

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成26年 7月23日

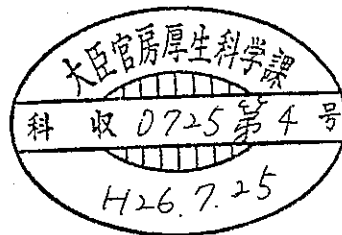
厚生労働大臣 殿

実 施 施 設	所在地	〒329-0498 栃木県下野市薬師寺3311-1
	名称	自治医科大学附属病院 (電話番号) 0285-44-2111 (FAX 番号) 0285-40-8303
	代表者 役職名・氏名	自治医科大学附属病院長 安 田 是 和 (職印)

下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実施計画に対する意見を求めます。

記

遺伝子治療臨床研究の課題名	総括責任者の所属・職・氏名
AADC欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究	自治医科大学 医学部小児科学 教授 山 形 崇 倫 



別紙様式第1の添付

遺伝子治療臨床研究 実施計画 概要書

平成26年7月23日 (申請年月日)

研究の名称	AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究		
研究実施期間	最終登録症例にベクターを投与した時点から9か月後まで		
総括責任者	所属部局の所在地	栃木県下野市薬師寺 3311-1 (郵便番号 329-0498)	
	所属機関・部局・職	自治医科大学医学部小児科学・教授	
	氏名	山形 崇倫 	
実施の場所	所在地	栃木県下野市薬師寺 3311-1 (郵便番号 329-0498)	
	名称	自治医科大学附属病院 病院長 安田是和	
	連絡先	栃木県下野市薬師寺 3311-1 (電話番号 0285-44-2111)	
総括責任者以外の研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	・村松慎一 ・小澤敬也 ・小坂仁 ・渡辺英寿 ・中嶋剛 ・五味玲 ・水上浩明 ・竹内護 ・多賀直行 ・門田行史 ・中村幸恵 ・小野さやか ・吉尾卓 ・山崎晶司 ・加藤光広 ・瀬川昌也 ・野村芳子 ・一瀬宏 ・佐藤俊彦 ・峰野純一	- 自治医科大学・神経内科学部門・教授 - 自治医科大学・免疫遺伝子細胞治療学・客員教授 - 自治医科大学・小児科学学・教授 - 自治医科大学・脳神経外科学・教授 - 自治医科大学・脳神経外科学・助教 - 自治医科大学・脳神経外科学・教授 - 自治医科大学・遺伝子治療研究部・学内教授 - 自治医科大学・麻酔科学・集中治療医学・教授 - 自治医科大学とちぎ子ども医療センター小児手術・集中治療部・准教授 - 自治医科大学・小児科学・講師 - 自治医科大学・小児科学・大学院生 - 自治医科大学・神経内科学・助教 - 自治医科大学・臨床研究支援センターとちぎ臨床試験推進部・部長 - 自治医科大学・臨床研究支援センターとちぎ臨床試験推進部・副部長 - 山形大学医学部・小児科学・講師 - 瀬川クリニック・院長 - 瀬川クリニック・副院長 - 東京工業大学生命理工学研究科・教授 - 宇都宮セントラルクリニック・院長 - タカラバイオ株式会社 バイオ産業支援事業部門・本部長	- 適応患者の選択・評価およびウイルスベクターの管理 - ウイルスベクターに関する全般管理 - 患者の管理・評価 - 脳内へのベクター注入の管理・助言 - 遺伝子導入のための定位脳手術実施 - 遺伝子導入の定位脳手術、術後管理 - ウイルスベクターの管理・検出 - 麻酔・術後管理 - 麻酔・術後管理 - 患者の管理・評価 - ウイルスベクターの管理、患者の管理、評価 - PET 解析 - 試験実施の支援 - 試験実施の支援 - 対象患者の治療前および安定後の診察 - 対象患者の治療前および安定後の診察 - 対象患者の治療前および安定後の診察 - ベクター品質評価・患者検体解析 - PET 実施 - ベクターに関する技術支援

