

遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 実 施 計 画 申 請 書

平成26年 7月23日

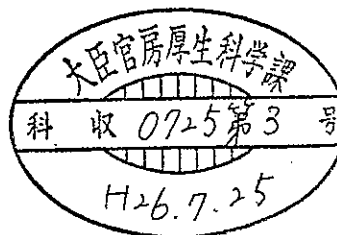
厚生労働大臣 殿

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発現AAVベクター被殻内投与によるパーキンソン病遺伝子治療の第Ⅰ/Ⅱ相臨床研究	自治医科大学 医学部内科学講座 神経内科学部門 教授(特命教授) 村 松 慎 一 (印)



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 発現 AAV ベクター被殻内投与によるパーキンソン病遺伝子治療の第 I/II 相臨床研究	
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 教授 (特命教授) 内科学講座 神経内科学部門	
	氏 名	村 松 慎 一 (印)	
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
	小澤敬也	自治医科大学・免疫遺伝子細胞治療学・客員教授	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・脳神経外科学・教授	脳内へのベクター注入の管理・助言
	中嶋剛	自治医科大学・脳神経外科学・助教	遺伝子導入のための定位脳手術実施
	安藤喜仁	自治医科大学・神経内科学・助教	患者評価・ケア統括
	小野さやか	自治医科大学・神経内科学・助教	適応患者の選択・評価および PET 解析
	奈良優子	自治医科大学・神経内科学・非常勤医員	適応患者の選択・評価および PET 解析
	水上浩明	自治医科大学・遺伝子治療研究部・学内教授	ウイルスベクターの品質検査と管理・検出
	ト部匡司	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
	吉尾卓	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	試験実施の支援
山崎晶司	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	試験実施の支援	
佐藤俊彦	宇都宮セントラルクリニック・院長	PET 計測	
外部協力者			
峰野純一	タカラバイオ株式会社・バイオ産業支援事業部門・本部長	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 発現 AAV ベクター被殻内投与によるパーキンソン病遺伝子治療の第 I/II 相臨床研究」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、進行したパーキンソン病患者の被殻に、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うるジスキネジアは L-dopa の投与量を減らすことにより予防する。今回の臨床研究は、新たに作製した国産のベクターを使用し、その安全性を検証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) パーキンソン病の現状と遺伝子治療臨床研究を選定する理由 ① パーキンソン病に関する現時点での知見 パーキンソン病は振戦、暴動、筋強剛、姿勢反射障害を主たる症候とし、通常 40-70 歳で発症し、10 年前後で臥床状態となる進行性神経変性疾患である。パーキンソン病は、線条体に投射する黒質ドパミン合成ニューロンが脱落する結果、線条体のドパミンが欠乏して発症すると考えられている。パーキンソン病に対しては薬物療法や深部脳電気刺激療法など、複数の治療法があるが、いずれも問題を有している。治療の主流となる薬物療法では、長期投与により①効果が減弱し、②wearing-off 現象、on-off 現象、ジスキネジアが出現、③幻覚や妄想が現れるようになり、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。一方、深部脳電気刺激療法は進行して L-dopa の効果が無くなった症例には無効である。そのため新規治療法の開発が望まれている。 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) を進行したパーキンソン病患者の被殻に定位脳手術的に注入する。AADC は L-dopa をドパミンに変換する酵素であり、L-dopa の服用でドパミン産生が増加し、症状の改善が期待できる。仮に AADC が過剰に発現した場合には L-dopa 服用量を減らすことでジスキネジアを予防できる。 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 a. ドパミン産生細胞の移植 ドパミン産生細胞を被殻に移植する治療法で、これまで自家副腎髄質細胞、交感神経節細胞の移植が行われてきたが、効果は不十分である。近年、米国においてパーキンソン病患者の両側被殻に中絶胎児の黒質ドパミン細胞を移植する二重盲検試験が実施された。治療 1 年後、一部の症例で運動症状の多少の改善が認められたが、全体としては偽手術より有意な改善が得られなかった。また、多くの症例でジスキネジアが出現した。この治療では、患者 1 人当たり胎児 4 人分のドパミン細胞が必要であり、さらに移植細胞の生着のために免疫抑制剤を使用した場合、免疫能力の低下に起因する様々な合併症の危険が考えられる。また本邦で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、この治療法を実施することは困難である。 b. 幹細胞治療 幹細胞は適切な条件下で神経細胞を含む種々の細胞に分化させることができ、これをパーキンソン病の移植治療に用いる研究がなされている。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、ドナー細胞の腫瘍化を阻止するにはどうすればよいのか、ヒト ES 細胞の利用に際しては、倫理面も含め実用化の前に解決すべき問題が多い。2006 年にヒト iPS 細胞が樹立され ES 細胞に代わるドパミン細胞の供給源として期待されているが、ES 細胞と同様に未分化細胞の混入による腫瘍形成の可能性や、患者自身の細胞を使用した場合、脆弱性が存続する可能性がある。本来黒質に存在するドパミン神経細胞を被殻に移植する場合は、異所性の移植になる。

	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。導入する遺伝子の種類によって、三種類の戦略が考えられている。第1はドパミン産生に関わる酵素遺伝子を導入してドパミンを産生させる方法である。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ることで症状が改善することが期待される。 遺伝子導入療法の第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。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案されている。 第3の戦略は、抑制性伝達物質 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。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。 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として、この方法を採用した。
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 のエクソンからなり、各々のエクソンは 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。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 (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

