


様式A(4)

厚生科学研究費補助金研究報告書

平成 12 年 4 月 8 日

厚生大臣 丹羽 雄哉 殿

研究者 フリカナ オザワ ケイヤ
氏名 小澤 敬也 
(所属施設 自治医科大学 医学部)

平成 11 年度厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・遺伝子治療 研究事業)に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名(課題番号) AAVを利用した遺伝子導入法の基礎研究とその応用
(パーキンソン病の遺伝子治療法開発) (H10-ゲノム-026)

国庫補助金精算所要額 金 60,000,000 円也

- 1 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク (別添1のとおり)
- 2 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添2のとおり)
- 3 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添3のとおり)
- 4 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名(雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Anal Biochem 278 91-92 DNA/calcium phosphate precipitates mixed with medium are stable and maintain high transduction efficiency	2000年		Urabe, M, Kume, A, Tobita, K., and Ozawa, K
J Gen Virol 80 2477-2480. Highly-regulated expression of adeno-associated virus large Rep proteins in stable 293 cell lines using the Cre-loxP switching system	1999年		Ogasawara, Y, Mizukami, H, Urabe, M, Kume, A, Kanegae, Y, Saito, I, Monahan, J, and Ozawa, K
Biogenic Amines 15 21-37 Strategies for gene therapy of Parkinson's disease using adeno-associated virus (AAV) vectors	1999年		Ozawa, K, Fan, D, Ogawa, M, Urabe, M, Kume, A, Monahan, J, and Nakano, I
Jpn J Cancer Res 90 476-483 Efficient production of adeno-associated virus vectors using split-type helper plasmids	1999年		Ogasawara, Y, Urabe, M, Kogure, K, Kume, A, Colosi, P, Kurtzman, G J, and Ozawa, K

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執筆者氏名
J Virol 73 2682-2693 Charged-to-alanine scanning mutagenesis of the N-terminal half of adeno-associated virus type 2 Rep78 protein	1999年		Urabe, M , Hasumi, Y , Kume, A , Surosky, R T , Kurtzman, J , Tobita, K., and Ozawa, K
Gene 230 233-239 Molecular cloning of the human Nurr1 gene. Characterization of the human gene and cDNAs	1999年		Ichinose, H , Ohye, T , Suzuki, T , Sumi-Ichinose, C , Nomura, T , Hagino, Y , and Nagatsu, T
J Neurochem 73 2510-2516 Characterization of wild-type and mutants of recombinant human GTP cyclohydrolase I Relationship to etiology of dopa-responsive dystonia	1999年		Suzuki, T , Ohye, T , Inagaki, H , Nagatsu, T , and Ichinose, H
Biochem Biophys Res Commun 260 747-751 Decrease in GTP cyclohydrolase I gene expression caused by inactivation of one allele in hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation	1999年		Inagaki, H , Ohye, T , Suzuki, T , Segawa, M , Nomura, Y , Nagatsu, T , and Ichinose, H

5 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況

特になし

別 添 2

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療 研究事業）

総括 研究報告書

AAVを利用した遺伝子導入法の基礎研究とその応用
（パーキンソン病の遺伝子治療法開発）

主任 研究者 小澤 敬也 自治医科大学

研究要旨 AAVベクターに関する基礎研究としては、AAVベクター作製用パッケージング細胞の開発が重要課題であり、そのために必要な技術として、全AAV蛋白質の発現を一括制御するためのシステムの構築を行った。第19番染色体部位特異的遺伝子組込み（TVI）法に関しては、導入遺伝子の組込み部位の塩基配列の解析を行った。また、TVI活性を保持し、細胞毒性を減弱させた変異Repの開発を行った。AAVベクターの応用研究としては、パーキンソン病の遺伝子治療法の開発を進めた。治療用遺伝子としては、ドーパミン合成に必要なチロシン水酸化酵素（TH）、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）、及びGTPシクロヒドロラーゼI（GCH）の各遺伝子に注目し、それぞれをAAVベクターに挿入して遺伝子治療実験を行った。その結果、パーキンソン病モデルラットの系で、これら三者の併用が最も有効であることが示され、治療効果も長期間持続することが判明した。また、MPTP投与によるパーキンソン病モデルサルを使った前臨床研究を開始した。

分担研究者

中野 今治

自治医科大学医学部

教授

永津 俊治

藤田保健衛生大学総合医科学研究所

所長・教授

最近脚光を浴びているアデノ随伴ウイルス（AAV: adeno-associated virus）を利用した遺伝子導入法に焦点を当て、その基礎研究から応用の可能性について検討した。AAVベクターの有利な点は、野生型AAVがウイルスゲノムを第19番染色体長腕19q13.3-qter（AAVS1領域）に部位特異的に組み込む性質を有し、非病原性で安全性が高いと考えられること、また非分裂細胞への遺伝子導入が可能であることなどがあげられる。このようなユニークな性質を持つAAVに由来するベクターの実用化を図るには、作製法自体の開発が必須であり、パッケージング細胞株の樹立は重要課題である。そのための基礎実験

A. 研究目的

遺伝子治療臨床研究が米国を中心に活発に実施されているが、臨床的有効性が確認されたものはまだほとんどなく、ベクター開発などの基礎研究の重要性が指摘されている。本研究では、

として、これまでCre/loxP法を応用して細胞毒性を持つlarge Repの発現を厳密に調節する方法を検討してきたが、本年度はさらに、全AAV蛋白質の発現を一括制御するためのシステムの開発に取り組んだ。また、AAVの性質を利用した染色体部位特異的遺伝子組込み法 (TVI: targeted vector integration) に関しては、治療用遺伝子の第19番染色体AAVS1領域特異的組込みを狙った将来性のある技術であり、その開発を推進した。特に、AAVS1以外の場所で、組込みが起こりやすい塩基配列が存在するかどうか検討した。また、TVI活性を保持し、細胞毒性が減弱した変異Repが得られるかどうか調べた。

応用研究としては、神経細胞がAAVヘクターに適した標的細胞であることに着目し、黒質線条体系ドーパミンニューロンの選択的変性を来す神経変性疾患であるパーキンソン病の遺伝子治療法開発に向けた基礎実験を推進した。パーキンソン病に対する遺伝子治療の戦略としては、ドーパミン合成酵素遺伝子を用いる方法と、ドーパミン神経細胞の生存維持に関係する神経栄養因子遺伝子を用いる方法が代表的なものである。前者は対症療法の範疇に入るものであり、後者は疾患の進行を防ぐことを目的としたものである。ドーパミン合成には、チロシン水酸化酵素 (TH: tyrosine hydroxylase) と芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC: aromatic L-amino acid decarboxylase) が必要である。これまで、AAV-THにAAV-AADCを併用すると、パーキンソン病モデル動物であるドーパミンニューロン破壊ラットのアポモルフィン誘発回旋運動が効率よく減少することを見出した。本年度は、THとAADC遺伝子に加えGTPシクロヒドロラーゼI (GCH: GTP cyclohydrolase I) 遺伝子をさらに併用する遺伝子治療実験をモデルラットの系で行った。GCHはTHの補酵素であ

るテトラヒドロピオプテリン (BH₄) 合成系における律速酵素であり、GCHの遺伝子導入によりドーパミンの合成量のさらなる増加が期待できる。このGCHに関しては、大腸菌で発現させた組換え蛋白質を用いて、酵素化学的解析も行った。また、パーキンソン病モデルラットを用いた治療実験では、できるだけ長期間の観察を行い、遺伝子治療の効果がどの程度持続するか検討した。さらに、前臨床研究として、霊長類のカニクイザルの系で遺伝子治療実験を行う必要があるため、その研究に着手した。

B. 研究方法

1) AAVヘクター作製技術の開発：高効率のパッケージング細胞株の開発に向けて、Cre/loxPによりAAV蛋白質の発現を厳密に制御するシステムに関する検討を進めてきた。これまでの研究で、最も細胞毒性が強いと考えられるlarge Repの発現を制御した293細胞株を作製し、それを用いてAAVヘクターの作製効率を検討したが、その結果、その他のAAV蛋白質も制御する必要があることが示唆された。そこで、変異loxPを用いた新規Cre/loxPシステムにより、全てのRep/Cap蛋白質の発現を一括制御する方法について検討した。具体的には、プロモーターとAAV蛋白質コード領域の間に、野生型あるいは変異loxPで挟んだsuffer配列を挿入したプラスミドを構築し、それぞれを293細胞にトランスフェクションした。さらに、Creリコンビナーゼ発現プラスミドのトランスフェクションあるいはCreリコンビナーゼ発現アデノウイルスベクターの感染を行った。その後、suffer配列がCreリコンビナーゼの作用により切り出されているかどうか、DNA-PCR法により確認し、また各AAV蛋白質の発現誘導に関して、western分析を行った。

2) 第19番染色体部位特異的遺伝子組込み法の

開発．野生型AAVはそのウイルスゲノムを第19番染色体長腕AAVS1領域に特異的に組み込む性質を有しているが、この現象はウイルスゲノム両端のITR (inverted terminal repeat) とRep蛋白質を介したものと考えられている。この現象を解析するために、ITRで挟んだneo^r遺伝子発現ユニットを持つプラスミド (pWNeo) とRep発現プラスミドを標的細胞 (293細胞またはK562細胞) に同時にトランスフェクションした。この系における染色体組込み部位には、AAVS1以外の未同定の部位が含まれる。これら未同定の領域を解析し、組込みが生じやすい塩基配列の特徴について検討した。AAVS1領域への組込みの確認には、PCR/DNA gel法、Southern分析法、FISH法によった。G418で選択後に得られた細胞クローンでAAVS1領域以外に導入遺伝子の組込みの起きた各々8、10クローンを対象に選び、解析を行った。即ち、各クローンからgenomic DNAを抽出し、それを鋳型にしてAlu-PCRを応用したnested PCRで組込み近傍領域を増幅し、サブクローニングを行い、その塩基配列を決定した。また、Rep78のN末端約1/3の領域の極性アミノ酸をすべてアラニンに置換した変異Repに関しては、これまでに開発した約60種類の変異Rep発現ベクターの細胞毒性を中心に、さらに詳細に解析を行った。その他、DNAシャフリング法によりランダムに変異を挿入したRep遺伝子の解析も進めた。即ち、AAVS1の塩基配列を持つエピソーム型ベクター (EBV由来のEBNA1とori配列を持つ) を予め293細胞に導入しておき、その系で、AAVS1特異的組込み活性を保持し、細胞毒性の低くなった変異Rep遺伝子をスクリーニングする作業を進めた。

3) パーキンソン病の遺伝子治療法開発．TH遺伝子、AADC遺伝子、GCH遺伝子、あるいはLacZ遺伝子の発現ユニットを含むAAVヘクター

(AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCH、及びAAV-LacZ) を作製した。AAVヘクターは塩化セシウム密度勾配超遠心法により精製した。パーキンソン病モデルラットは、黒質線条体路に6-OHDA (6-hydroxydopamin) を注入して作製した。遺伝子治療実験では、モデルラットの線条体に、AAV-TH + AAV-AADC + AAV-LacZ、あるいは、AAV-TH + AAV-AADC + AAV-GCH (各 1×10^8 vector particles) をステレオ装置を用いて注入した。導入遺伝子の発現に関しては、THと神経細胞のマーカであるMAP2 (microtubule-associated protein 2)、あるいはグリア細胞のマーカであるGFAP (glial fibrillary acidic protein) との蛍光二重染色を行い、標的細胞の種類を検討した。また、THとAADC、THとGCHに関して蛍光二重染色を行い、co-transductionの効率について検討した。さらに、導入遺伝子のヘクター注入部位近傍での発現の拡がりについては、7月後及び12カ月後の脳切片で、免疫組織染色によりTHの発現を調べた。遺伝子治療の効果判定については、アポモルフィン誘発異常回旋運動の程度を12カ月間に亘って比較検討した。その他、生化学的検査として、遺伝子導入後、線条体部分を取り出し、HPLC法によりBH₄とドーパミンの測定を行った。カニクイザルを用いた前臨床研究 (筑波霊長類センターとの共同研究) に関しては、神経毒のMPTPをサルに長期間投与してパーキンソン病モデル (薬剤性パーキンソニズム) を作出した。そして、TH、AADC、GCHの各遺伝子を含むAAVヘクターを定位脳手術により線条体に注入する治療実験をスタートした。一ヶ月後に脳切片標本を作成し、TH免疫組織検査を行い、導入遺伝子の発現の拡がりを調べた。

その他、GST融合ヒトGTPシクロヒドロラーゼI (GST-hGCH) を大腸菌で発現させる実験を行った。精製GST-hGCHよりGST領域を除去

し、酵素化学的性質を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は、非病原性のAAVを利用した遺伝子導入法の開発とその応用を目指したものであり、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的問題が生ずることはないと考えている。ラットを用いた実験計画は、自治医大動物実験指針規定に沿って動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて審議され、承認を受けた。筑波霊長類センターでのサルの実験は、厚生省霊長類共同利用施設の利用許可を受け、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」および筑波霊長類センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。

C 研究結果

1) AAVベクター作製技術の開発 293細胞の系で、プラスミドトランスフェクションあるいはアデノウイルスベクターの感染によりCreリコンビナーゼを作用させたところ、DNA-PCR法ならびにwestern法の両者において、変異型loxPは野生型loxPとほぼ同等の組換え効率を有することが判明した。

2) 第19番染色体部位特異的遺伝子組込み法 (TVI) に関する基礎的検討: Alu-PCR法により、8個の293細胞クローンからは9個のDNA断片が、10個のK562細胞クローンからは12のDNA断片が各々増幅された。それらの塩基配列を解析したところ、プラスミド部分とAlu配列間のゲノム断片が増幅されていることが確認できた。検討した範囲では各DNA断片間で共通の特徴的な塩基配列はなかったが、K562から得られたDNAの一つにGAGTの繰り返し配列を認めた。但し、ゲルシフト法による解析では、この配列にRep蛋白質結合能は検出されなかった。変異Repの解析では、TVI活性を保持し細胞毒性の減弱したミュータントの分離を試みた。その結

果、そのような傾向の性質を持つものが5個 (H18A, RD61AA, R122A, E201A, E226A) 得られた。但し、細胞毒性を完全に取り除くには至らなかった。DNAシャフリング法により得られた変異Repに関しては、スクリーニングにより候補となるクローンが得られ、現在確認実験を行っている。

3) パーキンソン病の遺伝子治療法開発: パーキンソン病モデルラットを用いた遺伝子治療実験では、まず、蛍光二重染色により標的細胞の検討を行った。その結果、TH陽性はほとんどがMAP2陽性 (神経細胞) であり、GFAPは陰性であった。また、MAP2陽性細胞の約20%がTH陽性であった。THとAADC、THとGCHの蛍光二重染色では90%以上の効率でcoexpressionが認められた。TH免疫組織染色では、遺伝子導入後、7カ月及び12カ月のいずれの時点でも広範囲に導入遺伝子の発現が確認された。行動異常に対する遺伝子治療の効果については、AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCHの三者同時の遺伝子導入を行った群の方が、AAV-THとAAV-AADCの二者のみの群に比べて、アポモルフィン誘発回旋運動の明らかな減少が観察された。また、生化学的検査でも、線条体におけるBH4とドーパミン濃度が三者併用の方が有意に高いことが確認された。カニクイザルを用いた前臨床研究 (筑波霊長類センターとの共同研究) に関しては、約半年間のMPTP投与によりパーキンソン病モデルが作出できた。AAVベクター注入一ヶ月後の脳切片標本では、TH染色で、線条体のベクター注入部位近傍において十分広範囲に遺伝子発現を確認できた。

大腸菌で発現させたGCHの酵素化学的解析では、ゲルろ過での溶出パターンから、ネイティブなものと同様に10量体構造をとることが判明した。さらに、酵素反応速度論的解析を行った結果、GCHの反応触媒部位はC末端側に

存在すること、N末端側アミノ酸は酵素反応に対して抑制的に働いていることが示唆された。

D 考察

1) AAVベクター作製技術の開発 これまでAAVベクターの臨床応用を阻んできた大きな要因は、効率の良い作製法が確立されていないことである。特に、パッケージング細胞株の開発は重要課題として、活発な開発競争が行われている。本年度の研究で、全てのAAV蛋白質の発現を制御する新しい手法の目処が立ったため、今後、高効率のAAVベクター作製用パッケージング細胞樹立への応用が期待される。

2) 第19番染色体部位特異的遺伝子組込み法の開発：本年度は、TVI法を行った場合の導入遺伝子の組込み部位塩基配列について詳細な検討を行った。これらの研究成果に基づき、組込みが起こった部位のオリジナルの塩基配列を今後解析することになり、さらに有用な情報が得られるものと考えられる。また、TVI法の実用化を推進するには、細胞毒性を減弱させた変異Repの開発が重要となる。Rep蛋白質のTVI活性と細胞毒性を機能的に分離することができれば大きな前進となるが、今回、そのための基礎的な知見が得られた。

3) パーキンソン病の遺伝子治療法開発：パーキンソン病の治療としてはL-ドーパ療法が一般的であるが、そのような内服療法には様々な問題点が伴っている。本研究では、ドーパミン合成酵素遺伝子を組み込んだAAVベクターを線条体に注入し、直接線条体内でドーパミンを産生させる遺伝子治療の実験を行ってきた。これまでに、AAV-THとAAV-AADCの併用がTH単独の場合に比べて有効性が高いことを見出している。本年度は、パーキンソン病モデルラットを用いた遺伝子治療実験で、さらにGCH遺伝子も併用することにより、異常運動の明らか

な改善が認められ、さらにこの治療効果が長期間持続することを確認した。パーキンソン病ではドーパミンニューロンの変性により線条体内のGCHの活性も低下していると考えられ、より効率よくドーパミンを生成するためにGCH遺伝子の補充が有効であることが今回の実験で示された。現在、長期MPTP投与による薬剤性パーキンソニズムを発症させたカニクイザルを用いて、遺伝子治療前臨床研究を開始した。ラットだけでなく、大動物でも治療効果が得られることを確認することは、ヒトへの臨床応用の前段階として極めて重要なステップである。

E. 結論

AAVベクターに関する基礎研究としては、AAVベクター作製用パッケージング細胞の開発が重要課題であり、そのために必要な技術として、全AAV蛋白質の発現を一括制御するためのシステムの構築を行った。第19番染色体部位特異的遺伝子組込み (TVI) 法に関しては、導入遺伝子の組込み部位の塩基配列の解析を行った。また、TVI活性を保持し、細胞毒性を減弱させた変異Repの開発を行った。AAVベクターの応用研究としては、パーキンソン病の遺伝子治療法の開発を進めた。治療用候補遺伝子としては、ドーパミン合成に必要なTH、AADC、及びGCHの各遺伝子に注目し、それぞれをAAVベクターに挿入して遺伝子治療実験を行った。その結果、パーキンソン病モデルラットの系で、これら三者の併用が最も有効であることが示され、治療効果も長期間持続することが判明した。また、MPTP投与によるパーキンソン病モデルサルを使った前臨床研究を開始した。

F 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ozawa, K, Fan, D -S., Shen, Y, Muramatsu,

