

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：ヒトゲノムテーラーメイド研究

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中野 今治

平成20(2008)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-----	7
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-----	10
村松 慎一	
3. 定位的被殻内ドパミン合成酵素遺伝子注入術 —AADC 発現 AAV ベクターによるパーキンソン病の遺伝子治療—-----	13
加藤 正哉	
4. FMT—PET によるパーキンソン病の画像診断-----	17
佐藤 俊彦	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	20
--------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	24
----------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業：ヒトゲノムテーラーメイド研究）
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

主任研究者 中野今治 自治医科大学医学部内科学
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てその安全性を判定し、かつ本手法の有効性を 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的とする。

黒質のドパミン産生ニューロンは線条体に投射して、そこでドパミンを放出する。パーキンソン病は、黒質ニューロンの脱落に伴って線条体でドパミンが不足することにより発症する。病初期には L-DOPA 内服により症状が改善するが、進行期には芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素 (aromatic L-amino acid decarboxylase: AADC) の活性が著しく低下するために L-DOPA がドパミンに変換されず、効果が減弱する。この知見に基づいたパーキンソン病遺伝子治療戦略として、AADC 遺伝子を線条体の神経細胞に導入する手法の有効性が考えられる。申請者らは、アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) ベクターによるドパミン合成系酵素の遺伝子をパーキンソン病モデルサルに導入し、この手法の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計画」を立案した。本研究は、自治医大 IRB および厚生科学審議会科学技術部会での審議を経て、平成 18 年 10 月 31 日に厚生労働大臣により承認された。

この承認を踏まえて、平成 19 年 5 月 7 日に本邦における初めてのパーキンソン病遺伝子治療を実施した。症例は 50 歳代の進行期パーキンソン病患者で、全身麻酔下に両側被殻に AAV-AADC 3×10^{11} ベクターゲノム (容量 200 μ l) を注入した。また、平成 19 年 7 月 23 日には同じ治療を 2 例目に対して行った。

2 例とも、抗パーキンソン病薬を併用する本治療により症候が改善し、Hoehn-Yahr 重症度分類では、off 状態の重症度が術前の 4 から治療 6 カ月後には 2.5 に改善した。また、2 例とも治療 6 カ月後に実施した 6- 18 F fluoro-L-*m*-tyrosine (FMT) をリガンドとした PET (FMT-PET) に於いて注入部位での導入遺伝子の発現が観察された。第 1 例では特段の有害事象が見られなかったが、第 2 例では、静脈性と推測される遅発性出血が右前頭葉皮質下白質で認められ、左手の不使用方法などの前頭葉症状や軽度の左片麻痺が出現した。しかし、これらの症候は改善し、現在はみられなくなっている。

パーキンソン病遺伝子治療を我々と同様のプロトコールで行っている UCSF でも 9 例中 2 例

で脳出血が認められた(1例は無症候性静脈性出血、1例は動脈性出血で右片麻痺が出現したもののほぼ治癒)ため、FDAによる調査と研究の一時差し止めが行われたが、UCSFのIRBでの審議を経て平成19年12月に再開が許可された。我々も、UCSFの有害事象例と共に第2例の有害事象(遅発性左前頭葉白質出血)を厚労省に報告し、研究を見合わせた後、米国での状況を睨んで、厚労省の指導を受けながら現在再開への準備を進めている。

一方、本態性振戦の患者や多数のパーキンソン病患者にFMT-PETを行い、前者では線条体全体でAADC活性が確認されたのに対して、後者では被殻後方部を主体に活性低下が認められ、本手法の信頼性が確認された。

ヒトの臨床研究と併行して、パーキンソン病モデルサルを使用した研究を行い、長期的な有効性と安全性を確認した。特に ^{11}C L-dopaを使用したPET計測により遺伝子導入6年後にもAADC遺伝子の発現が持続していることを確認した。

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

准教授

加藤正哉

自治医科大学医学部

准教授

佐藤俊彦

宇都宮セントラルクリニック

代表

A. 研究目的

本研究は、進行期パーキンソン病患者の被殻に、AADC遺伝子を組み込んだ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、パーキンソン症候の改善効果

についても検討する。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、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、そこでドパミンを放出する。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つとして浮かび上がってくる。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ベクターを注入する前臨床試験を行い、その方法の有効性と安全性を確認してきた。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重症パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究計画」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(3×10^{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(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 $50 \mu\text{l}$ 、1例当たり $200 \mu\text{l}$ である。

本治療法の安全性は、実施患者を細心の注意を払って治療観察し、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重症度分類、日常生活動作評価のためのSchwab & England Scale、Four Timed Testingを治療の前後で実施し、比較検討することで行う。患者のビデオ撮影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FMT-PETを行う。これとMRI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(9×10^{11} ベクターゲノム)に増やして第2群3症例に実施し、第1群と同様な評価を行う。なお、臨床レベルのAAVベクターと注入用装置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社から我々に既に供給されている。

さらに、PDモデルサルを使用した研究を行い、 $[^{14}\text{C}]$ L-dopaを使用したPET計測により長期的な効果と安全性を評価した。

C. 研究結果

1. 臨床研究実施に向けての準備

Genzyme社との間で2回のテスト・シンプメントを滞りなく行った後、同社から平成19年春にGMPレベルの治療用ベクターと注入装置を輸入した。

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、稼働テストの後、パーキンソン病患者や本態性振戦などの症例で実施された。前者では被殻後部でのAADC活性が低下しているのに対して、後者では高いAADC活性が線条体全体で認められ、本手法がパーキンソン病の診断や導入遺伝子の発現検索に有用であることが確認された。

