

20000382

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等 研究事業

AAVベクターを用いた遺伝子治療法の
基礎ならびに応用研究

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成13 (2001) 年4月

目 次

I. 総括研究報告書

AAVベクターを用いた遺伝子治療法の基礎ならびに応用研究	-----	1
小澤 敬也		

II. 分担研究報告書

1. パーキンソン病モデル動物を用いた遺伝子治療実験	-----	9
中野 今治		

2. ドーパミンニューロン活性化に関わる遺伝子群の探索	-----	11
一瀬 宏		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	14
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	16
-----------------	-------	----

総括研究報告書

AAVベクターを用いた遺伝子治療法の基礎ならびに応用研究

主任 研究者 小澤 敬也 自治医科大学医学部教授

研究要旨 安全性と長期遺伝子発現などの点で優れているアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの実用化を目指し、基礎ならびに臨床研究を行った。前者については、AAVベクター作製用パッケージング細胞株の開発を推進すると共に、アデノウイルスベクターを一部に利用した新規AAVベクター作製法の開発にも着手した。応用研究としては、中脳黒質線条体系ドーパミンニューロンの選択的変性によるパーキンソン病の遺伝子治療法の開発研究を行った。治療用遺伝子としては、ドーパミン合成に必要な酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH)、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC)、GTPシクロヒドロラーゼI (GCH) と神経栄養因子のGDNFなどの遺伝子を検討した。また、新規蛋白質V-1のドーパミンニューロン活性化作用を検討した。遺伝子治療実験では、6-OHDA投与によるパーキンソン病モデル・ラット、サルのパーキンソン病モデル（神経毒MPTP投与による薬剤性パーキンソニズム）を用いた。特にサルの系では、AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCHを線条体に注入したところ、その治療効果が確認された。その他、AAVベクターを使った癌遺伝子治療法の戦略についても様々な角度から検討した。

分担研究者

中野 今治

自治医科大学医学部

教授

一瀬 宏

藤田保健衛生大学総合医科学研究所

教授

として重要である。本研究では、非病原性のアデノ随伴ウイルス (AAV: adeno-associated virus) に由来するベクターを用いた遺伝子治療法に焦点を当て、その基礎から応用の可能性について研究した。最近、遺伝子治療用ベクターの副作用が問題になってきており、安全性の高いAAVベクターが改めて注目されている。但し、AAVベクターの本格的実用化には、高効率のベクター作製/精製法、遺伝子発現増強法等の開発が重要課題として残されている。本研究では、AAVベクター作製用パッケージング細胞株の開発を中心に、これらに関する基盤研究を推進し

A. 研究目的

遺伝子治療臨床研究がスタートして約10年経つが、臨床の有効性が確認されたものはまだ僅かであり、ベクター開発などの基盤研究が依然

た。応用研究としては、非分裂細胞への高効率遺伝子導入、長期遺伝子発現、別々のベクターによる数種類の遺伝子の同時導入といったAAVベクターの特徴を活かし、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のパーキンソン病に対する遺伝子治療法の開発研究を推進した。残存ドーパミンニューロンを活性化し、病態の進行を阻止するための新規治療用遺伝子の探索から、霊長類のサルを用いた前臨床研究まで、幅広く研究を行った。パーキンソン病に対する遺伝子治療の戦略としては、ドーパミン生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。また、パーキンソン病患者への適用の前段階として、癌患者でのAAVベクターを用いた遺伝子治療臨床研究のステップの重要性も考慮し、AAVベクターの特徴を活かした癌遺伝子治療法の開発研究を並行して行った。高齢化社会を迎え、パーキンソン病に対する優れた治療法の開発は益々重要視されるようになってきている。さらに、癌に対する新しい集学的治療法の開発に繋がる研究成果が得られれば、本研究の社会的貢献は一層大きなものになると期待される。

B. 研究方法

1) AAVベクター作製法に関する基盤技術開発：

i) AAVベクターを作製するには、AAVベクタープラスミド（目的遺伝子の両端にITR配列を連結）・AAVヘルパープラスミド（AAV蛋白質のRep/Capを発現する）・アデノウイルス遺伝子プラスミド（アデノウイルスのヘルパー作用を担う遺伝子を含む）の三者を293細胞にその都度トランスフェクションする必要がある。

この従来法は煩雑であり、大量作製により適した方法の開発が望まれている。そこで、変異loxPを用いたCre/loxP法による複数蛋白質一括発現制御システムを応用し、細胞毒性を持つRepとCapの発現を厳密に制御したAAVベクター作製用パッケージング細胞株の開発を進めた。Cre発現アデノウイルスベクターの感染によるAAV蛋白質の発現誘導は、western blot法により検討した。また、AAVベクター作製効率に関しては、得られた細胞株にAAVベクタープラスミドをトランスフェクションし、さらにCre発現アデノウイルスベクターを感染させ、培養上清をDNA dot blot法で検討した。

ii) AAVベクター・カセットとAAV蛋白質発現カセットを各々搭載したハイブリッド型アデノウイルスベクターの構築を進め、それを使った新規AAVベクター作製法の開発に着手した。従来、AAV蛋白質発現カセットをアデノウイルスベクターに組み込むことは困難であるとされていたが、本研究では、発現制御を工夫することによりその課題の克服を試みた。

