

2014/5023A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等実用化研究事業
(難治性疾患実用化研究事業)

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 砂田芳秀

平成27(2015)年3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等実用化研究事業
(難治性疾患実用化研究事業)

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 砂田芳秀

平成 27(2015) 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	18
3. 古賀靖敏	21
4. 太田成男	24
5. 萩原宏毅	27
6. 西松伸一郎	30
7. 村上龍文	33
8. 大澤 裕	37
9. 武藤多津郎	40
10. 尾上祐行	44
11. 内山 剛	47
12. 白石裕一	50

13. 小川 厚	52
14. 中村道三	55
15. 西田勝也	57
16. 高橋哲也	60

III.研究成果の刊行に関する一覧表	63
-----------------------------	----

IV.研究成果の刊行物・別刷	67
-------------------------	----

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

DNA 二重らせんモデルを発見した Click は、tRNA のアンチコドンには正確なコドン認識のため何らかの転写後化学修飾が存在すると予言した (Click, J Mol Biol 19, 1966)。ミトコンドリア脳筋症 MELAS は tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子領域のクローバー構造の一塩基変異により発症する。分担研究者太田らは、正常 tRNA^{Leu(UUR)} ではアンチコドン 1 文字目がタウリン修飾を受けるが、MELAS 変異 tRNA^{Leu(UUR)} では修飾が欠損し (Yasukawa, JBC 275, 2000)、ミトコンドリア蛋白質の翻訳が障害される (Yasukawa, EMBO J 20, 2001) ことを発見して、世界に先駆け「tRNA 転写後化学修飾異常病」の概念を提唱した。この独創的知見から、太田らとの共同研究によりタウリン大量投与によるモデル細胞のミトコンドリア機能障害の改善、2 名の MELAS 患者の脳卒中様発作の 9 年余の抑制効果を証明して非臨床 POC を得た (Rikimaru, Intern Med 51, 2012)。その後、精神発達遅滞など 19 疾患で tRNA 転写後修飾異常病が報告されたが、われわれの他に治療介入研究はない (Torres, Trends Mol Med 20, 2014)。本研究は MELAS 患者における脳卒中様発作の再発抑制治療として、タウリン大量経口投与の有効性と安全性について臨床 POC を取得し、薬事承認を獲得する目的で平成 24 年 10 月に開始された。前観察期間 78 週、試験薬投与 54 週の多施設・オープン・第 3 相試験プロトコルを作成し、既に「うっ血性心不全・高ビリルビン血症」を適応にタウリンの薬事承認を得ている企業（大正製薬）から GMP 基準試験薬の提供を受けた。厚生労働省ミトコンドリア病調査研究（後藤）班の協力を得て、日本神経学会と日本小児神経学会との共同研究によってこれまで国内最大の MELAS 疫学調査を実施し、脳卒中様発作を反復する 10 施設 10 被験者を登録した。PMDA・IRB 承認を経て平成 25 年 10 月から平成 26 年 1 月まで期間 1 年で治験薬タウリンを投与した。これまでの集計では、主要評価項目「100%レスポンド率（発作完全抑制）」が 6 被験者で達成された。また FIH（First-in-human）で検討した、バイオマーカー候補のうち白血球 tRNA^{Leu(UUR)} タウリン修飾率は解析した 9 被験者中 5 被験者で投与後に有意に上昇した。年度末までに総括報告書を提出し、企業による優先薬事承認申請を、早期の論文作成によって支援する。また平成 26 年 1 月 6 日の厚生労働省難治性疾患実用化研究ヒアリングでは、長期投与治験への移行を勧告されたため、現在、日本医療研究開発機構研究費を申請中である。

研究分担者

砂田芳秀 川崎医科大学神経内科学 教授
(治験調整医師・治験責任医師)
後藤雄一 (独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第二部 部長
太田成男 日本医科大学大学院医学研究科 教授
古賀靖敏 久留米大学医学部小児科 教授

(治験責任医師)

