

Mini Review

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターによるパーキンソン病モデル動物の遺伝子治療

村松慎一¹⁾, 王立軍^{1,2)}, 池口邦彦¹⁾, 藤本健一¹⁾,
永田三保子¹⁾, 中野今治¹⁾, 小澤敬也²⁾

¹⁾自治医科大学内科学講座神経内科

²⁾同 分子病態治療研究センター遺伝子治療

Gene therapy of Parkinson's disease: AAV vectors for delivery of therapeutic genes into mammalian brains

Motor symptoms in Parkinson's disease (PD) result from severe decreases in the dopamine (DA) content of the striatum, secondary to progressive loss of nigrostriatal dopaminergic neurons. One potential strategy for treating advanced PD is the local production of DA in the striatum by restoring the enzymes for DA synthesis. Injection of recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors expressing enzymes necessary for efficient DA synthesis into the unilateral putamen of Parkinsonian monkeys resulted in amelioration of motor dysfunction with robust transgene expression and elevated DA synthesis in the treated putamen. An alternative strategy for gene therapy of PD is to relieve or reverse the ongoing degenerative processes by delivering genes for molecules that would block further dopaminergic cell loss. Sustained expression of a glial cell line-derived neurotrophic factor gene in the striatum rescued nigral neurons and led to functional recovery in a rat model of PD, even when treatment was delayed until after the onset of progressive degeneration. Gene therapy using rAAV vectors represents a novel and feasible protocol for the treatment of PD.

Rec.1/28/2003, Acc. 2/28/2003, pp218-222

Shin-ichi Muramatsu¹⁾, Lijun Wang^{1,2)}, Kunihiko Ikeguchi¹⁾,
Ken-ichi Fujimoto¹⁾, Mihoko Nagata¹⁾, Imaharu Nakano¹⁾, Keiya Ozawa²⁾

¹⁾ Division of Neurology, Department of Medicine,

²⁾ Division of Gene Therapy, Center for Molecular Medicine,
Jichi Medical School

Key words パーキンソン病, 遺伝子治療, アデノ随伴ウイルス, ドパミン, GDNF

はじめに

遺伝子治療では、目的とする細胞に治療用の外来遺伝子を導入し発現させる技術が鍵となる。In vivoにおける遺伝子導入用ベクターとして、これまでにレトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス adeno-associated virus (AAV) などのウイルス由来ベクターが開発されてきた。これらのうち、AAVベクターは、1) 野生型のAAVが非病原性であり、他の病原性ウイルス由来のベクターと比較して安全性が高い、2) 細胞毒性がほとんどなく、炎症や免疫反応を惹起しにくい、3) 神経細胞などの非分裂細胞にも遺伝子導入できる、4) ウイルス

粒子は物理的に安定で扱いやすく、長期間の保存が可能である、などの長所を有しており、脳内の神経細胞へ遺伝子導入するためのベクターとして現在最も有望と考えられる¹⁾。本稿では、臨床応用が期待できるAAVベクターを使用したパーキンソン病の遺伝子治療について紹介する。

パーキンソン病

パーキンソン病は、線条体(尾状核と被殻)に投射する中脳黒質緻密部のドパミン細胞が進行性に脱落する変性疾患で、動作緩慢、静止時振戦、筋強剛、姿勢反射障害などの運動障害を主症状とする。高齢者の神経変性疾患ではア

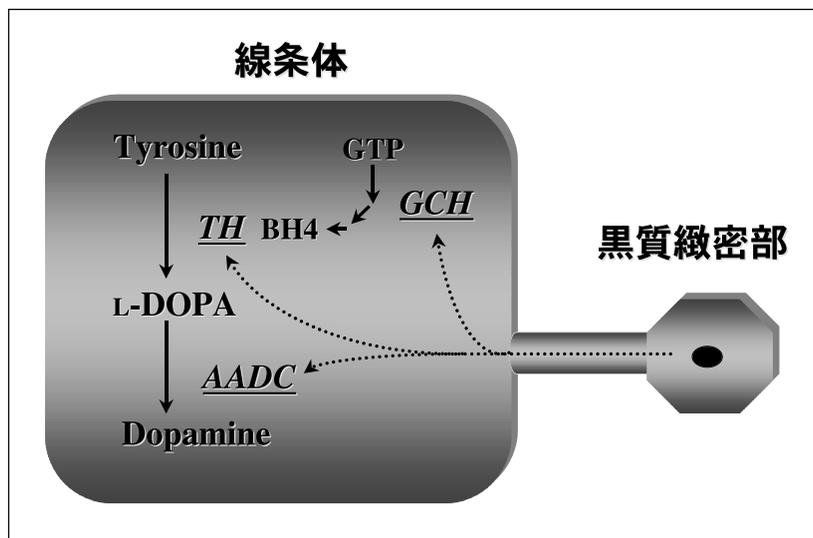


図1 ドパミンの生合成経路

ドパミンはアミノ酸のチロシンからL-DOPAを経て合成される。この経路には、tyrosine hydroxylase (TH) と aromatic L-amino-acid decarboxylase (AADC) が働く。THには補酵素としてテトラヒドロピオプテリン (BH4) が必要で、これはGTPから合成されるが、その際GTP cyclohydrolase I (GCH) が律速酵素となる。TH、AADC、GCHはいずれも黒質ドパミン神経細胞より供給されるため、パーキンソン病では活性が低下している。

ルツハイマー病について多く、人口10万人あたり100人以上の有病率が認められる²⁾。近年、家族性の発症を示す一部の家系において、 α -synuclein, parkin, ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1), DJ-1など、関連した遺伝子変異が相次いで見いだされた³⁾。しかし、大部分を占める散発性のパーキンソン病では、環境要因を含む多因子が発症に関与すると考えられ、単一の遺伝子異常は同定されていない。

現在行われている治療の主体は、線条体におけるドパミン濃度の低下を補充し、運動症状の改善を図る薬物療法である。ドパミン自体は血液脳関門を通過しにくいので、その前駆物質であるL-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) 製剤が使用される。経口投与されたL-DOPAは、血液から脳に移行し、線条体内のドパミン神経終末に主に存在する芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 aromatic L-amino-acid decarboxylase (AADC) によってドパミンに変換される。パーキンソン病の初期には、L-DOPAが著効し、症状の劇的な改善が得られるが、進行とともに効果は持続しなくなり、高用量の投与に伴い不随意運動 levodopa-induced dyskinesia や、幻覚などの精神症状が出現するようになる。このように、L-DOPA治療には限界があり、結局は寝たきりになってしまう患者は少なくない。そこで、新たな治療法の開発が望まれている。

ドパミン合成系酵素の遺伝子導入

パーキンソン病に対する遺伝子治療の第1の戦略は、L-DOPAの経口投与に代わり直接線条体内でドパミンの合成を行う補充療法である。パーキンソン病の進行期にL-DOPA治療の効果が減弱する主な理由は、ドパミン神経終末の脱落に伴うAADC活性の低下と、それによるL-DOPA

からドパミンへの変換障害にあると考えられる。ドパミン受容体を持つ線条体の神経細胞が脱落するわけではないので、ドパミンを再び供給すれば症状の改善が期待できる。ドパミンはアミノ酸のチロシンからL-DOPAを経て合成されるが、脳内で効率よくドパミンを生成するためには、AADCの他に、チロシンをL-DOPAに変換するチロシン水酸化酵素 tyrosine hydroxylase (TH) と、THの補酵素となるテトラヒドロピオプテリン (BH4) をGTPから合成する際の律速酵素であるGTP cyclohydrolase I (GCH) が必要である(図1)。TH、AADC、GCHは、いずれも黒質緻密部のドパミン細胞で合成され、順行性に線条体の神経終末に輸送されるため、パーキンソン病では酵素活性が著しく低下している。そこで、これら三種類の酵素遺伝子を線条体内の細胞に導入し、ドパミン合成を回復させる遺伝子治療が考えられる⁴⁾。