2) パーキンソン病のための治療用遺伝子の開発：残存ドーパミンニューロンを活性化し細胞死の進行を阻止するための新規治療用遺伝子の探索研究として、カテコールアミン生合成活性化作用を持つV-1遺伝子に着目して研究を行った。実験には、V-1遺伝子を定常的に過剰発現しているPC12D細胞株とコントロール細胞株を用いた。GTPシクロヒドロラーゼI (GCH: GTP cyclohydrolase I) とビオプテリン生合成の第3段階を司るセピアプテリン還元酵素の酵素活性は、高速液体クロマトグラフィ-蛍光検出法により定量した。細胞内転写因子の活性化は、転写制御因子の結合配列にTATAボックスとルシフェラーゼ遺伝子をつないだプラスミドベクターを用いて調べた。

3) パーキンソン病モデル・ラットを用いた遺

伝子治療実験：選択的神経毒6-OHDA (6-hydroxydopamin) をラット脳の片側の内側前頭束に注入し、黒質線条体路を破壊し、パーキンソン病モデル・ラットを作製した。遺伝子治療実験では、ドーパミン生合成酵素遺伝子、即ち、チロシン水酸化酵素 (TH: tyrosine hydroxylase)、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC: aromatic L-amino acid decarboxylase)、GCHの各遺伝子を搭載したAAVベクターを作製し、それを黒質破壊側の線条体に定位脳手術により注入した。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転運動の程度を長期間に亘って観察した。さらに、定位脳手術により、黒質近傍の線条体へGDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) 遺伝子を搭載したAAVベクターの注入を行い、6-OHDAによる神経細胞死を防御できるかどうかを検討した。

4) サルのパーキンソン病モデルの作製と遺伝子治療前臨床研究：筑波霊長類センターとの共同研究として、以下の研究を行った。

i) カニクイザルに選択的神経毒1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine (MPTP, 0.25 mg/kg)を週1回静脈注射(計20回程度)する慢性投与法により、薬剤性パーキンソニズムを発症させた。

ii) 遺伝子治療の効果判定のためのサル用の臨床評価スケールを作成した(4個のレーズンをつまみとる動作を行わせた)。また、コンピュータ運動解析法を利用した効果判定法の確立を行った。

iii) パーキンソン病モデル・サルの一側の被殻に、定位脳手術によりAAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCHの混合液を注入し、Primate Parkinsonism Rating Scale (PPRS)による運動障害の評価ならびにコンピュータ運動解析による効果判定(レーズン取りをデジタルビデオカメラで撮影し解析)、アポモルフィンによる回転傾

向の有無の検討、in vivoマイクロダイアリシス法による両側の被殻でのドーパミンならびにその代謝産物である3,4-dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC) と3-methoxytyramine (3MT)の分泌量の測定、脳組織切片の免疫組織染色(抗TH、抗AADC、抗GCHの各抗体および神経細胞のマーカーであるMAP-2に対する抗体などを使用)による導入遺伝子の発現確認(共焦点レーザー顕微鏡による観察)などを行った。

5) AAVベクターを用いた癌に対する遺伝子治療モデル実験：

i) AAVベクターによる導入遺伝子の発現がγ線や抗癌剤などで増強することに着目し、AAVベクターを用いた自殺遺伝子治療法にγ線や抗癌剤を併用することで治療効果の増強が認められるかどうかを検証した。ヒト上顎癌由来の細胞株(NKO-1)に異なる線量のγ線を照射し、LacZ発現AAVベクターを感染させ、Southern blot法で導入遺伝子の存在様式を検討した。また、単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ(HSV-TK) 遺伝子を組み込んだAAVベクターを様々な量でNKO-1に感染させ、ガンシクロビル(GCV)による殺細胞効果を検討した。さらに、γ線を照射して併用効果を解析した。抗癌剤の場合は、ヒト喉頭癌由来の細胞株(Hep-2)及びHeLaをトポイソメラーゼ阻害剤(エトポシド・カンプトテシン)で処理した後にAAV-LacZを感染させた。

ii) VEGFは著明な血管透過性亢進作用をもつ血管新生因子であり、腹水産生腫瘍の血管新生と腹水貯留に重要な役割を果たしている。そこで、VEGF結合活性を有する可溶性Flt-1 (sFlt-1)の発現による卵巣癌由来腹水貯留の抑制効果を検討した。ヒト卵巣癌細胞株にsFlt-1遺伝子をAAVベクターで導入し、その効果を検討した。

iii) HGF (hepatocyte growth factor) のアンタゴ

ニストとして知られるNK4は、癌細胞の遊走を阻害する活性があるが、卵巣癌遺伝子治療への応用の可能性について基礎的検討を行った。NK4発現ベクターを卵巣癌細胞株（HRA）に遺伝子導入し、遊走能への影響をscrach wound healing assayで検討した。またヌードマウスの腹腔内に接種し、腹膜播種の程度および生存期間を検討した。

iv) AAVベクターを癌の遺伝子治療に用いる場合、癌細胞に直接遺伝子導入する方法ではその発現レベルが低いことが問題となっている。そこで、腫瘍特異的増殖型AAVベクターの開発を行った。AAVが増殖するにはアデノウイルスのヘルパー作用が必要となるが、AAVの増殖には十分でアデノウイルスの増殖には不十分なアデノウイルス蛋白質の条件を検討した。

（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ベクター作製法に関する基盤技術開発：

i) AAVベクター作製用パッケージング細胞株の開発では、各AAV蛋白質の発現制御が変異loxP配列を用いることにより可能であることをwestern blot法により確認した。さらに、この細

胞株を用いて、10 cmディッシュあたり 2×10^{11} ゲノムコピーのベクターを産生する細胞株が得られた。この作製効率は以前のRep単独制御を行った細胞株の約40倍に相当するレベルである。但し、このベクター産生効率を長期間維持することは困難であった。

ii) ハイブリッド型アデノウイルスベクターを使った新規AAVベクター作製法の開発では、アンチセンス法とCre/loxP法を駆使することによりAAV蛋白質の発現を制御できるようにしたアデノウイルスベクターを構築した。予備的検討で、この方法によりAAVベクターが産生されることを確認したが、効率はまだ不十分であった。

2) パーキンソン病のための治療用遺伝子の開発：V-1過剰発現PC12D細胞株では、コントロール細胞に対してGCH活性が約8倍、細胞内ピロプテリン量が約5倍に増加していた。一方、セピアプテリン還元酵素の活性は、V-1過剰発現細胞においても対照株と変化していなかった。次に、V-1過剰発現細胞においてどのような細胞内における変化により、一群のカテコールアミン生合成関連遺伝子の発現誘導が生じているのかを知るために、各種のエンハンサーエレメントを持つレポーター遺伝子を細胞にトランスフェクションして、それぞれのエンハンサー活性の強さを調べた。その結果、カテコールアミン生合成関連遺伝子の発現にはCRE（サイクリックAMPレスポンスエレメント）を介する遺伝子発現制御系が深く関わっていることが判明した。

3) パーキンソン病モデル・ラットを用いた遺伝子治療実験：パーキンソン病モデル・ラットの線条体にAAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCHの三種類のベクターを注入し、その治療効果の長期的観察を行ったところ、一回の治療で効果が18カ月以上持続することが判明した。さらに、

導入遺伝子の長期的発現も免疫染色により同様に確認された。また、GDNF発現AAVベクターを用いた遺伝子治療法に関しては、予備実験ながらアポモルフィン誘発異常回転運動の抑制効果が観察された。抗TH抗体を用いた免疫染色では、AAV-GDNFによりドーパミンニューロンの破壊が抑制されていることを確認した。

4) サルのパーキンソン病モデルの作製と遺伝子治療前臨床研究：カニクイザル4頭に週1回のMPTP静脈内投与を行い、パーキンソン病モデル・サルを作製した。片側の被殻にAAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCHを注入したところ、対側上下肢の運動障害の改善が認められ、レーズン取りなどの動作が素早くなり、筋強剛、振戦も消失した。アポモルフィンを筋肉注射すると、ベクター注入側に向かう体軸の回転傾向が認められ、線条体におけるドーパミン受容体のsupersensitivityが改善していることが示された。遺伝子治療の効果は4ヶ月以上持続した。また、マイクロダイアリシス法により、注入側被殻でドーパミンおよびその代謝産物のDOPAC、3MTのいずれもが増加していた。ベクター注入5週間後の脳組織切片の免疫組織染色では、被殻の広範な領域にわたって、抗TH抗体、抗AADC抗体、抗GCH抗体に陽性となる細胞が認められ、その大部分はMAP-2陽性の神経細胞であった。尚、特に副作用は認められなかった。

5) AAVベクターを用いた癌に対する遺伝子治療モデル実験：

i) HSV-TK遺伝子導入頭頸部癌細胞株について、導入遺伝子の二本鎖への変換ならびにGCVによる破壊が、放射線照射や抗癌剤投与により増強されることが確認された。

ii) 卵巣癌細胞株にsFlt-1を発現させてもin vitroでの増殖能に変化は認められなかったが、マウスの腹腔内に接種すると、sFlt-1発現細胞株では血性腹水出現頻度の低下と生存期間の有

意の延長を認めた。

iii) 卵巣癌細胞(HRA)にNK4遺伝子を導入すると遊走能の有意な低下がみられ、腹腔内接種実験では腹膜播種の抑制と生存期間の延長が認められた。

iv) 腫瘍特異的複製型AAVベクター・システム開発のための基礎検討を行い、アデノウイルス蛋白質の一部を欠損させるとアデノウイルスは増殖できなくなるが、AAVに対するヘルパー作用は保持されることが明らかになった。

D. 考察

1) AAVベクター作製法に関する基盤技術開発：

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、臨床グレードのベクターを効率良く大量作製する方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。本研究では、二つの方向から新しいAAVベクター作製法を検討した。パッケージング細胞株の開発では、今回はAAVベクタープラスミドのトランスフェクションを行ったが、少量のAAVベクターをシードとして用い、それを増幅するシステムの開発も並行して進めており、今後の検討課題である。いずれの方法でもまだ実用化レベルには到達していないため、適切なプロモーターの選択など、さらに一層の改良を行っていく計画である。

2) パーキンソン病のための治療用遺伝子の開発：カテコールアミン生合成酵素遺伝子のうち、THとドーパミンβ水酸化酵素についてはプロモータ領域に典型的なCREをもつことが知られている。しかし、V-1過剰発現細胞において強く誘導されている芳香族アミノ酸脱炭酸酵素やGCHにおいては典型的なCREは持っていない。今後、V-1過剰発現細胞において起きている細胞内分子機構を解析することにより、カテコー

