

201324106A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)

ミトコンドリア脳筋症 MELAS の脳卒中様発作に
対するタウリン療法の開発

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 砂田芳秀

平成 26(2014) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)

ミトコンドリア脳筋症 MELAS の脳卒中様発作に
対するタウリン療法の開発

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 砂田芳秀

平成 26(2014) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告	
ミトコンドリア脳筋症 MELAS の脳卒中様発作に対するタウリン療法の開発 砂田芳秀	1
II. 分担研究報告	
1. 砂田芳秀	15
2. 後藤雄一	19
3. 古賀靖敏	23
4. 太田成男	25
5. 萩原宏毅	29
6. 西松伸一郎	33
7. 村上龍文	37
8. 大澤 裕	41
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
IV. 研究成果の刊行物・別刷	47

I. 総括研究報告

「ミトコンドリア脳筋症 MELAS の脳卒中様発作に対するタウリン療法の開発」

研究代表者 砂田芳秀 川崎医科大学 神経内科学・教授

研究要旨

1966年、クリックは tRNA アンチコドン 1 文字目と mRNA コドン 3 文字目の結合はワトソン・クリック水素結合モデルだけでは説明しきれず、アンチコドン 1 文字目には何らかの化学修飾が想定されると予言した。MELAS はミトコンドリア tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子のクローバーリーフ領域の一塩基変異によるが、われわれは世界に先駆け、正常 tRNA^{Leu(UUR)} のアンチコドン 1 文字目がタウリン修飾を受け、一方、MELAS の変異 tRNA^{Leu(UUR)} ではこの修飾が欠損し転写障害が惹起されることを発表した。さらにタウリンを大量投与するとモデル細胞のミトコンドリア機能障害が改善、2 例の MELAS 患者の反復する脳卒中様発作が抑制されることから MELAS の基本病態を tRNA^{Leu(UUR)} アンチコドン 1 文字目のタウリン修飾異常症と提唱した。本研究は、この独創的知見から、MELAS 脳卒中様発作の再発抑制のため、タウリン大量経口投与の医師主導治験を実施して国内薬事承認を目指している。治験を実施するに先立って、ミトコンドリア病調査研究班、日本神経学会、日本小児神経学会のバックアップを受け MELAS 全国疫学調査を実施した。その結果、これまで最大数の MELAS 患者が集積し、脳卒中様発作を反復する患者が多数存在することが明らかになった。その中から本治験に参加可能な患者数を設定し、多施設共同・オープン・Phase III 試験として PMDA および実施医療機関の IRB 承認を得て治験計画届を提出し、治験を開始した。治験には、10 施設 10 患者が参加し、治験薬タウリンを 1 年間服用し、平成 27 年 1 月初旬までに終了予定である。治験薬タウリンの効果は、100%レスポンス率（脳卒中様発作の完全抑制）を主要評価項目として判定する。ミトコンドリア病に対して保険適応を獲得した薬剤は世界的に皆無である。既に高ビリルビン血症と心不全を適応として薬事承認されているタウリンによる治療が確立できれば、厚生労働行政の課題である希少難病対策の一翼を担える。日本で遺伝子変異が同定され RNA 修飾異常というユニークな病態が発見された疾患 MELAS の独創的な病態介入療法として、厚生労働科学研究費補助金事業と我が国の医薬品開発力の卓越性を世界にアピールしたい。

研究分担者

砂田芳秀 川崎医科大学神経内科学 教授
大澤 裕 川崎医科大学神経内科学 講師
萩原宏毅 帝京科学大学医療科学部 教授
西松伸一郎 川崎医科大学分子生物学1 講師
村上龍文 川崎医科大学神経内科学 准教授
後藤雄一 (独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第2部 部長
古賀靖敏 久留米大学医学部 小児科 教授
太田成男 日本医科大学大学院医学研究科 教授

本研究は平成 24 年 10 月に開始され、希少難病ミトコンドリア脳筋症の MELAS 患者における脳卒中様発作の再発抑制治療としてタウリン療法の医師主導治験を実施し有効性と安全性を検証して国内薬事承認を得ることを目的とする。

MELAS はミトコンドリア病で最も頻度の高い病型で、ミトコンドリア DNA がコードしている tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子のクローバーリーフ構造の点変異が原因とされているが、発症のメカニズムの全容は未だ解明されていない。脳卒中様発作を繰り返しながら中枢神経系にダメージが蓄積していく進行性の経過をとるため、その再発を抑制

A. 研究目的

する治療法の確立が急務となっている。これまでは急性期には脳梗塞急性期に準じた治療が、慢性期にはエネルギー代謝改善を目的とした治療が行われてきたが、その効果は十分とはいえない。

われわれは、世界に先駆け MELAS の変異 tRNA^{Leu(UUR)}においてアンチコドン 1 文字目 (U) のタウリン修飾が欠損していることを発見した (Yasukawa, Ohta, et al. *JBC* 275, 2000)。このタウリン修飾は翻訳におけるコドン認識に重要な役割を果たし、MELAS ではタウリン修飾欠損の結果、蛋白質合成障害が惹起されることから、その基本病態を RNA 修飾異常症であると提唱した (Yasukawa, Ohta, et al. *EMBO J* 20, 2001)。さらに MELAS モデル培養細胞にタウリンを添加するとミトコンドリア機能が改善する。こうした独創的な基礎研究に基づき、2 例の MELAS 患者にタウリン経口投与を行ったところ、反復していた脳卒中様発作が 9 年以上にわたって完全に抑制されている (Rikimaru, et al. *Intern Med* 51, 3351-3357, 2012)。これらの先行研究の結果から、MELAS は 1996 年のクリックが予言した tRNA アンチコドン 1 文字目の化学修飾 (Click, *J Mol Biol* 19, 1966) の欠損病態と考えられる。

タウリンは 1987 年にうっ血性心不全と高ビリルビン血症に対する保険適応が承認され、これまで重篤な副作用報告はなく安全性の高い薬剤と考えられる。厚生労働省ミトコンドリア病研究班のバックアップのもと、将来の国際標準治療を見据えたタウリン療法の医師主導治験のプロトコルを整備し、平成 25 年度から 1 年間の計画で治験を実施して有効性・安全性を評価し、薬事承認申請に取り組む。MELAS 脳卒中様発作の再発抑制治療の開発研究としては、分担研究者の古賀らによる L-アルギニン療法を除いては国内外で類似研究はない。

