

厚生労働科学研究補助金

成育疾患克服等総合研究事業

AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究

平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 山形 崇倫

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I . 総括研究報告	
AADC欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究	2
山形 崇倫	
(資料1) 遺伝子治療臨床研究実施計画書	9
(資料2) 作業報告書：AAV-hAADC-2 製造一式	78
II . 分担研究報告	
1 . AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究	84
GMP レベルベクターの作製と生物多様性評価	
村松慎一	
(資料1) AAV-hAADC-2 の品質試験	87
(資料2) 生物多様性影響評価書	90
2 . アデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子治療における	104
諸条件の基礎的検討	
小澤敬也	
3 . AADC欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究	106
-定位脳手術法の確立	
中嶋 剛	
(資料) 注入用カニューレおよびポンプ	108
4 . AADC欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究-手術法の検討	111
渡辺英寿	
5 . AADC欠損症遺伝子治療実施に向けた手術および	112
術後管理体制の検討	
竹内 護	
(資料) 治療施設の地図及び見取り図	114
6 . AADC 欠損症におけるロチゴチンパッチの有用性の検討	121
加藤 光広	
7 . アデノ随伴ウイルスによる小児期遺伝性疾患治療	124
~ 新規 AADC 欠損症患者の診断と適応疾患拡大を目指して ~	
小坂 仁	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	132
IV . 研究成果の刊行物・別刷	138

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-[¹⁸F]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

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 1.8×10^{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、 1.5×10^{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 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、 β -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 1.8×10^{12} vg/mL、HEK293 細胞におけるドパミン産生は 22.8 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 1×10^{12} vg/ml のベクターを患児一人あたり 200 μ 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、 4×10^{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 36th 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 36th 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 36th 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 36th 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 36th 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

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）

分担研究報告書

アデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子治療における諸条件の基礎的検討

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

小澤敬也、水上浩明

研究要旨 AAV ベクターを用いた遺伝子治療が広がりを見せる中、関連技術に関する報告が増えており、最適な方法に関して改めて検討する必要性が生じている。そこで今回このような観点から AAV ベクターの作製・精製法、定量法に関して検討した。その結果、研究室レベルでは現在用いている方法で概ね最適と考えられたものの、今後臨床応用に向けて大量に調製する場合には新しい方法に移行する必要があるものと考えられた。

A. 研究目的

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いた遺伝子治療が広まるにつれて、関連する技術の開発が進んできている。近年報告されている技術に関して広く情報を収集し、ベクター作製・精製法、定量法などに関して最適な方法を探ることを目的とする。

B. 研究方法

・AAV ベクターの作製法に関する検討：これまでの報告を精査し、長所及び短所を比較検討した。また、現在最も広く行われているトランスフェクション法に関して、使用するフラスコのサイズと収量に関して検討した。

・AAV ベクターの精製法に関する検討：これまでの報告を精査し、我々が通常行っている塩化セシウムによる濃度勾配を用いる方法よりも有用なものがあるかどうかに関して検討した。

・AAV ベクターの定量法に関する検討：これまでの報告を精査し、我々が通常行っているリアルタイム PCR 法に比較して有利な方法があるかどうかに関して検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は、非病原性の AAV に由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的な問題が生ずることは基本的にないものと考えている。

C. 研究結果

・AAV ベクターの作製法に関する検討：ベクターの作製法としては依然としてリン酸カルシウム法によるトランスフェクションが優れているものと考えられた。また、効率良い作製のためにはできるだけ大きなフラスコを用いることが望ましいとの考えから 10 段のフラスコを用いてきたが、単位面積あたりの収量に換算すると無駄が多いことが問題となっている。このため、より段数の少ない 4 段、2 段のフラスコを用いて効率を検討したところ、段数が少なくなるにつれて単位面積あたりの作製効率が高まる傾向が見られた。総合的には 4 段のフラスコを用いることが最適と考えられた。また、将来的に臨床用に大量調製する場合にはウイルスを用いる方法、中でもバキュロウイルスを用いる方法が有望と考えられた。

・AAV ベクターの精製法に関する検討：多くの方法が報告されている中で、塩化セシウム

法は全ての血清型のベクターに応用可能であり、空ベクターを効率良く除去できるなど有利な点が多いものと考えられた。将来的に大量調製する場合には処理能力に限界があることから異なる方法に移行する必要があるものと思われ、その際にはアフィニティーカラムを用いる方法などが有力な候補と考えられた。

- ・ AAV ベクターの定量法に関する検討：リアルタイム PCR 法が最も広く用いられているが、誤差の問題があり、正確な定量には他の方法と組み合わせる必要があるものと思われた。このような欠点を克服した方法としてデジタル PCR 法が開発されており、今後普及するものと予想される。

D. 考察

AAV ベクターを用いる遺伝子治療法は近年臨床研究における数々の成功により急速に普及が進んでいる。その結果ベクター調製に関しても多くの技術が開発されてきている。それぞれに長所と短所があることから、目的に応じて選択することになるが、改良も行われており、変化が激しい。今回は研究室レベルでの視点から最適な技術を選択したが、今後臨床への展開が進むにつれて産業用に調製する必要が出てくるものと思われ、そのような視点からも選択を考慮する必要がある。特に作製法ではトランスフェクションのスケールを大きくするだけでは限界があり、バキュロウイルス法などを採用することが必要と考えられた。

E. 結論

AAV ベクターの作製・精製法、定量法に関して検討した結果、研究室レベルでは現在用いている方法で概ね最適と考えられた。しかしながら、今後臨床応用に向けて大量調製する場合には、新たな方法に移行する必要があるものと考えられた。今後も新しい技術の開発が続くものと予想されることから、引き続き検討を続けていきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

Mimuro, J., Mizukami, H., Shima, M., Matsushita, T., Taki, M., Muto, S., Higasa, S., Sakai, M., Ohmori, T., Madoiwa, S., Ozawa, K., Sakata, Y.: Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals. **J Med Virol**, *in press*.

Takahashi, K., Mizukami, H., Saga, Y., Takei, Y., Urabe, M., Kume, A., Machida, S., Fujiwara, H., Suzuki, M., Ozawa, K.: Suppression of lymph node and lung metastases of endometrial cancer by muscle-mediated expression of soluble vascular endothelial growth factor receptor-3. **Cancer Sci**, 104:1107-11, 2013.

Shimada, M., Abe, S., Takahashi, T., Shiozaki, K., Okuda, M., Mizukami, H., Klinman, D.M., Ozawa, K., Okuda, K.: Prophylaxis and treatment of Alzheimer's disease by delivery of an adeno-associated virus encoding a monoclonal antibody targeting the amyloid Beta protein. **PLoS One**, 8(3):e57606. 2013.

