

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 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成 16 (2004) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

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

1. パーキンソン病に対する遺伝子治療臨床研究 -----	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 -----	16
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	19
-----------------------	----

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）
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

主任研究者 小澤 敬也 自治医科大学医学部 教授

研究要旨 安全性の高いアデノ随伴ウイルス (AAV) 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した研究を行った。臨床応用に向けた研究では、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) 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考えている。この方法では L-DOPA の投与量を調節することによりドパミン産生量をコントロールでき、安全性が高い。平成 15 年度は、神経毒 MPTP 慢性投与を行ったモデルサルを用いた前臨床研究を継続して実施し、長期間に亘りその有効性と安全性を確認した。尚、新規治療用遺伝子の開発では、オーファン核内受容体の *Nurr1* について検討し、cAMP 依存性シグナル経路の重要性が示唆された。AAV ベクターを用いた遺伝子治療の基礎研究では、AAV の血清型 (1~5 型) と組織特異性に関して、筋肉・神経系・肝臓などへの遺伝子導入効率の検討を引き続き行った。その他の疾患については以下の研究を実施した。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で、可溶性 Flt-1 遺伝子と IL-10 遺伝子 (AAV ベクターの筋注法による) の有効性を確認した。ii) 腫瘍内自己複製型 AAV ベクターの開発を推進した。iii) 脳血管障害や動脈硬化症：脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHR-SP) を用いた実験では、IL-10 発現 AAV ベクターを筋注し、脳梗塞や高血圧症の予防効果を認めた。ApoE 欠損マウスを用いた実験では、動脈硬化病変の進行が AAV-IL-10 筋注群で有意に抑制された。iv) 尿崩症ラット：アルギニン-バソプレシン遺伝子を視床下部に導入する治療実験を引き続き行い、治療効果を解析した。v) 感音難聴に対する遺伝子治療法開発では、各種血清型 AAV を用いたマウス蝸牛への遺伝子導入実験で、各々に特徴的な遺伝子発現様式が観察され、応用研究では、GDNF の聴器毒性に対する予防効果がラットモデル実験で示された。

分担研究者

中野 今治
自治医科大学医学部
教授

一瀬 宏
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した。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した。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まで、幅広く研究を行った。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 年度には、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開始した。本年度は、臨床研究に向けた準備をさらに進めた。

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の検討を推進した。その他、AAV ベクターの特徴に合わせた癌遺伝子治療法の開発研究に加えて、脳血管障害、動脈硬化症、中枢性尿崩症、感音性難聴などについても疾患モデル動物を利用した遺伝子治療実験を実施し、そのフィージビリティと将来性について検討した。

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。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。平成 14 年度に遺伝子治療臨床研究実施計画申請書を自治医大の施設内審査委員会に提出しているが、その改訂を行うと共に、臨床用 AAV ベクターの供給を受ける予定である米国 Avigen 社との打ち合わせを行った。

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）：カニクイザルに MPTP を慢性投与し、パーキンソン病モデルサルを作製した。臨床プロトコルに沿った方法の有効性を検証するため、このサルに L-DOPA を服用させ、その後に AAV-AADC を被殻に注入した（筑波霊長類センターとの共同研究）。また、AAV ベクターの安全性を高めるため、導入遺伝子を Cre/loxP 法により取り外すテクノロジーの開発を進めた。即ち、エストロゲン受容体のリガンド結合部位を融合した Cre リコンビナーゼ (CreERT2) を利用して、誘導的に Cre リコンビナーゼを活性化させる AAV ベクターを開発した。これを用い、loxP を両端に連結した TH (チロシン水酸化酵素) 遺伝子を取り外す基礎実験を行った。

3) パーキンソン病のための治療用遺伝子の探索（東工大）：オーファン核内受容体 Nurr1 について、パーキンソン病治療用遺伝子として有効であるかどうか検討した。具体的には、ラット褐色細胞腫由来の PC12 細胞に、Nurr1、Nurr1 の転写活性化ドメインを除いたコンストラクト (Δ AB)、Nurr1 と同じ遺伝子ファミリーに属する NGFI-B、NOR-1 を発現するベクターをトランス

フェクションし、TH 遺伝子のプロモーター活性、GTP シクロヒドロラーゼ I (GCH: GTP cyclohydrolase I) 遺伝子のプロモーター活性の変化を調べた。また、Nurr1 および NGFI-B の結合認識配列 (NBRE) をタンデムに持つレポーターベクターを用い、内在 Nurr1 の活性を制御するメカニズムを検討した。即ち、細胞内情報伝達系に作用する種々の薬剤や遺伝子を発現させて、NBRE レポーター遺伝子の活性の変化を調べた。

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) LacZ 及びエリスロポエチン (以下 Epo) をコードする各血清型の AAV ベクターを準備し、マウス (C57BL/6) に対して骨格筋および門脈内への投与を行った。脳内投与としては海馬及び線条体への LacZ ベクターの注入を行った。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。免疫反応に関してはベクターキャプシドに対する抗体を検出する ELISA 法を確立し、ベクター投与前後の抗体価を比較検討した。また、副作用の検討としてはベクター注入を行った個体の観察に加えて、標的組織の標本作製し、組織障害・細胞浸潤などの有無につき検討した。

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は、VEGF 産生卵巣癌細胞株 (SHIN-3 細胞) をマウスに皮下接種することで担癌動物モデルを作製し、可溶性 Flt-1 又は IL-10 を発現する AAV ベクターを用いて骨格筋に遺伝子導入することで、治療効果を検討した。

iii) 自殺遺伝子の治療効果を増強させるため、腫瘍内自己複製型 AAV ベクターの開発を行った。具体的には、神経膠腫細胞株 U251MG などに、AAV ベクターゲノムの複製に必要なアデノウイルス初期遺伝子群等を、AAV ベクターやアデノウイルスを用いて導入した。また、腫瘍内での遺伝子発現効率を向上させてベクターの遺伝子発現

と複製効率を増強させるため、EGFP 発現 AAV ベクター感染時に、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (FK228 や CHAP31) を用い、発現増強効果を解析した。

iv) 動脈硬化性疾患のモデル小動物に対し、AAV ベクターを用いて抗炎症性サイトカインである Interleukin-10 (IL-10) 遺伝子を導入し、高血圧症・動脈硬化・高脂血症などの予防効果を検討した。細動脈硬化症のモデルとしては、脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHR-SP) を用いた。6 週齢 SHR-SP の前脛骨筋に IL-10 発現 1 型 AAV ベクターを筋注し、収縮期血圧、尿蛋白量、脳卒中発作などを観察した。粥状硬化症のモデルとしては、ApoE 欠損マウスを用いた。8 週齢 ApoE 欠損マウスの前脛骨筋に IL-10 発現 5 型 AAV ベクターを筋注し、上行大動脈起始部における動脈硬化病変や血清脂質の変化などを観察した。

v) 中枢性尿崩症モデルの Brattleboro ラットにおいて、アルギニン-バソプレシン遺伝子発現 AAV ベクター (AAV-AVP) を両側視床下部視索上核に注入し、長期的観察と解析を行った。

v) 感音難聴に対する遺伝子治療法の開発では、マウスおよびラット蝸牛における AAV ベクターを用いた遺伝子導入条件や、神経栄養因子遺伝子を用いた治療効果を検討した。まず、4 ないし 8 週齢マウスの蝸牛に、顕微鏡下で卵円窓を介し EGFP 発現 1-5 ないし 7-8 型 AAV ベクターを注入し、遺伝子発現様式を観察した。次に、GDNF 発現 1 型 AAV ベクターを用いてラット蝸牛有毛細胞への遺伝子導入を行い、7 日後からカナマイシン投与を開始して 12 日間継続した。その後、ABR (聴性脳幹反応) の測定によって他覚的聴力の検討を行い、聴器毒性に対する予防効果を検討した。

(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（自治医大神経内科、遺伝子治療研究部）：これまでのモデルサルの実験結果からベクターの投与量を当初の予定の 1/10 程度に減らせる可能性がある。また、米国 Avigen 社と今後のベクター供給の見通しに関して打ち合わせを行った。同社では現在、米国で NIH の RAC 審査ならびに FDA での審査を受けているが、さらに安全性に関するデータを求められているようである。

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 2 週間後には L-DOPA 常用量（5mg/kg）の投与 1 時間後に対側の上半肢の動きが改善し、この効果は 3-4 時間ほど持続した。ベクター投与による副作用は認めなかった。これまでに遺伝子導入した 3 頭ではいずれも同様の結果であった。また、昨年度遺伝子導入したサルは 1 年後にも効果が持続しており、副作用も認めていない。

導入遺伝子の制御法を開発するため、CreERT2 を搭載した AAV-CreERT2 を作製した。また、TH cDNA を 2 つの loxP 配列の中に組み込んだ AAV-floxed TH と、GCH を発現する AAV-GCH を作製した。パーキンソン病モデルラットの線条体に、AAV-floxed TH、AAV-AADC、AAV-GCH の組み合わせを、AAV-lacZ、AAV-Cre、AAV-CreERT2 のいずれかと共に注入した。AAV-CreERT2 を注入したラットの一部にはさらに 4 hydroxy-tamoxifen (4OHT) を投与した。その結果、AAV-Cre 群および AAV-CreERT2/4OHT(+) 群では、運動障害の改善の程度が AAV-LacZ 群や AAV-CreERT2/4OHT(-) 群と比べ悪く、線条体におけるドパミン濃度も

低かった。

3) パーキンソン病のための治療用遺伝子の探索：Nurr1 の強制発現により、TH 遺伝子の転写活性は約 2 倍、GCH 遺伝子の転写活性は約 1.5 倍にそれぞれ増加した。フォルスコリンの刺激でこれらの遺伝子のプロモーター活性が数十倍に増加することから、Nurr1 発現によるドパミン合成酵素の発現上昇効果はそれほど大きくないと考えられた。また、cAMP 依存性リン酸化酵素 (PKA) の発現により Nurr1 活性が大きく上昇した。

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) 経門脈投与での検討では、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 型が最も高い効果を示し、次に 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 型で著明な高発現を呈し、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ている。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った。骨格筋及び門脈内にベクター投与を行った個体では該当する血清型のキャプシドに対する抗体が生起していた。また、個体レベルにおける行動・組織所見などでは明らかな副作用は認められなかった。

ii) AAV ベクターを用いて可溶型 Flt-1 遺伝子あるいは IL-10 遺伝子を骨格筋に導入したマウスに、卵巣癌細胞を皮下接種した治療モデル実験を行った。いずれの場合においても腫瘍増殖が有意に抑制され、対照群を遙かに上回る IL-10 の血中濃度が観察された。

iii) 腫瘍内自己複製型 AAV ベクターの開発では、AAV 蛋白質発現遺伝子やアデノウイルス初期遺伝子群の腫瘍細胞への導入により、AAV ベクターが腫瘍細胞内で複製されることが示唆された。腫瘍内の治療遺伝子の増幅効果は 10 倍以上であった。しかし、アデノウイルス初期遺伝子群の供給に野生型アデノウイルスを用いた場合には、治療遺伝子のコピー数が 1000 倍以上に増幅され

ることから、さらに複製の効率を改善できると考えられた。また、FACSにて AAV ベクター感染細胞を解析し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の量に依存して EGFP 陽性率が増強することを確認した。

iv) 脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHR-SP) を用いた実験では、1 型 AAV ベクター筋注 3 週間より血清 IL-10 濃度が上昇し、20 週間以上にわたり 500pg/ml 前後の高い血中濃度が持続した。AAV ベクター筋注 3 週間後から、IL-10 治療群で降圧効果が認められ、蛋白尿も低値を維持した。これに対して対照群では、高血圧症の増悪、腎機能障害や脳卒中発作を全例に認めた。IL-10 治療群では脳卒中発作も殆どみられず、生存率の延長が認められた。次に、ApoE 欠損マウスを用いた実験では、上行大動脈起始部における動脈硬化病変の進行が IL-10 治療群で抑制された。MCP-1 の血中濃度や局所での発現量が低いことから、炎症機転に作用したと考えられた。一方、IL-10 治療群では血清総コレステロール値も抑制され、粥状硬化の進展抑制に関与したと考えられた。

v) 中枢性尿崩症ラットの治療実験では、AAV-AVP 投与による効果は、投与後 1 年間以上にわたって持続した。視索上核の組織抽出物を定量した結果、正常対照群には及ばないものの顕著な量の AVP の存在が確認できた。

vi) マウスの蝸牛への AAV ベクターを用いた遺伝子導入実験では、4 型以外の今回検討した全ての血清型にて内有毛細胞への遺伝子導入が認められた。1 型や 5 型 AAV ベクターでは内有毛細胞や神経節などを中心に比較的広範囲にわたる高い発現が得られたが、3 型 AAV ベクターでは内有毛細胞に限局した特徴的な発現が観察された。次に、感音難聴に対する遺伝子治療実験を行った。GDNF 発現 1 型 AAV ベクターを蝸牛へ注入したラットでは、カナマイシン投与後の有毛細胞の脱落が少なく、聴力障害の予防効果も認められた。

D. 考察

本研究は、パーキンソン病の線条体における

ドパミン欠乏を修復し運動障害を改善するため、AAV ベクターを使用して被殻に AADC 遺伝子を導入し、経口投与された L-DOPA をドパミンに効率良く変換する遺伝子治療法の開発を目標としている。今回のモデルサルの実験で 1 年以上の長期にわたって症状の改善を認めており、その間、特に副作用を認めていない。本法の利点は、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ことであるが、将来的には AADC に加えて L-DOPA を生合成するのに必要な TH および GCH の遺伝子も導入することにより、L-DOPA 内服の不必要な遺伝子治療法への発展が望まれる。その際に今回開発した AAV-CreERT2 を利用すれば、万一口ドパミン産生が過剰になっても 40HT により TH の発現のみを抑制し、AADC の発現を維持することが可能になる。この場合には L-DOPA の服用によりドパミン産生が継続し治療効果が得られることになる。

ラット褐色細胞腫由来の PC12 細胞を用いた実験で、Nurr1 の発現による TH の転写活性化は低かった。一方、cAMP-PKA 経路により Nurr1 活性が大きく上昇することが判明した。これらの結果は、ドパミンニューロンの分化やドパミン生合成酵素遺伝子の発現調節における cAMP 依存性シグナル系路の重要性、および、cAMP シグナルの変化による神経疾患治療の可能性を示唆している。

AAV ベクターの血清型と組織特異性に関しては、各血清型による違いは主に導入効率の違いに基づくものと考えられる。最近開発され、骨格筋・肝臓における良好な発現が報告されている 7 型・8 型に関しても、ベクター作製システムの供与を受け、検討を開始した。

癌の遺伝子治療への応用では、AAV ベクターで可溶型 Flt-1 または IL-10 を発現させる基礎実験を行った。本研究では、卵巣癌細胞株の移植の前に遺伝子導入を行っているが、これは癌病巣切除後に遺伝子治療を行う方式をイメージしたものである。癌の再発・転移を防ぐことを狙った治療法に発展することが期待される。腫瘍内自己複製型 AAV ベクターについては、アデ

ノウイルス初期遺伝子群により腫瘍内にて AAV ベクターの複製が認められた。また、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の遺伝子発現増強効果が証明された。

動脈硬化性疾患に対しては、IL-10 体内発現により、モデル動物における疾病予防効果が示された。

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、機能的な回復が長期間確認された。

感音難聴に対する遺伝子治療法開発では、まず各種血清型 AAV を用いた蝸牛への遺伝子導入実験で、各々に特徴的な遺伝子発現様式が観察され、応用研究では、GDNF の聴器毒性に対する予防効果が示唆された。アミノ配糖体による聴神経障害の予防法の開発が期待される。

E. 結論

AAV ベクターにより AADC 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に沿った実験をパーキンソン病モデルサルで実施し、その効果と安全性を確認した。さらに、安全性を高めるため、TH 遺伝子を取り除くシステムを開発した。

Nurr1 によるドパミン生合成酵素遺伝子発現への影響に関する検討では、Nurr1 の直接的関与はないと考えられた。

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、癌や脳血管障害、動脈硬化症、尿崩症、感音難聴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) Mochizuki, S., Mizukami, H., Kume, A., Muramatsu, S., Takeuchi, K., Matsushita, T.,

Okada, T., Kobayashi, E., Hoshika, A., and Ozawa, K.: Adeno-Associated Virus (AAV) vector-mediated liver- and muscle-directed transgene expression using various kinds of promoters and serotypes. *Gene Ther. Mol. Biol.* (in press)

- 2) Mochizuki, S., Mizukami, H., Ogura, T., Kure, S., Ichinohe, A., Kojima, K., Matsubara, Y., Kobayashi, E., Okada, T., Hoshika, A., Ozawa, K., and Kume, A.: Long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice. *Gene Ther.* (in press)

- 3) Takeda, S., Takahashi, M., Mizukami, H., Kobayashi, E., Takeuchi, K., Hakamata, Y., Kaneko, T., Yamamoto, H., Ito, C., Ozawa, K., Ishibashi, K., Matsuzaki, T., Takata, K., Asano, Y., and Kusano, E.: Successful Gene Transfer Using Adeno-Associated Virus Vectors into the Kidney: Comparison among Adeno-Associated Virus Serotype 1 to 5 Vectors In Vitro and In Vivo. *Nephron* (in press)

- 4) Mizukami, H., Okada, T., Ogasawara, Y., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., and Ozawa, K.: Separate control of Rep and Cap expression utilizing mutant and wild-type loxP sequences and improved packaging system for adeno-associated virus vector production. *Mol. Biotechnol.* (in press)

- 5) Okada, T., Caplen, N.J., Ramsey, W.J., Onodera, M., Shimazaki, K., Nomoto, T., Ajalli, R., Wildner, O., Morris, J., Kume, A., Hamada, H., Blaese, R.M., and Ozawa, K.: In situ generation of pseudotyped retroviral progeny by adenovirus-mediated transduction of tumor cells enhances the killing effect of HSV-tk suicide gene therapy in vitro and in vivo. *J. Gene Med.* (in press)

- 6) Iwata, N., Mizukami, H., Shirota, K., Takaki, Y., Muramatsu, S., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Ozawa, K. and Saido, T.C.: Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid- β peptide in

- mouse brain. *J. Neurosci.* 24: 991-998, 2004.
- 7) Ideno, J., Mizukami, H., Honda, K., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Saito, T., Ishibashi, S., and Ozawa, K.: Persistent phenotypic correction of central diabetes insipidus using adeno-associated virus vector-expressing arginine-vasopressin in brattleboro rats. *Mol. Ther.* 8: 895-902, 2003.
- 8) Nagata, M., Takahashi, M., Muramatsu, S., Ueda, Y., Hanazono, Y., Takeuchi, K., Okada, K., Suzuki, Y., Kondo, Y., Suemori, M., Ikeda, U., Nakano, I., Kobayashi, E., Hasegawa, M., Ozawa, K., Nakatsuji, N., and Shimada, K.: Efficient gene transfer of a simian immunodeficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells. *J. Gene Med.* 5: 921-928, 2003.
- 9) Saga, Y., Mizukami, H., Takei, Y., Ozawa, K., and Suzuki, M.: Suppression of cell migration in ovarian cancer cells mediated by PTEN overexpression. *Int. J. Oncol.* 23: 1109-1113, 2003.
- 10) Kohno, T., Mizukami, H., Suzuki, M., Saga, Y., Takei, Y., Shimpo, M., Matsushita, T., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Sato, I., and Ozawa, K.: Interleukin-10-mediated inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice bearing VEGF-producing ovarian cancer. *Cancer Res.* 63: 5091-5094, 2003.
- 11) Urabe, M., Kogure, K., Kume, A., Sato, Y., Tobita, K., and Ozawa, K.: Positive and negative effects of adeno-associated virus Rep on AAVS1-targeted integration. *J. Gen. Virol.* 84: 2127-2132, 2003.
- 12) Saga, Y., Suzuki, M., Mizukami, H., Kohno, T., Takei, Y., Fukushima, M., and Ozawa, K.: Overexpression of thymidylate synthase mediates desensitization for 5-fluorouracil of tumor cells. *Int. J. Cancer* 106: 324-326, 2003.
- 13) Kametaka, M., Kume, A., Okada, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., and Ozawa, K.: Reduction of CTL-2 cytotoxicity by induction of apoptosis with a Fas-estrogen receptor chimera. *Cancer Sci.* 94: 639-643, 2003.
- 14) Xin, K.Q., Ooki, T., Jounai, N., Mizukami, H., Hamajima, K., Kojima, Y., Ohba, K., Toda, Y., Hirai, S., Klinman, D.M., Ozawa, K., and Okuda, K.: A DNA vaccine containing inverted terminal repeats from adeno-associated virus increases immunity to HIV. *J. Gene. Med.* 5: 438-445, 2003.
- 15) Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K., Mizukami, H., Matsushita, T., Hanazono, Y., Kume, A., Katsura, K., Katayama, Y., and Ozawa, K.: Distinct patterns of gene transfer to gerbil hippocampus with recombinant adeno-associated virus type 2 and 5. *Neurosci. Lett.* 340: 153-157, 2003.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) Takahashi, K., Merchant, S.N., Miyazawa, T., Ymaguchi, T., McKenna, M.J., Kouda, H., Iino, Y., Someya, T., Tamagawa, Y., Takiyama, Y., Nakano, I., Saito, K., Boyer, P., and Kitamura, K.:

- Temporal bone histopathology and quantitative analysis of mitochondrial DNA in MELAS. *Laryngoscope* 113: 1362-1368, 2003.
- 20) Kato, S., Funakoshi, H., Nakamura, T., Kato, M., Nakano, I., Hirano, A., and Ohama, E.: Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in anterior horn cells of the spinal cord in the patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS and familial ALS with superoxide dismutase 1 gene mutation. *Acta Neuropathol.* 106: 112-120, 2003.
- 21) Ichinose, H., Ohye, T., Shinotoh, H., Arai, K., Yamazaki, S., Mizuta, E., Kuno, S., and Nagatsu, T.: Biopterin metabolism in patients with malignant syndrome. *Parkinsonism and Related Disorders* 9: S11-S14, 2003.
- 22) Shiraishi, H., Kato, T., Atsuta, K., Sumi-Ichinose, C., Ohtsuki, M., Itoh, M., Hishida, H., Tada, S., Udagawa, Y., Nagatsu, T., Hagino, Y., Ichinose, H., and Nomura, T.: cGMP inhibits GTP cyclohydrolase I activity and biosynthesis of tetrahydrobiopterin in human umbilical vein endothelial cells. *J. Pharmacol. Sci.* 93: 265-271, 2003.
- 23) Chen, J., Kuhlencordt, P., Urano, F., Ichinose, H., Astern, J., and Huang, P.L.: Effects of chronic treatment with L-arginine on atherosclerosis in apoE knockout and apoE/inducible NO synthase double-knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 97-103, 2003.
- 24) Kim, T.E., Lee, H.S., Lee, Y.B., Hong, S.H., Lee, Y.S., Ichinose, H., Kim, S.U., and Lee, M.A.: Sonic hedgehog and FGF8 collaborate to induce dopaminergic phenotypes in the Nurr1-overexpressing neural stem cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305: 1040-1048, 2003.
- 25) Muramatsu, S., Yoshimura, Y., Wang, L.J., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Okada, T., Mizukami, H., Nakano, I., and Ozawa, K.: Gene therapy for neurodegenerative diseases on rodent and primate models by single to triple transduction of rAAV vectors. In *Progress in Gene Therapy*, volume 2; Pioneering stem cell/gene therapy trials. Roger Bertolotti, Keiya Ozawa and H. Kirk Hammond (Ed.): Zeist, VSP, *in press*
- 26) Muramatsu, S., Wang, L., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Nakano, I., Okada, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Nakano, I., and Ozawa, K.: Adeno-associated viral vectors for Parkinson's disease. *Int. Rev. Neurobiol.* 55: 205-222, 2003.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
- 1) 発明の名称：遺伝子導入効率増強剤
出願番号：特願 2003-122968
出願日：2003年4月25日
発明者：岡田尚巳、小澤敬也
- 2) 発明の名称：Methods for treating and preventing vascular disease
出願番号：US-2003-10/690063
出願日：2003年10月20日
発明者：小澤敬也、野本達也、岡田尚巳、水上浩明
- 3) 発明の名称：Method of treating amino acid metabolic disorders using recombinant adeno-associated virus virions
出願番号：51271/10PCT
出願日：2003年
発明者：Keiya Ozawa, Mizukami Hiroaki, and Akihiro Kume
- 4) 発明の名称：Compositions and Methods for Treating Neurodegenerative Diseases
国際出願番号：PTC/JP02/08761
出願日：2004年
発明者：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研究事業）

分担 研究報告書

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研究を行った。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芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)遺伝子の線条体への導入と L-DOPA 服用を併用する方法の有効性と安全性を確認した。さらに、導入した遺伝子発現を抑制するための分子機構を開発した。

分担研究者

村松慎一	自治医科学神経内科	助手
池口邦彦	同	講師
藤本健一	同	助教授
李 小剛	同	客員研究員
土田順子	同	リサーチレジデント

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、昨年度施設内倫理委員会に提出した臨床研究実施計画を実験結果に基づき改訂する。昨年度に続き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改訂：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、昨年度に自治医大の施設内審査委員会に提出した遺伝子治療臨床研究実施計画を改訂する。

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。さらに、安全性を高めるために導入した遺伝子の発現を調整できる分子機構として、エストロゲン受容体のリガンド結合部位と融合した Cre リコンビナーゼ (CreER²)を利用して誘導的に Cre リコンビナーゼを発現させる AAV ベクターを開発する。

（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う。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。臨床研究では、厚生労働省の「遺伝子治療臨床研究に関する指針」を遵守し、学内の審査委員会ならびに厚生労働省の委員会で審査を受ける。実施にあたっては、対象患者に不利益が生ずることのないように配慮し、またインフォームドコンセントを取得する。

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改訂：昨年度、施設内倫理委員会に提出した実施計画では、重症パーキンソン病患者 9 例を対象として、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ものであった。これまでのモデルサルの実験結果からベクターの投与量を当初の予定の 1/10 程度に減らせる可能性がある。現在、遺伝子導入したサルの長期的な結果も加えて倫理委委員会で継続審査中である。

2) サルのパーキンソン病モデルの作製と前臨床試験：昨年度に続き、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。ベクター投与による副作用は認めなかった。これまでに遺伝子導入した 3 頭ではいずれも同様の結果であった。また、昨年度遺伝子導入したサルは、1 年後にも効果が持続しており副作用も認めていない。

導入した遺伝子発現を制御する分子機構を開発するため AAV ベクターに CreER^{T2} を搭載した AAV-CreER^{T2} を作製した。また、チロシン水酸化酵素 (TH) の cDNA を 2 つの loxP 配列の中に組み込んだ AAV-floxed TH と、GTP cyclohydrolase I (GCH) を

発現する AAV-GCH を作製した。選択的神経毒 6-OHDA によるラットのパーキンソン病モデルの線条体に AAV-floxed TH, AAV-AADC, AAV-GCH を、AAV-lacZ, AAV-Cre, AAV-CreER^{T2} のいずれかとともに注入し、AAV-CreER^{T2} を注入したラットの一部にはさらに 4 hydroxytamoxifen (4OHT) を投与した。その結果、AAV-Cre 群および AAV-CreER^{T2} の 4OHT(+) 群では、運動障害の改善の程度が AAV-LacZ 群や AAV-CreER^{T2} の 4OHT(-) 群と比べ悪く、線条体におけるドパミンの濃度も低かった。

D. 考察

本研究は、パーキンソン病の線条体におけるドパミンの欠乏を修復し運動障害の改善を得るために、AAV ベクターを使用して被殻に AADC 遺伝子を導入し、経口投与された L-DOPA をドパミンに変換する遺伝子治療法の臨床応用を目標としている。神経細胞に効率よく治療用遺伝子を導入し長期間発現させることができるウイルスベクターとしては、AAV ベクターと HIV などのレンチウイルスベクターがあるが、野生型のウイルスに病原性がなく、大部分が染色体への組み込みではなく episome に存在する AAV の方が安全性において優れていると考えられる。今回のモデルサルの実験でも、1 年以上の長期にわたって症状の改善を認めており、その間特に副作用を認めていない。特にパーキンソン病患者に対する胎児細胞移植で問題となっている L-DOPA の投与と無関係に生じる不随意運動が出現していないことは、免疫抑制剤が不要なことと合わせ、細胞移植よりも遺伝子治療の方が安全で簡便であることを示している。本方法の利点は、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ことであるが、将来的には AADC に加えて L-DOPA を生合成するのに必要な TH および GTP cyclohydrolase I の遺伝子も導入することにより、L-DOPA 内服の不必要な遺伝子治療法への発展が

望まれる。その際に今回開発した AAV-CreER^{T2} を利用すれば万が一ドパミン産生が過剰になっても 4OHT により TH の発現のみを抑制し AADC の発現を維持することが可能になる。この場合には L-dopa の服用によりドパミン産生が継続し治療効果が得られることになる。

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に沿った実験をパーキンソン病のモデルサルで実施し、その効果と安全性を確認した。さらに、安全性を高めるために導入した遺伝子の発現を調整できる分子機構として、CreER^{T2} を利用した AAV ベクターを開発した。

F. 研究発表

1. Muramatsu S, Yoshimura Y, Wang LJ, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Nakano I, and Ozawa K, Gene therapy for neurodegenerative diseases on rodent and primate models by single to triple transduction of rAAV vectors. In Progress in Gene Therapy, volume 2; Pioneering stem cell/gene therapy trials Roger Bertolotti, Keiya Ozawa and H. Kirk Hammond (Ed.): Zeist, VSP, *in press*
2. Muramatsu, S., et al., Adeno-associated viral vectors for Parkinson's disease. *Int Rev Neurobiol.* 55:205-222, 2003.
3. Lu YY, Wang LJ, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, et al.: 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.

