

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 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成 17 (2005) 年 4 月

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 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成 17 (2005) 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 ----- 15

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 18

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計画している。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。臨床用 AAV ベクターを供給する Avigen 社と打ち合わせ会議を開催し、自治医科大学で実施する臨床プロトコルを完成させ、それに沿って改訂した遺伝子治療臨床研究実施計画書の審査を施設内倫理審査委員会で受けた。神経毒 MPTP 慢性投与を行ったパーキンソン病モデルサルを用いた前臨床研究に関しては、PET 検査で有効性を確認した。また、AAV ベクターに対する抗体を調べると共に、遺伝子治療前後で全身の臓器・組織でベクターゲノムの検出を試み、AAV ベクターの安全性を確認した。基礎研究では、安全性を確保するための導入遺伝子除去システムの開発、AAV-GCH のマウス線条体への投与実験などを行った。AAV の血清型と組織特異性に関しては、最近の 7、8 型についても検討した。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引き続き行った。ii) 腫瘍内自己複製型 AAV ベクターの開発でヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の効果を確認した。iii) 動脈硬化や高血圧・心不全などを来す疾患モデル動物で IL-10 発現 AAV ベクターを筋注し、予防効果を確認した。iv) 感音性難聴に関して、ラット内耳に神経栄養因子発現 AAV ベクターを注入すると予防効果が観察された。v) 新生仔マウスへの AAV ベクター投与方法を検討し、腹腔内ルートの有用性を明らかにした。vi) AAV ベクターを用いた脂肪組織への遺伝子導入法を確立した。

分担研究者

中野 今治
自治医科大学医学部
教授

一瀬 宏
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、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を第一に推進した。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 相臨床研究の準備まで、幅広く研究を行った。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、臨床の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、遺伝子治療臨床研究実施計画申請書を施設内審査委員会に提出し、審査を受けている。平成 16 年度は、米国 Avigen 社 (GMP グレードの臨床用 AAV ベクターを供給するベンチャー企業) との打ち合わせ会議を行うと共に、臨床プロトコルの方法に沿った形の前臨床研究を、神経毒 MPTP 慢性投与を行ったモデルサルで実施するなど、臨床研究に向けた準備を引き続き進めた。AAV ベクターの安全性評価に関しては、AAV ベクターに対する抗体を調べると共に遺伝子治療を行ったサルの全身臓器・組織でベクターゲノムの検出を試みた。

基礎研究では、AAV の血清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。最近報告された 7、8 型についても既にベクター作製システムの供与を受けており、これまで検討してきた 1-5 型と合わせて遺伝子導入効率、安全性などの検討を行った。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、心血管病変、動脈硬化症、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行い、そのフィジビリティと将来性について検討した。

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改訂 (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。自治医科大学の施設内審査委員会に既に提出している遺伝子治療臨床研究実施計画申請書に関して、米国 Avigen 社で作成した臨床プロトコルを参考にしながら、自治医科大学で実施する場合を想定し、細部の改訂をさらに進めた。

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、L-DOPA の有効性が減弱した重症のモデルを使用し、AAV-AADC を被殻に注入した (筑波霊長類セターとの共同研究)。導入した AADC 遺伝子の発現状況を PET (positron emission tomography) 計測により評価した。また、AAV ベクター被殻注入前後のパーキンソン病モデルサルにおける AAV に対する血清抗体価を ELISA 法で測定し、遺伝子治療前後の変動を調べた。さらに、観察期間終了後にモデルサルの各臓器・組織から DNA を抽出し、ベクターに特異的な塩基配列の有無を PCR 法により検討した。その他、安全性をより高めるため、引き続き Cre-loxP システムなどを応用し、導入遺伝子の発現調節法の開発を行った。

3) パーキンソン病のための治療用遺伝子の探索 (東工大): パーキンソン病発症におけるテトラヒドロピオプテリン生合成量の低下について検討した。テトラヒドロピオプテリン生合成酵素の GCH (GTP シクロヒドロラーゼ I) を発現する AAV ベクター (AAV-GCH) を作製し、その遺伝子導入によるパーキンソン病治療の可能性を動物実験で検討した。即ち、AAV-GCH を微量注入法により片側のマウス線条体内に投与し、マウス線条体におけるピオプテリン量やチロシン水酸化酵素活性などの変化を高速液体クロマトグラフィ法により定量した。

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 (自治医大遺伝子治療研究部): i) 7 種類の血清型の AAV ベクターに関して、筋肉注射以外に、脳内投与・門脈内投与などの遺伝子導入効率を検討すると共に、免疫反応・副作用についても検討を加えた。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、より実際に近いモデル系 [VEGF 産生卵巣癌細胞株 (SHIN-3 細胞) を皮下接種して作製した担癌マウス] で、可溶型 Flt-1 遺伝子、IL-10 遺伝子発現 AAV ベクターの治療効果を引き

続き検討した。iii) 腫瘍内自己複製型AAVベクターの開発および発現増強法の検討を進めた。iv) 細動脈硬化症ラットや高脂血症マウスにIL-10発現AAVベクターを筋注し、動脈硬化性疾患や高血圧症性疾患の予防効果を検討した。v) 感音性難聴に対する遺伝子治療実験として、マウスおよびラットの内耳有毛細胞への遺伝子導入条件や神経栄養因子などを応用した治療効果を検討した。vi) 胎児及び新生マウスの腹腔・骨格筋等にAAVベクターを注入し、導入遺伝子の発現効率並びに組織分布を検討した。vii) 骨格筋、肝臓に代わる標的として脂肪細胞に対する遺伝子導入法を開発すると共に、その際の遺伝子導入効率につき確認した。

