

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成14 (2002) 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	12
一瀬 宏	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	15
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	18
-----------------	----

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、AAVベクターの血清型と組織特異性の問題について、骨格筋を中心に検討した。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、ドーパミン生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さらに詳細に検討した。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・ラットの系で、GDNF遺伝子を線状体に導入すると病気の進行が抑えられることを確認した。また、サルのパーキンソン病モデル（神経毒MPTP投与による）の系で、AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCHを線条体に注入した前臨床研究では、その治療効果が長期間持続することを観察した。その他、AAVベクターを使った癌遺伝子治療法のストラテジー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

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

A. 研究目的

遺伝子治療臨床研究が米国でスタートして10年以上経つが、臨床的有効性が確認された

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ストラテジーとしては、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。その他、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) 現行のトランスフェクション法に取って代わるパッケージング細胞株の確立が望まれている。そのようなAAV蛋白質 (Rep, Cap) を発現する細胞株の樹立にあたっては、これらの蛋白質が細胞毒性を有することからその発現制御技術が鍵となる。そこで、loxP配列で挟んだCMVプロモーターの下流にAAVゲノムをア

ンチセンスの向きに連結したプラスミドベクター (pLCLRC) を構築した。このpLCLRCを293細胞に導入した細胞株 (293LCLRC) は、アンチセンスの転写の方が強いためにRep, Capの発現は抑制された状態にある。ところが、Creリコンビナーゼを発現させると、CMVプロモーターが除去されるためにアンチセンスによる抑制が解除され、AAV本来のプロモーターによってRep, Capが発現されるようになる。この細胞株のパッケージング機能を確認するため、LacZ発現AAVベクターとAdexCre (Creリコンビナーゼ発現アデノウイルスベクター) を感染させた。さらに、ベクター産生効率を改善させるため、Cap発現アデノウイルスベクター (AVC2Cap) を共感染させる実験も行った。

ii) 最近、AAVの血清型とその組織特異性が注目されており、本研究でも検討を開始した。ヒト細胞へ感染能を有することが知られている1型から5型までの計5種類の血清型のAAVベクターを作製するシステムを準備し、これらを用いてLacZ遺伝子及びマウスEpo遺伝子を搭載したベクター (AAV-LacZ及びAAV-Epo) を作製した。これらのベクターをマウス下腿三頭筋に注射し、経時的に遺伝子発現を追跡し、比較検討した。

2) パーキンソン病のための治療用遺伝子の開発：カテコールアミン合成活性化作用を持つV-1遺伝子に着目し、V-1がカテコールアミン合成酵素活性をどのようにして増大させているのかについて解析した。前年度、V-1過剰発現PC-12D細胞内でcAMP responsive element (CRE) を介する転写機構が特異的に活性化していることを明らかにした。本年度は、このCRE転写活性化がドーパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) の発現にどのように影響しているか、また、どのよう

な機構によりV-1細胞でCRE転写活性化がなされているのかについて検討した。具体的には、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）と対照細胞株（C-7, C-9）を用い、レポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイなどを行った。

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：病態の進行の阻止を目的とした治療法の開発を進めた。即ち、6-OHDA（6-hydroxydopamine）を線条体に注入することによりドーパミン神経終末を部分的に破壊したパーキンソン病モデル・ラットにおいて、定位脳手術によりGDNF（glial cell line-derived neurotrophic factor）遺伝子を搭載したAAVベクターを線条体に注入する実験を継続して行った。尚、内因性のGDNFと区別するためFLAGペプチド配列をC端に付加した発現ベクター（AAV-GDNF *flag*）を作製した。治療効果については、異常運動の改善効果に関する観察に加えて生化学的解析を行った。

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)の週1回静脈注射（計20回程度）を長期間行い、薬剤性パーキンソニズムを発症させた。

ii) パーキンソン病モデル・サルの片側の被殻に定位脳手術によりAAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCHを注入し、平成12年度に認められた有効性に関して長期的観察を行った。運動障害の改善効果をPrimate Parkinsonism Rating Scale (PPRS)およびデジタルビデオ解析により検討した。

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) 頭頸部癌細胞接種マウスに対するAAVベクターを用いた自殺遺伝子治療の γ 線照射による増強効果について検討した。即ち、ヒト喉頭癌由来のHEp-2細胞をヌードマウス皮下に移植して形成した腫瘍に、AAVベクター（AAV-LacZあるいはAAV-TK）を感染させ、 γ 線照射の有無による腫瘍内での導入遺伝子の発現及びガンシクロビル（GCV）に対する感受性の差を調べた。

ii) インターロイキン-10（IL-10）に腫瘍血管を抑制する作用があることが最近注目されており、その卵巣癌に対する作用について検討した。本研究では、VEGFを産生するSHIN-3細胞株とVEGF非産生のKOC-2S細胞株を用い、マウスIL-10遺伝子を導入した細胞の*in vitro*での増殖パターン、ヌードマウスに皮下移植あるいは腹腔内投与した時の増殖パターンならびに腹腔内播種／生存率について検討した。

iii) HSV-TK遺伝子搭載ベクターの神経膠腫細胞内での増幅と殺細胞効果の増強を狙った治療法の開発を進めた。即ち、HSV-TKおよびRepを発現するAAV-TkRepを構築し、AAV-E1、AV-Capと共に9L細胞に感染させた。

