

令和 2 年 5 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11530

研究課題名（和文）培養前駆脂肪細胞の培養工程における遺伝子発現推移解析に基づく輸送・移植製剤の確立

研究課題名（英文）Establishment of transport / transplant formulation based on gene expression transition analysis in culture process of cultured preadipocytes

研究代表者

黒田 正幸（Kuroda, Masayuki）

千葉大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：00253005

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：申請者らは、これまで脂肪組織から調製した前駆脂肪細胞に、*ex vivo*で治療用遺伝子導入を行うことで治療タンパク質を分泌する細胞（遺伝子治療用脂肪細胞）へと作り変え、それを移植することにより欠損タンパク質を患者体内で持続的に補充する治療法の開発研究を実施してきた。本研究では、患者近隣の基幹病院での投与を可能とするため、遺伝子治療用脂肪細胞を少なくとも48～72時間の非凍結下で保存可能な輸送液を開発することを目的とした。その結果、4℃で少なくとも48時間保存が可能となる細胞懸濁液の確立に至った。細胞の特性試験や非臨床動物試験等の安全性試験を経て、実用化につなげていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

導入遺伝子や標的細胞、そして移植部位など、今後取り組む個々のプロジェクト特異的に解決すべき課題はあると考えられるが、「遺伝子治療用脂肪細胞」技術ならびに従来行われてきた脂肪細胞移植治療の底上げが期待でき、かつiPSやES細胞を用いた再生医療研究へも応用できると考えられる。本研究の成果により、製造場所から患者近隣の基幹病院まで投与細胞を輸送し、当該基幹病院で「遺伝子治療用脂肪細胞」の治療を受けることが実現可能な基盤が達成された。

研究成果の概要（英文）：We have been conducting research and development of enzyme replacement therapy to continuously supply defective proteins in patients. We focus on pre-adipocytes prepared from adipose tissue as target cells, where we introduce therapeutic genes *ex vivo* to secrete therapeutic proteins (adipocytes for gene therapy) and transplant into patients. In this study, we aimed to develop a transport solution that can preserve adipocytes for gene therapy in the non-freezing state for at least 48 to 72 hours, so that they can be administered to a base hospital near the patient. As a result, we have established a cell preservation solution to keep viability of gene-transduced pre-adipocytes at 4 °C for at least 48 hours. Based on the obtained basic data, it is planned to be put to practical use through safety tests such as cell characteristic tests and non-clinical animal tests.

研究分野：遺伝子細胞治療

キーワード：前駆脂肪細胞 移植 輸送 加工

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療等の安全性の確保等に関する法律(再生医療等安全性確保法)が平成26年11月25日より施行され、本邦における再生医療の研究分野及びその周辺分野は今後も益々発展することが期待される。申請者は、これまで脂肪組織を標的とし、*ex vivo* 遺伝子導入と細胞移植に基づく欠損タンパク質補充療法の開発研究を実施してきた。脂肪細胞に関するがん化の報告は稀であり、再生医療技術に関わらず、移植用細胞調製の材料として安全性が高いことは、形成外科領域の乳房再建技術などの臨床実績からも証明されてきた。脂肪組織からは2種類の前駆脂肪細胞を調製することが可能である。一つは、脂肪組織コラゲナーゼ処理・遠心後の沈査(Stromal vascular fraction、SVF)から調製される接着細胞、いわゆる脂肪幹細胞(ASC)である。もう一つはコラゲナーゼ処理・遠心後の浮遊分画(成熟脂肪細胞)から天井培養法により調製される接着細胞であり、申請者は ceiling culture-derived proliferative adipocyte (ccdPA) と呼び研究開発の対象としてきた。マウス脂肪組織より調製したインスリン遺伝子導入 ccdPA は、糖尿病モデルマウスの移植実験で長期に血糖降下作用を示す(Diabetologia, 2005)。この成果をもとにコンセプト特許(「遺伝子治療用初代脂肪細胞」、特許第4879867、US 7,820,438 B2、EP 1541674 B1)が成立している。さらに遺伝子治療法に最適な細胞(低平均導入コピー数で高い陽性率)の調製技術を標準化した(TOGTJ, 2011、JDI, 2011、特許第5806791)。本細胞が分泌する蛋白は、患者血清への添加実験(MGM, 2010)、モデルマウスの移植治療実験で有効性が証明された。その特性を難治性疾患の酵素補充療法に応用展開し、現在、千葉大学医学部附属病院未来開拓センターを拠点とし、第一種再生医療臨床研究「家族性レシチン:コレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)欠損症を対象としたLCAT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」が、再生医療等安全性確保法下、平成28年8月8日付認可され、患者を対象とした移植治療臨床研究が可能となっている(厚生労働省発医政0808第2号)。これは現在臨床評価が可能な唯一の*ex vivo* 遺伝子治療国産シーズである。

この「遺伝子治療用初代脂肪細胞」シーズの特徴の1つは、治療遺伝子を変更することで、原則移植する方法を変えることなく、全ての酵素補充療法に適応可能であるという汎用性である。糖尿病、血友病、ライソゾーム病などの、全身性の障害が引き起こされる疾患から、加齢黄斑変性症、アルツハイマー型認知症、抗体医薬などの新たな疾患領域への応用展開等、多くの難病に苦しむ患者の福音となる可能性がある。

しかし、この治療技術を多様な疾患領域に普及するためには、以下の課題が存在する。

LCAT プロジェクトではリンゲル液にヒトアルブミンを加えた溶液(リンゲル-HSA)で細胞を懸濁・運搬し、移植生着率に寄与するフィブリンゲル(EMM, 2011)を混合することによる提供を行う。移植細胞の非凍結状態での長時間の保存は難しく、千葉大学医学部附属病院に設置された細胞調製室で製造した細胞を当院でそのまま投与するため、遠方の患者さんに当院まで来ていただく必要がある。すなわち、その治療を望む患者さんへの提供や普及が制限される可能性がある。少なくとも48~72時間(理想的には1週間)程度の非凍結状態での保存・輸送が可能となる条件が必要である。実用化(標準化)にはよりシンプルな処方が求められる。これらの保存・運搬条件と移植条件が同一となればさらに理想的である。

この治療技術は移植後治療タンパクを分泌する脂肪細胞として生着することを期待するものであり、脂肪細胞の初代培養(天井培養法)が標準化されたことから、本研究を開始するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究課題では上記の課題解決を目的として、まず初代培養、その後の培養過程における培養脂肪細胞の分化関連転写制御遺伝子の発現推移を検討し、そのシグナル伝達系に関連する知見を取得する。付随して過去に遺伝子導入用ウイルスベクターを作出している治療用遺伝子に関して、ccdPA に遺伝子導入することにより、分泌までのどのプロセスが律速となっているかを遺伝子ごとで検討する。その上で、その特性を維持ないしは、脂肪分化を指向するような保存溶液、それと同時に移植効率を向上させる細胞懸濁液カクテルのプロトタイプを作出することを目的とする。本研究により「遺伝子治療用脂肪細胞」の次世代化を目指す。この研究に基づき、遺伝子治療用脂肪細胞の汎用性の拡大のみならず、他の再生医療分野への展開を進めることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では2種類の前駆脂肪細胞(ccdPA と ASC)の初代培養、その後の遺伝子導入・継代培養過程において、脂肪分化関連遺伝子の発現推移を複数のドナーについて検討した。輸液として薬事承認を受けている製品について、各種成分の含量等を調査し、典型的な輸液を数種類プロトタイプとなり得るかどうか検討した。引き続き現行のリングル-HSA を基本的な組成として、細胞の保存に有効な作用を持つと考えられる候補物質(及びその組み合わせ)を添加した溶液を作製し、長時間保存後のバイアビリティやマウス移植実験における生存率を指標として保存/輸送用カクテルと移植用カクテルの開発を行った。これらの輸送カクテルと移植カクテルの研究結果の融合を図り、最終的に、細胞の生存率や導入遺伝子産物の血中への分泌を指標として、マウス移植実験での脂肪細胞としての生着評価により、輸送後細胞洗浄することなく移植が可能な遺伝子治療用脂肪細胞カクテルのプロトタイプを作製した。

