

Nagatsu I, Ichinose H, Nagatsu T, Kurtzman G-J, and Ozawa K: Behavioral recovery in 6-hydroxydopamine-lesioned rats by cotransduction of striatum with tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase genes using two separate adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther* 9: 2527-2535, 1998.

#### 加藤正哉

1982年 自治医科大学医学部卒業、国立仙台病院臨床研修医  
1984年 東北大学医学部附属脳疾患研究施設脳神経外科  
1989年 医学博士（東北大学）  
1990年 宮城県公立佐沼総合病院脳神経外科医長  
1991年 大原総合病院附属大原医療センター脳神経外科副部長  
1992年 東北大学医学部脳疾患研究施設脳神経外科助手  
1992年 自治医科大学脳神経外科（兼）救急医学講座助手  
1994年 自治医科大学脳神経外科（兼）救急医学講座講師  
1997年 University of New Mexico, Dept. of Neurology, MEG laboratory (fellow)  
1999年 自治医科大学脳神経外科（兼）救急医学講座講師  
2002年 自治医科大学救急医学講座助教授

加藤正哉、木村友昭、橋本勲：鼻腔電気刺激による三叉神経感覚誘発磁場。日本生体磁気学会誌 13: 186-187, 2000.

Kato S, Wang Y, Papuashvili N, and Okada Y-C: Stable synchronized high-frequency signals from the main sensory and spinal nuclei of the pig activating by A-beta fibers of the maxillary nerve innervating the snout. *Brain Res* 959: 1-10, 2003.

Kato S, Papuashvili N, Okada Y-C: Identification and functional characterization of the trigeminal ventral cervical reflex pathway in the swine. *Clin Neurophysiol* 114: 263-271, 2003.

加藤正哉、藤本健一、増澤紀男：視床下核脳深部刺激に伴う副作用とその対策。機能的脳神経外科 42(2): 62-63, 2003.

#### 久米晃啓

1984年 東北大学医学部卒業、神奈川県立こども医療センター小児科研修医  
1990年 東北大学大学院医学研究科修了、学位取得  
1990年 東北大学小児科医員  
1992年 Indiana University School of Medicine, Pediatrics, Post-doctoral fellow  
1994年 熊本大学医学部助手（免疫識別学）  
1996年 自治医科大学講師（分子生物学）  
2001年 自治医科大学助教授（遺伝子治療研究部）

Kume A, Xu R, Ueda Y, Urabe M, and Ozawa K: Long-term tracking of murine hematopoietic cells transduced

- with a bicistronic retrovirus containing CD24 and EGFP genes. *Gene Ther* 7: 1193-1199, 2000.
- Kume A, Koremoto M, Mizukami H, Okada T, Hanazono Y, Sugamura K, and Ozawa K: Selective growth advantage of wild-type lymphocytes in X-linked SCID recipients. *Bone Marrow Transplant* 30: 113-118, 2002.
- Kume A, Koremoto M, Xu R, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Hasegawa M, and Ozawa K: *In vivo* expansion of transduced murine hematopoietic cells with a selective amplifier gene. *J Gene Med* 5: 175-181, 2003.
- Mochizuki S, Mizukami H, Ogura T, Kure S, Ichinohe A, Kojima K, Matsubara Y, Kobayashi E, Okada T, Hoshika A, Ozawa K, and Kume A: Long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice. *Gene Ther* 11: 1081-1086, 2004.
- Hara T, Kume A, Hanazono Y, Mizukami H, Okada T, Tsurumi H, Moriwaki H, Ueda Y, Hasegawa M, and Ozawa K: Expansion of genetically corrected neutrophils in chronic granulomatous disease mice by cotransferring a therapeutic gene and a selective amplifier gene. *Gene Ther* 11: 1370-1377, 2004.

村松慎一

- 1983年 自治医科大学卒業  
 1991年 自治医科大学大学院卒業（医学博士）  
 1991年 自治医科大学神経内科助手  
 1992年 長野原町へき地診療所長  
 1995年 NHLBI, NIH, visiting associate  
 1997年 自治医科大学神経内科助手  
 2004年 自治医科大学神経内科講師  
 2005年 自治医科大学神経内科助教授

- Muramatsu S, Mizukami H, Young N-S, and Brown K-E: Nucleotide sequencing and generation of an infectious clone of adeno-associated virus 3. *Virology* 221: 208-217, 1996.
- Shen Y, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Fan D-S, Ogawa M, Mizukami H, Urabe M, Kume A, Nagatsu I, Urano F, Suzuki T, Ichinose H, Nagatsu T, Monahan J, Nakano I, and Ozawa K: Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* 11: 1509-1519, 2000.
- Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Shizuma N, Kawasaki K, Ono F, Shen Y, Wang L, Mizukami H, Kume A, Matsumura M, Nagatsu I, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Terao K, Nakano I, and Ozawa K: Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesis in Avigens. *Hum Gene Ther* 13: 345-354, 2002.
- Wang L, Muramatsu S, Lu Y, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Nakano I, and Ozawa K: Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Ther* 9: 381-389, 2002.

Li X-G, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Muramatsu C, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Nakano I, Ozawa K, and Muramatsu S: Viral Mediated temporally-controlled dopamine production in a rat model of Parkinson's disease. *Mol Ther* 13: 160-166, 2006.

#### 池口邦彦

1982年 筑波大学医学専門学群卒業  
1982年 自治医科大学内科研修医  
1984年 自治医科大学神経内科研修医  
1987年 自治医科大学神経内科病院助手  
1990年 自治医科大学神経内科講座助手  
1995年 医学博士 (自治医科大学)  
2001年 自治医科大学神経内科学内講師  
2004年 自治医科大学神経内科講師

Hanyu S, Ikeguchi K, Imai H, Imai N, and Yoshida M: Cerebral infarction associated with 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy') abuse. *Eur Neurol* 35: 173, 1995.

Ikeguchi K, and Kuroda A: Mianserin treatment of patients with psychosis induced by antiparkinsonian drugs. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 244: 320-324, 1995.

Ikeguchi K, and Kuroda A: Mianserin, a 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist, in the treatment of delirium: an open study. *Eur J Neurol* 1: 261-266, 1995.

Koike R, Onodera O, Tabe H, Kaneko K, Miyatake T, Iwasaki S, Nakano M, Shizuma N, Ikeguchi K, Nishizawa M, Mosser J, Sarde C-O, and Tsuji S: Partial deletions of putative adrenoleukodystrophy (ALD) gene in Japanese ALD patients. *Hum Mutat* 6: 263-267, 1995.

#### 水上浩明

1986年 防衛医科大学校卒業  
1988年 潜水医学実験隊実験部員  
1990年 防衛医科大学校第3内科  
1992年 自衛隊舞鶴病院  
1993年 Hematology Branch, NHLBI, NIH, Visiting Associate  
1995年 自衛隊横須賀病院  
1998年 自治医科大学助手 (遺伝子治療研究部)  
2004年 自治医科大学講師 (遺伝子治療研究部)

Mizukami H, Young N-S, and Brown K-E: Adeno-associated virus type 2 binds to a 150-Kilodalton cell membrane glycoprotein. *Virology* 217: 124-130, 1996.

Qiu J, Mizukami H, and Brown K-E: Adeno-associated virus 2 co-receptors? *Nat Med* 5: 467-468, 1999.

Ideno J, Mizukami H, Honda K, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Saito T, Ishibashi S, and Ozawa K: Persistent

- phenotypic correction of central diabetes insipidus using adeno-associated virus vector-expressing arginine-vasopressin in brattleboro rats. *Mol Ther* 8: 895-902, 2003.
- Iwata N, Mizukami H, Shirohani K, Takaki Y, Muramatsu S, Lu B, Gerard N-P, Gerard C, Ozawa K, and Saido T-C: Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain. *J Neurosci* 24: 991-998, 2004.
- Mizukami H, Okada T, Ogasawara Y, Matsushita T, Urabe M, Kume A, and Ozawa K: Separate control of Rep and Cap expression utilizing mutant and wild-type loxP sequences and improved packaging system for adeno-associated virus vector production. *Mol Biotechnol* 27: 7-14, 2004.

岡田尚巳

- 1991年 金沢大学医学部卒業
- 1995年 金沢大学大学院医学研究科修了、医学博士
- 1995年 富山市民病院脳神経外科
- 1996年 Clinical Gene Therapy Branch, NHGRI, NIH (Fogarty Fellow)
- 1998年 公立能登総合病院脳神経外科
- 2000年 自治医科大学医学部助手 (ウイルス学)
- 2001年 自治医科大学医学部助手 (遺伝子治療研究部)
- 2004年 自治医科大学医学部講師 (遺伝子治療研究部)

- Okada T, Nomoto T, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Ogura T, Iwata-Okada M, Uchibori R, Shimazaki K, Mizukami H, Kume A, and Ozawa K: Large-scale production of recombinant viruses using a large culture vessel with active gassing. *Hum Gene Ther* (in press)
- Okada T, Mizukami H, Urabe M, Nomoto T, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Tobita K, and Ozawa K: Development and characterization of an antisense-mediated regulation system for adeno-associated virus vector production with introduction of Cre recombinase. *Biochem Biophys Res Comm* 288: 62-68, 2001.
- Okada T, Shah M, Higginbotham J, Li Q, Wildner O, Walbridge S, Oldfield E, Blaese M, and Ramsey J: AV.TK- mediated killing of subcutaneous tumors in situ results in effective immunization against established secondary intracranial tumor deposits. *Gene Ther* 8: 1315-1322, 2001.
- Okada T, Shimazaki K, Nomoto T, Matsushita T, Mizukami H, Urabe M, Hanazono Y, Kume A, Tobita K, Ozawa K, and Kawai N: AAV mediated gene transfer for gene therapy of ischemia-induced neuronal death. *Method Enzymol* 346: 378-393, 2002.
- Okada T, Caplen N-J, Ramsey W-J, Onodera M, Shimazaki K, Nomoto T, Ajalli R, Wildner O, Morris J, Kume A, Hamada H, Blaese R-M, and Ozawa K: In situ generation of pseudotyped retroviral progeny by adenovirus-mediated transduction of tumor cells enhances the killing effect of HSV-tk suicide gene therapy *in vitro* and *in vivo*. *J Gene Med* 6: 288-299, 2004.
- Okada T, Nomoto T, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Ogura T, Iwata-Okada M, Uchibori R, Shimazaki K, Mizukami H, Kume A, and Ozawa K: Large-scale production of recombinant viruses using a large culture vessel with active gassing. *Hum Gene Ther* (in press)

#### 卜部匡司

- 1985年 自治医科大学医学部卒業、福井県立病院研修医
- 1987年 社会保険高浜病院内科医員
- 1989年 福井医科大学第二内科助手
- 1995年 自治医科大学大学院卒業（医学博士）、自治医科大学ウイルス学講座助手
- 1999年 米国NIH分子血液学教室留学
- 2004年 自治医科大学遺伝子治療研究部助手
- 2005年 自治医科大学遺伝子治療研究部講師

Surosky R-T, Urabe M, Godwin S-G, McQuiston S-A, Kurtzman GJ, Ozawa K, and Natsoulis G: Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J Virol* 71:7951-7959, 1997.

Urabe M, Hasumi Y, Kume A, Surosky R-T, Kurtzman G-J, Tobita K, and Ozawa K: Charged-to-alanine scanning mutagenesis of the N-terminal half of adeno-associated virus type 2 Rep78 protein. *J Virol* 73: 2682-2693, 1999.

Kawada T, Nakazawa M, Nakauchi S, Yamazaki K, Shimamoto R, Urabe M, Nakata J, Hemmi C, Masui F, Nakajima T, Suzuki J, Monahan J, Sato H, Masaki T, Ozawa K, and Toyoo-Oka T: Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy: amelioration of morphological findings, sarcolemmal permeability, cardiac performances, and the prognosis of TO-2 hamsters. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 901-906, 2002.

Urabe M, Ding C, and Kotin R-M: Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther* 13: 1935-43, 2002.

Urabe M, Kogure K, Kume A, Sato Y, Tobita K, and Ozawa K: Positive and negative effects of adeno-associated virus Rep on AAVS1-targeted integration. *J Gen Virol* 84: 2127-32, 2003.

Toyoo-Oka T, Kawada T, Nakata J, Xie H, Urabe M, Masui F, Ebisawa T, Tezuka A, Iwasawa K, Nakajima T, Uehara Y, Kumagai H, Kostin S, Schaper J, Nakazawa M, and Ozawa K: Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: a scheme for the progression of cardiac dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7381-7385, 2004.

#### 川上忠孝

- 1985年 自治医科大学医学部卒業
- 1985年 島根県立中央病院内科研修医
- 1987年 島後町村組合立隠岐病院内科医員
- 1988年 島前町村組合立島前診療所内科・国保知夫村診療所
- 1990年 石見町立邑南病院内科医員
- 1992年 羽須美村国保阿須那診療所
- 1994年 自治医科大学神経内科臨床助手
- 1996年 国立療養所足利病院内科医員

1998年 厚生連上都賀総合病院内科医員  
1999年 医学博士（自治医科大学）  
2000年 自治医科大学神経内科病院助手  
2004年 自治医科大学神経内科講座助手

Kawakami T, Takiyama Y, Yanaka I, Taguchi T, Tanaka Y, Nishizawa M, and Nakano I: Chronic bromvalerylurea intoxication: a case report of a dystonic posture and cerebellar ataxia due to nonsteroidal anti-inflammatory drug abuse. *Intern Med* 37: 788-791, 1998.

Kawakami T, Takiyama Y, Yoshioka T, Nishizawa M, Reid ME, Kobayashi O, Nonaka I, and Nakano I: A case of McLeod syndrome with unusually severe myopathy. *J Neurol Sci* 166: 36-39, 1999.

川上忠孝、池口邦彦、田中康文、西澤正豊、中野今治：Diltiazemにより急性にパーキンソニズムを呈した1症例。 *神経治療* 17: 57-60, 2000.

川上忠孝、中野今治：【検査計画法】神経・筋疾患編 頭痛。 *総合臨床* 51: 1090-1093, 2002.

田口朋広、川上忠孝、中野今治：【非ヘルペス性辺縁系脳炎をめぐる最近の話題(そのII)症例集】失読・失書で初発し、痙攣重積を呈するがMRI上有意の所見を認めず *epilepsia partialis continua* を残した脳炎の20歳女性例。 *神経内科* 59: 184-187, 2003.

#### 松下 卓

1989年 信州大学医学部卒業、浜松医科大学小児科研修医  
1990年 県西部浜松医療センター小児科研修医  
1991年 国立がんセンター研修医（小児科）  
1994年 浜松医科大学小児科医員  
1995年 自治医科大学分子生物学講座研究生  
1995年 University of Southern California, Dept of Urology/ Avigen, Inc.  
1999年 自治医科大学遺伝子治療研究部研究生  
2000年 ヒューマンサイエンス振興財団リサーチレジデント  
2001年 自治医科大学助手（ウイルス学）  
2003年 自治医科大学助手（分子病態治療研究センター）

松下卓、矢島周平、大平睦郎：自家骨髄移植を行った肝芽腫の治療。 *小児外科* 27: 86-92, 1995.

Hongo T, Matsushita T, Ogawa N, and Yajima S: In vitro assay results of 15 children with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia and their clinical outcomes. *Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma* II 59-64, 1996.

Matsushita T, Elliger S, Elliger C, Podsakoff G, Villarreal L, Kurtzman G-J, Iwaki Y, and Colosi P: Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* 5: 938-945, 1998.

Grimm D, Zhou S, Nakai H, Thomas C-E, Storm T-A, Fuess S, Matsushita T, Allen J, Surosky R, Lochrie M, Meuse L, McClelland A, Colosi P, and Kay M-A: Preclinical in vivo evaluation of pseudotyped adeno-associated virus vectors for liver gene therapy. *Blood* 102: 2412-2419, 2003.

Matsushita T, Okada T, Inaba T, Mizukami H, Ozawa K, and Colosi P: The adenovirus E1A and E1B19K genes provide a helper function for transfection-based adeno-associated virus vector production. J Gen Virol 85: 2209-2214, 2004.

佐藤俊彦

- 1985年 福島県立医科大学卒業、同大学放射線科入局
- 1987年 日本医科大学第一病院放射線科入局
- 1989年 獨協医科大学附属病院放射線科入局
- 1993年 鷲谷病院副院長就任、獨協医大越谷病院放射線科非常勤講師
- 1996年 有限会社ドクターネット設立
- 1997年 宇都宮セントラルクリニックを開業

佐藤俊彦：臨床家のための Clinical-PET. デジタルメデイスン社、東京、2004.

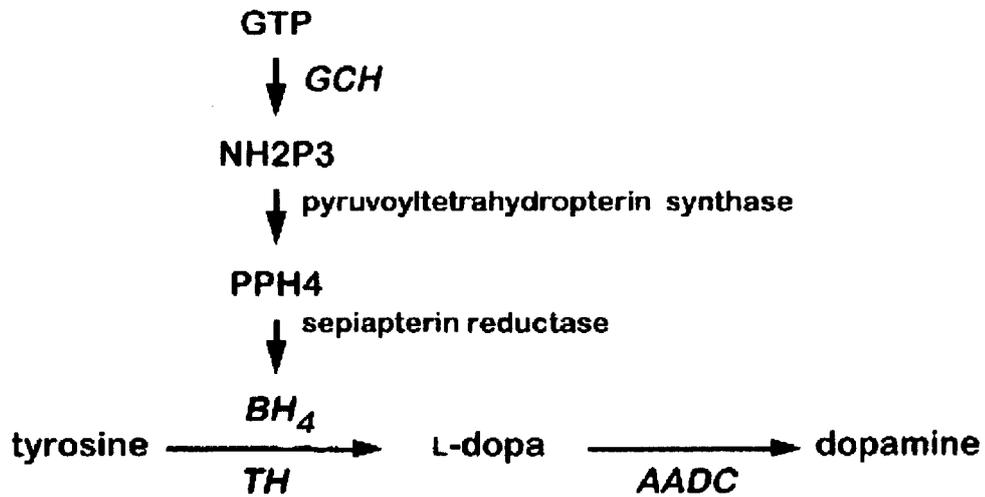
## 2 実施施設の施設設備の状況

当該遺伝子治療臨床研究は自治医科大学医学部附属病院手術室、隔離室および脳神経センター病棟で行う。本院では、手術室に定位脳手術装置を備えている。手術に用いた器具はエチレンオキサイドガス滅菌装置を用いて処理し、患者排泄物は本院が有する高圧滅菌機で処理する。また、ウイルスベクターの取扱に関しては、Avigen 社から提供された臨床用 AAV ベクターの脳内注入のための試験管分注と注射器への吸引は、指示書（資料4）にしたがい、自治医科大学附属病院「臨床用細胞プロセッシング室」（クリーンかつ P2 レベル対応）の中の安全キャビネット内（クラス 100）において、担当者が行う。

## 3 実施施設における当該遺伝子治療臨床研究に関する培養細胞、実験動物を用いた研究成果

効率よくドパミンを生合成するためには、アミノ酸のチロシンを L-dopa に変換するチロシン水酸化酵素 tyrosine hydroxylase (TH)、L-dopa をドパミンに変換する芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC)、TH の補酵素である tetrahydrobiopterine (BH<sub>4</sub>) を合成するのに必要な GTP cyclohydrolase I (GCH) の3種類の酵素が必要である (図 1)。

図1: ドパミンの生合成経路



TH, Tyrosine hydroxylase; AADC, aromatic-L-amino-acid decarboxylase;

BH<sub>4</sub>, tetrahydrobiopterin, a cofactor of TH; PPH<sub>4</sub>, 6-pyruvoyl tetrahydropterin, NH<sub>2</sub>P<sub>3</sub>,

D-erythro-7, 8-dihydroneopterin triphosphate ;

GTP, guanosine triphosphate; GCH, GTP cyclohydrolase I.

自治医科大学では、AAV ベクターを使用して、これらの酵素の遺伝子を導入することによりドパミン産生を回復する遺伝子治療法を開発してきた。

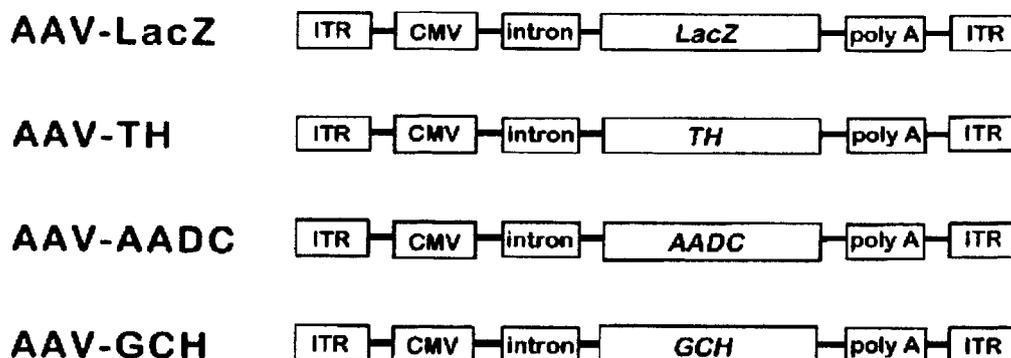
## (1) 培養細胞を用いた研究の成果

### ① 実験計画の概要

ラット脳の初代培養神経細胞およびヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞において、LacZ マーカー遺伝子を発現する AAV ベクター (AAV-LacZ) を使用して遺伝子導入効率を検討した。また、TH、AADC、GCH の各遺伝子を発現する AAV ベクター (AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCH) を使用して、AAV-TH 単独の場合と AAV-AADC および AAV-GCH を併用した場合とで、ドパミン産生への効果を比較検討した。

使用した AAV ベクターは、いずれも臨床研究と同じく 2 型 AAV (AAV-2) 由来で、CMV プロモーターにより各遺伝子を発現する (図 2)。

図 2 : 実験に使用したベクターの構造



ITR, AAV inverted terminal repeat; CMV, cytomegalovirus immediate-early promoter; intron, the human growth hormone first intron; poly A, the SV40 polyadenylation signal sequence.

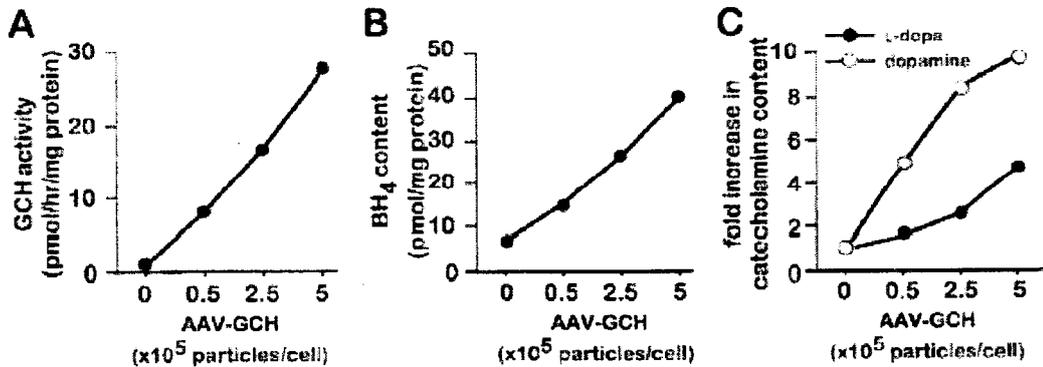
### ② 培養細胞における遺伝子導入効率および導入された遺伝子の構造と安定性

ラット胎仔 (Wistar, 胎生 20 日) 線条体の初代培養神経細胞に、AAV-LacZ を  $5 \times 10^2$  から  $1 \times 10^5$  vector genome (vg) /cell の力価範囲で感染させると、 $1 \times 10^4$  vg/cell 以上の力価では、1 週間後にほぼ 30 % の細胞が LacZ 陽性となった。2 週間後にも同様の発現が持続して認められた<sup>56)</sup>。各  $1 \times 10^5$  vg/cell の AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCH を感染させた HEK293 細胞において、Western blot により TH、AADC、GCH 各蛋白質の発現が確認された。

### ③ 培養細胞に導入された遺伝子の機能

HEK293 細胞に  $4.5 \times 10^3$  vg/cell の AAV-TH を感染させると 23.35 fg/cell の L-dopa の産生が認められたがドパミンは検出されなかった。しかし、AAV-TH に加えて  $4.5 \times 10^2$  から  $4.5 \times 10^3$  vg/cell までの範囲の AAV-AADC を感染させると、AAV-AADC の量が増えるにしたがい L-dopa が減少してドパミンが増加した。このことは、導入された AADC 遺伝子が発現し、L-dopa からドパミンへの変換が行われた結果と考えられた。ラットの初代培養神経細胞において、各  $1.4 \times 10^4$  vg/cell の AAV-TH と AAV-AADC を感染させた場合には、 $0.91 \pm 0.03$  fg/cell のドパミンが産生された。AAV-TH 単独の感染では、ドパミン産生量は 0.20 fg/cell 未満であった<sup>56)</sup>。293 細胞において、AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCH (各  $5 \times 10^5$  vg/cell) の 3 種類を同時に感染させると、ドパミンの産生量は AAV-GCH を加えないときに比べて約 10 倍に増加した (図 3)。

図3：培養細胞における AAV-GCH 添加によるドパミン産生の増強



HEK293 細胞に各  $5 \times 10^5$  vg/cell の AAV-TH と AAV-AADC、および  $0, 0.5, 2.5, 5 \times 10^5$  vg/cell の AAV-GCH を添加した。AAV-GCH の用量依存的に BH<sub>4</sub> の産生増加が認められ、ドパミンも増加した。

#### ④ 培養細胞を用いた実験の評価

AAV ベクターによりラットの初代培養神経細胞では 30 %程度に遺伝子導入された。TH、AADC、GCH の各遺伝子を HEK293 細胞に導入することによりドパミンが産生された。AADC 遺伝子導入により、L-dopa からドパミンの変換が行われると考えられる。

## (2) 実験動物を用いた研究の成果

### ① 実験計画の概要

選択的に黒質ドパミン神経細胞を傷害する 6-hydroxydopamine (6-OHDA) と 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) によるパーキンソン病モデル動物を使用した。6-OHDA を黒質線条体路に注入したラット、および MPTP を慢性的に全身投与したカニクイサル (*Macaca fascicularis*) の線条体に、AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCH を注入して、遺伝子導入によるドパミン産生と運動障害の改善効果を検討した。

### ② 実験動物における遺伝子導入効率および導入された遺伝子の構造と安全性

6-OHDA モデルラットの線条体に各  $5 \times 10^7$  vg の AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCH を 3 個所に分けて注入 (合計  $1.5 \times 10^8$  vg) した場合、免疫蛍光染色の結果から遺伝子導入された細胞の 95 %以上は抗 microtubule-associated protein (MAP2) 抗体に反応する神経細胞であった。線条体の神経細胞への遺伝子導入効率は約 20 %で、ベクター注入部位では  $1-2 \times 10^5$  の神経細胞が遺伝子導入された<sup>57)</sup>。AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCH の各遺伝子は 18 ヶ月後にも発現していた<sup>58)</sup> (図 4)。

図 4 : モデルラット線条体の免疫染色



AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCH の 3 種類のベクターを注入  
18 ヶ月後の抗 TH 抗体による免疫染色.

2 本の注入トラックを中心に遺伝子導入されている.

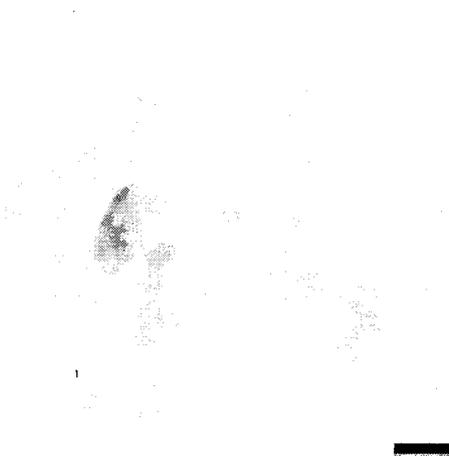
Scale bar = 2 mm

MPTP サルにおいて、各  $1.5 \times 10^{11}$  vg のベクターを被殻の 9 個所に注入した場合には、被殻の 92-94 % の領域に遺伝子導入された (図 5).

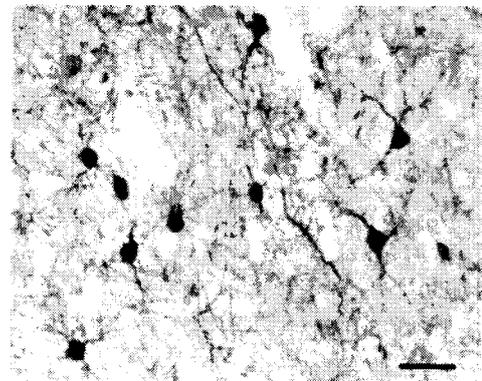
図 5 : MPTP サル脳 (冠状断) の免疫染色

左図 : AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCH の 3 種類のベクターを注入 65 日後の抗 AADC 抗体による免疫染色. 被殻の広範な領域に遺伝子導入されている (矢印). 選択的神経毒 MPTP により黒質からのドパミン神経終末が脱落し、遺伝子非導入側の被殻および両側の尾状核では染色性が低下している.

右図 : 遺伝子導入側の被殻では多数の TH 陽性細胞が認められる.



