

「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 後藤 雄一 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

研究要旨

MELAS はミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のクローバーリーフ構造の点変異によって発症するが、そのメカニズムは不明であった。本研究は、MELAS 基本病態を変異 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> アンチコドンのタウリン修飾異常（tRNA 修飾異常病）と捉え、タウリン大量投与でその改善と脳卒中様発作再発予防を目指す医師主導治験である。平成 24 年度から 25 年度には、厚労省ミトコンドリア病調査研究（後藤）班として本研究を全面的にバックアップした。日本小児神経学会及び日本神経学会及びに協力を求め、MELAS 脳卒中様発作についての全国疫学調査共同研究を実施した。認定医施設（911 施設）の診療部長へのアンケートでは、これまでの疫学調査では最大の 291 名の MELAS 患者（小児科 63 名/神経内科 223 名）を集計できた。このうち脳卒中様発作反復患者は 83 名（小児科 33 名/神経内科 50 名）であった。この結果は世界的にも明確となっていない MELAS 自然歴の解明に繋がり、あわせて将来の National registry に向けた基盤データとなっている。次いで平成 25-26 年度は、ミトコンドリア遺伝子解析により、治験登録を実施した。さらに、FIH Firest-in-human) で実施した、血中バイオマーカー解析に協力し、実際に tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾率が上昇することを証明した。タウリン療法は、新しい疾患概念である「tRNA 転写後修飾異常病」への世界発の病態介入治療となる可能性がある。そこで、今後は、タウリン長期継続投与治験（AMED 採択）に協力し、①希少難病 MELAS の「National registry（自然歴の解明・軽症患者を含めた治験体制構築）」と、②タウリン療法とピルビン酸療法（(分担研究者古賀) 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療法（24-難治等（難）一般-005）との「治療アルゴリズムを構築し、希少疾患 MELAS の包括的な克服事業を加速する。

A. 研究目的

MELAS は、ミトコンドリア DNA の tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 遺伝子のクローバーリーフ領域の点変異（A43243G）が、80%の患者で認められる希少難病である(Goto Y, et al. *Nature* 348 : 651-651, 1990)。この遺伝子変異から脳卒中様発作など多様な臨床発症に至る分子メカニズムの全容については未だに解明されていない。

分担研究者太田らは、MELAS の変異 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のアンチコドン 1 文字目の塩基である U34 で、正常で認められるタウリン修飾の欠損を発見し (Yasukawa T, Ohta S, et al. *JBC* 275 : 4251-4257, 2000)、このタウリン修飾欠損と MELAS 臨床症状との相関を

示した (Kirino Y, et al. *PNAS* 102 : 7127-7132, 2005)。さらに、研究代表者らによってタウリンを大量投与することによって MELAS モデル細胞の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長期に抑制されることが報告され、RNA 修飾異常のタウリン大量治療の可能性が示された (Rikimaru M, et al. *Intern Med.* 51, 3351-3357, 2012)。

タウリンはうっ血性心不全と高ビリルビン血症に対し既に薬事承認されているアミノ酸であるため、容易に保険適応外投与が行われ得る。そこで、厚労省ミトコンドリア病調査研究（後藤）班は、研究代表者らに、タウリンの MELAS 脳卒中様発作再発

予防の薬事承認を目的とする厳密な医師主導治験を開始するよう勧告し、本研究を全面的にバックアップした。

まず、MELAS 全国疫学アンケート調査に協力し、この疫学データを踏まえ、将来の自然歴把握と National registry 構築の基盤とすることを目指して研究を進めた。次いで、ミトコンドリア遺伝子解析を実施し治験登録を推進した。さらに First-in-human (FIH) で実施したバイオマーカー解析に協力した。

## B. 研究方法

①MELAS 疫学全国調査：研究代表者に協力し、日本神経学会、日本小児神経学会との疫学共同研究を立案した。平成 25 年 1 月下旬から本邦 MELAS 患者の疫学・自然歴を把握するための一アンケート票を専門医療施設の診療部長宛てに発送し、集計に協力した。

②ミトコンドリア遺伝子解析：治験登録基準に合致するが、遺伝子解析が未施行の候補患者について、ミトコンドリア DNA を抽出し変異解析を行った。

③バイオマーカー白血球 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾率解析：研究代表者に協力し、解析デザインを立案した。

(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。治験登録候補患者の遺伝子解析については、患者の同意のもと、藤田保健衛生大学およびNCNPの倫理委員会の承認を得て、その規定を遵守して施行した。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された。

## C. 研究結果

①MELAS 全国疫学調査：われわれは、MELAS 疫学および自然歴調査のため、研究代表者が作成した MELAS 疫学研究を改訂した。日本小児神経学会に共同研究申請をおこなった。この申請が採択され、小児神経学会認定施設(141 施設)へ MELAS 患者に対する疫学アンケート票を郵送し調査協力を

依頼した。現在までに 87 施設/61.7%の解答を得て、本邦の小児科医の診療する MELAS 患者疫学について最新情報が得られた。同様に日本神経学会と共同研究をおこない神経学会認定施設(770 施設)の MELAS 患者について調査した。これまで最大の 291 名の MELAS 患者が集まり、このうち 2 年間に 2 回以上の脳卒中様発作反復患者数は、83 名で、小児科が 33 名、神経内科が 50 名であった。さらに、登録・実施医療機関選定のための二次調査および三次調査に協力した。

②National registry：ミトコンドリア調査班の分担研究者である小牧宏文が平成 25 年 7 月の本治験キックオフミーティングに参加し希少難病である MELAS の本邦の National registry の現状と問題点について発言した。これを受けて、調査班全体として本治験への患者・実施施設登録への協力体制構築に協力した。NCNP が進めている Remudy システムによる National registry を基盤として、今後は International registry への展開を図っている。

③ミトコンドリア遺伝子解析：遺伝子解析が未施行である治験登録候補患者について、タウリン修飾欠損が予想される m tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 遺伝子領域の詳細な遺伝子解析を実施し、その治験登録の可否を判定した。

④白血球 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> タウリン修飾率測定：分担研究者は、ミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 遺伝子領域の A3243G, T3271C, G3244A, T3258C, T3291C で tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> タウリン修飾率について検討した先行研究を実施している。この情報を分担研究者西松の伝達し、FIH で被験者血中白血球検体を用いて実施されるタウリン修飾率デザインと、その評価について助言した(結果の詳細は分担研究者西松の項参照)。

