

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 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 山形 崇倫

平成 27 (2015) 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

(添付資料)「AADC欠損症に対する遺伝子治療臨床研究」班会議

プログラム ----- 11

II . 分担研究報告

1 . AADC欠損症に対する遺伝子治療に関する研究 ----- 12

- 小児に対する定位的脳手術法の改良

中嶋 剛

2 . AADC欠損症遺伝子治療における周術期管理態勢構築に関する研究 ----- 14

竹内 護、多賀 直行

3 . 遺伝子治療患児における治療前後の社会的認知機能評価に関する研究

渡辺 英寿、平井 真洋 ----- 16

4 . AADC欠損症の血清酵素学的診断 ----- 18

小坂 仁、青木 志保、牛島 健太郎、藤村 昭夫、山形 崇倫

5 . AADC欠損症の遺伝子診断 ----- 23

加藤 光広、久保田 哲夫

6 . AADC欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究 ----- 26

-血管内投与型AAVベクターの開発と応用

村松 慎一

7 . アデノ随伴ウイルスによる小児期遺伝性疾患治療 ----- 29

~ 適応疾患拡大を目指して ~

小坂 仁、中村 幸恵、青木 志保、村松 慎一、山形 崇倫

8 . アデノ随伴ウイルスベクターに対する中和抗体と ----- 32

遺伝子治療への影響に関する検討

水上浩明

III . 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 35

IV . 研究成果の刊行物・別刷 ----- 36

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、より効率がよ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、徐々に運動発達を得られ、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歳女児の兄妹例、（症例4）4歳女児の4例である。（症例5）1歳男児が新たに診断され、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。

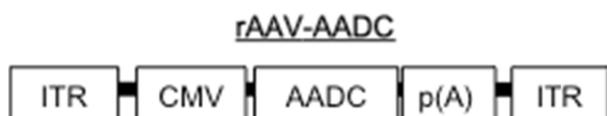


図 1 rAAV-AADC の構造

AAV2 由来の塩基配列は両端の inverted terminal repeat (ITR) 以外を除去。cytomegalovirus 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ろ紙血の、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 (synI) 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。

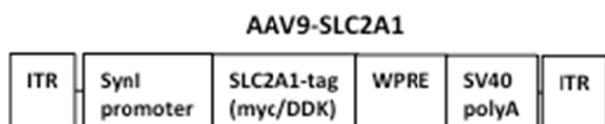


図2 AAV9-SLC2A1 の構造

AAV2 由来の塩基配列は両端の inverted terminal repeat (ITR) 以外を除去。synapsin I promoter (SynI 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)

「AACDC 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

「AACDC 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. hAACDC 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

AADC欠損症に対する遺伝子治療に関する研究
小児に対する定位的脳手術法の改良

研究分担者 中嶋 剛（自治医科大学 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。
定位的脳手術装置用の治具および刺入針先端位置確認用インジケータを設計、製作しその精度を検証した。

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高精度定位的脳手術法（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および刺入針先端位置確認用インジケータを設計、製作しその精度を検証する。

（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および刺入針先端位置確認用インジケータを他疾患に対する実際の定位的脳手術に適用したところ有意に精度の向上に寄与することを確認できた。

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。今回、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、先端位置を確実な可視化に成功した。さらに実際の定位的脳手術において使用し精度の向上に有用であることが確認できた。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と考えられる。

E．結論

遺伝子治療の実施に必要な高精度定位的脳手術フレーム用治具および刺入針先端位置確認用インジケータの設計と製作を終えた。

F．健康危険情報

特記すべきことなし。

G．研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

従来型非充電式IPGから充電式IPGへの交換には工夫を要する, 関東機能的脳外科カンファレンス, 2014年4月 東京

3Dプリンターによる駒井式定位置脳手術装置の再興, 脳神経外科手術と機器学会, 2014年4月 福岡

高齢者の難治性振戦に対する外科的治療の在り方, 老年脳神経外科学会, 2014年4月 新潟

Avantage of axillary skin incision for implantation of deep brain stimulator. The XXIst Congress of the European Society for Stereotactic and Functional Neurosurgery, September 2014 Netherlands

Accuracy control of stereotactic surgery (invited lecture). Noble Art of Lesioning, November 2014 Tokyo

遺伝性痙性対麻痺に対するバクロフェン持続髄注治療の長期的意義, 日本定位機能神経外科学会総会, 2015年1月 東京

パーキンソン病に対するSTN DBS治療 –治療10

年以上経過した自験26症例からみえてくるもの、
日本定位機能神経外科学会総会, 2015年1月 東京

脳卒中後疼痛に対する脊髄刺激治療の工夫 -より
高い治療効果を目指した電極配置-, 日本定位
機能神経外科学会総会, 2015年1月 東京

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 欠損症遺伝子治療における周術期管理態勢構築に関する研究

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 欠損症に対する遺伝子治療を実施する上で必要な周術期管理について、台湾および自治医科大学で実施された遺伝子治療の結果と文献を基に問題点を検討し、周術期管理態勢の構築について検討した。

A．研究目的

AADC 欠損症に対する遺伝子治療臨床研究では、患者被殻への遺伝子導入の定位脳手術において全身麻酔が必須である。また遺伝子治療の周術期には、MRI など検査時の全身麻酔や、集中治療室での術後全身管理が必要とされ、患者の安全を確保すると共に、ウィルスベクター拡散防止対策などを含んだ周術期全身管理態勢の構築が必要である。

B．研究方法

台湾で行われた AADC 欠損症に対する遺伝子治療の情報と、自治医科大学で実施されたパーキンソン病の遺伝子治療臨床研究報告書、および他施設で実施された遺伝子治療に関する論文などの出版物から周術期管理上の問題点を抽出し、自治医科大学での遺伝子治療実施に向けた周術期管理態勢の構築を検討した。

（倫理面への配慮）

総括報告書参照。

C．研究結果

（1）患者の状態に起因する問題点

自律神経系・交感神経系の異常に起因するものとして、無呼吸発作、気道分泌物過多、嚥下障害による誤嚥性肺炎、低血糖、体温調節異常、徐脈、低血圧、カテコラミン類に対する異常反応、循環血液量変動に対する代償反

応の欠落などが周術期の問題点として指摘された。

（2）麻酔管理上の問題点

循環動態の不安定な小児に対する定位脳手術であることが、全身麻酔に伴う技術的な問題点として指摘された。また、経過観察のための MRI 撮影などにも全身麻酔が必要とされるため、手術室外で全身麻酔管理を行う必要があることも麻酔管理上の問題点として指摘された。

（3）術後管理上の問題点

ウィルスベクター拡散防止のために、術後は PICU 陰圧室で管理を行う。ベクター排出がないことが確認されるまでガウンテクニックなどを厳密に行い、環境汚染などに注意する必要がある。また、術後の無呼吸発作は過去にも指摘されており、発作の程度にもよるが、術後に積極的な呼吸管理を必要とする可能性も指摘されている。さらに、術後の創部痛に対する鎮痛処置と安静を保つための鎮静の必要性が指摘された。

D．考察

AADC 欠損症患者の周術期管理において、担当チームが留意しなくてはならないことは、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。周術期には十分なモニタリングを行い、適切な管理を行う必要がある。

また、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。

E. 結論

AADC 欠損症患者の周術期管理の問題点について検討し、個々の問題点を明らかにするとともにその対策を検討した。AADC 欠損症患者の周術期管理態勢は、患者の術前状態に基づき呼吸循環管理計画と呼吸循環モニタリング、術中および術後使用薬剤の選択を中心に構築するべきであると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
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

遺伝子治療患児における治療前後の社会的認知機能評価に関する研究

研究分担者 渡辺英寿 自治医科大学 脳外科学 教授

研究協力者 平井真洋 自治医科大学先端医療技術開発センター 脳機能研究部門 准教授

研究要旨

遺伝子治療に伴う患児の社会的認知機能を評価するための眼球計測システムならびに検査課題の開発を行い、治療前後の社会認知機能評価手法を確立する。

A.研究目的

遺伝子治療の前後遺伝子治療による、患児の認知機能、特に社会的認知の変化を言語によらない、患児の「目の動き」のみから評価するシステムの構築と検査課題を確立する。これにより、遺伝子治療に伴う認知機能の変化を定量的に評価する。

B.研究方法

非侵襲的にかつ簡便に患児の眼球運動を計測可能なアイトラッキングシステムを用いることにより、ベッドサイドで定量的に認知機能を評価することを目指す。アイトラッキングシステムは、トビー社製（スウェーデン）のX2-60を用い、4つの社会的認知課題を実施する予定であり、現時点において課題を作成している。

1. 顔認知課題

正立顔と倒立顔を呈示した際に、どちらに視線が向き、どの程度注視するかを定量的に評価する。

2. 顔検出課題

Riby ら(2008)の実験に基づき、風景の中に埋め込まれた顔刺激に気づき、どのくらい早く顔を検出し、かつどの程度注視するかを定量的に評価する。

3. 視点取得課題

他者の見ている景色と自分の見ている景色は異なることを理解できるかを、最初のサッケードがどちらに向かうかを指標として、定量評価する。

4. 注意の解放課題

中心に呈示された刺激の後に周辺に呈示される刺激をどの程度の遅れを持って見るかを、サッケード潜時により評価する。これにより、患児の注意機能の評価と、周辺視へ呈示される顔といった社会刺激への選好を評価する。

いずれの課題も乳児、児童を対象とした先行研究により確立している実験パラダイムを用いることにより、患児の社会的認知機能を評価する。

（倫理面への配慮）

本研究で用いるアイトラッキングシステムは、非侵襲であり、これまで世界中で乳児・児童、定型発達・非定型発達児を対象とした研究に用いられている。このため、危険性は全くなく、簡便に患児の認知機能を評価することが可能である。

C.研究成果

現時点における予備的な結果として、患児の認知機能を臨床の現場、特にベッドサイドで使用可能なアイトラッキングシステムを構築し、遺伝子治療前後においてどのように変化するか、経時的な変化を追うためのシステムを構築した。現時点において、定型発達児を対象とした研究を進めており、今後、遺伝子治療の対象となる患児で評価を実施する。

D.考察

治療に伴う評価のうち，一つの重要な項目として，社会的コミュニケーション能力がどのように治療前後で変化するかを明らかにする必要がある．病棟という制約，肢体が不自由な患者を対象とした条件で，簡便かつ頑健に認知機能を評価可能な眼球運動計測システムを用いることにより，その認知機能の評価を試みる．

E. 結論

遺伝子治療の前後の患児の社会認知機能を評価するシステムを構築した．今後，実際の治療前後に伴う評価として用いる．

F. 健康危険情報

該当なし．

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hashimoto N, Toyomaki A, **Hirai M**, Miyamoto T, Narita H, Okubo R, Kusumi I. (2014) Absent activation in MPFC and TPJ but not STS during the perception of biological motion in schizophrenia: A functional MRI study, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 10: 2221–2230.

2) **Hirai M**, Gunji A, Inoue Y, Kita Y, Hayashi T, Nishimaki K, Nakamura M, Kakigi R, Inagaki M. (2014) Differential electrophysiological responses to biological motion in children and adults with and without autism spectrum disorders. *Research in Autism Spectrum Disorders* 8:1623-1634.

3) **平井真洋**. (2014) 身体・身体運動に埋め込まれた感情情報処理の神経基盤. *心理学評論* 57(1):140-150.

1) **平井真洋**. (2014) 日本薬物脳波学会（若手研究最前線），長泉山荘, 2014年6月13日.

2) **平井真洋**. (2014) 認知科学会サマースクール（若手研究者プレゼンテーション）. 箱根湯本富士屋ホテル, 2014年9月2日.

3) **Hirai M**. (2014) “Embodied cognition from the inside out in atypical development”. Birkbeck college, Center for Brain and Cognitive Development, University of London. July 23, 2014.

