

201122018B

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

(神経・筋疾患分野)

孤発性 ALS の分子異常を標的とした治療技術の確立

(H21-こころ-一般-017)

平成 21 年度～平成 23 年度 総合研究報告書

研究代表者 郭 伸

平成 24 年 (2012 年) 3 月

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

(神経・筋疾患分野)

孤発性 ALS の分子異常を標的とした治療技術の確立

(H21-こころ-一般-017)

平成 21 年度～平成 23 年度 総合研究報告書

研究代表者 郭 伸

平成 24 年 (2012 年) 3 月

目 次

I. 総括研究報告

孤発性 ALS の分子異常を標的とした治療技術の確立	1
郭 伸	

II. 分担研究報告

1. 相澤 仁志	11
2. 村松 慎一	13
3. 詫間 浩	17

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	25
-----------------	----

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業 神経筋疾患分野）

（総合）研究報告書

孤発性 ALS の分子異常を標的とした治療技術の確立

研究代表者 郭 伸・東京大学准教授

東京大学大学院 医学系研究科 脳神経医学専攻 神経内科学

【研究趣旨】 孤発性 ALS の運動ニューロンで疾患特異的、部位選択的分子変化として我々が見出した GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常は、神経細胞死を引き起こす一次原因であり、疾患特異的な分子異常である。GluR2 Q/R 部位の RNA 編集は、RNA 編集酵素 adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) により触媒されることより、孤発性 ALS 運動ニューロンでは ADAR2 活性が低下していると考えられる。したがって、ADAR2 活性の賦活により GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が正常化し、孤発性 ALS の神経細胞死を抑制する効果が期待される。1) 330 種類以上の市販薬を含む化学物質の *in vitro* スクリーニングから 31 種の活性賦活候補物質を得、その内 9 種類は ADAR2 の発現レベルを上昇させた。野生型マウスへの全身投与で 1 種類に ADAR2 発現賦活作用を確認した。2) 血管投与型アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて、経静脈的ルートによる脊髄運動ニューロンへの ADAR2 遺伝子導入、発現に成功した。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

相澤仁志 国立病院機構東京病院 地域医療連携部長

村松慎一 自治医科大学 特任教授

詫間浩 筑波大学 講師

A. 研究目的

我々は孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンに発現するグルタミン酸受容体である AMPA 受容体の GluR2 サブユニットに、本来生ずべき Q/R 部位における RNA 編集が行われない mRNA が含まれていること、この分子異常は ALS 運動ニューロンに疾患特異的かつ細胞選択的な変化であることを報告した(1-3)。AMPA 受容

体の大多数はサブユニットに編集型 GluR2 (グルタミン・アルギニン (Q/R) 部位がアルギニン) を含むため、Ca²⁺透過性が低い。他方、未編集型 GluR2 (Q/R 部位がグルタミン) を含む AMPA 受容体は、GluR2 を含まない AMPA 受容体同様 Ca²⁺透過性が高い。AMPA 受容体の大多数は GluR2 をサブユニットに含み、正常のニューロンは編集型 GluR2 のみを発現するので、AMPA 受容体の大多数は Ca²⁺非透過性である。これに対し、孤発性 ALS では未編集型 GluR2 の発現により Ca²⁺透過性 AMPA 受容体が増加している。GluR2 mRNA の Q/R 部位は、RNA 編集酵素 ADAR2 (adenosine deaminase acting on RNA 2) により特異的に編集され、アデノシンがイノシンに変換する。イノシンは翻訳時にグアノシンとして認識されるため、ゲノムの Q コドン (CAG) が R コドン (CGG) に変換され、アミノ酸置換が起こる。ADAR2 のノックアウト動物は幼弱期に死亡し(4)、ADAR2 を発現しない運動ニュー

ーロンは緩徐な死に至る(5)。これは、編集型 GluR2 を発現することで阻止できるので(4, 5)、未編集型 GluR2 の発現による AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性亢進が神経細胞死の直接原因であると考えられる。実際、孤発性 ALS の運動ニューロンでは、ADAR2 mRNA 発現レベルが特異的に低下しており(6)、ADAR2 活性が低下していることが未編集型 GluR2 の増加を引き起こしていると考えられる。この仮説が正しければ、ADAR2 活性を上げることにより運動ニューロン死を阻止し、孤発性 ALS の進行を抑止する治療法の開発が可能であると考えられる(7-9)。さらに、孤発性 ALS 運動ニューロンに特異的な病理変化として近年明らかにされた TDP-43 病理(10, 11)が ADAR2 活性低下と極めて密接に関連していることが示され(12)、この仮説の妥当性を支持する知見が得られている。

本研究では、ADAR2 活性賦活による孤発性 ALS の特異治療法(8)の開発のため、ADAR2 活性賦活物質の探索、ADAR2 遺伝子導入による治療技術基盤の確立を目的とする。

B. 研究方法

1. ADAR2 活性賦活物質

我々が開発した TetHeLaG2m細胞(13)を用いて、0.1-10 μ M 濃度の薬剤に 24 時間曝露後の GluR2 Q/R 部位編集率の変化から、ADAR2 活性賦活作用のスクリーニングを行った。編集率の変化したものは ADAR2 mRNA の発現レベルの変化を検討した。スクリーニング対象は本邦における市販薬、US Drug Collection1040 種類、およびその他の化合物とした。

GluR2 Q/R 部位の編集率が上昇した物質に付き、ADAR2 mRNA 定量を行った。ADAR2 mRNA 発現量を上昇させた物質を 1-2 週間野生型マウスに経口ないし皮下投与し、脊髄運動ニューロンにおける ADAR2 基質である cytoplasmic fragile X mental retardation protein interacting protein 2 (CYFIP2) K/E 部位の編集率変化(9, 14)および ADAR2 mRNA 定量(6, 7)で、ADAR2 活性の変化を検討した。

2. ADAR2 遺伝子の運動ニューロンへの導入技術の確立

ADAR2 遺伝子の導入技術を確立するために、投与ルートとして、静脈、髄液、脊髄実質、筋肉からの逆行性軸索輸送、などが考えられる。ALS が運動ニューロンを広汎に侵し進行性であることから、広汎かつ効率の高い、安全な遺伝子送達法を開発する必要がある。運動ニューロンに広汎に遺伝子を送達する目的で、血管内投与に適したベクターを開発し、本研究に使用することを試みた。また、効率よく運動ニューロンに遺伝子を送達する方法として、筋肉内投与による逆行性軸索輸送による送達も検討した。

ADAR2 cDNA を組み込んだ血管内投与型 AAV ベクターを作成し、ADAR2 遺伝子が発現することを培養細胞、マウス脳実質内投与で確認するために、ADAR2 mRNA の発現、ADAR2 により特異的に触媒される編集部位の編集活性を、前記の方法で測定した。