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

AADC欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究—定位脳手術法の確立

研究分担者 中嶋 剛 自治医大脳神経外科 助教

研究要旨

AADC 欠損症に対する遺伝子治療の実施に向けて定位的脳手術法の開発を行った。
定位的脳手術用治具、遺伝子注入用カニューレ、注入ポンプを製作した。
また、小児での脳定位手術の実施法について検討した。

A．研究目的

AADC 欠損症に対する遺伝子治療の実施に向けて定位的脳手術法（遺伝子導入法）を確立する。

B．研究方法

定位的脳手術装置用の治具、遺伝子注入用カニューレ、注入ポンプの設計、製造し安全性について検証する。

また、小児での脳低手術の方法について確認した。

（倫理面への配慮）

自治医科大学倫理委員会において承認された研究計画に則って実施した。

C．研究結果

定位的脳手術用治具、遺伝子注入用カニューレ、注入ポンプの製作行程が終了した。

乳幼児は、骨が柔らかいため、脳定位手術での固定がずれる可能性や骨折のリスクがあるが、これまでの経験と、文献上から、4 歳以上ではリスクも低く、実施可能であると判断した。

D．考察

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を過度に小さくすると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示唆されたため、脳深部標的部位の近傍では細く、脳表の近傍ではより太い径となるような一部テーパ形状を有するカニューレが本研究に最適であると考えられた。

E．結論

遺伝子治療の実施に必要な定位的脳手術フレーム用治具、遺伝子注入用カニューレ、ポンプ

の設計と製作を終えた。

G．研究発表

1．論文発表

Horisawa S, Taira T, Goto S, Ochiai T, Nakajima T. Long-Term improvement of musician's dystonia after stereotactic ventro-oral thalamotomy. Ann Neurol 74:648-54, 2013

中嶋剛. 新たな脳深部刺激装置. 先端医療シリーズ45「臨床医のための最新脳神経外科」先端医療技術研究所, 東京 (in press).

中嶋剛, 手塚正幸, 河村洋介, 黒田林太郎, 木村唯子, 横田英典, 小黒恵司, 渡辺英寿. 脳深部刺激バッテリー留置術における腋下皮膚切開法の利点. 日本整容脳神経外科研究会記録集 4 1-2, 2013

手塚正幸, 中嶋剛, 木村唯子, 横田英典, 小黒恵司, 平孝臣, 渡辺英寿. 痙性斜頸に対する選択的末梢神経遮断術後のボツリヌス毒素筋肉注射: 術後補助療法としての有用性. 機能的脳神経外科 52:166-69, 2013

2．学会発表

脳深部刺激バッテリー留置術における腋下皮膚切開法の利点, 日本整容脳神経外科研究会, 2013年4月 長野

定位的脳手術の精度とその管理（招待講演）, 東京女子医科大学機能脳神経外科夏季セミナー, 2013年8月 東京

自治医大式手術用ナビゲーションと市販汎用型経頭蓋磁気刺激相当のシステム統合, 脳神経外科学会総会, 2013年10月 東京

DBS vs ablation for movement disorder (invited lecture). The 9th Scientific Meeting for Asian Australian Society of Stereotactic and Functional Neurosurgery, January 2014 Shanghai

3Dプリンターがもたらす機能的神経外科のイ
ノベーション, 日本定位機能神経外科学会総会,
2014年2月 大阪

定位脳手術の現状と展望 (招待講演)、CREST
「脳機能回路」研究領域 運動系関連研究チー
ム合同ワークショップ, 2014年2月 愛知

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

AADC欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究-手術法の検討

研究分担者 渡辺英寿 自治医大脳神経外科 教授

研究要旨

脳内へのベクター注入の管理・定位脳手術実施を行う。

A．研究目的

脳内へのベクター注入の管理・
定位脳手術実施を行う。

の準備・予行を行った。

B．研究方法

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。分担者はこのための外科的なAA導入法の確立を目指す。

（倫理面への配慮）

患者に投与する AADC 遺伝子の純度およびその安全性を慎重に検討する。

C．研究結果

本年度は実際の打ち込み手術は行わず、その準備を行った。

準備は以下の3点である。

- 1) ターゲットを決定し手術ナビゲーション手術を行うための特別に手術支援ナビゲーターを用意する。
- 2) ナビゲーションを行うための画像解析システムの準備と手術シミュレーションを行う。

3) AAV virus 打ち込み中、打ち込み後の感染予防対策を手術室及び病棟でのシミュレーションを行った。

D．考察

本年は実際の打ち込みを行っていないので、予備的な実施予行を行うにと止まったが、大きな問題なく施行できると考えられた。

E．結論

本年は術前検討のシステム構築と手術

G．研究発表

1. 論文発表
別紙 4 参照
2. 学会発表
 - 新井文博, 小黒恵司, 渡辺英寿: 難治性てんかん患者に対する新規抗てんかん薬 levetiracetam の使用経験. 日本脳神経外科学会第 71 回学術総会, 大阪, 2012 年 10 月 18 日.
 - 海老原彰, 紺野武彦, 田中裕一, 渡辺英寿: 酸素吸入法による光トポグラフィーを用いた脳虚血側診断-主成分分析による評価-. 第 71 回日本脳神経外科学会総会, 大阪, 2012 年 10 月 17-19 日.

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

AADC欠損症遺伝子治療実施に向けた手術および術後管理体制の検討

研究分担者 竹内 護 自治医科大学 麻酔科学・集中治療医学 教授
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

研究要旨

AADC 欠損症の遺伝子治療臨床研究を実施する上で、麻酔や術後管理について、台湾での AADC 欠損症に対する遺伝子治療と自治医科大学で実施したパーキンソン病の遺伝子治療臨床研究の結果を基に検討した。麻酔に対しての問題点は報告されていない。術後管理では、無呼吸発作の増加と一過性のジスキネジアの出現に注意が必要である。

また、ウィルスベクター拡散防止対策を確認した。

A．研究目的

AADC 欠損症に対する遺伝子治療は、台湾で 4 例実施した論文報告があり、現在、8 例実施されている。また、同じ AAV-hAADC-2 ベクターを用いた遺伝子治療臨床研究が、自治医科大学で 6 例実施されている。いずれも、ベクターを定位脳手術により被殻に注入する手法で実施された。

AADC 欠損症は、ドーパミン、カテコールアミンやセロトニンの合成が低下し、発達遅滞と共に、筋緊張異常、ジストニアなどの不随意運動、睡眠障害などの神経症状に加え、成長障害や体重増加不良があり、全身状態が不良になる例もある。遺伝子治療臨床研究を行う上で、術前、術中、術後の管理上の問題点と対応法を、台湾での実施例の情報等から検討した。また、ウィルスベクター拡散防止対策、手術の安全対策等についても検討した。

B．研究方法

(1) 有害事象の解析

台湾での AADC 欠損症に対する遺伝子治療を実施した 8 例について、有害事象等の詳細な情報を入手した。また、自治医科大学で実施したパーキンソン病の遺伝子治療臨床研究での報告書も検討した。これらの実施例から、治療実施上の問題点と対応法について検討した。

(2) ウィルスベクター拡散防止対策

ベクターの移送、手術室での対応、術後の患者管理について検討した。

(3) 術前、術中、術後管理の検討

上記検討結果から、術前、術中、術後の管

理方法を検討した。

（倫理面への配慮）

総括報告書参照。

C．研究結果

(1) 有害事象の解析

台湾での AADC 欠損症の有害事象として、術後に無呼吸発作を反復した例が報告されている。一過性の強いジスキネジアが 2 例で見られた。その中の 1 例は口唇・顔面ジスキネジアが強く、摂食困難になり、一時的に経管栄養を実施した。一例は、術前から疾患の進行により全身状態が不良であった。術後、自宅で胃腸炎症状から脱水、ショックになり、心肺停止、蘇生した。