ルアミン生合成酵素を誘導するための細胞内シグナルを追究していく予定である。

3) パーキンソン病モデル・ラットを用いた遺伝子治療実験：ドーパミン生合成酵素遺伝子を導入する遺伝子治療実験では、AAVベクターを用いると治療効果が長期間持続することを確認できた。さらに、GDNF遺伝子を用いた遺伝子治療法の検討に着手したが、6-OHDAによるドーパミンニューロンの破壊が阻止され、病態の進行を遅延させる効果が期待できるものと思われる。理想的には、ドーパミン生合成酵素遺伝子とGDNF遺伝子の両者を併用する治療法が考えられる。この点でも、複数の遺伝子を別々のベクターにより併用できるAAVベクターは有利であると思われる。

4) サルのパーキンソン病モデルの作製と遺伝子治療前臨床研究：AAVベクターでは遺伝子発現が局所に限局されるため、ラットで遺伝子治療の効果が得られても、大型動物でも同様の結果が得られるかどうか懸念された。しかし、カニクイザルでの遺伝子治療前臨床研究で、被験の広範な領域に導入遺伝子の発現が認められ、予想以上に良好な治療効果が得られた。安全性の点でも、これまでのところ特に問題は認められていない。したがって、AAVベクターによるドーパミン生合成酵素遺伝子の線条体への導入は、パーキンソン病の有力な遺伝子治療法として期待できると考えられる。

5) AAVベクターを用いた癌に対する遺伝子治療モデル実験：AAVベクターを用いた自殺遺伝子治療に関しては、放射線治療あるいは抗癌剤との併用が有用であることが示唆された。また、sFlt-1やNK4を発現させる方法は、卵巣癌由来腹水貯留ならびに腹膜播種に対して有効な治療法となり得ることが示唆された。さらに、腫瘍特異的増殖型AAVベクターの開発に繋がる知見が得られた。

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の推進、アデノウイルスベクターを利用した新規AAVベクター作製法の検討などを行った。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。ドーパミン生合成酵素遺伝子をパーキンソン病モデルラットの線条体に導入すると治療効果が1年半以上持続した。また、MPTP投与によるパーキンソン病モデルサルを用いた前臨床研究でも明らかな治療効果が観察された。さらに、GDNF遺伝子を用いた治療法の開発研究にも着手した。癌に対する遺伝子治療への応用では、AAVベクターの特徴を活かした様々なストラテジーについて検討した。

F. 健康危険情報

本研究で、特に有害事象や不都合は観察されていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanazawa, T., Urabe, M., Mizukami, H., Okada, T., Kume, A., Nishino, H., Monahan, J., Kitamura, K., Ichimura, K., and Ozawa, K.: Gamma rays enhance rAAV-mediated transgene expression and cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on cancer cells. *Cancer Gene Ther.* (in press)
- 2) Kogure, K., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Sato, Y., Monahan, J., and Ozawa, K.: Targeted integration of foreign dna into a defined locus on chromosome 19 in K562 cells using AAV-derived components. *Int. J. Hematol.* (in press)
- 3) Maeda, Y., Ikeda, U., Shimpo, M., Ishibashi, S., Takizawa, T., Monahan, J., Ozawa, K., and

- Shimada, K.: Adeno-associated virus-mediated transfer of endothelial nitric oxide synthase gene reduces vasoconstrictive response. *Exp. Clin. Cardiol.* (in press)
- 4) Shen, Y., Muramatsu, S., Ikeguchi, I., Fujimoto, K., Fan, D., Ogawa, O., Mizukami, H., Urabe, M., Kume, A., Nagatsu, I., Urano, F., Suzuki, T., Ichinose, H., Nagatsu, T., Monahan, J., Nakano, I., and 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.* 11: 1509-1519, 2000.
- 5) 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]* 58: 181-191, 2000.
- 6) Chen, H., Ikeda, U., Shimpo, M., Maeda, Y., Shibuya, M., Ozawa, K., and Shimada, K.: Inhibition of vascular endothelial growth factor activity by transfection with the soluble FLT-1 gene. *J. Cardiovasc. Pharm.* 36: 498-502, 2000.
- 7) Urabe, M., Shimazaki, K., Saga, Y., Okada, T., Kume, A., Tobita, K., and Ozawa, K.: Self-amplification system for recombinant adeno-associated virus production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276: 559-563, 2000.
- 8) Maeda, Y., Ikeda, U., Shimpo, M., Shibuya, M., Monahan, J., Urabe, M., Ozawa, K., and Shimada, K.: Adeno-associated virus-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer into cardiac myocytes. *J. Cardiovasc. Pharm.* 36: 438-443, 2000.
- 9) Shimazaki, K., Urabe, M., Monahan, J., Ozawa, K., and Kawai, N.: Adeno-associated virus vector-mediated bcl-2 gene transfer into post-ischemic gerbil brain in vivo: prospects for gene therapy of ischemia-induced neuronal death. *Gene Ther.* 7: 1244-1249, 2000.
- 10) Maeda, Y., Ikeda, U., Shimpo, M., Shibuya, M., Monahan, J., Urabe, M., Ozawa, K., and Shimada, K.: Adeno-associated virus-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer into cardiac myocytes. *J. Cardiovasc. Pharm.* 36: 438-443, 2000.
- 11) Shimpo, M., Ikeda, U., Maeda, Y., Ueno, S., Ikeda, M., Minota, S., Takizawa, T., Urabe, M., Kume, A., Monahan, J., Ozawa, K., and Shimada, K.: Gene transfer into rat renal cells using adeno-associated virus vectors. *Am. J. Nephrol.* 20: 242-247, 2000.
- 12) 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.* 7: 589-596, 2000.
- 13) Maeda, Y., Ikeda, U., Oya, K., Shimpo, 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.
- 14) 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.
- 15) Ozawa, K., Muramatsu, S., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Shen, Y., Fan, D.-S., Mizukami, H.,

