

20020833

厚生労働科学研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進 研究事業

パーキンソン病や癌などに対するAAVベクターを用いた
遺伝子治療法の開発とその臨床応用

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤敬也

平成15(2003)年4月

目 次

I. 総括研究報告書

パーキンソン病や癌などに対するAAVベクターを用いた 遺伝子治療法の開発とその臨床応用 -----	1
小澤 敬也	

II. 分担研究報告書

1. パーキンソン病に対する遺伝子治療臨床研究 -----	7
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 -----	10
一瀬 宏	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	13
---------------------------	----

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

パーキンソン病や癌などに対する AAV ベクターを用いた
遺伝子治療法の開発とその臨床応用

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) ベクターを用いた遺伝子治療法の臨床展開に向けた研究を実施した。臨床応用研究では、パーキンソン病に対する遺伝子治療法の開発を推進した。臨床研究の第一段階としては、線条体における芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC: L-DOPA をドパミンに変換する酵素) の活性低下のために L-DOPA の効果が減弱してきた重症患者を対象とし、AAV-AADC (ステレオ装置で被殻に注入) と L-DOPA 経口投与の併用療法を試みる方法を計画した。この治療法では L-DOPA の投与量を調節することによりドパミン産生量がコントロールでき、安全性が高いものと思われる。今年度は、遺伝子治療臨床研究実施計画申請書を作成し、自治医科大学の審査委員会に提出し、審査を受けた。また、この方法に沿った形の前臨床研究をモデルサル (神経毒 MPTP 慢性投与による薬剤性パーキンソニズム) で実施し、その有効性と安全性を確認した。基礎研究では、AAV の血清型と組織特異性の問題について、1~5 型の AAV ベクターを作製し、筋肉・神経系・肝臓などへの遺伝子導入に適した血清型を明らかにした。その他の疾患については、以下の研究を行った。i) 腫瘍血管抑制や播種・転移の抑制を狙った動物個体レベルでの治療実験を行った。ii) 腫瘍内自己複製型 AAV ベクターの開発を推進した。iii) 脳虚血に対する遺伝子治療法開発の基礎実験として、スナネズミ海馬への遺伝子導入のための AAV ベクターの構築を検討した。iv) 自然発症中枢性尿崩症ラットにおいて、アルギニン-バソプレシン遺伝子を AAV ベクターで視床下部に導入する治療実験を行い、治療効果を確認した。

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

(現: 東京工業大学大学院生命理工学研究科)

教授

A. 研究目的

遺伝子治療臨床研究で有効性が確認されたものはまだ僅かであるが、遺伝子操作テクノロジーを駆使することにより、既存の方法とは全く異なる新しい角度からの治療法が可能となることから、その開発に大きな期待が寄せられている。本研究は、非病原性の AAV 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、その臨床展開を図ることを目的とする。最近、遺伝子治療用ウイルスベクターの副作用が問題になっていることから、安全性の高い AAV ベクターは益々注目されている。非分裂細胞への高効率遺伝子導入、長期遺伝子発現といった AAV ベクターの特徴を活かし、臨床応用に向けた研究としては、中脳黒質線条体系ドパミンニューロンの選択的変性によるパーキンソン病に対する遺伝子治療法の開発を第一に推進する。残存ド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、さらに第 I/II 相臨床研究まで、幅広く研究を行う。これまでのパーキンソン病モデルサルを用いた遺伝子治療実験で、臨床的有効性をかなり期

待できる段階に来ていると判断している。臨床研究の第一段階としては、病状が進行し、線条体における AADC 活性の低下のために L-DOPA の効果が減弱してきた患者を対象とし、AAV-AADC の被殻への注入と L-DOPA 経口投与の併用を計画している。この方法であれば、L-DOPA の投与量を調節することによりドパミン産生量がコントロールできるため、安全性が高いものと思われる。平成 14 年度は、遺伝子治療臨床研究実施計画申請書を作成し、自治医科大学の施設内審査委員会に提出すると共に、この方法に沿った形の前臨床研究をモデルサルで実施するなど、臨床研究に向けた準備を進める。

基礎研究では、AAV の血清型と組織特異性の問題について、1~5 型の AAV ベクターを作製し、筋肉・神経系・肝臓などへの遺伝子導入に適した血清型の検討を行う。その他の疾患については以下の研究を行う。

i) 腫瘍血管抑制や播種・転移の抑制を狙った動物個体レベルでの治療実験を行う。ii) 腫瘍内自己複製型 AAV ベクターを開発を推進する。iii) 脳虚血に対する遺伝子治療実験として、スナネズミ海馬 CA1 領域にアポトーシス抑制遺伝子を効率よく導入する系を確立する。iv) 尿崩症ラットにおいて、アルギニン-バソプレシン遺伝子を AAV ベクターで視床下部に導入する治療実験を行う。

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。また、癌に対する新しい集学的治療法や、その他の様々な疾患に対する新規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) パーキンソン病に対する遺伝子治療臨床プロトコルの作成（自治医大神経内科、遺伝子治療研究部）：研究の名称は、「AADC 発現 AAV ベクター線条体内投与による重症パーキンソン病遺伝子治療の第 I/II 相臨床研究」で、本研究の分担研究者の中野今治教授が総括責任者を務める。L-DOPA の効果が減弱してきたパーキンソン病の重症例において、線条体（被殻部分）に AAV-AADC を定位脳手術で注入し、その安全性を検証すると共に、L-DOPA 経口投与との併用により

ドパミンを局所で産生させ、パーキンソン病の症状を改善させることを目的とした臨床研究である。本年度は、遺伝子治療臨床研究実施計画申請書を作成し、自治医大の施設内審査委員会に提出・審査を受けた。

2) 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（自治医大神経内科、遺伝子治療研究部）：選択的神経毒 MPTP を慢性投与してパーキンソン病モデルサルを作製し、このモデル系で臨床プロトコルに沿った方法の有効性を検証した（筑波霊長類センターとの共同研究）。その他、AAV ベクターの安全性評価のため、遺伝子導入を行ったサルの全身臓器・組織におけるベクターゲノムの検出を試みた。

3) パーキンソン病のための治療用遺伝子の探索（藤田保健衛生大）：パーキンソン病患者脳内においては、ドパミンニューロン機能の低下を補うための代償機構が働いていることが予測される。生体内で働いている代償機構を知ることは、ドパミンニューロン活性化の方法を探るうえで、重要な知見を与えてくれると考えられる。そこで、パーキンソン病患者および対照者剖検脳において、種々の酵素の遺伝子発現がどのように変化しているかを、リアルタイム PCR 法により調べた。

4) AAV ベクターを用いた癌その他の疾患に対する遺伝子治療モデル実験（自治医大遺伝子治療研究部）：

i) AAV の血清型と組織特異性の関係について検討した。LacZ あるいはマウス型エリスロポエチン（以下 Epo）の発現ユニットを搭載した各血清型の AAV ベクターを作製し、マウス（C57BL/6）に対して骨格筋、及び門脈内への投与を行った。脳内の投与では海馬及び線条体への AAV-LacZ の注入を行った。また、各臓器組織における至適プロモーターに関しては、肝臓における比較に主眼をおき、CMV, CAG, EF-1 α , PGK プロモーターにより Epo を発現する 2 型 AAV ベクターを作製し、マウス個体に投与した。投与後は定期的に採血し、血中の Epo 濃度を測定した。また、LacZ ベクター投与群では、注入後 2 ないし 4 週の時点で組織標本を X-Gal 染色を用いて発現を確認すると共に、一部では組織抽出物の β -Gal 活性を定量した。

ii) 腫瘍血管抑制や播種・転移の抑制に基

づく抗腫瘍効果について、動物個体レベルでの治療実験を行った。具体的には、VEGF産生卵巣癌細胞株（SHIN-3細胞）に可溶性Flt-1又はIL-10遺伝子を導入してマウス腹腔内に接種し、経過を観察した。また、より実際的なモデルとしてSHIN-3細胞をマウスに皮下接種し、可溶性Flt-1又はIL-10を搭載するAAVベクターを用いて骨格筋に遺伝子導入した。

iii) 腫瘍内自己複製型 AAV ベクターの開発では、治療用 AAV ベクターと共に、AAV の溶解感染に必要なアデノウイルス初期遺伝子群や AAV 蛋白質を、アデノウイルスベクターや AAV ベクターを用いて腫瘍細胞に発現させ、治療 AAV ベクターの複製促進効果について検討した。

iv) 脳虚血に対する遺伝子治療のモデル実験では、CMV または RSV プロモーターを用い、 β -galactosidase を発現する 2 型および 5 型 AAV ベクターを構築し、ラット脳皮質由来初代培養細胞やスナネズミ海馬での遺伝子発現様式とその分布を比較した。

v) 自然発症の中枢性尿崩症ラット（Brattleboro ラット）において、ラットのアルギニン-バソプレシン（AVP）遺伝子を搭載した AAV ベクターを両側視床下部視索上核に定位脳手術により注入し、遺伝子導入の効果を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は、非病原性 AAV ベクターを用いる研究で、周辺環境および研究従事者・研究対象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ないと考えている。小動物を用いた実験は、動物倫理面を含めて自治医大動物実験指針規定に従って行った。厚生省霊長類共同利用施設で実施したサルの実験は、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。

C. 研究結果

1) パーキンソン病に対する遺伝子治療臨床プロトコルの作成：重症パーキンソン病患者 9 例を対象とした臨床研究の実施計画を作成した。第 1 群： 4×10^{12} virus genome (vg)、第 2 群： 1.2×10^{13} vg、第 3 群：前二群の結果により増減したベクター量、の

AAV-AAADC を片側の被殻に注入する計画である。現在、自治医大の施設内審査委員会で審査中である。

2) 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：MPTP 慢性投与によりパーキンソン病モデルサルを作製した。次に、このモデルサルの片側の被殻に、AAV-AAADC を注入する実験を行った。遺伝子導入前には、L-DOPA を大量 (20mg/kg) 投与しても運動障害は改善しなかったが、遺伝子導入の 2 週間後には、L-DOPA 常用量 (5mg/kg) の投与 1 時間後に対側の四肢の動きが改善し、この効果は 3~4 時間ほど持続した。不随意運動などの副作用は認められなかった。AAV ベクターによりドパミン合成系の酵素遺伝子導入を行ったサルの組織標本を使用して PCR 法による AAV ゲノムの検出を試みた結果、脳以外の臓器への AAV の拡散は認められなかった。

3) パーキンソン病のための治療用遺伝子の探索：パーキンソン病患者脳内においては、ドパミン生合成酵素であるチロシン水酸化酵素および芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 mRNA が、対照者に比べて、それぞれ 24%、13%という著明な減少を示したが、ビオプテリン生合成酵素である GTP シクロヒドロラーゼ I mRNA は、対照の 60%の低下にとどまった。

