目次

略語・略号一覧 2
2.6.1 緒言 3

略語・略号一覧

略語・略号	内容
DMRV	縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (Distal myopathy with rimmed vacuoles)
GNE	ウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ (UDP-ClcNAc 2-epimerase)
hIBM	遺伝性封入体ミオパチー (Hereditary inclusion body myopathy)
MNK	N-アセチルマンノサミンキナーゼ (N-acetylmannosamine kinase)
TK	トキシコキネティクス (Toxicokinetics)

2.6.1 緒言

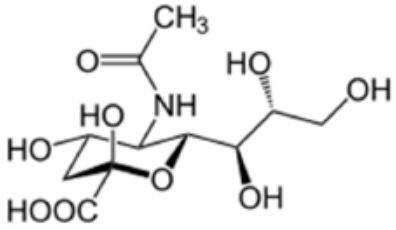
アセノイラミン酸（本剤）錠 500 mg（SA-ER 錠）は、1 錠中にアセノイラミン酸 500 mg を含む徐放性製剤である。白色の素錠であり、GNE ミオパチー（縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー(DMRV)又は遺伝性封入体ミオパチー（hIBM）とも言われる）による筋力低下の進行抑制を適応症として開発された治療薬である。

GNE ミオパチーは筋肉そのものに原因があって、筋力が低下する病気（筋原性疾患）である。筋原性疾患の多くは躯幹（胸・腰のあたり）や上腕・大腿部など躯幹に近い筋（近位筋）が侵されるが、この遠位型ミオパチーは特に手指や下腿など手足の先から筋力が低下していく遺伝性筋疾患である。本邦では約 150～400 人の患者がいると推定されており、ほとんどの患者は 15～35 歳で発症する希少疾病である。

本疾病の発症メカニズムはまったく不明であったが、2001 年遠位型ミオパチーの患者で、シアル酸生合成経路の律速酵素であるウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ（GNE）／N-アセチルマンノサミンキナーゼ（MNK）をコードする GNE 遺伝子のミスセンス変異のあることが指摘された[1)]。これにより、生体内において十分な量のシアル酸の生合成ができず、シアル酸の供給量の不足が示唆され、薬物治療としては不足しているシアル酸を補充することにより遠位型ミオパチー患者の病態進行の改善が期待されると考えられた。

以下にアセノイラミン酸の化学構造を示す。

和　名：アセノイラミン酸（Aceneuraminic acid）
化学名：(-)-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-*glycero*-D-*galacto*-nonulosonic acid
分子式：$C_{11}H_{19}NO_9$
分子量：309.27
構造式：



非臨床試験では、薬理試験に関し、国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所で実施された GNE ミオパチーの日本人患者から採取した筋細胞を用いた in vitro 試験及び GNE ミオパチーマウスモデルを用いた in vivo 試験で評価したアセノイラミン酸の薬理作用試験成績を CTD 様式にまとめた。このモデルマウスは GNE ミオパチー患者の疾患の進行を非常によく再現している。

安全性薬理試験は安全性薬理試験ガイドラインに従って GLP に準拠して実施した。

薬物動態試験は、公表文献にて評価可能な項目については公表文献を使用し、一部必要な試験を実施してとりまとめた。放射性同位元素標識体を使用した吸収、分布、代謝及び排泄については、公表文献（経口投与、静脈内投与、経気道投与及び皮下投与）及び実施した静脈内投与試験により評価した。非標識体の単回経口投与及び反復経口投与時の血清中濃度については、実施した単回投与試験及び毒性試験に付随するトキシコキネティクス（TK）試験（ラット、イヌ及びウサギ）により、薬物動態学的薬物相互作用については、Ultragenyx 社の実施した in vitro 試験により評価した。

毒性試験は、ラットを用いた単回投与毒性試験、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験、細菌、ヒトリンパ球及びマウス骨髄小核を用いた遺伝毒性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験を実施した。いずれの試験も医薬品毒性試験法ガイドラインに準拠して実施した（ただし単回投与毒性試験、ラット 4 週間反復投与毒性試験及びウサギ胚・胎児発生試験の TK 測定を除く）。なお、がん原性試験については、本剤が内因性の遊離シアル酸と同じ生物学的作用を有すること、臨床用量は通常の全身濃度を大幅に超えるものでないことから実施の必要はないと考え実施しなかった。

参考文献

1) Cho A, Christine M, Malicdan V, Miyakawa M, Nonaka I, Nishino I and Noguchi S. Sialic acid deficiency is associated with oxidative stress leading to muscle atrophy and weakness in GNE myopathy. Hum Mol Genet. 2017 Aug 15;26(16):3081-3093. doi: 10.1093/hmg/ddx192. PubMed PMID:28505249.

目次

略語・略号一覧 2
2.6.2 薬理試験の概要文 3
2.6.2.1 まとめ 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 3
2.6.2.2.1 in vitro 試験における作用 3
2.6.2.2.2 in vivo 試験における作用 6
2.6.2.2.3 作用機序 15
2.6.2.3 副次的薬理試験 16
2.6.2.4 安全性薬理試験 17
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 24
2.6.2.6 考察及び結論 24
2.6.2.7 参考文献 25

略語・略号一覧

略語・略号	内容
cDNA	相補的 DNA (Complementary DNA)
DMRV	縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (Distal myopathy with rimmed vacuoles)
GlcNAc	N-アセチルグルコサミン (N-acetylglucosamine)
GNE	ウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ (UDP-ClcNAc 2-epimerase)
hERG	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子 (Human Ether-a-go-go Related Gene)
hIBM	遺伝性封入体ミオパチー (Hereditary inclusion body myopathy)
KO	ノックアウト (Knock Out)
ManNAc	N-アセチルマンノサミン (N-acetylmannosamine)
MNK	N-アセチルマンノサミンキナーゼ (N-acetylmannosamine kinase)
NeuAc	N-アセチルノイラミン酸 (N-acetylneuraminic acid)、アセノイラミン酸
ROS	活性酸素種 (Reactive oxygen species)
RT-PCR	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse transcription- polymerase chain reaction)
UDP-GlcNAc	ウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

本項においては、遠位型ミオパチーにおける遺伝子異常とシアル酸低下の関係、モデルマウスの作製とそのミオパチー症状、最後に治療薬候補として、シアル酸の一種である本剤（(N-アセチルノイラミン酸(NeuAc)）の薬理作用、そして安全性薬理作用の結果につき以下に示した。

in vitro 試験において、日本人の DMRV/hIBM 患者から 12 種類の GNE 遺伝子変異を見出し、これを遺伝子組み換え技術を用いて COS-7 細胞に発現させたところ、シアル酸合成の初期 2 段階を担う GNE（ウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ）及び MNK（N-アセチルマンノサミンキナーゼ）のどちらかの酵素活性は低下していた。DMRV/hIBM 患者から採取した初代前脛骨筋細胞ではこの酵素活性の低下に伴い、シアル酸含量も低下していた。このシアル酸含量の低下は筋細胞培養液中に 5 mM NeuAc を加えることで対照群（健常人からの筋細胞のシアル酸含量）のレベルまで回復しうることが明らかとなった。

in vivo 試験では、まず遺伝子工学的手法によって内在性の GNE 遺伝子を破壊し、ヒト変異 GNE（p.D207V(旧称 D176V)遺伝子変異型）のみを発現する DMRV/hIBM モデルマウスを作製し、ヒトでみられるミオパチー症状の特徴を有するか否か検討した。このモデルマウスではヒトで観察されたミオパチーの症状である運動機能の低下、筋収縮力の低下、筋萎縮を観察し、また、病理観察では筋線維の大小不同、縁取り空胞や筋線維内にアミロイドなど多数のたん白質蓄積が観察された。これらの表現型や病理変化は NeuAc の長期投与（約 50 週間）により予防できることが明らかとなった。

安全性薬理試験において、NeuAc は一般症状、行動、呼吸器系及び循環器系に対してほとんど影響を及ぼさなかった。

以上のように、NeuAc を継続的に補充することで、ヒトに類似した DMRV/hIBM モデルマウスのミオパチーを改善することが示されたことから、いまだ治療法の存在しないヒトの同疾患において NeuAc は有用性の高い治療薬として期待される。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 in vitro 試験における作用

＜添付資料 4.2.1.1-1 参＞

①日本人 DMRV/hIBM 患者で発見された 12 種類の GNE 変異遺伝子を発現させた COS-7 細胞における変異 GNE 酵素活性

これまでに日本人 DMRV/hIBM 患者から発見された GNE 遺伝子変異 12 種類(p.C44S(旧称 C13S)、p.H163Q（旧称 H132Q)、p.D207V（旧称 D176V)、p.R208C（旧称 R177C)、p.V362A（旧称 V331A)、p.D409Y（旧称 D378Y)、p.I503T（旧称 I472T)、p.A555V（旧称 A524V)、p.V603L（旧称 V572L)、p.A661T（旧称 A630T)、p.A622V（旧称 A631V)、p.G739S（旧称 G708S)）につき、これらの遺伝子変異がシアル酸合成において重要な GNE 酵素活性を低下させているか否かを遺伝子組み換え技術を用いて検討した。野生型 GNE の cDNA は RT-PCR 法によって健常人の骨格筋から作製した。

変異型 GNE の cDNA も同様に RT-PCR 法によって DMRV/hIBM 患者の骨格筋から、あるいは野生型 GNE の突然変異した骨格筋から作製した。これらで得られた cDNA は最終的には発現ベクターにインサート後、COS-7 細胞にトランスフェクトした。本試験ではこの COS-7 細胞を用いた。酵素活性に関しては GNE 及び MNK 活性はラジオメトリック法により測定した。

結果を図 2.6.2-1 に示す。酵素活性は野生型から得られた酵素活性を 100%としたときの相対比較を示す。

GNE 酵素活性（黒カラム）に関して、変異型では p.C44S、p.H163Q、p.D207V、p.R208C、p.V362A 及び p.D409Y の酵素活性は野生型のそれに比べ、20%以下と低かった。p.I503T 及び p.G739S 変異型は野生型のほぼ 50%の活性を示した。p.V603L、p.A661T 及び p.A622V の変異型は野生型に比べ、酵素活性は 20～30%低下を示した。MNK 酵素活性（白カラム）に関しては、N 末端の変異型の p.C44S、p.H163Q、p.D207V、p.R208C、p.V362A 及び p.D409Y の酵素活性は野生型と同じレベルを保持していたが、C 末端の変異型の p.I503T、p.V603L、p.A661T、p.A622V 及び p.G739S の酵素活性は著しく低下していることが観察された。しかしながら、今回検討した 12 種類の変異型すべてにおいて、両酵素活性の完全消失は認められなかった。