研究班全体として、①医師主導治験により MELAS 脳卒中様発作予防に対するタウリンの有効性の立証 (多施設共同・オープン・Phase III)、②MELAS 脳卒中様発作の新規バイオマーカーの開発 (モデル動物がいないため First-in man で検討する)、③タウリン有効投与量の確認、を目標とする。有効性が証明され、新規バイオマーカーが確認できれば国際標準化を見据えた PCT 出願

を目指す。

B. 研究方法

当該年度はタウリンの MELAS 脳卒中様発作に対する再発防止の薬事承認を目指す医師主導治験についてプロトコルを作成し PMDA の治験承認を受け、治験インフラを整備した。具体的方法と担当について以下に記載する。

①治験薬 (タウリン) 供与 (砂田) : 既に心不全と高ビリルビン血症を適応としてタウリン薬事承認をうけている企業 (大正製薬) と交渉し、治験薬提供・GMP に従った治験協力・終了後の薬事承認の申請について合意を得た。

②治験薬概要書作成 (砂田、太田) : 企業と協議し、心不全・高ビリルビン血症承認時の薬事データを収集した。さらにミトコンドリア病に対する非臨床試験成績に関しても、*in vitro*, *in vivo* ともに、POC データを収集して治験薬概要書を作成した。

③治験登録患者候補選定・実施医療機関選定 (砂田、大澤、後藤、古賀) : 厚生労働省ミトコンドリア病研究 (後藤) 班、日本神経学会、日本小児神経学会のバックアップを得て全国 MELAS アンケート調査を実施し、患者登録候補選定と実施医療機関選定の準備を行った。

④治験プロトコル・同意説明文書作成 : 医師が (砂田、大澤、萩原、村上) 治験プロトコル原案を作成し、次いで川崎医科大学の各部門 (薬剤部、中央検査部、中央放射線部、医事課、治験管理室、研究支援係、および購買部) の担当者からなる川崎医科大学医師主導治験ワーキンググループを立ち上げ、プロトコルの問題点を検討した。この検討をもとに書類の改訂作業を行った。

⑤PMDA 薬事戦略相談 (対面助言) (砂田、大澤、萩原) : 治験実施計画・症例報告書・同意説明文書・治験薬概要書・治験実施の科学的妥当性について書類一式をまとめ、PMDA 対面助言に臨み、問題点を PMDA 薬事戦略相談に提出し治験実施の承認を受けた。

⑥IRB 審査・患者登録 (砂田、後藤、古賀) : 患者同意説明文書を含む治験審査委員会申請書類を川崎医科大学及び治験実施医

療機関の治験審査委員会に申請して審査を受けた。承認後直ちに治験の概要についてUMIN治験webサイト（UMIN000011908：KN01のミトコンドリア脳筋症（MELAS）を対象とした多施設共同試験）にアップして公示した。治験参加候補患者への説明と同意を経て患者登録を実施した。

⑦薬効モニタリング（太田、西松）：検体（白血球）を用いたミトコンドリア遺伝子変異率（ヘテロプラスミー）測定、プライマー延長法によるtRNA^{Leu(UUR)}タウリン修飾率アッセイ、ウエスタンブロットによるLeu(UUR)アミノ酸含量が豊富なND6蛋白質量測定、血中ミトコンドリア障害マーカー測定（乳酸、ピルビン酸）について、それぞれ測定条件を設定し、被験者白血球による薬効判定の準備を行った。

⑧国際特許申請（太田、砂田）：本研究の基本特許となるタウリン特許（太田：登録番号5028639）から⑦で進歩性が得られればPCT出願を行うため、基本情報についての収集を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は2008年ソウル版ヘルシンキ宣言に準じ平成20年“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”及び平成23年版“医療における遺伝子検査・診断に関するガイドライン”を遵守する。さらに、本治験は、平成24年3月発令の「臨床研究・治験活性化5ヶ年計画」に基づいた医師主導治験である。

バイオモニタリングのため採取された血液のタウリン修飾についての個人情報には匿名化され計画全体の個人情報管理者である研究分担者：川崎医科大学神経内科学村上龍文が管理する。本研究の結果は学会発表・論文発表される場合があるが、個人情報漏洩の防止について個人情報管理者を中心に行う。

タウリンは既に安全性が確認されている市販薬であり、オフラベル使用である本研究では対象者に対する直接の不利益はないものと予想される。しかし被験者について生じた健康被害の補償に対しては「臨床研究に関する倫理指針」の原則に準じて、日本医師会治験推進センターが締結した補償賠償責任保険を雛形として保険加入

し対応する。

また、以上の倫理的配慮について、対象者あるいは対象者が未成年の場合には両親などの代諾者に対して、研究の目的、研究の方法、研究に協力する際の利益・不利益、個人情報保護、研究結果発表、研究協力の任意性と撤回の自由、費用負担に関する事項、有害事象・健康被害の補償について詳細に記載した同意説明文書を準備し、説明して同意を得る。

以上の配慮を盛り込んだIRB申請書が各実施機関で承認され、それぞれの機関規定を遵守し遂行していく。

C. 研究結果

研究班全体としての研究成果

タウリンのMELAS脳卒中様発作に対する再発防止の薬事承認を目指す医師主導治験のプロトコルは、PMDAと各治験実施医療機関の承認を受け、平成26年1月までに10患者10施設で治験薬投与が開始された。

①治験薬（タウリン）の供与：既に心不全と高ビリルビン血症を適応としたタウリン薬事承認をうけている企業（大正製薬）とGMP基準に従った治験薬の提供・治験協力・終了後の薬事承認申請について合意した。平成25年6月からタウリンを治験薬（KN01）としてGMP基準で製造し、各治験実施医療機関に提供した。

②治験薬概要書作成：医師が大正製薬と協議し、心不全・高ビリルビン血症承認時の薬事データとMELASに対する非臨床試験成績のPOCデータを収集して治験薬概要書を作成した。PMDA事前審査（第一回：平成24年12月、第二回平成25年3月）では問題点は指摘されず、平成25年7月薬事戦略相談で治験承認を得た。

