

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～16 年度 総合研究報告書

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 14 年度～16 年度 総合研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成 17 (2005) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告

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

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	20
------------------------	----

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）
総合研究報告書

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。平成 14 年度 (H14) は、遺伝子治療臨床研究実施計画書を作成し、自治医科大学の倫理委員会 (IRB) に提出し、審査を受けた。その後、臨床用 AAV ベクターを供給する Avigen 社との打ち合わせ会議を重ね、その際の意見交換をもとに自治医科大学で実施する臨床プロトコルを改訂した。本研究期間の終了時点で、IRB 審査はほぼ終了した。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、長期間に亘りその有効性と安全性を確認した (H14-16)。また、PET 検査を実施し、有効性を確認した (H16)。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 (H14-16)。将来的な治療ストラテジーに繋がる研究としては、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を行った (H15, 16)。新規治療用遺伝子の開発では、パーキンソン病患者脳内の遺伝子発現の検討を行った (H14)。オープン核内受容体の *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 (H15)。AAV-GCH のマウス線条体への投与実験などを行った (H16)。AAV の血清型と組織特異性に関しては、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い (H15)、最近の 7、8 型についても検討した (H16)。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 (H15, 16)。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 (H15, 16)。iii) 脳血管障害や動脈硬化症：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 (H14)。次に、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、*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、*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 (H15)。同様に、高血圧・心不全などを来す食塩感受性ダールラットを用いた実験で、予防効果を確認した (H16)。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。(H14, 15)。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 (H15)、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 (H15, 16)。vi) 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。vii) 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
(H14 当時:藤田保健衛生大学総合医科学研究所)
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。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、平成 15 年度は引き続き臨床研究の準備を進めた。さらに、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った。また、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行った。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を全身臓器・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行った。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した。また、脳血管障害、心血管病変、動脈硬化症などに対する新規遺伝子治療法の開発を進めた。iv) 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った。v) 感音性難聴に対する遺伝子治療法の開発を進めた。vi) 新生仔マウスへの AAV ベクター投与方法を検討した。vii) AAV ベクターを用いた脂肪組織への遺伝子導入法を検討した。以上の基礎研究では、疾患モデル動物を必要に応じて利用し、遺伝子治療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書を自治医科大学の施設内審査委員会に提出した。米国 Avigen 社との打ち合わせを継続的に行うと共に、米国の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、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 (藤田保健衛生大、東工大) :
- i) 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。
 - ii) オーフン核内受容体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 A B)、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が発現させて、NBREレポーター遺伝子の活性の変化を

調べた。

- iii) GCH発現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ビ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ベクターの血清型と組織特異性に関する検討 (自治医大遺伝子治療研究部) : 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。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、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、標的組織の標本を作製し、組織障害・細胞浸潤などの有無につき検討した。
- 5) 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) 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。
 - ii) 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。

iii) 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。次に、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IL-10 (interleukin-10) 遺伝子を導入し、高血圧症・動脈硬化・高脂血症・心不全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ベクターを筋注射し、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ベクターを筋注射し、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。また、食塩感受性ダールラットを用いて、高血圧や心不全に対する予防効果を同様に検討した。

iv) 自然発症の中樞性尿崩症ラット (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、遺伝子治療の効果を長期的に検討した。

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、神経栄養因子のGDNFを発現する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。

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作成 (自治医大神経内科、遺伝子治療研究部) : 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。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、自治医科大学遺伝子治療臨床研究倫理委員会 (IRB: Institutional Review Board) での審査を受け、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-AAADC 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-AAADC 注入側と対側の四肢の動きが改善し、この効果は約 3 時間持続した。ベクター投与による副作用は認めなかった。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、AAADC 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の開発では、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-AAADC、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 (東工大) :

i) パーキンソン病患者脳内においては、ドパミン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、ビオプテリン合成酵素である GTP シクロヒドラーゼ I mRNA は、対照の 60% の低下にとどまった。

ii) *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。

iii) マウスの片側線条体に AAV-GCH を微量投与した動物実験では、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。

4) AAV ベクターの血清型と組織特異性に関する検討 (自治医大遺伝子治療研究部) : 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 8 型が最も高い効果を示し、次に 5 型の順であった。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。骨格筋における血清型の比較では 1 型と 7 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。

5) 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) 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。

ii) 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。効果を検討した。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ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の効果を確認できた。

iii) 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。次に、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 週間後より血清 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、生存期間の延長が認められた。また、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。基礎実験では、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。さらに、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。

iv) 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。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。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。

v) 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。

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 (健常人の 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。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。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。前臨

床研究では、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。

尚、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、一方で 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。

新規治療用遺伝子の探索に向けた実験では、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。ドパミン生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。

ラット褐色細胞腫由来の PC12 細胞を用いた実験では、Nurr1 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。

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ビオプテリン量を高めることができた。今後は、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、ビ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 ベクターの血清型と組織特異性に関しては、得られた知見に基づき、標的とする臓器・組織に至適な血清型を選択していくことが重要である。また、新規血清型に関して依然として開発が続いており、最近では 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、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、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。

脳虚血に対する遺伝子治療法の開発では、神経栄養因子遺伝子を搭載した 5 型 AAV ベクターが、虚血後再灌流障害に対して期待できることが判明した。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が期待される。

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、機能的な回復が長期間確認された。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、下垂体後葉での AVP 分泌メカニズムの研究にとっても有用な実験系になると思われる。

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。

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。
- ・Nurr1 によるドパミン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。
- ・AAV-GCH の線条体への投与により、脳内で持続的にビ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実施した。
- ・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。
- ・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し、治療効果を確認した。
- ・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 ベクター投与方法を検討し、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., Shirogami, 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.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) 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.
 - 21) 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.
 - 22) 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.
 - 23) 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.
 - 24) 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.
 - 25) 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.
 - 26) 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.
 - 27) 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.
 - 28) 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.
 - 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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, 2002.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 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: II36-II40, 2002.
- 39) 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.
- 40) 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.
- 41) 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.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) 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.
- 45) 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.
- 46) 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 Nurrl modifies susceptibility of mouse neural stem cells to neurotoxins. *Neurosci Lett* 333: 74-78, 2002.
- 47) 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.
- 48) 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.
- 49) 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.
- 50) 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. 知的財産権の出願・登録状況
- 1) 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
 - 2) 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
 - 3) 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
 - 4) 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
 - 5) 発明の名称：Method of treating amino acid metabolic disorders using recominant 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
 - 6) 発明の名称：“Adeno-Associated Virus -Mediated Delivery of GDNF to Skeletal Muscles”
出願番号：
U.S. Patent Application No. 10/327,620
International Patent Application
No. PCT/US02/41010
出願日：December 19, 2002
発明者：Lijun Wang, Shin-ichi Muramatsu, Imaharu Nakano, Hiroaki Mizukami, and Keiya Ozawa

6) 発明の名称：“Composition and Methods
for Treating Neurodegenerative
Diseases”
出願番号：

U.S. Patent Application No. 10/230,875
発明者：Keiya Ozawa, Shin-ichi
Muramatsu, Kunihiko Ikeguchi,
and Imaharu Nakano

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
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, Y., Fisher, A., and Hanin, I.	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
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., 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

Mochizuki, S., Mizukami, H., Kume, A., Muramatsu, S., Takeuchi, K., Matsushita, T., Okada, T., Kobayashi, E., Hoshika, A., and <u>Ozawa K.</u>	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 <u>Ozawa, K.</u>	Topoisomerase inhibitors enhance the cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on head and neck cancer cells.	Int. J. Oncol.	25	729-735	2004
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>	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
Mizukami, H., Okada, T., Ogasawara, Y., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., and <u>Ozawa, K.</u>	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
Matsushita, T., Okada, T., Inaba, T., Mizukami, H., <u>Ozawa, K.</u> , 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
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.	Long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice.	Gene Ther.	11	1081-1086	2004
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	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

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>	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
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-b peptide in mouse brain.	J. Neurosci.	24	991-998	2004
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
Suzuki, T., Kurita, H., and Ichinose, H.	GTP cyclohydrolase I utilizes metal-free GTP as its substrate.	Eur. J. Biochem.	271	349-355	2004
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
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 AAVSI-targeted integration	J. Gen. Virol.	84	2127-2132	2003
Saga, Y., Suzuki, M., Mizukami, H., Kohno, T., Takei, Y., Fukushima, M., and <u>Ozawa, K.</u>	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 <u>Ozawa, K.</u>	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., <u>Ozawa, K.</u> , 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 <u>Ozawa, K.</u>	Distinct patterns of gene transfer to gerbil hippocampus with recombinant adeno-associated virus type 2 and 5	Neurosci. Lett.	340	153-157	2003
Takahashi, K., Merchant, S.N., Miyazawa, T., Ymaguchi, T., McKenna, M.J., Kouda, H., Iino, Y., Someya, T., Tamagawa, Y., Takiyama, Y., <u>Nakano, I.</u> , 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., <u>Nakano, I.</u> , 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