2. パーキンソン病患者での遺伝子治療実施

自治医科大学神経内科ホームページや外来待合室などで本治療希望患者を募り、臨床研究担当医師とコーディネーターによる詳細な説明を行って、インフォームドコンセントを得た。治療前の診察と諸検査を実施し、2007年5月7日に第1例に実施した。次いで、同年7月23日に第2例の治療を行った。

3. 安全性と有効性の評価

1) 第1例：治療に伴う特段の有害事象は臨床的にも画像上も認められなかった。術前に認められていた off 状態の時間帯が無くなり、Hoehn-Yahr パーキンソン病重症度分類では off 時のそれは術前が 4 に対して治療 6 か月後には 2.5 と明らかに改善した。また、FMT-PET では、術前の画像に比して 6 か月後の画像に於いて、遺伝子注入部位での AADC 活性の増加が確認された。

2) 第2例：手術終了当日の脳 CT では脳出血は見られなかったが、4 日後の頭部 MRI および 5 日後の頭部 CT で左前頭葉皮質下白質(カテーテル経路に相当する部位)に静脈性と考えられる脳出血が認められた。治療ベクターを注入した被殻には特段の異常は観察されなかった。左上下肢の軽度の麻痺が見られ、左手の不使用方法や強制把握などの前頭葉症候も認められた。出血に伴う脳浮腫も認められたため、抗浮腫薬を投与し、リハビリテーションを行うことでこれらの症候はほぼ消失し、2007年9月7日に徒歩退院した。画像上は出血も吸収された。出血に関連した症候の軽減と併行するようにパーキンソン病症候に改善が見られるようになり、Hoehn-Yahr のパーキンソン病重症度分類では off 時のそれは術前が 4 であったのに対して治療 6 か月後には 2.5 と明ら

かに改善した。また、FMT-PET では 6 か月後でも遺伝子注入部位での AADC 活性の増加が確認された。

3) 治療に伴う脳出血について：我々と類似のプロトコールで遺伝子治療が先行実施されている UCSF に於いて、第 5 例で無症候性の皮質下白質の静脈性出血、第 9 例で術中に皮質下白質の動脈出血が出現した。自治医大での第 2 例の静脈出血も含めた 3 例の脳出血について、それぞれのチームで検討を行い、かつ UCSF、Genzyme 社および我々で国際テレビ会議を実施し、出血原因を討議した。いずれの症例に於いてもベクター注入部位である被殻には画像上異常が見られないことと出血がいずれもカテーテルの刺入経路に当たることとから、この出血は導入した遺伝子自体に拠るものではなく、定位脳手術と関連したものであろうとの結論に達した。

この有害事象に基づいて、FDA から UCSF と Genzyme 社に対して臨床研究の見合わせとプロトコール改訂の指導があった。両者はそれに応じてプロトコールを改訂し、UCSF の IRB の審議を経て、平成 19 年 12 月、再開が許可された。臨床研究を見合わせていた自治医大でも、UCSF でのこのような動きを受けて、厚生労働省の指導のもと、再開の準備を進めている。

なお、脳出血回避策として今後の手術では、ガイド針を使用することと、注入用カテーテルを長時間同一部位に静置せず、わずかずつ引き抜くことにした。

4. パーキンソン病モデルサルでの実験

遺伝子導入した 3 頭のモデルサルは、特に合併症を生じることなく、各 7 年、5 年、2 年間以上生存した。1 頭について、遺

伝子導入6年後に行ったPET計測では、遺伝子導入側の被殻で ^{11}C L-dopaの集積の増加が認められた。また、もう1頭については遺伝子導入2年6か月で組織解析を行い、抗AADC抗体に陽性となる神経細胞が導入側の被殻で多数認められた。

D. 考察

平成18年10月31日に出された厚生労働大臣の認可に応じて、平成19年に2例のパーキンソン病患者に遺伝子治療を実施した。第2例では遅発性静脈性皮質下出血が生じたものの、2例ともベクター注入部位である被殻にはMRIにて特段の異常は観察されず、導入遺伝子そのものの安全性に関しては現在までのところ問題はないと考えられる。この点は、先行しているUCSFの事例からも考えられるところである。

有効性に関しては、まず2例とも治療6か月後のFMT-PETに於いて、線条体注入部位でAADCの活性の増大が認められ、導入遺伝子が6か月後も発現していることが確認された。また、治療効果については、2例ともoff時におけるHoehn-Yahrの重症度分類が術前の4から治療6か月後には2.5と軽減しており、本手法により服用したL-DOPAが効率よくドパミンに変換されるようになったことが推測され、本治療が有効である可能性が示されている。第3例と第2群（高用量群）での結果が待たれるところである。

UCSFで2例、自治医大で1例の手術関連脳出血が発現した。UCSFでは局所麻酔下で手術をしている。第2例では手術中に発話による反応がなくなり、右肩麻痺が出現したことから直ちに脳CTを撮ったところ、左

大脳半球白質の約8cm X 2 cm X 4.5 cmの出血が認められた。この出血は、定位脳手術に於いてまれに見られる、カテーテルによる動脈損傷によるものと考えられる。また、UCSFの他の1例は無症候性の皮質下白質の出血、自治医大の脳出血症例は症候性であるもののやはり皮質下白質の遅発性出血であり、この2例は静脈性出血を生じたものと考えられた。この種の静脈性出血は、パーキンソン病のDBS例でも時に認められることが今回判明し、手術手技に伴うものであることが予想される。

なお、自治医大では今後の症例に対しカテーテル刺入前にガイド針を使用することと、カテーテルをごくわずかずつ引き抜くことによりそれを長時間静置するのを避けることとで、静脈性脳出血の回避に努めることになった。

UCSFでは、2例の脳出血例発生の後、FDAの指示に応じて研究を見合わせていた。再開の結論はUCSFのIRBに託されていたが、平成19年12月にそこから再開の許可が出された。自治医大でも厚生労働省の指導に従って本臨床研究を見合わせていたが、UCSFの再開許可を踏まえて研究再開を申請すべく準備中である。

E. 結論

進行したパーキンソン病患者2例にAAV-AADCを定位脳手術的に被殻に注入する遺伝子治療を実施した。

2例とも、抗パーキンソン病の併用により治療6か月後でもパーキンソン病症候の改善が認められ、同じく治療6か月後のFMT-PETでは導入遺伝子の発現が観察された。

第2例では遅発性静脈性皮質下出血が認められたが、その症候は消失した。UCSFと自治医大での有害事象発現に伴って両施設で臨床研究を見合わせていたが、UCSFで再開が許可されたことを受けて、自治医大でも再開申請の準備中である。

今後、手術に伴う脳出血を回避する対応策を講じた。

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. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shimazaki H, Sakoe K, Niijima K, Nakano I, Takiyama Y: An unusual case of a spasticity-lacking phenotype with a novel SACS mutation. Journal of the Neurological Sciences 255: 87-89, 2007.

2) Ishikawa T, Morita M, Nakano I: Constant blood flow reduction in premotor frontal lobe regions in ALS with dementia - a SPECT study with 3D-SSP. Acta Neurol Scand 116: 340-344, 2007.

3) Shimazaki H, Ando Y, Nakano I, Dalmau J: Reversible limbic encephalitis with antibodies against the membranes of neurons of the hippocampus. Joournal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 78: 324-325, 2007. (March2007, Vol.78)

2. 学会発表

1) 田代邦男、中野今治：座長の言葉。シンポジウム「西太平洋地域の筋萎縮性側索硬

化症/パーキンソン痴呆複合 (AKS/PDC) と関連神経変性疾患. 第48回日本神経学会総会、名古屋、2007年5月16-18日 (プログラム・詳録集 p.131)

2) 藤本健一、川上忠孝、中野今治、加藤正哉、小泉唯子、渡辺英寿：視床下核脳深部刺激とドパミン調整異常症候群. 第48回日本神経学会総会、名古屋、2007年5月16日 (プログラム・詳録集 p.145)

3) 浅利さやか、村松慎一、西田紘子、奈良優子、滝野直美、肖 エ忠、岡田尚巳、松下 卓、小澤敬也、中野今治：Oligodendrocyte を標的とした AAV ベクターの開発. 第48回日本神経学会総会、名古屋、2007年5月18日 (プログラム・詳録集 p.320)

4) 大西理文、佐藤俊彦、村松慎一、中野今治、泉田龍男：FMT-PET によるパーキンソン病の画像診断及び解析について. 第47回日本核医学学術総会、仙台、2007年11月4日-6日 (核医学 44 (No. 3) : 330, 2007) (2007年10月号)

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(創薬基盤推進研究事業:ヒトゲノムテラーメード研究)

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 自治医科大学医学部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 AAV ベクターのキャプシドに対する中和抗体価に関して検討を行った。特に今後様々な応用が期待される8型 AAV に対して測定法を改良し検出感度を高めた。また、8型 AAV の感染効率がソルビトール存在下で増強することを見出した。これらの成果は中和抗体の力価と治療効果との関係を明らかにする上で役立つとともに、AAV ベクターの有用性をより高めることに繋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などについては十分に明らかにされていない。また、2型以外の血清型のベクターに関しては中和抗体の検出法は確立しておらず、検出感度も不十分と考えられている。今回は有用性の高い8型に関して、中和抗体の検出法につき種々の検討を行った。また、細胞への DNA 取り込みを促進することが知られている高浸透圧刺激が AAV ベクターの感染効率に与える影響につき検討した。

B. 研究方法

1. 中和抗体検出法に関する検討: これまでに実施した2型の AAV ベクターに対する中和抗体検出法の成果から、i) 検出法として従来法に代わり 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繋がるかどうかにつき検討した。

2. ベクターの感染効率増強に関する検討: 0-5%のソルビトール存在下で、8型 GFP 発現 AAV ベクターを培養 293 細胞に細胞あたり 30,000 ベクターの用量で感染させ、GFP の発現を経時的に観察した。

(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(8型)の感染細胞に関する探索では、肝臓由来のHuh-7細胞を用いた場合に従来使用している293細胞の場合とほぼ同等の結果が得られた。iii) Huh-7または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(3-10倍程度)。以上の結果から、中和抗体の検出感度を10倍以上高めることができた。