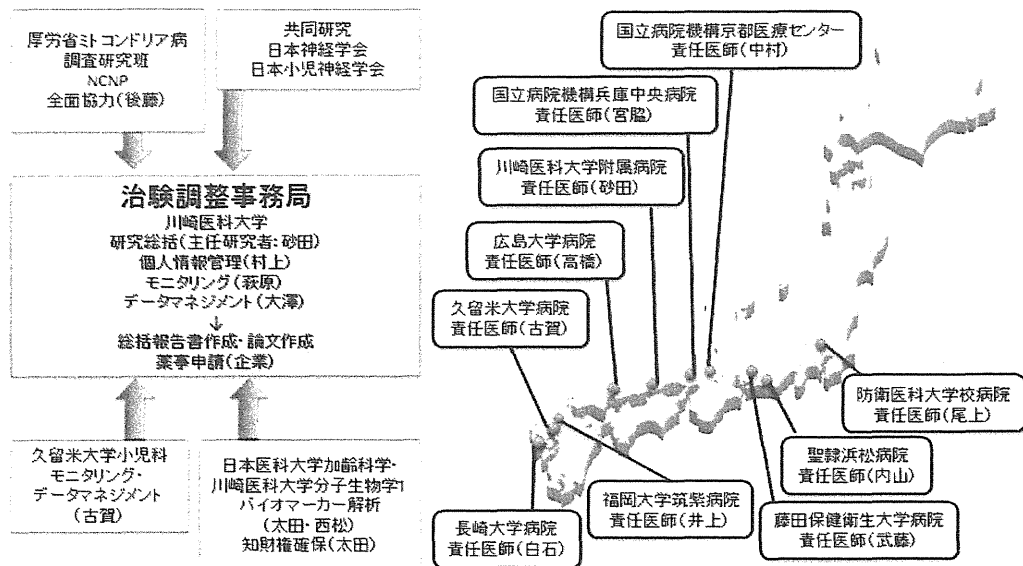
③治験登録患者候補選定・実施医療機関選定：治験患者登録を目的として、ミトコンドリア病研究（後藤）班のバックアップ（平成24年10月）により日本小児神経学会および日本神経学会の共同研究承認（平成25年1月）を受け、それぞれの専門医認定施設（合計911施設）の診療部長宛ての全国MELAS一次アンケート調査を実施した。これまで最大のMELAS患者：291名（小児科68名/神経内科223名）が集計され、このうち過去2年間に2回以上の脳卒中様

発作のあった脳卒中様発作反復患者数は83名(小児科33名/神経内科50名)で全MELAS患者数に占める比率は小児科が高率であった。二次調査は過去1年間で2回以上の脳卒中様発作があった症例28例(神経内科14例/小児科14例)を対象に実施し、アルギニン併用が多い実態が明らかとなった。三次調査は二次調査のうちプロトコルの基準をみたす登録候補症例とした。内訳はアルギニン非併用:2例;アルギニン併用例:11例、非併用例では、未回答例が1例、アルギニンウォッシュアウト見込み例が1例あり、全ての候補症例の平均発作回数は3.08回であった。最終的に、本治験のプロトコルを満たす患者がおり、かつ治験実施体制が整備されている医療機関10施設10患者を本治験に選定した。

④治験プロトコル・同意説明文書作成: 普

く、プロトコルの大枠について方針を改訂した。これに則して治験実施計画、同意説明文書、症例報告書、治験薬概要書、治験実施の科学的妥当性について記載した書類等の作成を行った。対面助言では、対象とする被験者について、目標被験者数について、用量について、脳卒中様発作の判定について(評価期間と脳卒中様発作の定義(=判定基準)について)、副次的評価項目について、等を主な相談事項とした。PMDAとのやり取りを踏まえて、プロトコルの主要な内容は以下のように決定した。本治験のデザインは多施設共同・オープン・Phase IIIで、目標症例は、過去1.5年間で2回以上かつ1年で1回以上の脳卒中様発作を反復したA3243G-及びT3291C-MELASの10症例とした(実施医療機関と役割分担図参照:次年度は各医療機関の治験責任医師を新たに研究分担者に追加)。タウリンは体

<研究体制と役割分担>



ロトコル作成ワーキンググループを立ち上げ、治験プロトコル原案を作成した。平成25年3月のPMDAの第二回事前面談で、アルギニン併用条件の必要性等について助言を受けた。これに対応するため、先行研究におけるタウリン血中濃度の再測定・再評価を行い、対象患者・症例数・投与量について検討し、プロトコルを改定した。また、改定プロトコルに準拠した患者同意説明文書を作成した。

⑤PMDA薬事戦略相談(対面助言): 第二回事前面談で指摘された問題点に対応すべ

重区分により規定された1日用量(例えば40kg以上では12g)を1日3回食後経口投与として、治験薬提供者(大正製薬)がGMP基準にて製造、提供し、投与期間1年とした。タウリンの脳卒中様発作再発防止の有効性については、主要評価項目を100%レスポンス率(発作完全抑制)とした。選択基準における脳卒中様発作の定義は、以下の①~⑥の発作時突発性局所神経徴候(①片麻痺あるいは単麻痺 ②皮質性感覚障害(感覚消去) ③皮質性視覚障害(閃輝暗点、皮質盲) ④失語 ⑤失行 ⑥失認)

のいずれかを有するものとし、頭部MRIの実施は問わない、とした。副次評価項目としては、ミトコンドリア病重症度スコア（JMDRS）、50%レスポonder率、特殊検査（血中・髄液の乳酸値、ピルビン酸値、乳酸/ピルビン酸比、タウリン値）、画像検査（頭部MRI検査）などについて解析することとした。安全性については自覚症状、他覚所見及び各検体検査を総合し、治験責任医師及び治験調整医師がタウリン自体の有害事象か判定することにした。6月14日薬事戦略相談（対面助言）を受け、7月に本治験についての承認を受けた。

⑥ IRB審査・UMIN治験登録・患者登録：PMDA薬事戦略相談でプロトコルが承認されたため患者同意説明文書を含むIRB関連書類一式を各治験実施医療機関の治験審査委員会に申請し審査を受けた（平成25年8月～12月）。承認後は直ちにプロトコルをUMINデータベースへ登録し公表

（UMIN000011908：KN01のミトコンドリア脳筋症（MELAS）を対象とした多施設共同試験）、治験登録候補の患者へ説明・同意を経て患者登録を実施（平成25年6月～12月）し、10施設10症例の登録が完了した。