（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) Cre/loxP法とアンチセンス法を併用することによりAAVのRep, Cap両蛋白質の発現を制御可能にしたAAVベクター作製用パッケージング細胞株の開発では、10cmディッシュ換算で最大 7.5×10^{10} ゲノムコピーのベクターを産生する細胞株が得られた。

ii) 種々の血清型のAAVベクター (AAV-1~5) を用い、骨格筋に遺伝子導入した場合の発現効率について検討した。AAV-LacZベクターの投与実験では、筋標本のX-Gal染色の結果、1型及び5型において極めて高い発現が認められ、2・3・4型では従来の2型における結果とほぼ同等の発現を示した。 β -Gal活性の測定結果も同様の結果であった。また、筋標本においては明らかな炎症反応などは認められなかった。AAV-Epoベクターを筋注した実験では、血清Epo濃度は1型が最も高く、5型がこれに次ぎ、残りはいずれも2型と同程度であった。

2) パーキンソン病のための治療用遺伝子の開発：V-1細胞でのCRE依存的転写活性化がどのような転写因子によりもたらされているのかを調べるために、PC12D細胞の核抽出液を用いて、THのCRE配列に対するゲルシフトアッセイを行った。この実験で、THのCRE依存的転写に関わっている転写因子がCREBとATF-2の2つであることが明らかになったので、V-1細胞におけるそれぞれの活性化状態を、抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロッティングと、リン酸化状態に依存してレポータ遺伝子が活性化するトランスレポーターシステムを用いて解析した。その結果、V-1細胞内でCREBのリン酸化や転写活性は対照細胞株とそれほど変化していないものの、ATF-2のリン酸化とそれに伴う転写活性が大きく亢進していることが明らか

かになった。

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：線条体へのAAV-GDNF $flag$ の注入20週後にもFLAG抗体で陽性となる神経細胞が認められ、GDNF $flag$ 蛋白質が持続して発現していた。6-OHDA注入4週間後のAAV-GDNF $flag$ の注入時点においては、TH抗体に陽性となる黒質のドーパミン細胞は非障害側の約35%であったが、AAV-GDNF $flag$ 注入20週後も57%に保たれていた。一方、対照としてのAAV-LacZ注入群では、20週後にTH陽性細胞は19.5%まで減少していた。AAV-GDNF $flag$ の注入4週後よりアポモルフィン誘発回転運動およびシリンダーテストにおける左右前肢使用頻度の不均等の改善効果が認められ、その効果は観察期間 (20週) の間、持続した。遺伝子導入側の線条体では、ドーパミン及びその代謝産物のDOPAC、HVAのいずれもが増加していた。

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：ドーパミン合成系の三種類の酵素遺伝子を導入したモデルサルでは、ベクターを注入した被験の反対側の上下肢では、動作が速くなり、筋強剛、振戦も消失した。この効果はベクター注入後18か月持続していた。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) ノードマウス皮下腫瘍内でのAAV-LacZの発現は γ 線で約3倍に増強された。また、腫瘍増殖はAAV-TK/GCV単独でも低下したが、 γ 線の併用で30日間完全に抑制された。

ii) マウスIL-10遺伝子を導入しても、卵巣癌細胞株2種のin vitroでの増殖パターンに変化は生じなかった。しかし、SHIN-3細胞株にIL-10遺伝子を導入した場合、皮下腫瘍の形成が抑制され、血管新生も抑えられた (dorsal

air sac assay)。さらに、腹腔内投与した場合は、腹膜播種の抑制と生存率の延長が観察された。一方、VEGF非産生のKOC-2S細胞株では、そのようなIL-10の in vivo 効果は観察されなかった。

iii) 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、AAV-E1、AV-Cap併用によりAAV-TkRepが腫瘍細胞内で増幅されることを確認した。

D. 考察

1) AAVベクター作製法に関する基盤技術開発：臨床グレードのベクターを効率良く大量作製する方法に関して、特に、パッケージング細胞株の開発は重要課題となっている。本年度は、新しい角度からのアプローチを検討した。但し、実用化を図るには更なる改良が必要と思われる。

AAVベクターの血清型と組織特異性はこの領域における最近のトピックスであるが、我々の研究グループも体系的な検討を行い、骨格筋にはAAV-1ベクター、次いでAAV-5ベクターが適しており、従来汎用してきたAAV-2ベクターでは効率が悪いことが判明した。筋肉は蛋白質補充療法を行う場合には適した標的細胞であり、今後の研究には今回の知見を活かしていく必要がある。尚、神経細胞にはAAV-2ベクターを用いていくことで構わないと考えている。

2) パーキンソン病のための治療用遺伝子の開発：今回、V-1細胞ではATF-2というCRE結合タンパク質の特異的活性化が起こっていることを明らかにした。このことは、カテコールアミン生合成酵素の発現にATF-2を介する細胞内情報伝達系が重要であることを示し、これらの活性化によるドーパミン生合成活性化の新しい方法が示唆された。

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：パーキンソン病では中脳黒質緻

密部のドーパミン細胞が進行性に脱落するため、この変性過程を抑制する治療法の開発が重要である。GDNFは in vitro においては微量でもドーパミン神経細胞の生存率を高めることが知られている。今回、AAVベクターによりGDNF遺伝子を線条体に直接導入する方法を開発した。解析結果から、線条体で発現したGDNFが逆行性に黒質ドーパミン細胞へ輸送され保護作用を発揮したと考えられた。6-OHDA投与1か月後の既に変性過程が始まった段階においても、AAVベクターでGDNF遺伝子を導入するとドーパミン細胞の保護と運動機能の回復が得られたことから、ヒトにおいてはパーキンソン病の診断後でもこの方法によって病気の進行を抑えることを狙った遺伝子治療を行える可能性がある。

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：モデルサルにおいて、ドーパミン合成系の酵素遺伝子の導入による運動障害の改善が長期間認められ、副作用もないことから、AAVベクターによるこの遺伝子治療法はヒトへの応用が期待できるものと考えられる。

尚、臨床研究の第一段階では、AAV-AADCとL-ドーパ経口投与の併用療法を考えている。これはAADC活性低下に伴いL-ドーパの効果が減弱してきた重症患者において、AADC遺伝子を導入し、ドーパミンへの変換を促進することにより、L-ドーパに対する反応性を回復させることを狙った戦略である。この治療法では、一種類のAAVベクターを使って安全性を検討できること、L-ドーパの内服量を調節することによりドーパミン産生をコントロールできることから、ドーパミン過剰産生による副作用を回避できることなどの利点がある。

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、放射線治療との併用が有

用であることが動物個体レベルにおいても示された。癌の転移や浸潤・播種を抑えるアプローチとしては、IL-10遺伝子の有用性が示された。おそらく、腫瘍血管新生を何らかの機序により抑えるものと推定される。AAV-1ベクターでIL-10遺伝子を筋肉に導入し、長期的に発現させる方法を今後検討していく必要がある。さらに、腫瘍特異的増殖型AAVベクターの開発も進み、将来的にはより強力な自殺遺伝子治療への応用が期待される。

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の推進、AAVベクターの血清型と組織特異性に関して特に骨格筋を中心にした検討を行った。応用研究としては、AAVベクターを利用したパーキンソン病の遺伝子治療法の開発を進めた。GDNF遺伝子を線状体に導入すると、疾患の進行が抑えられることをモデルラットの系で確認した。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は、長期的な観察を行い、有効性と安全性に関する基礎データを蓄積することができた。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) Hasumi, Y., Mizukami, H., Urabe, M., Kohno, T., Takeuchi, K., Kume, A., Momoeda,

M., Yoshikawa, H., Tsuruo, T., Shibuya, M., Taketani, Y., and Ozawa, K.: Soluble Flt-1 expression suppresses carcinomatous ascites in nude mice bearing ovarian cancer. *Cancer Res.* (in press)

2) Wang, L., Muramatsu, S., Lu, Y., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Okada, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Urano, F., Ichinose, H., Nagatsu, T., Nakano, I., and Ozawa, K.: Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Ther.* 9: 381-389, 2002.

3) Shimpo, M., Ikeda, U., Maeda, Y., Takahashi, M., Miyashita, H., Mizukami, H., Urabe, M., Kume, A., Takizawa, T., Shibuya, M., Ozawa, K., and Shimada, K.: AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model. *Cardiovasc. Res.* 53: 993-1001, 2002.

4) Muramatsu, S., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., Shizuma, N., Kawasaki, K., Ono, F., Shen, Y., Wang, L., Mizukami, H., Kume, K., Matsumura, M., Nagatsu, N., Urano, F., Ichinose, H., Nagatsu, T., Terao, T., Nakano, I., and Ozawa, K.: Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum. Gene Ther.* 13: 345-354, 2002.

5) Okada, T., Shimazaki, K., Nomoto, T., Matsushita, T., Mizukami, H., Urabe, M., Hanazono, Y., Kume, A., Tobita, K., Ozawa, K.,

- and Kawai, N.: Adeno-associated viral vector-mediated gene therapy of ischemia-induced neuronal death. *Method. Enzymol.* 346: 378-393, 2002.
- 6) Kawada, T., Nakazawa, M., Nakauchi, S., Yamazaki, K., Shimamoto, R., Urabe, M., Nakata, J., Hemmi, C., Masui, F., Nakajima, T., Suzuki, J.I., Monahan, J., Sato, H., Masaki, T., Ozawa, K., and Toyo-Oka, T.: Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy: Amelioration of morphological findings, sarcolemmal permeability, cardiac performances, and the prognosis of TO-2 hamsters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 901-906, 2002.
- 7) Okada, T., Mizukami, H., Urabe, M., Nomoto, T., Matsushita, T., Hanazono, Y., Kume, A., Tobita, K., and Ozawa, K.: Development and characterization of an antisense-mediated regulation system for adeno-associated virus vector production with introduction of Cre recombinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 62-68, 2001.
- 8) Saga, Y., Mizukami, H., Suzuki, M., Urabe, M., Kume, A., Nakamura, T., Sato, I., and Ozawa, K.: Expression of HGF/NK4 in ovarian cancer cells suppresses intraperitoneal dissemination and extends host survival. *Gene Ther.* 8: 1450-1455, 2001.
- 9) Maeda, Y., Ikeda, U., Oya, K., Shimpō, M., Ueno, S., Urabe, M., Kume, A., Monahan, J., Ozawa, K., and Shimada, K.: Adeno-associated virus-mediated transfer of endothelial nitric oxide synthase gene inhibits protein synthesis of rat ventricular cardiomyocytes. *Cardiovas. Drug Ther.* 15: 19-24, 2001.
- 10) 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.* 73: 469-475, 2001.
- 11) Xin, K.-Q., Urabe, M., Yang, J., Nomiyama, K., Mizukami, H., Hamajima, K., Nomiyama, H., Saito, T., Imai, M., Monahan, J., Okuda, K., Ozawa, K., and Okuda, K.: A novel recombinant adeno-associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus. *Hum. Gene Ther.* 12: 1047-1061, 2001.
- 12) Maeda, Y., Ikeda, U., Shimpō, 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.* 6: 50-55, 2001.
- 13) Kawada, T., Sakamoto, A., Nakazawa, M., Urabe, M., Masuda, F., Hemmi, C., Wang, Y., Soo Shin, W., Nakatsuru, Y., Sato, H., Ozawa, K., and Toyo-oka, T.: Morphological and physiological restorations of hereditary form of dilated cardiomyopathy by somatic gene therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284: 431-435, 2001.
- 14) Kanazawa, T., Urabe, M., Mizukami, H., Okada, T., Kume, A., Nishino, H., Monahan, J., Kitamura, K., Ichimura, K., and Ozawa, K.: γ -Rays enhance rAAV-mediated transgene

- expression and cytotoxic effect of AAV-
HSVtk/ganciclovir on cancer cells. *Cancer Gene
Ther.* 8: 99-106, 2001.
- 15) Fan, D., Shen, Y., Kang, D., Nakano, I., and
Ozawa, K.: Adeno-associated virus vector-
mediated triple gene transfer of dopamine
synthetic enzymes. *Chinese Med. J.* 114: 1276-
1279, 2001.
- 16) Sumi-Ichinose, C., Urano, F., Kuroda, R.,
Ohye, T., Kojima, M., Tazawa, M., Shiraishi, H.,
Hagino, Y., Nagatsu, T., Nomura, T., and
Ichinose, H.: Catecholamines and serotonin are
differently regulated by tetrahydrobiopterin: a
study from 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase
knockout mice. *J Biol Chem*
2001;276(44):41150-41160.
- 17) Ohye, T., Ichinose, H., Yoshizawa, T.,
Kanazawa, I., and Nagatsu, T.: A new splicing
variant for human tyrosine hydroxylase in the
adrenal medulla. *Neurosci Lett* 2001;312(3):157-
160.
- 18) Sugimoto, T., Ikemoto, K., Murata, S.,
Tazawa, M., Nomura, T., Hagino, Y., Ichinose,
H., and Nagatsu, T.: Identification of (6R)-
5,6,7,8-tetrahydro-D-monopterin (= (6R)-2-
amino-5,6,7,8-tetrahydro-6-[(1R,2R)-1,2,3-
trihydroxypropyl]-pteridin-4(3H)-one) as the
native pteridine in *Tetrahymena pyriformis*. *Helv
Chim Acta* 2001;84:918-927.
- 19) Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno,
Y., Kogure, O., Kuno, S., Ichinose, H., and
Nagatsu, T.: Glial cell line-derived neurotrophic
factor in the substantia nigra from control and
parkinsonian brains. *Neurosci Lett* 2001;300:179-
181.
- 20) Sugimoto, T., Ikemoto, K., Murata, S.,
Tazawa, M., Nomura, T., Hagino, Y., Ichinose,
H., Nagatsu, T., and Wada, A.: A convenient
determination of chiral pteridines: Application of
fluorescence detected circular dichroism (FD-
CD) to the major pterin from *Escherichia coli*.
Heterocycles 2001;54(1):283-290.
- 21) Zabetian, C.P., Anderson, G.M., Buxbaum,
S.G., Elston, R.C., Ichinose, H., Nagatsu, T., Kim,
K.-S., Kin, C.-H., Malison, R.T., Gelernter, J., and
Cubells, J.F.: A quantitative-trait analysis of
human plasma-dopamine β -hydroxylase activity:
Evidence for a major functional polymorphism at
the DBH locus. *Am J Hum Genet* 2001;68:515-
522.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

U.S. Patent Application No. 10/096,723 entitled
"Methods of Treating Parkinson's Disease Using
Recombinant Adeno-Associated Virus Virions"
Inventors: Keiya Ozawa, Ken-ichi Fujimoto,
Shin-ichi Muramatsu, Kunihiko Ikeguchi, and
Imaharu Nakano

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

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)ベクターを使用したパーキンソン病の遺伝子治療法の開発を目的として、ドパミン神経細胞の保護作用のある神経栄養因子 glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)をモデルラットの線条体で発現させる実験を行った。また、ドパミン合成系の遺伝子をモデルサルに片側被殻に導入した実験の長期効果について検討した。その結果、GDNF の遺伝子導入では、神経毒 の注入から 1 か月後にベクター投与を行っても、黒質ドパミン神経細胞の保護作用と機能回復が認められた。モデルサルのドパミン合成系の遺伝子導入では、対側上下肢の運動障害の改善効果はベクター注入の 18 か月後も持続していた。

A. 研究目的

AAV ベクターを使用したパーキンソン病の遺伝子治療法の開発を目的とし、パーキンソン病モデル動物を用いた前臨床研究を行う。

B. 研究方法

1) 神経保護因子遺伝子の導入

内因性のものと区別するため FLAG ペプチド配列を C 端に付加した glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)の遺伝子、または対照として LacZ 遺伝子を搭載した AAV ベクター (AAV-GDNF *flag* および AAV-LacZ)を作製した。はじめに、ラット胎児中脳ドパミン細胞の初代培養系において、AAV-GDNF *flag* がドパミン神経細胞の保護作用を示すことを確認した。その後、ラットの一側の線条体に選択的神経毒 6-ヒドロキシドパミン(6-OHDA)を注入し黒質線条体路を部分的に破壊した。4 週間後 AAV-GDNF *flag* または AAV-LacZ を破壊側の線条体に注入し、アポモルフィン投与後の回転運動数およびシリンダー

テストにおける左右前肢の使用頻度を経時的に評価した。免疫組織化学によりドパミン神経細胞の脱落の程度を検討した。線条体内のドパミンとその代謝物(DOPAC、HVA)の濃度を測定した。

2) ドパミン合成系酵素の遺伝子導入

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)の各遺伝子をそれぞれ発現する 3 種類の AAV ベクター (AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCH)を一側の被殻に注入する遺伝子治療実験を行ったパーキンソン病モデルサルについて、昨年度に引き続き運動障害の改善効果を Primate Parkinsonism Rating Scale (PPRS)およびデジタルビデオ解析により検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、非病原性 AAV に由来するベクター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、倫理的な問題が生ずることは基本的にはないと考えている。ラットを用いた実験は、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）

を含めて自治医大動物実験指針規定に従って行った。筑波霊長類センターとの共同研究として実施したサルの実験は、厚生労働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」及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。

B. 研究結果

1) AAV-GDNF *flag* による機能回復

ラット胎児中脳の初代培養において AAV-GDNF *flag* によりドパミン細胞の生存率は対照の約2倍となった。モデルラットでは、線条体への AAV-GDNF *flag* の注入 20 週後にも FLAG 抗体で陽性となる神経細胞が認められ、GDNF *flag* 蛋白が持続して発現していた。6-OHDA 注入 4 週間後の AAV-GDNF *flag* の注入時点においては、TH 抗体に陽性となる黒質のドパミン細胞は非障害側の約 35%であったが、ベクター注入 20 週後には 57%に回復していた。一方、AAV-LacZ 注入群では 20 週後に TH 陽性細胞は 19.5%まで減少していた。AAV-GDNF *flag* の注入 4 週後よりアポモルフィン誘発回転運動およびシリンドertestにおける左右前肢使用頻度の不均等の改善効果が認められた。遺伝子導入側の線条体ではドパミン、DOPAC、HVA のいずれも増加していた。

1) モデルサルでの運動障害の長期改善

ドパミン合成系の三種類の遺伝子導入を行ったモデルサルでは、ベクターを注入した被殻の反対側の上下肢では、動作が速くなり、筋強剛、振戦も消失した。この効果はベクター注入後 18 か月持続していた。副作用は認められなかった。

B. 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が進行性に脱落するため、この変性過程を抑制する治療法の開発が重要である。GDNF は *in vitro* においては微量でもドパミン神経細胞の生存率を高めることが知られている。しかし、血液脳

関門を通過しない、全身投与では副作用を生じる、半減期が短い、など蛋白として利用することは困難である。米国で行われた GDNF の脳室内投与による臨床試験では効果が認められなかったが、その原因としては黒質のドパミン細胞へ GDNF を持続的に供給できなかった可能性が考えられている。今回、私たちは AAV ベクターにより GDNF を線条体に直接導入する方法を開発した。黒質には TH 抗体および FLAG 抗体がともに陽性の細胞が存在しており、線条体で発現した GDNF が逆行性に黒質ドパミン細胞へ輸送され保護作用を発揮したと考えられた。6-OHDA 投与 1 か月後の既に変性過程が始まった段階においても AAV ベクターによる GDNF の供給を行うとドパミン細胞の保護と運動機能の回復が得られたことから、ヒトにおいてはパーキンソン病の診断後でもこの方法による遺伝子治療を行える可能性がある。

