

200807010A

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中野 今治

平成21（2009）年3月

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中野 今治

平成21（2009）年3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.....	5
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.....	8
村松 慎一	
3. 脳内遺伝子導入による酵素誘導技術の現状と課題	11
加藤 正哉	
4. FMT-PET によるパーキンソン病の画像診断.....	14
佐藤 俊彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷.....	21

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

研究代表者 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

研究要旨

パーキンソン病(PD)は、線条体(被殻と尾状核)に投射している黒質緻密帯のドパミン合成細胞が緩徐進行性に変性脱落するために、線条体でドパミンが欠乏することで発症する。このドパミン不足を補うべくドパミン合成酵素の一つである芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素(AADC)の遺伝子(AADC)を搭載したアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター(AAV-hAADC-2)を、進行したPD6例の両側被殻に定位脳手術的に注入後、L-DOPAを経口投与する治療法を実施し、その安全性と有効性を評価した。注入したベクター自体による有害事象は見られず、安全性は高いと考えられた。また、治療後にはoff stateでの運動症候の明らかな改善とFMT-PET検査で導入遺伝子の長期発現が確認され、パーキンソニズムに対する治療効果も有する可能性が考えられた。

研究分担者

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
特命教授

加藤正哉

自治医科大学医学部
准教授

佐藤俊彦

医療法人DIC宇都宮セントラルクリニック
理事

A. 研究目的

進行したパーキンソン病(PD)患者の被投に、ド

パミン合成酵素の一つである芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素(AADC)の遺伝子(AADC)を搭載したアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター(AAV-hAADC-2)を注入して、その安全性を確認することを第一目的とし、併せて評価する有効性を第二目的とする。

B. 研究方法

対象は進行したPD患者6例である。GMPレベルのAAV-hAADC-2を両側被殻に全身麻酔下にて定位脳手術的に一次的に投与した。患者一人当たりのベクター総投与量は 3×10^{11} vector genome(200 μ l)で、一側被殻に2トラックで2箇所、左右で計4箇所に注入(1箇所当たり50 μ l, 1 μ l/分)した。

GMPレベルのAAVベクターは、類似の臨床研究を支援している米国Genzyme社から我々に供給された。ベクター注入はやはりGenzyme社より供給される専用の注入ポンプとカテーテルにて行った。

いずれの症例に於いても手術後には安全性と臨

床効果の評価を行った。安全性は、患者の症候(主として神経症候)と頻回の脳画像(MRI と CT)にて判定した。臨床効果は UPDRS、Hoehn-Yahr の重症度、症状日誌、Geriatric Depression Scale (GDS) の short form、Mini-Mental State Examination (MMSE) にて評価した。運動ニューロン症候の判定の際にはビデオ撮影を行って評価の客観性を保った。

導入した遺伝子の発現を経時的かつ客観的に判定するために、6-[¹⁸F]Fluoro-*l*-*m*-tyrosine (FMT)をリガンドとした FMT-PET 計測システムを構築した。この装置にて各症例の被殻での AADC 発現量を術前に調べて、手術 1 か月後、3 か月後、6 か月後に PET 計測を行って、診断の確度を上げ、導入した遺伝子の発現量と発現範囲を判定した。

導入した遺伝子の拡散の有無を判定するために、術後 3 日間連続して患者血液を採取してベクター DNA プローブを用いて PCR を行い、陰性であることを確認した。陽性の場合には陰性になるまで PCR を実施し、その間患者は個室に隔離した。

さらに、PD 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した。

倫理面への配慮

臨床研究実施に当たっては、厚生労働省の「遺伝子治療臨床研究に関する指針」を遵守する。かつ、症例毎に自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会 安全・効果評価・適応部会に治療前のデータを提示して承認を得、かつ治療後にも定期的に評価を受けて指導を得る。個人情報保護に関しては、個人情報保護法を遵守して厳格なプライバシー保護を図る。