⑦ 薬効モニタリングの条件設定：血清・白血球を用いたミトコンドリア遺伝子変異率、プライマー延長法によるtRNA^{Leu(UUR)}タウリン修飾率、ウエスタンブロットによるミトコンドリアのLeu(UUR)-rich蛋白質であるND6蛋白質量測定、血中尿中ミトコンドリア障害マーカーによる薬効判定アッセイについて正常ヒト対象者検体によって試行し、それぞれ条件設定を行った。治験前後の被験者検体で First-in man での解析を予定して進めている。

⑧ 治験実施・中間報告会：上記①～⑦のインフラ整備により、2014年1月までに10の治験実施医療機関で10症例の登録患者に治験薬タウリン投与を開始した。さらに、進捗状況報告および問題点抽出を目的とした治験中間報告会を2014年3月29日に開催した。

・研究分担項目の成果

砂田：治験薬供与交渉・治験薬概要書作成・治験登録患者候補選定と実施医療機関選定・治験プロトコル作成・IRB審査・患者登録・PMDA事前面談・

PMDA薬事戦略相談（対面助言）

後藤：治験登録患者候補選定・実施医療機関選定

古賀：プロトコル作成・治験登録患者候補選定・患者登録・実施医療機関選定

太田：治験薬概要書作成・薬効モニタリング準備・知財担当

萩原：治験プロトコル作成・PMDA事前面談・PMDA薬事戦略相談（対面助言）

西松：薬効モニタリング準備

村上：同意説明文書作成・ワーキンググループ立ち上げ・MRI撮影条件・画像データ管理・個人情報管理担当

大澤：治験プロトコル作成・PMDA事前面談・PMDA薬事戦略相談（対面助言）・IRB審査・治験登録患者候補選定と実施医療機関選定・薬効モニタリング準備

・研究目的の達成度

平成25年度の目標である治験インフラの整備は概ね当初計画したタイムテーブルに沿って進捗した。これにより平成26年1月末までに全登録患者に治験薬投与を開始することが可能となり、現在1年間の治験を実施中である。ここまでの成果については、2013年世界神経学会で研究代表者が発表し、「Poster Award：XXI World Congress of Neurology」を受賞した。希少難治性疾患MELASに対するユニークな病態介入療法の取組みとして国際的にも注目されているものと考えている。

達成できた目的・目標

治験実施体制の立ち上げ・治験薬供与体制の確立・治験薬概要書作成・治験プロトコルのPMDA承認 IRB承認・アンケート調査・患者登録・治験薬投与。

達成できなかった目的・目標

・国際特許取得

現時点では国際特許取得の申請はしていない。独自にアッセイ系を構築した患者血液白血球試料によるtRNA^{Leu(UUR)}タウリン修飾率・ND6蛋白質定量を、そのためのシーズ候補とする。tRNA^{Leu(UUR)}タウリン修飾と直結するこれらの項目について治験薬投与前後でFirst-in manで測定する。これらがバイオマーカーとして薬効評価

に有用であれば、獲得済みのタウリン特許（太田：登録番号5028639）に進歩性が得られたと判断できるためPCTを得て国際特許取得への展開をはかる。

D. 考察

本邦で遺伝子変異が発見され、疾患概念が確立した MELAS は、特定疾患に認定されている希少難病で、予後を決する脳卒中様発作の再発予防治療が待望されている。ところが、ミトコンドリア病に対し有効性が証明され保険適応を獲得した薬剤は世界的に皆無である（Pfeffer G, et al. *Treatment for mitochondrial disorders. Cochrane Database Syst Rev.* 2012;4:CD004426）。

一方、MELAS 患者の疫学・自然歴については、小規模なコホート研究に限られているのが現状である（Yasuga S, Koga Y, et al. *BBA* 1820:619-624, 2012）。今回、治験患者の登録の過程で明らかとなった本邦 MELAS および、その脳卒中様発作についての最新疫学調査では、これまでの報告と比較し最大症例数を集積することに成功した。このうち反復する脳卒中様発作患者の占める頻度については、小児科患者が神経内科患者を上回り、小児期発症 MELAS が成人発症 MELAS と比較して、より重症と考えられた。

また、正常ヒト対照の白血球および血清を用いた ND6 蛋白質の新たなバイオアッセイ系についてはごく最近になって、マウス C2C12 筋芽細胞が筋管細胞へ分化すると、ミトコンドリア呼吸鎖の Complex I, II, および III が培養上清に出現することが報告された（Forterre, et al. *PLoS One* 9, e84153, 2014）。正常ヒトの Complex I 構成蛋白質である ND6 蛋白質の流血中出現の分子機構と、その MELAS 病態での変動についての検討も興味深くバイオマーカーとして期待できる。

本研究によりタウリン療法の有効性と安全性が立証できれば、難病 MELAS の世界初の脳卒中様発作再発防止治療となると期待される。安価なアミノ酸製剤によって希少難病治療が可能となれば、国民の医療費と介護負担削減という厚生労働行政の課題解決の一翼を担える。

本研究は「臨床研究・治験活性化 5 ヶ年計画」の 3 大目標のうち、①迅速に国民に医薬品を届ける、②日本で疾患概念が確立し遺伝子変異が同定された稀少疾患 MELAS（Goto, et al. *Nature* 348, 1990）の tRNA 修飾異常症（Yasukawa, Ohta, et al. *EMBO J* 20, 2001）の修復治療（Rikimaru, et al. *Intern Med* 51, 2012）という独創的シーズの実用化、③市販後医薬品による最適治療法を見出すためのエビデンス構築、にいずれも合致する。日本の医療水準の向上ばかりでなく、日本発のシーズを国際標準治療として世界に発信できれば、厚生労働科学研究費補助金事業の卓越性をアピールできるものと考えられる。

E. 結論

MELAS 発症の基本病態がタウリンによる RNA 修飾異常症であるとする独創的研究から、本邦 MELAS の最新疫学調査を実施し、経口タウリン治療についての医師主導治験のインフラ整備を終了し、期間 1 年の治験を開始した。

F. 健康危険情報

現段階では治験調整事務局（川崎医科大学神経内科）に有害事象の報告・該当はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno SI, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H. Modeling Alzheimer's Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with

Intracellular A β and Differential Drug Responsiveness. *Cell Stem Cell* 12(4):487-496, 2013

