

日本小児科学会雑誌 116(11): 1717-1723, 2012

11) 荒尾正人、武者育麻、日笠山絢香、赤塚淳弥、山崎太郎、雨宮 伸、阪本靖介、笠原群生、大竹 明: 門脈欠損症 II 型 (門脈低形成症) に対してシャント血管離断術が奏功した VACTERL 連合の 1 例. 埼玉県医学会雑誌 47(1): 224-227, 2012

2. 学会発表

(患者会講演、全国レベルの招待・教育講演と国際学会のみ)

1) 大竹 明: ミトコンドリア呼吸鎖ってなあに?: 包括的診断と治療へ向けての取り組み. ミトコンドリア病患者・家族の会 (MCM 家族の会) 講演 6 月 3 日 日本医科大学武蔵小杉キャンパス (川崎市), 2012

2) Murayama K, Kawachi E, Tsuruoka T, Mori M, Yamazaki T, Okazaki Y, Takayanagi M, Ohtake A: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: the experiment of systematic analysis for causative gene. The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases & The 12th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism & The 12th Korean Congress of Inherited Metabolic Disease. April 1 - 4, Lotte Hotel Seoul (Seoul, Korea), 2012.

3) Takahashi T, Hattori M, Furui M, Yamada K, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukuda S, Ohtake A, Wanders RJA, Yamaguchi S: Chemical Diagnosis of Methylmalonate Semialdehyde Dehydrogenase (MMSDH) Deficiency: A First Case Report in East Asia. The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases & The 12th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism & The 12th Korean Congress of Inherited Metabolic Disease. April 1 - 4, Lotte Hotel Seoul (Seoul, Korea), 2012.

4) Fukuoka S, Murayama K, Fushimi T, Muta K, Kawachi E, Ajima M, Mori M, Okazaki Y, Takayanagi M, Ohtake A: Clinical manifestation and molecular, biochemical, and histological findings of mitochondrial cardiomyopathies. SSIEM (Society for the Study Group of Inborn Errors of Metabolism) Annual Symposium 2012, September 4-7, ICC (Birmingham, UK), 2012

5) 大竹 明: S3-4 迷った時にはミトコンドリア病. 第 54 回日本先天代謝異常学会総会シンポジウム 3: 日常診療と先天代謝異常症 11 月 15-17 日 じゅうろくプラザ (岐阜市), 2012

6) Ohtake A, Yamazaki T, Murayama K, Mori M, Kohda M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: exome sequencing for the disease gene identification. AussieMit2012. 10-12 December, Monash University Caylfield Campus (Melbourne, Australia), 2012

7) Arao M, Sakai T, Musha I, Yamazaki T, Abe Y, Amemiya S, Uehara N, Tokuzawa Y, Okazaki Y, Murayama K, Mori M, Ohtake A: Pyruvate therapy for two infantile mitochondrial diseases due to mitochondrial DNA mutations. AussieMit2012. 10-12 December, Monash University Caylfield Campus (Melbourne, Australia), 2012

8) Yamazaki T, Murayama K, Mori M, Iwasa H, Kohda M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Mimaki M, Okazaki Y, Thorburn DR, Ohtake A: Mitochondrial respiratory chain disorders in Japan and the West, focusing principally on the mitochondrial DNA depletion syndrom. AussieMit2012. 10-12 December, Monash University Caylfield Campus (Melbourne, Australia), 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
 分担研究報告書

ミトコンドリア病の病態に関与する新規因子の検索

分担研究者 北風政史 国立循環器病研究センター 部長

研究要旨 研究分担者は、脳死心臓移植を我が国で最も多く行う施設に所属し、重症心不全の病態解明、治療への応用を目的として研究を行っている。臓器の中で最もミトコンドリアが多く存在する心臓においては、ミトコンドリア病の病態が心機能不全として特異的に表れることが知られている。しかし、ミトコンドリア機能の心不全における具体的な重要性についてはまだほとんど解明されていない。本研究では心臓におけるミトコンドリア機能の解析を中心に、病態特異的に変化する新しい遺伝子の機能解析を行い、ミトコンドリア機能が関与する心疾患およびミトコンドリア病の病態解明、治療への応用をめざす。

A. 研究目的

ミトコンドリア病は主にミトコンドリアを構成するタンパク質、特に酸化リン酸化にかかわるタンパク質の異常によって発症することが知られている。酸化リン酸化を担うタンパク質群は数十からなる複合体を形成しており、酸素を消費して体内で消費される大部分のATPを産生する。

本研究ではATP代謝とくにその調節にかかわる分子の新たな同定をすすめることにより、ミトコンドリア病を含めたエネルギー代謝心疾患の病態の解明・治療への応用を図ることを目的とする。

B. 研究方法

心臓は体内で最も多くのミトコンドリアを含有する臓器であり、酸化リン酸化を担うタンパク質およびその調節蛋白質が最も多く存在する。我々はエネルギー枯渇状態に敏速に対応する調節因子を同定するため、心筋細胞を低酸素ストレスに暴露した時に一過性に誘導される因子に注目しその生化学的解析を行った。

（倫理面への配慮）

将来的には、当該因子のヒト心不全およびミトコンドリア病における遺伝子検索を行う予定であるが、現在当施設では行っていない。

C. 研究結果

23年度までの研究成果により、培養心筋細胞を使用1%O₂刺激により2時間で上昇し、12時間で低下する遺伝子を網羅的に検索し、その中から3種の遺伝子を同定した。これらの蛋白は従来の低酸素反応性遺伝子とことなり、その特異的な発現様式から異なるエネルギー代謝経路にかかわることが示唆された。この中から機能未知の遺伝子を選択し解析をすすめた。本遺伝子産物は、一回膜貫通型のタンパク質で全身に発現するが特に骨格筋、脳、脂肪組織などで強い発現がみられるとともに、ミトコンドリアでの特異的な発現も確認された。また本遺伝子産物の低酸素での顕著なタンパク質発現上昇も確認されATP代謝調節における役割が強く示唆された。24年度においては本遺伝子の機能解析をさらにすすめるために、2つのアッセイ系を構築した。一つはATP感受性のFRETを利用したミトコンドリアATP濃度測定系であり、もう一つは細胞膜を透過させた細胞を使用してミトコンドリアからのATP産生を直接観察する手法である。この2つの手法を使用することにより、本遺伝子産物は酸化リン酸化反応の活性を速度論的に増強させることが明らかとなった。

D. 考察

ミトコンドリア機能を動的に制御する遺伝子を機能解析し、発現を制御することができれば、エネルギー代謝改善を直接行うことによるミトコンドリア病および心不全の新しい治療法につながると期待される。今後さらにこの分子の生化学的・生理学的機能解析を行う。

E. 結論

低酸素により一過性に発現誘導される新規のミトコンドリア構成タンパク質を同定し、さらにそのATP産生に与える新たな機能を明らかにした。今後、この遺伝子の生理機能解析をすすめ、エネルギー代謝における役割の解明を進める。さらに本遺伝子のミトコンドリア病における役割を検討する。最終的にはこの分子を標的としたミトコンドリア治療薬の開発を目指す。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1. 論文発表

関連論文なし

2. 学会発表

第77回 日本循環器病学総会・学術集会

(平成25年3月15日)

Young Investigator Awards 受賞講演

Kioka H., Kato H., Asano Y., Kitakaze M.,

Takashima S., Komuro I.