## 4. 研究成果

### (1) 2種類の前駆脂肪細胞(ccdPA と ASC)における脂肪分化関連遺伝子の発現推移

健常人ボランティアより調製した前駆脂肪細胞について、調製後の遺伝子発現プロファイルを評価した。私たちが既に報告しているように(AJP-CP, 2011)、ccdPA と ASC の間で PPAR $\gamma$  遺伝子発現に違いは認められなかった。他の分化関連遺伝子の解析において、ccdPA と ASC の間で発現が異なる遺伝子候補が見出された。評価した検体数が少ないため、今後複数検体の評価が必要であるが、成熟脂肪細胞由来の ccdPA と ASC との違いを特徴づける遺伝子である可能性がある。今後同一ドナー由来の成熟脂肪細胞との比較解析も加えて、遺伝子発現解析を行い、それらの遺伝子を同定する予定である。

### (2) 遺伝子導入前駆脂肪細胞の細胞懸濁液の至適化に向けた検討

本研究の主要目的であるヒト前駆脂肪細胞懸濁液を 4°C で少なくとも 48 時間以上、バイアビリティの低下を最小限にできる細胞懸濁液の基本組成の探索を行った。まず、医薬品として承認されているいくつかの輸液について検討したが、検討した範囲ではリングル-HSA よりも細胞の生存率が低下した。輸液にはグルコースやアミノ酸をはじめとする栄養素が含まれており、細胞を非凍結下で保存した場合、それらが代謝され、細胞内外の pH 変化等が起こることにより、細胞のバイアビリティが低下したのではないかと考えられた。

種々の既報から非凍結状態での細胞の保存に有効な作用(抗酸化、不凍化、粘度調整、代謝維持等)を有すると考えられる試薬について、リングル-HSA に添加する検討を 100 種類程度の組

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

み合わせにより検討したが、有意にバイアピリティを向上させる試薬および組み合わせは見つからなかった。一方、フラスコに接着状態の細胞のバイアピリティを低温で維持できる溶液に関する既報に基づき、その溶液（メーカーより購入の溶液 A、既報に基づきさらに改良されており、その組成は非開示）を用いて LCAT 遺伝子導入した ccdPA を用いて検討したところ、リングル-HSA に比べて明らかにバイアピリティが向上した（図 1）。

既報に基づき、溶液 A に含まれている物質が、ccdPA のバイアピリティにどのような影響を与えるのか、また、溶液 A は少なくとも既報においてはかなり複雑な組成であることから、溶液 A と同等の性能を有するシンプルな細胞懸濁液の確立について追加検討を進めた。

リングル-HSA に加えられている HSA については、投与液調製時に、遠心洗浄を繰り返すことから、この研究以前に細胞の遠心後の回収効率に着目した検討を行い、濃度を決定していた。本研究の目的は、投与液調製後の細胞のバイアピリティ維持であることから、HSA 濃度についても至適化を行う必要があると考え、検討を行った。濃度の影響をより明確にするため、組成としてシンプルなリングル液と PBS を用いて至適化検討を行った。その結果、4 保存における HSA 濃度が至適化された。

次に、リングル液の細胞懸濁液は pH が酸性になっていること、そして溶液 A についても緩衝能が付与されていることから、緩衝能についても検討を行った。その結果、溶液 A に前述の検討で至適化された HSA を添加した溶液は、現行のリングル-HSA に比べて 4 でのバイアピリティ維持能が向上することが明らかとなった。また HSA 濃度を至適化したリングル-HSA に緩衝能を付加した溶液において、HSA を加えた溶液 A と同等のバイアピリティの維持が認められた（図 2）。

最終的な出荷の段階では細胞の濃度はかなり濃くなることから、出荷時の細胞濃度での検討を行った。その結果、リングル-HSA に緩衝能を追加した溶液（以下、「溶液 RB-HSA」と呼ぶ）とするのみで、溶液 A と同等の細胞生存効果が確認された（図 3）。予備検討の段階で RB-HSA に対して添加することで細胞の生存率を向上させることが確認された医薬品原体（M）を見出した。しかしながら、投与時の細胞濃度では、有意な効果は認められなかった。

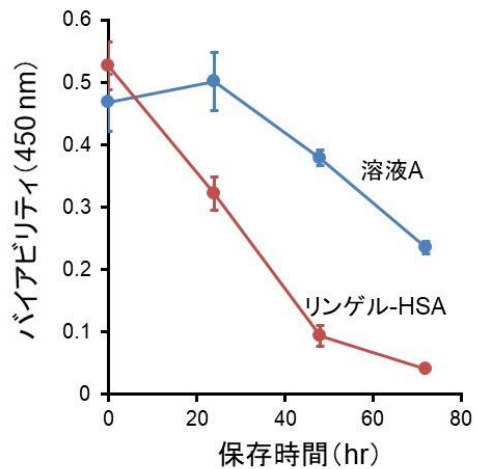


図 1. リングル-HSA と溶液 A により調製した細胞懸濁液のバイアピリティの比較  
所定の時間 4°C で保存後の細胞懸濁液を播種し、翌日細胞のバイアピリティを WST アッセイにより測定した。

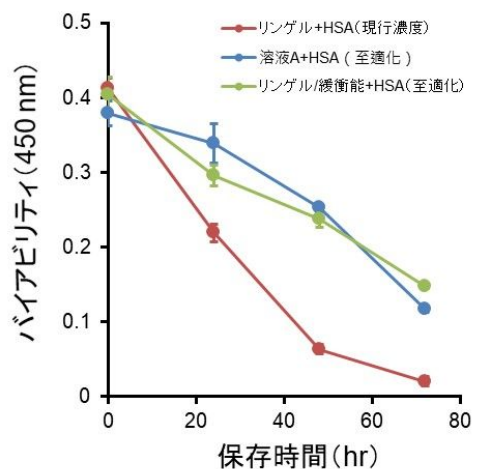


図 2. 緩衝能の検討

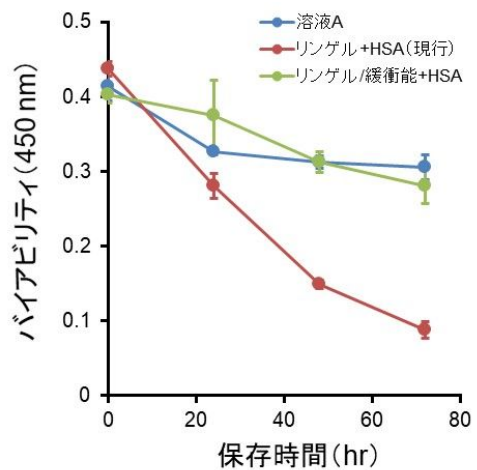


図 3. 投与液調製時の細胞濃度での検討

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

医薬品原体(M)については、そのメカニズム含めた今後の検討が必要であると考えられた。医薬品原体(M)は遺伝子治療用脂肪細胞の投与方法である注射剤としての適応はないため、今後遺伝子治療用脂肪細胞の実用化に向けては注射剤としての安全性等の評価が必須である。それに関連した医薬品原体(M)の適応の検討については今後の研究課題とし、医薬品原体(M)不含の組成についてマウス移植実験を実施した。8時間保存後のRB-HSAと現行組成で調製直後の細胞懸濁液について、移植14日後の細胞の生