小動物を用いた実験は、動物倫理面を含めて自治医科大学動物実験指針の規定に従って行う。筑波霊長類医科学研究センターおよび浜松ホトニクスにおけるサルの実験では、当該施設の動物実験指針を遵守する。

C. 研究結果

2007年5月7日に第1例の遺伝子治療を実施し、2008年9月22日に第6例の遺伝子治療を行って当初の予定症例数の治療を研究期間内に終了した。

予備的な解析では次のような結果が得られた。

1) 安全性に関して：ベクター自体による有害事象は認められず、脳画像上もベクターを注入した被殻部位には出血や MRI 上の信号変化は観察されなかった。1例(第2例)に於いて、右前頭葉の注入用カテーテルのトラックに相当する皮質下白質に遅発性の(手術終了時の脳 CT では見られず、4日目の MRI で同定された)出血が出現した。これに関連して、軽度の右片麻痺と右手の不使いが一過性に出現したが、2カ月で症候は消失した。これに関して脳外科医を含めて研究チームで討議し、3例目以降の手術では、トラックの途中まで先端の鈍なガイド針を用いることとした結果、3-6例目では有意の脳出血は認められなくなった。2) 臨床効果：off state に於いて motor function (UPDRS-III, Hoehn-Yahr 重症度で判定)の明らかな改善が認められ、6カ月の評価を終えた症例ではこの改善が持続していた。症状日誌では、服用する L-DOPA を増量しなくても on state 時間の増加が手術 6 か月後にも認められた。FMT-PET では、術 1 か月後の検査にてベクター注入箇所にて AADC 発現の明らかな増加が認められ、これは 6 か月後の PET でも確認された。3)ベクターの拡散に関して：いずれの症例でも血液 PCR ではベクター DNA は陰性、或いは極軽度陽性であったが、後者でも術後 3 日目までには陰性化した。

D. 考察

我々が実施した PD6 例に於いては導入されたベクター自体による有害事象は見られなかった。我々と同様に AAV-*hAADC-2* を定位脳手術的に被殻内に導入する治療法は、カリフォルニア大学サンフランシスコ校(UCSF)医療センターでも 10 例で実施され、ベクター自体による有害事象は観察

されていない。症例数は少ないものの両施設での結果を併せると、脳内に注入された AAV-hAADC-2 の高い安全性が推察される。

静脈性出血と推測される遅発性脳内出血が UCSF と我々の施設でそれぞれ 1 例ずつ、また、動脈性と考えられる出血が UCSF の別の 1 例で観察された。いずれの出血例に於いても、ベクター注入部位である被殻には MRI 上特段の異常は見られないこと、静脈性、動脈性を問わず、出血がカテーテルの挿入経路に関連して生じていることから、ベクターによるものではなく手術手技に関係した事象と判断された。実際、我々の施設では、ガイド針を用いてカテーテルを挿入する手技に変更してからは、有意の出血は生じていない。

また、注入したベクター(遺伝子組換え生物)の拡散に関しては、患者血液の連続 3 日間の PCR では、いずれの症例においてもベクター DNA は 3 回とも陰性、あるいは初期に軽度陽性であっても 3 日目には陰性化しており、有意の拡散は生じないものと考えられた。

有効性に関しては、特に off state での運動機能の改善が認められ、これは 6 カ月後にも確認された。ただし、今回の臨床研究は盲検化されていない少数例での研究であり、有効性の判定には慎重を要するものと考えられる。

一方、PET 検索では、注入 1 か月後に導入遺伝子の発現増加が注入部位に於いて認められ、これは 6 か月後でも持続していた。注入部位選択的に増加していることから、これは手術自体の影響ではなく導入された遺伝子が発現している、即ち、導入部位に於いて AADC 産生が増加しているものと判断される。

