

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 ) )

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バイオマーカー探索

研究分担者：西野 一三<sup>1)</sup>

共同研究者：野口 悟<sup>1)</sup>

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 相臨床試験が行われ良好な結果が得られていると報告されている。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 相試験が行われている。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。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。また、新規バイオマーカーの探索研究を行うべく、GNE ミオパチー患者の唾液中のシアル酸を測定し、感度、再現性を解析した。これまでの血液でのシアル酸測定と合わせて議論を行った。

### 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。

また、GNE ミオパチー患者 11 名より、25 検体の唾液サンプルを解析した。唾液は国立精神・神経医療研究センター病院への検査入院時、早朝食事前に、サリソフトにて、採取した。採取後は、一旦 4℃ に保管し、遠心分離後、-20℃ にて保管した。シアル酸量は、加水分解後 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxy-benzene (MDB) にて誘導体化し、HPLC にて測定した。タンパク量は、BCA 法にて、牛血清アルブミンをスタンダードとして測定した。

(倫理面への配慮)

DMRV 患者を対象とした研究では、遺伝子解析の結果を含む情報を登録することについてのインフォームド・コンセントを同意書と

して得ることを必須とするとともに、研究対象者となる者が研究対象者となることを拒否できるよう十分に配慮した。取り扱う情報は、遺伝子解析の結果を含む個人情報であり個人情報管理については十分な配慮を行った。本研究は厚生労働省・文部科学省「疫学研究に関する倫理指針」を準拠し、行政機関の保有する個人情報の保護に関する法律を遵守した。

### 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た

([http://files.shareholder.com/downloads/AMDA-2CDCD3/2939518627x0x715743/480663d0-7d46-42df-93f9-dd6291725040/Ultra-genyx Announces Results from Phase 2 Study of Sialic Acid Extended-Release Treatment in Hereditary Inclusion Body Myopathy.pdf](http://files.shareholder.com/downloads/AMDA-2CDCD3/2939518627x0x715743/480663d0-7d46-42df-93f9-dd6291725040/Ultra-genyx%20Announces%20Results%20from%20Phase%20Study%20of%20Sialic%20Acid%20Extended-Release%20Treatment%20in%20Hereditary%20Inclusion%20Body%20Myopathy.pdf))

。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、この第 Ⅲ 相試験の結果を踏まえて、2015 年中にグローバル第 Ⅲ 相試験が実施されることも最近報告された。本邦がこの流れにしっかりと歩調を合わせていくことが必須であると考えられる。

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 相試験の結果も報告された。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 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*. 85(8): 914-917, Aug, 2014)。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として掲載された(Huizing M, Carrillo-Carrasco N, Malicdan MC, Noguchi S, Gahl WA, Mitrani-Rosenbaum S, Argov Z, Nishino I: *GNE* myopathy: New name and new mutation nomenclature. *Neuromuscul Disord*. 24(5): 387-389, May, 2014 [Epub Mar 2014])。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した(Nishino I, Carrillo-Carrasco N, Argov Z: *GNE* myopathy: current update and future therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. [Epub Jul 2014] ahead of print)。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  $525 \pm 98$  pmol/mg タンパク質であり、血清非添加で  $341 \pm 37$  pmol/mg タンパク質、N-アセチルノイラミン酸添加で  $1373 \pm 495$  pmol/mg タンパク質、ManNAc 添加で  $1749 \pm 293$  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、 $409 \pm 83$  pmol/mg タンパク質であり、血清非添加では  $203 \pm 30$  pmol/mg タンパク質、N-アセチルノイラミン酸添加では  $1676 \pm 132$  pmol/mg タンパク質、ManNAc 添加では  $1592 \pm 109$  pmol/mg タンパク質であった。

25 検体での唾液中のシアル酸濃度は、 $218.7 \pm 121.0$  pmol/ul であった。タンパク質含量での補正值は、 $137.3 \pm 49.7$  pmol/ug タンパク質であった。同一患者由来のサンプルでの測定では、エラー率はそれぞれ、0.23, 0.10, 0.26 と、再現性の高い値が得られた。

#### 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 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。

さらに最近、2015 年中のグローバル第 相試験実施が発表されたが、本邦がこの流れにしっかりと歩調を合わせて、第 相試験に参加する形で諸外国に後れを取ることなく、シアル酸製剤の上市が行われることを強く願う。

米国 NIH が行っている ManNAc による臨

床試験では、徐放剤と同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る。一日も早い治療剤開発を待つ 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。1X10<sup>6</sup> 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。

唾液中のシアル酸の解析では、シアル酸濃度  $218.7 \pm 121.0$  pmol/ul のエラー率 0.55、タンパク質あたりでは、 $137.3 \pm 49.7$  pmol/ug : エラー率 0.36 であった。以前 44 名の患者で測定した血清中のシアル酸濃度、 $396.8 \pm 178.9$  pmol/ul : エラー率 0.45 に比較して、タンパク質で解析すれば、誤差が小さいと言える。これは、唾液検体がシアル酸の測定に適した検体であることを示している。さらに、容量あたりの含量は、一方、これらのデータは、唾液中に含まれるタンパク含量の違いによると考えられ、唾液中のタンパク含量の変化によるシアル酸合成量が気にかかることである。しかしながら、同時に唾液中に存在するシアル酸はタンパク質に結合して存在している可能性をも示していると思われる。このことは、治療が進行中の患者における投与シアル酸薬物動態の解析において重要である。唾液中のシアル酸測定は、血液での投与シアル酸の代謝量とは、独立かつ同時に、その患者がもつシアル酸生合成能を測定しうるものと考えている。つまり、長期シアル酸投与によ

るシアリル化の治療効果を推定しうる事が出来る。

さらに、同一の患者において、異なる日に得られた唾液サンプル間のエラー率は極めて小さい(0.1-0.26)ことがわかった。血液検体では、反復的な採取が難しいため、再現性の試験は行っていないが、少なくとも、唾液サンプルは血液にも劣らない再現性を示すものと考えている。血液中のシアル酸は主に肝臓で合成され、唾液は顎下腺で合成されるのであるが、これらのサンプル間でのシアル酸量変化の特性は興味深いところである。今後は、さらに解析検体を増やす、実際のシアル酸の状態(遊離型、タンパク結合型、脂質結合型)を解析する、血液サンプルとの関連および違いなどバイオマーカーとしての特性を調べるなどの必要がある。

## 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 相臨床試験が行われ有望な結果がでていいる。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る。2015 年中に開始予定のグローバル第 相試験に、本邦も参加してシアル酸製剤の上市が諸外国に遅れることのないようにすることが必須である。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

## 1. 論文発表

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

Nishino I, Carrillo-Carrasco N, Argov Z: GNE myopathy: current update and future therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. [Epub Jul 2014] ahead of print

Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Yonemoto N, Nakamura H, Murata M, Takeda SI, Nishino I, Kimura E: Nationwide patient registry for GNE myopathy in Japan. *Orphanet J Rare Dis*. 9(1): 150, Oct, 2014 [Online journal]

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*. 85(8): 914-917, Aug, 2014

Huizing M, Carrillo-Carrasco N, Malicdan MC, Noguchi S, Gahl WA, Mitrani-Rosenbaum S, Argov Z, Nishino I: GNE myopathy: New name and new mutation nomenclature. *Neuromuscul Disord*. 24(5): 387-389, May, 2014 [Epub Mar 2014]

Mori-Yoshimura M, Oya Y, Yajima H, Yonemoto N, Kobayashi Y, Hayashi YK, Noguchi S, Nishino I, Murata M: GNE myopathy: A prospective natural history study of disease progression. *Neuromuscul Disord*. 24(5): 380-386, May, 2014 [Epub Feb 2014]

## 2. 学会発表

西野一三：次世代シーケンサーによる筋疾患遺伝子解析 .第 56 回日本小児神経学会学術集会，静岡県浜松市(オークラアクトシティホテル浜松)，5.30, 2014(5.29-5.31)

## H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし