目次

1 緒言 4
1.1 医薬品の構造及び薬理的特性に関する簡潔な情報 4
1.2 予定する効能又は効果 5
1.3 予定する用法及び用量 5
2 参考文献 6

図目次

図 2.6.1-1　　ミグルスタットの化学構造 5

略語及び用語の説明

略語及び用語	日本語	英語
ALGLU	アルグルコシダーゼ アルファ	alglucosidase alfa
AT2221	ミグルスタット	miglustat
ERT	酵素補充療法	enzyme replacement therapy
GAA	酸性 α-グルコシダーゼ	acid α-glucosidase
rhGAA	遺伝子組換えヒト酸性 α-グルコシダーゼ	recombinant human acid α-glucosidase

1　緒言

1.1　医薬品の構造及び薬理的特性に関する簡潔な情報

ポンペ病は、ライソゾーム内のグリコーゲンの分解に関与する酵素、酸性 α-グルコシダーゼ（GAA）をコードする遺伝子の突然変異によって引き起こされるまれな常染色体劣性遺伝性疾患である。この酵素活性の欠乏により、ライソゾーム内にグリコーゲンが蓄積し、特に心臓、骨格筋及び肝臓において細胞機能の破壊が進行する。

現時点で既承認の治療法は遺伝子組換えヒト酸性 α-グルコシダーゼ（rhGAA）を用いた酵素補充療法（ERT）であり、体外から酵素を供給することにより酵素活性の欠乏を補う。日本ではポンペ病患者を対象として、2007 年 4 月 18 日にアルグルコシダーゼ アルファ（販売名：マイオザイム®点滴静注用 50mg、ALGLU）が承認され、2021 年 9 月 27 日にアバルグルコシダーゼ アルファ（販売名：ネクスビアザイム®点滴静注用 100mg）が新たな酵素製剤として承認された。

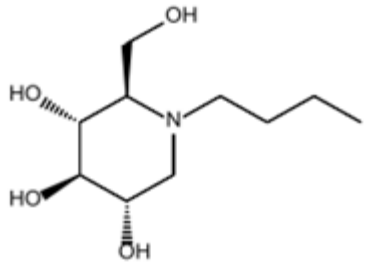
ALGLU を用いた治療では、治療開始初期の筋機能、運動機能及び呼吸機能は改善されるが、その後、これらの機能は緩やかに低下する。ALGLU に対する抵抗性の最も重要な要因は、非効率的な筋肉組織への取込みであると考えられており（Kohler et al. 2018）、筋肉への標的指向性が改善された新たな ERT に対するアンメットメディカルニーズが存在する。

シパグルコシダーゼ アルファ（遺伝子組換え）（ATB200）（以下、シパグルコシダーゼ アルファ）及びミグルスタット（AT2221）は、成人のポンペ病患者の治療を目的とした新規医薬品で、2 剤の併用療法として開発されている。

ミグルスタットの構造式を図 2.6.1-1 に示す。ミグルスタットは、D-グルコースの合成アナログであるイミノ糖であり、血中で rhGAA と選択的に結合し、その不活性化を抑制する酵素安定化剤として機能する。ミグルスタットは、シパグルコシダーゼ アルファ活性部位に直接結合して、血中の中性 pH 下での物理的安定性を高め、変性や不可逆的な不活性化を最小限に抑える。血中でシパグルコシダーゼ アルファを安定化させることにより、血中濃度が上昇し、疾患関連組織への送達、筋組織でのグリコーゲン減少作用並びに筋病変及び筋機能が改善される。ミグルスタットはシパグルコシダーゼ アルファとの併用療法として開発された。ミグルスタット単独では、グリコーゲン減少作用を示さず、ポンペ病患者に対する直接の薬理学的作用はない。

ミグルスタットは、現在多くの国々でゴーシェ病 1 型及び／又はニーマン・ピック病 C 型の治療薬として販売名 Zavesca®で承認されている。国内では、ミグルスタットはニーマン・ピック病 C 型の治療薬として 2012 年 3 月 30 日に製造販売承認されたブレーザベス®カプセルの有効成分であり、再審査期間（10 年）が 2022 年 3 月 29 日に終了している。本申請でのミグルスタットの申請区分は（4）新効能医薬品、（6）新用量医薬品、（8 の 2）剤形追加に係る医薬品（再審査期間中でないもの）である。

図 2.6.1-1　　ミグルスタットの化学構造



Miglustat
N-butyl-deoxynojirimycin

1.2　予定する効能又は効果

遅発型ポンペ病に対するシパグルコシダーゼ アルファ（遺伝子組換え）との併用療法

1.3　予定する用法及び用量

シパグルコシダーゼ アルファ（遺伝子組換え）との併用において、通常、成人には体重 40 kg 以上 50 kg 未満の場合はミグルスタットとして 1 回 195 mg、体重 50 kg 以上の場合はミグルスタットとして 1 回 260 mg を隔週経口投与する。ミグルスタット経口投与 1 時間後にシパグルコシダーゼ アルファ（遺伝子組換え）を点滴静脈内投与する。なお、ミグルスタットは食事の前後 2 時間を避けて投与すること。

2 参考文献

Kohler L, Puertollano R, Raben N. Pompe Disease: From Basic Science to Therapy. Neurotherapeutics. 2018;15(4):928-42.

目次

1　まとめ……10
2　効力を裏付ける試験……12
2.1　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用……12
2.1.1　In vitro 試験……12
2.1.2　In vivo 試験……15
3　副次的薬理試験……69
4　安全性薬理試験……70
4.1　ミグルスタット……70
4.1.1　In vitro 試験……70
4.2　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用……70
4.2.1　In vivo 試験……70
5　薬力学的薬物相互作用試験……71
6　考察及び結論……72
7　参考文献……76

表目次

表 2.6.2- 1　rhGAA の融解温度 14

表 2.6.2- 2　294A 及び 294B 試験の群構成 16

表 2.6.2- 3　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン減少作用（294B 試験） 18

表 2.6.2- 4　296 試験の群構成 26

表 2.6.2- 5　320 試験の群構成 29

表 2.6.2- 6　328 試験の群構成 30

表 2.6.2- 7　343 試験の群構成 31

表 2.6.2- 8　384 試験の群構成 33

表 2.6.2- 9　392 試験の群構成 33

表 2.6.2- 10　374 試験の群構成 34

表 2.6.2- 11　群構成 37

表 2.6.2- 12　391 試験の群構成 41

表 2.6.2- 13　359 試験の群構成 48

表 2.6.2- 14　362 試験の群構成 55

表 2.6.2- 15　408 試験の群構成 67

図目次

図 2.6.2- 1　ミグルスタットによる rhGAA の安定化作用（pH 7.4）.....13

図 2.6.2- 2　ヒト血中でのミグルスタットによるシパグルコシダーゼ アルファの安定化作用.....15

図 2.6.2- 3　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 6 回）による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン減少作用（294A 試験）.....19

図 2.6.2- 4　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン減少作用（294B 試験）.....20

図 2.6.2- 5　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 6 回）による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン蓄積減少作用（PAS 染色、294A 試験）.....21

図 2.6.2- 6　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）投与による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン蓄積減少作用（PAS 染色、294B 試験）.....22

図 2.6.2- 7　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 6 回）による *Gaa* KO マウス組織中 GAA 活性増加作用（294A 試験）.....23

図 2.6.2- 8　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）による *Gaa* KO マウス組織中 GAA 活性に対する作用（294B 試験）.....24

図 2.6.2- 9　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 6 回）による抗薬物抗体産生（294A 試験）.....25

図 2.6.2- 10　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）による抗薬物抗体産生（294B 試験）.....25

図 2.6.2- 11　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのグリコーゲン減少作用（296 試験）.....27

図 2.6.2- 12　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋での GAA 活性に対する作用（296 試験）.....28

図 2.6.2- 13　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのグリコーゲン蓄積減少作用（PAS 染色、296 試験）.....28

図 2.6.2- 14　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのグリコーゲン減少作用（296、320 及び 328 試験）.....31

図 2.6.2- 15　シパグルコシダーゼ アルファ又はミグルスタット単独投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのグリコーゲン減少作用（343 試験）.....32

図 2.6.2- 16　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのライソゾーム内 GAA 取込みへの作用（単回投与 72 時間後）（384 試験）.....34

図 2.6.2- 17　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのライソゾーム内 GAA 取込みへの作用（単回投与 72 時間後）（392 試験）.....35

図 2.6.2- 18　シパグルコシダーゼ アルファ単独投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのライソゾーム内 GAA 取込みへの作用（2 回目投与 14 日後）（374 試験）.....35

図 2.6.2- 19　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのグリコーゲン蓄積減少作用（PAS 染色及び TEM 評価）.....37

図 2.6.2- 20　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス組織中 LAMP1 発現に対する作用（IHC 解析）.....38

図 2.6.2- 21　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウスヒラメ筋各種線維での LAMP1 発現に対する作用（IHC 解析）.....39

図 2.6.2- 22　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのオートファジー関連マーカー（LC3 II 及び p62）に対する作用（IHC 解析）.....40

図 2.6.2- 23　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋での LAMP1 発現に対する作用（IHC 解析）.....42

図 2.6.2- 24　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋での LC3 II 発現に対する作用（IHC 解析）.....43

図 2.6.2- 25　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）による *Gaa* KO マウス腓腹筋白色部単一筋線維での LAMP1 及び LC3 II 発現に対する作用（免疫蛍光二重染色法）.....44

図 2.6.2- 26　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）による *Gaa* KO マウス腓腹筋白色部での筋線維構造に対する作用（SHG 及び TPEF 顕微鏡法）.....45

図 2.6.2- 27　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 11 回）による *Gaa* KO マウス筋組織での AMPK シグナル伝達に対する作用.....46

図 2.6.2- 28　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 11 回）による *Gaa* KO マウス筋組織での mTORC1 シグナル伝達に対する作用.....47

図 2.6.2- 29　シパグルコシダーゼ アルファ（EB2 及び GMP4）／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン減少作用（アミログルコシダーゼ法）.....50

図 2.6.2- 30　シパグルコシダーゼ アルファ（EB2 及び GMP4）／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス組織中 GAA 活性に対する作用.....51

図 2.6.2- 31　シパグルコシダーゼ アルファ単独投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋での LAMP1 発現に対する作用（IHC 解析）.....51

図 2.6.2- 32　シパグルコシダーゼ アルファ（EB2 及び GMP4）／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋での LAMP1 発現に対する作用（IHC 解析）.....52

図 2.6.2- 33　*Gaa* KO 及び WT マウス大腿四頭筋での LC3 II 発現（IHC 解析）.....53

図 2.6.2- 34　シパグルコシダーゼ アルファ（EB2 及び GMP4）／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋での LC3 II 発現に対する作用（IHC 解析）.....53

図 2.6.2- 35　シパグルコシダーゼ アルファ（EB2 及び GMP4）／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのジスフェルリン細胞内蓄積に対する作用（IHC 解析）.....54

図 2.6.2- 36　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウスの筋機能改善.....56

図 2.6.2- 37　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 6 回）による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン減少作用.....57

図 2.6.2- 38　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 12 回）による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン減少作用.....58

図 2.6.2- 39　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 6 回）による *Gaa* KO マウス組織中 GAA 活性.....59

図 2.6.2- 40　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 12 回）による *Gaa* KO マウス組織中 GAA 活性.....60

図 2.6.2- 41　*Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン量と握力改善の相関.....61

図 2.6.2- 42　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用（隔週 6 又は 12 回）投与による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋での LAMP1 発現に対する作用（IHC 解析）.....62

図 2.6.2- 43　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用（隔週 6 又は 12 回）投与による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋での LC3 II 発現に対する作用（IHC 解析）.....63

図 2.6.2- 44　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用（隔週 6 又は 12 回）投与による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのジスフェルリン細胞内蓄積に対する作用（IHC 解析）.....64

図 2.6.2- 45　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用（隔週 12 回）投与による *Gaa* KO マウス上腕三頭筋での LAMP1 発現に対する作用（IHC 解析）.....65

図 2.6.2- 46　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用（隔週 12 回）投与による *Gaa* KO マウス上腕三頭筋での LC3 II 発現に対する作用（IHC 解析）.....65

図 2.6.2- 47　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用（隔週 12 回）投与による *Gaa* KO マウス上腕三頭筋でのジスフェルリン細胞内蓄積に対する作用（IHC 解析）.....66

図 2.6.2- 48　室温で 4 時間放置後のシパグルコシダーゼ アルファを単独又はミグルスタットとの併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン減少作用.....68

略語及び用語の説明

略語及び用語	日本語	英語
4EBP1	―	eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
4-MU	4-メチルウンベリフェロン	4-methylumbelliferone
4-MU-α-Glc	4-メチルウンベリフェリル-α-D-グルコピラノシド	4-methylumbelliferyl-α-D-glucopyranoside
ALGLU	アルグルコシダーゼ アルファ	alglucosidase alfa
AMPK	アデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼ	adenosine monophosphate activated protein kinase
AT2221	ミグルスタット	miglustat
AUC	血漿中濃度 - 時間曲線下面積	area under the concentration-time curve
bis-M6P	ビスマンノース-6-リン酸	bis-phosphorylated high mannose 6-phosphate
CI-MPR	カチオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体	cation-independent mannose 6-phosphate receptor
CQA	重要品質特性	critical quality attributes
DPH	ジフェンヒドラミン塩酸塩	diphenhydramine hydrochloride
EB	エンジニアリングバッチ	engineering batch
ELISA	酵素結合免疫測定法	enzyme-linked immunosorbent assay
ERT	酵素補充療法	enzyme replacement therapy
Gaa	マウス酸性 α-グルコシダーゼをコードする遺伝子	gene encoding mouse acid α-glucosidase
GAA	酸性 α-グルコシダーゼ	acid α-glucosidase
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準	Good Laboratory Practice
GMP	医薬品の製造管理及び品質管理の基準	Good Manufacturing Practice
HEK	ヒト胎児腎	human embryonic kidney
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子	human ether-à-go-go-related gene
HPAEC-PAD	パルスアンペロメトリック検出による高 pH 陰イオン交換クロマトグラフィー	high-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection
IC_{50}	50%阻害濃度	50% inhibitory concentration
IgG	免疫グロブリン G	immunoglobulin G
IHC	免疫組織化学	immunohistochemistry
KO	ノックアウト	knock-out
LAMP1	―	lysosome-associated membrane protein 1
LC3	―	microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LKB1	―	liver kinase B1
M6P	マンノース-6-リン酸	mannose 6-phosphate
MHC	ミオシン重鎖	myosin heavy chain isoform

略語及び用語	日本語	英語
mTORC1	―	mammalian target of rapamycin complex 1
MTX	メトトレキサート	methotrexate
p62	セクエストソーム-1	sequestosome-1
PAS	過ヨウ素酸シッフ	periodic acid-Schiff
p-AMPKα	リン酸化型 AMPKα サブユニット	phosphorylated AMPKα subunit
PK	薬物動態	pharmacokinetic
RF	大腿直筋	rectus femoris
rhGAA	遺伝子組換えヒト酸性 α-グルコシダーゼ	recombinant human acid α-glucosidase
SHG	第二高調波	second harmonic generation
TEM	透過型電子顕微鏡	transmission electron microscopy
Tm	融解温度	melting temperature
TPEF	2 光子励起蛍光	two-photon excited fluorescence
VL	外側広筋	vastus lateralis
VM	内側広筋	vastus medialis
WT	野生型	wild type

1　まとめ

ポンペ病は、ライソゾーム内のグリコーゲンの分解に関与する酵素、酸性 α-グルコシダーゼ（GAA）をコードする遺伝子の突然変異によって引き起こされるまれな常染色体劣性遺伝性疾患である。この酵素活性の欠乏により、ライソゾーム内にグリコーゲンが蓄積し、特に心臓、骨格筋及び肝臓において細胞機能の破壊が進行する。

現時点で既承認の治療法は組換えヒト酸性 α-グルコシダーゼ（rhGAA）を用いた酵素補充療法（ERT）であり、体外から酵素を供給することにより酵素活性の欠乏を補う。日本ではポンペ病患者を対象として、2007 年 4 月 18 日にアルグルコシダーゼ アルファ（販売名：マイオザイム® 点滴静注用 50mg、ALGUL）が承認され、2021 年 9 月 27 日にアバルグルコシダーゼアルファ（販売名：ネクスビアザイム®点滴静注用 100mg）が新たな酵素製剤として承認された。

ALGLU を用いた治療では、治療開始初期の筋機能、運動機能及び呼吸機能は改善されるが、その後、これらの機能は緩やかに低下する。ALGLU に対する抵抗性の最も重要な要因は、非効率的な筋肉組織への取込みであると考えられており（Kohler et al. 2018）、筋肉への標的指向性が改善された新たな ERT に対するアンメットメディカルニーズが存在する。

シパグルコシダーゼ アルファ（遺伝子組換え）（ATB200）（以下、シパグルコシダーゼ アルファ）は、ポンペ病に対する次世代酵素製剤として開発された新規 rhGAA である。シパグルコシダーゼ アルファの作用機序は ALGLU と同じであるが、翻訳後の *N*-結合型糖鎖構造が異なる。具体的には、シパグルコシダーゼアルファは、可溶性ライソゾーム酵素を識別して GAA をライソゾームに送達するための天然構造であるマンノース-6-リン酸（M6P）を ALGLU よりも多く含む。特に、シパグルコシダーゼ アルファには 2 箇所がリン酸化されたビスマンノース-6-リン酸（bis-M6P）を有する糖鎖が付加されている点は重要である。bis-M6P 含有糖鎖は、カチオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体（CI-MPR）への結合親和性が全ての既知の糖鎖の中で最も高い。この特殊な糖鎖付加により細胞表面の CI-MPR に対する結合親和性が大幅に上昇し、特に投与後の酵素濃度が低い骨格筋で、rhGAA の細胞内取込み及びライソゾームへの送達が改善される（Tong and Kornfeld 1989）。その結果、シパグルコシダーゼ アルファを投与したポンペ病動物モデルでは、同一条件下で投与した ALGLU と比較して、筋組織での細胞内取込みが著しく改善され、グリコーゲン減少作用が増強される。

rhGAA を含むライソゾーム酵素と同様に、シパグルコシダーゼ アルファは中性 pH で不安定であり、静脈内投与後に循環血中で変性及び不活性化されやすい。ミグルスタット（AT2221）は、低分子型酵素安定化剤として機能し、血中で rhGAA に結合し、その不活化を抑制する。ミグルスタットは、中性 pH でシパグルコシダーゼ アルファを安定化させて筋肉及びライソゾームへの送達を確実にするため、シパグルコシダーゼ アルファと併用投与する経口剤として開発された。ミグルスタットは、現在多くの国々でゴーシェ病 1 型及び／又はニーマン・ピック病 C 型の治療薬として販売名 Zavesca®で承認されている。国内では、ミグルスタットはニーマン・ピック病 C 型の治療薬として 2012 年 3 月 30 日に製造販売承認されたブレーザベス®カプセルの有効成分であり、再審査期間（10 年）が 2022 年 3 月 29 日に終了している。本申請でのミグル

スタットの申請区分は（4）新効能医薬品、（6）新用量医薬品、（8 の 2）剤形追加に係る医薬品（再審査期間中でないもの）である。

マウス酸性 α-グルコシダーゼをコードする遺伝子（*Gaa*）を欠失することによりポンペ病の表現型を再現した *Gaa* ノックアウト（KO）マウス（Raben et al. 2005）を用いて、複数の in vivo 薬理試験を実施した。同マウスモデルを用いた試験で、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与によるシパグルコシダーゼ アルファの血漿中 GAA 活性の上昇（Module 2.6.4, Section 3.2.2）、骨格筋ライソゾーム中の成熟型 GAA 増加を指標としたシパグルコシダーゼ アルファの筋肉内取込み増加、グリコーゲン減少作用の増強並びに骨格筋構造及び筋病変の改善が認められ、最終的に筋機能が改善することが示された（2.1.2 項）。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与は、疾患表現型に対して ALGLU よりも高い有効性を示した。以上のデータから、次世代 rhGAA であるシパグルコシダーゼ アルファとミグルスタットの併用投与は、ライソゾームへのグリコーゲン蓄積を抑制し、ポンペ病の発症カスケードに沿った複数の機能障害を抑制又は改善できことが示唆される（参考資料 Meena 2020）。

また *Gaa* KO マウスを用いた薬理試験で、リサーチグレードで製造したシパグルコシダーゼ アルファの有効性（グリコーゲン減少作用）をエンジニアリングバッチ（EB）及び／又は医薬品の製造管理及び品質管理の基準（GMP）バッチと比較した（2.1.2.6 項）。これらの試験結果から、シパグルコシダーゼ アルファの製造工程は実生産規模まで問題なくスケールアップされたこと、また in vivo 有効性を保持する重要な特性（高含量の bis-M6P 及びシアル酸）を有する製剤が一貫して製造されたことが示された。

安全性薬理評価では、ミグルスタットの潜在的催不整脈作用を評価するため、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）試験を実施した結果、ミグルスタットは検討したいずれの濃度でも明らかな阻害作用を示さなかった（4.1.1.1 項）。カニクイザルを用いた GLP 適用反復投与毒性試験の一部として、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与による安全性薬理評価を実施した結果、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対して投与に関連した明らかな所見は認められなかった（4.2.1.1 項）。

2　効力を裏付ける試験

2.1　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用

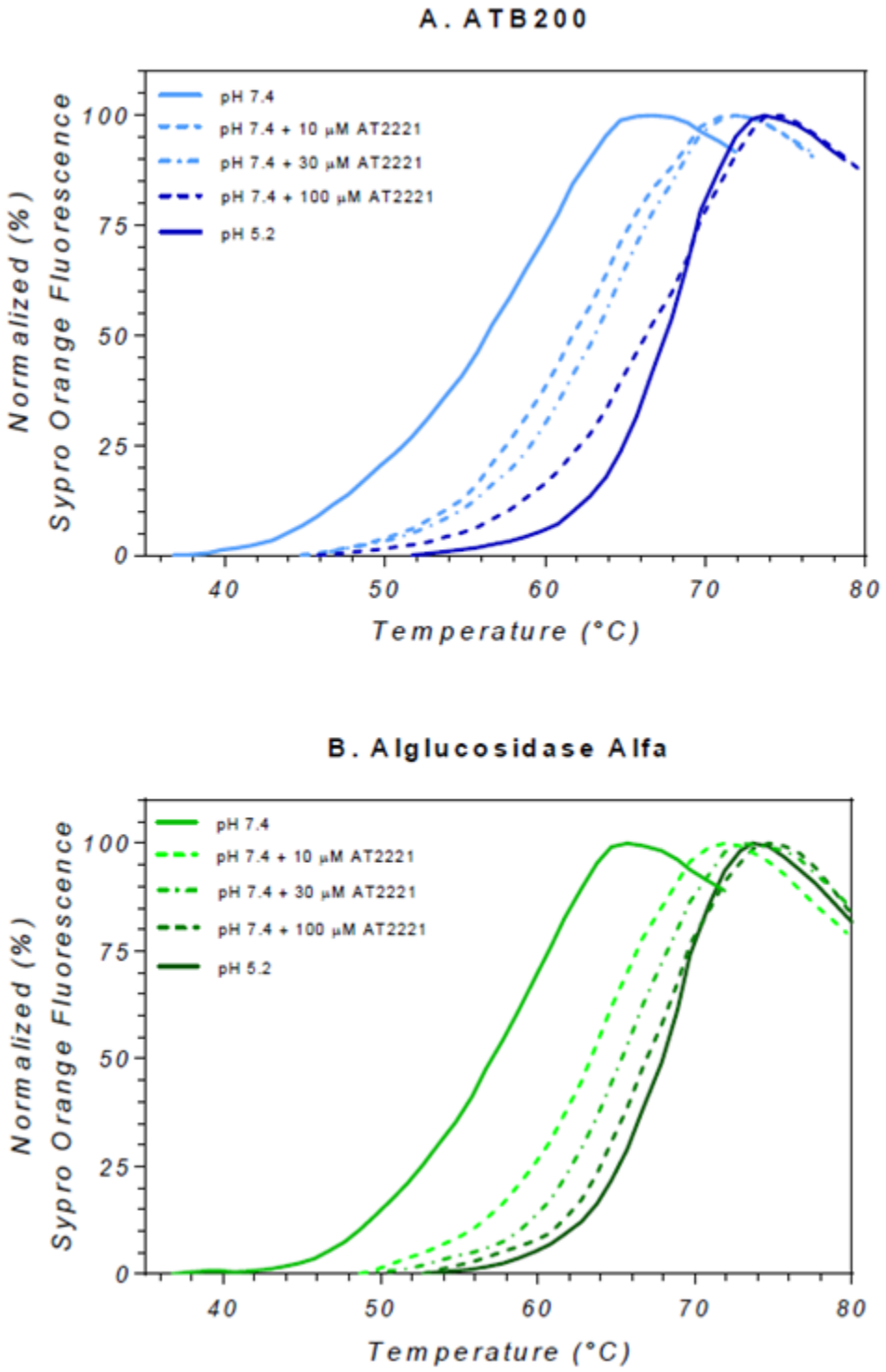
2.1.1　In vitro 試験

2.1.1.1　ミグルスタットによるシパグルコシダーゼ アルファの熱安定化作用

報告書番号：RRB200-010、添付資料番号：4.2.1.1.2

改良した蛍光検出による熱安定性試験（Niesen et al. 2007）を用いて、ミグルスタットによるシパグルコシダーゼ アルファの物理的安定性に対する影響を検討した。この方法では、pH 5.2 及び 7.4 において、一定の勾配で温度（25°C～90°C）を上昇させながら SYPRO Orange 蛍光強度を検出し、酵素の熱変性を経時的に測定した。SYPRO Orange は、変性タンパク質の表面に露出した疎水性領域に結合し、蛍光を発する。pH 7.4 では、ミグルスタット（0、10、30 及び 100 µmol/L）の濃度増加に伴い融解温度（T_m）が上昇して熱変性曲線が高温にシフトし、タンパク質の安定化を示した。ALGLU を対照として用いた。結果及び算出した T_m をそれぞれ図 2.6.2-1 及び表 2.6.2- 1 に示す。

図 2.6.2- 1　　ミグルスタットによる rhGAA の安定化作用（pH 7.4）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; rhGAA = recombinant human acid α-glucosidase
Thermal stability assay data of cipaglucosidase alfa (A) and alglucosidase alfa (B) in the absence and presence of increasing concentrations of miglustat. Unfolding/denaturation of cipaglucosidase alfa was monitored by the increase in SYPRO orange fluorescence as a function of temperature.
Source: Study Report No. RRB200-010, Figure 1

表 2.6.2- 1　　rhGAA の融解温度

Buffer	Melting Temperature (°C)	
	Alglucosidase Alfa	Cipaglucosidase Alfa
pH 7.4	56.7	56.2
pH 7.4 + 10 µmol/L Miglustat	62.9	61.6
pH 7.4 + 30 µmol/L Miglustat	64.9	62.9
pH 7.4 + 100 µmol/L Miglustat	66.5	66.0
pH 5.2	67.4	67.3

Abbreviations: rhGAA = recombinant human acid α-glucosidase
Source: Study Report No. RRB200-010, Table 2

シパグルコシダーゼ アルファの安定性は、酸性 pH（pH 5.2）よりも生理的 pH（pH 7.4）で著しく低かった（T_m はそれぞれ 67.3°C 及び 56.2°C）が、pH 7.4 での安定性はミグルスタット添加により濃度依存的に高くなった（図 2.6.2- 1 A）。pH 7.4 でミグルスタット 100 µmol/L 添加時のシパグルコシダーゼ アルファの安定性は、pH 5.2 でミグルスタット非添加時の安定性と同程度であった。ALGLU でも同様の結果が認められた（図 2.6.2- 1 B 及び表 2.6.2- 1）。

以上の結果から、ミグルスタットは、rhGAA がより安定化するライソゾーム中の酸性環境に送達される前に、中性（生理的）pH で不可逆的なアンフォールディング及び変性から rhGAA を保護する可能性が示唆された。

2.1.1.2　　ヒト血中でのミグルスタットによるシパグルコシダーゼ アルファの安定化作用

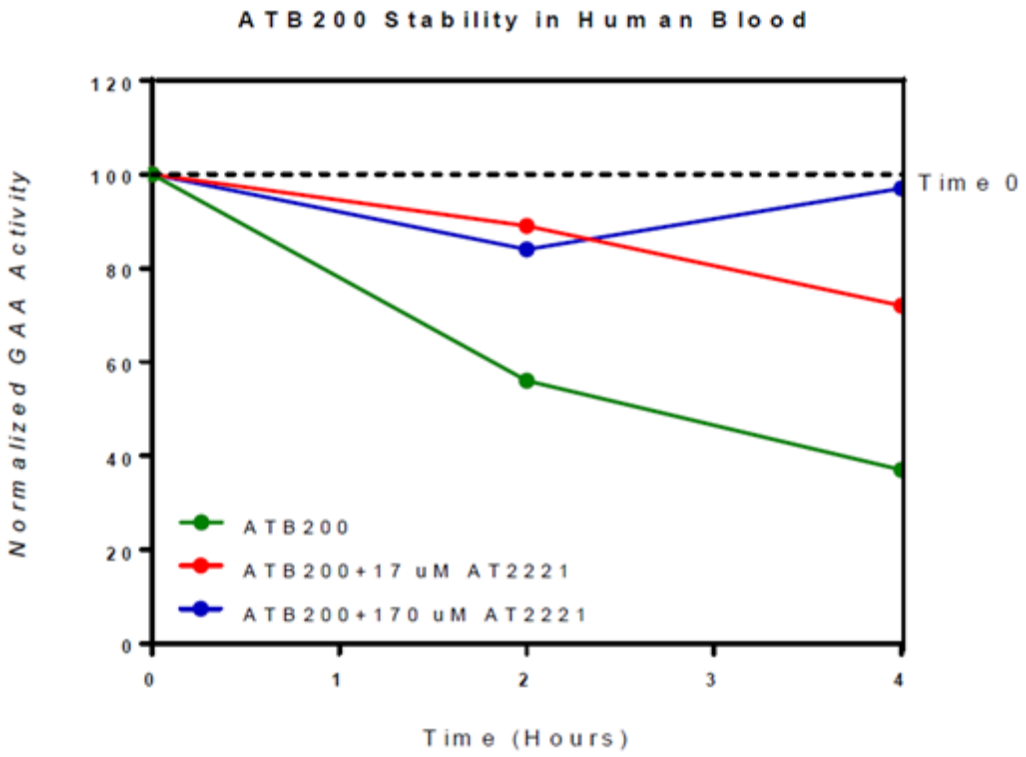
報告書番号：RRB200-040、添付資料番号：4.2.1.1.3

ヒト全血中でのシパグルコシダーゼ アルファ単独又はシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用の安定性を検討した。10 例の男女混合ドナーから採取及びプールした血液を、ミグルスタット（17 又は 170 µmol/L）存在／非存在下でシパグルコシダーゼ アルファ（3 µmol/L）と 2 又は 4 時間インキュベーションした。

なお、ミグルスタット 17 µmol/L は、ポンペ病患者にミグルスタット 260 mg 投与後の最高血漿中濃度と同程度である（ATB200-02 試験）。酵素活性は、合成基質 4-メチルウンベリフェリル-α-D-グルコピラノシド（4-MU-α-Glc）を用いて測定した。この基質はシパグルコシダーゼ アルファにより加水分解されて蛍光生成物 4-メチルウンベリフェロン（4-MU）を放出する。試験中に放出された 4-MU の量は、nmol 4-MU released/mL/hr として表すシパグルコシダーゼ アルファ活性に比例した。

試験結果から、インキュベーション 4 時間後、シパグルコシダーゼ アルファは血中での活性が約 70%低下することが示された（図 2.6.2- 2）。一方、ミグルスタット存在下では、濃度依存的にシパグルコシダーゼ アルファ活性の低下が減少し、血中安定性の向上が認められた。ヒト全血中で 4 時間インキュベーション後、臨床で到達可能な濃度であるミグルスタット 17 µmol/L の併用によりシパグルコシダーゼ アルファの活性は約 30%低下しただけであり、ミグルスタット 170 µmol/L の併用によるシパグルコシダーゼ アルファの活性低下はごくわずかであった。

図 2.6.2- 2　　ヒト血中でのミグルスタットによるシパグルコシダーゼ アルファの安定化作用



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; GAA = acid α-glucosidase
Stabilization of cipaglucosidase alfa activity by miglustat in human whole blood. The normalized cipaglucosidase alfa activity in human blood was plotted against time of incubation.
Source: Study Report No. RRB200-040, Figure 1

2.1.2　In vivo 試験

2.1.2.1　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 又は 6 回）によるグリコーゲン減少作用

報告書番号：RRB200-004、添付資料番号：4.2.1.1.4

Gaa KO マウスにシパグルコシダーゼ アルファ（10 又は 20 mg/kg、静脈内投与）を単独又はミグルスタット（10 又は 30 mg/kg、経口投与）との併用により反復投与したときの疾患関連組織中グリコーゲン量及び蓄積への影響を評価した。*Gaa* KO マウスモデルでは、ポンペ病患者で認められるグリコーゲン蓄積やその他の表現型が再現されている（Raben et al. 1998）。シパグルコシダーゼ アルファの用量は、以前に報告された ALGLU を用いた同様の試験（Zhu et al. 2009）に基づき選択した。ミグルスタットの用量は、以前に報告された ALGLU に類似した被験物質を用いた非臨床試験（Khanna et al. 2012）に基づき選択した。疾患関連組織におけるシパグルコシダーゼ アルファの GAA 活性及び血漿中抗 GAA 免疫グロブリン G（IgG）抗体（抗薬物抗体）も評価した。

Gaa KO マウスに、各被験物質を隔週 6 回（294A 試験）又は 4 回（294B 試験）反復静脈内投与（10 mL/kg）した（表 2.6.2- 2）。有効性評価に性別は影響しないと予測されるため（Bijvoet et

al. 1998)、本試験では雄のみを用いた。294A 試験では、グリコーゲン量及び GAA 活性の基準値を得るため、野生型（WT）マウス群（第 9 群）を組み入れた。両試験では、ALGLU 20 mg/kg（通常 ERT に用いる用量）を対照として用いた。一部の群では、シパグルコシダーゼ アルファ静脈内投与の 30 分前にミグルスタットを経口投与した。2 回目以降の投与では、アナフィラキシーを最小限に抑えるため、静脈内投与の 10 分前にジフェンヒドラミン塩酸塩（DPH）10 mg/kg を腹腔内投与した。

表 2.6.2- 2　　294A 及び 294B 試験の群構成

Group	No. of Animals and Sex	Treatment (mg/kg, IV)	Miglustat (mg/kg, PO)
1	5M	vehicle (deionized water)	N/A
2	6M	alglucosidase alfa, 20	N/A
3	6M	cipaglucosidase alfa, 10	N/A
4	6M	cipaglucosidase alfa, 10	10
5	6M	cipaglucosidase alfa, 10	30
6	6M	cipaglucosidase alfa, 20	N/A
7	6M	cipaglucosidase alfa, 20	10
8	6M	cipaglucosidase alfa, 20	30
9	6M	N/A (WT mice)	N/A

Abbreviations: IV = intravenous; M = male; N/A = not applicable; PO =oral; WT = wild type
IV administration volume is 10 mL/kg. Miglustat oral co-administration was given 30 minutes before IV administration. The vehicle was deionized water and the volume of administration is 10 mL/kg. Group 9 of 6 WT mice was included in Study No. 294A only to provide glycogen and activity baseline information and serve as a reference.

最終投与 14 日後にマウスを安楽死させ（Zhu et al. 2009）、下記項目の評価のため血漿及び疾患関連組織／筋肉（心臓及び骨格筋）を採取した。

- アミログルコシダーゼを用いた生化学的方法（Khanna et al. 2012）により測定した大腿四頭筋、上腕三頭筋及び心臓でのグリコーゲン量
- 組織学的解析［過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色］及び透過型電子顕微鏡（TEM）（Khanna et al. 2012）により評価した大腿四頭筋、横隔膜及び心臓でのグリコーゲン蓄積
- Khanna et al. 2012 に示す方法により測定した GAA 活性に基づく ALGLU 又はシパグルコシダーゼ アルファの疾患関連組織への取込み
- 酵素結合免疫測定法（ELISA）により測定した血漿中抗 GAA IgG 抗体価

294A 及び 294B 試験では、シパグルコシダーゼ アルファの反復静脈内投与により、検討した全ての組織において組織中 GAA 活性が用量依存的に増加し、グリコーゲン量及び蓄積が用量依存的に減少した（図 2.6.2- 3、図 2.6.2- 4、図 2.6.2- 5 及び図 2.6.2- 6）。

294A 試験では、シパグルコシダーゼ アルファ及び ALGLU によるグリコーゲン減少作用に明らかな違いは認められなかった（図 2.6.2- 3）。これは in vivo 有効性に悪影響を与える抗薬物抗体

の生成によるものと考えられ、抗体は rhGAA に結合して血中から消失させ、筋肉に送達される活性酵素が減少した可能性がある。また、可能性は低いものの、シパグルコシダーゼ アルファ投与群のグリコーゲン量が WT マウス群の値に近づいたため「プラトー効果」が生じたとも考えられる。これに対し、294B 試験では、ALGLU と比較して、シパグルコシダーゼ アルファは顕著なグリコーゲン減少作用を示した（図 2.6.2- 4）。大腿四頭筋でのグリコーゲン減少作用は、ALGLU 20 mg/kg 投与群では溶媒対照の 33%であったのに対し、シパグルコシダーゼ アルファ 10 及び 20 mg/kg 投与群ではそれぞれ 61%及び 74%であった。同様に、上腕三頭筋でのグリコーゲン減少作用は、ALGLU 20 mg/kg 投与群で 32%であったのに対し、シパグルコシダーゼ アルファ 10 及び 20 mg/kg 投与群ではそれぞれ 48%及び 62%であった。このように、通常用量（20 mg/kg）の ALGLU によるグリコーゲン減少作用と比較して、シパグルコシダーゼ アルファは半分の用量（10 mg/kg）で最大 1.8 倍の作用を示した（表 2.6.2- 3）。なお、シパグルコシダーゼ アルファ及び ALGLU 投与群では心臓のグリコーゲン量が顕著に減少し、WT マウスと同程度の値を示した。

ミグルスタット（10 mg/kg）併用により、シパグルコシダーゼ アルファ 10 mg/kg 投与群のグリコーゲン減少作用は増強しなかったが、20 mg/kg 投与群では、グリコーゲン減少作用が増強する傾向がみられた（図 2.6.2- 3 及び図 2.6.2- 4）。294B 試験で、シパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg 投与群の大腿四頭筋グリコーゲン量は、溶媒対照と比較して 74%減少したのに対し、ミグルスタット併用によりその減少作用は 94%に増強した。同様に、上腕三頭筋のグリコーゲン量は、シパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg 単独で溶媒対照に比べて 62%減少したのに対し、ミグルスタット併用により、その減少作用は 73%に増強した。また、ミグルスタット 10 mg/kg の併用により、シパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg 投与群での大腿四頭筋及び上腕三頭筋グリコーゲン減少作用は、ALGLU 投与群と比較してそれぞれ 2.8 及び 2.3 倍増大した（表 2.6.2- 3）。しかし、ミグルスタット 30 mg/kg の併用投与により更なるグリコーゲン減少作用の増強は得られず、特に隔週 6 回投与では、ミグルスタット 30 mg/kg 及びシパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg の併用投与で、単独投与よりもグリコーゲン量が高くなることもあった。この結果から、ミグルスタット 30 mg/kg は高すぎると考えられ、GAA 活性を阻害し始める可能性も示唆される。以上より、シパグルコシダーゼ アルファは、ライソゾームへの標的指向性を向上させることで ALGLU よりもグリコーゲン蓄積を減少させ、ミグルスタット併用によりグリコーゲン減少作用は更に増強することが示された。

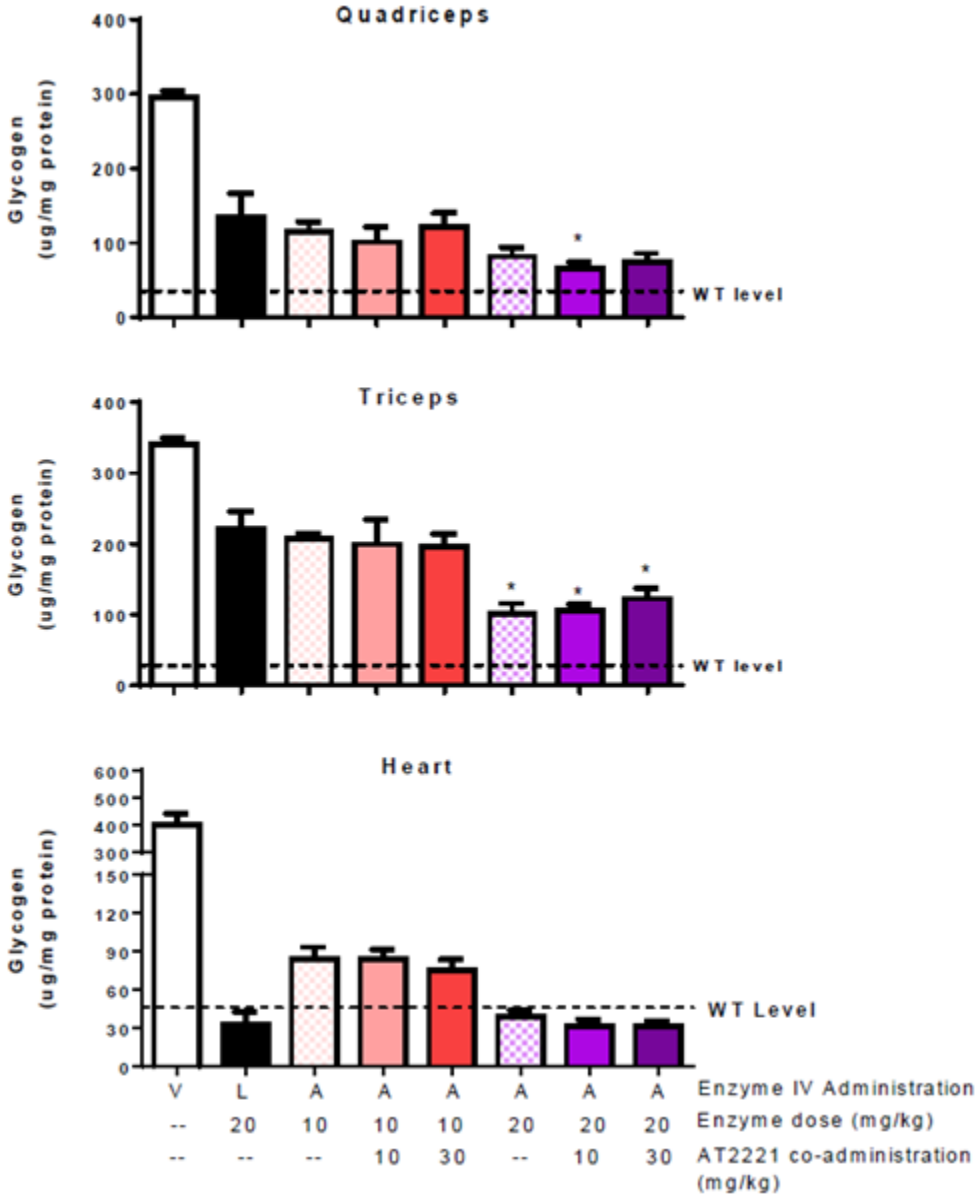
表 2.6.2- 3　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン減少作用（294B 試験）

	Glycogen (% change from baseline)	
	Quadriceps	**Triceps**
Alglucosidase Alfa (20 mg/kg)	-33 ± 10	-32 ± 7
Cipaglucosidase Alfa (10 mg/kg)	-61 ± 7	-48 ± 3
Cipaglucosidase Alfa (10 mg/kg) + Miglustat (10 mg/kg)	-62 ± 6	-46 ± 2
Cipaglucosidase Alfa (20 mg/kg)	-74 ± 4*	-62 ± 5*
Cipaglucosidase Alfa (20 mg/kg) + Miglustat (10 mg/kg)	-94 ± 3*#	-73 ± 2*#

Abbreviations: *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; KO = knock-out; SEM = standard error of the mean
Baseline glycogen levels in vehicle group *Gaa* KO mice were 296 ± 12 and 443 ± 22 µg/mg protein in the quadriceps and triceps, respectively, and in wild-type C57BL/6 mice were 35 ± 5 and 28 ± 6 µg/mg protein, respectively (mean ± SEM of 6 mice). The data shown represent the percent glycogen change from baseline in each tissue as normalized between wild-type (0%) and vehicle group *Gaa* KO (100%) levels. Each value represents the mean ± SEM of 4 to 6 mice. Statistical significance was determined using unpaired t-tests, where * represents $p < 0.05$ versus alglucosidase alfa and # represents $p < 0.05$ versus same-dose cipaglucosidase alfa alone.
Source: Study Report No. RRB200-004, Table 3

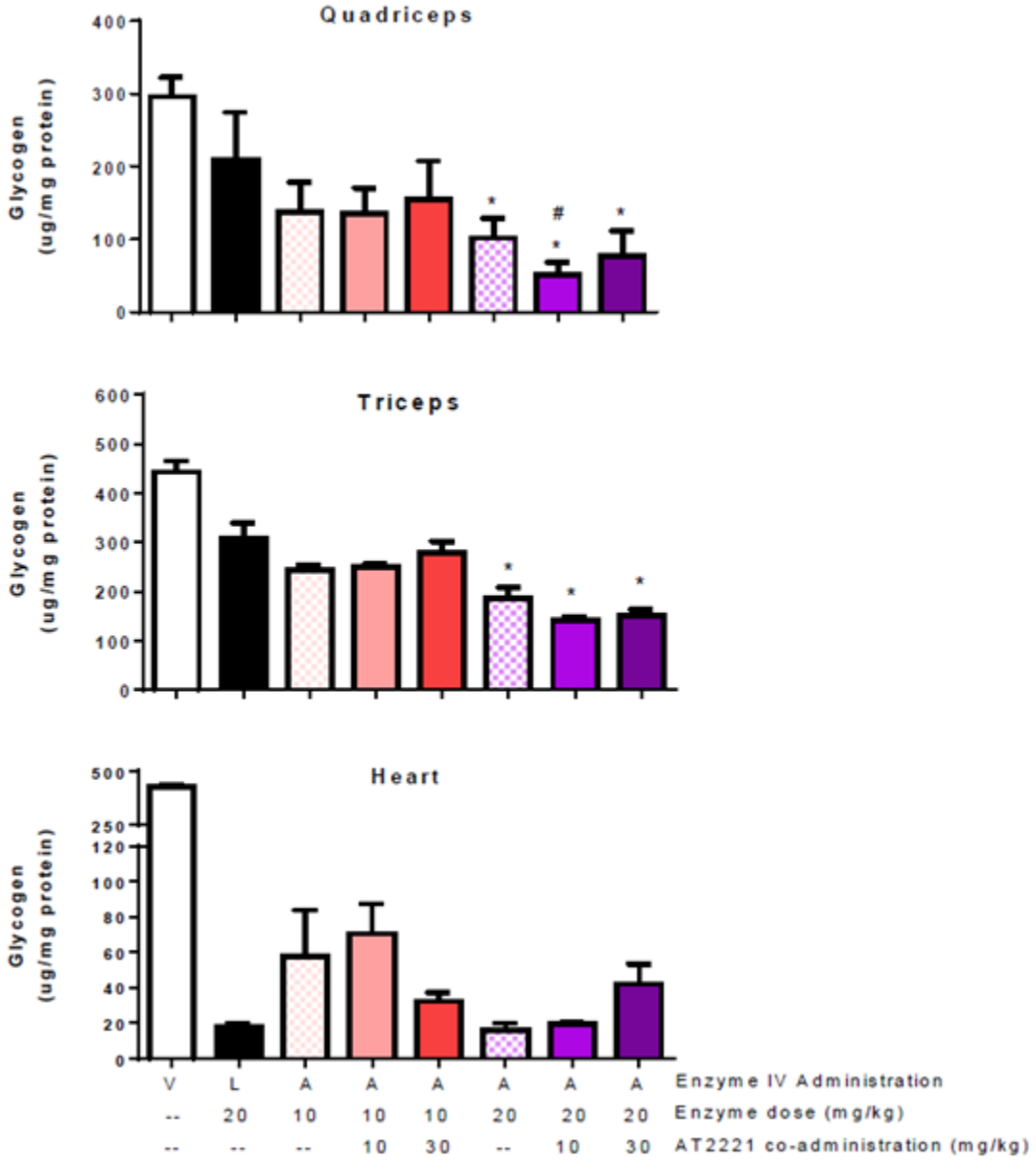
心臓では、グリコーゲンは心筋細胞及び血管平滑筋細胞に認められた。ALGLU 又はシパグルコシダーゼ アルファ（いずれも 20 mg/kg）投与群での心臓のグリコーゲン蓄積はいずれもほぼ完全に消失したが、血管平滑筋細胞でのグリコーゲン減少作用は、シパグルコシダーゼ アルファ投与群よりも ALGLU 投与群の方が弱かった。また、横隔膜及び大腿四頭筋でのグリコーゲン減少作用は、ALGLU 投与群よりもシパグルコシダーゼ アルファ投与群で強かった。また、ミグルスタット（10 mg/kg）併用により、シパグルコシダーゼ アルファ 10 mg/kg 投与群のグリコーゲン減少作用は増大し、20 mg/kg 投与群での作用は更に増大した。組織学的解析結果は、生化学的解析結果と一致した（図 2.6.2- 5 及び図 2.6.2- 6）。

図 2.6.2- 3　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 6 回）による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン減少作用（294A 試験）



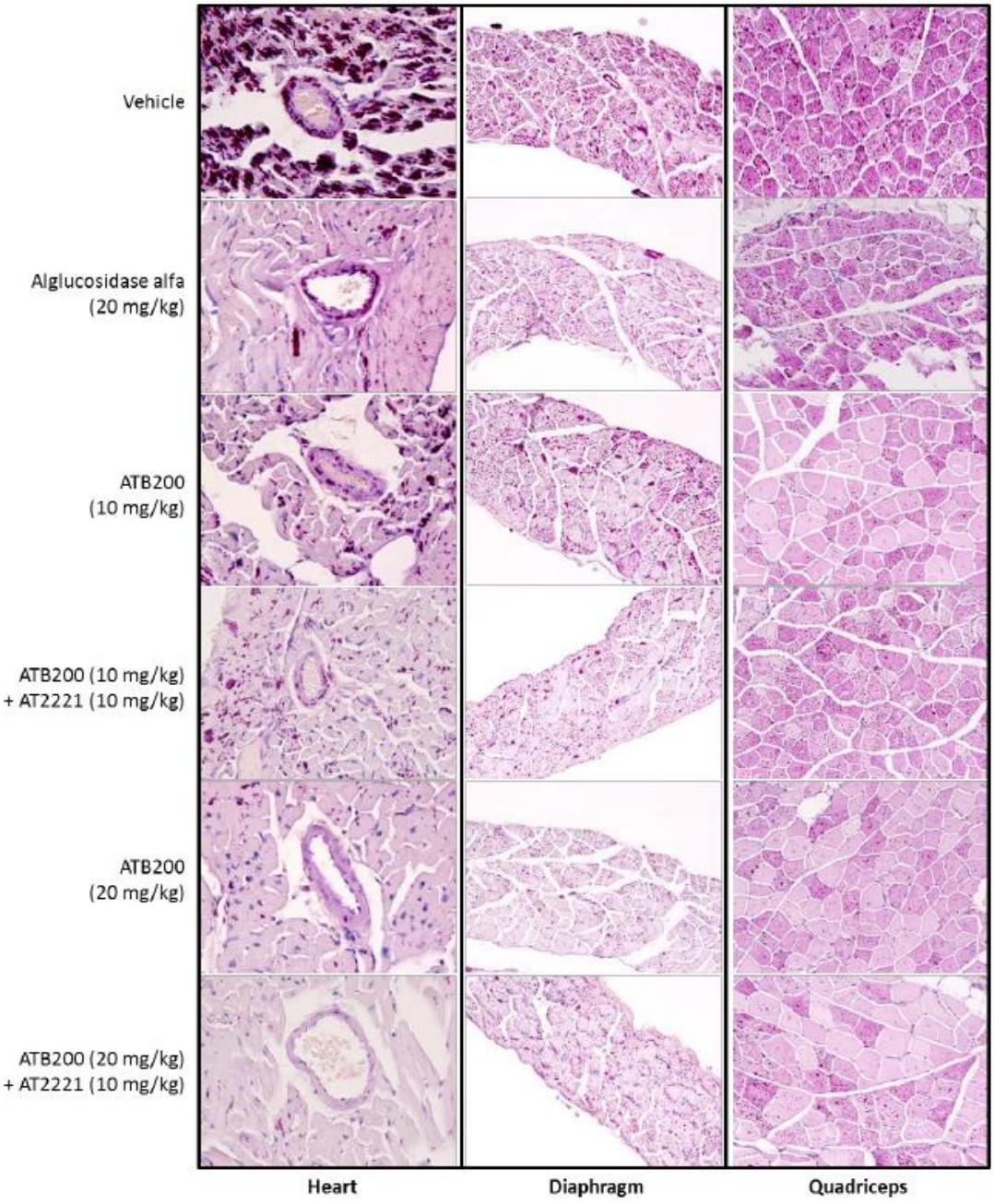
Abbreviations: A = cipaglucosidase alfa; AT2221 = miglustat; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IV = intravenous; KO = knock-out; L = alglucosidase alfa; SEM = standard error of the mean; V = vehicle; WT = wild type
Each column represents mean ± SEM of 4-6 animals. Statistical significance was determined using unpaired t-tests, where * represents $p < 0.05$ versus alglucosidase alfa
Source: Study Report No. RRB200-004, Figure 4

図 2.6.2- 4　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン減少作用（294B 試験）



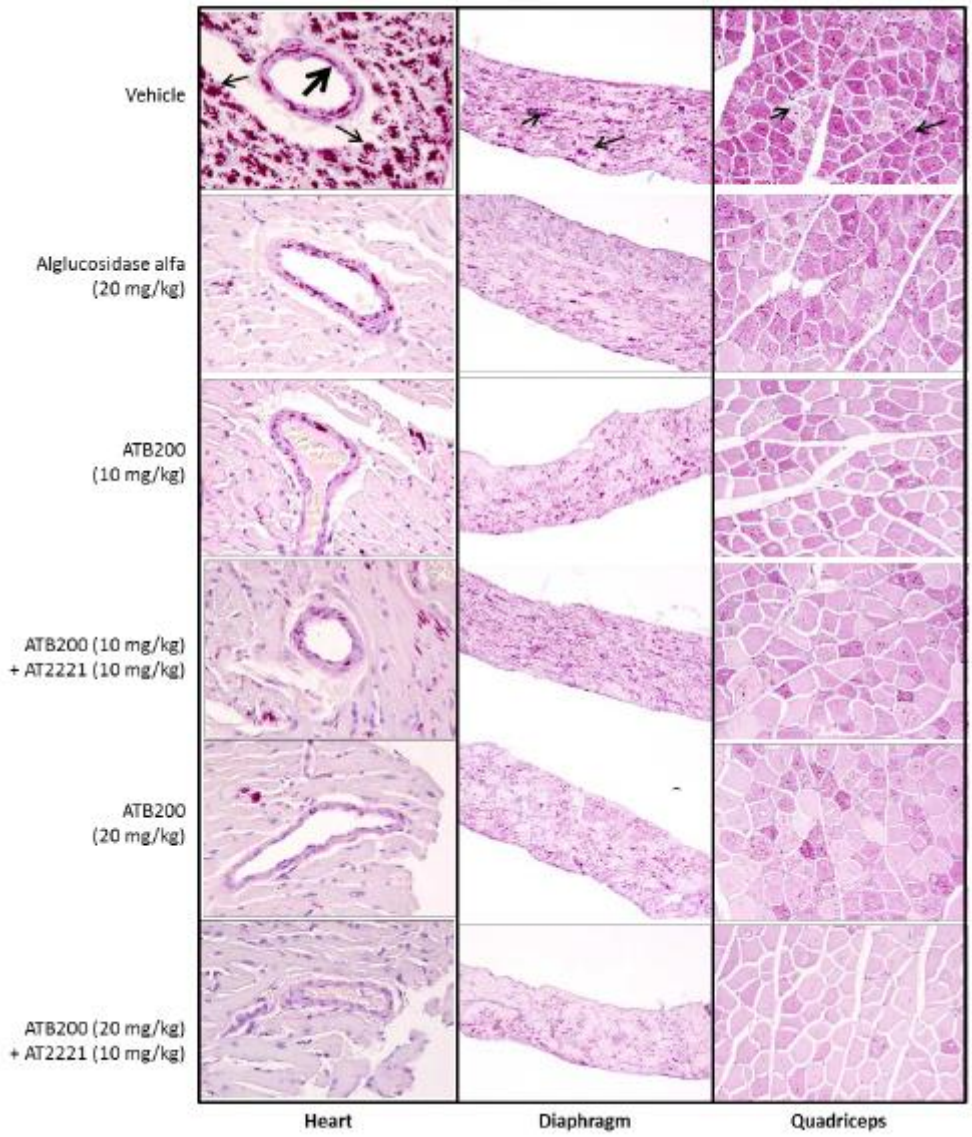
Abbreviations: A = cipaglucosidase alfa; AT2221 = miglustat; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IV = intravenous; KO = knock-out; L = alglucosidase alfa; SEM = standard error of the mean; V = vehicle
Each column represents the mean ± SEM of 4-6 animals. Statistical significance was determined using unpaired t-tests, where * represents $p < 0.05$ versus alglucosidase alfa and # represents $p < 0.05$ versus the same-dose of cipaglucosidase alfa alone.
Source: Study Report No. RRB200-004, Figure 1

図 2.6.2- 5　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 6 回）による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン蓄積減少作用（PAS 染色、294A 試験）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; KO = knock-out; PAS = periodic acid-Schiff
The data shown are representative photomicrographs from 4 to 6 mice per group (1 section per animal) using a 20X lens (Xu et al. 2019). The purple punctuates indicate glycogen storage.
Source: Study Report No. RRB200-004, Figure 5

図 2.6.2- 6　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）投与による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン蓄積減少作用（PAS 染色、294B 試験）

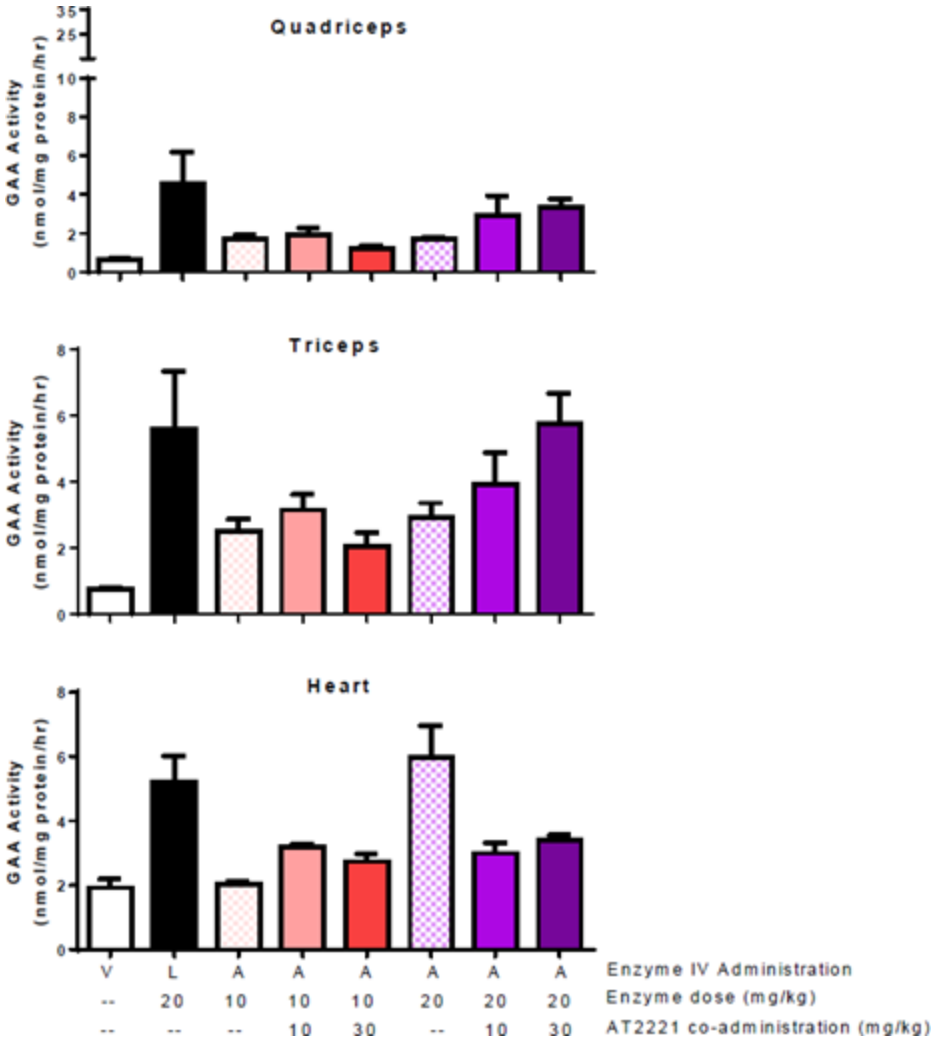


Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; KO = knock-out; PAS = periodic acid-Schiff; vSMCs = vascular smooth muscle cells
The data shown are representative photomicrographs from 4 to 6 mice per group (1 section per animal) using a 20X lens (Xu et al. 2019). The purple punctuates (arrows) indicate glycogen storage. Glycogen storage in specific cell types in heart (upper left panel) is highlighted: cardiomyocytes (thin arrows) and vSMCs of blood vessel walls (thick arrows).
Source: Study Report No. RRB200-004, Figure 2

シパグルコシダーゼ アルファ投与群の組織ホモジネート中 GAA 活性は ALGLU 投与群よりも高くはなかったが（図 2.6.2- 7 及び図 2.6.2- 8）、シパグルコシダーゼ アルファ投与群の大腿四頭筋及び上腕三頭筋のグリコーゲン減少作用は ALGLU 投与群よりも大きかった。異なる rhGAA 間で測定された組織中 GAA 活性に差が認められなかったのは、ライソゾーム以外のコンパートメントで測定されたためと考えられる。したがって、グリコーゲン減少作用（生化学的及び組織学的解析）の方が重要な評価項目であると考えられ、この結果から、シパグルコシダーゼ アル

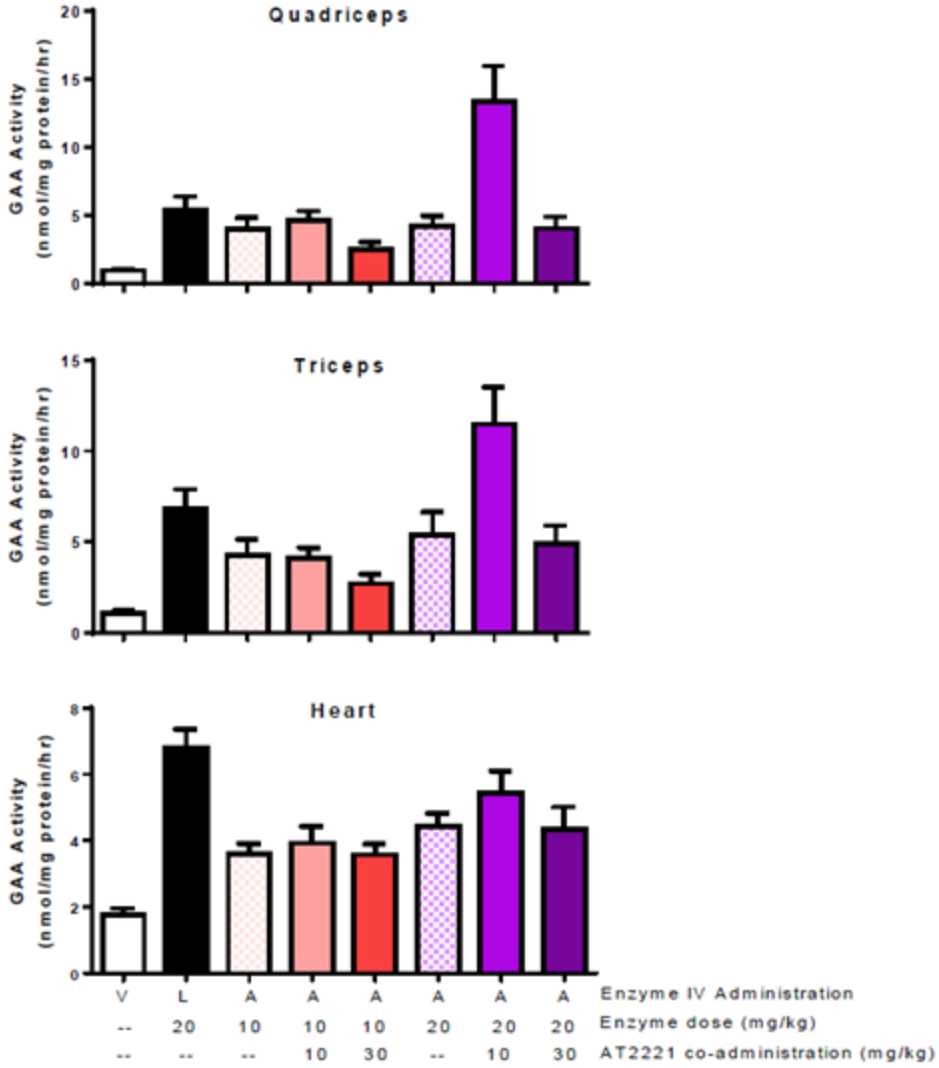
ファの筋ライソゾームへの標的指向性が向上していることが示された。データのばらつきは大きいものの、ミグルスタット併用により、特にシパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg 投与群での組織中 GAA 活性が増加する傾向が認められ、組織中グリコーゲン量の結果と一致していた。

図 2.6.2- 7　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 6 回）による *Gaa* KO マウス組織中 GAA 活性増加作用（294A 試験）



Abbreviations: A = cipaglucosidase alfa; AT2221 = miglustat; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GAA = acid α-glucosidase; IV = intravenous; L = alglucosidase alfa; V = vehicle; IV = intravenous; KO = knock-out; SEM = standard error of the mean; WT = wild type
Each column represents mean ± SEM of 4-6 animals. The GAA activity (nmol/mg protein/hr) in WT tissues was as follows: quadriceps-27.2; triceps-21.6; heart-18.9.
Source: Study Report No. RRB200-004, Figure 6

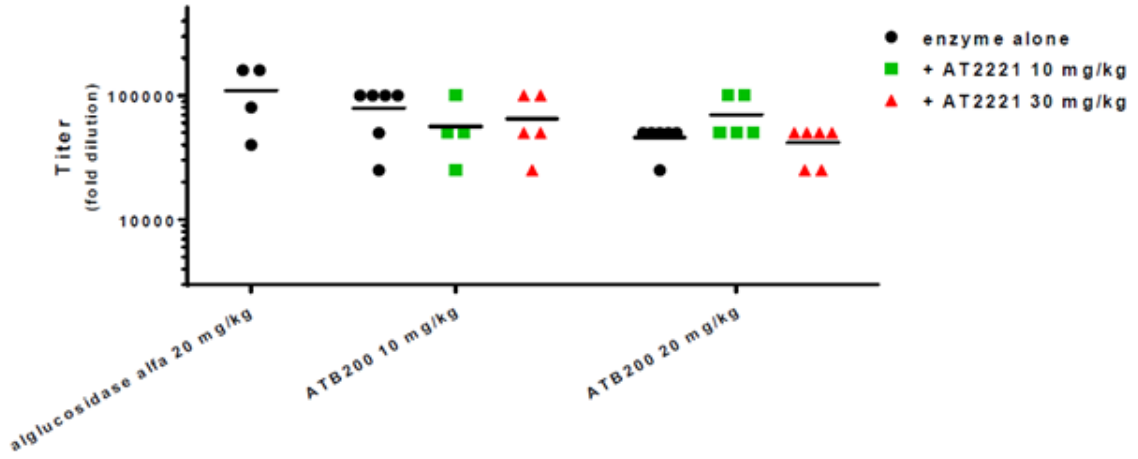
図 2.6.2- 8　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）による *Gaa* KO マウス組織中 GAA 活性に対する作用（294B 試験）



Abbreviations: A = cipaglucosidase alfa; AT2221 = miglustat; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GAA = acid α-glucosidase; IV = intravenous; KO = knock-out; L = alglucosidase alfa; V = vehicle; SEM = standard error of the mean; WT = wild type
Each column represents mean ± SEM of 4-6 animals. The GAA activity (nmol/mg protein/hr) in WT tissues was as follows: quadriceps-27.2; triceps-21.6; heart-18.9.
Source: Study Report No. RRB200-004, Figure 3

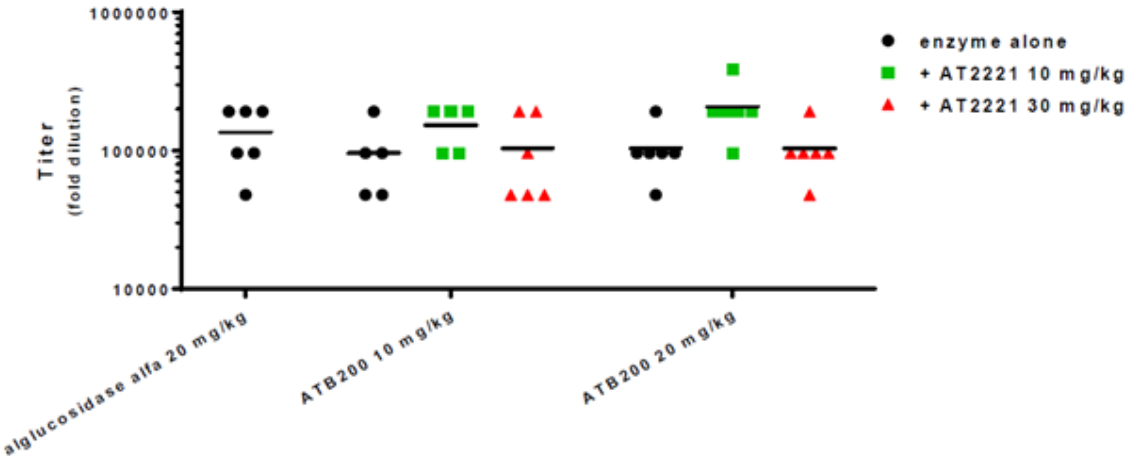
いずれの試験でも、ALGLU 又はシパグルコシダーゼ アルファを投与した全ての動物で高力価の抗薬物抗体が認められた（図 2.6.2- 9 及び図 2.6.2- 10）。ALGLU 及びシパグルコシダーゼ アルファ投与群間で、またシパグルコシダーゼ アルファ 10 mg/kg 及び 20 mg/kg 投与群間で、抗体価に明らかな差は認められなかった。ミグルスタット併用により抗薬物抗体価は影響を受けなかった。

図 2.6.2- 9　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 6 回）による抗薬物抗体産生（294A 試験）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; IV = intravenous; rhGAA = recombinant human acid α-glucosidase
Source: Study Report No. RRB200-004, Figure 8

図 2.6.2- 10　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）による抗薬物抗体産生（294B 試験）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; IV = intravenous; rhGAA = recombinant human acid α-glucosidase
Source: Study Report No. RRB200-004, Figure 7

2.1.2.2　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）によるグリコーゲン減少作用

報告書番号：RRB200-005、添付資料番号：4.2.1.1.5
報告書番号：RRB200-025、添付資料番号：4.2.1.1.6

本試験（296、320、328 及び 343 試験、報告書番号 RRB200-005）では、*Gaa* KO マウスに対するシパグルコシダーゼ アルファの有効性を検討するとともに、各用量のミグルスタットをシパグルコシダーゼ アルファと併用し、至適用量を確認した。

296 試験の群構成を表 2.6.2- 4 に示す。ALGLU 又はシパグルコシダーゼ アルファ（5、10 及び 20 mg/kg）を隔週 2 回投与した。シパグルコシダーゼ アルファ（5 及び 10 mg/kg）静脈内投与 30 分前にミグルスタット（0、1、3 及び 10 mg/kg）を経口投与した。シパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg 投与群では、併用するミグルスタットの用量を 0、1、3、10 及び 30 mg/kg とした。低用量のシパグルコシダーゼ アルファは、これまでの報告で検討された ALGLU の用量（Zhu et al. 2009）に基づき選択し、低用量のミグルスタットは、シパグルコシダーゼ アルファの長期投与試験の結果（2.1.2.1 項）に基づき選択した。

表 2.6.2- 4　296 試験の群構成

Dose Group	No. of Animals and Sex	Treatment (mg/kg, IV)	Miglustat (mg/kg, PO)
1	5M	vehicle (saline)	N/A
2	7M	alglucosidase alfa, 20	N/A
3	7M	cipaglucosidase alfa, 5	N/A
4	7M	cipaglucosidase alfa, 5	1
5	7M	cipaglucosidase alfa, 5	3
6	7M	cipaglucosidase alfa, 5	10
7	7M	cipaglucosidase alfa, 10	N/A
8	7M	cipaglucosidase alfa, 10	1
9	7M	cipaglucosidase alfa, 10	3
10	7M	cipaglucosidase alfa, 10	10
11	7M	cipaglucosidase alfa, 20	N/A
12	7M	cipaglucosidase alfa, 20	1
13	7M	cipaglucosidase alfa, 20	3
14	7M	cipaglucosidase alfa, 20	10
15	7M	cipaglucosidase alfa, 20	30

Abbreviations: IV = intravenous; M = male; N/A = not applicable; PO = oral
IV administration volume was 10 mL/kg. For the vehicle group, 10 mL/kg saline was administered. Miglustat oral co-adminstration was given at 10 mL/kg, 30 minutes before cipaglucosidase alfa IV administration. The vehicle was deionized water.

大腿四頭筋は *Gaa* KO マウスの代表的な疾患関連組織として長期投与試験（2.1.2.1 項）で用いられた組織であり、本試験でも同様に最終投与 14 日後に組織中グリコーゲン量（生化学的及び組織学的解析）及び GAA 活性を測定した。

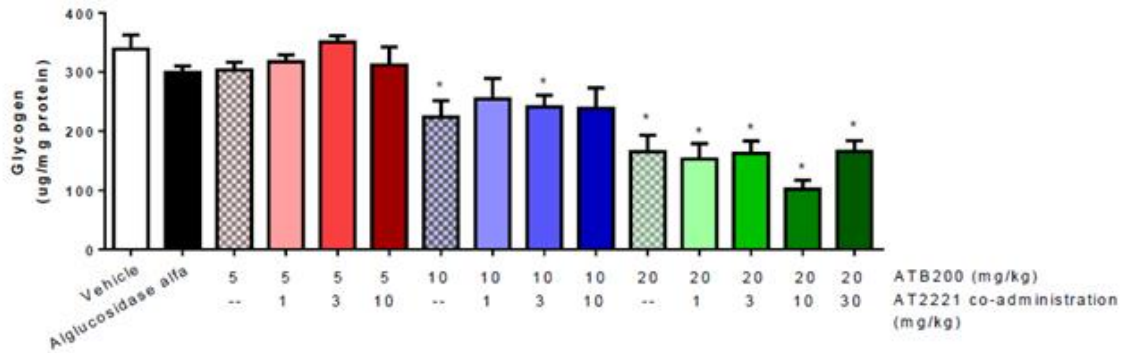
296 試験では 5 匹が死亡した。5 匹中 2 匹の死因は、2 回目投与後のアナフィラキシー反応であった。残り 3 匹の死亡は、時間及び投与群のいずれもランダムに発生し、被験物質との関連はないと考えられた。*Gaa* KO マウスでは、遺伝子組換えヒトタンパク質を 2 回以上投与後に全ての動物で免疫応答が惹起されることが明らかになっているため（Khanna et al. 2012）、以降の試験（320 試験、328 試験及び 343 試験）では、アナフィラキシーを最小限に抑えるために 2 回目の rhGAA 静脈内投与 10 分前に DPH（10 mg/kg、腹腔内投与）を投与した。

296 試験では、シパグルコシダーゼ アルファ単独投与による大腿四頭筋中グリコーゲン量及び GAA 活性は、明らかな用量依存性を示した（図 2.6.2- 11 及び図 2.6.2- 12）。ALGLU 20 mg/kg と比較して、シパグルコシダーゼ アルファ 5 mg/kg では同程度、10 及び 20 mg/kg では有意に強いグリコーゲン減少作用を示した。この結果に対応して、シパグルコシダーゼ アルファ 10 及び 20 mg/kg 投与群では、ALGLU 20 mg/kg 投与群よりも高い GAA 活性が誘導された。

組織学的解析では、シパグルコシダーゼ アルファ 5 mg/kg 投与群のグリコーゲン減少作用はほとんど又は全くみられず、ALGLU 20 mg/kg 投与群でも同様であった（図 2.6.2- 13）。シパグルコシダーゼ アルファ 10 mg/kg 投与群では、組織中グリコーゲン減少作用が認められ、その作用は 20 mg/kg 投与群でより顕著であった（ALGLU 20 mg/kg 投与群よりも強かった）。

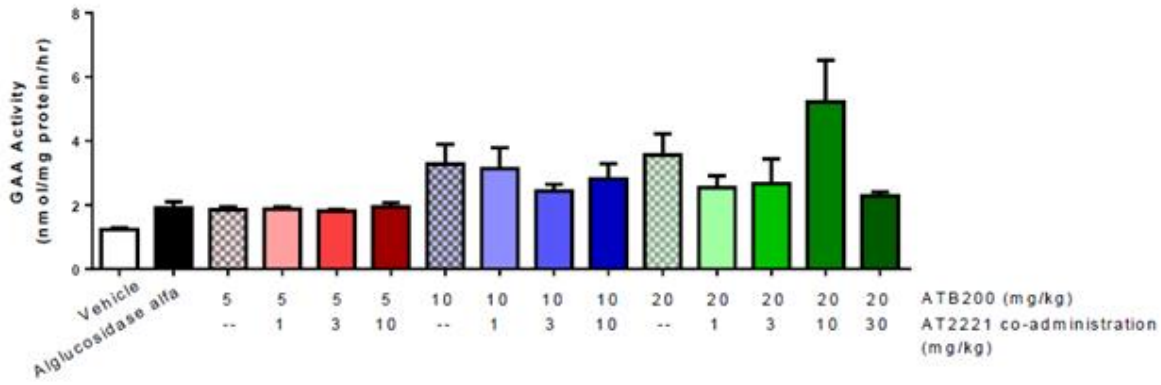
検討した全ての用量（1、3 及び 10 mg/kg）のミグルスタット併用により、シパグルコシダーゼ アルファ 5 及び 10 mg/kg 投与群のグリコーゲン減少作用は増強されなかった。しかし、シパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg 投与群では、ミグルスタット 10 mg/kg の併用によりグリコーゲン減少作用が最も増強された（図 2.6.2- 11）。以上より、長期投与試験（2.1.2.1 項）と同様に、グリコーゲン減少作用に対する至適用量は、シパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg 及びミグルスタット 10 mg/kg であることが、本試験で確認できた。同様に、ミグルスタット 10 mg/kg をシパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg と併用投与したとき、組織中 GAA 活性が上昇し（図 2.6.2- 12）、組織学的解析でもグリコーゲン蓄積の減少が確認されたが（図 2.6.2- 13）、ミグルスタット 3 又は 30 mg/kg の併用ではこれらの効果を示さなかった。

図 2.6.2- 11　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのグリコーゲン減少作用（296 試験）



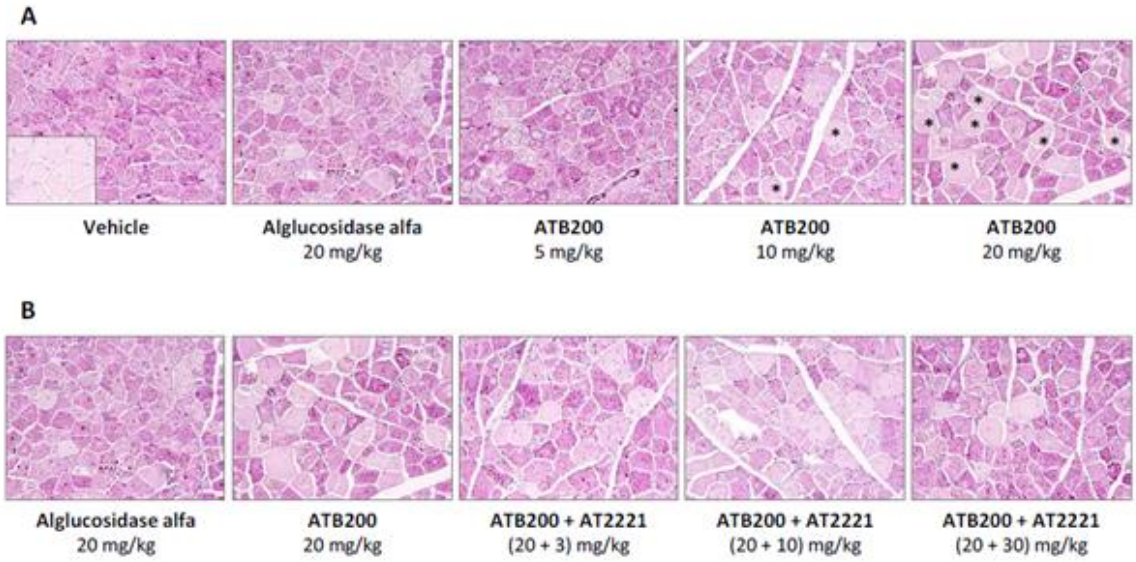
Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; KO = knock-out; SEM = standard error of the mean
Each bar represents the mean ± SEM. Statistical significance was determined using unpaired t-tests, where * represents $p < 0.05$ versus alglucosidase alfa.
Source: Study Report No. RRB200-005, Figure 1

図 2.6.2- 12　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋での GAA 活性に対する作用（296 試験）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GAA = acid α-glucosidase; KO = knock-out; SEM = standard error of the mean
Each bar represents the mean ± SEM. Statistical comparison was not performed on these activity data.
Source: Study Report No. RRB200-005, Figure 2

図 2.6.2- 13　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのグリコーゲン蓄積減少作用（PAS 染色、296 試験）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; KO = knock-out; PAS = periodic acid-Schiff
PAS staining of glycogen in paraffin sections of quadriceps. Glycogen is shown as intense, magenta puncta. (A) The dose-response effect of cipaglucosidase alfa on glycogen reduction. An image from a wild-type animal is shown in the inset. (B) The dose-response effect of miglustat co-administration on cipaglucosidase alfa-mediated glycogen reduction. Images were taken with a 20x objective and the overall magnification is 200x. One section per animal was examined, and each image is representative of 6-7 mice per group. Asterisks showed fibers with clearance or significant reduction of glycogen signal.
Source: Study Report No. RRB200-005, Figure 3

以上の結果から、*Gaa* KO マウスでのグリコーゲン減少作用に対して、シパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg 及びミグルスタット 10 mg/kg の併用投与が最適であることが示された。

320 及び 328 試験では、ミグルスタットをより広範囲の用量でシパグルコシダーゼ アルファ（20 mg/kg）と併用し、大腿四頭筋中グリコーゲン量を測定した。320 試験では、*Gaa* KO マウスに溶媒、ALGLU（20 mg/kg）又はシパグルコシダーゼ アルファ（5、10、20 mg/kg）を隔週 2 回静脈内投与した。さらに、シパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg 投与群には、ミグルスタット（0、5、10、20 及び 30 mg/kg）を併用投与した（表 2.6.2- 5）。

表 2.6.2- 5　　320 試験の群構成

Dose Group	No. of Animals and Sex	Treatment (mg/kg, IV)	Miglustat (mg/kg, PO)
1	7M	vehicle (saline)	N/A
2	7M	alglucosidase alfa, 20	N/A
3	7M	cipaglucosidase alfa, 5	N/A
4	7M	cipaglucosidase alfa, 10	N/A
5	7M	cipaglucosidase alfa, 20	N/A
6	7M	cipaglucosidase alfa, 20	5
7	7M	cipaglucosidase alfa, 20	10
8	7M	cipaglucosidase alfa, 20	20
9	7M	cipaglucosidase alfa, 20	30

Abbreviations: IV = intravenous; M = male; N/A = not applicable; PO = oral
IV administration volume was 10 mL/kg. For the vehicle group, 10 mL/kg saline was administered. Miglustat oral co-administration was given at 10 mL/kg, 30 minutes before cipaglucosidase alfa IV administration. The vehicle was deionized water.

328 試験では、溶媒、ALGLU 又はシパグルコシダーゼ アルファ（いずれも 20 mg/kg）を隔週 2 回投与した。シパグルコシダーゼ アルファ投与群にはミグルスタット（0、5、10、20 及び 30 mg/kg）を併用投与した（表 2.6.2- 6）。試験中に 4 匹が死亡したが、いずれもランダムに発生した。

表 2.6.2- 6　　328 試験の群構成

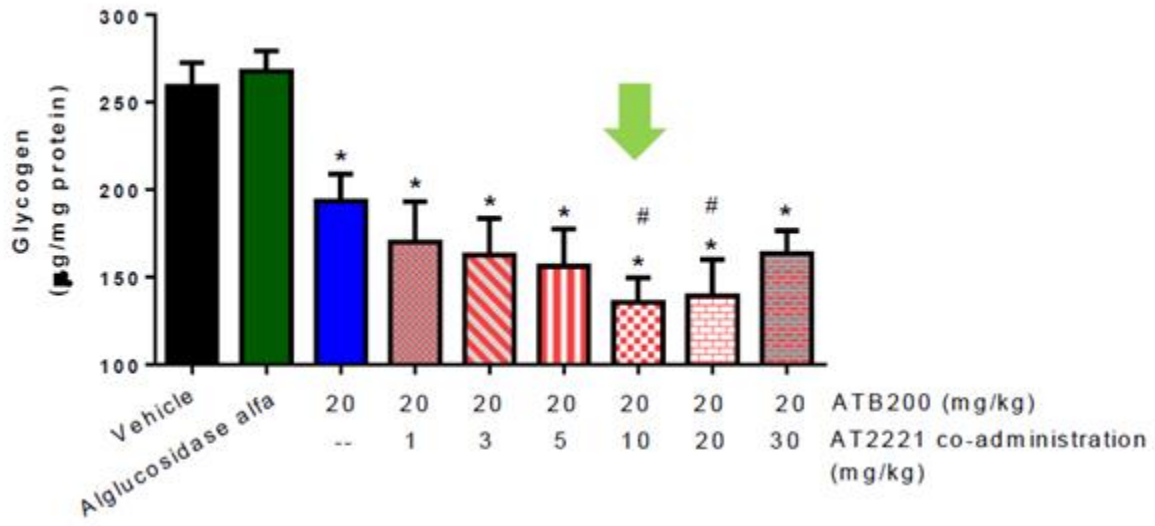
Dose Group	No. of Animals and Sex	Treatment (mg/kg, IV)	Miglustat (mg/kg, PO)
1	7M	vehicle (saline)	N/A
2	7M	alglucosidase alfa, 20	N/A
3	7M	cipaglucosidase alfa, 20	N/A
4	7M	cipaglucosidase alfa, 20	5
5	7M	cipaglucosidase alfa, 20	10
6	7M	cipaglucosidase alfa, 20	20
7	7M	cipaglucosidase alfa, 20	30

Abbreviations: IV = intravenous; M = male; N/A = not applicable; PO = oral
IV administration volume was 10 mL/kg. For the vehicle group, 10 mL/kg saline was administered. Miglustat oral co-administration was given at 10 mL/kg, 30 minutes before cipaglucosidase alfa IV administration. The vehicle was deionized water.

結果の頑健性を高めるため、296、320 及び 328 試験で同一投薬群の結果を併合した（図 2.6.2-14）。その結果、シパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg 投与群のグリコーゲン減少作用は、同用量の ALGLU 投与群よりも強く、ミグルスタットの併用により作用は増強することが示された。296 及び 320 試験で、ミグルスタット 5 及び 10 mg/kg の併用効果は概して同程度であった。低用量（1 mg/kg）又は高用量（30 mg/kg）のミグルスタットの併用で、シパグルコシダーゼ アルファのグリコーゲン減少作用は増強されなかった。ミグルスタット 10 mg/kg 及びシパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg の併用により、筋肉中グリコーゲン量はトラフ値に達すると考えられる。

シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用による ALGLU 又はシパグルコシダーゼ アルファ単独よりも優れた効果は、上腕三頭筋、腓腹筋及び心臓等、他の疾患関連組織でも認められた（2.1.2.3 項）。

図 2.6.2- 14　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのグリコーゲン減少作用（296、320 及び 328 試験）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; KO = knock-out; SEM = standard error of the mean
The data shown represent pooling of several studies, with the Vehicle, alglucosidase alfa, cipaglucosidase alfa (20 mg/kg), cipaglucosidase alfa (20 mg/kg) + miglustat (10 mg/kg), and cipaglucosidase alfa (20 mg/kg) + miglustat (30 mg/kg) groups representing the mean ± SEM of 17-21 mice; the 'cipaglucosidase alfa (20 mg/kg) + miglustat (5 mg/kg)' and 'cipaglucosidase alfa (20 mg/kg) + miglustat (20 mg/kg)' groups representing the mean ± SEM of 13-14 mice; and, the 'cipaglucosidase alfa (20 mg/kg) + miglustat (1 mg/kg)' and 'cipaglucosidase alfa (20 mg/kg) + miglustat (3 mg/kg)' groups representing the mean ± SEM of 4-7 mice. Statistical significance was determined using unpaired t-tests, where # represents $p < 0.05$ versus cipaglucosidase alfa alone; * represents $p < 0.05$ versus alglucosidase alfa alone. The green arrow indicates the optimal dose combination of 10 mg/kg miglustat with 20 mg/kg cipaglucosidase alfa with respect to glycogen reduction.
Source: Study Report No. RRB200-005, Figure 4

以上の検討結果から、最も効果的なグリコーゲン減少作用を示す用量として、シパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg 及びミグルスタット 10 mg/kg の併用投与を選択したが、次の 343 試験では、*Gaa* KO マウスでのミグルスタット単独投与による潜在的なグリコーゲン減少作用を検討した。溶媒、ミグルスタット（10 mg/kg、経口投与）、ALGLU（20 mg/kg）又はシパグルコシダーゼ アルファ（20 mg/kg）を隔週 2 回静脈内投与した（表 2.6.2- 7）。

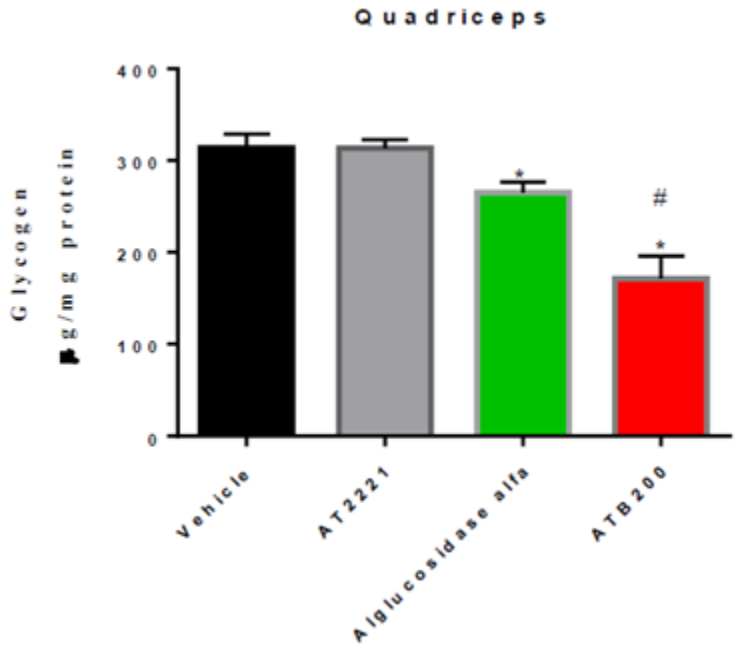
表 2.6.2- 7　　343 試験の群構成

Dose Group	No. of Animals and Sex	Treatment (mg/kg, IV)	Miglustat (mg/kg, PO)
1	7M	vehicle	N/A
2	7M	N/A	10
3	7M	alglucosidase alfa, 20	N/A
4	7M	cipaglucosidase alfa, 20	N/A

Abbreviations: IV = intravenous; M = male; N/A = not applicable; PO = oral
IV administration volume was 10 mL/kg. For the vehicle group, 10 mL/kg saline was administered. Miglustat oral co-administration was given at 10 mL/kg. The vehicle was deionized water.

その結果、ミグルスタット単独投与により筋肉中のグリコーゲン量は減少せず、シパグルコシダーゼ アルファ単独投与では、溶媒対照及び ALGLU 単独投与と比較して有意なグリコーゲン減少作用が認められた（図 2.6.2- 15）。以上の結果から、ミグルスタットは、単独ではグリコーゲン減少作用を示さず、シパグルコシダーゼ アルファを安定化させて筋肉内への取込みを改善することにより、グリコーゲン減少作用を増強することが確認された。

図 2.6.2- 15　　シパグルコシダーゼ アルファ又はミグルスタット単独投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのグリコーゲン減少作用（343 試験）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; KO = knock-out; SEM = standard error of the mean

Each bar represents the mean ± SEM. Statistical significance was determined using unpaired t-tests, where * represents $p < 0.05$ versus vehicle and # represents $p < 0.05$ versus alglucosidase alfa.
Source: Study Report No. RRB200-005, Figure 5

2.1.2.3　　シパグルコシダーゼ アルファのライソゾームに対する in vivo 標的指向性

報告書番号：RRB200-039、添付資料番号：4.2.1.1.7

本試験（384、392 及び 374 試験）では、in vivo でのシパグルコシダーゼ アルファのライソゾームへの標的指向性を *Gaa* KO マウスを用いて評価した。疾患関連筋組織を用いたウエスタンブロット解析により、ライソゾーム中の成熟型 GAA（76 kDa）を同定した（Moreland et al. 2005）。GAA タンパク質は、後期エンドソーム及びライソゾームで行われる糖鎖切断及びタンパク質分解によるプロセシングを受けて、最終的に 76 kDa の成熟型アイソフォームとなる。

384、392 及び 374 試験の群構成をそれぞれ表 2.6.2- 8、表 2.6.2- 9 及び表 2.6.2- 10 に示す。384 及び 392 試験（表 2.6.2- 8 及び表 2.6.2- 9）では、溶媒、ALGLU 又はシパグルコシダーゼ アルファ（いずれも 20 mg/kg）を単回静脈内投与し、シパグルコシダーゼ アルファ投与群には、静

脈内投与の 30 分前にミグルスタット 10 mg/kg（384 試験及び 392 試験）又は 30 mg/kg（384 試験）を経口投与した。静脈内投与 72 時間後に各群 5 匹を安楽死させ、大腿四頭筋を採取してウエスタンブロット解析に供した。

374 試験（表 2.6.2- 10）では、溶媒、シパグルコシダーゼ アルファ（10、20 及び 100 mg/kg）又は ALGLU（20 mg/kg）を隔週 2 回、静脈内投与した。一部のシパグルコシダーゼ アルファ（10 及び 20 mg/kg）投与群には、静脈内投与 30 分前にミグルスタット 3、10 又は 30 mg/kg を経口投与した。溶媒（Group 1）、ALGLU20 mg/kg（Group 2）及びシパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg（Group 4）投与群の一部の動物を 2 回目投与 14 日後に安楽死させ、大腿四頭筋を採取してウエスタンブロット解析に供した。

表 2.6.2- 8　　384 試験の群構成

Group	No. of Animals and Sex	Treatment (mg/kg, IV)	Miglustat (mg/kg, PO)
1	5M	vehicle	N/A
2	5M	alglucosidase alfa, 20	N/A
3	5M	cipaglucosidase alfa, 20	N/A
4	5M	cipaglucosidase alfa, 20	10
5	5M	cipaglucosidase alfa, 20	30

Abbreviations: IV = intravenous; M = male; N/A = not applicable; PO = oral
PO administration was given 30 minutes before IV injection; Miglustat was dissolved in deionized water and the volume of administration was 10 mL/kg. IV administration volume was 5 mL/kg; vehicle for IV dosing was 25 mmol/L sodium phosphate buffer containing 20 mg/mL mannitol, 0.5 mg/mL polysorbate 80, and 2.92 mg/mL sodium chloride. Final pH 6.0.

表 2.6.2- 9　　392 試験の群構成

Group	No. of Animals and Sex	Treatment (mg/kg, IV)	Miglustat (mg/kg, PO)
1	15M	vehicle	N/A
2	15M	alglucosidase alfa, 20	N/A
3	15M	cipaglucosidase alfa, 20	N/A
4	15M	cipaglucosidase alfa, 20	10

Abbreviations: IV = intravenous; M = male; N/A = not applicable; PO = oral
PO administration was given 30 minutes before IV injection; Miglustat was dissolved in deionized water and the volume of administration was 10 mL/kg. IV administration volume was 5 mL/kg; vehicle for IV dosing was 25 mmol/L sodium phosphate buffer containing 20 mg/mL mannitol, 0.5 mg/mL polysorbate 80, and 2.92 mg/mL sodium chloride. Final pH 6.0.

表 2.6.2- 10　　374 試験の群構成

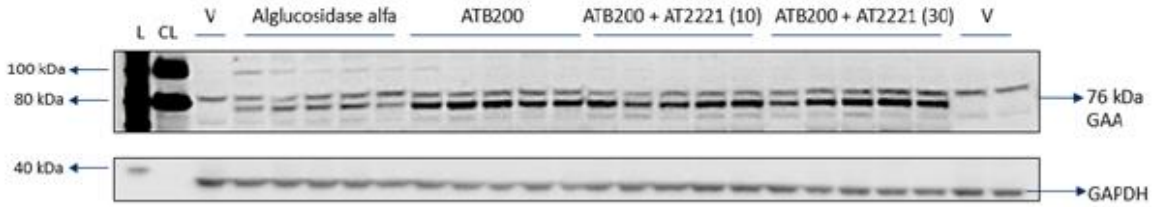
Group	No. of Animals and Sex	Treatment (mg/kg, IV)	Miglustat (mg/kg, PO)
1	7M	vehicle	N/A
2	7M	alglucosidase alfa, 20	N/A
3	7M	cipaglucosidase alfa, 10	N/A
4	7M	cipaglucosidase alfa, 20	N/A
5	7M	cipaglucosidase alfa, 10	3
6	7M	cipaglucosidase alfa, 10	10
7	7M	cipaglucosidase alfa. 10	30
8	7M	cipaglucosidase alfa, 20	3
9	7M	cipaglucosidase alfa, 20	10
10	7M	cipaglucosidase alfa, 20	30
11	4M	cipaglucosidase alfa, 100	N/A

Abbreviations: IV = intravenous; M = male; N/A = not applicable; PO = oral
PO administration was given 30 minutes before IV injection; Miglustat was dissolved in deionized water and the volume of administration was 10 mL/kg. IV administration volume was 5 mL/kg; vehicle for IV dosing was 25 mmol/L sodium phosphate buffer containing 20 mg/mL mannitol, 0.5 mg/mL polysorbate 80, and 2.92 mg/mL sodium chloride. Final pH 6.0.

374 試験では、2 回目の静脈内投与後 2 時間以内に計 12 匹が死亡し、ハンドリングのストレスやアナフィラキシーの複合的な影響によるものと考えられた。

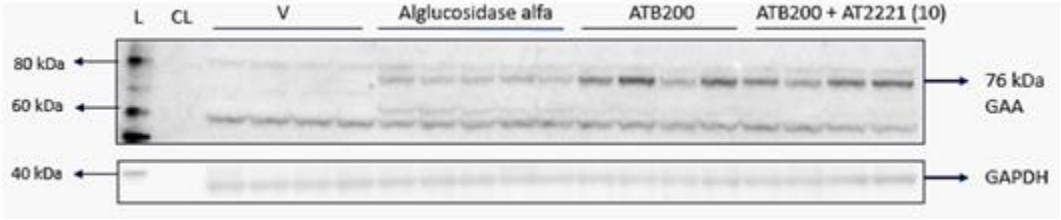
384 及び 392 試験では、ミグルスタット併用の有無にかかわらず、シパグルコシダーゼ アルファ投与群の成熟型 GAA（76 kDa）が ALGLU 投与群と比較して大幅に増加したことから（図 2.6.2- 16 及び図 2.6.2- 17）、*Gaa* KO マウス骨格筋でのシパグルコシダーゼ アルファのライソゾームに対する標的指向性は、ALGLU よりも良好であることが示された。

図 2.6.2- 16　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのライソゾーム内 GAA 取込みへの作用（単回投与 72 時間後）（384 試験）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; CL = cell lysate from rat fibroblasts incubated with rhGAA, as a positive control for GAA signal after internalized and processed in cells; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GAA = acid α-glucosidase; GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; KO = knock-out; L = Magic Mark Molecular weight ladder; rhGAA = recombinant human acid α-glucosidase; V = vehicle
Data are from 4 animals in the vehicle group, 5 in the alglucosidase alfa group, and 4 each from the cipaglucosidase alfa +/- miglustat groups.
Source: Study Report No. RRB200-039, Figure 1

図 2.6.2- 17　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのライソゾーム内 GAA 取込みへの作用（単回投与 72 時間後）（392 試験）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; CL = cell lysate from rat fibroblasts incubated with rhGAA, as a positive control for GAA signal after internalized and processed in cells; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GAA = acid α-glucosidase; GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; KO = knock-out; L = Magic Mark Molecular weight ladder; rhGAA = recombinant human acid α-glucosidase; V = vehicle
Data are from 4 animals in the vehicle group, 5 in the alglucosidase alfa group, and 4 each from the cipaglucosidase alfa+/- miglustat groups.
Source: Study Report No. RRB200-039, Figure 2

374 試験でシパグルコシダーゼ アルファを隔週 2 回投与した結果、ライソゾーム中の成熟型 GAA（76 kDa）が増加したのに対し、ALGLU 投与群ではほとんど又は全く増加せず（図 2.6.2-18）、シパグルコシダーゼ アルファ単回投与後（384 及び 392 試験）と同様の所見が認められた。

図 2.6.2- 18　　シパグルコシダーゼ アルファ単独投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのライソゾーム内 GAA 取込みへの作用（2 回目投与 14 日後）（374 試験）



Abbreviations: ATB200 = cipaglucosidase alfa; CL = cell lysate from rat fibroblasts incubated with rhGAA, as a positive control for GAA signal after internalized and processed in cells; CT = a positive control using the tissue lysate from an animal in Study No. 384; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GAA = acid α-glucosidase; GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; KO = knock-out; L = Magic Mark Molecular weight ladder; rhGAA = recombinant human acid α-glucosidase
GAA signals were detected in quadriceps in select animals from each group: Vehicle group (4 out of 6 animals available), 20 mg/kg alglucosidase alfa group (7 out of 7 animals available), and 20 mg/kg cipaglucosidase alfa group (5 out of 5 animals available).
Source: Study Report No. RRB200-039, Figure 3

2.1.2.4　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与によるグリコーゲン蓄積及び疾患関連組織マーカーに対する作用（免疫組織学的解析）

報告書番号：RRB200-006、添付資料番号：4.2.1.1.8

シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタットによる *Gaa* KO マウスのポンペ病表現型に対する作用をより詳細に検討するため、大腿四頭筋、ヒラメ筋、横隔膜及び心臓などのその他の疾患関連筋組織で以下の疾患関連マーカーを測定した。

