

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
委託業務成果報告（総括）

tRNA 修飾異常に起因した 2 型糖尿病のコンパニオン診断薬開発を目指した臨床研究

業務主任者 富澤 一仁 熊本大学大学院生命科学研究部・教授

研究要旨

【目的】アジア型 2 型糖尿病に特有の危険因子 Cdkal1 に着目した新規糖尿病治療薬、ならびに同コンパニオン診断薬を創出し、糖尿病領域で世界初となる個別化医療を実現することを目的とする。

【必要性】2 型糖尿病においては、アジア人種の病態がヨーロッパ人種のものと異なり、アジア人種、特に日本人では遺伝的素因に基づく膵 細胞のインスリン分泌能の低下が病態に関与すると考えられている。このため、アジア人においてはインスリン分泌改善を作用機序とする SU 薬や DPP-4 阻害薬などの効果が欧米人に対し大きいとされ、アジア人種の 2 型糖尿病に対してはこれらのインスリン分泌促進系の薬剤による治療が不可欠となっている。しかしながら、SU 薬は長期投与による体重増加、二次無効、さらには低血糖の危険性の問題があり、一方 DPP-4 阻害薬は単独投与では低血糖のリスクが低いものの、長期投与時の作用の減弱や膵炎・膵癌発症に対する懸念などの問題点がある。これらの点から、長期に安全かつインスリン分泌を改善する作用を有する治療薬の開発のニーズは依然高く、特に、インスリン分泌改善能を評価したうえで、より安全かつ効果的な治療を行う、個別化治療の開発が必要とされる。

【成果】 tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発：ヒト末梢血から分離した血球成分から tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を定量する技術の標準化を行い、末梢血サンプルの保存方法、逆転写酵素の最適化、定量 PCR 機器の設定が終了した。また、PMDA との事前相談を行った。

2 型糖尿病に対する新規治療薬の開発：エペリゾンの 2 型糖尿病治療薬としての有効性に関する臨床研究についてプロトコルの作成が終了した。作成したプロトコルについて、PMDA と事前相談を行った。そして、そのプロトコルを基とした臨床研究について、学内臨床研究倫理委員会ならびにヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会に申請し、承認を得た。臨床研究チームを発足し、臨床研究の手順書の作成が完了した。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

委託業務成果報告（総括）

業務項目

tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発：

- ・富澤一仁・熊本大学・教授
- ・魏 范研・熊本大学・助教
- ・井上 謙吾・静岡県産業振興財団ファルマバレーセンター・名誉所長

業務項目

2型糖尿病に対する新規治療薬の開発：

- ・富澤一仁・熊本大学・教授
- ・荒木栄一・熊本大学・教授
- ・井上 謙吾・静岡県産業振興財団ファルマバレーセンター・名誉所長
- ・角間辰之・久留米大学・教授
- ・下田誠也・熊本大学・講師
- ・瀬ノ口隆文・熊本大学・特任助教

A. 研究目的

2型糖尿病に対する個別化医療の実現化を目指し、タンパク質翻訳精度を向上させる効果を有する2型糖尿病に対する新規治療薬の開発とtRNA<sup>Lys</sup>(UUU)のチオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発のための臨床研究を実施することを目的とする。

このうち、2型糖尿病に対する新規治療薬の開発では、エペリゾンの2型糖尿病患者への有効性を検討する臨床研究を実施する。また標的としたコンパニオン診断技術の開発では、コンパニオン診断技術を確立し、エペリゾンの血糖値改善効果とtRNA<sup>Lys</sup>(UUU)のチオメチル化修飾に相関性があるか検討する臨床研究を実施する。

B. 研究方法

tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発：

・ Good Laboratory Practice (GLP)に準拠したコンパニオン診断技術の確立

ヒト末梢血から分離した血球成分からトータル RNA を精製し、ヒト tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)を直接逆転写し、その逆転写産物を定量 PCR することにより tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を定量する技術の標準化を行った。まず、採血後の血液保存状態が tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾に及ぼす影響を調査するために、健常人ボランティアから採血した血液を以下の条件で保存した。

- ・氷上で30分、1時間、2時間、24時間
- ・室温で30分、1時間、2時間、24時間

その後、3,000rpm/分で遠心し、血球成分をトリゾールで可溶化した。そしてトータル RNA を精製し、精製した RNA を従来我々が開発した定量 PCR 法を応用した tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾解析技術を用いて、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾について比較検討した。

次に RNA 精製法についてトリゾールを用いたフェノールとグアニジンイソチシアネートの単相溶液精製法と miRNeasy Mini kit を用いたシリカスピンカラム法で、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾の検出に差が認められるか検討した。健常人ボランティアから採血した血液を直ちに遠心し、血球成分と血清成分に分画した。分画した血球成分から、トータル RNA をトリゾールならびに miRNeasy Mini

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

委託業務成果報告（総括）

kit で精製した。その後、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾解析技術を用いて、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾について両者で比較検討した。

tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾解析に用いる定量 PCR 機器について、使用する機器によって tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾の測定結果に差があるのか検討した。野生型(WT)マウスと Cdka11 欠損(KO)マウスの肝臓からトリゾールを用いてトータル RNA を精製した。

比較検討した機器は、以下の3種類である。

・Veriti 96 皿サーマルサイクラー（アップライド・バイオシステムズ社）

・サーマルサイクラー ダイスレッドシステム TP800（タカラバイオ社）

・サーマルサイクラー ダイスレッドシステム TP870（タカラバイオ社）

・ tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術に関する臨床研究について PMDA との事前相談

2 型糖尿病に対する tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の臨床研究計画について PMDA と事前相談を行い、コンパニオン診断薬開発のための臨床研究プロトコール作成に資した。

#### 2 型糖尿病に対する新規治療薬の開発

エペリゾンの 2 型糖尿病治療薬としての有効性に関する臨床研究についてプロトコール作成

2 型糖尿病患者を Cdka11 遺伝子に関してリスクアレル群とノンリスクアレル群に分け、両群に

エペリゾンを 12 週間投与し、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾率と HbA1c の変化量の相関性を主要評価項目とした臨床研究に関するプロトコールを作成した。

・エペリゾンの 2 型糖尿病治療薬としての有効性に関する臨床研究について PMDA との事前相談

で作成したプロトコールに準じた臨床研究計画について PMDA に事前相談し、プロトコールの修正に資した。

・エペリゾンの 2 型糖尿病治療薬としての有効性に関する臨床研究の準備

、で作成したエペリゾンの 2 型糖尿病治療薬としての有効性に関する臨床研究プロトコールに準じた臨床研究について、学内臨床研究倫理委員会ならびにヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会に申請した。

（倫理面への配慮）

tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発において、健康人ボランティアから末梢血を採血し、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾について検討したが、本研究は熊本大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会で承認された方法（承認番号：ゲノム 159）に則り実施した。またインフォームドコンセントに関しても、同委員会で承認された方法に準じて行った。

C . 研究結果

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

委託業務成果報告（総括）

tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的とした  
コンパニオン診断技術の開発：

・ Good Laboratory Practice (GLP)に準拠した  
コンパニオン診断技術の確立

a. 血液保存状態が tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾に及ぼす影響について

・ 氷上で 30 分、1 時間、2 時間、24 時間  
・ 室温で 30 分、1 時間、2 時間、24 時間の 8  
条件で保存した血液から RNA を精製し、チオメチル化修飾について比較検討した。いずれの条件でも tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾に有意な差は認められなかった。

b. RNA 精製法の標準化

トリゾールを用いたフェノールとグアニジンイソチオシアネートの単相溶液精製法と miRNeasy Mini kit を用いたシリカスピンカラム法で、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾において、有意な差は認められなかった。いずれの方法を用いても、十分な Ct 値が得られた。

c. tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾解析に用いる定量 PCR 機器の選定

・ Veriti 96 皿サーマルサイクラー（アップライド・バイオシステムズ社）

・サーマルサイクラー ダイスレッドシステム TP800（タカラバイオ社）

・サーマルサイクラー ダイスレッドシステム TP870（タカラバイオ社）

上記 3 機種 of tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾検出感度について比較検討した。その結果、

3 機種間の検出感度に有意な差は認めなかった。

tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術に関する臨床研究について PMDA との事前相談

下記のとおり PMDA と事前相談

相談日：2014 年 11 月 6 日 13 時～14 時

相談者：富澤一仁、井上謙吾

相談内容：

・臨床研究で行うべきか、医師主導の治験で実施すべきか。

・コンパニオン診断薬の臨床研究（医師主導治験）の進め方についてご指導いただきたい。  
助言内容：

・既存承認用量で効果が十分に得られるかどうかを検討し、もし、用量を変更するとなった場合は、非臨床試験を実施する必要がある。

・将来的な製造販売元を決めた上で必要な試験を行う方が良い。もし、熊本大学で製造販売を行うとなると非臨床試験から全てのデータを取り直す必要があるため、薬剤の現販売元であるエーザイに協力を求め安全性データや薬剤に関するデータ提供を受ける方が現実的である。

・本試験は、臨床研究と言う位置付けとして GCP 対応で行う方が、将来的にメーカー側で本試験データを使用出来る可能性が残る。このことより、申請時の安全性データとして使用可能にするためにも、可能な限り GCP 遵守で行う。なお、この際、治験届は不要で

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

委託業務成果報告（総括）

ある。また、PMDA としては GCP 対応で行う販売承認目指した試験に関してのみ相談を受け付けているため、上記のような対応を取るのであれば、今後も相談を受けることが可能である。

2 型糖尿病に対する新規治療薬の開発

エペリゾンの 2 型糖尿病治療薬としての有効性に関する臨床研究についてプロトコール作成

「tRNA 修飾異常に起因した 2 型糖尿病のコンパニオン診断薬開発を目指した臨床研究」プロトコールを完成させた。詳細なプロトコールは、資料 1 を参照。

エペリゾンの 2 型糖尿病治療薬としての有効性に関する臨床研究について PMDA との事前相談

下記のとおり、PMDA と事前相談を実施した。

相談日：2014 年 11 月 6 日 13 時～14 時

相談者：富澤一仁、井上謙吾

助言内容：

・まずは POC にて試験の感触を確かめることを勧める。

・患者の組み入れに汎用の試薬を使用することは、バリデートされていない（信頼性のない基準で診断する）ものなので難しいと考える。もし、汎用の試薬を使用する場合は、別の試薬を併用するなど、クロスチェックを行い最低限のバリデーションを行う必要があると考える。コンパニオン診断薬メーカーと共同でバリデートされたキットの開発を行い、そのキットを用いて医師主導試験を実施すべきである。

・コンパニオン診断薬のガイドラインは 5 つ出

ているので、PMDA の HP からダウンロードして参照すること。

・エペリゾンの 2 型糖尿病治療薬としての有効性に関する臨床研究の準備

、 で作成したエペリゾンの 2 型糖尿病治療薬としての有効性に関する臨床研究プロトコールに準じた臨床研究について、学内臨床研究・医療技術倫理委員会、ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会、ならびに臨床研究利益相反審査委員会に申請した。申請書類についてこれら委員会で審議が行われ、また学内臨床研究・医療技術倫理委員会とヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会ではヒアリングも行われ、下記のとおり、承認された。

a. 臨床研究・医療技術審査結果

受付番号：先進第 1 9 2 7 号

課題名：tRNA 修飾異常に起因した 2 型糖尿病のコンパニオン診断薬開発をめざした臨床研究

実施責任者：富澤一仁

決定日：平成 27 年 2 月 9 日

決定内容：許可

b. ヒトゲノム・遺伝子解析研究審査結果

受付番号：ゲノム第 2 7 5 号

ゲノム第 2 7 5 号（変更）

課題名：tRNA 修飾異常に起因した 2 型糖尿病のコンパニオン診断薬開発をめざした臨床研究

実施責任者：富澤一仁

決定日：平成 26 年 7 月 28 日

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

委託業務成果報告（総括）

一部変更申請決定日：平成 26 年 8 月 14 日

決定内容：許可

c. 臨床研究利益相反審査結果

課題名：tRNA 修飾異常に起因した 2 型糖尿病の

コンパニオン診断薬開発をめざした臨床研究

実施責任者：富澤一仁

決定日：平成 26 年 7 月 28 日

審査結果：問題なし。

D. 考察

tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的とした  
コンパニオン診断技術の開発

採血した血液は、24 時間常温で保存しても、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾の結果に影響しないことが明らかになった。このことから、病院で採血後、検査ラボに輸送し、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾について解析することが可能であることが示唆された。tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾の解析を各病院検査部で実施することは、機器の設置などから困難であることが予想されるため、検査ラボで実施するようになると思われる。その場合、血液サンプルの保管方法と輸送時間に制限があると、検査が困難である。本結果から、本技術は、検査ラボで実施するコンパニオン診断技術として問題無いことが示された。

RNA 精製方法で、トリゾールを用いたフェノールとグアニジンイソチオシアネートの単相溶液精製法と miRNeasy Mini kit を用いたシリカスピncラム法では、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾の解析結果に差は認められなかった。単相溶液精製法のほうが、コストがかからないが、シリカ

スピncラム法を用いたほうが、自動化できるメリットがある。多数検体を一度に効率的に測定できることから、キットでは、シリカスピncラム法を用いることとした。

3 機種を用いて定量 PCR を行ったが、機器間で解析結果に差はなかった。このことから、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾解析技術は、定量 PCR 解析機器の性状に影響を受けないことが明らかになった。

今回臨床研究プロトコールを作成している途中に、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」が刷新されるということが判明した。当初、同倫理指針が公布されるのを待って、その指針に沿ったかたちで臨床研究を実施することを考えていた。しかし、新倫理指の公布が遅れたため、公布されるのを待っていると本研究の進捗が図れないため、医師主導治験に準じたプロトコールを作成した。労力はかかったが、将来的に製薬企業と提携して上市を目指すためには良かったと思われる。

当初の計画どおり本臨床研究について倫理委員会の承認が得られたことは、来年度以降速やかに臨床研究に移ることができる。

E. 結論

tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発：ヒト末梢血から分離した血球成分から tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を定量する技術の標準化を行い、末梢血サンプルの保存

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

委託業務成果報告（総括）

方法、逆転写酵素の最適化、定量 PCR 機器の設定が終了した。また、PMDA との事前相談を行った。

2 型糖尿病に対する新規治療薬の開発：エペリゾンの 2 型糖尿病治療薬としての有効性に関する臨床研究についてプロトコルの作成が終了した。作成したプロトコルについて、PMDA と事前相談を行った。そして、そのプロトコルを基とした臨床研究について、学内臨床研究倫理委員会ならびにヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会に申請し、承認を得た。臨床研究チームを発足し、臨床研究の手順書の作成が完了した。

F．健康危機情報

業務主任者ならびに業務担当者の健康に危機を及ぼすようなことは無かった。

G．研究発表

1．論文発表

・ Zhou, B, Wei, F.-Y., Kanai, N., Fujimura, A., Kaitsuka, T., and Tomizawa, K. Identification of a splicing variant that regulates type 2 diabetes risk factor CDKAL1 level by a coding-independent mechanism in human. **Hum. Mol. Genet.** 23, 4639-4650, 2014.

2．学会発表

該当無し

H．知的財産権の出願・登録状況  
該当無し。



## 資料 1

### 臨床研究実施計画書