4) AAV ベクターを用いた癌その他の疾患に対する遺伝子治療モデル実験：

i) 経門脈投与の検討では、プロモーター比較の結果、CAG 群で最も高い Epo の発現がみられ、CMV 群がそれに次いだ。血清型の比較では、5 型 AAV ベクターが最も発現効率が高く、次いで 2 型、1 型の順であった。骨格筋における血清型の比較では、1 型で著明な高発現が認められ、5 型と 2 型がそれに続いた。いずれの検討においても 4 ヶ月以上にわたり効果の持続が確認された。脳内への投与では、2 型が神経細胞に特異的に導入されるのに比べ、5 型を用いた場合にはグリア細胞にも遺伝子導入が可能であることが確認された。

ii) 腫瘍細胞内に遺伝子導入し、腹腔内に接種したモデルでは、可溶性 Flt-1 及び IL-10 のいずれの遺伝子を用いた場合でも、腹膜播種・腹水貯留・生存期間に有意な改善が見られた。また、腫瘍細胞を皮下接種し、AAV ベクターを用いて骨格筋に遺伝子

導入したモデルでは、可溶性 Flt-1 と IL-10 のいずれの遺伝子を用いた場合においても対照群を遙かに上回る血中濃度が観察され、腫瘍増殖が有意に抑制された。

iii) 腫瘍内自己複製型 AAV ベクターの開発では、神経膠腫細胞株 U251MG および U87MG において、アデノウイルス初期遺伝子や AAV 蛋白質 Rep/Cap の腫瘍細胞内で強制発現させたところ、治療用 AAV ベクターのコピー数が Cap 発現ベクターの量に依存して増加することが認められた。

iv) 脳虚血の遺伝子治療法開発に向けた基礎検討では、ラット初代培養細胞を用いた実験により、2 型 AAV ベクターでは神経細胞で、5 型 AAV ベクターでは星状膠細胞でより効率的な遺伝子発現が見られることを確認した。スナネズミ海馬では、血清型およびプロモーターにより発現パターンが著しく異なることが判明した。CMV プロモーターを搭載した 5 型 AAV ベクターでは、海馬全体に高い発現がみられた。一方、RSV プロモーターを搭載した場合、2 型 AAV ベクターでは錐体細胞層に、5 型 AAV ベクターでは顆粒細胞層に強い発現が認められた。

v) 中枢性尿崩症ラットの治療実験では、AAV-AVP の注入後 2 週間から、自由飲水下における尿量が有意に減少し、尿浸透圧が有意に上昇した。高張食塩水負荷に対しては、血漿浸透圧の上昇が見られ、血中 AVP 濃度は著明に上昇した。免疫組織学的にも視索上核における AVP の発現が確認できた。ベクター投与による効果は、投与後 1 年間にわたって持続した。

D. 考察

MPTP パーキンソン病モデルサルを用いた従来の研究で、AADC 遺伝子に加えて L-DOPA 合成に必要なチロシン水酸化酵素および GTP cyclohydrolase I の遺伝子を AAV ベクターで被殻に導入すると、ドパミン生成が回復し運動機能が改善することを既に明らかにしてきた。しかし、臨床応用の第一段階では、AADC 遺伝子単独の導入と L-DOPA 経口投与の併用療法を計画している。この方法では、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-DOPA の内服量を調節することによりドパミン産生をコントロールし、ドパミン過剰による副作用を回

避できるといった利点がある。今回作成した実施計画では、これまでのサルでの結果を踏まえて、被殻の容積がヒトではサルの約 10 倍あることなどから AAV 投与量を設定した。今後、条件が整い次第、厚生労働省（厚生科学課）に実施計画申請書を提出して審査を受ける予定である。

MPTP モデルサルの遺伝子治療前臨床研究では、臨床プロトコールに沿った治療法で効果が確認できた。効果の持続が約 3~4 時間であったのは L-DOPA の血中有効濃度の持続時間に相当し、L-DOPA の服薬回数を増やすことで解決する問題であると考えている。不随意運動を含めた副作用や、AAV ゲノムの他臓器への拡散はなく、安全性を確認することができた。

パーキンソン病のための治療用遺伝子の探索では、そのための第一歩として、パーキンソン病患者脳内の遺伝子発現の検討を行った。ドパミン合成酵素の遺伝子発現が大きく低下していたのに対し、GTP シクロヒドロラーゼ I mRNA は、対照の 60% の低下にとどまった。このことは、ビオプテリン合成酵素の発現がパーキンソン病患者で代償的に増加している可能性を示唆している。今後の治療用遺伝子の候補を考えていく上で参考となる知見である。

AAV ベクターの血清型と組織特異性に関しては、主に導入効率の違いに基づくものと考えられるが、その分子基盤は殆ど明らかにされていない。最近になって、2 型・4 型・5 型でレセプター及びその後の感染経路が徐々に報告されてきており、導入効率の相違を説明するものとして期待される。また、各組織における至適プロモーターについては、組織特異的かつ強発現が可能であることが理想であるが、現実には両者の条件を同時に満たすことは難しい。例えば、骨格筋では CK プロモーターが代表的なものであるが、発現の強さという点では CMV などのウイルス由来のプロモーターの方が遙かに高く、従って現段階では後者を用いることになる。経門脈投与では CAG プロモーターにおいて最大の効果が得られたが、これはほぼ予想通りであった。本検討により骨格筋及び経門脈投与における最適な AAV ベクターの構築が明らかとなり、この成果は各組織を標的とした遺伝子治療全般にお

いて役立つものと期待される。

癌の遺伝子治療への応用では、AAV ベクターで可溶性 Flt-1 または IL-10 を発現させる基礎実験を行った。可溶性 Flt-1 は VEGF の作用と直接拮抗し、腫瘍血管の新生を阻害することで効果を発揮するものと考えられる。IL-10 の作用機序に関しては充分明らかではないが、やはり VEGF の作用を阻害していることが示唆された。このような腫瘍血管新生などを標的とするアプローチでは、AAV ベクターの特性を活かすことができ、新しい抗腫瘍療法として有望と思われる。また、腫瘍内自己複製型 AAV ベクターについては、さらに様々な腫瘍について動物モデルでの効果が確認されれば、安全性の高い癌遺伝子治療法の開発に繋げることができるものと期待される。

中枢性尿崩症に対する遺伝子治療実験では、Brattleboro ラットの視床下部に AAV ベクターでラット AVP 遺伝子を導入し、機能的な回復が確認された。今回得られた知見は、内分泌疾患に対する遺伝子治療法の開発にとって有用であると同時に、AVP の分泌メカニズムの研究にとっても有意義なものと思われる。また、脳虚血に対する遺伝子治療法の開発では、今年度の基礎データに基づき、神経栄養因子遺伝子を搭載した 5 型 AAV ベクターを構築し、虚血後再灌流障害に対する遺伝子治療実験を検討中である。

E. 結論

パーキンソン病に対する遺伝子治療法として、AAV-AAADC の線条体への導入と L-DOPA 経口投与の併用療法の臨床研究実施計画を作成し、学内の審査委員会に提出した。その治療プロトコールに沿った遺伝子治療前臨床研究をパーキンソン病モデルサルで実施し、治療効果と安全性を確認した。その他、AAV ベクターの血清型と組織特異性の関係など、遺伝子治療のための基盤研究を進めると共に、癌や中枢性尿崩症、脳虚血などに対する遺伝子治療の基礎実験を行った。

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) Lu, Y.-Y., Wang, L.J., Muramatsu, S., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Okada, T., Mizukami, H., Matsushita, T., Hanazono, Y., Kume, A., Nagatsu, T., Ozawa, K., and Nakano, I.: Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport. *Neurosci. Res.* 45: 33-40, 2003.
- 2) Yamaguchi, T., Okada, T., Takeuchi, K., Tonda, T., Ohtaki, M., Shinoda, S., Masuzawa, T., Ozawa, K., and Inaba, T.: Enhancement of thymidine kinase-mediated killing of malignant glioma by BimS, a BH3-only cell death activator. *Gene Ther.* 10: 375-385, 2003.
- 3) Kanazawa, T., Mizukami, H., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Nishino, A., Takeuchi, K., Kitamura, K., Ichimura, K., and Ozawa, K.: Suicide gene therapy using AAV-HSVtk/ganciclovir in combination with irradiation results in regression of human head and neck cancer xenografts in nude mice. *Gene Ther.* 10: 51-58, 2003.
- 4) Okada, T., Nomoto, T., Shimazaki, K., Lijun, W., Lu, Y., Matsushita, T., Mizukami, H., Urabe, M., Hanazono, Y., Kume, A., Muramatsu, S., Nakano, I., and Ozawa, K.: Adeno-associated virus vectors for gene transfer to the brain. *Methods* 28: 237-247, 2002.
- 5) Ozawa, K., Muramatsu, S., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., Shen, Y., Wang, L., Okada, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Ichinose, H., Nagatsu, T., Terao, K., and Nakano, I.: Gene therapy for Parkinson's disease using AAV vectors. In, *Advances in Behavioral Biology Vol. 51: Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's Disease.* (ed. by Mizuno, Y., Fisher, A., and Hanin, I.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp.459-462.
- 6) Kobayashi, N., Koshino, T., Uesugi, M., Yokoo, N., Xin, K.Q., Okuda, K., Mizukami, H., Ozawa, K., and Saito, T.: Gene marking in adeno-associated virus vector infected periosteum derived cells for cartilage repair. *J. Rheumatol.* 29: 2176-2180, 2002.
- 7) Muramatsu, S., Wang, L., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Nakano, I., and Ozawa, K.: Recombinant adeno-associated viral vectors