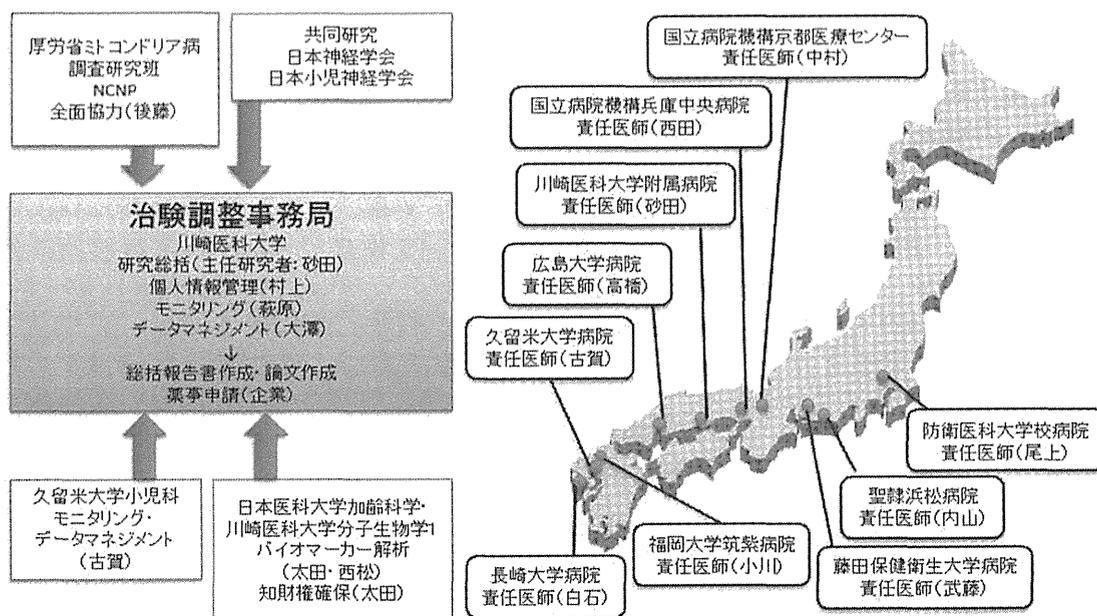
萩原宏毅 帝京科学大学医療科学部 教授
大澤 裕 川崎医科大学神経内科学 講師
萩原宏毅 帝京科学大学医療科学部 教授
西松伸一郎 川崎医科大学分子生物学1 講師
村上龍文 川崎医科大学神経内科学 准教授
武藤多津郎 藤田保健衛生大学医学部神経内科学 教授
尾上祐行 防衛医科大学校病院神経抗加

内山 剛 聖隷浜松病院神経内科 部長
 白石裕一 長崎大学病院神経内科 助教
 小川 厚 福岡大学筑紫病院小児科 教授
 中村道三 (独)国立病院機構京都医療センター神経内科 医長
 西田勝也 (独)国立病院機構兵庫中央病院神経内科
 高橋哲也 広島大学病院脳神経内科 講師 (治験責任医師)

積していく進行性の経過をとるため、その再発を抑制する治療法の確立が急務となる、いわゆる unmet medical needs に該当する。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。

分担研究者太田らは、世界に先駆け MELAS の A3243G 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

<研究体制と役割分担>

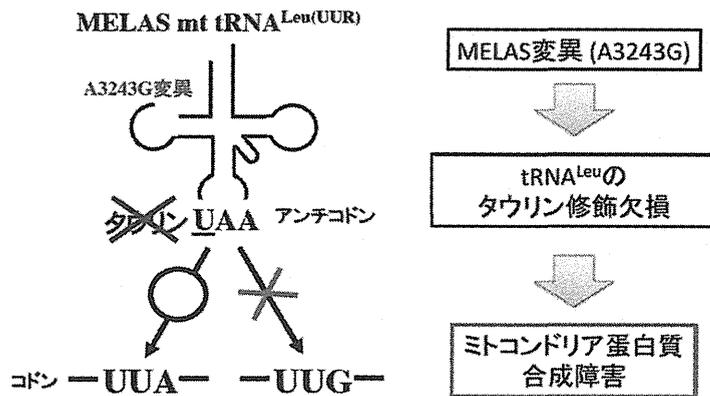


A. 研究目的

本研究は厚生労働省難治性疾患等克服研究事業として平成24年10月に開始された。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実施し有効性と安全性を検証し国内薬事承認を得ることを目的とする。

MELAS は希少疾患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

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 転写後化学修飾異常症であると世界に先駆け提唱した (Yasukawa, Ohta, et al. *EMBO J* 20, 2001, 図1)。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、回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, Ohta, Sunada, et al. *Intern Med* 51, 3351-3357, 2012)。これらの先行非臨床 POC 試験の結果からは、MELAS は1996年に二重らせんモデルを発見した Click が予言したコドンの



Kirino, Ohta et al. PNAS 101,2004

図1. 本研究の作業仮説。MELASはtRNA^{Leu}(UUR)タウリン修飾欠損病：タウリン大量投与によりMELAS基本病態は改善する。

正確な認識のための tRNA アンチコドン 1 文字目 (wobble nucleotide) の転写後化学修飾 (Click, J Mol Biol 19, 1966) の欠損病態と考えると矛盾しない。

タウリンは1987年にうつ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 (大正製薬) され、これまで重篤な副作用報告がなく安全性の高い既存医薬と考えられる。昨年度までに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、これまで国内最大数 (全 294 症例、このうち脳卒中様発作反復症例が 81 名) の MELAS 疫学調査を実施した。平成 25 年 10 月から投与期間 1 年間の計画で治験を実施し有効性・安全性を評価し、薬事承認申請に取り組んだ。

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。また、これまでに MELAS を含む 19 疾患で確認されている tRNA 修飾異常病で、われわれの他に病態介入研究は皆無である (Torres, Trends Mol Med 20, 2014)。

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・安全性の立証 (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 (モデル動物がないため First-in human で検討する)、③タウリン有効投与量の確認、を目標とした。有効性および安全性が証明されれば、企業 (大正製薬) もよる薬事承認申

請を支援できる。また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 出願も可能となる。

B. 研究方法

計画とその役割分担について具体的に記載する。

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、萩原) : 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治験患者登録・実施医療機関選定 (砂田、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と医療施設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。

⑤当局 (PMDA) 対応 (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纏め、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。

	全例 (N = 10)	アルギニン非併用 (N = 1)	アルギニン併用 (N = 9)
100%レスポ ンダー数 (%)	6 (6.0)	1 (100.0)	5 (55.6)
95%信頼区間	(26.2, 87.8)	n/a	(21.2, 86.3)

図4. 試験薬タウリンの脳卒中様発作再発抑制効果。
10症例中6症例は主要評価項目である脳卒中様発作完全消失を達成。95%信頼区間の下限は、全例で26.2%、アルギニン併用例で21.1%であり、プロトコルで定めた閾値100%レスポナー率5%を大きく上回り、臨床的有用性が示された。

⑦バイオマーカー候補のFIH解析（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い実施した。

⑧知財権確保（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・検討を行った。

⑨治験実施（治験調整医師・各実施医療施設の治験責任医師）：平成25年10月から平成26年1月までに、全10施設で観察期間1年の治験薬投与を実施した。投与期間中SAE報告はなく、平成27年1月末までに全参加施設で治験が終了した。

⑩モニタリング・データマネージメント（砂田、村上、大澤、萩原、西松）：昨年度引き続き医師主導治験を継続し、手順書に則して、治験受託会社と協力して、SDVを主体とするモニタリングおよびデータマネージメントを担当した。

⑪治験終了届書提出（砂田、大澤、萩原）：全参加施設で治験が終了した後、平成27年1月30日治験終了届書を作成し、当局に提出した。

⑫成果報告会実施（全員）：平成27年2月7日に、全参加医療施設からの治験責任医師および担当者の参加による成果報告

会を実施した。個別の症例検討を行った後、データを固定させた。

⑬総括報告書の作成（砂田、村上、大澤、萩原、西松）：EDCデータマネージメントにより、期間1年間のタウリン投与により「100%レスポナー率＝脳卒中様発作完全抑制」を主要評価項目とした有効性と安全性を検証し、総括報告書を作成する。