今後は、これらのデータを踏まえて盲検性を有する臨床研究を多施設で実施する必要があると思われる。

E. 結論

進行した PD6 例に対して、その両側被殻に定位

脳手術的に AAV-hAADC-2 を導入する遺伝子治療を実施した。ベクターそのものによる有害事象は見られず、ベクター拡散の問題も生じなかった。有効性に関しては慎重な判断を要するものの、運動機能の明らかな改善が見られ、FMT-PET にて導入遺伝子の長期発現が確認されたことから、本治療法は有望な手法と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ouyang Y, Segers K, Bouquiaux O, Wang FC, Janin N, Andris C, Shimazaki H, Sakoe K, Nakano I, and Takiyama Y: Novel SACS mutation in a Belgian family with saccin-related ataxia. *J. Neurol. Sci.* 264: 73-76, 2008.
2. Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach T.G, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H: Phosphorylated TDP-43 in fronto temporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 64: 60-70, 2008.
3. Shimazaki H, Morita M, Nakano I: Inverse ocular bobbing in a patient with encephalitis associated with antibodies to the N-methyl-D-aspartate receptor. *Arch Neurol.* 65(No.9): 1251, 2008.
4. Yokota O, Tsuchiya K, Terada S, Ishizu H, Uchikado H, Ikeda M, Oyanagi K, Nakano I, Murayama S, Kuroda S, Akiyama H: Basophilic inclusion body disease and neuronal intermediate filament inclusion disease: a comparative clinicopathological study. *Acta Neuropathol.* 115: 561-575, 2008.
5. Shimazaki H, Vazifehmand R, Heidari M.H, Khorram-Khorshid H.R, Saber S, Hejazi S, Aghakhani-Moghadam F, Ouyang Y, Honda J,

Naknao I, Takiyama Y: A large family with spinocerebellar ataxia type 6 in Iran: A Clinical and Genetic study. Archives of Iranian Medicine 11(4): 459-462, 2008.

6. 中野今治: 本邦初のパーキンソン病の遺伝子治療. 日本老年医学会雑誌 45 : 9-13, 2008.
7. 嶋崎晴雄, 中野今治: 放射線照射による脊髄障害と神経叢障害. BRAIN and NERVE 60(2): 115-121, 2008.
8. 中野今治: 孤発性 ALS 古典型「病理」. Clinical Neuroscience 26:277-279, 2008.

2. 学会発表

1. Muramatsu S, One F, Takino N, Asari S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Tsukada H, Terao K, Ozawa K, Nakano I: Long-term behavioral recovery in primate model of Parkinson's disease with persistent gene expression of dopamine-synthesizing enzymes. American Society of Gene Therapy 11th Annual Meeting. Boston, May 28-June 1, 2008. (Abstract PS264) (Molecular Therapy 16; Suppl.1, May 2008)
2. 藤本健一、川上忠孝、中野今治、木村唯子、加藤正哉、渡辺英寿: パーキンソン病の非運動症状に対する視床下核脳深部刺激の影響. 第49回日本神経学会総会、横浜、2008年5月15日-17日(プログラム・抄録集 p.192)
3. 村松慎一、浅利さやか、池口邦彦、藤本健一、小野文子、寺尾敬治、塚田秀夫、中野今治: パーキンソン病モデルサルにおける遺伝子治療の長期効果. 第49回日本神経学会総会、横浜、2008年5月15日-17日(プログラム・抄録集 p.193)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

前臨床研究のためのAAVベクターの作製

研究分担者：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。AAV ベクターの感染効率が糖質の存在下で増強することを見出したことから、様々な応用が期待される 8 型・9 型 AAV に対する測定法を改良し、検出感度を高めた。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、検出感度も不充分と考えられている。そこで AAV ベクターの感染効率を改善させる方法を探した結果、糖質を培地に添加することで感染が増強されることを見出した。更にはその成果を応用して 8 型・9 型に対する中和抗体検出法の改善に向けて種々の検討を行った。

