

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

日本人 AADC 欠損症患者への遺伝子治療の臨床研究の実施体制を確立した。AAV2 に AADC 遺伝子を組み込んだ AAV-hAADC-2 ベクターを、タカラバイオ社に委託し、GMP レベルの遺伝子治療に必要な量を作製した。また、小児への定位脳手術方法の改良、麻酔および周術期の管理について検討した。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承認を得て、厚生労働省に実施申請中である。承認取得後、患者 4 人に順次治療実施する。また、低年齢の児に対する定位脳手術法を導入し、2 歳からの治療を目標とする。

AADC 欠損症は、症状からの診断が困難で、診断には髄液カテコールアミン測定が必要であり、簡便な診断法が求められる。よって、ろ紙血を用いて HPLC 法で 3-O-methyl dopa を測定するスクリーニング法を開発している。また、酵素活性測定法、遺伝子変異解析法を確立した。

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。AAV9 に SLC2A1 ベクターを挿入した治療用ベクターを作製し、マウス腹腔内に投与し、神経細胞での発現を確認した。今後、髄腔内投与による、より効率が高い治療法を開発中である。

さらに、Hunter 症候群や自閉症スペクトラムも視野に入れた遺伝子治療法開発を実施する。

研究分担者	平井 真洋 自治医科大学先端医療技術開発
村松 慎一 自治医科大学医学部神経内科学 特命教授	センター 脳機能研究部門 准教授
中嶋 剛 自治医科大学医学部脳神経外科 助教	中村 幸恵 自治医科大学医学部小児科学 大学院生
渡辺 英寿 自治医科大学医学部脳神経外科 教授	小島 華林 自治医科大学医学部小児科学 助教
竹内 護 自治医科大学医学部麻酔科学 教授	松本 歩 自治医科大学医学部小児科学 助教
加藤 光広 山形大学医学部小児科学 講師	A . 研究目的
小坂 仁 自治医科大学医学部小児科学 教授	本研究班の課題は、(1)AADC 欠損症に対する 遺伝子治療臨床研究を実施し、(2)AADC 欠損症 の日本での診断方法を確立し、診断と治療の ガイドラインを作製すること、および(3)他の 遺伝性難治性神経疾患に対する遺伝子治療法 を開発することである。これらの遺伝子治療 法の開発には、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベク ターを用いる。
水上 浩明 自治医科大学分子病態治療研究セ ンター遺伝子治療研究部 教授	AAV ベクターは、非病原性で、アデノウイル スや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し、染色体に組み込ま れる率は低く、発癌のリスクが低い。血清型 の違いにより、臓器への移行性が違うが、2 型 など、神経細胞への移行が良好で神経系の難
研究協力者	
多賀 直行 自治医科大学 麻酔科学・集中 治療医学 准教授	

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) 欠損症(OMIM608643)は、L-dopa から dopamine へ、および 5-hydroxy tryptophan から serotonin を合成する酵素である AADC をコードする遺伝子の欠失により発症する常染色体劣性遺伝性疾患である。AADC の欠損により、dopamine と dopamine から生成される norepinephrine などのカテコールアミン、および serotonin の合成が低下し発症する。Dopamine 系は、黒質から線条体へ至る経路が主要な経路で、運動機能の調整に重要な経路である。また、腹側被蓋から前頭葉や側座核に至る経路もある。これらの経路の機能低下による運動機能、精神発達、自律神経機能等の障害による症状を呈する。過半数が新生児期から乳児期早期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する。主症状は、筋緊張低下、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。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、顎定が得られず、生涯臥床状態である患者がほとんどで、症状の進行とともに嚥下困難や呼吸障害が出現し、多くは小児期に死亡する。Dopamine agonist、monoamine oxidase 阻害薬などの薬物療法が実施され、一部の軽症例で症状が軽度改善した報告はあるが、典型例にはほとんど効果がなく、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 compassionate use として開始され、4例の結果が論文として報告され(Hwu WL 2012)、計 8 例に実施された。現在は Phase II/III として再開されている。使用したベクターは、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する方法で、分担研究者の村松らが、日本で Parkinson 病 6 例に対して実施した臨床研究で用いたベクターである(Muramatsu S 2010)。治療後、運動機能が徐々に改善し、臥床状態から立位可能になった患児もある。