⑭長期継続投与への取り組み（砂田、村上、大澤、萩原、西松）：EDCデータマネージメントにより、平成25年10月から平成27年9月までの期間2年間のタウリン継続投与を実施する「臨床研究」プロトコルを作成し、治験受託会社の協力を得て実施している。

（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25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。治験は、平成24年発令の「臨床研究・治験活性化5か年計画」に基づいた医師主導治験として実施する。治験は、平成24年発令の「臨床研究・治験活性化5か年計画」に基づき、「医薬品の臨床研究の実施に関する省令（GCP）」に該当する医師主導治験として実施する。

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25年10月から平成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。主要評価項目は100%平成25年10月から平成26年1月迄に全施設で投与が終了した。

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、試験終了後廃棄した。

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月の薬事戦略相

$$\text{タウリン修飾率 (\%)} = \frac{\text{mt}^{\Delta}U_{34}}{U_{34} + \text{mt}^{\Delta}U_{34}} \times 100$$

主要評価項目	タウリン修飾率			
	登録例数	測定例数	上昇例数**	上昇割合 (95%信頼区間)
100%レスポnder	6	5	3	60.0% (14.7%, 94.7%)
Non-100%レスポnder	4	4	2*	50.0% (6.8%, 93.2%)
合計	10	9	5	55.6% (21.2%, 86.3%)

図5. mt tRNA^{Leu}(UUR) タウリン修飾率。試験薬投与前後(0週、52週)の被験者白血球検体から、それぞれプライマー伸張法で測定。タウリン修飾率の上昇割合は、100%レスポンスの有無に関わらず50-60%を示し、タウリンの有効性を支持する結果であった。

談で治験承認を得た。

③治験患者登録・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脳卒中様発作頻発症例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。

④治験プロトコル・同意説明文書作成・PMDA対応：プ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検討を重ね、PMDA事前面談を受けた。(i)対象患者年齢制限の撤廃(当初は成人のみ)、(ii)治験症例数の設定根拠の明確化(当初は10例)、(iii)タウリン経口投与量設定の理論的根拠(当初は0.25g/kg/day)の提示、(iv)主要評価項目の設定根拠、(v)アルギニン併用例の薬効評価、などについて批判と助言を受けた。こ

医師主導治験課題名	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
治験方法	多施設共同・オープン試験(第3相)
対象	脳卒中様発作を反復するMELAS患者(年齢・性別は不問)
症例数・投与期間	10症例・52週

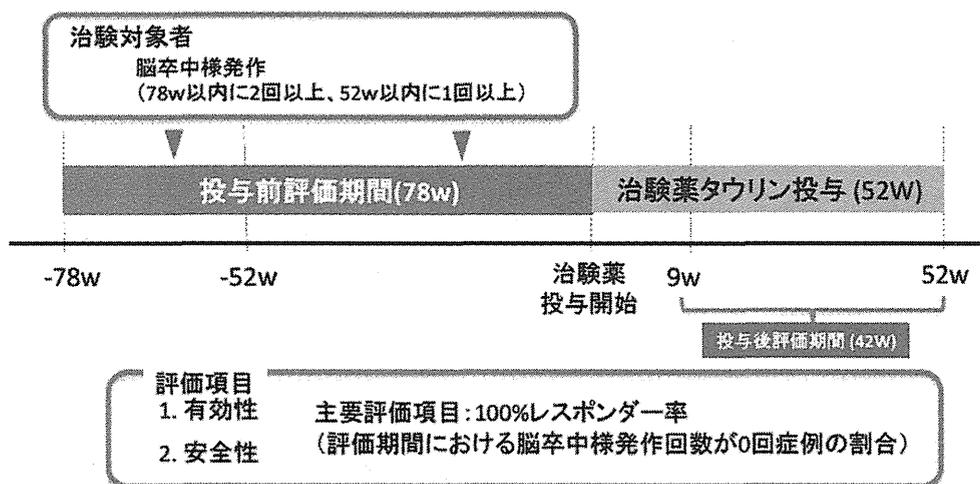


図2. 医師主導治験プロトコル概要.

