

厚生労働科学研究補助金（難治性疾患克服研究事業）
総合分担研究報告書

新しい治療法の開発（ケミカルシャペロン療法）
神経型ゴーシェ病に対するケミカルシャペロン療法

分担研究者：H22-H24 大野耕策 鳥取大学医学部脳神経小児科・教授
H25-H26 成田綾 鳥取大学医学部脳神経小児科・助教

研究要旨

ゴーシェ病に対する酵素補充療法は臓器腫大や血液学的所見を改善させる。しかし、酵素製剤は脳血液関門を通過出来ない為、本邦のゴーシェ病患者の過半数を占める神経型の治療として、酵素補充療法の効果は乏しく、中枢神経系を標的とした新規治療法の開発が望まれている。本研究にて我々は2010年より鳥取大学倫理委員会の承認を受け、神経型ゴーシェ病患者に対し、アンブロキシソールによるケミカルシャペロン療法を開始した。また、ゴーシェ病の中枢神経症状の早期発見ならびに治療効果を判定する客観的指標（LC-ESI-MS/MSによる髄液グルコシルスフィンゴシン測定、赤外線電子瞳孔計による対光反射測定）の開発と臨床応用を行い、シャペロン療法による神経学的所見ならびに客観的指標の改善を認め、中枢神経系への有効性が示唆された。

A. 研究目的

ゴーシェ病はライソゾーム酵素の一つであるグルコセレブロシダーゼ（GBA）の欠損により、その基質であるグルコセレブロシドが肝、脾、骨髄、神経系等に蓄積することで発症する遺伝性疾患で、臨床的には神経症状を呈さない型と、神経症状を呈する型および型に分類される。

現在、酵素補充療法が開発され、治療により肝脾腫、貧血などの身体症状は改善するが、酵素製剤は血液脳関門を通過しないため、神経症状に対する効果は認められていない。

そこで我々は神経型ゴーシェ病の中枢神経系の治療法の開発を行ってきた。我々は神経型ゴーシェ病の中枢神経系の治療法の開発をめざし、変異酵素を活性化する薬理的シャペロンの開発を行い、N-オクチルバリエナミン（NOV）が3型の原因変異であるF213I、N188S、G202Rの残存酵素活性を上昇させることを見いだした。またスペインとの共同研究でSP2アザ糖が新しいシャペロンとし

て働くことを見いだした。

一方で2009年にナダのグループがFDA承認薬をスクリーニングし、市販薬であるアンブロキシソール（ムコサル、ムコソルバン）が、非神経型の原因変異であるN370S変異の酵素活性をあげることを見いだした。アンブロキシソールは低分子化合物である為、血液脳関門を通過し、神経症状への効果が期待できる。また、去痰剤として汎用されている薬剤であり、安全性や薬物動態が比較的明らかにされている事から、より早期の臨床応用が期待できると考えた。

そこで我々は神経型ゴーシェ病患者由来培養線維芽細胞（N188S/G193W、F213I/L444P、R120W/L444P）を用いてアンブロキシソールのシャペロン効果を確認した。次に正常マウスに対してアンブロキシソール投与を行い、中枢神経系での変異グルコセレブロシダーゼ活性の上昇を確認した。これらの結果より、アンブロキシソールは神経型ゴーシェ病に対しても有効なシャペ

ロン化合物であり、中枢神経系に移行し、効果を発揮する事が期待できるとし、2010年より鳥取大学医学部倫理審査委員会の承認後、患者家族の同意を得て神経型ゴーシェ病患者に対して、酵素補充療法に併せてアンブロキシソール投与を行い、シャペロン療法の安全性を有効性の評価を開始した。

また、臨床症状は患者毎に多様であることから、臨床症状の観察に加え、客観的な有効性の評価法を構築する必要があると考え、生化学的指標として髄液グルコシルスフィンゴシン濃度を、生理学的指標として対光反射を正常コントロールと比較し、神経型ゴーシェ病の診断と治療の評価法として有用であるかを検討した。

B. 研究方法

【患者】

スクリーニング時に以下の選択基準をすべて満たす患者を対象とした。

- 1) リンパ球又は培養皮膚線維芽細胞 β グルコセレブロシダーゼ (GBA) 活性の低下、及び遺伝学的 (GBA 遺伝子診断) にゴーシェ病と確定診断された患者。
- 2) 上記 1) にてゴーシェ病と診断され、神経症状を*有する患者。
* 異常眼球運動、呼吸障害、嚥下障害、構音障害、けいれん発作、ミオクローヌス・筋緊張の異常 (ジストニア、低緊張、後弓反張、痙性)・失調による運動能力の退行、知的能力の退行など。
- 3) 患者由来培養皮膚線維芽細胞にてアンブロキシソールによるシャペロン効果が確認された患者。
- 4) ゴーシェ病の治療として、酵素補充療法を実施している患者。
- 5) 本研究の参加にあたり、十分な説明を受けた後、十分な理解の上、患者本人あるいは保護者の自由意思による文書同意が得られた患者。

【治療薬の調整】

アンブロキシソール塩酸塩製剤 (以下、アンブロキシソール、商品名ムコソルバン) は帝人ファーマ株式会社から購入した。

【治療薬の投与方法】

簡易懸濁法にて溶解したアンブロキシソールを分3投与した。アンブロキシソールは 3mg/kg/日 から開始し、最終投与量を 25mg/kg/日まで増量した。

【治療効果の判定】

血液 (血算、一般生化学検査、リンパ球 G B A 酵素活性、アンブロキシソール血中/髄液中濃度)、尿検査、腹部エコー、腹部 CT、脳 MRI、MRS、脳波、電気生理検査 (聴性脳幹反応、短潜時 SEP、視覚誘発電位、Blink reflex、眼電位図) を治療開始前後に行った。

また、リンパ球 G B A 酵素活性は全ての患者において評価が可能であるが、臨床症状は多様であることから、臨床症状を一律に同一評価方法で行う事は困難である。また、通常の MRI や MRS、電気生理検査所見も患者毎に様々であることから、中枢神経系に特異的で、どの患者にも適応できる客観的な評価方法の開発が必要であると考えた。

そこで本研究では、生化学的指標として髄液グルコシルスフィンゴシン濃度を、生理学的指標として対光反射を正常コントロールと比較し、評価法として有用であるかも併せて検討した。

C. 結果

【対象】

2013年10月31日の時点で、計17名の患者に投与を行った。1年以上の投与を終了した6例 [2013年10月31日の時点で、治療期間中央値: 1年11ヵ月 (1年~3年7ヵ月)] について、安全性、有効性及び薬物動態の解析を行った (後述

の結果は投稿準備中である)。

【治療経過による有害事象】

安全性に関しては、投与を行ったすべての患者について集計し、1例に皮疹、2例に低尿酸血症を認めたが、いずれも軽度であり、投薬継続で自然軽快した。中止例は3例であり、1例はリンパ球GBA酵素活性の上昇が得られず、無効と判断し、中止となった。2例目は原疾患の進行に関連するイレウス(上腸間膜動脈症候群)にて一旦中止としている。3例目は薬剤アレルギー(ムコソルバンによるDLST陽性)にて使用21日で中止となった。

これら3例を除いた14例は現在も治療を継続しており、有害事象は報告されていない。

【有効性】

以下の有効性に関する項目は、1年以上の投与を終了した6例[2013年10月31日の時点で、治療期間中央値:1年11ヵ月(1年~3年7ヵ月)]について解析を行った。

(1) リンパ球GBA酵素活性

リンパ球GBA活性は、アンプロキシソール塩酸塩を25mg/kg/日投与することにより、治療前のコントロールの14.3%(n=6、5.5-30.9%)から、治療後には48.3%(n=6、42.2-54.6%)まで有意に上昇した。

(2) 臨床症状(痙攣、ミオクローヌス)

薬剤抵抗性のミオクローヌス並びに痙攣発作を有した5例において、発作頻度並びに発作持続時間の改善を認めた(表1、図1)。治療前には歩行や独座が不能であった2症例では、再度歩行が可能となるなど粗大運動機能スコア(GMFM)(図2)ならびに日常生活動作(ADL)の改善(図3)を得た。開始時に既に寝たきりとなっており、ADLの評価不能であった2症例に関しても、痙攣やミオクローヌスの軽減によって全身状態の

安定化や介護者の負担軽減が得られた。

(3) 電気生理検査

治療効果判定の生理学的指標として、脳波、電気生理検査(聴性脳幹反応、短潜時SEP、視覚誘発電位、Blink reflex、眼電位図)を施行した。治療1年目の評価で聴性脳幹反応、短潜時SEP、視覚誘発電位、Blink reflexに関しては、一定の傾向は得られなかった。診察指示に応じる事が可能な2例で眼電位図による水平性衝動性眼球運動の潜時を測定し、治療後に潜時の改善を認めた。その他、脳波で1例にspike indexの低下を認めた。

(4) 画像検査

頭部MRI、MRS検査を施行し、1例に軽度の萎縮の進行を認めた。その他5例では著変は認めなかった。MRSにて共通する特記所見は得られなかった。

(5) 髄液グルコシルスフィンゴシン

酵素補充療法を行っている神経型ゴーシェ病患者13例(型6例、型7例、中央値2.2歳、6ヶ月~49歳)ならびに正常コントロール26例(中央値2.5歳、3ヶ月~18歳)の髄液グルコシルスフィンゴシンをLC-ESI-MS/MSを用いて測定し、神経型ゴーシェ病では平均29倍(中央値88.0pg/ml、26.6-2000pg/ml)とコントロール群(中央値2.81pg/ml、0-8.49pg/ml)に比して有意に上昇していることを確認した。

また、6例全例で治療開始12ヶ月後にベースラインより有意な低下を認めた(図4)。

(6) 電子瞳孔計による対光反射計測

酵素補充療法を行っている神経型ゴーシェ病患者15例(型2例、型6例、型7例)ならびに正常コントロール33例(コントロール1:n=30、平均年齢23歳、22~37歳、コントロール2:n=3、平均年齢4.7歳、4~6歳)におい

て赤外線電子瞳孔計（イリスコーダデュアルC 10641、浜松ホトニクス、浜松、日本）を用いて両眼の対光反射の潜時と縮瞳率を計測した。

神経型（Ⅲ型およびⅡ型）ゴーシェ病では12/13例（92.3%）に潜時の遅延や縮瞳率の低下を認められた。非神経型（Ⅰ型）の2例にはいずれの異常も認めなかった。

治療12ヶ月後に評価が可能であった4例に関して再度測定を行い、ベースライン時には反応が消失していた3例で波形の再出現を認めた。残り1例も縮瞳率および潜時の改善を認めた（図5）。

D. 考察

本研究において、17例中1例の薬剤アレルギーによる因果関係が否定できない中止を認めたが、その他の重篤な副作用は認めず、安全性・忍容性に優れた治療であることが示唆された。

臨床症状の改善に関しては、治療抵抗性の痙攣発作やミオクローヌスに対しても、評価症例全例においてミオクローヌス及び痙攣の軽減を認め、それに伴うADLの改善が得られた。また、眼球運動の潜時や対光反射などの生理学的指標においても中枢神経における改善が確認できた。

病状の重症度や治療法に影響を受けにくい客観的な評価法として、髄液グルコシルスフィンゴシンの定量を行い、その評価系を構築した。この測定系を用いると、神経型ゴーシェ病では年齢や神経学的重症度、先行する酵素補充療法等の患者背景に影響を受けず、髄液グルコシルスフィンゴシンの有意な上昇を認めた。グルコシルスフィンゴシンはゴーシェ病の蓄積基質であるグルコセレブロシドが脱アシル化されて合成されるリゾ体で、神経型の中枢神経に過剰蓄積し、神経変性に関与すると考えられている。グルコシルスフィンゴシンの主な供給源はスフィンゴ脂質が過剰に蓄積したゴーシェ細胞と考えられているため、血清中에서도検出可能だが、酵素補充療法にて低下するため、先行する酵素補充療法の時期や投与量が均一でない患者群での評価は困難である。一方

で髄液では酵素補充療法が移行しないため、先行治療歴に関わらず評価が可能であり、中枢神経系の評価として特異性が高いと考える。

加えて、全例でシャペロン療法後に低下を認められたことは、シャペロンによる変異酵素の安定化が促進された結果、グルコセレブロシドやグルコシルスフィンゴシンの分解と蓄積の抑制が得られた事を示唆するものであり、治療効果の客観的指標として有用であると考えられた。

E. 結論

神経型ゴーシェ病患者へのアンブロキシソールの大量長期経口投与は、有害事象を伴わず、患者の残存酵素活性を上昇させた。また、進行例であってもミオクローヌスや対光反射の改善等の神経症状に対する改善効果を有する可能性が示唆された。

加えて本研究で開発した髄液グルコシルスフィンゴシン測定と電子瞳孔計を用いた対光反射測定は、指示に応じる事が困難な年少児や重症例においても施行可能な客観的評価方法であり、効果判定の有用な指標となり得る事が示唆された。

今後は症例数を増やし、安全性・忍容性に加え、中枢神経治療薬としての有効性を更に検討していく。

図表

表1. 臨床症状の経過

患者	年齢	病型	発作様式	発作頻度（前）	発作頻度（治療後）
①	33	Ⅲ	ミオクローヌス（安静時）	顔面、四肢に 10回>10秒	
②	3	Ⅱ	強直痙攣	8回/28日	4回未満/28日
③	22	Ⅲ	強直痙攣 ミオクローヌス	強直痙攣： 4.8回/28日 ミオクローヌス： 10回>10秒	強直痙攣： 4.6回/28日 ミオクローヌス： 10回>10秒
④	17	Ⅲ	強直間代痙攣 ミオクローヌス	強直間代痙攣： 26回/28日 ミオクローヌス： 10回>10秒	強直間代痙攣： 12.3回/28日 ミオクローヌス： 10回>10秒
⑥	4	Ⅱ	強直間代痙攣 ミオクローヌス	痙攣重積：3回/年 ミオクローヌス： 7.2回/10秒	痙攣重積：1回/年 ミオクローヌス： 3.4回/10秒

図 1 . ミオクローヌス評価 (U M R S)

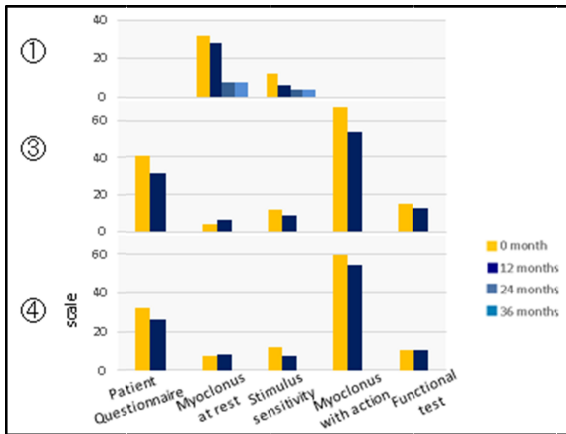


図 4. 髄液グルコシルスフィンゴシン

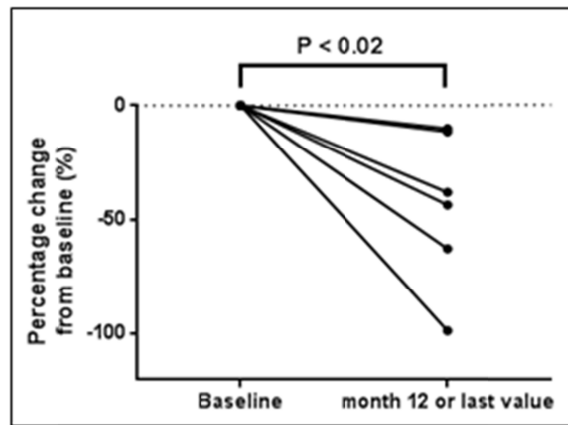


図 2 . 粗大運動評価 (G M F M)

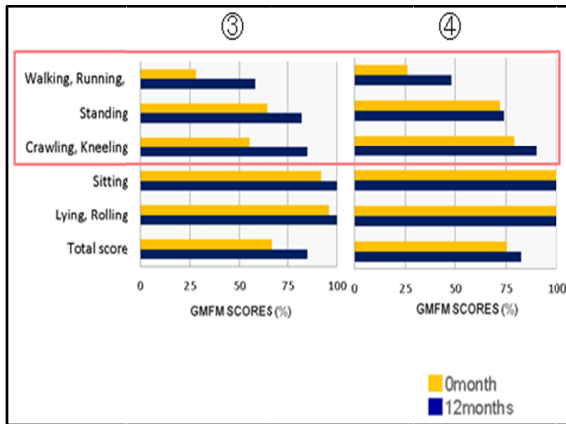


図 5. 対光反射

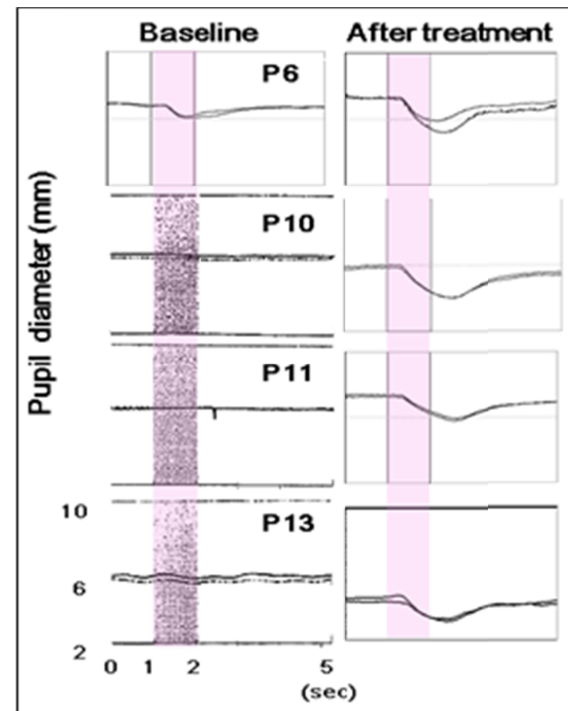
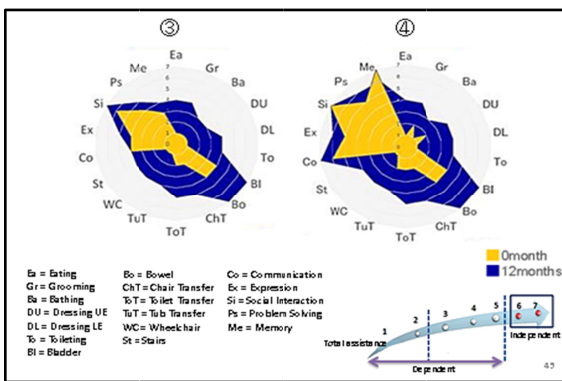


図 3 . 日常生活動作評価 (F I M)



1. 論文発表

- 1) Li, L., K. Higaki, et al. Chemical chaperone therapy: luciferase assay for screening of beta-galactosidase mutations. *Mol Genet Metab* 101(4): 364-369, 2010
- 2) Luan, Z., K. Higaki, et al. A Fluorescent sp2-iminosugar with pharmacological chaperone activity for gaucher disease: synthesis and intracellular distribution studies. *ChemBiochem* 11(17): 2453-2464, 2010

- 3) Katsumi Higaki , Linjing Li , Kousaku Ohno, et al. Chemical Chaperone Therapy: Chaperone Effect on Mutant Enzyme and Pathophysiology in β -Galactosidase Deficiency. Hum Mutat 32: 843-852, 2011.
- 4) Ayumi Takamura, Katsumi Higaki, Kousaku Ohno, et al. Lysosomal accumulation of Trk protein in brain of GM1-gangliosidosis mouse and its restoration by chemical chaperone. J.Neurochem.118, 399-406, 2011
- 5) Luan Z, Linjing Li , Higaki K ,Ohno K, et al. The chaperone activity and toxicity of ambroxol on Gaucher cells and normal mice. Brain Dev. 2012 Jun 7
- 6) Suzuki Y, Ichinomiya S, Ohno K, et al. Therapeutic chaperone effect of N-octyl 4-epi- β -valienamine on murine G(M1)-gangliosidosis. Mol Genet Metab. 106(1), 92-98, 2012
- 7) 成田綾、大野耕策：先天代謝異常症と眼； Gaucher 病の眼科所見と治療. 神経眼科 29 (3): 303-309、2012
- 8) 成田綾、大野耕策：ミオクローヌス What ' s myoclonus ? ライソゾーム病. Clinical Neuroscience 30(7):822-825, 2012
- 第 54 回日本先天代謝異常学会
- 4) Aya Narita, Kousaku Ohno, et al. Chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease. 13th Lysosomal Disease Network World Symposium .Orlando, Feb. 2013
- 5) 成田綾、板村真司、大野耕策他 神経型 Gaucher 病に対するアムプロキソールを用いたケミカルシャペロン療法 第 55 回日本小児神経学会学術集会.大分, 2013.5
- 6) Aya Narita, saori Kosugi, Kosaku Ohno, et al. Elevated CSF Glucosylsphingosine in neuronopathic Gaucher disease : relation to phenotype and therapeutic response with chaperone therapy. The 55th Annual meeting of JSIMD/The 3rd ACIMD, maihama, Nov.2013
- G . 知的財産権の出願・登録状況
なし

2.学会発表

- 1) 成田綾、前垣義弘、大野耕策 . Gaucher 病 3 型患者に対するケミカルシャペロン療法の効果 . 第 53 回日本小児神経学会総会 . 横浜、2011.5
- 2) Aya Narita, Luan Zhuo, Kousaku Ohno, et al. Chemical chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease. 12th International Child Neurology Congress 2012
- 3) 成田綾、白井謙太郎、大野耕策他 神経型 Gaucher 病に対するケミカルシャペロン療法