- Urabe, M., Hanazono, Y., Kume, A., Ogawa, M., and Nakano, I.: Adeno-associated virus (AAV) vectors and gene therapy of Parkinson's disease. In, *Progress in Gene Therapy - Basic and Clinical Frontiers.* (ed. by Bertolotti, R., Parvez, S.H., and Nagatsu, T.), VSP BV, Netherlands, pp.289-306, 2000.
- 16) Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H., and Nagatsu, T.: Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from Parkinsonian brain. *J. Neural Transm.*, 107: 335-341, 2000.
- 17) Hibiya, M., Ichinose, H., Ozaki, N., Fujita, K., Nishimoto, T., Yoshikawa, T., Asano, Y., and Nagatsu, T.: Normal values and age-dependent changes in GTP cyclohydrolase I activity in stimulated mononuclear blood cells measured by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 740: 15-42, 2000.
- 18) Kaneko, S., Hikida, T., Watanabe, D., Ichinose, H., Nagatsu, T., Kreitman, R. J., Pastan, I., and Nakanishi, S.: Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function. *Science* 289: 633-637, 2000.
- 19) Mogi, M., Togari, A., Tanaka, K., Ogawa, N., Ichinose, H., and Nagatsu, T.: Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)- α in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats is suppressed by immunosuppressant FK506. *Neurosci. Lett.*, 289: 165-168, 2000.
- 20) Tazawa, M., Ohtsuki, M., Ichinose, C., Shiraishi, H., Kuroda, R., Hagino, Y., Nakashima, S., Nozawa, Y., Ichinose, H., Nagatsu, T., and Nomura, T.: GTP cyclohydrolase I from *Tetrahymena pyriformis*: cloning of cDNA and expression. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 127: 65-73, 2000.
- 21) Ichinose, H., Inagaki, H., Suzuki, T., Ohye, T., and Nagatsu, T.: Molecular mechanisms of hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation, Segawa's disease. *Brain Dev.* 22: S107-S110, 2000.
- 22) Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., and Togari, A.: Cytokines in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. [Suppl]* 58: 143-151, 2000.
- 23) Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., and Togari, A.: Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. [Suppl]* 60: 253-266, 2000.
- 24) Hibiya, M., Ichinose, H., Ozaki, N., Fujita, K., Nishimoto, T., Yoshikawa, T., Asano, Y., and Nagatsu, T.: Normal values and age-dependent changes in GTP cyclohydrolase I activity in stimulated mononuclear blood cells measured by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 740: 35-42, 2000.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

分担研究報告書

パーキンソン病モデル動物を用いた遺伝子治療実験

分担研究者 中野今治 自治医科大学神経内科教授

【研究要旨】 アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを使用してド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)、および GTP cyclohydrolase I (GCH)の遺伝子をパーキンソン病のモデル動物の線条体に導入する実験を行った。ラットでは、長期間（18 か月）にわたり運動障害の改善が認められた。MPTP によるモデルサルでは、片側の被殻に遺伝子導入することにより対側上下肢の運動障害の改善が認められた。遺伝子導入側の被殻では、免疫組織化学により広範な領域で酵素遺伝子の発現が認められ、*in vivo dialysis* によりドパミンとその代謝産物の増加が確認された。

A. 研究目的

AAV ベクターを使用して線条体内で直接ドパミンを効率よく合成する新たな遺伝子治療法の開発を目的とする。

B. 研究方法

ドパミン合成に必要な三種類の酵素(TH、AADC、GCH)の遺伝子および LacZ の遺伝子をそれぞれ発現する4種類の AAV ベクター (AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCH、AAV-LacZ)を作成した。ラットでは選択的神経毒 6-OH ドパミンを一側の内側前頭束に注入し黒質線条体路を破壊した。カニクイサルの実験では、あらかじめ4個のレーズンをつまみとる動作を左右の上肢について訓練し、その後、選択的神経毒 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro- pyridine (MPTP, 0.25mg/kg)を週一回静脈注射する慢性投与方法によりモデルを作製した。上記 AAV ベクター (AAV-TH/-AADC/-GCH)を混合して、ラットでは黒質破棄側の線条体に、またサルでは一側の被核に定位脳