このベクターを用い血管内投与により脊髄運動ニューロンに有効に遺伝子導入されるかどうかを、野生型マウスを用いて検討した。ADAR2a および GFP を搭載した AAV ベクターの血管内投与後 7 週目にサンプリングし、GFP の発現を形態および RT-PCR で、ADAR2 の発現を定量 RT-PCR で検討した。また、同じ AAV ベクターを腓腹筋に投与し、L5 レベルでの運動ニューロンへの送達を検討した。

野生型マウスの血管内投与により有意な ADAR2 遺伝子発現がみられたため、モデルマウスにおける導入効率、神経細胞死抑制効果につき解析を加えた。モデルマウスは、運動ニューロン選択的に ADAR2 遺伝子を欠失させた ADAR2^{fllox/fllox}/VChT-Cre マウス (AR2 マウス) を用いた。このマウスは、運動ニューロンの約半数で、ADAR2 遺伝子の発現が無く、未編集型 GluR2 のみを発現し、緩徐な運動ニューロン死を引き起こす。3 ヶ月齢 AR2 マウスに 1.5 x 10¹¹ v. g. (n=5) および 2.25 x 10¹² v. g. (n=4) の投与を行い、行動変化をロータロッドスコア、前肢握力、運動量で、ADAR2 遺伝子の導入を定量的 RT-PCR、細胞死を L5 前根の軸索数計測、前角細胞の形態観察・細

胞数計測により評価した。

(倫理面への配慮)

遺伝子操作に関しては、第二種使用等拡散防止措置における承認を得、全ての遺伝子操作は本学 DNA 組換え実験指診に従い行った。また動物実験については、東京大学医学部動物委員会の承認を得、実験方法については同動物実験指針に従い動物愛護面に十分配慮した。

C. 研究結果

1. Tet-HeLaG2m 細胞系を用い中枢移行性の高い市販薬を中心に 330 種類以上の化合物のスクリーニングを行い、ADAR2 活性賦活作用のある薬剤を 31 種類得た。これらの作用メカニズムは、ADAR2 mRNA 発現量の増加によるもの、ADAR2 mRNA/GluR2 pre-mRNA 比の増加によるものの他、これらの ADAR2 活性に関連しうる分子には影響を与えないものがあり、異なる分子メカニズムに依ることが明らかになった(13)。この内 9 種類で ADAR2 mRNA 発現が増加した。

ADAR2 mRNA を賦活させた化合物はヒトへの体重あたり一日常用量の 10 倍量を、一週間連続で野生型マウスに経口ないし皮下投与した。その結果、CYFIP2 K/E 部位における ADAR2 活性が上昇している薬剤が複数えられたが ADAR2 発現量を上昇させた物質は 1 種類であった。

2. 遺伝子治療

血管内投与により脊髄運動ニューロンに有効に遺伝子導入するための AAV ベクターを製作した。脊髄運動ニューロンの 20% 程度への導入効率を得ている。この AAV ベクターにヒト ADAR2a cDNA を組み込んだコンストラクトを作成し、培養細胞に感染させることで有意な ADAR2 の発現、特異的 RNA 編集部位における RNA 編集活性上昇を確認した。

上記の AAV ベクターを用いて、野生型マウス脳への直接投与による ADAR2 の発現を確認した。GluR2 Q/R 部位に対する活性賦活効果を確認することが重要であるが、野生型マウス

脳ではこの部位の RNA 編集率は 100% に保たれているため、ADAR2a cDNA による ADAR2 発現量の上昇のほか、活性のない変異型 ADAR2^{E396A} cDNA によりこの部位の RNA 編集が阻害されることを指標とした。投与部位では GluR2 pre-mRNA Q/R 部位の編集率が 60% に低下していた。この効果は投与部位から離れた部位では見られず、ウィルスの感染の広がり依存していた。従って、ADAR2 遺伝子の発現により GluR2 Q/R 部位の RNA 編集活性が変化することが確認出来た。

野生型マウス脳での遺伝子発現が確かめられたので、野生型マウスの尾静脈から AAV ベクターを投与し (7.4×10^{11} v. g.)、脊髄運動ニューロンへの ADAR2 発現を以下の方法で確認した。同時に GFP を搭載した AAV ベクターを投与し、運動ニューロンにおける GFP の発現を観察し、脊髄組織の RT-PCR で確認した。さらに、脊髄前角における ADAR2 mRNA の発現上昇を定量的 PCR により確認した。GFP の取り込みは個体差があり、5 匹中 3 匹で確認できた。GFP はおもに前角運動ニューロンに発現していた。GFP の取り込みがあった個体での脊髄組織の ADAR2 mRNA の上昇は平均で約 20% であった。

さらに、筋肉内投与により、逆行性軸索輸送による遺伝子送達を検討したが、血管内投与に比べ有意な優越性は得られなかった。今後、より強力なプロモーター使った検討が必要であると考えられる。

上記の結果を基に、神経細胞死抑制に要する ADAR2 遺伝子発現レベルの検討のために、モデルマウス AR2 に AAV ベクターを血管内投与し、神経細胞死の抑制効果を検討している。運動ニューロンにおける ADAR2 遺伝子の発現は確認出来ているので、神経細胞死の抑制が可能で遺伝子量が発現しているかどうかの評価を行う。効果が不十分な場合には、投与量、投与ルート、および、ヘテロ接合体モデルマウス AR2H を用いることによりマイルドな病態での細胞死抑制作用の検討を行う予定である。孤発性 ALS 患者運動ニューロンは未編集型 GluR2 と編集型 GluR2 とを共に発現しており、ある程度の RNA 編集活性

は保たれていると考えられるので、ヘテロ接合体AR2Hマウスでの効果が得られれば、臨床的な効果が得られる可能性が高いといえる。

D. 考察

ADAR2 活性賦活作用を持つ治療薬候補物質のスクリーニングを進め、マウス脊髄運動ニューロンに ADAR2 活性を賦活させる薬剤候補をえた。

ADAR2 遺伝子の経静脈的ルートによる脊髄運動ニューロンへの送達による遺伝子発現、活性賦活効果が得られ、遺伝子治療の基盤技術が得られた。

モデルマウスを用いた、神経細胞死抑制効果の検討を行い、これらの方法が治療的に有効性が得られるかどうかの検討を行う。

ALS は全身の運動ニューロンが変性脱落する疾患であるため、細胞死に陥る前に治療を開始することが必要である。薬剤の全身投与、経静脈的遺伝子導入により、未発症運動ニューロンへの治療も可能となり、この目的が達せられる可能性が示された。投与ルート、ベクターの工夫により、送達効率の高い方法を模索する必要がある。

E. 結論

ADAR2 発現低下に対する特異的薬剤・遺伝子治療のための基盤技術が得られた。今後、至適投与ルート、用量設定、安全試験を行うことにより臨床応用の可能性が見えてきたといえる。

(文献)

1. Kawahara Y, *et al*, *Nature* **427**: 801, 2004.
2. Kwak S, *et al*, *J Mol Med* **83**: 110-120, 2005.
3. Kawahara Y, *et al*, *Neurosci Res* **54**: 11-14, 2006.
4. Higuchi M, *et al*, *Nature* **406**: 78-81, 2000.
5. Hideyama T, *et al*, *J Neurosci* **30**: 11917-11925, 2010.
6. Hideyama T, *et al*, *Neurobiology of disease* **45**: 1121-1128, 2012.
7. Hideyama T, *et al*, *Frontiers in molecular neuroscience* **4**: 33, 2011.
8. Kwak S, *et al*, *Neuropathology* **30**: 182-188, 2010.
9. Kwak S, *et al*, *RNA Biol* **5**: 193-197, 2008.
10. Arai T, *et al*, *Biochemical and biophysical research communications* **351**: 602-611, 2006.
11. Neumann M, *et al*, *Science* **314**: 130-133, 2006.
12. Aizawa H, *et al*, *Acta Neuropathol* **120**: 75-84, 2010.
13. Sawada J, *et al*, *Neurosci Res* **64**: 251-258, 2009.
14. Nishimoto Y, *et al*, *Neurosci Res* **61**: 201-206, 2008.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Sawada J, Yamashita T, Aizawa H, Aburakawa Y, Hasebe N, Kwak S: Effects of antidepressants on GluR2 Q/R site-RNA editing in a modified HeLa cell line. *Neurosci Res* **64**:251-258, 2009.
2. Fukushima F, Nakao K, Shinoue T, Fukaya M, Muramatsu S, Sakimura K, Kataoka H, Mori H, Watanabe M, Manabe M, Mishima M: Ablation of NMDA receptors enhances the excitability of hippocampal CA3 neurons. *PLoS ONE*, **4**(1):e3993, 2009.
3. 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*, 63:541-548, 2009.
4. Okuno T, Nakayama T, Konishi N, Michibata H, Wakimoto K, Suzuki Y, Nito S, Inaba T, Nakano I, Muramatsu S, Takano M, Kondo Y, Inoue N: Self-contained induction of neurons from human embryonic stem cells. *PLoS ONE*, 4:e6318, 2009.
 5. Ito T, Yamamoto S, Hayashi T, Kodera M, Mizukami H, Ozawa K, Muramatsu S: A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of anti-adenovirus neutralising antibodies. *Ann Clin Biochem*, 46(Pt 6):508-510, 2009.
 6. Noguchi, A, Matsumura, S, Dezawa, M, Tada, M, Yanazawa, M, Ito, A, Akioka, M, Kikuchi, S, Sto, M, Ideno, S, Noda, M, Fukunari, A, Muramatsu S, Itokazu, Y, Sato, K, Takahashi, H, Teplow, DB, Nabeshima, Y, Kakita, A, Imahori, K, Hoshi, M: Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high-mass amyloid b-protein (Ab) assembly from Alzheimer's disease brains. *J Biol Chem*, 284(47):32895-905, 2009.
 7. Kadkhodaei, B, Ito, T, Joodmardi, E, Mattsson, B, Rouillard, C, Carta, M, Muramatsu S, Ichinose, C, Nomura, T, Chambon, P, Metzger, D, Larsson, N, Lindqvist, E, Olson, L, Bjorklund, A, Ichinose, H: Nurr1 is Required for Maintenance of Maturing and Adult Midbrain Dopamine Neurons. *J Neurosci*, 29(50):15923-15932, 2009.
 8. Aizawa H, Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Katayama T, Hasebe N, Kimura T, Yahara O, Kwak S: TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking RNA editing enzyme ADAR2. *Acta Neuropathol* 120:75-84, 2010
doi:10.1007/s00401-010-0678-x.
 9. Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Seeburg PH, Takahashi R, Misawa H, Kwak S: Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. *J Neurosci* 30:11917-11925, 2010. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2021-10.2010.
 10. Hideyama T, Yamashita T, Nishimoto Y, Suzuki T, Kwak S: Novel etiologic and therapeutic strategies for neurodegenerative diseases: RNA editing enzyme abnormality in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Sci*, 113:9-13, 2010.
doi:10.1254/jphs.09R21FM.
 11. Kwak S, Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H: AMPA receptor-mediated neuronal death in sporadic ALS. *Neuropathology* 30:182-188, 2010.
doi:10.1111/j.1440-1789.2009.01090.x.
 12. Krzyżosiak A, Szyszka-Niagolov M, Wietrzyk M, Gobaille S, Muramatsu S, Krężel W. Retinoid X receptor gamma control of motivated behaviours involves dopaminergic signalling in mice. *Neuron*, 66(6):908-920, 2010.
 13. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, Nakano I. A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther*, 18(9):1731-1735, 2010.
 14. Muramatsu S, Asari S, Fujimoto K, Ozawa K, Nakano I: Gene therapy for Parkinson's disease. Strategies for the local production of dopamine. *Gene Therapy & Regulation* 5(1):57-65, 2010.
 15. Muramatsu S: The current status of gene therapy for Parkinson's disease, *Ann Neurosci*, 17(2):92-95, 2010.
 16. Hideyama T, Kwak S: When does ALS start? ADAR2-GluA2 hypothesis for the etiology of sporadic ALS. *Front Mol Neurosci* 4:33, 2011. doi:10.3389/fnmo.2011.00033
 17. Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H, Tsuji S, Kakita A, Takahashi H, Kwak S: Profound downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor

neurons. *Neurobiol Dis* 45:1121-28, 2012. DOI:10.1016/j.nbd.2011.12.033.

18. Yamashita T, Tadami C, Nishimoto Y, Hideyama T, Kimura D, Suzuki T, Kwak S: RNA editing of the Q/R site of GluA2 in different cultured cell lines that constitutively express different levels of RNA editing enzyme ADAR2. *Neurosci Res* in press. doi:10.1016/j.neures.2012.02.002
19. Yamashita T, Hideyama T, Teramoto S, Kwak S: Abnormal processing of TDP-43 does not regulate ADAR2 activity in cultured cell lines. *Neurosci Res* in press.
20. Asari S, Fujimoto K, Miyauchi A, Sato T, Nakano I and Muramatsu S: Subregional 6-[18F]fluoro-L-m-tyrosine uptake in the striatum in Parkinson's disease. *BMC Neurol*, 11-35, 2011.
21. Tokuoka H, Muramatsu S, Ichinose C, Sakane H, Kojima M, Aso Y, Nomura T, Metzger D and Ichinose H: Compensatory regulation of dopamine after ablation of the tyrosine hydroxylase gene in the nigrostriatal projection. *J Biol Chem*, 286(50):43549-43558, 2011.
22. Miyamoto M, Miyamoto T, Iwanami M, Muramatsu S, Asari S, Nakano I and Hirata K: Preclinical substantia nigra dysfunction in rapid eye movement sleep behaviour disorder. *Sleep Med*, 13(1): 102-106, 2011.
23. Muramatsu S, Asari S: Assessment of dopaminergic function in Parkinson's disease by SPECT/PET. *Horizons in Neuroscience Research* Volume 7, Nova Publishers, in press.
24. Muramatsu S: Gene therapy for continuous dopamine production in Parkinson's disease. *Dopamine: Functions, Regulation and Health Effects*, Nova Publishers, in press.
25. Kondo Y, Okuno T, Asari S and Muramatsu S: Cell therapy for Parkinson's disease. *Clinical implications of fetal*

transplantation in Medicine (editors: Stubblefield P and Bhattacharya N), Springer-Verlag, in press.

他 13 編

学会発表

1. 澤田 潤、相澤仁志、長谷部直幸、木村隆、箭原修、山下雄也、郭 伸: AMPA 受容体サブユニット GluR2 の Q/R 部位 RNA 編集率に及ぼす各種薬剤の効果. 第 50 回日本神経学会総会、仙台、May 20-22, 2009.
2. 詫間 浩、山下 雄也、郭 伸、玉岡 晃: マイクロアレイを用いた RNA 編集酵素 (ADAR2) の新規基質の同定. 第 50 回日本神経学会総会、仙台、May 20-22, 2009.
3. 郭 伸: 「興奮性神経細胞死から見た ALS」 ALS シンポジウム. 第 50 回日本神経病理学会、高松、June 4-6, 2009.
4. 郭 伸: 「ALS における RNA editing」. シンポジウム「精神・神経・筋疾患のトランスレーショナルリサーチ」第 52 回日本神経化学会、伊香保、June 22-24, 2009.
5. 郭 伸, 日出山拓人, 山下雄也, 鈴木岳之: 「発症機構から導き出された神経疾患の薬物治療への新たな可能性」. シンポジウム「生体機能と創薬シンポジウム」. 日本薬学会, 東京, August 26-27, 2009.
6. 郭 伸: 「ALS 治療標的としての興奮性細胞死. Excitotoxicity, old but new vistas to ALS therapy」シンポジウム「神経変性疾患の分子標的治療への新たな展開, Molecular targeted therapy for neurodegenerative disease - new progress」第 32 回日本神経科学大会, 名古屋, September 13-18, 2009.
7. Hideyama T, Yamashita T, Tsuji S, Takahashi R, Misawa H, Suzuki T, Kwak S: Role of RNA editing of GluR2 mRNA in mouse model of sporadic ALS. *The 20th International Symposium on MND/ALS*, Berlin, 8-10 Dec, 2009.
8. 鈴木聡文、下西学、郭 伸、多田幸雄、小

- 島宏建、岡部隆義、長野哲雄：ALS の病因仮説である RNA 編集率低下の改善を目指したスクリーニング系の構築. 日本薬学会 第 130 年会、岡山、March 28-30, 2010.
9. 村松慎一：パーキンソン病の再生医学. 第 50 回日本神経学会総会，仙台，2009 年 5 月 22 日. (プログラム p45)
 10. 浅利さやか，村松慎一：パーキンソン病の遺伝子治療の PET 解析. 第 50 回日本神経学会総会，仙台，2009 年 5 月 22 日. (プログラム p121)
 11. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari 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 therapy for Parkinson's disease: results from an open-label, phase I trial", The American society of gene therapy (ASGT)'s 12th annual meeting, San Diego, May 29, 2009.
 12. 伊藤哲男，林司，古寺美加，水上浩明，小澤敬也，三室淳，坂田洋一，村松慎一：中和抗体法と相関性のある抗 AAV2 抗体検出試薬の開発. 第 32 回日本血栓止血学会学術集会，北九州，2009 年 6 月 5 日. (日本血栓止血学会誌 20(2), p204)
 13. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I: Phase I trial of AAV vector-mediated gene delivery of aromatic L-amino acid decarboxylase for parkinson's disease. The Japan society of gene therapy's 15th annual meeting. Osaka, July 11, 2009.
 14. 村松慎一，一瀬宏：線条体のドパミン代謝：新たな視点と治療. 第 32 回日本神経科学大会，名古屋，2009 年 9 月 17 日. (プログラム p84)
 15. 郭 伸：「AMPA 受容体サブユニットの RNA editing 異常と孤発性 ALS」第一回宮崎先端医学セミナー「グルタミン酸受容体の基礎と臨床」宮崎 April 23, 2010.
 16. 郭 伸：「Inefficient A-to-I RNA editing and ALS/ALS における RNA editing 異常の病因的意義」シンポジウム：Neurodegenerative diseases and RNA/神経疾患と RNA、第 51 回日本神経学会総会 東京 May 22, 2010.
 17. 澤田潤、相澤仁志、長谷部直幸、山下雄也、郭 伸：AMPA 受容体サブユニット GluR2 の Q/R 部位 RNA 編集率に及ぼす各種薬剤の効果. 第 51 回日本神経学会総会、東京、May 20-22, 2010.
 18. 日出山拓人、山下雄也、相澤仁志、柿田明美、高橋均、辻省次、郭 伸：孤発性筋萎縮性側索硬化症と RNA 編集異常. 第 51 回日本神経学会総会、東京、May 20-22, 2010.
 19. Aizawa H, Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Kwak S: TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in neurons lacking the RNA editing enzyme ADAR2. *XIIth International Congress on Neuromuscular Diseases*, Naples, 17-22 July 2010.
 20. 郭 伸：「ADAR2 活性と TDP-43：統一理論は可能か？」厚生労働省難治性疾患克服事業 神経変性疾患に関する研究班夏のワークショップ 東京 July 23, 2010.
 21. 日出山拓人、山下雄也、鈴木岳之、Higuchi Miyoko, Seeburg H Peter, 高橋良輔、辻省次、三澤日出巳、郭 伸：孤発性筋萎縮性側索硬化症における RNA 編集酵素異常. RNA editing enzyme abnormality in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. ミニシンポジウム「若手研究者が展開する筋萎縮性側索硬化症研究の将来展望」第 33 回日本神経科学大会，神戸 September, 2-4, 2010.
 22. 山下雄也，日出山拓人，寺本さやか、郭 伸：GluR2 RNA 編集異常と TDP-43 蛋白のプロセッシング異常の分子連関. Analysis for the molecular link between abnormal GluR2 RNA editing and TDP-43 protein processing. 第 33 回神経科学大会、neuro2010、神戸 September 2-4, 2010.
 23. Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Seeburg PH, Takahashi R, Misawa H, Kwak S: Absence of GluR2 RNA editing induces slow death of motor

- neurons in conditional ADAR2 knockout mice. *40th Annual Meeting Society for Neuroscience*, San Diego, 13-17 November 2010.
24. 郭 伸: Inefficient GluA2 RNA editing as a cause of slow death of motor neurons. Current understandings and future directions for ALS. First BRI International Symposium 2010 新潟大学脳研究所シンポジウム 新潟 November 22-23, 2010.
 25. Aizawa H, Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Kwak S: Close association of TDP-43 pathology with loss of RNA editing enzyme ADAR2 in motor neurons of sporadic ALS. *The 21st International Symposium on MND/ALS*, Orland, 11-13 December, 2010.
 26. 村松慎一, 浅利さやか, 中村優子, 川上忠孝, 池口邦彦, 藤本健一, 中野今治: AADC 遺伝子導入による L-dopa 反応性の変化. 第 51 回日本神経学会総会, 東京, 2010 年 5 月 20 日. (プログラム p69)
 27. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I: AADC gene therapy for Parkinson's disease: A phase I study. The Japan society of gene therapy's 16th annual meeting. Utsunomiya, July 1, 2010. (abstract p55)
 28. 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子・細胞治療. 第 20 回日本保健科学学会学術集会, 東京, 2010 年 10 月 9 日. (特別講演) (日本保健科学学会誌 Vol.13(1), p18)
 29. 村松慎一: 神経変性疾患の遺伝子治療へ AAV ベクターの応用へ. 第 4 回 In vivo 実験医学シンポジウムへ「In vivo 実験医学の今後の展望」へ, 東京, 2011 年 2 月 23 日. (招待講演) (プログラム p34-35)
 30. 郭 伸: Failure of RNA editing and the pathogenesis of ALS. AAN-JSN Joint Symposium (ALS セッション) 第 52 回日本神経学会総会 名古屋 May 18-20, 2011.
 31. Kwak S: Failure of RNA editing and ALS pathogenesis. ALS Conference. Tarry Town NY, September 7-9, 2011. (招待講演)
 32. 郭 伸: 孤発性 ALS における ADAR2-GluA2 仮説. 都医学研セミナー 東京都医学総合研究所 東京 March 19, 2012.
 33. Yamashita T, Hideyama T, Hachiga K, Teramoto S, Kwak S: Abnormal GluR2 RNA editing and TDP-43 pathology in ALS motor neurons. *41st Annual Meeting Society for Neuroscience*, Washington DC 12-16 Nov, 2011.
 34. Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H, Kwak S: Downregulation of RNA editing enzyme ADAR2 and sporadic ALS. *The 22^d International Symposium on MND/ALS* Sydney 30 Nov - 2 Dec, 2011
 35. 澤田潤, 相澤仁志, 片山隆行, 長谷部直幸, 山下雄也, 郭 伸: AMPA 受容体サブユニット GluR2 の Q/R 部位 RNA 編集率に及ぼす各種薬剤の効果. 第 52 回日本神経学会総会, 名古屋, May 18-20, 2011.
 36. 日出山拓人, 山下雄也, 相澤仁志, 柿田明美, 高橋均, 辻省次, 鈴木岳史, Seeburg PH, Higuchi M, 高橋良輔, 三澤日出巳, 郭 伸: 孤発性 ALS における RNA 編集異常のメカニズムと運動ニューロン死. 第 52 回日本神経学会総会, 名古屋, May 18-20, 2011.
 37. 山下雄也, 日出山拓人, 八賀康介, 寺本さやか, 郭 伸: ALS 運動ニューロンにおける RNA 編集異常と TDP-43 の病理. Abnormal GluR2 RNA editing and TDP-43 pathology in ALS motor neurons. 第 34 回神経科学大会, neuro2011, 横浜 September 14-17, 2011.
 38. 村松慎一, 奈良優子, 浅利さやか, 宮内ひとみ, 綾部啓子, 滝野直美, 中野今治, 嶋崎久仁子: 血管内投与型 AAV ベクターによる乏突起膠細胞への遺伝子導入. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011 年 5 月 18 日, 名古屋. (プログラム p285)
 39. Asari S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Watanabe E, Sato T, Ozawa K, Nakano I and Muramatsu S: PET assessment of the aromatic L-amino acid decarboxylase gene expression in a phase I gene therapy study for

Parkinson's disease. 15th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Jun 9, 2011, Toronto. (Program p83)

40. Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Strategies for the local production of dopamine. The Federation of European Biochemical Societies 36th FEBS Congress, Jun 30, 2011, Torino.
41. Muramatsu S: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. The 17th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, 2nd Takara Bio Award Lecture, Jul 15, 2011, Fukuoka. (abstract p102)
42. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I: AADC gene therapy for Parkinson's disease: Four years of follow-up. The 17th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Best Presentation, Jul 15, 2011, Fukuoka. (abstract p107)
43. Muramatsu S: In vivo imaging in cell and gene therapy for Parkinson's disease. The 17th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 17, 2011, Fukuoka. (abstract p91)
44. Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Four years follow-up. The 8th International Symposium, Sep 21, 2011, Nikko. (abstract p20-21)

45. Muramatsu S: Gene therapy: the state of the art. 6th International Expert Meeting on the Treatment of Parkinson's disease, Oct 30, 2011, Tokyo.

46. Muramatsu S: Frequent formulae of current Kampo medicine in Japan. Annual Congress of Korean Oriental Medical Society, Nov 6, 2011, Seoul.

他 9 編

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

1. Methods of treating Parkinson's disease using recombinant adeno-associated virus virions. 登録日 2009年9月15日, 番号: 7,588,757, 発明者 小澤敬也, 藤本健一, 村松慎一, 池口邦彦, 中野今治, 出願国 米国
2. 「筋萎縮性側索硬化症の予防及び治療のための医薬」出願人 国立大学法人 東京大学, 郭 伸, 山下雄也, 日出山拓人 出願国 日本 (特願 2009-175128 出願日 2009年07月28日), 世界知的所有権機関 (WIPO) 出願番号 PST/JP2010/062580 (出願日 2010年07月27日).
3. 神経系細胞への遺伝子導入のためのアデノ随伴ウイルスビリオン. 出願日 2011年10月26日, 番号: PCT11-0056, 発明者 村松慎一

実用新案登録

なし

その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
（総合・分担）研究報告書

孤発性 ALS の分子異常を標的とした治療技術の確立
（運動ニューロンのADAR2活性を賦活する薬物の開発）

研究分担者 相澤 仁志（独）国立病院機構東京病院地域医療連携部長

研究要旨：ADAR2 活性を測定する目的で Tet-HeLaG2m細胞系培養細胞により薬剤 274 種を一次スクリーニングし、現在まで 23 種類の薬剤が ADAR2 活性を賦活することを確認した。

A.研究目的

ALSの運動ニューロン死に特異的変化である RNA編集酵素ADAR2の活性低下を正常化する薬剤のスクリーニングをする。

B.研究方法

Tet-HeLaG2m培養細胞に薬剤を10nM-10μMの間で24時間暴露する。総RNAを抽出して GluA2 Q/R部位のRNA編集率を測定する。有意な編集率の変化を引き起こした物質については、ADAR2 mRNA、GluA2 pre-mRNAを定量しADAR2活性賦活作用のメカニズムを検討する。対象は市販薬、および活性のある市販薬に類似の構造を持つ化合物、転写活性物質とする。

（倫理面への配慮）

培養細胞を使用した薬剤スクリーニングであり、倫理面の問題はない。

C.研究結果

現在まで、合計274種の薬剤スクリーニングを行い、23種でADAR2活性賦活作用を確認した。

D.考察

ADAR2活性賦活作用を有する薬剤はADAR2活性を低下させた孤発ALSのモデルマウスであるコンディショナルマウスを用いたin vivo二次スクリーニングに使用可能と考えられる。

E.結論

新たにADAR2活性賦活作用を有する薬剤を複数見いだした。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. [Aizawa H](#), Azuma N, Katayama T, et al. Cerebrovascular disease and intracranial artery stenosis in patients with symptomatic peripheral artery disease. J Stroke Cerebrovasc Dis. Epub Jun 22, 2011.
2. Saito T, [Aizawa H](#), Sawada J, et al. Lesion of the nucleus intercalatus in primary position upbeat nystagmus. Arch Neurol.67:1403-4,2010.
3. Kumar MA, Jain A, Dechant VE, Saito T, Rafael T, [Aizawa H](#), et al. Anti-N-Methyl-D-aspartate Receptor Encephalitis During Pregnancy. Arch Neurol. 67:884-7,2010.
4. [Aizawa H](#), Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Katayama T, Hasebe N, Kimura T, Yahara O, Kwak S. TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking the RNA editing enzyme ADAR2. Acta Neuropath, 120: 75-84, 2010.
5. Sawada J, Yamashita T, [Aizawa H](#), Aburakawa Y, Hasebe N, Kwak S. Effects of antidepressants on GluR2 Q/R site-RNA editing in Modified HeLa cell line. Neurosci Res. 64: 251-258, 2009.

2. 学会発表

1. [Aizawa H](#), Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Kwak S. TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking the RNA editing enzyme ADAR2. XII International Congress on Neuromuscular Diseases. July, 2010, Naples, Italy
2. 澤田 潤、[相澤仁志](#)、片山隆行、長谷部直

幸、山下雄也、郭 伸。AMPA 受容体サブユニット GluR2 の Q/R 部位 RNA 編集率に及ぼす各種薬剤の効果。第 52 回日本神経学会総会、名古屋。2011 年 5 月

3. 澤田 潤、相澤仁志、長谷部直幸、山下雄也、郭 伸。AMPA 受容体サブユニット GluR2 の Q/R 部位 RNA 編集率に及ぼす各種薬剤の効果。第 51 回日本神経学会総会、東京。2010 年 5 月

4. 相澤仁志、澤田 潤、片山隆行、日出山拓人、山下雄也、木村隆、箭原修、郭 伸。孤発性 ALS 運動ニューロンの TDP-43 病理と GluR2 の RNA 編集異常の関連。第 51 回日本神経病理学会総会、東京。2010 年 4 月

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得：有効性を確認次第提出。
2. 実用新案登録：該当なし
3. その他：該当なし

孤発性 ALS の分子異常を標的とした治療技術の確立

研究分担者 村松慎一 自治医科大学大学内科学講座神経内科学部門・特命教授

研究要旨：孤発性 ALS の遺伝子治療法の基盤技術として、脳と脊髄の運動神経細胞へ効率よく ADAR2 および GluR2 遺伝子を導入可能な方法を開発することを目標に研究を行った。アデノ随伴ウイルス (AAV) のカプシドおよびゲノム塩基配列の改変を行い、血管内あるいは筋肉内投与により中枢神経の広範な領域の運動神経細胞に遺伝子を送達可能なベクターの開発に成功した。

A. 研究目的

孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対する遺伝子治療として、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを応用して治療用の ADAR2 および編集型 GluR2 遺伝子を脳および脊髄の運動神経細胞へ送達する方法を開発する。

B. 研究方法

AAV1, 2, 3, 5, 8, 9, 10 など複数の野生型 AAV のゲノム配列を参考に血管内投与により中枢神経に移行しやすく、神経細胞での遺伝子発現が期待できる AAV ベクターを開発した。カプシド蛋白の数か所のアミノ酸配列を置換し、発現カセットの塩基配列も改変した。また、神経細胞への親和性を持つ Rabies virus の糖タンパク質由来の RVG ペプチド(29 アミノ酸)の誘導体を化学合成しカプシド蛋白を修飾した。AAV3 の inverted terminal repeats (ITR) の間に強力な CMV promoter あるいは神経細胞特異的 Synapsin I (Syn I) promoter と蛍光蛋白質 GFP 遺伝子を搭載した pseudotype AAV ベクターを作製した。これらのベクターを成体マウスの血管内または下肢の筋肉内に投与し、4 週間以降に組織を解析した。また、ADAR2 および GluR2 遺伝子を搭載した血管内型 AAV ベクターを作製した。

C. 研究結果

野生型カプシドを持つ AAV ベクターでは、脳内の少数の神経細胞およびグリア細胞に GFP の発現が認められたが、脊髄の神経細胞では発現が見られなかった。Syn I promoter

プロモーターを搭載した改良型 AAV ベクターでは、血管内投与により脳の広範な領域と脊髄の神経細胞で GFP の発現が認められた。脊髄の ChAT 陽性細胞では 20%程度に GFP の発現が得られた。CMV promoter を搭載した改良型 AAV ベクターを下肢の筋肉に投与した場合にも、脳と脊髄の神経細胞で GFP の発現が認められた。

D. 考察

従来、AAV ベクターは、脳内での逆行性輸送および筋肉内投与による末梢神経終末から脊髄への輸送についての報告があるがその効率は高くなかった。カプシド・ゲノムの改変によりこの点を改善できれば ALS の遺伝子治療が可能になる。今回、開発した改良型ベクターでは、血管内投与および筋肉投与により脊髄の運動神経細胞へ遺伝子導入が可能であり、臨床応用への期待が持てる。血液脳関門を通過する詳細な機序は不明であるが、炎症反応や組織破壊は認めていない。現在、ADAR2 および GluR2 遺伝子を搭載した改良型ベクターを使用して研究代表者により前臨床試験が実施されている。

E. 結論

カプシド蛋白およびゲノム配列を改変し、血管内投与により効率よく脳と脊髄の神経細胞へ ADAR2 および編集型 GluR2 遺伝子を導入可能な AAV ベクターを開発した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukushima F, Nakao K, Shinoe T, Fukaya M, Muramatsu S, Sakimura K, Kataoka H, Mori H, Watanabe M, Manabe M, Mishima M : Ablation of NMDA receptors enhances the excitability of hippocampal CA3 neurons. PLoS ONE, 4(1):e3993, 2009.
2. 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, 63:541-548, 2009.
3. Okuno T, Nakayama T, Konishi N, Michibata H, Wakimoto K, Suzuki Y, Nito S, Inaba T, Nakano I, Muramatsu S, Takano M, Kondo Y, Inoue N: Self-contained induction of neurons from human embryonic stem cells. PLoS ONE, 4:e6318, 2009.
4. Ito T, Yamamoto S, Hayashi T, Kodera M, Mizukami H, Ozawa K, Muramatsu S: A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of anti-adenovirus neutralising antibodies. Ann Clin Biochem, 46(Pt 6):508-510, 2009.
5. Noguchi, A, Matsumura, S, Dezawa, M, Tada, M, Yanazawa, M, Ito, A, Akioka, M, Kikuchi, S, Sto, M, Ideno, S, Noda, M, Fukunari, A, Muramatsu S, Itokazu, Y, Sato, K, Takahashi, H, Teplow, DB, Nabeshima, Y, Kakita, A, Imahori, K, Hoshi, M: Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high-mass amyloid β -protein (A β) assembly from Alzheimer's disease brains. J Biol Chem, 284(47):32895-905, 2009.
6. Kadkhodaei, B, Ito, T, Joodmardi, E, Mattsson, B, Rouillard, C, Carta, M, Muramatsu S, Ichinose, C, Nomura, T, Chambon, P, Metzger, D, Larsson, N, Lindqvist, E, Olson, L, Bjorklund, A, Ichinose, H: Nurr1 is Required for Maintenance of Maturing and Adult Midbrain Dopamine Neurons. J Neurosci, 29(50):15923-15932, 2009.
7. Kuratomi S, Ohmori Y, Ito M, Shimazaki K, Muramatsu S, Mizukami H, Uosaki H, Yamashita JK, Arai Y, Kuwahara K and Takano M : The cardiac pacemaker-specific channel Hcn4 is a direct transcriptional target of MEF2. Cardiovasc Res, 83(4):682-687, 2009.
8. Krzyżosiak A, Szyszka-Niagolov M, Wietrzych M, Gobaille S, Muramatsu S and Kręzel W: Retinoid X receptor gamma control of motivated behaviours involves dopaminergic signalling in mice. Neuron, 66(6):908-920, 2010.
9. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. Mol Ther, 18(9):1731-1735, 2010.
10. Asari S, Fujimoto K, Miyauchi A, Sato T, Nakano I and Muramatsu S: Subregional 6-[¹⁸F]fluoro-L-m-tyrosine uptake in the striatum in Parkinson's disease. BMC Neurol, 11-35, 2011.
11. Tokuoka H, Muramatsu S, Ichinose C, Sakane H, Kojima M, Aso Y, Nomura T, Metzger D and Ichinose H: Compensatory regulation of dopamine after ablation of the tyrosine hydroxylase gene in the nigrostriatal projection. J Biol Chem, 286(50):43549-43558, 2011.
12. Miyamoto M, Miyamoto T, Iwanami M, Muramatsu S, Asari S, Nakano I and Hirata K: Preclinical substantia nigra dysfunction in rapid eye movement sleep behaviour disorder. Sleep Med, 13(1):102-106, 2011.
13. Muramatsu S, Asari S: Assessment of dopaminergic function in Parkinson's disease by SPECT/PET. Horizons in Neuroscience Research Volume 7, Nova Publishers, *in press*.
14. Muramatsu S: Gene therapy for continuous dopamine production in Parkinson's disease. Dopamine: Functions, Regulation and Health Effects, Nova Publishers, *in press*.
15. Kondo Y, Okuno T, Asari S and Muramatsu S: Cell therapy for Parkinson's disease. Clinical implications of fetal transplantation in Medicine

(editors: Stubblefield P and Bhattacharya N), Springer-Verlag, *in press*.

2.学会発表

1. 村松慎一：パーキンソン病の再生医学. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 2009 年 5 月 22 日. (プログラム p45)
2. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari 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 therapy for Parkinson's disease: results from an open-label, phase I trial ", The American society of gene therapy (ASGT)'s 12th annual meeting, San Diego, May 29, 2009.
3. 伊藤哲男, 林司, 古寺美加, 水上浩明, 小澤敬也, 三室淳, 坂田洋一, 村松慎一：中和抗体法と相関性のある抗 AAV2 抗体検出試薬の開発. 第 32 回日本血栓止血学会学術集会, 北九州, 2009 年 6 月 5 日. (日本血栓止血学会誌 20(2), p204)
4. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I : Phase I trial of AAV vector-mediated gene delivery of aromatic L-amino acid decarboxylase for parkinson's disease. The Japan society of gene therapy's 15th annual meeting. Osaka, July 11, 2009.
5. 村松慎一, 一瀬宏：線条体のドパミン代謝：新たな視点と治療. 第 32 回日本神経科学大会, 名古屋, 2009 年 9 月 17 日. (プログラム p84)
6. Muramatsu S: Cell therapy for Parkinson's disease. 2nd AOPMC Congress, Feb 17, 2009, New Delhi.
7. Muramatsu S: Gene and Cell therapy for Parkinson's disease. Taiwan Movement Disorder Society Symposium, May 9, 2009, Taipei.
8. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I: AADC gene therapy for Parkinson's disease: A phase □ study. The 16th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 1, 2010, Utsunomiya. (abstract p55)
9. Asari S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Watanabe E, Sato T, Ozawa K, Nakano I and Muramatsu S: Positron emission tomography assessment of aromatic L-amino acid decarboxylase gene transfer in Parkinson's disease. The 15th annual meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 1, 2010, Utsunomiya. (abstract p166)
10. Tokuoka H, Muramatsu S, and Ichinose H: Compensatory regulation of dopamine content in the nigro-striatal dopaminergic projection. Neuro 2010, Sep 2, 2010, Kobe. (Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry, Vol .49 (No.2,3) p477, 2010)
11. Asari S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Watanabe E, Sato T, Ozawa K, Nakano I and Muramatsu S: *In vivo* assessment of the aromatic L-amino acid decarboxylase gene expression by positron emission tomography in Parkinson's disease. Neuro2010, Sep 2, 2010, Kobe. (Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry, Vol .49 (No.2,3) p484, 2010)
12. 村松慎一：パーキンソン病の遺伝子・細胞治療. 第 20 回日本保健科学学会学術集会, 2010 年 10 月 9 日, 東京. (特別講演) (日本保健科学学会誌 Vol.13(1), p18)
13. Muramatsu S: Promise of gene therapy in PD. 3rd Asian and Oceanian P arkinson's Disease and Movement Disorders Congress (AOPMC), Mar 27, 2011, Taipei.
14. Muramatsu S: Gene and stem cell therapy in Parkinson's disease. 8th International Symposium of Asian and Pacific Parkinson Association (APPA), Mar 27, 2011, Taipei.
15. 村松慎一, 奈良優子, 浅利さやか, 宮内ひとみ,

