

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 (アルギニン療法、ピルビン酸ナトリウム療法の開発)

久留米大学医学部・小児科・教授
古賀 靖敏

トピックス

“ミトコンドリア病など治るはずがない”。私が医師になった時代、大学病院の小児病棟には、常時2-3名のミトコンドリア病の患者が入院していた。腹膜透析、血液透析、人工呼吸器などを用いて、どんなに頑張っても、脳梗塞、心不全、腎不全、肝不全などから多臓器不全となり、ついには敗血症を合併して多くの患者が亡くなっていった。当時のミトコンドリア病は、まさしく不治の病であり“ミトコンドリア病など治るはずがない”という印象であった。その頃から考えると、治療効果がある薬物療法を世界に先駆けて開発、2年間の治験を経てその有効性を検証、新たな治療法として世界に発信できた事は、生まれてきてこの時に巡り合えた事、このような仕事に携われた事にただ感謝である。今まで指導して頂いた多くの諸先輩、国内および海外留学中にお世話になった指導教授・同僚、現在の治験体制を共に支えて頂いているメンバーにこの場を借りて心から感謝したい。

希少難病であり遺伝病であるミトコンドリア病の根本治療は、ミトコンドリア機能障害を正常化する事である。しかし、医学研究が進んだ今日においても、本症を治療適応として承認された薬剤は世界に存在しない。私がこのミトコンドリア病の分子病態解明、治療法開発をライフワークとして取り上げ、早くも30年が経過した。このトピックスでは、私が今まで行ってきた研究につき、日本で開発中の治療薬2剤を中心に紹介する。

1. 希少難病に対する治療薬開発の難しさ

日本には、1) 希少性 (患者数5万人未満)、2) 原因不明、3) 治療方法未確立、4) 生活面への長期の支障の4要素を満たす疾患から選定された原因究明を主とする研究班が130疾患、また、これら4要素の臨床調査研究分野に含まれず疾患の実態すら明らかでない疾患が214疾患存在する。これら難病の克服研究事業に、平成24年度は162もの難治疾患研究事業が班研究として採択され実働している。しかしながら、治療薬開発に至るチャンスは、今なお稀である。希少疾病の治療薬開発

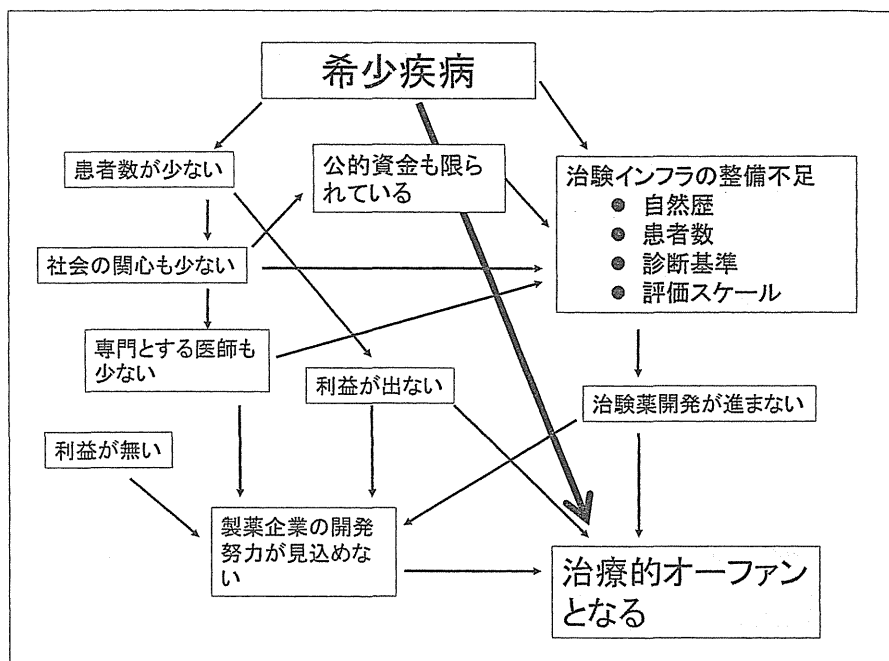


図1 希少難病治療薬開発における諸問題
 希少疾病（オーファン病）は、日本で患者数5万人未満の疾患と定義され、その多くは治療法の開発が進んでいない希少難病でもある。この治療法開発には、製薬企業の参入も見込めず、その開発の多くは大学機関の限られた研究者に委ねられており、平成24年から新たに始まった医療イノベーション5か年計画の重点領域にもなっている。

に関わる諸問題を図1に示す。

2. MELASに合併する血管内皮機能障害に対するL-アルギニン療法の開発研究

希少難病であるミトコンドリア脳筋症で最も頻度の多い病型が、40歳以前に脳卒中様発作を来すMELAS(mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes)である。本症の80%にミトコンドリアDNAの点変異(tRNA^{Leu}(UUR)のA3243G変異)があり、その結果、電子伝達系酵素の低下¹⁾、RNA19の蓄積²⁾、タウリン修飾の異常などのメカニズムによる細胞障害の機序が見出された。MELASによる脳卒中様発作の特徴は、血管支配に一致しない梗塞領域で、梗塞部位は時間的・空間的に進展もしくは消失する。最終的には梗塞部位は萎縮し、脳血管性認知症となる。小児型MELASは、平均発症9歳、平均死亡15歳と非常

に重篤な疾患である事が我々の5年間のコホート研究で明らかになった³⁾。従来、MELASの生検筋では、典型的な赤ボロ線維(ragged-red fiber)がみられ、その部位には電子顕微鏡で異常形態を示すミトコンドリアの集積が診られる。一方、筋内の微小動脈血管壁や剖検脳動脈においても、血管内皮細胞層および中膜平滑筋層にも同様の所見が確認され、ミトコンドリア血管障害mitochondrial angiopathyとして報告された。しかしながら、どうして脳卒中様発作が起こるのか、その分子病態は長い間解らなかつた。私は、ミトコンドリア血管障害の分子病態を明らかにし、治療法を開発する目的で以下の研究を行った。

まず、患者における血管内皮機能に関わる種々の因子を検討した。一酸化窒素依存性の動脈拡張のメカニズムを図2に示す。血管拡張の生理機能でNO産生に影響するアルギニン、シトルリン、NO_x、およびcGMPについて、MELAS患者の脳

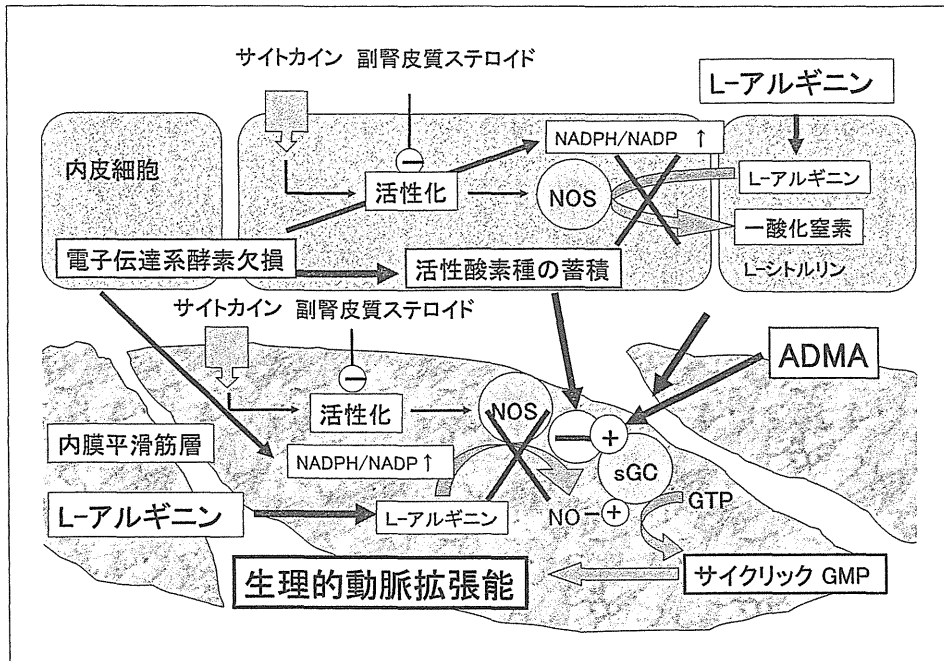


図2 一酸化窒素依存性の動脈拡張のメカニズム
アルギニンの効果発現のスキームを示す。

卒中様発作急性期と寛解期、および年齢性別を一致させた対照群の3群で比較検討した。その結果、患者では、脳卒中様発作急性期は、アルギニンおよびその生成物であるNO_xおよびシトルリン、cGMPの有意な低下がある事を見出した⁴⁾。そこで、脳卒中様発作急性期にアルギニンを静注すると、脳卒中様発作による急性期症状が速やかに改善することを報告した⁴⁻⁵⁾。また、MELAS患者でNO依存性動脈拡張能の低下を直接検証するために、FMD(flow-mediated dilatation)検査を行った。その結果、MELAS患者では、例外なく血管内皮機能が著しく低下している事を証明した⁶⁾。この有効な治療法を全国どこでも使えるようにするためには、薬事法に基づく治験を行わなければならない。しかしながら、この治療の有効性を初めて論文化した2002年当時、ミトコンドリア病に対する治験インフラは全く整っていなかった。治療薬を開発するには、1)患者数(疫学統計データ)、2)診断基準、3)自然歴、4)重症度の指標、5)概念実証(proof of concept)、6)研究資金などのインフラ整備が必要であったが、

そのすべてが存在しなかった。そこで、厚生労働省の難治疾患研究事業として2002年に班会議を立ち上げた(図3)。3年間の班研究で、MELASに対するL-アルギニンの有効性を検証するための治験インフラの整備を完了した。その後、2005年に日本医師会治験促進センターの研究採択を受けて、2年間の医師主導治験を実施した。医薬品医療機器総合機構(PMDA)の治験前相談では、レスキュープロトコルを含めた二重盲検プラセボ対照比較試験を提出した。しかし、実際、治験を実施する段階になって、「これだけ効果があると報告されているのであれば、プラセボ対照比較試験は認められない」と、各治験実施施設のIRB承認が得られず、やむなくプロトコルを改訂しオープン試験とせざるを得なかった。選択基準は、先に班会議で策定したMELASの診断基準を満たすものとした。また、脳卒中様発作発現の必須症状とした頭痛・嘔吐症状がない成人例の存在も報告され、それまで想定していなかった発作形態がある事も治験研究を通して明らかになった。脳卒中様発作の急性期を対象とした試験は過去に例が

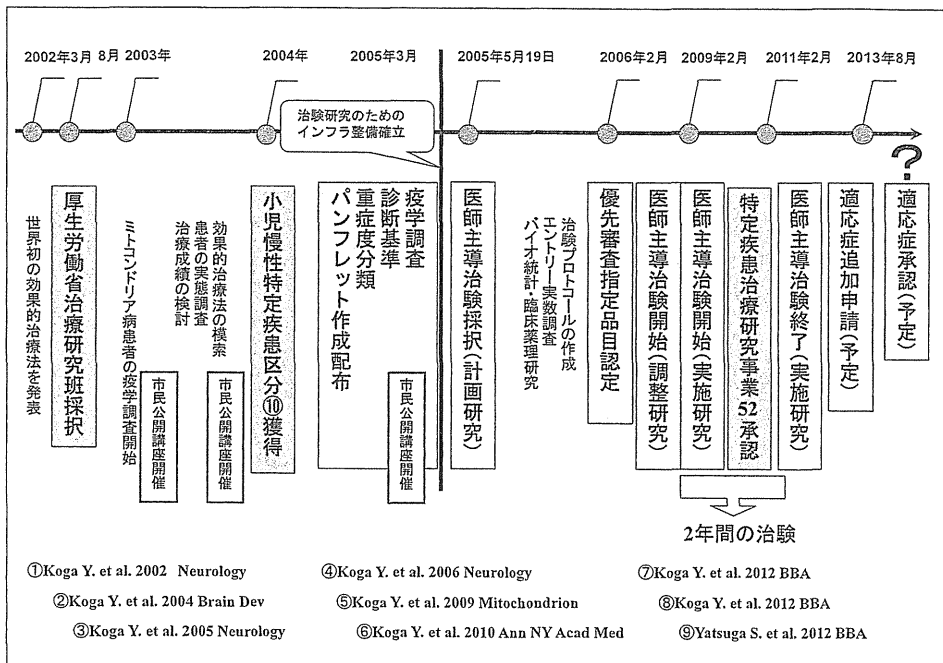


図3 難病 MELAS に対する L-アルギニン治療の治験研究の取り組み
希少難病 MELAS の治療薬開発に関する年表

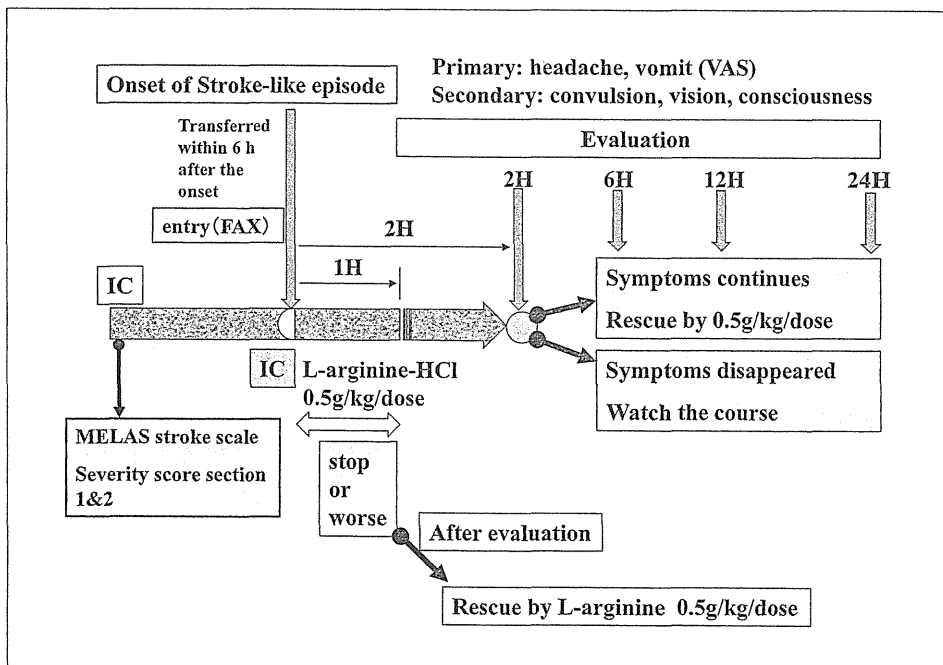


図4 静注試験のダイアグラム
急性期の静注試験のダイアグラムを示す。前もって同意取得した診断基準を満たした MELAS 患者で、頭痛および嘔吐に加えて視野異常や痙攣を発現した時を脳卒中様発作のオンセットとした。オンセット後6時間以内に協力病院に搬入された場合、再度同意説明を行い、治験に入る。L-アルギニン・HCl 10% 溶液 (アルギU注®) で 5ml/kg/hr (0.5g/kg) を1時間かけて静注投与する。その後、2、6、12、24時間での症状の改善を検証した。治験期間は、2009年5月9日から2011年6月30日。

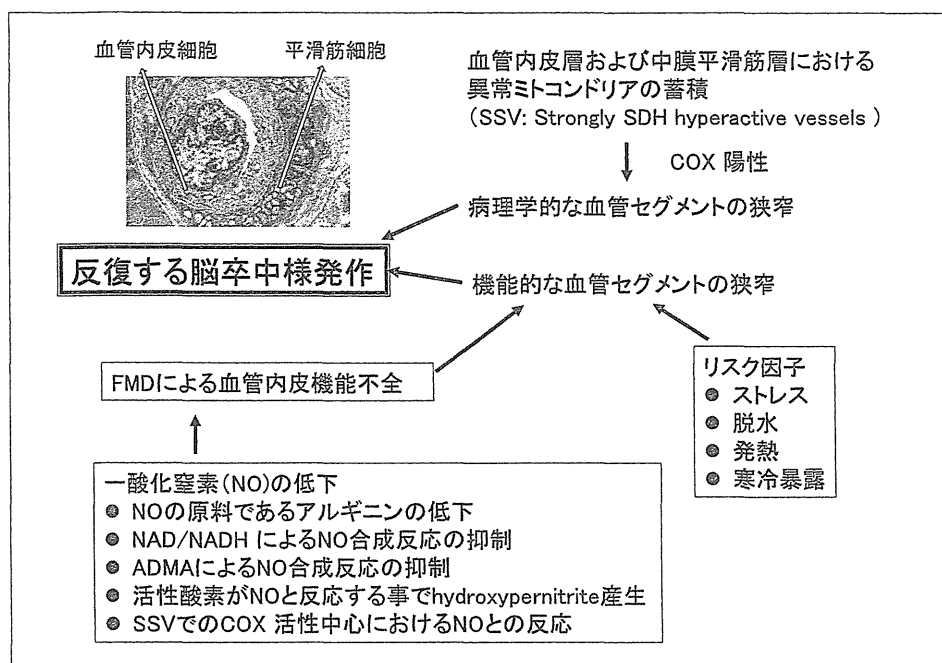


図5 MELASの脳卒中様発作の病態 (文献7)

MELASでは、血管内皮層および中膜平滑筋層における異常ミトコンドリアの蓄積がSSVとして報告され、病理学的な血管セグメントの狭窄が存在する。また、脳卒中様発作時にはNOの基質であるアルギニンの低下、レドックス状態が酸化型に傾く事でNAD/NADHによるNO合成反応の抑制、活性酸素蓄積によるNOの減衰などが相まって、血管内皮依存性動脈拡張力の低下として働く。

なく、主要・二次評価項目の設定は、自主研究での評価方法を踏襲した。2008年6月2日に治験申請を提出し、2011年9月30日に2年間の治験を終了した。脳卒中様発作の急性期を対象とした治験のダイアグラムを図4に示す。最終的に18エピソード、15名での急性期治験が終了した。研究参加施設は、小児科10施設、神経内科6施設で、急性期の静注試験による症状改善効果、および発作寛解期の内服による発作予防および重症度の軽減効果を検証する2治験を実施した。2年間の治験により、脳卒中様発作の急性期に見られる頭痛、嘔吐、意識障害、視野の異常および痙攣は、静注試験にて明確な有効性が証明された。また、発作寛解期における内服試験により、発作の頻度を減らし、重症度の進行を抑える効果がある事を証明した。

この結果、MELASに対するL-アルギニンの有効性は以下の様な機序で効果を発現すると考えた(図5)⁷⁾。MELAS患者の脳内中小動脈の

中膜平滑筋細胞層および、血管内皮細胞層では、筋での赤ボロ線維 (ragged-red fiber) と同様に異常なミトコンドリアが集積し、セグメント的に内腔が狭窄している部分が病理学的に存在する。このセグメントを起点として何らかのリスク因子が加わる事で脳梗塞様虚血発作が起こると考えられる。また、MELASでは、上記に加えて機能的な狭窄が起こる。すなわち、脳卒中様発作では、NO産生の中心的役割を担うアルギニンの濃度低下により、NO産生が減少し、動脈が拡張不全になる。また、電子伝達系酵素欠損により、酸化ストレスや活性酸素物質が蓄積し、NOと反応しhydroxypemnitriteに変換されることでNO濃度が減衰する。また、もともと存在する電子伝達系酵素欠損により、redox potentialに異常を来し、NADPH過剰状態からNO合成酵素の反応を補酵素のレベルで抑制すると考えられる。さらには、相対的に増加したADMA (asymmetrical dimethylarginine) によりNO合成酵素活性がさ

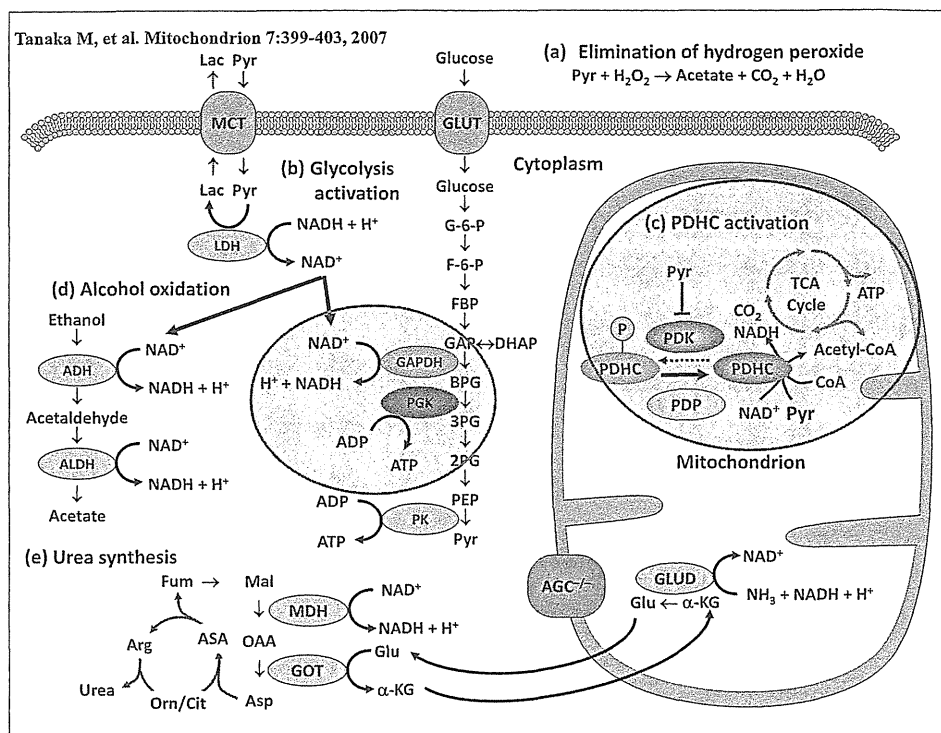


図6 ピルビン酸ナトリウムの作用機序 (文献8)

ピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDHC) を最大限に活性化させる働きの他に、レドックスステートを25以下に温存し、解糖系でのATP合成をレストアする働きがある。以上の根拠から、ミトコンドリア病に合併するL/P比が25.6以上になるような重篤な代謝性アシドーシス状態でも、細胞内呼吸の不全に起因するアポトーシスを予防し、中枢神経系細胞の脱落変性を防ぐと考えられる。

らに低下し、結果的には血管内皮機能不全に陥る。脳卒中様発作急性期症状に対するL-アルギニンの効果は、脳血管内皮細胞におけるeNOSのNO産生量を増加させてcGMP濃度を上げることにより脳の中小動脈の正常な血管生理機能を回復させ、虚血部位における血流を改善させることにより発現すると思われる。MELAS患者に対するL-アルギニン投与は、MELAS患者の卒中様発作急性期だけでなく、発作間歇期の予防にも極めて有効な治療法と考えられる。脳卒中様発作急性期には、L-アルギニン・HCl 10%溶液 (アルギU注[®]) で5 ml/kg/hr (0.5g/kg) を1時間かけて静注投与する。発作寛解期には、発作の予防および重症度の軽減目的に内服療法を行う。用法用量は、0.3-0.5g/kg/dayを分3で内服投与し、血漿中のL-アルギニンのトラフ値を150 μmol/L以上に維持する。頻回の脳卒中様発作をおこしている患者

では、上記投与量を一日4-6回に分けて服薬し、トラフ値が150 μmol/L以下にならない様に用法用量を調節する必要がある。日本人MELAS患者96名の5年間のコホート研究結果が明らかになり³⁾、アルギニン内服が、自然予後を改善できる事が2年間の治験により検証できた。平成23年2月には日本医師会治験促進センター採択の2年間の医師主導治験が終了し (治験調整医師：古賀靖敏)、現在、承認申請を平成25年夏に提出予定である。アルギニン療法は、ミトコンドリア血管障害mitochondrial angiopathyを治療する唯一の方法であり、同様の臨床試験は、欧州および米国、カナダでも開始されている。また、この治療法は、ミトコンドリア病に対する治験により有効性が証明された世界初の治療法となる (用法特許：古賀靖敏)。

3. ミトコンドリア病に合併する高乳酸血症に対するピルビン酸ナトリウム療法

ミトコンドリア病は、電子伝達系酵素障害を伴う。そのATP合成不全により起こる種々の細胞障害をmitochondrial cytopathyと総称する。臨床的には重要臓器における細胞障害が細胞死を惹起し、更なる機能不全を来す。このATP合成不全による細胞死を予防する唯一の化合物と考えられるのが、ピルビン酸ナトリウムである。図6にピルビン酸ナトリウムの作用機序を示す⁸⁾。ミトコンドリア異常症では、ATP産生不足により細胞のアポトーシスが進行し、最終的にはLeigh脳症に代表される重要細胞の脱落変性が生じる。特に、高乳酸血症が重度で、L/P比が25.6以上になる患者では、解糖系のATP合成も完全にストップする。このため、このアポトーシスが急速に進行し、中枢神経系を含めた全身臓器の細胞の脱落変性も進行すると考えられる。この化合物は、DCA (dichloroacetate) 同様、ピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDHC) を最大限に活性化させる働きの他に、レドックスステートを25以下に温存し、解糖系のATP合成をレストアする働きがあり、アポトーシスを予防すると考えられる。実際、ミトコンドリアDNA欠乏症によるLeigh脳症に対する治療効果⁹⁾、ピルビン酸脱水素酵素PDHE1 α 欠損症によるLeigh脳症に対する治療効果¹⁰⁾、チトクロームC酸化酵素欠損症によるLeigh脳症に対する治療効果¹¹⁾ などがすでに報告されている。ピルビン酸ナトリウムという工業用特級試薬を、ミトコンドリア脳筋症に合併する高乳酸血症の治療薬として開発するプロジェクトは、平成24年4月1日付けで、厚生労働省難治疾患等克服研究事業の重点領域研究（主任研究者：古賀靖敏）として採択された。試薬からの医薬品開発として、また、アルギニンのMELASに対する治療法と同様、日本から世界に発信できる新しい治療法として世界から注目されている。

おわりに

希少疾病であるミトコンドリア病の治療薬開発

は、疾患の疫学調査、自然歴、適切な臨床的評価指標がなく、インフラ整備が整っていない事、また、慢性進行性の重篤な経過をとるために二重盲検プラセボ対照比較試験が行い難いなどの理由で、世界的にその開発は遅れている。MELASに対するL-アルギニン療法は、日本から世界に発信できるミトコンドリア病を治療適応とした初めての治療薬となる。また、ピルビン酸ナトリウムは本症に合併する一次性高乳酸血症の治療薬となるだけでなく、溺水、心筋梗塞、脳梗塞、循環不全時における二次性高乳酸血症に対する救急現場におけるファーストライン治療薬としても期待される画期的治療薬となる。なお本研究は、以下の競争的資金の採択の基で実施されている。

