

歳)と報告されている<sup>4</sup>。また非典型的な軽症例として、ジストニア、易疲労性、睡眠障害等を伴い、運動発達は遅れるものの、歩行可能な例が少数報告されている<sup>7</sup>。

画像所見として、頭部 MRI 上、2 割程度の患者では、大脳萎縮、白質変性の所見、脳梁のひ薄化等の異常が報告されているが、有意な所見を示さない例が大半である<sup>1</sup>。PET: (2-deoxy-2-[<sup>18</sup>F] fluoro-D-glucose 使用)で、前頭前野皮質と両側基底核の糖代謝の低下が示されている<sup>8</sup>。また、AADC の基質である fluorodopa (FDOPA)をラベルした 6-[<sup>18</sup>F]fluorodopa (FDOPA)—PET で FDOPA の基底核への取り込みが低下している<sup>8</sup>。線条体の機能不全は AADC 欠損症の主な運動症状であるジストニアと随意運動の障害の原因となり、前頭前野の機能不全が精神遅滞症状をひきおこす原因の一つとなっていると考えられる。

検査所見としては、脳脊髄液中のドパミンの代謝産物である homovanillic acid (HVA) とセロトニンの代謝産物である 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)が非常に低値であり、ドパミンの前駆物質である L-dopa と、セロトニンの前駆物質である 5-hydroxy-tryptophan(5-HTP)が非常に高値である。また L-dopa がメチル化されて代謝された産物である 3-O-methyldopa も上昇する。髄液以外でも、血漿、尿中の L-dopa と 3-O-methyldopa、および 3-O-methyldopa の代謝産物である vanillic acid (VLA)が上昇する。

診断は、上記の臨床症状などから疑われた例に対し、髄液中のカテコールアミン代謝産物を測定する。L-dopa 高値、HVA 低値の特徴的所見が得られた場合、AADC 欠損症と診断する。髄液検査前に、尿中の上記カテコールアミン代謝産物の測定によるスクリーニングも試みられている。確定診断には、血漿中あるいはリンパ球等での AADC 活性の低下、あるいは AADC 遺伝子変異同定が必要である。

### 病因遺伝子変異

AADC 遺伝子は、染色体 7q12.1 に局在している。変異部位は多様で、BIOMDB データベースには 30 種類の変異が、JAKA データベースには 24 種類の変異が登録されている。また、Brun らは 49 人で 24 種類の異なった変異を報告している<sup>1</sup>。

一方、台湾の患者では、16 例中 13 例で、IVS6+4 A>T 変異が確認されている。変異の種類としては、スプライス部位の変異である (IVS6+4A>T)がもっとも多く、45%の患者で検出されているが、全て中国・台湾人である。次に多いのは基質結合部位の変異である S250F で、10%にみられる。また、軽症例になる G102S が 8%で検出されている。日本の患者では、兄弟症例で g.329C > A がヘテロ接合性に検出されている。

### 既存の治療法

AADC の補酵素であるビタミン B6 (Pridoxine)、ドパミン作動薬である Bromocriptine、ドパミンとセロトニンを代謝する Monoamine oxidase (MAO)の阻害

薬である Tranylcypramide や Selegiline、抗コリン薬の Trihexyphenidyl、および L-dopa などが単独で、あるいは併用で試みられている<sup>1,6,9</sup>。軽症例では、これらの治療により、運動機能が改善した例が報告されている。しかし、典型例では、ジストニアや筋緊張低下がやや改善した例はあるが、運動発達が得られた例はなく、ほとんどの例で効果は認められていない。

## ② AADC 欠損症に対する遺伝子治療

2012年に台湾から AADC 欠損症に対する遺伝子治療を実施した結果が報告された<sup>4</sup>。論文報告では、対象は4人の患者で、4・6歳時に治療実施し、現在5・6歳の、男児1例、女児3例。全例、顎定なく、臥床状態であった。遺伝子変異は、3例が IVS6+4 A>T のホモで、1例が IVS6+4 A>T と c.1297\_1298ins の複合ヘテロであった。方法は、ヒト AADC 遺伝子を組み込んだ2型 AAV ベクター (AAV-hAADC-2) を AADC 欠損症患者の線条体 (被殻) に、定位脳手術的に注入した。

治療効果として、運動機能に関して著明な改善を得た。治療開始前は、全員寝たきりの状態で、自発運動は少しのみだったが、遺伝子治療実施1・2週間後には眼瞼下垂が改善し、1か月後からジスキネジアが改善し始め、それと共に運動機能が改善し始めた。1例は、3か月後から顎定が得られ、6か月後に坐位保持可能となり、13か月後には、臥床から自分で坐位が取れて、おもちゃを手を持って遊べるように、16か月後には支えての立位が可能になった。1例は、3か月後に顎定が、9か月後に支えての坐位が可能になった。他の2例でも、顎定が得られ、改善傾向になっている。また運動機能評価として、Alberta Infant Motor Scale (AIMS)、Peabody Developmental Motor Scale, Second edition (PDMS-II)を用いて評価し、全例スケールが改善した。また、認知機能と運動機能を評価する Comprehensive Developmental Inventory for Infants and Toddlers (CDIIT)でも、運動、認知両者とも改善した。oculogyric crisis の改善、感情的な安定性の向上、多汗や体温上昇の改善なども得られた。PET 検査では、治療6か月後に 6-[<sup>18</sup>F]fluorodopa (FDOPA)の基底核への取り込みが改善した。髄液検査でも、ドパミンの代謝産物である HVA とセロトニンの代謝産物である 5-HIAA が増加した。しかし、L-dopa と 3-o-methyldopa は高値のままである。

治療に使われた AADC を発現する AAV ベクターは、自治医大でパーキンソン病に対する遺伝子治療の前臨床試験のために開発したものである。

その後の情報では、現在、実施例数は8例になっており、3例で座位保持可能でうち2例は支えての立位可能に、4例で支えての座位保持可能に改善している。

副作用に関しては、一番多かったのは一過性のジスキネジアであった。2例で口部から顔面のジスキネジアで嚥下障害を来し、1例では3か月間経管栄養を要した。1例で、

チアノーゼを伴う無呼吸発作が 10 か月間反復した。しかし、これらの副作用はいずれも軽快した。

1 例では、術前から全身状態が悪かった患者で、遺伝子治療実施後退院し自宅療養していたが、下痢と嘔吐からくる脱水、ショックにより心停止となり受診。蘇生したが、臥床状態が続いている。

### ③ パーキンソン病に対する AADC 遺伝子治療

パーキンソン病の遺伝子治療には、1) ドパミン合成系の酵素遺伝子を被殻に導入する、2) 神経栄養因子の遺伝子を被殻と黒質に導入する、3) 抑制性神経伝達物質である  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) の合成酵素を視床下核に導入する、という三種類の方法があり、それぞれ臨床試験が実施されている。1) の方法のうち、AADC を発現する AAV ベクターを両側の被殻に注入する第 1 相臨床試験が自治医科大学と米国 UCSF (400 Parnassus Ave. San Francisco) で実施された。両施設では同一ロットの AAV ベクターを使用している。自治医科大学では単群 ( $3 \times 10^{11}$  vector genome) の 6 人を対象とし、UCSF では低用量群 ( $9 \times 10^{10}$  vector genome) の 5 人と高用量群 ( $3 \times 10^{11}$  vector genome) の 5 人の合計 10 人を対象とした。両施設とも 6 か月後の評価で AAV ベクターに関連した副作用は認められなかった。自治医科大学の 6 人では、オフ時 (L-dopa の効果が切れている状態) の unified Parkinson disease rating scale (UPDRS) 運動スコアが 46% 改善した。AADC に結合する [ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-L-m-tyrosine (FMT) をトレーサーとして使用した PET 計測では、6 か月後に 56% の集積増加を認め 2 年後にも計測した 2 名では集積の増加が持続していた<sup>10</sup>。UCSF の 10 人では UPDRS の運動スコアはオフ時に 36%、オン時に 28% 改善した。また、FMT-PET 計測では、遺伝子導入 6 か月後には低用量群で 30%、高用量群では 75% の被殻への集積の増加を認め、4 年後にも計測した 2 名では集積の増加が持続していた<sup>11,12</sup>。

自治医科大学で実施された臨床研究については、総括報告書(添付資料Ⅲ.3 関連する研究の成果)を参照。

## V.3 当該遺伝子治療臨床研究の概要

本臨床研究では、AADC 欠損症患者の線条体 (被殻) に、ヒト AADC 遺伝子を組み込んだ 2 型 AAV ベクター (AAV-hAADC-2) を定位脳手術的に注入する。

AADC (酵素番号 enzyme code: EC4.1.1.28) はそれぞれドパミンおよびセロトニンの前駆体である L-dopa および 5-HTP を特異的基質とする酵素である。したがって AADC によってドパミンとその代謝により産生されるノルアドレナリン、アドレナリン、およびセロトニンが生成される。よって、AADC を注入することにより、ドパミンやセロトニンの欠乏状態が改善される。本臨床研究では、黒質-線条体路の投射先で

ある被殻の背外側部に選択的に AAV-hAADC-2 を注入するので、主に黒質・線条体路のドーパミン活性が上昇することにより、運動機能を中心に症状の改善が期待される。

#### V.4 他の治療法との比較および遺伝子治療を選択した理由

AADC 欠損症の軽症例に対しては、薬物療法により運動機能が改善した報告がある。また、基質結合部位に変異を持つ例で L-dopa 内服によりジストニア、筋緊張低下および発語が改善し、歩行が可能になった例が報告されている。しかし典型例では、ジストニアや筋緊張低下がやや改善した例はあるが、運動発達が得られた例はなく、全く反応がない例がほとんどであり、現状では、AADC 欠損症に対する有効な治療法はない。

AADC 欠損症に対する新しい治療戦略として画像上、構造的な異常が検出されず、機能的な異常が主体でありドーパミン、セロトニン系の機能を改善することにより、脳機能の回復する可能性が考えられ、遺伝子治療による機能回復が期待されている。

2012 年に、台湾から、遺伝子治療成功例が報告された。方法は、ヒト AADC 遺伝子を組み込んだ 2 型 AAV ベクター (AAV-hAADC-2) を AADC 欠損症患者の線条体 (被殻) に、定位脳手術的に注入した。治療効果として、前記(V.2)記載の様に、臥床状態から立位可能になった患者もあるなど、運動機能に関して著明な改善を得た。副作用は、一過性のジスキネジアとチアノーゼを伴う無呼吸発作の反復があったが、これらの副作用はいずれも軽快した。

これらの点から、また、患者家族からの強い希望もあり、遺伝子治療研究実施を計画した。

## VI 遺伝子の種類およびその導入法

### VI.1 人に導入する遺伝子の構造と性質

本臨床研究において用いる遺伝子は、ヒト AADC 遺伝子 (human AADC gene) で、AAV 由来の塩基配列は両端に存在する ITR 以外の部分が除かれ、サイトメガロウイルスのプロモーター/エンハンサー (CMV Promotor)、ヒト  $\beta$  グロビンイントロン、ヒト AADC 遺伝子 (human AADC cDNA)、ヒト成長ホルモンのポリ A 配列 (hGH poly(A)) によって置換されたベクターを用いる。

#### VI.1.1 人に導入する AADC 遺伝子の構造

ヒト AADC 遺伝子は第 7 染色体上に位置する 85,000 塩基対以上におよぶ大きな DNA で、メッセンジャー RNA に対応する 15 のエキソンからなり、各々のエキソンは 20 から 400 の塩基対、イントロンは 1,000 から 17,700 塩基対の長さである<sup>13</sup>。本臨床研究ではメッセンジャー RNA から逆転写で合成されたヒト AADC の相補的 DNA を治療遺伝子として用いるが、イントロンが除かれている点が、もとのゲノム DNA とは異なる。この相補的 DNA はヒト褐色細胞腫の相補的 DNA ライブラリーをもとに、480 個のアミノ酸をコードする 1,440 塩基対と終止コドンを含む 1,443 塩基対として単離されている。図 1 に AADC 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列を示す。

```
1 atgaacgcaa gtgaattccg aaggagaggg aaggagatgg tggattacgt ggccaactac
61 atggaaggca ttgagggacg ccaggtctac cctgacgtgg agccccggta cctgcggccg
121 ctgatccctg ccgctgcccc tcaggagcca gacacgtttg aggacatcat caacgacggt
181 gagaagataa tcatgcctgg ggtgacgcac tggcacagcc cctacttctt cgcctacttc
241 cccactgcc a gctcgtaccc ggccatgctt gcgacatgc tgtgcggggc cattggctgc
301 atcggcttct cctgggcggc aagcccagca tgcacagagc tggagactgt gatgatggac
361 tggctcggga agatgctgga actaccaaag gcatttttga atgagaaagc tggagaaggg
421 ggaggagtga tccaggggaag tgccagtga gcccacctgg tggccctgct ggccgctcgg
481 accaaagtga tccatcggct gcaggcagcg tccccagagc tcacacagggc cgctatcatg
541 gagaagctgg tggcttactc atccgatcag gcacactcct cagtggaaag agctgggtta
601 attggtggag tgaatttaa agccatcccc tcagatggca acttcgcat gcgtgcgtct
661 gccctgcagg aagccctgga gagagacaaa gcggtggcc tgattccttt ctttatggtt
721 gccacctgg ggaccacaac atgctgctcc tttgacaatc tcttagaagt cggctctatc
781 tgcaacaagg aagacatatg gctgcacgtt gatgcagcct acgcaggcag tgcattcatc
841 tgccctgagt tccggcacct tctgaatgga gtggagtttg cagattcatt caactttaat
901 cccacaaat ggctattggt gaattttgac tgttctgcca tgtgggtgaa aaagagaaca
```

961 gacttaacgg gagcctttag actggacccc acttacctga agcacagcca tcaggattca  
1021 gggcttatca ctgactaccg gcattggcag ataccactgg gcagaagatt tcgctctttg  
1081 aaaatgtggt ttgtatttag gatgtatgga gtcaaaggac tgcaggctta tatccgcaag  
1141 catgtccagc tgtcccatga gtttgagtca ctgggtgcgcc aggatccccg ctttgaatc  
1201 tgtgtggaag tcattctggg gcttgtctgc tttcggctaa agggttccaa caaagtgaat  
1261 gaagctcttc tgcaaagaat aaacagtgcc aaaaaaaaaatcc acttggttcc atgtcacctc  
1321 agggacaagt ttgtcctgcg ctttgccatc tgttctcgca cggtggaatc tgcccatgtg  
1381 cagcgggcct gggaacacat caaagagctg gcggccgacg tgctgcgagc agagagggag  
1441 tag

MNASEFRRRGKEMVDYVANYMEGIEGRQVYPDVEPGYLRPLIPAAAPQEPDTFEDIINDVEKIIM  
PGVTHWHSPYFFAYFPTASSYPAMLADMLCGAIGCIGFSWAASPACTELETVMMDWLGKML  
ELPKAFLNEKAGEGGGVIQGSASEATLVALLAARTKVIHRLQAASPELTQAAIMEKLVAYSSDQA  
HSSVERAGLIGGVKKAIPSDGNFAMRASALQEALERDKAAGLIPFFMVATLGTTCSSFDNLE  
VGPICNKEDIWLHVDAAYAGSAFICPEFRHLLNGVEFADSFNPNPHKWLLVNFDCSAMWVKKR  
TDLTGAFRLDPTYLKSHQDSGLITDYRHWQIPLGRRFRSLKMWFVFRMYGVKGLQAYIRKHV  
QLSHEFESLVRQDPRFEICVEVILGLVCFRLKGSNKVNEALLQRINSAKKIHLVPCHLRDKFVLR  
AICSRVESAHVQRAWEHKELAADVLRAERE

図 1 : AADC 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列

### VI.1.2 人に導入する遺伝子の性質

本臨床研究では、2 型 AAV 由来のベクターに神経細胞で安定に遺伝子を発現するサイトメガロウイルス由来のプロモーター配列を組み込み、その下流に配置した AADC 遺伝子を発現させる (図 2)。導入遺伝子が AAV ベクターにより染色体に組み込まれる可能性は極めて低く、導入遺伝子は基本的に染色体外に存在すると考えられている。AAV ベクター内では導入遺伝子は 1 本鎖 DNA であるが、細胞内で 2 本鎖 DNA に変換され導入遺伝子が発現する。ラットでは、この AAV ベクターによる発現は 1 年以上持続することが示唆され、サルにおいても遺伝子導入の効果が 3 年以上持続することが示されている。さらに米国で実施された Neurturin 遺伝子治療の臨床試験における剖検例では、4 年後にも Neurturin 遺伝子の発現が確認されている<sup>14</sup>。

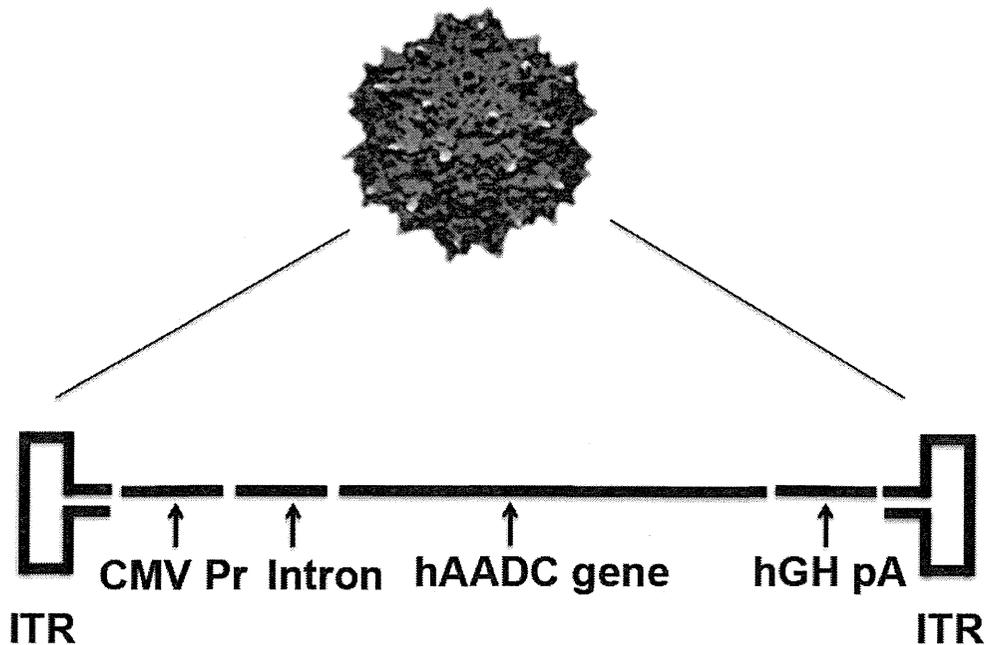


図 2： ウイルスベクターに搭載される遺伝子

AAV 由来の塩基配列は両端に存在する ITR 以外の部分が除かれ、サイトメガロウイルスのプロモーター/エンハンサー (CMV Pr)、ヒト  $\beta$  グロビンイントロン、ヒト AADC 遺伝子 (hAADC gene)、ヒト成長ホルモンのポリ A 配列 (hGH PA) によって置換されている。

### VI.1.3 導入遺伝子からの生成物の構造およびその生物活性

AADC は 53.9kDa の 2 量体として存在し、ドパミンやセロトニンなどの神経伝達物質の合成に関わっている。この酵素は、チロシン水酸化酵素により生合成された L-dopa の脱炭酸によりドパミンを合成する。本臨床研究では、経口投与する L-dopa の投与量を調節することにより、AADC によるドパミンの合成量を制御することが可能である。また、AADC はトリプトファン水酸化酵素により生合成された 5-HTP の脱炭酸によりセロトニンを合成するが、AADC により内因性の 5-HTP から生成されるセロトニンの量は生理的範囲内である。

### VI.2 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質

本計画では他の組換え DNA は使用しない。

### VI.3 標的細胞とした細胞の由来および生物学的特徴ならびに当該細胞を標的細胞とした理由

本臨床研究における標的細胞は被殻の神経細胞である。AADC 欠損症では、ドパミン、セロトニンを合成する AADC 自体が欠損しているために、脳内のドパミン、セロトニンが減少している。特に、ドパミンの作用として最も主要である黒質・線条体路が運動機能の調節に重要である。よって、黒質・線条体路の投射先である被殻の神経細胞を標的として遺伝子導入を行うことが、治療効果を得るために効果的であると期待される。本計画では安全性を考慮し、被殻に存在する自己の神経細胞を標的として遺伝子導入を行い、ドパミンを産生させる。

### VI.4 遺伝子導入方法の概略および当該導入法を選択した理由

遺伝子導入法に関しては、ウイルスベクターあるいは非ウイルスベクターが用いられるが、それぞれには一長一短があるため、標的細胞の種類や必要とされる発現期間などを考慮して目的に応じて使い分ける必要がある。神経細胞に遺伝子導入する場合には、①非分裂細胞である神経細胞に目的遺伝子を効率よく導入できること、②導入遺伝子が長期間にわたり発現すること、③生体に対して安全であること、が求められる。アデノウイルスベクターは細胞障害性が強く、導入遺伝子の発現が一過性である。レンチウイルスベクターは非分裂細胞に遺伝子を導入可能であるが、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) を基本骨格としており、前臨床試験において十分に研究されておらず安全性の面で劣る。AAV ベクターは神経細胞に効率よく遺伝子を導入できること、細胞毒性が少なく、静止期細胞で長期間発現が望めること、非病原性のウイルスを基本骨格としていることから上記 3 条件を満たす。霊長類の AAV には 2 型をはじめとして 100 以上の血清型が報告されている<sup>15</sup>。代表的な血清型について表 1 に示す。5 型では神経細胞以外にグリア細胞にも導入遺伝子の発現が多く認められるが、2 型 AAV は比較的特異的に神経細胞で導入遺伝子が発現する。2 型 AAV ベクターは臨床研究に最も広く使用されており、血友病に対して第 IX 凝固遺伝子発現 AAV ベクターの骨格筋<sup>16</sup>および肝臓への注射<sup>17</sup>、パーキンソン病に対してグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) 発現 AAV ベクターを視床下核に注入する臨床研究<sup>18,19</sup>および神経栄養因子である neurturin 発現 AAV ベクターを被殻に注入する臨床研究<sup>20,21</sup>が既に行われている。以上のことから今回の臨床研究では 2 型 AAV ベクターを利用するのが最適と考えられる。

表 1. 主な霊長類 AAV の血清型

| 血清型 | 2 型との相同性 | 由来 | レセプター   | 標的組織 |
|-----|----------|----|---------|------|
| 1   | 中        | サル | シアル酸    | 骨格筋  |
| 2   | -        | ヒト | ヘパラン硫酸プ | 神経   |

|   |   | ロテオグリカン |                |           |
|---|---|---------|----------------|-----------|
| 3 | 高 | ヒト      | 不明             | 神経        |
| 4 | 低 | サル      | シアル酸           | 脳室上皮      |
| 5 | 低 | ヒト      | シアル酸           | 気道・網膜・神経  |
| 6 | 中 | 1+2型    | シアル酸           | 骨格筋       |
| 7 | 中 | サル      | 不明             | 骨格筋       |
| 8 | 中 | サル      | ラミニン受容体        | 肝臓        |
| 9 | 中 | ヒト      | $\beta$ ガラクトース | 気道・肝臓・骨格筋 |

## VI.5 ウイルスベクターを用いて遺伝子導入

### VI.5.1 野生型ウイルスの生物学的特徴および人に対する影響

2型 AAV はパルボウイルス科デPENDウイルス属に分類される直径約 26 nm のエンベロープを持たない球形ウイルスである。VP1 (82 kDa)、VP2 (65 kDa)、VP3 (60 kDa) が 1:1:10 の比率で合計 60 分子が集まって約 3,600 kDa のキャプシドを構成している。ゲノムは 4,679 ヌクレオチドからなる 1 本鎖 DNA (約 1,500 kDa) であり、プラスとマイナス鎖がほぼ同じ比率で混在する。ゲノム両末端 145 ヌクレオチドは T 字型ヘアピン構造を形成しており inverted terminal repeat (ITR) と呼ばれる。AAV ゲノムには rep と cap 遺伝子がありそれぞれ非構造蛋白質とキャプシド蛋白質をコードしている。AAV はアデノウイルス、ヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスの存在下でのみ増殖でき、単独では増殖できない。単独で細胞に感染した場合、第 19 番染色体の AAVS1 領域 (19q13.42) に特異的にそのゲノムを組み込み、潜伏感染の状態となる。ヘルパーウイルスと同時に感染したり、潜伏感染状態でヘルパーウイルスが感染したときに AAV の増殖が起こる (図 3)。v2 型 AAV は呼吸器を主たる感染経路として人から人へ感染するとされている。大部分は不顕性感染で AAV の感染に伴う特有の疾患は報告されておらず、非病原性と考えられている。米国での調査によると出生直後は AAV に対する抗体は検出できないが、学童期で人口の 50 % 以上で抗体が陽性となる。rep 遺伝子より合成される Rep 蛋白質は過剰発現すると細胞増殖を抑制したり、ヘルパーウイルスを含めた他のウイルスの複製も抑制する。ウイルス粒子は物理化学的に極めて安定で、pH 3 から 9 の間で不活化されず、また 56°C 1 時間の処理でも不活化されない。

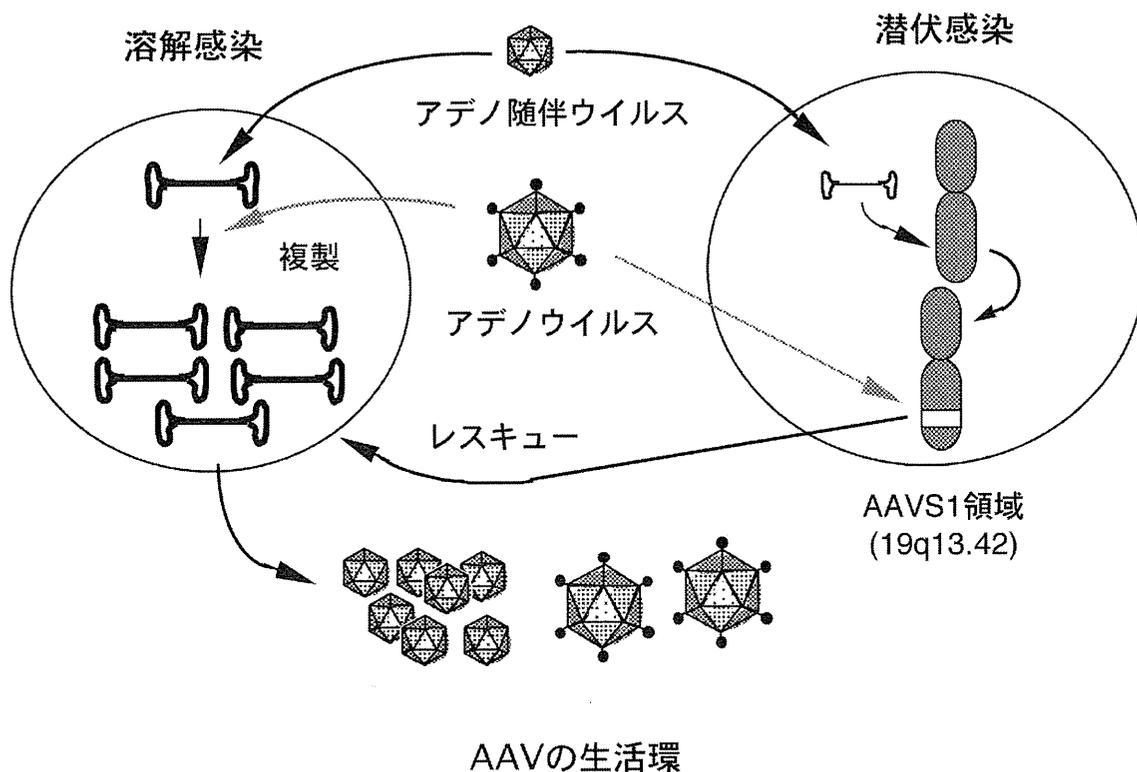


図 3 : AAV の生活環

### VI.5.2 AAV-hAADC-2 の作製方法

AAV-hAADC-2 の作製には、以下の 3 種類のプラスミドを使用した。

- ①pAAV-hAADC-2 : サイトメガロウイルスのプロモーター、 $\beta$  グロビンイントロン、ヒト AADC cDNA、ヒト成長ホルモン遺伝子ポリ A シグナルからなる AADC 発現カセットを AAV2 の ITR 間に挿入した AAV ベクタープラスミド。
  - ②pRC-BI-khB342-2 : AAV ゲノムの ITR を除き AAV2 の rep、cap 遺伝子をクローニングした pRC2 の SnaBI サイトに、ヒト Bcl-XL 遺伝子及び hsa-miR342 を発現するカセットを挿入した AAV2 ヘルパープラスミド。なお、ヒト Bcl-XL 遺伝子及び hsa-miR342 を発現するカセットは、バイディレクショナルに 2 種の遺伝子を発現可能な pBI-CMV1 のマルチクローニングサイト 2 か所にそれぞれ、ヒト BclXL cDNA 及び hsa-miR342 をクローニング後、発現カセットごと PCR で増幅したものである。
  - ③pHelper : 2 型アデノウイルスの E2A、E4、VARNA 遺伝子をクローニングしたアデノウイルスヘルパープラスミド。
- 各プラスミドのマップを図 4~6 に示す。

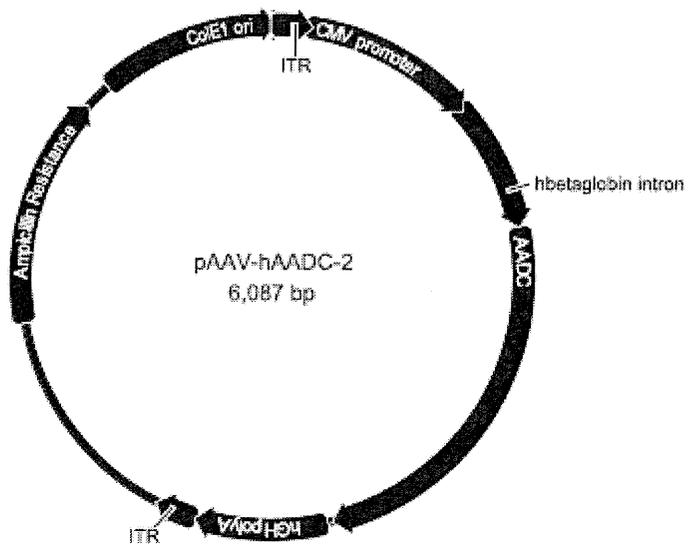


图 4 pAAV-hAADC-2

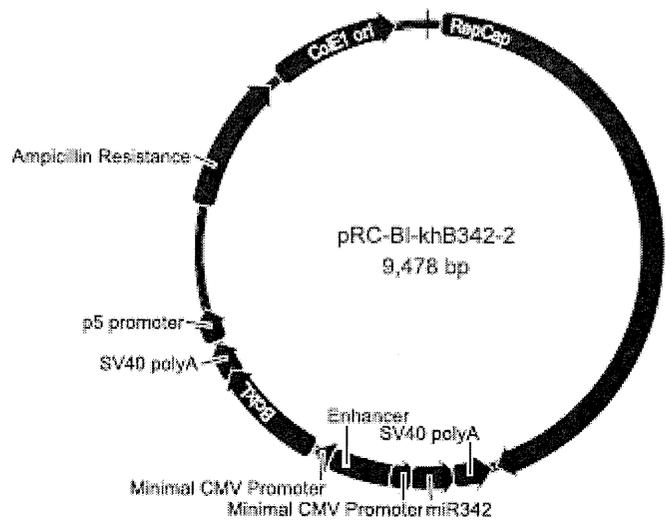


图 5 pRC-BI-khB342-2

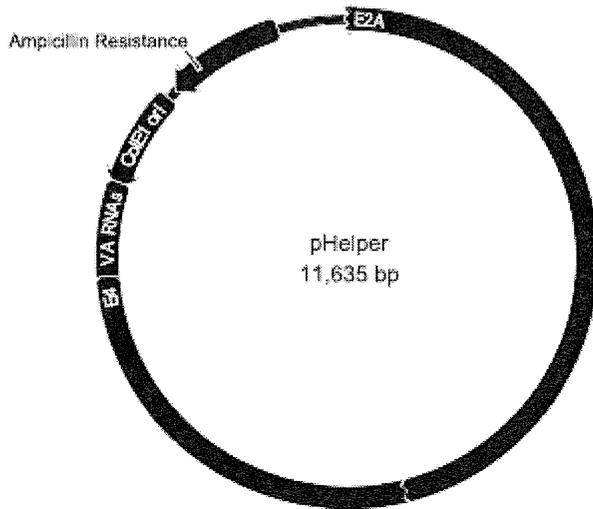


図 6 pHelper

これら 3 種類のプラスミドをリン酸カルシウム法にて 293T/17 細胞にトランスフェクションする<sup>22</sup>。トランスフェクション 3 日後、細胞を回収し凍結融解酸抽出による操作によって細胞内の AAV ベクターを遊離させ、ベンゾナーゼ処理、PEG 処理による粗精製後、塩化セシウム密度勾配超遠心によって精製する。最終濃度 0.05%未満の Poloxamer 188 ポリオキシエチレン(160)ポリオキシプロピレン(30)グリコールを含む pH7.4 の PBS (Phosphate-buffered Saline) にさらに最終濃度 200mM となるように塩化ナトリウムを加えた溶液により、タンジェンシャルフロー・フィルトレーションによりろ過濃縮し、0.22 $\mu$ m のフィルターで滅菌処理を行いウイルスベクター液とする。

ITR は AAV キャプシドへのパッケージングシグナルであるが、rep、cap 遺伝子を持つ AAV ヘルパープラスミド pRC-BI-khB342-2 は ITR 配列を持たないため、replication-competent AAV の出現は極力抑えられている。また rep 遺伝子の p5 プロモーター配列は AAV ヘルパープラスミドと AAV ベクタープラスミドの間で組換えを促進し、偽野生型 AAV の産生を起こすことが知られているが p5 プロモーターの TATA box を破壊し rep、cap 遺伝子のポリ A 配列の下流に移動させることにより偽野生型 AAV が生じなくなることが分かっている。pRC-BI-khB342-2 では偽野生型 AAV の産生を抑えるため p5 プロモーター配列を移動してある<sup>23</sup>。

### VI.5.3 AAV-hAADC-2 の構造

AAV-hAADC-2 の全塩基配列を参考資料 1 「AAV ベクターAAV-hAADC-2 の全塩基配列」に示す。AAV ベクターAAV-hAADC-2 は両末端の ITR は野生型と同じであるがその間はヒト AADC を発現させるための、サイトメガロウイルスのプロモーター/エンハンサー、ヒト  $\beta$  グロビンイントロン、ヒト AADC 遺伝子、ヒト成長ホルモン遺伝子ポリ A シグナルに置換されており、Rep、Cap をコードする配列は持たない。

#### VI.5.4 AAV-hAADC-2 の生物学的特徴

AAV はヘパラン硫酸プロテオグリカンを受容体として感染する。この分子は色々な細胞表面に存在すると考えられるため AAV の組織特異性は低い。人以外の動物でも感染が成立すると考えられている。AAV ベクターは神経細胞、肝臓、骨格筋、心筋などで効率の良い遺伝子発現が起こる。一本鎖ベクターゲノムは核内でその相補鎖とアニールしたり、宿主の DNA 合成酵素の働きで二本鎖となり導入遺伝子を発現できるようになる。また、二本鎖となったベクター DNA は複数が連なり環状 DNA を形成したり、コンカタマーを形成し、その一部が染色体に組み込まれると考えられる。AAV ベクターにより分裂細胞、静止期の細胞双方に遺伝子導入が可能であるが、発現様式に違いがある。分裂細胞では宿主 DNA 合成酵素の働きで発現型二本鎖に変換され感染直後より良好な導入遺伝子の発現が認められる。染色体に組み込まれていない導入遺伝子は細胞分裂に伴い希釈され失われてゆき、染色体に組み込まれた導入遺伝子を持つ細胞が最終的に長期発現を維持する。一方静止期細胞では相補鎖同士のアニーリングが二本鎖ゲノムの主たる合成経路と考えられ、約 1 ヶ月程かかって徐々に導入遺伝子の発現が上昇してゆき、染色体外でコンカタマーの形態で長期間にわたって安定に保持される (図 7)。動物実験では年余にわたる導入遺伝子の発現も報告されている。AAV ベクターゲノムの染色体での組込み部位は、rep 遺伝子を欠いているため AAVS1 領域へは組み込まれず、ランダムに組み込まれるが<sup>24</sup>、その組込み効率は極めて低いと考えられている。マウスでの肝臓での組込み部位の解析では組込みは遺伝子存在領域に組み込まれていることが多く、組込み部位近傍のゲノムが約 2 kb 程まで欠失していることもある<sup>25</sup>。ITR は弱いながらプロモーター活性を持つが、内向きにプロモーター活性を持ち<sup>26</sup>、また染色体への組込みに伴い欠失することが多く、組込み部位近傍の遺伝子の発現を誘導する可能性は少ない。