モデルサルにおいては、ドパミン合成系の酵素遺伝子の導入による運動障害の改善が長期間認められ、副作用もないことから、AAV ベクターによるこの遺伝子治療法はヒトへの応用が期待できる。

B. 結論

AAV ベクターにより GDNF 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ラットで、神経変性過程がある程度進んだ後に治療を開始してもドパミン神経細胞の保護作用と運動障害の改善効果が得られることを明らかにした。また、モデルサルにおいてドパミン合成系酵素の遺伝子治療の効果は 18 か月持続していることを確認した。

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) Muramatsu, S., Fujimoto, K., Ikeguchi K., Shizuma N., Kawasaki K., Ono F., Shen Y., Wang L., Mizukami, H., Kume A., Matsumura M., Nagatsu I., Urano F., Ichinose H., Nagatsu T., Terao K, Nakano I, and Ozawa K.: Behavioral Recovery in a Primate Model of Parkinson's Disease by Triple Transduction of Striatal Cells with Adeno-Associated Viral Vectors Expressing Dopamine-Synthesizing Enzymes. *Hum Gene Ther*: 13(3) 345-354, 2002.
- 2) Wang L., Muramatsu S., Lu Y., Ikeguchi K., Fujimoto K., Okada K., Mizukami H., Hanazono Y., Kume A., Urano F., Ichinose H., Nagatsu T., Nakano I., and Ozawa K. Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Ther*: *in press*.

2. 学会発表

- 1) Muramatsu, S., Fujimoto, K., Ikeguchi K., Shizuma N., Kawasaki K., Ono F., Shen Y., Wang L., Mizukami, H., Kume A., Matsumura M., Nagatsu I., Urano F., Ichinose H., Nagatsu T., Terao K, Ozawa K. and Nakano I.: Functional recovery in a primate model of Parkinson's disease by gene therapy using adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. 5th International conference on progress in Alzheimer's and Parkinson's disease, Kyoto, April 4, 2001
- 2) Muramatsu, S., Fujimoto, K., Ikeguchi K., Shizuma N., Kawasaki K., Ono F., Shen Y., Wang L., Mizukami, H., Kume A., Matsumura M., Nagatsu I., Urano F., Ichinose H., Nagatsu T., Terao K, Nakano I., and Ozawa K.: Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by gene therapy using adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. 4th annual meeting of the American Society of Gene Therapy, Seattle, Washington, May 31, 2001.
- 3) Muramatsu, S., Fujimoto, K., Ikeguchi K., Shizuma N., Kawasaki K., Ono F., Shen Y., Wang L., Mizukami, H.,

Kume A., Matsumura M., Nagatsu I., Urano F., Ichinose H., Nagatsu T., Terao K, Nakano I. and Ozawa K.: Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. 7th annual meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, July 5, 2001.

- 4) Wang, L., Muramatsu, S., Lu, Y., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Okada, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Urano, F., Ichinose, H., Nagatsu, T., Nakano, I., and Ozawa, K.: AAV vector-mediated delivery of GDNF gene in the striatum rescues dopaminergic neuron degeneration and ameliorates behavioral impairment in a rat model of Parkinson's disease. 7th annual meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, July 6, 2001.
- 5) Fujimoto, K., Muramatsu, S., Ikeguchi K., Shizuma N., Kawasaki K., Ono F., Shen Y., Wang L., Mizukami, H., Kume A., Matsumura M., Nagatsu I., Urano F., Ichinose H., Nagatsu T., Terao K, Ozawa K. and Nakano I.: Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. 31th annual meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, CA, November 15, 2001.

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

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。胎生期から生後発達期の脳で高い発現のみられるタンパク質として同定された新規タンパク質V-1は、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。昨年度の報告で我々は、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、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を明らかにした。今年度は、CREの活性化が、カテコールアミン生合成酵素であるチロシン水酸化酵素（TH）の発現に重要な働きをしていることを示し、どのようなCRE結合タンパク質がV-1細胞でのTH発現誘導に関わっているのかについて検討した。その結果、V-1細胞ではCREBではなく、ATF-2というCRE結合タンパク質の特異的活性化が起きていることを明らかにした。このことは、カテコールアミン生合成酵素の発現にATF-2を介する細胞内情報伝達系が重要であることを示し、これらの活性化によるドーパミン生合成活性化の新しい方法を示唆した。

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遺伝子、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活性化し、細胞変性を防ぐことができるような新しい治療用遺伝子を探索することを目的としている。

V-1は胎生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合成活性化作用を持つV-1遺伝子に着目し、V-1がカテコールアミン生合成酵素活性をどのようにして増大させているのかについて解析している。昨年度の研究において、V-1過剰発現PC-12D細胞内でcAMP responsive element (CRE)を介する転写機構が特異的に活性化していることを明らかにし

た。本年度は、このCRE転写活性化がドーパミン合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) の発現にどのように影響しているか、また、どのような機構によりV-1細胞でCRE転写活性化がなされているのかについて検討した。

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) と、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。

レポータープラスミドは、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た。ルシフェラーゼの酵素活性は、ケミルミネッセンス法により測定した。

ゲルシフトアッセイは、ラットTHのCREに対する合成ヌクレオチドを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ で標識し、定法に従って行った。

C. 研究結果

TH遺伝子上流には典型的なCRE配列 (T C A C G T C A) が存在する。V-1細胞におけるTHの発現上昇がCRE配列に依存しているかどうかを調べるために、通常のTHプロモータ領域0.8 kbにルシフェラーゼ遺伝子をつないだDNAと、同じ0.8 kbの長さを持つもののCRE配列を4塩基欠失により壊したプロモータ領域を持つレポーター遺伝子の2種類を作成した。それぞれをV-1細胞にトランスフェクションした結果、野生型プロモータでは非常に高いレポーター活性を示したが、CREを破壊した変異型プロモータではプロモータ無しのベクターとほぼ同じ程度の低い転写活性しか示さなかった。この結果は、V-1細胞におけるTHの発現上昇はCREを介する転写調節機構によりなされていることを示した。

次に、V-1細胞でのCRE依存的転写活性化がどのような転写因子によりもたらされているのかを調べるために、THのCRE配列に対するゲルシフトアッセイを行った。PC12D細胞の核抽出液を用いて、アイソトープ標識したDNAとインキュベートした後電気泳動したところ、2本の特異的なバンドが検出された。抗CREB抗体あるいは抗ATF-2抗体と一緒に反応させた

ときにバンドの位置がさらに遅くなったことから、THのCRE配列に結合した2本のバンドは、それぞれCREBを含む転写複合体と、ATF-2を含む転写複合体の2つであることが判明した。

PC12D細胞において、THのCRE依存的転写に関わっている転写因子がCREBとATF-2の2つであることが明らかになったので、V-1細胞におけるそれぞれの活性化状態を、抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロットティングと、リン酸化状態に依存してレポーター遺伝子が活性化するトランスレポーターシステムを用いて解析した。その結果、V-1細胞内でCREBのリン酸化や転写活性は対照細胞株とそれほど変化していないものの、ATF-2のリン酸化とそれに伴う転写活性はV-1細胞において大きく亢進していることが明らかになった。

D. 考察

今回の結果から、V-1細胞におけるTHの転写活性の増大に、CREBではなくATF-2を介する転写活性化が重要な役割を果たしていることが明らかになった。V-1細胞でTHと同様に発現が増大している芳香族アミノ酸脱炭酸酵素・ドーパミンβ水酸化酵素・GTPシクロヒドロラーゼIなど他のカテコールアミン合成酵素遺伝子の発現も同様な機構で活性化されている可能性が高い。これは、カテコールアミン合成酵素遺伝子の発現にCRE・ATF-2が重大な働きを担っていることを示唆すると共に、ATF-2を介するような細胞内情報伝達系の活性化が、一群のカテコールアミン合成酵素遺伝子群の転写活性化を通じてドーパミンニューロンの活性化を引き起こしうる可能性を示唆した。今後、細胞内でのATF-2の強制発現などにより、カテコールアミン合成酵素遺伝子の発現がどのように変化するかを検討していく予定である。

E. 結論

V-1の過剰発現細胞株においては、ATF-2によるCRE依存的転写の活性化がTHの発現を増大させていることが明らかになった。ATF-2を介する転写調節によるカテコールアミン合成酵素遺伝子の発現調節は、これまで知られていない新しい経路であり、この系の活性化によるドーパミン合成酵素の発現誘導の可能性を示した。

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) Sumi-Ichinose C, Urano F, Kuroda R, Ohye T, Kojima M, Tazawa M, Shiraishi H, Hagino Y, Nagatsu T, Nomura T, Ichinose H. Catecholamines and serotonin are differently regulated by tetrahydrobiopterin: a study from 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase knockout mice. *J Biol Chem* 2001;276(44):41150-41160.

2) Ohye T, Ichinose H, Yoshizawa T, Kanazawa I, Nagatsu T. A new splicing variant for human tyrosine hydroxylase in the adrenal medulla. *Neurosci Lett* 2001;312(3):157-160.

3) Sugimoto T, Ikemoto K, Murata S, Tazawa M, Nomura T, Hagino Y, Ichinose H, Nagatsu T. Identification of (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-D-monopterin (= (6R)-2-amino-5,6,7,8-tetrahydro-6-[(1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl]-pteridin-4(3H)-one) as the native pteridine in *Tetrahymena pyriformis*. *Helv Chim Acta* 2001;84:918-927.

4) Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Kogure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T. Glial cell line-derived neurotrophic factor in the substantia nigra from control and parkinsonian brains. *Neurosci Lett* 2001;300:179-181.

5) Sugimoto T, Ikemoto K, Murata S, Tazawa M, Nomura T, Hagino Y, Ichinose H, Nagatsu T, Wada A. A convenient determination of chiral pteridines: Application of fluorescence detected circular dichroism (FDChD) to the major pterin from *Escherichia coli*. *Heterocycles* 2001;54(1):283-290.

6) Zabetian CP, Anderson GM, Buxbaum SG, Elston RC, Ichinose H, Nagatsu T, Kim K-S, Kin C-H, Malison RT, Gelernter J, Cubellis JF. A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine β -hydroxylase activity: Evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus. *Am J Hum Genet* 2001;68:515-522.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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
Muramatsu, S., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., Shizuma, N., Kawasaki, K., Ono, F., Shen, Y., Wang, L., Mizukami, H., Kume, K., Matsumura, M., Nagatsu, N., Urano, F., <u>Ichinose, H.</u> , Nagatsu, T., Terao, T., <u>Nakano, I.</u> , and <u>Ozawa, K.</u>	Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes.	Hum. Gene Ther.	13	345-354	2002
Wang, L., Muramatsu, S., Lu, Y., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Okada, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Urano, F., <u>Ichinose, H.</u> , Nagatsu, T., <u>Nakano, I.</u> , and <u>Ozawa, K.</u>	Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease.	Gene Ther.	9	381-389	2002
Okada, T., Shimazaki, K., Nomoto, T., Matsushita, T., Mizukami, H., Urabe, M., Hanazono, Y., Kume, A., Tobita, K., <u>Ozawa, K.</u> , and Kawai, N.	Adeno-associated viral vector-mediated gene therapy of ischemia-induced neuronal death.	Method. Enzymol.	346	378-393	2002
Okada, T., Mizukami, H., Urabe, M., Nomoto, T., Matsushita, T., Hanazono, Y., Kume, A., Tobita, K., and <u>Ozawa, K.</u>	Development and characterization of an antisense-mediated regulation system for adeno-associated virus vector production with introduction of Cre recombinase.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	288	62-68	2001
Kogure, K., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Sato, Y., Monahan, J., and <u>Ozawa, K.</u>	Targeted integration of foreign DNA into a defined locus on chromosome 19 in K562 cells using AAV-derived components.	Int. J. Hematol.	73	469-475	2001
Kanazawa, T., Urabe, M., Mizukami, H., Okada, T., Kume, A., Nishino, H., Monahan, J., Kitamura, K., Ichimura, K., and <u>Ozawa, K.</u>	γ -Rays enhance rAAV-mediated transgene expression and cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on cancer cells.	Cancer Gene Ther	8	99-106	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saga, Y., Mizukami, H., Suzuki, M., Urabe, M., Kume, A., Nakamura, T., Sato, I., and Ozawa, K.	Expression of HGF/NK4 in ovarian cancer cells suppresses intraperitoneal dissemination and extends host survival.	Gene Ther.	8	1450-1455	2001
Kawada, T., Nakazawa, M., Nakauchi, S., Yamazaki, K., Shimamoto, R., Urabe, M., Nakata, J., Hemmi, C., Masui, F., Nakajima, T., Suzuki, J.I., Monahan, J., Sato, H., Masaki, T., Ozawa, K., and Toyo-Oka, T.	Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy: Amelioration of morphological findings, sarcolemmal permeability, cardiac performances, and the prognosis of TO-2 hamsters.	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.	99	901-906	2002
Kawada, T., Sakamoto, A., Nakazawa, M., Urabe, M., Masuda, F., Hemmi, C., Wang, Y., Soo Shin, W., Nakatsuru, Y., Sato, H., Ozawa, K., and Toyo-oka, T.	Morphological and physiological restorations of hereditary form of dilated cardiomyopathy by somatic gene therapy.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	284	431-435	2001
Maeda, Y., Ikeda, U., Oya, K., Shimpo, M., Ueno, S., Urabe, M., Kume, A., Monahan, J., Ozawa, K., and Shimada, K.	Adeno-associated virus-mediated transfer of endothelial nitric oxide synthase gene inhibits protein synthesis of rat ventricular cardiomyocytes.	Cardiovas. Drug Ther.	15	19-24	2001
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.	6	50-55	2001
Xin, K.-Q., Urabe, M., Yang, J., Nomiya, K., Mizukami, H., Hamajima, K., Nomiya, H., Saito, T., Imai, M., Monahan, J., Okuda, K., Ozawa, K., and Okuda, K.	A novel recombinant adeno-associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus.	Hum. Gene Ther.	12	1047-1061	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sumi-Ichinose, C., Urano, F., Kuroda, R., Ohye, T., Kojima, M., Tazawa, M., Shiraishi, H., Hagino, Y., Nagatsu, T., Nomura, T., and <u>Ichinose, H</u>	Catecholamines and serotonin are differently regulated by tetrahydrobiopterin: a study from 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase knockout mice.	J Biol Chem	276	41150-41160	2001
Ohye, T., <u>Ichinose, H</u> , Yoshizawa, T., Kanazawa, I., and Nagatsu, T	A new splicing variant for human tyrosine hydroxylase in the adrenal medulla.	Neurosci Lett	312	157-160	2001

研究成果の刊行物・別刷