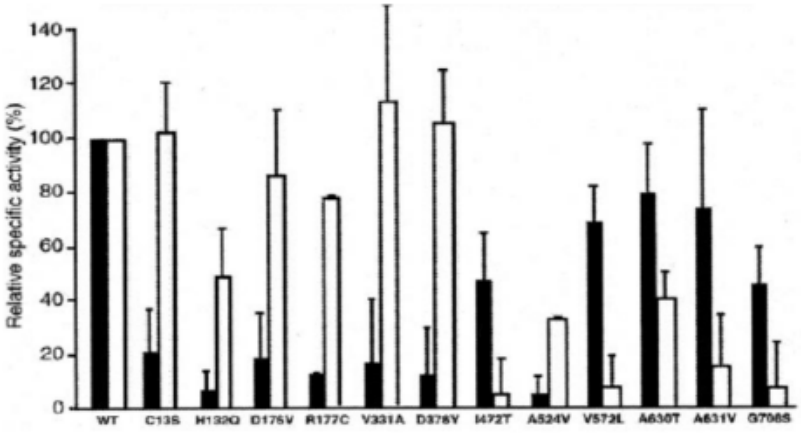


図 2.6.2-1 遺伝子組み換えによる 12 種類の変異遺伝子を発現させた COS-7 細胞における変異型 GNE 酵素活性の違い

WT：野生型（対照群）、黒カラム：UDP-GlcNAc 2-epimerase、白カラム：ManNAc kinase

② DMRV/hIBM 患者及び健常人から採取した血清又は骨格筋中のシアル酸濃度の比較

血清は 7 名の健常人と 9 名の DMRV/hIBM 患者（9 名の患者の遺伝子変異型は以下、p.V603L、pV603L/Exon 4 skipping、p.V603L、p.V603L、p.D207V/p.V603L、p.V603L、p.D207V/p.A661T、p.D204/p.V603L、p.D204/p.V603L）から採血し、骨格筋は 7 名の健常人と 4 名の DMRV/hIBM 患者から採取した。血清中のシアル酸濃度は SIALIZYME-550 kit を、骨格筋中のシアル酸濃度はチオバルビツール酸法を用いて定量した。

図 2.6.2-2 に示したように、DMRV/hIBM 患者の血清中のシアル酸濃度と健常人のそれとを比較したとき、両群間で差は認められなかった。一方、骨格筋のシアル酸濃度は健常人に比べ、DMRV/hIBM 患者では 25%減少した（$p<0.05$）。

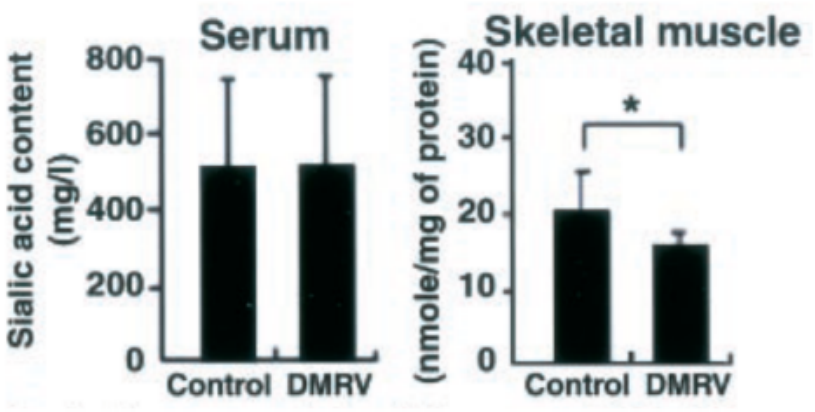


図 2.6.2-2 健常人及び DMRV/hIBM 患者から採取した血清又は骨格筋中のシアル酸含量の比較

*:p<0.05 vs control

③ DMRV/hIBM 患者から採取した筋管細胞及び皮膚線維芽細胞中のシアル酸含量に対する N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）、N-アセチルマンノサミン（ManNAc）、NeuAc 及び添加した血清の影響

皮膚線維芽細胞及び筋管細胞を DMRV/hIBM（皮膚線維芽細胞は 2 名の患者から 4 検体：遺伝子変異型は p.D207V/p.I503T、p.D207V/p.D207V、筋管細胞は 1 名の患者から 4 検体：遺伝子変異型は Exon 4 skipping）患者から採取し、その初代培養細胞を用いた。対照として健常人の皮膚線維芽細胞及び筋管細胞も同様に採取し、その初代培養細胞を用いた。これらの組織中のシアル酸含量はチオバルビツール酸法を用いて測定した。

図 2.6.2-3 に示したように、DMRV/hIBM 患者から採取した皮膚線維芽細胞及び筋管細胞を無血清培養液で培養したとき、シアル酸含量は健常人の 60～74%に減少した。この DMRV/hIBM 患者組織で観察されたシアル酸含量の減少は 5 mM NeuAcAc 及び ManNAc を培養液に加えることによって健常人のシアル酸含量レベルまで回復した。同様な効果は 10%のウシ胎児血清を添加して、これらの細胞を培養したときにも観察された。しかし 5 mM GlcNAc の培養液への添加では回復効果は認められなかった。

以上の結果から、in vitro において DMRV/hIBM 患者では骨格筋中のシアル酸含量は低下しており、NeuAc 又は ManNAc を添加することにより、病態で低下したシアル酸を健常人のレベルまで回復させうることが示された。

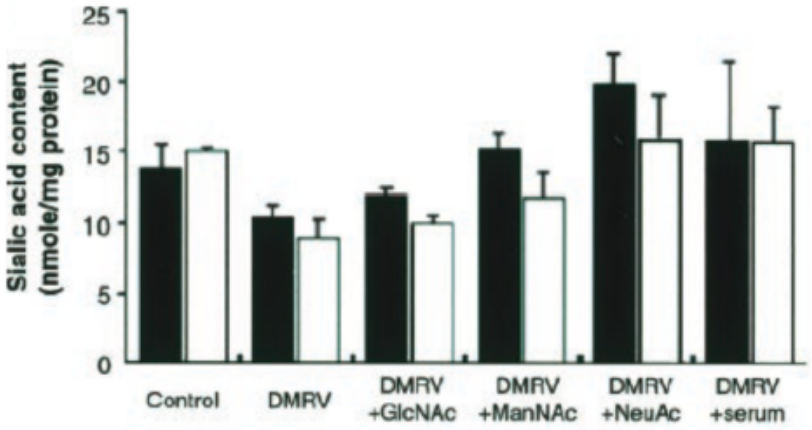


図 2.6.2-3 DMRV/hIBM 患者から採取した筋管細胞及び皮膚線維芽細胞中のシアル酸含量に対する添加した GlcNAc、ManNAc、NeuAc 及び血清の影響

（黒：1 例の筋管細胞より 4 検体、白：別の 2 例の皮膚線維芽細胞から 4 検体）

2.6.2.2.2 in vivo 試験における作用

＜添付資料 4.2.1.1-2 参＞

DMRV/hIBM の患者ではシアル酸生合成経路の重要な酵素である GNE/MNK をコードする GNE 遺伝子に変異があることはすでに述べたが、今回の検討においてこのミスセンス変異を有するヒト GNE トランスジーンのみを発現する DMRV/hIBM モデルマウスを用いて検討した。この病態モデルマウス（$GNE^{-/-}$hGNED176V-Tg）は GNE - KO マウスとヒト GNE 遺伝子の D176V 変異トランスジェニックマウスの掛け合わせにより作製した。

最も多く存在するシアル酸である NeuAc を腹腔内に単回投与すると、NeuAc の血清中濃度は数分以内で上昇し、5～30 分以内に 90%、4 時間以内ほとんどすべてが排泄された。一方、胃内に NeuAc を単回投与すると NeuAc の血清中濃度は、腹腔内投与の半分であったが、排泄速度はこれより遅く、シアル酸の 70%が 30～60 分以内に尿中に排泄された。NeuAc の前駆体である ManNAc を投与した場合も同様な挙動を示した。

① DMRV/hIBM モデルマウスの生存率、血清クレアチンキナーゼ活性、トレッドミル歩行距離、腓腹筋重量、血清中及び筋組織結合シアル酸含量に対する ManNAc の影響

結果を図 2.6.2-4 A～H に示す。ManNAc を DMRV/hIBM モデルマウスに 0、20、200 及び 2000 mg/kg/日を投与したが、同時にこのモデルマウスと同腹で異常のないマウスにも同様に投与した（各群同数、両群共に合計 18 例）。ManNAc の投与量は ManNAc を飲水中に加え 1 日当たりの用量を摂取するように 4 日毎に濃度を調整して自由に飲水させ、1 日 20 mg/kg の量を摂取するように濃度を調整して与えた。投与は生後 5～6 週から開始して 54～57 週まで連続投与した。図 2.6.2-4 A に示したように、生存率は 200 及び 2000 mg/kg 投与群では 100%であったが、20 mg/kg 投与群では 200 mg/kg 以上の投与群に比べると生存率に対する効果は弱かった。骨格筋障害の指標である血清クレアチンキナーゼ活性はモデルマウスでは増加し、この増加は本実験に用いた ManNAc すべての用量において抑制された（図 2.6.2-4 B）。DMRV/hIBM でみられたト

レッドミルによる運動機能低下も ManNAc いずれの用量によっても回復した（図 2.6.2-4 C)。20～2000 mg/kg の ManNAc は筋肉量を増加させ、筋横断面積（cross-sectional area:CSA）及び等尺性収縮力に対しても改善作用を示した（図 2.6.2-4 D～F)。血清中シアル酸濃度及び筋肉や他の組織での結合型シアル酸含量の低下も ManNAc の投与により抑制された(図 2.6.2-4 G～H)。組織中のシアル酸の増加に伴い、骨格筋指標も改善し、縁取り空胞数、細胞内アミロイド蓄積も顕著に減少した。しかし観察された ManNAc のこれらの効果には用量相関は認められなかった。ManNAc への耐性は良好で腎、肝機能は正常であったが、高用量群の雌の 2 例のいずれにも投与終了後に多発性卵巣腫が認められた。病理検査では多嚢胞性に似ており、出血性で液性の嚢胞であり充血を伴っていた。精査したが悪性の所見はなかった。

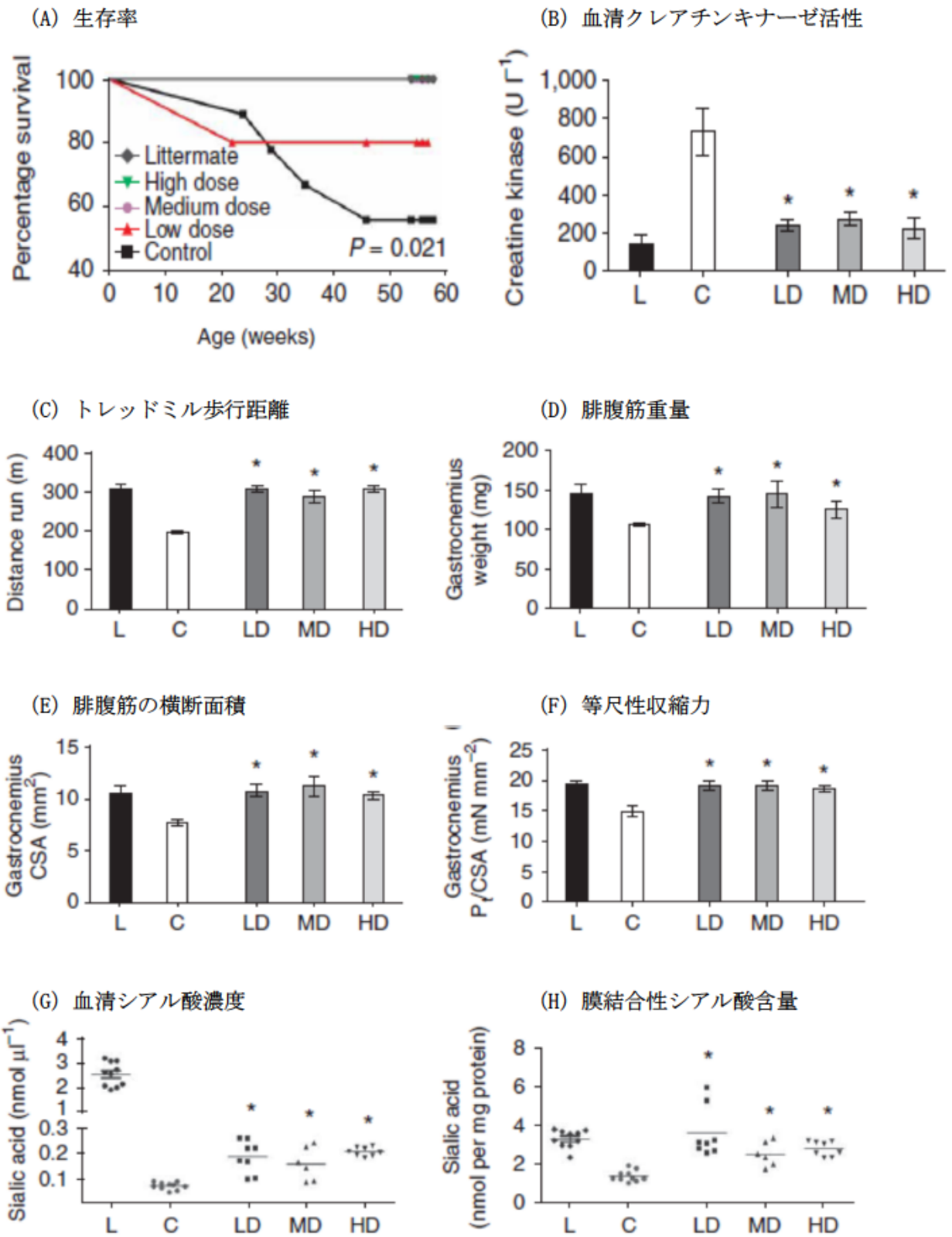


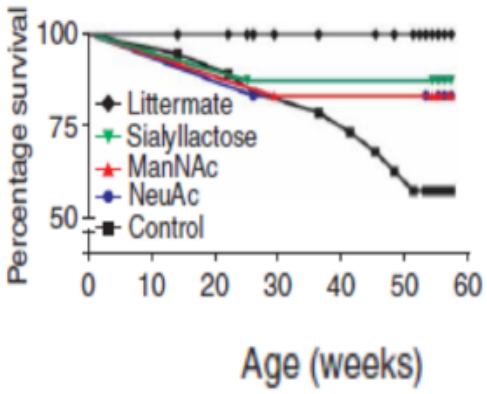
図 2.6.2-4 DMRV/hIBM モデルマウスの種々パラメータに対する ManNAc の影響

L:正常群（同腹仔、n=18）、C:対照群（DMRV/hIBM、n=5）、LD：20 mg/kg 投与群（n=5）
MD:200 mg/kg 投与群（n=4）、HD：2000 mg/kg 投与群（n=4）、＊:P<0.05 vs 対照群
(A):生存率の推移、(B):血清クレアチンキナーゼ活性、(C):トレッドミル歩行距離、
(D):腓腹筋重量、(E):腓腹筋の横断面積、(F):等尺性収縮力、(G):血清シアル酸濃度、
(H):膜結合性シアル酸含量

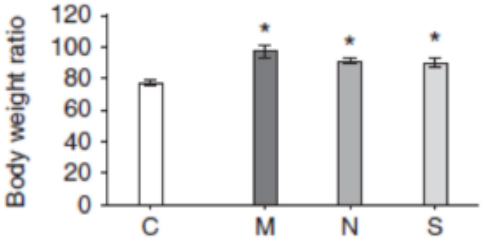
② DMRV/hIBM モデルマウスにおける NeuAc、ManNAc 及びシアリル乳糖の生存率、体重、シアル酸含量（血清及び筋組織）、トレッドミル歩行距離及び血清クレアチンキナーゼ活性に対する影響

ManNAc の本モデルマウスでの用量作用に関する検討結果から、最小投与量である 20 mg/kg において有効性が確認できたので、NeuAc、ManNAc 及びシアル酸化合物であるシアリル乳糖（Sialyllactose：牛乳中のシアル酸の主たる存在形態でシアル酸 45%を含む）の効果を検討した（図 2.6.2-5)。これらの 3 被験物質を飲水中に加え自由に飲水させ、それぞれ 1 日 20 mg/kg の量を摂取するように 4 日毎に濃度を調整して与えた（順に 6、5、7 例、また他に水のみの対照群として 10 例)。対照群以外には、モデルマウスと同腹の異常のないマウスを各群同数（計 18 例）として、各被験物質を飲水で投与した。生後 10～20 週から投与を開始し、54～57 週目まで連続投与した。いずれの被験物質群も耐性は良好で、生存率は対照群に比べ有意に改善（図 2.6.2-5 A）し、体重も増加した。対照群に比べ、ManNAc 群及び NeuAc 群では血清中シアル酸は有意に増加したがシアリル乳糖群では有意な増加はみられなかった。筋肉や他の組織では結合型シアル酸の有意な増加が NeuAc、ManNAc 及びシアリル乳糖群で認められた。運動機能に関してはトレッドミル、持久力、ぶら下がり試験において、いずれの機能も 3 被験物質投与群は対照群に優り、血清クレアチンキナーゼ活性はおおむね正常マウスのそれと同等のレベルであった。

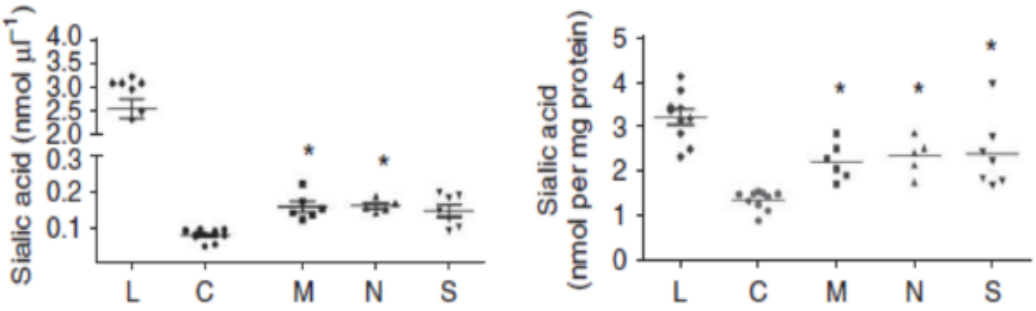
(A)生存率



(B)体重



(C)シアル酸含量（左：血清中、右：筋組織）



(D)トレッドミル歩行距離

(E)血清クレアチンキナーゼ活性

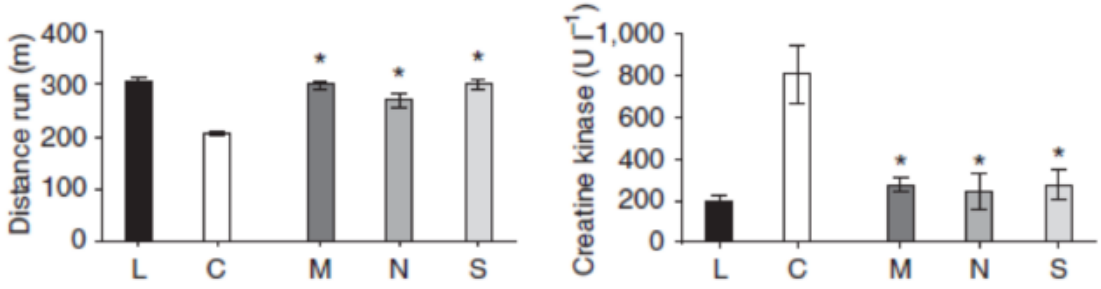


図 2.6.2-5 DMRV/hIBM モデルマウスの生存率、体重、シアル酸含量、トレッドミル及び血清クレアチンキナーゼ活性に対する ManNAc、NeuAc 及びシアリル乳糖の影響

(A)：生存率の推移、(B)：正常同腹仔群に対する体重比、(C)：血清（左）及び筋肉における結合した(右)シアル酸含量、(D)：トレッドミル歩行距離、(E)：血清クレアチンキナーゼ活性、横軸左から L：モデルマウスと同腹の異常のないマウス群、C：対照群（飲水）、M:ManAc 群、N:NeuAc 群、S:シアル酸乳糖群、
＊:P<0.05 vs C 群（対照群）（(B) 体重の M 群は C 群に対し P<0.01 と論文中に記載あり）、
ManNAc、NeuAc、シアリル乳糖の間では有意な差は認められなかった

③ DMRV/hIBM モデルマウスにおける NeuAc、ManNAc 及びシアリル乳糖の腓腹筋及び前脛骨筋の重量及び断面積に対する影響

図　2.6.2-6 に示すように、DMRV/hIBM モデルマウス（C 群）で減少している腓腹筋及び前脛骨筋の重量及び断面積は 20 mg/kg/day の NeuAc、ManNAc 及びシアリル乳糖の連続飲水投与によりいずれも同程度の減少の抑制が認められた。この効果は ManNAc、NeuAc、シアリル乳糖の間では有意な差は認められなかった。

（A）腓腹筋（左）と前脛骨筋（右）の重量　　（B）腓腹筋（左）と前脛骨筋（右）の断面積

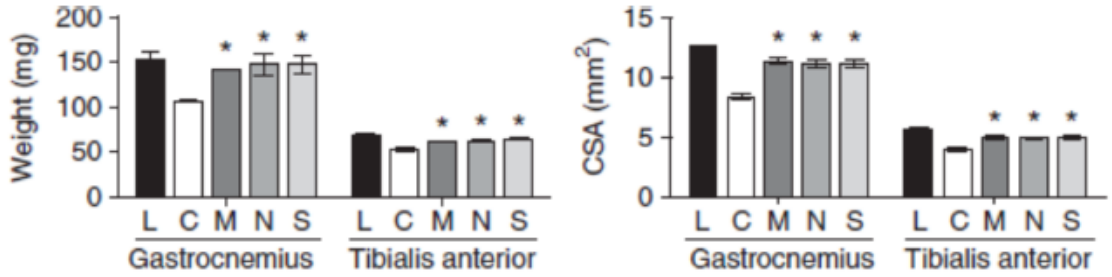


図 2.6.2-6 ManNAc、NeuAc 及びシアリル乳糖による骨格筋の重量及び断面積に対する作用

(A):単離した腓腹筋及び前脛骨筋の重量、(B):腓腹筋及び前脛骨筋の断面積
横軸の L:同腹仔、C:対照、M:ManNAc、N：NeuAc、S:シアリル乳糖
*:p<0.05 vs C 群（対照群）
M 群（ManNAc）、N 群（NeuAc）及び S 群（シアリル乳糖）間では有意差なし

④ DMRV/hIBM モデルマウスにおける ManNAc、NeuAc 及びシアリル乳糖の腓腹筋の等尺性収縮力、強縮性収縮力及び筋萎縮度分布に対する影響

NeuAc、ManNac 及びシアリル乳糖の骨格筋への影響を検討した結果を図 2.6.2-7 に示す。3 被験物質により、等尺性収縮張力、強縮性収縮力は著しく増加した（図 2.6.2-7 A 及び B)。この筋力の増強は、図 2.6.2-7 B で示した骨格筋横断面積の増加と共に、筋線維自体の筋力の改善によるものと考えられた。また、筋横断面積の増加は各々の筋線維の断面積の増加(図 2.6.2-7 C)によるものと考えられた。実際、被験物質投与群に少数だが腓腹筋の萎縮がみられているが、筋力は対照群に比べ優っていた。今回の結果から、筋肉でのシアリル化の改善により筋萎縮が予防され、モデルマウスでみられる筋萎縮には低シアリル化が関与していることが示唆される。

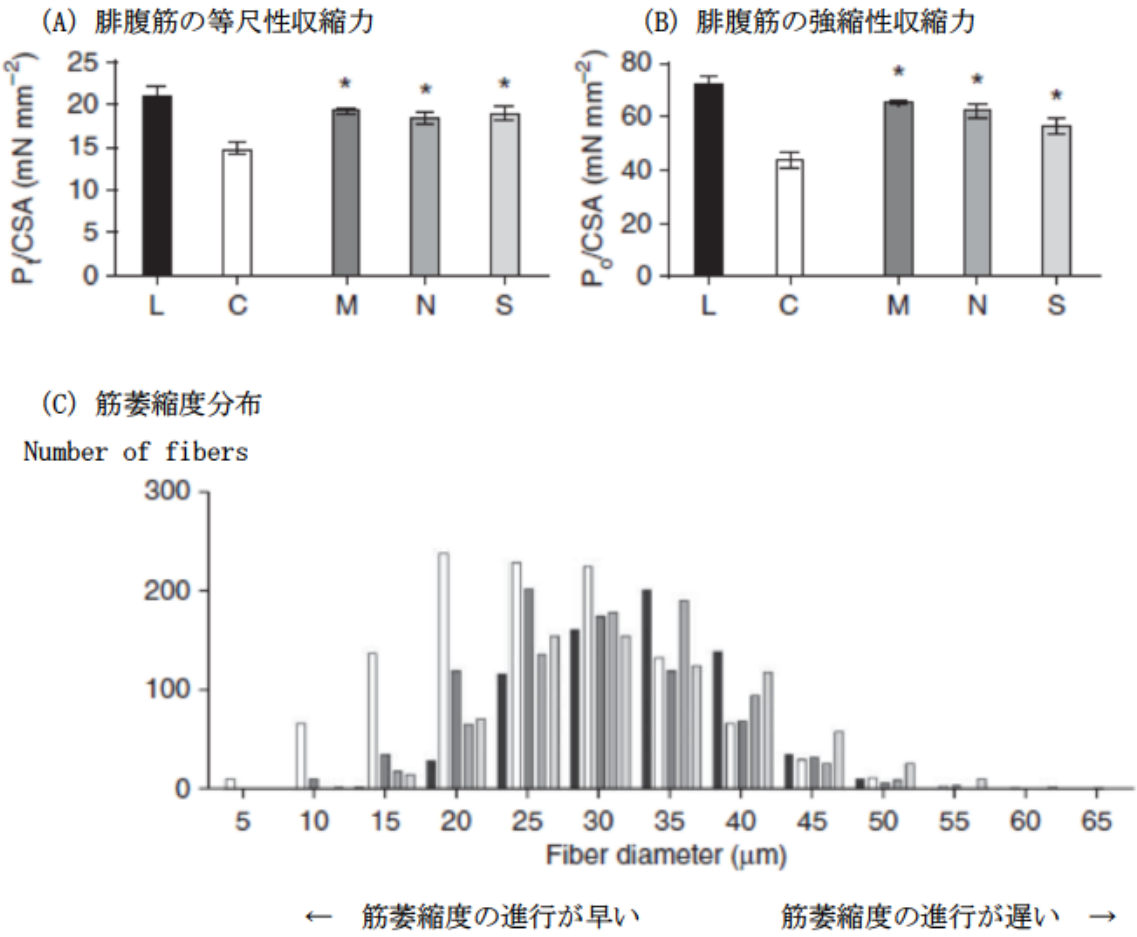


図 2.6.2-7 DMRV/hIBM モデルマウスにおける ManNAc、NeuAc 及びシアリル乳糖の腓腹筋の等尺性収縮張力、強縮性収縮力及び筋萎縮度分布に対する影響

(A):腓腹筋の等尺性収縮力（単刺激時の収縮力）
(B):腓腹筋の強縮性収縮力（反復刺激時の収縮力）
(C):筋線維径の度数分布図（左ほど萎縮が進行）
横軸の L、C、M、N 及び S は図 2.6.2.2-5 に同じ

⑤ DMRV/hIBM モデルマウスの筋肉変性に対する ManNAc、NeuAc 及びシアリル乳糖の経口投与の影響

図 2.6.2-8a に示したように、対照群のすべてのマウスは腓腹筋に縁取りのある空胞を示したが、被験物質投与群では少数のマウスだけが縁取りのある空胞を示した。DMRV-hIBM マウスでは、ManNAc(オッズ比、1.8%)、NeuAc(オッズ比、2.2%及びシアリル乳糖（オッズ比、1.3%)の投与後は、対照群と比較して縁取り空胞の発生は大幅に低かった(100%)。縁取りされた空胞を有する被験物質投与群では、縁取り空胞の数は対照群よりもはるかに少なかった(図 2.6.2-8b)。縁のある液胞は本質的にオートファジー性であることから、酸性ホスファターゼ染色と LC3 および Lamp2 に対する免疫反応性をチェックしたところ、これらのタンパク質の染色は減少していた。図 2.6.2-8a)。

縁取り空胞はオートファジー性であるため DMRV-hIBM マウスでは、筋肉内の細胞内アミロイド封入体が縁取り空胞の形成よりも早く起こることが注目されていることから、骨格筋の凍結切片を調べたところ、被験薬物質投与群の少数のマウスのみがそのような蓄積を示し（図 2.6.2-8a～c)、そのような封入体を有する被験薬物質投与群マウスの割合は被験薬物質投与群マウスよりも大幅に低かった。アミロイドが蓄積する可能性も同様に被験薬物質投与群では低く、ManNAc では 1.3%、NeuAc では 1.6%、シアリル乳糖では 0.9%であった。筋肉および血漿中のアミロイド負荷量を定量化するために、DMRV-hIBM マウスの筋肉に蓄積する β-アミロイドペプチド 1～40 及び 1～42 の含量を ELISA により測定した。その結果、DMRV-hIBM マウスの筋肉ホモジネート中及び血漿中の β-アミロイドペプチド 1～40 及び 1～42 の含量は ManNAc、NueA 及びシリアル乳糖群では有意に低下した(図 2.6.2-8d 及び e)。

DMRV-hIBM マウスの筋肉に蓄積することが知られているリン酸化タウやポリユビキチン化タンパク質に対する ManNAc、NueA 及びシリアル乳糖群の影響についても検討した。その結果、リン酸化タウ（図 2.6.2-8e）またはポリユビキチン化タンパク質の免疫反応性シグナルは認められなかった（データ非開示)。

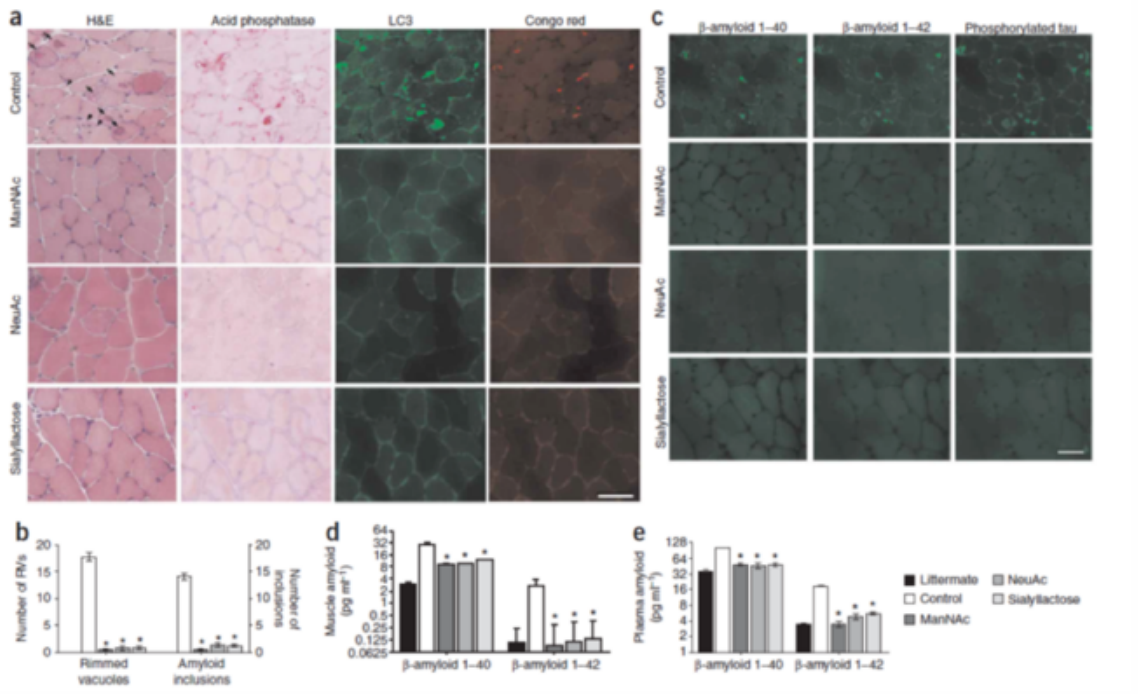


図 2.6.2-8 DMRV-hIBM マウスの筋肉変性に対するシアル酸代謝産物の経口投与の影響

a. DMRV-hIBM マウスの腓腹筋切片における縁のある空胞（矢印）と萎縮性線維（矢印)に対する ManNAc、NeuAc 及びシリアル乳糖の影響。左から H&E 染色：縁取り空砲と細胞内封入体の確認、酸性ホスファターゼ法;活性亢進が縁取り空砲周囲にみられる、LC3;オートファジーの活性、コンゴレッド法;筋線維内に染色を認める。スケールバーは 50 mm を示す。

b. シアル酸処理後の腓腹筋の全切片における縁取り空胞およびアミロイド封入体の数に対する ManNAc、NeuAc 及びシリアル乳糖の影響、＊ p<0.05 vs Control。

c. 細胞内沈着 β-アミロイドおよびリン酸化に対する ManNAc、NeuAc 及びシリアル乳糖の影響。スケールバーは 50 mm を示す。

d. 筋肉中の β-アミロイド 1～40 及び 1～42 含量に対する ManNAc、NeuAc 及びシリアル乳糖の影響。ELISA を用いて測定。 ＊ p<0.05 vs Control。

e. 血漿アミロイド含量に対する ManNAc、NeuAc 及びシリアル乳糖の影響。ELISA を用いて測定。

＊ p<0.05 vs Control。

⑥ DMRV/hIBM モデルマウスにおける ManNAc と NeuAc 投与による腓腹筋の筋病理像

＜添付資料 4.2.1.1-3 参＞

縁取り空胞形成や筋線維内たん白質蓄積物質により、モデルマウスは特に加齢に伴い筋力低下を示す。縁取り空胞はおそらく二次的に、細胞内で蛋白のミスホールディングや凝集により引き起こされると考えられる。腓腹筋の染色にはゴモリ/トリクローム染色法を用いた。

NeuAc、ManNAc 投与群では非投与群にみられる縁取り空胞や筋線維内たん白質蓄積は観察されず、対照群とほとんど同じ筋病理所見であった。また、NeuAc と ManNAc 投与群との間には有効性の違いは認められなかった（図 2.6.2-9)。

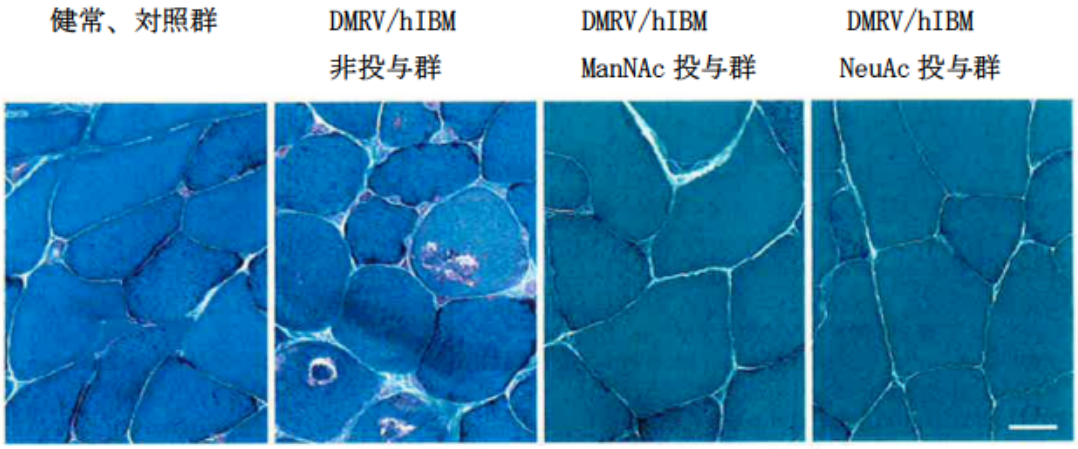


図 2.6.2-9 DMRV/hIBM モデルマウスにおける ManNAc、NeuAc 投与による腓腹筋の筋病理像

2.6.2.2.3 作用機序

今回の DMRV/hIBM モデルマウスを用いて経時的観察から明らかとなったことは、シアル酸の低下から引き起こされる最も早期の変化は筋萎縮である。その後、縁取り空胞の形成（自己貪食空胞の蓄積）と筋線維内でのアミロイドを含む様々なたん白質の蓄積が起こり、筋線維の変性が引き起こされる。この観察された筋萎縮と筋線維の変性によって筋力の低下が生じたと考えられる。

近年、この DMRV/hIBM モデルマウスでみられた筋萎縮及び筋線維の変性と活性酸素種（ROS）の産生増加との関連性が示唆されている[1)]。ヒト GNE ミオパチー患者及び DMRV/hIBM モデルマウスの低シアリル化筋肉において、筋タンパク質が S-ニトロシル化によって高度に修飾され、酸化ストレス応答性遺伝子が有意にアップレギュレートされていた。in vitro 及び in vivo の両実験系モデルで、ROS の産生は、細胞のシアリル化の低下にともない増加した。また、NeuAc はラジカルスカベンジャー作用を有する[2), 3)]が、NeuAc 摂取により全体的なシアリル化を増加させると、ROS 及び S-ニトロシル化タンパク質は減少することが示された。さらに、抗酸化剤である N-アセチルシステインの経口投与によっても、このモデルマウスの筋萎縮と筋力低下の改善が認められた。これらの結果は、本疾患の病因に酸化ストレスが関与している可能性を示すものである。従って、シアル酸補充を目的とした NeuAc 投与により DMRV/hIBM モデルマウスでみられた筋力低下の改善には ROS の低下が関与している可能性が示唆された。

最後に、本モデルマウスで明らかとなった DMRV/hIBM の発症経路と NeuAc 補充療法の効果につき図 2.6.2-10 に示した。投与した NeuAc あるいはシアリル乳糖又はシアル酸の前駆体 ManNAc は筋細胞内に取り込まれ、不足しているシアル酸を補うことで筋萎縮とアミロイドやポリユビキチン化たん白質などの蓄積を抑制し、筋線維の変性を防ぐことで筋力の低下抑制が期待できる。

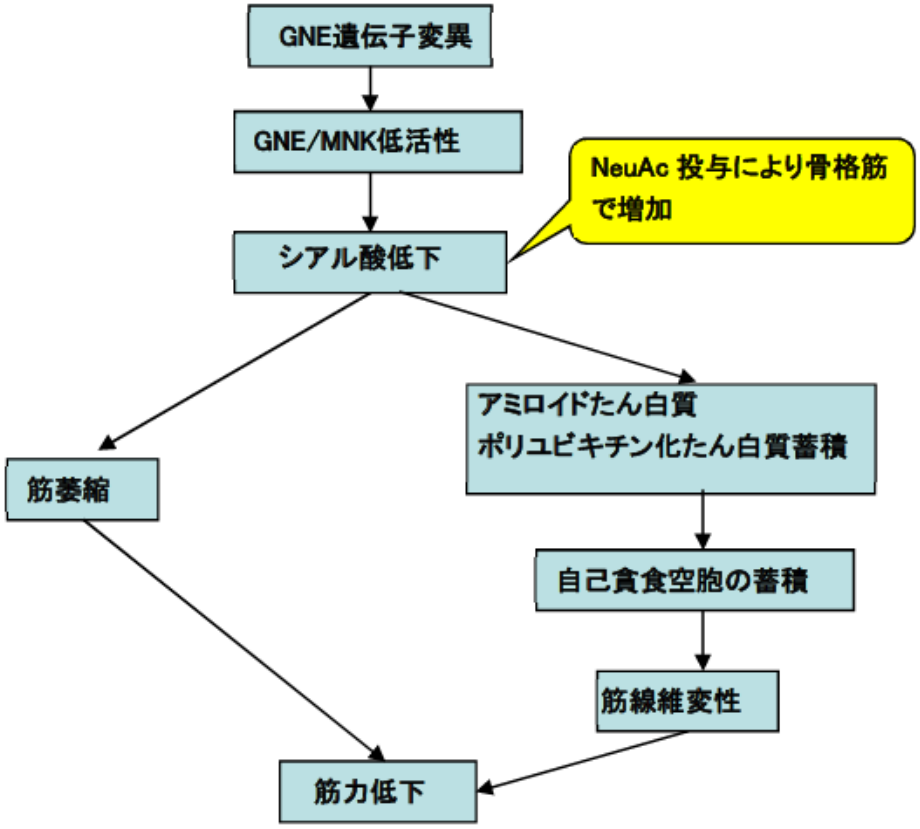


図 2.6.2-10 モデルマウスで明らかとなった DMRV/hIBM の発症経路 NeuAc
：N-アセチルノイラミン酸

2.6.2.3 副次的薬理試験

実施していない。

2.6.2.4 安全性薬理試験

(1) ラット一般症状及び行動に対する NeuAc の作用

＜添付資料 4.2.1.3-1＞

Crl:CD(SD)系雄性ラットの一般症状及び行動に対する NeuAc の作用につき Irwin 法の一部を改変した Irwin の変法を用いて検討した。NeuAc は注射用水（pH 3.02）に溶解した。NeuAc の投与量は 20、200 及び 2000 mg/kg で、投与容量はそれぞれ 1、10 及び 10 mL/kg として胃管を装着したディスポーザブルシリンジを用いて経口投与した。一般症状及び行動観察の評価項目として運動性（活動性）、異常行動、平衡感覚と歩行（失調性歩行、異常歩行及び正向反射）、中枢興奮（振戦、攣縮及びけいれん）、情動性反応（触逃避反応、発声、排尿、脱糞及びカタレプシー）、感覚運動反応（疼痛反応、角膜反射、耳介反射及び驚き反応）、筋緊張度（四肢筋緊張度、握力、駆幹筋緊張度及び腹筋緊張度）、自律神経系（瞳孔、眼瞼閉塞、眼球突出、流涎、流涙、下痢、立毛、体温下降、皮膚色、心拍及び呼吸）及び死亡に対する影響を NeuAc 投与前、投与後 0.5、1、2、4、6 及び 24 時間に観察した。

結果は表 2.6.2-1～表 2.6.2-4 に示した。媒体投与群（表 2.6.2-1）と比較して、NeuAc の 20、200 及び 2000 mg/kg 投与群では、投与直後から 24 時間において検討したすべての一般症状、行動及び死亡に対して有意な変化は認められなかった。これらの結果から、NeuAc 2000 mg/kg まではラット中枢神経系に影響を及ぼさないと考えられる。

表 2.6.2-1 一般症状及び行動に対する媒体（注射用水[a)]）投与群の影響

検討項目	投与後の時間（時間）						
	投与前	0.5	1	2	4	6	24
運動性							
活動性	－	－	－	－	－	－	－
異常行動	－	－	－	－	－	－	－
平衡感覚と歩行							
失調性歩行	－	－	－	－	－	－	－
異常歩行	－	－	－	－	－	－	－
正向反射	－	－	－	－	－	－	－
中枢興奮							
振戦	－	－	－	－	－	－	－
攣縮	－	－	－	－	－	－	－
けいれん	－	－	－	－	－	－	－
情動性反応							
触逃避反応	－	－	－	－	－	－	－
発声	－	－	－	－	－	－	－
排尿（例数）	4	1	0	2	2	3	5
脱糞（例数）	5	3	3	2	1	1	3
カタレプシー	－	－	－	－	－	－	－
感覚運動反応							
疼痛反応	－	－	－	－	－	－	－
角膜反射	－	－	－	－	－	－	－
耳介反射	－	－	－	－	－	－	－
驚き反応	－	－	－	－	－	－	－
筋緊張度							
四肢筋緊張度	－	－	－	－	－	－	－
握力	－	－	－	－	－	－	－
駆幹筋緊張度	－	－	－	－	－	－	－
腹筋緊張度	－	－	－	－	－	－	－
自律神経系							
瞳孔	－	－	－	－	－	－	－
眼瞼閉鎖	－	－	－	－	－	－	－
眼球突出	－	－	－	－	－	－	－
流涎	－	－	－	－	－	－	－
流涙	－	－	－	－	－	－	－
下痢	－	－	－	－	－	－	－
立毛	－	－	－	－	－	－	－
体温下降	－	－	－	－	－	－	－
皮膚色	－	－	－	－	－	－	－
心拍	－	－	－	－	－	－	－
呼吸	－	－	－	－	－	－	－
死亡	－	－	－	－	－	－	－

数字：排尿又は脱糞のみられた例数、－：影響なし、n=6、a)：注射用水（pH 3.02）

表 2.6.2-2 一般症状及び行動に対する NeuAc（20 mg/kg, p.o）投与群の影響

検討項目	投与後の時間（時間）						
	投与前	0.5	1	2	4	6	24
運動性							
活動性	－	－	－	－	－	－	－
異常行動	－	－	－	－	－	－	－
平衡感覚と歩行							
失調性歩行	－	－	－	－	－	－	－
異常歩行	－	－	－	－	－	－	－
正向反射	－	－	－	－	－	－	－
中枢興奮							
振戦	－	－	－	－	－	－	－
攣縮	－	－	－	－	－	－	－
けいれん	－	－	－	－	－	－	－
情動性反応							
触逃避反応	－	－	－	－	－	－	－
発声	－	－	－	－	－	－	－
排尿（例数）	2	2	2	1	1	1	2
脱糞（例数）	3	4	2	1	2	2	6
カタレプシー	－	－	－	－	－	－	－
感覚運動反応							
疼痛反応	－	－	－	－	－	－	－
角膜反射	－	－	－	－	－	－	－
耳介反射	－	－	－	－	－	－	－
驚き反応	－	－	－	－	－	－	－
筋緊張度							
四肢筋緊張度	－	－	－	－	－	－	－
握力	－	－	－	－	－	－	－
躯幹筋緊張度	－	－	－	－	－	－	－
腹筋緊張度	－	－	－	－	－	－	－
自律神経系							
瞳孔	－	－	－	－	－	－	－
眼瞼閉鎖	－	－	－	－	－	－	－
眼球突出	－	－	－	－	－	－	－
流涎	－	－	－	－	－	－	－
流涙	－	－	－	－	－	－	－
下痢	－	－	－	－	－	－	－
立毛	－	－	－	－	－	－	－
体温下降	－	－	－	－	－	－	－
皮膚色	－	－	－	－	－	－	－
心拍	－	－	－	－	－	－	－
呼吸	－	－	－	－	－	－	－
死亡	－	－	－	－	－	－	－

数字：排尿又は脱糞のみられた例数、－：影響なし、n=6

表 2.6.2-3 一般症状及び行動に対する NeuAc（200 mg/kg, p.o）投与群の影響

検討項目	投与後の時間（時間）						
	投与前	0.5	1	2	4	6	24
運動性							
活動性	－	－	－	－	－	－	－
異常行動	－	－	－	－	－	－	－
平衡感覚と歩行							
失調性歩行	－	－	－	－	－	－	－
異常歩行	－	－	－	－	－	－	－
正向反射	－	－	－	－	－	－	－
中枢興奮							
振戦	－	－	－	－	－	－	－
攣縮	－	－	－	－	－	－	－
けいれん	－	－	－	－	－	－	－
情動性反応							
触逃避反応	－	－	－	－	－	－	－
発声	－	－	－	－	－	－	－
排尿（例数）	2	0	1	1	3	1	1
脱糞（例数）	3	4	2	3	3	2	6
カタレプシー	－	－	－	－	－	－	－
感覚運動反応							
疼痛反応	－	－	－	－	－	－	－
角膜反射	－	－	－	－	－	－	－
耳介反射	－	－	－	－	－	－	－
驚き反応	－	－	－	－	－	－	－
筋緊張度							
四肢筋緊張度	－	－	－	－	－	－	－
握力	－	－	－	－	－	－	－
駆幹筋緊張度	－	－	－	－	－	－	－
腹筋緊張度	－	－	－	－	－	－	－
自律神経系							
瞳孔	－	－	－	－	－	－	－
眼瞼閉鎖	－	－	－	－	－	－	－
眼球突出	－	－	－	－	－	－	－
流涎	－	－	－	－	－	－	－
流涙	－	－	－	－	－	－	－
下痢	－	－	－	－	－	－	－
立毛	－	－	－	－	－	－	－
体温下降	－	－	－	－	－	－	－
皮膚色	－	－	－	－	－	－	－
心拍	－	－	－	－	－	－	－
呼吸	－	－	－	－	－	－	－
死亡	－	－	－	－	－	－	－

数字：排尿又は脱糞のみられた例数、－：影響なし、n=6

表 2.6.2-4 一般症状及び行動に対する NeuAc（2000 mg/kg，p.o）投与群の影響

検討項目	投与後の時間（時間）						
	投与前	0.5	1	2	4	6	24
運動性							
活動性	－	－	－	－	－	－	－
異常行動	－	－	－	－	－	－	－
平衡感覚と歩行							
失調性歩行	－	－	－	－	－	－	－
異常歩行	－	－	－	－	－	－	－
正向反射	－	－	－	－	－	－	－
中枢興奮							
振戦	－	－	－	－	－	－	－
攣縮	－	－	－	－	－	－	－
けいれん	－	－	－	－	－	－	－
情動性反応							
触逃避反応	－	－	－	－	－	－	－
発声	－	－	－	－	－	－	－
排尿（例数）	2	2	1	2	1	0	1
脱糞（例数）	4	4	3	2	3	4	5
カタレプシー	－	－	－	－	－	－	－
感覚運動反応							
疼痛反応	－	－	－	－	－	－	－
角膜反射	－	－	－	－	－	－	－
耳介反射	－	－	－	－	－	－	－
驚き反応	－	－	－	－	－	－	－
筋緊張度							
四肢筋緊張度	－	－	－	－	－	－	－
握力	－	－	－	－	－	－	－
駆幹筋緊張度	－	－	－	－	－	－	－
腹筋緊張度	－	－	－	－	－	－	－
自律神経系							
瞳孔	－	－	－	－	－	－	－
眼瞼閉鎖	－	－	－	－	－	－	－
眼球突出	－	－	－	－	－	－	－
流涎	－	－	－	－	－	－	－
流涙	－	－	－	－	－	－	－
下痢	－	－	－	－	－	－	－
立毛	－	－	－	－	－	－	－
体温下降	－	－	－	－	－	－	－
皮膚色	－	－	－	－	－	－	－
心拍	－	－	－	－	－	－	－
呼吸	－	－	－	－	－	－	－
死亡	－	－	－	－	－	－	－

数字：排尿又は脱糞のみられた例数、－：影響なし、n=6

(2) イヌ循環器及び呼吸器系に対する NeuAc の作用

＜添付資料 4.2.1.3-2＞

血圧・心電図用送信器を留置した 1 群 4 匹のビーグル犬（入荷時 9 ヵ月齢の雄）を用いて、心血管系では血圧（収縮期、拡張期及び平均）、心拍数及び心電図（PQ 間隔、QRS 群持続時間、QT 間隔及び QTc）、呼吸器系では呼吸数、1 回換気量及び分時換気量に対する NeuAc の影響を検討した。これらの測定前に動物をチャンバーに収容し、馴化させた後、血圧及び心電図波形は慢性循環実験テレメトリー自動計測システムを用いて測定し、呼吸器系機能は呼吸機能