(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改訂 (自治医大神経内科、遺伝子治療研究部): 臨床用 AAV ベクターを提供する予定となっている Avigen 社は、パーキンソン病に対する遺伝子治療法 (Phase 1/2 clinical trial using AV201) に関して準備を進め、2004年に米国 FDA から IND (investigational new drug) としての承認を受け、同年12月16日に第一例目の遺伝子治療を米国 UCSF で実施した。自治医科大学も Avigen 社と具体的な交渉を進め、2004年10月と12月には、同社の担当者が自治医科大学を訪問し、米国で予定していた臨床試験の概要説明、ならびに自治医科大学の関係施設の視察などを行った。その上で、自治医科大学と Avigen 社との間で、パーキンソン病遺伝子治療のための臨床用 AAV ベクターの提供に関する契約の細部を詰め、本学での遺伝子治療第 I/II 相臨床研究実施に向けた作業を進めた。具体的な遺伝子治療プロトコルに関しては、米国 UCSF と全く同じものにする必要はないこと、自治医科大学では UCSF のプロトコルでの第二用量に相当する AAV ベクター量からスタートすることが確認された。

遺伝子治療臨床研究実施計画書については、その後の知見や米国の状況に基づいた改訂を行うと共に、しばらく中断されていた自治医科大学遺伝子治療臨床研究倫理委員会 (IRB: Institutional Review Board) での審査が再開され、そこでの指示事項に沿って内容をさらに改訂した。平成16年3月中には IRB の承認が得られる見通しである。

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 (自治医大神経内科、遺伝子治療研究部): MPTP モデルサル (4頭) の実験では、遺伝子治療前には L-DOPA の大量 (20 mg/kg) を投与しても運動障害の改善が見られなかったのに対し、AAV-AADC 注入 2 週間後には、L-DOPA 5 mg/kg を投与すると 1 時間後には AAV-AADC 注入側と対側の上肢の動きが改善し、この効果は約 3 時間持続した。遺伝子導入側の被殻で、PET 計測により [¹¹C]L-DOPA の取り込みの増加が認められ、AADC の発現が *in vivo* で確認できた。12 週間後の PET 計測でも同様の発現が認められた。

免疫反応に関しては、検討したサル 2 頭のいずれにおいても、注入前に AAV ベクター (2 型) に対する抗体が低力価ながら検出された。このうち 1 頭では注入後一過性に軽微な抗体価の上昇が認められたが、残りの 1 頭では抗体価の変動は認められなかった。サルの体内臓器・組織におけるベクター分布に関しては、遺伝子導入を行った脳組織においてのみ導入遺伝子が検出され、他臓器には検出されなかった。

導入遺伝子の制御法に関しては、タモキシフェン (エストロゲン受容体のリガンドの一種) 投与により誘導的に Cre recombinase が活性化されるシステム (CreERT2 搭載 AAV ベクターをスイッチとして利用) を利用し、ラットのモデル動物において、ドパミンの過剰産生を抑制できることが確認された。

3) パーキンソン病のための治療用遺伝子の探索 (東工大): マウスの片側線条体に AAV-GCH または、コントロールとして PBS を微量投与した。線条体のピオプテリン量は投与後 7 日の時点においても非投与側と比べて、約 1.5 倍に増加していた。この結果は、AAV-GCH 投与により線条体内のピオプテリン量が期待通り持続的に増加したことを示した。

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 (自治医大遺伝子治療研究部): i) AAV ベクターの *in vivo* 投与方法について、血清型による発現効率を個体レベルで比較検

討した。骨格筋を標的とした場合には、7型由来のキャプシドを用いることで1型を用いた場合と同程度の高い発現が認められた。また、8型由来のベクターでは肝臓における高い発現が認められた。尚、既に報告されているように、肝臓における発現には性差があり、雌において低い傾向が見られた。ii) AAV ベクターを用いて可溶性 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モデル実験を引き続き行った結果、腫瘍増殖が有意に抑制される効果が確認された。

iii) 腫瘍内自己複製型 AAV ベクターの開発では、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さらに増強させるため、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の効果を検討した。その結果、遺伝子発現増強効果を腫瘍細胞の *in vitro* 培養系で認め、さらに担癌動物モデルにおいても、生体イメージング装置を用いた非侵襲的評価法にて同様の効果を確認した。iv) 細動脈硬化症のモデルである食塩感受性ダールラットを用いて IL-10 の体内発現を行い、降圧効果・心肥大の改善・生存期間の延長を認めた。また、粥状硬化症モデルである ApoE 欠損マウスでは、HMG-CoA 還元酵素の産生制御によるコレステロール低下作用が示唆された。v) 難聴に対する遺伝子治療実験では、AAV ベクターによる内耳への遺伝子導入実験を行った。GDNF 発現 1 型 AAV ベクターを蝸牛に注入したラットで、カナマイシン投与後の有毛細胞の脱落が予防され、注入側および対側の蝸牛において聴力障害予防効果が得られた。vi) 新生仔マウスに対する遺伝子導入法に関しては、腹腔内に 1 型由来のベクターを注入するのが効果的であった。腹膜及び腹腔付近の骨格筋において強い発現が認められた。また、新生仔マウスに 8 型由来のベクターを静脈内投与することで、肝臓における導入遺伝子の発現が認められた。成体を用いた場合とは異なり、雌においても雄と同等の発現レベルが得られた。vii) 脂肪細胞に対する遺伝子導入法に関しては、ヒト凝固第 IX 因子を搭載する 8 型由来のベクターを用いたところ、1 型由来のベクターを用いた場合を大きく凌駕する血中濃度（健康人の 10% レベル）が得られた。しかしながら、脂肪組織の摘除などによる検討の結果、遺伝子導入を行った脂肪組織よりも肝臓において強い発現が認められることが判明した。イメージングを用いても同様の結果が得られた。更には、骨格筋を標的として 8 型のベクターを注入した場合にも肝臓における発現