- bring gene therapy for Parkinson's disease closer to reality. *J. Neurol.* 249 Suppl. 2: I136-I140, 2002.
- 8) Tanaka, M., Borgeld, H.J., Zhang, J., Muramatsu, S., Gong, J.S., Yoneda, M., Maruyama, W., Naoi, M., Ibi, T., Sahashi, K., Shamoto, M., Fuku, N., Kurata, M., Yamada, Y., Nishizawa, K., Akao, Y., Ohishi, N., Miyabayashi, S., Umemoto, H., Muramatsu, T., Furukawa, K., Kikuchi, A., Nakano, I., Ozawa, K., and Yagi, K.: Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease *Sma*I into mitochondria. *J. Biomed. Sci.* 9: 534-541, 2002.
- 9) Xin, K.Q., Ooki, T., Mizukami, H., Hamajima, K., Okudela, K., Hashimoto, K., Kojima, Y., Jounai, N., Kumamoto, Y., Sasaki, S., Klinman, D., Ozawa, K., and Okuda, K.: Oral administration of recombinant adeno-associated virus elicits human immunodeficiency virus-specific immune responses. *Hum. Gene Ther.* 13: 1571-1581, 2002.
- 10) Wang, L., Lu, Y., Muramatsu, S., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Okada, T., Mizukami, H., Matsushita, T., Hanazono, Y., Kume, A., Nagatsu, T., Ozawa, K., and Nakano, I.: Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 22: 6920-6928, 2002.
- 11) 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.* 62: 2019-2023, 2002.
- 12) 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.
- 13) Suzuki, T., Yamakuni, T., Hagiwara, M., and Ichinose, H.: Identification of ATF-2 as a transcriptional regulator for the tyrosine hydroxylase gene. *J Biol Chem* 277: 40768-40774, 2002.
- 14) Ikemoto, K., Suzuki, T., Ichinose, H., Ohye, T., Nishimura, A., Nishi, K., Nagatsu, I., and Nagatsu, T.: Localization of sepiapterin reductase in the human brain. *Brain Res.* 954: 237-246, 2002.
- 15) Lee, M.A., Lee, H.S., Cho, K.G., Jin, B.K., Sohn, S., Lee, Y.S., Ichinose, H., Kim, S.U.: Overexpression of midbrain-specific transcription factor *Nurr1* modifies susceptibility of mouse neural stem cells to neurotoxins. *Neurosci Lett* 333: 74-78, 2002.
- 16) Ihara, M., Kohara, N., Urano, F., Ichinose, H., Takao, S., Nishida, T., Saiki, H., Kawamoto, Y., Ikeda, A., Takagi, S., and Shibasaki, H.: Neuroleptic malignant syndrome with prolonged catatonia in a dopa-responsive dystonia patient. *Neurology* 59: 1102-1104, 2002.
- 17) Ikeno, M., Inagaki, H., Nagata, K., Morita, M., Ichinose, H., and Okazaki, T.: Generation of human artificial chromosomes expressing naturally controlled guanosine triphosphate cyclohydrolase I gene. *Genes to Cells* 7: 1021-1032, 2002.
- 18) Suzuki, T., Inagaki, H., Yamakuni, T., Nagatsu, T., and Ichinose, H.: Enhanced expression of GTP cyclohydrolase I in V-1-overexpressing PC12D cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293: 962-968, 2002.
- 19) Kawasaki, H., Suemori, H., Mizuseki, K., Watanabe, K., Urano, F., Ichinose, H., Haruta, M., Takahashi, M., Yoshikawa, K., Nishikawa, S.-I., Nakatsuji, N., and Sasai, Y.: Generation of TH⁺ dopaminergic neurons and Pax6⁺ pigmented epithelia from primate ES cells by SDIA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1580-1585, 2002.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
- 1) U.S. Patent Application No. 10/327,620
International Patent Application No. PCT/US02/41010
"Adeno-Associated Virus-Mediated Delivery of GDNF to Skeletal Muscles"
Filed December 19, 2002
Applicants/Inventors: Lijun Wang, Shin-ichi Muramatsu, Imaharu Nakano, Hiroaki Mizukami, and Keiya Ozawa
- 2) U.S. Patent Application No. 10/230,875
"Composition and Methods for Treating Neurodegenerative Diseases"
Applicants/Inventors: Keiya Ozawa, Shin-ichi Muramatsu, Kunihiko Ikeguchi, and Imaharu Nakano

パーキンソン病に対する遺伝子治療臨床研究

分担研究者 中野 今治 自治医科大学 医学部 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臨床応用を目的として、L-DOPA からドパミンへの変換に必要な芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)の遺伝子を AAV ベクターにより線条体に導入する方法の臨床研究実施計画申請書を作成し、自治医大の施設内審査委員会に提出した。また、選択的神経毒 MPTP の慢性投与によるパーキンソン病モデルサルを使用して、臨床研究実施計画に沿った方法の有効性・安全性を確認した。

A. 研究目的

AAV ベクターを使用したドパミン合成系酵素の遺伝子導入によるパーキンソン病の遺伝子治療法の臨床応用を目的として、臨床研究実施計画の作成し、それに沿った前臨床試験をモデルサルを使用して行い効果と安全性を検証する。

B. 研究方法

1) パーキンソン病に対する遺伝子治療臨床実施計画の作成： L-DOPA の効果が減弱してきたパーキンソン病の重症例において、L-DOPA からドパミンへの変換に必要な芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)の遺伝子を搭載した AAV ベクター（AAV-AADC）を定位脳手術により被殻に注入し、L-DOPA 経口投与との併用によりドパミンを局所で産生させ、パーキンソン病の症状を改善させる遺伝子治療について、遺伝子治療臨床研究実施計画申請書を作成し、自治医大の施設内審査委員会に提出・審査を受ける。

2) 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：選択的神経毒 MPTP をカニクイサルに慢性投与しパーキンソン病モデルサルを作製する。このモデルを使用して臨床実施計画に沿った方法の有効性を検証する（筑波霊長類センターとの共同研究）。また、AAV ベクターの安全性評価のため、遺伝子導入を行ったサルの全身臓器・組織におけるベクターゲノムの検出を試みる。

（倫理面への配慮）

本研究は、非病原性 AAV ベクターを用いる研究で、周辺環境および研究従事者・研究対象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。筑波霊長類センターでのサルの実験は、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」を遵守して行う。

C. 研究結果

1) パーキンソン病に対する遺伝子治療臨床実施計画の作成：重症パーキンソン病患者 9 例を対象とした臨床研究の実施計

画を作成した，第 1 群： 4×10^{12} virus genome (vg)，第 2 群： 1.2×10^{13} vg，第 3 群：前二群の結果により増減，の AAV-AADC を片側の被殻に注入する．現在，自治医大の施設内審査委員会で審査中である．