B. 研究方法

1. ベクターの感染効率増強に関する検討：ソルビトール、マンニトール、スクロース、グルコース、キシリトール、トレハロースなどの存在下で、様々な血清型の AAV ベクターを培養 293 細胞に感染させ、導入遺伝子の発現を測定した。
2. 中和抗体検出法に関する検討：これまで

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に基づき、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) これまで用いている標準細胞よりも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、iv) アデノウイルスの代わりに糖類を用いることで、検出法が改善されるかどうか、につき検討した。

（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. ベクターの感染効率増強に関する検討：対象

とした全ての糖類について、培地に添加することでAAVベクターの感染効率が顕著に向上することを見出した。この効果は濃度依存的で明らかなピークを有しており、細胞毒性が見られる領域では効果は消失した。また、増強効果は検討したAAVの血清型(1・2・8・9型)全てにおいて認められた。結果として、感染を成立させるためのベクター量を低減させることに成功し、例えば2型AAVベクターでは細胞あたり100ベクターゲノム相当で感染が検出可能となった。

2. 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いた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)。iv) アデノウイルスの代わりに糖類を用いることで、ベクター量を一層減らすことができた。以上の結果から、中和抗体の検出感度を格段に高めることができた。

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。一方、8型・9型由来のベクター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が明らかにされており、様々な応用が期待されている。しかしながら、これらの血清型に関

しては中和抗体の良い検出法が確立していないことが問題となっている。その主な原因は効率よく感染する細胞が見出されていないことにあり、この解決に向けて我々を含め世界中で様々な探索が行われているが、良好な細胞は見出されていない。糖類を培地に添加することで感染が著しく増強されることから、その成果に基づき中和抗体価の鋭敏な測定系が確立することとなった。今後、中和抗体に関してより正確な評価が可能となるため、これらの血清型を用いた遺伝子治療の実用化へ向けての展開が期待される。

また、糖類によるAAV感染効率の増強は広範な応用の可能性を有している。これらの糖質の多く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証明すれば臨床応用への採用も比較的容易と思われる。更には本現象の作用機序についてもまだまだ明らかでないことから、この点の解明にも今後取り組んでいきたい。

E. 結論

8型・9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。

F. 研究発表(原著論文)

1. Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takeuchi, K., Katsura, K., Mizukami, H., Kume, A., Ookawara, S., Ikeda, U., Katayama, Y., Ozawa, K.: Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Gene Ther (in press)*

2. 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** 10: 368-74, 2008.
3. Suzumura, K., Hirano, T., Son, G., Imuro, Y., Mizukami, H., Ozawa, K., Fujimoto, J.: Adeno-associated virus vector-mediated production of hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis in mice. **Hepato Int** 2: 80-88, 2008.
4. 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** 16: 474-80, 2008.

G. 知的財産権の出願・取得状況
該当なし

パーキンソン病に対する遺伝子治療臨床研究

研究分担者 村松慎一 自治医科大学医学部内科学
神経内科学部門 特命教授

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8年以上経過したサルで運動障害の改善効果は持続しており、positron emission tomography (PET) 計測で導入した遺伝子の発現が認められた。安全性に問題は認めなかった。正常サル2頭において L-dopa 投与後の被殻の D2 受容体結合の変化を PET で経時的に計測した。

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 I/II 相臨床研究の前臨床研究として、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。

L-dopa 投与後に被殻の D2 受容体結合の変化を経時的に評価する。

B. 研究方法

1) 昨年度に続き遺伝子導入後長期観察中のパーキンソン病モデルサルの PET 計測を行った。モデルサルは選択的神経毒 MPTP の慢性投与により作製した。ドパミンの合成に必要なチロシン水酸化酵素 (TH)、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC)、GTP cyclohydrazase 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) を混合し、2000年9月20日に左側の被殻に各 1.5×10^{11} vector genome

(vg) 投与した。運動障害の改善効果を video 記録により解析した。 [^{11}C] L-dopa をリガンドとする positron emission tomography (PET) 計測を実施した。2) 正常カニクイサル2頭に L-dopa 1mg/kg を静脈注射し、投与前、30分後、3時間後、6時間後に [^{11}C] raclopride をリガンドとする PET 計測を行った。

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8年以上生存している。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。遺伝子導入8年後に行った PET 計測では、左側の被殻では右側に比べて [^{11}C] L-dopa の集積の増加が認められた。

正常サルにおいては、L-dopa 1mg/kg 投与後6時間までに、 [^{11}C] raclopride の結合能は有意な変化は認められなかった。

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成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。

正常サルでは、L-dopa 1mg/kg 投与後に D2 受容体に対するトレーサーである [¹¹C] raclopride 結合能の変化が検出されなかったが、これは正常サルでは既に十分量のドパミンが産生されており、また神経終末のドパミン貯蔵能も保たれていることから、L-dopa 投与後の変化が [¹¹C] raclopride 検出感度以下であった可能性が考えられる。現在、MPTP サルにおいてより感度の高いトレーサーを使用した PET 計測を行っている。

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。正常サルで L-dopa 投与後の D2 受容体の変化の検出を試みた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Liu Y, Okada T, Shimazaki K, Sheykholslami K, Nomoto T, Muramatsu S, Mizukami H, Kume A, Xiao S, Ichimura K and Ozawa K : Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by regulated AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea. *Mol. Ther.* 16(3): 474-480, 2008.

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 a-synuclein in mice. *Neurobiol Aging*, 29(4): 574-585, 2008.
3. Fukushima F, Nakao K, Shinoe T, Fukaya M, Muramatsu S, Sakimura K, Kataoka H, Mori H, Watanabe M, Manabe T, Mishina M. : Ablation of NMDA receptors enhances the excitability of hippocampal CA3 neurons. *PLoS One*, 4(1): e3993, 2009.
4. Tanaka Y, Ikeda T, Kishi Y, Masuda S, Shibata H, Takeuchi K, Komura M, Iwanaka T, Muramatsu S, Kondo Y, Takahashi K, Yamanaka S and Hanazono Y : Eras is expressed in primate embryonic stem cells but not related to tumorigenesis. *Cell Transplant*, in press.
5. Muramatsu S, Okuno T, Suzuki Y, Nakayama T, Kakiuchi T, Takino N, Iida A, Ono F, Terao K, Inoue N, Nakano I, Kondo Y and Tsukada H : Multi-tracer assessment of dopamine function after transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem cells in a primate model of Parkinson's disease. *Synapse*, in press.

2. 学会発表

1. 村松慎一、浅利さやか、池口邦彦、藤本健一、小野文子、寺尾恵治、塚田秀夫、中野今治：パーキンソン病モデルサルにおける遺伝子治療の長期効果。第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 16 日。(プログラム p193)
2. 浅利さやか、村松慎一、藤本健一、中野

今治、大西理文、永嶋聖治、佐藤俊彦：
FMT-PETによるパーキンソン病の画像診断。
第49回日本神経学会総会、横浜、2008
年5月17日。(プログラム p319)

3. Muramatsu S, Ono F, Takino N, Asari S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Tsukada H, Terao K, Ozawa K and Nakano I : Long-term behavioral recovery in primate model of Parkinson's disease with persistent gene expression of dopamine-synthesizing enzymes. The American society of gene therapy's 11th annual meeting, Boston, May 31, 2008.
4. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I : Aromatic L-amino acid decarboxylase gene transfer for parkinson's disease : preliminary results of an open-label safety study. The Japan society of gene therapy's 14th annual meeting, Sapporo, June 12, 2008.
5. Muramatsu S : Recombinant AAV vectors as a valuable tool for neuroscience. Neurosci Res, 61(1): S9, Tokyo, July 9, 2008.
6. Muramatsu S, Asari S, Terao K, Ozawa K, Nakano I and Tsukada H : PET Assessment of transgene-mediated dopamine synthesis in a primate model of Parkinson's disease. World Molecular Imaging Congress . Nice , September 11, 2008. (Program p14).
7. 浅利さやか、村松慎一、藤本健一、中野今治、齋藤順一、佐藤俊彦：FMT-PETによるパーキンソン病の画像診断。Movement Disorder Society Japan 第2回学術集会、京都、2008年10月3日。(抄録集 p56)。
8. Muramatsu S : Gene therapy for Parkinson's

disease. 2nd Korean Neurological Association and Japanese Society of Neurology joint symposium. Busan, October 10, 2008. (Journal of the Korean Neurological Association 26, suppl 3, p275).

- G. 知的財産権の出願・取得状況
該当なし

脳内遺伝子導入による酵素誘導技術の現状と課題

研究分担者 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

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）をアデノ随伴ウィルス（AAV）ベクターに組み込んで線条体内に注入することにより、神経終末の脱落に伴って低下した AADC 活性を回復させる遺伝子治療を 6 例に行った。手術には、被殻が直接描出された 1.5T-MRI T1 強調画像と通常の定位脳手術装置を用いたが、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 画像で 6-FMT 集積が著しく低下している被殻背外側部とした。術後 1 ヶ月後、6 ヶ月後にそれぞれ行った 6-FMT PET 検査では、注入部位に一致した被殻内 AADC 活性の拡大が認められ、本プロトコールの安全性を確認する事ができた。

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ィルス（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 月から 2008 年 9 月に行われた 6 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 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 画像と、術後 1 ヶ月目及び 6 ヶ月目に撮影した同画像

を比較して、被殻内の AADC 活性の増加を確認するとともに、新たに活性の増えた部分の経時的変化を観察した。術前、術後 1 ヶ月、術後 6 ヶ月それぞれの PET 画像において、後頭葉皮質下層に対象領域を設定し、検査毎に得られた被殻内の FMT 活性に対象領域との比率を用いて表した。また、被殻内それぞれのピクセル毎に対象領域との比(SUV)が 2.5 以上であった部位をプロットして画像化する事で、AADC 遺伝子導入により、被殻内のどこで活性が増えているのか、を観察した。

C. 研究結果

両側被殻内に定位脳手術で AAV-AADC 溶液を注入した 6 例の、注入 1 ヶ月後の被殻内 AADC 活性（FMT 発現値）は、6 例全例で術前に比して増加しており、その増加

率は術前の被殻内 FMT レベルの 111-175% (平均 136%) であった。同じく 6 ヶ月後に撮影した FMT-PET での被殻内 AADC 活性は前半に手術が行われ既に 6 ヶ月目の追跡が終了した 3 例では、術前の 103-130% (平均 116%) に留まっていた。しかし、AADC 活性の被殻内分布をみると、1 ヶ月後の画像では、遺伝子溶液注入部位付近のみで高い集積が見られたのに対して、6 ヶ月後は注入ポイントが不明瞭となり、より広い範囲に分布する傾向があるように思われた。今回の検討では、術前、手術時、術後それぞれの MRI、CT、PET 画像が統合されていなかった為、AAV-AADC 溶液の注入ポイントと、術後に AADC 活性が発現した領域の 3 次元分布を詳細に検討することができなかった。

D. 考察

今回の研究計画で採用された定位脳手術の手技及び画像診断は、目的とした被殻内に術後 FMT-PET 画像で AADC 活性の増加がみられた事で、当初の目的を達する為に十分である事が確認された。一連の手術において AADC 遺伝子溶液を脳内に注入する為に用いた注入針と注入ポンプは、いずれも大きなトラブルなく 6 例すべての手術時にそれぞれ適切に作動した。しかし、今回用いた遺伝子溶液注入速度の $1\mu\text{L}/\text{min}$ は十分に遅く、安全である事は明らかとなったが、これほど緩徐な注入が必要であるか否かについては、今後の課題と思われた。我々のプロトコルでは、一側被殻の 2 カ所の目標点に対してそれぞれ単一の穿刺針を用いて 2 回の注入を行なっているため、 $50\mu\text{L}$ の溶液を注入するには一カ所で 50 分、一側被殻 2 カ所で 100 分の注入時間を要した。長時間にわたる注入針の脳内