- 綾部啓子, 滝野直美, 中野今治, 嶋崎久仁子: 血管内投与型AAVベクターによるα突起膠細胞への遺伝子導入. 第52回日本神経学会学術大会, 2011年5月18日, 名古屋. (プログラム p285)
16. Asari S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Watanabe E, Sato T, Ozawa K, Nakano I and Muramatsu S: PET assessment of the aromatic L-amino acid decarboxylase gene expression in a phase I gene therapy study for Parkinson's disease. 15th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Jun 9, 2011, Toronto. (Program p83)
17. Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Strategies for the local production of dopamine. The Federation of European Biochemical Societies 36th FEBS Congress, Jun 30, 2011, Torino.
18. Muramatsu S: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. The 17th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, 2nd Takara Bio Award Lecture, Jul 15, 2011, Fukuoka. (abstract p102)
19. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I: AADC gene therapy for Parkinson's disease: Four years of follow-up. The 17th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Best Presentation, Jul 15, 2011, Fukuoka. (abstract p107)
20. Muramatsu S: In vivo imaging in cell and gene therapy for Parkinson's disease. The 17th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 17, 2011, Fukuoka. (abstract p91)
21. Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Four years follow-up. The 8th International Symposium, Sep 21, 2011, Nikko. (abstract p20-21)
22. Muramatsu S: Gene therapy: the state of the art.

6th International Expert Meeting on the Treatment of Parkinson's disease, Oct 30, 2011, Tokyo.

23. Muramatsu S: Frequent formulae of current Kampo medicine in Japan. Annual Congress of Korean Oriental Medical Society, Nov 6, 2011, Seoul.

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

村松慎一: PCT 出願 (PCT/JP2011/075240), 神経系細胞への遺伝子導入のためのアデノ随伴ウイルスベリオン

2. 実用新案登録

3. その他

なし

【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	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Muramatsu S</u> , Asari S	Assessment of dopaminergic function in Parkinson's disease by SPECT/PET.	Andres Costa and Eugenio Villalba	Horizons in Neuroscience Research	Nova Publishers	USA	in Press	
<u>Muramatsu S</u>	Gene therapy for continuous dopamine production in Parkinson's disease.	Endo Kudo and Yuriko Fuji	Dopamine: Functions, Regulation and Health Effects	Nova Publishers	USA	in Press	
Kondo Y, Okuno T, Asari S and <u>Muramatsu S</u>	Cell therapy for Parkinson's disease.	Stubblefield P and Bhattacharya N	Clinical implications of fetal transplantation in Medicine	Springer-Verlag	UK	in Press	
日出山拓人, 郭 伸	筋萎縮性側索硬化症(ALS)、運動ニューロン疾患	小林祥泰 水澤英洋	神経疾患 最新の治療 (2012-2014 年度)	南江堂	東京	2012	243- 246
Pan W, Yamamoto Y, <u>Kwak S</u>	Objective evaluation of the severity of parkinsonism using power-law temporal autocorrelation of activity.	Ed Dushanova J	Diagnosis and Rehabilitation of Parkinson's Disease	InTech	Croatia	2011	225- 238
日出山拓人, 郭 伸	髄液 (CSF)	中原一彦	検査値事典	総合医学社	東京	2011	696 - 701
郭 伸	Kugelberg-Welander 病	金澤一郎, 永井良三	今日の診断 指針 第6版	医学書院	東京	2010	658- 659

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
Yamashita T, Hideyama T, Teramoto S, <u>Kwak S</u>	The abnormal processing of TDP-43 is not an upstream event of reduced ADAR2 activity in motor neurons	Neurosci Res.		doi.org/10.1016/j.neures.2012.02.015	in press
Yamashita T, Tadami C, Nishimoto Y, Hideyama T, Kimura D, Suzuki T, <u>Kwak S</u>	RNA editing of the Q/R site of GluA2 in different cultured cell lines that constitutively express different levels of RNA editing enzyme ADAR2.	Neurosci Res.		doi:10.1016/j.neures.2012.02.002	in press
Kiyono K, Hoyano J, <u>Kwak S</u> , Watanabe E, Yamamoto Y	Non-Gaussianity of low frequency heart rate variability and sympathetic activation : lack of increases in multiple system atrophy and Parkinson disease.	Front. Compu. Physiol. Med.		doi:10.3389/fphys.2012.00034	in press
Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H, Tsuji S, Kakita A, Takahashi H, <u>Kwak S</u>	Profound downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor neurons.	Neurobiol Dis.	45	1121-1128	2012
日出山拓人, 郭 伸	ADAR2 発現低下と孤発性 ALS. 特集「筋萎縮性側索硬化症(ALS)の基礎研究」	脳 21	15	34-40	2012
Hideyama T, <u>Kwak S</u>	When does ALS start? ADAR2-GluA2 hypothesis for the etiology of sporadic ALS.	Front. Mol. Neurosci.	4	33	2011
Pan W, <u>Kwak S</u> , Fang Z, Zhi H, Gu G, Lu Y, Yamamoto Y	Traditional Chinese medicine improves activities of daily living in Parkinson's disease.	Parkinson's Dis.	2011	789506	2011
Pan W, <u>Kwak S</u> , Lu Y, Fang Z, Zhu X, Yamamoto Y	A compound belonging to traditional Chinese medicine improves nocturnal activity with nighttime in Parkinson's disease.	Sleep Med	12	307-308	2011