筆者らは、パーキンソン病のモデルサルを使用してAAVベクターによりドパミン合成に必要なTH、AADC、GCHの各遺伝子を線条体の細胞に導入する遺伝子治療実験を行った⁵⁾。選択的神経毒1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) をカニクイサルに慢性投与すると、両側の黒質のドパミン神経細胞が脱落し、振戦、動作緩慢、寡動、筋強剛などヒトのパーキンソン病と同様の症状を示すようになる。このモデルサルの片側の被殻に、TH、AADC、GCHの各遺伝子をそれぞれ組み込んだ三種類のAAVベクター、AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCH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。注入2ヵ月後の免疫組織化学では、抗TH抗体(図2)、抗AADC抗体、抗GCH抗体に陽性となる細胞が同側の被殻の広範な領域に認められ、*in vivo dialysis* では同側の被殻でドパミンとそ

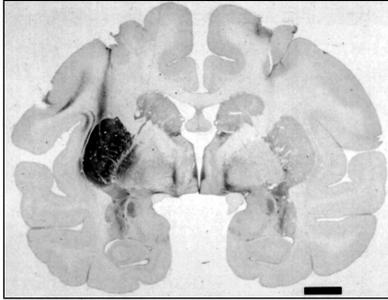


図2 パーキンソン病モデルサル被殻でのチロシン水酸化酵素 (TH) 遺伝子の発現
カニクイサルに選択的神経毒MPTPを全身投与して黒質線条体路を両側性に变性させた。その後片側(図左)の被殻にドパミン合成系の酵素遺伝子を発現するAAVベクターを注入した。65日後の脳組織の免疫染色を示す。注入側の被殻の広範な領域が抗TH抗体で陽性となっている。Scale bar = 0.5 cm (文献5より)

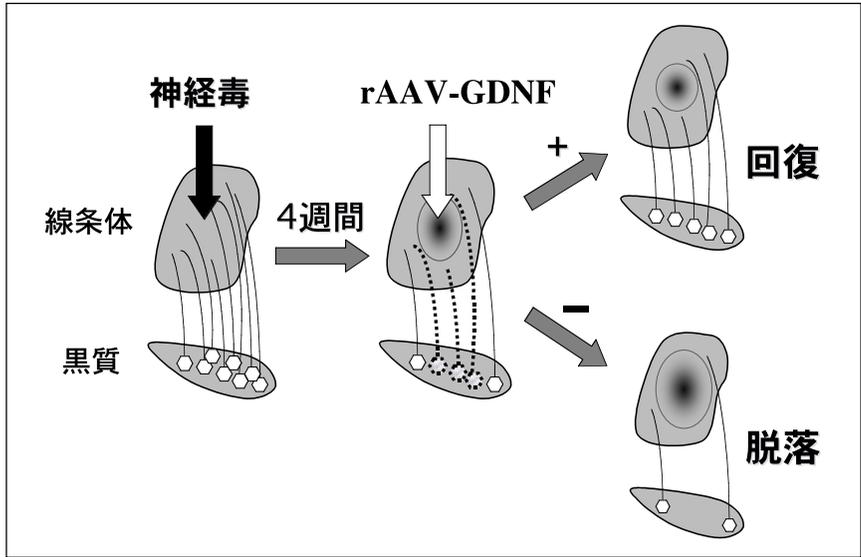


図3 神経栄養因子を使用した遺伝子治療
ラットの線条体に選択的神経毒を注入すると、黒質線条体路の変性が生じる。変性過程にある神経毒注入4週間後にGDNFを発現するAAVベクターを線条体に注入すると、変性の進行が抑制され機能回復が得られる。

の代謝物の増加が確認された。治療前の症状が最も重く臥床状態であった1頭のサルで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、28ヵ月後の現在もその効果は維持されている。これまで副作用は認められていない。

神経栄養因子の遺伝子導入

パーキンソン病の遺伝子治療の第2の戦略としては、ドパミン細胞の変性を抑制するために細胞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考えられる。ドパミン細胞の変性脱落を生じる機序としては、ミトコンドリア障害、フリーラジカル産生、アポトーシスなど多くの説が提唱されている。これらの仮説のいずれが主体であるとしても、その過程を阻害できる物質は遺伝子治療の候補となりうる⁶⁾。

Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)、Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)などの神経栄養因子は、ごく微量でも培養神経細胞に対して保護効果を示すことが知られているが、蛋白製剤として血液中または脳室内に投与すると、血液脳関門を通過しにくい、半減期が非常に短いなどの問題がある上に、全身性の副作用を生じ、かつ明らかな効果も認められなかった⁷⁾。そこで、これらの遺伝子を搭載したウイルスベクターを作製し、線条体または黒質へ直接注入する遺伝子治療が考えられた⁸⁾。これまで、ドパミン神経細胞の選択的神経毒を使用したパーキンソン病モデル動物において、アデノウイルスベクター⁹⁻¹¹⁾、

AAVベクター¹²⁻¹⁴⁾、レンチウイルスベクター¹⁵⁾によりGDNF遺伝子を神経毒の投与前または投与直後に線条体で発現させると、黒質ドパミン細胞の変性脱落を抑制することが報告されている。筆者らは、臨床応用を視野に入れ、神経毒注入後から4週間を経てすでに黒質線条体路の変性が進行している状態のモデルラットを使用し、GDNF遺伝子を搭載したAAVベクターを線条体に注入する実験を行った¹⁶⁾(図3)。その結果、進行過程の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た。このことから、PET scanなどによりパーキンソン病を早期に診断しGDNF遺伝子を線条体に導入する遺伝子治療を行えば、症状の発現あるいは増悪を抑制できる可能性があると考えられる。

臨床応用

サルのモデルでドパミン合成系酵素の遺伝子導入により運動障害の改善が得られたことから、臨床応用に向けた準備を現在進めている。第1段階としては、AADCのみの遺伝子導入を行い、L-DOPAの経口投与を継続する方法を考えている^{17,18)}。この場合には、L-DOPAの投与量によってドパミン産生量の調節が可能のため、ドパミンが過剰に生成され不随意運動や精神症状が誘発される危険を回避できる。将来的には、遺伝子発現レベルを調整可能な機構を組み入れたベクターを使用して、THとGCHの遺伝子導入もを行い、L-DOPAの服用から解放されることを目標としている。

米国では AAV ベクターを使用した臨床試験として、血友病に対する筋肉や肝臓への凝固因子の遺伝子導入¹⁹⁾や、Canavan 病に対する脳内への酵素遺伝子導入²⁰⁾がすでに行われている。さらに、パーキンソン病に対して視床下核の細胞に抑制性伝達物質である GABA の合成酵素の遺伝子を導入する遺伝子治療²¹⁾の臨床試験が計画されている。これは、現在パーキンソン病の治療としてすでに行われている視床下核の電気刺激に準じて、活動性が亢進している視床下核の機能を抑制することにより機能回復と神経保護作用を期待するものである。これまでのところ問題となる副作用は報告されていないが、安全性に配慮しながら本邦における遺伝子治療の実用化を目指したい。

おわりに

パーキンソン病に対する遺伝子治療として、線条体の神経細胞に AAV ベクターによりドパミン合成系の酵素遺伝子を導入し局所でドパミンの生成を行う方法と、神経栄養因子である GDNF の遺伝子を導入し黒質ドパミン細胞の変性を抑制する方法について、動物モデルにおける実験結果を紹介した。前者ではサルモデルでも治療効果がみられたことから臨床応用できると考えられる。

文 献

- 1) Monahan PE, Samulski RJ: AAV vectors: is clinical success on the horizon? *Gene Ther*, 7: 24-30, 2000.
- 2) 田代邦雄: 本邦における Parkinson 病の疫学調査。神経内科, 57: 467-470, 2002.
- 3) Cookson MR: Pathways to parkinsonism. *Neuron*, 37: 7-10, 2003.
- 4) Shen Y, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Fan DS, Ogawa M, Mizukami H, Urabe M, Kume A, Nagatsu I, Urano F, Suzuki T, Ichinose H, Nagatsu T, Monahan J, Nakano I, 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.
- 5) 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, 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.
- 6) Mochizuki H, Hayakawa H, Migita M, Shibata M, Tanaka R, Suzuki A, Shimo-Nakanishi Y, Urabe T, Yamada M, Tamayose K, Shimada T, Miura M, Mizuno Y: An AAV-derived Apaf-1 dominant negative inhibitor prevents MPTP toxicity as antiapoptotic gene therapy for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 10918-10923, 2001.
- 7) Kordower JH, Palfi S, Chen EY, Ma SY, Sendera T, Cochran EJ, Mufson EJ, Penn R, Goetz CG, Comella CD: Clinicopathological findings following intraventricular glial-derived neurotrophic factor treatment in a patient with Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 46: 419-424, 1999.
- 8) Bohn MC: Parkinson's disease: a neurodegenerative disease particularly amenable to gene therapy. *Mol Ther*, 1: 494-496, 2000.
- 9) Choi-Lundberg DL, Lin Q, Schallert T, Crippens D, Davidson BL, Chang YN, Chiang YL, Qian J, Bardwaj L, Bohn MC: Behavioral and cellular protection of rat dopaminergic neurons by an adenoviral vector encoding glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol*, 154: 261-275, 1998.
- 10) Connor B, Kozlowski DA, Unnerstall JR, Elsworth JD, Tillerson JL, Schallert T, Bohn MC: Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene delivery protects dopaminergic terminals from degeneration. *Exp Neurol*, 169: 83-95, 2001.
- 11) Kozlowski DA, Connor B, Tillerson JL, Schallert T, Bohn MC: Delivery of a GDNF gene into the substantia nigra after a progressive 6-OHDA lesion maintains functional nigrostriatal connections. *Exp Neurol*, 166: 1-15, 2000.
- 12) Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A, Mandel RJ: Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system. *J Neurosci*, 20: 4686-4700, 2000.
- 13) Mandel RJ, Snyder RO, Leff SE: Recombinant adeno-associated viral vector-mediated glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer protects nigral dopamine neurons after onset of progressive degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 160: 205-214, 1999.
- 14) Mandel RJ, Spratt SK, Snyder RO, Leff SE: Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus encoding rat glial cell line-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration model of Parkinson's disease in rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 14083-14088, 1997.

- 15) Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, Chen EY, Palfi S, Roitberg BZ, Brown WD, Holden JE, Pyzalski R, Taylor MD, Carvey P, Ling Z, Trono D, Hantraye P, Deglon N, Aebischer P: Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science*, 290: 767-773, 2000.
- 16) 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, 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.
- 17) Sanchez-Pernaute R, Harvey-White J, Cunningham J, Bankiewicz KS: Functional effect of adeno-associated virus mediated gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase into the striatum of 6-OHDA-lesioned rats. *Mol Ther*, 4: 324-330, 2001.
- 18) 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.
- 19) High KA: AAV-mediated gene transfer for hemophilia. *Ann NY Acad Sci*, 953: 64-74, 2001.
- 20) Janson C, McPhee S, Bilaniuk L, Haselgrove J, Testaiuti M, Freese A, Wang DJ, Shera D, Hurh P, Rupin J, Saslow E, Goldfarb O, Goldberg M, Larijani G, Sharrar W, Liouterman L, Camp A, Kolodny E, Samulski J, Leone P: Clinical protocol. Gene therapy of Canavan disease: AAV-2 vector for neurosurgical delivery of aspartoacylase gene (ASPA) to the human brain. *Hum Gene Ther*, 13: 1391-1412, 2002.
- 21) Doring MJ, Kaplitt MG, 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.