パーキンソン病の遺伝子治療臨床研究では、脳内出血を起こした例が 1 例あった。一時的な神経症状を示したが、後遺症は残さなかった。今回、ベクター注入用のカニューレは改良されており、出血のリスクは低いと考えられるが、十分な注意は必要である。

(2) ウィルスベクター拡散防止対策（参考資料参照）

カルタヘナ法に基づき、ウィルス拡散防止法の検討を行った。ベクターを細胞調整室から密封した容器に入れ、手術室へ移送する方法を確認した。また、手術室で一時的な保管場所、受け渡し方法などの拡散防止対策と安全管理を確認した。終了後は、被験者の創部を皮膚欠損用創傷被覆材により密閉し、さらに三角巾で覆い、マスク及びガウンを着用した被験者を、自治医科大学子ども医療センタ

一病棟に移動する手順とした。

術後は、ウィルスベクターの排出がないことが確認されるまで陰圧個室にて管理する。

(3) 術前、術中、術後管理の検討

(a) 術前管理

全身状態不良例で術後ショック状態になった例があり、術前の水分、栄養管理に留意し、全身状態を良好に保つようにする。

睡眠障害があり、適宜メラトニンのアゴニストであるラメルテオン、あるいはトリクロリール等を使用する。ベンゾジアゼピン系薬は、痰が増加するので、使用時は呼吸状態に注意する。

(b) 麻酔および術中管理

麻酔に対して問題があった例はなく、通常の麻酔で実施可能と考える。AADC 欠損症で悪性高熱の報告もないが、神経筋接合部をブロックする作用がある麻酔薬は出来る限り使用しない。術中の脳内出血等の副作用症状に注意する。

最少年齢が4歳と想定される。低年齢の児での定位脳手術の経験は全国的に少ない。慎重に実施する。

(c) 術後管理

全身状態に応じ、PICU 個室あるいは病棟の陰圧個室で管理する。もっとも問題となる有害事象は無呼吸発作で、発作時にすぐに対応が取れるようにするが、頻回、重度の場合は呼吸管理も検討する。

D. 考察

これまでの AADC 欠損症の遺伝子治療における有害事象から、無呼吸発作の増加と一過性のジスキネジアが起こるリスクはありと考えられ、術後それらに注意して管理を行う。パーキンソン病遺伝子治療研究では、一例で脳内出血があった。カニューレの改良も行っており、リスクは軽減されているが、留意して術中管理を行う。また、術前に全身状態を良好に保つことも重要である。

他に、麻酔や術前術後の管理上、問題とな

ることはなく、遺伝子治療実施可能であるが、低年齢の児に対しては、より慎重に実施する。

E. 結論

AADC 欠損症の遺伝子治療臨床研究実施における麻酔や管理上の問題について検討した結果、術後に無呼吸発作の増加と一過性のジスキネジアの出現に注意が必要である。麻酔上の問題は報告されていないが、注意して実施する。

G. 研究発表

1. 論文発表

竹内護、堀田訓久：実践臨床麻酔マニュアル .

中外医学社、東京、1-459, 5/30/2013

丹羽康則、井上荘一郎、中村文人、多賀直行、

竹内護、小西宏明：小児における連続呼吸監視 (RRa®) の使用経験 . 麻酔62(7): 855-858;

2013.

中村文人、大塚洋司、永野達也、五十嵐孝、

多賀直行、竹内護：抗菌薬治療抵抗性の肺炎：呼吸不全を契機に診断された重症複合型

免疫不全症の1症例 . 日本集中治療医学会雑誌20: 629-633; 2013

2. 学会発表

なし

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

AADC 欠損症におけるロチゴチンパッチの有用性の検討

研究分担者 加藤 光広 山形大学医学部附属病院 小児科講師

研究要旨

AADC 欠損症の兄妹 2 症例に対し、ドパミン受容体作動薬の経皮吸収型製剤ロチゴチンパッチを使用し、有用性を検討した。2 例とも乳児期から異常眼球運動とジストニア発作を週に数回起こし、重度発達遅滞を呈し、髄液 HVA、5HTAA、MHPG の低値、L-DOPA の高値を示した。成人量の 1/4 量を基準に、ロチゴチンパッチ 1.125mg / 日から開始し、2-4 週間毎に症状と副作用を確認しながら漸増し、9mg を越えないように調整した。症例 1 で傾眠、症例 2 で軟便がみられたが、一過性に消失した。症例 1 では発作間隔の拡大と発作時間の短縮効果を認めた。しかし、増量により発作回数は悪化し、減量で改善した。症例 2 では発作平均回数に変化はなかったが、発作間隔が不規則になった。AADC 欠損症の小児例に対してロチゴチンパッチは安全に使用できた。1 例では発作抑制効果がみられ有効であったが、適量の調節が必要である。

A . 研究目的

AADC 欠損症は、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 Aromatic amino acid decarboxylase (AADC) の機能低下により多様な神経症状をきたす難治性の疾患である。国内での確定診断例はこれまでのところ 3 家系 4 例のみと非常に稀だが、診断のためには髄液のモノアミン代謝物質の測定が必要であり、通常の一般検査では診断されないため未診断例が多いと推定される。AADC の酵素作用によって、5 水酸化トリプトファンがセロトニンに、L-DOPA がドパミンに変換されるため、AADC 欠損症ではセロトニンとドパミンの 2 系統のモノアミン系神経伝達物質の産生が著明に低下する。症状としては、発達遅滞、ジストニアを主体とする錐体外路徴候、発作性異常眼球運動、発汗や皮膚発赤などの自律神経症状、神経過敏、睡眠障害をきたし、多くは重度の発達障害を示し、座位も不可能なことが多い。治療はドパミンが低下するパーキンソン病に準じるが、パーキンソン病治療の中核となる L-DOPA は、AADC 欠損症ではドパミンに変換されないため無効であり、ドパミン受容体作動薬や MAO 阻害剤、AADC の補酵素であるビタミン

B6 が使用される。しかし、効果は限定的であり、より効果的な治療法の開発が求められる。

AADC 欠損症の症状の特徴として日内変動が認められる。これは、睡眠によってジストニアや異常眼球運動などの発作症状が改善し、覚醒時間が長くなると発作が起きてくる。パーキンソン病ではドパミン受容体の間欠的刺激により不随意運動が発現することが知られており、同様の機序で起きている可能性がある。最近、本邦において経皮吸収型製剤のドパミン受容体作動薬（ロチゴチンパッチ）が販売開始された。ロチゴチンパッチは、ドパミン受容体刺激の日内変動を少なくし、パーキンソン病において運動能力および日常生活動作を改善し、進行期のオフ時間を短縮する特性があり、AADC 欠損症の発作症状に対しても有効な可能性がある。AADC 欠損症の兄妹 2 症例に対してロチゴチンパッチを投与し、治療効果を検討した。