日本人 AADC 欠損症患者に対して、昨年度、遺伝子治療臨床研究を実施する計画を立て、タカラバイオ社に委託して、GMP レベルの治療必要量のベクターを作製した。

今年度は、ベクターの純度を確認し、厚生労働省に実施申請した。

(2) AADC 欠損症の診断、スクリーニング法の確立と診断と治療のガイドライン作製

AADC 欠損症は、症状は運動障害で臥床状態であることが多く、これまで、疑われる例においては、髄液中のカテコールアミンおよびセロトニン代謝関連物質を測定することにより診断されていた。その上で、確定診断は、酵素活性測定か遺伝子診断によりなされる。これらの、症状から疑われないことや診断の困難さから診断されていない例も多いと推定される。よって、簡便なスクリーニング法と、確定診断を行うシステムの確立が必要である。それらと、遺伝子治療結果を踏まえた診断と治療のマニュアル作製が求められる。

(3) その他の遺伝性神経難病の遺伝子治療法の開発研究

AAV ベクターは、非病原性で発癌のリスクが低く、神経への移行が良好であることから、難治性の遺伝性神経疾患への遺伝子治療法開発に有用である。よって、AADC 欠損症以外の疾患に対して遺伝子治療法開発研究を開始した。

第一の対象として GLUT1 欠損症を選択し、ベクターを開発した。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 遺伝子)の欠失により、中枢神経細胞への糖移転が低下し、エネルギー不足から神経細胞の機能が低下し、難治性のてんかん、知的障害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、糖を減らして脂質を多くした食事のため、子どもが食べられるメニューが限定され、継続が難しいことも多く、また、高脂血症のリスクもあるなど、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。

次に、Hunter 症候群の遺伝子治療法開発を検討している。Hunter 症候群は、ライソゾームの a-iduronate sulfatasen の欠損により、ムコ多糖が蓄積し、骨障害、肝脾腫、難聴、心弁膜症や重症型での神経症状を発症する疾

患である。

これらの遺伝子治療法研究により、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) AADC 欠損症に対する遺伝子治療臨床研究

台湾での治療成績のまとめ

台湾で compassionate use で実施された 8 例についての治療効果、有害事象の情報をまとめた。

遺伝子治療対象日本人患者

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。

遺伝子治療実施体制の確認

(a) 外科手術の検討

被殻への遺伝子導入に対する装置、方法を検討した。

(b) 麻酔および術前後の管理に関する検討

カテコールアミン、セロトニン代謝に異常があるため、安全な麻酔法、術前術後の管理について検討した。

(c) 治療効果評価法

昨年度、遺伝子治療効果および有害事象の評価法として、症状、評価スケール、臨床検査、FMT-PET 等の実施を確認した。

AADC 欠損症は、認知機能が比較的保たれていると考えられ、認知機能に関する、治療前後の評価方法として、eye tracker による解析法を検討した。

AADC 遺伝子導入したベクター作製、制度確認と管理

(a) ベクターの作製

タカラバイオ社と共同で GMP レベルのベクターを作製した。

(b) ベクターの検証

ベクターの量、純度等、昨年度に検証したが、不足および継続していた検証を実施した。AADC の特異的塩基配列プライマーを使用した定量的 PCR 法により、vector genome (vg) のコピー数を測定した。また、AAV-hAADC-2 の生物学的活性を確かめるための dopamine 定量試験として、 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、6 時間後に培地を回収し、dopamine を HPLC で定量した。

また、マウス脳に注入し、Dopamine 産生、遺伝子の発現を確認した。

(c) 実施申請

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、厚生科学審議会再生医療等評価部会に実施申請した。

(2) AADC 欠損症の診断、スクリーニング法の確立と診断と治療のガイドライン作製 スクリーニング法の開発

3-O-Methyl-dopa を測定する事による、乾燥紙血を用いた簡易スクリーニング法を検討した。

診断方法の確立

酵素活性測定と遺伝子診断方法を確立する。

診断と治療のガイドライン作成

(3) その他の遺伝性神経難病の遺伝子治療法の開発研究

GLUT1 欠損症に対する遺伝子治療法開発

(a) SLC2A1 発現ベクターを用いた発現解析系の確立

昨年度、SLC2A1 発現ベクターを作成し、GLUT1 や myc に対する抗体を用いた発現解析、糖取り込み能解析法を開発した。

その系を用い、Wild type と、変異を挿入した遺伝子を導入し、発現と当取り込み能を解析した。

(b) GLUT1 cDNA 挿入した治療用 AAV ベクター作製

AAV9 をベースとした AAV9-SLC2A1 を作成した。

(c) GLUT1 欠損マウスを用いた解析

GLUT1 ノックアウト (KO) マウスに対し、AAV-GLUT1 を腹腔内に注入し、脳での mRNA、蛋白の発現を確認した。また、脳室内注入による治療を検討している。

Hunter 症候群に対する遺伝子治療法開発

自治医大通院中の Hunter 症候群患者 8 名について症状、遺伝子変異等について検討した。ベクター作成に着手した。また、ノックアウトマウス使用の可能性を確認した。

(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

た。

厚生科学審議会再生医療等評価部会に実施申請中であり、認可を得た上で実施する。

対象患者は未成年であり、かつ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）および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」（平成26年文部科学省・厚生労働省告示第3号）を遵守して実施する。

また、患者の遺伝子診断に関しては、自治医科大学遺伝子解析研究倫理委員会の承認を得て、動物実験に関しては、動物実験委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

(1) AADC 欠損症に対する遺伝子治療臨床研究 台湾での治療成績のまとめ

2010年2月から2011年12月にかけて compassionate useとして遺伝子治療を実施した8例。観察期間は21か月から42か月。

治療時年齢は2歳0か月から8歳3か月。治療前は、全例臥床状態で頸定なく、ジストニア、oculogyric crisisあり。治療後、徐々に運動発達が得られ、7例で頸定、座位、手を出して物をつかむなどの発達あり。2例で立位、支えての歩行可能。現在も徐々に発達が得られている。有害事象として、2例に一過性の強いジスキネジアあり。1例で無呼吸発作あり。1例は、術前から全身状態が悪く、術後、下痢、嘔吐からショックになった。

遺伝子治療対象日本人患者（担当 加藤、小坂、小島、松本、山形）

対象患者は、（症例1）18歳男子、（症例2）14歳男子と（症例3）11歳女子の兄妹例、（症例4）4歳女子の4例である。（症例5）1歳男子が新たに診断され、今後の治療実施対象として検討する。

対象4例は、全例臥床状態で、筋緊張低下しており、dystoniaとoculogyric crisisを伴っていた。症例1は経管栄養とNIPPVを、症例2は胃瘻造設と気管切開を、症例3は胃瘻造設を受けている。

全例髄液中のカテコールアミン代謝産物が測定されており、L-dopaと5-hydroxy Tryptophanの高値、dopamine代謝産物のHVA

とserotonin代謝産物の5-HIAAの低値が確認されている。遺伝子解析結果は、症例1がc.1106A>G, p.Try369CysとIVS6+4A>Tのcompound heterozygote、症例2と3はc.329C>A, p.Ala110Gluが検出されているが他方の変異は未検出、症例4はc.315G>C, p.Trp105Cysとc.385C>T, p.Pro129Serの、症例5はc.236A>G, p.Tyr79Cysとc.755A>G, p.Asp252Glyのcompound heterozygoteであった。

遺伝子治療実施体制の確認

(a) 外科手術の検討（担当 中嶋、渡辺）

ベクターを、定位脳手術により、専用のカニューレを使用して両側被殻に注入する。定位的脳手術で使用する遺伝子注入用カニューレは直径が小さく脳深部への刺入時に容易に撓み遺伝子導入部位の精度低下の原因になることが予測される。そのため、刺入針の先端位置をX線透過装置で確認するための専用インジケータを製作し、先端位置な確実な可視化に成功した。これは小径カニューレを使用する本研究の遂行において大変重要な獲得技術要素である。