- S., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., Ogawa, M., Urabe, M., Kume, A., and Nakano, I.: Gene therapy of Parkinson's disease using adeno-associated virus (AAV) vectors J Neural Transm. (suppl.) (in press)
- 2) Matsuda, K.M., Madoiwa, S., Hasumi, Y., Kanazawa, T., Saga, Y., Kume, A., Mano, H., Ozawa, K., and Matsuda, M. A novel strategy for the tumor angiogenesis-targeted gene therapy. Generation of angiostatin endogenous plasminogen by protease gene transfer. Cancer Gene Ther. (in press)
- 3) Urabe, M., Kume, A., Tobita, K., and Ozawa, K.: DNA/calcium phosphate precipitates mixed with medium are stable and maintain high transduction efficiency. Anal. Biochem. 278 91-92, 2000.
- 4) Maeda, Y., Ikeda, U., Oya, K., Shimpō, M., Ueno, S., Okada, K., Saito, T., Mano, H., Ozawa, K., and Shimada, K. Endogenously generated nitric oxide by nitric-oxide synthase gene transfer inhibits cellular proliferation. J. Pharmacol Exp Therapeut. 292 387-393, 2000.
- 5) Ogasawara, Y., Hanazono, Y., Kodaira, H., Urabe, M., Mano, H., Kakizuka, A., Kume, A., and Ozawa, K. Potential application of dominant negative retinoic acid receptor genes for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. Gene Ther. Mol Biol. 3: 293-300, 1999.
- 6) Otsuki, T., Kajigaya, S., Ozawa, K., and Liu, J.M. SNX5, a new member of the sorting nexin family, binds to the Fanconi anemia complementation group A protein. Biochem. Biophys Res Commun. 265: 630-635, 1999
- 7) Ogasawara, Y., Mizukami, H., Urabe, M., Kume, A., Kanegae, Y., Saito, I., Monahan, J., and Ozawa, K.. Highly-regulated expression of adeno-associated virus large Rep proteins in stable 293 cell lines using the Cre-loxP switching system J Gen Virol. 80 2477-2480, 1999
- 8) Ohya, K., Kajigaya, S., Kitataka, A., Yoshida, K., Miyazato, A., Yamashita, Y., Yamanaka, T., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K., and Mano, H. Molecular cloning of a docking protein, BRDG1, that acts downstream of the Tec tyrosine kinase. Proc. Natl Acad. Sci. USA 96 11976-11981, 1999
- 9) Inukai, T., Inoue, A., Kurosawa, H., Goi, K., Shinjo, T., Ozawa, K., Mao, M., Inaba, T., and Look, A T SLUG, a ces-1-related zinc-finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. Mol. Cell 4. 343-352, 1999.
- 10) Xu, R., Kume, A., Matsuda, K M., Ueda, Y., Kodaira, H., Ogasawara, Y., Urabe, M., Kato, I., Hasegawa, M., and Ozawa, K.. A selective amplifier gene for tamoxifen-inducible expansion of hematopoietic cells. J Gene Med 1 236-244, 1999
- 11) Matsuda, K.M., Kume, A., Ueda, Y., Urabe, M., Hasegawa, M., and Ozawa, K. Development of a modified selective amplifier gene for hematopoietic stem cell gene therapy Gene Ther 6: 1038-1044, 1999.
- 12) Kume, A., Hashiyama, M., Suda, T., and Ozawa, K. Green fluorescent protein as a selectable marker of retrovirally transduced hematopoietic progenitors. Stem Cells 17: 226-232, 1999.
- 13) Kume, A., Ito, K., Ueda, Y., Hasegawa, M., Urabe, M., Mano, H., and Ozawa, K. A G-CSF receptor-gyrase B fusion gene a new type of molecular switch for expansion of genetically modified hematopoietic cells Biochem Biophys

Res Commun 260. 9-12, 1999

14) Kume, A, Hanazono, Y., Mizukami, H, Urabe, M., and Ozawa, K · Hematopoietic stem cell gene therapy· a current overview. Int. J Hematol 69 227-233, 1999.

15) Kuribara, R, Kinoshita, T., Miyajima, A, Shinjyo, T., Yoshihara, T, Inukai, T., Ozawa, K, Look, A.T., and Inaba, T. Two distinct interleukin-3-mediated signal pathways, Ras-NFIL3 (E4BP4) and Bcl-xL, regulate the survival of murine pro-B lymphocytes. Mol. Cell Biol. 19. 2754-2762, 1999

16) Ozawa, K., Fan, D, Ogawa, M, Urabe, M, Kume, A, Monahan, J, and Nakano, I · Strategies for gene therapy of Parkinson's disease using adeno-associated virus (AAV) vectors. Biogenic Amines 15 21-37, 1999

17) Ogasawara, Y, Urabe, M, Kogure, K., Kume, A, Colosi, P, Kurtzman, G J., and Ozawa, K. Efficient production of adeno-associated virus vectors using split-type helper plasmids. Jpn. J. Cancer Res 90· 476-483, 1999

18) Urabe, M., Hasumi, Y., Kume, A., Surosky, R.T., Kurtzman, J., Tobita, K., and Ozawa, K.. Charged-to-alanine scanning mutagenesis of the N-terminal half of adeno-associated virus type 2 Rep78 protein J Virol. 73: 2682-2693, 1999

19) Terui, Y., Tomizuka, H., Mishima, Y., Ikeda, M., Kasahara, T, Uwai, M, Mori, M., Itoh, T., Tanaka, M., Yamada, M., Shimamura, S., Ishizaka, Y., Ozawa, K., and Hatake, K.. NH2-terminal pentapeptide of endothelial interleukin 8 is responsible for the induction of apoptosis in leukemic cells and has an antitumor effect in vivo Cancer Res. 59 5651-5655, 1999

20) Mori, M., Terui, Y, Ikeda, M, Tomizuka, H., Uwai, M., Kasahara, T., Kubota, N., Itoh, T.,

Mishima, Y., Douzono-Tanaka, M., Yamada, M, Shimamura, S., Kikuchi, J, Furukawa, Y, Ishizaka, Y., Ikeda, K, Mano, H, Ozawa, K, and Hatake, K. β 2-Microglobulin identified as an apoptosis-inducing factor and its characterization Blood 94 2744-2753, 1999

G 知的所有権の取得状況

特になし。

別 添 3

厚生科学研究費補助金分担研究報告書

アデノ随伴ウイルスベクターを用いたドーパミン合成酵素の遺伝子導入 *in vivo* 及び *in vivo* での検討

分担研究者 中野今治 1), 自治医科大学神経内科教授

研究協力者 村松慎一 1), 池口邦彦 1), 藤本健一 1), 小川松夫 1),
小澤敬也 2), Yang Shen 1), 2), Dong-Shen Fan 1), 2),
ト部匡司 2) 久米晃啓 2), 一瀬 宏 3), 永津俊治 3),
永津郁子 4) 川崎勝義 5), 寺尾恵治 5)

研究要旨 ドーパミン合成系の三種類の酵素遺伝子をそれぞれ組み込んだアデノ随伴ウイルスベクターを、パーキンソン病モデル動物の脳内に導入することにより、各ベクターの重複感染が効率よく起きること、治療遺伝子の三者併用の有効性、および導入した治療遺伝子の長期発現が明らかとなった

A. 研究目的

パーキンソン病は、人口 10 万人あたりの有病率が約 100 であり、近年の高齢化傾向に伴い患者数は増加している。パーキンソン病では、中脳黒質緻密部から線条体（被殻・尾状核）に投射するドーパミンニューロンの選択的な変性脱落が認められ、その結果、線条体でドーパミンが欠乏し、動作緩慢、固縮、振戦などの運動障害が生じる。その治療ではドーパミン補充療法を中心とした薬物療法が行われるが、通常 10-20 年の長期間の多剤併用による薬物治療が必要となる。そのうえ長期治療中には、目的としない脳部位にドーパミンが作用するためにおこる薬物効果の減弱や精神症状などの副作用により、日常生活が著しく障害されることも多く、それに対して必要な社会的および個人的な負担は大きい。パーキンソン病に対する遺伝子治療としては、神経細胞の保護作用のある神経成長因子を発現させることにより中脳黒質のドーパミンニューロンの変性脱落を防ぐ保護療法的アプローチと、線条体内の神経細胞においてドーパミンを合成させるドーパミン局所補充によるアプローチが考えられる。前者について私たちは、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて glial-cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF)遺伝子をラットの初代培養中脳細