- Lysosome-associated membrane protein 1（LAMP1）：ライソゾームの拡張及び筋細胞機能障害を示すライソゾーム関連マーカー。ライソゾームの拡張はポンペ病の特徴である（Lim et al. 2014）。
- Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3（LC3）II 及びセクエストソーム-1（p62）：ライソゾームのオートファジー関連マーカー。ポンペ病ではオートファジー障害が生じる（Fukuda et al. 2006）。オートファジーは、エンドサイトーシス経路障害、CI-MPR 減少（Fukuda et al. 2006; Raben et al. 2003; Wenk and Hille 1991）及び筋細胞微細構造の破綻（Fukuda et al. 2006; Raben et al. 2007）により、rhGAA の取込み及びライソゾーム標的指向性を低下させ、ERT の効果に悪影響を及ぼす可能性がある。

一般的に、骨格筋を構成する線維はミオシン重鎖（MHC）I を発現する遅筋（I 型）線維及び MHC II を発現する速筋（II 型）線維の 2 種類に分けられる。ALGLU は、II 型線維に比べて I 型線維のグリコーゲンをより速やかに消失させることが報告されている（Raben et al. 2003）。ヒラメ筋には、I 型線維（42%）と II 型線維（58%）が同程度含まれているため（Augusto et al. 2004）、シパグルコシダーゼ アルファ単独又はミグルスタット併用投与による筋病変に対する作用の評価に、同組織を選択した。

本試験では、ALGLU 又はシパグルコシダーゼ アルファ（いずれも 20 mg/kg）を隔週 2 回、静脈内投与した。WT マウスを対照とし、第 5 群にはシパグルコシダーゼ アルファ静脈内投与 30 分前にミグルスタット（10 mg/kg）を経口投与した（表 2.6.2- 11）。

組織学的解析（Khanna et al. 2012）によりグリコーゲン量を評価した。LAMP1 マーカーを用いた免疫組織化学（IHC）解析により、大腿四頭筋、ヒラメ筋、横隔膜及び心臓でのライソゾーム拡張を評価し、LC3 II 及び p62 マーカーを用いた IHC 解析により大腿四頭筋でのオートファジーを評価した。また、I 型線維を標識する抗 MHC I 抗体を用いた IHC 解析により、ALGLU 及びシパグルコシダーゼ アルファ単独又はミグルスタット併用投与によるヒラメ筋の I 型及び II 型線維に対する作用を評価した。

表 2.6.2- 11　　群構成

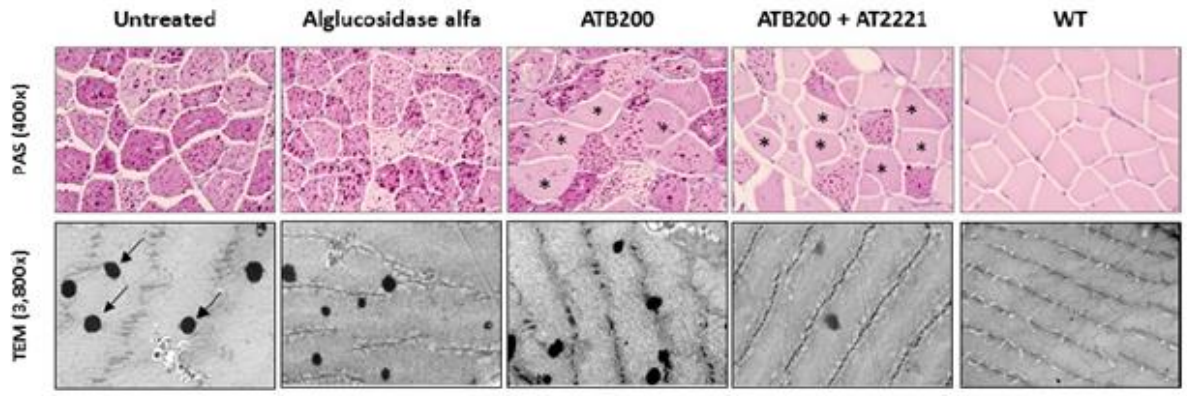
Group	Animals Strain/Genotype	Animal Number and Sex	Treatment (mg/kg, IV)	Miglustat (mg/kg, PO)
1	WT	5M	untreated	N/A
2	*Gaa* KO	5M	untreated	N/A
3	*Gaa* KO	5M	alglucosidase alfa, 20	N/A
4	*Gaa* KO	5M	cipaglucosidase alfa, 20	N/A
5	*Gaa* KO	5M	cipaglucosidase alfa, 20	10

Abbreviations: *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IV = intravenous; KO = knock-out; M = male; N/A = not applicable; PO = oral; WT = wild type
IV administration volume was 5 mL/kg; vehicle for IV dosing was 50 mmol/L sodium phosphate buffer containing 2% (w/v) mannitol, 0.02% (v/v) polysorbate 80, pH 6.0. PO administration was given 30 minutes before IV injection; Miglustat was dissolved in deionized water and the volume of administration was 10 mL/kg

2 回目投与後、第 4 群の 2 匹で嗜眠及びアナフィラキシー反応が認められ、投与 1 時間後に死亡した。これらのマウスには抗ヒスタミン薬を投与しておらず、死因はアナフィラキシー反応と考えられた。

シパグルコシダーゼ アルファを単独又はミグルスタット（10 mg/kg）との併用で隔週 2 回投与しただけで、ALGLU に比べて大腿四頭筋でのグリコーゲン蓄積が明らかに減少した（図 2.6.2- 19）。この作用は、シパグルコシダーゼ アルファ単独に比べてシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用時に大きかった。ALGLU で同程度のグリコーゲン減少作用を得るには、より高用量（100 mg/kg）が必要であると報告されている（Hawes et al. 2007）。

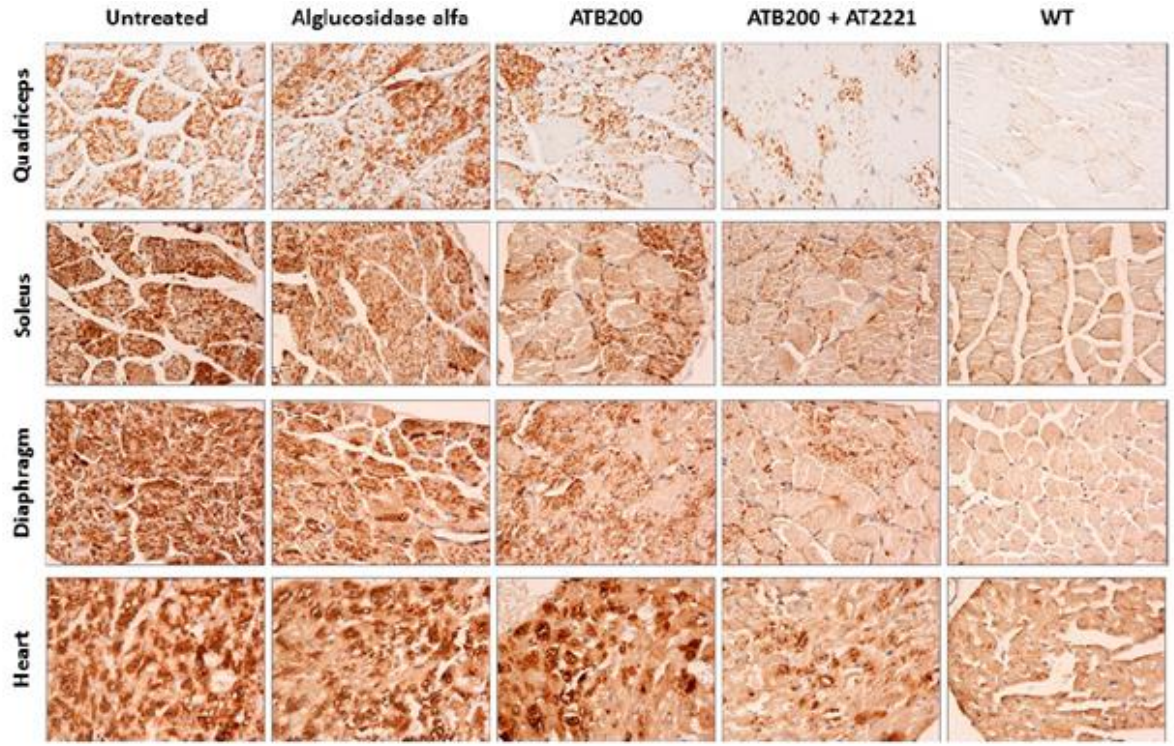
図 2.6.2- 19　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのグリコーゲン蓄積減少作用（PAS 染色及び TEM 評価）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; KO = knock-out; PAS = periodic acid-Schiff; TEM = transmission electron microscope; WT = wild type
PAS staining of glycogen in paraffin sections of quadriceps (top). Glycogen is shown as intense, magenta puncta. Images were taken with a 40x objective and the overall magnification is 400x. One section per animal was examined, and each image is representative of 5 mice per group (n = 3 in cipaglucosidase alfa group). Asterisks represent fibers with reduced PAS signal. TEM examination (3,800x) demonstrated lysosomal glycogen as membrane-bound, electron-dense material (arrows, bottom), which corresponds to the punctate PAS signals on paraffin sections (see upper panel). The data shown are representative photomicrographs from 3 or 5 mice per group.
Source: Study Report No. RRB200-006, Figure 1

評価した全ての筋組織（大腿四頭筋、ヒラメ筋、横隔膜筋及び心臓）で、無処置 *Gaa* KO マウスの LAMP1 陽性小胞の数及び大きさは、同齢の WT マウスに比べて大幅に増加した（図 2.6.2-20）。通常、LAMP1 はライソゾームマーカーとして用いられるタンパク質で、小胞体で合成され、広範な細胞内小胞輸送経路を介してライソゾームに送達される。LAMP1 の増加や蓄積は、細胞内小胞輸送の変化を示すと考えられるため、ERT による筋病変改善効果を評価する有用な指標である。ALGLU は、大腿四頭筋、ヒラメ筋及び横隔膜の LAMP1 陽性小胞数（LAMP1 発現レベル）を減少させなかったが、シパグルコシダーゼ アルファは単独で減少作用を示し、ミグルスタット併用によりこの作用が増強された。ALGLU に最もよく反応する組織であると報告されている心臓でも（Wenk and Hille 1991）、ALGLU 又はシパグルコシダーゼ アルファ単独投与群と比較して、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群で LAMP1 発現量は更に減少した。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用により、*Gaa* KO マウスの LAMP1 発現レベル及び発現パターンが WT マウスと同様になった点は注目すべき結果である。

図 2.6.2- 20　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス組織中 LAMP1 発現に対する作用（IHC 解析）

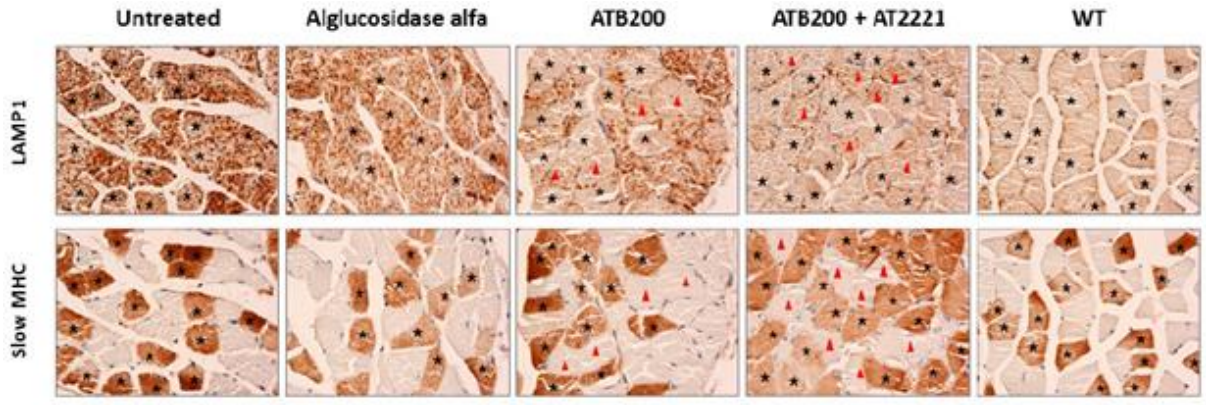


Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IHC = immunohistochemistry; KO = knock-out; LAMP1 = lysosome-associated membrane protein 1; WT = wild type
Paraffin sections of quadriceps, soleus, diaphragm, and heart were examined for LAMP1 by IHC. Each image is representative of a group of 5 mice (n = 3 in cipaglucosidase alfa group). The images were taken using a 40x objective and the overall magnification is 400x. The data shown are representative photomicrographs from 3 or 5 mice per group.
Source: Study Report No. RRB200-006, Figure 2

次に、MHC I 特異的抗体でヒラメ筋の I 型線維を標識し（図 2.6.2- 21、下図）、LAMP1 発現パターン（図 2.6.2- 21、上図）と比較した。ALGLU 投与群の LAMP1 発現レベルは、無処置群と

比較して全体的に若干減少した。一方、シパグルコシダーゼ アルファ単独投与群の LAMP1 発現レベルは、全ての I 型線維で完全又はほとんど正常レベルまで減少し、一部の II 型線維でも減少した。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群の LAMP1 発現レベルは、大多数の II 型線維を含むほとんどの線維で正常レベルまで減少した。

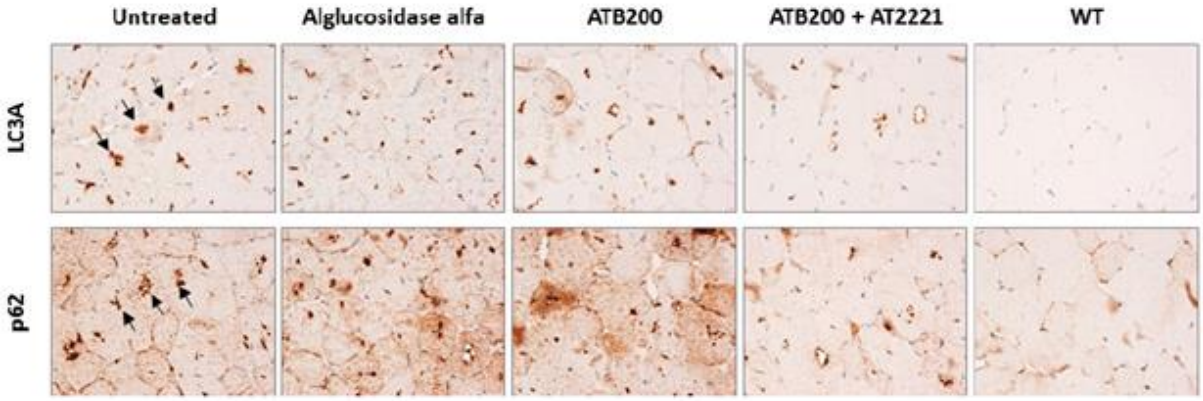
図 2.6.2- 21　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウスヒラメ筋各種線維での LAMP1 発現に対する作用（IHC 解析）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IHC = immunohistochemistry; KO = knock-out; LAMP1 = lysosome-associated membrane protein 1; MHC = myosin heavy chain; WT = wild type
Adjacent paraffin sections of soleus were stained with anti-LAMP1 (top panel) and anti-slow MHC antibody (bottom panel) separately. All the slow-twitch fibers in the images are marked with asterisks. The fast-twitch fibers are unmarked, except those showing a significant reduction in LAMP1 signal that are labeled with red triangles. The data shown are representative photomicrographs from 3 or 5 mice per group. The images were taken using a 40x objective and the overall magnification is 400x.
Source: Study Report No. RRB200-006, Figure 3

大腿四頭筋では、無処置 *Gaa* KO マウスの LC3 II 及び p62 陽性小胞を含む筋線維数が、同齢の WT マウスに比べて大幅に増加した（図 2.6.2- 22）。LC3 II 及び p62 の発現は、シパグルコシダーゼ アルファ単独投与群で ALGLU 単独投与群よりも低下した。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用群では両マーカーの発現が更に低下し、オートファジーの抑制が示された。

図 2.6.2- 22　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのオートファジー関連マーカー（LC3 II 及び p62）に対する作用（IHC 解析）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; KO = knock-out; LC3 = microtubule-associated protein light chain 3; p62 = sequestosome-1; WT = wild type
Paraffin sections were stained with antibodies against LC3 II (top panel) or p62 (bottom panel), respectively. Autophagic areas are shown as LC3 II- or p62-positive vacuoles (arrows). The data shown are representative photomicrographs from 3 or 5 mice per group. The images were taken using a 40x objective and the overall magnification is 400x.
Source: Study Report No. RRB200-006, Figure 4

2.1.2.5　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与による単一骨格筋線維でのオートファジーに対する作用

報告書番号：RRB200-055、添付資料番号：4.2.1.1.9
参考資料 Meena 2020、添付資料番号：4.2.1.1.14

本試験（391 試験）では、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋及び腓腹筋白色部のライソゾーム及びオートファジーマーカーに対する作用を評価した。ポンペ病患者の筋病変には、ライソゾームだけでなく、細胞内の主要なライソゾーム依存性リサイクル経路であるオートファジー（He and Klionsky 2009）の障害が関与していることが報告されている（Lim et al. 2014）。オートファジー障害により細胞内の不要物質が筋線維に沿って蓄積し、骨格筋構造及び収縮機能が破壊され（Drost et al. 2005）、ALGLU の送達が阻害される（Fukuda et al. 2006; Raben et al. 2007）。一度オートファジー機能が障害されると、ALGLU でも改善されず（Prater et al. 2013; Raben et al. 2003）、特に腓腹筋白色部では難治性であることが明らかになっている（Fukuda et al. 2006）。

IHC 解析及び免疫蛍光測定法を用いて、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用によるライソゾーム（LAMP1）及びオートファジー関連マーカー（LC3 II）に対する作用を評価し、ALGLU と比較した。さらに、第二高調波発生（SHG）及び 2 光子励起蛍光（TPEF）顕微鏡法（Ralston et al. 2008）により筋線維構造を解析した。

シパグルコシダーゼ アルファ（20 mg/kg）をミグルスタット（10 mg/kg、静脈内投与 30 分前に経口投与）との併用で隔週 4 回、静脈内投与した（表 2.6.2- 12）。対照として ALGLU（20 mg/kg）投与群を設定した。4 回目投与 14 日後にマウスを安楽死させ、血漿及び疾患関連組織を以降の分析に供した。

表 2.6.2- 12　　391 試験の群構成

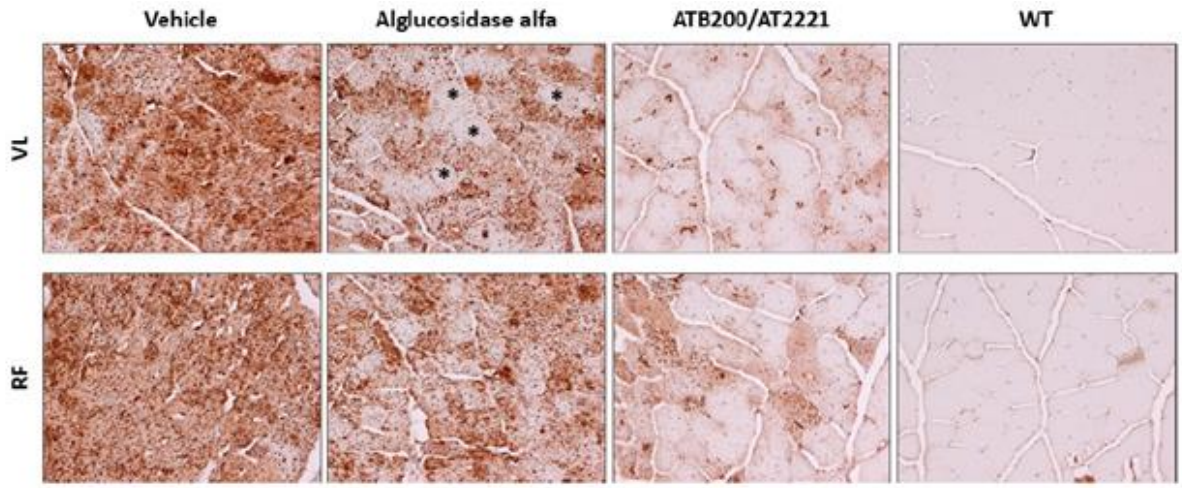
Group	No. of Animals and Sex	Genotype	Treatment (mg/kg, IV)	Miglustat (mg/kg, PO)
1	10M	*Gaa* KO	vehicle	N/A
2	10M	*Gaa* KO	alglucosidase alfa, 20	N/A
3	10M	*Gaa* KO	cipaglucosidase alfa, 20	10
4	6M	WT	untreated	N/A

Abbreviations: *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IV = intravenous; KO = knock-out; M = male; N/A = not applicable; PO = oral; WT = wild type
PO administration was given 30 minutes before IV injection; Miglustat was dissolved in deionized water and the volume of administration was 10 mL/kg. IV administration volume was 5 mL/kg; vehicle for IV dosing was 25 mmol/L sodium phosphate buffer containing 20 mg/mL mannitol, 0.5 mg/mL polysorbate 80, and 2.92 mg/mL sodium chloride. Final pH 6.0.

試験中に溶媒投与群で 3 匹、ALGLU 投与群で 3 匹が死亡したが、これらは投与に関連したものではなく、アナフィラキシー反応によるものと考えられた。

シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群では、ALGLU 投与群と比較してリソソーム拡張及びオートファジー障害を著しく改善した。溶媒投与群では、検討した全ての大腿四頭筋線維［外側広筋（VL）及び大腿直筋（RF）の 2 切片を評価］で WT マウスと比較して LAMP1 発現が増加した（図 2.6.2- 23）。これに対し、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群では、ほとんどの線維で LAMP1 発現が大幅に減少し、特に VL 切片での発現パターンは WT マウスに類似していた（図 2.6.2- 23、上図）。ALGLU 投与群では、LAMP1 発現の著しい減少又は消失が認められた線維はごくわずかであった。

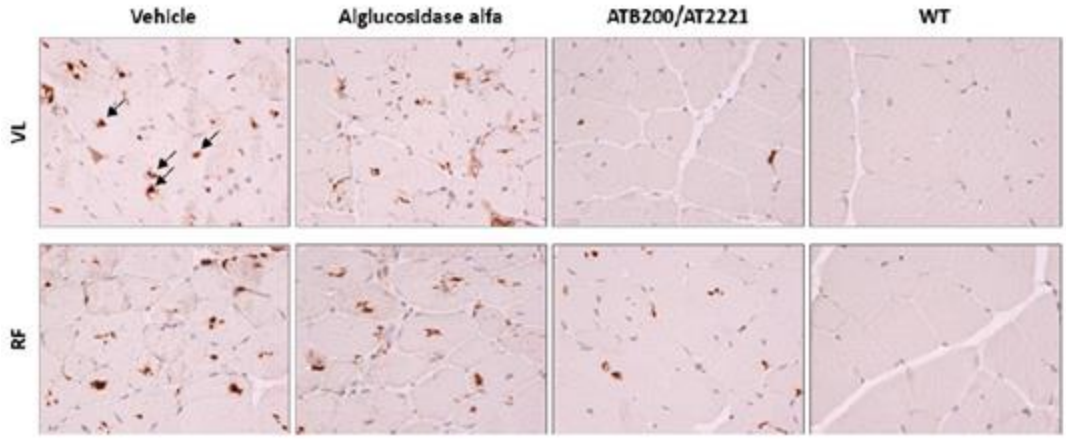
図 2.6.2- 23　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋での LAMP1 発現に対する作用（IHC 解析）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IHC = immunohistochemistry; KO = knock-out; LAMP1 = lysosome-associated membrane protein 1; RF = rectus femoris; VL = vastus lateralis; WT = wild type
Paraffin sections (5 µm in thickness) were stained with an anti-LAMP1 antibody. One cross section per animal was examined, with VL (top panels) and RF (bottom panels) analyzed separately. Each image is representative of 7 - 9 mice per group (n = 6 for WT). Asterisks mark the few muscle fibers in the alglucosidase alfa-treated group that showed significantly reduced LAMP1signals. Magnification = 200x.
Source: Study Report No. RRB200-055, Figure 1

オートファジー関連マーカー（LC3 II）でも同様の結果が得られた。溶媒投与群の VL 切片では、LC3 II 発現が凝集体として認められた（図 2.6.2- 24）。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群では、LC3 II 発現が大幅に減少したが、ALGLU 投与群での効果は中程度であった。LC3 II でも、VL 切片が RF 切片よりも高い反応性を示した。

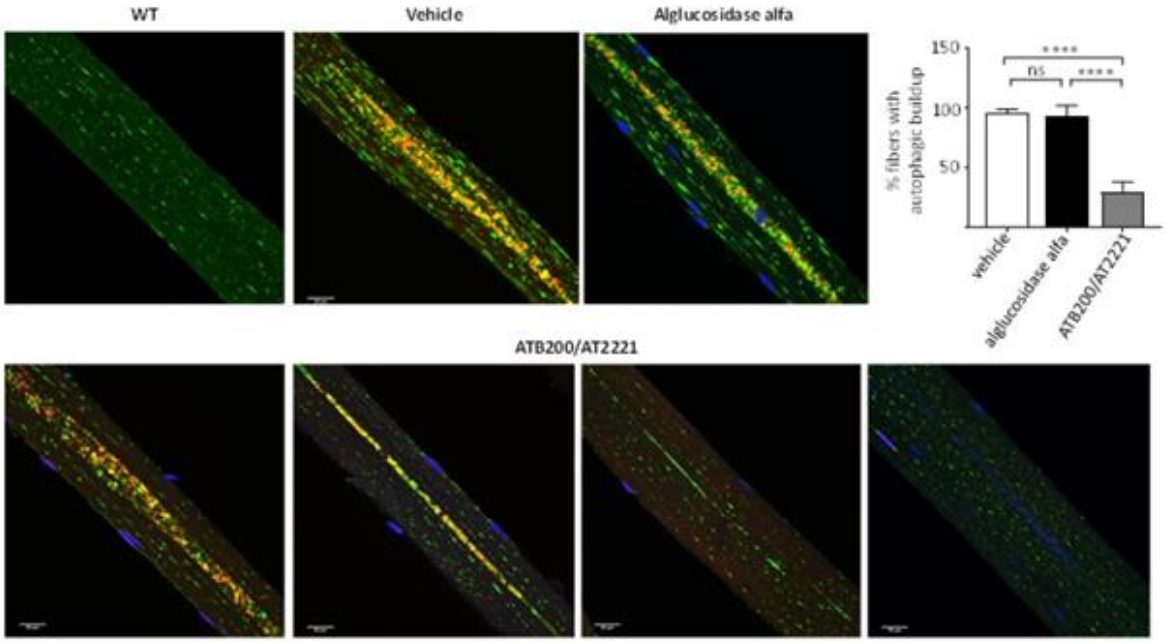
図 2.6.2- 24　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋での LC3 II 発現に対する作用（IHC 解析）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IHC = immunohistochemistry; KO = knock-out; LC3 = microtubule-associated protein light chain 3; RF = rectus femoris; VL = vastus lateralis; WT = wild type
Paraffin sections (5 µm in thickness) were stained with an anti-LC3 antibody. One cross section per animal was examined, with VL (top panel) and RF (bottom panel) analyzed separately. Each image is representative of 7 - 9 mice per group (n = 6 for WT). Arrows mark the LC3 II-positive aggregates. Magnification = 400x.
Source: Study Report No. RRB200-055, Figure 2

腓腹筋白色部から得た単一筋線維を用いた蛍光免疫二重染色法により、溶媒投与群では WT マウスに比べて、広範な LAMP1/LC3 II 染色領域（オートファジー障害による LC3 II 蓄積）が認められた（図 2.6.2- 25）。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群で、明らかな LC3 II 蓄積を認める筋線維数は 30%未満まで減少したが、ALGLU 投与群では 95%超の筋線維で LC3 II 蓄積が認められた（図 2.6.2- 25、右上グラフ）。ALGLU 投与群とは異なり、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群では、筋線維の大部分は LC3 II 蓄積領域以外でのリソソーム拡張をほとんど認めず、その多く（50%超）は WT マウスと区別がつかなかった。

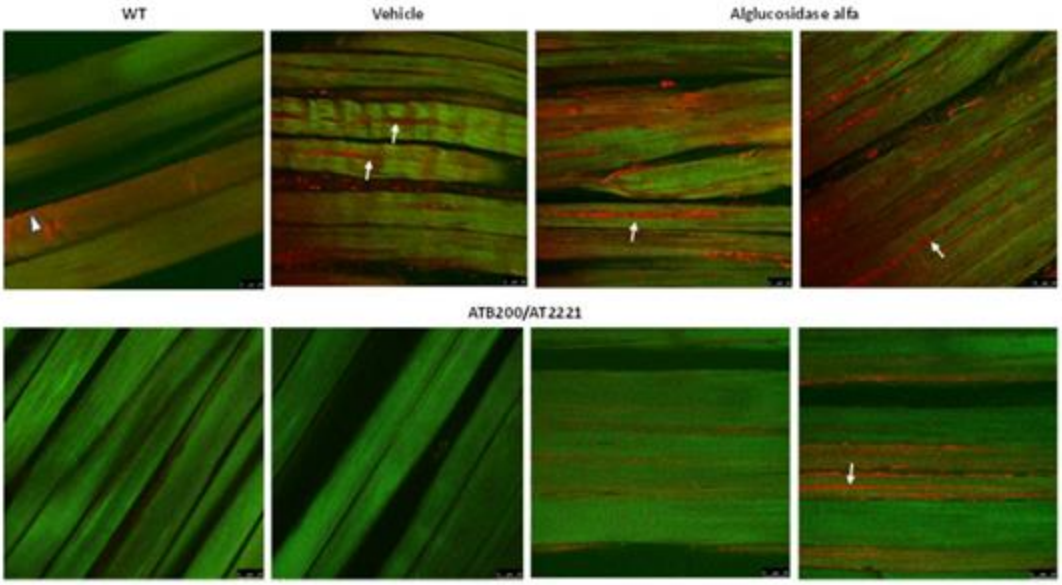
図 2.6.2- 25　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）による *Gaa* KO マウス腓腹筋白色部単一筋線維での LAMP1 及び LC3 II 発現に対する作用（免疫蛍光二重染色法）



Abbreviations: ANOVA = analysis of variance; ATB200/AT2221 = cipaglucosidase alfa/miglustat; Co-IF = Co-immunofluorescence; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; KO = knock-out; LAMP1 = lysosome-associated membrane protein 1; LC3 = microtubule-associated protein light chain 3; ns: not significant; SD = standard deviation; WT = wild type
Co-IF staining of single fibers with markers for lysosomes (LAMP1; green), autophagosomes (LC3 II; red), and nuclei (Hoechst dye; blue). The bar graph indicates the percent of fibers with autophagic buildup in each group. N = 141 fibers from 4 alglucosidase alfa-treated *Gaa* KO mice; N = 127 fibers from 4 cipaglucosidase alfa/miglustat -treated *Gaa* KO mice. Data represent the mean ± SD; **** P < 0.0001; Tukey's multiple comparison following one-way ANOVA. Bar: 20 µm.
Source: Study Report No. RRB200-055, Figure 3

SHG 及び TPEF 顕微鏡法を用いた筋線維構造解析結果から、溶媒投与群では小さな穴（核及びライソゾーム拡張）及び大きな穴（オートファジー残屑の蓄積）により腓腹筋白色部の筋線維構造が破壊されていることが示された（図 2.6.2- 26）。ALGLU 投与群の筋組織では、依然として明らかな LC3 II 発現が認められた。一方、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群では、LC3 II 発現領域の大きさ及び数が明らかに減少した。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群では、大部分の筋線維が正常で、各線維の幅にわたって断続的な太いフィラメントが認められた。

図 2.6.2- 26　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 4 回）による *Gaa* KO マウス腓腹筋白色部での筋線維構造に対する作用（SHG 及び TPEF 顕微鏡法）



Abbreviations: ATB200/AT2221 = cipaglucosidase alfa/miglustat; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; KO = knock-out; SHG = second harmonic generation; TPEF = two-photon excited fluorescence; WT = wild type
SHG reflects the position and organization of myosin heavy chain, while TPEF reflects mitochondria and autofluorescent particles such as lipofuscin. WT fibers show a well-organized SHG signal and little TPEF except where mitochondria are concentrated along the blood vessels at the surface of one of the fibers (arrowhead). In contrast, fibers from vehicle-treated and alglucosidase alfa-treated *Gaa* KO mice show long interruptions of the myosin bands (thick filaments) that are rich in TPEF positive particles (arrows); these areas correspond to the space occupied by autophagic debris. In cipaglucosidase alfa/miglustat-treated mice, some areas still show such a defect (arrows), but many areas appear indistinguishable from WT.
Bar: 25 µm.
Source: Study Report No. RRB200-055, Figure 4

以上より、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与により、*Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのライソゾーム及びオートファジー関連マーカー（LAMP1 及び LC3 II）が著しく減少することが IHC 解析により示された。また、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与により、*Gaa* KO マウス腓腹筋白色部でのオートファジー障害が抑制され、筋線維構造が改善されたことから、ポンペ病での筋損傷を回復させる可能性が示唆された。これは、ポンペ病患者でのオートファジー障害を回復させることができるという最初のエビデンスである。

Gaa KO マウス筋肉のライソゾーム機能障害に起因する細胞レベルの影響として、ライソゾーム拡張及びオートファジー障害に加えて、2 つの重要なキナーゼであるアデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼ（AMPK）及び mammalian target of rapamycin complex 1（mTORC1）によって制御されるシグナル伝達の異常がある（Lim et al. 2018; Lim et al. 2017）。骨格筋代謝において、AMPK の活性化はオートファジーの正の制御因子、mTORC1 活性低下はオートファジーの負の制御因子として確立されている（Egan et al. 2011; Inoki et al. 2012; Kim et al. 2011; Sengupta et al. 2010）。

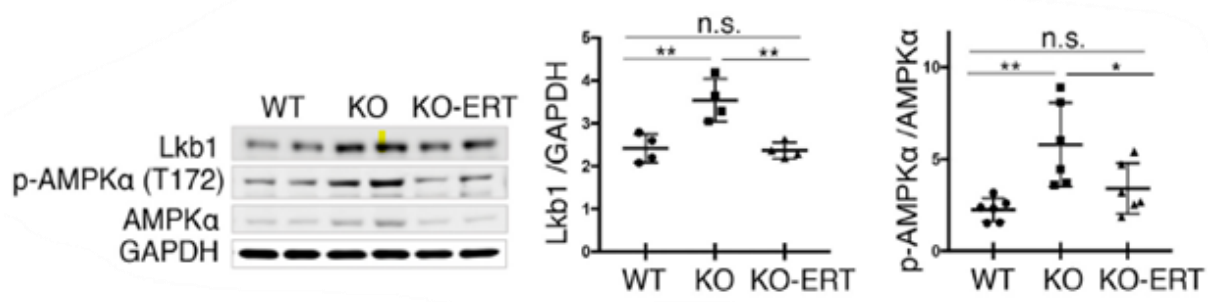
Gaa KO マウス筋組織の AMPK 及び mTORC1 シグナル伝達に対するシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用の影響を評価した（参考資料 Meena 2020）。シパグルコシダーゼ ア

ルファ（20 mg/kg）をミグルスタット（10 mg/kg、経口投与）との併用で隔週 11 回、静脈内投与した。

AMPK の Thr172 リン酸化を指標に AMPK 活性及び liver kinase B1（LKB1、AMPK ファミリーのマスターキナーゼ）を測定した結果、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用により *Gaa* KO マウス筋組織での AMPK 活性［リン酸化型 AMPKα サブユニット（p-AMPKα）］及び LKB1 レベルが低下した（図 2.6.2- 27）。また、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用による mTORC1 シグナル伝達に対する影響を、リン酸化型及び非リン酸化型 eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1（4EBP1）の筋組織での発現を指標として評価した。翻訳抑制因子 4EBP1 は、mTORC1 シグナル伝達の基質として知られている。mTOR の下流シグナルであるリン酸化型 S6（p-S6$^{S235/236}$）並びにリン酸化型 4EBP1（p-4EBP1^{S56} 及び p-4EBP1$^{T37/46}$）のレベルは、投薬群と無処置群で有意な差は認められず、いずれも WT マウスと比較して減少し、mTOR 活性低下を示した（図 2.6.2- 28、上図）。非リン酸化型 4EBP1（non-p-4EBP1^{T46}）及び総 4EBP1 レベルは、投薬群で無処置群よりも減少し、mTORC1 シグナル伝達の部分的な回復が示唆された（図 2.6.2- 28、下図）。

以上より、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与は、ポンペ病の病態を多方面から改善又は抑制することから、ALGLU と比較して治療上のベネフィットをもたらすことが示された。

図 2.6.2- 27　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 11 回）による *Gaa* KO マウス筋組織での AMPK シグナル伝達に対する作用

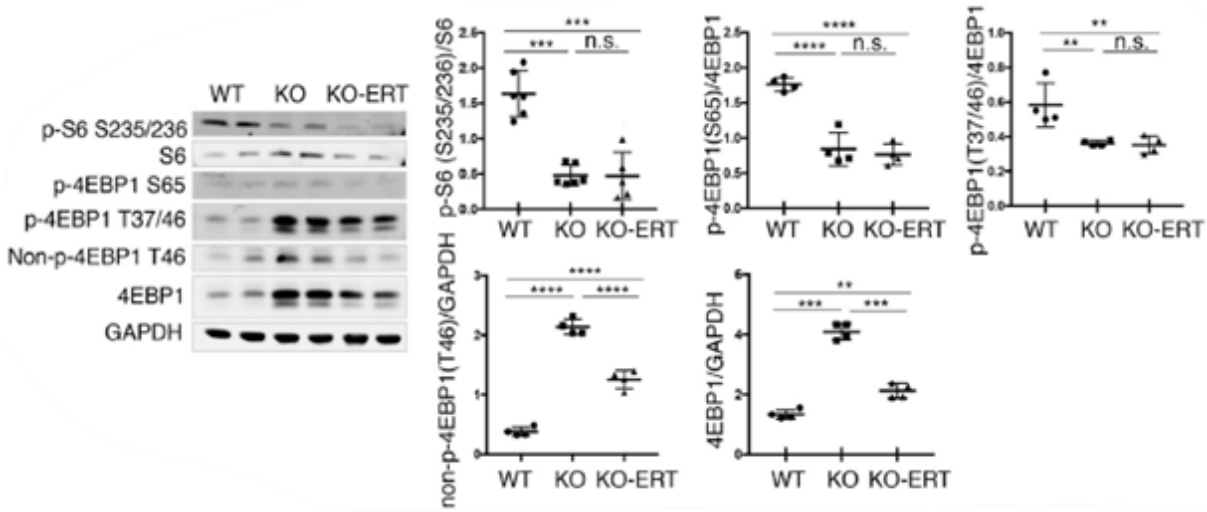


Abbreviations: AMPK = AMP (adenosine monophosphate) activated protein kinase; ANOVA = analysis of variance; ERT = enzyme replacement therapy; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; KO = knock-out; LKB1 = liver kinase B1; n.s. = not significant; SD = standard deviation; WT = wild type

Muscle biopsies were collected from age and sex-matched WT, untreated (KO) and cipaglucosidase alfa/miglustat treated Gaa KO (KO-ERT) mice. Western blot analysis of muscle lysates from WT, untreated KO (KO), and cipaglucosidase alfa/miglustat treated Gaa KO (KO-ERT) mice with the indicated antibodies (n = 4 for each group for LKB1; n = 6 for each group for p-AMPKα^{T172}). Different form of AMPKα, phosphorylated (p-AMPKα^{T172}) and total (AMPKα) were analyzed. GAPDH was used as loading control. Each data point represents an individual mouse. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Graphs represent mean ± SD. *P < 0.05; ** P < 0.01.

Source: Reference Study Meena 2020, Figure 6A

図 2.6.2- 28　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 11 回）による *Gaa* KO マウス筋組織での mTORC1 シグナル伝達に対する作用



Abbreviations: 4EBP1 = eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; ANOVA = analysis of variance; ERT = enzyme replacement therapy; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; KO = knock-out; mTORC1 = mammalian target of rapamycin complex 1; n.s. = not significant; SD = standard deviation; WT = wild type
Muscle biopsies were collected from age and sex-matched WT, untreated (KO) and cipaglucosidase alfa/miglustat treated *Gaa* KO (KO-ERT) mice. Western blot analysis of muscle lysates from WT, untreated KO (KO), and cipaglucosidase alfa/miglustat treated *Gaa* KO (KO-ERT) mice with the indicated antibodies (n = 4-6 for each group). Different forms of 4EBP1, phosphorylated (p-4EBP1$^{T37/46}$ and p-4EBP1^{S65}), non-phosphorylated (non-p-4EBP1^{T46}) and total (4EBP1) were analyzed. GAPDH was used as loading control. Each data point represents an individual mouse. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Graphs represent mean ± SD. *P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001.
Source: Reference Study Meena 2020, Figure 7B

2.1.2.6　　シパグルコシダーゼ アルファ EB 及び GMP バッチのグリコーゲン減少作用の比較

報告書番号：RRB200-014、添付資料番号：4.2.1.1.10
報告書番号：RRB200-015、添付資料番号：4.2.1.1.11

本試験（359 試験）では、ラージスケールで製造した EB2（原薬）と GMP バッチ（GMP4、製剤）のシパグルコシダーゼ アルファ（20 mg/kg）を単独又はミグルスタット（10 mg/kg）との併用で隔週 2 回投与し、*Gaa* KO マウスのグリコーゲン減少作用（報告書番号 RRB200-014）及び疾患関連組織マーカーに対する作用（報告書番号 RRB200-015）を評価した。*Gaa* KO マウスに溶媒、ALGLU（20 mg/kg）、シパグルコシダーゼ アルファ EB2（20 mg/kg）又はシパグルコシダーゼ アルファ GMP4（20 mg/kg）を隔週 2 回静脈内投与した。一部のシパグルコシダーゼ アルファ投与群には静脈内投与 30 分前にミグルスタット（10 mg/kg）を経口投与した（表 2.6.2-13）。本試験では DPH は投与せず、未処置の WT マウスを対照群とした。2 回目投与 14 日後にマウスを安楽死させ、血漿及び疾患関連組織を以降の分析に供した。

ミグルスタット単独投与による影響を評価するため、大腿四頭筋、上腕三頭筋及び心臓でのグリコーゲン量及び GAA 活性を測定し（Khanna et al. 2012）、大腿四頭筋での LAMP1 及び LC3 II 染色による組織学的検査を実施した。

表 2.6.2- 13　　359 試験の群構成

Group	No. of Animals and Sex	Genotype	Treatment (mg/kg, IV)	Miglustat (mg/kg, PO)
1	8M	*Gaa* KO	vehicle	N/A
2	8M	*Gaa* KO	alglucosidase alfa, 20	N/A
3	8M	*Gaa* KO	EB2 cipaglucosidase alfa, 20	N/A
4	8M	*Gaa* KO	GMP4 cipaglucosidase alfa, 20	N/A
5	8M	*Gaa* KO	EB2 cipaglucosidase alfa, 20	10
6	8M	*Gaa* KO	GMP4 cipaglucosidase alfa, 20	10
7	8M	*Gaa* KO	N/A	10
8	8M	WT	untreated	N/A

Abbreviations: EB = engineering batch; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GMP = Good Manufacturing Practice; IV = intravenous; KO = knock-out; M = male; N/A = not applicable; PO = oral; WT = wild type
PO administration was given 30 minutes before IV injection; Miglustat was dissolved in deionized water and the volume of administration was 10 mL/kg. IV administration volume was 5 mL/kg; vehicle for IV dosing was 25 mmol/L sodium citrate buffer containing 2% mannitol, and 0.05% polysorbate 80. Final pH 6.0.

また、大腿四頭筋でのジスフェルリン染色を用いた IHC 解析を実施した。膜貫通タンパク質であるジスフェルリンは、筋線維の膜修復に重要な役割を果たしている（Cárdenas et al. 2016）。ジスフェルリンは主に成人の骨格筋の筋細胞膜に発現しており、デュシェンヌ型、ベッカー型及び肢帯型（2C～F）など複数の型の筋ジストロフィーでジスフェルリンの細胞質蓄積の関与が知られている（Piccolo et al. 2000; McDade and Michele 2014）。

概して、シパグルコシダーゼ アルファ EB2（原薬）又は GMP4（製剤）を *Gaa* KO マウスに隔週 2 回静脈内投与後、投薬による副作用は認められなかった。2 回目投与後、シパグルコシダーゼ アルファ EB2 単独投与群（Group 3）の 1 匹が投与 1 時間後に死亡した。また、シパグルコシダーゼ アルファ EB2／ミグルスタット併用投与群（Group 5）及びシパグルコシダーゼ アルファ GMP4／ミグルスタット併用投与群（Group 6）でそれぞれ 1 匹、計 2 匹が 2 回目投与 5 日後に死亡した。投薬との直接的な関連性は確認できなかった。

全体として、シパグルコシダーゼ アルファ EB2 及び GMP4 投与群でのグリコーゲン減少作用は、全ての疾患関連組織でほぼ同程度あり、ALGLU 投与群と比較していずれも有意な作用が認められたことから（図 2.6.2- 29）、EB 及び GMP バッチで重要品質特性（CQA）が保持されていることが示された。アミログルコシダーゼ法を用いたグリコーゲン測定において、大腿四頭筋でのグリコーゲン減少率は、シパグルコシダーゼ アルファ投与群で溶媒投与群の 62.3%（EB2）又は 61.1%（GMP4）であったのに対し、ALGLU 投与群では 25.5%であった。また、上腕三頭筋でのグリコーゲン減少率は、シパグルコシダーゼ アルファ群で 53.2%（EB2）又は 42.2%（GMP4）、ALGLU 投与群では 14.2%であった。心臓でも同様の傾向が認められ、全てのシパグルコシダーゼ アルファ投与群では、ALGLU 投与群と比較して有意なグリコーゲン減少作用が認められた。大腿四頭筋等の一部の組織では、ミグルスタット併用投与により、シパグルコシダーゼ アルファのグリコーゲン減少作用が増強される緩やかな傾向がみられた。またミグルスタッ

ト自体によるグリコーゲン減少作用は認められず、これまでの試験結果（2.1.2.2 項）と一致した。

本試験でのシパグルコシダーゼ アルファ（GMP4 及び EB2）によるグリコーゲン減少作用は、隔週 2 回投与した試験で用いたリサーチグレードバッチよりも優れており、シパグルコシダーゼ アルファ単独投与による効果がプラトーに達した可能性がある。このため、グリコーゲン減少作用に対するミグルスタットの併用効果が、一部の組織に限定的であったとも考えられる。以上の結果から、新たな製造工程で製造したシパグルコシダーゼ アルファは、酵素活性の維持に不可欠な CQA を保持していることが示された。

クロマトグラフィー法［パルスアンペロメトリック検出による高 pH 陰イオン交換クロマトグラフィー（HPAEC-PAD）］を用いたグリコーゲン測定では、生化学的解析とほぼ同様のグリコーゲン減少作用が認められた（データ省略、報告書番号 RRB200-014）。

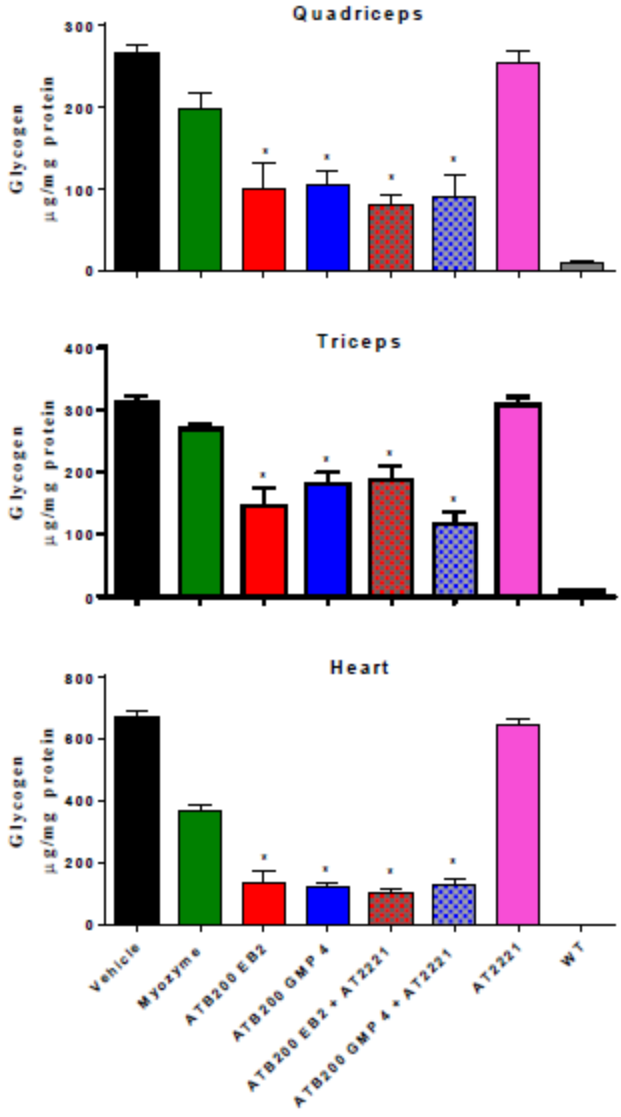
ALGLU 投与群では大腿四頭筋及び上腕三頭筋の GAA 活性が非常に低く、溶媒投与群をわずかに上回る程度にすぎなかった（図 2.6.2- 30）。一方、シパグルコシダーゼ アルファ投与群のこれらの骨格筋では、溶媒及び ALGLU 投与群に比べて GAA 活性が有意に高かった。ミグルスタット単独投与群の全ての組織で、溶媒群と比較して有意に高い GAA 活性は認められなかったことから、ミグルスタット自体は *Gaa* KO マウスの GAA 活性に影響しないことが改めて確認された。

溶媒投与群の大腿四頭筋では、評価した全ての筋線維で WT マウスよりも LAMP1 及び LC3 II 発現が増加し（図 2.6.2- 31 及び図 2.6.2- 33）、ポンペ病患者の筋病変で報告されている所見が再現された。ミグルスタット単独投与による影響は認められなかった（図 2.6.2- 32 及び図 2.6.2- 34）。

LAMP1 及び LC3 II を用いた IHC 解析において、シパグルコシダーゼ アルファ（EB2 及び GMP4）投与群での作用は ALGLU 投与群よりもはるかに顕著かつ広範囲であり、LAMP1 発現は正常化し、LC3 II 発現は溶媒対照群に比べて著しく低下した。またこれら 2 つのバッチ間に明らかな違いは認められなかった（図 2.6.2- 32 及び図 2.6.2- 34）。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群では、更なる改善傾向が認められた。また、大腿四頭筋での LAMP1 及び LC3 II 発現は、RF 切片よりも VL／内側広筋（VM）切片でより減少する傾向があることから、rhGAA 投与に対する大腿四頭筋の反応性は部位によって異なる可能性が考えられる。

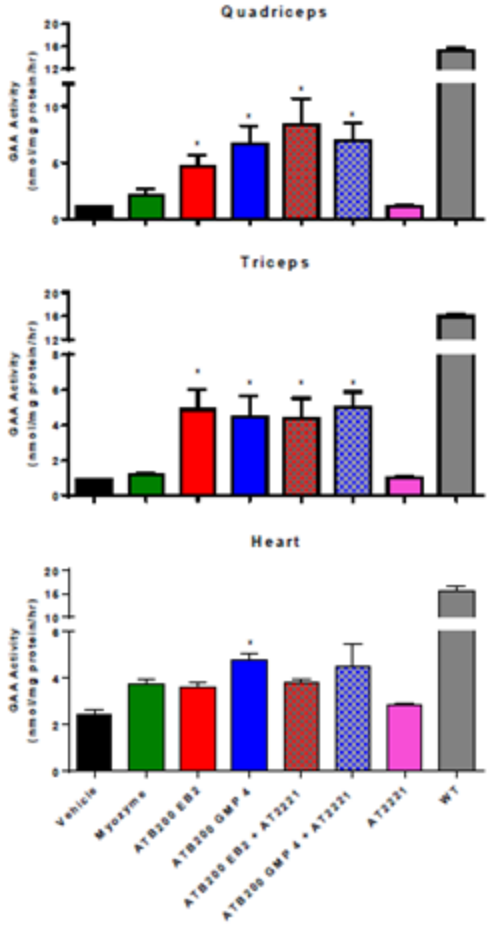
Gaa KO マウスの大腿四頭筋では、同齢の WT マウスと比較して明らかなジスフェルリンの細胞内蓄積も認められた（図 2.6.2- 35）。ALGLU 及びミグルスタット単独投与群では、*Gaa* KO マウス筋線維でのジスフェルリン細胞内蓄積はほとんど又は全く変化が認められなかったが、シパグルコシダーゼ アルファ投与群ではジスフェルリンの細胞内蓄積が著しく減少し、EB2 と GMP4 バッチの間に明らかな差は認められなかった（図 2.6.2- 35）。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群で、ジスフェルリン細胞内蓄積の減少作用は増強されなかった。VL/VM 切片では RF 切片よりも投与に対する反応性が良好であった。