また、乳幼児の定位脳手術では、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。しかし、低年齢の方が治療効果はより高いと考えられる。現在、2歳から手術が可能な手法の導入を検討中である。

(b) 麻酔および術前後の管理に関する検討（担当 竹内、多賀）

AADC欠損症患者の周術期管理では、無呼吸や鼻閉などの気道の問題や、血糖管理、体温管理、循環作動薬の選択、循環血液量管理、鎮痛薬および鎮静薬の選択など非常に多岐にわたる。特に気道管理や血糖管理、循環作動薬の選択、および循環血液量管理は患児の生命に直結する問題であり、慎重に行う必要がある。今回の研究で指摘された術後鎮痛と鎮静に関しては、対象者が小児であるため、十分な鎮痛と適切な鎮静が術後の安静には不可欠と考えられる。術後痛は通常48時間以内がピークであると言われ、術後鎮痛処置を必要とする場合が多いが、AADC欠損症患者では、使用する鎮痛薬の選択に注意が必要であると考えられる。麻薬性鎮痛薬は神経伝達物質の放出に影響を及ぼすと言われ、AADC欠損症患者での使用は慎重に行う必要がある。NSAIDsやアセトアミノフェンなど他の鎮痛薬についての使用報告は乏しく、その使用は慎重に行う必要があると考えられる。同様に術後の安

静を保つための鎮静薬の使用についても、薬剤選択に注意が必要であると考えられる。

(c)治療効果評価法開発(分担 渡辺、平井)

AADC 欠損症は、運動障害が強く、発語もないために意思表示が困難であるが、認知機能は比較的保たれていると考えられる。遺伝子治療前後に認知機能を評価する方法として、ベッドサイドで使用可能な eye tracking システムを開発した。また、このシステムは、同時に、oculogyric crisis の定量にも有用であると考えられる。今後、実際の患者で評価を行う予定である。

AADC 遺伝子を導入したベクター作製、制度確認と管理

(a) ベクターの作製(担当 村松、水上)

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。治療用ベクターは、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) を組み込んで作製した (AAV-hAADC-2) (図 1)。タカラバイオに委託し、GMP レベルの AAV-hAADC-2 を治療に必要な十分量を作製した。

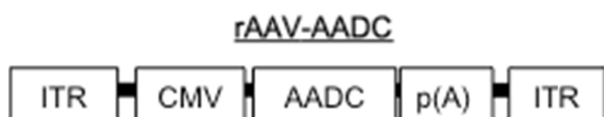


図 1 rAAV-AADC の構造

AAV2 由来の塩基配列は両端の inverted terminal repeat (ITR) 以外を除去。cytomegarovirus の promoter/enhancer (CMV Pr)、ヒト 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) に置換した。

(b) ベクターの確認(担当 村松、水上)

各種品質試験を実施した結果、品質は良好で、臨床使用が可能であった。また、ウイルスゲノムのコピー数は 1.95×10^{12} vector genome/ml で基準である 1.5×10^{12} 以上であった。また、生物学的活性を確認するためのドパミン定量試験では、 32 nmol/ml と基準である 1 nmol/ml 以上であり、生物学的活性が確認された。さらに、マウス脳に注入して発現が確認され、

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。

(c)実施申請(担当 山形、村松)

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、厚生科学審議会再生医療等評価部会への承認申請中である。

(3) AADC 欠損症の診断、スクリーニング法の確立と診断と治療のガイドライン作製

(a) スクリーニング法の開発(担当 小坂)

蓄積した l-dopa が代謝される 3-O-methyl-dopa は髄液のみならず、血漿中でも増加している。質量分析計を用いて乾燥紙血の、3-O-methyl-dopa を測定するスクリーニング法が報告されている (Chen et al. 2014)。この検査法が可能である事を確認した。ハイスループット化が可能なスクリーニング法であり、次年度にスクリーニングシステムを確立するための課題である。

(b) 診断方法の確立(担当 小坂)

酵素活性測定法として、患者血清に基質として L-dopa を添加し、chatecholamine を抽出して、HPLC で dopamine 産生を確認した。症例 4 を対照に解析した結果、dopamine 産生能が正常の 24% に低下している事を確認した。よって、酵素活性測定による診断法を確立した。また、AADC 遺伝子の全エクソンと近傍のイントロンを PCR 増幅し、直接シーケンスによる変異解析が可能である。

(c) 診断と治療のガイドライン(担当 小坂、加藤、山形)

上記診断法の確立と、遺伝子治療結果を踏まえ、次年度に作製予定である。

(3) GLUT1 欠損症に対する遺伝子治療法開発

(a) SLC2A1 発現ベクターを用いた発現解析系の確立(担当 小坂、中村、山形)

昨年度、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。また、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、wild type、ミスセンス変異、フレームシフト変異を挿入した遺伝子を培養細胞に

導入し、糖取り込み能を解析した。その結果、wild type に比して、ミスセンス変異、フレームシフト変異、コントロールベクターの順に糖取り込み能が低下していた。

これらの解析系は、遺伝子治療の培養細胞レベルでの治療効果判定に有用である。

(b) GLUT1 cDNA 挿入した治療用 AAV ベクター作製 (担当 村松、小坂、中村)

AAV9 に、神経細胞特異的なプロモーターである synapsin I (syn1) promoter、SLC2A1-tag(myc/DDK)、woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE)、Simian virus 40 polyA を挿入したベクターを作製した(図2)。

このベクターは、血管内あるいは髄腔内投与による使用が可能である。

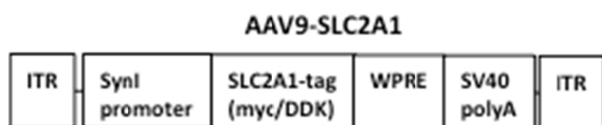


図2 AAV9-SLC2A1 の構造

AAV2 由来の塩基配列は両端の inverted terminal repeat (ITR) 以外を除去。synapsin I promoter (Syn1 promoter, neuron-specific promoter)、woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE)、Simian virus 40 polyA (SV40 polyA) に置換した。

(c) GLUT1 欠損マウスを用いた解析(担当 小坂、中村、村松、山形)

GLUT1 KO マウスのヘテロ体に、日齢 7 に AAV9-SLC2A1(myc-DDK タグ付) 1.8×10^{11} vg を腹腔内投与した。5 週後に、脳での mRNA、蛋白の発現を免疫組織学的解析および RT-PCR 法で解析した結果、神経細胞での発現が確認された。しかし、発現量が少ないため、髄腔内投与での神経細胞移行を解析中である。

Hunter 症候群に対する遺伝子治療法開発 (担当 小坂、小島、松本、山形)

自治医科大学小児科に通院中の Hunter 症候群患者は 9 名で、重症型 3 名、軽症型 6 名であった。年齢は 3 歳から 29 歳。重症型の 3 例は全例臥床状態であり、酵素補充療法は未実施、あるいは終了とした。軽症型 6 例中、4 例は酵素補充療法実施中で、全例肝脾腫は改善

したが、骨症状、心弁膜症、難聴は残存している。1 例は開始準備中。1 例は 26 歳で、症状は軽度で、身長正常、肝脾腫、関節拘縮と心弁膜症も軽度認められるのみであり、治療を希望していない。

また、遺伝子治療法開発のためのベクター作成に着手した。ノックアウトマウス使用が可能であることも確認した。

AAV 中和抗体と遺伝子治療への影響 (担当 水上)

遺伝子治療適応疾患拡大の過程において、現在、血液中に投与し、脳や多臓器に対する治療が可能ベクターを開発している。その場合、中和抗体の存在が問題となる。日本人で抗体保有を確認した所、若年になるほど中和抗体保有率が低いことが確認された。小児に対する治療において問題となる可能性は低いと考えられるが、抗体の高感度の検出方法を確立しており、治療実施時には、注意深く検討する。

