

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K15685

研究課題名（和文）小児中枢神経疾患に対するアデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子治療の開発

研究課題名（英文）Development of Gene Therapy for Pediatric Neurological Diseases Using Adeno-Associated Virus Vectors

研究代表者

小島 華林 (Kojima, Karin)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00468331

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々はAADC欠損症に対してAAV2ベクターを定位脳手術により両側被殻へ注入する遺伝子治療を2015年から臨床研究として行い、治療を受けた全員が運動機能の改善が得られた。治療後長期にわたる効果を、MRI画像解析、運動機能・認知機能評価等を用いて解析した。早期の診断・治療が重要であり、AADC欠損症スクリーニング検査の確立のためにパイロットスタディを行なった。小児神経疾患には、遺伝子異常による疾患が多い。未診断例の分子遺伝学的解析を行うとともに、Rett症候群及びMECP2重複症候群に対するAAVを用いた遺伝子治療を開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子異常による神経疾患治療に神経移行の良いAAVを用いた遺伝子治療は根本治療として期待されている。AADC欠損症の遺伝子治療により、ベクター注入した被殻でのAADC発現が長期に確認でき、運動機能・認知機能の改善が持続している知見は今後の遺伝子治療開発にも重要な知見である。Rett症候群・MECP2重複症候群の遺伝子治療の開発は世界的に期待されている。

研究成果の概要（英文）：We have been conducting a clinical study since 2015 on gene therapy for AADC deficiency, in which AAV2 vector was injected into both sides of the putamen via stereotactic brain surgery. All patients who received the gene therapy showed improvement in motor function. The long-term effects of the treatment were analyzed using MRI imaging, motor function assessments, and cognitive function evaluations. Early diagnosis and treatment are crucial, and we conducted a pilot study to establish a screening test for AADC deficiency.

Many pediatric neurological disorders are caused by genetic variants. Alongside molecular genetic analysis of undiagnosed cases, we have been developing gene therapy using AAV for Rett syndrome and MECP2 duplication syndrome.

研究分野：小児神経

キーワード：AADC欠損症 遺伝子治療 AAV スクリーニング Rett症候群 MECP2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

AADC 欠損症はドパミン・セロトニン合成に必須の酵素 AADC が先天的に欠損し、典型例は乳児期から運動発達が得られない常染色体劣性遺伝性疾患である。当科では AADC 欠損症に対してアデノ随伴ウイルス 2 型(AAV2)ベクターを定位脳手術により両側被殻へ注入する遺伝子治療を 2015 年から臨床研究として行った。遺伝子治療を受けた患者全員が運動機能改善し、認知機能が著しく改善した患者もいる (Kojima, et al, Brain 2019)。治療時の年齢が低い方が治療効果は高く、早期の診断・治療が重要である事も分かった。AADC 欠損症を早期診断するために、低侵襲・高効率な診断法を確立することが重要である。また、遺伝子治療効果による器質的・機能的な変化の解析を長期間にわたり行う必要がある。

小児神経疾患には、単一遺伝子異常による疾患が多く、遺伝子治療は根本的治療として期待されている。未診断の神経疾患患者の分子遺伝学的解析は疾患理解のみならず、今後の治療法開発に重要である。これまで治療法がなかった疾患に対する遺伝子治療開発はニーズが高い。

2. 研究の目的

本研究では下記を目的として、研究を行なった。

- (1) AADC 欠損症の遺伝子治療を行なった患者の多角的評価。
- (2) AADC 欠損症の早期診断スクリーニングシステムの確立。
- (3) 小児神経疾患の診断及び分子病態解析と遺伝子治療法開発。

3. 研究の方法

- (1) AADC 欠損症の遺伝子治療を行なった患者の多角的評価。

MRI 画像を用いた治療前後の比較。

遺伝子治療後 2 年以上の患者を対象に、Functional MRI 画像及び拡散テンソルイメージング (DTI MRI) を用い、神経投射線維の変化を解析した。運動機能や認知機能との関連を解析する。

FMT-PET 解析。

AADC の特異的なトレーサーである 6-[(18)F]fluoro-l-m-tyrosine (FMT) を用いて、PET 検査を治療前後で行い比較する。遺伝子治療前は、脳内で AADC の発現が見られなかったが、遺伝子治療後 6 か月、2 年、5 年で、ベクターを注入した被殻で AADC の発現が持続しているかを確認する。

運動機能の評価。

AADC 欠損症患者のほとんどは、首も座らず生涯寝たきりである。しかし、遺伝子治療を行うことで、坐位保持が可能となる、支えられての歩行が可能となる方もおり、運動機能改善がみられた。運動機能の評価には、乳幼児期の運動発達を評価する Alberta Infantile Motor Scale (AIMS) を用いた。治療前後での運動機能の変化を解析する。

認知機能の評価。

AADC 欠損症では重度の知的障害となる。症状が軽い方でも単語数語のみの発語である。遺伝子治療により、認知機能が改善した。認知機能の評価は、新版 K 式発達検査を用いて、治療前後で比較する。

- (2) AADC 欠損症の早期診断スクリーニングシステムの確立。

AADC は、L-dopa をドパミンに、5-HT をセロトニンに変換する酵素であり、AADC 欠損によりドパミン、セロトニンは低下する。ドパミンへ変換されなかった L-dopa は代謝され 3-O-Methyl-dopa (3-OMD) となる。AADC 欠損症患者では、3-OMD が増加することが知られている。3-OMD は乾燥ろ紙血を用いて液体クロマトグラフィ質量分析法 (LC-MS/MS) で測定できる。AADC 欠損症の診断には、髄液検査でカテコラミン測定が必要だが、侵襲的検査であり、髄液検査施行は疾患を強く疑う場合に限られる。低侵襲で簡便なスクリーニング検査法として、LC-MS/MS を用い乾燥ろ紙血の 3-OMD を測定する解析系を当科で樹立した。パイロット研究として保護者より同意を得た院内出生新生児の乾燥ろ紙血を収集し、3-OMD を測定した。パイロット研究を通じて、検体収集・輸送システム等、実施方法の検討等を行う。

- (3) 小児神経疾患の診断及び分子病態解析と遺伝子治療法開発。

小児神経疾患患者 iPS の樹立及び大脳皮質オルガノイド作成。

Rett 症候群患者、MECP2 重複症候群患者、X 遺伝子 variant を持つ患者から、iPS 細胞を樹立し、それぞれ大脳皮質オルガノイドを作成し解析する。

他の小児神経疾患に対する AAV ベクターを用いた治療法の開発。

Rett 症候群、MECP2 重複症候群に対する遺伝子治療として CRISPR-dCas システムを応用し AAV ベクターを開発する。

未診断の神経疾患患者の遺伝子解析及び分子病態解析。

4. 研究成果

(1) AADC 欠損症の遺伝子治療を行なった患者の多角的評価。

MRI 画像を用いた治療前後の比較。

遺伝子治療を受けた 8 名 (4-19 歳) を対象に、治療 6 か月後及び 2 年後の Functional MRI 画像及び拡散テンソルイメージング (DTI MRI) を用い、神経投射線維の変化と運動機能 (AIMS) との比較を行なった。治療 6 か月後の AIMS score の高さと、前頭前野と被殻の結合の強さは正の相関が見られた (Onuki, Ono, Nakajima, Kojima et al. Brain Comm 2021)。

FMT-PET 解析。

遺伝子治療を受けた 8 名 (4-19 歳) を対象とした。遺伝子治療前は、脳内で AADC の発現が見られなかったが、遺伝子治療後 6 か月、2 年、5 年で、治療 AAV ベクターを注入した被殻で AADC の発現が持続していた。投与ベクターに搭載した DDC 遺伝子が長期に発現していることを確認した。

運動機能の評価 (AIMS)。

遺伝子治療を受けた 8 名 (4-19 歳) を対象とし、AIMS score を治療前後で比較した。寝たきりだった重症型 7 名は、治療前 0 点であったが、治療 3 か月後から score が増加し、緩やかではあるが経時的に 2 年まで増加し (15-30 点)、治療後 4-5 年間スコア維持を確認した。

認知機能の評価。

遺伝子治療を受けた 8 名のうち、日本語で検査が可能な 6 名 (4-19 歳) に新版 K 式発達検査を行い、治療前後の発達指数 (DQ) を比較した。治療前は単語数後を話すのみだった中間型 (6 歳) は、言語社会性スコア (DQ) は治療前 DQ40 から治療 1 年後 DQ80 を超え、その後も維持していた。

(2) AADC 欠損症の早期診断スクリーニングシステムの確立。

パイロット研究として保護者より同意を得た院内出生新生児 62 名の乾燥ろ紙血を収集した。3-OMD 値は、 77.90 ± 20.84 ng/mL ($n=62$) であった。AADC 欠損症患者で 2479 ± 1299 ng/mL (平均 \pm SD, $n=5$)、保因者で 20.3 ± 4.45 ng/mL ($n=7$)、正常コントロールで 25.5 ± 16.7 ($n=20$) であったため、カットオフ値を 300 ng/mL と設定したが、新生児 62 名は全員カットオフ値以下で陽性者はいなかった (渡辺、小島ら、日本マススクリーニング学会 2021)。

(3) 小児神経疾患の診断及び分子病態解析と遺伝子治療法開発。

小児神経疾患患者 iPS の樹立及び大脳皮質オルガノイド作成。

Rett 症候群患者、MECP2 重複症候群患者、X 遺伝子 variant を持つ患者から、iPS 細胞を樹立した。それぞれ大脳皮質オルガノイドを作成し、Day35、Day70、Day105、Day140 で harvest した。各ステージにおける遺伝子発現量を RNAseq で解析中である。

他の小児神経疾患に対する AAV ベクターを用いた治療法の開発。

小児期に発症する神経疾患で、MECP2 遺伝子の機能喪失で発症する Rett 症候群、MECP2 遺伝子重複で発症する MECP2 重複症候群に対する遺伝子治療を開発中である。MECP2 は厳密に発現量が調整されており、遺伝子治療では発現量の調整が必要となる。現在、CRISPR-dCas システムを応用した AAV ベクターを開発中である。

未診断の神経疾患患者の遺伝子解析及び分子病態解析。

ATRX 遺伝子と ERCC6 遺伝子変異を持つ Cockayne 症候群患者の臨床症状と遺伝子変異の関連を解析した。ATRX 遺伝子 variant (c.21-1G>A) は alpha thalassemia X-linked intellectual disability syndrome (ATR-XS) を生じる病的変異と報告されていたが、変異部位より下流にスタートコドンがあり、機能的 ATRX 蛋白が作られるため、ATR-XS の症状を呈さないことを報告した。 (Kojima, et al. Hum Gen Var 2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 小島華林	4. 巻 84
2. 論文標題 【小児遺伝子疾患事典】代謝疾患 DDC(関連疾患:芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素<ADC>欠損症).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 1520-1523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Keuls Rachel A., Kojima Karin, Lozzi Brittney, Steele John W., Chen Qiuying, Gross Steven S., Finnell Richard H., Parchem Ronald J.	4. 巻 21
2. 論文標題 MiR-302 Regulates Glycolysis to Control Cell-Cycle during Neural Tube Closure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21207534	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 渡邊知佳, 小島華林, 黒川愛恵・他	4. 巻 31
2. 論文標題 芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素(AADC)欠損症診断のための乾燥血液濾紙によるスクリーニング検査法と血漿AADC酵素活性測定系の開発.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本マススクリーニング学会誌	6. 最初と最後の頁 27-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Karin Kojima Takeshi Nakajima Naoyuki Taga Akihiko Miyauchi Mitsuhiro Kato Ayumi Matsumoto Takahiro Ikeda Kazuyuki Nakamura Tetsuo Kubota Hiroaki Mizukami Sayaka Ono Yoshiyuki Onuki Toshihiko Sato Hitoshi Osaka Shin-ichi Muramatsu Takanori Yamagata	4. 巻 142
2. 論文標題 Gene therapy improves motor and mental function of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 322-333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awy331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Karin Kojima
2. 発表標題 Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency in Japan improved the motor and mental function of patients with various phenotypes.
3. 学会等名 12th International Collaborative Forum of Human Gene Therapy for Genetic Diseases (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Karin Kojima, Takeshi Nakajima, Naoyuki Taga, Hitoshi Osaka, Shin-ichi Muramatsu, Takanori Yamagata
2. 発表標題 Improvement of Motor and Cognitive Function by Gene Therapy for Patients with AADC Deficiency
3. 学会等名 American society of gene and cell therapy the 21st annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小島華林、平井 真洋、中嶋 剛、多賀直行、宮内彰彦、小坂 仁、村松慎一、山形崇倫
2. 発表標題 AADC欠損症に対する遺伝子治療の効果：運動・認知機能の改善。
3. 学会等名 第33回日本大脳基底核研究会：シンポジウム。（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Karin Kojima, Takanori Yamagata.
2. 発表標題 Gene therapy for child neurological diseases: Effective for AADC deficiency, new challenges for Glut1-deficiency syndrome and potential for other diseases.
3. 学会等名 The 24th Annual Meeting of the American Society of gene and cell therapy (JSGCT2018): Symposium. (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小島 華林、山形 崇倫.
2. 発表標題 Gene therapy for AADC deficiency, AADC 欠損症に対する遺伝子治療臨床研究の成果と他疾患への応用.
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会学術集会:シンポジウム.(招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

PARCHEM LAB https://www.parchemlab.org AADC欠損症遺伝子治療 Gene therapy for AADC deficiency http://www.jichi.ac.jp/usr/pedi/aadc/index.html
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Baylor College of Medicine		