測定システムを用いて測定した。これらの検討項目に対して、NeuAc の投与前、投与後 0.5、1、2、4、6 及び 24 時間時点での影響を観察した。NeuAc は注射用水（pH 3.02）に溶解し、投与量は 20、200 及び 2000 mg/kg で、投与容量はそれぞれ 1、10 及び 10 mL/kg とした。NeuAc は経口カテーテルを装着したディスポーザブルシリンジを用いて経口投与した。

表 2.6.2-5 に示したように NeuAc 20、200 及び 2000 mg/kg 投与群すべてにおいて、投与後 0.5、1、2、4、6 及び 24 時間の SBP(収縮期血圧)、DBP（拡張期血圧)、MBP（平均血圧）及び HR（心拍数）は媒体投与群と比較して有意な差は認められなかった。心電図に対する媒体投与群の作用に関して表 2.6.2-6 に示した。NeuAc 20、200 及び 2000 mg/kg 投与群すべてにおいて、投与後 0.5、1、2、4、6 及び 24 時間の PQ 間隔、QRS 群持続時間、QT 間隔及び QTc は媒体投与群と比較して有意な差は認められなかった。

以上の結果から NeuAc は循環器系機能に対して影響を与えないと考えられる。

表 2.6.2-5 無麻酔・無拘束イヌの血圧及び心拍数に対する NeuAc の影響

項目	薬剤	用量 (mg/kg)	投与後の時間（時間）						
			投与前	0.5	1	2	4	6	24
SBP (mmHg)	媒体 a)	-	122±8	118±7	114±8	122±9	121±5	119±4	119±12
	NeuAc	20	127±12	116±3	112±10	118±8	122±7	122±6	123±5
	NeuAc	200	130±11	123±9	113±7	120±9	119±6	124±10	121±10
	NeuAc	2000	125±5	116±7	120±8	118±6	120±7	119±7	120±11
DBP (mmHg)	媒体	-	68±8	71±7	67±6	70±8	70±3	66±2	66±11
	NeuAc	20	72±9	69±8	65±7	68±8	69±4	68±4	70±5
	NeuAc	200	74±9	75±10	67±7	71±7	68±5	68±10	69±9
	NeuAc	2000	71±4	69±10	71±10	71±8	71±4	70±6	70±7
MBP (mmHg)	媒体	-	90±8	91±7	85±6	90±7	90±3	86±2	87±10
	NeuAc	20	94±9	89±5	85±8	88±8	90±5	90±2	91±4
	NeuAc	200	97±8	96±10	87±7	91±7	88±5	90±10	90±9
	NeuAc	2000	93±4	89±8	92±9	89±7	91±5	90±6	91±8
HR (bpm)	媒体	-	78±14	101±16	79±9	64±4	63±4	66±11	74±3
	NeuAc	20	81±5	99±9	81±13	72±4	65±9	63±10	84±6
	NeuAc	200	76±14	115±12	89±9	70±7	62±8	67±10	80±10
	NeuAc	2000	77±7	102±11	93±17	69±13	72±18	72±10	81±19

Mean±SD、n=4、a)：注射用水（pH 3.02～3.08）

表 2.6.2-6 無麻酔・無拘束イヌの心電図に対する NeuAc の影響

項目	薬剤	用量 (mg/kg)	投与後の時間（時間）						
			投与前	0.5	1	2	4	6	24
PQ 間隔 (ms)	媒体 a)	-	104±12	101±8	105±5	106±7	107±8	107±7	102±7
	NeuAc	20	101±9	102±10	99±7	103±6	103±11	100±5	99±11
	NeuAc	200	98±8	96±7	101±7	106±9	103±9	102±10	98±6
	NeuAc	2000	101±9	100±8	96±4	105±10	103±8	104±6	100±6
QRS 群持続時間 (ms)	媒体	-	38±2	38±2	38±2	39±1	37±1	38±1	37±2
	NeuAc	20	37±2	36±2	37±1	37±1	36±2	36±1	37±2
	NeuAc	200	37±1	38±2	37±2	38±2	38±2	37±3	38±3
	NeuAc	2000	38±2	38±2	39±1	39±2	38±2	38±2	38±2
QT 間隔 (ms)	媒体	-	224±9	205±8	224±5	241±2	236±5	233±12	227±6
	NeuAc	20	221±11	210±10	226±7	237±5	236±12	237±9	222±8
	NeuAc	200	217±16	200±9	222±8	236±14	240±13	232±13	219±5
	NeuAc	2000	223±2	209±7	217±9	238±3	229±8	232±4	222±15
QTc (ms)	媒体	-	238±9	245±2	241±5	241±11	239±6	233±4	242±5
	NeuAc	20	238±8	243±10	251±16	242±9	239±20	233±12	245±4
	NeuAc	200	233±22	246±8	250±3	245±19	243±17	235±15	241±16
	NeuAc	2000	237±9	245±9	248±7	241±12	240±14	242±8	243±9

Mean±SD、n=4、a)：注射用水（pH 3.02～3.08）

呼吸器系に対する NeuAc の影響について表 2.6.2-7 に示した。NeuAc 20、200 及び 2000 mg/kg 投与群すべてにおいて、投与後 0.5、1、2、4、6 及び 24 時間の呼吸数、1 回換気量及び分時換気量は媒体投与群と比較して有意な差は認められなかった。

以上の結果から、NeuAc は呼吸器系機能に影響を与えないと考えられる。

表 2.6.2-7 無麻酔・無拘束イヌの呼吸器系に対する NeuAc の影響

項目	薬剤	用量 (mg/kg)	投与後の時間（時間）						
			投与前	0.5	1	2	4	6	24
呼吸数 (息回数/分)	媒体 a)	-	17±1	25±9	18±2	19±2	16±3	15±4	17±3
	NeuAc	20	18±2	23±4	21±6	19±2	19±2	16±2	17±2
	NeuAc	200	17±3	23±3	24±4	17±3	15±4	19±4	18±3
	NeuAc	2000	16±4	31±13	20±4	15±4	15±4	17±5	17±3
1 回換気量 (mL/stroke)	媒体	-	99±9	65±17	88±13	84±15	101±18	115±22	111±24
	NeuAc	20	95±9	80±15	88±14	84±12	90±11	110±14	98±9
	NeuAc	200	100±6	92±35	74±6	82±11	104±17	95±22	93±9
	NeuAc	2000	102±30	75±21	82±20	104±14	106±10	103±19	105±18
分時換気量 (mL/min)	媒体	-	1618±52	1490±269	1473±110	1540±300	1548±136	1552±218	1755±235
	NeuAc	20	1581±216	1749±209	1714±201	1463±113	1603±124	1587±311	1631±163
	NeuAc	200	1527±192	1620±233	1608±201	1354±212	1460±251	1395±125	1570±167
	NeuAc	2000	1566±54	1836±291	1509±192	1480±186	1543±270	1584±212	1700±124

Mean±SD、n=4、a)：注射用水（pH 3.02～3.08）

(3) hERG（human ether-a-go-go related gene）電流に対する NeuAc の作用(in vitro)

＜添付資料 4.2.1.3-3＞

ヒト由来の遺伝子（human ether-a-go-go related gene）をヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞に導入して作成した hERG 導入 HEK293 細胞を用いて、ホールセルクランプ法により hERG 電流を測定した。測定用の細胞を接着させたカバーガラスを測定チャンバー（容量：0.7 mL）内に配

置し、細胞外液（10 mM HEPES buffer:NaCl 137 mM、KCl 4 mM、$CaCl_2$ 1.8 mM、$MgCl_2$ 1 mM、glucose 10 mM、pH 7.4）で灌流した。hERG 電流は電極内液を充填したガラス電極（実測値：2.6～4.6 MΩ、抵抗許容範囲：2～6 MΩ）を用い、パッチクランプ用アンプを介して測定した。NeuAc は 6×10^{-4}、2×10^{-3}、6×10^{-3} 及び 2×10^{-2} Mol/L の 4 濃度につき検討した。

表 2.6.2-8 に示したように、NeuAc 6×10^{-4}、2×10^{-3} 及び 6×10^{-3} Mol/L 添加後の hERG 電流抑制率はそれぞれ 2.4、0.1 及び 5.6%であった。なお、高用量の NeuAc（2×10^{-2} Mol/L）を 2 細胞に適用したところ、リーク電流が適用後 10 分経過する前に 100 pA 以上になったため評価はできなかった。

陽性対照薬の E-4031 は 1×10^{-7} Mol/L で強力な hERG 電流阻害作用（抑制率 92.2%）を示した。

表 2.6.2-8 hERG 導入 HEK293 細胞の hERG 電流に対する NeuAc の影響

薬剤	濃度（Mol/L）	実験した細胞数	相対値（%）	阻害率（%）
媒体 b)	－	5	95.2±3.7	－
NeuAc	6×10^{-4}	5	92.9±3.1	2.4±3.2
NeuAc	2×10^{-3}	5	95.1±2.1	0.1±2.2
NeuAc	6×10^{-3}	5	89.9±2.8*	5.6±2.9
NeuAc	2×10^{-2}	2	--a)	--a)
E-4031	1×10^{-7}	5	7.4±2.6†	92.2±2.7

mean±S.D、*p<0.05 vs 媒体（Dunnet's Multiple Comparison）、†p<0.01 vs 媒体（Student's-test）
相対値（%）＝（薬剤添加 10 分後の値/薬剤添加前の値）×100
阻害率（%）＝100-[薬剤の個々の相対値/媒体の平均相対値]×100
a):NeuAc 添加後リーク電流の著しい増加がみられたため、測定不能
b):注射用水（pH 3.09）

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

以上の成績から、NeuAc 投与によりシアリル化の増加に伴い、DMRV/hIBM モデルマウスで筋症状の進行、筋力低下は顕著に改善した。また、骨格筋に縁取り空胞がわずかにみられた少数例においても少なくとも進行を遅延させることが示唆された。NeuAc の経口投与により、筋肉や他の組織でシアル酸が増加したが、これは GNE 遺伝子の p.M743T（旧称 M712T）変異のノックインマウスで母マウスへの ManNAc 投与により産仔のたん白のシアリル化が増加したことと同様なものであった。筋線維中にアミロイドが蓄積する機序は明らかになっていないが、NeuAc が糖たん白質の安定化や、過酸化水素のようなラジカルを除去する物質として働いていることから、病態では様々な糖たん白質の変性や ROS によりアミロイド蓄積が引き起こされると考えられた。事実、ヒト GNE ミオパチー患者及び DMRV/hIBM モデルマウスの低シアリル化筋肉において、筋タンパク質が S-ニトロシル化によって高度に修飾され、酸化ストレス応答性遺伝子が有意にアップレギュレートされることが報告されている [1]。

