

## AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究

研究代表者 山形 崇倫 自治医科大学医学部 小児科学 教授

### 研究要旨

アデノ随伴ウイルス (AAV) 2 型ベクターは、非病原性であり、神経に移行性が高い。本研究は、AAV2 を用いて、小児の神経系の難治性疾患の遺伝子治療法を開発し確立する事を目的とする。まず、AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究を実施する。今年度は、遺伝子治療の実施手順や評価法を検討し、実施計画書を策定した。また、AAV2 にヒト AADC 遺伝子を組み込んだ治療用ベクターの AAV-hAADC-2 を GMP レベルで作製した。学内の倫理委員会の承認を得た。

また、他の神経難病の遺伝子治療法の開発研究として、GLUT1 欠損症の遺伝子治療法開発研究を開始し、遺伝子治療の評価法を確立した。また、ノックアウトマウスを用いた解析の準備中である。AAV2 に GLUT1 遺伝子 (SLC2A1) を組み込み中である。

### 研究分担者

村松 慎一 自治医科大学医学部神経内科学  
特命教授  
中嶋 剛 自治医科大学医学部脳神経外科  
助教  
渡辺 英寿 自治医科大学医学部脳神経外科  
教授  
竹内 護 自治医科大学医学部麻酔科学  
教授  
加藤 光広 山形大学医学部小児科学 講師  
小坂 仁 自治医科大学医学部小児科学  
教授  
小澤 敬也 自治医科大学医学部血液学、遺  
伝子治療学 教授

### 研究協力者

中村 幸恵 自治医科大学医学部小児科学  
大学院生  
小島 華林 自治医科大学医学部小児科学  
大学院生  
松本 歩 自治医科大学医学部小児科学  
大学院生

AAV ベクター、レンチウイルスベクター等を使用し、副腎白質ジストロフィーなどで治療成功例が報告されてきている。今後、細胞治療と共に、主要なものになると考えられる。

本研究の最大の目的は、神経に移行性の高いアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて、小児の神経系の難治性疾患の遺伝子治療法を開発し確立する事である。そのために、(1) AADC 欠損症の遺伝子治療臨床研究と、(2) その他の神経難病の遺伝子治療法の開発研究を主体として実施する。まず、海外で実施経験のある AADC 欠損症で遺伝子治療を実施し、順次、新たな疾患の治療法を開発していく。

AAV ベクターは、非病原性であり、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する。染色体に組み込まれる率は低く、核内で染色体外に存在すると考えられ、発癌のリスクが低い。血清型で 9 種類知られており、それぞれ臓器親和性が異なっている。2 型 AAV は神経細胞への移行が良好であり、非分裂細胞である神経細胞では、長期に遺伝子発現が得られる。よって、神経系の難治性疾患に対する遺伝子治療のベクターとして最適である。

### (1) AADC 欠損症に対する遺伝子治療臨床研究

芳香族 L アミノ酸脱炭酸酵素欠損症  
Aromatic L-amino acid decarboxylase、AADC

### A . 研究目的

難治性疾患に対する遺伝子治療は、欧米で、

欠損症(OMIM608643)は、カテコールアミンとセロトニンを合成する酵素；AADC をコードする遺伝子の変異により、dopamine、norepinephrine などのカテコールアミン、serotonin の合成が低下し発症する常染色体劣性遺伝性疾患である。

現在、世界中で報告例は 100 症例未満である。台湾では、創始者効果から比較的発症率が高く、生存例が 20 例、死亡例 10 例が確認されている。日本では、4 例診断されている。発症年齢は、典型例では生後 1 か月以内が多く、過半数が 6 か月以下に、重度の運動障害で発症する。新生児期には、筋緊張低下、哺乳困難、易刺激性、眼瞼下垂、低血圧、低血糖などを呈し、その後、運動障害を主体とした症状が出現してくる。主症状は、oculogyric crisis、四肢のジストニア、全身性アテトーゼ、随意運動の障害、ジストニア発作、重度精神運動発達遅滞などである。てんかんの合併例も報告されている。また、自律神経機能障害による心拍・血圧の調整障害、突然の発汗上昇、唾液分泌増加や、情緒不安定、睡眠障害もみられる。生下時から動きが少なく、頸定が得られず、生涯臥床状態である患者がほとんどである。重症例では、症状の進行とともに嚥下困難や呼吸障害が出現し、最重症例では乳幼児期に肺炎で死亡する例がある。多くは小児期に死亡し、有効な治療法はない。