G0/G1 Switch Gene 2 Promotes Mitochondrial ATP Production and Protects Cardiomyocytes from the Energy Crisis under Hypoxia

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得

発明名称 非公開 特願 2012-119937

発明者 北風政史 他

出願人 北風政史 他

2. 実用新案登録

現在のところなし

3. その他

特記すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
 分担研究報告書

希少疾病・ミトコンドリア病に合併する高乳酸血症に対する治療薬開発に関する研究

分担研究者 古賀 靖敏 久留米大学医学部小児科教授

研究要旨 高乳酸血症は、種々の難治性神経・代謝疾患で観察される重要な病態であるが、この治療薬は今だ世界に存在せず、その病態を踏まえた新しい治療薬の開発が熱望されている。ピルビン酸ナトリウム (PA) 治療 (Mitochondrion 2007;7:399- 403) は、ミトコンドリア脳筋症の細胞モデルで細胞死を防ぐ効果があり、臨床研究でもジクロロ酢酸に勝る乳酸の軽減効果と臨床的有効性がある事を報告した。現在は、工業用試薬であるが、医薬品として上市するのに必要な非臨床試験、GMP 原薬製造、および第 1、第 2/3 相試験を行い、世界初の高乳酸血症治療薬を開発する事が目的である。平成 24 年度は、パートナー企業としてノーベルファーマ社が参加し、PA の医薬品としての開発を進めるために、PMDA への戦略事前相談を行った。また、PA の GMP 原薬製造の委託契約を、医薬品製造経験のある 3 社でヒアリングを行い、塩野フィネス社と委託契約を締結した。さらに、第 1 相試験、第 2/3 相試験を行う上で、必須の前臨床試験データパッケージについて、新日本科学株式会社と委託契約を締結した。PA は、生体内物質であり、米国では脂質代謝改善薬としてのサプリメントとして、30 年来使用されている事から、過去の PA に関する研究論文の洗い出しを行った。平成 24 年度は、主な前臨床試験のデータが揃ったところで、戦略事前相談を重ね、平成 25 年 3 月 15 日に対面助言相談を行った。平成 24 年度の事業成果として、GMP 原薬製造については、品質管理および GMP 製造工程に問題なく、医薬品として充分使用可能な状態である事が塩野フィネス社より示された。また、前臨床試験データパッケージで、PA の安全性は充分担保されている事も判明したが、長期毒性および安全性試験、幼若動物に対する安全性試験など、今後、医薬品申請までに必要な前臨床試験については、PDMA と相談を重ねた上で、必要な試験を行う事となった。難治疾患等克服研究事業の重点研究採択により、用法特許を新たに申請する予定であり、日本から世界に発信できるミトコンドリア病に伴う高乳酸血症に対する PA の新規医薬品開発が実働している。

A. 研究目的

高乳酸血症の病態を踏まえた治療薬は今だ世界に存在しない。ミトコンドリア病では、高乳酸血症の程度が高度であるほど臨床的に重症で死亡率も高くなる事が示され (Neurology 2011;77:1965-1971)、高乳酸血症を治療することがミトコンドリア病の重症度を軽減できると考えられるようになった。しかし、従来ジクロロ酢酸 (DCA) が高乳酸血症に使用されていたが、その肝・腎・神経毒性が明らかになり、

DCA にかわる薬剤の開発が急務となった。我々は、ミトコンドリア病での臨床研究から、PA が高乳酸血症を軽減するのみでなく、臨床的にもその重症度を軽くするという知見を得た。このような世界情勢の中で、本研究は、先天性高乳酸血症の病態を踏まえた新しい治療薬の開発を目的としており、試薬からの医薬品開発研究として、日本から世界に発信できる独創的な開発研究を実施している。

B. 研究方法

(1) 当該研究計画に関して現在までに行った研究等高乳酸血症に対する PA 治療 (Mitochondrion 2007;7:399-403) は、ミトコンドリア病の細胞モデルでも細胞死を防ぐ効果がある事が最近のメタボローム解析で証明された (Mitochondrion 2012;12:644-665)。また、臨床研究では、DCA に勝る高乳酸の軽減効果と臨床的有効性が示された (BBA 2010;1800(3): 313-5、Brain & Dev 2012;34(2)87-91, BBA 2012;1820:632-636)。平成 23 年 4 月発足のミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究 (後藤班) と連携し、MELAS に対するアルギニンの医師主導試験の経験を踏まえ、医薬品開発研究に向けて、自主臨床研究として発表した。

(2) 治験薬概要書 (案)

非臨床試験データとして有用な情報を収集するために、PA 研究に関する論文を PubMed で網羅的に検索し、科学的論理的な論文の洗い出しを行った。しかしながら、データとして、非臨床試験に用いる事が出来るものは、我々が検索しうる限り、存在しなかった。今までのデータをまとめ、PA の概念実証としての根拠、および現在までのあらゆる臨床研究データを集大成し、治験薬概要書 (案) として作成した。

(3) 非臨床試験の実施

「first in man」の医薬品を、試薬から開発するために、非臨床試験のデータセットの実施が必要である。このために、戦略薬事相談を行って、必須項目のデータセットについて、新日本化学 (株) に委託して、以下に示すような非臨床試験を実施した (結果参照)。

(4) 第 1、2/3 相試験計画 (案)

将来の医師主導治験での第 2/3 相試験を実施する事を念頭に、第 1 相試験を計画した。これは、次回の戦略薬事相談に伴い詳細な指導を経て、プロトコルを確定する事になる。治験へ向けたエンドポイントの探索も同時に討議し、現在までのミトコンドリア脳筋症研究および PA の臨床研究から治験に最も鋭敏な感度および特異度の高いバイオマーカーをエンドポイントとしても検討した。

(5) 治験薬 GMP 製造した製剤の確保・製造工程記録一式

PA の製剤は、試験薬 GMP により製造され、CMO への製造技術移転が完了するまでに原薬および最終製剤の暫定規格、規格設定のための試験方法の確立並びに安定性試験を行わねばならない。この基準をクリアするために、原薬製造メーカー 3 社のヒアリングを行い、塩野フィネス社との GMP 製造委託契約を行った。現在、第 1 相および第 2 相試験のための必須項目 (原体の予備安定性試験、加速、過酷試験) に関し、塩野フィネス (株)、ノーベルファーマ社と共同し進めている。

(6) 治験実施組織の構築

日本におけるミトコンドリア臨床研究拠点を中心に 13 か所の治験協力施設 (候補) を抽出し、平成 24 年からの治験研究分担研究者として日本における治験システムを構築した。

C. 研究結果

1) 医薬品医療機器総合機構 (PMDA) への戦略相談

平成 24 年の研究費採択を受けて、今後の医薬品開発の進め方につき、PMDA への戦略薬事相談を行った。平成 23 年の班研究採択通知 (平成 23 年 8 月 1 日付) を受けて、平成 23 年 10 月 6 日に PMDA の薬事戦略事前相談を行った。その後、重点研究に発展したため、再度、平成 25 年 1 月 17 日に薬事戦略事前相談を行った。その相談内容調整により、3 月 15 日に対面助言相談を行った。

相談内容は以下の 3 点であった。

①非臨床試験データパッケージの充足性に関する相談

臨床第 I 相試験の開始までに実施する非臨床試験の一覧を添付資料に示す。必要な非臨床試験に漏れがないかどうか、その充足性を確認したい。

【相談の背景及び根拠】

国内ではピルビン酸 Na が医薬品として承認されておらず、医薬品の承認申請を目的とした非臨床試験は実施されていない。臨床第 I 相試験を開始するまでに必要と考えられる非臨床試験の一覧をまとめ、添付資料に示した。これらの非臨床試験データパッケ

ージの充足性を確認したい。

回答：非臨床試験データパッケージに大きな問題は無い。第 I 相試験前にイヌ 13 週反復投与試験、ラット 26 週反復投与試験が含まれてるが、ラットおよびイヌの 4 週試験で問題なければ、必ずしも実施する必要はないかもしれないので、相談する事。ナトリウム負荷に関しては、プラセボの施行を含めて再度相談する事。幼若動物を用いた毒性試験、生殖発生毒性試験についても再度相談する事。

②臨床第 I 相試験のデザインに関する相談

健康成人男性を対象とした第 I 相試験としては、単回投与試験、反復投与試験、食事の影響を評価する試験の 3 試験を実施する計画である。これらの試験では、ピルビン酸 Na (原薬) を水に溶解して被験者に投与する。単回投与及び反復投与試験ではプラセボ群を設定するが、プラセボには水を用いる予定である。

第 I 相試験の投与量・投与回数はこれまでの臨床研究成績に基づいて設定した。ここでは、その設定根拠の妥当性を確認したい。ただし、単回投与試験の初回投与量については、実施中の非臨床試験成績が揃った段階で無毒性量や最小薬理作用量を評価し、第 I 相試験の開始前に再度相談したい。

【相談の背景及び根拠】

健康成人男性を対象とした臨床第 I 相試験は、「単回投与試験」「反復投与試験」「薬物動態に及ぼす食事の影響を評価する試験」の合計 3 試験を実施する計画である。各試験計画の概要を以下に記載する。

(1). 単回投与試験

本試験は、ピルビン酸 Na を単回投与したときの安全性及び薬物動態を評価する目的で実施する。1 ステップあたりの被験者数は 8 名 (実薬群 6 名、プラセボ群 2 名) とし、ステップごとにピルビン酸 Na とし、0.08 g/kg (ステップ 1)、0.17 g/kg (ステップ 2)、0.33 g/kg (ステップ 3) を単回投与する。この投与量は、それぞれ 0.25, 0.5, 1.0 g/kg/day という 1 日投与量を 3 分割したものである。

安全性の評価項目は有害事象、臨床検査値、血圧、駆出分画 (心エコーを実施して算出)、推算糸球体濾過量 (eGFR) とし、治験責任医師がこれらを実験前から、次ステップに移行する。あわせて、試験中は血漿中のピルビン酸・乳酸・アラニン・fibroblast growth factor 21 (FGF-21) 濃度等を測定し、第 II/III

相試験の投与量を設定する際の参考データとする。

i) 投与量の設定根拠

上記の 3 用量のうち、これまでの臨床研究で主に使用されてきたのは、1 回投与量として 0.17 g/kg、1 日投与量として 0.5 g/kg/day であり (4.6 項参照)、これを本試験の中心用量とした。次に、0.33 g/kg (1.0 g/kg/day を 3 分割したときの 1 回投与量) は経口投与可能な最大量として設定した。本薬はナトリウム塩であるため、この投与量を超えるとナトリウム負荷が大きくなり、長期間にわたって服用することは困難である。たとえば、体重 50 kg の患者に 1.0 g/kg/day を投与すると、ナトリウム負荷が 9.1 mEq/kg/day となる。日本人の平均塩分摂取量は 11.6 g/日、この摂取量でのナトリウム負荷は約 4 mEq/kg/day であることから、平均的な塩分摂取に加えて本薬 1.0 g/kg/day を投与すると、通常のほぼ 3 倍のナトリウム負荷が生じることになる (添付資料参照)。

なお、初回投与量の設定根拠は本相談事項の末尾に記載する。

ii) 安全性評価項目の設定根拠

これまでの臨床研究で認められたピルビン酸 Na の主な有害事象は下痢、嘔気・嘔吐といった消化器症状である (4.6 項④参照)。また、水溶液に溶解する量によっては、浸透圧性の下痢が生じる可能性も考えられる。したがって、こうした消化器症状の有無を問診することによって、ピルビン酸 Na の安全性を評価する。さらに、高用量を投与するとナトリウム負荷が大きくなり、血圧や腎機能、心機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。このため、血圧・駆出分画・eGFR を測定し、有害事象の有無とこれらの測定値の変化を総合的に考慮し、次ステップに移行するかどうかを決定する。

(2). 反復投与試験

本試験は、ピルビン酸 Na を反復投与したときの忍容性、安全性及び薬物動態を評価する目的で実施する。被験者数は実薬群 6 名、プラセボ群 3 名とし、ピルビン酸 Na (1.0 g/kg/day) 又はプラセボを 1 日 3 回に分けて、7 日間反復投与する。なお、1.0 g/kg/day は現段階で想定する投与量であり、正式な投与量は単回投与試験成績を踏まえて決定する。

安全性の評価項目は有害事象、臨床検査値、血圧、

駆出分画, eGFR とする。あわせて, 試験中は血漿中ピルビン酸・乳酸・アラニン濃度, FGF-21などを測定し, 第II/III相試験の投与量を設定する際の参考データとする。

i) 投与量の設定根拠

先に記載したように, これまでの臨床研究で主に使用されてきたのは0.5 g/kg/dayであり, 第II相以降の臨床試験ではこれが中心用量になると考えられる。ただし, 第I相反復投与試験では忍容性評価を目的の一つとするため, 単回投与試験の安全性データに問題がなければ, 経口投与可能な最大量である1.0 g/kg/dayを使用し, 健康成人男性での忍容性を確認したい。ただし, 正式な投与量は単回投与試験成績を踏まえて決定する。

ii) 投与回数設定根拠

1日3回という投与回数は, 安定同位元素を用いたピルビン酸の薬物動態試験成績に基づいて設定した。この試験では¹³Cで標識したピルビン酸(ピルビン酸Naとして100 mgを水50 mLに溶解して投与)を用いた結果, 呼気中への排出は速やかで, 絶食時投与の呼気への回収率は約20分, ブドウ糖摂取後投与の回収率は約60分でそれぞれピークに達した¹⁾。本試験では投与後2時間までの回収量を測定したが, この試験成績から推定して, 6時間以内には投与した薬物が体内から消失すると考えられる(治験薬概要書序文参照)。

一方, ミトコンドリア病患者のエネルギー産生を向上させる必要があるのは主に身体の活動中で, 就寝中は向上させる必要性がそれほど高くない。このため, ピルビン酸Naを1日3回投与すれば, 身体活動に必要なエネルギー産生をもたらすことができると考え, 第I相反復投与試験で1日3回投与の忍容性, 安全性及び薬物動態を評価した後, 第II相試験以降ではこの投与回数での有効性及び安全性を評価することとした。

(3). 薬物動態に及ぼす食事の影響を評価する試験
被験者6名を対象とし, クロスオーバー法を用いて, 空腹時及び食後にピルビン酸Naとして0.33 g/kgを単回投与し, 薬物動態に及ぼす食事の影響を評価する。0.33 g/kgは単回投与試験の最大投与量で, 空腹時と食後の生物学的利用能を比較するためには, 可能な限り高用量を用いたほうがよいと判断した。