胞に導入すると、ドーパミンニューロンの突起形成が増加しその生存率も高まることを既に報告した。後者のドーパミンの局所補充療法としては、いくつかの研究グループにより、ドーパミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH tyrosine hydroxylase)の遺伝子をさまざまな方法で線条体の神経細胞に導入する試みが行われている。私たちは神経細胞への遺伝子導入ベクターとして、非分裂細胞にも遺伝子導入が可能なこと、安全性が高いこと、および重複感染が可能なことなどからの点で優れている AAV ベクターを使用した実験を行ってきた。私たちはこれまでに、TH 遺伝子を組み込んだ AAV ベクター(AAV-TH)に、L-ドーパをドーパミンへ変換する芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC)の遺伝子を組み込んだ AAV ベクター(AAV-AADC)を併用すると、AAV-TH のみを発現させたときに比べてドーパミン生成量が増加することを、*in vitro*(培養細胞)および *in vivo*(パーキンソン病モデル動物)において確認した。本年度はさらに、TH と AADC 遺伝子に加え GTP シクロヒドロラーゼ I (GCH GTP cyclohydrolase I)遺伝子を導入して三者の併用効果を確認し、かつ長期の遺伝子発現について検討する実験を行った。GCH は TH の補酵素

であるテトラヒドロbiopterin (BH4) 合成系における律速酵素であり、GCH の遺伝子導入によりドーパミンの合成量のさらなる増加が期待できる。また、治療遺伝子の長期発現の確認は臨床応用の際の重要な基礎データとなる。並行して、霊長類(サル)のパーキンソン病モデルも作成し、その遺伝子治療も開始した。

これらのアプローチによりパーキンソン病の遺伝子治療を確立させることで、必要な脳部位のみでのドーパミン産生が可能になるため、高薬価の治療薬の使用量を減量することかできるうえ、長期的な日常生活動作の改善、薬物の副作用軽減が可能である。安全かつ効率的に複数の治療遺伝子の同時導入が可能で、さらに長期にわたり遺伝子発現が持続する AAV ベクターを用いた遺伝子治療は、パーキンソン病の有効な治療法として期待され、医療経済の視点からも望まれる。

B. 研究方法

(1) AAV ベクターの作製：

霊長類の AAV のうち、基礎研究の最も進んでいる 2 型 AAV(AAV-2)を基にした AAV ベクターを作製した。ウイルスのゲノムのうち、複製およびウイルス粒子へのパッケージングに重要な両端の ITR (inverted terminal repeat)部分を残し、非構造蛋白質である Rep と構造蛋白質である VP をコードする領域(rep, vp)を切り出し、その代わりにプロモーターと GCH 遺伝子を組み込んだベクタープラスミドを作製した。このプラスミドと、rep, vp を組み込んだヘルパープラスミド、AAV の複製・増殖に必要なアデノウイルスのヘルパー作用を担う領域 (E1A, E1B, E2, E4ORF6, VAIRNA) を組み込んだプラスミドの三者を 293 細胞にトランスフェクションし、GCH 遺伝子を発現する組み替え AAV ベクター (AAV-GCH) を作製した。同様な方法で TH, AADC, LacZ 遺伝子をそれぞれ含む AAV ベクター(AAV-TH, AAV-AADC, AAV-LacZ)を作製した。このアデノフリーシステムはアデノウイルス不活性化のための加熱を必要とせず、従来法に比べ力化の高

いベクターの回収が可能となす。免疫原性の強いアデノウイルス由来の蛋白混入の心配がないなどのメリットがある。これらの AAV ベクターは塩化セシウムの超遠心法により精製し、ドットプロット法により力価を測定した。

(2) 293 細胞への GCH 遺伝子導入

35cm² の培養皿に 293 細胞を 5×10⁵ の密度でまき、24 時間後に AAV-TH+AAV-AADC+AAV-LacZ または AAV-TH+AAV-AADC+AAV-GCH (各 5 × 10⁵ vector particles/cell)を添加した。AAV-GCH については 0.5×10⁵、2.5×10⁵ vector particles/cell の低用量についても比較検討した。24 時間後に cell extract を回収し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて L-ドーパ及びドーパミンを測定した。また、ウェスタンブロットにより TH, AADC, GCH の発現を確認した。

(3) ラット線条体への GCH 遺伝子導入

6-OH ドーパミンにより黒質線条体路を破壊したラットの線条体に AAV-LacZ 単独、AAV-TH+AAV-AADC+AAV-LacZ、AAV-TH+AAV-AADC+AAV-GCH (各 1 × 10⁸ vector particles)を注入し、アポモルフィン誘発回旋運動の程度を比較検討した。さらに、これらの遺伝子の同一神経細胞での発現を免疫組織化学的に検討した。

(4) 長期的効果および長期遺伝子発現の確認：

遺伝子導入後の長期的効果は、モデル動物のアポモルフィン投与後の異常回旋運動に対する治療効果を遺伝子導入後 7 カ月間観察した。導入遺伝子の長期発現については、異常回旋運動の抑制が長期間 (7 カ月間) 確認されたモデルラットで免疫組織化学的に検討した。

C 研究結果

293 細胞に AAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCH ベクターを感染させると、ウェスタンブロットでそれぞれ TH, AADC, GCH 蛋白の発現が確認された。AAV-TH, AAV-AADC

AAV-GCH の三者同時の遺伝子導入を行ったものと、AAV-TH と AAV-AADC の二者のみのものを比較すると、三者の方がドーパミンの生成量が多かった。また、ドーパミンの生成量は AAV-GCH ベクターの濃度が高いほど多く用量依存的に増加した。遺伝子導入後の 293 細胞の GCH 活性、BH4 合成量およびドーパミン合成量は、AAV-GCH のウイルス感染量に応じ増加した。

6-ヒドロキシドーパミンによるパーキンソン病モデルラットを用いた実験では、AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCH の三者同時の遺伝子導入を行った群の方が、AAV-TH と AAV-AADC の二者のみの群に比べて、アポモルフィン誘発回転運動の減少の程度が著しかった。

遺伝子導入後、モデル動物の異常回転運動に対する治療効果は7カ月以上持続しており、形態学的にも導入遺伝子の発現は7カ月後の時点で免疫組織化学的に明瞭に確認された。

D 考察

L-ドーパの内服治療を主体としたドーパミンの補充療法は、パーキンソン病の運動症状に有効であり、治療の第一選択の一つとして確立している。しかし、パーキンソン病の薬物療法は長期にわたるため、L-ドーパの長期服用に伴う副作用として、ジスキネジアなどの異常不随意運動の出現、薬効の動揺 (wearing-off 現象, on and off 現象)、薬物効果の減弱、精神症状等の多くの問題点が出てくる。これらの問題点は、薬剤が全身投与されるため線条体以外の脳組織にも作用することにより起きる。ドーパミン補充を必要とする線条体においてのみドーパミンを産生させる遺伝子治療は、より合理的であり、かつ目的としない部位にドーパミンが作用することに伴う副作用が出現しない点からも理想的な治療である。そこで、私たちはドーパミン生合成酵素遺伝子を組み込んだベクターを線条体に直接注入し、線条体内でドーパミンを合成する遺伝子治療の研究を行ってきた。遺伝子導入の方法としては、AAV

ベクターを選択した AAV は野生型のウイルスの病原性がなく安全であることや、非分裂細胞である神経細胞にも容易に感染することなど、神経疾患に対する遺伝子治療を行う際の遺伝子導入ベクターとして優れた特徴を持っている。また注入部位の局所の炎症を惹起することもない。私たちはこれまで、AAV-TH と AAV-AADC を併用すると、同じ神経細胞にこれらの二種類のベクターウイルスが感染して TH と AADC 遺伝子の同時導入が可能であること。それにより TH 単独の場合に比べドーパミン合成量が増加することを明らかにした。本年度は、AAV-GCH も含めた三つのベクターが同一神経細胞に高い割合で重複感染し、GCH 遺伝子も含めた三種の遺伝子の同時導入が可能であることが確認され、その結果、長期にわたって、ドーパミン生成量のさらなる増加とモデル動物の異常運動の改善を認めた。パーキンソン病ではドーパミンニューロンの変性により線条体内の GCH の活性も低下していると考えられ、より効率よくドーパミンを生成するためには GCH の補充が有効であることが今回の実験で確認できた。現在私たちは、AAV ベクターの将来のヒトへの応用の前段階として、サルのパーキンソン病モデルの作成、サルのパーキンソン病運動症状の臨床評価スケールの作成およびコンピューターを利用した運動解析法の作成、サルの線条体への AAV ベクターの注入による治療遺伝子の導入などをスタートした。

E. 結論

(1) AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCH の3種類の AAV ベクターの同時投与により、神経細胞に重複感染が高い割合で起きていることから、別々のベクターを用いて複数の遺伝子を同一神経細胞に効率よく導入できることが確認された。(2) AAV-GCH の併用によって GCH 活性の上昇、BH4 合成量の増加が確認された。(3) AAV-TH と AAV-AADC の二者併用よりも、AAV-GCH を追加した三者併用の方が、機能的 (異常回転運動の抑制) にも、生

化学的（ドーパミン合成量の増加）にもより有用であることが示された（4）遺伝子導入後の長期効果については、7ヶ月後の時点で、異常回転運動に対する治療効果は持続しており、その時点での導入遺伝子の発現も免疫組織化学的に明瞭に確認された

- 1) 自治医科大学神経内科
- 2) 分子病態治療研究センター・遺伝子治療部
- 3) 藤田保健衛生大学総合医科学研究所神経科学
- 4) 藤田保健衛生大学解剖学2
- 5) 国立感染症研究所筑波霊長類センター

F. 研究発表

1 論文発表

- ① Ozawa K, Fan D, Ogawa M, Urabe M, Kume A, Monahan J and Nakano I Strategies for gene therapy of Parkinson's disease using adeno-associated virus (AAV) vectors *Biogenic Amnes* 15 21-37, 1999
- ② Sato Y, Murayama S, Kawai M, and Nakano I Breached cerebral glia limitans- basal lamina complex in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy *Acta Neuropathol* 98:330-336, 1999
- ③ Takayama Y, Sakoe K, Amaike M, Soutome M, Ogawa T, Nakano I and Nishizawa M: Single sperm analysis of the CAG repeats in the gene for dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) the instability of the CAG repeats in the DRPLA gene is prominent among the CAG repeat diseases *Human Molecular Genetics* 8 453-457, 1999
- ④ Hanyu S, Ito U, Kuroiwa T, Hakamata Y and Nakano I: Ischemic tolerance in the maturation of disseminated selective neuronal necrosis and cerebral infarction after repetitive ischemia. *Maturation Phenomenon in Cerebral Ischemia III*, U Ito et al. Eds, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1999 pp 105-109
- ⑤ Tanaka Y, Miyazawa Y, Hashimoto R, Nakano I and Obayashi T Postencephalitic focal retrograde amnesia after bilateral anterior temporal lobe damage.

Neurology 53 344-350, 1999

⑥ Kawakami T, Takayama Y, Sakoe K, Ogawa T, Yoshioka T, Nishizawa M, Reid M. E, Kobayashi O, Nonaka I and Nakano I A case of McLeod syndrome with unusually severe myopathy *J Neurol Sci* 166 36-39, 1999

⑦ Tsuchiya K, Arima K, Fukui T, Kuroiwa T, Haga C, Iritani S, Hirai S, Nakano I, Takemura T, Matsushita M, Ikeda K. Distribution of basal ganglia lesions in Pick's disease with Pick bodies A topographic neuropathological study of eight autopsy cases. *Neuropathology* 19: 370-379, 1999

⑧ Tsuchiya K, Shintani S, Kikuchi M, Kondo H, Kamaya T, Ohbu S, Kato S, Hayashi H, Ikeda K and Nakano I Sporadic amyotrophic lateral sclerosis of long duration mimicking spinal progressive muscular atrophy a clinicopathological study *Journal of the Neurological Sciences* 162 174-178, 1999

⑨ Takayama Y, Sato Y, Sawada M, Nishizawa M, Nakano I and Kusunoki S. An unusual case of facial diplegia. *Muscle & Nerve* 22 778-779, June 1999

⑩ 滑川道人, 藤井 卓, 西澤正豊, 中野今治. Abuliaを呈し、記憶障害や麻痺を認めなかった両側内包膝部梗塞の1例 *臨床神経* 39 767-770, 1999

⑪ 左山節子, 藤本健一, 静間奈美, 中野今治 習慣性顎関節脱臼を併発したパーキンソン病の2例 *臨床神経* 39 . 849-851, 1999

⑫ 小川朋子, 滑川道人, 村松慎一, 西澤正豊, 中野今治 両側顔面神経麻痺を契機にして診断されたHIV感染症の2例 *神経内科* 51 . 293-295, 1999

⑬ Tsuchiya K, Ozawa E, Fukushima J, Yasui H, Kondo H, Nakano I, Ikeda K. Rapidly progressive aphasia and motor neuron disease A clinical, radiological, and pathological study of an autopsy case with circumscribed lobar atrophy *Acta Neuropathol* 99 81-87, 2000

2. 学会発表

① 村松慎一, 中野今治, 半田敦史, 梶谷幸子 and Brown K.E. アデノ随伴ウイルス (AAV)ベクター作成過程における Rep 関連蛋白の検討 第40回

日本神経学会総会、東京、1999年5月21日(抄録集 P260)

②川上忠孝、池口邦彦、狩野操、橋本律夫、新島健司、中野今治 パーキンソン病における大脳皮質の関与—経頭蓋的磁気刺激法による評価 第40回日本神経学会総会、東京、1999年5月21日(抄録集 P135)

③池口邦彦、村松真一、静間奈美、中野今治、パーキンソン病の運動障害に対する川芎茶調散の効果について 第40回日本神経学会総会、東京、1999年5月21日(抄録集 P223)

④藤本健一、佐山節子、静間奈美、池口邦彦、中野今治 抗パーキンソン病薬による精神症状に対する mianserin の効果 第40回日本神経学会総会、東京、1999年5月21日(抄録集 P290)

⑤Shen Y, Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Ogawa M, Fan D-S, Urabe M, Kume A, Nagatsu I, Ichinose H, Nagatsu T, Monahan J, Nakano I, Ozawa K. Triple transduction with dopamin-biosynthesizing enzyme genes using separate AAV vectors for gene therapy of parkinsonian rats The 5th Annual Meeting 1999 The Japan Society of gene therapy Tokyo, June 18-19, 1999

⑥小川朋子、池口邦彦、藤本健一、中野今治 高度のパーキンソニスム・精神症状を呈し、修正電気痙攣療法が奏効した多系統変性症の一例 第3回栃木県脳神経疾患研究会講演会、宇都宮、1999年9月9日

⑦村松慎一、半田 敦、Kevin E. Brown、中野今治、小松則夫、三室 淳、窓岩清治、坂田洋一、松田道生 3型アデノ随伴ウイルス(AAV-3)ベクターによる血液細胞への遺伝子導入 第22回日本血栓止血学会、宇都宮、1999年12月2日(抄録 p396)

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

ドーパミンニューロンの活性調節機構の解明

分担研究者 永津 俊治 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 教授

研究要旨 我々は、これまでパーキンソン病の遺伝子治療用候補遺伝子として、ドーパミン合成関連遺伝子を単離し構造を決定してきた。これらの研究の過程で、ドーパミン合成を調節しているチロシン水酸化酵素の補酵素であるテトラヒドロbiopterin (BH4) が、チロシン水酸化酵素の活性を調節している重要な因子の一つであることが明らかとなった。本研究において、細胞内でのBH4量を制御しているGTPシクロヒドロラーゼIの活性調節機構を検討するために、GTPシクロヒドロラーゼIタンパクを大腸菌で大量発現させ、精製して酵素化学的性質を調べた。本研究結果は、GTPシクロヒドロラーゼIによるドーパミン合成調節機構を知る上で、また、GTPシクロヒドロラーゼIを用いた遺伝子治療用ベクターを構築する際に有用である。

A 研究目的

パーキンソン病は、高齢者に多発する運動障害を伴う神経変性疾患である。本疾患は、黒質線条体系ドーパミンニューロンの選択的変性により発症する。パーキンソン病の治療においては、ドーパミンの前駆体であるL-DOPAを内服することによるドーパミンの補充療法が一定の治療効果をあげるが、あくまで対症療法でありこれにより病気の進行を遅らせることはできない。また、従来の内服療法では、病気の進行に伴い薬効の減衰やL-DOPA投与による副作用などが現れるようになる。今後高齢化社会を迎える中で、パーキンソン病患者の数は増大していくことは明らかであり、新しい副作用の少ない効果的な治療法の開発、および、病気の進行を抑えて残存しているドーパミンニューロンを賦活化できるような根治療法の開発は急務である。本研究は、パーキンソン病治療に遺伝子治療法を応用することにより、従来のL-DOPA内服療法よりも効果的で副作用の少ない治療法の開発に結びつけることを目指している。

本研究では、これまでの研究から脳内でのL-DOPA産生によりパーキンソン病モデル動物に対する有効性が示されているGTPシクロヒドロラーゼIについて、ヒト酵素を大腸菌内で発現させて精製し、その酵素学的性質を詳細に検討した。本研究は、ウイ

ルスベクターを通じて遺伝子導入した酵素タンパク質を細胞内で有効に活性を発現させたり、GTPシクロヒドロラーゼIの産物であるbiopterinによるドーパミンニューロンの活性調節機構を探るうえで重要である。

B. 研究方法

ヒトGTPシクロヒドロラーゼIのcDNAを大腸菌のグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質発現用ベクターに組み込み、GST融合ヒトGTPシクロヒドロラーゼI(GST-hGCH)を発現させた。GST-hGCHの精製は、グルタチオンセファロースカラムとゲルろ過カラムを用いて行った。GST領域の除去に際して、プロテアーゼ処理の条件の違いにより、本来の認識部位で切断されたものと二次的な認識部位で切断されたN末端が45残基短いもの(Δ45)を作製した。

GTPシクロヒドロラーゼIの酵素活性の測定は、酵素反応により生成したジヒドロネオプテリン3リン酸を、ヨウ素酸化した後アルカリフォスファターゼによりリン酸基を除いてネオプテリンに変換し高速液体クロマトグラフィー-蛍光検出器を用いて定量した。基本的な酵素反応液は、20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 1 mg/ml ウシ血清

アルブミン、1 mM GTPを含み、37°Cで30分間の酵素反応を行った。

C. 研究結果

大腸菌内でGST融合タンパク質として発現させたGTPシクロヒドロラーゼIを、グルタチオンカラムで精製後さらにS-300ゲルろ過クロマトグラフィを通すことにより均一バンドとして精製した。精製されたGST-融合GTPシクロヒドロラーゼIをトロンピンで切断することにより組換え体のGTPシクロヒドロラーゼIとした。このとき、切断の時のトロンピンの濃度を変えることにより、トロンピンの本来の認識部位で切断されたものと二次的な認識部位で切断されたN末端が45残基短いもの(Δ45)を作製した。

ネイティブなGTPシクロヒドロラーゼIは、活性部位を5つのオリゴマーで形成し、これが上下に2つ重なった10量体を形成することが報告されている。ゲルろ過上の溶出位置をマウス肝臓から抽出したネイティブなGTPシクロヒドロラーゼIと比較したところ、大腸菌から精製した酵素においても同様な位置に溶出された。この結果は、大腸菌で発現させた酵素においても10量体構造をとっていることを示唆した。

基質であるGTPに対する酵素反応速度論的解析を行った。ネイティブな酵素はGTPに対してアロステリックな効果を示すことが報告されているが、大腸菌から精製した組換え体GTPシクロヒドロラーゼIにおいてもヒル定数2.8という高い正の協同性を示した。組換え体GTPシクロヒドロラーゼIの基質GTPに対するミカエリス定数は14.5 μMで最大反応速度は820 nmol/h/mg proteinであった。N末端45アミノ酸を欠除しているΔ45では、基質GTPに対するミカエリス定数は18.0 μMと通常の組換え体GTPシクロヒドロラーゼIとあまり変わらなかったが、最大反応速度は1,280 nmol/h/mg proteinと通常の組換え体に比べて1.5倍高い反応性を示した。このことは、GTPシクロヒドロラーゼIの反応触媒部位はC末端側に存在すること、N末端側アミノ酸は酵素反応に対して抑制的に働いていることを示唆した。

次に、精製した組換え体GTPシクロヒドロラーゼIを用いて、酵素反応に及ぼすマグネシウムイオンの作用を調べた。EDTA存在下で酵素反応を行った場合に比べて、1 mMの塩化マグネシウムの添加により活性が著明に阻害された。細胞内でマグネシウ

ムイオンは数mM存在しているので、GTPシクロヒドロラーゼIの活性はマグネシウムイオンにより抑制された状態になっていると考えられた。

D 考察

我々は、これまでにパーキンソン病の遺伝子治療用候補遺伝子として、チロシン水酸化酵素、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素、GTPシクロヒドロラーゼIなどのドーパミン合成関連遺伝子を単離し構造を決定してきた。また、ドーパミンニューロンでドーパミン合成能を高めるような遺伝子もパーキンソン病の遺伝子治療の候補遺伝子となり得るので、ドーパミンニューロンの発生分化に重要な役割をしているNurr1というオーファン核内受容体の遺伝子についても、ヒトcDNAとゲノムDNAを単離して構造を決定した。

自治医科大学の小澤敬也教授らにより、チロシン水酸化酵素・芳香族アミノ酸水酸化酵素・GTPシクロヒドロラーゼIをもつAAVベクターをパーキンソン病モデルラットに投与することにより、パーキンソン病モデルラットの行動を著明に改善することが示されている。実際にこれらの酵素を用いて脳内でL-DOPAやドーパミンを合成させるときには、これらの酵素の活性制御をどのように行うかが問題となる。

チロシン水酸化酵素はドーパミンを酵素内に含有することにより、活性が抑制されることが知られている。これは、細胞内でドーパミンを過剰に作りすぎないためのフィードバック機構であると考えられる。このドーパミンによる抑制は、チロシン水酸化酵素のN末端側アミノ酸を除くことにより解除される。チロシン水酸化酵素を常に活性型として細胞内に発現させるためには、N末端約50アミノ酸をあらかじめ除いておくことにより可能となる。

今回我々のGTPシクロヒドロラーゼIの解析により、GTPシクロヒドロラーゼIにおいてもN末端側のアミノ酸が酵素活性に抑制的に作用していることが示された。これまでに、GTPシクロヒドロラーゼIのN末端側アミノ酸がどのように細胞内での調節作用をもっているのか明らかではないが、遺伝子治療への応用の際にはN末端側アミノ酸を除いた酵素を導入することにより、高いGTPシクロヒドロラーゼI活性を得られる可

能性がある。

また、細胞内に高濃度存在するマグネシウムイオンによりGTPシクロヒドロラーゼI活性が抑制されることは、GTPシクロヒドロラーゼIの活性が金属イオン濃度あるいはリン酸化などにより調節される可能性を示唆している。これは、GTPシクロヒドロラーゼI活性の調節を通じてピロプテリン合成量を変化させることにより、ドーパミン合成量を調節するメカニズムの存在を示唆しており興味深い。

E. 結論

パーキンソン病の遺伝子治療に有望なピロプテリン合成酵素GTPシクロヒドロラーゼIを大腸菌で発現させ精製標品を調製して酵素化学的性質を調べた。酵素タンパク質のN末端側アミノ酸を削除することにより、ネイティブなものより比活性の高い酵素を得ることが可能であることがわかった。また、細胞内GTPシクロヒドロラーゼI活性はマグネシウムイオンなどにより調節を受けていることが明らかとなった。

F 研究発表

1 論文発表

1) Ichinose H, Ohye T, Suzuki T, Sumi-Ichinose C, Nomura T, Hagino Y, and Nagatsu T. (1999) Molecular cloning of the human Nurr1 gene. Characterization of the human gene and cDNAs *Gene*, 230, 233-239.

2) Suzuki T, Ohye T, Inagaki H, Nagatsu T, and Ichinose H. (1999) Characterization of wild-type and mutants of recombinant human GTP cyclohydrolase I. Relationship to etiology of dopa-responsive dystonia. *J. Neurochem.*, 73, 2510-2516.

3) Inagaki H, Ohye T, Suzuki T, Segawa M, Nomura Y, Nagatsu T, and Ichinose H. (1999) Decrease in GTP cyclohydrolase I gene expression caused by inactivation of one allele in hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 260, 747-751

2 学会発表

1) 一瀬宏、大江瑞恵、鈴木崇弘、一瀬千穂、野村隆英、萩野泰道、永津俊治 (1999) ヒトNurr1遺伝子の構造とヒト脳からのcDNAの単離 第72回日本生化学会大会、

(生化学第71巻1057頁)

2) 鈴木崇弘、池本桂子、大江瑞恵、一瀬宏、永津郁子、永津俊治 (1999) セピアプテリン還元酵素のヒト脳における発現分布 第72回日本生化学会大会、(生化学第71巻995頁)

3) 稲垣秀人、大江瑞恵、鈴木崇弘、永津俊治、一瀬宏 (1999) 瀬川病(HPD)におけるGTPシクロヒドロラーゼImRNAの減少 第72回日本生化学会大会、(生化学第71巻995頁)

4) 大江瑞恵、永津俊治、一瀬宏 (1999) ヒトのセピアプテリン還元酵素遺伝子の構造解析 第72回日本生化学会大会、(生化学第71巻995頁)

G. 知的所有権の取得状況
なし

19990353

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Ogasawara Y, Mizukami H, Urabe M, Kume A, Kanegae Y, Saito I, Monahan J, Ozawa K **Highly regulated expression of adeno-associated virus large Rep proteins in stable 293 cell lines using the Cre/loxP switching system** J Gen Virol 1999 Sep,80 (Pt 9) 2477-80

Urabe M, Hasumi Y, Kume A, Surosky RT, Kurtzman GJ, Tobita K, Ozawa K **Charged-to-alanine scanning mutagenesis of the N-terminal half of adeno-associated virus type 2 Rep78 protein** J Virol 1999 Apr,73(4) 2682-93

Shen Y, Muramatsu SI, Ikeguchi K, Fujimoto KI, Fan DS, Ogawa M, Mizukami H, Urabe M, Kume A, Nagatsu I, Urano F, Suzuki T, Ichinose H, Nagatsu T, Monahan J, Nakano I, Ozawa K **Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease.** Hum Gene Ther 2000 Jul 20,11(11) 1509-19