1. 厚生労働省難治疾患等研究事業 重点研究事業 ミトコンドリア病に合併する高乳酸血症に対するピルビン酸ナトリウム治療法の開発研究—試薬からの希少疾病治療薬開発の試み— (H24-難治等 (難) - 一般-005 平成24-26年度 主任研究者
2. 文部省科学研究費補助金 基盤研究 (c) ミトコンドリア病治療薬のための網羅的機能測定スクリーニングシステムの開発 平成25-27年 研究課題番号25461571. 主任研究者
3. 日本医師会治験促進センター 医師主導治験「MELASに対するL-アルギニン療法」、調整研究 (CCT-B-1803) (日本医師会) 平成16-24年度 主任研究者
4. 厚生労働科学研究費補助金 効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 「小児期発症のミトコンドリア脳筋症に対するL-アルギニンおよびジクロロ酢酸療法の効果判定と分子病態を踏まえた新しい治療法開発に関する臨床研究」研究課題番号 (H14-小児-006). 平成14-16年度 班研究 主任研究者
5. 厚生労働科学研究費補助金 効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 (臨床研究実施チームの整備) 「小児期発症のミトコンドリア脳

筋症に対するL-アルギニンおよびジクロロ酢酸療法の効果判定と分子病態を踏まえた新しい治療法開発に関する臨床研究（臨床研究実施チームの整備）」研究課題番号（H14-チーム（小児）-005）。平成14-16年度 班研究 主任研究者

6. 文部省科学研究費補助金 基盤研究（c）（2）：ミトコンドリア異常症の分子基盤とモデル動物開発に関する研究 平成14-17年 研究課題番号13670853. 主任研究者
7. 文部科学研究費 基盤研究B「ミトコンドリア・核ゲノム連関遺伝子情報ネットワークの解明」平成10-13年（課題番号 16390308） 主任研究者

11. Komaki H, et al. : Pyruvate therapy for Leigh syndrome due to cytochrome c oxidase deficiency. *Biochim Biophys Acta.* 1800:313-315, 2011.

【文献】

1. Koga Y, et al. Findings in muscle in complex I (NADH Coenzyme Q reductase) deficiency. *Ann Neurol* 24:749-756, 1988
2. Koga Y, et al. MELAS exhibits dominant negative effects on mitochondrial RNA processing. *Ann Neurol* 43:835, 1998
3. Yatsuga S, et al. MELAS: A nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan. *Biochem Biophys Acta General* 1820:619-624, 2012
4. Koga Y, et al : L-arginine improves the symptoms of stroke-like episodes in MELAS. *Neurology* 64:710-712, 2005.
5. Koga Y, et al. Effects of L-arginine on the acute phase of strokes in three patients with MELAS. *Neurology* 58:827-828, 2002.
6. Koga Y, Akita Y, Nishioka J, et al : Endothelial dysfunction in MELAS was improved by L-arginine supplementation. *Neurology* 66:1766-1769, 2006.
7. Koga Y, Povalko N, Katayama K, et al : Molecular pathology of MELAS and L-arginine effects. *Biochem Biophys Acta General* 1820:608-614, 2012.
8. Tanaka M, et al. : Therapeutic potential of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion.* 7 (6) :399-403, 2007.
9. Saito K, et al. : Pyruvate therapy for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Biochim Biophys Acta General* 1820:623-626, 2012
10. Koga Y, et al.: Beneficial effect of pyruvate therapy on Leigh syndrome due to a novel mutation in PDH E1 α gene. *Brain Dev.* 34:87-91, 2012.



日本臨牀 第72巻・第1号（平成26年1月号）別刷

ミトコンドリア脳筋症治療の現況と展望

古賀靖敏

ミトコンドリア脳筋症治療の現況と展望

The treatment of mitochondrial disorders, present and future

古賀靖敏

Abstract

Mitochondrial disorder has an inherited multi-system mitochondrial dysfunction that often involves the nervous, endocrine, renal and cardiac system. Although many molecular and cellular mechanisms leading to mitochondrial cytopathy have been discovered, clinical management of the disorders remains largely supportive. Many therapeutic drugs and reagents have been published effective in the past 20 years, however, none of those have been approved their efficacy by a double blind randomized placebo-controlled, or open labeled trial. In this review, we describe the current situation for developing the therapeutic drugs in mitochondrial disorders by clinical trial registry. We also describe the investigator-mediated clinical trial of L-arginine, and taurin for MELAS, and new project for developing the therapeutic drug of sodium pyruvate for lactic acidosis associated with mitochondrial disorders in Japan.

Key words: mitochondrial myopathy, stroke-like episodes, endothelial dysfunction, lactic acidosis, redox state

はじめに

ミトコンドリア脳筋症が初めてヒトの病気の疾患単位として報告されて久しい。ミトコンドリア脳筋症の根本治療は、ミトコンドリア機能障害を正常化することである。しかし、医学研究が進んだ今日においても、本症の特効薬的な治療法は残念ながら存在しない。

本稿では、ミトコンドリア脳筋症の治療薬開発の現況と将来展望について最新の情報を踏まえて綜説する。その中で、日本での治療薬開発の現状について、すなわち日本から世界に発信できるアルギニン、タウリンおよびピルビン酸ナトリウムの治療薬開発について紹介する。

1. ミトコンドリア脳筋症とは

ミトコンドリア脳筋症とは、ヒトのエネルギー代謝の中核として働く細胞内小器官ミトコンドリアの機能不全により、神経、筋および全身臓器の種々の症状を呈する症候群の総称である。電子伝達系酵素、ピルビン酸代謝、TCAサイクル関連代謝、脂肪酸代謝、核酸代謝、ATP転送など多岐にわたる原因が存在するため、症状は神経、筋症状のみならず、心臓・循環器、腎、内分泌、消化器、感覚器、血液など、実に多彩な症状を呈する。

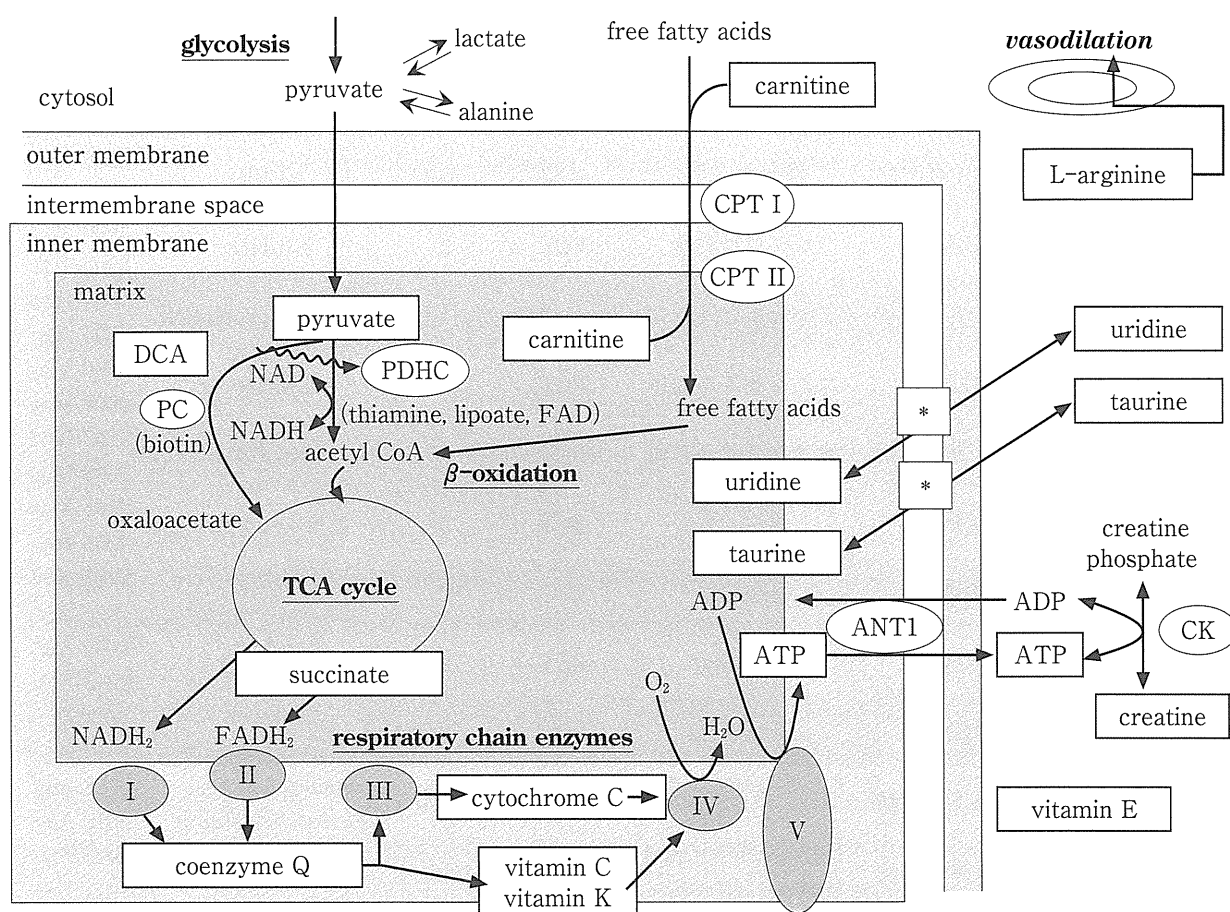


図1 ミトコンドリア脳筋症に使用されている医薬品および試薬

細胞内小器官であるミトコンドリアにおける代謝図とミトコンドリア脳筋症に対して使用を推奨されている医薬品および試薬を四角で示す。種々の臨床研究が行われているが、治験を経て効能を検証できた医薬品はない。

2. ミトコンドリア脳筋症の 治療薬開発の現況

1) 外国の臨床治験レジストリーにみる 治療薬開発の現況

ミトコンドリア脳筋症を治療適応とする治療薬は世界に存在しない。図1にミトコンドリア脳筋症に対して適応外使用されている医薬品および試薬を示す。2013年の米国NIH臨床治験レジストリー¹⁾およびEU臨床治験レジストリーでは、ミトコンドリア脳筋症関係の治験研究が340件報告され、その中で治療に直結する介入研究は18件存在する(表1)。しかし、その15件で有効性が証明できなかった。分子生物学的な研究結果と、GCPに準拠した法規制下の治験介入研究の結果では、大きな差が存在する。消滅していった治療候補薬の主なものを以下に挙げる。

MELASに対するジクロロ酢酸(dichloroacetate: DCA)治験では、本来この試薬で以前から報告されていた肝・腎毒性に加え、重篤な神経毒性が新たに報告され、これら重篤な有害事象のために治験自体が中止となった²⁾。電子伝達の転送体として期待されたコエンザイムQ10やそのアナログであるイデベノン、フリーラジカルのスカベンジャーとして期待されたクルクミン(ウコン)やビタミンEも、すべてその有効性が検証できなかった。

残る3件中1件は、エジソン製薬株式会社がグローバル治験として開発中のEPI-743である。この化合物は、遺伝的に確定した電子伝達系酵素欠損の患者にかぎり余命3カ月と宣告されたLeigh脳症に対して、終末期医療(compassionate use)としてFDAに承認された薬物であり、現在Phase 2b試験がLeigh脳症を対象に実

表1 外国の臨床治験レジストリーでのミトコンドリア脳筋症に対する介入試験

登録ID	対象患者	薬剤	試験方法	フェーズ	スポンサー	期間
NCT00004770	ミトコンドリア病	チオクト酸	治療	pilot	NCRR	2000 Feb 2005 Jun
NCT00068913	MELAS	ジクロロ酢酸	RCT	2	NICHD	2000 Mar 2005 中止
NCT00060515	ミトコンドリア病	アセチルウリジン	オープン	1	Repligen Corporation	2003 May 2005 Aug
NCT00327756	双極性障害	コエンザイム Q10	RCT	2	NIMH	2006 May 2009 May
NCT00432744	ミトコンドリア病	コエンザイム Q10	RCT	3	フロリダ大学	2007 Jan 2009 May
NCT00528151	LOHN	クルクミン (ウコン)	RCT	3	マヒドール大学	2005 May 2009 Dec
NCT00747487	LOHN	Idebenone	RCT	2	Santhera Pharmaceuticals	2007 Nov 2008 Dec
NCT00887562	MELAS	Idebenone	RCT	2	Santhera Pharmaceuticals	2009 Apr 2013 Feb
NCT01495715	LOHN	Idebenone	RCT	3	Santhera Pharmaceuticals	2011 Dec 中止
NCT00719706	ミトコンドリア病	アセチルカルニチン と α リポ酸	RCT	2	Stanley Medical Research Institute	2008 Aug 2010 Aug
NCT00328159	脂肪酸代謝異常症	Oil special 107 and MYGLIOL 810	RCT	pilot	Hôpitaux de Paris	2006 May 2011 Feb
NCT01074359	神経筋疾患	トコフェロール キノン	RCT	2	Penwest Pharmaceuticals Co.	2010 Feb 2011 Apr
NCT01642056	ミトコンドリア病	EPI-743	RCT	1/2	NHGRI	2012 July 2015 Sep
NCT01721733	Leigh	EPI-743	RCT	2	Edison Pharmaceuticals	2012 Nov 2013 Jun
NCT01370447	ミトコンドリア病	EPI-743	オープン	2	Edison Pharmaceuticals	2010 Feb 2012 Oct
NCT01728064	Friedreich's Ataxia	EPI-743	RCT	2	Edison Pharmaceuticals	2012 Nov 2013 Apr
NCT01603446	MELAS	アルギニン	オープン	2	トロント小児病院	2012 May 2013 Mar
NCT01339494	MELAS	アルギニン+ シトルリン	オープン	1/2	テキサス小児病院	2009 Jul 2012 Jun

2013年7月時点での情報では、ミトコンドリア脳筋症関連の介入研究が18件存在する。しかしながら、15件の治験結果では有効性が証明されなかった。

NCRR: National Center for Research Resources, NICHD: National Institute of Child Health and Human Development, NIMH: National Institute of Mental Health, NHGRI: National Human Genome Research Institute.

施されている。日本でも遺伝子異常が確定した電子伝達系酵素欠損のLeigh脳症患者を対象とした企業主導治験が計画されている。この治験は、6カ月間EPI-743を15 mg/kg/day, 5 mg/kg/day, もしくはプラセボを服薬し、ニューカッスル版小児ミトコンドリア病スケール(New-

castle Pediatric Mitochondrial Disease Scale: NPMDs)のセクション1-3の改善を主要評価項目として、その有効性を検証するものである。元来、EPI-743は、ビタミンE様の構造をもつ化合物であり、パラベンゾキノンをターゲットとして細胞内還元型グルタチオンを増加させる

フリーラジカルのスカベンジャーとして働くと推測されるが、正確な作用機序は不明である。残る2件は、いずれも日本で著者が開発した MELAS に対するアルギニンの治験であり、現在、米国およびカナダでの治験が進行中である。

2) 最新のレビューにみるミトコンドリア脳筋症治療薬の現況

2003年に続き2012年に発表されたミトコンドリア脳筋症の治療に関する Cochrane Review³⁾では、オーファン病であるミトコンドリア病の治療研究は進んでおらず、いまだ有効な治療法が開発されていないと述べている。クロスオーバーを含めたランダム化比較対照試験を探索子として、1966年～2011年7月までのMEDLINEおよび1980年1月～2011年7月までのEMBASEのデータベースを論文検索した。その結果、1,335件の論文抄録をレビューし、ランダム化比較対照試験21件が見いだされた。その中で、12件中8件は2003年のレビュー以後に実施された研究であった。

2件は、明らかな先入観があるもので、先のレビューでも除外されていた。治療対象疾患が多様であり使用する薬剤・用法・用量・研究デザイン・主要評価項目にわたるすべてで異なるために、類似した研究はほとんどなかった。方法論自体の質は比較的保たれていたが、先入観の問題が明確に論じられていなかった。重篤な有害事象は、DCAにおける神経障害のみであった。1件は、30症例に対する高用量のコエンザイムQ10研究で、臨床的效果はみられなかった。3件は、水酸化クレアチン単独治験であり、1件で筋力の増強と労作後の乳酸値が改善したが、他の2件では38症例に使用し何ら有効性はみられなかった。1件は、コエンザイムQ10と水酸化クレアチンおよびリポ酸の3剤を16症例に使用し、バイオマーカーやアキレス腱反射力は改善したが総合的な有効性はみられなかった。5件のDCAを使った研究があり、そのうち3件で63症例に対して使用され、副次的評価項目のミトコンドリア代謝指標(3例で静脈中の乳酸値、1例でMRSでの乳酸値)が改善した。1件で、DCA短期投与試験が成人例で行われ、

何ら効果がなかった。1件で、30例のMELAS成人例を対象としたDCA長期投与試験が行われたが、臨床症状の改善がなく、重篤な神経障害の副作用のために治験が中止された。1件で、ジメチルグリシンが5例に使用され、何ら有効性はみられなかった。1件で乳清由来の補助栄養素を13症例に投与したが、臨床的改善はなかった。結論として、2003年のレビューと同様、ミトコンドリア病に対する介入研究では、いまだに明確な有効性を示した治療法はないと結論づけている³⁾。

3. MELAS に対する L-アルギニン治療法開発

1) MELAS について

ミトコンドリア脳筋症の種々の病型の中で、小児期に発作性の頭痛、嘔吐、半身痙攣で発症する病型がmitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS)である。本症は、1984年、コロンビア大学の神経内科医Pavilakisにより初めて臨床的に報告された病型であり⁴⁾、ミトコンドリア脳筋症の亜型の中で最も頻度が高い。本症の80%の患者でミトコンドリアDNAのtRNA^{Leu(UUR)}遺伝子のA3243G変異が報告された。40歳前の一過性脳卒中様症状(頭痛、嘔吐、半身痙攣、視野異常、閃輝暗点、視力障害、麻痺など)を特徴とし、同時に筋力低下、感音性難聴、心刺激伝導障害、心筋症を合併するものもある。MELASによる脳卒中様発作の特徴は、血管支配に一致しない梗塞領域で、梗塞部位は時間的・空間的に進展もしくは消失する。最終的には梗塞部位は萎縮し、脳血管性認知症となる。

小児型MELASは、平均発症9歳、平均死亡15歳と非常に重篤な疾患であることが著者らの5年間のコホート研究で明らかになった⁵⁾。重症度の進行に対する評価スケールとして、ミトコンドリア病重症度スコア(Japanese Mitochondrial Disorders Rating Scale: JMDRS)を策定した⁶⁾。これは、患者の日常生活全般にわたって、①日常動作、②運動機能、③感覚器、④内分泌、⑤心機能、⑥腎機能、⑦高次脳機能

にわたって、網羅的、定量的に患者の病気の進行を評価する目的で策定したものである。20人の死亡例を含む日本人MELAS 96人のコホート研究では、5年間の重症度スコアの変化は、2003年(4.4±3.2)(mean±SD)から2008年(16.1±9.2)(mean±SD)へと有意に悪化していた(p値=0.0001)。

一方、アルギニンの医師主導治験では、2年間の試験期間で最も動きやすいと考えられた①日常動作：section 1, ②運動機能：section 2を指標としたため、同じ評価指標による変化がヒストリカルコントロールとして必要となる。このために、コホート研究の96人からアルギニンの医師主導治験における選択・除外基準の重症度に合わせた患者44人を抽出し、この変化につき解析した。44人の内訳は、男性26人、女性18人、その中で3人が観察期間中に死亡した。平均年齢は、25.9±13.3(mean±SD)歳で、3人の死亡例では、死亡時期が記載されていないため、今回の統計では解析中に存在する最悪値を記入し解析することとした。その結果、2003年(3.8±3.0)(mean±SD)に対して2008年(10.9±10.3)(mean±SD)と有意に悪化していた(p値=0.001)。これはあくまで5年間における悪化指標であり、病気が確実に進行すること、また、section 1, section 2の評価尺度が、2年間の観察研究でも有用であることを示していた。

2) MELASにおける血管内皮機能不全の証明

患者における血管内皮機能にかかわる種々の因子を検討した。一酸化窒素依存性の動脈拡張のメカニズムとMELASにおける血管内皮機能不全の病態を図2に示す。血管拡張の生理機能でNO産生に影響するアルギニン、シトルリン、NOx、およびcGMPについて、MELAS患者の脳卒中様発作急性期と寛解期、および年齢・性を一致させた対照群の3群で比較検討した。その結果、患者では、脳卒中様発作急性期は、アルギニンおよびその生成物であるNOxおよびシトルリン、cGMPの有意な低下があることを見いだした⁷⁾。そこで、脳卒中様発作急性期に

アルギニンを静注すると、脳卒中様発作による急性期症状が速やかに改善することを報告した。現在までに蓄積された情報を表2に示す。MELAS患者24人の合計34回の脳卒中様発作に対し、L-アルギニン塩酸塩0.5g/kg/回、またはプラセボ(5%ブドウ糖)を静注し、脳卒中様症状の改善を評価した結果を表2に示す。プラセボ静注時の頭痛および嘔吐の改善割合は、静注後30分、2時間、6時間、12時間、24時間のいずれも8%を超えることはなかった。一方、実薬投与では改善率は2時間以後いずれも100%であった。このデータは、プラセボ対照試験を行いにくい日本では、貴重な自主臨床試験データとなる。オープン試験をとらざるをえない日本での治験では、このプラセボデータに対する優位性が治験での評価の際に重要となる。また、MELAS患者で血管内皮機能不全をより直接的に証明するために、NO依存性動脈拡張能をflow-mediated dilatation(FMD)で検証した。その結果、MELAS患者では、例外なく血管内皮機能が著しく低下していることを証明した⁸⁾。

3) MELASにおけるアルギニン治療の分子病態

アルギニン治療による症状の改善効果は、ミトコンドリア血管障害(mitochondrial angiopathy)に対する治療効果で発現すると考えられる⁷⁾。MELASにおける血管障害の分子病態を以下に示す。MELAS患者の脳内中小動脈の中膜平滑筋細胞層および血管内皮細胞層では、筋での赤ボロ線維(ragged-red fiber)と同様に異常なミトコンドリアが集積し、セグメント的に内腔が狭窄している部分が病理学的に存在する。このセグメントを起点として何らかの危険因子が加わることで脳梗塞様虚血発作が起こると考えられる。また、MELASでは、上記に加えて機能的な狭窄が起こる。すなわち、脳卒中様発作では、NO産生の中心的役割を担うアルギニンの濃度低下により、NO産生が減少し、動脈が拡張不全になる。また、電子伝達系酵素欠損により、酸化ストレスや活性酸素物質が蓄積し、NOと反応しhydroxypernitriteに変換されることでNO濃度が減衰する。また、もともと

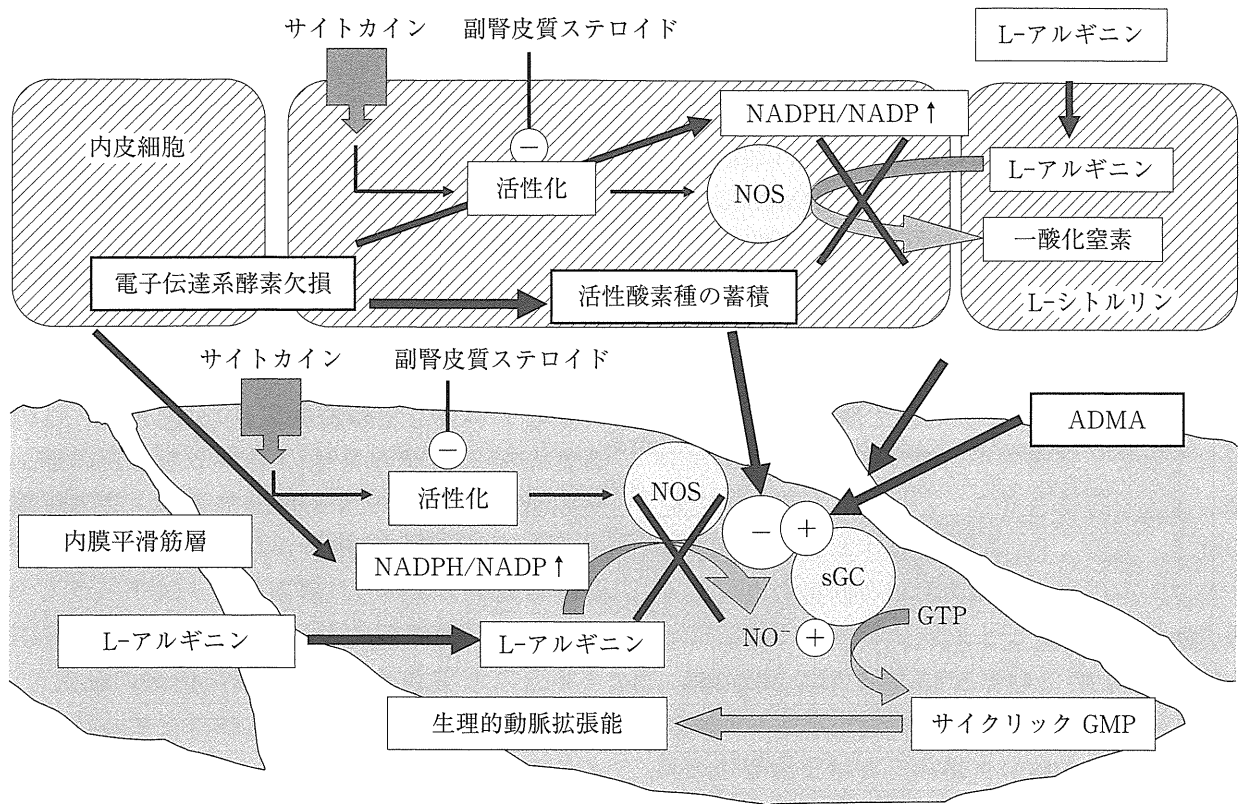


図 2 MELAS における血管内皮機能不全

脳卒中様発作では、NO 産生の中心的役割を担うアルギニンの濃度低下により、NO 産生が減少し、動脈が拡張不全になる。また、電子伝達系酵素欠損により、酸化ストレスや活性酸素物質が蓄積し、NO と反応し hydroxypernitrite に変換されることで NO 濃度が減衰する。また、もともと存在する電子伝達系酵素欠損により、redox potential に異常をきたし、NADPH 過剰状態から NO 合成酵素の反応を補酵素のレベルで抑制すると考えられる。更には、相対的に増加した asymmetrical dimethylarginine (ADMA) により NO 合成酵素活性が更に低下し、結果的には血管内皮機能不全に陥る。

表 2 L-アルギニン静注による脳卒中様発作急性期の治療効果

脳卒中様発作症状	治療前	30分後	2時間後*	24時間後	改善割合
1) 頭痛					
L-アルギニン	0/22	18/22	22/22	22/22	100%
プラセボ	0/12	1/12	1/12	1/12	8%
2) 嘔吐					
L-アルギニン	0/22	18/22	22/22	22/22	100%
プラセボ	0/12	0/12	0/12	1/12	8%
3) 視野異常					
L-アルギニン	0/7	4/7	7/7	7/7	100%
プラセボ	0/4	1/4	1/4	1/4	25%

MELAS 患者 24 人が合計 34 回の脳卒中様発作を発現した際に L-アルギニン塩酸塩 0.5g/kg/回またはプラセボ(5%ブドウ糖)を静注し、脳卒中様症状の改善を評価した。この試験では、投与前の重症度を、頭痛は 4 段階(0: なし, 1: 軽度, 2: 中等度, 3: 高度)、嘔吐および視野異常は 2 段階(0: なし, 1: あり)でスコア化し、頭痛では投与前のスコアが‘2 または 3’から投与後‘0 または 1’に低下した場合、嘔吐および視野異常では投与前 1 から投与後 0 に変化した場合に‘改善’とした。

* 6 時間後および 12 時間後も症状の改善割合は 2 時間後と同一である。

存在する電子伝達系酵素欠損により, redox potentialに異常をきたし, NADPH 過剰状態から NO 合成酵素の反応を補酵素のレベルで抑制すると考えられる. 更には, 相対的に増加した asymmetrical dimethylarginine (ADMA) により NO 合成酵素活性が更に低下し, 結果的には血管内皮機能不全に陥る. 脳卒中様発作急性期症状に対する L-アルギニンの効果は, 脳血管内皮細胞における eNOS の NO 産生量を増加させて cGMP 濃度を上げることで脳の中小動脈の正常な血管生理機能を回復させ, 虚血部位における血流を改善させることにより発現すると思われる. 実際, 急性期にアルギニンを投与することで, 脳内での乳酸の蓄積を回避したという報告がなされた.

MELAS 患者に対する L-アルギニン投与は, MELAS 患者の脳卒中様発作急性期だけでなく, 発作間欠期の予防にも極めて有効な治療法と考えられる⁹⁾. 脳卒中様発作急性期には, L-アルギニン・HCl 10% 溶液(アルギU注[®])で 5 mL/kg/hr (0.5 g/kg) を 1 時間かけて静注投与する. 発作寛解期には, 発作の予防および重症度の軽減目的に内服療法を行う. 用法・用量は, 0.3–0.5 g/kg/day を分 3 で内服投与し, 血漿中の L-アルギニンのトラフ値を 150 μmol/L 以上に維持する. 頻回の脳卒中様発作を起こしている患者では, 上記投与量を 1 日 4–6 回に分けて服薬し, トラフ値が 150 μmol/L 以下にならないように用法・用量を調節する必要がある.

4) MELAS に対するアルギニンの医師主導治験

前述の自主臨床研究結果から, 日本医師会治験促進センターの研究採択を得て, 2008 年 12 月 15 日から医師主導治験を開始した. MELAS の脳卒中様発作急性期の症状治療を目的としたアルギニン静注試験, および発作寛解期における脳卒中様発作予防もしくは重症度軽減のための内服試験の 2 試験を行った. 2 年にわたる試験の結果, 両試験ともにアルギニンの有効性を検証できたため(治験調整医師: 古賀靖敏), 薬事承認申請を平成 25(2013)年秋~冬に提出予定である(2013 年 9 月 1 日現在の情報). オープン試験

ではあるが, その有効性が治験により確認された世界初のミトコンドリア脳筋症治療薬となる.

4. タウリンの開発研究

MELAS にミトコンドリア DNA の tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子 A3243G 変異が報告されて以来, これまで 30 種以上の MELAS 関連遺伝子変異が報告されている. 2001 年になり, tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子の機能異常に, アンチコドンのタウリン修飾が欠損していることが報告された(図 3)¹⁰⁾. この新たな分子病態の発見の端緒となったのが, MELAS の細胞モデルの開発である. この細胞モデルは, MELAS 患者から単離した培養皮膚線維芽細胞を脱核した細胞質と, エチジウムブロマイドで長期間処理しミトコンドリア DNA を完全に消失させた HeLa 細胞由来の細胞(ρゼロ細胞)とを人工的に細胞融合させることにより作製された(ρゼロ Cybrid システム). なお, 正常対照群は, 同じ MELAS 患者由来で完全に正常型の tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子をもつものとし, この両者で機能解析を行った. MELAS の細胞モデルでは, 正常対照群と比較して著明にミトコンドリア酸素消費量が低下しており, 遺伝子ではコードされていないアンチコドンのタウリン修飾が欠損していた. この機能不全は, タウリン(40 mM)を添加することにより有意に酸素消費量の低下が改善した. 一方, 正常対照群ではタウリンによる影響は認められなかった. また, 培養液中の L-メチオニン(タウリン中間体)および L-システイン(タウリン前駆体)の量を制限した条件下では, MELAS の細胞モデルにおいて, タウリンは低下したミトコンドリア酸素消費量を濃度依存的に改善し, 0.3 mM で有意な作用を示した. したがって, MELAS ではタウリン修飾欠損がタンパク質合成障害を惹起すること, また, タウリンを添加することで, 機能が回復できることを分子生物学的に示した.

以上の情報から, 自主臨床研究として, MELAS 患者 2 例にタウリン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たと報告された¹¹⁾. この情報を踏まえて, MELAS の脳卒中様発作を予

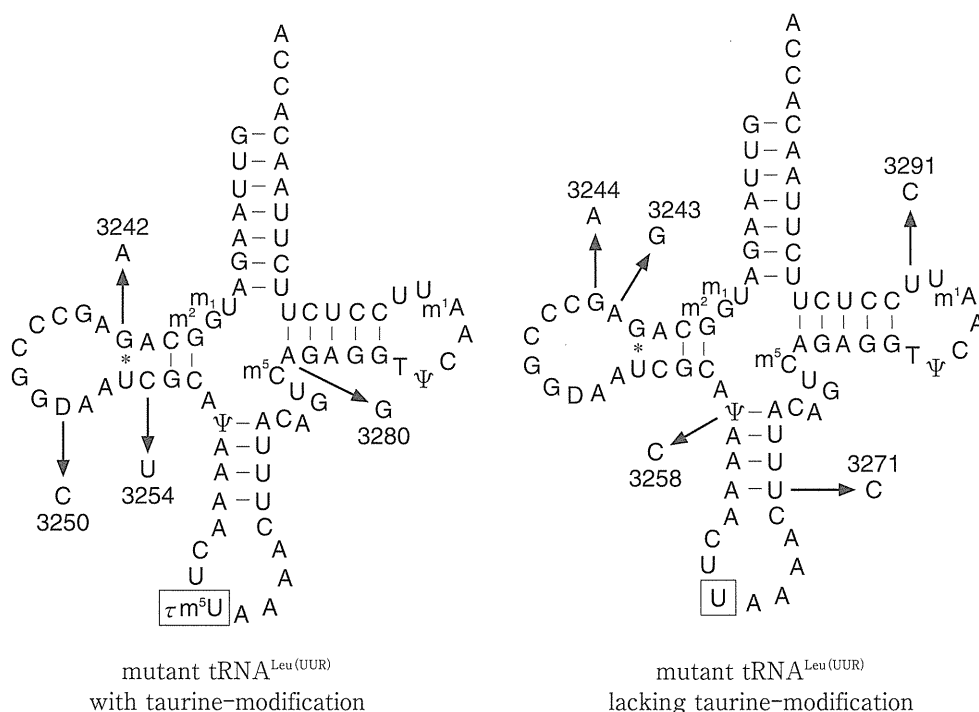


図3 ミトコンドリア tRNA 遺伝子変異とタウリン修飾異常

ミトコンドリア脳筋症で報告された、病的なミトコンドリア tRNA 遺伝子変異の多くは、結果的に wobble 位のタウリン修飾が障害される。左図に示す塩基置換は、タウリン修飾異常を伴わず、右図に示した病的変異は、タウリン修飾が欠落する。

防するためのタウリン治験が、平成 24(2012)年厚生労働省科学研究難治疾患等克服研究事業重点研究に採択され(主任研究者：川崎医科大学神経内科・砂田芳秀教授)，平成 25(2013)年 7 月より実働となった。この治験は、多施設共同オープンでの介入研究で、対象は遺伝的異常の明確な MELAS で、症例目標 15 例、1 年間の実薬投与期間で、100% 発作予防症例の割合をプライマリーエンドポイントとしている。治験登録機関は 2013 年 9 月～12 月まで、治験実施期間は 2014 年 12 月までとなっている。MELAS の遺伝子異常におけるタウリン修飾機構は、遺伝子異常の発見からその分子病態まで、日本人が先駆的に発見した知見であり、治療法の開発まで完成できれば、世界に誇れる日本人による臨床研究成果と期待される。

5. ピルビン酸ナトリウム(試薬)からの治療薬の開発研究

1) 高乳酸血症の治療の重要性

ミトコンドリア病は、電子伝達系酵素障害を

伴い、その多くは高乳酸血症を呈する。その ATP 合成不全により起こる種々の細胞障害を mitochondrial cytopathy と総称する。臨床的には重要臓器における細胞障害が細胞死を惹起し、更なる機能不全をきたす。MELAS における自然歴研究で、高乳酸血症についての興味深い報告がある¹²⁾。つまり、側脳室における髄液の乳酸値は MELAS の病気の進行とともに高度に蓄積し、かつ、髄液の乳酸値が高値である症例群で平均余命が有意に短縮した。このことから、高乳酸血症の程度が病気の予後と深い関係があり、髄液中の乳酸値を下げることで、細胞死を抑制し、MELAS での QOL を改善する可能性があり、ひいては、他の同様の代謝病態を有するミトコンドリア病でも治療的改善が見込めることが示された。

2) 高乳酸血症の治療の意義

次に、高乳酸血症を治療することで、臨床症状がはたして改善するのか、つまり治療することの意義について、重要な報告がなされた¹³⁾。ヒトのミトコンドリア DNA の大欠失を示す

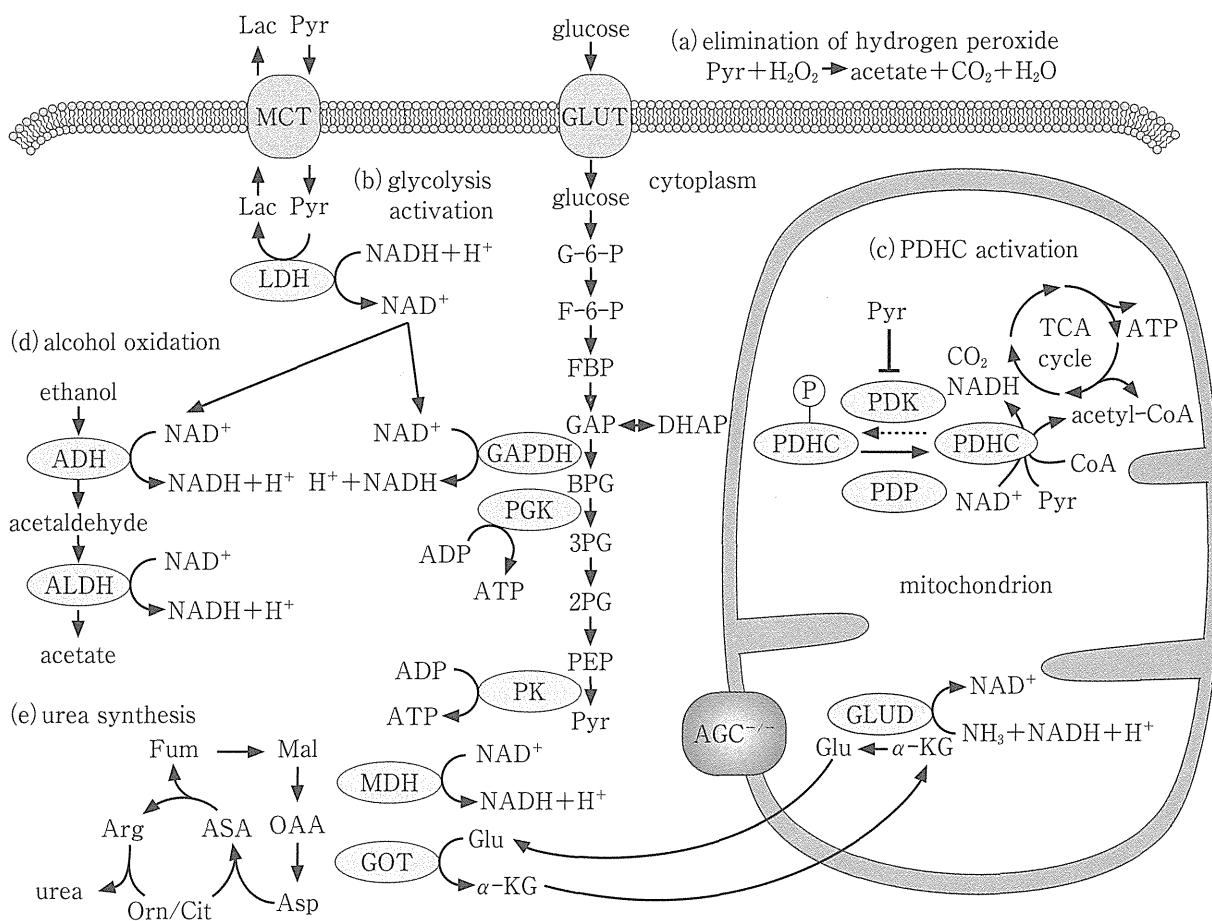


図4 ピルビン酸ナトリウムの作用機序(文献¹⁴⁾より引用)

ミトコンドリア脳筋症では、ATP産生不足により細胞のアポトーシスが進行し、最終的にはLeigh脳症に代表される重要細胞の脱落変性が生じる。特に、高乳酸血症が重度で、L/P比が25.6以上になる患者では、解糖系のATP合成も完全にストップする。このため、このアポトーシスが急速に進行し、中枢神経系を含めた全身臓器の細胞の脱落変性も進行すると考えられる。ピルビン酸は、ピルビン酸脱水素酵素複合体(PDHC)を最大限に活性化させる働きのほか、レドックスステートを25以下に温存し、解糖系のATP合成をレストアする働きがあり、アポトーシスを予防すると考えられる。

Kearns-Sayre症候群のモデル動物(mito-mouse)が作出された。このmito-mouseは、ミトコンドリアDNAの4696bpの欠失の蓄積により高乳酸血症を示し、刺激伝導系の異常、および、筋病理でragged-red fiberやチトクロームC酸化酵素欠損線維もみられ、寿命も対照群に比較し短縮していた。このモデル動物に乳酸値を下げるDCA治療をしたところ、活動性や体重増加が改善し、寿命が延長した。このことから、ミトコンドリア脳筋症で観察される慢性的な乳酸の過剰蓄積が更なるミトコンドリア機能不全をきたすと結論づけている。高乳酸血症を治療できる安全な方策があれば、患者のQOLを改善できる可能性が考えられた。

3) ピルビン酸の有効性を示す臨床研究成績

ATP合成不全による細胞死を予防する唯一の化合物と考えられるのが、ピルビン酸ナトリウムである。図4にピルビン酸ナトリウムの作用機序を示す¹⁴⁾。ミトコンドリア脳筋症では、ATP産生不足により細胞のアポトーシスが進行し、最終的にはLeigh脳症に代表される重要細胞の脱落変性が生じる。特に、高乳酸血症が重度で、L/P比が25.6以上になる患者では、解糖系のATP合成も完全にストップする。このため、このアポトーシスが急速に進行し、中枢神経系を含めた全身臓器の細胞の脱落変性も進行すると考えられる。この化合物は、DCA同様、ピルビン酸脱水素酵素複合体(PDHC)を最大

限に活性化させる働きのほかに、レドックスステートを 25 以下に温存し、解糖系の ATP 合成をレストアする働きがあり、アポトーシスを予防すると考えられる。実際、ミトコンドリア DNA 欠乏症による Leigh 脳症に対する治療効果、ピルビン酸脱水素酵素 PDHE1 α 欠損症による Leigh 脳症に対する治療効果¹⁵⁾、チトクローム C 酸化酵素欠損症による Leigh 脳症に対する治療効果などが既に報告されている。ピルビン酸ナトリウムという工業用特級試薬を、ミトコンドリア脳筋症に合併する高乳酸血症の治療薬として開発するプロジェクトは、平成 24

(2012)年 4 月 1 日付けで、厚生労働省難治疾患等克服研究事業の重点領域研究(主任研究者：古賀靖敏)として採択された。試薬からの医薬品開発として、また、アルギニンの MELAS に対する治療法と同様、日本から世界に発信できる新しい治療法として世界から注目されている。

おわりに

ミトコンドリア脳筋症を治療適応とした治療薬は、世界的にいまだ一剤も開発されていない。その評価には、二重盲検ランダム化プラセボ対照比較試験での治験体制が望まれる。

■ 文 献

- 1) <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=mitochondrial>
- 2) Kaufmann P, et al: Dichloroacetate causes toxic neuropathy in MELAS: a randomized, controlled clinical trial. *Neurology* **66**: 324-330, 2006.
- 3) Pfeffer G, et al: Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database Syst Rev* **4**: CD004426, 2012.
- 4) Pavlakis SG, et al: Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* **16**: 481-488, 1984.
- 5) Yatsuga S, et al: MELAS: A nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan. *Biochim Biophys Acta* **1820**: 619-624, 2012.
- 6) 厚生労働科学研究費, 小児疾患臨床研究事業, 「小児期発症のミトコンドリア脳筋症に対する L-アルギニンおよびジクロロ酢酸療法の効果判定と分子病態を踏まえた新しい治療法開発に関する臨床研究(H14-小児-006)」ミトコンドリア病パンフレット, 2005. [<http://www.ped-kurume.com/pdf/mitochondria.pdf>]
- 7) Koga Y, et al: L-arginine improves the symptoms of stroke-like episodes in MELAS. *Neurology* **64**: 710-712, 2005.
- 8) Koga Y, et al: Endothelial dysfunction in MELAS was improved by L-arginine supplementation. *Neurology* **66**: 1766-1769, 2006.
- 9) Koga Y, et al: Molecular pathology of MELAS and L-arginine effects. *Biochim Biophys Acta* **1820**: 608-614, 2012.
- 10) Kirino Y, et al: Specific correlation between the wobble modification deficiency in mutant tRNAs and the clinical features of a human mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 7127-7132, 2005.
- 11) Rikimaru M, et al: Taurine ameliorates impaired the mitochondrial function and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS. *Intern Med* **51**: 3351-3357, 2012.
- 12) Kaufmann P, et al: Natural history of MELAS associated with mitochondrial DNA m.3243A>G genotype. *Neurology* **77**: 1965-1971, 2011.
- 13) Ogasawara E, et al: Lactic acidemia in the pathogenesis of mice carrying mitochondrial DNA with a deletion. *Hum Mol Genet* **19**: 3179-3189, 2010.
- 14) Tanaka M, et al: Therapeutic potential of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion* **7**: 399-401, 2007.
- 15) Koga Y, et al: Beneficial effect of pyruvate therapy on Leigh syndrome due to a novel mutation in PDH E1 α gene. *Brain Dev* **34**: 87-91, 2012.