手術により注入した。ラットでは、アポモルフィン投与後の回転運動数の変化を評価した。サルでは、Primate Parkinsonism Rating Scale (PPRS)により運動障害の変化を評価した。また、レーズン取りをデジタルビデオカメラで撮影し解析した。さらに、アポモルフィンによる回転傾向の有無を調べた。2 頭のサルで、両側の被核にプローブを挿入し *in vivo dialysis* によりドパミンおよびその代謝産物である 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC) と 3-methoxytyramine (3MT)を測定した。抗 TH、抗 AADC、抗 GCH の各抗体を使用して、導入遺伝子の発現を検討した。また、抗 TH 抗体と神経細胞のマーカーである MAP-2 に対する抗体との二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

C. 研究結果

ラットでは、AAV 注入 18 か月後にもアポモルフィン誘発回転運動の抑制が減弱することなく持続していた。

MPTP サル(4 頭)においては、ベクター注入反対側の上下肢で動作が速くなり、筋強剛、振戦も消失した。アポモルフィンを筋肉注射すると、同側を向くように体軸を回転する傾向が認められ、ドパミン受容体の supersensitivity が改善された可能性を示すものと考えられた。ベクター注入5週間後の免疫組織化学では、被殻の広範な領域にわたって、抗 TH 抗体、抗 AADC 抗体、抗 GCH 抗体に陽性となる細胞が認められ、その大部分は MAP-2 陽性の神経細胞であった。遺伝子導入側の被殻ではドパミン、DOPAC、3MT のいずれも増加していた。副作用は認められなかった。

D. 考察

パーキンソン病では中脳黒質緻密部のドパミン細胞の脱落により無動、安静時振戦、筋強剛などの運動障害を生じる。薬物治療としては線条体で減少したドパミンを補充するため L-DOPA が使用される。L-DOPA は病初期には奏効するものの次第に効果が減弱し、高用量の L-DOPA を全身投与すると幻覚や不随意運動などの副作用が生じるようになる。そのため線条体内で効率よくドパミンを合成する遺伝子治療法の開発が望まれてきた。AAV ベクターは、神経細胞に *in vivo* で効率よく長期間にわたり遺伝子導入することが可能である。野生型のウイルスに病原性がなく安全性においても優れている。私たちは AAV ベクターによりドパミン合成に必要な三種類の遺伝子を線条体に直接導入する方法を開発した。今回、ラットにおいて 18 か月間の長期にわたり運動障害の改善と遺伝子発現を確認できた。また、サルのモデルを使用することによりレーズン取りのような細かい動作を含む運動障害の改善が得られることが明らかになった。AAV ベクターを使用したこの遺伝子治療法は、ヒトへも応用が可能であり効果が期待できる。

E. 結論

AAV ベクターにより三種類のドパミン合成酵素

の遺伝子を線条体に導入する遺伝子治療法を開発し、パーキンソン病のモデル動物で運動障害の改善が得られることを明らかにした。特にサルで効果が見られたことは人への応用への前臨床試験として重要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shen Y, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Fan D-S, Ogawa M, Mizukami H, Urabe M, Kume A, Nagatsu I, Urano F, Suzuki T, Ichinose H, Nagatsu T, Monahan J, Nakano I and Ozawa K: Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase I for gene therapy of Parkinson's disease. *Human gene therapy* 11:1509-1519, 2000.

2. 学会発表

Shen Y, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, 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. Third Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. Denver, Colorado, June 1, 2000.

Muramatsu S, Fujimoto F, Ikeguchi K, Shen Y, Kawasaki K, Ono F, Matsumura M, Mizukami H, Kume A, Nagatsu I, Ichinose H, Nagatsu T, Monahan J, Terao K, Nakano I, and Ozawa K. Functional recovery in a primate model of Parkinson's disease after triple transduction of adeno-associated virus vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. The Sixth Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy. Tokyo, July 27, 2000.

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

ドーパミンニューロン活性化に関わる遺伝子群の探索

分担研究者 一瀬 宏 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、パーキンソン病患者において、残存しているドーパミンニューロンを活性化し細胞死の進行を阻止するような新規治療用遺伝子を探索している。V-1とよばれるタンパク質は、未分化状態のPC12細胞において一群のカテコールアミン生合成酵素遺伝子の発現を増加させる作用がある。今回我々はまず、V-1がカテコールアミン合成に必須なビオプテリン補酵素の生合成遺伝子をも活性化させる作用を持っているのかを調べた。次に、V-1がどのような分子機構によりカテコールアミン生合成酵素遺伝子の発現を増大させているのかについて検討した。その結果、V-1過剰発現細胞ではサイクリックAMPレスポンスエレメント（CRE）を介する細胞内情報伝達系が非常に活性化されていることが明らかになった。以上の結果は、カテコールアミン生合成遺伝子群の発現増大のためにCREを活性化するような細胞内情報伝達系が重要であり、V-1やその他のCRE活性化作用を持つ遺伝子の導入がドーパミンニューロンの再活性化に有効である可能性を示唆した。

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。

パーキンソン病に対する遺伝子治療は、新しいパーキンソン病に対する治療法の一つとして注目を集めている。これまで、パーキンソン病に対する遺伝子治療の候補遺伝子として、チロシン水酸化酵素などのドーパミン生合成関連酵素、または神経栄養因子などがこれまで試みられてきて、一定の治療効果を持つことが動物実験で示されている。

本研究は、パーキンソン病患者において残存しているドーパミンニューロンを再活性化し、細胞変性を防ぐことができるような新しい遺伝子治療用遺伝子を探索することを目的としている。