ただし, これは現段階で想定している投与量であり, 正式な投与量は単回及び反復投与試験成績を踏まえて決定する。

(4). 第I相試験(3試験)の治験薬の投与方法

被験者には, 服用直前にピルビン酸Na(原薬)を水に溶解して投与する。服用直前に溶解する理由は, 水溶液中のピルビン酸Naの安定性が悪く, 時間が経過すると, パラピルビン酸Naに分解するためである。また, 粉末だとかさばるといった問題も生じる。たとえば, 体重60 kgの被験者に0.17 g/kgのピルビン酸Naを投与する場合, 投与量は10 gとなり, これを粉末として服用するのは困難である。

(5). 単回投与試験及び反復投与試験のプラセボ

単回投与試験及び反復投与試験では対照としてプラセボ群を設定し, プラセボには水を用いる予定である。ピルビン酸Naは水に溶解することができ, 高用量を投与する場合でも, 50~100 mLの水に溶かせば無色透明の液体となる(添付資料参照)。このため, 1回投与分の水溶液はコップに入れて被験者に提供することができ, 外観が識別可能な場合でも, 外側を紙で覆ったコップ(又は不透明なコップ)に水溶液を入れれば, 両試験を単盲検デザインで実施することが可能である。ただし, コップの中身は被験者間で比べ合わないようにする。また, ピルビン酸Naには特有の塩辛さがあり, 同様の塩辛さをもつ不活性粉末は存在しないが, 服用時の味覚を被験者間で話し合わないようすれば, 水をプラセボとして単盲検試験を実施することは可能と考える。

(6). 単回投与試験の初回投与量

単回投与試験の初回投与量は0.08 g/kgと設定した。この投与量は, これまでに実施した臨床研究成績に基づいて設定したものである(4.6項④参照)。この臨床研究では, 主として0.5 g/kg/dayという投与量が採用され, これを1日3回に分けて被験者に経口投与した。この場合, 1回あたりの投与量は0.17 g/kgとなり, この用量は小児でも忍容可能であった。単回投与試験では, この半量である0.08 g/kgから投与を開始したいと考える。

参考までに, この臨床研究ではミトコンドリアDNAの変異(A3243G変異)を有するミトコンドリア病患者8名にピルビン酸Naを投与した結果, 有害事象は3

名に認められ、その内訳は嘔気 (1 名)、下痢 (2 名) であった。嘔気は軽度で、ピルビン酸 Na の投与開始時に発現したものの、その後は発現していない。下痢の内容は、水様便又は軽度の軟便 (便性がやや柔らかくなった程度) で、いずれも投与継続中に消失した。すべての患者は現在でもピルビン酸 Na の服薬を継続しており、重篤な有害事象や投与中止を必要とする有害事象は認められていない。

また、高コレステロール血症患者を対象とした海外臨床試験では、ピルビン酸 Na として 14~28 g が 1 日 3 回に分けて投与されている 2)。この試験では、ピルビン酸群の患者の平均体重が 73.6 kg で、平均体重から算出したピルビン酸 Na の 1 日投与量は 0.19~0.38 g/kg/day、1 回投与量は 0.06~0.13 g/kg となる。さらに、高コレステロール血症患者を対象とした別の海外臨床試験では、ピルビン酸 Na として 18.8~30 g が 1 日 3 回に分けて投与され、患者の体重は 51~139 kg の範囲であった 3)。この試験に参加した患者の平均体重は公表されていないが、仮に体重 100 kg の患者が 1 日量として 30 g のピルビン酸 Na を服用した場合には、1 回投与量が 0.1 g/kg

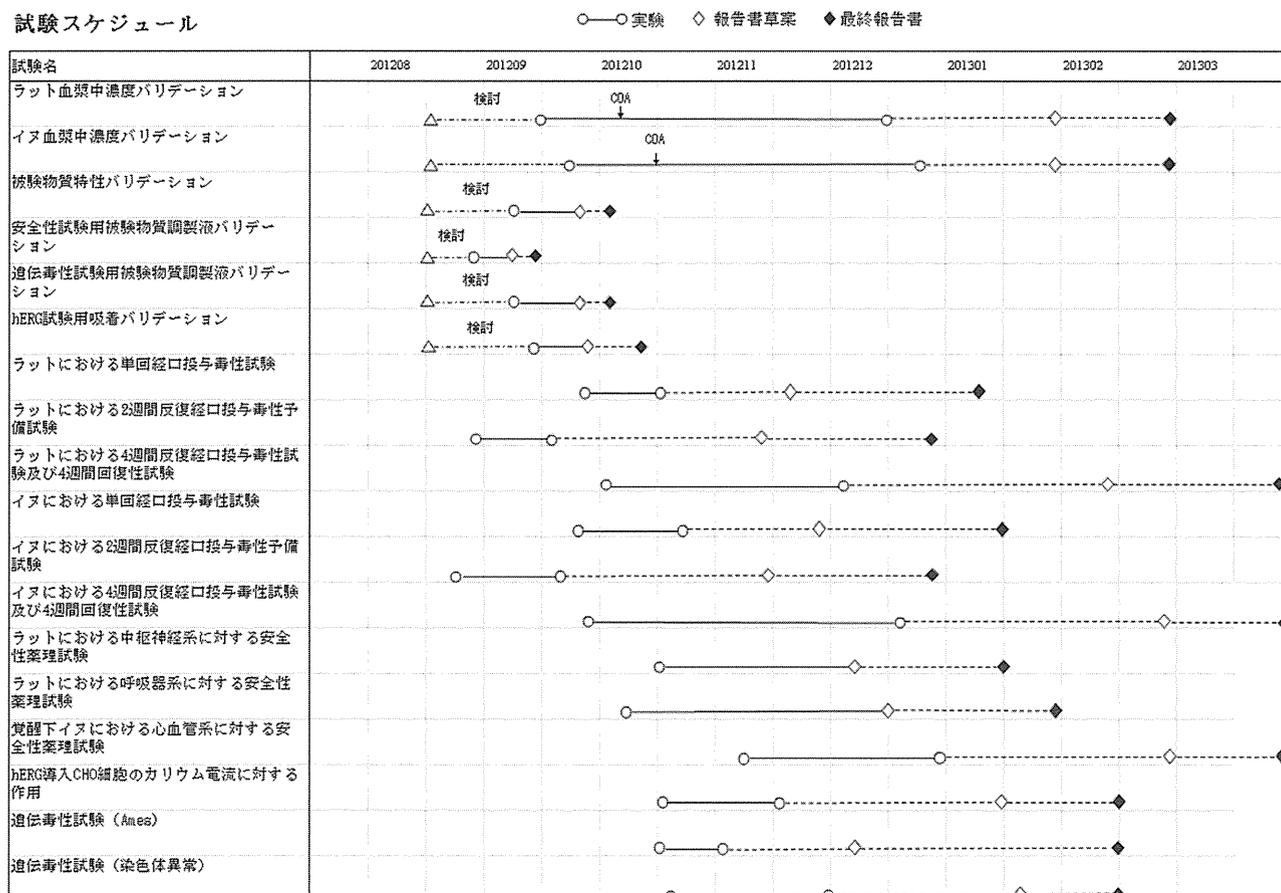
となる。海外臨床試験の対象となったのは血清脂質が高値を示す患者で、血清脂質値を除けば、健康人に比較的類似した集団である。単回投与試験の初回投与量はこれらの試験の投与量とほぼ同程度である。ただし、本薬については、臨床第 I 相試験の開始に必要な非臨床試験を実施している最中である。このため、これらの非臨床試験成績が得られた後、最小薬理作用量や無毒性量を評価し、初回投与量の妥当性を再度相談することとしたい。