2) サルのパーキンソン病モデルの作製と前臨床試験：MPTP の慢性投与により作製したパーキンソン病モデルサルを使用して，片側の被殻に AAV-AADC を注入する実験を行った．遺伝子導入前には，L-DOPA を大量 (20mg/kg) 投与しても運動障害は改善しなかったが，遺伝子導入の 2 週間後には，L-DOPA 常用量 (5mg/kg) の投与 1 時間後に対側の上肢の動きが改善し，この効果は 3~4 時間ほど持続した．不随意運動などの副作用は認められなかった．AAV ベクターによりドパミン合成系の酵素遺伝子導入を行ったサルの組織標本を使用して，PCR 法による AAV ゲノムの検出を試みた結果，脳以外の臓器への AAV の拡散は認められなかった．

D. 考察

昨年度までに，MPTP サルモデルにおいて，AAV ベクターにより AADC に加えて L-DOPA の合成に必要なチロシン水酸化酵素および GTP cyclohydrolase I の遺伝子を被殻に導入すると，ドパミン生成が回復し運動機能が改善することを明らかにしてきた．臨床応用に際しては，AADC のみを遺伝子導入し L-DOPA の経口投与を併用する．この方法では，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-DOPA の内服量を調節することによりドパミン産生をコントロールし，ドパミン過剰による副作用を回避できるといった利点がある．今回の実施計画では，これまでのサルでの結果を踏まえて，被殻の容積がヒトで

はサルの約 10 倍あることなどから AAV 投与量を設定した．現在，自治医大の委員会で審査中で，そこでの意見をもとに改訂を行っている．今後，了承が得られ次第厚生労働省（厚生科学課）に実施計画申請書を提出して審査を受ける予定である．

モデルサルの実験では，この実施計画に沿った AAV-AADC による遺伝子治療の効果が確認できた．効果の持続が約 3~4 時間であったのは L-DOPA の血中有効濃度の持続時間に相当し，L-DOPA の服薬回数を増やすことにより克服可能と考えられる．不随意運動を含めた副作用や，AAV ゲノムの他臓器への拡散はなく安全性が確認された．

E. 結論

AAV ベクターにより AADC の遺伝子を線条体に導入する遺伝子治療法の臨床研究実施計画を作成し施設内審査委員会に提出した．その計画に沿った実験をパーキンソン病のモデルサルで実施し効果と安全性を確認した．

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. Lu Y-Y, Wang L-J, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Muzukami H, Matushita T, Hanazono Y, Kume A, Nagatsu T, Ozawa K, Nakano I: Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport. *Neurosci. Res.* 45:33-40, 2003.

2. Wang L-J, Lu Y-Y, Muramatsu S, Ikeguchi K,

Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Nagatsu T, Ozawa K, Nakano I: Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 22: 6920-6928, 2002.

3. Muramatsu S., Wang L., Ikeguchi K., Fujimoto K., Nakano I., and Ozawa K.: Recombinant adeno-associated viral vectors bring gene therapy for Parkinson's disease closer to reality. *J. Neurol.* 249 [Suppl 2]: II/36-II/40, 2002.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1) U.S. Patent Application No. 10/327,620
International Patent Application No. PCT/US02/41010
“Adeno-Associated Virus-Mediated Delivery of GDNF to Skeletal Muscles”
Filed December 19, 2002

Applicants/Inventors: Lijun Wang, Shin-ichi Muramatsu, Imaharu Nakano, Hiroaki Mizukami, and Keiya Ozawa

2) U.S. Patent Application No. 10/230,875
“Composition and Methods for Treating Neurodegenerative Diseases”

Applicants/Inventors: Keiya Ozawa, Shin-ichi Muramatsu, Kunihiko Ikeguchi, and Imaharu Nakano

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進 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
(現：東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授)

研究要旨 パーキンソン病患者脳内においては、ドーパミンニューロン機能の低下を補うための代償機構が働いていることが予測される。生体内で働いている代償機構を知ることは、ドーパミンニューロン活性化の方法を探るうえで、重要な知見を与えてくれると考えられる。ドーパミン生合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素の補酵素であるテトラヒドロピオプテリン生合成酵素が、パーキンソン病患者および対照者剖検脳においてどのように変化しているかを、リアルタイム PCR 法により調べた。その結果、ドーパミン生合成酵素であるチロシン水酸化酵素および芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 mRNA は対照者に比べて、それぞれ 24%、13%という著明な減少を示したが、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 mRNA は、対照の 60%の低下にとどまった。このことは、ピオプテリン生合成酵素の発現がパーキンソン病患者で代償的に増加している可能性を示唆した。

A. 研究目的

パーキンソン病患者脳内においては、ドーパミンニューロン機能の低下を補うための代償機構が働いていることが予測される。我々はこれまでにドーパミン生合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素の活性調節に補酵素であるテトラヒドロピオプテリンが重要であることを、ピオプテリン生合成酵素のノックアウトマウスの解析から示した。

テトラヒドロピオプテリン (BH4) は、ドーパミン生合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素の補酵素である。多くの補酵素はビタミンとして食事から摂取されるが、人を含めて哺乳類は BH4 を生体内でグアノシン三リン酸 (GTP) から合成することができる。肝臓では、GTP シクロヒドロラーゼ I、ピルポイルテトラヒドロピオプテリン合成酵素、セピアプテリン還元酵素の 3 種類の酵素により de novo 合成が行われる。また、BH4 は水酸化反応の際に酸化されてキノイド型ジヒドロピオプテリンとなるが、この物質はジヒドロピオプテリジン還元酵素の作用により再び BH4 に還元される。このような代

謝経路がこれまでの研究から明らかになっているが、脳内での BH4 の代謝については未解明な部分も多い。

我々は、BH4 生合成律速酵素である GTP シクロヒドロラーゼ I 遺伝子の変異が、ドーパ反応性ジストニアという遺伝性疾患の原因であることを発見した。ドーパ反応性ジストニア患者では、脳内の GTP シクロヒドロラーゼ I 活性が低下することにより、ドーパミンニューロン内の BH4 が不足しドーパミンニューロン機能低下が起こる。その結果、小児期にはジストニア症状が現れるが、成人期以降にはパーキンソニズムの症状を発現するようになる。また、BH4 は非常に酸化されやすい化合物であり、細胞内において酸化的ストレスを軽減し、細胞を保護する作用があることが知られている。

本研究においては、ドーパミン生合成調節機能を持っていると考えられるテトラヒドロピオプテリンの生合成酵素が、パーキンソン病患者脳内においてどのように変化しているかを調べて、テトラヒドロピオプテリンがドーパミンニューロン機能低下の際にどのように変化している

か明らかにする。また、テトラヒドロピオプテリン生合成酵素の遺伝子導入によるパーキンソン病治療の可能性についても検討しようとするものである。

B. 研究方法

パーキンソン病患者剖検脳および神経疾患以外で死亡した対照者剖検脳は、ドイツ脳バンクを運営する Würzburg 大学の Riederer 教授より提供された。剖検脳の黒質および線条体の組織から totalRNA を抽出分離した。約 100 ng の totalRNA を用いてランダムプライマーと逆転写酵素により cDNA を作製した。cDNA の一部を用いて、主にタックマンプローブを用いたリアルタイム PCR 法によりそれぞれの酵素 mRNA 量を測定した。また、サンプル間の RNA 量を補正するために、GAPDHmRNA 量を内部標準物質として測定し、それぞれの mRNA 量を GAPDHmRNA 量で割った値によりサンプル間の比較を行った。

C. 研究結果および考察

パーキンソン病患者剖検脳黒質のチロシン水酸化酵素 mRNA 量は、対照者 mRNA 量の約 24% に有意に低下していた。また、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 mRNA 量もチロシン水酸化酵素と同様に対照の約 13% に低下していた。これらの酵素 mRNA の低下は、パーキンソン病におけるドーパミンニューロンの選択的変性を現しているものと考えられた。一方、これらのドーパミン生合成酵素と共にドーパミンニューロンに共存していると考えられる GTP シクロヒドロラーゼ I、ピルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素の mRNA は、GTP シクロヒドロラーゼ I が対照の約 60% とパーキンソン病患者で低下傾向を示したが、ピルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素は対照と比べて変化が見られなかった。これは、残存しているドーパミンニューロンにおいて不足しているドーパミンを補うために代償的に BH4 合成が亢進している可能性を示唆した。あるいは、神経細胞死に

伴い集積してきたミクログリアまたはドーパミンニューロン周辺のアストログリア細胞内で、BH4 合成が新たに行われるようになった可能性を考えることもできる。

ピオプテリンの再還元に働くジヒドロプテリジン還元酵素 mRNA も、パーキンソン病患者において対照と有意な変化を示さなかった。脳内のジヒドロプテリジン還元酵素の局在についてはまだ十分明らかではないので、本酵素がドーパミンニューロンに局在しているか、または、他のニューロンやグリア細胞にも普遍的に存在しているのか今後明らかにしていく必要がある。

本研究からパーキンソン病脳でピオプテリン代謝関連酵素 mRNA がドーパミン生合成酵素と異なる変化を示すことが初めて明らかになった。我々は、ドーパミン生合成酵素の変化がドーパミンニューロンの細胞死を反映していると考えたが、細胞死の前にドーパミン生合成酵素の発現が低下している可能性もある。これらの点についてさらに検討していくため、ドーパミントランスポーターやドーパミン受容体の mRNA、また、ドーパミンニューロンの生存維持に係わっていることが示唆されている核内受容体 Nurr1 などの定量も行い、それらのタンパク質の発現量を比較することにより、何がドーパミンニューロンの細胞死と共に減少し、何が減少あるいは増加しているのかについて、剖検脳さらにモデル動物脳を使うことにより明らかにしていきたい。また、今後ピオプテリン生合成酵素遺伝子の導入によるパーキンソン病治療の可能性についても、モデル動物を用いて検討していきたい。

E. 結論

我々は、初めてヒトピオプテリン生合成酵素 mRNA の変化をパーキンソン病患者剖検脳および対照者にて測定した。その結果、ドーパミン生合成酵素であるチロシン水酸化酵素および芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 mRNA は対照者に比べて、

それぞれ 24%, 13% という著明な減少を示したが、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 mRNA は、対照の 60% の低下にとどまった。このことは、ピオプテリン生合成酵素の発現がパーキンソン病患者で代償的に増加している可能性を示唆した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki T, Yamakuni T, Hagiwara M, Ichinose H (2002) Identification of ATF-2 as a transcriptional regulator for the tyrosine hydroxylase gene. *J Biol Chem*, 277: 40768-40774
- 2) Ikemoto K, Suzuki T, Ichinose H, Ohye T, Nishimura A, Nishi K, Nagatsu I, Nagatsu T: (2002) Localization of sepiapterin reductase in the human brain. *Brain Res*, 954: 237-246
- 3) Lee MA, Lee HS, Cho KG, Jin BK, Sohn S, Lee YS, Ichinose H, Kim SU (2002) Overexpression of midbrain-specific transcription factor Nurr1 modifies susceptibility of mouse neural stem cells to neurotoxins. *Neurosci Lett*, 333: 74-78
- 4) Ihara M, Kohara N, Urano F, Ichinose H, Takao S, Nishida T, Saiki H, Kawamoto Y, Ikeda A, Takagi S, Shibasaki H (2002) Neuroleptic malignant syndrome with prolonged catatonia in a dopa-responsive dystonia patient. *Neurology*, 59: 1102-1104
- 5) Ikeno M, Inagaki H, Nagata K, Morita M, Ichinose H, Okazaki T (2002) Generation of human artificial chromosomes expressing naturally controlled guanosine triphosphate cyclohydrolase I gene. *Genes to Cells*, 7: 1021-1032
- 6) Suzuki T, Inagaki H, Yamakuni T, Nagatsu T, Ichinose H (2002) Enhanced expression of GTP cyclohydrolase I in V-1-overexpressing PC12D cells. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 962-968