V-1は胎性期から生後発達期の脳において高い発現がみられるタンパク質である。最近このタンパク質をラット褐色細胞腫細胞株であるPC-12Dに過剰発現させると、チロシン水酸化酵素・芳香族アミノ酸脱炭酸酵素・ドーパミンβ水酸化酵素の発現が高まり、カテコールアミンの合成量が増すことが報告された。我々は、カテコールアミン生11合成活性化作用を持つV-1遺伝子に着目し、V-1がチロシン水酸化酵素の必須の補酵素であるビオプテリン生合成酵素の発現をも増大させ、カテコールアミン合成に必要なすべての遺伝子の発現を増大させているのか、また、V-1がカテコールアミン生合成酵素活性を増大させる分子機構について解析した。

B. 研究方法

V-1遺伝子を定常的に過剰発現しているPC12D細胞株（V1-46, V1-69）は、三菱化成生命科学研究所の山国徹博士により樹立された。このとき、V-1遺伝子の組み込まれていないプラスミドDNAを同様にトランスフェクトされた細胞株を対照細胞株（C-7, C-9）として実験に用いた。

ビオプテリン生合成律速酵素であるGTPシクロヒドロラーゼIの酵素活性は、酵素反応により生成したジヒドロネオプテリン三リン酸を、ヨウ素酸化した後アルカリフォスファターゼの作用により脱リン酸化してネオプテリンに変換し、ネオプテリンをすることにより測定した。

ビオプテリン生合成の第3段階を司るセピアプテリン還元酵素の酵素活性は、セピアプテリ

ンを基質として用い酵素反応により生成したジヒドロピオプテリンをヨウ素酸化してピオプテリンとした後、GTPシクロヒドロラーゼIと同様に高速液体クロマトグラフィ-蛍光検出法により定量した。

細胞内転写因子の活性化は、転写制御因子の結合配列にTATAボックスとルシフェラーゼ遺伝子をつないだプラスミドベクターを用いて調べた。それぞれのエンハンサーエレメントを持つプラスミドを、Lipofect AMINE 2000 (GIBCO)を用いてPC12D細胞にトランスフェクションして48時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼの酵素活性をケミルミネッセンス法により測定した。

C. 研究結果および考察

V-1過剰発現PC12D細胞において、カテコールアミン生合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素の活性は、対照株に比べて約2-3倍の増加を示した。この細胞において、チロシン水酸化酵素の必須の補酵素であるテトラヒドロピオプテリンの量を測定したところ、V-1過剰発現細胞において対照株の約5倍に増加していた。また、テトラヒドロピオプテリン生合成律速酵素であるGTPシクロヒドロラーゼIの酵素活性は、対照株の8-9倍に増加していた。GTPシクロヒドロラーゼIのmRNA量や酵素タンパク質量をノーザンブロッティング、ウエスタンブロッティングの手法によりそれぞれ調べてみたところ、mRNA量、タンパク質量共に明らかに増加していた。これらの結果は、V-1過剰発現細胞ではチロシン水酸化酵素や芳香族アミノ酸脱炭酸酵素ばかりでなく、テトラヒドロピオプテリン生合成酵素であるGTPシクロヒドロラーゼIも酵素誘導により活性が増大していることを示した。

一方、テトラヒドロピオプテリン生合成の第三段階を司るセピアプテリン還元酵素の活性は、V-1過剰発現細胞においても対照株と変化していなかった。このことは、テトラヒドロピオプテリン生合成の律速段階はGTPシクロヒドロラーゼIであり、セピアプテリン還元酵素活性は、PC12D細胞においてV-1遺伝子導入以前から充分高い酵素活性を発現していることを意味した。

次に、V-1過剰発現細胞においてどのような細胞内における変化により、一群のカテコールアミン生合成関連遺伝子の発現誘導が生じているのかを知るために、各種のエンハンサーエレメントを持つレポーター遺伝子を細胞にトランスフェクションして、それぞれのエンハンサー活性の強さを調べた。エンハンサーエレメントとしてはAP-1、サイクリックAMPレスポンスエレメント (CRE)、グルココルチコイドレスポンスエレメント (GRE)、ヒートショックエレメント (HSE)、NF-kB、および、ストレスレスポンスエレメント (SRE) の6種類について検討した。その結果、V-1過剰発現細胞株に

おいては、CREが顕著に活性化されていることが判明した。

カテコールアミン生合成酵素遺伝子のうち、チロシン水酸化酵素とドーパミンβ水酸化酵素についてはプロモータ領域に典型的なCREをもつことが知られている。しかし、V-1過剰発現細胞において強く誘導されている芳香族アミノ酸脱炭酸酵素やGTPシクロヒドロラーゼIにおいては典型的なCREは持っていない。

また、細胞内cAMPを増加させてプロテインキナーゼAを通してCREBを活性化する経路が、フォルスコリンなどの薬剤により引き起こされる。しかし、PC12D細胞をフォルスコリンで刺激するだけでは、V-1過剰発現細胞株で見られるようなカテコールアミン生合成酵素すべての強い誘導は起こらない。ゆえに、V-1過剰発現細胞においては、何らかの別のシグナルによりCREによる転写活性が増大していることが予測される。今後、V-1過剰発現細胞において起きている細胞内分子機構を解析することにより、カテコールアミン生合成酵素を誘導するための細胞内シグナルを追究していく予定である。

E. 結論

V-1の過剰発現によりカテコールアミン生合成関連遺伝子の発現が広く活性化されていること、また、これらのカテコールアミン生合成関連遺伝子の発現にはCREを介する遺伝子発現制御系が深く関わっていることが明らかとなった。この結果は、V-1細胞と同様な機構によりCREを活性化させることができれば、ドーパミン生合成量を人為的に増加させることができることを示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komuro O, Kuno S, Ichinose H, and Nagatsu T (2000). Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from Parkinsonian brain. *J. Neural Transm.*, 107, 335-341.

