パーキンソン病の遺伝子治療

村 松 慎 一

Gene Therapy for Parkinson Disease

by

Shin-ichi Muramatsu, M.D.

from

Division of Neurology, Department of Medicine, Jichi Medical University

Adeno-associated viruses (AAV) are small, non-enveloped, single-stranded DNA viruses of the *Parvoviridae* family. More than one hundred genotypes of AAVs have been isolated from primates, in which they seem to be non-pathogenic. AAV-2 has been the most extensively studied, particularly as a vector for gene therapy. Pure and high titer recombinant AAV (rAAV) vectors can be generated using a helper plasmid containing the minimum adenovirus genome sequences necessary for helper functions. These rAAV vectors offer safe, efficient, and long-term expression of transgenes in mammalian brain neurons without triggering a substantial immune response. rAAV vectors have led to significant functional recovery in animal models, making their use in gene therapy for Parkinson disease (PD) promising. Three different rAAV vector-based protocols for treating for PD are currently in phase 1 clinical trials. One is the gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) in combination with oral administration of L-dopa. Although patients would still need to take L-dopa to control their PD symptoms with this approach, the dose could be lowered and the duration of the ON period prolonged. If two other enzymes, tyrosine hydroxylase and guanosine triphosphate cyclohydrolase I, could also be provided, L-dopa could be produced in the striatum, making the patient drug-free. The gene expression has to be regulated since excess synthesis of dopamine may cause adverse effects. The second clinical trial is transduction of the subthalamic nucleus with rAAV vectors expressing glutamic acid decarboxylase (GAD) to produce γ -aminobutyric acid (GABA), an inhibitory transmitter. The aim of the strategy is to modulate the activity of subthalamic neurons, an effect similar to deep brain stimulation. The third clinical trial is delivery of an rAAV vector expressing neurturin, a neurotrophic factor for dopaminergic neurons, into the putamen to block or slow down the ongoing degeneration. Neuroimaging techniques and genetic analyses of familial patients could help identify individuals at risk for PD before they develop symptoms. They would be able to receive early the gene therapy given to symptomatic PD patients. Gene therapy using rAAV vectors seems to be a promising way of treating PD.

(Received July 4, 2006 ; accepted July 25, 2006)

Key words : Parkinson disease, gene therapy, adeno-associated virus, dopamine

Jpn J Neurosurg (Tokyo) 15 : 756-760, 2006

はじめに

遺伝子治療では、化合物や蛋白質などの代わりに外来

遺伝子を細胞に導入することにより生体の機能障害の修復を行う。生体内の細胞に効率よく遺伝子を導入するためには、ウイルスベクターを利用する方法が優れている。

自治医科大学神経内科／〒329-0498 下野市薬師寺 3311-1〔連絡先：村松慎一〕

Address reprint requests to : Shin-ichi Muramatsu, M.D., Division of Neurology, Department of Medicine, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke-shi, Tochigi 329-0498, Japan

Table 1 Viral vectors

Origin of vectors	Limitations
Adenovirus	Transient expression
Herpes virus	Immunogenicity
Oncoretrovirus	Cannot transduce neurons Insertion mutagenesis
Lentivirus	Safety concerns
Adeno-associated virus (AAV)	Transgene size < 4 kb

Table 2 Adeno-associated virus (AAV)

• Not adenovirus!	• Small (ϕ 25 nm)
• <i>Parvoviridae</i>	• Non pathogenic
• ssDNA (4.7 kb)	• >100 genotype
• Non-enveloped	• Physically stable

Fig. 1 Production of recombinant AAV vectors

HEK293 cells are transfected with three kinds of plasmids to generate recombinant AAV vectors. Vector plasmids contain an expression cassette consisting of a promoter, cDNA of a therapeutic gene, and a poly (A) sequence, between the inverted terminal repeats (ITR) of the AAV-2 genome. Packaging plasmid expresses viral capsid (VP) and non-structural (Rep) proteins. Helper plasmids supply adenoviral DNAs necessary for helper function.