2. ベクターの感染効率増強に関する検討: ソルビトールを加えない場合には8型ベクターの感染効率は低く、感染後2日でGFP陽性細胞は約10%であったが、ソルビトールを2-3.5%加えたときにはほぼ100%の陽性率を示した。また、個々の細胞のGFP強度も増強した。以上の効果は感染後7日にわたって認められた。尚、ソルビトール濃度を4%以上にすると細胞に悪影響があり、結果的に生存GFP陽性細胞数は減少した。

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、用いる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課題が残されている。これらの点に関しても、中和抗体価の鋭敏な測定系が確立することで、より正確な評価が可能となることが期待される。8型は静脈内投与によっても中枢神経系への遺伝子導入が見られるなどの特徴を有しており、今後実用化へ向けての展開が期待される

また、ソルビトールにより8型AAVの感染効率が増強されることが分かった。発現が早期より観察されることから、AAVベクターの取り込みもしくは細胞内でのプロセッシングの促進効果があるものと推察される。今後は本現象の作用機序を明らかにするとともに、中和抗体測定系における有用性についても検討していきたい。なお、ソルビトールは既に医薬品添加剤として認可されており、有効な濃度が生体に安全であることが判明すれば臨床応用への採用も比較的容易と思われる。

E. 結論

8型AAVに関して中和抗体価の測定法を改良するとともに、臨床応用を視野に入れて感染効率の増強効果につき検討した。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)

Nonaka-Sarukawa, M., Okada, T., Ito, T., Yamamoto, K., Yoshioka, T., Nomoto, T., Hojo, Y., Shimpo, M., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K.: Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats. *J Gene Med*, *in press*.

Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Sheykholslami, K., Nomoto, T., Muramatsu, SI., Mizukami, H., Kume, A., Xiao, S., Ichimura, K., Ozawa, K.: Protection Against Aminoglycoside-induced Ototoxicity by Regulated AAV Vector-mediated GDNF Gene Transfer Into the Cochlea. *Mol Ther*, *in press*.

Ito, T., Okada, T., Miyashita, H., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Maeda, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K.: Interleukin-10 expression mediated by an adeno-associated virus vector prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ Res* 101: 734-41, 2007.

Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Miyashita, H., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Sakata, Y., Shimada, K., Ozawa, K.: Adenoassociated virus-mediated prostacyclin

synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats. *Hypertension* 50: 531-6, 2007.

Liu, Y., Okada, T., Nomoto, T., Ke, X., Kume, A., Ozawa, K., and Xiao, S.: Promoter effects of adeno-associated viral vector for transgene expression in the cochlea in vivo. *Exp Mol Med* 39: 170-175, 2007.

H. 知的財産権の出願・取得状況
該当なし

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

神経内科学部門 准教授

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7年、5年、2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。遺伝子導入6年後に実施した positron emission tomography (PET) 計測で、導入した遺伝子の発現が認められた。

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 I/II 相臨床研究の前臨床研究として、カン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頭を使用し、これらの AAV ベクターを2000年9月20日、2003年1月22日、2005年2月2日に左側の被殻に注入した。1頭目には、AAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCH

の3種類のベクターを混合し、各 1.5×10^{11} vector genome (vg) を投与した。2頭目には、 4.35×10^{10} vg の AAV-AADC のみを投与した。3頭目には、AAV-loxP-TH, AAV-AADC, AAV-GCH の3種類のベクターを混合し、各 3.4×10^{10} vg, 5.4×10^{10} vg, 5.0×10^{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。 $[^{14}\text{C}]$ -L-dopa をリガンドとする positron emission tomography (PET) 計測を実施し、1頭については、脳組織を免疫染色により解析した。

C. 研究結果

遺伝子導入したモデルサルは、特に合併症を生じることなく、各7年、5年、2年間以上生存した。TH, AADC, GCH の3種類の酵素遺伝子を導入した2頭では、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。このうち1頭について、遺伝子導入6年後に行ったPET計測では、左側の被殻で ^{11}C L-dopaの集積の増加が認められた。また、もう1頭については遺伝子導入2年6か月で組織解析を行い、抗TH抗体と抗AADC抗体に陽性となる神経細胞が左側の被殻で多数認められた。

AADCのみ遺伝子導入した1頭は、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7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。さらにPET計測により、導入した遺伝子の発現が6年後にも持続していることを示した。組織学的にも2年6か月後に遺伝子発現が認められた。現在、2頭が生存しており今後も引き続き評価を行う。

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. *J Neurosci Res*, 85(8):1752-1761, 2007.
2. 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 α -synuclein in mice. *Neurobiol Aging*, *in press*.