2010 年から台湾で AADC 欠損症の遺伝子治療が開始され、4 例の結果が報告され(Hwu WL 2012)、現在 8 例に実施されている。アデノ随伴ウイルス (AAV) 2 型ベクターに AADC 遺伝子を搭載し、患者の両側被殻に注入した。1 年間の観察で運動機能が改善し、臥床状態から立位可能になった患児もある。合併症は一時的なジスキネジアや無呼吸のみであった。台湾で使用したベクターは、研究分担者らが Parkinson 病患者の遺伝子治療目的に、線状体 Dopamine を増やすために開発したベクターで、神経細胞移行が特に良好である。日本でも Parkinson 病に臨床研究が行われ、6 例に対して、線状体に注入し、運動症状を改善した(Muramatsu S 2010)。

よって、日本人 AADC 欠損症患者に対して、遺伝子治療を実施する事は十分可能であり、また、日本人患者家族の希望も強い。AADC 欠損症で有効な治療は遺伝子治療のみで、病状改善に必須である。

## (2) その他の神経難病の遺伝子治療法の開発研究

AAV ベクターを用い、他疾患の遺伝子治療開発研究を行う。その第一の対象として GLUT1 欠損症を選択した。GLUT1 欠損症は、神経系のグルコーストランスポーターである GLUT1 (SLC2A1 gene) の欠失により、中枢神経細胞のエネルギー不足から、難治性のてんかん、発達遅滞と小脳失調などを来す疾患である。中枢神経細胞へのエネルギー供給を目的としたケトン食治療が有効であるが、効果は限定的であり、また、制限の多い食事のため、ケトン食がうまく実施できないことも多く、長期間の有効な治療法となり得ていない。よって、根本的な治療法の開発が待たれている。

これらの遺伝子治療研究により、患者の症状の改善が期待されると共に、小児神経疾患に対する遺伝子治療法が確立され、また、遺伝子治療に伴う有害事象の評価により、特に小児における遺伝子治療の安全性と今後の多様な疾患への遺伝子治療法開発への指標となることが期待される。

## B . 研究方法

### (1) 対象

日本人 AADC 欠損症患者 4 名。

自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会、厚生科学審議会科学技術部会の承認後、保護者へ十分説明し、インフォームドコンセントを得て実施する。新規患者があった場合は追加する。

### (2) 方法

遺伝子治療実施体制の確立

#### (a) 治療体制の検討

治療は、自治医科大学とちぎ子ども医療センターで実施するが、病棟、PICU での管理体制を確認する。

#### (b) 遺伝子導入方法の検討

手術方法、遺伝子導入部位の確定方法等を検討する。

#### (c) 臨床評価および治療評価方法の確定

治療前後で、治療効果や副作用を確認するための、臨床症状評価や実施する検査法を確定する。

#### (d) 実施計画書の作成

上記を踏まえ、また、ベクター作製経過等を記入し、実施計画書を作成する。

#### (e) 遺伝子治療倫理委員会申請

自治医科大学遺伝子治療倫理審査委員会に申請し、認可を得る。

AADC 遺伝子導入したベクター作製

(a) ベクターの構造

AADC 遺伝子の転写産物は 1,443bp で、480 個のアミノ酸をコードする。2 型 AAV 由来のベクターに、両端の ITR 以外の AAV 由来の塩基配列を除き、サイトメガロウイルス由来プロモーター、AADC cDNA、ヒト成長ホルモンのポリ A 配列 (hGH PA) を組み込む (AAV-hAADC-2)。

(b) ベクターの作製と調整

タカラバイオ社と共同で GMP レベルのベクターを作製する。

また、マウス脳に注入し、Dopamine 産生等測定し、遺伝子の発現を確認する。

GLUT1 欠損症に対する遺伝子治療法開発

(a) GLUT1 の遺伝子である SLC2A1 発現ベクターを細胞内に導入して、GLUT1 を発現させる系を作製。

(b) 抗体作製し発現解析、あるいは糖取り込み能解析などの、遺伝子治療系確立時に、培養細胞レベルで治療効果判定が可能となる遺伝子発現解析系を確立する。

(c) GLUT1 cDNA を AAV ベクターに組み込む。

(d) GLUT1 欠損マウス入手

AAV-GLUT1 の脳室内注入による神経全体への拡散の確認、蛋白発現、糖取り込み能解析、行動解析、等による遺伝子治療効果の解析

(倫理面への配慮)

研究実施にあたって、自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会、自治医科大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得る。

自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会承認後、厚生科学審議会科学技術部会に実施申請し、認可を得た上で実施する。

対象患者は未成年であり、発語がないために意志の確認はできない。よって、患者の保護者に十分に効果とリスクを説明した上で、文書でのインフォームドコンセントを得て実施する。

実施に当たっては、遺伝子治療臨床研究に関する指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省告示第 2 号) を遵守して実施する。

C. 研究結果

遺伝子治療実施体制の確立

(a) 治療体制の検討

小児科病棟に入院し、治療後数日間は PICU 管理する。治療後は陰圧個室に隔離、排泄物

管理に留意し、ベクター排出を PCR で確認し、ベクター DNA 排出がないことを確認し、隔離解除する。また、遺伝子治療実施に向けて、院内の手術、術後管理、ベクターの管理と受け渡し等の体制を整備、確認し、これらの術前・術後体制を確認した。

(b) 遺伝子導入方法の検討

術前に撮影した MRI と FMT-PET 解析に基づき AAV ベクターの注入部位を決定する。定位脳手術により、専用のカニューレを使用して両側線状体 (被殻) 内に注入する。

小児での定位脳手術の実施は全国的に少ない。乳幼児では骨が柔らかいため、固定がずれたり骨折のリスクも否定出来ない。よって、対象は 4 歳以上とした。

治療のための、被殻への注入機器やカニューレも開発し、安全かつ効果的に実施出来る様に準備した。

(c) 臨床評価および治療評価方法の確定

治療効果の判定および有害事象の評価のため、以下の評価・検査を、治療前、治療後定期的に評価することにした。

- ・ 身体所見、神経学的所見、および乳幼児神経学的検査チャートを使用した評価。運動、認知機能をアルバータ乳幼児運動発達検査法、新版 K 式発達検査などのスケールで評価する。
- ・ 血液検査、髄液検査 (L-Dopa、5HTP、HVA、5HIAA 等を含む)
- ・ 頭部 MRI、脳波、神経誘発電位等
- ・ FMT-PET

AADC のトレーサ 6-[<sup>18</sup>F]fluoro-L-*m*-tyrosine を使用した positron emission tomography。AADC 蛋白量の減少のため線条体取込みが消失。治療で改善する見込み。治療前後で実施。

- ・ 全有害事象を記載、検証する。

(d) 実施計画書の作成

上記内容を反映した、「AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究」実施計画書を作製した (資料 1)。

(e) 倫理審査

自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会に申請し、審議の上、2014 年 2 月 14 日付で遺伝子治療研究実施の承認を得た。

現在、厚生科学審議会科学技術部会への承認申請の準備中である。

AADC 遺伝子導入したベクター作製

AAV ベクターに AADC 遺伝子を組み込んだ GMP レベルの AAV-hAADC-2 が作製された (資

料 2 )。各種検定を実施した結果、臨床使用可能である。マウス脳に注入して発現が確認された。また、遺伝子導入後の Dopamine 増加を検出し、遺伝子発現し蛋白が機能している事が確認された。

現在、遺伝子治療実施に必要なベクター量を増産中で、5-6 月頃には十分量が得られる見込みである。

GLUT1 欠損症に対する遺伝子治療法開発 (a) GLUT1 の遺伝子である SLC2A1 発現ベクターを培養細胞内に導入して、GLUT1 を発現させる系を作製した。

GLUT1 自体、および tag として挿入してある myc に対する抗体を作製し、免疫組織染色および Western 法で検出した結果、導入した GLUT1 が細胞膜上に発現している事が検出された。

また、糖取り込み能を解析した結果、遺伝子導入細胞で糖取り込みが増加していた。

よって、培養細胞レベルで遺伝子治療効果を判定する系が確立された。

(b) 現在、SLC2A1 cDNA を AAV2 ベクターに組み込んでいる。

(c) GLUT1 欠損マウス

AAV-GLUT1 の脳室内注入による神経全体への拡散の確認、蛋白発現、糖取り込み能解析、行動解析、等による遺伝子治療効果の解析を行うために、SLC2A1 ノックアウトマウスを作製する事が必要である。ノックアウトマウスを作製予定であったが、既存の SLC2A1 ノックアウトマウスの入手が可能となった。凍結受精卵の状態であり、復元し作製中である。

#### D. 考察

AAV はヒトで病原性がなく安全性が高い。野生型 AAV は単独で複製できず、アデノウイルスなどのヘルパーウイルスを必要とするが、AAV ベクターはウイルス由来遺伝子の大部分が除去され、ヘルパーウイルス存在下でも複製できない。マウス・ラット・サルで神経細胞傷害性がないことが確認されている。腫瘍化の可能性も低い。これらの点から、AAV は遺伝子治療に有用なベクターである。臨床的に、米国で、血友病などに 2 型 AAV ベクターを用いた多数例で遺伝子治療が行われたが、ベクターに関する副作用の報告はない。また、パーキンソン病の治療に、ドーパミン産生を改善する目的で AADC 遺伝子を AAV ベクターに組み込んだ AAV-hAADC-2 を用いた遺伝子治療が開発され、サルでの前臨床研究、およびパ

ーキンソン病患者への臨床研究の結果、治療効果が得られ、ベクターに由来する有害事象はなかった。さらに、台湾で AADC 欠損症に対し、AAV-hAADC-2 を用いた遺伝子治療が治療が行われ、患者の運動機能を改善し、大きな副作用は起きていない。

よって、日本人 AADC 欠損症患者に対しする遺伝子治療を計画した。ベクターは研究分担者らが開発した物で、台湾での遺伝子治療に使われた物と同じ構造である。タカラバイオと共同で GMP レベルのベクターを産生し、各種検定の結果、臨床使用可能なレベルであった。マウス脳に注入した結果、dopamine 産生が増加し、機能も得られている。現在、治療必要量を増産中である。また、遺伝子治療を実施する体制も出来て、学内の倫理委員会の承認も得た。厚生科学審議会へ申請し、承認が得られれば、治療開始可能である。

AAV2 ベクターは、上記のように、安全性も高く、臨床使用が進められている。神経移行性が高いため、他の神経疾患での治療法開発を行っている。最初の候補として、GLUT1 欠損症を対象とした SLC2A1 遺伝子導入 2 型 AAV ベクター (pAAV-SLC2A1-2) を作製中である。治療効果の評価のため、まず、培養細胞型で治療効果を判定する系を確立した。さらに、SLC2A1 ノックアウトマウスを準備中である。

この 2 つの疾患に対する遺伝子治療法開発が順調に進行した場合には、さらにベクター改良の研究、AAV ベクターを用いた他疾患の遺伝子治療法開発も進める。

#### E. 結論

日本人 AADC 欠損症患者への遺伝子治療の臨床研究を実施する準備が出来た。ベクターは、タカラバイオ社に作製委託し、完成しており、遺伝子治療に必要な量を生産中である。実施体制を確認し、実施計画書を作製した。自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会の審議を受け、承認を得た。承認後、厚生科学審議会科学技術部会の承認を得て、患者 4 人に順次治療実施する。

他の疾患での治療法開発研究として、GLUT1 欠損症に対する遺伝子治療法を開発中である。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Matsumoto A, Mizuno M, Hamada N, Nozaki

- Y, Jimbo EF, Momoi MY, Nagata K, Yamagata T. LIN7A depletion disrupts cerebral cortex development contributing to intellectual disability in 12q21-deletion syndrome. *PLoS One* 2014;9:e92695.
2. Okamoto N, Yamagata T, Yada Y, Ichihashi K, Matsumoto N, Momoi MY, Mizuguchi T. Williams-Beuren syndrome with brain malformation and hypertrophic cardiomyopathy. *Brain Dev* 2014 in press.
  3. Saito M, Yamagata T, Shiba Y, Nagashima M, Taniguchi S, Jimbo E, Momoi MY: MAOA/B deletion syndrome in male siblings with severe developmental delay and sudden loss of muscle tonus. *Brain Dev* 2014;36:64-69.
  4. Miyauchi A, Monden Y, Watanabe M, Sugie H, Morita M, Kezuka T, Momoi MY, Yamatata T. Persistent presence of the anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantibody in a pediatric case of acute disseminated encephalomyelitis followed by optic neuritis. *Neuropediat* 2014 in press.
  5. Aoyagi J, Odaka J, Kuroiwa Y, Nakashima N, Ito T, Saito T, Kanai T, Yamagata T, Momoi MY. Utility of nonenhanced magnetic resonance imaging to detect acute pyelonephritis. *Pediatr Int* 2014 in press.
  6. Matsumoto A, Kuwajima M, Miyake K, Kojima K, Nakashima N, Jimbo EF, Kubota T, Momoi MY, Yamagata T. Xp22.12 microduplication including RPS6KA3 identified in a family with variably affected intellectual and behavioral disabilities. *J Hum Genet* 2013;58:755-757.
  7. Kosho T, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saito H, Miyake N, Matsumoto N: Clinical correlations of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: Detailed description of 21 patients and a review of the literature. *Am J Med Genet A* 2013;161:1221-1237.
  8. Kato M, Yamagata T, Kubota M, Arai H, Yamashita S, Nakagawa T, Fujii T, Sugai K, Imai K, Uster T, Chitayat D, Weiss S, Kashii H, Kusano R, Matsumoto A, Nakamura K, Oyazato Y, Maeno M, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito K, Hayasaka K, Matsumoto N, Saito H: Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. *Epilepsia* 2013;54:1282-7.
  9. Monden Y, Mori M, Kuwajima M, Goto T, Yamagata T, Momoi MY: Late-onset Leigh syndrome with myoclonic epilepsy with ragged-red fibers. *Brain Dev* 2013;35:582-585.
  10. Iwasa M, Yamagata T, Mizuguchi M, Itoh M, Matsumoto A, Hironaka M, Honda A, Momoi MY, Shimozawa N: Contiguous ABCD1 DXS1357E deletion syndrome: Report of an autopsy case. *Neuropathology* 2013;33:292-298.
- ## 2 . 学会発表
1. Matsumoto A, Mizuno M, Hamada N, Jimbo EF, Kojima K, Momoi MY, Nagata K, Yamagata T. Contribution of Scaffold proteins to developmental disorder. The 63rd Annual Meeting for the American Society of Human Genetics. 2013.10.22-26. Boston.
  2. Kojima K, Yamagata T, Matsumoto A, Jimbo EF, Momoi MY. Mutations in Secretin receptor may be related to autism spectrum disorder. The 63rd Annual Meeting for the American Society of Human Genetics. 2013.10.22-26. Boston.
  3. 山形崇倫、松本歩、永田浩一：発達障害患者 CNV 領域におけるシナプス関連分子の解析. 第 55 回日本小児神経学会シンポジウム 2013.5.29-2013.6.1 大分
  4. 石井 朋之、山形 崇倫、宮内 彰彦、池田 尚広、門田 行史、森 雅人、桃井 真里子：小児の痙攣に対するホスフェニトインの効果. 第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分
  5. 池田尚広、門田行史、宮内彰彦、森雅人、山形崇倫、杉江秀夫、桃井真里子：Guillain-Barre 症候群に高血圧を合併し、可逆性後頭葉白質脳症を呈した 1 例. 第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

6. 宮内彰彦、山形崇倫、中山佐与、門田行史、森雅人、福田冬季子、杉江秀夫、高橋幸利、桃井真里子：シクロホスファミド、リツキシマブ併用療法が有効であった抗 NMDA 受容体脳炎小児例。第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分
7. 黒川愛恵、山形崇倫、山岸裕和、宮内彰彦、齊藤貴志、石井朋之、門田行史、森雅人、杉江秀夫、桃井真里子：トピナマートが有効であった先天性パラミオトニアの 1 例。第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分
8. Nagashima M, Monden Y, Dan I, Yamagata T, Watanabe E, Momoi MY: MPH-induced fNIRS monitoring to explore attention-related cortical hemodynamics in ADHD children in randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. 第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分
9. 松本歩、山形崇倫、野崎靖之、神保恵理子、永田浩一、桃井真里子：発達障害患者 CNV 領域におけるシナプス関連分子の解析。第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分
10. Monden Y, Dan I, Nagashima M, Yamagata T, Watanabe E, Momoi MY: fNIRS monitoring of methylphenidate effects for medication-naïve ADHD children. 第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分
11. 宮内彰彦、池田尚広、長嶋雅子、門田行史、森雅人、杉江秀夫、山形崇倫：トピラマートの難治性てんかん小児例に対する治療効果の検討。第 47 回日本てんかん学会学術集会 2013.10.11-12. 北九州
12. Miyauchi A, Monden Y, Mori M, Sugie H, Osaka H, Murayama K, Ohtake A, Yamagata T: A *NDUFA1* mutation in a boy with mitochondrial complex deficiency. The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases(JSIMD) 2013.11.27-29. Tokyo
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし