

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

パーキンソン病遺伝子治療臨床研究における安全性評価と  
positron emission tomography (PET) による有効性の評価

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中野 今治

平成19 (2007) 年4月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

パーキンソン病遺伝子治療臨床研究における安全性評価と positron emission tomography(PET)による有効性の評価に関する研究 -----	1
中野 今治	

### II. 分担研究報告書

1. 前臨床研究のための AAV ベクターの作製 -----	9
小澤 敬也	
2. パーキンソン病に対する遺伝子治療臨床研究 -----	12
村松 慎一	
3. 重症パーキンソン病遺伝子治療に向けた定位的遺伝子導入法の研究 -----	14
— 難治性振戦を伴う進行したパーキンソン病に対する外科治療 —	
加藤 正哉	
4. パーキンソン病遺伝子治療での PET 計測に関する研究 -----	20
佐藤 俊彦	

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 24

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 30

パーキンソン病遺伝子治療臨床研究における安全性評価と positron emission tomography(PET)による有効性の評価に関する研究

主任研究者 中野 今治 自治医科大学医学部内科学講座  
神経内科学部門 教授

研究要約

本研究では、進行したパーキンソン病患者を対象として遺伝子治療の臨床研究を実施し、その安全性と治療効果を PET 計測により非侵襲的・客観的に評価する方法を確立することを目標とする。

パーキンソン病は、線条体に投射する黒質ニューロンが脱落することから線条体でドパミンが十分に合成されないために発症する。病初期にはドパミンの前駆物質である L-DOPA の内服により症状の改善が得られるが、進行すると L-DOPA をドパミンに変換する芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) の活性が著しく低下するためその効果が減弱する。そこで、AADC 遺伝子を線条体の神経細胞に導入しその活性を回復させる遺伝子治療が考えられる。申請者らは、選択的神経毒 MPTP の慢性投与によって作製したパーキンソン病モデルサルを使用した前臨床試験において、AAV ベクターによるドパミン合成系酵素の遺伝子導入を行い有効性と安全性を確認してきた。その結果を踏まえて、「AADC 発現 AAV ベクター (AAV-AADC) 線条体内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究」を立案した。

本研究では、まず低用量 ( $3 \times 10^{11}$  ベクターゲノム) の AAV-AADC による治療を進行期パーキンソン病 3 症例で実施する。安全性および臨床効果の評価に加え、6-[ $^{18}\text{F}$ ] fluoro-L-*m*-tyrosine (FMT) をリガンドとした PET 計測を行う。低用量群が安全に終了すれば、ベクター量を 3 倍に増やして更に 3 症例に実施し、合計 6 症例 (2 群、各群 3 例) のパーキンソン病患者に遺伝子治療を行う。なお、臨床レベルの AAV ベクターは、本ベクターを用いてパーキンソン病の臨床研究を行っている米国 Genzyme 社から供給される。

今回の遺伝子治療で期待される効果は、AADC 遺伝子導入により線条体での AADC 活性が回復して服用する L-DOPA からドパミンが産生されることに伴う症状の改善である。PET 計測システムを新たに構築することにより、パーキンソン病患者の線条体での AADC 活性を非侵襲的・客観的に計測し、遺伝子導入効率を判定するとともに、症状改善度を判定する臨床スコア (UPDRS など) との対比を行う。

さらに、パーキンソン病モデルサルを使用した研究を行い、PET 計測法の改良と遺伝子導入を行ったサルの全身臓器でベクターゲノムの有無を検討し安全性に関するデータを蓄積する。

## 分担研究者

小澤敬也

自治医科大学医学部

教授

村松慎一

自治医科大学医学部

助教授

加藤正哉

自治医科大学医学部

助教授

佐藤俊彦

宇都宮セントラルクリニック

院長

## A. 研究目的

本研究は、進行したパーキンソン病患者の線条体（被殻）に、ヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素（aromatic L-amino acid decarboxylase : AADC）遺伝子を組み込んだ2型アデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus : AAV）ベクターを定位脳手術的に注入し、その安全性を検証することを第1の目的とする。併せて、経口投与するL-DOPAによってドパミン産生を促し、パーキンソン症状を改善する効果についても評価する。ドパミンの過剰合成に伴って生じるジスキネジアはL-DOPAの投与量を減らすことにより阻止する。また、6-[<sup>18</sup>F] fluoro-L-*m*-tyrosine (FMT)を用いたPET計測システムを新たに構築して、導入遺伝子発現効率の非侵襲的・客観的な評価方法を確立することを目指す。

## B. 研究方法

黒質のドパミン合成ニューロンは線条体に投射して、そこにドパミンを放出している。パーキンソン病は、この黒質ニューロンが変性・脱落して線条体でドパミンが不足するために発症する神経変性疾患である。パーキンソン病治療薬のゴールドスタンダードであるL-DOPAは、黒質ニューロンの軸索終末に存在するAADCによってドパミンに変換される。病初期にはAADCはまだ相当量残存しているため、内服したL-DOPAからドパミンが合成されて症状の改善が得られるが、進行するとAADC活性が著しく低下するため十分量のドパミンが合成されず、L-DOPAの効果が減弱する。そこで、AADC遺伝子を線条体の神経細胞に導入してAADC活性を回復させる遺伝子治療が、パーキンソン病治療の1つとして考えられる。

我々は長年にわたって、選択的神経毒MPTPの慢性投与によって作製したパーキンソン病モデルサルに、ドパミン合成系酵素の遺伝子を搭載したAAVベクターを線条体に注入する前臨床試験を行い、この方法は有効かつ安全であることを確認してきた。この結果を踏まえて、我々は「AADC発現AAVベクター線条体内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究」を立案した。

本臨床研究では、進行したパーキンソン病患者6症例（2群、各群3例）に遺伝子治療を行う予定である。まず低用量（ $3 \times 10^{11}$ ベクターゲノム）のAAV-AADCによる治療を3症例（第1群）で実施する。全身麻酔下に左右前頭部にバーホールを1個ずつ設け、定位脳手術的にAAV-AADCを左右の線条体のそれぞれ2カ所、計4カ所に注入する。注入量は1カ所50 $\mu$ l、1例当たり200

μl である。

本治療法の安全性は、治療実施患者の注意深い観察、臨床症候、脳画像を含めた検査データから評価する。治療効果の判定は、Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)、修正 Hoehn & Yahr Stage、日常生活動作評価のための Schwab & England Scale、Four Timed Testing を、治療の前後に於いて実施し、比較検討することで行う。患者のビデオテープへの記録と各スコアによる神経症状の評価を術後4週までは毎週、12週までは隔週、以降は毎月おこなう。UPDRS の項目 32 及び 36~39 の判定に当たっては、患者の記入した「症状日記」を参考にする。投薬量の変化も治療効果の間接的な指標として検討する。遺伝子導入前と導入1か月後および6か月後に、6-[<sup>18</sup>F] fluoro-L-*m*-tyrosine (FMT) をリガンドとした PET 計測を行う。これと CT 画像との組み合わせにより AADC 遺伝子発現の程度を定量的に評価する方法を開発し、臨床症状の変化と対比させて解析する。

低用量群 3 例の終了時点で自治医大施設内倫理委員会に本治療法の安全性の評価判定を申請する。この委員会にて安全性が確認されれば、ベクター量を 3 倍 ( $9 \times 10^{11}$  ベクターゲノム) に増やして更に 3 症例(第 2 群)に実施し、第 1 群と同様な評価を行う。なお、臨床レベルの AAV ベクターは、本ベクターを用いてパーキンソン病の臨床研究を行っている米国 Genzyme 社から供給される。

パーキンソン病モデルサルを使用した研究を行い、PET 計測法の改良と遺伝子導入を行ったサルの全身臓器でベクターゲノム

の有無を検討し安全性のデータを蓄積する。さらに、次世代の AAV ベクターとして、より安全性の高いベクターの開発を行う。

## C. 研究結果

### 1. 本研究プロトコルの国からの承認取得

本研究プロトコルは平成 17 年度に自治医大施設内倫理委員会の承認を得た後、厚生労働省に申請された。平成 18 年 2 月 1 日の厚生労働省厚生科学審議会科学技術部会の審議を経て、パーキンソン病遺伝子治療臨床研究作業委員会(笹月健彦委員長)に審議が付託された。平成 18 年 3 月 20 日と同 年 8 月 4 日の同作業委員会でのヒアリングと審議がなされ、それに従った改訂の後、平成 18 年 10 月 31 日付けにて厚生労働大臣および環境大臣より承認された(官報 4 4 6 2 号)。

### 2. 臨床研究実施に向けての準備

我々の研究とほぼ同一のプロトコルで先行している米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校 (UCSF) 医療センターチーム、両研究チームにベクター供給する Genzyme 社、および我々による研究打合せが、平成 19 年 1 月 25 日、サンフランシスコで開かれた。我々の研究チームから村松、佐藤、中野が出席し、UCSF 医療センターでの研究に関する情報を取得し、我々のチームの研究進行状況を報告した。ベクターの輸入に関しては、Genzyme 社との間で既に 2 回のテスト・シッピングを安全に実施しており、同社から平成 18 年度中に治療用ベクターと注入装置を輸入する予定である。

PET 検索のための FMT 合成装置が平成 19 年 1 月に宇都宮セントラルクリニックに設

置され、現在稼働状況のテスト中である。平成18年度内には治療前のPET検査が実施される予定である。

### 3. 本遺伝子治療希望患者の募集

自治医科大学神経内科ホームページや外来待合室などに本遺伝子治療の希望患者募集の案内を出し、平成18年12月と平成19年1月、2月の3回、患者とその家族向けの説明会を開いた。その結果、すでに3人の申し出があり、そのうちの一人に関しては治療前の診察と諸検査を実施中である。

### 4. パーキンソン病モデルサルでの実験

2000年9月20日、2003年1月22日、2004年2月2日にAAV-AADCを含むAAVベクターを脳内投与したパーキンソン病モデルサルにおいて、遺伝子導入後の長期効果及び安全性の評価を行った。これらのサルのいずれにおいても、運動障害の改善は持続しており、安全性においても特段の問題は認められていない。今後、PET計測による遺伝子導入後の変化についても評価する予定である。

### 5. 次世代ベクターの開発

より安全性を高めた改良型AAVベクターとして、誘導型Cre/LoxPシステムを応用することにより、導入した遺伝子の過剰発現を抑制できるAAVベクターを開発した。

## D. 考察

UCSF医療センターでは、パーキンソン病患者15例(3群、各群5例)を対象とした臨床研究が進行中である。UCSFの第1群は我々の第1群の1/3量である $1 \times 10^{11}$ ベクターゲノムで治療研究を開始し、現在第1群5例の治療が終了した段階である。注入したベクターそのものによると思われる有害事象は生じていない。第5例に於いて、

バーホール形成時の機械的静脈損傷によると考えられる出血性静脈梗塞が手術後の脳CTにて同定されたが、無症状に終始し、その後の画像検査により病変の消失が確認されている。その他の症例でも手術創に伴うと考えられる頭痛が見られているが、いずれも短期間で消失している。