D. 考察

AADC 欠損症は、dopamine と serotonin を合成する酵素の欠損から主に運動障害を来す、脳の機能的障害による疾患である。破壊性の疾患ではないため、遺伝子治療により機能回復が期待出来る。実際に、台湾で遺伝子治療が行われ、運動機能の回復が得られ、有効性が示された。台湾での治療には、分担研究者の村松らが Parkinson 病の遺伝子治療用に開発したベクターが用いられ、同じベクターが使用可能であるために、日本人患者への遺伝子治療臨床研究実施を計画した。

昨年度、遺伝子治療実施体制を検討、整備し、タカラバイオ社に委託して、治療実施に必要な GMP レベルのベクターを作製した。純度の検定等で、治療使用が可能であると判断されたが、本年度も追加検査を実施し、治療に必要な量のベクターが得られ、遺伝子発現によるタンパク機能も確認され、治療実施が可能である。また、小児に対する定位脳手術法の改良、麻酔法や周術期の管理などに関する検討も行い、より安全に実施する体制を確立した。さらに、AADC 欠損症では、運動障害の程度に比して、認知機能は比較的保たれていると考えられ、eye tracker を用いて認知機能を評価する方法を開発した。日本人の AADC 欠損症患者は 5 人確認されている。5 例目は、現在 1 歳である。現在、日本で実施可能な定位脳手術では、4 歳以上が対応可能と考えられ、

まずは4例に実施する。2歳から実施可能な定位脳手術法もあり、その方法の導入を検討中で、導入可能となれば、5例目にも実施する。

現在、厚生労働省に実施申請中であり、認可が得られ次第、遺伝子治療臨床研究を実施する。

AADC欠損症は、症状からの診断が困難で、脳性麻痺として診断されていない例もあると考えられる。診断には髄液カテコールアミン測定が必要であり、簡便な診断法が求められる。ろ紙血を用いてHPLC法で3-O-methyl dopaを測定するスクリーニング法が開発されることにより、診断される例が増えると考えられる。また、酵素活性測定法、遺伝子変異解析法を確立した。これらと、遺伝子治療の結果を踏まえ、診断と治療法のガイドライン作成を行っていく。

前述の様に、脳の機能的な障害による疾患に対して、遺伝子治療は有望な治療法であると考えられる。治療を行うベクターとして、AAVは、神経細胞への移行が良好で、非病原性であり、発がん性のリスクが低いなどの利点がある。よって、AAVベクターを用いて、AADC欠損症以外の遺伝性難治性神経疾患に対する遺伝子治療法の開発を検討した。

第一に、GLUT1欠損症を選択した。GLUT1欠損症は、脳への糖移送の障害により、神経細胞のエネルギー不足により、痙攣、知的障害、失調等を来す疾患である。GLUT1遺伝子である9型AAVベクターにSLC2A1遺伝子を導入したAAV9-SLC2A1を作製した。このベクターは、末梢からや髄腔内に投与で神経細胞へ移行することが可能である。まず、SLC2A1ノックアウトマウスの腹腔内にベクター投与し、脳神経細胞での遺伝子発現を確認した。しかし、脳で遺伝子発現した神経細胞は一部であり、より大量に投与する必要がある。よって、今後は脳室内投与が有用であると考え、解析中である。

次に、Hunter症候群に対する遺伝子治療法の開発に着手した。Hunter症候群は、ライソゾーム酵素の欠損により発症するムコ多糖症である。Hunter症候群に対する遺伝子治療法が確立されれば、今後、他のライソゾーム病に対する遺伝子治療法開発が進むと考えられる。

さらには、特定の遺伝子異常に起因する自閉症スペクトラムも遺伝子治療のターゲットとなり得る。あるいは、多様な遺伝子異常が背景にあると考えられる自閉症スペクトラムであるが、特定のグループに共通する治療タ

ーゲットが抽出される可能性もある。社会性の障害や行動上の問題から、本人、家族の苦痛も大きく、治療法開発が待たれる疾患である。

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、GMPレベルの遺伝子治療に必要な量が得られている。自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認を得て、厚生労働省に実施申請中である。承認取得後、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。AAV9にSLC2A1ベクターを挿入した治療用ベクターを作製した。マウス腹腔内に投与し、神経細胞での発現を確認した。今後、髄腔内投与による、より効率がよい治療方法を開発中である。

さらに、Hunter症候群や自閉症スペクトラムも視野に入れた遺伝子治療法開発を行っていく。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Inaguma Y, Ito H, Hara A, Iwamoto I, Matsumoto A, Yamagata T, Tabata H, Nagata KI: Morphological characterization of mammalian Timeless in the mouse brain development. *Neurosci Res.* 2014;92:21-28.
2. Nagashima M, Monden Y, Dan I, Dan H, Tsuzuki D, Mizutani T, Kyutoku Y, Gunji Y, Hirano D, Taniguchi T, Shimoizumi H, Momoi MY, Watanabe E, Yamagata T: Acute neuropharmacological effects of atomoxetine on inhibitory control in ADHD children: a fNIRS study. *Neuroimage Clin.* 2014;6:192-201.
3. Mizuno M, Matsumoto A, Hamada N, Ito H, Miyauchi A, Jimbo EF, Momoi MY, Tabata H, Yamagata T, Nagata KI: Role of an adaptor protein Lin-7B in brain development: possible involvement in autism spectrum disorders. *J Neurochem* 2014;132:61-9.

4. 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.
 5. Uehara N, Mori M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Tamaru S, Kohda M, Moriyama Y, Nakachi Y, Matoba N, Sakai T, Yamazaki T, Harashima H, Murayama K, Hattori K, Hayashi J, Yamagata T, Fujita Y, Ito M, Tanaka M, Nibu K, Ohtake A, Okazaki Y: New MT-ND6 and NDUFA1 mutations in mitochondrial respiratory chain disorders. *Ann Clin Transl Neurol.* 2014;1:361-9.
 6. Kosho T, Okamoto N, Yamagata T, Coffin-Siris Syndrome International Collaborators: Genotype-phenotype correlation of Coffin-Siris syndrome caused by mutations in *SMARCB1*, *SMARCA4*, *SMARCE1*, and *ARID1A*. *Am J Med Genet C* 2014;166:262-275
 7. Miyauchi A, Monden Y, Watanabe M, Sugie H, Morita M, Kezuka T, Momoi M, Yamagata T: Persistent presence of the anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantibody in a pediatric case of acute disseminated encephalomyelitis followed by optic neuritis. *Neuropediatrics* 2014;45:196-9.
 8. 鈴木 峻, 南 孝臣, 籾 義仁, 佐藤 智幸, 横溝 亜希子, 岡 健介, 白石 裕比湖, 片岡 功一, 多賀 直行, 河田 政明, 山形 崇倫: 乳児期早期までに頻拍誘発性心筋症を発症した Wolff-Parkinson-White 症候群の 2 例. *小児科臨床* 67:1735-1740,2014
2. 学会発表
1. Nakamura S, Osaka H, Muramatsu S, Aoki S, Jimbo EF, Yamagata T: Mutational and functional analysis of Glucose transporter 1 deficiency syndrome. The 63rd Annual Meeting for the American Society of Human Genetics. 2014.10.18-22. San Diego.
 2. Goto M, Matsumoto A, Kojima K, Eriko F Jimbo EF, Mori M, Osaka H, Yamagata T: Manifestations of Xp22.2 - 22.13 and Xp21.3 microduplications. The 63rd Annual Meeting for the American Society of Human Genetics. 2014.10.18-22. San Diego.
 3. 池田 尚広, 山崎 雅世, 鈴木 峻, 門田 行史, 小坂 仁, 杉江 秀夫, 新保 裕子, 山形 崇倫: ミトコンドリア DNA m.3243A>T 変異を認めた mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes の 1 例. *脳と発達* 46:454,2014
 4. 横溝 亜希子, 南 孝臣, 佐藤 智幸, 岡 健介, 片岡 功一, 山形 崇倫, 宮原 義典, 河田 政明: アレイ CGH 解析により Xq26.1-26.3 重複を認めた両大血管右室起始、肺動脈閉鎖の 1 例. *日本小児循環器学会雑誌* 30:Suppl.271,2014
 5. 楊 志亮, 小島 華林, 神保 恵理子, 山形 崇倫, 桃井 隆, 桃井 真里子: 自閉性障害原因遺伝子 *CADM1* に結合する足場タンパク *MUPP1* の遺伝子変異解析. *脳と発達* 46:S386,2014
 6. 松本 歩, 楊 志亮, 小島 華林, 中山 一大, 神保 恵理子, 岩本 禎彦, 永田 浩一, 山形 崇倫: 自閉症患者における時計関連遺伝子の変異解析. *脳と発達* 46:S386,2014.
 7. 宮内 彰彦, 門田 行史, 池田 尚広, 川原 勇太, 長嶋 雅子, 小坂 仁, 杉江 秀夫, 森本 哲, 渡辺 浩史, 下泉 秀夫, 下澤 伸行, 山形 崇倫: 当院における副腎白質ジストロフィー 6 例の臨床的検討. *脳と発達* 46:S325,2014.
 8. 永田 浩一, 浜田 奈々子, 松本 歩, 山形 崇倫: 変貌する自閉症スペクトラム障害の医療 病態に立脚した診断から治療へ 自閉症スペクトラム障害の病態関連遺伝子の機能解析. *脳と発達* 46:S140,2014.
 9. 山形 崇倫, 門田 行史: 変貌する自閉症スペクトラム障害の医療 病態に立脚した診断から治療へ 自閉症スペクトラム障害の評価 統一した評価法の必要性. *脳と発達* 46:S139,2014.
 10. 尾崎 理史, 宮内 彰彦, 門田 行史, 新島 瞳, 八木 正樹, 川原 勇太, 小坂 仁, 杉江 秀夫, 森本 哲, 下澤 伸行, 山形 崇倫: 臍帯血造血幹細胞移植を実施した 1 歳 10 ヶ月の副腎白質ジストロフィー 1 例. *日本小児科学会雑誌* 118:993-994,2014.