2) Hibiya M, Ichinose H, Ozaki N, Fujita K, Nishimoto T, Yoshikawa T, Asano Y and Nagatsu T (2000). Normal values and age-dependent changes in GTP cyclohydrolase I activity in stimulated mononuclear blood cells measured by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 740, 15-42.

3) Shen Y, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Fan D-S, Ogawa M, Urabe M, Kume A, Nagatsu I, Urano F, Suzuki T, Ichinose H, Nagatsu T, Monahan J, Nakano I, and Ozawa K (2000). 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. *Human Gene Therapy*, 11, 1509-1519.

4) Kaneko S, Hikida T, Watanabe D, Ichinose H, Nagatsu T, Kreitman RJ, Pastan I, and Nakanishi S (2000). Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function. *Science*, 289, 633-637.

5) Mogi M, Togari A, Tanaka K, Ogawa N, Ichinose H, and Nagatsu T (2000). Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)- α in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats is suppressed by immunosuppressant FK506. *Neurosci. Lett.*, 289, 165-168.

6) Tazawa M, Ohtsuki M, Ichinose C, Shiraishi H, Kuroda R, Hagino Y, Nakashima S, Nozawa Y, Ichinose H, Nagatsu T, and Nomura T (2000). GTP cyclohydrolase I from *Tetrahymena pyriformis*: cloning of cDNA and expression. *Comp Biochem Physiol B*, 127, 65-73.

7) Ichinose H, Inagaki H, Suzuki T, Ohye T, and Nagatsu T (2000). Molecular mechanisms of hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation, Segawa's disease. *Brain and Development*, 22, S107-S110.

8) Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, and Togari A (2000). Cytokines in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. [Suppl]* 58, 143-151.

9) Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, and Togari A (2000). Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. [Suppl]* 60, 253-266.

G. 知的所有権の取得状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shen, Y., Muramatsu, S., Ikeguchi, I., Fujimoto, K., Fan, D., Ogawa, O., Mizukami, H., Urabe, M., Kume, A., Nagatsu, I., Urano, F., Suzuki, T., Ichinose, H., Nagatsu, T., Monahan, J., Nakano, I., and 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.	11	1509-1519	2000
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]	58	181-191	2000
Urabe, M., Shimazaki, K., Saga, Y., Okada, T., Kume, A., Tobita, K., and Ozawa, K.	Self-amplification system for recombinant adeno-associated virus production.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	276	559-563	2000
Shimazaki, K., Urabe, M., Monahan, J., Ozawa, K., and Kawai, N.	Adeno-associated virus vector-mediated bcl-2 gene transfer into post-ischemic gerbil brain in vivo: prospects for gene therapy of ischemia-induced neuronal death.	Gene Ther.	7	1244-1249	2000
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.	7	589-596	2000
Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H., and Nagatsu, T.	Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from Parkinsonian brain.	J. Neural Transm.	107	335-341	2000
Hibiya, M., Ichinose, H., Ozaki, N., Fujita, K., Nishimoto, T., Yoshikawa, T., Asano, Y., and Nagatsu, T.	Normal values and age-dependent changes in GTP cyclohydrolase I activity in stimulated mononuclear blood cells measured by high-performance liquid chromatography.	J. Chromatogr. B.	740	15-42	2000
Kaneko, S., Hikida, T., Watanabe, D., Ichinose, H., Nagatsu, T., Kreitman, R. J., Pastan, I., and Nakanishi, S.	Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function.	Science	289	633-637	2000

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mogi, M., Togari, A., Tanaka, K., Ogawa, N., <u>Ichinose, H.</u> , and Nagatsu, T	Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)- α in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats is suppressed by immunosuppressant FK506.	Neurosci. Lett.,	289	165-168	2000
Tazawa, M., Ohtsuki, M., <u>Ichinose, C.</u> , Shiraishi, H., Kuroda, R., Hagino, Y., Nakashima, S., Nozawa, Y., Ichinose, H., Nagatsu, T., and Nomura, T.	GTP cyclohydrolase I from Tetrahymena pyriformis: cloning of cDNA and expression.	C o m p . B i o c h e m . Physiol. B.	127	65-73	2000
<u>Ichinose, H.</u> , Inagaki, H., Suzuki, T., Ohye, T., and Nagatsu, T.	Molecular mechanisms of hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation, Segawa's disease.	Brain Dev.	22	S107-S110	2000
Nagatsu, T., Mogi, M., <u>Ichinose, H.</u> , and Togari, A.	Cytokines in Parkinson's disease.	J. Neural Transm. [Suppl]	58	143-151	2000
Nagatsu, T., Mogi, M., <u>Ichinose, H.</u> , and Togari, A.	Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease.	J. Neural Transm. [Suppl]	60	253-266	2000

20000382

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
P14-P15「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください

