

AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究  
GMP レベルベクターの作製と生物多様性評価

村松慎一

自治医科大学 内科学講座 神経内科学部門

**研究要旨**

パーキンソン病に対する遺伝子治療の臨床研究で使用したベクターと同様の発現カセットを搭載した GMP レベルのアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを作製した。力価は  $1.8 \times 10^{12}$  vector genome/mL で、HEK293 細胞を使用したドパミン産生試験で基準を満たすドパミンの産生が確認された。また、遺伝子組換え生物の第一種使用における評価を行い、生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断した。

**A. 研究目的**

1. 芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究で使用するアデノ随伴ウイルス 2 型（AAV2）由来のベクターを作製しその評価を行う。
2. 遺伝子組換え生物の第一種使用における生物多様性に対する影響を評価する。

**B. 研究方法**

1. 自治医科大学では 2007 年以降にパーキンソン病に対する遺伝子治療の臨床研究で実施した。その際に使用した AAV2 ベクターと同様の発現カセットを持つベクタープラスミドをタカラバイオ社に供給し GMP レベルの AAV ベクター（AAV-hAADC-2）を委託生産した。

受け入れ試験として、1) 変性の有無を確認する外観試験、2) ウイルスのゲノムコピー数の測定、3) AAV-hAADC-2 の生物学的活性を確かめるためのドパミン定量試験を実施した。外観試験は、融解後ベクター液の混濁の有無を肉眼で確認し、無色澄明であるとき適合とした。ゲノムコピー数の定量は、AAV-hAADC-2 作製時に使用するプラスミド pAAV-hAADC-2 を基準とし、AADC の特異的塩基配列プライマーを使用した定量的 PCR を実施し、 $1.5 \times 10^{12}$  vector genome (vg)/ml 以上を条件とした。ドパミン定量試験は、 $10^5$  個の HEK293 細胞に  $10^8$  vg の AAV-hAADC-2 を感染させ、

36 時間後に  $5 \mu\text{g/ml}$  の L-dopa を培地中に添加した。その 6 時間後に培地を回収しドパミンを HPLC により定量した。 $1 \text{ nmol/ml}$  以上のドパミン産生を基準とした。

2. 第 1 種使用における生物学的多様性への影響を評価した。

**(倫理面への配慮)**

遺伝子治療の実施計画は、厚生労働省の定める「遺伝子治療臨床研究に関する指針」にもとづき設置された、施設内の遺伝子治療臨床研究倫理審査委員会で審査された。生物多様性評価は、施設内遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得た。

**C. 研究結果**

1. pAAV-hAADC-2 の発現カセットは、CMV 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 poly (A) で構成される。受け入れ試験の結果、外観は無色透明、力価は  $1.8 \times 10^{12}$  vg/mL、HEK293 細胞におけるドパミン産生は  $22.8 \text{ nmole/ml}$  であり、いずれも適合していた。タカラバイオ社において実施中の品質試験を別紙に示した。

2. AAV2 ベクターが感染する動植物等の種類は野生型 AAV2 と同等で、ほ乳動物に感染する。自然界で植物及び微生物に感染するとの報告はない。環境中への拡散は極力抑えられており、拡散し

たとしても、その量は検出レベル以下であると推定される。増殖能を失っているため、野生型 AAV 及びそのヘルパーウイルスであるアデノウイルス等との三重感染がないかぎり、環境中で増殖することはない。ヒト体内の同一の細胞にベクターと野生型 AAV 及びそのヘルパーウイルスであるアデノウイルス等が感染する可能性は極めて低く、ベクターはやがて環境中から消滅すると考えられる。極めて微量のベクター由来の replication-competent AAV (以下 RCA) の環境中への放出も完全には否定できないが、AAV 粒子へパッケージングできる DNA のサイズに上限があるため、RCA は野生型 AAV2 と同じになるか、あるいは短い外来遺伝子を含んでいても野生型 AAV2 に極めて近い構造になると考えられる。RCA の感染性、増殖性、病原性及び核酸を水平伝達する性質は野生型 AAV2 と同等であり、ヒト及び他のほ乳動物、植物並びに微生物に新たな影響を与えることはないと考えられる。今回の臨床研究における第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

#### D. 考察

1. 作製した GMP レベルベクターのドパミン産能を培養細胞で確認した。今回の計画では  $1 \times 10^{12}$  vg/ml のベクターを患児一人あたり 200  $\mu$ l 投与する予定であり、力価も基準を満たしていた。現在、マウスの脳内投与による安全性試験とタカラバイオ社における品質検定を実施している。

2. アデノ随伴ウイルス (AAV) はパルボウイルス科デンドウイルス属に分類されている。これまでに霊長類で分離されたウイルスは、血清型およびゲノムの違いに基づき 100 以上の型に分けられており、今回の遺伝子治療では 2 型 (AAV2) を宿主として作製する。AAV2 は自然界に広く分布しており、哺乳類に感染する。ヒトへの病原性は知られていない。自治医科大学で実施したパーキン病の遺伝子治療では術後 4 日目以降、排泄