Kawakami E, Kawai N, Kinouchi N, Mori H, Ohsawa Y, Ishimaru N, Sunada Y, Noji S, Tanaka E. Local Applications of Myostatin-siRNA with Atelocollagen Increase Skeletal Muscle Mass and Recovery of Muscle Function. *PLoS One* 8(5): e64719, 2013

Murakami T, Shimada Y, Imada Y, Nakamura A, Sunada Y. Vascular Endothelial Growth Factor Electro-Gene Therapy Improves Functional Outcome in a Mouse Model of ALS. *Immun., Endoc. & Metab. Agents in Med. Chem.* 2(13):107-111, 2013

Murakami T, Kutoku Y, Nishimura H, Hayashi M, Abe A, Hayasaka K, Sunada Y. Mild phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease type 4B1. *J Neurol Sci* 334(1-2):176-179, 2013

Goto M, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nishino I, Goto Y. MELAS phenotype associated with m.3302A>G mutation in mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene. *Brain Dev.* 36:180-182, 2014

Nojima A, Yamashita M, Yoshida Y, Shimizu I, Ichimiya H, Kamimura N, Kobayashi Y, Ohta S, Ishii N, Minamino T.: Haploinsufficiency of akt1 prolongs the lifespan of mice. *PLoS One.* 30;8(7):e69178, 2013

Lee H, Ohno M, Ohta S, Mikami T.: Regular moderate or intense exercise prevents depression-like behavior without change of hippocampal tryptophan

content in chronically tryptophan-deficient and stressed mice. *PLoS One.* 4;8(7):e66996, 2013

Yoritaka A, Takanashi M, Hirayama M, Nakahara T, Ohta S, Hattori N.: Pilot study of H₂ therapy in Parkinson's disease: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Mov Disord.* 28(6):836-9, 2013

Terada K, Misao S, Katase N, Nishimatsu S, Nohno T: Interaction of Wnt Signaling with BMP/Smad Signaling during the Transition from Cell Proliferation to Myogenic Differentiation in Mouse Myoblast-Derived Cells. *Int J Cell Biol.* 2013:616294. doi: 10.1155/2013/616294.

(著書)

砂田 芳秀: カルパインパチー (カルパイン3 異常症) 筋疾患診察ハンドブック. 中外医学社: 171-175, 2013

後藤 雄一: ミトコンドリア病, 2339 - 2342 (内科学、第10版、朝倉書店、東京) 2013

後藤 雄一: ミトコンドリア脳筋症. 疾患・症状別 今日の看護. 南江堂, 東京, 771-773, 2013

古賀 靖敏: ミトコンドリア脳筋症. 791-797 (今日の神経疾患治療指針第2版、医学書院, 東京)

(総説)

砂田 芳秀: 筋疾患の治療の進歩. 神経治療学. 30 (4): 427-430, 2013

後藤 雄一: ミトコンドリア病の診断と治療. 内分泌・糖尿病・代謝内科 37:481-486, 2013

古賀 靖敏: 希少難病: ミトコンドリア病の治療が可能となる時代に巡り合って (アルギ

ニン療法、ピルビン酸ナトリウム療法の開発).
(福岡県小児科医報 2013 年版 : 91-98、2013)

古賀 靖敏: ミトコンドリア脳筋症治療の
現況と展望. 日本臨床. 72 (1) : 175-
184, 2014

2. 学会発表 (国際学会)

Sunada Y, Rikimaru M, Ohsawa Y, Murakami
T, Nishimatsu S, Hagiwara H, Ohta S
「Taurine ameliorates mitochondrial
dysfunction and prevents stroke-like
episodes in patients with MELAS」XXIth
World Congress Of Neurology
2013. 9. 22-26 Vienna, Austria
European Federation Of
Neurological Societies (EFNS) より
「Poster Award」受賞

Ohsawa Y, Nishimatsu S, Fujino M,
Hagiwara H, Hinohara A, Sunada Y.
Inverse regulation of myogenesis and
adipogenesis by caveolin-3 through
type I TGF- β type I receptor kinase.
EMBO workshop. Molecular mechanisms of
muscle growth and wasting in health and
disease. Ascona, Switzerland, Sep
15-21, 2013.

Ohta S: Multi functional molecular
hydrogen acting as an anti oxidant, anti
inflammation and energy metabolism-
Stimulator. The International
Conference and Exhibition on
Biochemical & Molecular
Engineering Texas USA 2013. 10. 7-9

Ohta S: Molecular Hydrogen has
Potential for Preventive and
Therapeutic Applications for
Neurological Diseases. International
Drug Discovery Science & Technology,
Therapy and EXPO Hainan International
Convention and Exhibition Center,
MolMed Part of WGC China 2013. 11. 15.

Ohta S: Molecular Hydrogen is an
Efficient Antioxidant Accompanied with
Anti-inflammatory and Energy
Metabolism-enhancing Roles.
International Drug Discovery Science &
Technology, Therapy and EXPO Hainan
International Convention and
Exhibition Center, IDDST Part of WGC
China 2013. 11. 15.

(国内学会)

砂田 芳秀「タウリンは MELAS の脳卒中様
発作を防止する: 医師主導治験への取り
組み」第 54 回日本神経学会学術大会
2013 年 5 月 31 日 東京

砂田 芳秀「筋疾患に対するマイオスタチン
抗体療法の開発と応用」第 18 回日本神経感
染症学会総会学術集会 2013 年 10 月 11 日
宮崎

砂田 芳秀「タウリン経口投与は MELAS 脳卒
中様発作を抑制する: 医師主導治験の取り
組み」第 31 回日本神経治療学会総会 2013
年 11 月 22 日 東京

根岸 豊、服部 文子、竹下 絵里、安藤 直
樹、伊藤 哲也、後藤 雄一、齋藤 伸治「ミ
トコンドリア DNA3697G>A ホモプラスミー
変異を認めた Leigh 脳症の 3 同胞例」第
58 回日本人類遺伝学会大会 2013 年 11
月 23 日 仙台

三宅 紀子、矢野 正三、後藤 雄一、松本
直通「UQCR2 ホモ接合性変異による新規ミ
トコンドリア呼吸鎖複合体 III 欠損症」第
58 回日本人類遺伝学会大会 2013 年 11
月 23 日 仙台