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、プロトコルに準拠した患者同意説明文書を作成した。科学的・倫理的妥当性についての書類一式を整え平成25年7月PMDA薬事戦略相談を受け、治験承認を得た。

本治験のデザインは多施設共同・オープン・第3相で、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症例である(治験実施医療機関と役割分担図参照)。タウリンは体重区分により規定された1日用量(たとえば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年とする。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onder率(発作完全抑制)とし、発作の定義は、「突発性局所神経徴候(片麻痺・感覚消去・皮質盲・失語・失行・失認)があり頭部MRI拡散強調像で高信号が確認されるもの」とする(図2)。副次評価項目としてミトコンドリア病重症度スコア(JMDRS)、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)、頭部MRI所見について解析する。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が判定した。

⑤IRB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被験者を登録した。

⑥薬効バイオマーカー候補のFIH解析: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、ウェ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。次

医療機関名	実施状況	年齢	性別	投与量(g/日)	投与開始日	投与終了日	DNA点変異	アルギニン併用	治験薬投与開始後脳卒中様発作回数・このうちMRI高信号発作回数/期間	治験薬投与開始後脳卒中様発作回数・MELASストローク判定基準による発作回数/期間
川崎医科大学附属病院	終了	46	女	9	13/10/3	14/10/2	A3243G	あり	3回/3回/49週	0回/0回/52週
国立病院機構兵庫中央病院	終了	45	男	12	13/10/28	14/10/22	A3243G(G点変異率20%)	あり	2回/2回/66週	1回/1回/62週
国立病院機構京都医療センター	終了	30	女	12	13/10/31	14/11/6	A3243G	あり	6回/6回/56週	0回/0回/62週
藤田保健衛生大学病院	終了	19	男	12	13/11/2	14/11/7	A3243G	あり	2回/0回/78週	1回/1回/62週
福岡大学筑紫病院	終了	15	男	9	13/11/7	14/11/12	A3243G	あり	4回/3回/78週	3回/0回/62週
聖隷浜松病院	終了	31	男	12	13/11/14	14/11/13	T3271C	なし	3回/2回/78週	0回/0回/52週
長崎大学病院	終了	30	女	9	13/11/18	14/11/17	A3243G	あり	3回/2回/78週	1回/0回/62週
久留米大学附属病院	終了	14	男	9	13/12/8	14/12/1	A3243G	あり	4回/1回/78週	1回/1回/50週
広島大学病院	終了	38	男	12	13/12/27	14/12/19	A3243G	あり	2回/1回/78週	0回/0回/47週
防衛医科大学校病院	終了	23	男	12	14/1/7	14/12/22予定	A3243G	あり	4回/0回/78週	2回/1回/46週
合計									33回/200週	8回/4回

*2014年2月18日現在

図3. 試験薬タウリン投与前後の各被験者の脳卒中様発作回数。水色=100%レスポonder。

いで治験前後の被験者検体でFirst-in manでの解析した。

⑦タウリン大量療法の脳卒中様発作再発防止効果・安全性:現在までの責任医師による成果報告会(症例検討会)及び、モニターによるそのSDVによる集計から、全10被験者での、投与前評価期間78週と、投与期間52週の脳卒中様発作回数を比較した

(図3、2015年2月7日現在)。100%レスポonder(投与期間・評価期間における脳卒中様発作回数0回=完全抑制)は10被験者中6被験者で達成された。この結果はプロトコル作成時に設定した閾値5%を大きく上回り、臨床的有用性が示された。

一方、First-in manでの解析したバイオマーカー候補のうち、被験者白血球検体からプライマー延長法で解析したtRNA^{Leu(UUR)}タウリン修飾率は100%レスポンスの有無にかかわらず50-60%を示しタウリン有効性を支持する結果であった。

タウリン投与との因果関係のある有害事象および重篤な有害事象(SAE)は全経過中、報告されなかった。

・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事前審査・治験調整医師(治験総括)・治験責任医師(川崎医科大学病院)

後藤: 治験患者候補選定・実施医療機関選定・ミトコンドリア遺伝子解析・バイオマーカー解析

古賀: プロトコル作成・治験患者候補選定・患者登録・実施医療機関選定・治験責任医師(久留米大学病院)

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・治験患者候補選定・実施医療機関選定。薬効モニタリング

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・IRB審査・治験患者候補選定と実施医療機関選

定・薬効モニタリング

武藤多津郎: 治験責任医師・報告書作成

尾上祐行: 治験責任医師・報告書作成

内山 剛: 治験責任医師・報告書作成

白石裕一: 治験責任医師・報告書作成

小川 厚: 治験責任医師・報告書作成

中村道三: 治験責任医師・報告書作成

西田勝也: 治験責任医師・報告書作成

高橋哲也: 治験責任医師・報告書作成

・研究目的の達成度

平成26年度の目標である治験実施は概ね当初計画したタイムテーブルに沿って進捗した。2013年世界神経学会で主任研究者が発表し「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・治験実施。

・達成できなかった目的・目標

バイオマーカーの新規性によるPCT出願(現在検討中)
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っている。

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。この結果および情報は、現在、厚生労働省ミトコンドリア病調査研究(後藤)班が推進している、本邦の MELAS-national registry の基盤となると考えられる。

本研究で示された、タウリン投与による脳卒中様発作防止効果は、unmet medical needs に対する優先薬事承認に該当すると考えられる。現在、企業(大正製薬)による優先薬事承認申請に協力すべく、学術論文を作成している。現在、EDC データマネジメントにより、平成 25 年 10 月から平成 27 年 9 月までの期間 2 年間のタウリン継続投与を実施する「臨床研究」プロトコルを作成し、治験受託会社の協力を得て実施している。この結果を平成 26 年 1 月 6 日の厚生労働省難治性疾患実用化研究ヒアリングで発表したところ、長期投与治験の有効性の結果を得て国際展開するように強く勧告されたため、長期継続投与医師主導治験(ステップ 2-3)として、日本医療研究開発機構研究費を申請中である。

MELAS は、これまでモデル動物が作出できていないため、本治験では被験者検体を用いた FIH による薬効バイオマーカーアッセイ法の開発と、その測定を実施した。このうち血中白血球検体によるプライマー延長によるミトコンドリア tRNA^{Leu(UUR)} タウリン修飾率測定では、100%レスポンスの有無にかかわらず 50-60%を示しタウリン有効性を支持する結果であった。さらに tRNA^{Leu(UUR)}-rich ND6 蛋白質(全アミノ酸残基の 5%に相当)についてもタウリン投与によって有意に低下した被験者が存在することは、MELAS 基本病態を mt tRNA^{Leu(UUR)} 転写後化学修飾異常症であるとする、本研究の作業仮説に合致する可能性がある。これらの測定値と、血清および髄

液タウリン値の相関について、現在解析を進めている。また、今後は、タウリン大量投与によって、ミトコンドリア tRNA^{Leu(UUR)} タウリン修飾酵素(未同定)の「酵素誘導」が惹起されるか、についての詳細な基礎研究も必要となる。

本研究は「臨床研究・治験活性化 5 ヶ年計画 2012」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(Goto, *Nature* 348, 1990)され、tRNA 修飾異常症(Yasukawa, Ohta, et al. *EMBO J* 20, 2001)と新規疾患概念とその世界初の基本病態介入治療(Rikimaru, et al. *Intern Med* 51, 2012; Torres, *Trends Mol Med* 20, 2014)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基礎研究を基盤に、本邦 MELAS の最新疫学調査と、既存薬タウリンの大量経口投与による医師主導治験を実施した。100%レスポナー(投与期間・評価期間における脳卒中様発作回数 0 回=完全抑制)は 10 被験者中 6 被験者で達成された。この結果はプロトコル作成時に設定した閾値 5%を大きく上回り、臨床的有用性が示されたと考えている。また First-in man での解析したバイオマーカー候補のうち、被験者白血球検体からプライマー延長法で解析した tRNA^{Leu(UUR)} タウリン修飾率は 100%レスポンスの有無にかかわらず 50-60%を示しタウリン有効性を支持する結果であった。論文を取り纏め、協力企業(大正製薬)による優先薬事承認申請に協力する。