B . 研究方法

対象：AADC 欠損症の兄妹 2 例。

症例 1（兄）：14 歳男児。軽度の仮死出生があ

り、生後から体動が少なく啼泣は微弱で、1週間経管栄養を必要とした。生後3か月から異常な眼球運動が週に数回認められるようになり、ジストニアも発作性に認められるようになった。当初てんかん発作が疑われたが、脳波には異常なく、頭部MRIも正常であった。3歳時の髄液検査で5-HIAA <1.0 ng/ml (17-116), HVA 5.7 ng/ml (28-200), MHPG <1.0 ng/ml (6.5-51), L-DOPA 13.6 ng/ml (<2.0)と特徴的变化を示し、AADC欠損症と診断された。

症例2(妹): 12歳女児。生後1か月から異常な眼球運動を示し、生後3か月から2-3時間続く発作性の全身筋緊張低下を来し、兄と同病が疑われ、兄と同時期に生後6か月で髄液検査が行われ、5-HIAA <1.0 ng/ml (17-116), HVA 12.2 ng/ml (28-200), MHPG <1.0 ng/ml (6.5-51), L-DOPA 27.4 ng/ml (<2.0)と特徴的变化を示し、AADC欠損症と診断された。

方法: 成人量の1/4量(開始時の体重は症例1が27.9kg、症例2が26kg)を基準に、ロチゴチンパッチ1.125mg/日から開始し、2-4週間毎に症状と副作用を確認しながら漸増し、9mgを越えないように調整した。他の投与薬(症例1は、フルボキサミンマレイン酸塩20mg、リン酸ピリドキサル Ca 234mg、葉酸8mg、ダントローレン Na 50mg、カルボシステイン600mg、塩酸ロペラマイド0.6mg、水溶性アズレン3mg、乳酸菌製剤2g。症例2は、リン酸ピリドキサル Ca 179mg、葉酸7.5mg、カルボシステイン600mg、乳酸菌製剤2g、およびプロチゾラム0.25mg 不眠時屯用)は原則として変更しないようにした。

(倫理面への配慮)

山形大学医学部倫理委員会の承認を受け(平成22年1月18日 第137号)保護者から治療に対する同意を得た。

C. 研究結果

症例1。当初2週間は眠気が強かったが、その後は消失し、経過中嘔吐や吐き気はなかった。発作開始前は3日に1回発作が起きていたが、ロチゴチンパッチ貼付開始2か月後に4.5mgに増量したところ、1週間に1回に発作が減少した。また、

発作が起きても眠れるようになり、発作自体も軽くなった。4か月後に9mgに増量したところ、発作が3日間連続して出現し増悪したため、6.75mgに減量し、再び発作間隔は1週間に1回に減少した。6か月経過時点で、体重は29.2kgに増加し、発作以外の神経症状に変化はみられなかった。貼付部位の発赤はなかった。

症例2。投与開始前の異常な眼球運動とジストニア発作は2-3日に1回規則的に起きていた。投与3か月後、ロチゴチンパッチ4.5mgで発作には変化がなく一過性に軟便が出現したが改善したため5か月後から6.75mgに増量した。施設に短期入所時のみ不眠が強いため、ラメルテオン4mgを屯用で追加処方。6.75mgに増量後、発作の平均回数に変化はなかったが、4日おきだったり、3日間連続して、発作間隔が不規則になった。症例1が9mgで悪化したため、6.75mgで継続していたが、投与6か月後から9mgに増量し、現在経過観察中である。6か月経過時点で、体重は26.1kgとほぼ変化なく、発作以外の神経症状に変化はみられなかった。貼付部位の発赤はなかった。

D. 考察

症例1で傾眠、症例2で軟便がみられたが、いずれも一過性で消失し、2症例ともロチゴチンパッチは安全に使用可能であった。

症例1では発作間隔の拡大と発作時間の短縮効果を認め有効であった。しかし、増量により発作回数は悪化し、適量の調節が必要であった。増量により悪化した理由は不明だが、パーキンソン病ではロチゴチンパッチの過量投与により不随意運動等のドパミン受容体刺激作用に関連する症状の発現が予想されている。本例では嘔吐などの他の刺激作用はみられなかったが、AADC欠損症においても過剰なドパミン受容体刺激により発作が誘発された可能性がある。

症例2ではロチゴチンパッチの投与前後で発作平均回数に変化はなかったが、発作間隔が不規則になった。ロチゴチンパッチの影響も否定はできないが、施設への短期入所による不眠を繰り返しており、生活環境の変化による睡眠覚醒の日内リズムの変動に伴う影響が考えられる。経過中認

められた軟便や不眠はドパミン受容体刺激作用との因果関係は考えづらく、明らかな副作用はみられなかった。その一方、投与量の不足も考えられ、9mg への増量効果をみて有効性を判定する必要がある。

E. 結論

AADC 欠損症の小児例に対してロチゴチンパッチは安全に使用できた。1 例では発作抑制効果がみられ有効であったが、適量の調節が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saitsu H, Nishimura T, Muramatsu K, Kodera H, Kumada S, Sugai K, Kasai-Yoshida E, Sawaura N, Nishida H, Hoshino A, Ryujin F, Yoshioka S, Nishiyama K, Kondo Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Arakawa H, Kato M, Mizushima N, Matsumoto N: De novo mutations in the

autophagy gene *WDR45* cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nat Genet* 2013;45(4):445-449, 449e441

2. 学会発表

- 1) 加藤光広：難治性てんかんの分子遺伝学．第 55 回日本小児神経学会学術集会シンポジウム．難治性てんかんの病態を探る－分子遺伝学、病理、免疫、代謝異常、画像、電気生理：大分 2013 年 5 月 30 日

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

アデノ随伴ウイルスによる小児期遺伝性疾患治療 ～新規 AADC 欠損症患者の診断と適応疾患拡大を目指して～

小坂 仁¹、中村幸恵¹、才津浩智²、松本直通²、山形崇倫¹
¹自治医科大学小児科学、²横浜市立大学医学研究科遺伝学

研究要旨

新規 AADC 欠損症患者の診断

アデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus：AAV）による治療が計画されている芳香族 L アミノ酸脱炭酸酵素欠損症、AADC 欠損症は、世界での報告例は 100 症例程度である。本邦においては現在まで 3 例診断されていたが、今回エクソームシーケンスにより原因遺伝子；DDC に c.315G>C, p.W105C /c.385C>T, p.P91S の新規変異を 3 才女兒に認め髄液中モノアミン値血漿中 AADC 酵素活性値測定により診断確定した。本児では、神経回路網の完成前に、ウイルスベクターによる治療を行うことが可能であるため、より強い効果が期待できる。

新たな対象疾患の拡大

小児期遺伝性疾患は、機能喪失により発症する疾患が多く、原因蛋白の発現増加により、機能回復を見るため、ウイルスベクター治療の良い適応となる。AADC 欠損症に引き続き AAV 治療を拡大するためグルコーストランスポーター 1 型（Glut 1）欠損症の治療研究に着手した。Glut 1 (SLC2A1) の一過性発現により細胞膜表面での細胞内局在を確認し、糖取込試験により、細胞内糖取り込みが、有意に上昇することを確認した。現在 2 型 AAV ベクターを作製しており、今後 glut1 ノックアウトマウス(ヘテロ体)への治療を行い、AADC 同様臨床研究実施を目指している。小児期遺伝性神経疾患は、それぞれの症例数は 100 例前後と希少で種類の多い疾患からなり、Glut1 欠損症の治療法の確立により更に多くの患者の治療が可能になる。

