

パーキン遺伝子を用いた家族性・孤発性パーキンソン病に対する遺伝子治療の研究

研究期間 平成18年度～平成22年度(予定)



※平成21年度における研究体制

パーキンソン病に対する新たな遺伝子治療法

Project KeyWord

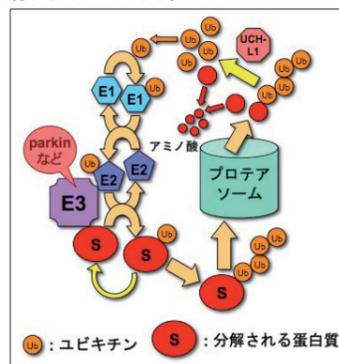
パーキンソン病	加齢に伴い発症頻度の高くなる神経変性疾患の一つで、アルツハイマー病に次いで患者数が多い。脳内の黒質ドパミン産生神経細胞の選択的な脱落が発症原因とされる。現時点で進行を抑制する根本的な治療法は無い。
遺伝子治療	人体に対する毒性を欠失させたウイルスベクターを用いて、治療遺伝子を生体内の特別な細胞に導入する治療方法。現在までパーキンソン病に対して3種類の遺伝子により治療効果の検証が行われている。
パーキン遺伝子	神経細胞内などで不要な蛋白質を除去するユビキチンプロテアソームシステムの構成因子・パーキン蛋白質をコードしている。パーキンソン病に対する新たな治療候補遺伝子として期待されている。

1 研究の背景・意義

パーキンソン病における遺伝子治療の現状

パーキンソン病の主な症状は、運動機能が障害されることであり、運動の調節に関わる黒質ドパミン神経細胞が死滅することが発症原因とされる。ドパミン神経細胞死の原因の一つとして、細胞内での異常蛋白質の蓄積が考えられている。現在治療の主流となっているのはドパミン合成前駆体であるレボドパの服用による対症療法であるが、治療の長期化に伴う不随運動の出現などが大きな問題となっている。

これまで重度のパーキンソン病患者に対して施された遺伝子治療には3種類ある。何れの場合も人体に害の少ないアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いている。①視床下核からの興奮出力を抑えるためグルタミン酸脱炭酸酵素を導入するというもの、②ドパミン合成を触媒する芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)を補充するものであり、これらは対症的なコンセプトに基づいている。もう一つは③細胞外に遊離される神経保護因子ニュートリンを線条体に充填する方法で、残存するドパミン神経を死滅から防ぐ目的で行われるものである。



本研究プロジェクトでは、神経細胞の内側から死滅を防ぐ目的で、不要蛋白質の除去に関わるパーキン(図)をAAVベクターにより補充して遺伝子治療効果を得られるか否かを検討した。

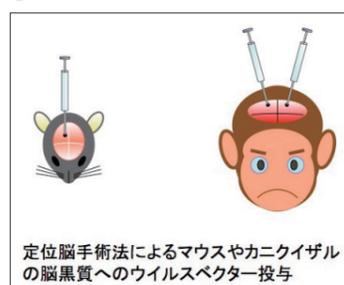
ユビキチンプロテアソームシステムの概略。連続的な反応によりユビキチンが付加され、不要な蛋白質の分解が引き起こされる。

2 研究プロジェクトの目標

パーキンによる遺伝子治療法の確立

パーキンソン病には、ごく稀ではあるが、単一の遺伝子変異により発症する遺伝性パーキンソン病の存在が知られており、その原因遺伝子がこれまでにいくつか同定されている。パーキン遺伝子はその一つで、蛋白質分解に関わる因子をコードしている。遺伝子変異によるパーキン蛋白質の機能損失が発症の引き金になると言われている。また家族歴のない孤発型のパーキンソン病患者においても、パーキン蛋白質の不活性化が起こっていると考えられている。そのため正常パーキンを補充することにより、遺伝型のみならずパーキンソン病患者の病態進行遅延・抑制が可能になると期待される。これまで培養細胞や小動物モデルを用いた検討により、パーキンが神経保護作用を有するという研究結果が、我々のグループを含め世界中から報告されている。

本研究プロジェクトの目標は、①新規パーキンソン病モデルマウスやカニクイザルにおけるAAV-パーキンの遺伝子治療効果の検証、②カニクイザルにおけるAAV-パーキン導入の安全性の検証、③臨床応用グレードのAAV-パーキンの調製、及びこれらに基づく④パーキンソン病患者に対する遺伝子治療法の確立である。



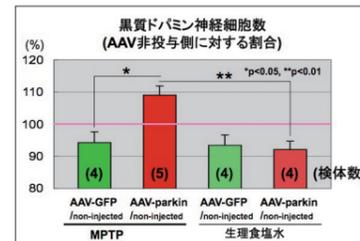
定位脳手術によるマウスやカニクイザルの脳黒質へのウイルスベクター投与

マウスやカニクイザルモデルの脳黒質にAAV-パーキンを導入し、ドパミン神経細胞の機能改善や細胞死抑制効果を調べる。

3 研究プロジェクトの成果

新規マウスモデルでのパーキン遺伝子治療

マウスやサルにおいてパーキンソン病モデルの作製に広く用いられているMPTPという薬剤を使用した。事前にAAV-パーキン、対照としてオワンクラゲの緑色蛍光蛋白質GFPを搭載するAAVをマウス黒質に投与しておき、2週間後に腹腔内埋め込み型の浸透圧ポンプにより約1ヶ月間、持続投与して慢性MPTPモデルを作製した。それぞれの対照として、生理食塩水を浸透圧ポンプで持続投与したものを用いた。その結果、AAV-パーキン自体の毒性は見られず、またMPTP神経毒性に対する保護効果が行動学的、病理学的に確認できた。図は黒質ドパミン神経細胞数(AAV非投与側に対する割合)を示している。



浸透圧ポンプによりMPTPを慢性投与したマウスモデルにおいて、AAV-パーキンによる遺伝子治療効果が確認できた。

カニクイザルのパーキンソン病モデル作製

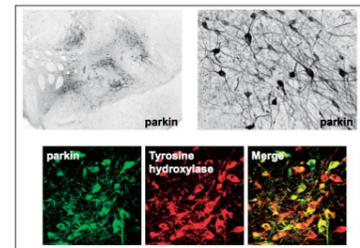
パーキンソン病患者のドパミン神経細胞に蓄積するαシヌクレインをウイルスベクターを用いて黒質内で過剰発現することにより、パーキンソン病動物モデルを作製出来ることが報告されている。ここではカニクイザルに対してAAV-αシヌクレインを投与してモデル作製を試みた。核磁気共鳴画像法(MRI)に基づいたナビゲーションシステムにより、カニクイザルなどの大型動物に対する正確な脳内ベクター注入が可能となった(図)。AAV-αシヌクレイン注入後、運動機能の低下が認められ、また病理学的にもドパミン神経細胞の脱落が見られたことから、有用なパーキンソン病モデルが作製できた。



ナビゲーションシステムによるウイルスベクター注入。注入針をMRI画像と重ね合わせリアルタイムモニタリングが可能となった。

カニクイザルにおけるAAV-パーキンの安全性

AAV-パーキン投与自体の安全性確認のため、カニクイザル黒質へのAAV-パーキン投与後にパーキンの分布、及び黒質神経細胞の生存度への影響を調べた。注入9週間後まで行動異常は認められず、またパーキンに対する免疫組織染色を行ったところ、黒質ドパミン神経細胞内でのパーキン過剰発現が確認できた。図下側ではパーキンを緑色、ドパミン神経のマーカーであるチロシン酸化酵素を赤で示し、両者が重なった場合に黄色で確認することが出来る。またドパミン神経細胞の生存度に対する大きな影響は見られなかった。今後、より長期的な検討を行い、AAV-パーキンの安全性をさらに検証する予定である。



AAV-パーキン投与により、カニクイザルの黒質ドパミン神経細胞でパーキンの発現が確認された。

4 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

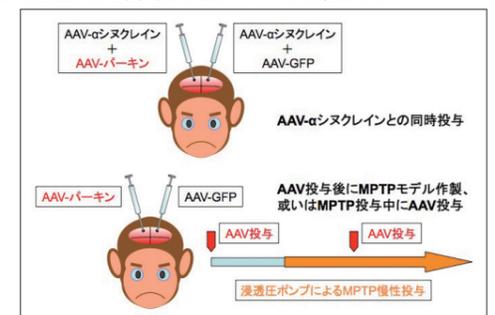
サルモデルでのパーキン遺伝子治療効果

今後の研究計画では、AAV-αシヌクレインを用いたカニクイザルモデルにおいて、AAV-パーキンの遺伝子治療効果の検証を行う。AAV-αシヌクレイン+AAV-GFPを片側黒質に、AAV-αシヌクレイン+AAV-パーキンを反対側黒質に投与して、同一個体内での治療効果を行動的、及び病理学的に解析する。現在少数のサルにおいて保護効果が確認されつつあり、検体数を増やして検討を継続する。

また、浸透圧ポンプによるMPTP慢性投与モデルを確立し、AAV-パーキン投与後のMPTP投与モデル、さらにMPTP投与中のAAV-パーキン投与モデルについて遺伝子治療効果を検証する。

一方でAAVベクターを用いたRNAi法によりパーキン発現抑制を行い、パーキン欠損モデルマウスやサルの作製を試みる。これらのモデルにおけるパーキン遺伝子治療実験を計画する。

治療効果の確認と同時に安全性の確認が必要不可欠であり、カニクイザルへのAAV-パーキン単独投与後の長期観察を行う。また、上記パーキンソン病モデルにおける検討を基準としてAAV-パーキンの至適濃度・投与量・投与箇所数などプロトコルを確立する。



カニクイザルモデルにおけるAAV-パーキン治療効果の検証方法。

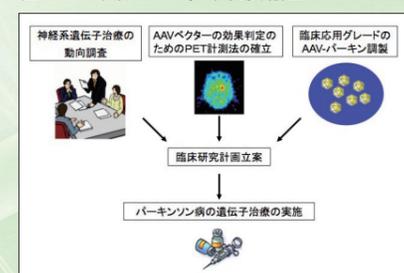
臨床品質のベクター作製や今後の研究方針

臨床応用グレードのAAV-パーキンベクターの開発を行う。企業との共同開発により現在試作中であり、カニクイザルを用いて投与実験を計画している。

国内外の遺伝子治療関連学会や科学雑誌において本研究成果を公表し、治療方法やPET計測法による効果の判定方法などについて有識者や専門家など意見を交換し、倫理面や法律的側面についても配慮しながら慎重に計画を進める必要がある。

2007年5月、我が国で初めて自治医科大学においてパーキンソン病に対する遺伝子治療(AAV-AADC)が行われたが、これを規範として倫理委員会の設置、臨床プロトコルの作製、厚生労働省への申請、対象患者の選定などを順次計画していく予定である。

また脳内のグリア細胞にαシヌクレインが蓄積し、現在治療法の存在しない難病である多系統萎縮症に対して、AAV-パーキンによる



パーキンソン病患者への遺伝子治療のための今後の研究計画について。

遺伝子導入治療が応用できるか否かについて検討を行う。マウスモデルやカニクイザルモデルの作製を試み、また様々な血清型のAAVベクターを用いてグリア細胞への遺伝子導入法を確立する。

参考文献
 Yamada M, Mizuno Y, Mochizuki H. (2005) Parkin gene therapy for alpha-synucleinopathy: a rat model of Parkinson's disease. Hum Gene Ther 16(2):262-270.
 Yasuda T, Miyachi S, Kitagawa R, Wada K, Nihira T, Ren YR, Hirai Y, Ageyama N, Terao K, Shimada T, Takada M, Mizuno Y, Mochizuki H. (2007) Neuronal specificity of alpha-synuclein toxicity and effect of Parkin co-expression in primates. Neuroscience 144(2):743-753.
 Mochizuki H, Yasuda T, Mouradian MM. (2008) Advances in gene therapy for movement disorders. Neurotherapeutics 5(2):260-269.