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. 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="655 1261 1128 1500"> <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

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点変異によって発症する。MELAS 変異 tRNA^{Leu(UUR)} アンチコドンでは、正常で認められるタウリン修飾が欠損し (Yasukawa, Ohta, JBC 275, 2000)、転写が障害される (Yasukawa, Ohta, EMBO J 20, 2001)。一方、タウリン大量投与によって MELAS モデル細胞のミトコンドリア機能障害が改善し、2 名の MELAS 患者の脳卒中様発作が 10 年以上完全に抑制された (Rikimaru, Sunda, Ohta, Intern Med51, 2012)。この POC 試験から、MELAS 基本病態は tRNA 修飾異常症と提唱し、平成 24 年度にタウリン特許を取得し、脳卒中の再発予防効果を効能効果とする薬事承認を目指す医師主導治験（多施設・オープン・第 3 相）実施を骨子とする本研究を開始した。エントリー基準は試験薬同意取得前 78 週以内に 2 回以上、かつ 52 週以内に 1 回以上の発作性突発性局所神経徴候とした。試験薬タウリンの投与期間は 52 週で、評価期間は 42 週間、主要評価項目は 100%レスポnder：脳卒中様発作完全抑制とした。薬効バイオマーカーとして、本治験では、ミトコンドリア tRNA^{Leu(UUR)} のタウリン修飾率、ミトコンドリア Leu(UUR)-rich ND6 蛋白質量、及びミトコンドリア遺伝子変異率（ヘテロプラスミー）について検討した。実施医療施設川崎医科大学病院では、エントリー基準の脳卒中様発作回数 3 回の 40 代 MELAS 女性 1 名を登録し治験を実施した。試験薬タウリン経口投与によって脳卒中様発作は完全に抑制され、薬効バイオマーカーのうち白血球ミトコンドリア tRNA^{Leu(UUR)} タウリン修飾率が有意に上昇した。タウリン大量経口投与による脳卒中様発作再発予防効果の有効性が検証できたものと考えられる。

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 (A43243G) を同定し (Goto, 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, Ohta, et al. JBC 275, 4251-4257, 2000) 希少難病で

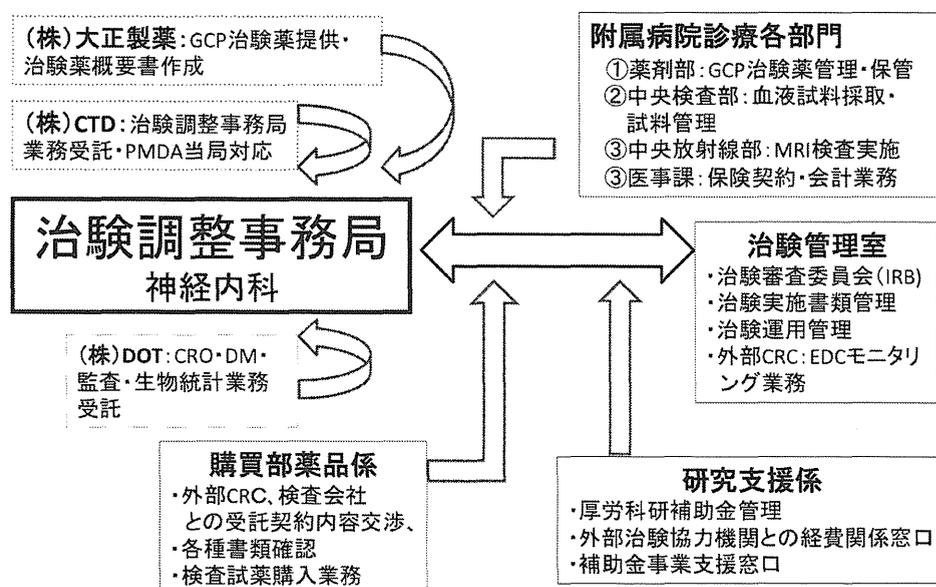


図1. 川崎医科大学治験実施体制