が主体であることが明らかとなった。

D. 考察

パーキンソン病は、黒質緻密部から線条体に投射するドーパミン神経細胞が選択的に脱落する変性疾患で、振戦、筋強剛、動作緩慢などの運動障害を呈する。初期にはドーパミンの前駆物質である L-DOPA の服用が有効であるが、やがてその効果は減弱してしまう。その理由として L-DOPA をドーパミンに変換する AADC の活性が線条体で低下することが考えられる。そこで、この AADC の遺伝子を AAV ベクターにより線条体の細胞に導入する遺伝子治療法が考えられる。この方法では L-DOPA の投与量を調節することにより、ドーパミン産生量をコントロールできるため安全性が高く、臨床応用の第一段階として適切であると考えられる。本研究では、ヒトと同様な運動症状を示す、選択的神経毒 MPTP の慢性投与によるサルモデルにおいて、この方法の有効性と安全性を確認した。ほぼ同様の方法による遺伝子治療臨床研究が米国の UCSF で 2004 年 12 月に開始されており、世界的にも成果が期待されている。自治医科大学でも IRB で遺伝子治療臨床研究実施計画の承認が得られる見込みであることから、続いて厚生労働省（厚生科学課）に実施計画書を提出して審査を受ける予定である。承認が得られ次第、臨床研究を開始する。

尚、サルを用いた実験では、頭蓋内注入に伴う抗体価の変化は殆ど認められなかった。また、脳以外の組織においてベクターが検出されなかったことで、この方法の安全性が確認できた。本実験で用いたベクター用量は導入遺伝子産物の全身的な供給を目指した場合に比べると 1/100 前後であり、しかも脳内に限局した投与であることから、免疫反応及び他臓器への遺伝子導入が起こるリスクは低いものと考えられる。

次に、マウス線条体内に直接 AAV-GCH を投与した実験では、期待通りに脳内で持続的にピオプテリン量を高めることができた。今後は、ピオプテリン増加マウスにパーキンソン病発症神経毒である MPTP を投与し、ピオプテリンが増加していることが MPTP 毒性に対して保護的に働くかどうかを解析する計画である。

AAV ベクターの基礎研究では、新規血清型に関しては依然として開発が続いており、最近 10 型及び 11 型についても発表がなされた。しかしながら、これらの血清型の組織特異性に関しては不明な点が多く、今後更に比較検討を行い、有用性

を明らかにしていく必要がある。

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でその効果を確認し、癌の再発・転移を防ぐことを狙った治療法の実用化に向けた研究が期待される。腫瘍内自己複製型 AAV ベクターについては、開発を引き続き推進した。特に、担癌動物モデルにおいても、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得られることを確認した。

循環器疾患に対しては、抗炎症性サイトカインである IL-10 を AAV ベクター筋注法で動脈硬化疾患動物モデルに発現させ、その多面的作用を確認した。生活習慣病に対する新しい治療法の開発に繋がることを期待される。

感音性難聴に関しては、ラット内耳での AAV ベクターを用いた神経栄養因子の発現による聴力障害予防効果が得られた。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。

新生児及び胎児に対する遺伝子治療法は、先天性疾患などにおいて、発症後の治療では不可逆的かつ重篤な後遺障害が生じてしまう場合など、早期治療が望まれる場合を想定したもので、将来的には有力な治療手段となりうることから開発が期待されている。腹腔内注入はマウス新生仔モデルの大きさであっても技術的に困難が少なく、また、実施に当たって最も大量のベクターが注入可能である等の点で有利である。1型を用いた場合に最大の効果が得られたが、発現臓器は主に腹腔周辺の骨格筋であった。腹腔内注入したベクターが近傍の筋肉に移行する機序は不明であるが、1型ベクターは骨格筋に特異性が高いことが知られており、何らかの関連が示唆される。また、肝臓に対する遺伝子導入では、新生仔を対象とする雌においても効率が良いことが有利な点である。成体における肝臓への遺伝子導入に際しては男性ホルモンに関連した未だ不明の分子が必要であることが報告されており、雌に対する遺伝子導入効率は低い。今回我々は新生仔に遺伝子導入することでこの問題が回避可能であることを示すことができた。

脂肪組織を標的とする方法では1型を用いた場合には組織特異的な発現が得られるものの、十分な効果が得られなかったため、他の血清型による検討を行った。その結果、8型を用いた場合に治療域に達する凝固第IX因子の血中濃度が得られた。しかしながらその後の解析により、標的とした脂肪組織よりも肝臓における発現がより強いことが判明した。この事実に基づき、骨格筋に

ベクターを注入した場合の発現組織に関する検討を行ったところ、やはり同様に肝臓が主体であることが判明した。これまで8型由来のベクターは骨格筋に注入した場合にも高い効果が期待できるとされていたが、その効果は主に肝臓に由来するものであると考えられる。これは8型由来のベクターの肝臓に対する組織特異性が極めて高いことに起因する現象と考えられ、特定の臓器組織に対して極端に親和性が高いベクターを使用する場合には発現臓器に関して注意が必要と考えられた。

長寿高齢化の進む国際社会にとって、予防対策・新規治療法の確立を目指す本治療研究は重要かつ必要性の高いものであり、学術的・社会的意義は極めて大きい。今後さらに各種疾患の動物モデルを用いた前臨床的研究に力を入れ、生活習慣病などの慢性疾患に対する新規治療法の本格的実用化に繋がる基盤技術開発を推進していきたい。

