

＜日本神経学会 2008 年度橋林賞受賞者招待講演＞

## パーキンソン病の遺伝子治療研究

望月 秀樹

要旨：近年パーキンソン病治療としてアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターをもちいた 4 種類の遺伝子治療クニカルトリアル phase I が開始された。遺伝子治療法の主体はアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターで、それ自身の病原性や自己増殖等のみとめない。パーキンソン病に対する遺伝子治療は、現在必ずしも最良の治療とは思わないが、さらなる進歩により将来的に新たな治療手段になる可能性は否定できない。本稿では、パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究の紹介とそれに関連するわれわれの遺伝子治療研究について概説する。

(臨床神経, 49 : 753—755, 2009)

Key words : 遺伝子治療, パーキンソン病, アデノ随伴ウイルスベクター, パーキン

### パーキンソン病の遺伝子治療

まずパーキンソン病遺伝子治療の概略について述べる。遺伝子を体に投与するときには、直接ウイルスベクター等もちいて投与する *in vivo* 法と取り出した細胞に修復遺伝子を入れてもどす方法の *ex vivo* 法がある。たとえば iPS 細胞に正常な遺伝子を導入してから神経細胞にして修復するという治療法である。また、これまで遺伝子治療が進んだのはウイルスベクターの進歩によるものと考えられている。アデノ随伴ウイルスベクターは、神経細胞に効率よく遺伝子導入でき、さらに安全性が高いことが特徴である。そのため、海外を中心にすでに 4 つのパーキンソン病遺伝子治療のプロトコルが進んでいる。一部はすでに phase II に移行してその有用性について検討されている。そして、日本においても自治医科大学中野教授を中心に AAV-AAADC の遺伝子治療が開始された。またそれにともなって、日本のパーキンソン病ガイドラインにも遺伝子治療の項が登場しており、これは、遺伝子治療研究に携わってきたものにとって、この上も無い喜びである。

### 抗細胞死遺伝子治療

それでは、私が進めてきた研究について紹介する。パーキンソン病の細胞死にミトコンドリア呼吸鎖の障害が知られているが、その細胞死の過程でカスパーゼが関与していることが知られている。具体的には、ミトコンドリア呼吸障害からミトコンドリア膜ポテンシャルの低下をきたし、それによりミトコンドリアからチトクローム c の漏出をひきおこし、Apaf-1、カスパーゼ 9 を介し、下流のカスパーゼ 3 を活性化することにより導かれるアポトーシスをひきおこす系がパーキンソン病の細胞死に関与していることをうたがひ、それを制御する Apaf-dominant negative の CARD 遺伝子をコードする AAVvector をマウス黒質に投与した後に MPTP を全身投与

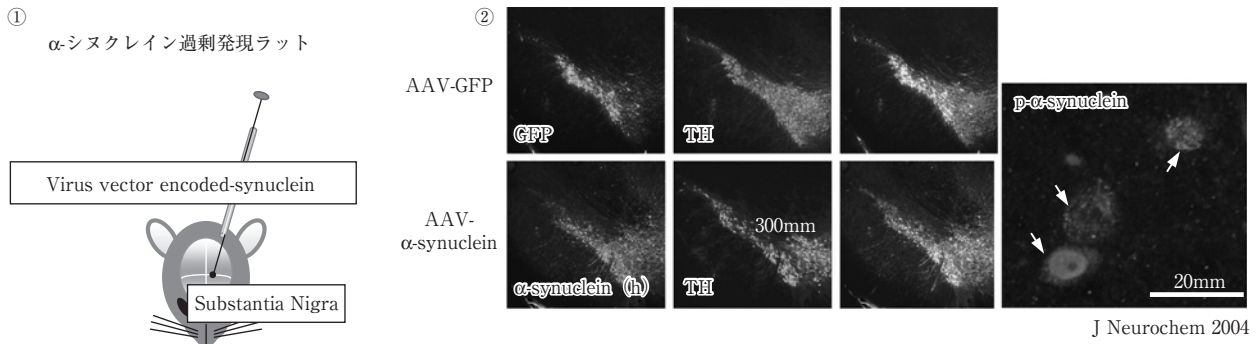
した。遺伝子導入した側のみ細胞死をおさえることに成功し、この結果からパーキンソン病の細胞死にはミトコンドリアの関与が重要であることを示した<sup>1)</sup>。

### 霊長類をもちいたパーキンソン病モデル

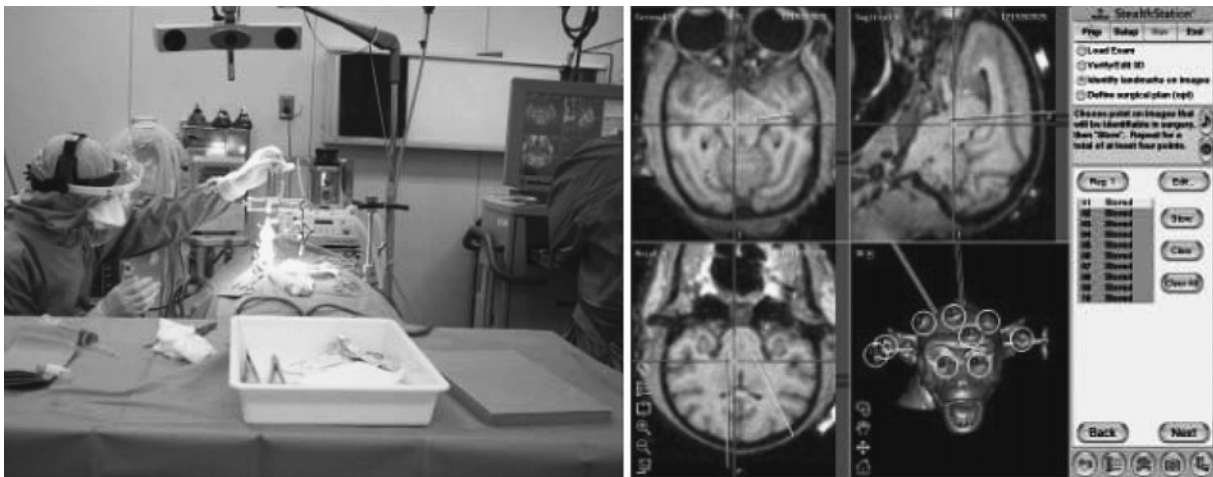
このような、治療効果を試すために臨床の前に大型の霊長類のモデルを作成することを試みた。具体的には、 $\alpha$  シヌクレインに注目した。 $\alpha$  シヌクレインは孤発性パーキンソン病では、レビー小体に沈着し、常染色体優性家族性パーキンソン病の原因遺伝子のひとつであるため、その過剰発現が細胞死を生じる可能性を考えた。われわれは、先程の AAV ベクターをもちいて黒質に選択的に投与したところ、リン酸化シヌクレインの発現をみとめ、選択的に細胞が障害することを確認し報告した<sup>2)</sup> (Fig. 1)。次に、この手法をもちいて霊長類のパーキンソン病モデル作成に移行した。当初、霊長類の黒質に遺伝子を投与することに苦労したが、共同研究者の高田らのグループがヒトと同じ Navigation system を使用して黒質への投与が可能になった (Fig. 2)。注入から 5 週では、症状が出現しなかったが病理学的には黒質で  $\alpha$  シヌクレインの過剰発現を確認できた。8 週以降に症状が確認でき、黒質の神経細胞の選択的脱落をみとめ、進行性のパーキンソン病モデル作製に成功した。

### パーキンソン病遺伝子治療

常染色体劣性遺伝若年発症型家族性パーキンソンニズム (Autosomal recessive juvenile Parkinsonism : ARJP) のひとつ PARK2 の原因遺伝子産物である parkin は、ユビキチン・プロテアソームシステムを構成する E3 ユビキチンリガーゼの一種であることが知られている。PARK2 は Parkin 蛋白質の機能損失によりひきおこされるとされており、その基質蛋白質の蓄積がドバミンニューロン変性の原因と考えられてい

Fig. 1 パーキンソン病と $\alpha$ -シヌクレイン

① AAV-GFP, AAV- $\alpha$ -シヌクレインと定位脳手術にて投与 ② AAV-GFP では、黒質は正常だが $\alpha$ -シヌクレイン投与モデルでは黒質の変性脱落をみとめる。一部リン酸化 $\alpha$ -シヌクレイン陽性細胞をみとめる。



- ・基準となるマーカーをサルの皮膚に貼る。
- ・脳のMRIを撮影
- ・ターゲット（黒質）stereotaxic coordinatesを計測
- ・Stereotaxicに針を刺入，ウイルスベクターを注入

高田らとの霊長類センターでの共同研究

Fig. 2 Navigation Systemの概略

る。parkin 遺伝子をもちいた parkin 変異による家族性パーキンソン病に対する治療法は、変異遺伝子にかわる正常遺伝子を導入するという遺伝子治療である。しかも病変は、黒質に限局しているので遺伝子導入による治療効果は充分期待できる。一方で、parkin の遺伝子治療は動物実験ではあるがMPTPモデルや6-OHDAモデルでも治療効果が海外から報告されている。われわれも、先程のAAVベクターでコードされた $\alpha$ シヌクレイン遺伝子を黒質ドパミン神経細胞に過剰発現することにより作製した片側のパーキンソン病モデルに、parkin 遺伝子をAAVベクターで黒質同時投与する事により病理所見の改善、運動効果の改善を確認した<sup>3)</sup>。家族性パーキンソン病患者さんのみならず孤発型パーキンソン病患者さんにも有用な治療法と期待されている。現在、われわれのグループでは霊長類をもちい、parkin 遺伝子導入の治療効果や安全性を検討中であり、将来的に臨床応用すべく研究を続けている<sup>4)</sup>。

### 遺伝子治療、再生医療研究の方向性

今後は、より安全な治療用遺伝子や再生医療が要求される。そのためには、ES細胞よりiPS細胞が推奨されるであろうが、癌化の問題が挙げられる。癌化を抑制することが重要であろう。

そして、より正確に治療用遺伝子や細胞を運搬することが必要となるために、組織特異的に遺伝子を発現させるためのキャリアーの開発が重要になる。より厳密に神経細胞を修復することが要求されるために、移植細胞のシナプス形成を目指すことが必須となる。より簡便に治療用遺伝子や細胞を運搬することが患者さんのメリットになる。そのために、遺伝子導入法が従来の定位脳手術よりもっと簡便な静脈注射や、ワクチンなどによる投与法の開発のさらなる発展が期待される分野と思われる。今後の科学の進歩に期待したい。

**謝辞**：この度は、楯林賞に選定いただきありがとうございます。選考委員の先生にお礼を申し上げます。楯林先生に憧れて楯林神経内科に入局したものとして、楯林博太郎先生の冠のついた賞をいただくことは、ありがたく光栄に思っております。共同研究していただいた日本医科大学島田隆教授、京都大学高田昌彦教授、自治医科大学小澤敬也教授、本賞に推薦していただいた順天堂大学服部信孝教授、研究をご指導いただいた精神研秋山治彦先生など多くの先生に感謝いたします。また、今回の賞は、パーキンソン病の研究でいただいたものですが、私のパーキンソン病の基礎研究は最初から水野美邦教授のご指導によるものです。この場をお借りしてお礼を述べさせていただきます。

#### 文 献

1) Mochizuki H, Hayakawa H, Migita M, et al: An AAV-derived Apaf-1 dominant negative inhibitor prevents

MPTP toxicity as anti-apoptotic gene therapy for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10918—10923

2) Yamada M, Iwatsubo T, Mizuno Y, et al: Overexpression of alpha-synuclein in rat substantia nigra results in loss of dopaminergic neurons, phosphorylation of alpha-synuclein and activation of caspase-9: resemblance to pathogenetic changes in Parkinson's disease. *J Neurochem* 2004; 91: 451—461

3) Yamada M, Mizuno Y, Mochizuki H: Parkin gene therapy for alpha-synucleinopathy: a rat model of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 262—270

4) Yasuda T, Miyachi S, Kitagawa R, et al: Neuronal specificity of alpha-synuclein toxicity and effect of Parkin co-expression in primates. *Neuroscience* 2007; 19: 743—753

#### Abstract

### The studies of gene therapy for Parkinson's disease

Hideki Mochizuki, M.D.

Department of Neurology, Kitasato University

Currently, four Phase I clinical trials are underway utilizing recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors for the treatment of Parkinson's disease. The vehicle used mainly for gene delivery to the human brain is rAAV vector, which is non-pathogenic and non-self-amplifying. At present, the gene therapy approach is not the best way for the treatment of PD patients, but we believe that the further progress is anticipated toward making this strategy a therapeutic option for PD in the future. This article will review currently ongoing clinical trials of PD gene therapy and then introduce our studies about the gene therapy for PD.

(*Clin Neurol*, 49: 753—755, 2009)

**Key words:** Gene therapy, Parkinson's disease, AAV vector, parkin