

の低用量群と 8×10^{11} vg の高用量群の各群 6 例を予定している。2006 年 4 月までに低用量群の 6 例に遺伝子導入が行われ、2-17 ヶ月間の観察期間において副作用は認められていない。

導入遺伝子	Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC)	Glutamic acid decarboxylase (GAD)	Neurturin (CERE-120)
遺伝子の性状	ドパミン合成系の酵素	抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素	神経栄養因子
ベクター投与量	低用量群 9×10^{10} 中用量群 3×10^{11} 高用量群 9×10^{11} (vector genomes)	低用量群 3.5×10^9 中用量群 1.0×10^{10} 高用量群 3.5×10^{10} (particles)	低用量群 2×10^{11} 高用量群 8×10^{11} (vector genomes)
予定症例数	15 (各群 5)	12 (各群 4)	12 (各群 6)
投与経路	定位脳手術	定位脳手術	定位脳手術
投与部位	両側の被殻	片側の視床下核	両側の被殻
評価	臨床症状 (UPDRS, 患者日記, GDS, MMSE, Hoehn & Yahr) FMT-PET, MRI	臨床症状 (CAPIT, UPDRS) FDG-PET	臨床症状 (UPDRS, 患者日誌など) ^{18}F -DOPA PET
予定観察期間	5 年間 FMT-PET は、ベクター投与 1 ヶ月後と 6 ヶ月後	1 年間	1 年間
2006 年 4 月に米国神経学会 (AAN) で公表された結果	低用量群の 3 名に遺伝子導入を行った。それぞれ術後 1, 3, 6 ヶ月の時点で、患者日記による評価で症状の改善がみられた。FMT-PET では、平均 15% の FMT の取り込みの増加が認められた。術後すぐに軽快した頭痛があったが、重篤な副作用は認めていない。	12 症例に遺伝子導入完了。 11 例で 6 ヶ月後の評価まで終了。安全性に問題はなかった。FDG-PET で、期待された効果 (淡蒼球内節と視床 VL 核における FDG の取り込み減少と大脳皮質運動野の取り込みの増加) が認められた。	低用量群の 6 例に遺伝子導入を完了。2-17 ヶ月の観察期間において、副作用は認められなかった。

UPDRS: Unified Parkinson's Disease Rating Scale, GDS: Geriatric Depression Scale (Mood Assessment)

Scale -Short Form), MMSE: Mini Mental State Examination, CAPIT: Core Assessment Program for Intracerebral Transplantations, FMT: [¹⁸F] Fluoro-metatyrosine, FDG: [¹⁸F] Fluoro-deoxyglucose

本研究と UCSF で実施中の遺伝子治療臨床研究（上記第 2）では，米国 Avigen 社において 2004 年 11 月に作製された同一ロットの AAV-hAADC-2 (1.5×10^{12} vg/ml, vg/infectious unit ratio=12) を使用し，共通の項目について評価を行う．本研究では，UCSF の研究の第 2 群，第 3 群に相当する 3×10^{11} , 9×10^{11} vg の投与量を設定している．両研究とも，主要評価項目は安全性であり，副次評価項目は，①治療の有効性，および②AAV-hAADC-2 注入量と AADC 発現量との関係評価である．安全性の評価は，一般身体所見（バイタルサインを含む），神経学的所見，有害事象，抗パーキンソン病薬の必要量，併用薬，臨床検査について行う．①効果の判定は症状日誌，臨床的評価，服用する L-DOPA の必要量に基づいて行う．②の発現量は FMT-PET によって判定する．

両研究間では，下表に示したように被験者の選択基準などに若干の差がある．

実施施設名	自治医科大学	UCSF
研究名	AADC 発現 AAV ベクター線条体内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究	A Phase 1 Open-label Safety Study of Intrastriatal Infusion of Adeno-Associated Virus Encoding Human Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase (AAV-hAADC-2) in Subjects with Mid- to Late-Stage Parkinson's Disease
試験開始日		2004 年 12 月 16 日
ベクター投与量	3×10^{11} , 9×10^{11} vg	9×10^{10} , 3×10^{11} , 9×10^{11} vg
登録予定症例	各群 3 例，合計 6 例	各群 5 例，合計 15 例
被験者の選択基準	- 発症年齢が 40 歳以上 - UPDR スコア Part III (OFF 状態)の合計が 20-80 点	- 診断時年齢が 40 歳以上 - UPDR スコア Part III (OFF 状態)の合計が 20-60 点
被験者の除外基準	- MMSE で 20 点以下 3 年以内に痙攣発作の既往，抗てんかん薬を服薬中，脳波検査でてんかん性の異常を認める - 重篤な薬物アレルギーの既往 - 過去 6 ヶ月以内に本臨床研	MMSE で 26 点以下

		究，他の臨床研究，治験のいずれかに参加したことがある - 最近の心筋梗塞などの急性疾患あるいは管理不良な疾患を合併している - 総括責任者が本研究の対象として不適当と判断した	
試験実施 予定期間	最終登録症例にベクターを投与後 9 ヶ月間	最終登録症例にベクターを投与後 5 年間	
被験者のフォローアップ期間	10 年間（フォローアップ期間中に重篤な有害事象が発生した場合には，病院長から厚生労働大臣への報告を行う）	15 年間	
パーキンソン病以外に，頭蓋内への 2 型 AAV ベクター注入を行った遺伝子治療としては，Canavan 病の小児に対して欠損した酵素の遺伝子を発現する AAV ベクターを大脳に投与した結果が最近報告され，特段の副作用を認めることなくプロトコルが遂行されている。 嚢胞性線維症の治療を目指した臨床研究では，合計 7 つのプロトコルが実施されている．いずれも 2 型 AAV ベクターを経気道的に投与するもので，結果が既に報告されている 4 つのプロトコルにおいて合計 80 例に対して最大で 1×10^{13} vg 相当量が使用されているが，ベクター自体の毒性による副作用は見出されていない．体内へのベクターの注入に基づく治療法としては，血友病 B の遺伝子治療を目指して骨格筋ならびに肝臓を標的とするプロトコルが実施された．血友病 B に対して，肝臓への遺伝子導入を行った 2 例で軽度の肝逸脱酵素の一過性上昇が認められたが，その他の副作用は認められていない．体内への注入を行った臨床研究はすべて第 I 相試験であるが，これらの報告をまとめると以下のようになる．			
対象疾患	血友病 B	血友病 B	Canavan 病
標的組織	骨格筋	肝臓	大脳皮質
ベクター投与量	2×10^{11} 6×10^{11} 1.8×10^{12} (vg/kg)	8×10^{10} 4×10^{11} 2×10^{12} (vg/kg)	8×10^{11} 1×10^{12} (vg, 総投与量)
投与経路・ 投与部位	大腿・下腿部骨格筋への直接注入	カテーテルによる肝動脈内注入	頭蓋骨 6 個所を開窓し脳実質内に注入（定位脳手術）
症例数	8 例	7 例	10 例
年齢（平均）	23-67 (39)	20-63 (34)	2.0-6.8 (4.1)

	観察期間	1 年以上	1 年以上 (平均 2 年以上)	1 年以上 (平均 2 年以上)
	その他特記事項	5 例で注入部に軽度の一過性の痛みまたは血腫. 全例で AAV キャプシドに対する中和抗体価の著明な上昇	2 例で治療後に軽度の肝逸脱酵素の一過性上昇. 全例で AAV キャプシドに対する中和抗体価の著明な上昇	3 例で AAV キャプシドに対する中和抗体価の軽度の上昇

評価スケジュール1年目

	Screen *	Base line	手術	個室管理			評価 1	評価 2	評価 3	評価 4	評価 5	評価 6	評価 7	評価 8	評価 9	評価 10	評価 11	評価 12	評価 13	評価 14	評価 15
	≤ 8 weeks	Day -10 ~-1	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 7 (注 3)	Day 14 (注 4)	Day 28	Day 42	Day 56	3M	4M	5M	6M	7M	8M	9M	10M	11M	12M
一般身体所見	○	○	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
神経所見	○	○	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
UPDRS (注 2)	◎	◎						○	◎		○	◎			◎						◎
Hoehn& Yahr	○								○			○			○						
MMSE, GDS	○														○						
服用薬の確認	○	○	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
症状日誌の確認	○	○							○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
有害事象の有無		○	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
PET scan		○							○						○						
頭部 MRI		○	○					○	○						○						
血液	○						○	○	○			○			○						○
凝固		○																			
生化学	○						○	○	○			○			○						○
PMBC	○							○	○			○			○						
AAV 抗体	○							○							○						
PCR (血清) (注 1)	○			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
尿検査		○							○						○						

* 全ての臨床検査は Screening 評価の時に実施する (心電図も含む)。

注1. PCR に関しては Day 7 以降は連続 3 検体が陰性になるまで採取を継続する。

注2. ○ : on で part II と III のみ評価, ◎ : on で part I ~IV, off で part II と III (part III はそれぞれビデオ撮影)。

注3. PCR 陽性のときは個室管理を継続する。

注4. 術後 2 週間まで入院予定。

	評価 16	評価 17	評価 18	評価 19	評価 20	評価 21	評価 22	評価 23	評価 24	評価 25	評価 26	評価 27	評価 28	評価 29	評価 30	評価 31
	15M	18M	21M	24M	27M	30M	33M	36M	39M	42M	45M	48M	51M	54M	57M	60M
一般身体 所見	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
神経所見	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
UPDRS (注 2)				◎				◎				◎				◎
服用薬の 確認	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
症状日誌の 確認	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
有害事象の 有無	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
血液				○				○				○				○
生化学				○				○				○				○
PCR (血清) (注 1)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

注1. PCR に関しては連続 3 検体が陰性になるまで採取を継続する。
注2. ○ : on で part II と III のみ評価, ◎ : on で part I ～IV, off で part II と III (part III はそれぞれビデオ撮影)。

なお、血液検査、凝固検査、生化学検査に含まれる項目は、次に示すとおりである。

血液検査

赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、MCV, MCH, MCHC,
白血球数、好中球数、リンパ球数、単球数、好酸球数、好塩基球数、血小板数

凝固検査

PT, aPTT, INR, フィブリノゲン

生化学検査

BUN, クレアチニン, Na, K, Cl, Mg, P, Ca, 血糖, 総タンパク, アルブミン,
総ビリルビン, GOT (AST), GPT (ALT), ALP, GGT (γ GTP)

遺伝子治療臨床研究実施計画書

(2006 年 9 月 15 日改訂版)

目 次

1 遺伝子治療臨床研究の名称 -----	1
2 総括責任者およびその他の研究者の氏名ならびに当該遺伝子 治療臨床研究において果たす役割 -----	1
(1) 総括責任者の氏名 -----	1
(2) 総括責任者以外の研究者の氏名およびその担当する役割 -----	1
3 実施施設の名称およびその所在地 -----	1
4 遺伝子治療臨床研究の目的 -----	2
5 遺伝子治療臨床研究の対象疾患およびその選定理由 -----	2
(1) 治療を直接の目的とした遺伝子治療臨床研究を行う場合 -----	2
① 対象疾患に関する現時点での知見 -----	2
② 当該遺伝子治療臨床研究の概要 -----	4
③ 他の治療法との比較および遺伝子治療を選択した理由 -----	4
6 遺伝子の種類およびその導入法 -----	7
(1) 人に導入する遺伝子の構造と性質 -----	7
① 人に導入する遺伝子の構造 -----	7
② 人に導入する遺伝子の性質 -----	9
③ 導入遺伝子からの生成物の構造およびその生物活性 -----	9
(2) 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質 -----	9
(3) 標的細胞とした細胞の由来および生物学的特徴ならびに 当該細胞を標的細胞とした理由 -----	9
(4) 遺伝子導入方法の概略および当該導入法を選択した理由 -----	9
(5) ウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行う場合 -----	10
① AAV-hAADC-2 の野生型ウイルスの生物学的特徴および人に対する影響 -----	10
② AAV-hAADC-2 の作製方法 -----	11
③ AAV-hAADC-2 の構造 -----	12
④ AAV-hAADC-2 の生物学的特徴 -----	12
7 安全性についての評価 -----	13
(1) 遺伝子導入方法の安全性 -----	13
① 遺伝子導入に用いる AAV ベクターの純度 -----	13
② 患者に投与する AADC 遺伝子の純度およびその安全性 -----	14
③ 増殖性ウイルスの出現の可能性 -----	14

④ 遺伝子導入に用いる AAV ベクターの細胞傷害性	14
⑤ 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性	14
⑥ 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性	15
⑦ 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点	15
⑧ がん原性の有無	15
(2) 遺伝子産物の安全性	15
(3) 細胞の安全性	15
① 培養細胞の純度	15
② 細胞の遺伝子型、表現型の安全性	16
③ 被験者に投与する細胞の安全性	16
(4) AAV 以外のウイルスベクターに起因する重篤な有害事象	16
(5) これまでに実施された臨床試験における成績	17
8 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した理由	19
9 遺伝子治療臨床研究の実施計画	20
(1) 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画	20
(2) 被験者の選択基準および除外基準	22
(3) 被験者の同意の取得方法	24
(4) 実施期間および目標症例数	24
(5) 遺伝子治療臨床研究の実施方法	24
① 対照群の設定方法	24
② 遺伝子導入方法（安全性および有効性に関する事項を除く）	24
③ 前処置および併用療法の有無	25
④ 臨床検査項目および観察項目	25
⑤ 予測される副作用およびその対処方法	30
⑥ 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準および中止判定基準	31
⑦ 被験者の安全性確保および健康被害補償	34
⑧ 症例記録に関する記録用紙等の様式	34
(6) 米国における類似の研究との関連	34
10 患者のプライバシー保護と秘密の保全	36
(1) 実施施設での安全管理措置	36
(2) 本研究における個人情報の保護	37
(3) 記録の保存	37
11 成績の公表の方法	38
<実施計画書に添付すべき資料>	
研究者の略歴および研究業績	39

実施施設の施設設備の状況 -----	48
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 -----	48
遺伝子治療臨床研究に関連する実施施設以外の内外の研究状況 -----	56
文献 -----	58

- 資料 1： AVIGEN, INC. CLINICAL RESEARCH AGREEMENT
 および Genzyme からの契約継承の証明（注：添付省略）
- 資料 2： Modified Hoehn & Yahr 重症度、UPDRS、MMSE、GDS
- 資料 3： 臨床研究「パーキンソン病遺伝子治療」参加のしおり
- 資料 4： DEVICE DESCRIPTION AND USE（注：添付省略）
- 資料 5： 2006 年 4 月米国神経学会抄録（同上）
- 資料 6： 評価スケジュール

- 参考資料 1： AVIGEN Protocol No.AAV-hAADC-2-003（注：添付省略）
- 参考資料 2： AAV-hAADC-2 AADC Test Records Lot # 1063-01954（同上）
- 参考資料 3： 受入れ試験の詳細（同上）

1 遺伝子治療臨床研究の名称

AADC 発現 AAV ベクター線条体内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究

2 総括責任者およびその他の研究者の氏名ならびに当該遺伝子治療臨床研究において果たす役割

(1) 総括責任者の氏名

中野今治 自治医科大学医学部・神経内科・教授
遺伝子治療臨床研究の総括

(2) 総括責任者以外の研究者の氏名およびその担当する役割

小澤敬也 自治医科大学・遺伝子治療研究部・教授
副責任医師、ウイルスベクターに関する全般管理

渡辺英寿 自治医科大学・脳神経外科・教授
副責任医師、脳内へのベクター注入の管理・助言

藤本健一 自治医科大学・神経内科・助教授
患者評価統括と定位脳手術補助

村松慎一 自治医科大学・神経内科・助教授
適応患者の選択・評価およびウイルスベクターの管理

加藤正哉 自治医科大学・脳神経外科・助教授
遺伝子導入のための定位脳手術実施

久米晃啓 自治医科大学・遺伝子治療研究部・助教授
ウイルスベクターの品質検査と管理

池口邦彦 自治医科大学・神経内科・講師
患者への説明と同意の取得および患者評価

水上浩明 自治医科大学・遺伝子治療研究部・講師
ウイルスベクターの検出

岡田尚巳 自治医科大学・遺伝子治療研究部・講師
ウイルスベクターの管理と注入に関する情報収集

卜部匡司 自治医科大学・遺伝子治療研究部・講師
ウイルスベクターの解析

川上忠孝 自治医科大学・神経内科・助手
適応患者の選択、患者評価および定位脳手術補助

松下 卓 自治医科大学・遺伝子治療研究部・助手
ウイルスベクターの品質検査と管理

佐藤俊彦 宇都宮セントラルクリニック・院長
PET 検査

3 実施施設の名称およびその所在地

名称：自治医科大学附属病院

所在地：〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1

4 遺伝子治療臨床研究の目的

本研究は、進行したパーキンソン病患者の線条体(被殻)に、ヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素(aromatic L-amino acid decarboxylase : AADC) 遺伝子を組み込んだ2型アデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus : AAV) ベクターを定位脳手術的に注入し、その安全性を検証するとともに、経口投与するL-dopaによってドパミン産生を促し、パーキンソン症状を改善することを目的とする。ドパミンの過剰合成に伴って生じ得るジスキネジアはL-dopaの投与量を減らすことにより予防する。

5 遺伝子治療臨床研究の対象疾患およびその選定理由

(1) 治療を直接の目的とした遺伝子治療臨床研究を行う場合

① 対象疾患に関する現時点での知見

パーキンソン病は振戦、寡動、筋強剛、姿勢反射障害を主たる症候とし、通常40-70歳で発症する進行性の神経変性疾患である。振戦は概して安静時に出現し、病初期には一側性である。衣服の着脱や靴の脱ぎはきなど日常生活動作に時間がかかるようになり、このことはボタンのかけ外しや靴ひもを結ぶなどの指先のこまかい動作において特にめだつ。また、歩行時の腕振り、瞬目、唾液のみこみなど、無意識に行う動作が少なくなる。姿勢は前屈となり、股関節、膝関節、肘関節が屈曲傾向を示す。病気の進行とともに患者の動作はますます遅くなり、椅子やソファに人形のように身動きもせずにならわっているようになる。この段階になると、患者はバランスを失って（立ち直り反射の障害）転倒しやすくなる。最も進行した状態では車椅子あるいはベッドに寝たきりとなり、濃厚な介護を要するようになる。

欧米におけるパーキンソン病の有病率は人口10万人当たり120-130人と推計されている。本邦でのそれは、従来は欧米よりもはるかに少ないと考えられてきたが、最近の調査では欧米と殆ど変わらないことが判明した¹⁾。これは主に人口の高齢化によるものと考えられている。本症の経過には症例差があり、発症から寝たきりになるまでの期間は3-15年と幅がある。抗パーキンソン病薬の発達した現在では、発症15年を経ても、on時には約4分の3の患者がHoehn-Yahrのステージ分類でIII度以下との報告もある²⁾。

パーキンソン病の病理は、黒質と青斑核のメラニン含有細胞の脱落とLewy小体の出現である。黒質のメラニン含有細胞数と体積は加齢でも減少する³⁾。McGeer PL et al.は80歳では若年時の425,000個から200,000個に減少していたと報告している⁴⁾。黒質のメラニン含有細胞の数、密度、および体積は10歳、歳をとるごとにそれぞれ9.8%、7.4%、3.2%減少する⁴⁾。その細胞数は、90歳代では、10歳代の約3分の1に減少している。McGeer PL et al.はパーキンソン病においてはメラニン含有細胞数が同年齢正常対照の約30%に減少していたと報告した。さらに、Pakkenberg B et al.は、7例のパーキンソン病患者と7例の同年代の正常対照例において黒質のメラニン含有細胞の数を計測した。その結果、正常人の黒質メラニン含有細胞の平均数は550,000個であるのに対しパーキンソン病ではその約70%が脱落していた、とほぼ一致した減少率を記載している⁵⁾。このようにパーキンソン病でみられる黒質メラニン含有細胞の脱落は加齢のみでは説明し難く、別の要素が関与しているものと考えられる。

黒質のドパミンニューロンは線条体に投射しているので、黒質ニューロンの脱落によって線条体のドパミンが欠乏する。この減少は¹⁸fluoro-L-dopaを使ったPET studyによっても示されており^{6) 7)}、パーキンソンニズムを生ずる神経薬理学的背景と考えられている。

パーキンソン病の原因は不明である。原因究明はもっぱら遺伝、毒物、ウイルス、フリーラジカル、

視床下部栄養因子欠乏の観点から行われてきた²⁾。これまでのところ、一部の家族性パーキンソン病に限って α -synuclein⁸⁾や parkin⁹⁾などの遺伝子変異が見つかったが、大部分の特発性パーキンソン病では遺伝子変異は明らかになっていない。

毒物に関しては、自然界には存在しない 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) という合成化合物によって黒質ニューロンが脱落してパーキンソニズムが生じることが報告された¹⁰⁾。パーキンソン病は MPTP 類似の、しかし、より慢性的に作用する外毒素により生ずる可能性が示されたわけであるが、これまでの精力的な研究にもかかわらずその毒素は特定されていない。

一方、ドパミンニューロンは上述のように加齢とともに減少し、ドパミンの分解酵素であるモノアミン酸化酵素の活性は加齢とともに上昇することから、内在毒素説が提唱された。細胞酸化反応により過酸化水素とフリーラジカルが発生し、これを取り除かないとドパミンニューロンが傷害される。パーキンソン病患者の黒質では、過酸化水素の除去に対して主要な役割を果たす還元型グルタチオンが高度に減少している¹¹⁾。しかしながら、この減少は酸化ストレスをもたらす(酸素ラジカルを増大させる)原因なのか、逆に酸化ストレスの結果(還元型グルタチオンは酸化ストレスで減少する)なのかは未確定である。一方、パーキンソン病患者の黒質ではミトコンドリアの複合体 I の活性が低下していることが示されている^{12) 13)}が、これは外毒素、酸化ストレス、あるいはミトコンドリア DNA の遺伝的欠陥のいずれでも生じ得る。

現在、パーキンソン病に対しては複数の治療法がある。抗パーキンソン病薬(抗パ薬)だけでも数種類、すなわち最も強力な L-dopa のほか、ドパミン作動薬、モノアミン酸化酵素阻害薬、抗コリン剤、アマンタジンなどが使用可能である。実際には臨床症状に合わせて、これらの中から 1 つあるいは複数を選んで使用する¹⁴⁾。さらに、視床破壊術や淡蒼球破壊術などの定位脳手術も行われている。加えて脳内の諸核に刺激電極を留置し、前胸部に植え込んだ電気刺激装置によってこの電極を高頻度刺激する深部脳電気刺激療法(deep brain stimulation)も世界各地で行われている¹⁵⁾。本邦でも、2000 年 4 月より、深部脳電気刺激療法に保険が適用されるようになり、当施設でも脳神経外科と神経内科が協力して既に多数例で実施している。また、保険の適用はないが、修正電気痙攣療法(modified electroconvulsive therapy)も試みられている¹⁶⁾。

しかしながら、これらの治療法はそれぞれに問題点を有している。抗パ薬、特に L-dopa を長期服用すると様々の不都合が生じる；①効果の減弱、②運動症状の日内変動、すなわち wearing-off 現象や on-off 現象、あるいは過剰運動としてのジスキネジア(不随意運動)、③精神症状、すなわち幻覚や妄想がその代表である。これらは、線条体におけるドパミンニューロンの軸索終末が減少することによって生じると推測されている。L-dopa からドパミンへの変換は軸索終末で行われるために、これらの軸索終末が減少すれば L-dopa を投与してもドパミンへの変換は十分には行われなくなり、L-dopa の効果は減弱する。一方、線条体でのドパミンニューロンの軸索終末の減少によってドパミンに対する脱神経性過敏が生じ、このために L-dopa 投与により線条体のドパミン量がわずかでも過剰になればジスキネジア(不随意運動)が出現すると考えられている¹¹⁾。L-dopa 治療後 2 年で、運動症状の動揺は約 50%、不随意運動は 30%に出現する¹⁷⁾。また、ドパミン受容体作動薬を単剤で長期間治療するのは困難で、3 年目までに約 50%、5 年目までに 70%近くの患者は L-dopa との併用を要する^{18) 19)}。また、視床や淡蒼球などの定位脳破壊術や深部脳電気刺激療法も全てのパーキンソン病症例に対して有効なわけではなく、症状によって適用術式が限定される。例えば視床破壊術は振戦や筋強剛の改善効果は強いが、その他のパーキンソン症状に対する効果は弱い。また、両側手術では認知症などの合併症の危険がある。淡蒼球破壊術は筋強剛や抗パ薬の副作用としてのジスキネジア(不随意運動)に対する効果は強いが、歩行障害や寡動、姿

勢反射障害などに対する効果は不十分である。深部脳電気刺激療法、とりわけ両側視床下核の同時刺激は振戦、寡動、筋強剛、姿勢反射障害など全てのパーキンソン症状に対して有効だが、進行して L-dopa の効果がなくなった症例には無効であり、長期予後も良好とは言えない²⁰⁾。磁気刺激療法や修正電気痙攣療法はまだ研究段階であり、どのような症例に有効であるかの基準もなく、広く普及するには至っていない。

② 当該遺伝子治療臨床研究の概要

本研究では、進行したパーキンソン病患者の線条体（被殻）に、ヒト AADC 遺伝子を組み込んだ 2 型 AAV ベクター（AAV-hAADC-2）を定位脳手術的に注入する。AADC（酵素番号 enzyme code:EC4.1.1.28）はそれぞれドパミンおよびセロトニンの前駆体である L-dopa および 5-HTP（5-hydroxytryptophan）を特異的基質とする酵素である。したがって AADC によってドパミンの他にセロトニンも生成されるが、セロトニンの生成量は 5-HTP の量に依存する。5-HTP はプロトコール上投与されることはなく、内因性の 5-HTP から AADC を介して生成されるセロトニンの量は生理的範囲内であるのでセロトニンが過剰生成されることはない。

本研究に期待されるもう 1 つの点は、進行したパーキンソン病治療に伴って問題になる精神症状への対策である。ドパミンはパーキンソン病において不足する黒質-線条体路だけではなく、中脳-辺縁系路における神経伝達物質でもある。パーキンソン病の治療を目的として L-dopa などのドパミン受容体刺激薬を使用すると、中脳-辺縁系路が刺激されて精神症状が発現する。本研究では、黒質-線条体路の投射先である被殻の背外側部に選択的に AAV-hAADC-2 を注入するので、精神症状を発現させることなくパーキンソン症状を改善させることが期待される。

③ 他の治療法との比較および遺伝子治療を選択した理由

進行したパーキンソン病に対しては、薬物療法のみならず外科的治療も無効である。また磁気刺激療法や修正電気痙攣療法は研究段階であり、パーキンソン病に対する効果が十分には確認されていない。特に進行例に対する効果は限定的であると考えられる。現在のところ、進行したパーキンソン病に対する新しい治療戦略として、ドパミン産生細胞の移植、幹細胞治療、そして遺伝子導入療法が考えられる。

A. ドパミン産生細胞の移植

ドパミン産生細胞の移植によってパーキンソン病を治療する試みは、1979 年に Bjorklund らがパーキンソン病のモデル動物の線条体に、胎仔の中脳黒質ドパミンニューロンを移植し、症状の改善を報告したことに端を発する。臨床応用では、ドパミンを産生する移植細胞をどこに求めるかが問題になった。最初に注目されたのは患者自身の副腎髄質細胞で、1982 年以来世界中で 300 例以上の自己副腎移植が行われたが、その結果は満足できるものではなかった。原因は細胞の生着率の悪さにあると考えられた。そこで自己副腎と神経栄養因子の分泌がさかんな末梢神経を同時に移植する試みが行われている。治療成績は自己副腎のみの移植と比べて良好であるが、症例数も少なく、一般化するには至っていない。

板倉らはドパミン供給細胞として交感神経節に注目し、1991 年以来、自己の頸部交感神経節（星状神経節）より採取した細胞を線条体に移植している²¹⁾。治療効果は認められるものの、時間経過とともに効果は減弱するので、星状神経節はドパミン供給のためには量的に不十分と考えられた。より多くの交換神経節細胞を得るために、胸部交換神経節を利用する方法も検討されているが、長期的な効果は不明である。

1987年にメキシコの Madrazo らは中絶胎児の中脳黒質ドパミン細胞をパーキンソン病患者に移植し、症状の改善を報告した。米国の施設も追随しようとしたが、NIH は 1988 年に胎児を用いた移植研究を禁止した。宗教上の理由から人工妊娠中絶に反対する強い世論が存在し、一方で金銭と引きかえに胎児を売る人間が現れてもおかしくない社会情勢に配慮した決定だった。その後連邦政府および各州での法整備が進み、法律に準拠した胎児脳移植が再開され、胎児の黒質ドパミン細胞を用いた二重盲検試験が 2 つ実施された²²⁾²³⁾。いずれの試験でも移植群において PET により [¹⁸F] L-dopa の取込みの増加が認められ、剖検例で移植したドパミン神経細胞が生着していることが確認された。しかし、臨床効果については、当初期待されたほどではなかった。1 番目の試験では、60 歳以下の患者でのみプラセボ群と比較して軽度の症状の改善を認めた。また、2 番目の試験では、移植前の運動障害が軽い患者のみ 2 年後の症状の増悪がプラセボ群より少なかったが、全体としてはプラセボ群と差がなかった。さらに、移植患者の一部で L-dopa を服薬しない状態においても不随意運動 off-medication dyskinesia が出現することが明らかになった。これらの結果から、2 番目の試験を行った Olanow らは、現時点では胎児細胞移植はパーキンソン病の治療として推奨できないとしている。

胎児細胞移植では、1 人のパーキンソン病患者を治療するために、胎児 4 人分のドパミン細胞が必要である。さらに移植細胞の生着のためには、免疫抑制剤を使用した場合には、免疫能力の低下に起因する様々な合併症の危険がある。胎児の黒質ドパミン細胞移植の症例数は世界的にも限られており、効果についても議論が分かれている。また、現在我が国には中絶胎児組織の臨床応用に関するガイドラインが存在せず、直ちにこの治療法を実施することは困難である。

B. 幹細胞治療

脳内にも分化能力に富む神経幹細胞が存在することが発見され、その移植によって様々な神経疾患の治療ができるのではないかと注目を集めている。多能性の幹細胞は適切な条件下では、神経細胞を含む種々の細胞に分化させることができる。パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経疾患の治療に際して、この幹細胞を修復用の細胞や組織の供給源として用いることが研究されている。この領域の研究は大きな成果をもたらす可能性を秘めているが、実用化の前には高いハードルが数多く横たわっている。例えば、神経幹細胞をどこから得るかという問題がある。胎児の幹細胞を利用する場合は、胎児の黒質ドパミン細胞移植の場合と同様の問題が生じよう。成人の死体から神経幹細胞を分離したという報告もあるが、このようにして得た神経幹細胞を利用する場合には、臓器移植と同様の問題が生じる。成体内に元来少数存在する神経幹細胞を取り出して増殖する方法なら、多くの問題を解決できるが、短期間で大量の移植用細胞を分化誘導する技術は確立していない。また増殖中の細胞を利用する場合には、未熟な細胞であるだけに、がん化の可能性も考慮する必要がある。胚性幹細胞（embryonic stem cell : ES 細胞）からドパミン細胞を分化させる方法も開発されてきているが、未分化細胞の混入による奇形種発生危険性がある。また、胎児細胞移植と同様、細胞移植後に不随意運動が生じる可能性がある。またヒト ES 細胞の利用に際しては、ヒト ES 細胞の臨床応用に関するガイドラインが未整備であることも問題である。このように、パーキンソン病に対して近い将来、幹細胞治療を行い得る見通しは、今のところ立っていないのが実状である。

C. 遺伝子導入療法

細胞移植に伴う問題点を回避する方法として、遺伝子導入療法が考えられる。脳内に存在する自己細胞に遺伝子を導入することによって、失われた神経細胞の働きを遺伝子導入された自己細胞に代行させ

るという戦略である。導入する遺伝子の種類によって、3種類の戦略が考えられている。第1はドパミン産生にかかわる酵素遺伝子を導入して、自己細胞にドパミンを産生させる方法である。パーキンソン病に対するドパミン神経細胞の移植治療では、その本来の存在部位である黒質への細胞移植は手技的に難しいこと、また仮に黒質に移植したとしても線条体にその軸索を投射させる手法がないことから線条体への細胞移植が行われており、Open-label study では、L-dopa 非服用時における unified Parkinson's disease rating scale (UPDRS)の運動スコアで 30-40 %の運動障害の軽減、1日のうちで L-dopa が無効な時間(off)の 43-66 %の減少、1日あたりに必要な L-dopa の 16-77 %の減量など、実際ある程度奏効している²⁴⁾。線条体に投射しているドパミンニューロンの軸索終末からドパミンが放出される機構は十分には解明されていないが、ドパミンは他の伝達物質とは異なって単に細胞間隙に一定量が徐々に漏れだしていれば十分であるとの考えもある。カプセル化細胞の線条体移植実験²⁵⁾はこの仮説を支持するものである。また、上記の細胞移植治療が奏効することもこの推測に反しない。以上の知見を総合すれば、ドパミン合成に必要な酵素遺伝子を線条体の神経細胞に導入してドパミンを産生させれば症状が改善することが期待される。これが本臨床研究の基本的なコンセプトである。

遺伝子導入療法第2の戦略は、線条体の細胞に神経栄養因子を産生させる方法である。神経細胞が長期間にわたって生存していくためには、神経栄養因子の存在が必要である。神経変性疾患では、例えばパーキンソン病ではドパミンニューロンが障害され、アルツハイマー病ではアセチルコリンニューロンが障害され、筋萎縮性側索硬化症では運動ニューロンが障害されるというように、特定の系統のニューロンが障害される。特定の機能を持ったニューロンには、その生存に必要な栄養因子が存在し、その栄養因子の欠乏によって神経変性疾患が発病するという説がある。パーキンソン病ではドパミン細胞の生存に必要な栄養因子の不足が、ドパミン細胞の変性脱落を加速している可能性がある。そこで神経膠細胞由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor : GDNF) をはじめとするドパミン細胞の栄養因子を線条体に補充する治療が考慮されている。神経栄養因子は分子量が大きいため、血液脳関門を通過することができない。持続的に脳室内へ投与する工夫もあるが、感染の危険もあって臨床応用は現実的には難しい。そこで遺伝子導入によって、線条体の細胞に神経栄養因子を産生させる方法が考えられた²⁶⁾。2004年から、AAVベクターを使用して GDNF 類似の神経栄養因子である neurturin の遺伝子を被殻に導入する遺伝子治療の臨床試験が米国で開始された。

第3の戦略は、抑制性伝達物質である GABA の合成酵素である glutamic acid decarboxylase (GAD-65 および GAD-67) の遺伝子を視床下核の細胞に導入して、視床下核の出力を興奮性から抑制性に変換する方法である²⁷⁾。パーキンソン病では視床下核の神経細胞の活動性が異常に亢進しており、これが症状発現に大きく関与していることが、様々なデータから推察されている。2003年8月には、米国で AAVベクターを使用したこの方法による臨床試験が開始され、成果が注目されている。しかし、この方法では、視床下核の過剰な抑制に陥る可能性や、視床下核内の機能局在により遺伝子導入の効果が異なる可能性がある。

このように、従来の薬物療法や手術療法では L-dopa の効果が減弱した進行例に対する治療には限界があり、また遺伝子導入以外の新しい治療法はそれぞれの問題があつて、直ちに広く臨床応用することは難しい。本研究では進行したパーキンソン病に対する新しい治療法として、ドパミン合成を促進する遺伝子治療を選択した。予定されている AADC 遺伝子の導入と L-dopa の経口投与を組み合わせる方法は安全性も高く、動物実験において有効性も確認されていることから、遺伝子治療臨床研究の第一歩として、この方法を採用した。

今回使用する臨床用 AAV ベクターについては、米国 Avigen 社（1301 Harbor Bay Parkway, Alameda, CA 94502）によって作製された。同社と本研究チームは約 10 年間にわたって AAV ベクターに関する共同研究を幅広く進めてきた。Avigen 社は AAV ベクターを用いた遺伝子治療法の開発を主目的に設置されたベンチャー企業であり、血友病 B に対する遺伝子治療臨床研究を実施したことで知られている。同社は 2 番目の遺伝子治療対象疾患としてパーキンソン病を取り上げ、その戦略としては、AADC 発現 AAV ベクターと L-dopa 内服を組み合わせる方法を採用した。我々は、チロシン水酸化酵素 tyrosine hydroxylase (TH) 発現 AAV ベクター／AADC 発現 AAV ベクター／GTP cyclohydrolase I (GCH) 発現 AAV ベクターの三者を組み合わせる遺伝子治療法の開発を行い、パーキンソン病モデルサルでその有効性を確認しているが、臨床応用の第 1 段階としてはドパミン産生量の制御が簡単であり、かつ 1 種類のベクターで済む Avigen 社の方法が適していると判断し、Avigen 社の臨床プロトコルにほぼ沿った形で最初の臨床研究を実施することとした。この AAV-hAADC-2 と L-dopa 内服を組み合わせる遺伝子治療法に関しても、パーキンソン病モデルサルを用いた前臨床研究で、その安全性と有効性を既に確認している。

Avigen 社は、本遺伝子治療法（Phase 1 clinical trial using AV201）に関して慎重に準備を進め、2004 年に米国 FDA から IND としての承認を受け、同年 12 月 16 日に第 1 例目の遺伝子治療を米国 UCSF（400 Parnassus Ave. San Francisco, CA 94143）で実施した。本研究チームも、ここ数年、Avigen 社とパーキンソン病の遺伝子治療に関して話し合いを行ってきており、2004 年に入ってから具体的な交渉を進めてきた。また、2004 年 10 月と 12 月には、Avigen 社の担当者が自治医科大学を訪問し、米国の臨床試験の概要説明・自治医科大学の関係施設の視察などを行った。2005 年 7 月 20 日に UCSF で実施された第二例目の遺伝子治療手術は、申請者らの立ち会いのもとで行われた。その上で、自治医科大学と Avigen 社との間でパーキンソン病遺伝子治療のための臨床用 AAV ベクターの提供に関する契約（Clinical Research Agreement:CRA）を締結し、本学での遺伝子治療第 I/II 相臨床研究を実施することとなった。この CRA は 2005 年 8 月 12 日付けで締結された（資料 1）。自治医大における具体的な遺伝子治療プロトコルに関しては、細部については米国 UCSF と全く同じものにする必要はないこと、自治医科大学では UCSF のプロトコルでの第二用量に相当する AAV ベクター量からスタートできることが確認されている。なお、Avigen 社がパーキンソン病の遺伝子治療を目的に AAV-hAADC-2 を提供する施設としては、今のところ、米国では UCSF、米国外では自治医科大学の 2 箇所に限定されている。

2005 年 12 月 17 日に Avigen はこの遺伝子プロトコルを米国の Genzyme 社に売却したため、今後 Genzyme 社からベクターの供給を受けることとなる。本臨床研究で使用する予定のベクターは既に Avigen 社により製造されており、現在は Genzyme 社に保管されている。上述した Avigen 社と自治医科大学間の契約（CRA）は Genzyme 社が引き継ぐことを確認している（資料 1）。

6 遺伝子の種類およびその導入法

(1) 人に導入する遺伝子の構造と性質

① 人に導入する遺伝子の構造

ヒト AADC 遺伝子は第 7 染色体上に位置する 85,000 塩基対以上におよぶ大きな DNA で、メッセンジャー RNA に対応する 15 のエキソンからなり、各々のエキソンは 20 ないし 400 塩基対、イントロンは 1,000 ないし 17,700 塩基対の長さである²⁸⁾。本研究ではメッセンジャー RNA から逆転写で合成されたヒト AADC の相補的 DNA を治療遺伝子として用いるが、イントロンが除かれている点が、もとのゲノム DNA とは異なる。この相補的 DNA はヒト褐色細胞腫の相補的 DNA ライブラリーをもとに、480 個のア

ミノ酸をコードする 1,440 塩基対と終止コドンを含む 1,443 塩基対として単離されている。この相補的 DNA を、アンピシリン耐性遺伝子を含むプラスミドベクターに組み込み、そのプラスミドベクターで形質転換した大腸菌を培養する。この後、大腸菌よりプラスミド精製用陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて必要量のプラスミドベクターを調製する。

② 人に導入する遺伝子の性質

本研究では、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（図 1）。導入遺伝子が AAV ベクターにより染色体に組み込まれる可能性は極めて低く、導入遺伝子は基本的に染色体外に存在すると考えられている。AAV ベクター内では導入遺伝子は 1 本鎖 DNA であるが、細胞内で 2 本鎖 DNA に変換され導入遺伝子が発現する。ラットでは、この AAV ベクターによる発現は 1 年以上持続することが示唆され、サルにおいても遺伝子導入の効果が 3 年以上持続することが示されている。