E. 結論

- ・重症パーキンソン病患者を対象とした AAV-AADC による遺伝子治療の臨床プロトコルを完成させ、改訂版について IRB 審査を受けた。
- ・パーキンソン病モデルサルを用いた前臨床研究では、この臨床プロトコルの有効性と安全性を、それぞれ PET 検査、免疫反応ならびにベクターの体内での拡がりに関する検査で確認することができた。
- ・次の段階の治療ストラテジーを念頭に置き、安全性を確保するための導入遺伝子除去システムの開発をモデルラットの実験系で行った。
- ・AAV-GCH の線条体への投与により、脳内で持続的にピオプテリン量が増加したマウスの作製に成功した。パーキンソン病の病態解析と治療法開発に有用と考えられる。
- ・AAV ベクターに関する基盤研究を、AAV の血清型と組織特異性に焦点を当てて、さらに進めた。
- ・癌や心血管疾患などの生活習慣病に対し、AAV ベクターを用いた遺伝子治療法の開発を目指し、各種モデル動物を用いた実験を行い、治療ストラテジーの有効性を検証した。
- ・感音性難聴に対する治療法を開発した。
- ・新生仔マウスへの AAV ベクター投与法を検討し、腹腔内ルートの有用性を明らかにした。
- ・AAV ベクターを用いた脂肪組織への遺伝子導入法を確立した。

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., Yoshimura, M., Wang, L., 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.* (ed. by, Bertolotti, R., Ozawa, K., and Kirk Hammond H.), VSP, pp.275-298, 2004.
- 2) Yoshioka, T., Okada, T., Maeda, Y., Ikeda, U., Shimpo, M., Nomoto, T., Takeuchi, K., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takahashi, M., Matsushita, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Ookawara, S., Kawano, M., Ishibashi, S., Shimada, K., and Ozawa, K.: Adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Gene Ther.* 11: 1772-1779, 2004.
- 3) 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.* 8: 9-18, 2004.
- 4) Yokoo, N., Saito, T., Uesugi, M., Kobayashi, N., Xin, K.Q., Okuda, K., Mizukami, H., Ozawa, K., and Koshino, T.: Repair of articular cartilage defect by autologous transplantation of basic fibroblast growth factor gene-transduced chondrocytes with adeno-associated virus vector. *Arthritis Rheum.* 52: 164-170, 2005.
- 5) Kanazawa, T., Mizukami, H., Nishino, H., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Kitamura, K., Ichimura, K., and Ozawa, K.: Topoisomerase inhibitors enhance the cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on head and neck cancer cells. *Int. J. Oncol.* 25: 729-735, 2004.
- 6) Toyo-Oka, T., Kawada, T., Nakata, J., Xie, H., Urabe, M., Masui, F., Ebisawa, T., Tezuka, A.,

Iwasawa, K., Nakajima, T., Uehara, Y., Kumagai, H., Kostin, S., Schaper, J., Nakazawa, M., and Ozawa, K.: Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: a scheme for the progression of cardiac dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 7381-7385, 2004.

7) 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.* 27: 7-14, 2004.

8) Matsushita, T., Okada, T., Inaba, T., Mizukami, H., Ozawa, K., and Colosi, P.: The adenovirus E1A and E1B19K genes provide a helper function for transfection-based adeno-associated virus vector production. *J. Gen. Virol.* 85: 2209-2214, 2004.

9) 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.* 11: 1081-1086, 2004.

10) 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 Exp. Nephrol.* 96: 119-126, 2004.

11) 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.* 6: 288-289, 2004.

12) Iwata, N., Mizukami, H., Shirotani, 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.
- 13) Suzuki T, Kurahashi H, and Ichinose H: Ras/MEK pathway is required for NGF-induced expression of tyrosine hydroxylase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315: 389-396, 2004.
- 14) Suzuki T, Kurita H, and Ichinose H: GTP cyclohydrolase I utilizes metal-free GTP as its substrate. *Eur J Biochem* 271: 349-355, 2004.
- 15) Kikuchi A, Takeda A, Fujihara K, Kimpara T, Shiga Y, Tanji H, Nagai M, Ichinose H, Urano F, Okamura N, Arai H, and Itoyama Y: Arg(184)His mutant GTP cyclohydrolase I, causing recessive hyperphenylalaninemia, is responsible for dopa-responsive dystonia with parkinsonism: a case report. *Mov Disord* 19: 590-593, 2004.
2. 学会発表
- 1) Okada, T., Nomoto, T., Liu, Y., Okada, M., Takahashi, M., Shimazaki, K., Matsushita, T., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in cancer cells in vitro and in vivo. The 7th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Minneapolis, MN, USA, June 5, 2004. (*Mol Ther* 9: S288, 2004)
- 2) Okada, T., Nomoto, T., Yoshioka, T., Ogura, T., Matsushita, T., Mizukami, H., Kume, A., Nielsen, V., Ozawa, K.: Large-scale production of AAV and adenovirus vectors using active gassing with large culture vessel. The 7th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Minneapolis, MN, USA, June 4, 2004. (*Mol Ther* 9: S161, 2004)
- 3) Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K., Yoshioka, T., Sarukawa, M., Takeuchi, K., Mizukami, H., Matsushita, T., Katsura, K., Yamamoto, K., Kume, A., Ikeda, U., Ookawara, S., Katayama, Y., Ozawa, K.: Protection of End-Organ Damage in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats by Intramuscular Injection of AAV Vector Expressing Interleukin-10. The 7th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Minneapolis, MN, USA, June 4, 2004. (*Mol Ther* 9: S149, 2004)
- 4) Liu, Y., Okada, T., Nomoto, T., Shimazaki, K., Sheykholeslami, K., Muramatsu, S., Ajalli, R., Takeuchi, K., Mizukami, H., Kume, A., Xiao, S., Ichimura, K., Ozawa, K.: Specific and Efficient Transduction of the Cochlear Inner Hair Cells with Recombinant Adeno-Associated Virus Type 3 Vector. The 7th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Minneapolis, MN, USA, June 6, 2004. (*Mol Ther* 9: S407, 2004)
- 5) Ogura T, Mizukami H, Mimuro J, Okada T, Hamada H, Kume A, Yoshikawa H, Sakata Y, Ozawa K.: Characterization of delivery routes of AAV vectors for neonatal gene transfer. The 7th annual meeting of American Society of Gene Therapy, Minneapolis, MN, USA, June 4, 2004. (*Mol. Therapy* 9: S130, 2004)
- 6) Ito, T., Okada, T., Sarukawa, M., Yoshioka, T., Maeda, Y., Miyashita, H., Nomoto, T., Matsushita, T., Mizukami, H., Kume, A., Yamamoto, K., Ozawa, K., Shimada, K.: Adeno-associated virus vector-mediated systemic expression of interleukin-10 ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. The 77th Annual Scientific Session of American Heart Association, New Orleans, November 7-10, 2004. (*Circulation* 2004, 110 suppl III, p11)
- 7) Ito, T., Okada, T., Sarukawa, M., Yoshioka, T., Maeda, Y., Miyashita, H., Nomoto, T., Matsushita, T., Mizukami, H., Kume, A., Yamamoto, K., Ozawa, K., Shimada, K.: Adeno-associated virus vector-mediated systemic expression of interleukin-10 ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Cytokines and Inflammation*, San Francisco, January 27-28, 2005.
- 8) Muramatsu S, Nakayama T, Nara Y, Suzuki Y, Nagata M, Ono F, Kondo Y, Terao K, Tsukada H, Inoue N, and Nakano I: Restoration of dopamine function in a primate model of Parkinson's disease after transplantation of primate ES cell-derived neural stem cells, Keystone symposium, Keystone, Jan 26, 2004.
- 9) Muramatsu S, Li Xg, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Nakano I, Ozawa K: A fail-safe system for