1990年に米国の国立衛生研究所 (NIH) において adeno-sine deaminase (ADA) 欠損症の小児に対して、末梢血のリンパ球にレトロウイルスベクターを使用して ADA 遺伝子を導入する世界初の遺伝子治療が行われて以来、難治性の悪性腫瘍や先天性代謝異常症を主な対象として臨床研究が進められてきた。中枢神経疾患に対しても、神経細胞への遺伝子導入が可能なアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus; AAV) 由来のベクターを使用した研究が展開されている。

パーキンソン病は、アルツハイマー病のように脳の広範な領域が冒される疾患に比べて、黒質線条体路という限局した部位に主な病変があるため遺伝子導入の目標を

絞りやすい。また、淡蒼球や視床下核の電気刺激など定位脳手術の手技が確立しており、被殻へのベクター注入は局所麻酔でも可能なことから遺伝子治療のよい適応となる⁸⁾。モデル動物における前臨床試験で好成績が得られたことを踏まえて、AAV ベクターを使用した三種類の異なる戦略による第 1 相の臨床試験が米国で始まっており、日本でも実施計画の審査が行われている。

AAV ベクター

現在、遺伝子治療に使用されている主なウイルスベクターを Table 1 に示した。アデノウイルスおよびヘルペ

スウイルス由来のベクターは、神経細胞へ遺伝子導入できるが免疫原性が強く、炎症反応を惹起しやすい。遺伝子発現は短期間で、脳腫瘍の遺伝子治療に応用される。長期間の遺伝子発現が必要な慢性疾患の遺伝子治療には不適当である。Oncoretrovirus は、神経細胞などの非分裂細胞へは遺伝子導入できない。Lentivirus は、神経細胞へも効率よく遺伝子導入可能で長期間の発現が得られるが、野生型のウイルスが HIV に代表されるように病原性であるために安全性に懸念が残る。

AAV は線状の一本鎖 DNA ウイルスで、パルボウイルス科 (*Parvoviridae*) に属する (Table 2)。名称から混同されやすいが、アデノウイルスとはまったく異なるウイルスである。ウイルスゲノムの複製に際して、アデノウイルスまたはヘルペスウイルスの遺伝子産物の一部をヘルパー機能として必要とする。成人の多くには不顕性感染しており病原性はない (最近、胎盤機能不全との関連を示唆した論文¹⁾が出たが追試されていない)。大多数では染色体に組み込まれずに episomal concatemer として存在する。霊長類の AAV には 100 種類以上の型が分離されているが、現在臨床試験で使用されているのは、最初に塩基配列が決定された 2 型 AAV (AAV-2) 由来のベクターである。AAV-2 では約 4.7 kb のゲノム DNA の両端に特徴的なヘアピン構造 (inverted terminal repeats) があり、その間に非構造蛋白である Rep と外被蛋白である VP をコードする領域が存在する。遺伝子治療用の組換え AAV ベクターを作製する際には、Rep と VP をコードする部分を切り出し、その代わりに目的とする遺伝子をプロモーターと poly (A) 配列の間に挟んで組み入れたプラスミドを利用する (Fig. 1)。このプラスミドと、Rep と VP を組み込んだプラスミド、ヘルパー機能に必要なアデノウイルスのゲノム配列を含むプラスミドの三種類を HEK293 細胞にトランスフェクションすることにより、治療用遺伝子を発現する 10^{13} ~ 10^{14} vector genome/ml 程度の高力価の組換え AAV ベクターが得られる。

AAV ベクターは、ラット・マウス・ネコ・サルなどの実験動物の脳神経細胞へ効率よく遺伝子を導入し、長期間発現させることができる。サルの脳では、導入した遺伝子の発現は 3 年間以上持続していることが確認されており³⁾、一度定位脳手術によりベクターを投与すれば、反復投与の必要はないと考えられる。炎症反応や免疫反応はほとんど認められず、安全性が高い。組み込み可能な遺伝子の長さがプロモーターと poly (A) 配列を合わせて 4 kb 以下という制限があるが、大部分の治療用遺伝子はこの範囲に収まる。また、一つの細胞に数種類の異

なる遺伝子を同時に導入することができる。

ドパミン合成の回復

パーキンソン病に対する遺伝子治療の戦略の第一は、線条体内におけるドパミン合成機能の回復を目標とする。ドパミンは、血液から供給されたアミノ酸のチロシンがチロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase; TH) により L-dopa となり、続いて芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (aromatic L-amino acid decarboxylase; AADC) が作用して生合成される。TH の補酵素としてテトラヒドロbioプテリン (BH₄) が必要で、その合成には GTP cyclohydrolase I (GCH) が律速酵素となる。TH, AADC, GCH はいずれも黒質緻密部の神経細胞からの軸索終末に存在するが、進行したパーキンソン病では軸索終末の変性脱落が著しく、これらの酵素活性が低下する。薬物治療として、血液脳関門を通過しにくいドパミンに代わり L-dopa が投与されることになるが、当初は著効を示すものの、やがて AADC の活性低下によるドパミンへの変換障害とドパミン貯留の減少のために効果が減弱する。症状の改善を得るには高用量の L-dopa を頻回に投与しなくてはならず、血中濃度の変動に伴う不随意運動や、前頭葉に存在するドパミン受容体への作用による幻覚などの副作用が生じる。そこで、AADC 遺伝子を線条体内に導入し酵素活性を回復し、再び L-dopa の効果が得られるようにする遺伝子治療が考えられる (Fig. 2)。この方法では、L-dopa の服用を継続する必要があるが、L-dopa の量を調節することによりドパミンが過剰になることを防ぐことができる。2004 年の 12 月から米国の UCSF において、進行したパーキンソン病患者を対象として両側の被殻に AADC 遺伝子を導入する第 1 相臨床試験が開始された。

将来的には、TH と GCH の遺伝子も導入することにより、線条体内で直接ドパミンを合成し L-dopa の内服を不要とする遺伝子治療が望まれる。この場合には、持続的にドパミンを供給することになり、L-dopa 内服の際に生じるドパミンの血中濃度の変動に伴う不随意運動などの副作用を回避できる可能性がある。選択的神経毒 MPTP の慢性投与により作製したモデルサルを使用した前臨床試験では、AADC 導入と L-dopa 内服の組み合わせ²⁾、および TH, AADC, GCH の遺伝子導入⁷⁾のいずれの方法においても、明らかな効果が認められている (Fig. 3)。

Fig. 2 Restoration of dopamine production

In advanced Parkinson disease (PD), activity of aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) in the striatum is profoundly reduced and orally administered L-dopa was inefficiently converted to dopamine, resulting in dose failure and induction of adverse effects. Gene delivery of AADC by rAAV vectors restores the enzyme activity and dopamine production.

視床下核機能の調整

視床下核の高頻度電気刺激 deep brain stimulation (DBS) によりパーキンソン病の運動症状の改善が得られるという臨床経験に基づき、視床下核の出力を調整するために抑制性伝達物質である γ -aminobutyric acid (GABA) の合成酵素 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する遺伝子治療が考えられた⁵⁾。視床下核は体積が小さく (140 mm³, 脳全体の 0.02%), 神経細胞の数も約 30 万個と比較的少ないため、少量の AAV ベクターにより遺伝子導入できる。この方法による臨床試験も 2003 年 8 月から米国の Cornell 大学で開始されている。視床下核の電気刺激が有効である機序としては、視床下核の発火パターンの変化が重要と推測されており、GAD 遺伝子導入後に視床下核の出力が抑制過剰になる可能性や、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も考えられる。2006 年中に終了する臨床試験の結果が注目される。

神経栄養因子による変性抑制

パーキンソン病における黒質ドパミン神経細胞の選択的な変性には、蛋白質分解障害、ミトコンドリア機能障害、フリーラジカル産生、アポトーシス、ミクログリア活性化などの要因が考えられており、それらにかかわる分子を利用した遺伝子治療の研究が進められてきた。その中でも有力なのが、ドパミン神経細胞に対する保護作用を持つ glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) や neurturin などの神経栄養因子である。これら因子は血漿中の半減期が短く血液脳関門も通過しないため、線条体に遺伝子を導入して持続的に発現させる遺伝子治療が考えられる。モデルラットの実験では、線条体への神経毒注入後、すでに黒質線条体路の変性がある程度進行し

Fig. 3 *In vivo* imaging of transgene in a primate model of PD

Positron emission tomography shows increased [¹¹C] L-dopa uptake in the striatum of MPTP-treated monkey three months after the gene transfer of AADC into the left putamen.

ている状態でも、GDNF 遺伝子を搭載した AAV ベクターを線条体に注入することにより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認められている⁹⁾。2005 年から両側の被殻に neurturin を発現する AAV ベクターを注入する臨床試験が開始された⁴⁾。

今後の動向

現在行われている三種類の臨床試験の正式な結果が近日中に公表される予定である。いずれも第 1 相試験ということで安全性の確認を目標としている。2006 年 4 月の米国神経学会における途中経過の報告では、安全性に問題がないことに加えて、AADC 導入では [¹⁸F] fluoro-meta-tyrosine (FMT) positron emission tomography (PET) による AADC の発現が確認され、L-dopa が有効な時間 (ON time) の増加が認められるなど、ほぼ期待されたと

おりの効果も得られている。日本では、AADC 導入による方法の実施計画が厚生労働省において審査中である。

パーキンソン病では、ドパミン以外にセロトニン、ノルアドレナリンなどにも障害があることが知られており、L-dopa 治療があまり有効でない症状として、痴呆、うつ状態、姿勢反射障害、自律神経障害、すくみ足などがある。これらに対しては、線条体へのドパミン合成系酵素の遺伝子導入のみでは不十分と思われるが、ドパミン合成の回復により運動障害を治療することで ADL の改善が期待できる。

導入した遺伝子の発現を制御する機構を組み込んだ次世代 AAV ベクターの開発が進められており⁶⁾、今後、傷害された遺伝子そのものを修復する技術の開発や細胞移植との組み合わせなども行われるものと期待される。

文 献

- 1) Arechavaleta-Velasco F, Ma Y, Zhang J, McGrath CM, Parry S: Adeno-associated virus-2 (AAV-2) causes trophoblast dysfunction, and placental AAV-2 infection is associated with preeclampsia. *Am J Pathol* **168**: 1951-1959, 2006.
- 2) Bankiewicz KS, Eberling JL, Kohutnicka M, Jagust W, Pivrotto P, Bringas J, Cunningham J, Budinger TF, Harvey-White J: Convection-enhanced delivery of AAV vector in parkinsonian monkeys; *in vivo* detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach. *Exp Neurol* **164**: 2-14, 2000.
- 3) Daadi MM, Pivrotto P, Bringas J, Cunningham J, Forsayeth J, Eberling J, Bankiewicz KS: Distribution of AAV2-hAADC-transduced cells after 3 years in Parkinsonian monkeys. *Neuroreport* **17**: 201-204, 2006.
- 4) Dass B, Olanow CW, Kordower JH: Gene transfer of trophic factors and stem cell grafting as treatments for Parkinson's disease. *Neurology* **66**: S89-103, 2006.
- 5) During MJ, Kaplitt MJ, Stern MB, Eidelberg D: Subthalamic GAD gene transfer in Parkinson disease patients who are candidates for deep brain stimulation. *Hum Gene Ther* **12**: 1589-1591, 2001.
- 6) Li XG, Okada T, Koder M, Nara Y, Takino N, Muramatsu C, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Nakano I, Ozawa K, Muramatsu S: Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. *Mol Ther* **13**: 160-166, 2006.
- 7) Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Shizuma N, Kawasaki K, Ono F, Shen Y, Wang LJ, Mizukami H, Kume A, Matsumura M, Nagatsu I, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Terao K, Nakano I, 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-synthesizing enzymes. *Hum Gene Ther* **13**: 345-354, 2002.
- 8) Muramatsu S, Tsukada H, Nakano I, Ozawa K: Gene therapy for Parkinson's disease using recombinant adeno-associated viral vectors. *Expert Opin Biol Ther* **5**: 663-671, 2005.
- 9) Wang LJ, Muramatsu S, Lu Y, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada K, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Nakano I, 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.

要 旨

パーキンソン病の遺伝子治療

村 松 慎 一

パーキンソン病に対する遺伝子治療として、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを応用した三種類の第 1 相臨床試験が開始されている。第一の方法では、L-dopa をドパミンに変換するのに必要な芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) の遺伝子を被殻に導入してドパミン機能の回復を計る。第二の方法では、視床下核に抑制性神経伝達物質である GABA の合成酵素の遺伝子を導入し、深部電気刺激と同様な神経活動の調整を行う。第三の方法では、神経栄養因子 neurturin の遺伝子を被殻で発現させて黒質ドパミン神経細胞の変性を抑制する。AAV ベクターによるパーキンソン病の遺伝子治療は、近い将来に実用化が期待できる。

脳外誌 **15**: 756-760, 2006