今回の結果から、NeuAc による低シアリル化の是正により筋肉のアミロイド蓄積を減らせる可能性があることが推定される。さらに、アミロイド β-たん白の分解酵素である neprilysin が、低シアリル化により酵素活性が低下すること、縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの筋肉で発現が減少していることが示された。このことは低シアリル化により neprilysin が障害を受けアミロイド β-たん白の蓄積をもたらしている可能性を示唆している。

以上まとめると、DMRV/hIBM モデルマウスにおいて低シアリル化は単に代謝障害の副産物というものではなく、この疾患の発症要因の一つと考えられる。DMRV/hIBM モデルマウスでの筋肉におけるシアル酸の補充により骨格筋の萎縮、筋力の低下、筋線維の退縮を顕著に予防できることが示された。

安全性薬理試験において、NeuAc は一般症状、行動、循環器系及び呼吸器系に対してほとんど影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、NeuAc を摂取すると縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの患者の病態の進行抑制が期待できること、そして安全性が高いことから、有効な治療薬が存在しない難病の縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーにおいて本剤は有益性の高い治療薬になりうると考えられる。

2.6.2.7 参考文献

1) Cho A, Christine M, Malicdan V, Miyakawa M, Nonaka I, Nishino I and Noguchi S. Sialic acid deficiency is associated with oxidative stress leading to muscle atrophy and weakness in GNE myopathy. Hum Mol Genet. 2017 Aug 15;26(16):3081-3093. doi: 10.1093/hmg/ddx192. PubMed PMID: 28505249.
2) Iijima, R., Takahashi, H., Namme, R., Ikegami, S. and Yamazaki, M. Novel biological function of sialic acid (N-acetylneuraminic acid) as a hydrogen peroxide scavenger. FEBS Lett.2004;561:163-166.
3) Ogasawara, Y., Namai, T., Yoshino, F., Lee, M.C. and Ishii, K. Sialic acid is an essential moiety of mucin as a hydroxyl radical scavenger. FEBS Lett.2007;581:2473-2477.

目次

略語・略号一覧 2
2.6.3 薬理試験概要表 3
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 4
2.6.3.3 副次的薬理試験 6
2.6.3.4 安全性薬理試験 7
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 8

略語・略号一覧

略語・略号	内容
DMRV	縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー(Distal myopathy with rimmed vacuoles)
GNE	ウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ (UDP-GlcNAc 2-epimerase)
hERG	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子(Human Ether-a-go-go Related Gene)
hIBM	遺伝性封入体ミオパチー (Hereditary inclusion body myopathy)
ManNAc	N-アセチルマンノサミン (N-acetylmannosamine)
MNK	N-アセチルマンノサミンキナーゼ (N-acetylmannosamine kinase)
NeuAc	N-アセチルノイラミン酸 (N-acetylneuraminc acid)

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：N-アセチルノイラミン酸

	試験の種類	動物種／組織	投与方法	報告書発行年及び実施施設	添付資料
薬効を裏付ける試験	遠位型ミオパチーにおける遺伝子異常とシアル酸低下の関係	COS-7 細胞 健常人及び DMRV/hIBM 患者の血清、骨格筋、筋管細胞及び線維芽細胞	in vitro	2004 年 国立精神・神経医療研究センター、神経研究所	4.2.1.1-1 参考資料
	DMRV/hIBM マウスモデルにおける N-アセチルノイラミン酸（NeuAc）の筋症状改善作用	DMRV／hIBM マウス	経口投与	2009 年 国立精神・神経医療研究センター、神経研究所	4.2.1.1-2 参考資料
	DMRV/hIBM マウスモデルにおける NeuAc の作用(筋病理像の検証)	DMRV／hIBM マウス	経口投与	2010 年 国立精神・神経医療研究センター、神経研究所	4.2.1.1-3 参考資料
安全性薬理試験	中枢系	ラット	経口投与	[redacted]	4.2.1.3-1[1)]
	循環器系及び呼吸器系	イヌ	経口投与	[redacted]	4.2.1.3-2[1)]
	hERG 電流	HEK293 細胞	in vitro	[redacted]	4.2.1.3-3[1)]

1)：安全性薬理試験ガイドラインに準拠して GLP にて実施した試験

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

筆頭著者・雑誌名	表題	試験目的	動物種／被験物質	試験結果	CTD における記載場所
Noguchi S et al. J.Biol. Chem 2004; 279(12): 11402-7.	Reduction of UDP-N-acetyl glucosamine 2-epimerase/N-acetyl mannosamine kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles.	日本人 DMRV/hIBM 患者から発見された GNE 遺伝子変異 12 種類（p.C44S（旧称 C13S）、p.H163Q（旧称 H132Q）、p.D207V（旧称 D176V）、p.R208C（旧称 R177C）、p.V362A（旧称 V331A）、p.D409Y（旧称 D378Y）、p.I503T（旧称 I472T）、p.A555V（旧称 A524V）、p.V603L（旧称 V572L）、p.A661T（旧称 A630T）、p.A622V（旧称 A631V）、p.G739S（旧称 G708S））につき、これらの遺伝子変異がシアル酸合成において重要な GNE 酵素活性を低下させているか否かを遺伝子組み換え技術を用いて検討する。	COS-7 細胞 健常人及び DMRV／hIBM 患者の血清、骨格筋、筋管細胞及び線維芽細胞／ NeuAc	日本人の DMRV/hIBM 患者から 12 種類の GNE 遺伝子変異を見出し、これを遺伝子組み換え技術を用いて COS-7 細胞に発現させたところ、シアル酸合成の初期 2 段階を担う GNE 及び MNK のどちらかの酵素活性は低下していた。DMRV/hIBM 患者から採取した初代前脛骨筋細胞ではこの酵素活性の低下に伴い、シアル酸含量も低下していた。このシアル酸含量の低下は筋細胞培養液中に 5 mM NeuAc を加えることで対照群（健常人からの筋細胞のシアル酸含量）のレベルまで回復しうることが明らかとなった。	4.2.1.1-1 参考資料
Malicdan MC et al. Nature Medicine 2009;15(6):690-5.	Prophylactic treatment with sialic acid metabolites precludes the development of the	DMRV/hIBM の患者ではシアル酸生合成経路の重要な酵素である GNE/MNK をコードする GNE 遺伝子に変	DMRV／hIBM マウス／ NeuAc	遺伝子工学的手法によって内在性の GNE 遺伝子は破壊され、ヒト変異 GNE p.D207V（旧称 D176V）のみを発現する DMRV/hIBM モデルマウスを作製し、ヒトで見られるミオパチー症状の特徴を有するか否か検討した。こ	4.2.1.1-2 参考資料

筆頭著者・雑誌名	表題	試験目的	動物種／被験物質	試験結果	CTD における記載場所
	myopathic phenotype in the DMRV-hIBM mouse model.	異があり、このミスセンス変異を有するヒト GNE トランスジーンのみを発現する DMRV/hIBM モデルマウスを用いて NeuAc の作用を検討する。		のモデルマウスではヒトで観察されたミオパチーの症状である運動機能の低下、筋収縮力の低下、筋萎縮を観察し、また、病理観察では、筋線維の大小不同、縁取り空胞や筋線維内にアミロイドなど多数のたん白質蓄積を観察した。これらの表現型や病理変化は NeuAc の長期投与（約 50 週間）により予防できることが明らかとなった。	
Noguchi S et al. Brain and Nerve 2010; 62(6): 601-7.	Animal model of distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy and pre-clinical trial with sugar compounds.	DMRV/hIBM モデルマウスにおける NeuAc の経口投与による腓腹筋の筋病理像を非投与のそれと比較する。	DMRV／hIBM マウス／NeuAc	縁取り空胞形成や細胞内蓄積物質により、モデルマウスは特に加齢に伴い筋力低下を示す。腓腹筋の染色にはゴモリ/トリクローム染色法を用いた。 NeuAc 投与群では非投与群にみられる縁取り空胞や細胞内蓄積たん白質は観察されず、対照群とほとんど同じ筋病理所見であった。また、NeuAcNAc 投与群との間には有効性の違いは認められなかった。	4.2.1.1-3 参考資料

2.6.3.3 副次的薬理試験

実施していない。

2.6.3.4 安全性薬理試験

試験番号名	表題	試験目的	動物種／被験物質	試験結果	CTDにおける記載場所
[redacted] 社内資料 試験番号 [redacted]	N-アセチルノイラミン酸の安全性薬理試験 ラットの一般症状及び行動に及ぼす作用	安全性薬理試験の一環として一般症状及び行動に対する影響を検討する。	SD系雄性ラット Irwinの変法を使用 NeuAc	NeuAc 20、200及び2000 mg/kgの経口投与はラットの一般症状、行動及び死亡に対し影響を与えなかった。	4.2.1.3-1
[redacted] 社内資料 試験番号 [redacted]	N-アセチルノイラミン酸の安全性薬理試験 無麻酔・無拘束イヌの循環器系及び呼吸器系に及ぼす作用	安全性薬理試験の一環として循環器系及び呼吸器系に対する影響を検討する。	ビーグル犬 NeuAc	NeuAc 20、200及び2000 mg/kgの経口投与では収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧及び心拍数に対し影響を与えなかった。心電図のPQ間隔、QRS群持続時間、QT間隔及びQTcに対しても影響を与えなかった。 呼吸器系機能に関しては、呼吸数、1回換気量及び分時換気量に対しNeuAcは影響を与えなかった。	4.2.1.3-2
[redacted] 社内資料 試験番号 [redacted]	N-アセチルノイラミン酸の安全性薬理試験 hERG電流に及ぼす作用	安全性薬理試験の一環としてin vitroにおけるhERG電流に対する影響を検討する。	ヒト由来の遺伝子(Human ether-a-go-go related gene)をヒト胎児腎臓由来のHEK293細胞に導入した細胞を使用。 NeuAc、E-4031	NeuAcの6×10^{-4}、2×10^{-3}、6×10^{-3}及び2×10^{-2} mol/Lを適用し、hERG電流に対する作用を検討した。NeuAcの6×10^{-4}、2×10^{-3}及び6×10^{-3} mol/Lの添加によるhERG電流の阻害率はそれぞれ2.4、0.1及び5.6%であった。NeuAc 2×10^{-2} mol/Lは、リーク電流が100pA以上になったため評価できなかった。陽性対照薬のE-4031は1×10^{-7} mol/Lにおいて92.2%の阻害率を示した。	4.2.1.3-3

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

実施していない。