gene therapy of Parkinson's disease; Application of removable expression cassette to prevent overproduction of dopamine in a rat model. The American society of gene therapy's 7th annual meeting. Minneapolis, June 4, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 発明の名称：

血中コレステロール濃度低下作用物質

出願番号：特願 2004-209126

出願日：2003 年 7 月 15 日

発明者：池田宇一、高橋将文、吉岡徹、
小澤敬也、岡田尚巳、島田和幸、
前田喜一、新保昌久

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

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に対する遺伝子治療の臨床応用の実現に向けて、線条体への芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)の遺伝子導入とL-dopa経口投与の併用による遺伝子治療臨床研究実施計画を完成させた。施設内の倫理委員会で最終的な審議が行われた結果、平成17年3月中に承認を得る見込みである。選択的神経毒MPTPを投与して作製したパーキンソン病のモデルサルを使用して臨床プロトコルに沿った遺伝子導入実験を行い、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遺伝子発現の調整機構を組み入れたベクターシステムを開発した。

研究協力者

村松慎一	自治医科学神経内科	講師
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

AAV-AADCを被殻に注入する（筑波霊長類セターとの共同研究）。導入したAADC遺伝子の発現状況をpositron emission tomography (PET)計測（浜松ホトニクスで実施）により評価する。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行う。さらに、安全性をより高めるため、導入遺伝子の発現を調節する技術の開発を行う。

A. 研究目的

安全性の高いアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを使用して、進行期のパーキンソン病に対する遺伝子治療法を開発する。第Ⅶ相臨床研究の実施を目指す。霊長類のサルを使用して臨床研究のプロトコルに沿った前臨床研究を行う。

B. 研究方法

1) パーキンソン病の遺伝子治療の臨床プロトコルを完成させる。線条体における芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）の活性低下のためにL-dopaの効果が減弱してきた進行期の患者を対象とした、AAV-AADCの被殻注入とL-dopa経口投与の併用による遺伝子治療法のプロトコルを作製する。
2) 臨床プロトコルに沿った方法の有効性と安全性を検証するため、選択的神経毒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、

C. 研究結果

1) 遺伝子治療臨床研究実施計画「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」を作成し、自治医大の施設内倫理委員会に提出した。そこでの意見をもとに改訂を行った。平成16年3月中に施設内倫理委員会の承認が得られる見込みである。

2) MPTPモデルサル（4頭）の実験では、遺伝子治療前にはL-dopaの大量（20 mg / kg）を投与しても運動障害の改善が見られなかったのに対し、AAV-AADC注入2週間後には、L-dopa 5 mg/kgを投与すると1時間後にはAAV-AADC注入側と対側の上肢の動きが改善し、この効果は約3時間持続した。遺伝子導入側の被殻で、PET計測により^[11C]L-dopaの取り込みの増加が認められ、AADCの発現が*in vivo*で確認できた。12週間後のPET計測でも同様の

発現が認められた。

3) エストロゲン受容体のリガンドであるタモキシフェンと結合して、誘導的に Cre recombinase 活性をを発現する CreERT2 を AAV ベクターに組み込んだシステムを開発し、ラットのモデル動物において、ドパミンの過剰産生を抑制できることを明らかにした。

D. 考察

パーキンソン病は、黒質緻密部から線条体に投射するドパミン神経細胞が選択的に脱落する変性疾患で、振戦、筋強剛、動作緩慢などの運動障害を呈する。初期にはドパミンの前駆物質である L-dopa の服用が有効であるが、やがてその効果は減弱してしまう。その理由として L-dopa をドパミンに変換する AADC の活性が線条体で低下することが考えられる。そこで、この AADC の遺伝子を AAV ベクターにより線条体の細胞に導入する遺伝子治療が考えられる。この方法では L-dopa の投与量を調節することにより、ドパミンの産生量をコントロールできるため安全性が高く、臨床応用の第一段階として適切であると考えられる。本研究では、ヒトと同様な運動症状を示す、選択的神経毒 MPTP の慢性投与によるサルモデルにおいて、この方法の有効性と安全性を確認した。平成 16 年 12 月には、ほぼ同様の方法による遺伝子治療が米国の UCSF で開始されており、世界的にも成果が期待されている。近日中に施設内倫理委員会により遺伝子治療臨床研究実施計画の承認が得られる見込みであることから、続いて厚生労働省（厚生科学課）に臨床研究実施計画申請書を提出して審査を受ける。承認が得られ次第、臨床研究を実施する。

E. 結論

重症パーキンソン病患者を対象とした AAV-AADC による遺伝子治療の臨床プロトコルを完成させた。3 月中に施設内の倫理委員会より臨床研究実施計画の承認が得られる見込みである。モデルサルを使用した前臨床実験により、臨床プロトコルの有効性と安全性を確認した。さらに、安全性を高

めるための遺伝子発現の調整機構の開発を行った。

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. 奈良優子, 村松慎一, 中野今治: ES 細胞による治療. 特集 パーキンソン病 日本臨床, 62(9): 1643-1647, 2004.
2. 村松慎一: 遺伝子治療. 特集 パーキンソン病 日本臨床, 62(9): 1648-1652, 2004.

2. 学会発表

1. Muramatsu S, Nakayama T, Nara Y, Suzuki Y, Nagata M, Ono F, Kondo Y, Terao K, Tsukada H, Inoue N, and Nakano I: Restoration of dopamine function in a primate model of Parkinson's disease after transplantation of primate ES cell-derived neural stem cells, Keystone symposium, Keystone, Jan 26, 2004.
2. Muramatsu S and Nakano I: Cell transplantation and gene therapy; preclinical studies in animal models of Parkinson disease. Nagoya Symposium "Neural transplantation and repair of disturbed brain function", Nagoya, Feb 21, 2004.
3. Nakano Imaharu: Gene therapy for neurodegenerative diseases— preclinical studies on animal models involving adeno-associated virus (AAV) vectors. The 21st Century Centre of Excellence (COE) Program First International Symposium on Molecular Medicine for Neurological Disorders, Neural Development and Differentiation. Nagoya, March 25-26, 2004.
4. 村松慎一, 中山孝, 鈴木豊, 奈良優子, 永田三保子, 近藤靖, 寺尾恵治, 塚田秀夫, 井上順雄, 中野今治: パーキンソン病モデルサルへの ES 細胞由来神経幹細胞の移植. 第 3 回日本再生医療学会, 幕張, 2004 年 3 月 24 日.
5. Muramatsu S, Li Xg, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Nakano I,

Ozawa K: A fail-safe system for gene therapy of Parkinson's disease; Application of removable expression cassette to prevent overproduction of dopamine in a rat model. The American society of gene therapy's 7th annual meeting. Minneapolis, June 4, 2004.

6. 村松慎一, 李小剛, 古寺美加, 池口邦彦, 岡田尚巳, 浦野扶美, 一瀬宏, Daniel Metzger, Pierre Chambon, 小澤敬也, 中野今治: 誘導的に Cre リコンビナーゼを活性化する AAV ベクターを応用したより安全なパーキンソン病の遺伝子治療の開発. 第25回日本炎症・再生医学会, 東京, 2004年7月13日.

7. Li Xg, Muramatsu S, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Nakano I, and Ozawa K: Inducible Reduction of Transgene Expression as a Fail-Safe System for Gene Therapy of Neurodegenerative Diseases, The 10th annual meeting of the Japan Society of Gene therapy, Tokyo, August 5, 2004.

8. Muramatsu S, Kakiuchi T, Ono F, Kodera M, Nara Y, Takino N, Nishiyama S, Harada N, Fukuyama D, Tsuchida J, Ikeguchi K, Fujimoto K, Terao K, Tsukada H, Nakano I, and Ozawa K: *In Vivo* Monitoring of Transgene Expression in a Primate Model of Parkinson's Disease; Potential Application of Positron Emission Tomography in Gene Therapy, The 10th annual meeting of the Japan Society of Gene therapy, Tokyo, August 5, 2004.

9. Muramatsu S, Nakayama T, Kakiuchi T, Nishiyama S, Harada N, Suzuki Y, Konishi N, Okuno T, Ono F, Nagata M, Nara Y, Takino N, Kodera M, Terao K, Kondo Y, Nito S, Inoue N, Tsukada H, and Nakano I: Transplantation of Neural Stem Cells Derived from Primate ES Cells in a Primate Model of Parkinson's Disease. JMS 21st Century COE Program Nikko International Symposium, Nikko, September 25, 2004.

H. 知的財産権

該当なし

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 テトラヒドロピオプテリン (BH4) は、ドーパミン合成に必要な化合物であり、細胞内 BH4 濃度の変化によりドーパミン生成量が調節されていることを我々は明らかにしてきた。BH4 は還元性が高い化合物であり、パーキンソン病患者におけるドーパミンニューロン細胞死の原因の一つといわれている酸化ストレスを減弱させることが期待できる上に、ドーパミン合成の補酵素としてドーパミン合成量を増加させる作用を持つ。そのため、脳内で BH4 を持続的に増加させることはパーキンソン病患者にとって有効な遺伝子治療法の一つとなる可能性がある。本研究では、マウス脳内線条体に BH4 生合成律速酵素である GTP シクロヒドロラーゼ I を、AAV ベクターを用いて導入することによる脳内ドーパミン量やピオプテリン量の経時的变化について検討した。その結果、AAV を用いることにより脳内ピオプテリンを持続的に増加させることができることが判明した。今後このマウスを用いて、パーキンソン病発症神経毒に対する感受性がどのように変化するかについて解析していく。