## D. 考察

本研究は厚生労働省および文部科学省の「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希少疾患 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。本研究で得られたわが国の MELAS 疫学情報は、将来予定される、ピルビン酸・EPI 等の治験についての重要な基礎データとなるものと考えられる。難治疾患 MELAS の克服に向けた National registry への取り組みが必要と考えられた。本治験から新規疾患概念である tRNA 修飾異常病 (Torres AG, et al. Y, et al. *Trends Mol Med* 20 : 306-314, 2014) の世界初の薬事承認を得たい。

本研究は 3 年間の期限があり、治験薬投与前評価を 1-1.5 年、試験薬投与を 1 年という、短期評価をせざるを得なかった。そこで、平成 27 年度から 29 年度の長期継続投与を AMED に申請し、採択された。今後は、本タウリン療法及び分担研究者古賀によるピルビン酸療法と連携し、AMED 採択時の課題である、①「National registry」および②「治療アルゴリズム」構築に取り組み、この希少難治性疾患の包括的克服に取り組む。

## E. 結論

ミトコンドリア病調査研究班、日本小児神経学会、日本神経学会の協力により、本治験の患者登録のための MELAS 全国アンケート調査を実施して本邦 MELAS 患者の実態についての最新情報を得た。また FIH で被験者血中白血球検体を用いて実施された白血球 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> タウリン修飾率測定に協力した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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

(著書)

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

後藤雄一 : ミトコンドリア病, 267-271 (図説分子病態学 改訂第 5 版、中外医学社、東京) 2014. 5. 10

後藤雄一 : ミトコンドリア病, 831-833 (小児の治療指針、小児科診療 2014 年増刊号、診断と治療社、東京) 2014. 4. 2

後藤雄一 : ミトコンドリア病, 817-822 (神経症候群Ⅲ (第 2 版)、日本臨床別冊、大阪) 2014. 6. 20

後藤雄一 : ミトコンドリア病, 251-252 (2015-2017 神経疾患最新の治療、南江堂、東京) 2015. 1. 30

(総説)

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

### 2. 学会発表

(国際学会)

Sakai C, Matsushima Y, Sasaki M, Miyamoto Y, Goto Y: Targeted exome sequencing identified a novel genetic disorder in mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation. Euromit 2014, Tampere, Finland, 6.16, 2014

Matsushima Y, Hatakeyama H, Takeshita E, Kitamura T, Kobayashi K, Yoshinaga H, Goto Y. Leigh-like syndrome associated with calcification of the bilateral basal ganglia caused by compound heterozygous mutations in mitochondrial poly(A) polymerase. Euromit 2014, Tampere, Finland, 6.16, 2014

Goto Y: Mitochondrial Disease. Asian & Oceanian Epilepsy Congress 2014.

Singapore, 8.7, 2014

(国内学会)

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. 11.23, 2013, 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. 11.23, 2013, 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. 11.23, 2013, 仙台

後藤雄一：ミトコンドリア病に関わる基礎研究の進展. 企画セミナー 1 ミトコンドリア病：A reappraisal. 第 56 回日本小児神経学会学術集会, 浜松, 5.30, 2014

後藤雄一：ミトコンドリア脳筋症：MELAS の脳卒中発作に対するタウリン療法の開発. 共同研究支援委員会主催セミナー. 第 56 回日本小児神経学会学術集会, 浜松, 5.30, 2014

水野葉子、三牧正和、太田さやか、下田木の実、高橋長久、岩崎博之、齊藤真木子、岡明、水口雅、後藤雄一：ミトコンドリア呼吸鎖異常省の診断における Blue-Native 電気泳動 (BN-PAGE). 第 56 回日本小児神経学会学術集会, 浜松, 5.30, 2014

坂井千香、松島雄一、山口清次、佐々木征行、宮本雄策、後藤雄一：ECHS1 の変異は呼吸鎖の活性低下を伴う Leigh 脳症を引き起こす. 第 14 回日本ミトコンドリア

学会年会, 福岡, 12.5, 2014

金田大太、新宅雅幸、窪田-坂下美恵、加藤忠史、後藤雄一：MELAS 脳卒中発作における AQP4 の発現低下. 第 14 回日本ミトコンドリア学会年会, 福岡, 12.5, 2014

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

「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 古賀 靖敏 久留米大学医学部小児科・教授

研究要旨

MELAS ではミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 遺伝子の A3243G 変異が見られる。太田らは、正常 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のアンチコドン 1 文字目はタウリン修飾をうけるが、MELAS 型変異 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> ではこの修飾が欠損するため (Yasukawa, JBC 275, 2000)、転写が障害される (Yasukawa, EMBO J 20, 2001) ことを世界に先駆けて発見報告した。本治験の目的は、タウリン経口療法によって、MELAS の脳卒中様発作を予防でき、且つ、ミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾率の改善、Complex I 構成蛋白質 (ND6) 量の増加、ミトコンドリア遺伝子変異率 (ヘテロプラスミー) の軽減が達成されるかなど、有効性と安全性を検証する事である。本院では、A3243G 変異を有する小児型 MELAS 1 名について、医師主導治験を行った。2013 年 12 月から一年間のタウリン内服により、発作の発現や臨床症状の重症度の変化について観察した。しかしながら、当院の患者は、期間中に残念ながら典型的な脳卒中様発作を起こした。また、タウリン使用前後のミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾率、Complex I 構成蛋白質 (ND6) 量、ミトコンドリア遺伝子変異率 (ヘテロプラスミー) は、それぞれ、38.48±2.71 が 28.35±3.72 へ、31.3±2.6 が 22.9±3.5 へ、57.8±1.21 が 56.9±0.96 へと全く改善が見られなかった。本児では、タウリン内服後もタウリン修飾率の改善、Complex I 構成蛋白質 (ND6) 量、ミトコンドリア遺伝子変異率 (ヘテロプラスミー) いずれも変化なく、逆に悪化した結果となり、脳卒中様発作も起こしたことから、タウリン内服による有効性は検証できなかった。

A. 研究目的

タウリン内服により、MELAS の脳卒中様発作を予防でき、且つ、ミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾率の改善、Complex I 構成蛋白質 (ND6) 量の増加、ミトコンドリア遺伝子変異率 (ヘテロプラスミー) の軽減が達成されるかを検証する目的で、医師主導治験に参加、治験での有効性と安全性の検証を行った。

B. 研究方法

川崎医科大学タウリン治験ワーキンググループが作成した治験プロトコールに従って、1例の小児型 MELAS 患者で、タウリンを内服し、治療効果について検証した。治験参加に先立って、久留米大学臨床試験審査委員会 (IRB) に本治験プロトコールを申請し、久留米大学治験センターの承認を得た。

(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、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、久留米大学臨床試験審査委員会 (IRB) の規定に従って、患者の同意を得て実施された。

選択・除外基準。

選択基準

- (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
- (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
- (3) 同意取得時の年齢、性別、入院・外来は不問
- (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

(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であり、当院患者は、アルギニン服薬患者であるため、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）

(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

(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を満たしていたためにエントリー可能となった。

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があり、何れの条件にも抵触しないためにエントリー可能となった。

（倫理面への配慮）

本治験研究は、倫理面で久留米大学の IRB にて承認申請を得ており、実施に当たっては、最新の注意を払って行われた。

## C. 研究結果

患者：小児型 MELAS 1 名。

現在までに 13 回の脳卒中様発作を起こしていた。背景調査では、平成 24 年 9 月 3 日、平成 24 年 11 月 27 日、平成 25 年 5 月 28 日、平成 25 年 8 月 20 日の 4 回脳卒中様発作を起こしていた。選択除外基準に照らして、エントリー可能であった。タウリンの投与開始時期は平成 25 年 12 月 6 日からで、1 年間の治験を実施した。その後、タウリン内服開始後、8 か月後の平成 26 年 8 月 20 日頃より、頭痛、嘔吐、右半身のけいれん、不全麻痺が発現した。その後、救急車にて病院受診し、脳卒中様発作として、緊急に L-アルギニンの 0.5 g / k g / one shoot を静注し、入院して経過観察した。右半身のけいれん、不全麻痺は静注後 1-2 時間で回復したが、頭痛と軽度の嘔気は翌日まで残存した。発症後翌日の 8 月日に拡散強調画像を含めた、頭部 MRI 施行し、右後頭、側頭、頭頂部にかけての異常画像を確認した。その後、臨床症状は徐々に 2-3 日で改善し、5 日目に退院となった。そのほかにも 2 回程度、脳卒中様発作を疑う症状が発現したが、数時間で症状が消失したため、発作とは考えていない。

タウリン使用前後のミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾率、Complex I 構成蛋白質 (ND6) 量、ミトコンドリア遺伝子変異率（ヘテロプラスミー）は、それぞれ、38.48±2.71 が 28.35±3.72 へ、31.3±2.6 が 22.9±3.5 へ、57.8±1.21 が 56.9±0.96 へと、全く改善が見られなかった。

## D. 考察

本児では、タウリン内服後にも、脳卒中様発作を起こし、且つミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾率、Complex I 構成蛋白質 (ND6) 量、ミトコンドリア遺伝子変異率（ヘテロプラスミー）が改善する事はなかった。他の施設の患者では、タウリンが脳卒中様発作を予防し、修飾率も改善した症例もあり、タウリン修飾に現在考えられている他の因子が関与しているものと推測される。

## E. 結論

我々の MELAS 症例では、タウリンの有

効性を検証することは出来なかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Fujii T, Nozaki F, Saito K, Hayashi A, Nishigaki Y, Murayama K, Tanaka M, Koga Y, Hiejima I, Kumada T. Efficacy of pyruvate therapy in patients with mitochondrial disease: A semi-quantitative clinical evaluation study. *Mol Genet Metab* 112(2) 133-8, 2014

Fujita Y, Ito M, Kojima T, Yatsuga S, Koga Y, Tanaka M. GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion* 2034-42, 2015

Katayama K, Povalko N, Yatsuga S, Nishioka J, Kakuma T, Matsuishi T, Koga Y. New TRPM6 mutation and management of hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia. *Brain Dev.* 2015. (in press)  
doi:10.1016/j.braindev.2014.06.006

Wei F-Y, Zhou B, Suzuki T, Miyata K, Ujihara Y, Horiguchi H, Takahashi N, Xie P, Michiue H, Fujimura A, Kaitsuka T, Matsui H, Koga Y, Mohri S, Suzuki T, Oike Y, Tomizawa K. Cdk5rap1 mediated 2-methylthio modification of mitochondrial tRNAs governs protein translation and contributes to myopathy in mice and humans. *Cell Metabolism* (in press) 2015, cmet.2015.01.019

### 2. 学会発表

Koga Y. Pharmacologic therapy for mitochondrial myopathies. The Joint 13th AOMC Annual Scientific Meeting and 20th PNA Midyear Convention. 2014. 5. 14-17 (Manila, Philippines)

Koga Y, Nakamura H, Yatsuga S, Tanaka M. Development of therapeutic drug of

Sodium Pyruvate (SP) for lactic acidosis associated with mitochondrial disorders. *Mitochondrial Medicine* 2014 - Pittsburgh. 2014. 6. 4-7 (Pittsburgh, USA)

Yatsuga S, Koga Y. Growth differentiation factor 15 and fibroblast growth factor 21: novel biomarkers for mitochondrial diseases. *Mitochondrial Medicine* 2014 - Pittsburgh. 2014. 6. 4-7 (Pittsburgh, USA)

Yatsuga S, Koga Y. Growth differentiation factor 15 and fibroblast growth factor 21: novel biomarkers for mitochondrial diseases. *International Meeting on Mitochondrial Pathology* 2014. 2014. 6. 15-19 (Tampere, Finland)

Koga Y. Development of therapeutic drug of sodium pyruvate (SP) for lactic acidosis associated with mitochondrial disorders. 11th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research & Medicine. 2014. 11. 13-16 (Taipei, Taiwan)

古賀 靖敏、ピルビン酸ナトリウム治療法開発チーム。ミトコンドリア脳筋症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。第117回日本小児科学会学術集会。2014. 4. 11-13 (名古屋)

金城さおり、豊浦麻記子、吉年俊文、喜久山至、小濱守安、閑野将行、源川隆一、八ツ賀秀一、古賀靖敏。ピルビン酸ナトリウムを開始したミトコンドリア呼吸鎖異常症の6か月男児。第87回日本内分泌学会学術総会。2014. 4. 24-26 (福岡)

八ツ賀秀一、古賀靖敏。血漿 FGF21 は筋

症状を伴うミトコンドリア病のバイオマーカーになる. 第 56 回日本小児神経学会学術集会. 2014. 5. 29-31 (浜松)

八ツ賀秀一、佐々木孝子、古賀靖敏. 健康日本人の血漿 FGF21 値の検討. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会. 2014. 9. 25-27 (浜松)

Yatsuga S, Koga Y. Growth differentiation factor-15 (GDF-15): a most reliable biomarker for mitochondrial disorders. 第 56 回日本先天代謝異常学会. 2014. 11. 13-15

八ツ賀秀一、石井亜紀子、藤田泰典、小島俊男、伊藤雅史、田中雅嗣、角間辰之、古賀靖敏. GDF-15&FGF-21 : ミトコンドリア病の新規バイオマーカー. 第 14 回日本ミトコンドリア学会年会. 2014. 12. 3-5 (福岡)

G. 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

「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 太田成男 日本医科大学大学院医学研究科・教授

研究要旨

MELAS はミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 遺伝子のクローバーリーフ領域の一塩基変異によるが発症機構は不明であった。私たちは、正常 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のアンチコドン 1 文字目はタウリン修飾をうけ、一方 MELAS 変異 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> ではこの修飾が欠損するため (Yasukawa, JBC 275, 2000)、転写が障害される (Yasukawa, EMBO J 20, 2001) ことを発見した。この発見により MELAS の基本病態は RNA 修飾異常症であると提唱し、タウリンの治療特許を取得した。本治験ではタウリン経口療法によって、ミトコンドリア Complex I 構成蛋白質 (ND6) 量の増加、ミトコンドリア遺伝子変異率 (ヘテロプラスミー) の軽減が認められるかを、患者白血球試料を用いて解析した。臨床試験の結果、タウリンの大量経口投与によって、患者 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾を示唆する例が見つかった。

A. 研究目的

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 文字目は何らかの化学修飾を受けていると予言した (Click, J Mol Biol 19, 1966)。MELAS はミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 遺伝子のクローバーリーフ領域の一塩基変異によるが発症機構は不明であった。われわれは世界に先駆け、正常 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のアンチコドン 1 文字目がタウリン修飾を受け、一方 MELAS 変異 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> ではこの修飾が欠損し (Yasukawa, JBC 275, 2000)、転写が障害される (Yasukawa, EMBO J 20, 2001) ことを発見した。この結果から MELAS の基本病態を tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾異常症と提唱し、タウリン大量投与により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 10 年以上抑制されることを報告した (Rikimaru, Ohta, et al. Intern Med 51, 2012)。

本治験はタウリン経口療法によって、ミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾率が改善するという作業仮説 (太田：特許第 5028639) を基盤とした臨床治験で

ある。

また、tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> は、UUA と UUG のコドン認識するが、タウリン修飾が欠損すると UUA のみを認識するようになる (Kirino, Ohta. et al. PNAS 101, 15070-15075, 2004)。UUG のコドンの比率が最も多いサブユニットは、ND6 (complex I; NADH-ユビキノン酸化還元酵素サブユニット 6) である。そこで、タウリン大量投与後に ND6 の含量が変化するかどうかを調べた。また、変異ミトコンドリア DNA の比率の変化も調べた。

B. 研究方法

タウリンの大量経口投与の前後で、血液から白血球画分を分離、凍結保存した。(1) 変異ミトコンドリア DNA (mtDNA) の比率の変動について、治療前後の血液細胞において、3243 変異については mtDNA の tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 遺伝子領域を PCR で増幅し、3243 変異については、制限酵素 (ApaI) で切断し、電気泳動によって変異 mtDNA と正常 mtDNA の比率を求めた。また、3271 変異においては、ミスマッチ PCR によって、変異 mtDNA と正常 mtDNA の比率を求めた。なお、定量的に正しい値を得るために、PCR においては、直線上に増加して

いる条件を用いた。

(2)ND6 の定量については、抗 ND6 抗体を用いた Western blot により行った。なお、標準としては、actin を用いて、ほとんど actin 量が一定になるような条件で測定した。

(倫理面への配慮)

すでに分離された試料を用いており、匿名化されているので、倫理的な問題はない。本研究は、日本医科大学の倫理審査委員会にて承認を受けている。

### C. 研究結果

(1)予備実験において、変異 mtDNA の比率が正確に測定できる条件を決定した。また、ND6 の含量は、Westernblot により測定できることを示した。血液試料では、血清中のアルブミンの混入が避けられないが、分子量の大きさが異なるので、ND6 の測定に影響を及ぼさないことを確認した。

(2)変異 mtDNA と正常 mtDNA の比率は、タウリン投与後に変異率が増加した例は 1 例、減少した例は 3 例、変化がほとんどなかった例は 6 例であったので、全体としての傾向は認められなかった。

(3)ND6 の変化

ND6 が有意に増加した症例は 1 例。増加した傾向が見られた症例は 1 例、減少した傾向があった症例は 2 例であった。全体としては、明確な傾向はみられなかった。しかし、3271 変異をもつ患者では、有意に ND6 の量の増加が認められた。この症例では、変異 mtDNA の比率に変化がなかった。

### D. 考察

血液細胞において、変異 mtDNA と ND6 の測定が正確にできることを確認した。その測定法にて調べた結果、タウリン大量投与により、全体としては変異 mtDNA の比率の変化は認められなかった。また、全体としては、ND6 の変化は認められなかったが、3271 変異を持つ症例においては、タウリンの大量投与後に、ND6 の増加が認められた。

ND6 の増加は、ND6 の合成の増加または、分解の減少の可能性があるが、tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) のタウリン修飾によって、ND6 タンパク質

の合成増加の可能性はありうる。

### E. 結論

全体として、タウリン大量投与による変異 mtDNA の比率の変化は認められなかった。全体としては、ND6 の変化は認められなかったが、3271 変異を持つ症例においては、タウリンの大量投与後に、ND6 の増加が認められた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Kanamaru T, Kamimura N, Yokota T, Nishimaki K, Iuchi K, Lee H, Takami S, Akashiba H, Shitaka Y, Ueda M, Katsura KI, Kimura K, Ohta S.: Intravenous transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells prevents memory impairment in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2015 in press.

Yokota T, Kamimura N, Igarashi T, Takahashi H, Ohta S., Oharazawa H: Protective effect of molecular hydrogen against oxidative stress caused by peroxynitrite derived from nitric oxide in rat retina. *Clin Experimental Ophthalmol.* 2015 in press.

Kanamaru T, Kamimura N, Yokota T, Iuchi K, Nishimaki K, Takami S, Akashiba H, Shitaka Y, Katsura K, Kimura K, Ohta S.: Oxidative stress accelerates amyloid deposition and memory impairment in a double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2015;587:126-31.

Hayashida K, Sano M, Kamimura N, Yokota T, Suzuki M, Ohta S., Fukuda K, Hori S.: Hydrogen Inhalation During Normoxic Resuscitation Improves Neurological Outcome in a Rat Model of Cardiac Arrest, Independent of Targeted Temperature Management. *Circulation.* 2014;130(24):2173-80.

Yokoyama M, Okada S, Nakagomi A, Moriya

- J, Shimizu I, Nojima A, Yoshida Y, Ichimiya H, Kamimura N, Kobayashi Y, Ohta S, Fruttiger M, Lozano G, Minamino T.: Inhibition of endothelial p53 improves metabolic abnormalities related to dietary obesity. *Cell Rep*. 2014;7(5):1691-703.
- Nakashima Y, Ohsawa I, Nishimaki K, Kumamoto S, Maruyama I, Suzuki Y, Ohta S.: Preventive effects of Chlorella on skeletal muscle atrophy in muscle-specific mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 activity-deficient mice. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:390.
- Wolf AM, Nishimaki K, Kamimura N, Ohta S.: Real-time monitoring of oxidative stress in live mouse skin. *J Invest Dermatol*. 2014;134(6):1701-1709.
- Lee H, Kiuchi T, Muto J, Ohta S, Mikami T.: Intense exercise enhances the hippocampal proliferation of progenitor cells via activating the Flkl signaling cascade in mice. *J. Internal Med. Pharmacol*. 2014; 173:329-40.
- 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*. 2013;8(7):e69178.
- 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*. 2013;8(7):e66996.
- Yoritaka A, Takanashi M, Hirayama M, Nakahara T, Ohta S, Hattori N.: Pilot study of H<sub>2</sub> therapy in Parkinson's disease: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Mov Disord*. 2013;28(6):836-9.
- Hayashida K, Sano M, Kamimura N, Yokota T, Suzuki M, Maekawa Y, Kawamura A, Abe T, Shigeo Ohta S, Fukuda K, Hori S: H<sub>2</sub> gas improves functional outcome after cardiac arrest to an extent comparable to therapeutic hypothermia. *J. Am. Heart Assoc*. 2012; 1(5):e003459.
- Hoshi H, Hao W, Fujita Y, Funayama A, Miyauchi Y, Hashimoto K, Miyamoto K, Iwasaki R, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto H, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Kitagawa K, Nakayama KI, Kawamoto T, Sano M, Fukuda K, Ohsawa I, Ohta S, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Miyamoto T.: Aldehyde-stress resulting from Aldh2 mutation promotes osteoporosis due to impaired osteoblastogenesis. *J. Bone Miner Res*. 2012; 27(9):2015-23.
- Sakurazawa M, Katsura K, Saito M, Asoh S, Ohta S, Katayama Y.: Mild hypothermia enhanced the protective effect of protein therapy with transductive anti-death FNK protein using a rat focal transient cerebral ischemia model. *Brain Res*. 2012;1430:86-92.
- Rikimaru M, Ohsawa Y, Wolf AM, Nishimaki K, Ichimiya H, Kamimura N, Nishimatsu S-i, Ohta S, Sunada Y.: Taurine ameliorates impaired mitochondrial function and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS. *Internal Med*. 2012; 51(24):3351-7.
- Koga Y, Tanaka M, Ohta S, Wei YH.: Biochemistry of mitochondria, life and intervention 2010. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(5):551-2.
- Kashio A, Sakamoto T, Kakigi A, Suzuki M, Suzukawa K, Kondo K, Sato Y, Asoh S, Ohta S, Yamasoba T.: Topical

application of the antiapoptotic TAT-FNK protein prevents aminoglycoside-induced ototoxicity. *Gene Ther.* 2012;19(12):1141-9.

Ohta S.: Molecular hydrogen as a novel antioxidant: overview of the advantages of hydrogen for medical applications. *Methods Enzymol.* 2015;555:289-317.

Ohta S.: Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine. *Pharmacol Ther.* 2014;144(1):1-11.

Zhai X, Chen X, Ohta S, Sun X.: Review and prospect of the biomedical effects of hydrogen. *Med Gas Res.* 2014;4(1):19.

太田成男: 水素医学の創始、展開、今後の可能性: 広範な疾患に対する分子状水素の予防ならびに治療の臨床応用へ向かって 生化学会雑誌 2015; 87(1)82-90.

太田成男: 医療への水素利用 ケミカルエンジニアリング 化学工業社 pp42(206)-48(212), 2015

太田成男: ミトコンドリア DNA 構造と発現制御 *Clinical Neuroscience* ミトコンドリア病 up to date 2012;30(9):988-991

太田成男: 酸化ストレス制御とアンチエイジング *SURGERY FRONTIER* 2012;19(2):80(184)-83(187).

太田成男: 水素医学の現状: 基礎医学から臨床医学へ *ファルマシア* 2012;48(8) 767-771.

## 2. 学会発表

太田成男: ミトコンドリア tRNA のタウリン修飾とその機能 第 1 回国際タウリン研究会日本部会 神戸 2015. 2. 21.

太田成男: ミトコンドリア活性酸素の実時間計測、酸化ストレス亢進マウスの作製、新概念の抗酸化物質としての水素 第 36 回日本基礎老化学会シンポジウム 東京 2014. 10. 25.

太田成男: 水素医学の展開: 基礎医学から臨床応用へ向かって日本性機能学会 第 25 回学術総会 仙台 2014. 9. 5.

太田成男: ケトン体代謝について 糖尿病新治療 東京 2014. 8. 27.

太田成男: How To 水素治療 第 14 回日本抗加齢医学会総会 大阪 2014. 6. 7.

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 大阪 2013. 4. 21.

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 横浜 2013. 6. 28.

太田成男: 細胞は若返る- 人体の不思議をミトコンドリアが解き明かす- JASIS2013 幕張メッセ 2013. 9. 5.

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

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 東京国際フォーラム 2013. 10. 21.

Ohta Shigeo: 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, Mol Med Part of WGC China 2013. 11. 15.

Ohta Shigeo: 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.

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. 11. 22.

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 日本運動指導士会岡山支部 岡山 2013. 11. 23.

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 東京 2013. 11. 24.

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 京都 2013. 12. 01.

Shigeo Ohta: Recent progress toward hydrogen medicine. International symposium of Mitochondrial biomedicine China 2012. 4. 8.

太田成男: 水素医学の発展と健康への貢献 日本アンチエイジング歯科学会 名古屋 2012. 5. 19

太田成男: 東洋はり医学会 ミトコンドリアを維持し、増やすための生活の知恵 東京 2012. 5. 13

太田成男: 老いと若さを制御するミトコンドリア エイジングサイエンスシンポジウム 東京 2012. 6. 7.

太田成男: 水素医学の展開 日本NO学会 学術集会神戸 2012. 6. 29

太田成男: ミトコンドリアはどこ迄老化

と若返りに関与している? 日本抗加齢医学会 2012. 9. 30 札幌

太田成男: 水素による抗酸化作用とアンチエイジング効果 第6回東京眼科アカデミー 東京 2013. 1. 20

太田成男: 水素医学研究 update-2012 分子状水素医学シンポジウム 東京 2013. 2. 10

## G. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

取得した特許等知的財産権

特許: 028639号

<http://www1.ipdl.inpit.go.jp/>

RS1/cgi-bin/RS1P400.cgi/9001/

発明の名称: ミトコンドリア病の予防又は治療薬

出願人 太田成男

出願日 平成13年8月2日

出願国 日本

登録日 平成24年7月6日

特許番号 5028639

登録国 日本

特許満了日 平成33年8月1日

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

「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 萩原 宏毅

帝京科学大学 医療科学部・教授

研究要旨

ミトコンドリア脳筋症 MELAS はミトコンドリア病で最も頻度の高い病型で、脳卒中様発作を繰り返す進行性の経過をとるため、発作の再発を抑制する治療法の確立が急務である。本疾患では、ミトコンドリア DNA の tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 遺伝子一塩基置換が同定され、変異 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> においてアンチコドンのタウリン修飾が欠損していることが発見された。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の改善が認められ、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た。これらの知見に基づき、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目的で本研究を開始した。平成 24 年度は、本研究を厚生労働省難治性疾患克服研究事業・医師主導治験として実施するため、治験実施計画（プロトコル）の作成、関連書類の準備、行政当局（PMDA）との対応などを実施し、治験開始に向けたインフラの整備を進めた。平成 25 年度は、6 月に PMDA の薬事戦略相談を受け、7 月に治験の承認が得られた。これを受け IRB 審査を申請し承認を受けた。また、キックオフミーティングを開催し、治験参加医療施設と理解の共有を図った。これらにより当初のタイムテーブル通り治験を開始する環境が整い、平成 26 年 1 月までに観察期間 1 年の治験薬タウリン投与を開始した。平成 26 年度は、医師主導治験を継続し、手順書に則してモニタリングを実施した。平成 27 年 1 月末までに全参加施設で治験が終了し、治験終了届書を提出した。成果報告会を実施し、データを固定した後、EDC データマネジメントによりタウリンの MELAS の脳卒中様発作に対する再発抑制効果と安全性を検証し、総括報告書を作成して提出した。

A. 研究目的

MELAS (Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic-acidosis and Stroke-like episodes) はミトコンドリア病で最も頻度の高い病型である。脳卒中様発作を繰り返す進行性の経過をとるため、発作の再発を抑制する治療法の確立が急務である。本疾患では、ミトコンドリア DNA の tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 遺伝子一塩基置換が同定され、変異 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾欠損が発見された。こうした基礎研究に基づき、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た (Rikimaru M, et al. Intern Med 51, 3351-3357, 2012)。これらの知見を踏まえ、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ことを本研究の目的とした。

平成 24 年度は、医師主導治験として実施するための、プロトコル・同意説明文書作成、治験薬概要書作成、PMDA 対面助言に向けた準備、IRB 審査に向けたインフラの整備を実施した。平成 25 年度は、医師主導治験として実施するため、治験プロトコルを完成させ、PMDA と各医療機関での IRB 承認を得た。平成 26 年 1 月までに当初のタイムテーブル通り、10 症例観察期間 1 年の治験薬タウリン投与を開始した。平成 26 年度は医師主導治験を継続し、手順書に従ってモニタリングを実施した。平成 27 年 1 月末までに全参加施設で治験が終了し、治験終了届書を提出した。

2月7日成果報告会を実施し、個別の症例検討を行った後、データを固定させた。タウリンの MELAS 脳卒中様発作に対する再発抑制効果と安全性を検証し、本年度末までに総括報告書を作成することを目的とした。

## B. 研究方法

- ① 治験実施計画（プロトコル）・同意説明文書作成:平成 25 年 3 月の PMDA の第二回事前面談を踏まえ、プロトコルを完成させた。また、改訂したプロトコルに準拠した患者同意説明文書を作成した。
- ② 行政当局（PMDA）対応:PMDA 事前面談を受け、平成 25 年 6 月に薬事戦略相談(対面助言)を受け、治験実施の承認を得た。
- ③ IRB 審査に向けた準備:PMDA 薬事戦略相談(対面助言)でプロトコルが承認された後、各治験実施医療機関の治験審査委員会(IRB)に申請し審査を受け承認を得るため、IRB 関連書類一式の準備を進めた。
- ④ キックオフミーティングの実施:プロトコルを完成させた後、治験参加候補の医療機関の担当者が一同に会し、情報を共有し理解を深めることを目的として行った。
- ⑤ 治験実施:平成 26 年 1 月までに、全参加施設で観察期間 1 年の治験薬投与を開始した。平成 27 年 1 月末までに全参加施設で治験が終了した。
- ⑥ モニタリングの実施:手順書に則してモニタリングを実施した。
- ⑦ 治験終了届書の提出: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提出した。
- ⑧ 成果報告会の実施:平成 27 年 2 月 7 日成果報告会を実施し、個別の症例検討を行った後、データを固定させた。
- ⑨ 総括報告書の作成:EDC データマネジメントにより、期間 1 年間のタウリン投与により「100%レスポonder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、総括報告書を作成した。

(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 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」を遵守した。