③臨床試験に使用する製剤に関する相談

臨床試験では原薬を用時に水に溶解し、被験者に投与したいが、この考えでよいかどうかを確認したい。なお、ピルビン酸 Na には特有の塩辛さがあり、水に溶解すると、この塩辛さが気になる患者も存在する。このため、本薬が服用しやすくなるよう、原薬に甘味料等を追加した製剤を開発することを検討している。開発途中でこうした改良を行う場合には、原製剤 (原薬を用時に溶解) と甘味料等を追加した製剤との生物学的同等性の確認方法に関して、改めて相談することとしたい。

【相談の背景及び根拠】

試験スケジュール



まず、臨床試験を開始する前に GMP 原薬の製造方法を決定し、原薬の規格値を定める計画である。そのうえで、臨床試験では規格を満たす原薬を用時に水に溶解し、被験者に投与することとしたい。

なお、ピルビン酸 Na には特有の塩辛さがあることから、水に溶解した場合には、この塩辛さが気になる患者も存在する。ミトコンドリア病は小児期に発症することが多いため、小児も服用しやすいように、甘味料等を追加した製剤を開発できないかどうかを検討する予定である。仮にこうした製剤が開発できた場合には、原薬の用時溶解投与と甘味料等を追加した製剤との生物学的同等性をどのように確認すればよいか、改めて相談することとしたい。

2) 非臨床試験データパッケージ

「first in man」の医薬品を、試薬から開発するために、非臨床試験のデータセットの実施が必要である。このために、戦略薬事相談を行って、必須項目のデータセットについて、新日本化学 (株) に委託して、以下の表 1 に示すような非臨床試験を実施した。ヒトに使用するための必須の非臨床試験データとして、通常ラット単回、イヌ単回試験、薬物濃度測定法の確立、およびラットおよびイヌに対する一か月反復投与試験、安全性薬理試験などが含まれる。第 1 相試験移行のために必須の非臨床試験の項目については、薬事戦略相談の指導に従って、今後臨床試験への移行を考え項目を設定した。開発対象となる適応症については、遺伝性疾患であるミトコンドリア病に合併する高乳酸血症とした。この疾患は Unmet Medical Needs 医薬品であり、かつ希少疾病である。平成 24 年度に実施した実験項目を表 1 に示す。元来、生体内物質である PA は、投与してもほとんど毒性らしき影響はなかった。しかし、第 I 相試験前に、イヌ 13 週反復投与試験、ラット 26 週反復投与試験が含まれているが、ラットおよびイヌの 4 週試験で毒性に問題なければ、必ずしも実施する必要はないかもしれない。今後は、機構への相談を重ねて、必要なもののみ実施する予定である。ナトリウム負荷に関しては、プラセボ対照試験も視野に入れて、毒性データを確認しながら、再度相談する予定である。幼若動物を用いた毒性試験、生殖発生毒性試験についてもその必要性について再度 PMDA に相談する。

3) GMP原薬製造

PA の製剤は、試験薬 GMP により製造され、CMO への製造技術移転が完了するまでに原薬および最終製剤の暫定規格、規格設定のための試験方法の確立並びに安定性試験を行う事とする。現在、第 1 相および第 2 相試験のための GMP 原薬製造に関する必須項目 (原体の予備安定性試験、加速、過酷試験) について、塩野フィネス (株) に委託し、一工程ながら、武蔵野化学試験特級品を原料として、十分な純度を予備実験により得られた。今後は、原体の予備安定性試験、加速、過酷試験を行って、ヒトに使用できる法規制をクリアした後、第一相試験への製造ラインと工程、品質管理につき、本製造を前提としての試験を行う。また、このすべての過程は、PMDA の指導の下に、ノーベルファーマ社と共同し実施する。

4) 治験実施組織の構築

日本を代表するミトコンドリア病臨床研究拠点をまとめ、平成 24 年の厚生労働科学研究班として研究チームを構築した (図 1)。

5) 治験薬概要書 (別添資料)

D. 考察

平成 24 年度の難治疾患研究事業の採択から、PMDA への相談および、非臨床試験データセットの実施、GMP 原薬製造会社の選定とパイロット研究により、品質管理を G L P 準拠した原薬の製造が可能となった。平成 25 年度は、治験前相談を実施し、第 I 相試験を秋から実施する。

E. 結論

今回の研究成果から、PA の試薬からの医薬品開発を目指して、平成 24 年度の難治疾患研究事業の重点領域研究ステップ 1 に採択され、順調に実働していると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yasutoshi Koga, Nataliya Povalko, Koujyu Katayama, Noriko Kakimoto, Toyojiro Matsuishi, Etsuo Naito, Masashi Tanaka. . Beneficial effect of pyruvate therapy on Leigh syndrome due to a novel mutation

in PDH E1 gene. Brain & Dev 2012 ;34; 87- 91

Yasutoshi Koga, Nataliya Povalko, Junko Nishioka, Koujyu Katayama, Noriko Kakimoto, and Toyojiro Matsuishi . Molecular Pathology of MELAS and L-Arginine Effects. Biochem Biophys Acta General 2012;1820:608-614

Shuichi Yatsuga, Nataliya Povalko, Koujyu Katayama, Junko Nishioka, Noriko, Kakimoto, Toyojiro Matsuishi, Yasutoshi Koga. MELAS: A nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan Biochem Biophys Acta General 2012;1820:619-624

Masamichi Ikawa, Kenichiro Arakawa, Tadanori Hamano, Miwako Nagata, Yasunari Nakamoto, Masaru Kuriyama, Yasutoshi Koga, Makoto Yoneda. Evaluation of systemic redox states in patients carrying MELAS A3243G mutation in mitochondrial DNA. European Neurology 2012;67(4):232-7.

Shuichi Yatsuga, Yuji Hiromatsu, Shigekazu Sasaki, Hirotohi Nakamura, Koju Katayama, Junko Nishioka and Yasutoshi Koga. A two-day-old hyperthyroid neonate with thyroid hormone resistance born to a mother with well-controlled Graves' disease: a case report. Journal of Medical Case Reports 2012, 6:246-8.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
 分担研究報告書

ミトコンドリア病に対する生殖補助医療の現状と選択肢への考察

分担研究者 末岡 浩 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室准教授

研究要旨 ミトコンドリア病の遺伝的伝搬による発生に関し、生殖医療における予防的医療の方法論の確立を目標に技術的検討を行った。ミトコンドリア病に対する着床前遺伝子診断（preimplantation genetic diagnosis: PGD）として、2例の Leigh 脳症に対して、日本産科婦人科学会の倫理承認を得て、実施に至っている。実施事例は、45%の変異比率を有する女性保因者に対し実施し、生検胚のなかで低い変異比率を示す移植可能胚が存在せず、胚移植に至らなかった。事例によって発症を回避できる自己の卵子による妊娠が困難であることを示唆した。他の生殖医療によるミトコンドリア病の遺伝的発症予防の手法として、提供卵子そのものを用いる方法と提供卵子に対してさらなる生殖補助技術を用いる卵細胞質移植と核移植の方法がある。倫理、議論および法の解釈について検討が求められる。

研究協力者 佐藤 卓 慶應義塾大学産婦人科

A. 研究目的

ミトコンドリア病の遺伝的伝搬による発生に関し、生殖医療における予防的医療の方法論の確立を目標に技術的検討を行う。

B. 研究方法

1. 着床前遺伝子診断（preimplantation genetic diagnosis: PGD）の技術開発と効果

わが国では、重篤な遺伝性疾患に関する PGD が対象となる事例ごとの倫理審査を経て実施に至っている。ミトコンドリア病については、これまでに2例の Leigh 脳症（8993 T>G）が承認され、うち1例が実施に至っている。ミトコンドリア病に対する PGD の対象、診断技術、効果について検討し、課題を抽出する。

2. 他の生殖医療によるミトコンドリア病の遺伝的発症予防の技術的・倫理的検討の調査

PGD 以外の生殖補助医療を用いた方法論に関し、現在の技術的背景とその応用に関する倫理

的背景について調査検討する。

倫理面への配慮：PGD に関しては、日本産科婦人科学会“着床前診断に関する見解”に基づき実施することが定められている。十分な遺伝カウンセリング（第三者機関を含む）のうえで、実施施設の倫理委員会の審議のうえ、日本産科婦人科学会倫理委員会の審議を経て、実施承認を得た事例について対象とする。

C. 研究結果

1. PGD の技術開発と効果

生殖過程に伝播するミトコンドリア遺伝病の予防対策として考えられる生殖医療からの手法には、①出生前診断、②PGD、③卵細胞質移植、④核移植、⑤健常な第三者からの提供卵子、の5種に分類される。技術面以外にも倫理的、法的な観点からの問題点が議論されている。ミトコンドリア（mt）DNA 変異によって生じるミトコンドリア病に対する PGD として、neurogenic muscle weakness, ataxia, and retinitis pigmentosa (NARP) およびレーベル遺伝性視神経萎縮症（Leber's hereditary optic

neuropathy: LHON) に対する実施の報告がなされている。我々は 2 例の Leigh 脳症に対して、日本産科婦人科学会の倫理承認を得ており実施に至っている。手法としては顕微授精後の初期胚から胚細胞および検体を生検し、mtDNA のヘテロプラスミー変異率を測定し、疾患が発症するヘテロプラスミーの threshold 以下である胚を選択して胚を胚移植に供する。このなかで、8993T>G および 8993T>C 変異によって発生する Leigh 脳症、およびその軽症型の NARP は、臓器間や時間的な変異比率変化はほとんど認められず、変異比率と疾患重篤度も密接に相関しており、安全性の高い診断基準を設けやすいため PGD の適応として最も有効と考えられる。実施事例は、45%の変異比率を有する女性保因者に対し実施し、生検胚のなかで低い変異比率を示す移植可能胚が存在せず、胚移植に至らなかった。さらにそれ以外の 3 回の妊娠が全て 95%以上の高い比率で示したことから重篤なミトコンドリア遺伝子病を発症しない卵子が得られづらい結果に至っている。ミトコンドリア病に対する PGD での効率が明らかでないが、事例によって発症を回避できる自己の卵子による妊娠が困難であることを示唆した。

2. 他の生殖医療によるミトコンドリア病の遺伝的発症予防の技術的・倫理的検討の調査

PGD が必ずしも効率の高い方法とは言えない可能性についての議論があり、これに対して、諸外国では、より確実に効率のよい、児の発症を防ぐ方法として、健全な第三者の卵子を用いることが、具体的に考えられている。提供卵子そのものを用いる方法と提供卵子に対してさらなる生殖補助技術を用いる卵細胞質移植と核移植の方法がある。特に米国において、提供卵子による体外受精は全体外受精の約 12%を占め、高齢女性を始めとする生殖能低下を対象として多く実施されるに至っている。卵細胞質移植は、mtDNA の変異比率の高い保因者の女性の卵子に存在するヘテロプラスミー比率を低下させる目的で、正常な m t DNA を有する第三者の卵子の一部を注入する方法である。発症を防止するた

めには、正常な mtDNA を有する提供卵子から上限で 50%の細胞質の移植が必要となるため、現実的にはその補填は大きな課題と考えられる。核移植は、m t DNA 変異を持たない提供者の卵細胞と変異保因者の女性から得た卵子の核を入れ替えることによって m t DNA 変異の比率を 0 に近似させる。これに関して、英国のニューキャッスル大学および Human Fertilization and Embryology Authority (HFEA) における議論で、前核を用いた核移植についての研究を承認するに至っている。

D. 考察

PGD に関しては、ミトコンドリア病の遺伝的発症を予防するうえで、最も法的・倫理的には合理的と考えられる手法である。課題は、技術的に他の疾患に対する PGD より診断法が比較定量化を必要とするため煩雑であり、mutant load をどこに設置するかについて議論があること、さらに発症を防止できる移植可能胚が得られる効率が不明であることなどが課題として挙げられる。これに対して、卵子提供、卵細胞質移植、核移植などの他の選択肢は、効率面では安定的な成果が期待できる一方で、これらは、共に第三者の卵細胞を使用する点で議論がある。医学的なミトコンドリア遺伝病の伝搬を防止する効果とそのリスクについて解明されていない点が多いこと、他、倫理的および法的な視点での議論があり、なお意見の分かれる内容を多く含んでいる。卵子提供は、罹患児の妊娠を防止できる実用性の高い技法との考え方がある。しかし、わが国においては公式に容認しておらず、現実的な選択肢であるといえない。匿名の卵子提供者を見つけることは非常に困難であることに加えて、ミトコンドリア病に関して、第一度近親者間での実施では、クライアント妻の姉妹は疾患遺伝子の保因者である可能性があり、一方、クライアント夫の姉妹は血族間の生殖となるためである。倫理、議論および法の解釈についてわが国を同一状況と考えることは困難な面があるが、ミトコンドリア遺伝病の発症を防止する目的での生殖補助技術について十分な議論のう

え、研究を前提としたトライアルを検討する可能性が考えられる。

E. 結論

生殖過程に伝播するミトコンドリア遺伝病の予防対策と生殖医療からの手法として PGD および細胞質移植、核移植などの生殖補助医療技術の安全性と効果につき、倫理的議論の根拠となる科学的検討が求められる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1) 村越行高, 末岡浩, 五十畑葵, 泉陽子, 高橋香織, 佐藤卓, 田島博人, 佐藤健二, 吉村泰典: 加齢女性の卵子に生じるミトコンドリア DNA の動態に関する検討. “第 30 回日本受精着床学会学術講演会” (2012. 8. 30-31)

2) K. Sueoka: What is the new direction of PGD? - The potential of whole genome amplification. (シンポジウム)

“ASPIRE 2012 (4th Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction)” .

Osaka International Convention Center (Osaka, Japan) (2012. 8 月 31-9 月 2 日)

3) 末岡浩, 佐藤卓, 水口雄貴, 泉陽子, 高橋香織, 佐藤健二, 中林章, 吉村泰典, 後藤雄一: ミトコンドリア遺伝病における着床前遺伝子診断の不効率例に対する新たな対策の必要性. “日本人類遺伝学会 第 57 回大会”. (2012. 10. 24-27)

4) 村越行高, 末岡浩, 五十畑葵, 泉陽子, 高橋香織, 佐藤卓, 櫻井友義, 田島博人, 佐藤健二, 中林章, 吉村泰典: 卵子のミトコンドリア遺伝子から解析した胚発生に関わる因子に関する検討. “第 57 回日本生殖医学会総会”. (2012. 11. 8-9)

5) 村越行高, 末岡浩, 五十畑葵, 泉陽子, 高橋香織, 佐藤卓, 櫻井友義, 田島博人, 佐藤健二, 中林章, 吉村泰典: 年齢による卵子, 顆粒膜細胞の変化がミトコンドリア DNA と胚発生に及ぼす影響. “第 57 回日本生殖医学会総会”. (2012. 11. 8-9)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
 分担研究報告書

MELAS 変異を有するサイブリッドにおけるメタボローム解析

分担研究者 田中雅嗣 東京都健康長寿医療センター 部長

研究要旨 半導体シーケンサーを用いてミトコンドリア DNA 変異を迅速に解析する方法を開発すると共に、ピルビン酸ナトリウムの有効性を MELAS m. 3243A>G 変異を有するサイブリッド細胞を用いて検討した。

A. 研究目的

ミトコンドリア呼吸鎖欠損を有するモデル細胞を用いてピルビン酸ナトリウム投与とジクロロ酢酸投与のどちらが物質代謝ならびにエネルギー代謝をより改善するかを検討する。

B. 研究方法

ヒト 143B 骨肉腫細胞に由来する MELAS m. 3243A>G 変異 mtDNA を有するサイブリッド(2SD)と正常 mtDNA を有するサイブリッド(2SA)を 1 mM ピルビン酸の存在下で培養した。これらのサイブリッドの培地を 10 mM ピルビン酸 ([3-¹³C]pyruvate) を含む培養液、あるいは 1 mM ジクロロ酢酸と 10 mM 乳酸 ([3-¹³C]lactate) を含む培養液に切り換え、0, 1, 2, 4 時間後に細胞内および培養液中の代謝産物をキャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析 (CE-TOFMS) によって網羅的に解析した。

(倫理面への配慮) 該当しない。

C. 研究結果

細胞内および培養液における代謝中間体の量の時間経過および代謝流量を解析した。ピルビン酸ナトリウムを培地に添加することによって、[NADH]/[NAD⁺]のバランスが保持され、細胞内エネルギー状態が正常化した。同時に、解糖系が賦活化され、TCA 回路の代謝流量も部分的に正常化した。

一方、ジクロロ酢酸の培地の添加によっては全く細胞内エネルギー状態が改善されず、ピルビン酸の

優位性が示された。

D. 考察

脳卒中様発作を伴うミトコンドリア脳筋症の病因の一つとして tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子の m. 3243A>G 変異がある。ミトコンドリア病に対する治療法としてジクロロ酢酸 (dichloroacetate: DCA) の投与がこれまでに試みられてきた。ジクロロ酢酸投与によって血中乳酸値が低下したとする肯定的な報告があるものの、ジクロロ酢酸投与によっては臨床的改善が見られず、むしろ末梢神経障害・肝障害・腎障害などが出現する。我々は、ピルビン酸療法を提唱し、ピルビン酸ナトリウム投与が MELAS を含むミトコンドリア病の臨床症状を緩和することを報告してきた。今回の結果から、2SD 細胞へのピルビン酸ナトリウム添加によってエネルギー代謝に対して劇的かつ持続可能な好影響が得られることが明確になった。

E. 結論

メタボローム解析により、ピルビン酸ナトリウム投与は代謝学的に合理的な治療法であり、MELAS をはじめとするミトコンドリア病の症状を改善する可能性があることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kami K, Fujita Y, Igarashi S, Koike S, Sugawara S, Ikeda S, Sato N, Ito M, Tanaka M, Tomita M, Soga T. Metabolomic profiling

rationalized pyruvate efficacy in cybrid cells harboring MELAS mitochondrial DNA mutations. *Mitochondrion* 12: 644-665, 2012

Kato T, Nishigaki Y, Noguchi Y, Fuki N, Ito T, Mikami E, Kitamura K, Tanaka M. Extended screening for major mitochondrial DNA point mutations in patients with hereditary hearing loss. *J Hum Genet* 57: 772-775, 2012

Saito K, Kimura N, Oda N, Shimomura H, Kumada T, Miyajima T, Murayama K, Tanaka M, Fujii T. Pyruvate therapy for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1820: 632-636, 2012

Koga Y, Povalko N, Katayama K, Kakimoto N, Matsuishi T, Naito E, Tanaka M. Beneficial effect of pyruvate therapy on Leigh syndrome due to a novel mutation in PDH E1 α gene. *Brain Dev* 34: 87-91, 2012

H. 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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
 分担研究報告書

^{62}Cu -ATSM PET による過還元状態（酸化ストレス）の生体機能イメージングの
 基礎的研究

分担研究者 米田 誠 福井大学医学部内科学 准教授

研究要旨 PET 用核種標識化合物である、 ^{62}Cu -ATSM は、生体における過還元状態（酸化ストレス）を画像化できることが期待される。MELAS mtDNA A3243G 変異 mtDNA を導入した培養細胞系でこれを立証した。

A. 研究目的

PET 用核種標識化合物である、 ^{62}Cu -ATSM あるいは ^{64}Cu -ATSM を用いて、生体における過還元状態（電子が過剰な状態）を画像化できることが期待される。過還元状態は、呼吸鎖の機能不全（電子の滞留）により発生し、ミトコンドリア病における酸化ストレスの増強を評価しうる。我々は、MELAS 患者に対し応用し、脳卒中様発作病変における集積増加を報告している (Ikawa M, et al. Mitochondrion 2009)。今回我々は、 ^{62}Cu -ATSM 集積の特性と有用性を明らかにすべく、培養細胞を用いた基礎的検討を行った。

B. 研究方法

ヒト骨肉腫由来 143B 培養細胞株と 143B からミトコンドリア遺伝子 (mtDNA) を欠く ρ^0 細胞株、および cybrid 技術により作製した 2SA 細胞株 (mtDNA A3243G 変異なし) と 2SD 細胞株 (A3243G 変異 94%) における ^{64}Cu -ATSM 集積を比較検討した。

C. 研究結果

通常酸素下 143B 細胞に比べ、 ρ^0 細胞、ロテノン（呼吸鎖阻害剤）処理もしくは低酸素（1%）下 143B 細胞における ^{64}Cu -ATSM の集積増加が認められた ($P < 0.05$)。また、各細胞における

^{64}Cu -ATSM の集積と NADH および NADPH の濃度は比例していた ($P < 0.01$)。同様に、通常酸素下 2SA 細胞に比べ、2SD 細胞および低酸素（1%）下 2SA 細胞での ^{64}Cu -ATSM の集積増加、および NADH, NADPH の増加が認められた ($P < 0.05$)。

D. 考察

^{62}Cu -ATSM は、ミトコンドリア機能不全により過還元状態にある呼吸鎖に集積する。

E. 結論

^{62}Cu -ATSM は、ミトコンドリア機能不全もしくは低酸素により過還元状態にある呼吸鎖に集積することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ikawa M, Arakawa K, Hamano T, Nagata M, Nakamoto Y, Kuriyama M, Koga Y, Yoneda M: Evaluation of Systemic Redox States in Patients Carrying MELAS A3243G Mutation in Mitochondrial DNA. Eur Neurol 67:232-237, 2012

井川正道、米田 誠、田中雅嗣：ミトコ

ンドリア心筋症. 循環器内科 72:592-598,
2012

井川正道、米田 誠：ミトコンドリア病.
PHARM STAGE 12:48-52, 2012

2. 学会発表

Yoneda M. PET Imaging of oxidative stress in neurodegenerative diseases using ^{62}Cu -ATSM. International Symposium of Asian Association of Aging Research2012, August 24-26, 2012, Fukuoka, Japan (invited)

Yoneda M, Ikawa M, Yoshii Y, Nakamoto Y, Fujibayashi Y, Okazawa H. *In Vitro* and *In Vivo* Imaging of Over-reduction States (Oxidative Stress) in MELAS using PET Radiopharmaceutical ^{62}Cu -ATSM, Annual Meeting of American Academy of Neurology, New Orleans, LA, USA, 2012.

H. 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.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
 分担研究報告書

ミトコンドリア病における耳鼻咽喉科的研究

分担研究者 山嵜 達也 東京大学医学部附属病院 教授

研究要旨

- 1) ミトコンドリア遺伝子 3 2 4 3 位点変異の患者に対して、水素水およびタウリン内服の効果を検討した。自覚的疲労度の軽減は見られたが、難聴の緩徐進行を停止する効果は無かった。
- 2) 高速撮影が可能な Nikon A1R 共焦点顕微鏡を基盤とした生体内リアルタイム共焦点顕微鏡を構築し、内耳有毛細胞の *in vivo* イメージングを可能とした。ミトコンドリア膜電位標識蛍光プローブを用いて、ゲンタマイシン投与後に発現が外有毛細胞有意に低下することを観察した。
- 3) Optical coherence tomography (OCT) を用い、モルモットの摘出蝸牛を脱灰して観察したところ、血管条、ラセン靭帯、コルチ器などの詳細な観察が可能となった。ミトコンドリア障害モデルでは側壁の萎縮、コルチ器の変性などが確認できた。

研究目的

1) ミトコンドリア遺伝子 3 2 4 3 位点変異による難聴・糖尿病 (MIDD) の患者では感音難聴が徐々に進行することが知られているが、有効な治療法はまだないため、水素水およびタウリンによる難聴進行抑制効果を明らかにする。

2) Optical coherence tomography (OCT) は非侵襲的に生体の内部構造を観察することができる。この技術によりヒト生体の蝸牛内部構造の変化を観察可能にし、ミトコンドリア障害による感音難聴の臨床解析に用いられるようにする。

3) 高速撮影が可能な Nikon A1R 共焦点顕微鏡を基盤とした生体内リアルタイム共焦点顕微鏡を構築、内耳有毛細胞の *in vivo* イメージングを可能にし、ミトコンドリア障害による難聴の機序を解析できるようにする。

B. 研究方法

1) MIDD 患者の聴力を標準純音聴力検査により 3 ヶ月ごとに計測し、水素水 500-600ml/日、及びタウリン 3.06g/日の投与により、難聴進行が抑制できるか検

討した。

2) OCT は非侵襲的に生体の内部構造を観察することができ、解像度は 10 μm であり、CT、MRI と比べ非常に高い。ヒトの応用の前に、動物実験でどこまで解析可能か検討した。正常モルモット、酸化ゲルマニウム投与、カナマイシン・エタクリン酸投与、ストレプトマイシン内耳灌流、内リンパ水腫などの内耳障害を起こした動物の蝸牛を摘出し、ホルマリンで固定後 EDTA で脱灰して OCT にて観察した。さらにパラフィンに包埋し、切片を作成して対比した。

3) 高速撮影が可能な Nikon A1R 共焦点顕微鏡を基盤とした生体内リアルタイム共焦点顕微鏡を構築し、内耳有毛細胞の *in vivo* イメージングを行う。Ventral approach より頂回転を露出し、カルシウム指示薬、ミトコンドリア膜電位感受性蛍光色素、活性酸素指示薬などを直接滴下し、音刺激あるいは電気刺激による有毛細胞の脱分極、膜電位の変化を記録した。

(倫理面への配慮)

本研究の臨床研究は非侵襲性の検査（標準純音聴力検査）を基本とし、通常臨床の一環として行うため、検査に関して特別な不利益は生じない。研究計画は倫理委員会の承認を得ている。動物実験の計画も東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会の許可を得ている。動物実験ではNIHの実験動物に関するガイドライン、東京大学の実験動物の取り扱いに関する規定に従い、使用する動物数が最小限となるよう実験計画を工夫している。また対象となる動物が不快、苦痛を感じないよう最大限の留意を払う。なお研究参加者は全員東京大学医学系研究科動物実験講習会を受講済みである。

C. 研究結果

1) MIDD患者に水素水およびタウリンを内服させたところ、自覚的な疲労度の軽減は見られた。難聴の進行は緩徐であり、投与前後で統計的な有意差は見られなかった。

2) 正常モルモットでは、蝸牛脱灰操作によりOCTの観察で蝸牛軸以外の内部構造（側壁、コルチ器、ライスネル膜など）は全回転において明瞭に観察することができた。正常耳の組織では基底板の歪みやライスネル膜のひだなどのアーチファクトが見られたがOCTではそのような所見は無かった。内リンパ水腫動物では4週間後に摘出したが、組織所見では内リンパ水腫を全回転に認め、それはOCTでもきれいに観察できた。エタクリン酸とカナマイシンで聾にした動物ではコルチ器の変性が組織所見で観察でき、OCTでも同様の所見であった。ストレプトマイシンを蝸牛灌流して4週経った動物ではコルチ器は平坦化し、血管条を含む側壁も萎縮していたが、OCTでもこの所見がきれいに観察された。ゲルマニウム投与によるミトコンドリア障害動物ではコルチ器の平坦化が観察されたが、組織学的に認められた血管条の変性は観察困難であった。

3) Nikon A1R 共焦点顕微鏡を基盤とした生体内リアルタイム共焦点顕微鏡は構築でき、内耳有毛細胞の *in vivo* イメージ

ングが可能となった。頂回転を露出したところ、有毛細胞の同定は可能であり、頭部を固定することで呼吸のアーチファクトをほぼ除去できた。また音響刺激による基底板振動も観察できた。活性酸素マーカーを投与してアミノ配糖体を与えたところ、活性酸素の産生が確認された。またカルシウムマーカー、膜電位感受性蛍光色素を滴下したところ、音響刺激により外有毛細胞内のカルシウム濃度が上昇することが観察された。さらに Mitotracker で標識し、アミノ配糖体を投与すると蛍光強度が低下し、膜電位の低下が示唆された。

D. 考察

水素水は酸化ストレスを抑制する事が知られている。タウリンには、血圧降下、コレステロール降下、解毒作用、乳酸蓄積抑制などの効果が知られ、老化抑制や認知機能維持なども報告されている。ミトコンドリア遺伝子障害の臨床像は酸化ストレスと関与するとの報告があり、難聴についての CoQ10 が有効であった症例報告がある。今回の検討では症例も少なく評価時間も長くないが、有意な効果は見られなかった。今後さらに症例と観察期間を延ばしての検討が必要である。Optical coherence tomography (OCT) は非侵襲的に生体の内部構造を観察することができる。その解像度は $10\mu\text{m}$ であり、CT、MRI と比べ非常に高い。これまでに内耳に対して使用したいくつかの報告があるが、蝸牛組織の内部構造を描出することは限定的であった。我々は脱灰という方法を用い、モルモットの蝸牛においてはアーチファクトを押さえ、蝸牛内部構造の観察ができること、コルチ器や側壁の変性、内リンパ水腫などの病変も的確に観察できることを示した。今後はさらに特殊な観察用カメラを作成し、生体内リアルタイムに内部構造の変化を観察することを検討したい。

共焦点顕微鏡を基盤とした生体内リアルタイム共焦点顕微鏡は内耳の状態を *in vivo* でイメージングできるという極めて大きなメリットがあるが、これまで成功したという報告は無い。今回我々は内耳有毛細胞の *in vivo* イメージングに成功