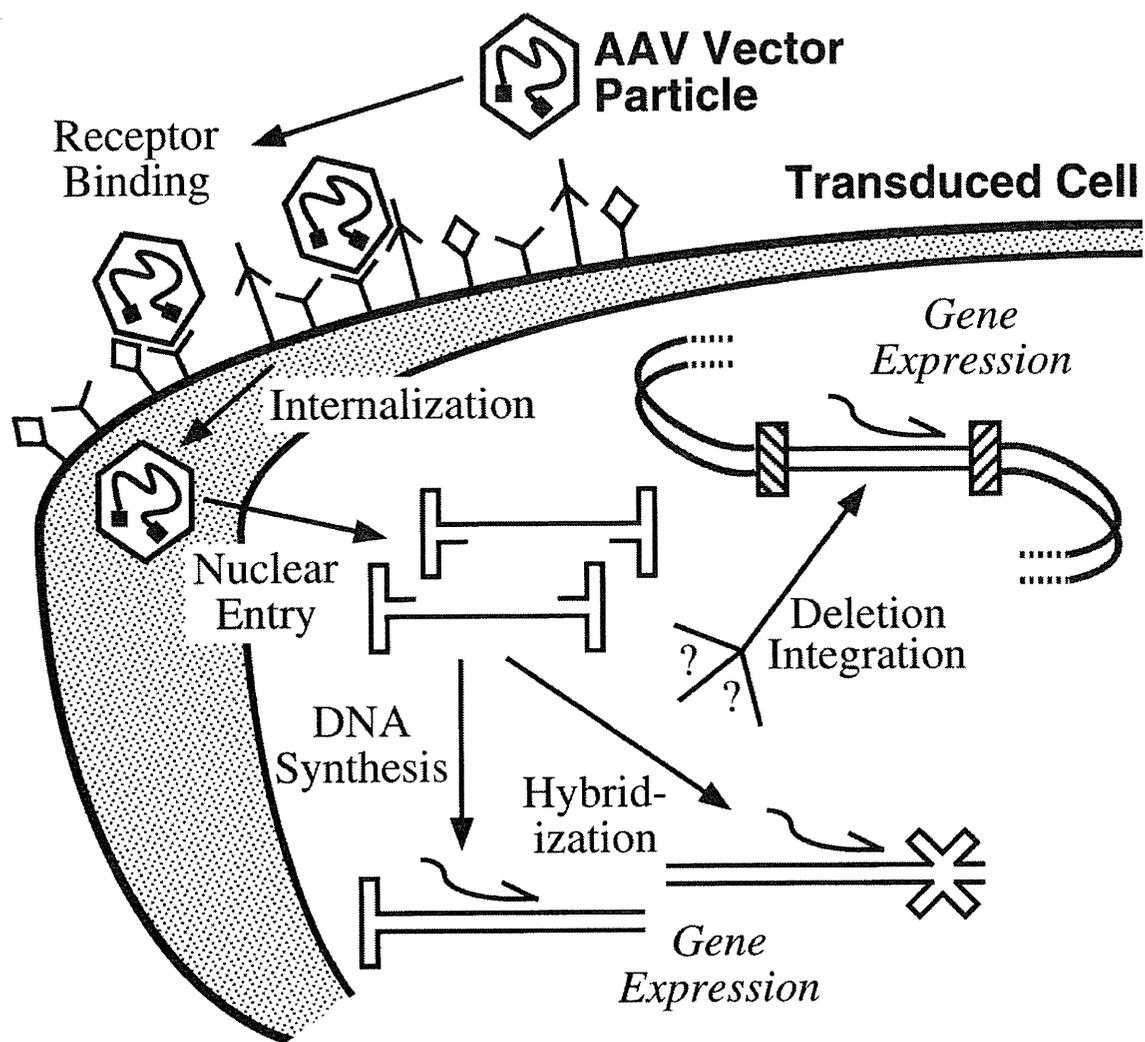


図 7. AAV の感染と発現様式<sup>27</sup>

## VII 安全性についての評価

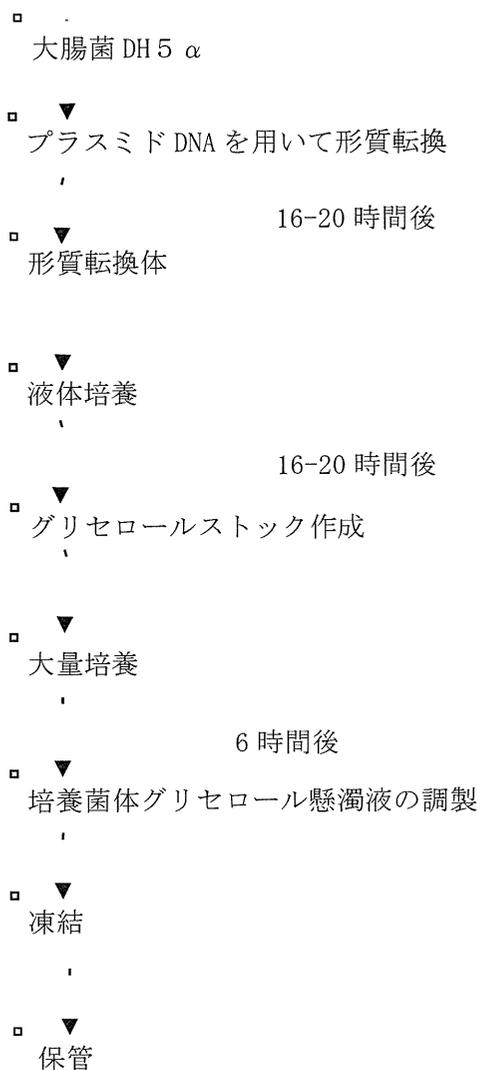
### VII.1 遺伝子導入方法の安全性

#### VII.1.1 遺伝子導入に用いる AAV ベクターの純度

本臨床研究に用いる AAV ベクター AAV-hAADC-2 は、パッケージング細胞 293T/17 に 3 種類のプラスミドを導入し産生する。AAV ベクター AAV-hAADC-2 を安定かつ安全に供給するために、細胞ならびにプラスミドにはセルバンクシステムを使用する。293T/17 のマスターセルバンク (MCB) は、シードセル (ATCC CRL-11268) より、ワーキングセルバンク (WCB) は 293T/17 の MCB より、タカラバイオ社 (滋賀県大津市瀬田 3-4-1) の GMP 製造施設の管理区域で製造する。また、プラスミドのマスターワーキングセルバンク (MWCB) は、株式会社 AMBiS (沖縄県南城市大里字大里 2013) の GMP 製造施設の管理区域で製造する。組成と品質の確認された培地及び試薬を使用し、特にウシ胎児血清はウシ海綿状脳症非発生国産のものを使用する。

##### VII.1.1.1 プラスミド MWCB の作製

プラスミド MWCB の作製フローを図 8 に示す。株式会社 AMBiS の GMP 製造施設の管理区域にてプラスミドを用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  を形質転換した。形質転換体を液体培養し、グリセロールストックを作製した。グリセロールストックを大量培養し、150 バイアルの MWCB が GMP 遵守下で作製された。プラスミド MWCB の作製においては組成と品質が確認された培地及び試薬が使用された。なお、作製に使用する培地及び試薬等を含めた詳細な製造工程、培養条件及び保存条件等を参考資料 2「プラスミド MWCB 作製方法」に記載する。



液体窒素保管容器（気相）

図 8 プラスミド Master Working Cell Bank (MWCB) 作製フローチャート

作製された MWCB に関しては、以下の品質試験が行われた（参考資料 3-5

「pAAV-hAADC-2 プラスミド MWCB の品質試験及び結果」「pRC-BI-khB342-2 プラスミド MWCB の品質試験及び結果」「pHelper プラスミド MWCB の品質試験及び結果」参照）。

1. 生菌数試験
2. コロニー形態試験（単一性試験）
3. プラスミド DNA 保持率試験
4. プラスミド DNA 制限酵素地図試験

## 5. プラスミド DNA 塩基配列試験

### VII.1.1.2 プラスミドベクターの製造

プラスミドベクターの製造フローを図 9 に示す。作製したマスターワーキングセルバンク (MWCB) を株式会社 AMBiS の GMP 製造施設の管理区域にて拡大培養する。培養後、回収した菌体はアルカリ SDS 処理し、遠心後上清液を回収する。さらにゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーを行い、膜濃縮処理にて最終組成バッファーに置換する。バッファー置換後、濃度調整を行い無菌濾過処理後、2 mL クライオバイアルに目標 250  $\mu$ g/バイアルとなるように充填する。充填後、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存する。

プラスミドベクターの製造においては組成と品質が確認された培地及び試薬が使用された。なお、作製に使用する培地及び試薬等を含めた詳細な製造工程、培養条件を参考資料 6「プラスミドベクターの製造方法」に記載する。

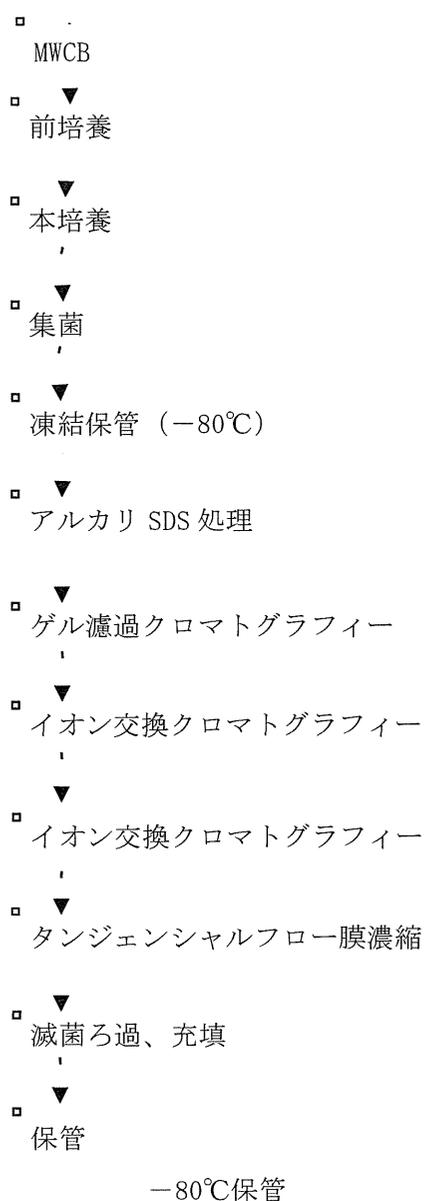


図9 プラスミドベクター 製造フローチャート

製造されたプラスミドベクターに関しては、以下の品質試験が行われた（参考資料 7-9 「pAAV-hAADC-2 プラスミドベクターの品質試験及び結果」「pRC-BI-khB342-2 プラスミドベクターの品質試験及び結果」「pHelper プラスミドベクターの品質試験及び結果」参照）。

1. 性状試験
2. DNA 濃度及び純度試験
3. pH 測定試験

4. エンドトキシン試験
5. 制限酵素地図試験
6. 塩基配列試験
7. 純度試験（電気泳動法）

#### VII.1.1.3 293T/17 MCB の作製

293T/17 MCB の作製フローを図 10 に示す。タカラバイオ社の GMP 製造施設の管理区域にて 1 バイアルの 293T/17 MCB 用シードセル（ATCC CRL-11268）より拡大培養され、最終的に 56 バイアルの 293T/17 MCB が Good Manufacturing Practice (GMP) 遵守下で作製された。293T/17 MCB の作製においては組成と品質が確認された培地及び試薬が使用された。なお、作製に使用する培地及び試薬等を含めた詳細な製造工程、培養条件を参考資料 10「293T/17 MCB の作製方法」に記載する。

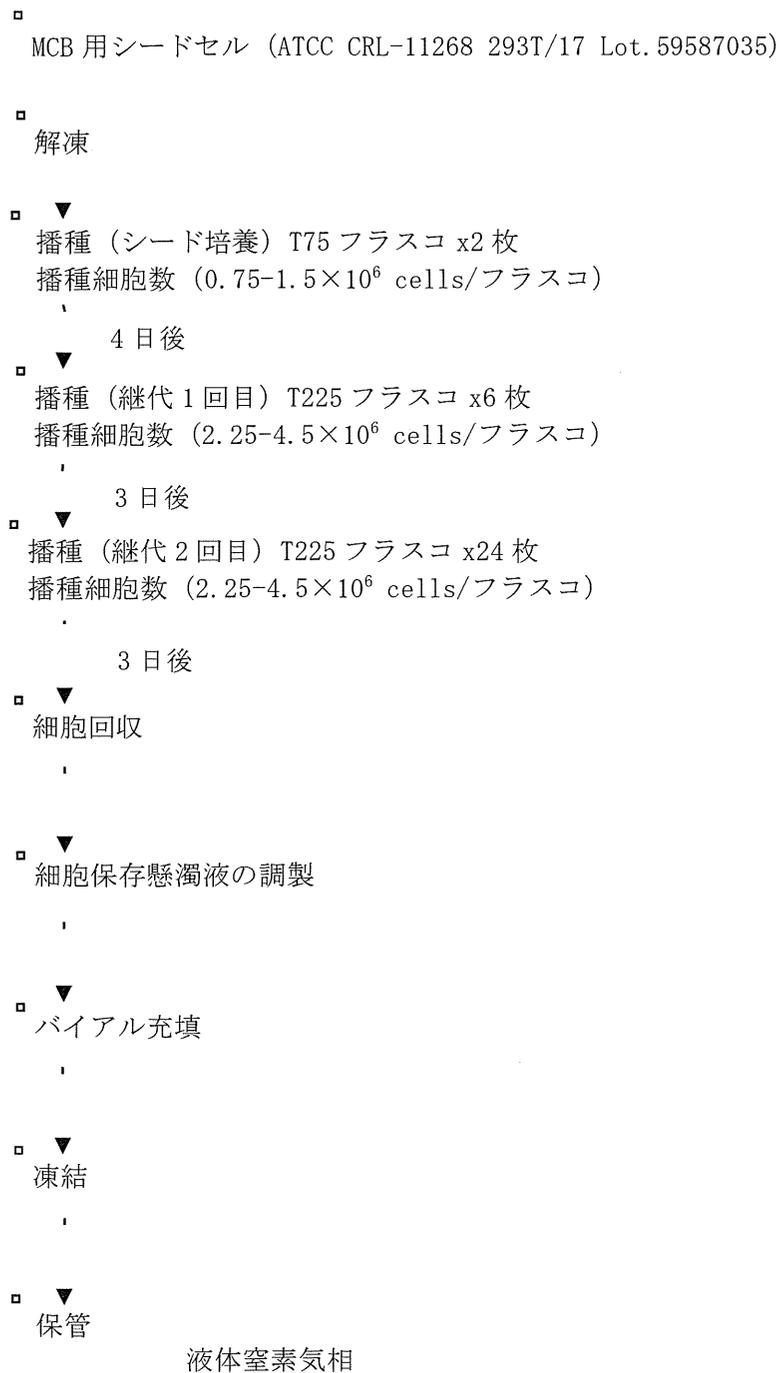


図 10 293T/17 MCB 作製フローチャート