審査委員会が研究計画の実施を適当と認める理由	審査委員会では、提出された遺伝子治療臨床研究実施計画書「AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究」を慎重に審査した結果、本遺伝子治療臨床研究実施計画書は、遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成 14 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号、平成 16 年文部科学省・厚生労働省告示第 2 号により全部改正、平成 20 年文部科学省告示第 2 号により一部改正以下「国の指針」という。）の必要条件を全て満たしていると認められたため、所管官庁に遺伝子治療臨床研究実施計画を申請することを決定した。	
	審査委員会の長の職名	氏名
	自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会 委員長 自治医科大学地域医療学センター 地域医療学部門 教授	梶井英治  (印)
研究の区分	○遺伝子治療臨床研究 遺伝子標識臨床研究	

4 遺伝子治療臨床研究の目的	本臨床研究は、ヒト芳香族 L アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)欠損症患者の線条体（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、運動症状を改善することを目的とする。
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) AADC 欠損症の現状と遺伝子治療臨床研究を選定する理由 ① AADC 欠損症に関する現時点での知見 AADC 欠損症 (OMIM608643)は、カテコールアミンとセロトニンを合成する酵素である AADC をコードする遺伝子の変異により発症する常染色体劣性遺伝性疾患である。 現在、世界中で報告例は 100 症例未満である。日本では、4 例診断されているが、脳性麻痺との鑑別が困難な場合もあり、正しく診断を受けていない症例も多いと考えられる。 AADC は、チロシンからチロシン水酸化酵素により生成された L-dopa をドパミンに、また、トリプトファンからトリプトファン水酸化酵素により生成された 5-OH-tryptophan をセロトニンに代謝する酵素で、ドパミンからは、ノルエピネフリン、エピネフリンが合成されるため、これらのカテコールアミン全体が低下する。また、セロトニンからメラトニンが合成されるために、メラトニンも低下する。 AADC 欠損症は、カテコラミンとセロトニンの合成が障害されることにより、乳幼児期に重度の運動障害で発症する。筋緊張低下、眼球上転発作を主症状とし、知的障害、発達の遅れ、運動異常、体温異常、摂食困難などを伴う。また、メラトニン低下による睡眠障害も来す。 発症年齢は、典型例では生後 1 か月以内に、過半数が 6 か月以下で発症する。新生児期には、筋緊張低下、哺乳困難、易刺激性、眼瞼下垂、低血圧、低血糖などを呈し、その後、運動障害を主体とした症状が出現してくる。主症状は、眼球上転発作あるいは注視痙攣、四肢ジストニア、全身性アテトーゼ、随意運動の障害、ジストニア発作、重度精神運動発達遅滞などである。てんかんの合併例も報告されている。また、自律神経機能障害による、心拍・血圧の調整障害、発作性発汗、唾液分泌増加や、情緒不安定、睡眠障害もみられる。生下時から動きが少なく、頸定が得られず、生涯臥床状態である患者がほとんどである。重症例では、症状の進行とともに嚥下困難や呼吸障害が出現し、多くの例が小児期に死亡する。台湾での死亡例 10 例の平均死亡年齢は 4.6 ± 2.0 歳（1.0-7.0 歳）と報告されている。画像所見として、頭部 MRI 上、24%で大脳萎縮、白質変性様の所見、脳梁ひ薄化等の異常が報告されているが、大半の例では有意な所見を示していない。PET (2-deoxy-2-[^{18}F] fluoro-D-glucose 使用)で、前頭前野皮質と両側基底核の糖代謝の低下が示されている。また、PET で判る活性評価として、AADC の基質である

	fluorodopa (FDOPA)をラベルした 6-[¹⁸F]fluorodopa (FDOPA)—PET で FDOPA の基底核への取り込みが低下している。 線条体の機能不全はAADC欠損症の主な運動症状であるジストニアと随意運動の障害の原因となり、前頭前野の機能不全が精神遅滞症状をひきおこす原因の一つとなっていると考えられる。 診断は、上記の臨床症状などから疑われた例に対し、髄液中のカテコールアミン代謝産物を測定する。L-dopa 高値、homovanillic acid 低値の特徴的所見が得られた場合、AADC 欠損症と診断する。確定診断は、血漿中あるいはリンパ球等での AADC 活性の低下、あるいは AADC 遺伝子変異同定が必要である。 ② 当該遺伝子治療臨床研究の概要 AADC 遺伝子を搭載した AAV ベクター (AAV-hAADC-2) を AADC 欠損症患者の線条体 (被殻) に定位脳手術的に注入する。AADC 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 を特異的基質とする酵素であり、AADC を注入することにより、ドパミンやセロトニンの欠乏状態が改善される。本臨床研究では、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、主に黒質-線条体路のドパミン活性が上昇することにより、運動機能を中心に症状の改善が期待される。 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 AADC 欠損症の軽症例に対しては、薬物療法により運動機能が改善した報告がある。また、基質結合部位に変異を持つ例で L-dopa 内服によりジストニア、筋緊張低下と発語が改善し、歩行が可能になった例が報告されている。しかし、典型例では、ジストニアや筋緊張低下がやや改善した例はあるが、運動発達が得られた例はなく、全く反応がない例がほとんどであり現状では、AADC 欠損症に対する有効な治療法はない。 AADC 欠損症に対する新しい治療戦略として画像上、構造的な異常が検出されず、機能的な異常が主体でありドパミン、セロトニン系の機能を改善することにより、脳機能の回復する可能性が考えられ、遺伝子治療による機能回復が期待されている。 2012 年に、台湾から、遺伝子治療成功例が報告された。方法は、ヒト AADC 遺伝子を組み込んだ 2 型 AAV ベクター (AAV-hAADC-2) を AADC 欠損症患者の線条体 (被殻) に、定位脳手術的に注入した。治療効果として、臥床状態から立位可能になった患者もあるなど、運動機能に関して著明な改善を得た。副作用は、一過性のジスキネジアとチアノーゼを伴う無呼吸発作の反復があったが、これらの副作用はいずれも軽快した。これらの点から、また、患者家族からの強い希望もあり、遺伝子治療研究実施を計画した。
6 遺伝子の種類及びその導入方法	(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 の塩基対、イントロンは 1,000 ないし 17,700 塩基対の長さである。本臨床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。 ② 人に導入する遺伝子の性質 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。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一本鎖 DNA であるが、細胞内で二本鎖 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。さらに米国で実施された Neurturin 遺伝子治療の臨床試験に剖検例では、4 年後にも Neurturin 遺伝子の発現が確認されている。 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 の二量体として存在し、ドパミンやセロトニンなどの神経伝達物質

の合成に関わっている。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。本臨床研究では、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 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

AADC 欠損症では、ドパミン、セロトニンを合成する AADC 自体が欠損しているために、脳内のドパミン、セロトニンが減少している。特に、ドパミンの作用として最も主要である黒質-線条体路が運動機能の調節に重要である。よって、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

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劣る。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 100 以上の血清型が報告されており、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。2 型 AAV ベクターは臨床研究に最も広く使用されており、血友病に対して第 IX 凝固遺伝子発現 AAV ベクターの骨格筋および肝臓への注射、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。

(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ブド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一本鎖 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。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°C 1 時間の処理でも不活化されない。

② AAV-hAADC-2 の作製方法

AAV-hAADC-2 の作製には、以下の 3 種類のプラスミドを使用した。

- 1) pAAV-hAADC-2 : サイトメガロウイルスのプロモーター、 β グロビンイントロン、ヒト AADC cDNA、ヒト成長ホルモン遺伝子ポリ A シグナルからなる AADC 発現カセットを AAV2 の ITR 間に挿入した AAV ベクタープラスミド。
- 2) pRC-BI-khB342-2 : AAV ゲノムの ITR を除き AAV2 の rep、cap 遺伝子をクローニングした pRC2 の SnaBI サイトに、ヒト Bcl-XL 遺伝子及び hsa-miR342 を発現するカセットを挿入した AAV2 ヘルパープラスミド。なお、ヒト Bcl-XL 遺伝子及び hsa-miR342 を発現するカセットは、バイディレクショナルに 2 種の遺伝子を発現可能な pBI-CMV1 のマルチクローニングサイト 2 か所にそれぞれ、ヒト BclXL cDNA 及び hsa-miR342 をクローニング後、発現カセットごと PCR で増幅したものである。
- 3) pHelper : 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。

これら 3 種類のプラスミドをリン酸カルシウム法にて 293T/17 細胞にトランスフェクションする。トランスフェクション 3 日後、細胞を回収し凍結融解酸抽出による操作によって細胞内の AAV ベクターを遊離させ、ベンゾナーゼ処理、PEG 処理による粗精製後、塩化セシウム密度勾配超遠心によって精製する。最終濃度 0.05% 未満の Poloxamer 188 ポリオキシエチレン(160)ポリオキシプロピレン(30)グリコール)を含む pH7.4 の PBS (Phosphate-buffered Saline) にさらに最終濃度 200mM となるように塩化ナトリウムを加えた溶液により、タンジェンシャルフロー・フィルトレーションによりろ過濃縮し、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。

③ AAV-hAADC-2 の構造

AAV ベクター AAV-hAADC-2 は両末端の 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、ヒト β グロビンイントロン、ヒト AADC 遺伝子、ヒト成長ホルモン遺伝子ポリ A シグナルに置換されており、Rep、Cap をコードする配列は持たない。

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。一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 合成酵素の働きで二本鎖となり導入遺伝子を発現できるようになる。また、二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二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二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。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、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。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、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。

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

AAV ベクター AAV-hAADC-2 は、パッケージング細胞 293T/17 に 3 種類のプラスミド

を導入し産生する。AAV ベクター AAV-hAADC-2 を安定かつ安全に供給するために、細胞ならびにプラスミドにはセルバンクシステムを使用する。293T/17 のマスターセルバンク (MCB) は、シードセル (ATCC CRL-11268) より、ワーキングセルバンク (WCB) は 293T/17 の MCB より、タカラバイオ社 (滋賀県大津市瀬田 3-4-1) の GMP 製造施設の管理区域で製造する。また、プラスミドのマスターワーキングセルバンク (MWCB) は、株式会社 AMBiS (沖縄県南城市大里字大里 2013) の GMP 製造施設の管理区域で製造する。組成と品質の確認された培地及び試薬を使用し、特にウシ胎児血清はウシ海綿状脳症非発生国産のものを使用する。

② 患者に投与する AADC 遺伝子の純度およびその安全性

ベクターは (最終濃度 0.05 %未満の Poloxamer 188 を含む pH 7.4 の PBS にさらに最終濃度 200mM となるように塩化ナトリウムを加えた溶液) 内に浮遊しており、患者に投与する際には必要に応じて PBS でベクター溶液を希釈する。PBS はリン酸水素二ナトリウム-リン酸二水素カリウム緩衝生理食塩水である。これらの物質はいずれも国内で医薬品添加物としての使用実績があり、国内承認経口医薬品、欧州薬局方もしくは米国医薬品集の生物学的製剤の製造に適合する製品、又は cGMP 下で製造された製品を使用する。いずれも同一投与経路での承認前例は無いが、静脈内投与、筋肉内投与あるいは皮下注射等での最大使用量を超えない投与量にて使用する。

③ 増殖性ウイルス出現の可能性

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同組換えにより増殖性ウイルスが出現することが考えられるが、ITR をコードする DNA 断片と Rep、Cap をコードする DNA 断片は異なったプラスミド上にあり、その可能性は極めて低いと考えられる。AAV ベクター AAV-hAADC-2 の試験項目に replication competent AAV 否定試験が含まれており、増殖性ウイルス陰性の AAV ベクターのみ臨床使用する。

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。本臨床研究に用いる濃度以上の AAV ベクターをサル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、骨格筋内への注入では悪影響は認められていない。パーキンソン病に対する AAV ベクターによる遺伝子治療については、これまでにベクターに関連する副作用は報告されていない。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。本臨床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与実験 (最大投与量: 4.35×10^{10} vg) では脾臓、心臓、肝臓、卵巣へのベクターゲノムの取込みは認められなかった。

⑥ 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性

本臨床研究では血友病の臨床研究に比べて極めて少ない量のベクターを局所に投与することから、ベクターを投与した患者から有意な量のベクター排出がみられる可能性は低いと考えられる。しかし、ベクターが排出された場合には、本臨床研究の対象となる患者以外に感染する可能性を否定することはできない。ベクター拡散の可能性を最小限にするために、本臨床研究の対象患者はベクター投与後一定の方法で隔離する。また、患者の尿、便、および血液は PCR 法でベクター DNA が陰性になるまで検査する。なお、当施設で実施されたパーキンソン病遺伝子治療臨床研究においては、被験者 6 人全

	員3日間体外へのベクターの排出が認められないことを確認した後、一般病棟へ移動した。 ⑦ 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点 AAV ベクターは遺伝子が導入された細胞の染色体に組み込まれる可能性があるが、その確率や程度は著しく低いものと推定される。宿主細胞の DNA に組みこまれた結果として最も懸念されるのは、外来遺伝子の挿入によりがん遺伝子が活性化したり、がん抑制遺伝子が不活化されたりすることで発がんの危険性が高まることである。遺伝子導入の結果として染色体内へ遺伝子が組み込まれる可能性は完全には否定できないが、極めて低いものと思われる。また、今回遺伝子導入の標的とするのは非分裂細胞と考えられる神経細胞であることから、遺伝子を導入した細胞が腫瘍化する危険性は低いものと考えられる。 ⑧ がん原性の有無 元来、非常に高率（～80%）に肝細胞癌を生じるマウスに AAV ベクターを投与した際に、肝細胞癌の発生率が上昇したという報告があるが、通常の動物では癌原性はほとんどないと考えられる。 (2) 遺伝子産物の安全性 AADC は正常でも線条体内のドパミンニューロン終末に存在する酵素である。この酵素は L-dopa をドパミンに変換する働きを有するので、原料である L-dopa の供給がなくてはドパミンを産生することはできない。したがって本臨床研究では、L-dopa の投与量を調節することで線条体内のドパミン濃度が過剰とならないように制御することが可能であり、遺伝子発現における安全性は高いと考えられる。また、ドパミンの他に AADC により 5-HTP を基質としてセロトニンが生成されるが、内因性の 5-HTP は少量であり、AADC の過剰発現が起こっても生成されるセロトニンの量は生理的範囲内であると予想されるため、これによる副反応は生じないと考えられる。 (3) 細胞の安全性 ① 培養細胞の純度 293T/17 細胞はタカラバイオ社の GMP 製造施設における管理区域内でマスターセルバンク並びにワーキングセルバンクが作製されて使用される。各セルバンクの品質試験において、細菌、真菌、マイコプラズマ、ウイルス等による汚染の有無についてテストされ、安全性が確認されている。細菌および真菌については直接培地に接種する培養法により、細菌、真菌の発現を認めず安全であることが確認された。マイコプラズマに関しては寒天培地及び液体培地を用いた培養法および Vero 細胞を用いた DNA 染色法のいずれでも検出されず安全であることが確認された。ウイルスについては MCB を検体として <i>in vitro</i>、<i>in vivo</i> でウイルスの増殖試験を行ったがウイルスの感染を示す徴候は検出されず 293T/17 細胞の安全性が確認された。 ② 細胞の遺伝子型、表現型の安定性 複数の細胞内酵素（Nucleoside phosphorylase (NP)、Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)、Malate dehydrogenase (MD)、Aspartate aminotransferase (AST)）の発現パターンを電気泳動法によって比較し、他種の細胞の混入の有無をテストし、混入を認めないことを確認している。また実際のベクター作製には 293T/17 ワーキングセルバンクを用いており、表現型が安定している細胞をベクター作製に使用している。 ③ 被検者に投与する細胞の安全性 被験者には細胞成分を投与することはない。
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	台湾において、本臨床研究と同じベクターを用いた AADC 欠損症に対する遺伝子治療実施例が 4 例報告され、効果が得られている。また、重篤な副作用は報告されていない。 当施設で、本臨床研究と同じベクターを用いたパーキンソン病に対する遺伝子治療が 6 例に対して施行し、既に安全性と有効性を確認している。うち 1 名に手術後、静脈性脳出血が認められたが、総括責任者はカニューレの挿入に伴う外科的手技が原因と判断し、AAV ベクターとの関連性は否定された。また世界的に、AAV ベクターを使用した血友病、嚢胞性線維症、その他多くの疾患に対する臨床試験が行われており、これまで 2 型 AAV ベクターに関連した副作用は報告されていない。

	本臨床研究の遂行には、DNA 技術をはじめとする遺伝子工学、パーキンソン病診療、定位脳手術に精通した専門家の協力が必要である。術後管理に関しても、治療後は状態が安定するまで自治医科大学とちぎ子ども医療センターPICUで管理する。当施設はこの条件を満たし、綿密な協力体制が出来上がっており、遺伝子治療臨床研究の実施が可能である。
9 遺伝子治療臨床研究の実施計画	(1) 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画 本臨床研究は抽出を行わない単一用量非対照オープン試験である。 ① 研究の目的 本臨床研究の主要評価項目は、AADC 欠損症患者被殻内への AAV-hAADC-2 注入療法の安全性である。副次的評価項目は、① AAV-hAADC-2 注入療法の有効性であり、その判定は発作記録と臨床的評価に基づいて行う。かつ、②被殻注入 AAV-hAADC-2 の発現量も副次的評価項目とし、FMT-PET によって判定する。 ② AAV-hAADC-2 の投与 AADC 欠損症患者の線条体（被殻）に、定位脳手術の手法によって AAV-hAADC-2 を注入する。対象患者は4例を予定している。AAV-hAADC-2 の注入量は 1×10^{12} vg/mL の濃度で、最大 50μL を被殻内の4個所に分けて注入する。具体的には片側の被殻あたり2個所、両側で計4個所に各々最大 50μL を注入する。注入量（vector genomes : vg）は1症例あたり 200μL で 2×10^{11} vg である。 ③ 対象患者 対象は当院および研究協力機関に通院中で、髄液検査、酵素活性測定、あるいは遺伝子診断で診断が確定されている日本人 AADC 欠損症患者 4 例とする。治療実施時の年齢が4歳以上。新たに診断が確定した患者が出た場合には、追加実施する可能性がある。 ④ 評価項目（詳細は実施計画書に記載）。 1) 患者情報調査、 2) 一般身体所見（バイタルサインを含む）、 3) 神経学的所見（乳幼児神経学的検査チャートを使用）、 4) Alberta Infant Motor Scale (AIMS)、 5) 新版 K 式発達検査、 6) 有害事象、 7) 併用薬、 8) 臨床検査（血液検査、凝固検査、生化学検査、免疫検査、PCR 分析）、 9) 心電図、 10) AADC のトレーサーである FMT を使用した脳の PET スキャン、 11) 脳の MRI、CT、 12) 脳波、 13) 髄液検査 ⑤ 対象者の参加取り止め 全ての対象者は本臨床研究のいかなる時点においても、不利益を被ることなく、本臨床研究への参加を取りやめることができる。この場合であっても、安全性に関する経過観察は、対象者に受け入れ可能な方法で実施すべきものとする。 (2) 被験者の同意の取得方法 本臨床研究の対象者は、未成年で、かつ発語がなく書字も不可能で、意思表示が困難であるため、同意を得ることは不可能である。よって、親権者を代諾者として承諾を得る。被験者の親権者に対して、臨床治療研究実施医師より、臨床研究「AADC 欠損症に対する遺伝子治療」参加のしおり（資料2）を基にして十分な説明を行い、文書により同意を得る。 (3) 期間および目標症例数 実施期間は、最終登録症例にベクターを投与した時点から9ヶ月後までとする。ただし、5年後までは一定の評価を行い、さらに10年後まで安全性に関して長期フォローする。目標症例数は4例とする。 (4) 遺伝子治療臨床研究の実施方法：詳細は実施計画書参照 ① 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） 被験者は治療開始10日前（Day -10）に自治医科大学附属病院に入院する。遺伝子の導入は定位的脳手術法によって被殻へ直接注入投与する。全ての外科的手技は、不随意運動疾患を対象とした定位的機能神経外科手術の標準的手法に準ずる。原則として、

手術は全身麻酔下に実施することとし、麻酔の実際は同附属病院麻酔科による管理下で実施する。AAV-hAADC-2の注入目標である被殻は手術に先だって撮影するMRI画像に基づき解剖学的・空間的位置を同定する。

頭蓋骨への穿孔は頭蓋骨円蓋部に左右各々1ヶ所とし、そこを刺入点とし4つの目標部位にAAV-hAADC-2を注入投与する。穿孔位置は通常の定位的脳手術で穿頭する位置に準じて冠状縫合の前方、正中より約4 cmの位置を目安としMRI画像で脳表からAAV-hAADC-2注入部位までの経路にて脳血管を回避すべく適宜調整する。注入部位までの穿刺には定位的脳手術装置に取り付けたmicromanipulator を用いてAAV-hAADC-2注入用カニューレを目標点まで刺入する。通常の定位的脳手術手技に則り、X線透視装置でカニューレ先端位置を確認しながら実施する。

AAV-hAADC-2を含む溶液は、専用のシリンジポンプを用いて3 μ l/min の速度で注入する。2ヶ所目の注入が終了したらカニューレを抜去し、2番目の注入部位にカニューレを刺入する。一つの刺入経路で十分離れた2カ所の注入目標を確保することが困難な場合には、1カ所目の注入後にカニューレを抜去し、別の経路から刺入し直す。先と同様に AAV-hAADC-2 を含む溶液を標的部位に注入する。対側も同様に、1つの穿孔部から被殻内2ヶ所の目標部位に AAV-hAADC-2 を含む溶液を注入する。4ヶ所への注入が終了したら、カニューレを抜去した通常の穿頭手術に準じて閉創を行う。頭蓋から定位的脳手術用フレームを取り外して、全身麻酔から覚醒後に頭部 CT 検査を実施し穿刺部位の確認および頭蓋内出血などの合併症の有無を確認する。定位的脳手術装置を含め、手術に用いた全ての医療器具はウイルスの核酸に対する不可逆的アルキル化作用を有するエチレンオキサイドガスを用いた滅菌処理を施す。

② 臨床検査項目および観察項目

遺伝子導入手術後2週間 (Day 14) までは入院することとする。患者はスケジュールにしたがって評価と臨床検査を受ける。ベクター投与直後3日間は個室に隔離し、外出・外泊は認めない。なお投与後3日目の時点でPCR法による検査でベクターDNAを認める場合には、ベクターDNAが陰性になるまで個室への隔離期間を延長する。陰性になれば、スケジュールにしたがって外来における観察を受けることとする。

PET スキャンはBase line (Day -14～-1)、評価9 (Month 6)、評価19 (Month 24)、評価31 (Month 60) に実施する。PET スキャンによって、それぞれの用量ごとにどれだけのAADCが発現したかを予測することが可能である。

AAV カプシド蛋白質に対する抗体は、Base line、評価9 (Month 6) に患者の血清を採取して測定する。

③ 予測される副作用およびその対処方法

a. ベクターによる合併症

炎症反応を惹起し、発熱などの全身症状や脳浮腫による痙攣や意識障害をきたす可能性は低いが完全に否定することは出来ない。患者を注意深く観察することによって合併症の発生をいち早く察知し、適切な処置をとる。

AAV-hAADC-2 ベクターの投与により、ウィルスカプシドに対する免疫反応が生じる可能性がある。その場合には、ベクター再投与の際に治療遺伝子の発現に影響が生じるおそれがあり、以降のAAVを使った治療の対象から除外されることも考えられる。

AAV ベクターが患者細胞の染色体に組み込まれる可能性は否定できないが、その確率は著しく低いものと推定される。万一、このような事態が生じた場合に最も懸念されるのは、発癌の危険性が高まることである。身体所見及び画像診断などを通じて、早期発見に努める。またベクターDNAが生殖細胞に組み込まれることは考えにくい、その可能性を完全に否定することはできない。

b. 手術による合併症

定位脳手術は侵襲の少ない手技であるが、予期しない合併症を起こす危険は避けられない。全ての定位脳手術における手術合併症の報告は、ほとんど無症状のものを含めても成人では5%以下で、出血、感染および麻酔の合併症が主である。小児での実施数は多くなく、合併症は明瞭ではないが、4歳以上は成人同様に実施可能と考えられる。

④ 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

	有効性及び安全性の判定を客観的に行うため、第三者が入る有効性及び安全性の判定検討委員会を設置する。 ⑤ 症例記録に関する記録用紙等の様式 本臨床研究の記録に関する様式（症例報告書）は、別に定める。 ⑥ 記録の保存および成績の公表の方法 本臨床研究に関連した記録は、自治医科大学付属病院において、研究の中止もしくは終了の後 10 年間保存する。また遺伝子治療臨床研究に関する指針に基づき、研究に関する情報は適切かつ正確に公開するように努め、かつプライバシーの保護を徹底する。これは、文部科学省・厚生労働省の「遺伝子治療臨床研究に関する指針」〔平成 14 年 3 月 27 日（平成 16 年 12 月 28 日全部改正）〕に則って行う。
備考	1) 被験者の同意取得について：被験者（代諾者）は本遺伝子治療臨床研究について文書に基づいて説明を受け、その内容と期待される治療効果および危険性を十分に理解し、自由意思にて同意した上で、同意書に署名したものとする。なお、被験者（代諾者）はその申し出により同意を撤回し、本遺伝子治療臨床研究への参加、あるいは継続を取りやめることができる。