留置は周囲脳組織に対しても好ましいとは言い難く、手術侵襲の観点より今後短縮することを検討すべきであろう。また手術時の麻酔に関しても、現在広く行われているパ病に対する脳深部刺激電極埋め込み術が局所麻酔下で安全に普及している事を考慮すれば、手術時間の短縮を図る事で、本治療も局所麻酔下で施行可能であると思われる。確実な遺伝子注入法が確立したので、今後はその手技をより低侵襲に改善する事を検討したい。

術後 1 ヶ月目に撮影した FMT-PET 画像にて、全例で注入部位周囲に AADC 活性の分布が見られたが、6 ヶ月後にも同様の検査が行われた 3 例では、AADC 活性は 1 ヶ月目に比してさらに広範囲に拡大する傾向がみられた。その一方で、今回の治療により導入された新たな AADC 活性も、6 ヶ月後の被殻内での分布をみると、術前の画像で AADC 活性が残っていた被殻前半部に強く発現しており、パ病で特徴的に活性が低下するとされる被殻後半部は、遺伝子導入後も、その活性は前半部に比して少なめであった。この分布は今回ヒトでの臨床治験で始めて明らかとなった点であり、今後先に報告された動物実験での長期成績との対比が待たれる所である。遺伝子溶液の注入部位と、術後の AADC 活性の広がりや 3 次元画像で定量的に解析するためには、術前術後を通した画像情報の統合が不可欠である。今回の研究では不十分であった画像の統合については、今後、手術時に用いた CT の座標系を用いて MRI、PET 等の情報を表示する事ができるような手術支援ソフトウェアの使用を検討する予定である。

手術を受けた 6 例はいずれも術後臨床的

にパ病の症状改善を認めているが、本治療と従来の視床下核に対する脳深部刺激療法を比較すれば、外科的手技は、被殻内への遺伝子溶液注入がはるかに容易で安全であった。視床下核に比べ解剖学的な大きさと脳表からの深さのいずれも被殻の方が勝っている事より、穿刺時合併症の危険は少なく、目標点に到達するための定位脳手術的な精度もさほど厳密である必要はない事が予測された。今後臨床効果を比較しながら、両治療法の優劣を評価する必要があると思われる。

E. 結論

定位脳手術により、AADC 遺伝子を組み込んだ AAV ベクター溶液を安全に脳内の目標とする被殻に注入する事が可能であり、注入された遺伝子溶液は、被殻内で AADC 活性を発現する事が術後の FMT-PET 画像で確認された。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. 加藤正哉、木村唯子、渡辺英寿 パーキンソン病に対する定位脳手術週術期合併症 第 67 回日本脳神経外科学会総会 2008/10/1-3 (盛岡)
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 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 48 回日本定位機能神経外科学会 2009/1/23-4 (東京)
3. 光トポグラフィーによるパーキンソン病 STN-DBS 術後高次脳機能評価 木村唯子、加藤正哉、藤本健一、菊地千一郎、渡辺英寿 第 48 回日本定位機能神経外

科学会 2009/1/23-4 (東京)

4. 加藤正哉 脳内遺伝子導入による酵素誘導技術の現状と課題—AAV vector を用いた線状体での AADC 活性再生療法—第 1 回 Psychiatry & Clinical Neurosciences 研究会「精神・神経疾患における新規医療研究モダリティの開発」 2009/1/25 (東京)

- G. 知的財産権の出願・取得状況
該当なし

FMT-PET によるパーキンソン病の画像診断

研究分担者 佐藤俊彦 医療法人 DIC 宇都宮セントラルクリニック
理事

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-[¹⁸F]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6名を含む35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およびボランティアによる正常例の画像を解析した。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、CT および MRI において特に画像所見を認めず、4大徴候(安静時振戦・筋固縮・無動・姿勢保持反射障害)を呈することが条件とされてきた。