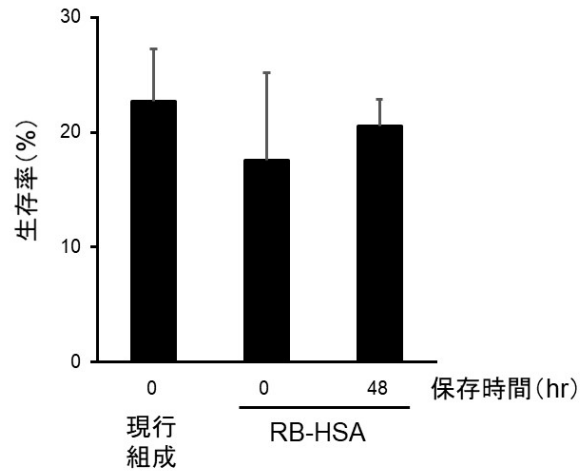


図 4. マウス移植後の生存率

存率を比較したところ、同等の生存率であった(図4)。また、遺伝子導入産物であるLCATのマウス血中への分泌を検討したところ、RB-HSAによって調製し、48時間保存した細胞懸濁液を移植したマウスにおいて、現行組成で調製直後の細胞懸濁液を移植した場合と比較してほぼ同程度のLCAT分泌が確認された。

以上の結果から、RB-HSAで調製した細胞懸濁液は、4で48時間程度保存しても、現行のリンゲルHSAで調製された直後の細胞懸濁液と同程度のバイアビリティを維持していることが確認された。今後、本輸送・移植製剤の実用化に向けて、組成の改良によるバイアビリティのさらなる向上、保存中の細胞特性の変化、非臨床安全性試験等を実施する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kuroda Masayuki, Saito Yasushi, Aso Masayuki, Yokote Koutaro	4. 巻 66
2. 論文標題 A Novel Approach to the Treatment of Plasma Protein Deficiency: <i>Ex Vivo</i>-Manipulated Adipocytes for Sustained Secretion of Therapeutic Proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem Pharm Bull (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 217 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c17-00786	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kuroda M, Ishikawa K, Kubota Y, Mitsukawa N, Tawada A, Aoyagi Y, Asada S, Yamamoto T, Konno S, Tanaka S, Tanio M, Aso M, Saito Y, Wada J, Yokote K.
2. 発表標題 First in human clinical trial of treatment of familial LCAT deficiency syndrome by self-transplantation of therapeutic-enzyme secreting adipocytes.
3. 学会等名 25th TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society) World Congress. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Aoyagi Y, Kuroda M, Asada S, Onitake A, Kirinashizawa M, Yamamoto T, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Saito Y, Yokote K, Aso M.
2. 発表標題 A novel technology for lifelong treatment of intractable plasma protein deficiency: Ex vivo-manipulated adipocytes for sustained secretion of therapeutic proteins.
3. 学会等名 25th TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society) World Congress. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川耕、黒田正幸、武城英明、和田淳、麻生雅是、齋藤康、横手幸太郎.
2. 発表標題 家族性LACT欠損症に対する脂肪細胞を用いた遺伝子/再生医療技術による難病治療法の実用化研究.
3. 学会等名 第50回日本動脈硬化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi N, Kuroda M, Yokote K, Saito Y, Aso M
2. 発表標題 Genetically Modified Adipocytes, GMAC, for Regenerative Cell Medicine and Gene Therapy
3. 学会等名 5th International Symposium for Medicinal Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1)黒田正幸、武城英明、和田淳、石川耕、麻生雅是、齋藤康、横手幸太郎
2. 発表標題 家族性LCAT欠損症 - 腎不全関連異常リポ蛋白の同定とLCAT分泌自己脂肪細胞の移植による持続的LCAT補充療法 -
3. 学会等名 第49回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	窪田 吉孝  (Kubota Yoshitaka)  (10375735)	千葉大学・大学院医学研究院・講師   (12501)	