

	<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><b>5. 導入遺伝子からの生成物の構造および生物活性</b></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><b>1. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の特性</b></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><b>(1) 形態</b></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><b>(2) 細胞プロファイル</b></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<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> (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"> <li>・ 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</li> <li>・ CD105、CD146 が陽性であることから、線維芽細胞ではない</li> <li>・ 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</li> <li>・ 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</li> </ul> <p>これらより、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞は、CD13<sup>+</sup>31<sup>-</sup>34<sup>-</sup>45<sup>-</sup>90<sup>+</sup>105<sup>+</sup>146<sup>+</sup> 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。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  $4 \times 10^6$  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  $-80^{\circ}\text{C}$  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)	$3.63 \times 10^9$	$3.91 \times 10^9$
RCR 簡易培養法	陰性	陰性	遺伝子産物発現試験 (copies/10 ngRNA)	$4.99 \times 10^5$	$7.96 \times 10^5$

#### (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

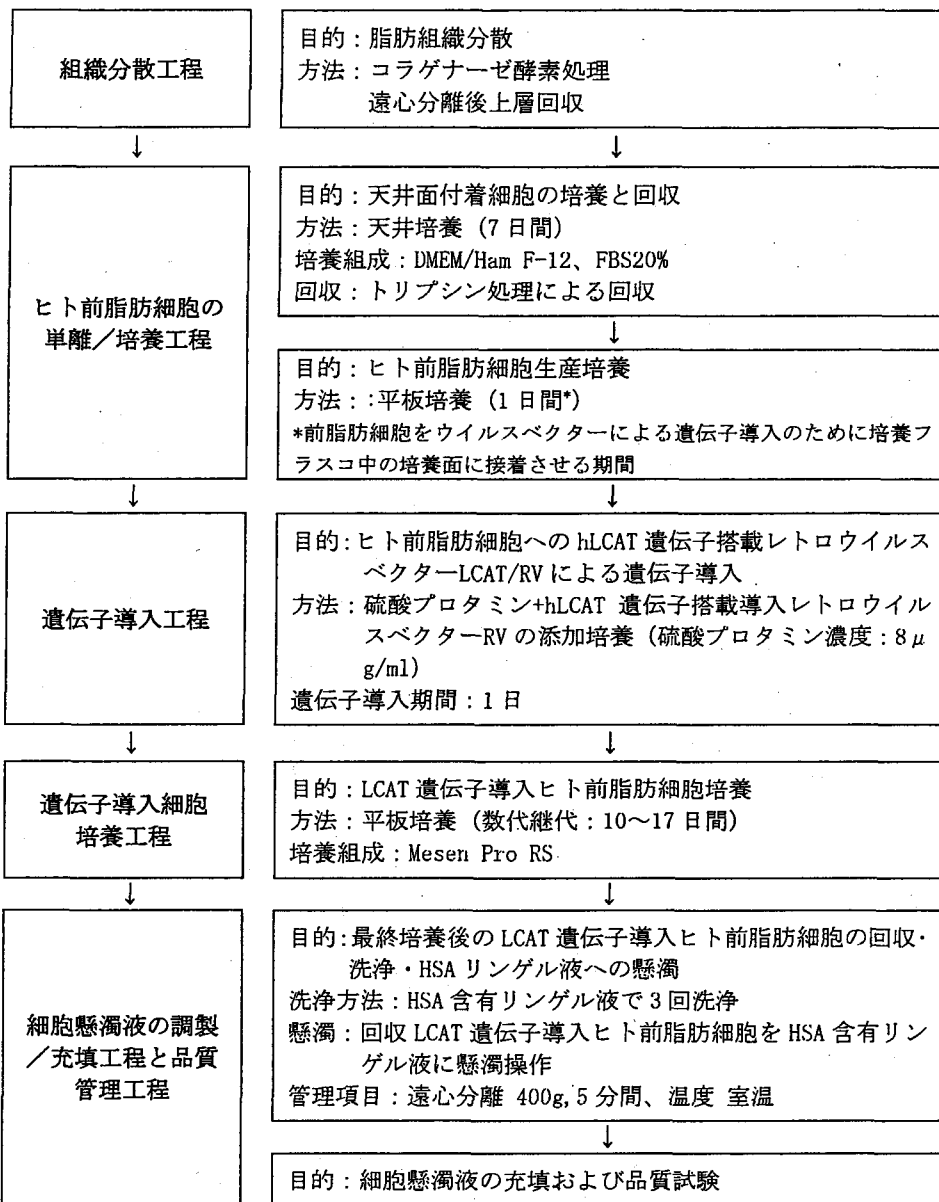
##### 1) 細胞懸濁液製造フローチャート

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) 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。

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

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 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  $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ )。  
\* 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。

### 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  $\alpha$ 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  $\alpha$ 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  $\alpha$ 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 <sup>㉑</sup> 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

<sup>㉑</sup> 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