A . 研究目的

アデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus：AAV）は遺伝性疾患治療において、現在最も有望視されている遺伝子治療のベクターであり、本研究班では、AAV ベクターを用いたアミノ酸脱炭酸酵素欠損症；Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) 欠損症での、遺伝子治療臨床研究を

進めている。AAV ベクターによる遺伝子導入は現在治療法の存在しない多くの小児難治性遺伝性疾患患者および家族にとり、大きな希望となっている。この治療法を、今後多くの患児に行うためには、未診断例から確定診断例を増やす取り組みと、AADC 欠損症に加え、新たな対象疾患の拡大が必要である。今回私達は、エクソームシーク

エンスにより、新規 AADC 欠損症患者を見出すとともに、治療のモデルとしてグルコーストランスポーター 1 型欠損症治療研究に着手したので報告する。

B . 研究計画・方法 (概要)

新規 AADC 欠損症患者の診断

症例 ; 3 才女児。在胎 41 週 2 日 2978g , アプガールスコア 8 点 (1 分) /9 点 (5 分) で吸引分娩にて出生した。日齢 1 にけいれん様の動きがあり、近医へ搬送された。1 ヶ月間 NICU で入院加療をうけたが、明らかなけいれんを認めず、頭部 CT でも異常を認めないため退院した。9 ヶ月時、頸定・寝返りがないため、療育センターでの訓練が開始された。10 ヶ月発達遅滞精査が行われたが MRI 検査および尿中有機酸分析、TORCH , アミノ酸分析 , タンデムマス分析等で異常が認められなかった。2 歳 7 ヶ月初診時現症では、意識清明、一般理学的所見に異常なし。固視・追視あり、笑顔あるが、表情に乏しく軽度眼瞼下垂あり、口をとがらせることで意思表示可能であった。筋力は、上下肢とも 4/5 であり、筋緊張は低下し、姿勢は下肢でカエル様肢位をとり、左凸の側彎を認めた。間欠的な四肢のジストニアが認められたが、その他ヒョレアなどの不随意運動はなく、眠い時に眼球上転を繰り返していた。その他発汗過多、流涎は多く、恒常的に下痢を認めていた。一般生化学検査、髄液・血液・尿検査、脳血流 SPECT , MRI はいずれも正常であった。方法 ; 血液から採取した DNA を Sure Select Human All Exon v4 Kit (51Mb; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) でキャプチャーした後、Illumina HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA) を用い、シーケンスを行い、CASAVA ソフトウェア v1.8 (Illumina) を用いてエクソーム解析を行った。

(倫理面への配慮)

神奈川県立こども医療センター倫理委員会承認の説明書の書式に則り、遺伝カウンセリングの上、書面にて承諾を得た。

新たな対象疾患の拡大

小児期遺伝性疾患は、AADC 欠損症のように劣性遺伝形式を取り、機能喪失により発症する疾患が多い。これらの多くは、蛋白導入により、機能回復を見る。厳密な量の制御は必要ない場合が多く、ウイルスベクター治療の良い適応となる。この点において、優性遺伝形式をとり、新たな機能すなわち細胞毒性の獲得により、発症する成人疾患と大きく異なる。AADC 欠損症に引き続き AAV 治療を拡大することが求められる。今回、劣性遺伝形式の小児期発症神経疾患として、グルコーストランスポーター 1 型欠損症 ; Glucose transporter type 1 deficiency; Glut1 欠損症を取り上げた。この疾患は、中枢神経系の内皮細胞に発現する Glut1 の欠損により、中枢神経の低血糖症状を呈し、小頭症、てんかん、知的発達遅滞等の重篤な症状をとる疾患である。蛋白が糖の取り込みに関するトランスポーターであり機能が明らかであり、かつホモロジーモデリングにより、構造決定されており、遺伝型と表現型の相関も明確であり、疾患モデルマウスも存在するため、治療効果を判定するプロトタイプとしてこの疾患を取り上げた。

C . 研究結果

新規 AADC 欠損症患者の診断

結果 ; AADC 欠損症の原因遺伝子である DDC に c.315G>C, p.W105C (母親由来) および c.385C>T, p.P91S (父親由来) いずれも新規変異 (The Human Gene Mutation Database による解析) を認めた。これらは日本人 406 名のノーマルコントロールにおいて認められない変異であった。

この結果を踏まえ、髄液中モノアミン値

を測定したところ、L-dopa は 15.5ng/ml (正常値<4.9 と著増し) 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol, MHPG は <1.0 ng/ml (正常値 8~43) であり低値であった。また血漿中 AADC 酵素活性値測定を、チューリッヒ大学小児病院に依頼し、3.62 pmol/min/ml (正常値 36-129) と下限値の約 10% であり、診断が確定した。

新たな対象疾患の拡大

Glut 1 (SLC2A1) 発現ベクターを HEK293 細胞 (ヒト胎児腎臓由来細胞) に一過性に発現させ、ウエスタンブロッティングにより、目的の分子量に外来性 *Glut 1* の発現を確認した。またタグに対する抗体染色により、細胞膜表面での細胞内局在を確認した。また 2-デオキシグルコース (2DG) 取込試験により、細胞内のリン酸化 2DG6-リン酸を測定し糖取り込みが、有意に上昇することを確かめた。

D . 考察

新規 AADC 欠損症患者の診断

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 (MIN608643) 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発症する常染色体劣性遺伝性疾患である。1990 年に、初めて報告され、現在までに世界での報告例は 100 症例程度である。日本では、今までに 3 例診断されていたが、今回新たに 1 例診断を診断確定した。AADC は、チロシンから生成された L-dopa をドパミンに、また、トリプトファンから生成された 5-ハイドロキシトリプトファンをセロトニンに代謝する酵素である。ドパミンからは、ノルエピネフリン、エピネフリンが合成されるため、これらのカテコールアミン全体が低下する。本児では髄液で、ドパミンの前駆体の、L-dopa が著増するととも

に、ノルエピネフリンの代謝物である PHPG は減少していた。また臨床症状としては、カテコラミンとセロトニンの合成が障害されることにより、乳幼児期に重度の運動障害で発症し、主な症状としては、筋緊張低下、眼球上転発作 (oculogyric crises)、知的障害、体温異常、摂食困難などを伴う。また、メラトニン低下による睡眠障害や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、本例では多くの症状が合致していた (下線部は本例で認められた症状)。以上の臨床症状に加え、髄液検査、遺伝子検査、および酵素活性測定より、診断が確定した。なお、ホモロジーモデリングからは、変異アミノ酸残基は基質結合面にはないため、活性低下はアロステリック効果によりもたらされるものと考えられた。

新たな対象疾患の拡大

現在 SLC2A1 遺伝子導入 2 型 AAV ベクター (pAAV-SLC2A1-2) を作製しており、今後神経系ヒト培養細胞 (SH-SY5Y 細胞) に遺伝子導入し、発現確認した後 *Glut1* KO マウス (ヘテロ体) に pAAV-SLC2A1-2 を脳室内注入発現確認、機能評価 ; 髄液糖測定マウス行動解析マウス脳組織を用いた電気生理検査 (共同研究) 脳波検査、を行い、AADC 同様臨床研究実施を目指している。

5 . 結論

新規 AADC 欠損症患者の診断

AADC 欠損症患者の、示す症状は非特異的であり、本例の様に原因不明の低緊張あるいは脳性麻痺として、診断未定例が多いと思われる。神経伝達物質の低下という、”機能的”疾患ではあるが、診断が遅れた場合には、すでに神経回路の構成が、終了しており、症状の回復が難しいとされており、早期診断・早期治療のシステムを整える必

要がある。本症例のように、エクソームシーケンスにより、診断される症例は今後も拡大する可能性はあるが、検査施設は少なく、費用的にも高額なため当面限られた症例となろう。国内での遺伝子治療の実施により、“治療できる疾患”として、この疾患の認知度は高まると予想される。現在国内で、AADCの酵素活性を測定できる施設がないため、確定診断と残存酵素活性による重症度の予測が困難である。この検査法の確立は次年度の課題としたい。

新たな対象疾患の拡大

AADC欠損症に対する遺伝子治療を国内における難治性神経疾患のさきがけとして、更に治療を拡大するためのプロトタイプとしてGlut1欠損症治療研究に着手した。小児期遺伝性神経疾患は、それぞれの症例数は100例前後（希少で）の数多くの（種類の多い）疾患からなる。AADCのように発現が、脳内の基底核に限られた疾患は、むしろ稀である。Glut1欠損症のように、欠損蛋白が、広く脳内に分布するものが多いため、Glut1欠損症の治療法の確立は多くの適応疾患拡大につながる。

参考文献

AADC欠損症; Brun L, Ngu LH, Keng WT, Ch'ng GS, Choy YS, Hwu WL, et al. Clinical and biochemical features of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Neurology*. 2010;75:64-71.

1, 論文発表

Takanashi J, Osaka H, Saitsu H, Sasaki M, Mori H, Shibayama H, Tanaka M, Nomura Y, Terao Y, Matsumoto N, Barkovich AJ. Different patterns of hypomyelination and cerebellar abnormality between POLR3A and

POLR3B mutations. *Brain Dev* in press.

Ravenscroft G, Miyatake S, Lehtokari VL, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, Hayashi YK, Miyake N, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Osaka H, Yamashita S, Ohya T, Sakamoto Y, Koshimizu E, Imamura S, Yamashita M, Ogata K, Shiina Bryson-Richardson RJ, Vaz R, Ceyhan O, Brownstein CA, Swanson LC, Monnot S, Romero NB, Amthor H, Kresoje N, Sivadorai P, Kiraly-Borri C, Haliloglu G, Talim B, Orhan D, Kale G, Charles AK, Fabian VA, Davis MR, Lammens M, Sewry CA, Manzur A, Muntoni F, Clarke NF, North KN, Bertini E, Nevo Y, Willichowski E, Silberg IE, Topaloglu H, Beggs AH, Allcock RJ, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N, Laing NG. Mutations in KLHL40 Are a Frequent Cause of Severe Autosomal-Recessive Nemaline Myopathy. *Am J Hum Genet* 2013; 93: 6-18.

Anselm I, Azzouz H, Bratkovic D, de Brouwer A, Hamel B, Kleefstra T, Yntema H, Campistol J, Vilaseca MA, Cheillan D, D'Hooghe M, Diogo L, Garcia P, Valongo C, Fonseca M, Frints S, Wilcken B, von der Haar S, Meijers-Heijboer HE, Hofstede F, Johnson D, Kant SG, Lion-Francois L, Pitelet G, Longo N, Maat-Kievit JA, Monteiro JP, Munnich A, Muntau AC, Nassogne MC, Osaka H, Ounap K, Pinard JM, Quijano-Roy S, Poggenburg I, Poplawski N, Abdul-Rahman O, Ribes A, Arias A, Yapliito-Lee J, Schulze A, Schwartz CE, Schwenger S, Soares G, Sznajder Y, Valayannopoulos V, Van Esch H, Waltz S, Wamelink MM, Pouwels PJ, Errami A, van der Knaap MS, Jakobs C, Mancini GM, Salomons GS. Phenotype and genotype in 101 males with X-linked creatine transporter deficiency. *J Med Genet* 2013; 50:463-472.

Mitani T, Aida N, Tomiyasu M, Wada T, Osaka H. Transient ischemic attack-like episodes without stroke-like lesions in MELAS. *Pediatr Radiol* 2013; 43: 1400-1403.

Kato H, Miyake F, Shimbo H, Ohya M, Sugawara H, Aida N, Anzai R, Takagi M, Okuda M, Takano K, Wada T, Iai M, Yamashita S, Osaka H. Urine screening for patients with developmental disabilities detected a patient with creatine transporter deficiency due to a novel missense mutation in SLC6A8. *Brain Dev* in press.

Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, Haginoya K, Tohyama J, Okuda M, Wada T, Shimakawa S, Imai K, Takeshita S, Ishiwata H, Lev D, Lerman-Sagie T, Cervantes-Barragan DE, Villarroel CE, Ohfu M, Writzl K, Gnidovec Strazisar B, Hirabayashi S, Chitayat D, Myles Reid D, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N, Saitsu H. Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology* 2013; 81: 992-998.

Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Osaka H, Nakamura S, Tohyama J, Kumada T, Furukawa T, Iwata S, Shiihara T, Kubota M, Miyatake S, Koshimizu E, Nishiyama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Ogata K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H. De Novo Mutations in GNAO1, Encoding a Galphao Subunit of Heterotrimeric G Proteins, Cause Epileptic Encephalopathy. *Am J Hum Genet* 93: 496-505.

Imagawa E, Osaka H, Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Sugie H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H,

Ogata K, Matsumoto N, Miyake N. A hemizygous GYG2 mutation and Leigh syndrome: a possible link? *Hum Genet* in press.

Ohba C, Osaka H, Iai M, Yamashita S, Suzuki Y, Aida N, Shimozawa N, Takamura A, Doi H, Tomita-Katsumoto A, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Eto Y, Tanaka F, Matsumoto N, Saitsu H. Diagnostic utility of whole exome sequencing in patients showing cerebellar and/or vermis atrophy in childhood. *Neurogenetics* 2013; 14: 225-232.

Kodera H, Nakamura K, Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, Okamoto N, Iai M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, Sugahara K, Yuasa I, Wada Y, Matsumoto N, Saitsu H. De novo mutations in SLC35A2 encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy. *Hum Mutat.* 2013;34: 1708-1714.

Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, Osaka H. A Three-Year-Old Boy With Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome Presenting With Episodic Ataxia. *Pediatr Neurol* in press.

Matsufuji M, Osaka H, Gotoh L, Shimbo H, Takashima S, Inoue K. Partial PLP1 Deletion Causing X-Linked Dominant Spastic Paraplegia Type 2. *Pediatr Neurol.* 2013; 49: 477-481.