今回 FMT-PET 検査を実施し、パーキンソン病の早期診断、病巣決定、遺伝子治療の効果判定に使える可能性に関して検討した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。パーキンソン病 29 名(男性 12 名、女性 17 名、平均年齢 63.2 歳)、進行性核上性麻痺(PSP) 2 名(男性 1 名、女性 1 名、平均年齢 67.

5 歳)、多系統萎縮症(MSA) 10 名(男性 4 名、女性 6 名、平均年齢 65.9 歳)、本態性振戦 5 名(男性 1 名、女性 4 名、平均年齢 63.4 歳)、レビー小体症(DLB) 1 名(女性 1 名、76 歳)である。

また、パーキンソニズムとの比較のために、正常例を得ることを目的とし、当院にて募集をかけ、文書による同意を得たものを対象とした。(男性 4 名、女性 7 名、平均年齢 60.4 歳)

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については、検査前日夜より服用を止めることとした。検査当日には、末梢での AADC 代謝を防ぐため、検査前にカルビドーバを[体重×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 装置にて Dynamic

撮影した。また、ボランティアにおいても同様とした。

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・後頭葉を標準部位とし、小脳および後頭葉、被殻全て、または一部に 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・後頭葉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、治療前後について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パーキンソン病における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。病初期のパーキンソン病患者については、左右差が認められた。

②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。レビー小体症(DLB)では、全体的な集積低下が認

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。

③遺伝子治療前後の変化

6 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 1 か月後のスポットを中心とし、近傍に広がりをも認めた。

④正常例

正常例では全例において、被殻に良好な集積を認め、被殻に比べて尾状核の集積が低い傾向が見られた。

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 の計測で、正常ボランティアの被殻において著明な集積を認めた。パーキンソン病についてはドパミン神経の変性脱落の病態を反映したものと考えられる。特に病初期において臨床症状と相関し、対側の被殻において低集積を示していた。PSP および MSA・DLB では、黒質緻密部の神経細胞の減少に伴い、ここからの神経終末が脱落し、その結果、FMT の集積が低下したと推察される。

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、やがて被殻内におけるベクター注入近傍で均等化した可能性が考えられる。

E. 結論

FMT-PET は、中脳黒質緻密部から線条体

へのドパミン神経の脱落状態を *in vivo* で評価する有力な手法と考えられ、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。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ouyang Y, Segers K, Bouquiaux O, Wang FC, Janin N, Andris C, Shimazaki H, Sakoe K, Nakano I, Takiyama Y.	Novel SACS mutation in a Belgian family with sascin-related ataxia	J Neurol Sci	264	73-76	2008
Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, BeachTG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H.	Phosphorylated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis	Ann Neurol	64	60-70	2008
Shimazaki H, Morita M, Nakano I	Inverse Ocular Bobbing in a Patient with Encephalitis Associated With Antibodies to the N-methyl-D-aspartate Receptor	Arch Neurol	65 (No.9)	1251	2008
Yokota O, Tsuchiya K, Terada S, Ishizu H, Uchikado H, Ikeda M, Oyanagi K, Nakano I, Murayama S, Kuroda S, Akiyama H.	Basophilic inclusion body disease and neuronal intermediate filament inclusion disease:a comparative clinicopathological study	Acta Neuropathol	115	561-575	2008
Shimazaki H, Vazifehmand R, Heidari M. H, Khorram-Khorshid H.R, SaberS,Hejazi S, Aghakhani-MoghadamF, Ouyang Y, Honda J, Nakano I, Takiyama Y.	A Large Family with Spinocerebellar Ataxia Type 6 in Iran:A Clinical and Genetic Study	Archives of Iranian Medicine	11(4)	459-462	2008