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</p>

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) 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。

(5) 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。

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。

(6) 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。

(7) 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、ウェ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（ 10^5 cells、平均導入コピー数 0.37 コピー/細胞）は、3 日間でおおよそ 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。

(8) 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相関していた。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

(9) 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を用いたところ、平均約 30 個のコロニーが検出された。

(10) 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。

(11) hLCAT 遺伝子導入による前脂肪細胞の特性変化

上記(1)~(4)及び(8)~(10)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 0~3 コピー程度であった。

さらに、hLCAT 遺伝子導入サル前脂肪細胞を、皮下脂肪採取を行ったカニクイザルに自家移植し、移植後 2 週間後および 2 ヶ月後に剖検を行ったところ、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。

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 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)	3.63×10^9	3.91×10^9
RCR 簡易培養法	陰性	陰性	遺伝子産物発現試験 (copies/10 ngRNA)	4.99×10^5	7.96×10^5

(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

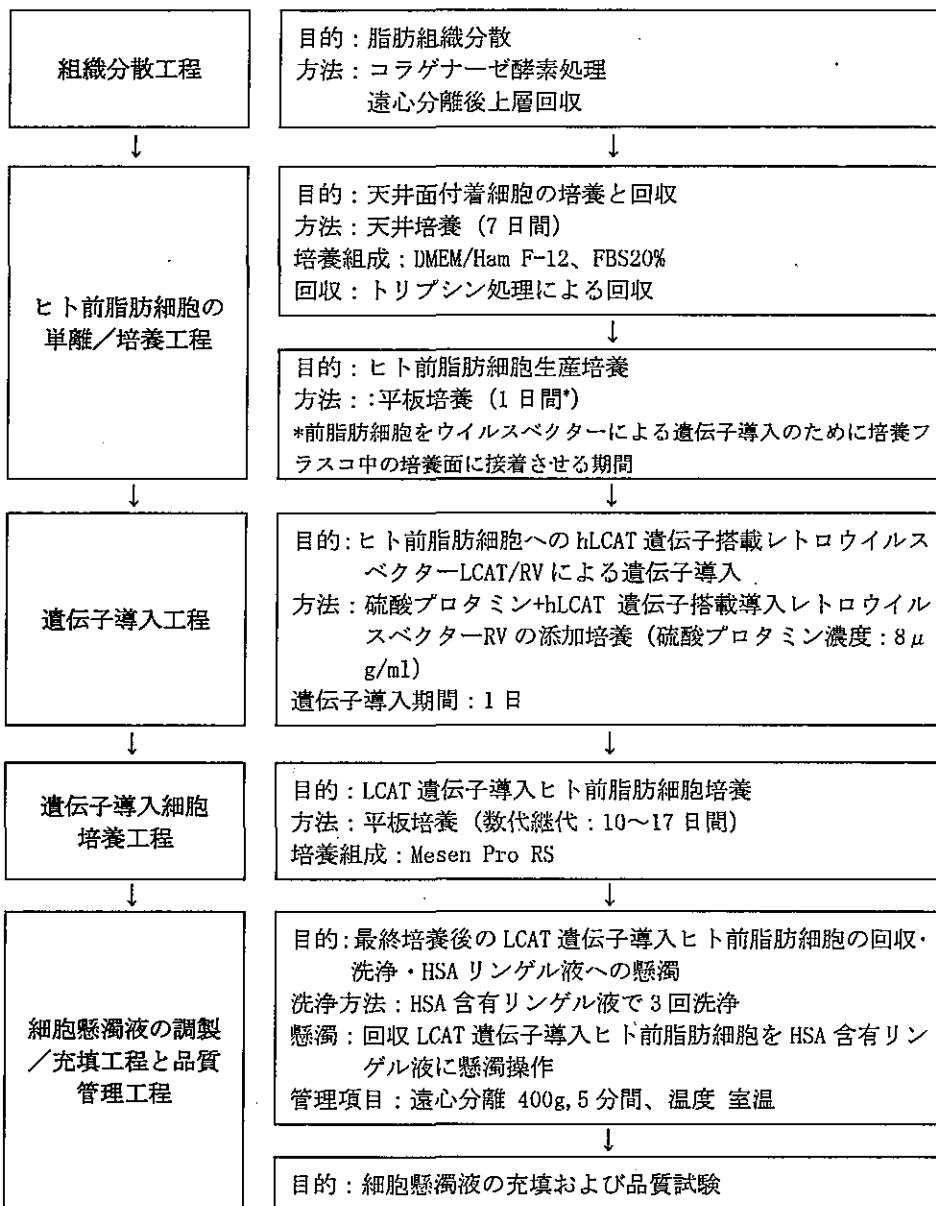
1) 細胞懸濁液製造フローチャート

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

細胞懸濁液製造工程

工程の詳細



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、組織適合性や内在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、移植後も長期にわたってクローナリティ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。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、および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、*in vitro* で継代培養した移植細胞の細胞学的観察やクローナリティ出現、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の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。ヒト型蛋白質であることから、ヒトでは抗原性を持たないと考えられるが、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。

<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 αLCAT 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。</p> <p>治療法としては、低脂肪食による食事療法以外、現在のところ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 αLCAT 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。</p> <p>LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞は、安定持続した正常 LCAT を供給することができることから、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 αLCAT 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</p>
----------------------------------	--

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	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
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（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、安全性及び有効性について評価する。

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）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ヵ月間にわたり、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(ただし、魚眼病においては腎機能障害・溶血性貧血は発現しない)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評価する。

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ヵ月後以降においても移植後5年間にわたり、3ヵ月に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ヵ月時点での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2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 (LCAT およびアポ A1) ・ 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 (魚眼病はこの限りではない) <p>高感度測定法</p> <p>古典型 LCAT 欠損症： 正常域の 10% 未満 (α、β LCAT 活性)</p> <p>部分型 LCAT 欠損症： 正常域の 20% 以下 (α、β LCAT 活性)</p> <p>魚眼病： 正常域の 20% 以下 (α LCAT 活性)</p>	<p><除外基準></p> <ol style="list-style-type: none"> ① 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 ② 不・低栄養、悪液質 ③ アポ A1 異常症、Tangier 病 ④ 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 ⑤ 皮下脂肪摘出 (20 g 程度) が困難な被験者 ⑥ 治療歴：1 ヶ月以内の新鮮血輸血等による LCAT 補充療法 ⑦ 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		