Akiyama T, Osaka H, Shimbo H, Nakajiri T, Kobayashi K, Oka M, Endoh F, Yoshinaga H. A Japanese Adult Case of Guanidinoacetate Methyltransferase Deficiency. *JIMD Rep.* 2013 Jul 12.

Abe J, Nakamura K, Nishikomori R, Kato M, Mitsuiki N, Izawa K, Awaya T, Kawai T, Yasumi T, Toyoshima I, Hasegawa K, Ohshima Y, Hiragi T,

Sasahara Y, Suzuki Y, Kikuchi M, Osaka H, Ohya T, Ninomiya S, Fujikawa S, Akasaka M, Iwata N, Kawakita A, Funatsuka M, Shintaku H, Ohara O, Ichinose H, Heike T. A nationwide survey of Aicardi-Goutieres syndrome patients identifies a strong association between dominant TREX1 mutations and chilblain lesions: Japanese cohort study. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 Dec 3.

Okabe T, Aida N, Niwa T, Nozawa K, Shibasaki J, Osaka H. Early magnetic resonance detection of cortical necrosis and acute network injury associated with neonatal and infantile cerebral infarction. *Pediatr Radiol*. 2014 Jan 14. [Epub ahead of print] 31.

Wada T, Haddad MR, Yi L, Murakami T, Sasaki A, Shimbo H, Kodama H, Osaka H, Kaler SG. A Novel Two-Nucleotide Deletion in the ATP7A Gene Associated With Delayed Infantile Onset of Menkes Disease. *Pediatr Neurol*. 2014 in press.

2. 学会発表

大城亜希子、高木真理子、安西理恵、奥田美津子、高野亨子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁、相田典子：全脊髄炎を呈し、重度の後遺症を残した急性散在性脳脊髄炎の一例 第58回日本小児神経学会関東地方会 2013.3.9. 東京（東京医科大学病院）

Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, et al. : Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

萩野谷和裕、加藤光広、小坂仁、横地健治、荒井洋、和田敬仁、小山典久、近藤典子、高橋悟、平林伸一、平井聡里、才津浩智：COL4A1 変異の臨床病型の広がり：孔脳症から裂脳症まで。 第55回日本小

児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

Osaka H, Takagi M, Okuda M, Anzai R, et al. : A rapid screening for the genetic diagnosis of Leigh syndrome. 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

高野亨子、高木真理子、奥田美津子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁：生後4カ月に発症し急速な退行を示した vanishing white matter disease の1例 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

高木真理子、高野亨子、奥田美津子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁：m.3697G>A/ND1 変異を認めた Leigh 症候群の2症例 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

黒田友紀子、大橋育子、高野亨子、和田敬仁、松井潔、小坂仁、黒澤健司：次世代シーケンサーを用いた小児神経疾患のターゲットシーケンス解析のワークフロー 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

山本亜矢子、大城亜希子、安西理恵、高木真理子、奥田美津子、新保裕子、高野亨子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁：ATG>AGG (開始コドン)の変異で軽症の表現型を示した Pelizaeus-Merzbacher 病の一男児例 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

小坂仁：小児期発症の脊髄小脳変性症：レビューと鑑別診断 シンポジウム 2DNA 修復障害と神経変性 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

山下純正、和田敬仁、小坂仁、柴崎淳、松井潔：ポーランドメービウス症候群の神経病理 血管障害との関連において 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

奥田美津子、安西理恵、高木真理子、高野

亨子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁、新宅治夫：日内変動のあるジストニアを認め、遺伝子解析で瀬川病と診断した9歳女児例 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

宮武聡子、輿水江里子、林由起子、Ravenscroft G、三宅紀子、土井宏、鶴崎美德、才津浩智、小坂仁、他：ネマリオンミオパチーの新規原因遺伝子 KLHL40 の同定 第58回日本人類遺伝学会 2013.11.20-11.23. 仙台

大場ちひろ、小坂仁、井合瑞江、山下純正、鈴木ゆめ、相田典子、土井宏、他：小児期に小脳萎縮を呈する疾患における全エクソーム解析による遺伝子診断第58回放射線科 日本人類遺伝学会 2013.11.20-11.23. 仙台

小寺啓文、中村和幸、秋田天平、椎名政昭、加藤光広、星野英紀、寺嶋宙、小坂仁、他：3量体Gタンパク質GαoサブユニットをコードするGNAO1のde novo変異はてんかん性脳症を引き起こす 第58回日本人類遺伝学会 2013.11.20-11.23. 仙台

今川英里、小坂仁、山下暁朗、椎名政昭、高橋英彦、杉江秀夫、中島光子、鶴崎美德、才津浩智、緒方一博、松本直通、三宅紀子：ケトン血症を伴うLeigh脳症兄弟例のエクソーム解析 第58回小児科 日本人類遺伝学会 2013.11.20-11.23. 仙台

和田敬仁、立川正憲、伊藤慎悟、大槻純男、新保裕子、小坂仁：クリアチントランスポーター欠損症5家系の分子遺伝学的検討 第58回神経内科 日本人類遺伝学会 2013.11.20-11.23. 仙台

高野亨子、小坂仁、大橋育子、黒田友紀子、黒澤健司、相田典子、村山圭：14q12欠失症候群の1例 第58回代謝科 日本人類遺伝学会 2013.11.20-11.23. 仙台

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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Kondo Y, Okuno T, Asari S, Muramatsu S	Cell therapy for Parkinson's disease.	Stubblefield P and Bhattacharya N	Clinical implications of fetal transplantation in Medicine	Springer-Verlag	英国	2013	193-203
村松慎一	パーキンソン病の遺伝子治療・細胞移植	辻省次, 高橋良輔	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	中山書店	東京	2013	384-391

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	36	64-69	2014
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	9	e92695	2014
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		in press.	2014
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	58	755-757	2013
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, et al.	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	161	1221-1237	2013

<u>Kato M, Yamagata T, Kubota M, Arai H, Yamashita S, Nakagawa T, Fujii T, Sugai K, Imai K, Uster T, Matsumoto A, et al.</u>	Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation.	Epilepsia	54	1282-7	2013
Monden Y, Mori M, Kuwajima M, Goto T, <u>Yamagata T</u> , Momoi MY.	Late-onset Leigh syndrome with myoclonic epilepsy with ragged-red fibers.	Brain Dev	35	582-585	2013
Iwasa M, <u>Yamagata T</u> , Mizuguchi M, Itoh M, Matsumoto A, Hironaka M, Honda A, Momoi MY, Shimozawa N.	Contiguous ABCD1 DXS1357E deletion syndrome: Report of an autopsy case.	Neuropathol	33	292-298	2013
Yan Y, Miyamoto Y, Nitta A, <u>Muramatsu S</u> , 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
Lee N-C, Shieh Y-D, Chien Y-H, Tzen K-Y, Yu I-S, Chen P-W, Hu M-H, Hu M-k, <u>Muramatsu S</u> , Ichinose H, Hwu W-L	Regulation of the dopaminergic System in a murine model of aromatic L-aminoacid decarboxylase deficiency.	Neurobiol Dis	52	177-190	2013
Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Staufenbiel M, <u>Muramatsu S</u> , Saïdo TC	Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice.	Sci Rep	3	1472	2013
Iida A, Takino N, Miyaochi H, Shimazaki K, <u>Muramatsu S</u>	Systemic delivery of tyrosine-mutant AAV vectors results in robust transduction of neurons in adult mice.	Bio Med Res Int	2013	974819	2013
Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, <u>Muramatsu S</u> , 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
Hwu WL, Lee NC, Chien YH, <u>Muramatsu S</u> , Ichinose H	AADC deficiency: occurring in humans, modeled in rodents.	Adv Pharmacol	68	273-84	2013
Miyamoto Y, Ishikawa Y, Iegaki N, Sumi K, Fu K, Sato K, Furukawa-Hibi Y, <u>Muramatsu S</u> , Nabeshima T, Uno K, 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 JNP		In press	

Shimada M, Abe S, Takahashi T, Shiozaki K, Okuda M, Mizukami, H, Klinman DM, Ozawa K, Okuda K.	Prophylaxis and treatment of Alzheimer's disease by delivery of an adeno-associated virus encoding a monoclonal antibody targeting the amyloid Beta protein.	PLoS One	8	e57606	2013
Matsushita T, Taki M, Muto S, Higasa S, Sakai M, Ohmori T, Madoiwa S, Ozawa K, Sakata Y.	Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals.	J Med Virol		in press.	
Horisawa S, Taira T, Goto S, Ochiai T, <u>Nakajima T.</u>	Long-Term improvement of musician's dystonia after stereotactic ventro-oral thalamotomy.	Ann Neurol	74	648-54	2013
中嶋剛, 手塚正幸, 河村洋介, 黒田林太郎, 木村唯子, 横田英典, 小黒恵司, 渡辺英寿.	脳深部刺激バッテリー留置術における腋下皮膚切開法の利点.	日本整容脳神経外科研究会記録集		41-2	2013
小黒恵司, 横田英典, 檀一平太, 渡辺英寿	倍密度光トポグラフィへの挑戦	認知神経科学	14(1)	27-34	2012
Ebihara A, Tanaka Y, Konno T, Kawasaki S, Fujiwara M, Watanabe E	Evaluation of cerebral ischemia using near-infrared spectroscopy with oxygen inhalation.	Journal of Biomedical Optics	17(9)	096002-1 ~ 096002-8	2012
Moriai-Izawa A, Dan H, Dan I, Sano T, Oguro K, Yokota H, Tsuzuki D, Watanabe E	Multichannel fNIRS assessment of overt and covert confrontation naming.	Brain & Language	121	185-193	2012
丹羽康則, 井上荘一郎, 中村文人, 多賀直行, 竹内護, 小西宏明	小児における連続呼吸監視 (RRa®) の使用経験 .	麻酔	62(7)	855-858	2013
中村文人, 大塚洋司, 永野達也, 五十嵐孝, 多賀直行, 竹内護	抗菌薬治療抵抗性の肺炎：呼吸不全を契機に診断された重症複合型免疫不全症の1症例 .	日本集中治療医学会雑誌	20	629-633	2013
Saitsu H, Nishimura T, Muramatsu K, Koderia H, Kumada S, Sugai K, Kasai-Yoshida E, <u>Kato M</u> , et.al.	De novo mutations in the autophagy gene <i>WDR45</i> cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood.	Nat Genet	45(4)	445-449, 449e441	2013
Takanashi J, <u>Osaka H</u> , Saitsu H, Sasaki M, Mori H, Shibayama H, Tanaka M, et al.	Different patterns of hypomyelination and cerebellar abnormality between POLR3A and POLR3B mutations.	Brain Dev	36	259-63	2014
Ravenscroft G, Miyatake S, Lehtokari VL, Todd EJ, Saitsu H, <u>Osaka H</u> , Laing NG, et al.	Mutations in KLHL40 Are a Frequent Cause of Severe Autosomal-Recessive Nemaline Myopathy.	Am J Hum Genet	93	6-18	2013

Anselm I, Azzouz H, Bratkovic D, de Brouwer A, Hamel B, Osaka H, Salomons	Phenotype and genotype in 101 males with X-linked creatine transporter deficiency.	J Med Genet	50	463-472	2013
Mitani T, Aida N, Tomiyasu M, Wada T, Osaka H.	Transient ischemic attack-like episodes without stroke-like lesions in MELAS.	Pediatr Radiol	43	1400-1403	2013
Kato H, Miyake F, Shimbo H, Ohya M, Sugawara H, Aida N, Anzai R, Takagi M, Okuda M, Takano K, Osaka H, et al.	Urine screening for patients with developmental disabilities detected a patient with creatine transporter deficiency due to a novel missense mutation in SLC6A8.	Brain Dev	in press		
Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, Saito H, et al.	Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome.	Neurology	81	992-998	2013
Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Osaka H, et al.	De Novo Mutations in GNAO1, Encoding a Galphao Subunit of Heterotrimeric G Proteins, Cause Epileptic Encephalopathy.	Am J Hum Genet	93	496-505	2013
Imagawa E, Osaka H, Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Sugie H, et al.	A hemizygous GYG2 mutation and Leigh syndrome: a possible link?	Hum Genet	133	225-34	2014
Ohba C, Osaka H, Iai M, Yamashita S, Suzuki Y, Aida N, Shimozawa N, et al.	Diagnostic utility of whole exome sequencing in patients showing cerebellar and/or vermis atrophy in childhood.	Neurogenetics	14	225-232	2013
Kodera H, Nakamura K, Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, et al.	De novo mutations in SLC35A2 encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy.	Hum Mutat.	34	1708-1714	2013
Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, Osaka H.	A Three-Year-Old Boy With Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome Presenting With Episodic Ataxia.	Pediatr Neurol	50	99-100	2014
Matsufuji M, Osaka H, Gotoh L, Shimbo H, Takashima S, Inoue K.	Partial PLP1 Deletion Causing X-Linked Dominant Spastic Paraplegia Type 2.	Pediatr Neurol.	49	477-481	2013
Akiyama T, Osaka H, Shimbo H, Nakajiri T, Kobayashi K, Oka M, Endoh F, Yoshinaga H.	A Japanese Adult Case of Guanidinoacetate Methyltransferase Deficiency.	JIMD Rep.	12	65-9	2014
Abe J, Nakamura K, Nishikomori R, Kato M, Mitsuiki N, Osaka H, Ohya T, Ninomiya S, Fujikawa S,	A nationwide survey of Aicardi-Goutieres syndrome patients identifies a strong association between dominant TREX1 mutations and chilblain	Rheumatology (Oxford)	53	448-58	2014

Okabe T, Aida N, Niwa T, Nozawa K, Shibasaki J, Osaka H.	Early magnetic resonance detection of cortical necrosis and acute network injury associated with neonatal and infantile cerebral infarction.	Pediatr Radiol.	53	448-58	2014
Wada T, Haddad MR, Yi L, Murakami T, Sasaki A, Shimbo H, Kodama H, Osaka H, Kaler SG.	A Novel Two-Nucleotide Deletion in the ATP7A Gene Associated With Delayed Infantile Onset of Menkes Disease.	Pediatr Neurol.	50	417-20	2014