4) **Hirai M**. (2014) “Hierarchical processing of biological motion and its development”. Birkbeck college, University of London. Sep 5, 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

2. 学会発表

AADC 欠損症の血清酵素学的診断

研究分担者 小坂 仁 自治医科大学医学部 小児科学 教授
研究協力者 青木志保¹、牛島健太郎²、藤村昭夫²、山形崇倫¹
¹自治医科大学小児科学、²臨床薬理学

研究要旨

芳香族 L アミノ酸脱炭酸酵素欠損症；AADC 欠損症は、本邦においては 4 例診断されているのみであり、診断のついていない症例が多いものと考えられる。早期診断法確立のため、血清を用いた酵素診断の確立を目指し、酵素活性測定系を立ち上げた。これにより血清を用いた、国内における診断を目的とした酵素活性測定が可能となった。今後は、更にハイスルーブットな一次スクリーニングの解析系の開発を進め、遺伝子検索と合わせ、早期診断のシステムの確立を進める。

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)欠損症に対する、遺伝子治療臨床研究を進めている。AADC は L- DOPA から Dopamine、および

5-Hydroxy Tryptophan(5HTP) から Serotonin への 5-hydroxy indolacetic acid (HIAA) の脱炭酸化に関わる酵素であり、モノアミン代謝、プテリジン代謝の最終経路に関わる（図 1）Dopamine 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。本症では髄液中で、Dopamine の前駆体の L-dopa およびその代謝物である 3-O-methyldopa(MD)、Serotonin の前駆体である 5-HTP が著増するとともに Dopamine の代謝物である Homovalinic acid (HVA)および Norepinephrine の代謝物である 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (PHPG) および Serotonin の代謝物である 5-HIAA の減少により診断し、遺伝子診断ないし酵素活性測定により確定する。これらの化合物のうち国内で測定可能なのは、L-dopa、HVA、PHPG、5-HIAA であり

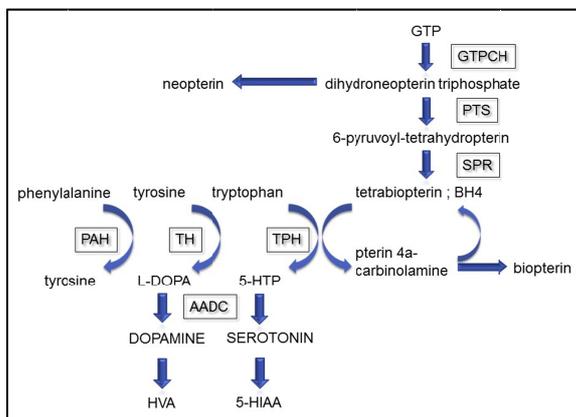


図 1 モノアミン・プテリジン代謝経路
AADC はこれらの系の最終経路にあたる

5-HTP, 3-O-MD は測定できない。また酵素活性の測定は、組織から蛋白抽出後に、活性を測定する研究レベルでの解析がなされているに過ぎない(図2 (Ichinose et al., Anal Biochem 1985)。今回血清を用いた、より簡便な酵素活性測定 (Verbeek et al., MGM 2006)を行い、我々が経験した AADC 患者の血液を用い、AADC 活性を測定した。

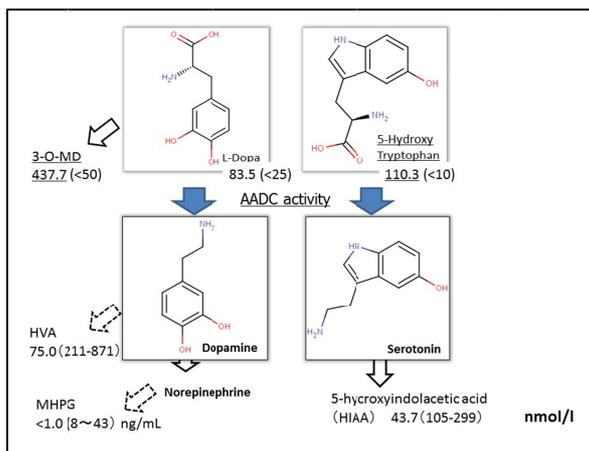


図2 本症例の化合物プロフィール
(下線部は測定を国外に依頼)

B. 対象・方法(概要)

対象; 4才女児。ADDC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)を認めている。報告されて

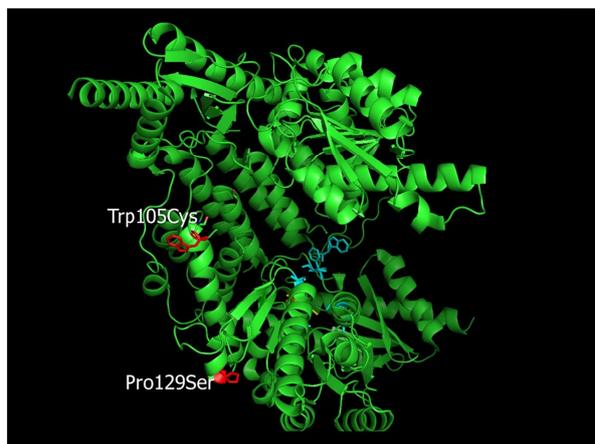


図3 本症例に認めたアミノ酸変異。中心部の側鎖を示すアミノ酸が酵素活性中心部位

いる、結晶構造(Giardina et al., PNAS 2011)からは、変異アミノ酸は活性中心から離れており、活性に大きな影響をあたえることは考えにくい(図3)。髄液中モノアミン値は、L-DOPA 83.5(正常値<25 nmol/l)、3-O-MD437.7(<50)、5-HTP110.3(<10)と著増し、5-HIAA; 43.7(105-299)、HVA; 75.0(211-871)と減少しており、AADC活性低下に合致している。また血漿中AADC酵素活性値測定は、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、診断が確定している。患者より、同意を得た後、2ml採血し血液を分離し活性測定に用いた。

方法; 血清 150 μl に 0.7mM Pyridoxal-5-phosphate 150 μl と 167mM Phosphate buffer (pH7.0) 900 μl を混合し、37℃で2時間インキュベートし基質として