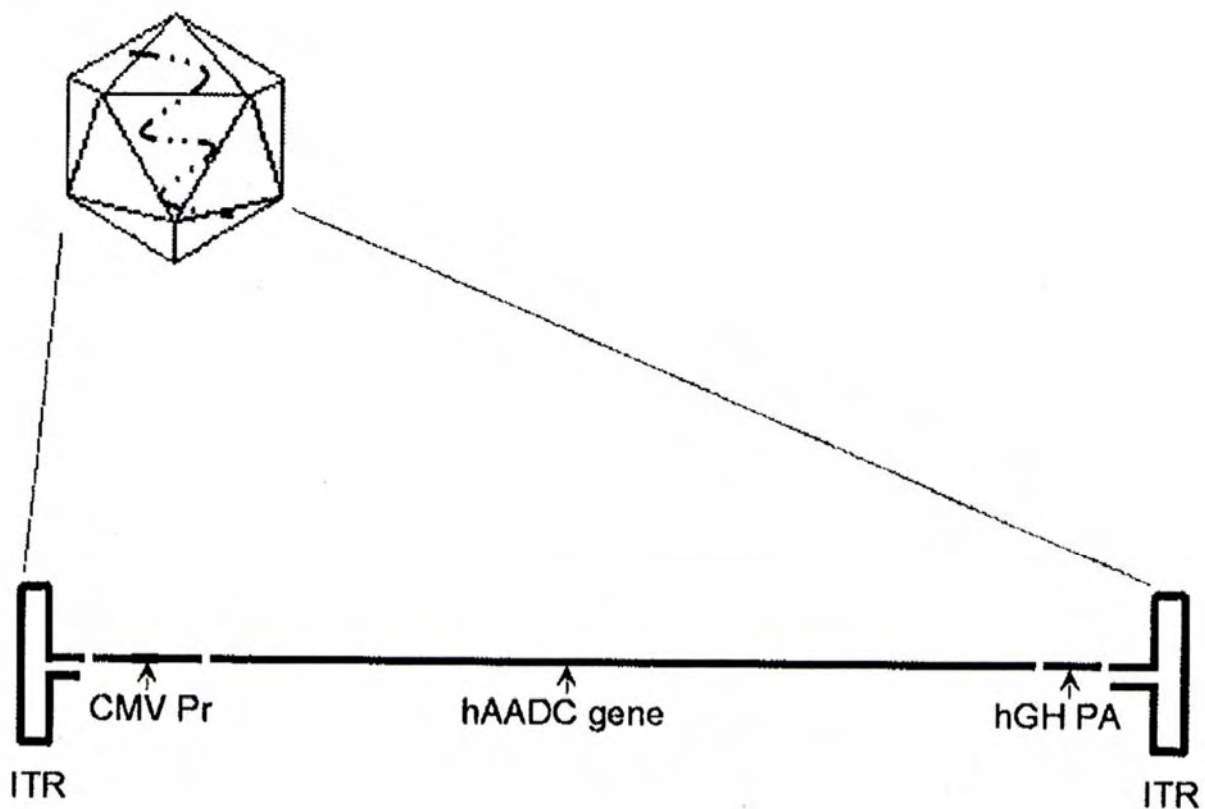


図 1：ウイルスベクターに搭載される遺伝子

AAV 由来の塩基配列は両端に存在する ITR 以外の部分が除かれ、サイトメガロウイルスのプロモーター/エンハンサー (CMV Pr)、ヒト AADC 遺伝子 (hAADC gene)、ヒト成長ホルモンのポリ A 配列 (hGH PA) によって置換されている。

③ 導入遺伝子からの生成物の構造およびその生物活性

AADC は 53.9kDa の 2 量体として存在し、ドパミンやセロトニンなどの神経伝達物質の合成にかかわっている。この酵素は、チロシン水酸化酵素により生合成された L-dopa の脱炭酸によりドパミンを合成する。本研究では、経口投与する L-dopa の投与量を調節することにより、AADC によるドパミンの合成量を制御することが可能である。また、AADC はトリプトファン水酸化酵素により生合成された 5-HTP (5-hydroxytryptophan) の脱炭酸によりセロトニンを合成するが、AADC により内因性の 5-HTP から生成されるセロトニンの量は生理的範囲内である。

(2) 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質

本計画では他の組換え DNA は使用しない。

(3) 標的細胞とした細胞の由来および生物学的特徴ならびに当該細胞を標的細胞とした理由

パーキンソン病では、線条体に投射している黒質ニューロンの脱落によって、線条体のドパミンが欠乏している。このため、黒質の神経細胞や、黒質-線条体路の投射先である被殻の神経細胞を標的として遺伝子導入を行うことが、治療効果を得るために効果的であると期待される。本計画では安全性を考慮し、被殻に存在する自己の神経細胞を標的として遺伝子導入を行い、ドパミンを産生させる。

(4) 遺伝子導入方法の概略および当該導入法を選択した理由

遺伝子導入法に関しては、ウイルスベクターあるいは非ウイルスベクターが用いられるが、それぞれには一長一短があるため、標的細胞の種類や必要とされる発現期間などを考慮して目的に応じて使い分ける必要がある。神経細胞に遺伝子導入する場合には、①非分裂細胞である神経細胞に目的遺伝子を効率よく導入できること、②導入遺伝子が長期間にわたり発現すること、③生体に対して安全であること、が求められる。アデノウイルスベクターは細胞障害性が強く、導入遺伝子の発現が一過性である。レンチウイルスベクターは非分裂細胞に遺伝子を導入可能であるが、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) を基本骨格としており、前臨床試験において十分に研究されておらず安全性の面で問題がある。AAV ベクターは神経細胞に効率よく遺伝子を導入できること、細胞毒性が少なく、静止期細胞で長期間発現が望めること、非病原性のウイルスを基本骨格としていることから上記 3 条件を満たす。霊長類の AAV には 2 型をはじめとして複数の血清型が同定されている (表 1)。またさらに多数の遺伝子型が存在する可能性が指摘されている。5 型では神経細胞以外にグリア細胞にも導入遺伝子の発現が多く認められるが、2 型 AAV は比較的特異的に神経細胞で導入遺伝子が発現する。米国では 2 型 AAV ベクターのみが臨床研究に使用することを認められており、血友病に対して第 IX 凝固因子発現 AAV ベクターの骨格筋²⁹⁾および肝臓への注射³⁰⁾、パーキンソン病に対してグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) 発現 AAV ベクターを視床下核に注入する臨床研究²⁷⁾および神経栄養因子である neurturin 発現 AAV ベクターを被殻に注入する臨床研究が既に行われている。以上のことから今回の臨床研究では 2 型 AAV ベクターを利用するのが最適と考えられる。

表 1. 霊長類 AAV の血清型

血清型	2 型との相同性	由来	レセプター	標的組織
1	中	サル	シアル酸	骨格筋
2	-	ヒト	ヘパラン硫酸ブ ロテオグリカン	神経
3	高	ヒト	不明	神経
4	低	サル	シアル酸	脳室上皮
5	低	ヒト	シアル酸	気道・網膜・神経
6	中	1+2 型	不明	骨格筋
7	中	サル	不明	骨格筋
8	中	サル	不明	肝臓
9	中	ヒト	不明	気道・肝臓・骨格筋

(5) ウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行う場合

① AAV-hAADC-2 の野生型ウイルスの生物学的特徴および人に対する影響

2 型 AAV はパルボウイルス科デPENDウイルス属に分類される直径約 26 nm のエンベロープを持たない球形ウイルスである。VP1 (82 kDa)、VP2 (65 kDa)、VP3 (60 kDa) が 1:1:10 の比率で合計 60 分子が集まって約 3,600 kDa のキャプシドを構成している。ゲノムは 4,679 ヌクレオチドからなる 1 本鎖 DNA (約 1,500 kDa) であり、プラスとマイナス鎖がほぼ同じ比率で混在する。ゲノム両末端 145 ヌクレオチドは T 字型ヘアピン構造を形成しており inverted terminal repeat (ITR) と呼ばれる。AAV ゲノムには *rep* と *cap* 遺伝子がありそれぞれ非構造蛋白質とキャプシド蛋白質をコードしている。AAV はアデノウイルス、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でき、単独では増殖できない。単独で細胞に感染した場合、第 19 番染色体の AAVS1 領域 (19q13.42) に特異的にそのゲノムを組み込み、潜伏感染の状態となる。ヘルパーウイルスと同時に感染したり、潜伏感染状態でヘルパーウイルスが感染したときに AAV の増殖が起こる (図 2)。2 型 AAV は呼吸器を主たる感染経路として人から人へ感染するとされている。大部分は不顕性感染で AAV の感染に伴う特有の疾患は報告されておらず、非病原性と考えられている。米国での調査によると出生直後は AAV に対する抗体は検出できないが、学童期で人口の 50 % 以上で抗体が陽性となる。*rep* 遺伝子より合成される Rep 蛋白質は過剰発現すると細胞増殖を抑制したり、ヘルパーウイルスを含めた他のウイルスの複製も抑制する。ウイルス粒子は物理化学的に極めて安定で、pH 3 から 9 の間で不活化されず、また 56℃、1 時間の処理でも不活化されない。

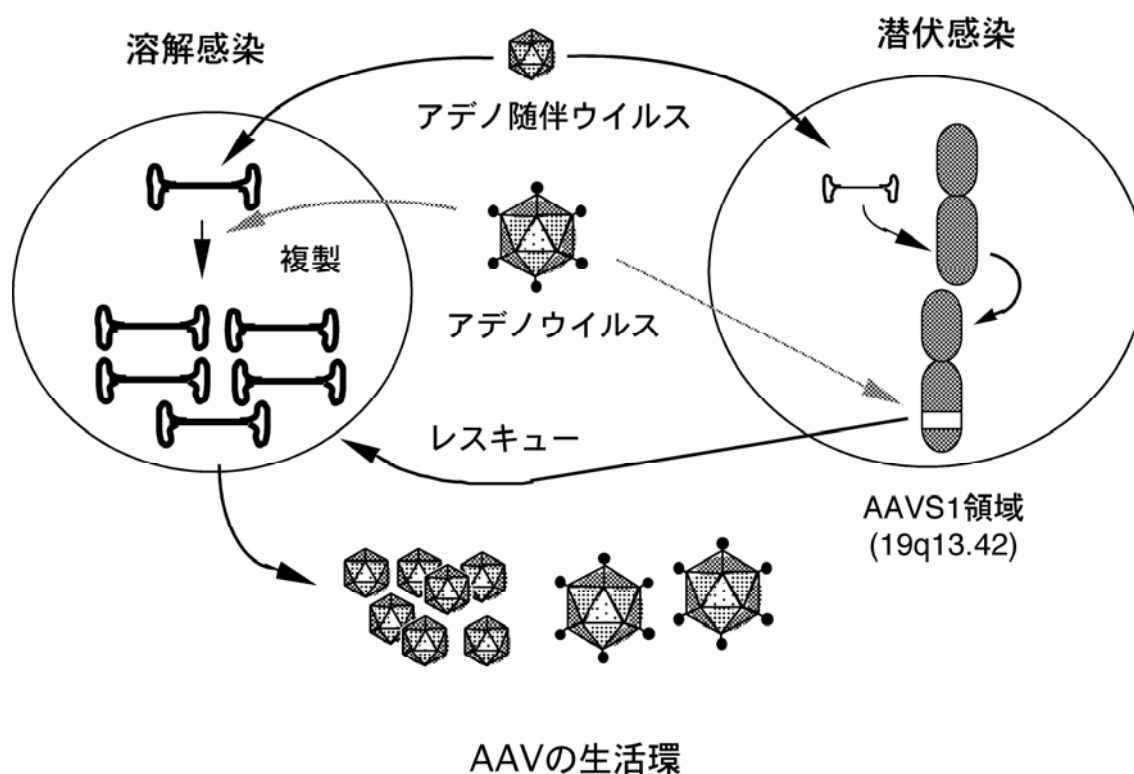


図 2

② AAV-hAADC-2 の作製方法

AAV ゲノムの ITR を除き *rep*、*cap* 遺伝子をクローニングした AAV ヘルパープラスミド (pHLP19)、サイトメガロウイルスのプロモーター／エンハンサー、CMV／ β グロビンキメライントロン、ヒト AADC 遺伝子、ヒト成長ホルモン遺伝子ポリ A シグナルからなる AADC 発現カセットを ITR 間に挿入した AAV ベクタープラスミド (pAAV-hAADC-2)、そして 2 型アデノウイルスの E2A、E4、VARNA 遺伝子をクローニングしたアデノウイルスヘルパープラスミド (pladeno5) の 3 種類をリン酸カルシウム法にて HEK293 細胞にトランスフェクションする³¹⁾。トランスフェクション 3 日後、細胞を回収し凍結融解操作で細胞内の AAV ベクターを遊離させ 2 回の塩化セシウム密度勾配超遠心によって精製する。10 mM リン酸ナトリウム／140 mM NaCl／5 % ソルビトール溶液 (pH 7.4) にて透析を行い、Poloxamer 188 を最終濃度 0.001 % になるよう加え、0.22 μ m のフィルターで滅菌処理を行いウイルスベクター液とする。使用する培地、血清、試薬等は全て米国の Food and Drug Administration (FDA) の good manufacturing practice (GMP) 規格に適合しており、Avigen 社の内部規定に基づいて作製されている。

ITR は AAV キャプシドへのパッケージングシグナルであるが、*rep*、*cap* 遺伝子を持つ AAV ヘルパープラスミド pHLP19 は ITR 配列を持たないため、replication-competent AAV の出現は極力抑えられている。また *rep* 遺伝子の p5 プロモーター配列は AAV ヘルパープラスミドと AAV ベクタープラスミドの間で組換えを促進し、偽野生型 AAV の産生を起こすことが知られているが p5 プロモーターの TATA box を破壊し *rep*、*cap* 遺伝子のポリ A 配列の下流に移動させることにより偽野生型 AAV が生じなくなることがわかっている。pHLP19 では偽野生型 AAV の産生を抑えるため p5 プロモーター配列を移動してある³²⁾。

③ AAV-hAADC-2 の構造

ウイルスキャプシドは野生型ウイルスと異ならない。キャプシド内に組み込まれているベクターゲノムは 3,466 ヌクレオチドからなり、両末端の ITR は野生型と同じであるがその間にはヒト AADC を発現させるための、サイトメガロウイルスのプロモーター／エンハンサー、CMV／ β グロビンキメライントロン、ヒト AADC 遺伝子、ヒト成長ホルモン遺伝子ポリ A シグナルに置き換えられている。

④ AAV-hAADC-2 の生物学的特徴

AAV はヘパラン硫酸プロテオグリカンを受容体として感染する。この分子は色々な細胞表面に存在すると考えられるため AAV の組織特異性は低い。人以外の動物でも感染が成立すると考えられている。AAV ベクターは神経細胞、肝臓、骨格筋、心筋などで効率の良い遺伝子発現が起こる。1 本鎖ベクターゲノムは核内でその相補鎖とアニールしたり、宿主の DNA 合成酵素の働きで 2 本鎖となり導入遺伝子を発現できるようになる。また、2 本鎖となったベクター DNA は複数が連なり環状 DNA を形成したり、コンカタマーを形成し、その一部が染色体に組み込まれると考えられる。AAV ベクターにより分裂細胞、静止期の細胞双方に遺伝子導入が可能であるが、発現様式に違いがある。分裂細胞では宿主 DNA 合成酵素の働きで発現型 2 本鎖に変換され感染直後より良好な導入遺伝子の発現が認められる。染色体に組み込まれていない導入遺伝子は細胞分裂に伴い希釈され失われてゆき、染色体に組み込まれた導入遺伝子を持つ細胞が最終的に長期発現を維持する。一方静止期細胞では相補鎖同士のアニーリングが 2 本鎖ゲノムの主たる合成経路と考えられ、約 1 ヶ月程かかって徐々に導入遺伝子の発現が上昇してゆき、染色体外でコンカタマーの形態で長期間にわたって安定に保持される (図 3)。動物実験では年余にわたる導入遺伝子の発現も報告されている。AAV ベクターゲノムの染色体での組込み部位は、*rep* 遺伝子を欠いているため AAVS1 領域へは組み込まれず、ランダムに組み込まれるが³³⁾、その組込み効率は極めて低いと考えられている。マウスでの肝臓での組込み部位の解析では組込みは遺伝子存在領域に組み込まれていることが多く、組込み部位近傍のゲノムが約 2 kb 程まで欠失していることもある³⁴⁾。ITR は弱いながらプロモーター活性を持つが、内向きにプロモーター活性を持ち³⁵⁾、また染色体への組込みに伴い欠失することが多く、組込み部位近傍の遺伝子の発現を誘導する可能性は少ない。