厚生科学研究費補助金（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 東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授

研究要旨 ラット褐色細胞腫由来の細胞である PC12 細胞に Nurr1 を発現させて、ドーパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素遺伝子、あるいは、GTP シクロヒドロラーゼ I 遺伝子のプロモータ領域をもつレポーター遺伝子の転写活性の変化を調べた。その結果、Nurr1 の強制発現によりチロシン水酸化酵素遺伝子の転写活性は、約 2 倍、また、GTP シクロヒドロラーゼ I 遺伝子の転写活性は約 1.5 倍にそれぞれ増加した。フォルスコリンの刺激でこれらの遺伝子のプロモータ活性が数十倍に増加することから、Nurr1 発現によるドーパミン合成酵素の発現上昇効果はそれほど大きくないと考えられた。また、PC12 細胞を種々の薬剤や細胞内情報伝達に関わる遺伝子を発現させることによる内在性 Nurr1 活性の変化を調べたところ、cAMP-PKA 経路により Nurr1 活性が大きく上昇することが判明した。これらの結果は、ドーパミンニューロンの分化やドーパミン合成酵素遺伝子の発現調節における cAMP 依存性シグナル系路の重要性、および、cAMP シグナルの変化による神経疾患治療の可能性を示唆した。

A. 研究目的

パーキンソン病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。現在、ドーパミンの不足を補うためにドーパミンの前駆体である L-DOPA を投与するドーパミン補充療法が行われており、一定の治療効果を挙げている。しかし、ドーパミンの補充はあくまで対症療法であり、病気の進行そのものを抑えることはできない。また、長期間 L-DOPA を服用することにより、wearing off、on-off 現象などの副作用が高頻度で現れるようになる。パーキンソン病の根本的な治療を行うためには、パーキンソン病の発症機構を解明し、ドーパミンニューロンの細胞死を防ぐ、あるいは、ドーパミンニューロンを再活性化するような方法を講じる必要がある。

Nurr1 は、核内受容体ファミリーのタンパク質の一つであるが、他の核内受容体と異なり転写活性化作用に対するリガンド依存性は明らかになっていない。

Nurr1 は、胎児期にドーパミンニューロンを含む脳内の広い範囲に発現する。

Nurr1 ノックアウトマウスでは中脳ドーパミンニューロンが形成されないことが判明し、Nurr1 が中脳ドーパミンニューロンの発生に必須であることが示された。また、Nurr1 は胎児期以降、成獣になっても発現し続けるため、ドーパミンニューロンの生存維持にも関わっていると考えられている。

Nurr1 がどのようにドーパミンニューロンの発生に関わっているのか、まだ十分に明らかになっていないが、ドーパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素の発現を制御しているとの報告もなされている。

本研究では、Nurr1 がどのようにドーパミンニューロンの発生や生存維持に関わっているかを分子レベルで解明し、ドーパミンニューロン活性化遺伝子の候補となるか調べることを目的として、Nurr1 によるドーパミン合成酵素の発現調節機構について検討した。

B. 研究方法

ラット褐色細胞腫由来の PC12 細胞に、

Nurr1、Nurr1 の転写活性化ドメイン (AB 領域) を除いたコンストラクト (Δ AB)、Nurr1 と同じ遺伝子ファミリーに属する NGFI-B、NOR-1 を発現するベクターをトランスフェクションした。ドーパミン合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素のマウス遺伝子 5' 上流プロモータ領域 4.3kb をもつルシフェラーゼレポーターベクター、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biopterin 合成律速酵素である GTP シクロヒドロラーゼ I のヒト遺伝子上流 8.1kb にルシフェラーゼをつないだレポーターベクター、Nurr1 および NGFI-B の結合認識配列

(NBRE) を 8 個タンデムにもちルシフェラーゼが結合しているレポーターベクターを転写活性化を調べるために用いた。トランスフェクション効率を補正するために、ウミシイタク由来のルシフェラーゼを同時にトランスフェクションした。また、内在の Nurr1 の活性を制御するメカニズムを明らかにするため、細胞な情報伝達系に作用する種々の薬剤や、遺伝子を発現させて、NBRE レポーター遺伝子の活性の変化を調べた。

本研究はラット由来の培養細胞を用いた研究であり、特に倫理面の問題はない。

C. 研究結果

Nurr1 は、ドーパミンニューロンの発生に必須であることから、Nurr1 がチロシン水酸化酵素遺伝子の発現を直接制御している可能性がある。そこで、Nurr1 の発現ベクターとチロシン水酸化酵素プロモータ領域を含むレポーターベクターを一緒にトランスフェクションして、チロシン水酸化酵素遺伝子の転写活性が増大するかどうか調べた。

その結果、図 1 C に示すように NBRE を結合したルシフェラーゼベクターにおいては、Nurr1 のトランスフェクションにより約 30 倍という顕著な転写活性化が観察され、Nurr1 と同じファミリーに属する NGFI-B や NOR-1 においても Nurr1 ほどではないが 7-8 倍の転写活性化がみられた。それに対して、図 1 A のように

チロシン水酸化酵素 5' 上流 4.3kb をもつルシフェラーゼベクターにおいては約 2 倍の転写活性化がみられたのみであった。チロシン水酸化酵素レポーターベクターの転写活性化は、NGFI-B や NOR-1 の場合にも 1.2 倍から 1.5 倍程度の軽微なものであった。

一方、ドーパミン合成に必須なテトラヒドロbiopterin の合成酵素である GTP シクロヒドロラーゼ I 遺伝子のプロモータ領域をもつレポーターベクターを用いた場合にも、Nurr1 のトランスフェクションにより転写活性が約 1.5 倍増加しただけであった (図 1 B)。また、NGFI-B や NOR-1 のトランスフェクションによる転写活性化もそれほどみられなかった。以上の結果から、Nurr1 によるチロシン水酸化酵素遺伝子の転写活性化は軽微なものであり、Nurr1 が直接チロシン水酸化酵素遺伝子の発現を調節している可能性は低いように思われた。

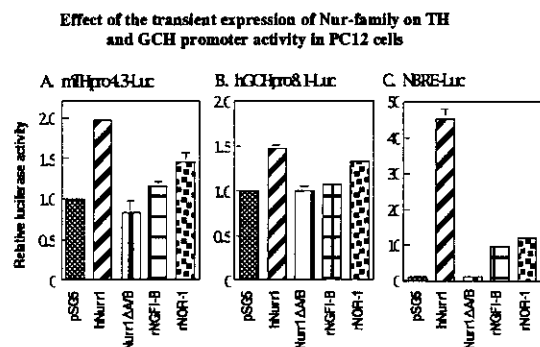


図 1. Nurr1 発現によるドーパミン合成酵素遺伝子転写活性化への影響

次に、PC12 細胞内で Nurr1 の活性がどのような刺激により誘導されるのかを、NBRE レポーターベクターを用いて調べた。神経成長因子 (NGF)、フォルスコリン、ジブチリル cAMP、デキサメサゾン、および、KCl (脱分極剤) を PC12 細胞に添加したのちに NBRE レポーターベクターのルシフェラーゼ活性を測定することにより、Nurr1 の活性化を定量した。その結果、図 2 A のようにフォルスコリンやジブチリル cAMP により顕著な活性化が起こることがわかった。

さらに細胞内情報伝達に関わる遺伝子を細胞内で発現させることによる Nurr1 活性への影響を検討したところ、MAP キナーゼや Ras, Raf の発現ではほとんど変化を示さなかったが、cAMP 依存性リン酸化酵素 (PKA) の発現により Nurr1 活性が大きく上昇した (図 2 B)。以上の結果は、Nurr1 活性が細胞内で cAMP および PKA を介する細胞内情報伝達系により制御されていることを示した。この結果は、ドーパミンニューロンに cAMP 系を活性化するようなシグナルあるいは薬剤を添加することにより、Nurr1 活性を増大させドーパミンニューロンを活性化することが可能であることを示唆した。

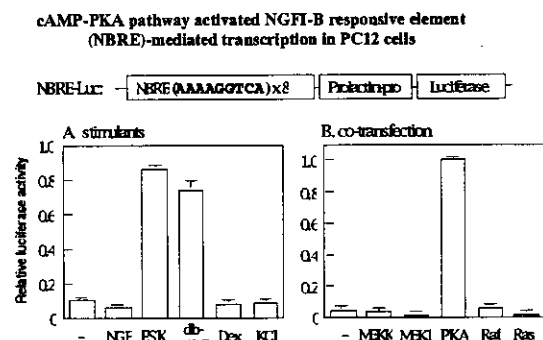


図 2. 細胞内シグナルによる Nurr1 活性の変化

D. 考察

ラットチロシン水酸化酵素遺伝子プロモータを用いて Nurr1 の転写活性化作用を調べて、チロシン水酸化酵素転写活性が 3-5 倍に増強されたとの論文が報告されている (Sakurada et al. (1999) Development, 126, 4017-4026)。彼らは、この論文でチロシン水酸化酵素遺伝子の転写開始点から上流 850 塩基の所に AAAGGTCA という典型的な Nurr1 結合配列 (NBRE) が存在し、この部分に Nurr1 が結合することにより転写活性化が行われると指摘している。今回我々は、ラットではなくマウスチロシン水酸化酵素遺伝子を用いて実験を行った。マウス遺伝子でラットの NBRE に相当する箇所の塩基配列を比較したところ、AAAGGTCA ではなく AAAGCCC という配列になっていた。その前後の配列は 90%以上の塩基配列が

マウスとラットで同一であり、ラットで存在する NBRE が重要な働きをしているのであれば、マウスでも保存されているべきであると考えられる。この配列がマウスで保存されていないことは、Nurr1 がチロシン水酸化酵素遺伝子プロモータに直接結合して作用している可能性が低いことを示唆している。今回の実験で Nurr1 の発現によるチロシン水酸化酵素の転写活性化は約 2 倍と低く、NBRE レポーターベクターによる数十倍の活性化とは大きな違いを示している。そのため、Nurr1 の発現がチロシン水酸化酵素以外の遺伝子に作用してその 2 次的な効果として、チロシン水酸化酵素遺伝子のレポーターベクターの活性が上昇したものと考えられる。

これまで、我々はチロシン水酸化酵素遺伝子の転写制御にサイクリック AMP レスポンスエレメント (CRE) が重要であること、CREB や ATF-2 がチロシン水酸化酵素の CRE 配列に結合して転写を調節していることを報告してきた (Suzuki et al. 2002, J Biol Chem, 277, 40768-40774)。Nurr1 の活性化においても cAMP-PKA 依存性シグナル伝達経路の重要性が、今回の実験から明らかになった。パーキンソン病患者においても、cAMP シグナルを変化させることにより残存ドーパミンニューロンを活性化することが可能となるものと考えられる。今後、薬剤や遺伝子導入による cAMP シグナルの変化を、神経疾患の治療に応用できる方策を検討していきたい。

E. 結論

Nurr1 の発現によるドーパミン生合成酵素遺伝子の発現増加は軽微であり、Nurr1 が直接これらの遺伝子の発現を制御しているのではないと考えられた。細胞内における Nurr1 の活性制御に cAMP-PKA 経路が重要な働きをしていることが明らかとなった。cAMP シグナルを人為的に変化させることにより、ドーパミンニューロンの活性化を行えることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ichinose H, Ohye T, Shinotoh H, Arai K, Yamazaki S, Mizuta E, Kuno S, and Nagatsu T (2003) Biopterin metabolism in patients with malignant syndrome. *Parkinsonism and Related Disorders*, 9: S11-S14.

2) Shiraishi H, Kato T, Atsuta K, Sumi-Ichinose C, Ohtsuki M, Itoh M, Hishida H, Tada S, Udagawa Y, Nagatsu T, Hagino Y, Ichinose H, and Nomura T (2003) cGMP inhibits GTP cyclohydrolase I activity and biosynthesis of tetrahydrobiopterin in human umbilical vein endothelial cells. *J Pharmacol Sci*, 93: 265-271.

3) Chen J, Kuhlencordt P, Urano F, Ichinose H, Astern J, and Huang PL (2003) Effects of chronic treatment with L-arginine on atherosclerosis in apoE knockout and apoE/inducible NO synthase double-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 97-103.

4) Kim TE, Lee HS, Lee YB, Hong SH, Lee YS, Ichinose H, Kim SU, and Lee MA (2003) Sonic hedgehog and FGF8 collaborate to induce dopaminergic phenotypes in the *Nurr1*-overexpressing neural stem cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 305: 1040-1048.

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., Wang, L., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Nakano, I., Okada, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., <u>Nakano, I.</u> , and <u>Ozawa, K.</u>	Adeno-associated viral vectors for Parkinson's disease	Int. Rev. Neurobiol.	55	205-222	2003
Iwata, N., Mizukami, H., Shirohani, K., Takaki, Y., Muramatsu, S., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., <u>Ozawa, K.</u> , and Saido, T.C.	Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid- β peptide in mouse brain.	J. Neurosci.	24	991-998	2004
Ideno, J., Mizukami, H., Honda, K., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Saito, T., Ishibashi, S., and <u>Ozawa, K.</u>	Persistent phenotypic correction of central diabetes insipidus using adeno-associated virus vector-expressing arginine-vasopressin in brattleboro rats	Mol. Ther.	8	895-902	2003
Nagata, M., Takahashi, M., Muramatsu, S., Ueda, Y., Hanazono, Y., Takeuchi, K., Okada, K., Suzuki, Y., Kondo, Y., Suemori, M., Ikeda, U., <u>Nakano, I.</u> , Kobayashi, E., Hasegawa, M., <u>Ozawa, K.</u> , Nakatsuji, N., and Shimada, K.	Efficient gene transfer of a simian immunodeficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells	J. Gene Med.	5	921-928	2003
Saga, Y., Mizukami, H., Takei, Y., <u>Ozawa, K.</u> , and Suzuki, M.	Suppression of cell migration in ovarian cancer cells mediated by PTEN overexpression	Int. J. Oncol.	23	1109-1113	2003
Kohno, T., Mizukami, H., Suzuki, M., Saga, Y., Takei, Y., Shimpo, M., Matsushita, T., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Sato, I., and <u>Ozawa, K.</u>	Interleukin-10-mediated inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice bearing VEGF-producing ovarian cancer	Cancer Res.	63	5091-5094	2003
Urabe, M., Kogure, K., Kume, A., Sato, Y., Tobita, K., and <u>Ozawa, K.</u>	Positive and negative effects of adeno-associated virus Rep on AAVS1-targeted integration	J. Gen. Virol.	84	2127-2132	2003

Saga, Y., Suzuki, M., Mizukami, H., Kohno, T., Takei, Y., Fukushima, M., and Ozawa, K.	Overexpression of thymidylate synthase mediates desensitization for 5-fluorouracil of tumor cells	Int. J. Cancer	106	324-326	2003
Kametaka, M., Kume, A., Okada, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., and Ozawa, K.	Reduction of CTLL-2 cytotoxicity by induction of apoptosis with a Fas-estrogen receptor chimera	Cancer Sci.	94	639-643	2003
Xin, K.Q., Ooki, T., Jounai, N., Mizukami, H., Hamajima, K., Kojima, Y., Ohba, K., Toda, Y., Hirai, S., Klinman, D.M., Ozawa, K., and Okuda, K.	A DNA vaccine containing inverted terminal repeats from adeno-associated virus increases immunity to HIV	J. Gene. Med.	5	438-445	2003
Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K., Mizukami, H., Matsushita, T., Hanazono, Y., Kume, A., Katsura, K., Katayama, Y., and Ozawa, K.	Distinct patterns of gene transfer to gerbil hippocampus with recombinant adeno-associated virus type 2 and 5	Neurosci. Lett.	340	153-157	2003
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
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
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
Takahashi, K., Merchant, S.N., Miyazawa, T., Ymaguchi, T., McKenna, M.J., Kouda, H., Iino, Y., Someya, T., Tamagawa, Y., Takiyama, Y., Nakano, I., Saito, K., Boyer, P., and Kitamura, K.	Temporal bone histopathology and quantitative analysis of mitochondrial DNA in MELAS	Laryngoscope	113	1362-1368	2003

Kato, S., Funakoshi, H., Nakamura, T., Kato, M., Nakano, I., Hirano, A., and Ohama, E.	Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in anterior horn cells of the spinal cord in the patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS and familial ALS with superoxide dismutase 1 gene mutation	Acta Neuropathol.	106	112-120	2003
Ichinose, H., Ohye, T., Shinotoh, H., Arai, K., Yamazaki, S., Mizuta, E., Kuno, S., and Nagatsu, T.	Biopterin metabolism in patients with malignant syndrome	Parkinsonism and Related Disorders	9	S11-S14	2003
Kim, T.E., Lee, H.S., Lee, Y.B., Hong, S.H., Lee, Y.S., Ichinose, H., Kim, S.U., and Lee, M.A.	Sonic hedgehog and FGF8 collaborate to induce dopaminergic phenotypes in the Nurr1-overexpressing neural stem cell	Biochem. Biophys. Res. Commun.	305	1040-1048	2003