Scale bar = 5 mm



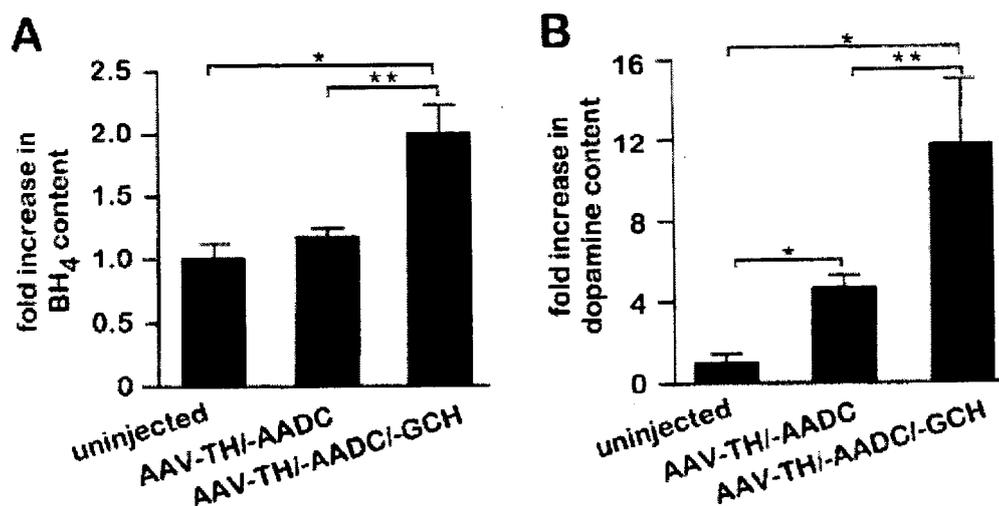
Scale bar = 50 mm

MPTP サルでは、positron emission tomography (PET)により遺伝子導入3ヶ月後も被殻で $[b-^{11}C]$  L-dopaの取込みの増加が認められ、AADC 遺伝子の発現が持続していると考えられた<sup>59)</sup>。

### ③ 実験動物に導入された遺伝子の機能

6-OHDA モデルラットの傷害側線条体に総量  $1.5 \times 10^9$  vg の AAV-TH を注入し、6 週間後に線条体の L-dopa の含有量を測定すると非注入群に比べて有意に増加した。AAV-TH と AAV-AADC を同時に注入した場合には、ドパミンの代謝産物である 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) が増加した<sup>56)</sup>。さらに AAV-GCH も加えて AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCH の 3 種類のベクター（各  $1.5 \times 10^7$  vg）を注入すると、AAV-TH 単独注入の場合と比較して、線条体の  $BH_4$  含量は約 2 倍に増加し、ドパミン含量も約 3 倍に増加した（図 6）。

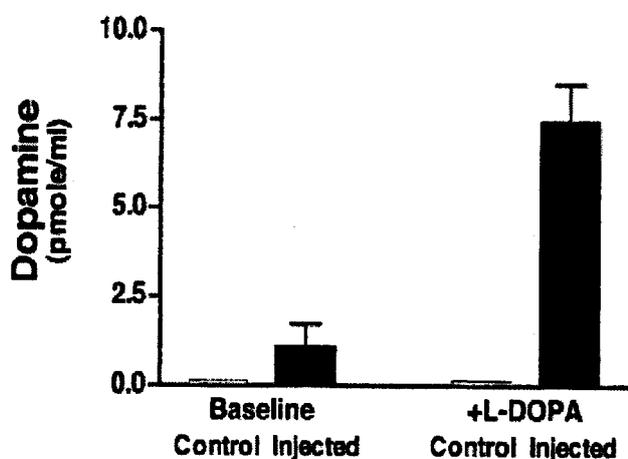
図 6：モデルラット線条体における遺伝子導入後の  $BH_4$  およびドパミン含量の増加



AAV-TH と AAV-AADC の 2 種類のベクターの投与によってアポモルフィン誘発の回転運動は抑制されたが、AAV-GCH を加えるとその効果は増加した。運動障害の改善効果は、ベクター注入後 18 ヶ月間の観察期間の間持続した。

MPTP サル（4 頭）の片側の被殻に AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCH（各  $1.5 \times 10^{11}$  vg）を定位脳手術により注入すると、反対側の上下肢では動作が速くなり、筋強剛、振戦も消失した。ドパミン受容体作動薬であるアポモルフィンの筋肉注射によりベクター注入側を向いた体軸の回転傾向が出現し、同側（ベクター注入側）の被殻でドパミンが産生されドパミン受容体の super-sensitivity が改善されたと考えられた。in vivo dialysis によって、同側の被殻でドパミンとその代謝物の増加が確認され、さらに L-dopa の全身投与によりドパミン生成の増加が認められた（図 7）。

図7：MPTPサル線条体のドパミンの増加



遺伝子導入側 (injected) の被殻では、非導入側 (control) に比べてドパミンの量が多かった。さらに L-dopa を静注すると遺伝子導入側ではドパミンの産生量が増加した。

特に副作用は認められず、脳組織標本でも炎症反応や神経細胞の脱落などの異常を認めなかった。治療前の症状が最も重く臥床状態であった1頭のサルについては、治療後対側の上下肢の運動障害の改善とともに起立可能となり4年後にも症状の悪化は認めていない。

AAV-AADC のみを注入した MPTP サル3頭のうち PET 計測を行った2頭 (各  $5.4 \times 10^{10}$ 、 $7.2 \times 10^{10}$  vg 注入) では、遺伝子導入した被殻で  $[b-^{11}C]$ L-dopa の取込みの増加が認められ AADC 活性が回復していた (図8)。

