

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）
遠位型ミオパチーにおける N-アセチルノイラミン酸の薬物動態の検討
及び第 2/3 相試験
分担研究報告書

GNE ミオパチー治療薬開発の国際状況把握とシアル酸測定法改良

研究分担者：氏名 西野 一三¹⁾

共同研究者：氏名 野口 悟¹⁾

1)(独) 国立精神・神経医療研究センター

研究要旨

米国およびイスラエルの GNE ミオパチー研究者とのワークショップ等の機会を利用し、米国・イスラエルでの臨床試験実施状況を把握した。米国・イスラエルでは、ベンチャー企業による N-アセチルノイラミン酸徐放剤を用いた第 Ⅲ 相臨床試験が行われており、すでに 48 週間の投与が行われている。詳細なデータは発表されていないものの、若干の筋力および機能改善が見られたとされている。効果は 3g 投与群よりも 6g 投与群でより顕著であった。この結果は、本邦で臨床試験を継続していくにあたり、極めて勇気づけられる結果である。また米国 NIH では ManNAc を利用した治療法開発を目指すべく、第 Ⅲ 相試験が行われている。これについても正式な報告はなされていないが、N-アセチルノイラミン酸よりも吸収が遅いことが確認され、治療薬として有望であるとみられている。また、本邦では、遺伝子診断で GNE ミオパチーとの診断が確定した例が 250 例を越えたとみられ、恐らく 300 例以上の患者が本邦に存在しているだろうと推測される。さらなるシアル酸化合物のシーズ探索、薬物動態および治療効果の探索のため、細胞内シアル酸測定法の改良を行った。これまでの細胞総シアル酸の変化測定に代わり、細胞内の CMP-NeuAc の測定が投与シアル酸の取り込みをよく反映すると考えられた。

A：研究目的

GNE ミオパチーに関して、国内外の治療法開発状況を明らかにする。シアル酸測定法を改良する。

B：研究方法

2013 年 10 月に米国カリフォルニア州で開催された世界筋学会に合わせて、サンフランシスコにおいて日・米・イスラエルの GNE ミオパチー研究者が一同に

会してクローズドのワークショップが開催され、診断ならびに治療法開発に関する現状報告が行われた。当該ワークショップならびに各種学会等での情報収集に努めるとともに、各種公開情報を検討した。

これまで、N-アセチルノイラミン酸の薬物動態は血液、尿中のシアル酸を定量することで、また前臨床研究における治療効果測定では、組織、細胞の総シアル酸を測定することが行われてきた。しかしながら、投与化合物が組織細胞内に取り込まれ、シアル酸合成に使われている量かを、正確にかつリアルタイムで、定量測定することは行われて来なかった。本研究では細胞内のシアル酸生合成の最終産物の CMP-NeuAc の測定を試みた。細胞内の CMP-NeuAc の測定は、ヒト正常コントロール及び GNE ミオパチー線維芽細胞をウシ胎仔血清添加培地及び非添加培地、5mM N-アセチルノイラミン酸、または 5mM ManAc 添加培地にて、3 日間培養した。細胞を回収後、エタノール抽出物を Envi-Carb column にてイオンペア固相抽出し、さらにイオンペア逆相クロマトグラフィーにて解析した。CMP-NeuAc の定量は標準物質との比較により行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては個人情報などを取り扱うことはなく、学術会議等での情報のみを扱うことから、特段の倫理への配慮は不要と考える。

C : 研究結果

米国・イスラエルでは、ベンチャー企業による N-アセチルノイラミン酸徐放剤を用いた第 Ⅲ 相臨床試験が行われており、すでに 48 週間投与後のデータについて、当該ベンチャーのプレスリリース発表が行われている

(http://files.shareholder.com/downloads/AMDA-2CDCD3/2939518627x0x715743/480663d0-7d46-42df-93f9-dd6291725040/Ultragenyx_Announces_Results_from_Phase_2_Study_of_Sialic_Acid_Extended-Release_Treatment_in_Hereditary_Inclusion_Body_Myopathy.pdf)。詳細なデータは発表されていないものの、若干の筋力および機能改善が見られたとされている。効果は 3g 投与群よりも 6g 投与群でより顕著であった。この結果は、本邦で臨床試験を継続していくにあたり、極めて勇気づけられる結果である。また上述の GNE ミオパチーワークショップにおいては、米国 NIH グループから ManNAc での第 Ⅲ 相試験の結果が報告された。正式な報告はなされていないため、詳細を記載することはできないが、N-アセチルノイラミン酸と比較して消化管から血中への移行が遅く、ゆっくりと代謝されるようであり、N-アセチルノイラミン酸の徐放剤と同様の効果が期待できると考えられた。

当該ワークショップでは、各国での患者数についても議論が行われた。本邦では、すでに国立精神・神経医療研究センターだけで 200 名以上の日本人患者の遺伝学的診断を確定している (Cho et al. J Neurol Neurosurg Psychiatr 2004)。他施設で診断されている例が 50 例以上あ

ることを踏まえると、恐らく本邦には300例以上の患者が存在することが予想される。また、GNE 遺伝子の新たなトランスクリプトが見いだされて変異記載方法に混乱が生じていることが確認された。その後の議論を通じて、統一的な記載方法を提唱することが決まった。この詳細については、Neuromuscular Disorders 誌に Letter として掲載されることが決定している。また、治療法開発の現状と各国での患者数、患者レジストリなどの状況について日・米・イスラエルが共同で総説を記述して公表することとなった

(Nishino et al. J Neurol Neurosurg Psychiatr, in revision)

細胞内 CMP-NeuAc 濃度は、コントロール正常細胞では、ウシ胎仔血清添加培養下で 525 ± 98 pmol/mg タンパク質であり、血清非添加で 341 ± 37 pmol/mg タンパク質、N-アセチルノイラミン酸添加で 1373 ± 495 pmol/mg タンパク質、ManNAc 添加で 1749 ± 293 pmol/mg タンパク質であった。GNE ミオパチー細胞では、ウシ胎仔血清添加培養下で、 409 ± 83 pmol/mg タンパク質であり、血清非添加では 203 ± 30 pmol/mg タンパク質、N-アセチルノイラミン酸添加では 1676 ± 132 pmol/mg タンパク質、ManNAc 添加では 1592 ± 109 pmol/mg タンパク質であった。

D : 考察

米国・イスラエルで行われている N-アセチルノイラミン酸徐放剤による第 Ⅲ 相臨床試験には治療効果が認められているようであり、極めて勇気づけられる。有

効性が認められる理由には高用量を用いていることに加えて、徐放剤を用いていることが影響しているのではないかと推察される。本申請研究においても、同様の徐放剤を用いた臨床試験が行われており、承認へ向けた治療薬開発戦略として正しい方向性を示していると考えられた。また、米国 NIH が行っている ManNAc による臨床試験も徐放剤様に吸収が遅いことが確認され、治療薬として有望であるとみられ、一日も早い治療薬開発を待つ GNE ミオパチー患者にとっては朗報である。

細胞内 CMP-NeuAc 濃度を再現性よく測定する系を確立した。 1×10^6 個程度の細胞数にて測定が可能であった。また、細胞のシアリル化に比べて、より鋭敏にかつリアルタイムで、培養時の細胞内でのシアル酸濃度を反映しているものと考えられた。今後は、ヒト患者での血球細胞内シアル酸濃度の測定に応用することで、N-アセチルノイラミン酸の薬物動態や治療効果の簡便な予測にも役立つものと考えられた。

E : 結論

米国・イスラエルにおいては製薬ベンチャー主導で N-アセチルノイラミン酸徐放剤を用いた第 Ⅲ 相臨床試験が行われ有望な結果がでてきている。本邦でも、同様の徐放剤を用いた開発が進められつつあることは正しい方向性を示しているものと考えられる。恐らく、本邦にはこれまで考えられてきたよりも多い 300 名以上の患者が存在すると推測され、その意味でも本邦での製剤開発は急務である。

F：健康危険情報

なし

G：研究発表**1：論文発表**

Cho A, Hayashi YK, Monma K, Oya Y, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Mutation profile of the *GNE* gene in Japanese patients with distal myopathy with rimmed vacuoles (GNE myopathy). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. [Epub 2013 Sep]

Nalini A, Gayathri N, Nishino I, Hayashi YK: GNE myopathy in India. *Neurol India*. 61(4): 371-374, 2013

Nemazanyy I, Blaauw B, Paolini C, Caillaud C, Protasi F, Mueller A, Proikas-Cezanne T, Russell RC, Guan KL, Nishino I, Sandri M, Pende M, Panasyuk G: Defects of Vps 15 in skeletal muscles lead to autophagic vacuolar myopathy and lysosomal disease. *EMBO Mol Med*. 5(6): 870-890, 2013 [Epub 2013 Jun]

Stenzel W, Nishino I, von Moers A, Kadry MA, Glaeser D, Heppner FL, Goebel HH: Juvenile autophagic vacuolar myopathy – a new entity or variant? *Neuropathol Appl Neurobiol*. 39(4): 449-453, 2013

2：学会発表

なし

H：知的所有権の取得状況（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