2. 学会発表

1. 村松慎一, 古寺美加, 奈良優子, 滝野直美, 西田紘子, 中野今治, 奥野剛, 小西奈依, 道端英雄, 鈴木豊, 近藤靖, 仁藤新治: 自殺遺伝子を導入したより安全な移植用ES細胞の開発. 第48回日本神経学会総会, 名古屋, 2007年5月17日.(プログラム p111)
2. 浅利さやか, 村松慎一, 西田紘子, 奈良優子, 滝野直美, Xiao Wei-zhong, 岡田尚巳, 松下卓, 小澤敬也, 中野今治: Oligodendrocyteを標的としたAAVベクターの開発. 第48回日本神経学会総会, 名古屋, 2007年5月18日.(プログラム p150)
3. Muramatsu S, Nishida H, Nara Y, Takino N, Asari S, Kodera M, Xiao W-Z, Sasaki Y, Kikuchi S, Matsushita T, Okada T, Hoshi M, Nakano I and Ozawa K: AAV8 vectors transduce oligodendrocytes efficiently, 10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy, Seattle, June 2, 2007. (*Mol Ther* Vol.5, Sup1, S319)
4. Muramatsu S, Ono F, Takino N, Nishida H, Asari S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Tsukada H, Terao K,

- Ozawa K and Nakano I. Long-term behavioral recovery in a primate model of parkinson's disease after gene transfer of dopamine-synthesizing enzymes. The Japan society of gene therapy's 13th annual meeting. Nagoya, June 29, 2007.
5. 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療. 日本病院薬剤師会関東ブロック第37回学術大会, 宇都宮, 2007年8月26日. (要旨集 p67)
 6. 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療. 第15回九州・山口機能神経外科セミナー・特別講演, 福岡, 2007年9月2日. (プログラム p36)
 7. Muramatsu S, Ono F, Takino N, Nishida H, Asari S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Tsukada H, Terao K, Ozawa K and Nakano I: Long-term recovery in a primate model of Parkinson disease after gene transfer of dopamine-synthesizing enzymes. *Neurosci Res*, 58(1): S58, Yokohama, Sept 11, 2007.
 8. Asari S, Nara Y, Nishida H, Takino N, Kodera M, Xiao W-Z, Sasaki Y, Kikuchi K, Matsushita T, Okada T, Hoshi M, Ozawa K, Nakano I and Muramatsu S : Efficient transduction of oligodendrocytes with AAV8 vectors. *Neurosci Res*, 58(1): S68, Yokohama, Sept 11, 2007.
 9. Sakane H, Sumi-ichinose C, Kojima M, Aso Y, Muramatsu S, Nakano I, Ozawa K, Nomura T, Nagatsu I, Nagatsu T, Metzger D, Chambon P and Ichinose H : Delayed reduction of the protein level in the striatum after genetic ablation of the tyrosine hydroxylase gene in the substantia nigra. *Neurosci Res*, 58(1): S138, Yokohama, Sept 11, 2007.
 10. 村松慎一, 小野文子, 滝野直美, 西田紘子, 浅利さやか, 池口邦彦, 藤本健一, 塚田秀夫, 寺尾恵治, 小澤敬也, 中野今治: パーキンソン病モデルサルにおけるドパミン合成系酵素遺伝子導入の長期効果. 第30回日本神経科学大会, 横浜, 2007年9月11日. (プログラム p114)
 11. 浅利さやか, 西田紘子, 奈良優子, 滝野直美, 古寺美加, Wei-ZhongXiao, 佐々木康郎, 菊地哲, 松下卓, 岡田尚巳, 星美奈子, 小澤敬也, 中野今治, 村松慎一: 8型AAVベクターによる乏突起細胞へ高効率遺伝子導入. 第30回日本神経科学大会, 横浜, 2007年9月11日. (プログラム p124)
 12. 村松慎一, 浅利さやか, 藤本健一, 中野今治, 大西理文, 永嶋聖治, 佐藤俊彦, 村田寿, 泉田龍男, 塚田秀夫: パーキンソン病遺伝治療におけるPETの応用. 第23回ブレイン・ファンクション・イメージング・カンファレンス, 神戸, 2007年9月22日. (プログラム p12)
 13. Muramatsu S, and Nakano I: Gene therapy for Parkinson's disease. JMU 21st Century COE Program The 4th Nikko International Symposium, Nikko, September 29, 2007. (abstract p29)
 14. 大西理文, 佐藤俊彦, 村松慎一, 中野今治, 泉田龍男: FMT-PETによるパーキンソン病の画像診断及び解析について. 第47回日本核医学会学術総会, 仙台, 2007年11月6日. (核医学 44(3) pS252)
- H. 知的財産権の出願・取得状況
なし

定位的被殻内ドパミン合成酵素遺伝子注入術
—AADC 発現 AAV ベクターによるパーキンソン病の遺伝子治療—

分担研究者 加藤正哉 自治医科大学医学部
脳神経外科学 准教授

研究要旨

パーキンソン病患者の線状体に芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) を導入してその活性を回復させる遺伝子治療を 2 例に行った。AADC 遺伝子の注入部位は、6-[¹⁸F]fluoro-L-*m*-tyrosine (6-FMT) をリガンドとする PET 画像を撮影し、6-FMT 集積が著しく低下している被殻背外側部とした。手術には通常の定位脳手術装置を使って、被殻が直接描出された 1.5T-MRI T1 強調画像を用いた。被殻の同定は、3T-MRI で周囲大脳白質との間により鮮明な境界が確認されたが、穿刺針挿入点を定める目的では、1.5T-MRI と CT 画像を用いた通常の定位脳手術手技により、安全に線状体内に治療用遺伝子を導入することができた。

A. 研究目的

進行したパーキンソン病（パ病）患者の線状体（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、脳内への遺伝子導入を確実に行う為の手術手技を、従来の手術法をもとに検討する。

B. 研究方法

2007 年 5 月及び 7 月に行われた 2 例の定位的被殻内ドパミン合成酵素遺伝子注入術

において、術前に撮影した 3T-MRI STIR-3D 画像と 6-[¹⁸F] fluoro-*m*-tyrosine (FMT) をトレーサーとした AADC 活性を画像化した FMT-PET 画像を重ね合わせた画像から、被殻内の AADC 活性低下部位を同定し、その中の 2 カ所を標的とした脳内遺伝子注入を行った。術中に、定位脳手術支援ソフトウェア StereoPlan を用いて、標的間距離を算出して、再度 FMT-PET 画像との比較を行った。

C. 研究結果

3T-MRI による被殻の同定は、T1 強調、T2 強調、PD 強調、FLAIR、STIR のいずれの撮像法でも周辺大脳深部白質との境界が明瞭

で、容易であった。FMT-PET 画像との重ね合わせは、同一の検査台を用いた撮像システムにより機械的に行ったが、定位脳手術支援ソフトウェアへの画像取り込みは今回行わずに、別途撮影した 1.5T-MRI Gd 造影 T1 強調像を用いた。被殻の同定は通常の定位脳手術の際に用いている 1.5T-MRI Gd 造影 T1 強調像でも、3T-MRI 画像と遜色なく行うことができた。

今回治療対象となった 2 症例の左右被殻内における AADC 遺伝子注入部位間距離は、17.3mm と 11.7mm、及び 10.2mm と 10.4mm であり、いずれの注入点も被殻内の背外側寄り、参照した FMT-PET 画像上、AADC 活性の低下した部位に一致していた。それぞれの遺伝子注入目標点の脳表からの距離は、症例 1 では左被殻内で 52.7mm と 46.9mm、右被殻内で 53.3mm と 49.9mm で、症例 2 では同じく左被殻が 46.3mm と 49.4mm、右被殻が 57.1mm と 54.3mm であった。この結果より、FMT-PET 画像を参照として、通常の CT 及び 1.5T-MRI T1 強調像を用いた画像誘導定位脳手術支援装置により注入部位を決定する方法により、被殻内で AADC 活性が低下した十分離れた 2 カ所に、遺伝子を導入する事が可能であった。

D. 考察

3T-MRI は現在臨床的に広く用いられている 1.5T-MRI に比べ、磁場強度が高い為高い SN 比を有しており、高分解能画像や高時間分解能が必要な dynamic study を行う事が可能である。また高い傾斜磁場をかけ

る事ができるので、RF 照射精度からくるメリットとして、THRIVE (T1)・VISTA (T2) 等の 3D-volume imaging を得ることが可能になった。正確な 3D 画像は、定位脳手術などの画像誘導治療において、計画から実施のすべての課程で目標決定を容易にする事が期待されている。

今回の AADC 遺伝子導入手術に於いても、FMT-PET 画像を重ね合わせた 3T-MRI 3D 画像を用いて定位脳手術の目標点を決定する試みを計画したが、3T-MRI で撮像した DICOM 画像ファイルを、我々が使用している定位脳手術支援ソフトウェアで取り込む事ができず、やむなく参照画像という形で使用に留まった。画像取り込みができなかった理由は、3T-MRI の画像ファイルに付けられているタグが、従来のものと異なる形式であった事が明らかになっているので、今後はソフトウェアのバージョンアップなどにより、改善されると思われる。

3T-MRI 画像の定位脳手術への応用は、既に視床下核脳深部刺激術 (STN-DBS) の際に STN を直接描出する試みや、視床手術において、Tractus mammillo-thalamicus (Fasciculus Vicq d' Azyrii) を基準として、Vo. a. を同定する試みなどが進められているので、今後はこれらの手技を用いて行われた手術の術後成績の報告が待たれる所である。

E. 結論

3T-MRI に FMT-PET 画像を重ね合わせたイメージは、明瞭に描出される被殻内で AADC

活性の低下した部位を同定することが可能であり、AADC 遺伝子注入の目標点決定に有用であった。

実際の遺伝子注入定位脳手術では、従来より用いている 1.5T-MRI Gd 造影 T1 強調像でも被殻の同定は容易であったので、FMT-PET 画像を参照して、目標点を決定する事ができた。

G. 研究発表

1) 小泉唯子、加藤正哉、藤本健一、菊地千一郎、渡辺英寿 近赤外線光トポグラフィと SPECT を用いた STN-DBS 中の局所脳血流測定 第46回日本定位機能神経外科学会 2007/1/26-7 (福岡)

2) 加藤正哉、木村唯子、村松慎一、中野今治、小澤敬也、佐藤俊彦、渡辺英寿 定位的被殻内ドパミン合成酵素遺伝子注入術- AADC 発現 AAV ベクターによるパーキンソン病の遺伝子治療- 第66回日本脳神経外科学会総会 2007/10/3-5 (東京)

3) 小泉唯子、加藤正哉、渡辺英寿、川上忠孝、藤本健一 精神症状を呈するパーキンソン病患者に対する視床下核脳深部刺激療法の効果の検討 第66回日本脳神経外科学会総会 2007/10/3-5 (東京)

4) 加藤正哉、木村唯子、渡辺英寿、佐藤俊彦 3T-MRI を用いた定位的視床凝固術 第47回日本定位・機能神経外科学会 2008/1/25-26 (浜松)

図1 1.5T-MRI と 3T-MRI の画質の違い (左 1.5T、右 3T)