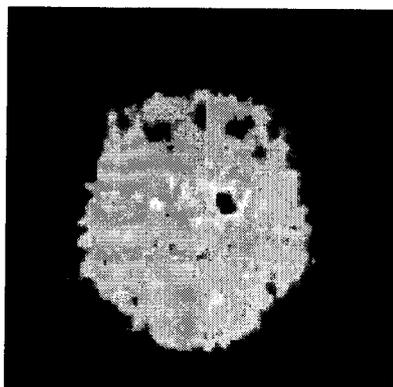


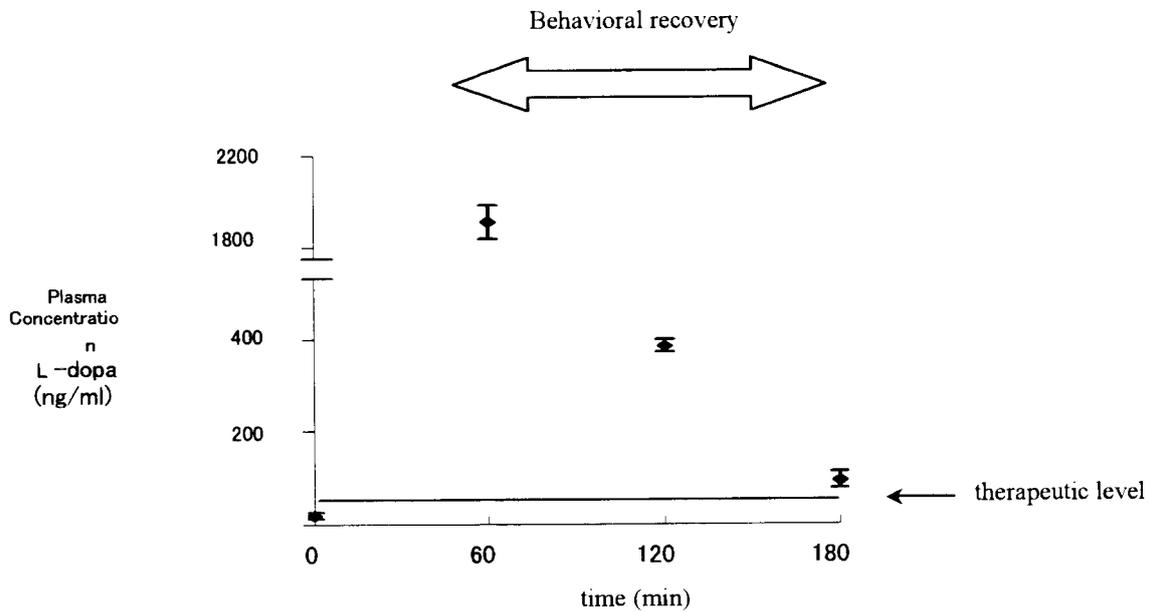
図8：MPTPサルの遺伝子治療後のPET画像

左側の被殻に AAV-AADC  $5.4 \times 10^{10}$  vg を注入 12 週間後の  $[b-^{11}C]$  L-dopa PET 画像。

また、L-dopa 5 mg/kg を末梢性脱炭酸阻害剤の Benserazide 1.25 mg/kg とともに経口投与すると、注入反対側の上下肢では運動障害が改善し、その効果は L-dopa の血中濃度を反映して 3-4 時間持続した (図9)。

長期観察中のサル ( $4.35 \times 10^{10}$  vg 注入) では、ベクター注入1年後にも L-dopa による症状の改善効果が認められている。

図9 : L-dopa 投与後の血中濃度と運動障害の改善



#### ④ 実験動物の評価

選択的神経毒によるパーキンソン病モデル動物において、AAV ベクターによるドパミン合成系の酵素遺伝子 (TH、AADC、GCH) を線条体で発現させることにより運動障害の改善が得られた。動作緩慢・筋強剛・振戦などパーキンソン病患者と同様の運動障害を呈する MPTP サルにおいて、臨床研究と同様、AADC の遺伝子導入と L-dopa の経口投与により運動症状の改善が認められた。

### (3) 関連する研究の成果

パーキンソン病の遺伝子治療の第2の戦略として、ドパミン神経細胞の変性を抑制するために神経保護作用のある物質を脳内に持続的に供給する遺伝子治療がある。神経栄養因子の Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) は、微量でも培養ドパミン神経細胞に対して保護効果を示すことが知られている。GDNF を発現する AAV ベクター (AAV-GDNF) を作製し、ラットの初代培養系においてドパミン神経細胞へ感染させることにより、神経細胞の生存率が高まることを明らかにした<sup>60)</sup>。また、6-OHDA を線条体に注入してから4週間を経て既に黒質線条体路の変性が進行している状態のラットの線条体に AAV-GDNF を注入する実験では、黒質ドパミン細胞の変性脱落が抑制され運動障害の改善効果が得られることを示した<sup>61)</sup>。さらに、GDNF は培養運動ニューロンにも保護効果があることが知られているため、筋萎縮性側索硬化症のモデル動物である SOD1 トランスジェニックマウスを使用して、四肢の筋肉に AAV-GDNF を発現させることにより、脊髄の運動ニューロンの脱落を抑制し、延命効果が得られることを報告した<sup>62)</sup>。