竹下 絵里、三牧 正和、吉田 寿美子、西
野 一三、後藤 雄一「Leigh 脳症 64 例に
おける原因遺伝子の検討」第 58 回日本人
類遺伝学会大会 2013 年 11 月 23 日 仙台

太田 成男「ミトコンドリア最新データに
みる老化との関係」抗加齢医学会 2013

年 4 月 21 日 大阪

太田 成男「ミトコンドリア機能と老化・疾患制御」第 13 回抗加齢医学会総会
2013 年 6 月 28 日 横浜

太田 成男「細胞は若返るー 人体の不思議をミトコンドリアが解き明かすー」
JASIS2013 2013 年 9 月 5 日 千葉

太田 成男「水素医学の展開：基礎医学から臨床実施へ」第 41 回日本救急医学会総会
2013 年 10 月 21 日 東京

太田 成男「水素療法の神経系疾患に対する効果：基礎医学から治療および予防への臨床適用へ向かって」第 31 回日本神経治療学会総会
2013 年 11 月 22 日 東京

太田 成男「老化と若返りにおけるミトコンドリアの役割：アンチエイジングに必要な体内エネルギー」日本運動指導士会
2013 年 11 月 23 日 岡山

太田 成男「ミトコンドリアの基礎と臨床」第 9 回キレーションセミナー
2013 年 11 月 24 日 東京

太田 成男「ミトコンドリアと生物活性物質との相互作用」京都-NPO 法人国際医科学研究会第 7 回フォーラム
2013 年 12 月 1 日 京都

萩原 宏毅，斉藤 史明，真先 敏弘，清水 輝夫，松村 喜一郎，園生 雅弘．レスベラトロールの先天性筋ジストロフィーモデルマウスに対する効果の検討．第 54 回日本神経学会学術大会．東京，5. 31，2013

村上 龍文、三五 一憲、渡部 和彦、大澤 裕、李 正花、山村 研一、砂田 芳秀 「ヒト異型トランスサイレチン遺伝子を発現する不死化シュワン培養細胞の確立」第 54 回日本神経学会学術大会
2013 年 5 月 30 日 東京

村上 龍文、久徳 弓子、西村 広健、林 真貴子、阿部 暁子、早坂 清、砂田 芳秀
「軽度の表現型を呈した Charcot-Marie

-Tooth 4B1 の検討」第 24 回日本末梢神経学会学術集会
2013 年 8 月 23 日 新潟

大澤 裕「TGF-beta シグナル制御による筋消耗性疾患治療法の開発」第 54 回日本神経学会学術大会
2013 年 5 月 31 日 東京
大澤 裕「TGF-beta 阻害低分子医薬による筋消耗性疾患とメタボリック症候群の治療戦略」第 31 回日本神経治療学会総会
2013 年 11 月 22 日 東京

Nishimatsu S，Hino J，Kangawa K，Matsuo H，Nohno T．「Differentiation and morphogenesis controlled by proprotein convertase PCSK5」第 36 回（平成 13 年度）日本分子生物学会
2013 年 12 月 4 日 神戸

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

**KN01 のミトコンドリア脳筋症(MELAS)
を対象とした多施設共同試験**

治験実施計画書

(抜粋)

**治験調整医師
川崎医科大学 神経内科学**

砂田 芳秀

作成年月日:2013年12月5日
治験計画書番号:KN01-MELAS-01
版番号:第2.0版

1. 治験実施計画書の要約

治験課題名	KN01 のミトコンドリア脳筋症 (MELAS) を対象とした多施設共同試験
目的	MELAS 患者における脳卒中様発作の再発抑制治療としてタウリン療法を実施し、その有効性と安全性を検証する。
対象	下記の選択基準をすべて満たし、除外基準に抵触しない患者
選択基準	<p>(1) 臨床所見、筋病理検査、並びに遺伝子検査により、MELAS の診断基準に照らし合わせて、総合的に MELAS と確定診断されている患者</p> <p>(2) ミトコンドリア DNA に A3243G、T3271C、G3244A、T3258C、T3291C のいずれかの点変異を有する患者</p> <p>(3) 同意取得時の年齢、性別、入院・外来は不問</p> <p>(4) 同意取得前 78 週間にアルギニンを使用していない患者、または、使用している場合は同意取得前 26 週間以上継続している患者</p> <p>(5) 同意取得前の脳卒中様発作*回数が次のいずれかを満たす患者</p> <p>①アルギニンを使用していない患者は、同意取得前 78 週間で 2 回以上、かつ同意取得前 52 週間に 1 回以上の脳卒中様発作のある患者 (アルギニン非併用例)</p> <p>②アルギニンを使用している患者は、アルギニン使用期間に応じて次のいずれかを満たす患者 (アルギニン併用例)</p> <p>(i)アルギニン使用期間が 78 週以内の場合、その使用期間で 2 回以上、かつ同意取得前 52 週間に 1 回以上の脳卒中様発作のある患者</p> <p>(ii)アルギニン使用期間が 78 週を超える場合、同意取得前 78 週間で 2 回以上、かつ同意取得前 52 週間に 1 回以上の脳卒中様発作のある患者</p> <p>*選択基準における脳卒中様発作の定義は、以下の①～⑥の発作時突発性局所神経徴候のいずれかを有するものとし、頭部 MRI の実施は問わない。</p> <p>①片麻痺あるいは単麻痺</p> <p>②皮質性感覚障害 (感覚消去)</p> <p>③皮質性視覚障害 (閃輝暗点、皮質盲)</p> <p>④失語</p> <p>⑤失行</p> <p>⑥失認</p> <p>(6) 過去にタウリン経口製剤で治療されたことのない患者</p> <p>(7) 脳卒中様発作の臨床所見の判定が可能な患者</p>

	(8) 本治験の参加に対し、事前に患者本人から文書による同意が得られた者（未成年の場合は、代諾者から文書同意、患者本人から文書によるアセントが得られた者）										
除外基準	(1) ペースメーカー植え込み等で頭部 MRI 検査が実施できない患者 (2) 痙攣重積及び重度の昏睡を有する患者 (3) 認知症、寝たきり等の状態にあり、意思の疎通が不可能な患者 (4) 敗血症を合併している患者 (5) 重篤な心機能、肝機能、腎機能障害を有する患者 (6) 長期間（2 週間以上）のステロイドの全身投与が必要な患者 (7) 同意取得前 12 週以内にピルビン酸を使用した患者 (8) 妊娠中、授乳中又は妊娠している可能性のある患者 (9) 治験薬の成分に過敏症の既往歴を有する患者 (10) 薬物アレルギーの既往歴を有する患者 (11) 同意取得前 12 週以内に、他の治験に参加した患者 (12) その他、治験責任医師又は治験分担医師が対象として不適格と判断した患者										
目標症例数	15 例（アルギニン非併用例 5 例、アルギニン併用例 10 例）										
治験薬	(1) 治験薬コード：KN01 (2) 一般名：タウリン (3) 成分含量及び剤型：1.02g 中 タウリン 1g 含有、散剤										
投与量及び投与方法	次の体重区分により規定された 1 日用量を 1 日 3 回食後に経口投与する。 <table border="1" data-bbox="608 1234 1076 1473"> <thead> <tr> <th>体重*</th> <th>1 日量</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>40kg 以上</td> <td>12g</td> </tr> <tr> <td>25kg 以上 40kg 未満</td> <td>9g</td> </tr> <tr> <td>15kg 以上 25kg 未満</td> <td>6g</td> </tr> <tr> <td>15kg 未満</td> <td>3g</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">* 前観察期間の体重</p>	体重*	1 日量	40kg 以上	12g	25kg 以上 40kg 未満	9g	15kg 以上 25kg 未満	6g	15kg 未満	3g
体重*	1 日量										
40kg 以上	12g										
25kg 以上 40kg 未満	9g										
15kg 以上 25kg 未満	6g										
15kg 未満	3g										
投与期間	52 週間										
併用禁止薬 併用禁止療法	①ピルビン酸、②2 週間以上のステロイドの全身療法、③アルギニン経口製剤（治験開始時にアルギニン経口製剤を服用していない患者）										
併用可能薬	治験責任医師又は治験分担医師が必要と判断した薬剤は使用可能とする。ただし、使用した薬剤については、薬剤名、用法・用量、投与期間及び併用理由を症例報告書に記載する。 ・救急処置薬剤：制限なし（アルギニン静注製剤を含む） ・治験期間中、可能な限り用法・用量を変更せずに使用可能な薬剤 硝酸薬、NO 供与作用を有する血管拡張薬、コエンザイム Q、抗てん										

	<p>かん薬（治験開始まで継続して服用していた場合）</p> <p>アルギニン経口製剤（同意取得 26 週以上前から服用していた場合）</p>
観察、検査及び調査項目	<p>(1) 臨床症状（脳卒中様発作回数、ミトコンドリア病の重症度スコア）</p> <p>(2) 理学検査（体重、体温、血圧、脈拍数）</p> <p>(3) 血液検査（血液学的検査、生化学検査）</p> <p>(4) 特殊検査</p> <p>血液検査：血中乳酸（除蛋白）、血中ピルビン酸（除蛋白）、 血中アミノ酸分析（39 種）</p> <p>髄液検査 [任意検査]： 髄液乳酸（除蛋白）、髄液ピルビン酸（除蛋白）、 髄液アミノ酸分析（39 種）</p> <p>血中白血球検査 [任意検査]： ミトコンドリア遺伝子変異率、 tRNA^{leu(UUR)}タウリン修飾率、ND6 蛋白質質量</p> <p>(5) 画像検査（頭部 MRI）</p> <p>(6) MMSE (Mini-Mental State Examination)スコア</p>
評価項目	<p>1. 有効性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 主要評価項目：評価期間（治験薬投与開始 9 週以降投与終了まで）における脳卒中様発作回数が 0 回だった症例（100%レスポonder）の割合 ・ 副次評価項目： <p>(1)ミトコンドリア病の重症度スコア Japanese Mitochondrial Disease Rating Scale (JMDRS)</p> <p>(2) 50%レスポonder率</p> <p>(3) MELAS ストローク判定基準のうち発作時突発性局所神経徴候（頭部 MRI 拡散強調像での高信号の確認を問わない）の発現回数</p> <p>(4) 特殊検査（血中・髄液の乳酸値、ピルビン酸値、乳酸/ピルビン酸比、タウリン値）</p> <p>(5) 画像検査（頭部 MRI 検査）</p> <p>(6) 治験薬投与前後のアルギニン静注製剤が使用された回数</p> <p>(7) 頭痛、嘔気・嘔吐、痙攣及び意識障害が発現した際に頭部 MRI を実施した場合の高信号の確認回数</p> <p>2. 安全性</p> <p>有害事象、副作用</p>
治験期間	2013 年 9 月～2014 年 12 月

Ⅱ. 分 担 研 究 報 告

「ミトコンドリア脳筋症 MELAS の脳卒中様発作に対するタウリン療法の開発」

研究分担者 砂田 芳秀 川崎医科大学 神経内科学・教授

研究要旨

ミトコンドリア病 MELAS はミトコンドリア DNA の tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子領域の点変異によって発症する。変異 tRNA^{Leu(UUR)} のアンチコドンで、正常で認められるタウリン修飾が欠損し、一方、タウリン大量投与によって MELAS モデル細胞におけるミトコンドリア機能異常が改善し、2 名の MELAS 患者の脳卒中様発作が 10 年以上抑制された。この先行臨床試験の結果をもとに、2012 年 10 月から 2 年余でタウリン経口投与による MELAS 脳卒中様発作の再発予防効果を証明し薬事承認獲得を目指す本研究を実施している。研究分担者として、ここでは中核医療機関である川崎医科大学の治験インフラ整備と 1 名の患者登録について記載する。

A. 研究目的

MELAS は、本邦でミトコンドリア DNA の tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子領域の点変異 (A3243G) を同定し (Goto Y, et al. *Nature* 348, 651-651, 1990)、変異 tRNA^{Leu(UUR)} のアンチコドンのタウリン修飾欠損が発見された (Yasukawa T, Ohta S, et al. *JBC* 275, 4251-4257, 2000) 希少難病である。われわれと研究分担者太田らとの共同研究により、タウリン大量投与によってモデル細胞のミトコンドリア機能異常が是正され、2 名の MELAS 患者の脳卒中様発作が 9 年以上抑制されることを報告した (Rikimaru M, et al. *Intern Med* 51, 3351-3357, 2012)。

本治験は、これらの先行研究を基盤にタウリン治療を日本発のシーズと考え、新たに MELAS 患者の脳卒中様発作の再発予防効果を証明し薬事承認の獲得を目標とする治験である。本年度は研究分担者として中核医療機関である川崎医科大学の治験インフラ整備と 1 名の患者登録を目指した。

B. 研究方法

タウリン経口投与による MELAS の脳卒中様発作に対する再発防止の薬事承認を目指す医師主導治験について、まず川崎医科大学の各部門と連携し治験体制を構築した。これらの担当者の協力によって医師主導治験のプロトコルおよび関連書類を作成し PMDA 薬事戦略相談を受けた。次いで川崎医科大

学の治験審査委員会 (IRB) の承認を受け、治験計画届を提出した。併せて企業からの治験薬提供により、川崎医科大学の登録患者 1 名に治験薬投与を開始した。

C. 研究結果

①川崎医科大学医師主導治験体制の構築：治験調整医師として神経内科に治験調整事務局を設置し、開発治験業務受託機関 (CTD 社) と治験管理室と連携し、治験実施体制を構築した (図 1 参照)。次に、医師およびバイオマーカー担当研究者 (砂田、村上、大澤、西松、萩原) と川崎医科大学の各部門 (薬剤部、中央検査部、中央放射線部、医事課、研究支援係、および購買部) の担当者からなる川崎医科大学医師主導治験ワーキンググループを立ち上げた。

②治験関連書類の作成 (プロトコル・同意説明文書・治験薬概要書、各種仕様書等)：医師 (砂田、大澤、萩原) がプロトコル等の治験書類の原案を作成し、ワーキンググループのうち薬剤部とは GMP 基準治験薬の仕様と管理、中央検査部とは血液試料の取り扱いと管理、中央放射線部とは MRI 撮影条件、医事課とは医療保険と治験会計について、それぞれ問題点を抽出し検討した。これを基盤として医師が書類の校正作業を行った。さらに、開発治験業務受託会社 (CTD 社) と治験管理室の協力を得て各種仕様書などの治験関連書類をまとめた。

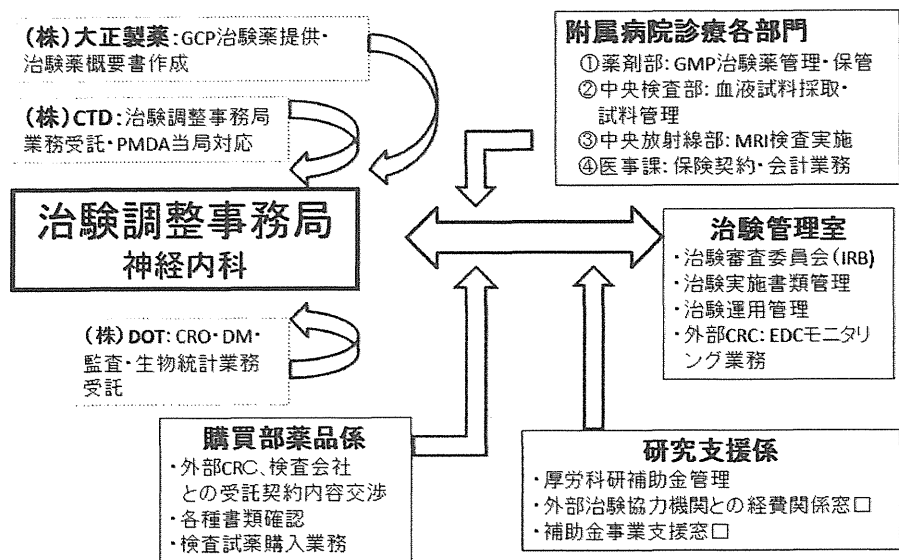


図1. 川崎医科大学治験実施体制

③行政当局（PMDA）対応：治験実施にあたり克服すべき問題点をPMDAに提示した事前面談で、プロトコルの大枠について方針が定まった。次いで治験実施計画・症例報告書・同意説明文書・治験薬概要書・治験実施の科学的妥当性について記載した書類の改訂作業を進め平成25年7月に本治験について承認を受けた（研究分担者萩原の稿参照）。

④IRB 審査：患者同意説明文書を含む書類一式を川崎医科大学の治験審査委員会（IRB）に申請し平成25年8月に承認を受けた。この医師主導治験について直ちに計画をweb上で公表（UMIN000011908：KN01のミトコンドリア脳筋症（MELAS）を対象とした多施設共同試験）した。他施設でも並行しIRB承認を受けて、多施設共同・オープン・Phase III 医師主導治験として平成25年9月に厚生労働大臣に治験計画届を提出した。

⑤患者登録・治験薬投与：MELAS 全国アンケート調査を行った（分担研究者大澤の稿参照）。治験参加患者への説明・同意を経て、まず川崎医科大学の1患者を平成25年9月に登録した。治験薬タウリンは提供者（大正製薬）がGMP基準にて製造し平成25年10月から、まず川崎医科大学で経口投与治験を開始した。

⑥治験実施：治験調整事務局と開発治験業務受託機関（CTD社）が中心となって、まず治験専用web構築を行い、安全性情報を中心とした情報共有システムとスケジュール管

理システムを構築した。次いで、本治験のための川崎医科大学の治験管理室に外部CRCを雇用した。同時にモニタ、データマネージメント、およびEDCシステムを受託機関会社DOT社に受託し、作成した。生物統計については名古屋大学平川晃弘博士と連携し解析している。

⑦バイオマーカー・知財権：First-in manで独自にアッセイ系を構築中の患者血液白血球試料によるミトコンドリアDNA遺伝子変異率・tRNA^{Leu(LUR)}タウリン修飾率・ND6蛋白質定量をその候補とする。tRNA^{Leu(LUR)}タウリン修飾と直結するこれらの項目について治験薬投与前後で測定する。これらがバイオマーカーとして薬効評価に有用であれば、すでに獲得済みのタウリン特許（太田：登録番号5028639）に進歩性が得られたと判断し、PCTを得て国際特許取得への展開をはかる。

（倫理面への配慮）

本治験は、ヒトゲノム遺伝子解析研究・介入研究（侵襲なし）に相当し、2008年版ソウル版ヘルシンキ宣言に基づく”ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”を遵守して施行する。

D. 考察

川崎医科大学は、これまでに医師主導治験の中核医療機関となった経験がなく、院内CRCもいなかった。したがって、ほとんどゼロの状態から手探りで準備を進めて行か