20mM L-dopa 300 μl を加えた。37℃で2時間インキュベートし Perchloric acid 120 μl を加え反応を停止し、内部コントロールとして 100ng/ml DHBA(internal standard) を 100 μl 加え、3500rpmにて5分間遠心し、カテコラミン抽出キット(Thermo Fisher Scientific Inc、MA)を用い、カテコラミンを抽出し、Acclaim 120 C18 Reversed-Phase LC Column (4.6X150mm) を接続した HPLC (日本分光、LC-2000) を用い、電気化学検出器(Thermo Fisher Scientific Inc、Couochem II)にて検出し、DHBAを内部標準として正常コントロールに対する比として算出した。

(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。

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。

C. 結果

AADC 活性患者/正常対照は 0.242 ± 0.061 (Mean+SEM) となり、ほぼ正常活性の24%低下を確認できた。

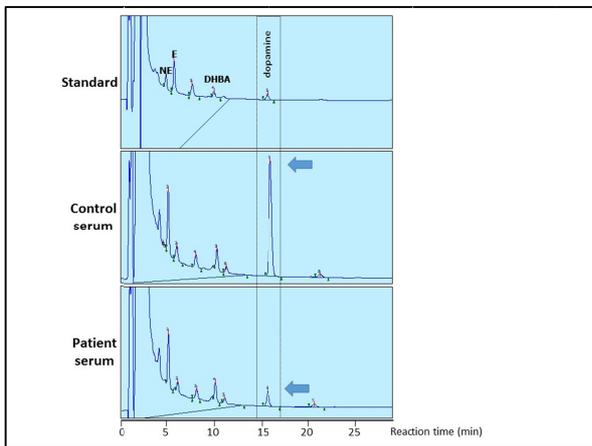


図4 血漿中の AADC による L-DOPA の Dopamine への分解。 が Dopamine に対応するピークであり、面積比(患者/正常コントロール)が非活性を示す。

E, Epinephrine; NE, Norepinephrine; DHBA, 3,4-dihydroxybenzylaminehydrobromine

D. 考察

現在 AADC 欠損症は臨床症状で疑われ、一部の髄液化合物検査と、AADC 遺伝子検査にて行われているが、遺伝子変異が証明されない例が存在するため、これらの症例に対して酵素活性測定による確定診断が重要である。また機能的評価としての酵素活性診断は、重症度、予後、治療選択に需要である。今回国内における、血清を用いた AADC 活性測定の系を立ち上げることができた。

E. 結論および今後の展開

AADC 欠損症患者の、示す症状は非特異的であり、今後遺伝子治療を標準治療と確立するためには、平行して早期診断のシステムを整える必要がある。エクソームシーケンスにより、診断される症例が今後も拡大する可能性はあるが、費用的にも高額なため当面は限られた症例となると考えられる。発達遅滞や、低緊張のような、比較的高頻度に認められる症状に対して、一次スクリーニングを行い、それらの中で可能性が高い症例に関して、二次スクリーニングとして、遺伝子検査や今回確立した AADC の酵素活性は確定診断に重症度予測、薬物治療と遺伝子治療の選択に有効である。また 3-O-MD は髄液のみならず、血漿中でも増加しており、質量分析計を用いたスクリーニングの報告があり、国内での整備が待たれる。この検査法はハイスループット化が可能であり (Chen et al., CCA, 2014)、一次スクリーニングに適しており、次年度の課題である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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 2014; 133: 225-34

2) 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.* 2014; 12: 65-9

3) 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; 50: 417-20

4) Shimbo H, Takagi M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Aida N, Osaka H. A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. *Mol Genet Metab Report*, 2014; 1:133-138.

5) 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.* 2014;50:99-100.

6) Nakashima M, Takano K, Osaka H, Aida N, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Causative novel PNKP mutations and concomitant PCDH15 mutations in a patient with microcephaly with early-onset seizures and developmental delay syndrome and hearing loss. *J Hum Genet.* 2014;59:471-4.

7) Miyatake S, Osaka H, Shiina M, Sasaki M, Takanashi J, Haginoya K, Wada T, Morimoto M, Ando N, Ikuta Y, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Ogata K, Matsumoto N, Saitsu H. Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating

leukoencephalopathies. *Neurology.* 2014;82:2230-7.

8) Kato M, Saitsu H, Murakami Y, Kikuchi K, Watanabe S, Iai M, Miya K, Matsuura R, Takayama R, Ohba C, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hamano S, Osaka H, Hayasaka K, Kinoshita T, Matsumoto N. PIGA mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. *Neurology.* 2014;82:1587-96.

9) van de Kamp J, Errami A, Howidi M, Anselm I, Winter S, Phalin-Roque J, Osaka H, van Dooren S, Mancini G, Steinberg S, Salomons G. Genotype-phenotype correlation of contiguous gene deletions of SLC6A8, BCAP31 and ABCD1. *Clin Genet* in press.

10) Numata Y, Gotoh L, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi J, Deguchi K, Yamamoto T, Osaka H, Inoue K. Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies. *J Neurol.* 2014;261:752-8.

11) Nakamura K, Osaka H, Murakami Y, Anzai R, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kinoshita T, Matsumoto N, Saitsu H. PIGO mutations in intractable epilepsy and severe developmental delay with mild elevation of alkaline phosphatase levels. *Epilepsia.* 2014;55:e13-7.

12) Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H. Involvement of ER Stress in Dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1

Missense Mutations Shown by iPSC-Derived Oligodendrocytes. Stem Cell Reports. 2014;2:648-61.

13) Tamaura M, Shimbo H, Iai M, Yamashita S, Osaka H. Seizure recurrence following pyridoxine withdrawal in a patient with pyridoxine-dependent epilepsy. Brain Dev. In press.

14) Kodera H, Osaka H, Iai M, Aida N, Yamashita A, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Mutations in the glutamyl-tRNA synthetase gene cause early-onset epileptic encephalopathy. J Hum Genet. In press.

15) Takano K, Tsuyusaki Y, Sato M, Takagi M, Anzai R, Okuda M, Iai M, Yamashita S, Okabe T, Aida N, Tsurusaki Y, Saitsu H, Matsumoto N, Osaka H. A Japanese girl with an early-infantile onset vanishing white matter disease resembling Creeleukoencephalopathy. Brain Dev. In press.