A. 研究目的

これまでに我々は、テトラヒドロピオプテリン (BH4) 生合成酵素ノックアウトマウスの解析から、BH4 が欠乏すると線条体においてドーパミン生合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) のタンパク質量が減少することを発見した。TH タンパク質量の変化は、ドーパミンニューロンにおいてドーパミン生合成能力が低下することを意味しており、ドーパミンニューロンによる情報伝達に重大な影響を及ぼす。神経終末の存在する線条体において、BH4 量が増加することが TH やドーパミン代謝にどのような影響を及ぼすかを明らかにするために、BH4 生合成律速酵素である GTP シクロヒドロラーゼ I (GCH) 遺伝子を線条体で発現させて BH4 量を持続的に変化させることを試みた。GCH 遺伝子の導入には、神経細胞に感染可能なアデノ随伴ウイルス (AAV) をベクターとして用いた。AAV を用いることにより、

線条体ニューロン内で持続的な GCH の発現と、それによる BH4 量の持続的な増加が期待できる。これまで、BH4 は末梢から投与しても血液脳関門を通過しにくいことから、脳内の濃度を増加させることは困難だった。また、脳内に直接 BH4 を投与した場合でも BH4 が不安定な化合物であるため、BH4 投与の効果は 1 時間以内に消滅してしまうと考えられる。そのため、持続的に脳内 BH4 量を増加させる試みは AAV-GCH を用いることにより初めて可能となったものである。

B. 研究方法

アデノ随伴ウイルスにピオプテリン生合成律速酵素である GTP シクロヒドロラーゼ I を組み込んだ AAV-GCH は、自治医科大学の小澤敬也教授・村松慎一博士らにより作製された。AAV-GCH を微量注入法により片側のマウス線条体内に投与した。投与後、1 日後、7 日後にマウスを犠牲

にして、線条体におけるチロシン水酸化酵素活性やドーパミン量の変化を高速液体クロマトグラフィにより定量した。

(倫理面への配慮)

マウス脳内に AAV を投与する際には、麻酔下で行った。また、殺す場合にもマウスに苦痛をできるだけ与えない方法で行った。

C. 研究結果

3匹のマウスの片側線条体に AAV-GCH または、コントロールとして PBS を微量投与した。線条体のビオプテリン量は投与後7日の時点においても非投与側と比べて、約 1.5 倍に増加していた。この結果は、AAV-GCH 投与により線条体内のビオプテリン量が期待通り持続的に増加したことを示した。AAV-GCH 投与マウスにおいて、線条体内のドーパミン量とチロシン水酸化酵素活性を測定した。投与 24 時間後において線条体ドーパミン量は、AAV-GCH 投与マウスにおいて、PBS 投与マウスに比べて約 1.3 倍に増加していた。しかし、7日後においては AAV-GCH 投与マウスのドーパミン量が PBS 投与群に比べて約 2 割減少していた。この変化は、TH 活性においても同様であった。投与 1 日後においては AAV-GCH 投与マウスにおいて PBS 投与マウスより高い TH 活性を示したが、7日後になると PBS 投与群の約 8 割の値にまで低下していた。両者ともに PBS 投与群の約 8 割に低下していた。

D. 考察

線条体内に直接 AAV-GCH を投与したことにより、期待通りに脳内で持続的にビオプテリン量を高めることができた。増加量は 1.5 倍程度でそれほど大きくはなかったが、今後線条体内に複数箇所投与することや、投与する際の量や時間を工夫することで、AAV の感染効率を上げて、ビオプテリンの合成量をさらに増やすことは可能であると思われる。

1 日後においてドーパミン量や TH 活性が増加したことから、ドーパミンニューロンではない線条体のニューロンで合成

された BH4 もドーパミンニューロンに取り込まれて、ドーパミンニューロン終末におけるドーパミン合成の増加に寄与したと考えられる。しかし、7日後においてドーパミン量や TH 活性は逆に低下した。この理由については、さらに検討しなければならないが、一つの可能性として、持続的に線条体内でドーパミン量が増加した結果、フィードバック制御機構が働いてドーパミンニューロンの活動を抑制する機構が働いたとも考えられる。今後、ドーパミンニューロン終末にどのような変化が起きて TH 活性が減少することになったのか分子メカニズムを検討していく。

さらに、ビオプテリン増加マウスにパーキンソン病発症神経毒である MPTP を投与して、BH4 が増加していることが MPTP 毒性に対して保護的に働くか、あるいは MPTP 毒性を強める方向に働くか解析する。BH4 は還元性の強い化合物であり種々の酸化ストレスに対して保護的に働くと考えられる。パーキンソン病の発症に酸化ストレスが関与していることは以前から指摘されており、BH4 がパーキンソン病におけるドーパミン神経細胞死を防ぐ方向に働くことが期待できる。今回作製した BH4 持続的増加マウスにおいて、ドーパミン神経細胞死に対する BH4 の保護効果が明らかとなった場合には、将来的にパーキンソン病患者への応用を含めて検討していく。

E. 結論

AAV-GCH の線条体への投与により、脳内で持続的に BH4 量が増加するマウスの作製に成功した。今後、脳内で BH4 が持続的に増加することにより脳内でどのような変化が起きるか、また、パーキンソン病発症神経毒に対する感受性がどのように変化するかといった点に関して明らかにしていき、将来的にパーキンソン病患者の治療への応用の可能性について検討していく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki T, Kurahashi H, and Ichinose H (2004) Ras/MEK pathway is required for NGF-induced expression of tyrosine hydroxylase gene. **Biochem Biophys Res Commun** 315, 389-396.
- 2) Suzuki T, Kurita H, and Ichinose H (2004) GTP cyclohydrolase I utilizes metal-free GTP as its substrate. **Eur J Biochem** 271, 349-355.
- 3) Kikuchi A, Takeda A, Fujihara K, Kimpara T, Shiga Y, Tanji H, Nagai M, Ichinose H, Urano F, Okamura N, Arai H, and Itoyama Y (2004) Arg(184)His mutant GTP cyclohydrolase I, causing recessive hyperphenylalaninemia, is responsible for dopa-responsive dystonia with parkinsonism: a case report. **Mov Disord** 19, 590-593.

2. 学会発表

- 1) 鈴木崇弘, 栗田秀樹, 一瀬宏. GTPシクロヒドロラーゼIはmetal-free GTPを基質とする. 日本ビタミン学会第56回大会; 2004年5月28-29日; 長岡.
- 2) Ito T, Suzuki T, Ichinose H. Ras-MEK pathway is required for NGF-induced expression of the GTP cyclohydrolase I gene. 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学会大会合同大会; 2004年9月21-23日; 大阪.
- 3) Ito T, Suzuki T, Ichinose H. Nerve Growth factor-induced expression of the GTP cyclohydrolase I gene via Ras-MEK pathway. 第77回日本生化学会大会; 2004年10月13-16日; 横浜.
- 4) Urano F, Hayashi N, Ichinose H. Pterin-dependent inactivation of tyrosine hydroxylase. 第77回日本生化学会大会; 2004年10月13-16日; 横浜.

H. 知的財産権の出願・登録状況

現時点ではない

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
Muramatsu, S., Yoshimura, M., Wang, L., 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.	Bertolotti, R., Ozawa, K., and Kirk Hammond H.	Progress in Gene Therapy, Volume 2, Pioneering Stem Cell/Gene Therapy Trials.	VSP	Boston	2004	275-298

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
Yokoo, N., Saito, T., Uesugi, M., Kobayashi, N., Xin, K.Q., Okuda, K., Mizukami, H., Ozawa, K., and Koshino, T.	Repair of articular cartilage defect by autologous transplantation of basic fibroblast growth factor gene-transduced chondrocytes with adeno-associated virus vector.	Arthritis Rheum.	52	164-170	2005
Yoshioka, T., Okada, T., Maeda, Y., Ikeda, U., Shimo, M., Nomoto, T., Takeuchi, K., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takahashi, M., Matsushita, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Ookawara, S., Kawano, M., Ishibashi, S., Shimada, K., and Ozawa, K.	Adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.	Gene Ther.	11	1772-1779	2004
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.	8	9-18	2004
Kanazawa, T., Mizukami, H., Nishino, H., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Kitamura, K., Ichimura, K., and Ozawa, K.	Topoisomerase inhibitors enhance the cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on head and neck cancer cells.	Int. J. Oncol.	25	729-735	2004

<p>Toyo-Oka, T., Kawada, T., Nakata, J., Xie, H., Urabe, M., Masui, F., Ebisawa, T., Tezuka, A., Iwasawa, K., Nakajima, T., Uehara, Y., Kumagai, H., Kostin, S., Schaper, J., Nakazawa, M., and <u>Ozawa, K.</u></p>	<p>Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: a scheme for the progression of cardiac dysfunction.</p>	<p>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</p>	<p>101</p>	<p>7381-7385</p>	<p>2004</p>
<p>Mizukami, H., Okada, T., Ogasawara, Y., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., and <u>Ozawa, K.</u></p>	<p>Separate control of Rep and Cap expression utilizing mutant and wild-type loxP sequences and improved packaging system for adeno-associated virus vector production.</p>	<p>Mol. Biotechnol.</p>	<p>27</p>	<p>7-14</p>	<p>2004</p>
<p>Matsushita, T., Okada, T., Inaba, T., Mizukami, H., <u>Ozawa, K.</u>, and Colosi, P.</p>	<p>The adenovirus E1A and E1B19K genes provide a helper function for transfection-based adeno-associated virus vector production.</p>	<p>J. Gen. Virol.:</p>	<p>85</p>	<p>2209-2214</p>	<p>2004</p>
<p>Mochizuki, S., Mizukami, H., Ogura, T., Kure, S., Ichinohe, A., Kojima, K., Matsubara, Y., Kobayashi, E., Okada, T., Hoshika, A., <u>Ozawa, K.</u>, and Kume, A.</p>	<p>Long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice.</p>	<p>Gene Ther.</p>	<p>11</p>	<p>1081-1086</p>	<p>2004</p>
<p>Takeda, S., Takahashi, M., Mizukami, H., Kobayashi, E., Takeuchi, K., Hakamata, Y., Kaneko, T., Yamamoto, H., Ito, C., <u>Ozawa, K.</u>, Ishibashi, K., Matsuzaki, T., Takata, K., Asano, Y., and Kusano, E</p>	<p>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.</p>	<p>Nephron Exp. Nephrol.</p>	<p>96</p>	<p>119-126</p>	<p>2004</p>
<p>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 <u>Ozawa, K.</u></p>	<p>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.</p>	<p>J. Gene Med.</p>	<p>6</p>	<p>288-289</p>	<p>2004</p>
<p>Iwata, N., Mizukami, H., Shiroani, K., Takaki, Y., Muramatsu, S., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., <u>Ozawa, K.</u> and Saido, T.C.</p>	<p>Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-b peptide in mouse brain.</p>	<p>J. Neurosci.</p>	<p>24</p>	<p>991-998</p>	<p>2004</p>

Suzuki, T., Kurahashi, H., and <u>Ichinose, H.</u>	Ras/MEK pathway is required for NGF-induced expression of tyrosine hydroxylase gene.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	315	389-396	2004
Suzuki, T., Kurita, H., and <u>Ichinose, H.</u>	GTP cyclohydrolase I utilizes metal-free GTP as its substrate.	Eur. J. Biochem.	271	349-355	2004