物中にベクターゲノムは検出されなかった。ヒト凝固第 IX 因子を搭載する遺伝子組換え AAV2 ベクター を肝動脈に注入した臨床試験では、 $4 \times 10^{11}$  vg/kg 投与群の 1 名で 16 週までベクターゲノムが精液中に検出され、別の 1 名では 20 週まで末梢血単核細胞中で検出されたと報告されている。そのため、臨床研究においては環境中への拡散に留意する必要があるが、今回の臨床研究における第一種使用等の方法によるかぎり、自然環境中でベクター由来のゲノムが生物多様性に影響を生ずるおそれはないと考えられる。

#### E. 結論

AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究に使用する GMP グレード AAV ベクターを作製した。受け入れ試験の結果は基準をみたした。また、今回の臨床研究では生物学的多様性に影響しないと判断した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yan Y, Miyamoto Y, Nitta A, Muramatsu S, Ozawa K, Yamada K and Nabeshima T: Intrastriatal gene delivery of GDNF persistently attenuates methamphetamine self-administration and relapse in mice. *Int JNP*, 16:1559-1567, 2013.
2. Lee N-C, Shieh Y-D, Chien Y-H, Tzen K-Y, Yu I-S, Chen P-W, Hu M-H, Hu M-k, Muramatsu S, Ichinose H and Hwu W-L: Regulation of the dopaminergic system in a murine model of aromatic L-aminoacid decarboxylase deficiency. *Neurobiol Dis*, 52:177-190, 2013.
3. Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Staufenbiel M, Muramatsu S and Saido TC: Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice. *Sci Rep*, 3:1472, 2013.
4. Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shimazaki K and Muramatsu S: Systemic delivery of tyrosine-mutant AAV vectors results in robust transduction of neurons in adult mice. *Bio Med*

Res Int, 2013;974819, 2013.

5. Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, Muramatsu S and Kwak S: Rescue of amyotrophic lateral sclerosis phenotype in a mouse model by intravenous AAV9-ADAR2 delivery to motor neurons. EMBO Mol Med, 5:1-10, 2013.
  6. Hwu WL, Lee NC, Chien YH, Muramatsu S and Ichinose H: AADC deficiency: occurring in humans, modeled in rodents. Adv Pharmacol, 68:273-84, 2013.
  7. Miyamoto Y, Ishikawa Y, Iegaki N, Sumi K, Fu K, Sato K, Furukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K and Nitta A: Overexpression of Shati/Nat8l, an N-acetyltransferase, in the nucleus accumbens attenuates the response to methamphetamine via activation of group II mGluRs in mice. Int J Neuropsychopharmacol, in press.
  8. 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, London, 193-203, 2013.
  9. 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療・細胞移植, アクチュアル 脳・神経疾患の臨床 パーキンソン病と運動異常, 辻省次 壮編集, 高橋良輔 専門編集, 中山書店, 東京, 2013, pp384-391.
- ## 2. 学会発表
1. Muramatsu S: Gene therapy clinical trial update for AADC. Cell and Gene Therapies for Inherited Metabolic Disease, April 17, 2013, London.
  2. 村松慎一: パーキンソン病の AADC 遺伝子治療: 長期効果遺伝子発現の検証. 第 54 回日本神経学会学術大会, 2013 年 5 月 31 日, 東京. (プログラム p137)
  3. Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Advances and challenges. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 21, 2013, Kyoto.
  4. Miyamoto Y, Iegaki N, Sumi K, Ishikawa Y, Furuta T, Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K and Nitta A: Overexpression of shati/nat8l in the dorsal striatum affects emotional behaviors via dysfunction of serotonergic neuronal system in mice. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 21, 2013, Kyoto.
  5. Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shibata H, Ono F and Muramatsu S: Widespread transduction of neurons in the primate brain using intrathecal injection of AAV vectors. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 22, 2013, Kyoto.
  6. Iwashita Y, Tokuoka H, Munezane H, Muramatsu S and Ichinose H: Distinct regulation mechanism of the dopamine content in the striatum from that in the midbrain. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 22, 2013, Kyoto.
  7. Nitta A, Ishikawa Y, Iegaki Y, Sumi K, Hurokawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K and Miyamoto Y: Different effects of shati/nat8l-overexpression on the responses to methamphetamine between in mice nucleus accumbens and dorsal striatum. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 22, 2013, Kyoto.
  8. Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shibata H, Ono F and Muramatsu S: Widespread neuronal transduction in the primate brain via intrathecal administration of adeno-associated virus vectors. The 19th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 4, 2013, Okayama. (abstract p125)
  9. Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Muramatsu S and Saido TC: Global and effective gene delivery of neprilysin to the brain via intravascular administration of AAV vector in alzheimer's disease mice. The 19th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 5, 2013, Okayama. (abstract p179)
  10. 小野さやか, 藤本健一, 池口邦彦, 村松慎一, 中野今治: 多系統萎縮症(NSA-P)の FMT-PET 解析. Movement Disorder Society Japan 第 7 回学術集会, 2013 年 10 月 11 日, 東京. (抄録集 p59)
  11. 村松慎一: Parkinson 病に対する遺伝子治療の現状と課題. 第 53 回日本定位・機能神経外科学会 シンポジウム, 2014 年 2 月 7 日, 大阪. (プログラム p63)
- ## H. 知的所有権の取得状況
- 該当なし