16) Niwa T, Aida N, Osaka H, Wada T, Saitsu H, Imai Y. Intracranial Hemorrhage and Tortuosity of Veins Detected on Susceptibility-weighted Imaging of a Child with a Type IV Collagen 1 Mutation and Schizencephaly. Magn Reson Med Sci. in press.

2. 学会発表

1) Osaka H, Shimbo H, Murayama K, Ohtake A, Noriko Aida N. A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. Mitochondrial Medicine 2014: Pittsburgh, PA June 4-7, 2014.

1) 安西里恵, 佐藤睦美, 高木真理子,

奥田美津子, 露崎悠, 高野亨子, 井合瑞江, 中村和幸, 才津浩智, 小坂仁, 山下純正: 重度精神遅滞, 難治性てんかんの臨床像を示し, PIGO 遺伝子変異が同定された 1 例. 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松

2) Osaka H, Tsuyusaka Y, Iai M, Yamashita S, Shimozawa N, Eto Y, Hiroto Saitsu H: Whole exome sequencing reveals molecular basis of childhood cerebellar atrophy. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松

3) Nakamura S, Osaka H, Muramatsu S, Aoki S, Jimbo EF, Yamagata T.: Mutational and functional analysis of Glucose transporter 1 deficiency syndrome. 第 64 回アメリカ人類遺伝学会 2014.10.18-22 サンディエゴ

4) 露崎悠, 井合瑞江, 安西里恵, 佐藤睦美, 高木真理子, 奥田美津子, 高野亨子, 小坂仁, 山下純正, 才津浩智: 治療可能な小脳失調: Cerebral Folate Transport Deficiency の同胞例. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松

5) 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. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松

H. 知的所有権の取得状況

なし。

AADC 欠損症の遺伝子診断

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
研究協力者 久保田 哲夫 安城更生病院 小児科

研究要旨

AADC 欠損症は眼球回転発作とジストニア発作が特徴的であり臨床的に疑うことができるが、診断には特殊な髄液検査と遺伝子解析が必要であり、国内における AADC 欠損症診断例は 3 家系 4 例のみであった。乳児期から臨床的に AADC 欠損症が疑われ、遺伝子解析で DDC の変異を認め、国内 5 例目となる AADC 欠損症を新たに診断した。症例は 1 歳、男児。生後 3 か月から眼球偏位とジストニア発作をきたし、生後 9 か月に髄液検査で 5-HIAA, HVA, MHPG の低下、L-DOPA の上昇を認めた。Sanger 法による遺伝子解析の結果、複合ヘテロ接合性ミスセンス変異(p.Tyr79Cys, p.Asp252Gly)を認めた。AADC 欠損症の確定診断には DDC 全領域の解析が必要であり、特徴的な臨床症状を周知する必要がある。

A．研究目的

AADC 欠損症は、DDC 遺伝子変異による常染色体劣性遺伝の先天性代謝異常症であり、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 Aromatic amino acid decarboxylase (AADC) の機能低下が原因である。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、睡眠障害など難治性の多様な神経症状をきたし、多くは重度の発達障害を示し、座位も不能なことが多い。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。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、通常的一般検査では診断されないため国内での確定診断例はこれまでのところ 3 家系 4 例のみであった。今回、ジストニア発作と異常眼球運動を契機に AADC 欠損症が疑われ、髄液検査と遺伝子解析で国内 5 例目となる AADC 欠損症の確定診断を行ったので報告する。

B．研究方法

症例：1 歳男児。血族婚ではない健康両親の第一子。在胎 37 週 5 日帝王切開で出生。仮死なし。出生時体重 2006 g、身長 45.5 cm、頭囲 32.0 cm。生後 3 か月から異常眼球運動(眼球偏位)が出現。易刺激性が強く、刺激後に四肢・体幹を過伸展させるジストニア発作が 1-4 時間持続し、左右差を認めることもあった。脳波は発作間欠期には背景活動は正常で、てんかん性異常波は認められず、ジストニア発作時には左後頭から 9-11Hz の波形が持続した。頭部 MRI にも明らかな異常は認められなかった。当初、非定型的ながらも小児交互性片麻痺やびっくり病/過剰驚愕症が疑われたが、クロナゼパムとクロバザムは無効だった。しいに異常眼球運動が目立ちはじめ、AADC 欠損症が疑われ、生後 9 か月の髄液検査では、5-HIAA <1.0 ng/ml (21.8-64.2), HVA 1.4 ng/ml (53.7-169.8), MHPG <1.0 ng/ml (9.4-20.6), L-DOPA 32.0 ng/ml (<2.0) と特徴的变化を示し、AADC 欠損症と臨床的に診断された。生後 10 か月の身長は 72.0 cm、体重 7.9 kg、頭囲 42.5 cm で胸腹部に異常を認めず、外表奇形もなかった。1 歳でも追視・固視はなく、未頸定で寝返りも不能であり、数日に 1 回のジストニア発作を繰り返す。

遺伝子解析：両親の同意を得て、患児および両親から採血し、ゲノム DNA を抽出した。DDC 遺伝子のエクソ

ン2からエクソン14までの全コード領域と近傍イントロンをPCRで増幅後にサンガー法による直接塩基配列解析を行ない、野生型と比較した。変異を認めたエクソンについては、両親の解析を追加し由来を確認した。同定された変異については、HGVS (<http://www.hgvs.org>)で過去の報告の有無を、PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)とSIFT (<http://sift.jcvi.org>)で病原性の程度を確認した。

(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)保護者から同意を得た。

C. 研究結果

DDC遺伝子に複合ヘテロ接合性ミスセンス変異(c.236A>G in exon 3, p.Tyr79Cys; c.755A>G in exon 7, p.Asp252Gly)を認めた。c.236A>Gは父由来、c.755A>Gは母由来であった。両変異ともHGVSに登録はなく、PolyPhen-2ではprobably damaging、SIFTではdamagingの判定であり、病的変異と考えられた。

D. 考察

AADC欠損症の確定診断は従来AADC酵素活性の測定によりなされてきたが、近年ではAADCをコードするDDC遺伝子の変異解析によって行われることが増えている。本例でも酵素活性の測定は行われていないが、眼球変異やジストニア発作などの臨床症状と髄液モノアミン代謝物のAADC欠損症に特異的な測定値に加え、DDC遺伝子にそれぞれ父および母由来の病的変異と考えられる2つのミスセンス変異を認めたことから、AADC欠損症と確定診断された。AADC欠損症の患者数が多い台湾では創始者効果によって1VS6+4A>T変異が患者の80%以上のアレルに認められるが、それ以外はAADC欠損症の変異好発部位はなく全エクソンに分布している。今回の症例でも両親の変異は異なっており、AADC欠損症の変異スクリーニングにおいては全エクソンの解析が必要である。

AADC欠損症の臨床症状には症例ごとに変化がみられるが、眼球偏位もしくは眼球回転発作 oculogyric crisisと、ジストニアなどの運動障害は全例に認められる。今回の症例においても発症早期から眼球偏位とジストニア発作が認められており、早期診断の重要な臨床徴候である。今回の症例では主治医がAADC欠損症

の特徴的な臨床症状を知っていたために、非常に早い時期からAADC欠損症が疑われ、髄液検査が行われ、遺伝子解析の依頼がなされた。AADC欠損症の頻度は未だ少ないが、特殊な髄液検査を必要とする診断の困難さから見かけ上の患者数が少ないだけで、潜在的な患者数はより多いと考えられる。近年、GC-MS法を用いて尿中のVMAと3-o-methyl dopaを組み合わせたAADC欠損症の非侵襲的診断方法や、原因不明の発達遅滞例における全エクソーム解析による診断がなされているが、それらが実用化されるまでは、AADC欠損症自体の啓蒙活動が早期発見に最も重要である。

E. 結論

国内5例目となるAADC欠損症の遺伝子診断を行ない、両アレルとも未報告の変異であった。AADC欠損症の確定診断にはDDC全領域の解析が必要であり、特徴的な臨床症状を周知する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kato M, Saitsu H, Murakami Y, Kikuchi K, Watanabe S, Iai M, Miya K, Matsuura R, Takayama R, Ohba C, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hamano S, Osaka H, Hayasaka K, Kinoshita T, Matsumoto N: *PIGA* mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. *Neurology* 2014;82(18):1587-1596

2. 学会発表

1) Jun Tohyama, Noriyuki Akasaka, Yu Kobayashi, Shinichi Magara, Hideshi Kawashima, Mitsuhiro Kato, Naomichi Matsumoto, Hiroto Saitsu: Genetic analysis in infantile epileptic encephalopathies with movement disorder: a single center study. 11th European Congress on Epileptology: Stockholm, Sweden; 2014年6月-7月

2) 加藤光広: 次世代シーケンス技術を用いた小児神経稀少難病研究の現状と今後. 第117回日本小児科学会学術集会, 名古屋; 2014年4月

3) Kazuyuki Nakamura, Mitsuhiro Kato, Hideki Hoshino, Hiroshi Terashima, Hitoshi Osaka, Shinichi Nakamura, Jun Tohyama, Takashi Shiihara, Masaya Kubota, Kiyoshi Hayasaka, Hiroto Saitsu: De novo mutations in *GNAO1* cause epileptic encephalopathy and involuntary movement. (English session) 第56回日本小児神経学会総会, 浜松

2013年5月

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
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 6.2×10^{12} - 1.2×10^{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

アデノ随伴ウイルスによる小児期遺伝性疾患治療

～ 適応疾患拡大を目指して～

研究分担者 小坂 仁 自治医科大学医学部 小児科学 教授

研究協力者 中村幸恵¹、青木志保¹、村松慎一²、山形崇倫¹

¹自治医科大学小児科学、²神経内科学

研究要旨

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 治療対象を拡大するためグルコーストランスポーター1 型欠損症（GLUT1DS）の治療研究を行い、*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、糖取込試験では、細胞内糖取り込みが上昇し、取り込み能と重症度との間に相関関係を認め、糖輸送評価系を確立した。また 9 型 AAV- SLC2A1 ベクターを作製し、Glut1 (+/-)への腹腔内投与を行い、脳内での SLC2A1 蛋白発現を確認した。小児期遺伝性神経疾患は、それぞれの症例数は 100 例前後と希少で種類が多い疾患からなり、Glut1 欠損症を初めとする膜蛋白（トランスポーター、受容体等）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

近年の次世代シーケンス解析等により、遺伝子診断される小児遺伝性神経疾患例が飛躍的に増えてきている。しかしながら原因が判明しても大多数の疾患には対症療法のみしか存在せず、根本的治療は確立されていない。小児遺伝性神経疾患は、対象患者は数百人からなる数百種の“希少性難病”より構成されている。これらの希少難病は、劣性遺伝形式をとり、機能欠失で発症する場合が多い事にある。この点で優性遺伝形式をとり、変異による細胞毒性が年余に渡り蓄積し発症する成人発症の遺伝性疾患と比較した特徴である。これらの優性遺伝性疾患では、詳

細な病態の解明の上で細胞毒性を軽減させる治療法の開発が必要である。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、AADC 欠損症に加え、

新たな対象疾患の拡大が必要である。現在私達は、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 (Glucose transporter 1 deficiency syndrome, GLUT1DS) 治療研究を細胞レベル、動物モデルで行った。

B . 研究計画・方法 (概要)

1) ヒト培養細胞への SLC2A1 導入

HEK293 細胞 (ヒト胎児腎臓由来細胞) に SLC2A1 正常型および SLC2A1 変異体ベクター、を用いて遺伝子導入する。変異体ベクターは、ミスセンス変異の 2 種類 (A405D; 軽症、R333W; 中等症)、フレームシフト変異 1 種類 (V303fs; 重症) を作成する。それぞれの変異に対応するオリゴヌクレオチドを作成し、アニーリングの後、制限酵素反応およびライゲーションで発現ベクターに組み込む。フレームシフト変異は患者 cDNA より RT-PCR 法により合成する。作成したプラスミドをリポフェクタミン法により一過性発現させ、得られたタンパク発現確認は anti c-myc Ab. (9E10; Santa Cruz Biotechnology)、anti GLUT1 Ab. (N-terminus ; OriGene Technologies) を用いて免疫染色およびウェスタンブロットによる蛋白の検出を行う。

2) ヒト神経系培養細胞への AAV9-SLC2A1 導入

SLC2A1 遺伝子をインサート DNA として、経静脈投与で脳移行が確認されている 9 型 AAV ベクター (AAV9) に組み込む。ヒト神経系培養細胞である SH-SY5Y 細胞 1×10^5 cell に AAV9-SLC2A1 (myc-DDK タグ付) を 3×10^9 vg 感染させ免疫染色を行う。

3) Glu1(+/-)への AAV9-SLC2A1 導入

ウイルスベクターの投与経路として、経

静脈投与もしくは髄腔内/脳室内投与の比較検討をおこなう。GLUT1 は、赤血球や脳の血管内皮細胞、神経細胞に発現を認める。今回ニューロン特異的プロモーターであるシナプシン 1 プロモーターを用い神経細胞で発現効率を上げる。

生後 1 週間前後の新生児マウスは、乳幼児に対応し、脳血液関門の脆弱性があり、腹腔内投与でも薬剤が高率に脳移行するため、日齢 7 にヘテロマウス Glut1 (+/-) に AAV9-SLC2A1 1.5×10^{10} vg 腹腔内投与する。

(倫理面への配慮)

研究実施にあたって、自治医科大学遺伝子解析研究倫理委員会、自治医科大学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た。

C . 研究結果

1) ヒト培養細胞への SLC2A1 導入

一過性発現後の細胞を用いたウェスタンブロット法にて、正常型およびミスセンス変異を有する SLC2A1 の発現を確認した。免疫染色では、SLC2A1 正常型およびミスセンス変異で細胞膜近傍に myc 染色陽性を確認した。フレームシフト変異では、ウェスタンブロットティングおよび免疫染色法いずれもタンパク発現はみられず、蛋白が安定せず小胞体で分解していることが考えられた。また GLUT の細胞内の糖取込み機能を 2-デオキシグルコース (2DG) 取込試験で評価した。SLC2A1-正常型、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導入細胞の順に糖取込み能は低下しており重症度との相関を認めた。

2) ヒト神経系培養細胞への AAV9-SLC2A1 導入

AAV9-SLC2A1 を導入した SH-SY5Y 細胞

膜近傍に SLC2A1 の発現を確認した。

3) Glu1+/-1 への AAV9-SLC2A1 導入

生後 6 週で、脳組織を採取し採取した脳組織で免疫染色 (anti-GLUT1, anti-myc-tag)、ウェスタンブロット法 (anti-GLUT1, anti-myc-tag) でタンパク発現確認を行ったところ ~ 1 % の中枢神経細胞で発現を認めた。

D . 考察

SLC2A1 遺伝子導入による、糖輸送機能の獲得を、2DG 取込試験で評価する系を作成した。GLUT1DS の重症度と関連しており、GLUT1 の機能評価として適切であることが示された。また Glu1 KO マウス、Glu1(+/-) に AAV-SLC2A1-9 を腹腔内に投与したところ、脳内での発現を確認した。導入効率が低いため、今後は脳室内投与を行い、導入効率や Glu1(+/-) に認められる、失調症状、小頭症等の臨床症状の改善が認められるか観察する。

E . 結論

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、更に治療対象を拡大するため GLUT1DS を対象とした研究を行っている。小児期遺伝性神経疾患は、それぞれの症例数は 100 例前後 (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、少なく、GLUT1DS 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、GLUT1DS の治療法の確立により、多くの適応疾患 ; 膜受容体・キャリア蛋白、またライソゾーム病、ミトコンドリア病、ペルオキシゾーム病などの細胞内小器官の遺伝性神経難病への AAV 治療の応用拡大を目指すことが可能となり、結果として多くの小児遺伝性疾患患者・家

族にとって待ち望んだ根本治療を提供することになる。

F . 健康危険情報
特になし。

G . 研究発表

1 . 論文発表

1) 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.* 2014;50:99-100.

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. 第 64 回アメリカ人類遺伝学会 2014.10.18-22 サンディエゴ

H . 知的所有権の取得状況

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に対する中和抗体と遺伝子治療への影響に関する検討
研究分担者 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

研究要旨 AAVベクターを用いた遺伝子治療の効果に影響することが懸念される因子として代表的なものである、ベクターに対する中和抗体に関して検討を行った。肝臓への遺伝子導入に際しては中和抗体の有無は効果に直結したが、パーキンソン病臨床研究における中枢神経系への遺伝子導入に際しては、中和抗体は効果に影響を与えていなかった。抗体価が非常に高い場合の影響に関しては検討できておらず、この点は今後の課題といえる。また、日本人全体としては中和抗体の陽性率は約3割で、年齢による大きな違いがあり、若年層では低下する傾向が認められた。

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法の成功例が増えてきており、有効性と安全性に関する情報が蓄積してきた。一方、AAVベクターに対する中和抗体が存在する場合には、血液中への通常の投与方法では効果が得られないことが懸念されている。本研究ではこのようなベクターに対する中和抗体の問題につき検討し、遺伝子治療を確実に実施することを目的とした。

B. 研究方法

・パーキンソン病遺伝子治療臨床研究における中和抗体と治療効果の解析：2007年から本学で実施されたパーキンソン病遺伝子治療臨床研究に関して、結果を改めて解析すると共に、保存されていたサンプルを必要に応じて最新の高感度測定法を用いて再測定した。
・血友病遺伝子治療前臨床研究における中和抗体と治療効果の解析：実験対象となったサルの遺伝子導入前の中和抗体を測定し、治療効果との関連を検討した。また、医薬基盤研・霊長類医科学研究センターのカニクイザル188頭に関して中和抗体陽性率を検討した。
・日本人における中和抗体陽性率の解析：日本国内の健常者85人、血友病患者59人を対象

とした解析を行った。

（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。マウスを用いた動物実験は自治医大で実施するが、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて自治医大動物実験指針規定に沿って行った。医薬基盤研・霊長類医科学研究センターとの共同研究として実施するサルの実験では、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」および霊長類医科学研究センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。また、ヒトサンプルの取扱いに際しては非連結匿名化を行い、測定結果と本人が関連づけられないように配慮した上で実施した。

C. 研究結果

・パーキンソン病遺伝子治療臨床研究における中和抗体の解析：本臨床研究の対象となった6名の治療前の中和抗体の状況は、2名が陰性、2名が弱陽性、2名が中等度陽性であった。治療前の中和抗体の力価と治療効果の間には関連を認めなかった。また、注入後の

中和抗体は全例で陽性となっており、全例で2週間後に力価の上昇が認められ、半年後にも上昇した状態は続いていた。

・血友病遺伝子治療の前臨床研究における中和抗体と治療効果の解析：この検討では8型のベクターを末梢静脈から注入した。対象となったサルでの遺伝子導入前の中和抗体は3例で陽性、4例で陰性であった。中和抗体陰性例では全例で治療域に達する凝固第 因子濃度が得られた。一方、中和抗体陽性例では効果を認めた個体はなかった。また、医薬基盤研・霊長類医科学研究センターのカニクイザルでは、8型に対する中和抗体陽性率は71.3%であった。

・日本人における中和抗体陽性率の解析：日本国内の健常者85人、血友病患者59人を対象とした測定したところ、いずれのグループでも約3割が陽性との結果を得た。この結果を更に年齢別に検討したところ、年代が下がるにつれて陽性率が下がる傾向が認められた。

D. 考察

AAVベクターを用いる遺伝子治療に際してはさまざまな組織が標的となっており、中枢神経系への遺伝子導入には2型が好適で、神経細胞に特異性の高い効果が得られる。肝臓を標的とする場合には静脈内投与で効果が期待できる8型が最も有望と考えられている。一方で、サルでは8型に対する中和抗体の陽性率が高く、中和抗体が存在する場合には遺伝子導入に成功していない。一般に中枢神経系を標的にする場合のように組織に直接注入する際には血液中への投与に比べて中和抗体の影響は受けにくいと考えられており、今回の検討結果もこの説を支持するものである。中和抗体の力価が非常に高い場合には影響する可能性があるが、今のところ詳細は不明である。中和抗体の測定法に関しては我々も改良を加えてきており、世界的に見ても最も鋭敏な検出法として確立できたものと考えられる。日本人における陽性率に関してはこれまで検討されていなかったが、いずれの血清型においても陽性率は約3割であり、他の先進

諸国と大きな差はなかった。若年層で陽性率が低くなっている理由は明らかではないが、A型肝炎ウイルスなどでも同様の事象が認められており、公衆衛生の改善、特に下水道の整備による経口感染の減少が影響している可能性がある。今後の追跡調査が必要であるが、この傾向は遺伝子治療の効果が期待できる対象が増えることを意味しており、AAVベクターを用いた遺伝子治療を広く進めていく上で有利な知見である。

台湾で12月に行われたAADC国際シンポジウムでは台湾のAADC症例において中和抗体陽性率が極めて低いことが話題となった。台湾全体における中和抗体陽性率のデータがないので正確な議論は出来ないが、他の国々と同等と仮定すると、幼少時における同年代の子ども達からの感染の機会が少ないことが影響しているのではないかと思料される。

E. 結論

AAVを用いた遺伝子治療法に影響しうる因子として治療前の中和抗体につき検討した。肝臓に対する遺伝子治療の際には中和抗体の存在により効果の著明な減弱が認められたが、中枢神経系を対象とした場合には影響は明らかでなかった。高力価の場合には影響する可能性があることから、今後もこの点に留意しつつ、臨床への展開を進めていきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsukahara, T., Iwase, T., Kawakami, K., Iwasaki, M., Yamamoto, C., Ohmine, K., Uchibori, R., Teruya, T., Ido, H., Yasushi, S., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Nakamura, M., Brentjens, R., Ozawa, K.: The Tol2 transposon system mediates the genetic engineering of T-cells with CD19-specific chimeric antigen receptors for B-cell malignancies. **Gene Ther**, *in press*.

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**, 86:1990-7, 2014.

2. 学会発表

Mizukami, H.: “Immune responses in hemophilia gene therapy” in Symposium II, Genetic diseases. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, August 6-8, 2014.

Mizukami, H., Mimuro, J., Ohmori, T., Shima, M., Matsushita, T., Taki, M., Muto, S., Higasa, S., Sakai, M., Uchibori, R., Tsukahara, T., Urabe, M., Kume, A., Madoiwa, S., Sakata, Y., Ozawa, K.: Age-related eligibility of hemophilia gene therapy using AAV vectors. The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Osaka, Oct. 31-Nov. 2, 2014.

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

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
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	92	21-28	2015
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	123	61-69	2014
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	1	361-369	2014
Miyamoto Y, Ishikawa Y, Iegaki N, Sumi K, Fu K, Sato K, Furukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K, Nitta A	Overexpression of Shati/Nat8l, an <i>N</i> -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
Ito H, Fujita K, Tagawa K, Chen X, Homma H, Sasabe T, Shimizu J, Shimizu S, Tamura T, Muramatsu S, 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
Miyamoto Y, Iida A, Sato K, Muramatsu S, 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
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, Okazawa H	In utero gene therapy rescues microcephaly caused by Pqbp1-hypofunction in neural stem progenitor cells.	Mol Psychiatry	-	-	In press

Shimbo H, Takagi M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Aida N, Osaka H.	A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome.	Mol Genet Metab Report	1	133-138	2014
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
Miyatake S, Osaka H, Shiina M, Sasaki M, Takanashi J, Haginoya K, Wada T, Morimoto M, Ando N, Ikuta Y, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Ogata K, Matsumoto N, Saitsu H.	Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies.	Neurology	82	2230-2237	2014
Nakamura K, Osaka H, Murakami Y, Anzai R, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kinoshita T, Matsumoto N, Saitsu H.	PIGO mutations in intractable epilepsy and severe developmental delay with mild elevation of alkaline phosphatase levels.	Epilepsia	55	e13-17	2014