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出来ること、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良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凝固因子発現 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は、AADC 以外にも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すでに行われている。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 26nm 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ヌクレオチドから成る1本鎖DNA(約1,500 kDa)であり、プラス鎖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時に 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きわめて安定で、pH3 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。

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する。

①pAAV-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

②pRC-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。 ③pHelper : 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 Poloxamer188 (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、タンジェンシアルフロー・フィルトレーションによりろ過濃縮し、0.22µm 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渡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 2kb 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。更に 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み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 rcAAV 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的に低い。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 1/30 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り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見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、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、前回の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癌遺伝子が活性化したり、癌抑制遺伝子が不活化されたりすることで発癌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、真菌の増殖を認めず、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	当施設で診療している多数の進行期パーキンソン病患者は、新しい治療法に大きな期待を寄せている。パーキンソン病モデルサル被験への AAV-hAADC-2 注入による前臨床研究では、AADC が長期間被験内で発現して治療効果が認められ、かつ副作用は見られず安全性が確認されている。さらに当施設で薬物治療で十分な効果が得られなくなった進行したパーキンソン病患者に対して 6 名の遺伝子治療を施行し既に安全性と有効性を確認している。また当施設と同様なプロトコルにより Avigen/Genzyme 社から供給された AAV ベクターを使用した臨床試験が UCSF で実施された。米国では、AAV ベクターを使用して抑制性神経伝達物質の合成酵素(GAD)遺伝子を視床下核に導入する臨床試験と、神経栄養因子 neurturin 遺伝子を被験に導入する臨床試験も実施された。さらに、台湾で AADC 欠損症の小児に対して AAV ベクターを使用して被験に AADC 遺伝子を導入する遺伝子治療が実施されている。これまで、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。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 本研究は患者間用量比較オープン試験であり、臨床試験の第 I/II 相に相当する。 ① 研究の目的 本臨床研究の主要評価項目は、進行期パーキンソン病患者被験内への AAV-hAADC-2 注入療法の安全性である。副次的評価項目は、①AAV-hAADC-2 注入療法の有効性であ

り、その判定は症状日誌、臨床的評価、服用する L-dopa の必要量に基づいて行う。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

進行期パーキンソン病患者の被殻に、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1群3例で2群を予定している。AAV-hAADC-2 の注入量は全体で 200 μ L (第1群) または 600 μ L (第2群) とし、被殻内の4ヶ所に分けて注入する。具体的には片側の被殻あたり2ヶ所、両側で計4ヶ所に各々50 μ L (第1群) または 150 μ L (第2群) を注入する。第1群での注入量 (vector genomes : vg) は1症例あたり 3×10^{11} vg とし、第2群では 9×10^{11} vg を注入する。注入治療後の安全性の評価および治療効果の判定に関しては、各群とも同じとする。

③ 対象患者

対象は自治医科大学付属病院あるいはその関連病院に通院中の、進行期パーキンソン病患者6症例とする。

④ 評価項目 (詳細は実施計画書に記載)。

1) 一般身体所見 (バイタルサインを含む)、2) 神経学的所見、3) 有害事象、4) 抗パ
薬 (L-dopa) の必要量、5) 併用薬、6) 臨床検査 (血液検査、生化学検査、免疫検査、PCR
分析)、7) 心電図、8) 脳の PET scan、9) 脳の DAT scan、10) 脳の MRI、11) 患者の
記載する症状日誌、12) MDS-UPDRS、13) Hoehn & Yahr 重症度、14) Geriatric Depression
Scale (GDS) の short form、15) Mini-Mental State Examination (MMSE)、16) Montreal
Cognitive Assessment (MoCA)

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止めることができる。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。

対象者が参加を取りやめた場合、次の基準にしたがって他の対象者に振り替えることと
する。

- ① 対象者が遺伝子導入以前に参加を取りやめた場合、次の対象者に振り替える。
- ② 対象者が遺伝子導入後に参加を取りやめた場合、次の対象者への振り替えは
行わない。しかしながら、安全性に関する経過観察は継続する。

(2) 被験者の同意の取得方法

本臨床研究に参加する候補者は、自治医科大学付属病院あるいはその関連病院への通
院患者の中から募集する。募集に当たっては、この臨床治療研究についての情報を、そ
れらの病院に勤務する神経内科医に広く提供する。被験者に対しては臨床治療研究実施
医師より、臨床研究「パーキンソン病遺伝子治療」参加のしおりを基にして十分な説明
を行い、文書による同意を得る。

(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か月後までとする。ただ
し、5年後までは一定の評価を行い、さらに10年後まで長期フォローする。目標症例数
は6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) に自治医科大学付属病院に入院する。
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4cm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シ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) 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 scanとDAT scanはBase line (Day -14~1)と評価9 (Month 6)に実施する。AADCのトレーサーであるFMTを使用したPET scan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、screening visitと評価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。患者には避妊するよう指導し、将来子供をもうけることを希望する患者には、治療前に精子を凍結保存しておくようカウンセリングを行う。

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5%以下で、出血、感染および麻酔の合併症が主である。 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。 2) 前回実施した臨床研究との相違：今回申請している臨床研究は、2007年から自治医大で実施した「AADC 発現 AAV ベクター線条体内投与によるパーキンソン病遺伝子治療の臨床研究」と同様に、安全性を主要評価項目とし、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。相違点は、今回の臨床研究では、国産の AAV-hAADC-2 を使用することと、前回と同様の 3×10^{11} vg に加え、高用量の 9×10^{11} vg を投与することである。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の効果判定は症状日誌、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。