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した。

## C. 研究結果

- ① 治験実施計画（プロトコル）・同意説明文書作成:平成 25 年 3 月の PMDA 事前面談で、アルギニン併用条件の必要性について助言を受けた。これを踏まえてプロトコルを改訂した。また、この改訂プロトコルに準拠した患者同意説明文書を作成した。
- ② 行政当局（PMDA）対応:対面助言では、対象とする被験者・目標被験者数・用量・脳卒中様発作の判定(評価期間と脳卒中様発作の定義(＝判定基準)について)等の副次的評価項目について、プロトコルの主要な内容は以下のように決定した。用量は体重区分により規定された 1 日用量を 1 日 3 回食後経口投与とした。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onder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。平成 25 年 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得た。
- ③ IRB 審査に向けた準備:PMDA の承認を受けて、同意説明文書等書類一式を準備した。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。
- ④ キックオフミーティングの実施:平成 25 年 7 月 20 日キックオフミーティングを開催した。治験参加機関が集合し、プロトコルや各機関での IRB 申請の手続きなどについての共通の理解を深めた。
- ⑤ 治験とモニタリングの実施:本治験のデザインは、多施設共同・オープン・Phase III 試験で、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 の MELAS 患者である。日本神経学会・日本小児神経学会のバックアップにより疫学アンケート調査を実施し、これまで最大の MELAS 患者の中から脳卒中様発作反復 10 患者を登録した。治験薬タウリンは提供者（大正製薬）が GMP 基準で提供し、体重区分により規定された 1 日用量を 1 日 3 回食後経口投与、投与期間 1 年とした。治験プロトコルを作成し、PMDA と各医療機関の IRB 承認を経て、平成 26 年 1 月初旬までに全施設で投与を開始した。モニタリングを手順書に則して行い、当初の計画通り完了した。平成 27 年 1 月末までに全参加施設で治験が終了し、治験終了届書を提出した。

⑥成果報告会の実施：平成 27 年 2 月 7 日成果報告会を実施し、個別の症例検討を行った。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・感覚消失・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」とした。副次評価項目として、ミトコンドリア病重症度スコア（JMRS）、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 所見について解析した。安全性は、自覚症状、他覚所見及び各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し、本会議にて確認した。報告会の後、データを固定させた。⑦総括報告書の作成：EDC データマネジメントにより、期間 1 年間のタウリン投与により「100%レスポonder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、総括報告書を作成している。今後この報告書をもとに論文を作成し、社会に発信する計画である。

#### D. 考察

治験プロトコルを確定させ、関連書類の準備を十分に行い、PMDA より治験の承認を得ること、それを受けて IRB 審査で承認を得ることは、MELAS の脳卒中様発作に対するタウリン療法を医師主導治験として実施する前提として必須である。これらを当初のタイムテーブル通り完了させ、治験を

開始することができた。平成 26 年 1 月までに観察期間 1 年の治験薬投与を開始し、平成 27 年 1 月末までに全参加施設で治験が終了し、治験終了届書を提出した。EDC データマネジメントによりタウリンの MELAS の脳卒中様発作に対する再発抑制効果と安全性を検証した後、総括報告書を作成した。期間の都合上準備時間が限られていたが、各方面の協力を得て当初の研究計画通り研究を実施することが出来た。

#### E. 結論

タウリン療法を医師主導治験として実施するため、治験プロトコルおよび関連書類を作成し PMDA 薬事戦略相談の承認を得た。次いで、川崎医科大学を最初に IRB の承認を受け、当初のタイムテーブル通り、医師主導治験を開始した。平成 27 年 1 月末までに全参加施設で治験が終了し、治験終了届書を提出した。タウリンの MELAS の脳卒中様発作に対する再発抑制効果と安全性を検証し、総括報告書にまとめた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

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

砂田芳秀, 大澤裕, 力丸満恵, 村上龍文, 西松伸一郎, 萩原宏毅, 古賀靖敏, 後藤雄一, 太田成男. 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. 東京, 5.31, 2013

Sunada Y, Rikimaru M, Ohsawa Y, Murakami T, Nishimatsu S-I, Hagiwara H, Ohta S. Taurine ameliorates mitochondrial dysfunction and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS. 21th World Congress of Neurology. Vienna, Austria 9.22-26, 2013

萩原宏毅, 齊藤史明, 真先敏弘, 松村喜一郎, 園生雅弘. レスベラトロールは線維化を軽減し先天性筋ジストロフィーモデルの症状を改善する. 日本神経学会学術大会. 福岡市, 5.24, 2014

齊藤史明, 萩原宏毅, 真先敏弘, 松村喜一郎. 先天性筋ジストロフィーモデルに対するレスベラトロールの長期的効果と作用機序の検討. 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター精神・神経疾患研究開発費 26-8 「筋ジストロフィー関連疾患の基盤的診断・治療開発研究」平成 26 年度「西野班」班会議. 東京, 2014.12.5

### G. 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

「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 西松 伸一郎 川崎医科大学 分子生物学 1・講師

研究要旨

本研究は、「ミトコンドリア脳筋症（MELAS）に対するタウリン療法」の医師主導治験において、被験者白血球に含まれるミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>のタウリン修飾率を解析し薬効評価を行った。本治験で登録された10症例のうち、タウリン修飾率の測定を行ったのは9例であった。このうち6例でタウリン投与終了後の tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>のタウリン修飾率が有意に増加していた。脳卒中様発作とタウリン修飾率の相関は、発作が完全に抑制された6例のうち、測定を行ったのは5例で、このうち3例でタウリン修飾率が有意に改善していた。また脳卒中様発作が再発した残り4症例においても、2例でタウリン修飾率の上昇が認められた。タウリン修飾率上昇の割合は、全体で55.6%（95%信頼区間21.2%–86.3%）を示し、タウリンの有効性を支持する結果が得られた。

A. 研究目的

ミトコンドリア脳筋症（MELAS）は、ミトコンドリアDNAがコードする tRNA<sup>Leu(UUA)</sup> 遺伝子の点変異により発症するが、病態メカニズムの全貌については未解明のまま残されている。後藤、太田らは、ミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUA)</sup> のアンチコドン3番目の塩基がタウリンで修飾されていること、さらに MELAS の変異 tRNA<sup>Leu(UUA)</sup> では3番目のアンチコドンのタウリン修飾が欠損していることを発見した。tRNA<sup>Leu(UUA)</sup> のタウリン修飾が欠損すると、Leu<sup>(UUG)</sup> コドンへの対応が十分にできなくなるため、ミトコンドリア呼吸酵素複合体タンパク質の合成が抑制され、ミトコンドリアの呼吸機能が低下するのではないかと考えられている。われわれは、MELAS のモデル細胞の培養液にタウリンを添加するとミトコンドリアの呼吸機能が改善すること、さらに MELAS 患者2名にタウリンを投与すると脳卒中用発作が抑制されることを明らかとし、MELAS の基本病態は RNA 修飾異常症であることを提唱した。

これまでの基礎研究および先行臨床研

究にもとに本研究では、タウリンの投与による脳卒中様発作の抑制効果と関連して、被験者白血球に含まれるミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUA)</sup> のタウリン修飾がタウリン投与前後で変化しているか解析し、ミトコンドリア機能が改善しているか検討した

B. 研究方法

【白血球分画の調整】

被験者より採血した血液21mL（EDTA入り）に、等量の生理食塩水を加え、リンフオプレップチューブに重層した。2000回転で20分間遠心後、白色の中間層を採取し白血球分画とした。この分画を Isogen 液（Wako）と混合し全RNAを抽出した後、DNA分解酵素により混入しているゲノムDNAを分解し全RNAを精製した。

【プライマー伸長法によるミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUA)</sup> タウリン修飾率の解析】

ミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUA)</sup> のアンチコドンの3'側上流の塩基配列に相補的なプライマーを作製し放射性ヌクレオド（ $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP）により標識した。被験者より採取した全RNAとジデオキシグアノシン（ddGTP）、デオキ

ヌクレオチド (dATP, dTTP) を混合し、逆転写酵素 (MMLV) により cDNA 合成を行った。タウリンで修飾された tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> を鋳型とした場合、アンチコドンの 3 番目の塩基「U」は「G」と水素結合を形成するため、ddGTP が取り込まれ cDNA 合成が停止する。一方、タウリンで修飾されていない場合、「U」は「A」と水素結合を形成し cDNA 合成が継続され「G」に相当する塩基が出現したところで停止する。cDNA 合成の差を定量することで、タウリン修飾率を算出した (図 1)。

$$\text{タウリン修飾率 (\%)} = \frac{\tau\text{m}^5\text{U}_{34}}{\text{U}_{34} + \tau\text{m}^5\text{U}_{34}} \times 100$$

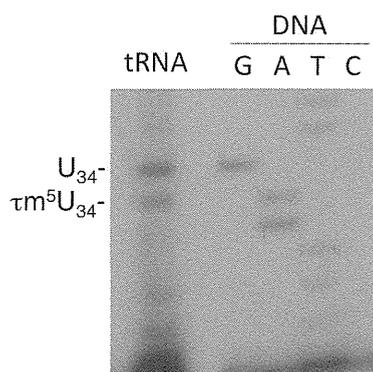


図 1 プライマー伸長法によるミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> タウリン修飾の解析

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム遺伝子解析研究・介入研究 (侵襲なし) に相当し、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実施している。

### C. 研究結果

血中白血球検査の同意が得られた被験者 9 名より採取した治験薬投与開始前 (0 週) と投与終了後 (52 週) の白血球より全 RNA を抽出した。放射性ヌクレオチド ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP) により 5' 末端を標識したプライマーを用いて tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾率を分析した。標準物質としてミトコンドリア DNA A3243G 変異を有する培養細胞株とそのコントロールの A4 細胞株より調整した全 RNA を用いた。標準物質の A4 細胞株と A3243G 変異を有する培養細胞株由来の RNA については 6 回測定を行い、タウリン修飾率と標準偏差はそれぞ

れ  $32.54 \pm 2.83\%$ 、 $21.21 \pm 2.35\%$  であった。標準誤差は、それぞれ 1.15 と 0.96 でプライマー伸長法によるタウリン修飾率測定の再現性を確認した。

続いてタウリン投与開始前と終了後の検体を用いて、ミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾率を解析した。血中白血球検査を行った 9 例のうち、タウリン投与前に比べ投与後に修飾率が増加していたのは 6 例であった。脳卒中様発作との関連については、発作が完全に抑制された 6 例のうち、タウリン修飾率の測定を行ったのは 5 例で、このうち 3 例で有意にタウリン修飾率が上昇していた。脳卒中様発作が再発した残り 4 例においても、2 例でタウリン修飾率が改善していた。このうち 1 例では、脳卒中様発作時に検査を実施した。投与前 (0 週) と発作時 (15 週) のタウリン修飾率に差は認められなかったが、タウリン投与終了時 (52 週) には上昇していた。

### D. 考察

本検査を行った 9 例のうち 5 例で tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾率が有意に増加していた。太田らによるタウリン投与前後のミトコンドリア DNA の変異率 (ヘテロプラスミー) 測定では有意な変化は認められなかった。このことから、ミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾率の上昇は、ミトコンドリア DNA の複製レベルでの調節というよりは、転写後の段階で調節されている可能性が示唆された。タウリンの経口投与により被験者白血球のミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾自体が回復しているものと推察される。

ND6 タンパク質の合成との関連については、タウリン修飾率の上昇に伴って、T3271C 変異を有する 1 例で ND6 タンパク質の合成が有意な上昇が認められた。この症例では、作業仮説のとおり、タウリンの大量投与によりミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾が改善することで、ミトコンドリア ND6 タンパク質の合成が回復し、ミトコンドリア呼吸酵素複合体 I の活性が改善し、脳卒中様発作の抑制が達成された可能性が示唆された。

タウリン修飾率が上昇した症例で、ND6 タンパク質量に有意な上昇が認められない症例については、タウリン大量投与の二次的な効果として、ミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウ

ン修飾率が上昇した可能性が示唆される。血中タウリン濃度を含む生化学検査データと照合し検討する必要がある。

本治験は1年間という短期間でのタウリンの薬効を検証したものである。長期投与によるタウリンの効果を検証するとともに、症例数を増やしてさらに詳細な検討を行う必要がある。

## E. 結論

本治験で特殊検査（血中白血球検査）を行った9例のうち6例で tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾率が有意に増加していた。タウリン修飾率上昇の割合は、脳卒中様発作の有無に関わらず全体で 55.6% (95%信頼区間 21.2%–86.3%) で、タウリンの有効性を支持する結果が得られた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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. (2013)

Motomura E, Narita T, Nasu Y, Kato H, Sedohara A, Nishimatsu S, Sakai M : Cell-autonomous signal transduction in the *Xenopus* egg Wnt- $\beta$ -catenin pathway. *Dev Growth Differ* 56, 640–652 (2014)

Takayama K, Noguchi Y, Aoki S, Takayama S, Yoshida M, Asari T, Yakushiji F, Nishimatsu S, Ohsawa Y, Itoh F, Negishi Y, Sunada Y, Hayashi Y : Identification of the minimum peptide from mouse myostatin prodomain for human myostatin inhibition. *J. Med. Chem.* 58, 1544–1549 (2015)

### 2. 学会発表

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、神戸、12.4. 2013

Nishimatsu S, Ohsawa Y, Terada K, Katase N, Suzuki T, Sunada Y, Nohno T: Regulation of skeletal muscle growth by the pro-protein convertase, furin. 第37回（平成14年度）日本分子生物学会、横浜、11.26. 2014

## G. 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