7) 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, Ozawa K (2002) 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

8) 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, Ozawa K (2002) 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

9) Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, Haruta M, Takahashi M, Yoshikawa K, Nishikawa S-i, Nakatsuji N, Sasai Y (2002) Generation of TH+ dopaminergic neurons and Pax6+ pigmented epithelia from primate ES cells by SDIA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 1580-1585

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Ozawa K, Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Shen Y, Wang L, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Ichinose H, Nagatsu T, Terao K, Nakano I.	Gene therapy for Parkinson's disease using AAV vectors.	Mizuno, et al	Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's disease.	Kluwer Academic Plenum Publishers	New York	2002	459-462

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
Lu, Y.-Y, Wang, L.J., Muramatsu, S., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Okada, T., Mizukami, H., Matsushita, T., Hanazono, Y., Kume, A., Nagatsu, T., <u>Ozawa, K.</u> , and <u>Nakano, I</u>	Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport.	Neurosci. Res.	45	33-40	2003
Yamaguchi, T., Okada, T., Takeuchi, K., Tonda, T., Ohtaki, M., Shinoda, S., Masuzawa, T., <u>Ozawa, K.</u> , and Inaba, T	Enhancement of thymidine kinase-mediated killing of malignant glioma by BimS, a BH3-only cell death activator.	Gene Ther.	10	375-385	2003
Kanazawa, T., Mizukami, H., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Nishino, A., Takeuchi, K., Kitamura, K., Ichimura, K., and <u>Ozawa, K</u>	Suicide gene therapy using AAV- <i>HSVtk/ganciclovir</i> in combination with irradiation results in regression of human head and neck cancer xenografts in nude mice.	Gene Ther.	10	51-58	2003
Okada, T., Nomoto, T., Shimazaki, K., Lijun, W., Lu, Y., Matsushita, T., Mizukami, H., Urabe, M., Hanazono, Y., Kume, A., Muramatsu, S., <u>Nakano, I.</u> , and <u>Ozawa, K</u>	Adeno-associated virus vectors for gene transfer to the brain	Methods	28	237-247	2002

Kobayashi, N., Koshino, T., Uesugi, M., Yokoo, N., Xin, K.Q., Okuda, K., Mizukami, H., <u>Ozawa, K.</u> , and Saito, T.:	Gene marking in adeno-associated virus vector infected periosteum derived cells for cartilage repair.	J. Rheumatol.	29	2176-2180	2002
Muramatsu, S., Wang, L., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., <u>Nakano, I.</u> , and <u>Ozawa, K.</u>	Recombinant adeno-associated viral vectors bring gene therapy for Parkinson's disease closer to reality.	J. Neurol.	249 Suppl. 2	1136-1140	2002
Xin, K.Q., Ooki, T., Mizukami, H., Hamajima, K., Okudela, K., Hashimoto, K., Kojima, Y., Jounai, N., Kumamoto, Y., Sasaki, S., Klinman, D., <u>Ozawa, K.</u> , and Okuda, K.:	Oral administration of recombinant adeno-associated virus elicits human immunodeficiency virus-specific immune responses	Hum. Gene Ther.	13	1571-1581	2002
Wang, L., Lu, Y., Muramatsu, S., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Okada, T., Mizukami, H., Matsushita, T., Hanazono, Y., Kume, A., Nagatsu, T., <u>Ozawa, K.</u> , and <u>Nakano, I.</u>	Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis.	J. Neurosci.	22	6920-6928	2002
Hasumi, Y., Mizukami, H., Urabe, M., Kohno, T., Takeuchi, K., Kume, A., Momoeda, M., Yoshikawa, H., Tsuruo, T., Shibuya, M., Taketani, Y., and <u>Ozawa, K.</u>	Soluble Flt-1 expression suppresses carcinomatous ascites in nude mice bearing ovarian cancer	Cancer Res.	62	2019-2023	2002
Shimpo, M., Ikeda, U., Maeda, Y., Takahashi, M., Miyashita, H., Mizukami, H., Urabe, M., Kume, A., Takizawa, T., Shibuya, M., <u>Ozawa, K.</u> , 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
Suzuki, T., Yamakuni, T., Hagiwara, M., and <u>Ichinose, H.</u>	Identification of ATF-2 as a transcriptional regulator for the tyrosine hydroxylase gene	J Biol Chem.	277	40768-40774	2002
Ikemoto, K., Suzuki, T., <u>Ichinose, H.</u> , Ohye, T., Nishimura, A., Nishi, K., Nagatsu, I., and Nagatsu, T.	Localization of sepiapterin reductase in the human brain.	Brain Res.	954	237-246	2002

Suzuki, T., Inagaki, H., Yamakuni, T., Nagatsu, T., and <u>Ichinose, H.</u> :	Enhanced expression of GTP cyclohydrolase I in V-1- overexpressing PC12D cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	293	962-968	2002
---	---	--------------------------------------	-----	---------	------

20020833

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.13-P.15の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。