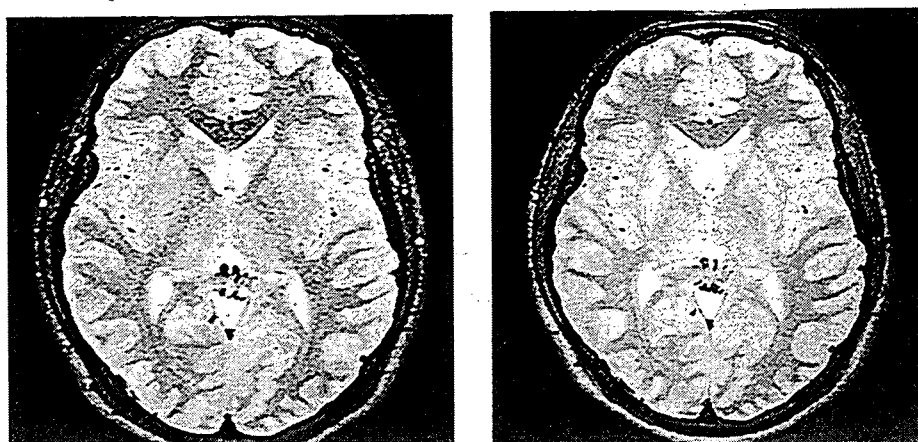
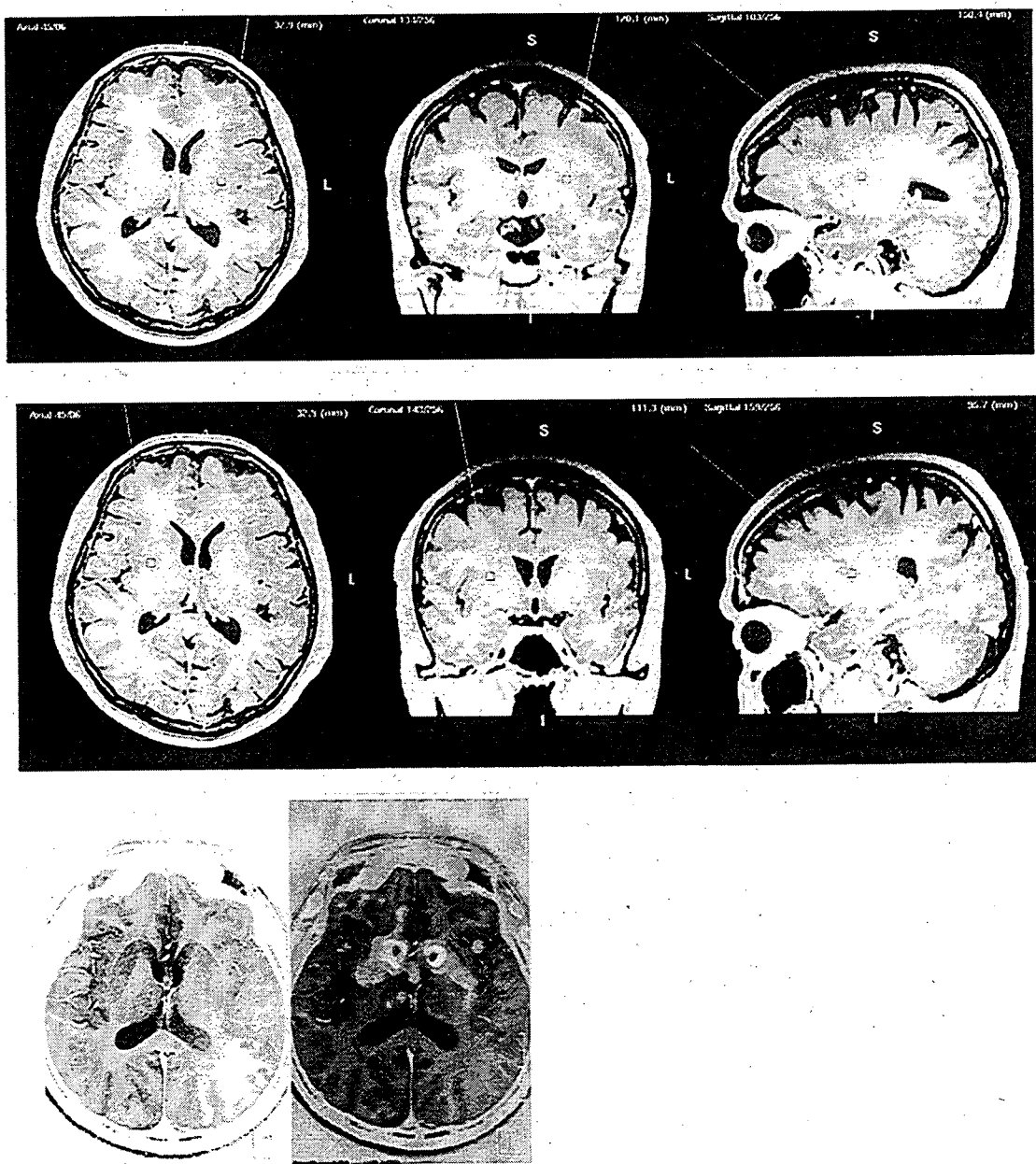


図2 症例1の AADC 遺伝子注入部位 (上段 左、中段 右、下段 FMT-PET 画像)



FMT-PET によるパーキンソン病の画像診断

分担研究者 佐藤 俊彦 宇都宮セントラルクリニック代表

研究要旨

パーキンソン病に対する遺伝子治療の適応を決定し客観的な効果判定を行うため、 $6-[^{18}\text{F}]\text{Fluoro-meta-tyrosine}$ (FMT)をリガンドとして使用した positron emission tomography(PET)による臨床検査と画像評価を行った。FMT は、線条体に存在する芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)によって代謝され脳内に蓄積するため、AADC の活性を反映する。遺伝子治療を行った2名を含む47名のパーキンソン病患者と、少数のパーキンソン症候群患者の画像を解析した。FMT の集積は、パーキンソン病では病初期より低下していること、AADC 遺伝子導入により回復しその効果は6か月後にも持続していることが確認された。

A. 研究目的

パーキンソン病の診断は、従来、パーキンソニズムと呼ばれる臨床症状が認められた場合にパーキンソン病治療薬を投与し、効果の有無により判断されることが多く、画像診断の判断基準としては、CT および MRI において特に画像所見を認めない場合とされてきた。

今回 FMT-PET により、遺伝子治療の適応を決定し客観的な効果判定を行うため、パーキンソン病とパーキンソン症候群の鑑別を試みるとともに、他のパーキンソニズムを呈する疾患を有する患者においても FMT-PET 検査を実施し、画像解析と評価を行った。

B. 研究方法

自治医科大学附属病院の外来患者で、パーキンソニズムを呈し、文書による同意を得たものを対象とした。内訳は、パーキンソン病 47 名（男性 20 名、女性 27

名、平均年齢 61.6 歳）、進行性核上性麻痺 (PSP) 7 名（男性 3 名、女性 4 名、平均年齢 69.7 歳）、多系統萎縮症 (MSA) 5 名（男性 1 名、女性 4 名、平均年齢 67.2 歳）、薬剤性パーキンソニズム 1 名（女性 1 名、75 歳）、本態性振戦 1 名（女性 1 名、81 歳）、生理的振戦 2 名（女性 2 名、53.5 歳）である。

FMT と競合し検査に影響を与える可能性のあるパーキンソン病治療薬は、検査前日夜より服用を止めた。検査当日には、末梢での AADC 代謝を低減させるため、検査前にカルビドーパを[体重 \times 0.1 錠](1 日最大量 8 錠)投与した。1 時間後に FMT を静脈より投与し、さらに 30 分後から PET-CT 装置を使用して撮影した。

解剖学的な脳部位の同定を容易にするため、3T-MRI により脳の撮像を実施した。使用シーケンスは、線条体を含む大脳基底核が比較的判別しやすい、プロトン密度強調画像系の IR-PD 強調画像である。

FMT-PET と 3T-MRI のデータにより、fusion 画像(重ね合わせ画像)を作成し解析を実施した。小脳を標準部位とし、小脳および被殻全てに ROI(関心領域)を設定し、10 分間に放出されたガンマ線のカウントを計測し、小脳に対する被殻のカウント比を求めた。

また、FMT 静注後 30 分から 40 分の間の画像を、静注後 50 分から 60 分の間の画像から差し引くサブトラクション処理を行い、経時的变化を確認した。

遺伝子治療対象患者においては、治療前後で、サブトラクション処理を実施し、治療効果を評価した。

C. 研究結果

①被殻背側の低集積

パーキンソン病・パーキンソン症候群および他のパーキンソニズムを呈する疾患を有する患者における FMT 集積は、被殻背側において低下していた。

②臨床所見と画像所見の関連

ほぼ全例で病側肢と対側の被殻の集積が低下し、同側被殻よりも低下の程度が強い傾向が認められた。

③他のパーキンソニズムを呈する疾患

進行性核上性麻痺(PSP)、多系統萎縮症(MSA)では、線条体において萎縮の程度に応じた低集積が認められた。本態性振戦と薬剤性パーキンソニズムでは集積低下は認められなかった。

④遺伝子治療前後の変化

2 例とも、治療 1 か月後に、被殻内に治療前に見られなかった新たなスポット状の集積が認められ、治療 6 ヶ月後の経過観察時にはスポットは消失し全体的に

集積が亢進していた。

D. 考察

パーキンソン病における変性は、被殻背側部に投射する黒質緻密部の腹外側から始まることが病理学的に知られており、今回の FMT-PET の結果は、このことを反映していると考えられる。また、パーキンソン病では、臨床症状の程度に左右差が認められることが多いが、FMT-PET でも臨床症状の重い側と対側の被殻において低集積を示していた。PSP および MSA では、被殻の細胞の脱落に伴い、黒質緻密部からの神経終末も脱落し、その結果、FMT の集積が低下すると推察される。

遺伝子治療例で認められたスポット状の集積増加は、ベクター注入部近傍で当初 AADC が高発現し、やがて被殻内で均等化した可能性が考えられる。

E. 結論

FMT-PET は、遺伝子治療の適応および効果判定のみならず、パーキンソン病の鑑別診断・病態評価に有用である。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

佐藤俊彦, 大西理文, 中野今治, 村松慎一, 泉田龍男:FMT-PET によるパーキンソン病の画像診断及び解析について。第 47 回日本核医学会学術総会(2007 年 11 月 6 日 宮城県仙台市 仙台国際センター)(抄録:核医学第 44 巻第 3 号 p330)