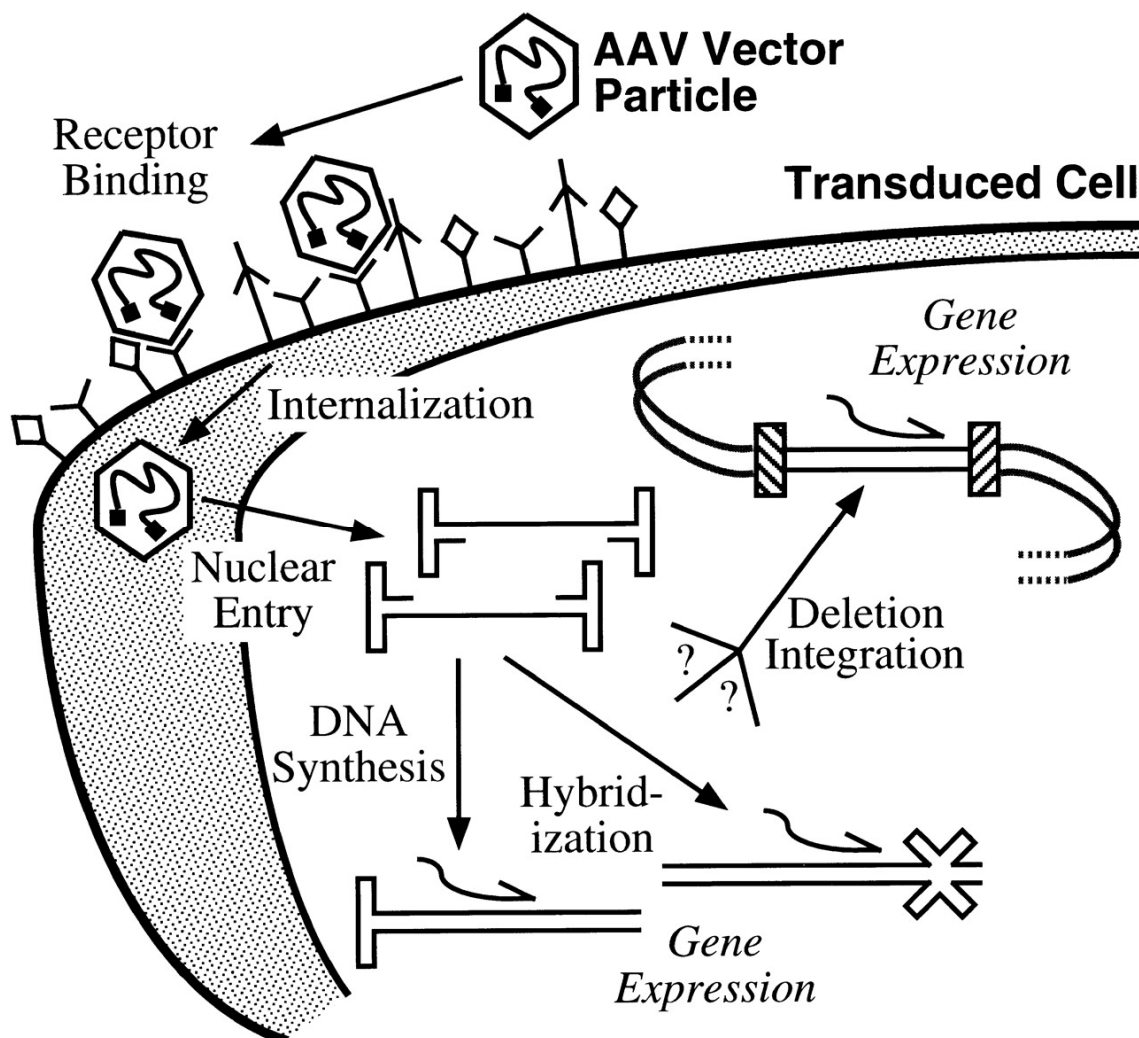


図 3. AAV の感染と発現様式²⁶⁾

7 安全性についての評価

(1) 遺伝子導入方法の安全性

① 遺伝子導入に用いる AAV ベクターの純度

組換えウイルスの製造および純度の検定は、ベクター供給元である米国 Avigen 社および 2006 年以降は Genzyme 社において行う。本研究においては、米国 FDA による医薬品および医療用装置に関する GMP の認可を受けた品質管理のための設備を有している Avigen 社において製造されたロットを用いる。ベクターはポリエチレングリコールによる沈殿の後、2 度にわたる塩化セシウムを用いた密度勾配遠心分離により精製される。ベクターは最終濃度 5 % のソルビトールならびに 0.001 % の Poloxamer 188 を含む pH 7.4 の PBS (Phosphate-buffered Saline) 内に浮遊しており、患者に投与する際には必要に応じてこの溶液でベクター溶液を希釈する。これらの物質はいずれも米国で医薬品添加物として認可されたものであり、純度および安全性に問題のないものを用いることとする。最終的なベクター溶液は無色・無臭であり、エンドトキシンの含有量は (10 EU/ml 以下) である。混入蛋白質は SDS-PAGE によって検定し、300 ng (5×10^{10} vg) のベクターを電気泳動・銀染色して確認した場合にウイルス由来以外のバンドが検出されないこととする (10 ng 以下に相当)。また、ウェスタン法によってもウイルス構造蛋白質に該当する分

子量以外のバンドは認められないこととする。一方、産生細胞およびプラスミドに由来する DNA の混入についてはそれぞれ特異的な配列を標的とした定量的 PCR 法を用いて検討し、基準は 120 pg/ml 以下とする。エンドトキシンは LAL アッセイにより測定し、基準は 10 EU/ml 以下とする。この方法の測定感度は 0.005 EU/ml である。また、精製に使用した塩化セシウムの残留に関しては、NEL Laboratories において ICP-MS 法により測定する。この方法の感度は 5 ng/mL であり、1.4 μ g/ml 以下を合格とする。無菌性の確認は BioReliance 社に委託して行われ、14 日間にわたる培養で細菌および真菌が検出されないことを基準とする。なお、本研究で使用するヒト AADC 遺伝子を搭載した 2 型 AAV ベクター (AAV-hAADC-2) の品質検査の結果を添付する (参考資料 2)。

② 患者に投与する AADC 遺伝子の純度およびその安全性

AAV-hAADC-2 に搭載されたヒトサイトメガロウイルスプロモーター (略称 CMV) は、ヒト AADC 遺伝子のみを転写し AADC (EC 4.1.1.28) が発現する。また、ヒト成長ホルモンの poly A 付加シグナル (略称 GH pA) により転写が終了する。細胞培養および動物実験において AADC の過剰発現による毒性は報告されていない。

③ 増殖性ウイルスの出現の可能性

元来野生型の AAV は単独では複製できず、複製するためにはアデノウイルスや単純ヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスの存在を必要とする。さらに AAV ベクターは構築の段階でウイルス由来の遺伝子の大部分が除去されているため、ヘルパーウイルスが存在しても複製することはできない。唯一の可能性としてベクター作製時に非相同組換えにより生成した野生型 AAV がヘルパーウイルスの存在下で複製することがあり得る。野生型 AAV の混入を検出するため、作製したベクターを野生型のアデノウイルスとともに HEK293 細胞に感染させ、低分子量の DNA を回収し電気泳動を行って AAV に相当するバンドを確認する。この方法の検出感度は 10^7 ゲノムあたり 1 コピーであり、検出感度以下を基準とする。

④ 遺伝子導入に用いる AAV ベクターの細胞傷害性

AAV ベクターを用いた場合の細胞傷害性は一般に低い。本研究に用いる濃度以上の AAV ベクターをサル脳の脳内に注入した前臨床研究では、細胞傷害性は認められなかった。これまで血友病 B に対して行われた臨床研究においては、AAV ベクターの肝臓への遺伝子導入を行った 2 例で軽度の肝逸脱酵素の一過性上昇が認められたが³⁶⁾、骨格筋内への注入では悪影響は認められていない。米国で行われているパーキンソン病に対する AAV ベクターによる 3 種類の遺伝子治療については、2006 年 8 月の時点で手術操作によって生じたと推察される軽度の頭痛が報告されているのみで、ベクター自体によると考えられる副作用は生じていない。今回の治療により細胞傷害が起こる可能性は極めて低いものと考えられる。

⑤ 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

AAV ベクターを用いた血友病 B の臨床研究において、肝動脈経路でベクターを投与した際に、数週間精液中へのベクターの排出が認められた。しかしながら、その後の検討で、生殖細胞に対して高力価のベクターを作用させた場合にも、遺伝子導入が起こる可能性は極めて低いことが示された³⁷⁾。本研究では血友病の臨床研究に用いられた量のおおよそ 1/100 程度の量のベクターを頭蓋内に局所投与するものであり、標的とした神経細胞以外に顕著な遺伝子導入が起こる可能性は低い。サルの脳へのベクター投