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

(添付資料)

「AADC 欠損症に対する遺伝子治療臨床研究」班会議

日時：2014年11月8日 13:00 から

場所：自治医科大学小児科学カンファレンス室

(0285-58-7366 または内線 3447)

挨拶： 厚生労働省 雇用均等・児童家庭局母子保健課
福田 亮介主査

第一部 (13:00-14:30) 座長 山形 崇倫

「AADC 欠損症に対する遺伝子治療臨床研究実施に向けた検討」(各 5-15分)

1. 実施計画概要および台湾での実施成績
山形 崇倫 (主任研究者)
2. 対象患者概略
加藤 光広 (研究分担者)、小坂 仁 (研究分担者)
3. hAADC ベクターと FMT-PET について
村松 慎一 (研究分担者)、小野さやか、斉藤順一
4. 遺伝子導入手術の実際、問題点および対応について
中嶋 剛 (研究分担者)、渡辺 英寿 (研究分担者)
5. 麻酔および術前術後管理について
多賀 直行、竹内 護 (研究分担者)
6. 術前、術後のベクター管理およびカルタヘナ法への対応
水上 浩明 (研究分担者)
7. 有害事象および治療効果の評価方法
山形 崇倫 (主任研究者)
8. 討議

第二部 (14:40-16:00) 座長 村松 慎一

「研究成果報告」(各 10-15分)

1. AAV9/3ベクターによる大型動物中枢神経への遺伝子導入
飯田 麻子、村松 慎一 (研究分担者)
2. GLUT1 欠損症に対する遺伝子治療法開発研究
中村 幸恵、小坂 仁 (研究分担者)
3. アイトラッカーを用いた社会認知能力の評価の可能性
平井 真洋、渡辺 英寿 (研究分担者)
4. 血友病遺伝子治療の準備状況と課題
水上 浩明 (研究分担者)
5. 自閉症スペクトラム障害遺伝子治療の可能性の検討
松本 歩、小島 華林、山形 崇倫 (主任研究者)

講評：鳥取大学医学部周産期・小児医学 神崎 晋教授