

201015023B

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業

NDDPX08の筋萎縮性側索硬化症に対する医師主導臨床研究

平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 池田 穰衛

平成24（2012）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

NDDPX08の筋萎縮性側索硬化症に対する医師主導臨床研究

平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 池田 穰衛

平成24（2012）年 3月

目次

I.	総合研究報告	-----	1
	NDDPX08の筋萎縮性側索硬化症に対する医師主導臨床研究		
	池田 穰衛		
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	15
III.	研究成果の刊行物・別刷	-----	19
IV.	添付資料	-----	43
	資料1 臨床研究プロトコール		
	日本語版		
	英文版		
	資料2 臨床研究被験者への説明文書および同意文書		
	資料3 臨床研究に係る記録書類		
	資料4 臨床研究実施に係る資料		
	資料5 調剤に係る資料		
	資料6 統計解析計画書		
	資料7 有効性の要約に関する推移		

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
総合研究報告書
NDDPX08の筋萎縮性側索硬化症に対する医師主導臨床研究
研究代表者 池田 穰衛
東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は上位と下位の運動神経の変性脱落を特徴とする原因不明の難治性運動神経変性疾患である。発症後2年から5年で死にいたる重篤な疾患であり、その治療法は未だ確立していない。ALS治療薬の開発は、ALS患者とその家族の肉体的、精神的、経済的負担を取り除き、生活の質の向上と医療保険費の軽減に大きく貢献するものである。

近年、ALSの発症と進行の分子背景として、酸化ストレスや活性酸素種による運動ニューロンの変性を裏付ける知見が蓄積している。我々はこれまでに、医薬品化合物NDDPX08（化合物名、bromocriptine mesylate）が酸化ストレス性神経細胞死に対して選択性の高い抑制活性を示すこと、そして、ALS（*SOD1H46R*）マウスモデルでの発症後投与において、運動神経機能保全ならびに発症後生存期間の延長に顕著な効果を発揮する新たな薬理作用を呈すること等を見出している。さらに、bromocriptine mesylateはパーキンソン病の治療薬として長年にわたり臨床で使用されており、その安全性も確認されている。

本臨床研究では、未だ確固たる治療法が確立していないALS治療における新規治療薬の開発を目的とし、多医療施設（東海大学、北里大学、東邦大学）において、弧発性および家族性の日本人ALS患者を対象とし、偽薬対照を含むリゾール併用二重盲検試験（米国FDAの指針に準じたPhase 2aプロトコルを適用）を計画し、bromocriptine mesylateの安全性と臨床効果を検証した。平成20年度～23年度（平成23年度は1年延長期間）における本臨床研究への参加に同意が得られた患者の総数は49名であった。観察期（12週間）を経て本登録基準を満たした試験薬投与患者の総数は38名であった。本臨床研究期間中、試験薬との因果関係が考えられる有害事象は観察されなかった。有効性及び安全性の統計解析対象群のデータ固定後に投薬情報コードを開示した。実薬投与群は31症例、偽薬投与群は7症例であった。その内、有効性解析対象集団としては、最大解析対照群（FAS）36症例（実薬投与群29症例、偽薬投与群7症例）であった。FAS群は全てプロトコル適合群（PPS）であった。外部機関による本臨床試験の統計学的解析結果をALS治療計画評価委員会に報告し、bromocriptine mesylateの安全性と有効性の判定を委ねた。その結果、「日本人ALS患者に対するbromocriptine mesylateの安全性については、中長期連投薬症例群において憂慮すべき弊害は認められず安全性は概ね保障されている」、「本統計解析条件での解析結果から、実薬投与ALS症例群において最も顕著な有意傾向が上肢及び下肢機能の維持を始め複数のQOL機能に認められている、さらにALSFRS-Rトータルスコア、頸部筋力維持においても有意傾向が確認されている。従って、bromocriptine mesylateのALS用薬としての有効性を更にPhase 3臨床試験で検証する事が妥当である」との総合評価を得た。

本臨床研究成果は最少症例数での結果であるが、統計学的にもbromocriptine mesylateの明らかな臨床効果（傾向）が示されている。従って、より多くの症例数で、より治療に近い形でのbromocriptine mesylateの効果と安全性を確認（Phase 3臨床試験）することで、ALS治療の新規治療薬としての開発が期待できる。

分担研究者

高木 繁治	東海大学医学部内科学系 神経内科 教授
吉井 文均	東海大学医学部内科学系 神経内科 教授
瀧澤 俊也	東海大学医学部内科学系 神経内科 教授
永田 栄一郎	東海大学医学部内科学系 神経内科 講師
北川 泰久	東海大学医学部付属 八王子病院 神経内科 教授
岩崎 泰雄	東邦大学医療センター 大森病院 神経内科 教授
荻野 美恵子	北里大学部付属東病院 神経内科 講師

研究協力者

高橋 裕秀	東海大学医学部内科学系 神経内科 准教授
高橋 若生	東海大学医学部内科学系 神経内科 准教授
大貫 優子	東海大学医学部内科学系 神経内科 助教
大貫 知英	東海大学医学部内科学系 神経内科 助教
尾上 久一郎	東海大学総合医学研究所 非常勤 講師
岩本康之助	東邦大学医療センター 大森病院 神経内科 助教

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は上位運動ニューロン及び下位運動ニューロンの選択的な変性脱落を特徴とする進行性の神経変性疾患である。ALSの大半は孤発性であり、約10%が家族性である。これまでに家族性ALSの複数の原因遺伝子が同定され、さらに孤発性ALSの病態に関連する幾つかの危険因子が報告されているにも関わらず、未だ運動ニューロン死の原因は不明であり、さらに有効な治療方法も確立されていない。現在、ALS治療にはリルゾー

ルが使用されているが、わずかな延命効果をもたらすのみである。ALS治療薬の開発は、ALS患者とその家族の肉体的、精神的、経済的負担を取り除くだけでなく、生活の質 (QOL) の向上と医療保険費の軽減に大きく貢献するものである。

近年、ALSの発症・進行の分子背景として、酸化ストレスや活性酸素種による運動ニューロンの変性・細胞死が大きく関わっていることを裏付ける状況証拠が蓄積してきている。我々はこれまでに、脊髄性筋萎縮症の重篤度に関わる因子として neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP; 改称 NLR) を同定し、NAIP の酸化ストレス性細胞死に対する選択的な抑制活性と神経細胞保護機能について明らかにした (*Nature* (1996) 379, 349-353、*Nat. Med.* (1997) 3, 997-1004)。そして、新たな神経変性疾患治療薬開発の観点から、内因性NAIPの活性化化合物のスクリーニング系 (NAIP-based ALS Drug Screening) を開発し、神経向性化合物カタログの中から一群のヒット化合物を同定した。中でも、L-745, 870 (ドーパミン D4 受容体拮抗剤) と NDDPX08 (既存の神経変性疾患治療薬: 知財保護のためコード名で表記する) は培養細胞系での酸化ストレス性細胞死に対して高い選択性と強い抑制活性を示した。また、in vivo においても、L-745, 870 は酸化ストレス性神経細胞死に対して効果的な抑制活性と神経保護作用を示し (*J. Cereb. Blood Flow Metab.* (2005) 25, 794-806)、緩徐進行型 ALS モデルマウス (ALS (*SOD1H46R*) マウス) に対する発症前・発症後経口投与の双方で、症状改善や発症後生存期間延長 (延命) 等に有効であった (*Exp. Neurol.* (2008) 211, 378-386)。さらに、bromocriptine mesylate について、当該化合物の発症 ALS モデルマウスへの腹腔内投与において、ALS モデルマウスの運動機能ならびに QOL の保全、発症後生存期間の延長に有意な薬効が得られている。

ALS治療薬の開発研究において、前臨床研究段階では、一連の薬理解析および毒性試験等を経た後にALSモデルマウス (ヒト変異SOD1遺伝子導入マウス) を用いて、薬剤被投与ALSモデルマウスの運動機能の保全および生存期間の延長を指標として候補化合物 (あるいは既

存医薬分子)の薬効が評価される。これまでに200例を超すALSモデルマウスでの薬効試験が報告されている。そのほとんどの化合物(および薬剤)は、神経症候発現(発症)前からの投与例においてのみ薬効が認められ、その後の臨床研究あるいは治験では有意な効果が得られていない。

NAIP-based ALS Drug Screening で選抜されたbromocriptine mesylate は、(1)既存の神経変性疾患治療薬であること、(2)当該薬剤は長年に亘り使用されており、安全性は極めて高いこと、(3)前臨床試験でALSモデルマウスでの薬効試験において、発症後投与において顕著な症状改善と運動神経細胞保護効果が得られていること、(4)薬剤被投与マウスの有効血中濃度は、ヒトにおける適応薬量範囲にあること、(5)酸化ストレス性細胞死を選択的に抑制する等、新規の薬理活性を有していることが判明した。これらの新たな知見に基づき、本臨床研究では、孤発性および家族性のALS患者を対象として、偽薬患者を対照とする二重盲検試験により、bromocriptine mesylateの臨床効果を検討し、ALS治療薬の早期開発を目指す。

尚、本臨床研究で用いる bromocriptine mesylate は疾患治療薬として現在臨床で使用されており、本臨床研究に参加できないALS患者の方々への倫理的配慮と安全性確保ならびに知財保護等の観点から、本報告書ならびに添付資料での実薬名の表記を避け、コードネーム(NDDPX08)を使用する。また、実薬名が容易に類推できる可能性がある文章表記(適応疾患名、症例等)は伏せ字表記した。

B. 研究方法

本臨床研究は多医療施設と共同して総数50名の孤発性および家族性のALS患者を対象として、偽薬患者(及びナチュラルヒストリー)を対照とする二重盲検試験により bromocriptine mesylate の安全性と臨床効果を検証するものである。

本臨床研究は38~98週間を計画した。臨床試験期間のうち、最初の12週間は経過観察期間とし、現在ALSの治療薬として認可されてい

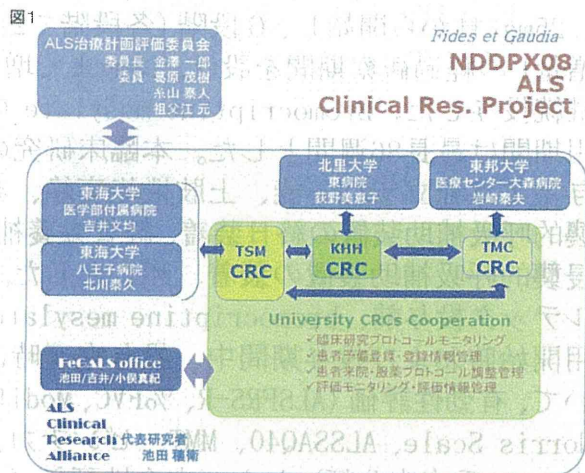
るリルテック(一般名、リルゾール)を投与した。Bromocriptine mesylateの投与は、1.25mg/日から開始し、6段階(各段階で2.5mg増量)の経過観察期間を設け、15mgまで増量・継続投与した。Bromocriptine mesylateの併用期間は最長86週間とした。本臨床研究の投与完了は独立歩行不能、上肢機能廃絶、非侵襲的呼吸補助装置の終日装着、経管栄養補給、侵襲的呼吸補助装置の装着、死亡とした。リルテック投与前、bromocriptine mesylate併用開始時および投与期間中、投与完了時において、有効性評価(ALSFRS-R、%FVC、Modified Norris Scale、ALSSAQ40、MMT、ピンチ力、握力、ALS重症度分類)および安全性評価(有害事象(特に、幻覚、嘔気、嘔吐、食欲不振など)、血圧、心拍数、臨床検査、心臓超音波検査)を行い、各評価項目の変化を比較し検討した。

1. 臨床研究の実施体制ならびに ALS 治療計画評価委員会の設置

本臨床研究は東海大学医学部倫理委員会(ならびに臨床研究協力機関倫理委員会)で承認された臨床研究計画書[添付資料1:臨床研究プロトコール(東海大学医学部臨床研究審査会に提出、平成20年12月25日付け了承、改訂平成22年8月10日)、日本語版および英文版]に基づいて、東海大学医学部付属病院と臨床研究協力機関(東海大学八王子病院、東邦大学医療センター大森病院、北里大学東病院)において実施した(図1)。

また、1)本臨床研究の計画・進捗・成果に対する客観的な評価を図るための外部諮問・評価委員会「ALS治療計画評価委員会」(委員長:金澤一郎、日本学術会議会長・宮内庁長官官房皇室医務主管・国際医療福祉大学大学院教授、委員:葛原茂樹、鈴鹿医療科学大学保健衛生学部医療福祉学科教授、委員:糸山泰人、国立精神・神経センター病院長、委員:祖父江元、名古屋大学大学院医学研究科神経内科教授)を設置、2)多施設共同臨床研究の円滑な遂行と有効性評価基準の普遍性と評価の客観性を確保するための臨床治験プロトコールに準じた臨床研究コーディネーター(CRC)を導入、3)本臨床研究事務局(FeGALS、東海大学)を設置し、平成20年12

月に開始した（図1）。



2. 対象被験者の選定基準および登録

本臨床研究の被験者は、Airlie House の診断基準に準じて診断された弧発性または家族性 ALS 患者とした。対象患者は ALS の重症度分類（厚生省特定疾患神経変性疾患調査研究班 1998 年）の重症度 1 から重症度 3 までとし、球型および bromocriptine mesylate 投与前の観察期間中に臨床症状進行が認められない症例は除外した。

上記の選定基準を満たし、文書によって本臨床研究への参加の同意が得られた被験者を対象とした（添付資料 2：臨床研究被験者への説明文書および同意文書）。

臨床研究責任医師は、観察期開始時に被験者の適格性を判定し、12 週間の観察期に仮登録した。そして、観察期終了時に要項を満たす被験者について、bromocriptine mesylate の臨床研究に登録した。

3. 臨床研究に係る関連資料及び記録書類

本臨床研究に係る関連書類及び記録書類を作成した（添付資料 3：臨床研究に係わる記録書類、添付資料 4：臨床研究実施に係る資料、添付資料 5：調剤に係る資料）。

4. 評価検査項目

ALS 患者を対象に bromocriptine mesylate のイベント（独立歩行不能、上肢機能廃絶、非侵襲的呼吸補助装置の終日装着、経管栄養補給、侵襲的呼吸補助装置の装着、若しくは死亡）発生までの期間及び運動・呼吸機能、QOL の各項目（日本語版改定 ALS Functional

Rating Scale (ALSFRS-R)、%FVC、Norrris スケール、徒手筋力検査 (MMT)、握力・ピンチ力、ALSAQ-40) について、多施設共同、無作為化、リルゾール対照、平行群間比較試験で検証する。被験者数は 50 名（累計：内、10 名はリルゾールと偽薬（乳糖）を投与）を計画した。

5. 投与量および投与期間

リルゾールの有効性は明確でないが、当薬剤を投与されている被験者の割合は多い。被験者の倫理面を考慮し、また bromocriptine mesylate の有効性を客観的に検証するために、本臨床研究における被験者は観察期間開始時から臨床研究終了時または中止時までリルゾールを併用投与（100mg/日）した。

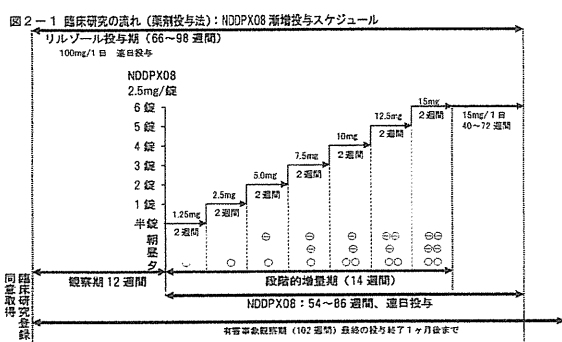
Bromocriptine mesylate の投薬は、観察期終了直後より行った。Bromocriptine mesylate の臨床研究の流れの概要を図 2-1 に記した。Bromocriptine mesylate の経口投与量は 1.25mg/日から開始し、6 段階（2.5mg、5mg、7.5mg、10mg、12.5mg、15mg）の経過観察期間を設けて段階的に増量した。但し、例えば、10mg/日増量時に著しい副作用が生じ、当該薬量維持が困難と判断される場合は 7.5mg/日を維持量とした。尚、漸増途中で増量により症状改善がみられたと判断される場合は、その用量を維持量とした。本臨床研究の薬剤投与期間は 26 週以上最長 86 週間を計画しているが、上記イベント（評価検査項目参照）が発生した時点では投与を完了した。また、本臨床研究において各施設で使用した bromocriptine mesylate の残薬は各段階的な投与後に回収した。

尚、目標症例数 50 例のうち 10 例は偽薬（乳糖）を併用しており、東海大学 2 病院、北里大学東病院、東邦大学医療センター大森病院における登録患者の登録日時に従って 1 番から一元的に順位付けした。ただし、bromocriptine mesylate 併用と偽薬併用の割付は、東海大学 ALS 臨床研究事務 (FeGALS) が乱数表を用いて行い、割付情報は FeGALS で秘匿保管・管理した。

本臨床研究では、平成 21 年 1 月に臨床研究を開始し、平成 24 年 1 月に投与全症例において試験薬の連日定量投与を終了した。なお、試験

薬の漸減は、定量投与終了後4週間以内に完了し、試験薬漸減完了後4週間の追跡調査と最終安全性確認をもって本臨床研究を完了した。

解析用ソフトへの入力を行った（添付資料6：統計解析計画書）。



8. 評価項目の解析

薬剤有効性の統計解析は現在まで報告されている Natural History から χ^2 乗検定および最低限有意差を持つように設定した偽薬からの比較を用いて行った。但し、統計解析は外部機関に委託した（添付資料6：統計解析計画書）。統計解析結果を「ALS 治療計画評価委員会」に提出後、同委員会は統計解析結果と神経機能診断結果等を総合的に検討し、bromocriptine mesylate の安全性と有効性について評価・判定を行った。

6. 有効性、安全性およびその他項目の検査時期

本臨床研究では、実施医療機関において bromocriptine mesylate 投薬、有効性評価、安全性評価、及び運動・呼吸機能、QOL 評価を原則としてそれぞれ独立した担当者（それぞれ少なくとも1名）が実施した。さらに、図2-2に基づいて、各段階の経過観察期間；観察期の開始時と6週間目、bromocriptine mesylate 投与開始時と開始後2、4、8、14週間目、段階的増量完了後は2ヶ月毎、イベント発生時または中止時にも有効性、安全性とそれぞれの必要な評価を実施した。

9. 倫理面への配慮

本臨床研究の実施に先立って、臨床研究計画書（プロトコール）を作成し、東海大学医学部臨床研究審査委員会ならびに臨床研究協力機関の臨床研究審査委員会での承認を得て実施した。また、本臨床研究の進捗と研究成果について、随時に外部評価委員会「ALS 治療計画評価委員会」での評価を諮り、臨床研究の公明、適正な遂行を図った。倫理委員会の指針を遵守し、臨床研究への協力を希望する ALS 患者に対しては、臨床研究計画内容の十分な説明を行い、納得の確認と同意（同意書への署名）を得た後に臨床研究に参加してもらった。臨床研究協力 ALS 患者との意思の疎通を図り、双方の高い信頼に基づいた臨床研究を遂行した。

さらに、投与終了または中止後、4週間以内の有害事象についても観察した。

評価表は検査終了1週間以内に FeGALS が回収し、管理した。

図2-2 臨床研究の流れ（評価項目及び調査スケジュール）

	観察期 12週間	NDDPX08 投薬期間						中止時
		開始時	2週間	4週間	8週間	14週間	開始後 14週後以降 2ヶ月毎	
同意取得、登録	○	○						
登録者登録	●	●						
採血	●	●						
安全性、質評価	●	●						
費用表、費用請求	●	●						●
ALSPFR	●	●	●	●	●	●	●	●
hFVC	●	●	●	●	●	●	●	●
Modified Norris Scale	●	●	●	●	●	●	●	●
ALS AQ-4D	●	●	●	●	●	●	●	●
徒手筋力検査 (MMT)	●	●	●	●	●	●	●	●
ピンチ力	●	●	●	●	●	●	●	●
握力	●	●	●	●	●	●	●	●
ALS 重症度分類	●	●	●	●	●	●	●	●
膀胱機能	●	●	●	●	●	●	●	●
心臓超音波検査	● ¹⁾	●	●	●	●	●	●	●
血圧・心拍数	●	●	●	●	●	●	●	●
有害事象 ²⁾	●	●	●	●	●	●	●	○ (最終の投薬1ヶ月後)

*1 心臓超音波検査は観察期に行う。

*2 有害事象は投与開始から最終の投与終了1ヶ月後までの有害事象の有無を調査する。

C. 研究結果

1. 臨床研究の実施

本臨床研究は、東海大学医学部倫理委員会（ならびに臨床研究協力機関倫理委員会）で承認された臨床研究プロトコール（米国FDAの臨床試験指針に準拠し、Phase 2a 相当：添付資料1）に基づいて、東海大学医学部付属病院と臨床研究協力機関（東海大学八王子病院、東邦大学医療センター大森病院、北里大学東病院）ならびに「ALS治療計画評価委員会」との連携を堅持して、本臨床研究を実施した。

NDDPX08-ALS臨床研究計画では、当初臨床研

7. 試験データの入力処理

Bromocriptine mesylate の安全性と有効性評価に必須となる臨床研究試験データの統計解析処理に向けて、各評価項目データの統計

究協力ALS患者50症例を計画した（臨床研究期間：平成20年12月～平成23年3月）。しかしながら、ALS発症予後の進行状況が患者毎に異なることから、観察期（3ヶ月）を終えた時点で投薬開始基準に満たない症例が頻発した。さらに、製薬企業によるALS臨床試験が本臨床研究と同時進行中であることが判明した。本臨床研究および既存臨床試験の何れに参加を希望するかはALS患者の自由選択であることから、本臨床研究に参加を希望するALS患者が当初の予測累積症例数を下回るのとの懸念が生じた。平成22年10月時点で、これまでの月毎観察期登録症例数を基に推定累積症例数を試算した結果、当初研究計画を1年間延長する事により研究計画症例数50症例を概ね達成できるとの結論を得た。よって、本臨床研究の研究期間変更（1年間延長、平成24年3月終了）を申請した（平成23年度厚生労働研究費補助金繰越明許申請書提出：平成23年2月25日）。

本臨床期間中、臨床研究の経過報告ならびに多施設共同臨床研究の進捗に伴って顕在化した改善点について討議するために、ALS治療計画評価委員及び臨床研究研究者によるALS臨床研究合同会議を以下の日時で開催した；第1回：平成21年1月27日（丸ビルに於いて開催）、第2回：平成21年6月30日、第3回：9月29日、第4回：平成22年2月23日、第5回：平成22年6月29日、第6回：9月21日、第7回：平成23年2月8日、第8回：平成23年7月19日、第9回：10月25日（霞ヶ関ビル東海大学交友会館に於いて開催）。

また、臨床研究試験データの厳密な評価に向けて、本臨床研究の最終年度（平成23年度、1年延長申請期間）にALS治療計画評価委員による評価会議を開催した。第1回評価会議（平成24年2月10日、霞ヶ関ビル東海大学交友会館に於いて開催）では、本臨床研究の試験データを精査し、統計処理に向けたデータ採用の可否についての検討が行われた。第2回評価会議（平成24年3月16日、霞ヶ関ビル東海大学交友会館に於いて開催）では、予備統計解析結果の確認が行われ、第3回評価会議（平成24年3月29日、国際医療福祉大学に於いて開催）において、NDDPX08の安全性ならびに有効性についての判定が行われた（後述）。

2. 被験者への説明文書、同意文書ならびにALS臨床研究に係る記録書類の作成

本臨床研究に登録するための被験者への本臨床研究に係る説明文書および同意文書（添付資料2）を作成した。

また、本臨床研究に係る以下の22種類の記録書類を作成した。1. 仮登録票、2. 本登録票、3. 薬剤割付連絡票、4. 神経学的所見、5. 経過毎評価表-1（安全性）、6. 経過毎評価表-2（有効性）、7. 安全性評価記録-1（臨床検査）、8. 安全性評価記録-2（心臓超音波）、9. 安全性評価記録-3（有害事象）、10. 併用薬・併用療法、11. 重篤な有害事象発生事（速報）、12. 重篤な有害事象発生事（第報）、13. 投薬管理表（症例ごと）、14. 参加登録連絡用紙（新規・変更）、15. 追跡情報記録-1、16. 追跡情報記録-2、17. 研究薬回収確認表（全症例）、18. 督促連絡票、19. 安全性情報などに関する報告書、20. Query Form、21. スクリーニング登録リスト、22. 患者医療費提出書類（評価検査費用医事課処理用）。本臨床研究で用いる記録書類一式と本臨床研究の概要、有効性評価表（日本語版ALSSAQ40、ALSFRS-R、Modified Norris Scale）、ならびに被験者への提供資料（総合相談室連絡票、臨床研究参加カード、次回来院のお知らせ）を添付資料3に付した。

さらに、本臨床研究の有効性評価のために使用する道具の資料を添付資料4に付した。

3. 臨床研究薬剤 NDDPX08 並びに偽薬の調剤

実薬および偽薬の調剤法と識別法ならびに盲検試験プロトコルを以下に示す。また、調剤に係る資料（添付資料5）を参考資料として付した。

【調剤】

本臨床研究に使用する偽薬（乳糖：250mgおよび500mg）ならびにbromocriptine mesylate 2.5mg錠は散剤とした。Bromocriptine mesylate 2.5mg錠、1錠の重量は140mgである。薬包残留薬剤を最少に留める（服用薬剤量誤差を最小とする）ため、bromocriptine mesylate 2.5mg錠、1錠分の散剤（140mg）当たり110mgの乳糖を加え250mgに増量した。1回の（bromocriptine mesylate 2.5mg錠）服用

量が0.5錠（1.25mg）の場合は、乳糖180mgを加え250mgに増量した。Bromocriptine mesylate 2.5mg錠の服用が2錠の場合は、2錠分散剤280mgに乳糖220mgを加え500mgとした。Bromocriptine mesylate（散薬、bromocriptine mesylate 1.25mg、2.5mg、5.0mg）および同量の粉末乳糖（250mg、500mg）は夫々遮光薬包とした。

偽薬ならびに実薬の散剤調整は各研究実施医療機関（東海大学八王子病院、北里大学東病院、東邦大学医療センター大森病院）の薬剤部において調製した。尚、調剤に使用する薬剤（bromocriptine mesylate 2.5mg錠、乳糖）および物品（薬包フィルム、遮光袋、および散剤調製に必要な物品）は東海大学医学部付属病院薬剤部から供給した。散剤調製ならびに実薬/偽薬の識別と管理に関するプロトコールは東海大学医学部付属病院薬剤部ならびに東海大学 ALS 臨床研究 CRC が提示した。

【実薬および偽薬の識別】

Bromocriptine mesylate薬包は薬包フィルム表面にNDDPX08-TSM-363374の6桁の番号を最初として、通し番号を印字した。また、薬包毎に服用時間（朝、昼、晩）と含まれている薬剂量（1.25mg、2.5mgおよび5.0mg）を表示した。偽薬（乳糖）薬包は薬包フィルム表面にNDDPX08-TSM-258963の6桁の番号を最初として、通し番号を印字した。また、薬包毎に服用時間（朝、昼、晩）と含まれている薬剂量（1.25mg、2.5mgおよび5.0mg）を表示した。bromocriptine mesylateならびに乳糖（偽薬）は東海大学付属病院薬剤部において調整、厳重に保管・管理し、本臨床研究分担医師のbromocriptine mesylateの処方により被験者へ供した。

薬剤識別コードは、臨床研究使用薬剤記号（NDDPX08）と実施機関識別記号（東海大学＝TSM、北里大学東病院＝KHH、東邦大学医療センター大森病院＝TMC）および実・偽薬識別番号（6桁）を表示した。

【盲検試験プロトコール】

臨床研究分担医師（主治医）は、観察登録被験者について観察期満了時（12週間後）に臨床研究続行の可否を判定し、結果をCRCに

伝えた。臨床研究続行を決定した場合、CRCは被験者の登録番号をALS臨床研究事務局FeGALSが管理している実薬/偽薬割付表と照合して投与薬剤を決定した。CRCは投薬（実薬あるいは偽薬）コード情報を薬剤部に伝え、情報内容を相互に確認した後に、主治医へは投薬コード情報を秘匿したままで投薬コードの選択完了を伝え、薬剤部へのNDDPX08の処方を依頼した。薬剤部は投薬情報コードに該当する薬剤を主治医の処方に従って被験者に供した。CRCは、被験者あるいは被験者家族に薬剤保管、服薬手順ならびに服薬後および未服用の薬包回収について十分に説明した。

他の研究実施医療機関においては、臨床研究分担医師（主治医）が観察登録被験者について臨床研究続行を判定した場合、主治医は所属医療機関CRCにその判定結果を伝え、CRCは直ちに当該被験者の判定結果と共に観察登録日時情報を東海大学ALS臨床研究CRCへ連絡した。東海大学ALS臨床研究CRCは、当該被験者の登録番号をALS臨床研究事務局FeGALSが管理している実薬/偽薬割付表と照合して投与薬剤を決定し、その情報を当該CRCに回答した。当該CRCは投薬コード選択完了（但し、情報内容は秘匿する）について主治医に伝え、bromocriptine mesylateの処方を依頼し、同時に、CRCは投薬コード情報を所属医療機関薬剤部へ連絡し、内容を相互に確認した。薬剤部は、主治医の処方を待って、投薬情報コードに該当する薬剤を被験者に供した。CRCは、被験者あるいは被験者家族に薬剤保管、服薬手順ならびに服薬後の薬包回収についての十分な説明を行った。CRCは、被験者来院時に回収した薬包（服用状況を確認）を一時保管し、東海大学ALS臨床研究CRCの巡回訪問時に手渡した。

東海大学ALS臨床研究事務局FeGALSは回収した全ての薬包を保管し、外部機関による有効性評価に関わる統計処理を行う際に、回収した薬包に付着している残留薬および残存未使用薬包（無作為抽出）の薬剤を同定（外部検査機関に依頼）し、投薬コード情報と照合した。

東海大学ALS臨床研究事務局FeGALSは、被験者評価値統計処理時に投薬（実薬/偽薬）情報ならびに薬包残留薬および残存未使用薬包

薬剤に関する情報をALS治療計画評価委員会へ提出した。

4. 被験者の登録

本臨床研究期間（平成21年1月～平成24年3月）における参加患者は総計で49名であった。38名が観察期満了時に於いて本登録の基準値を満たし、図2-1の投与スケジュールに従って試験薬が投与された。また、10名は観察期（仮登録）未了および満了時において本登録基準値から外れ本登録に至らず、1名は参加基準を満たさなかった（図4）。本臨床研究期間を通して、憂慮すべき有害事象は観察されなかった。

図4. 症例数

平成20～23年度		本登録 (投薬開始)	被験者基準に 満たず除外または中止	参加被験者数
東海大学	医学部付属	12	6	18
	八王子	1	1	2
東邦大学		11	3	14
北里大学		14	1	15
合計		38	11	49

5. 統計解析と有効性評価

統計解析処理には、本登録者データ38名分と仮登録者データ10名分を用いた。各評価項目データを統計解析用データ管理ソフトへ入力した。その後、bromocriptine mesylateの安全性と機能評価値の統計解析を外部機関に委託した。本臨床試験完了後、有効性および安全性統計解析対象群のデータを固定した後、実薬および偽薬割付情報コードを開示した。

6. Bromocriptine mesylateの安全性ならびに有効性評価

本試験成績の統計解析に供した、被験者の内分けは、仮登録症例数48例、本登録症例数（および試験薬投与症例数）38例のうち実薬31症例、偽薬7症例であった。さらに、当該38症例のうち、試験完了症例数28例（実薬22例、偽薬6例）、試験中止症例数10例（実薬9例、偽薬1例）であった。当該試験中止例の内訳は、死亡（実薬、偽薬、各1例：疾患進行によるもの）、患者の意志又は臨床研究責任医師の判断による等である。被験者の有効性解析対象としての最大解析対象集団(FAS)は、本登録症例から対象外疾患、重大なGCP違反症例、未投薬症例、有効性評価データが全く得られな

かった症例を除いたものを解析対象集団とした。また、プロトコールに適合した解析対象集団(PPS)はFASから、選択基準からの逸脱症例、除外基準に抵触する症例、併用禁止薬の使用が新たに開始された症例を除いたものを解析対象集団とした。その結果、FAS解析対象集団は36例（実薬29例、偽薬7例）、FAS除外症例数2例（実薬2例）となった。FAS採用36症例の内、PPS解析対象症例数は36例（PPS除外症例なし）であった。

安全性解析対象集団は、本登録症例より以下の症例：重大な臨床研究計画書手順（及びGCP基準）違反症例、未投薬症例、安全性に関するデータが全く得られなかった症例を除いた集団である。本登録38症例中、安全解析対象症例は38例（実薬31例、偽薬7例）で除外症例はなかった。

被験者の背景については、性別、年齢、体重、身長、罹病期間（年）、ALS重症度分類、前治療薬有無、併用薬有無、併用療法有無、既往歴有無、合併症有無の項目について頻度集計、要約統計量を群別に実施した。有意水準両側15%で検定した結果、群間で背景項目に差は認められなかった。

有効性評価に関する解析 ALSFRS-R(主要評価項目)、%FVC、Modified Norris Scale(Limb, Bulbar)、ALSAQ-40(physical mobility, activity of daily living and independence, eating and drinking, communication, emotional reactions)、MMT(徒手筋力検査)、ピンチ力、握力について解析した。

第1の主要な解析は、2つの時点で、有効性の各評価項目における変化量の群間比較である。具体的には、(1)観察期終了時（試験薬投薬開始前）の値（ベースライン）と試験薬増量完了時の変化量の平均値との群間比較。更に、(2)ベースライン（観察期終了時の値）と投薬終了・中止時の変化量の平均値との群間比較を行った。当該解析にあたり、登録時ALS重症度と年齢の影響を除去、また試験薬増量完了時又は終了・中時のデータが欠測の場合は前の時点のデータで補完し、さらにアローワンス外データは除外した。

第2の主要な解析は、経時的推移を考慮した

評価値（測定値）の群間比較である。当該解析にあたり、登録時ALS重症度と年齢の影響を除去、ベースライン（観察期終了時の値）の影響や時間の効果および時期 x 群の交互作用を除去、さらに測定値に関する時点間の相関は時点によらず均一と仮定し、アローワンス外データは除外した。

有効性評価対象症例数（実薬例数/偽薬例）および投薬前症例数に対する割合（%実薬例/偽薬例）は、次の如く推移した。

観察期終了時（29/7, %-/ -）、
投薬（増量期）4週目（27/6, %93.1/85.7）、
投薬（増量期）8週目（27/7, %93.1/100）、
投薬（増量完了）14週目（25/7, %86.2/100）、
投薬22週目（22/6, %75.9/85.7）、
投薬30週目（24/6, %82.8/85.7）、
投薬38週目（18/5, %62.1/71.4）、
投薬46週目（16/5, %55.2/71.4）、
投薬54週目（14/5, %48.3/71.4）、
投薬62週目（12/4, %41.4/57.1）、
投薬70週目（9/4, %31.0/57.1）、
投薬78週目（8/4, %27.6/57.1）、
投薬86週目（5/1, %17.2/14.3）。

有効性解析結果の解釈にあたり、（1）第1および第2の主要な解析における有意傾向の有無（程度）はP値を判断基準として確認した。また、（2）有意水準両側20%以下を有意傾向と考え評価を行った。プロトコールでは5%と規定しているが、本臨床研究統計解析対象症例数が少ないことから、有意傾向解析に重点を置いた。加えて、本臨床研究では複数の検定（検査・評価項目）を実施しており、有意水準を両側20%以下とするため、（3）P値である程度の傾向を確認した後に投与群間の変化量に関する要約値の推移図を見て最終的な有意傾向の有無を判断した。

第1の主要な解析（1）と（2）において、以下の項目に関して有意傾向が確認された。

（1）試験薬増量完了時における変化量の群間比較において、ALSAQ40-communication、ALSAQ40-eating & drinking、ALSFRS-Rトータルスコア、握力（右側）に有意傾向が確認された。（2）投薬終了時または中止時における変化量の群間比較において、Limb Norris Scale、ALSAQ40-communication、ALSAQ40-eating & drinking、頸部前屈機能に

有意傾向が確認された。ただし、症例ごとに評価（投薬）期間が異なるため、評価時点（終了・中止時）における群間の時期効果が均一でない事も考慮しなければならない。

第2の主要解析（経時推移を考慮した試験評価（検査測定）値の群間比較）において以下の項目に関して有意傾向が確認された。Limb Norris Scale、ALSAQ40-communication、ALSAQ40-eating & drinking、握力（右側）に有意傾向が確認された。

第1および第2の主要解析の双方に於いて顕著な有意傾向が認められたのはLimb Norris Scale（上肢および下肢運動機能）、次いでALSAQ40-communication、ALSAQ40-eating & drinking、握力である。これらの有意傾向は登録時の重症度分類で重症度1（ALS初期）の群で最も顕著であった。

有効性解析の要約に関する推移の詳細は別紙添付資料7を参照されたい。

D. 考察

現在、ALS治療薬にはリルゾールが使用されている。欧米での臨床試験では、リルゾール投与により3ヶ月程度の延命効果が示されたが、わが国の臨床試験では病勢進展の抑制に有効性を証明できなかった（日本では1998年12月「承認条件」付きで承認）。また、これまでに多くのALS薬剤の開発が試みられたが、いずれも承認に至っておらず、生存期間の延長あるいは臨床症状を改善する薬剤の開発が必要である。

Bromocriptine mesylateは、酸化ストレスに対して選択的に働く内在性の神経細胞防御因子NAIPが係わる細胞防御系を標的とした低分子化合物のスクリーニング系で選抜された化合物の一つである。我々の先行研究において、bromocriptine mesylateがin vitro薬理作用（選択的な酸化ストレス性神経細胞死抑制活性）とin vivo活性（ALS(SOD1H46R)マウスに対して、発症後投与での顕著な症状改善と発症後生存期間延長）を示したことから、bromocriptine mesylateは孤発性および家族性のALS治療における有用なALS治療法となる可能性がある。

本臨床研究成果の判定は、統計学的解析と評価の公平性を保つために外部機関に委託した。ALS治療計画評価委員会では当該試験の統計学的解析結果を基に、bromocriptine mesylate の安全性と有効性について検討・評価した。その結果、「日本人ALS患者に対する bromocriptine mesylate の安全性については、中長期連投薬症例群において憂慮すべき弊害は認められず安全性は概ね保障されている」、「本統計解析条件での解析結果から、実薬投与ALS症例群において最も顕著な有意傾向が上肢及び下肢機能の維持を始め複数のQOL機能に認められている、さらにALSFRS-Rトータルスコア、頸部筋力維持においても有意傾向が確認されている。従って、bromocriptine mesylate のALS用薬としての有効性を更に Phase3 臨床試験で検証する事が妥当である」との総合判定を得た。

今回の有効性評価に於いて、統計学的有意傾向が見られなかった球症状(Norris Bulbar)及び呼吸機能(%FVC)については更に検討を加える必要がある。特に、球症状に関連する ALSAQ-40 communication, eating and drinking でも明らかに有意傾向が認められている。ALSの特徴は、疾患の進行にともなって損なわれる部位や機能は一様ではなく患者毎に大きく異なっている。従って、有効性の評価に当たっては、機能別、部位別に(統計解析)評価することが重要であると言える。特に注目すべきは、第1の主要解析(試験薬増量完了時における変化量の群間比較、投薬終了時または中止時における変化量の群間比較)および第2の主要解析(経時推移を考慮した試験評価(検査測定)値の群間比較)の双方に於いて顕著な有意傾向が認められた上肢および下肢運動機能、 ALSAQ40-communication、 ALSAQ40-eating & drinking、握力の全ての検査項目に関して、登録時重症度1(ALS初期)の群では更に顕著な有意傾向が確認されている。従って、今後のALS用薬の有効性臨床試験では重症度1群を対象として行う事によりALS用薬開発の可能性は格段に増大すると考えられる。

延命効果については、当該臨床研究プロトコルに含まれていないので評価対象外であり、今後の臨床試験(Phase 3)で評価されるで

あろう。

本臨床研究の有効性評価統計解析にあたり、米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校 Forbes Norris MDA/ALS Research Centre、ALS Data Share Repository (ALSDSR) から ALS natural history data (5,465症例:リルゾール服用・非服用症例混在)の利用許可を得た。当該 database はALSFRS-Rと%FVCにのみ特化されており、本臨床研究有効性評価解析の対照としては不向きであった。

近年、ALSの病因としては、酸化ストレスのみならず、神経炎症の関与が注目されている。本臨床研究における血液学的臨床検査結果の統計解析より、偽薬投与患者との比較において、実薬投与患者では炎症系反応が抑えられている傾向が認められた。このことは、bromocriptine mesylateのALS治療薬としての有用性を支持するものと考えられる。

今後は、より治療に近い形での bromocriptine mesylateの効果と安全性の確認を行うためのPhase 3 臨床試験へと展開することで、ALS治療における新規治療薬としての開発が期待できる。

E. 結論

本臨床研究は現在神経変性疾患の治療薬として臨床で使われている医薬化合物NDDPX08(化合物名:bromocriptine mesylate)の新たな薬理作用; 1) ALSモデルマウスでの発症後投与試験で顕著な症状改善と運動神経細胞保護効果、2) ALSモデルマウスの症状改善と延命における有効薬剤血中濃度はヒトにおける適応薬量の範囲にある、3) 酸化ストレス性細胞死の選択的な抑制効果に基づいて、孤発性および家族性のALS患者を対象としたリルゾール併用 bromocriptine mesylateの臨床効果の検証を目的とした。

当初の計画症例数(50症例)には至らなかったが、最終的な本臨床研究への参加被験者数の総数は49名であった。その内、投薬開始基準を満たした38名の本登録者(実薬投与31名、偽薬投与7名)及び仮登録者10名の臨床試験データに基づき、統計解析処理を実施して、その結果をALS治療計画評価委員会へ提出し

2. 学会発表

- 1) 池田穰衛、田中一則、菅野拓也、柳澤佳子、安武かおり、秦野伸二、吉井文均
筋萎縮性側索硬化症の新規治療薬の開発、
第52回日本神経学会学術大会、2011、名古屋
- 2) Tanaka K., Kanno T., Yanagisawa Y., Ysutake K., Hadano S., Yoshii F., Ikeda JE.
Post-onset administration of bromocriptine sustains motor functions and retards disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis via suppression of glial inflammation.
ASENT 14th Annual Meeting, Washington, D.C., USA. 2012 (Feb. 22-25) (Abstract No.14).

G. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

た。同委員会において、日本人ALS患者に対するbromocriptine mesylateの安全性については、中長期連投薬症例群において憂慮すべき弊害は認められず安全性は概ね保障されている、本統計解析条件での解析結果から、実薬投与ALS症例群において最も顕著な有意傾向が上肢及び下肢機能の維持を始め複数のQOL機能に認められている、さらにALSFRS-Rトータルスコア、頸部筋力維持においても有意傾向が確認されている。従って、bromocriptine mesylateのALS用薬としての有効性を更にPhase3臨床試験で検証する事が妥当であるとの総合判定を得た。

本臨床研究成果は最少症例数での有効性評価結果ではあるが、統計学的解析からbromocriptine mesylateの明らかな臨床効果(有意傾向)が確認された。従って、より多くの症例数で、より治療に近い形でのbromocriptine mesylateの効果と安全性を確認(Phase3臨床試験)することで、ALS治療の新規治療薬としての開発が期待できる。

本臨床研究は北米におけるグローバルスタンダード基準に準じたPhase 2a臨床試験プロトコルを基に実施した。我が国での、対象症例数が限られる臨床研究(Phase2a/2b)では全症例を実薬投与群としその有効性評価には、北米と同質の日本人ALS natural history database (またはALS placebo database: 北米でも構築されていない)を対照とするのが医療倫理の観点からも望ましい。また、臨床研究参加ALS患者の協力意志を尊重し継続するための背景として、また医療機関における臨床試験を同質として取り扱うために、医療機関の臨床研究体制の質の均一化(グローバルスタンダード化)が喫緊の課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表

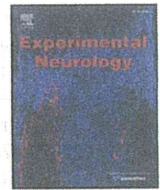
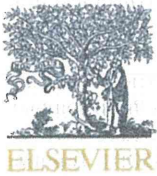
- 1) Tanaka K., Kanno T., Yanagisawa Y., Yasutake K., Hadano S., Yoshii F., Ikeda J-E.
Bromocriptine methylate suppresses glial inflammation and moderates disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tanaka K., Kanno T., Yanagisawa Y., Yasutake K., Hadano S., Yoshii F., Ikeda J-E.	Bromocriptine methylate suppresses glial inflammation and moderates disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.	Exp. Neurol.	232	41-52	2011

III. 研究成果の刊行物・別刷



Bromocriptine methylate suppresses glial inflammation and moderates disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis

Kazunori Tanaka^a, Takuya Kanno^b, Yoshiko Yanagisawa^b, Kaori Yasutake^b, Shinji Hadano^{b,c}, Fumihito Yoshii^d, Joh-E Ikeda^{a,b,e,*}

^a NGP Biomedical Research Institute, Neugen Pharma Inc., Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan

^b Department of Molecular Life Sciences, Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan

^c Research Center of Brain and Nervous Diseases, Tokai University Graduate School of Medicine, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan

^d Department of Neurology, Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan

^e Apoptosis Research Centre, Children's Hospital of Eastern Ontario, Ottawa, Ontario, Canada K1H 8L1

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 February 2011

Revised 19 July 2011

Accepted 8 August 2011

Available online 16 August 2011

Keywords:

Amyotrophic lateral sclerosis

Motor neurons

Cu/Zn superoxide dismutase

Therapeutic agent

Bromocriptine

Oxidative stress

Mutant SOD1 transgenic mice

Astrocytes

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult-onset neurodegenerative disease characterized by a selective loss of upper and lower motor neurons. Since oxidative stress plays a crucial role in the progression of motor neuron loss observed in ALS, anti-oxidative agents could be an important therapeutic means for the ALS treatment. We have previously developed a drug screening system allowing the identification of small chemical compounds that upregulate endogenous neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), an oxidative stress-induced cell death suppressor. Using this system, we identified the dopamine D2 receptor agonist bromocriptine (BRC) as one of NAIP-upregulating compounds. In this study, to prove the efficacy of BRC in ALS, we conducted a set of preclinical studies using a transgenic ALS mouse model carrying the H46R mutation in the human Cu/Zn superoxide dismutase (*SOD1*) gene ALS(*SOD1*^{H46R}) by the post-onset administration of BRC. ALS(*SOD1*^{H46R}) mice receiving BRC showed sustained motor functions and modest prolonged survival after onset. Further, BRC treatment delayed anterior horn cell loss, and reduced the number of reactive astrocytes and the level of inflammatory factors such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor (TNF)- α in the spinal cord of late symptomatic mice. *In vitro* study showed the reduced level of extracellular TNF- α after lipopolysaccharide (LPS) exposure in BRC-treated mouse astrocytes. BRC-treated ALS(*SOD1*^{H46R}) mice also showed a reduced level of oxidative damage in the spinal cord. Notably, BRC treatment resulted in an upregulation of anti-oxidative stress genes, activating transcription factor 3 (ATF3) and heme oxygenase-1 (HO-1), and the generation of a glutathione (GSH) in SH-SY5Y cultured neuronal cells in a dopamine receptor-independent manner. These results imply that BRC protects motor neurons from the oxidative injury via suppression of astrogliosis in the spinal cord of ALS(*SOD1*^{H46R}) mice. Thus, BRC might be a promising therapeutic agent for the treatment of ALS.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: ALS, amyotrophic lateral sclerosis; ANOVA, analysis of variance; ATF3, activating transcription factor 3; AUC, area under the curve; BRC, bromocriptine methylate; ChAT, choline acetyltransferase; CMC, carboxymethyl cellulose; DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DNP, dinitrophenyl; FBS, fetal bovine serum; FDA, Food and Drug Administration; GCCLM, glutamate-cysteine ligase modifier subunit; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GSH, glutathione; GSSG, oxidized glutathione; H&E, hematoxylin and eosin; HO-1, heme oxygenase-1; Iba-1, ionized calcium binding adaptor molecule 1; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LPS, lipopolysaccharide; MAP2, microtubule-associated protein 2; NAIP, neuronal apoptosis inhibitory protein; NGS, normal goat serum; non-Tg, non-transgenic; NQO1, NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1; Nrf2, nuclear factor related erythroid 2-related factor 2; NRS, normal rabbit serum; 8-OHdG, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine; PBS, phosphate-buffered saline; PPIA, peptidylprolyl isomerase A; PVDF, polyvinylidene difluoride; RA, retinoic acid; ROS, reactive oxygen species; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; SOD1, Cu/Zn superoxide dismutase; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

* Corresponding author at: Department of Molecular Life Sciences, Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan. Fax: +81 463 91 4993.

E-mail address: jeiked3@is.icc.u-tokai.ac.jp (J.-E. Ikeda).

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating neurodegenerative disorder characterized by a selective loss of upper motor neurons in the motor cortex, and lower motor neurons in the brainstem and spinal cord. The majority of ALS cases are sporadic, while 5–10% of patients are familial ALS (Cleveland and Rothstein, 2001), among which approximately 20% have mutations in the gene encoding for Cu/Zn superoxide dismutase (*SOD1*) (Rosen, 1993). Thus far, riluzole, an antiglutamatergic agent, is the only Food and Drug Administration (FDA)-approved drug for the treatment of ALS, but it has only a modest impact (Bensimon et al., 1994; Miller et al., 2007). Therefore, there is a clear unmet need for effective therapeutic interventions to cure or even significantly improve symptoms and the quality of life for patients.

While the precise etiology of ALS remains unknown, a complex interplay of many pathogenic factors, including oxidative stress, excitotoxicity, mitochondrial dysfunction, disruption of neurofilament network, neural inflammation, non-cell-autonomous damage and protein aggregation (Barber and Shaw, 2010; Barber et al., 2006; Boillee et al., 2006a; Pasinelli and Brown, 2006), have all been suggested as potential factors. Remarkably, an elevation of reactive oxygen species (ROS) is known to be associated with mitochondrial dysfunction (Barber and Shaw, 2010; Barber et al., 2006). ROS generated in motor neurons contributes to the reduction of glutamate uptake through glutamate transporters (Rao and Weiss, 2004; Rao et al., 2003) and induces oxidation in neighboring astrocytes (Rao et al., 2003). Further, recent findings have suggested the link between oxidative stress and inflammatory response in ALS (Barber and Shaw, 2010; Liu et al., 2009). Thus, oxidative stress plays a pivotal role in the ALS pathogenesis, and could be a main target for the development of novel therapeutic agents for ALS.

We have previously developed the neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP)-ELISA-based drug screening system (Okada et al., 2005). NAIP is a founding member of anti-apoptosis IAP family (Roy et al., 1995) and selectively suppresses oxidative stress-induced cell death (Liston et al., 1996). Using this system, we have identified several compounds that transiently upregulate NAIP, including L-745,870, a dopamine D4 receptor antagonist, and bromocriptine mesylate (BRC), a dopamine D2 receptor agonist (Okada et al., 2005). Indeed, we revealed that the L-745,870 treatment alleviated disease progression of a transgenic ALS mouse model carrying the H46R mutation in *SOD1* gene (Tanaka et al., 2008). However, the efficacy of BRC in the ALS treatment remains untested.

It has been reported that BRC inhibits prolactin-secretion with resulting suppression of lactation, binds to a dopamine D2 receptor and is thus used as a treatment for Parkinson's disease (Radad et al., 2005). It has also been shown that BRC confers protection against oxidative stress-induced cell death (Lim et al., 2008). Further, BRC exerts protective activity against ischemic neuronal insults in gerbils (Liu et al., 1995; O'Neill et al., 1998). These findings suggest that BRC could be a therapeutic agent for ALS besides Parkinson's disease.

In this study, to evaluate the efficacy of BRC in the ALS treatment, we initiated intraperitoneal administration of BRC after the onset of symptom in ALS(*SOD1*^{H46R}) transgenic mice. The BRC administration remarkably sustained the motor performance and prolonged 12% of the post-onset survival interval of the mice. The BRC treatment in ALS(*SOD1*^{H46R}) mice also resulted in a suppression of motor neuron loss in the spinal cord accompanied not only by a significant reduction of activated astrocytes but also by reduced levels of inflammatory factors, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor (TNF)- α , and oxidative damage. We also demonstrated that in mouse primary astrocyte cultures the release of TNF- α after lipopolysaccharide (LPS) exposure was reduced by the BRC treatment. Further, *in vitro* studies using SH-SY5Y cells suggested that the neuroprotective efficacy of BRC in ALS(*SOD1*^{H46R}) mice attributed, at least in part, to the upregulation of several anti-oxidative-stress genes, nuclear factor related erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), activating transcription factor 3 (ATF3), and heme oxygenase-1 (HO-1), and mediated an effective synthesis of glutathione (GSH). Collectively, BRC might be a potent therapeutic agent for the treatment of ALS.

Methods

Chemicals and antibodies

We purchased (5S)-2-Bromo-12'-hydroxy-5'-isobutyl-2'-isopropylergotaman-3',6',18-trione monomethanesulfonate (2-bromo- α -ergocryptine mesylate/bromocriptine mesylate) (Molecular Weight: 750.70), SCH23390, Sulpiride, and Raclopride from Tocris bioscience,

2-amino-6-(trifluoromethoxy)-1,3-benzothiazole (riluzole) from Apollo Scientific Limited, α -naphthoquinone and okadaic acid from Wako, cisplatin and etoposide from Calbiochem, staurosporin from Alexis Biochemicals, and dimethyl sulfoxide and menadione sodium bisulfate from Sigma-Aldrich. All other chemicals are from commercial sources and of analytical grade. Primary antibodies used for immunoblotting included rabbit polyclonal anti-SOD1 (dilution 1:50,000) (Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-NOS2 (iNOS) (M-19) (dilution 1:1000) (Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (dilution 1:50,000) (Biomed), rabbit polyclonal anti-ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1) (dilution 1:1000) (Wako), anti-Nrf2 (EP1808Y) (dilution 1:2000) (Epitomics), anti-ATF3 (C-19) (dilution 1:1000) (Santa Cruz Biotechnology), anti-HO-1 (H105) (dilution 1:1000) (Santa Cruz Biotechnology), anti-NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 (NQO1) (A180) (dilution 1:1000) (Santa Cruz Biotechnology), anti-glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM) (FL-274) (dilution 1:1000) (Santa Cruz Biotechnology), anti-lamin B1 (dilution 1:10,000) (Abcam) and anti- β -tubulin mouse monoclonal (dilution 1:500,000) (Chemicon) antibodies. For primary antibodies for immunohistochemistry, goat polyclonal anti-Iba-1 (dilution 1:100) (Abcam), Histofine rabbit polyclonal anti-GFAP (Nichirei), goat anti-choline acetyltransferase (ChAT) polyclonal (dilution 1:100) (Chemicon), goat polyclonal anti-TNF- α (dilution 1:50) (R&D Systems), mouse monoclonal anti-8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) (2 μ g/ml) (Nikken Seil Co., Ltd.) and rabbit polyclonal anti-microtubule-associated protein 2 (MAP2) (dilution 1:500) (Abcam) antibodies were used. For double immunostaining with anti-8-OHdG antibody, rabbit polyclonal anti-GFAP antibody (dilution 1:200) (Lab Vision) was used. Secondary antibodies used in this study included ECLTM anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (dilution 1:5000) (Amersham Biosciences) and ECLTM anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (dilution 1:5000) (Amersham Biosciences) for immunoblotting.

Animals

Transgenic mice carrying the H46R mutation in the human *SOD1* gene (*SOD1*^{H46R}) were used as a familial ALS mouse model. ALS (*SOD1*^{H46R}) transgenic mouse exhibits rather slow disease progression with widespread axonal degeneration in the spinal cord (Chang-Hong et al., 2005; Sasaki et al., 2007; Tanaka et al., 2008), when compared with ALS(*SOD1*^{G93A}) transgenic mice. Since genetic background is one of the important factors modulating disease phenotypes in mutant *SOD1* transgenic mice (Heiman-Patterson et al., 2005), we first generated a congenic line of ALS(*SOD1*^{H46R}) transgenic mice by backcrossing more than 15 generations to C57BL/6N mice. The line was maintained as hemizygotes by mating ALS(*SOD1*^{H46R}) males with C57BL/6N females. Offsprings were genotyped by PCR using genomic DNA from tail tissue. Mice were housed at 23 °C with a 12 h light/dark cycle, in which water and food was available *ad libitum*. All animal experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at Tokai University.

Administration of the compound and assessment of the onset of the symptom

BRC was suspended in 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC)-Na (carmellose sodium, Maruishi Pharmaceutical Co., Ltd.) and injected intraperitoneally at a dose of 1 mg or 10 mg/5 ml/kg body weight. In parallel, animals treated with 0.5% CMC-Na (vehicle group, 5 ml/kg) were used as controls.

Two other mice groups were treated with vehicle or 10 mg/kg BRC in combination with riluzole, which was given in drinking water (100 μ g/ml) *ad libitum* (Gurney et al., 1996).