また、米国においては上記UCSFチームとは異なる2つの研究チームによって、glutamic acid decarboxylase (GAD)遺伝子、或いはneurturin (CERE-120)遺伝子を搭載したAAVベクターをパーキンソン病患者に定位脳手術的に注入する臨床研究が実施されている。前者では片側の視床下核に、後者では両側被殻にいずれも12例に注入されており、我々の知る限り特段の有害事象は報告されていない。このように、AAVベクターによるパーキンソン病遺伝子治療の安全性は高いものと考えられる。

AAV-AADC注入法の効果に関しては、UCSF医療センターの5例ではいずれも術後1ヶ月と3ヶ月のPETにおいて遺伝子注入部位でのFMTの取り込み増大が確認されており、UPDRSにおいても術後6ヶ月時点で評点の改善が見られている。

我々の第1群では、UCSFでの第1群の3倍量のAAVベクターで治療することから、FMT-PETと神経症候の両者に於いて更なる改善が得られるものと予想される。

## E. 結論

進行したパーキンソン病患者を対象として遺伝子治療の臨床研究を実施し、その治療効果をPET計測により非侵襲的・客観的に評価する方法を確立することを目指とする。

本研究では、進行期パーキンソン病患者 6 例（低用量群 3 例、高用量群 3 例）に対し、全身麻酔下に AAV-AADC を定位脳手術的に被殻に注入する。まず、低用量群 3 例に実施して安全性と臨床効果を評価し、FMT-PET にて注入遺伝子の発現を経時的・定量的に判定する。低用量群 3 例の終了時点で自治医大 IRB にて本治療法の安全性に関する審議を受け、高用量群に対して同様の治療と評価を実施する。

本研究のプロトコールは平成 18 年 2 月 1 日の厚生労働省厚生科学審議会科学技術部会、およびパーキンソン病遺伝子治療臨床研究作業委員会（笹月健彦委員長）にて審議され、平成 18 年 10 月 31 日付けにて厚生労働大臣および環境大臣より承認された（官報 4 4 6 2 号）。

FMT の合成装置は宇都宮セントラルクリニックに設置され、平成 18 年度中に FMT-PET 検査が可能になる予定である。

治療用ベクターと注入装置は Genzyme 社から平成 18 年度中に輸入予定である。

本治療法の希望患者を募集して、患者・家族向けの説明会を開き、複数の応募者があった。現在、1 名の患者の術前診察と検査を実施中である。

モデルサルを使用した長期効果および安全性の評価を実施した。また、次世代ベクターの開発を行った。

## 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) Ouyang Y, Takiyama Y, Sakoe K, Shimazaki H, Ogawa T, Nagano S, Yamamoto Y, Nakano I: Sacsin-related ataxia (ARSACS): Expanding the genotype upstream from the gigantic exon. *Neurology* 66: 1103-1104, 2006.
- 2) Ouyang Y, Sakoe K, Shimazaki H, Namekawa M, Ogawa T, Ando Y, Kawakami T, Kaneko J, Hasegawa Y, Yoshizawa K, Amino T, Ishikawa K, Mizusawa H, Nakano I, Takiyama Y: 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia: A clinical and genetic study. *Journal of the Neurological Sciences* 247: 180-186, 2006.
- 3) Kamimura T, Shimazaki H, Morita M, Nakano I, Okazaki H, Minota S: Limited Wegener's granulomatosis manifested by abducens nerve palsy resulting from pachymeningitis. *Journal of Clinical Rheumatology* 12(No.5): 259-260, 2006.
- 4) Ishihara K, Sugie M, Shiota J, Kawamura M, Kitamoto T, Nakano I: Severe cortical involvement I MV2 Creutzfeldt-Jakob disease: An autopsy case report. *Neuropathology* 26: 433-437, 2006.
- 5) Ishihara K, Araki S, Ihori N, Shiota J, Kawamura M, Nakano I: An autopsy case of frontotemporal dementia with severe dysarthria and motor neuron disease showing

- numerous basophilic inclusions. *Neuropathology* 26: 447-454, 2006.
- 6) Ideno, J., Mizukami, H., Kakehashi, A., Saito, Y., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Kuroki, M., Kawakami, M., Ishibashi, S., and Ozawa, K.: Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. *Int J Mol Med* 19: 75-9, 2007.
- 7) Takei, Y., Mizukami, H., Saga, Y., Yoshimura, I., Hasumi, Y., Takayama, T., Kohno, T., Matsushita, T., Okada, T., Kume, A., Suzuki, M., Ozawa, K.: Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using adeno-associated virus serotype 1-derived vector. *Int J Cancer* 120: 278-84, 2007.
- 8) Xin, KQ., Mizukami, H., Urabe, M., Toda, Y., Shinoda, K., Yoshida, A., Oomura, K., Kojima, Y., Ichino, M., Klinman, D., Ozawa K., and Okuda, K.: The induction of robust immune responses against HIV is supported by the inherent tropism of AAV5 for DC. *J Virol* 80: 11899-910, 2006.
- 9) Mizukami, H., Mimuro, J., Ogura, T., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Sakata, Y., Ozawa, K.: Adipose tissue as a novel target for *in vivo* gene transfer by using adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther* 17: 921-8, 2006.
- 10) Ogura, T., Mizukami, H., Mimuro, J., Madoiwa, S., Okada, T., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., Hamada, H., Yoshikawa, H., Sakata, Y., Ozawa, K.: Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. *J Gene Med* 8: 990-7, 2006.
- 11) Li XG, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Muramatsu C, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Nakano I, Ozawa K and Muramatsu S: Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. *Mol Ther*,13(1):160-166,2006.
- 12) Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, Terao K and Hanazono H: Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey ES cells in the allogeneic setting. *Stem Cells*, 24(6):1450-1457, 2006.
- 13) Wakamatsu M, Ishii A, Iwata S, Sakagami J, Ukai Y, Ono M, Kanbe D, Muramatsu S, Kobayashi K, Iwatsubo T, Yoshimoto M: Selective loss of nigral dopamine neurons induced by overexpression of truncated human  $\alpha$ -synuclein in mice. *Neurobiol Aging*, *in press*.
- 14) Sawada H, Hishida R, Hirata Y, Ono K, Suzuki H, Muramatsu S, Nakano I, Nagatsu T, Sawada M: Activated microglia affect the



nigro-striatal dopamine neurons differently in neonatal and aged mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine has. *J Neurosci Res*, *in press*.

## 2. 学会発表

1) 藤本健一、川上忠孝、中野今治、小泉唯子、加藤正哉：精神症状を伴ったパーキンソン病患者に対する視床下核脳深部刺激の効果。第47回日本神経学会総会。東京、2006年5月11日-13日。

2) 村松慎一、奈良優子、滝野直美、小寺美加、西田紘子、垣内岳春、福元大、原田典弘、西山新吾、塚田秀夫、小野文子、土田順子、寺尾恵治、奥野剛、小西奈依、道端英雄、鈴木豊、近藤靖、仁藤新治、中野今治：パーキンソン病モデルサルへのヒトES細胞由来神経幹細胞移植。第47回日本神経学会総会。東京、2006年5月11日-13日。

3) 川上忠孝、藤本健一、中野今治：経頭蓋磁気刺激(TMS)による正常圧水頭症(NPH)とパーキンソニズム(PD, PSP)の鑑別。第47回日本神経学会総会。東京、2006年5月11日-13日。

4) Kodera M, Nara Y, Takino N, Nishida H, Tamura Y, Okuno T, Konishi N, Michihata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Nakano I, Muramatsu S. Embryonic stem cells expressing suicide gene reduced risk of teratoma formation. The 29th Annual meeting of the Japan Neuroscience Society. Kyoto, July 20, 2006.

5) Xiao W-Z, Matsushita T, Nara Y, Takino N, Nishida H, Kodera M, Sasaki Y, Kikuchi S, Okada T, Hoshi M, Nakano I, Ozawa K and Muramatsu S. Efficient transduction of oligodendrocytes by AAV8 vectors. The Japan society of gene therapy's 12th annual meeting. Tokyo, August 24, 2006. (abstract p24).

6) Muramatsu S, Kodera M, Nara Y, Takino N, Sato K, Kakiuchi T, Okuno T, Konishi N, Michibata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Tsukada H and Nakano I. Suicide gene transduction of embryonic stem cells reduces risk of teratoma formation. The Japan society of gene therapy's 12th annual meeting. Tokyo, August 26, 2006. (abstract p34).

7) 古寺美加, 山本茂一, 近藤靖, 仁藤新治, 村松慎一：自殺遺伝子導入による安全な移植用ES細胞の開発。第46回日本臨床化学会年次学術集会, 東京, 2006年9月8-9日。

8) Muramatsu S, Kodera M, Nara Y, Takino N, Nishida H, Sato K, Kakiuchi T, Okuno T, Konishi N, Michibata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Tsukada H and Nakano I. Suicide gene transduction of embryonic stem cells for safer cell therapy. Tenth International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. Kyoto, October 30, Movement Disorders 21(15)s399, 2006.

9) 小泉唯子、加藤正哉、渡辺英寿「ドパミン依存患者における外科的治療の適応」第23回関東機能的脳外科カンファ

ランス、2006.9.2、東京

10) 小泉唯子、加藤正哉、菊地千一郎、藤本健一、渡辺英寿「近赤外線光トポグラフィーを用いた STN-DBS 中の局所脳血流測定」第65回日本脳神経外科学会総会、2006.10.18-20、京都

11) 加藤正哉、小泉唯子、渡辺英寿「パーキンソン病の振戦に対する視床手術後の追跡と問題点」第65回日本脳神経外科学会総会、2006.10.18-20、京都

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

前臨床研究のためのAAVベクターの作製

分担研究者：小澤敬也 自治医科大学分子病態治療研究センター  
遺伝子治療研究部 教授

研究要旨

パーキンソン病に対する遺伝子治療法の遂行に際して懸案事項の一つである2型AAVのキャプシドに対する中和抗体価に関して、測定法を改良し検出感度を高めた。また、キャプシドを構成する蛋白質のうちVP1の含量と発現の程度に関連があることを見出した。これらの成果により、中和抗体の力価と治療効果との関係を明らかにするとともに、AAVベクターの有用性をより高めることにつながるものと期待される。

A. 研究目的

パーキンソン病に対するAAVベクターを用いた遺伝子治療法はサルモデルにおいて有効性が証明されたものの、頭蓋内注入に伴う免疫反応の程度や、中和抗体と遺伝子導入効率との因果関係については十分に明らかにされていない。中和抗体の検出法は標準化されておらず、また、検出感度を高めることでより緻密な検討が可能になるものと考えられることから、中和抗体の検出法につき種々の検討を行った。また、キャプシドを構成する蛋白質のうちVP1の含量と発現の程度に関連がある可能性が示唆されていたことから、この点についても検討を加えた。

B. 研究方法

1. 中和抗体検出法に関する検討： AAVベクターに対する中和抗体検出法につき、

i) 検出法として従来用いていたX-Gal染色法に代えてONPG (o-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside)を用いた比色定量法を用いること、ii) より少ないベクター量で感染する細胞に関する探索、iii) アデノウイルスを共感染させることで、より少ないベクター量で検出を可能とし、検出感度を高めることにつながるかどうかにつき検討した。

2. ベクターの構成蛋白質に関する検討： VP1の開始コドンとしてATG以外を用いることでキャプシド構成蛋白質の割合を変更させ、その結果生じたベクターを用いて発現の状況を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、非病原性のAAVに由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的な問題が生ずる

ことは基本的にないものと考えている。マウスを用いた動物実験に関しては自治医大で実施するが、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて自治医大動物実験指針規定に沿って行った。

### C. 研究結果

1. 中和抗体検出法に関する検討：i) 検出法として従来用いてきたX-Gal染色法に代えてONPG法を用いることで、より少ないベクター量で検出が可能となり、3倍程度の感度の上昇が得られた。ii) AAVベクター（2型）がより効率よく感染する細胞が見出されるかどうかを検討したが、従来用いている293細胞を上回るものは見出されなかった。iii) 293細胞にアデノウイルスを共感染させることで、より少ないベクター量で検出が可能と考えられた（3倍程度）。以上の結果を総合すると、中和抗体の検出感度を10倍程度高めることができた。

2. ベクターの構成蛋白質に関する検討：VP1の開始コドン様々を改変した結果、キャプシド構成蛋白質の割合に変化がみられ、UUGを開始コドンとした場合にVP1を高発現するベクターが得られた。VP1の含有量とベクターを293細胞に感染させた際の導入遺伝子（アルカリフォスファターゼ）の発現効率の間には正の相関関係が認められた。

### D. 考察

パーキンソン病に対する AAV ベクター

を用いた遺伝子治療法の臨床研究を遂行するに際しては、2型のベクターに対する中和抗体価の存在がどのように影響するか、また、脳実質内にベクターを投与した際の免疫反応の状況と再投与における有効性の推定などといった、明らかにすべき点が多数残されている。最近、他の研究の成果から、たとえ低力価であっても中和抗体の存在は遺伝子導入効率に大きな影響を与えうることが示されており、脳実質内へのベクター投与の場合にも効果が減弱する可能性がある。この点に関しても、今後より正確な評価が可能となることが期待される。

また、VP1の含量と発現の関連に関してはまだ萌芽的な段階であるが、より高効率のベクターを作製する試みとして斬新なものである。発現効率が増強する機序は明らかではないが、VP1は他の構造蛋白質にはない配列を有しており、この部分にフォスホリパーゼ活性が存在することが知られている。このためVP1の含量を増加させたキャプシドでは感染が効率よく進むなどの影響が出るものと考えられる。今後はこれらの知見を用いて *in vivo* での効果につき検討し、有効性を明らかにしていきたい。

### E. 結論

中和抗体価の測定法を改良した。また、臨床応用を視野に入れてベクター関連の基盤技術を整備した。このような進歩の積み重ねによって、臨床研究がより安全

かつ効果的に遂行されることが期待される。

G. 研究発表（原著論文）

1) Ideno, J., Mizukami, H., Kakehashi, A., Saito, Y., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Kuroki, M., Kawakami, M., Ishibashi, S., and Ozawa, K.: Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. **Int J Mol Med** 19: 75-9, 2007.

2) Takei, Y., Mizukami, H., Saga, Y., Yoshimura, I., Hasumi, Y., Takayama, T., Kohno, T., Matsushita, T., Okada, T., Kume, A., Suzuki, M., Ozawa, K.: Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using adeno-associated virus serotype 1-derived vector. **Int J Cancer** 120: 278-84, 2007.

3) Xin, KQ., Mizukami, H., Urabe, M., Toda, Y., Shinoda, K., Yoshida, A., Oomura, K., Kojima, Y., Ichino, M., Klinman, D., Ozawa K., and Okuda, K.: The induction of robust immune responses against HIV is supported by the inherent tropism of AAV5 for DC. **J Virol** 80: 11899-910, 2006.

4) Mizukami, H., Mimuro, J., Ogura, T., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Sakata, Y., Ozawa, K.: Adipose tissue as a novel target for *in vivo* gene transfer by using adeno-associated virus vectors. **Hum Gene Ther** 17: 921-8, 2006.

5) Ogura, T., Mizukami, H., Mimuro, J.,

Madoiwa, S., Okada, T., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., Hamada, H., Yoshikawa, H., Sakata, Y., Ozawa, K.: Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. **J Gene Med** 8: 990-7, 2006.

H. 知的財産権の出願・取得状況  
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

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 村松慎一 自治医科大学医学部内科学講座  
神経内科学部門 助教授

【研究要旨】 アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを応用したパーキンソン病に対する遺伝子治療の前臨床試験を行った。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のモデルサルにおいて、AAVベクターにより線条体へ芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)を含むドパミン合成系酵素の遺伝子導入を行い、長期的な効果と安全性を評価した。遺伝子導入後、各6年、4年、3年以上経過した3頭のサルのいずれにおいても運動障害の改善効果は持続しており、安全性において問題は認めなかった。さらに、チロシン水酸化酵素(TH)の発現カセットにloxP配列を挿入することにより、TH遺伝子の過剰発現を抑制できるAAVベクターを開発しモデルサルへ投与した。

A. 研究目的

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを応用した進行期のパーキンソン病に対する遺伝子治療の第III相臨床研究の実施に先立ち、カニクイサルのモデルを使用して長期的な効果と安全性の評価を行う。

B. 研究方法

ドパミンの合成に必要なTH, AADC, GTP cyclohydrolase I (GCH)の各酵素の遺伝子を発現する3種類の2型AAVベクター(AAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCH)を作製した。さらに、TH配列の両端にloxP配列を挿入したAAV-loxP-THを作製した。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（筑波霊長類センターとの共同研究）3頭(#11, #42, #12)を使用し、これらのAAVベクターを2000年9月20日(#11), 2003年1月22日(#42), 2004年2月2日(#12)に左側の被殻に注入した。#11には、AAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCHの3種類のベクターを混合し、各 $1.5 \times 10^{11}$  vector genome (vg)を投与した。#42には、 $4.35 \times 10^{10}$  vgのAAV-AADCのみを投与した。#12には、AAV-loxP-TH, AAV-AADC, AAV-GCHの3種類のベクターを混合し、各 $3.4 \times$

$10^{10}$  vg,  $5.4 \times 10^{10}$  vg,  $5.0 \times 10^{11}$  vgを投与した。運動障害の改善効果をvideo記録により解析した。血液検査により副反応の有無を評価した。

C. 研究結果

遺伝子導入したモデルサルは、3頭とも特に合併症を生じることなく、各6年、4年、3年間以上生存している。TH, AADC, GCHの3種類の酵素遺伝子を導入した#11と#12において、上下肢の運動機能は遺伝子導入側の対側となる右側でほぼ正常にまで回復しその状態が持続していた。左側では動作緩慢・寡動が持続していた。AADCのみ遺伝子導入した#42については、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注入後には、少量のL-dopa(5 mg/kg)に反応して対側の上肢の動きが改善し、この効果は継続して認められた。血算・一般生化学などの血液検査では異常を認めず、特に副作用も見られなかった。

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。進行したパーキンソン病ではドパミンの前駆物質である L-dopa をドパミンに変換する AADC の活性も低下してしまうため、L-dopa 製剤も無効となる。そこで、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た。本研究では、選択的神経毒 MPTP の慢性投与により作製したサルのパキンソン病モデルにおいて、遺伝子導入の長期的な有効性と安全性を確認した。AAV ベクターによるサル脳内への遺伝子導入では、これまで3年後にも発現が持続していることが報告されているが、本研究では6年以上も効果が持続し特に副作用もないことが確認できた。今後、さらに PET 計測などで評価を行う予定である。

## E. 結論

モデルサルを使用した前臨床実験で長期的な有効性と安全性を確認した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Li XG, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Muramatsu C, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Nakano I, Ozawa K and Muramatsu S: Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. *Mol Ther*,13(1):160-166,2006.
2. Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, Terao K and Hanazono H: Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey ES cells in the allogeneic setting. *Stem Cells*, 24(6):1450-1457,2006.
3. Wakamatsu M, Ishii A, Iwata S, Sakagami J, Ukai Y, Ono M, Kanbe D, Muramatsu S, Kobayashi K, Iwatsubo T, Yoshimoto M: Selective loss of nigral dopamine neurons induced by overexpression of truncated human  $\alpha$ -synuclein in mice. *Neurobiol Aging*, *in press*.
4. Sawada H, Hishida R, Hirata Y, Ono K, Suzuki H, Muramatsu S, Nakano I, Nagatsu T, Sawada M: Activated microglia affect the nigro-striatal dopamine neurons differently in neonatal and aged mice treated

with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine has. *J Neurosci Res*, *in press*.

### 2. 学会発表

1. Kodera M, Nara Y, Takino N, Nishida H, Tamura Y, Okuno T, Konishi N, Michihata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Nakano I, Muramatsu S. Embryonic stem cells expressing suicide gene reduced risk of teratoma formation. The 29th Annual meeting of the Japan Neuroscience Society. Kyoto, July 20, 2006.
2. Xiao W-Z, Matsushita T, Nara Y, Takino N, Nishida H, Kodera M, Sasaki Y, Kikuchi S, Okada T, Hoshi M, Nakano I, Ozawa K and Muramatsu S. Efficient transduction of oligodendrocytes by AAV8 vectors. The Japan society of gene therapy's 12<sup>th</sup> annual meeting. Tokyo, August 24, 2006. (abstract p24).
3. Muramatsu S, Kodera M, Nara Y, Takino N, Sato K, Kakiuchi T, Okuno T, Konishi N, Michihata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Tsukada H and Nakano I. Suicide gene transduction of embryonic stem cells reduces risk of teratoma formation. The Japan society of gene therapy's 12<sup>th</sup> annual meeting. Tokyo, August 26, 2006. (abstract p34).
4. 古寺美加, 山本茂一, 近藤靖, 仁藤新治, 村松慎二: 自殺遺伝子導入による安全な移植用 ES 細胞の開発. 第46回日本臨床化学会年次学術集会, 東京, 2006年9月8-9日.
5. Muramatsu S, Kodera M, Nara Y, Takino N, Nishida H, Sato K, Kakiuchi T, Okuno T, Konishi N, Michihata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Tsukada H and Nakano I. Suicide gene transduction of embryonic stem cells for safer cell therapy. Tenth International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. Kyoto, October 30, *Movement Disorders* 21(15)s399, 2006.

## G. 知的財産権

なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

重症パーキンソン病遺伝子治療に向けた定位的遺伝子導入法の研究  
－難治性振戦を伴う進行したパーキンソン病に対する外科治療－

分担研究者 加藤正哉 自治医科大学医学部脳神経外科学 助教授

**研究要旨** Parkinson 病の振戦には視床腹側中間核に対する凝固や脳深部刺激（DBS）が著効を示し長期成績も良好であるが、病期の進行に伴い振戦以外の運動症状が問題となってくる症例も経験される。初回、視床をターゲットとして定位脳手術を行った症例の術後の経過を追跡して報告する。対象は 2000 年 7 月～2006 年 12 月までに Parkinson 病に対して行った定位脳手術 74 例のうち、視床のみに DBS または凝固を行った 9 例。内訳は DBS 3 例、凝固 6 例で、DBS、凝固共に追跡期間中、振戦はほぼ完全に消失していたが、DBS 群の 2 例、凝固群の 2 例で経過中振戦以外の症状が悪化し、内服薬量増加や ADL 低下をきたしていた。凝固術後に ADL 低下を認めた 2 例はそれぞれ視床凝固の 4 ヶ月及び 3 年 3 ヶ月後に両側視床下核 DBS を行い、Parkinson 病の運動症状の全般的改善がみられた。振戦を主症状とする Parkinson 病は比較的進行が緩徐で視床手術により長期に ADL 改善が期待される事が多いが、寡動や歩行障害進行例もあるので、手術ターゲットの選択は、STN 等も視野に入れた検討が必要である。症例に応じて二期的な STN-DBS の追加や、初回から視床凝固と STN-DBS の組み合わせ療法、さらには AADC 遺伝子導入療法も考慮する余地がある。

A 研究目的

進行したパーキンソン病（パ病）患者の線条体（被殻）に、芳香族 L アミノ酸脱炭酸酵素（aromatic l-amino acid decarboxylase : AADC）遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus : AAV）ベクターを定位脳手術的に注入し、パーキンソン症状を改善するための新しい治療法を確立する為に、従来の定位脳手術手技を再確認すると共に、現在広く行われている外科治療である視床腹側中間核（Vim）凝固や脳深部刺激（DBS）療法ならびに視床下核（STN）DBS 療法の効果とそ

の限界を明らかにする。

B 研究方法

Wearing-off 等の進行したパ病の諸症状に対する STN-DBS は、症状の改善に劇的な効果があり、従来の薬物療法による治療の次の選択肢として確立している。我々の施設では STN-DBS を開始した 2000 年 7 月以降 2006 年 12 月までにパ病に対して 74 例の定位脳手術を行ってきた。パ病発病から数年以上が経過し、薬物療法で十分な ADL が得られなくなった症例を手術対象とし、我々は両側の STN をターゲットとし



て電極留置を行う一期的な両側同時手術を基本としている。しかし、中にはADLを悪くしている主たる原因が一側振戦という症例もあり、この場合の治療ターゲットは視床腹側中間核(Vim)とする。凝固とDBSのどちらを選択するかは、症状・年齢・患者の希望等を考慮して個々に検討している。74例中、視床手術を行ったのは視床のみをターゲットとした症例が10例、後述する視床と視床下核の組み合わせ手術を行った症例が5例であった。視床単独処置10例の中で術後1年以上経過した9例の臨床症状を追跡して検討した(表1)。

### C 研究結果

9例の患者背景は平均年齢61歳、男女比は4:5で、同時期にSTN-DBSを行った50例の平均年齢60歳と差がなかったが、発病から手術までの期間はSTN-DBSが平均12年であったのに対して、視床手術群は6.3年と短かく、振戦に対する効果的な薬物療法が少ないこともあり、比較的早期に手術に踏み切られている傾向があった。症例の内訳は、凝固術6例、うち4例は一側凝固のみ、残りの2例は一側の凝固後に2期的に両側STN-DBSが追加されていた。また最初からDBSを行った症例が3例であった。DBSの3例は一側Vim-DBSのみが1例、2期的に両側のVim-DBSを受けた症例が1例、残る1例は発病から4年目に一側のthalamotomyを受け、一旦症状軽快したが、徐々に対側の振戦が悪化したため、thalamotomyの13年後に対側のVim-DBSが行われた症例である。これら9例を平均42ヶ月追跡した。9例を一側視床凝固4例(図1A)、一側凝

固後両側STN-DBSの2例(図1B)、視床DBS3例(図1C)に分けて、それぞれの術前術後UPDRS運動スコアを経時的にプロットすると、二期的に両側STN-DBSを追加した症例以外は、いずれも40~50ヶ月後に症状が悪化していたことがわかった。

UPDRS運動スコア悪化の原因が、パ病のどんな症状なのかを明らかにするため、UPDRS,Part3の18から31の項目を体軸症状(A:Axial)、左半身の症状(L:Left)、右半身の症状(R:Right)の3群に分け、症例毎の運動スコア変化を観察した。

一側視床凝固を行った4例のスコア変化を図2に示す。このグラフでは、左視床凝固を行った場合を右側治療例(Rt. side treated)と表した。追跡期間にばらつきがあるため、統計的な観察を行うことはできなかったが、各症例共に凝固術後、治療側のスコアは激減して、その傾向は長期にわたりよく維持されていた。数年後に運動スコアの悪化をきたす要素は、対側(非治療側)の症状が表れてくる場合(症例2)と、新たに体軸症状が出現してくる場合(症例1と3)があった。

一側凝固後に二期的に両側STN-DBSを行った2例では、凝固後に残存していた対側の症状や体軸症状に対してDBSの効果がみられた(症例6)(図3)。

視床に対するDBS術後の経過は(図4)、凝固術後の経過に類似しており、治療側の振戦は長期にわたりよくコントロールされているにもかかわらず、対側の症状や体軸症状が徐々に出現する為に、UPDRSが上昇する傾向があった。対側症状の出現に対しては、二期的な視床DBSが著効を示した

が(症例7)、術後5年の経過で、体軸症状が顕著となって、ADLが障害されていた。

#### D 考察

視床をターゲットとした振戦や固縮に対する定位脳手術の効果は長期にわたって持続することが報告されている。しかし、1側の視床手術で一端ADLの改善がえられた症例でも、パ病の進行にともない、徐々に非手術側の症状や体軸症状が進行して、4～5年の経過でUPDRS運動スコアが増加する傾向が明らかとなった。スコアを増やしている症状が対側の振戦、固縮であれば、未手術側視床のDBSを追加することで、再びADLの改善が得られていたが、病状の進行によって生じた症状が体軸症状の場合には、やはりパ病の症状全般に対して効果のあるSTN-DBSが必要と思われた。症例6の様に、二次的なSTN-DBSの追加で、UPDRS運動スコアが著明に改善した事例もあるので、一回の定位脳手術が治療のゴールではない事を再認識した。

Rodriguez-OrozらのSTN-DBS術後の効果を調べた多施設共同研究では、UPDRS総運動スコアのなかでも振戦に関連するスコアが著減しており、振戦を含めてパ病に対する定位脳手術のターゲットはSTNが主流になりつつある。しかし、全般的なParkinson病の症状を改善させることができる、視床下核背側に限局した刺激では、振戦が十分抑制できないこともあるので、我々は最近視床凝固とSTN-DBSの同時手術を行い(図5、6)、より長期にわたるUPDRS運動スコアの改善を経験した。複数のターゲットに対して、異なる処置を行う手術は、パ病に対するAADC遺伝療法にも、朗報であ

り、将来DBSや視床凝固と遺伝子治療の組み合わせも考慮される日が期待される。一側の振戦が有意な症状であれば、当該側の視床凝固と、遺伝子治療を同時に行い、数年後の体軸症状に備えたり、DBS後の効果が減弱したときの切り札とする事ができる。我々の提唱しているAADC遺伝子を組み込んだAAVベクターを被殻に入れるという手技は比較的容易であり、充分安全に行い得る方法である。しかも、AADC単独の効果が発現しても、外部からのl-dopa投与を行わない限り、過剰な運動反応を呈することはないので、コントロール可能である利点をいかに、視床手術時に、遺伝子注入を行っておき、将来の症状悪化時に、改めてl-dopa療法を開始するような治療計画も検討されるべきと思われた。

#### E 結論

主たる症状が振戦・固縮のパ病に対して行った9例の定位脳手術後経過を検討した。手術対側の症状は著明な改善を認めたが、4～5年の経過を経て、パ病の対側や体軸症状が出現して、運動スコアを悪くする傾向があった。経過中に生じるこれらの症状に対して、視床手術と同時に行うSTN-DBSが有効であったことをふまえて、将来の遺伝子治療を現在外科的治療の主流となっている凝固術またはDBS療法と組み合わせる方法も考えられた。

#### F 健康危険状況

なし

#### G 研究発表

1) 小泉唯子、加藤正哉、渡辺英寿「ドパミ

ン依存患者における外科的治療の適応」第  
23回関東機能的脳外科カンファランス、  
2006.9.2、東京

2) 小泉唯子、加藤正哉、菊地千一郎、藤  
本健一、渡辺英寿「近赤外線光トポグラ  
フィーを用いた STN-DBS 中の局所脳血流  
測定」第65回日本脳神経外科学会総会、  
2006.10.18-20、京都

3) 加藤正哉、小泉唯子、渡辺英寿「パー  
キンソン病の振戦に対する視床手術後  
の追跡と問題点」第65回日本脳神経外  
科学会総会、2006.10.18-20、京都

H 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

表1 Stereotactic surgical cases for Parkinson's disease

• May 2000 - Dec 2006	74
• Target	
- Thalamus (Tremor dominant)	
• Vim thalamotomy	7
• Vim stimulation	3
- Subthalamic nucleus (Akinesia with motor fluctuation)	
• STN-DBS	59
- Globus pallidus int.	0
- Combination (Advanced symptoms with tremor)	
• Vim thalamotomy + STN-DBS	5

表2 UPDRS Part III (Motor examination)

- 18 speech
- 19 facial expression
- 20 tremor at rest (face, Rt/Lt, hand/foot)
- 21 action tremor of hand (Rt/Lt)
- 22 rigidity (neck, Rt/Lt, hand/foot)
- 23 finger taps (Rt/Lt)
- 24 hand movements (Rt/Lt)
- 25 rapid alternating mov. of hands (Rt/Lt)
- 26 leg agility (Rt/Lt)
- 27 arising from chair
- 28 posture
- 29 gait
- 30 postural stability
- 31 body bradykinesia

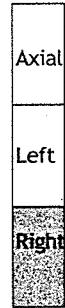


图1 Post-operative Progresses of the UPDRS score (Part III: motor)

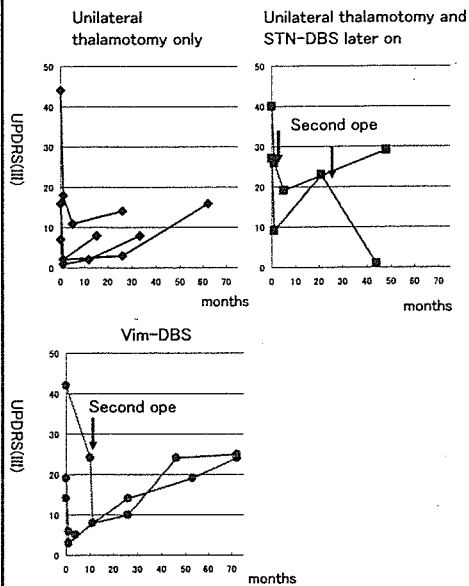


图2 Unilateral thalamotomy only

