

AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究  
血管内投与型 AAV ベクターの開発と応用

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**

広範な中枢神経領域と末梢組織の交感神経細胞への遺伝子導入を可能にする改変型アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを開発した。緑色蛍光蛋白質 GFP を発現する改変型 AAV ベクターを作製しマウスの心腔内とカニクイサルの髄腔内に投与した。組織解析の結果、広範な中枢神経と末梢臓器の神経細胞で GFP の発現が認められた。炎症反応や組織障害は認められなかった。

**A. 研究目的**

芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）欠損症では、脳内のドパミン、ノルアドレナリン、セロトニンの欠乏により重度の精神運動発達障害を生じる。このうち、線条体のドパミン欠乏と関連した運動機能障害の改善を主目標として、被殻への AADC 遺伝子導入を計画している。重症例には、より広範な領域の中枢神経や、全身の組織における交感神経細胞にも遺伝子導入が必要となる可能性がある。そのため、血管内あるいは髄腔内投与により使用できるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを作製し、マウスとカニクイサルで前臨床試験を実施する。

**B. 研究方法**

9 型 AAV (AAV3)の外被蛋白質と 3 型 AAV (AAV3)ゲノム配列を持つハイブリッド(AAV9/3)で、外被蛋白質のチロシンをフェニルアラニンに変異させた改変型 AAV ベクターを使用した。神経細胞特異的 Synapsin I プロモーターにより緑色蛍光蛋白質 GFP を発現する AAV ベクターを、マウスには  $10^{12}$  vector genome (vg)/匹を心腔内投与し、カニクイサルには  $6.2 \times 10^{12}$  -  $1.2 \times 10^{13}$  vg/頭を髄腔内投与した。カニクイサルの髄腔内投与に際しては、X 線透視下で腰椎または大槽よりカニューレを挿入し先端の位置を確認した。4 週間以降

に安楽殺して、免疫組織学的に GFP の発現の分布と有害反応の有無を評価した。

**(倫理面への配慮)**

遺伝子組換え実験と動物実験は、施設内遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験委員会の承認を得て実施した。

**C. 研究結果**

ベクターを心腔内投与したマウスでは、脳と脊髄の広範な領域の神経細胞で GFP の発現が認められ、黒質緻密部でも多数のチロシン水酸化酵素陽性細胞に遺伝子導入されていた。全身の臓器では、心臓の交感神経細胞にも GFP の発現が認められた。髄腔内投与したカニクイサルでは、線条体の中型棘神経細胞の他、小脳の Purkinje 細胞、大脳では前頭葉・側頭葉・頭頂葉・後頭葉のいずれの大脳皮質にも GFP 陽性の神経細胞が存在した。脊髄では全長にわたり灰白質で GFP 陽性の神経細胞が認められた。マウス、カニクイサルのいずれにおいても明らかな炎症反応や組織障害は認められなかった。

**D. 考察**

改変型 AAV ベクターは、細胞内でユビキチン化の標的となる外被蛋白質のチロシンをフェニルアラニンに置換することにより、核内に

到達するベクターゲノム量を増やし、目的遺伝子の発現を増強させる。また、神経細胞特異的プロモーターにより神経細胞以外で外来遺伝子が発現することを抑制している。血液脳関門、あるいは髄膜脳関門を通過する機序の詳細は不明であるが、髄腔内投与では、脊髄の後角と前角の灰白質に後根および前根に沿って侵入した可能性、小脳では苔状線維に沿って広がる可能性が推察される。心腔内投与では、特定の血管領域に集中する傾向は認められていない。これまで、搭載可能な目的遺伝子の発現カセットのサイズが 2kb 程度に限られる自己相補的 self-complementary AAV9 では成体動物の中枢神経の広い領域に遺伝子導入可能なことが報告されているが、チロシン変異を持つ改変型 AAV9/3 では 4.5kb 程度までの発現カセットを搭載可能である。今後、AADC 欠損症に限らず多くの先天性酵素欠損症の遺伝子治療への応用が期待できる。

## E. 結論

先天性酵素欠損症の遺伝子治療へ応用できる広範な中枢神経領域と末梢組織の神経細胞に効率よく遺伝子導入する AAV ベクターを開発した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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*, 17:1283-1294, 2014.

2. Ito H, Fujita K, Tagawa K, Chen X, Homma H, Sasabe T, Shimizu J, Shimizu S, Tamura T, Muramatsu S and Okazawa H: HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant ataxin-1 knock-in mice. *EMBO Mol Med*, 7(1):78-101, 2014.
3. Miyamoto Y, Iida A, Sato K, Muramatsu S, and Nitta A: Knockdown of dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens core suppresses methamphetamine-induced behaviors and signal transduction in mice. *Int JNP*, 1-7, 2015.
4. Ito H, Shiwaku H, Yoshida C, Homma H, Luo H, Chen X, Fujita K, Musante L, Fischer U, Frints SGM, Romano C, Ikeuchi Y, Shimamura T, Imoto S, Miyano S, Muramatsu S, Kawauchi T, Hoshino M, Sudol M, Arumughan A, Wanker EE, Richi T, Schwartz C, Matsuzaki F, Bonni A, Kalscheuer VM and Okazawa H: In utero gene therapy rescues microcephaly caused by Pqbp1-hypofunction in neural stem progenitor cells. *Mol Psychiatry*, in press.

### 2. 学会発表

1. 村松慎一: Gene therapy for Parkinson's disease in Japan: Current status and problems. 第 55 回日本神経学会学術大会シンポジウム, 2014 年 5 月 22 日, 福岡.(プログラム p60)
2. 飯田麻子, 滝野直美, 嶋崎久仁子, 伊藤美加, 村松慎一: 大型動物の広範な中枢神経領域に遺伝子導入可能なアデノ随伴ウイルスベクターの開発. 第 57 回日本神経化学学会大会, 2014 年 9 月 29 日, 奈良.
3. 村松慎一, 新田淳美: パーキンソン病の遺伝子治療. AAV ベクターを応用した神経・精神疾患の病態解明～基礎から臨床まで～, 第 57 回日本神経化学学会大会, 2014 年 10 月 1 日, 奈良. (神経化学 Vol.53(No.2), 2014, p82)
4. 村松慎一: 遺伝子治療と細胞治療. 神経変性の制御をめざして, 第 8 回パーキンソン病・運動

障害疾患 कांग्रेस, 2014 年 10 月 3 日, 京都.  
(プログラム p 21)

5. 小野さやか, 藤本健一, 池口邦彦, 佐藤俊彦, 村松慎一: FMT-PET によるパーキンソン病のすくみ足の病態解析. 第 8 回パーキンソン病・運動障害疾患 कांग्रेस, 2014 年 10 月 4 日, 京都. (プログラム p101)
6. 村松慎一: Parkinson 病の遺伝子治療. 第 32 回日本神経治療学会総会, 2014 年 11 月 22 日, 東京. (特別講演) (神経治療学 Vol.31(5), p547)
7. 村松慎一: AAV ベクターによる遺伝子治療. 第 54 回日本定位・機能神経外科学会, 2015 年 1 月 16 日, 東京. (プログラム p83)
8. 小野さやか, 藤本健一, 池口邦彦, 佐藤俊彦, 村松慎一: FMT-PET による Parkinson 病の病態解析. 第 54 回日本定位・機能神経外科学会,

2015 年 1 月 17 日, 東京. (プログラム p106)

9. Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson Disease. The First Asian Symposium on AADC Deficiency, Dec 21, 2014, Taipei.

#### **H. 知的所有権の取得状況**

該当なし