図 2.6.2- 29　　シパグルコシダーゼ アルファ（EB2 及び GMP4）／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン減少作用（アミログルコシダーゼ法）



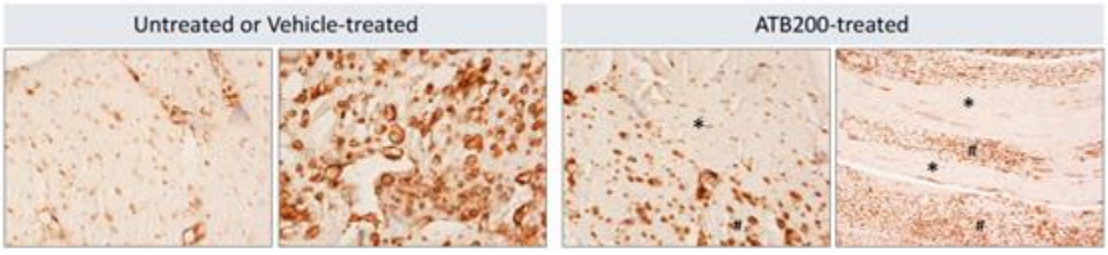
Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; EB = engineering batch; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GMP = Good Manufacturing Practice; KO = knock-out; Myozyme = alglucosidase alfa; SEM = standard error of the mean; WT = wild type
Each bar represents mean ± SEM of 7-8 animals per treatment group where samples were available. Statistical significance was determined using 2-sided t-tests, where * represents $p < 0.05$ versus alglucosidase alfa.
Source: Study Report No. RRB200-014, Figure 1

図 2.6.2- 30　　シパグルコシダーゼ アルファ（EB2 及び GMP4）／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス組織中 GAA 活性に対する作用



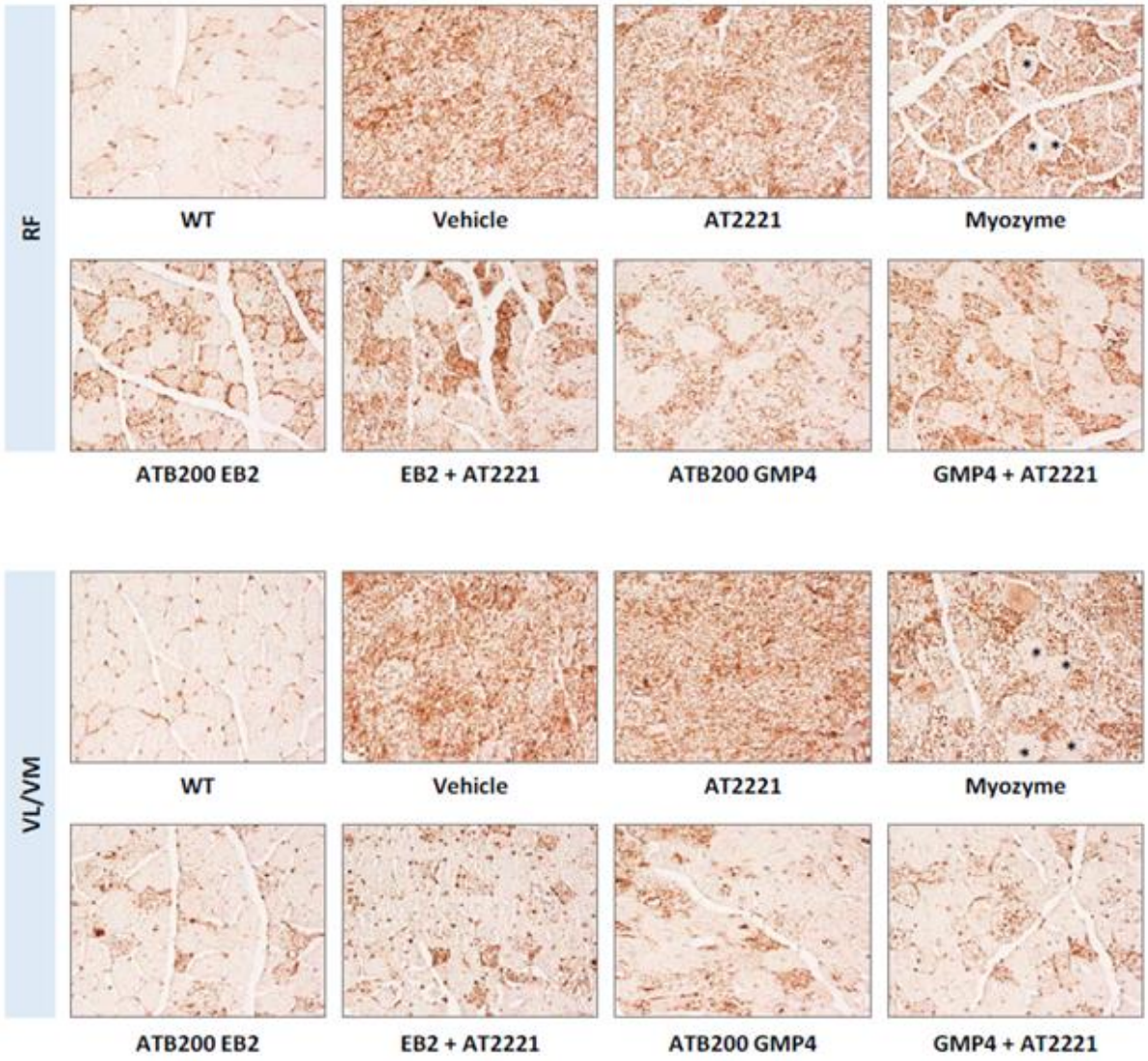
Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; EB = engineering batch; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GAA = acid α-glucosidase; GMP = Good Manufacturing Practice; KO = knock-out; Myozyme = alglucosidase alfa; SEM = standard error of the mean; WT = wild type
Each bar represents mean ± SEM of the 7-8 animals per treatment group for which the samples were available. Statistical significance was determined using 2-sided t-tests, where * represents $p < 0.05$ versus alglucosidase alfa.
Source: Study Report No. RRB200-014, Figure 3

図 2.6.2- 31　　シパグルコシダーゼ アルファ単独投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋での LAMP1 発現に対する作用（IHC 解析）



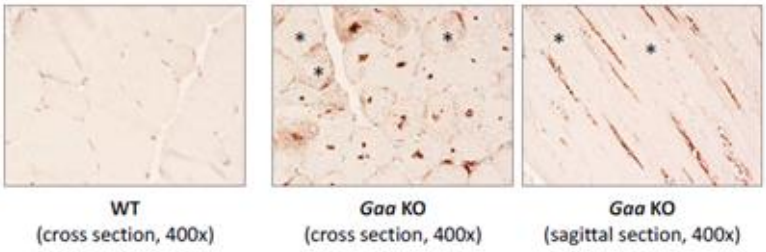
Abbreviations: ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IHC = immunohistochemistry; KO = knock-out; LAMP1 = lysosome-associated membrane protein 1
Paraffin sections (5 µm in thickness) were stained with an anti-LAMP1 antibody. Asterisks and number signs indicate the muscle fibers with normal and increased LAMP1 IHC signals, respectively.
Source: Study Report No. RRB200-015, Figure 1

図 2.6.2- 32　　シパグルコシダーゼ アルファ（EB2 及び GMP4）／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋での LAMP1 発現に対する作用（IHC 解析）



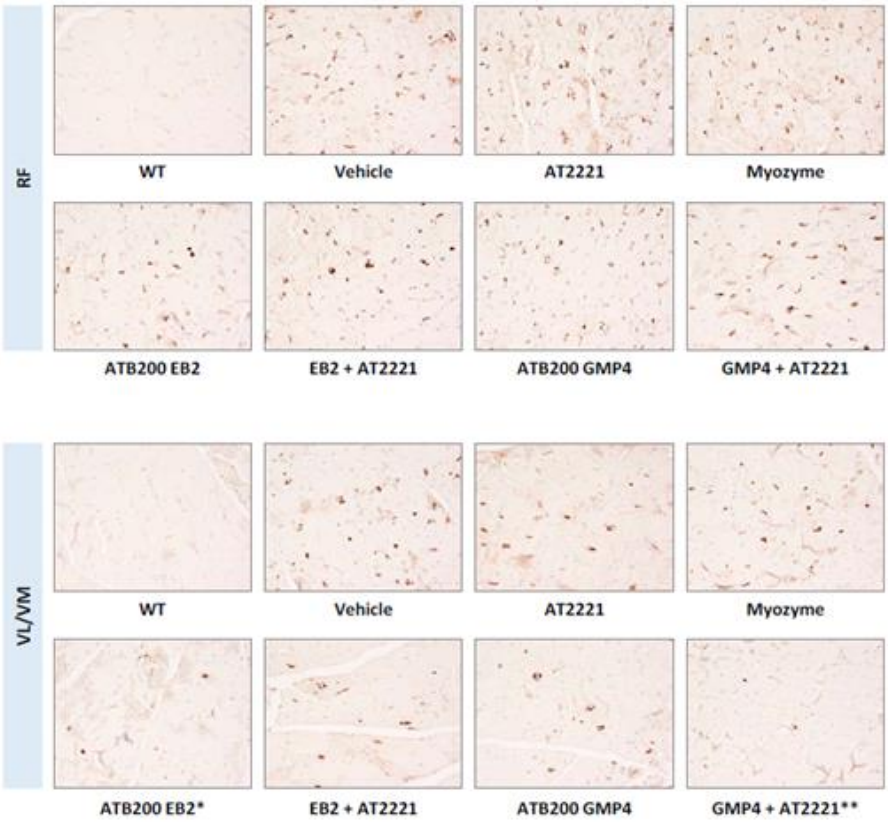
Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; EB = engineering batch; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IHC = immunohistochemistry; KO = knock-out; GMP = Good Manufacturing Practice; LAMP1 = lysosome-associated membrane protein 1; Myozyme = alglucosidase alfa; RF = rectus femoris; VL = vastus lateralis; VM = vastus medialis; WT = wild type
Paraffin sections (5 µm in thickness) were stained with an anti-LAMP1 antibody. One cross section per animal was examined, with RF (top panels) and VL/VM (bottom panels) muscles analyzed separately. Each image is representative of 7-8 mice per group, and samples with missing or unidentifiable RF or VL/VM were excluded from analysis. Asterisks mark the few muscle fibers in the alglucosidase alfa-treated group that showed significantly reduced LAMP1signals.
Magnification = 200x.
Source: Study Report No. RRB200-015, Figure 2

図 2.6.2- 33　　*Gaa* KO 及び WT マウス大腿四頭筋での LC3 II 発現（IHC 解析）



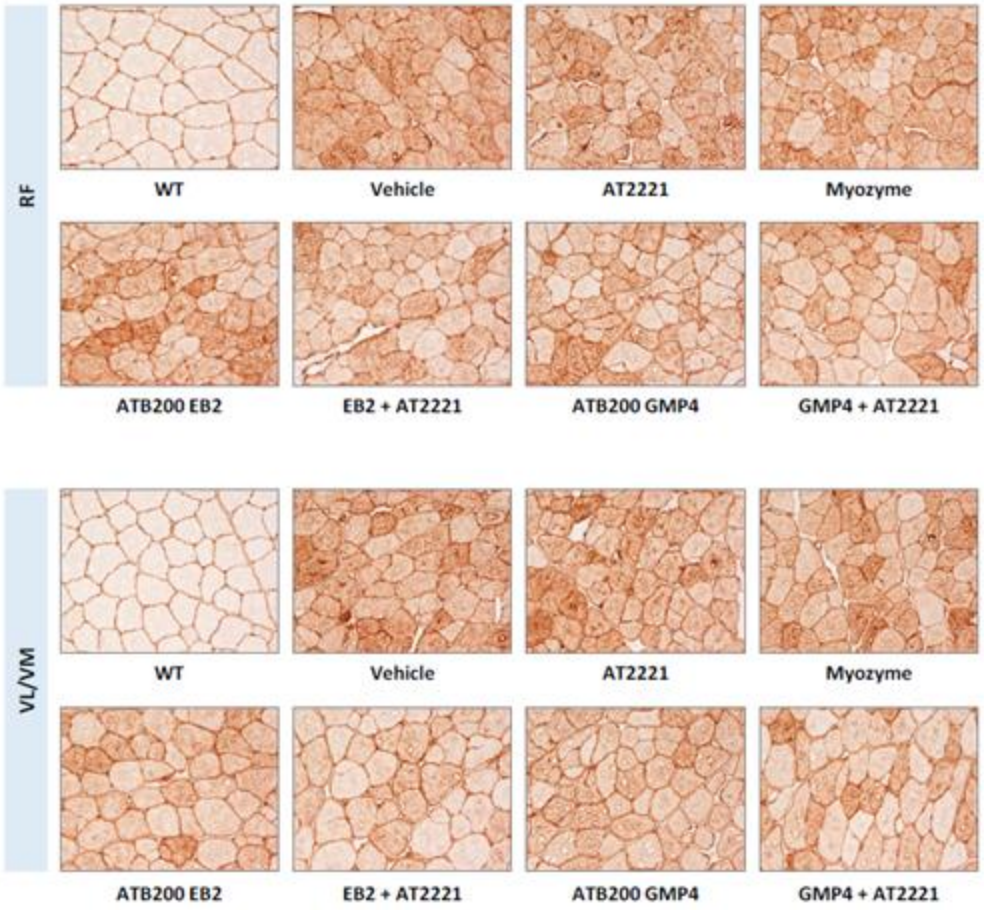
Abbreviations: *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IHC = immunohistochemistry; KO = knock-out; LC3 = microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3; WT = wild type
Paraffin sections (5 µm in thickness) were stained with an anti-LC3 antibody. Not all fibers (asterisks) in a section of quadriceps from untreated *Gaa* KO mice demonstrated LC3 II-positive signals.
Source: Study Report No. RRB200-015, Figure 3

図 2.6.2- 34　　シパグルコシダーゼ アルファ（EB2 及び GMP4）／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋での LC3 II 発現に対する作用（IHC 解析）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; EB = engineering batch; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GMP = Good Manufacturing Practice; IHC = immunohistochemistry; KO = knock-out; LC3 = microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3; Myozyme = alglucosidase alfa; RF = rectus femoris; VL = vastus lateralis; VM = vastus medialis; WT = wild type
Paraffin sections (5 µm in thickness) were stained with an anti-LC3 antibody. One cross section per animal was examined, with the RF (top panels) and VL/VM (bottom panels) muscles analyzed separately. Each image is representative of 7-8 mice per group; samples with missing or unidentifiable RF or VL/VM were excluded from analysis. Asterisks (* and **) indicate that the images are representative of 5 out of 7 samples analyzed. Magnification = 200x.
Source: Study Report No. RRB200-015, Figure 4

図 2.6.2- 35　　シパグルコシダーゼ アルファ（EB2 及び GMP4）／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのジスフェルリン細胞内蓄積に対する作用（IHC 解析）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; EB = engineering batch; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GMP = Good Manufacturing Practice; IHC = immunohistochemistry; KO = knock-out; Myozyme = alglucosidase alfa; RF = rectus femoris; VL = vastus lateralis; VM = vastus medialis; WT = wild type
Cryo sections (10 µm in thickness) were stained with an anti-dysferlin antibody. One cross section per animal was examined with the RF (top panels) and VL/VM (bottom panels) muscles analyzed separately. Each image is representative of 7-8 mice per group; samples with missing or unidentifiable RF or VL/VM were excluded from analysis. Magnification = 200x.
Source: Study Report No. RRB200-015, Figure 5

組織学的検査の結果から、シパグルコシダーゼ アルファは、ポンペ病の 2 つの重要な病理学的特徴であるライソゾーム拡張を抑制し、オートファジー障害を改善する可能性が示された。また、*Gaa* KO マウスにシパグルコシダーゼ アルファを 2 回投与後、膜修復マーカーであるジスフェルリンの細胞内蓄積が減少した。

2.1.2.7　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与による *Gaa* KO マウスの筋機能及び筋病変の改善

報告書番号：RRB200-017、添付資料番号：4.2.1.1.12

シパグルコシダーゼ アルファ（EB2）を単独又はミグルスタットとの併用で隔週 10～12 回投与したときの *Gaa* KO マウスのグリコーゲン減少作用を検討した。

マウスに溶媒、ALGLU（20 mg/kg）又はシパグルコシダーゼ アルファ（20 mg/kg）を隔週 12 回静脈内投与し、一部のシパグルコシダーゼ アルファ投与群には、静脈内投与 30 分前にミグルスタット（10 mg/kg）を経口投与した（表 2.6.2- 14）。アナフィラキシー反応の抑制のため、溶媒投与群を除く全ての群で、シパグルコシダーゼ アルファの初回投与時から DPH（10 mg/kg）を静脈内投与 10 分前に腹腔内投与した。メトトレキサート（MTX）投与群には、シパグルコシダーゼ アルファ初回静脈内投与 15 分、24 及び 48 時間後に MTX（5 mg/kg）を腹腔内投与し、アナフィラキシー反応が更に抑制されるかを検討した。WT マウスを対照群とした。

本試験（362 試験）の目的を以下に示す

- 筋機能をワイヤーハング試験及び握力試験を用いて月 1 回 6 ヵ月間評価する。
- 6 及び 12 回目投与 14 日後、大腿四頭筋、上腕三頭筋、腓腹筋及び心臓でのグリコーゲン量（生化学的解析法、Khanna et al. 2012）及び GAA 活性（酵素活性測定法、Khanna et al. 2012）を測定し、筋機能との相関性を評価する。
- 6 及び 12 回目投与 14 日後、大腿四頭筋及び上腕三頭筋で疾患関連組織マーカー（LAMP1 及び LC3 II）及びジスフェルリンを評価する。*Gaa* KO マウスでは、LAMP1 及び LC3 II の発現レベルの増加（2.1.2.4 項）及びジスフェルリンの細胞内蓄積（2.1.2.6 項）が認められている。

表 2.6.2- 14　362 試験の群構成

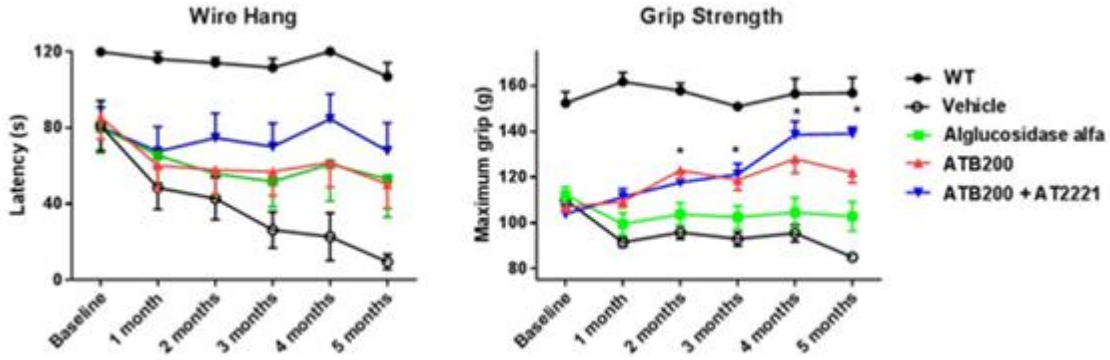
Group	No. of Animals and Sex	Genotype	Treatment (mg/kg, IV)	Miglustat (mg/kg, PO)	MTX (mg/kg, IP)
1	15M	*Gaa* KO (129/SVE)	vehicle	N/A	N/A
2	15M	*Gaa* KO (129/SVE)	alglucosidase alfa, 20	N/A	N/A
3	15M	*Gaa* KO (129/SVE)	cipaglucosidase alfa, 20	N/A	N/A
4	15M	*Gaa* KO (129/SVE)	cipaglucosidase alfa, 20	10	N/A
5	15M	*Gaa* KO (129/SVE)	cipaglucosidase alfa, 20	10	5
6	15M	WT (129/SVE)	N/A	N/A	N/A

Abbreviations: DHP = diphenhydramine hydrochloride; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IP = intraperitoneal; IV = intravenous; KO = knock-out; M = male; MTX = methotrexate; N/A = not applicable; PO =oral; WT = wild type
PO administration was given 30 minutes prior to cipaglucosidase alfa IV administration. DHP (10 mg/kg) was administered intraperitoneally to all groups except vehicle (to attenuate anaphylaxis), starting with the first administration, and was given 10 minutes prior to IV of cipaglucosidase alfa for each subsequent administration. MTX was given IP 15 min, 24 hours, and 48 hours post first IV cipaglucosidase alfa. The volume of administration was 5 mL/kg for IV dosing and 10 mL/kg for oral or IP dosing. Vehicle for IV dosing was 25 mmol/L sodium phosphate buffer containing 20 mg/mL mannitol, 0.5 mg/mL polysorbate 80, and 2.92 mg/mL sodium chloride. Final pH 6.0.

ALGLU 及びシパグルコシダーゼ アルファ投与群では、2 回目投与直後に典型的なアナフィラキシー反応が認められた。*Gaa* KO マウス 75 匹中 9 匹が死亡した。ほとんどの動物は投与数日後に死亡し、いずれも投薬に関連するものではないと考えられた。MTX 投与群（Group 5）の有効性（筋機能、グリコーゲン減少及び組織学的変化に対する作用）は DHP 投与群（Group 4）よりも減弱し、生存や免疫反応抑制に対する作用は DHP 投与群（Group 4）を超えなかった。

投与開始 1 週間前、以降は 2 回投与ごとに 1 ヵ月に 1 回、ワイヤーハング及び握力試験により筋機能を評価した。ワイヤーハング試験と握力試験の間隔を約 24 時間空けて、動物を休ませた。これらは疾患の自然経過及び治療効果を判断するのに適切な試験であり（Aartsma-Rus and van Putten 2014; Zhu et al. 2009）、独立した試験として盲検下で実施した。その結果、*Gaa* KO マウスの溶媒投与群では WT マウスと比較して、握力及び特にワイヤーハング試験の両方で成績が悪く、加齢に伴い悪化した。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群は、握力試験で ALGLU 投与群よりも統計学的に有意な改善を示し、ワイヤーハング試験では ALGLU 投与群と比較して改善傾向が認められた（図 2.6.2- 36）。ミグルスタット併用により、シパグルコシダーゼ アルファ単独投与と比較してワイヤーハング試験及び握力試験（後半の時点）で改善傾向が認められたが、いずれも統計学的に有意な作用ではなかった。握力を有意に改善し、月 1 回のワイヤーハング試験でいずれも改善傾向を示したことから、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用による筋機能への長期的な効果は、シパグルコシダーゼ アルファ単独及び ALGLU よりも優れていることが示唆される。

図 2.6.2- 36　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウスの筋機能改善

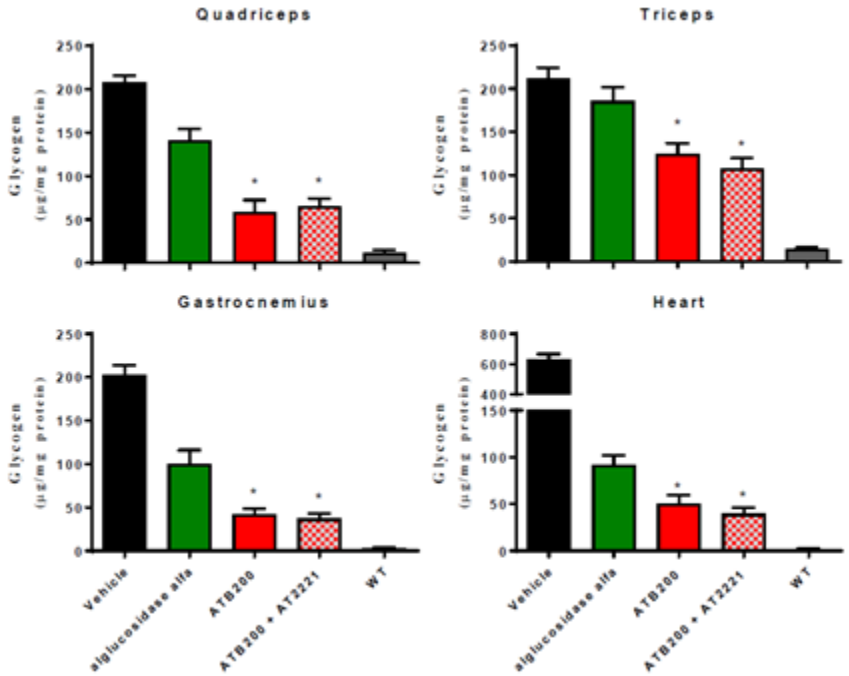


Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; KO = knock-out; SEM = standard error of the mean; WT = wild type
The wire-hang assay was conducted once on 2-consecutive days, with the data shown being the average of 2 assessments, while the grip-strength assay was repeated thrice on the same day, with the data shown being the average of those three assessments. Data from the 6-month time point were excluded in this analysis due to a possible systematic error, especially in grip-strength assay. Each point represents the mean ± SEM of 15 animals/group up to 3 months, and 8 animals/group for the remaining 3 months (7 animals sacrificed after 3 months). Statistical significance was determined using the 2-sided t-test, where * represents $p < 0.05$ versus alglucosidase alfa.
Source: Study Report No. RRB200-017, Figure 1

3 ヵ月隔週（6 回）投与後、シパグルコシダーゼ アルファ投与群の大腿四頭筋でのグリコーゲン量の溶媒対照群に対する減少率は 72%であったのに対して、ALGLU 投与群では 32.3%であっ

た（図 2.6.2- 37）。また、上腕三頭筋及び腓腹筋でのグリコーゲン減少率は、シパグルコシダーゼ アルファ投与群でそれぞれ 40.0%及び 79.3%であったのに対して、ALGLU 投与群ではそれぞれ 12.4%及び 57.6%であった。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群では、概してシパグルコシダーゼ アルファ単独投与群と同程度のグリコーゲン減少作用を示し、上腕三頭筋でのグリコーゲン減少作用は若干増強される傾向がみられた（それぞれ 49.1%及び 41.0%）。

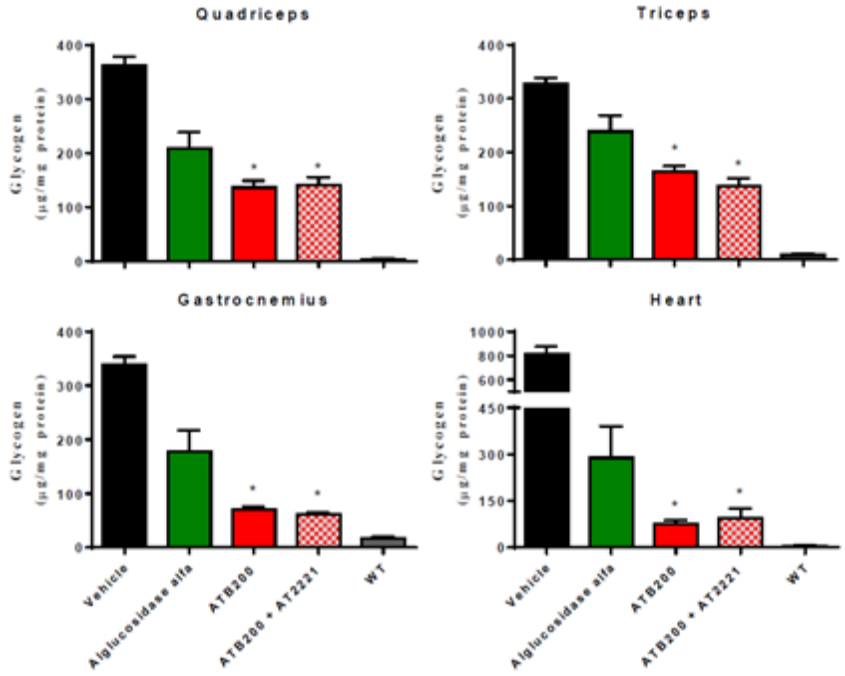
図 2.6.2- 37　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 6 回）による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン減少作用



Abbreviations: ANOVA = analysis of variance; AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; KO = knock-out; SEM = standard error of the mean; WT = wild type
Glycogen levels were measured 14 days after the 6th administration. About half of the animals in each group were sacrificed with tissues collected. Each column represents mean ± SEM of 6-7 animals. Statistical significance was determined using Dunnett's multiple comparison following one-way ANOVA, where * represents $p < 0.05$ versus alglucosidase alfa.
Source: Study Report No. RRB200-017, Figure 2

6 ヵ月隔週（12 回）投与後、シパグルコシダーゼ アルファ単独投与群でのグリコーゲン減少率は、大腿四頭筋で 62.3%、上腕三頭筋で 49.8%、腓腹筋で 79.2%であり、いずれも ALGLU 投与群（ぞれぞれ 42.1%、27.2%及び 47.3%）よりも有意な作用を示した（図 2.6.2- 38）。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群の有効性は、3 ヵ月投与と同様に、シパグルコシダーゼ アルファ単独投与時と同程度であった。

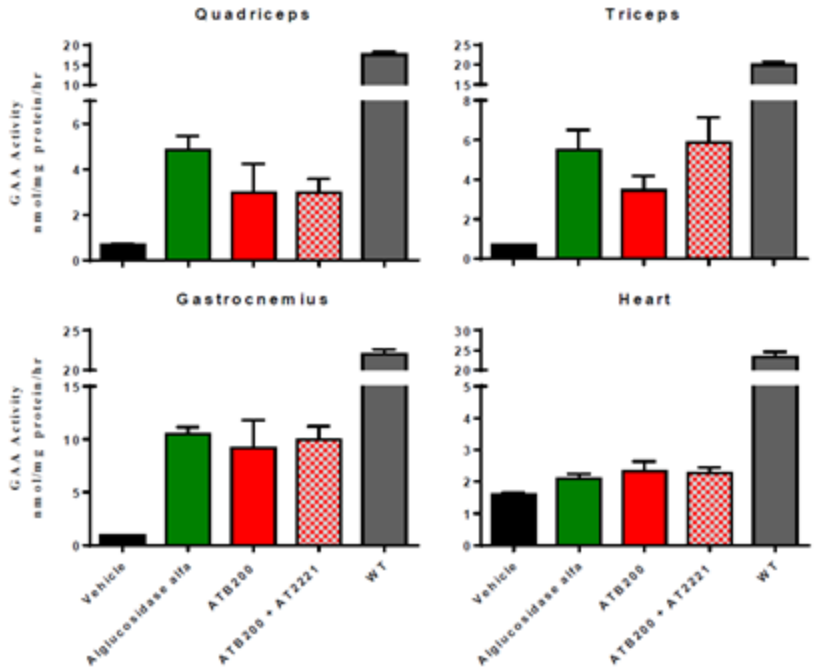
図 2.6.2- 38　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 12 回）による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン減少作用



Abbreviations: ANOVA = analysis of variance; AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; KO = knock-out; SEM = standard error of the mean; WT = wild type
Glycogen levels were measured 14 days after the 12th administration from the remaining animals in each group. Each column represents mean ± SEM of 5-8 animals. Statistical significance was determined using Dunnett's multiple comparison following one-way ANOVA, where * represents $p < 0.05$ versus alglucosidase alfa.
Source: Study Report No. RRB200-017, Figure 4

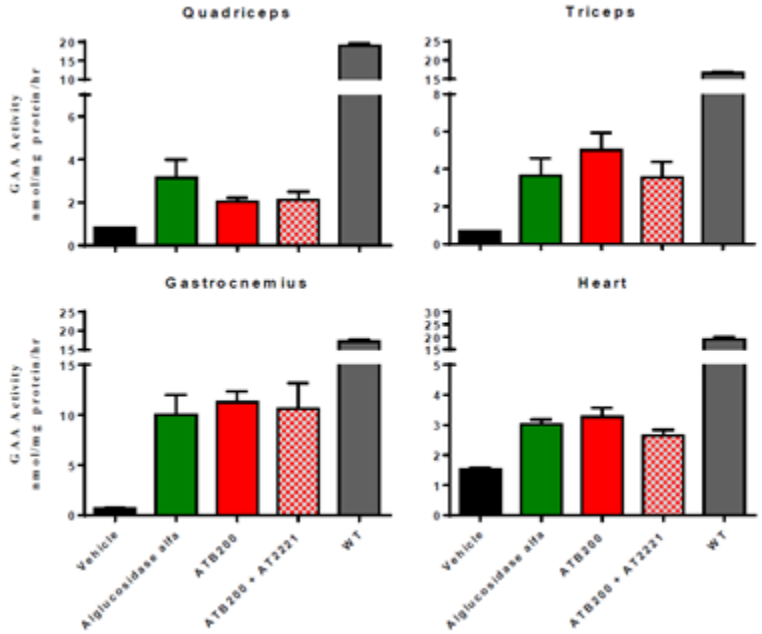
これらの組織での GAA 活性も評価した。3 ヵ月間投与後、大腿四頭筋及び上腕三頭筋での GAA 活性は、ALGLU 投与群でシパグルコシダーゼ アルファ単独投与群よりも高く、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群でシパグルコシダーゼ アルファ単独投与群よりもわずかに高かった（図 2.6.2- 39）。この GAA 活性上昇にも関わらず、ALGLU 投与群のグリコーゲン減少作用は、シパグルコシダーゼ アルファ単独又はミグルスタット併用下投与群と比較して増強されなかった（図 2.6.2- 37）。このことから、ライソゾーム標的指向性の改善によりグリコーゲン減少作用が増強されたシパグルコシダーゼ アルファとは異なり、ALGLU 投与群での GAA 活性の上昇は、おそらくライソゾーム以外のコンパートメントでの変化によるものであると考えられた。3 ヵ月間投与後の腓腹筋及び心臓、並びに 6 ヵ月間投与後の全ての組織での GAA 活性は、ALGLU、シパグルコシダーゼ アルファ単独及びシパグルコシダーゼアルファ／ミグルスタット併用投与群でほぼ同程度であった（図 2.6.2- 39 及び図 2.6.2- 40）。

図 2.6.2- 39　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 6 回）による *Gaa* KO マウス組織中 GAA 活性



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GAA = acid α-glucosidase; KO = knock-out; SEM = standard error of the mean; WT = wild type
GAA activities were measured 14 days after the 6th administration. About half of the animals in each group were sacrificed with tissues collected. Each column represents mean ± SEM of 6-7 animals.
Source: Study Report No. RRB200-017, Figure 3

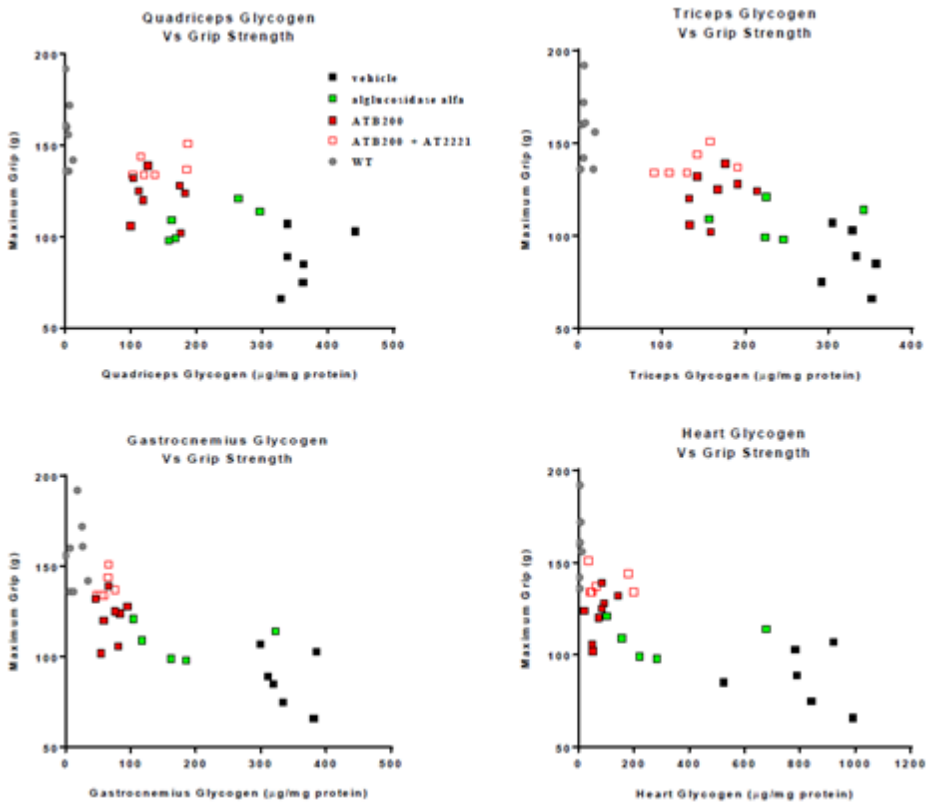
図 2.6.2- 40　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与（隔週 12 回）による *Gaa* KO マウス組織中 GAA 活性



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GAA = acid α-glucosidase; KO = knock-out; SEM = standard error of the mean; WT = wild type
GAA activities were measured 14 days after the 12th administration from remaining animals in each group. Each column represents mean ± SEM of 6-7 animals.
Source: Study Report No. RRB200-017, Figure 5

各組織中グリコーゲン量及び筋機能（特に前肢握力）の相関解析により、上腕三頭筋及び検討したその他の筋組織のグリコーゲン量と握力改善作用との間に良好な相関性が認められた。これらの所見から、骨格筋での顕著なグリコーゲン減少作用が、筋力の改善及び筋機能障害の回復につながる可能性が示唆される。

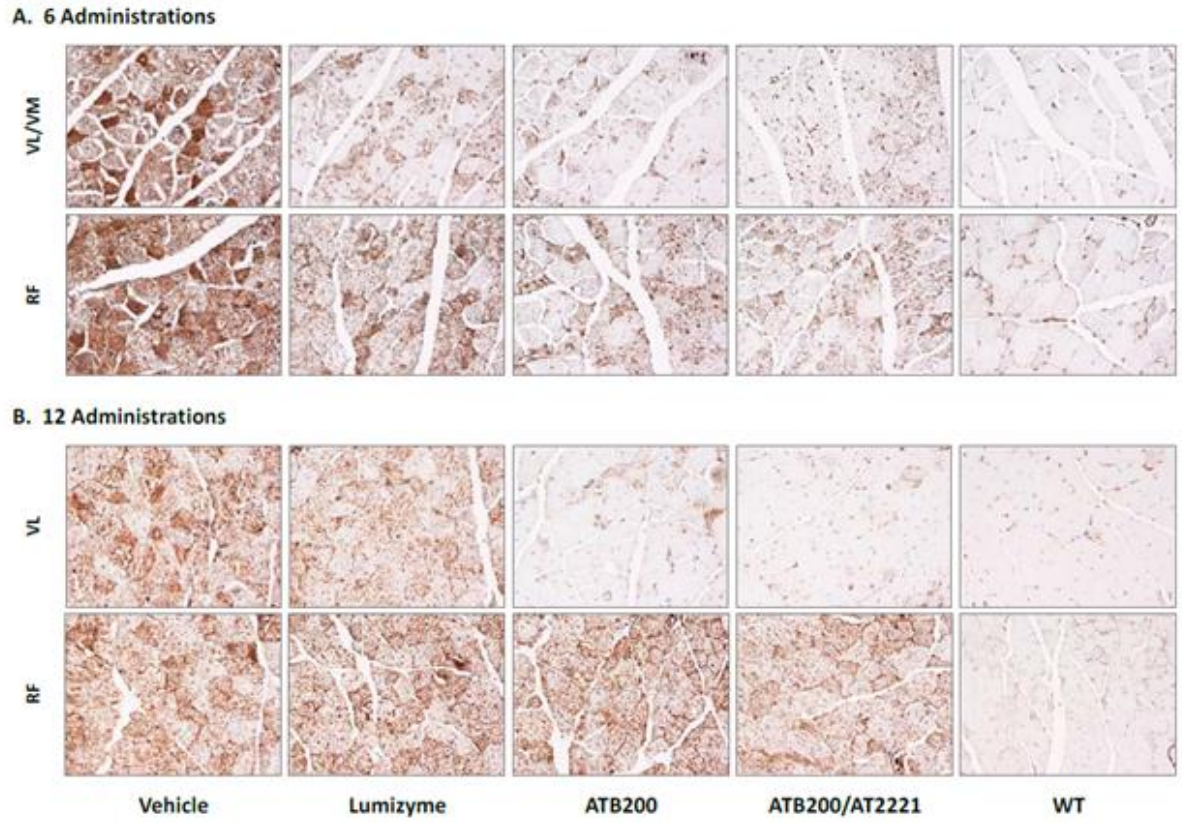
図 2.6.2- 41　　*Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン量と握力改善の相関



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; WT = wild type
Grip strength outcomes at 5 months are compared to glycogen levels in various tissues at the 6-month time point (n = 5-8). For each animal, the glycogen level is plotted against grip strength. With the pooled data from all groups, the Pearson correlation coefficient was calculated for the glycogen levels in each of the tissues versus grip strength indicating significant correlation ($p < 0.05$).
Source: Study Report No. RRB200-017, Figure 6

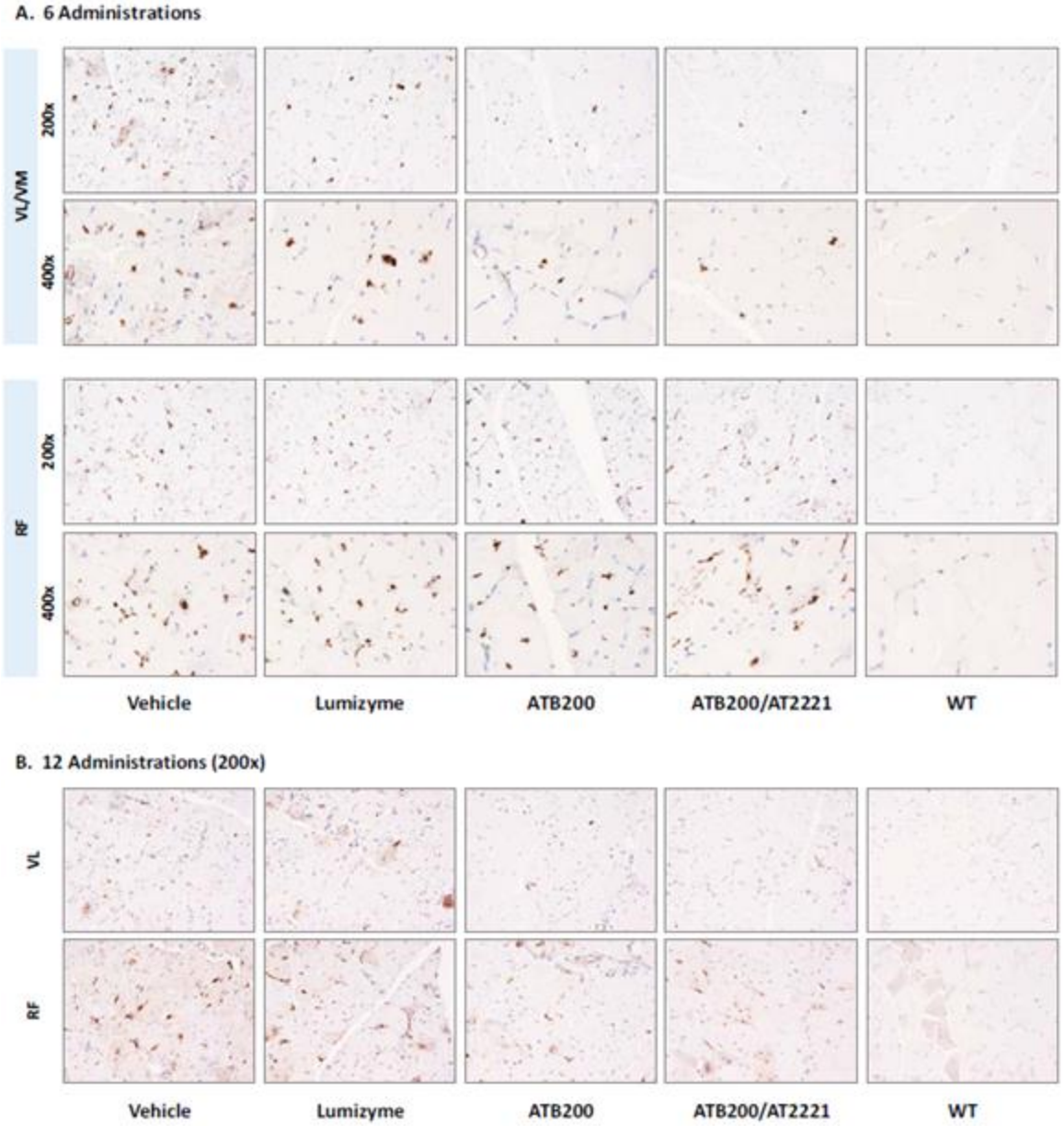
隔週 6 又は 12 回投与後、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群での大腿四頭筋の LAMP1 及び LC3 II 発現は、ALGLU 投与群と比較して著しく減少した（図 2.6.2- 42 及び図 2.6.2- 43）。ジスフェルリンの細胞内蓄積に関しても同様の結果が得られた（図 2.6.2- 44）。これまでの結果（2.1.2.6 項）と同様に、シパグルコシダーゼ アルファ単独又はミグルスタット併用投与群での作用は、RF 切片よりも VL/VM 切片で顕著であった。

図 2.6.2- 42　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用（隔週 6 又は 12 回）投与による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋での LAMP1 発現に対する作用（IHC 解析）



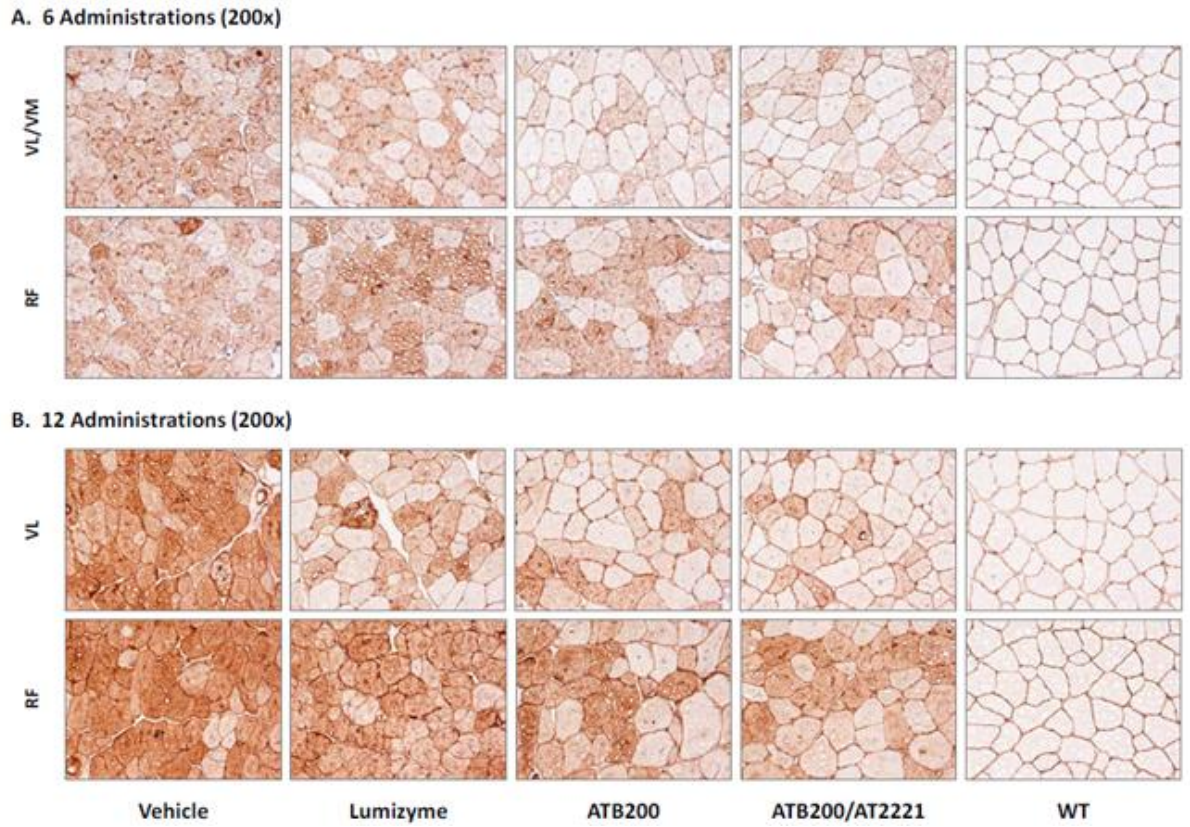
Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IHC = immunohistochemistry; KO = knock-out; LAMP1 = lysosome-associated membrane protein 1; Lumizyme = alglucosidase alfa; RF = rectus femoris; VL = vastus lateralis; VM = vastus medialis; WT = wild type
Paraffin sections (5 µm in thickness) were stained with an anti-LAMP1 antibody. One cross section per animal was examined. Each image is representative of 5-8 mice per group. Magnification = 200x.
Source: Study Report No. RRB200-017, Figure 7

図 2.6.2- 43　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用（隔週 6 又は 12 回）投与による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋での LC3 II 発現に対する作用（IHC 解析）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IHC = immunohistochemistry; KO = knock-out; LC3 = microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3; Lumizyme = alglucosidase alfa; RF = rectus femoris; VL = vastus lateralis; VM = vastus medialis; WT = wild type
Paraffin sections (5 µm in thickness) were stained with an anti-LC3 antibody. One cross section per animal was examined. Each image is representative of 5-8 mice per group.
Source: Study Report No. RRB200-017, Figure 8

図 2.6.2- 44　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用（隔週 6 又は 12 回）投与による *Gaa* KO マウス大腿四頭筋でのジスフェルリン細胞内蓄積に対する作用（IHC 解析）

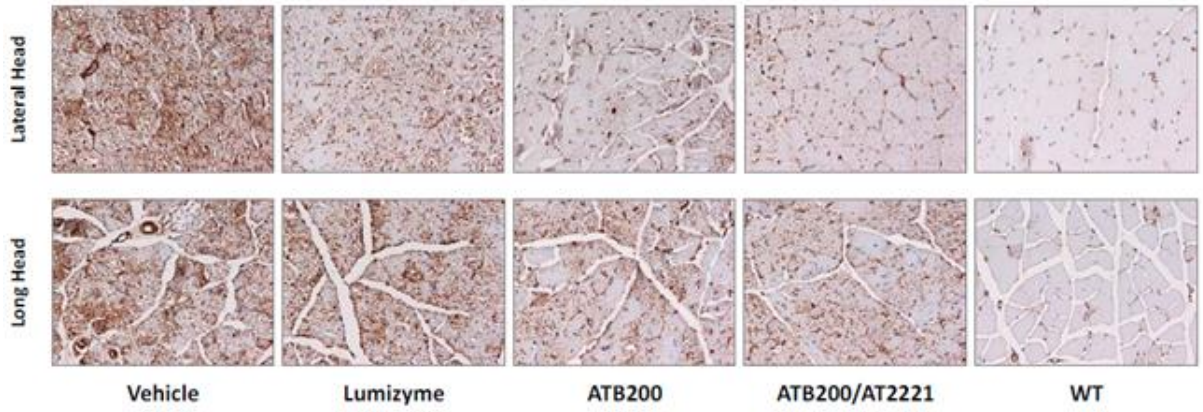


Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IHC = immunohistochemistry; KO = knock-out; Lumizyme = alglucosidase alfa; RF = rectus femoris; VL = vastus lateralis; VM = vastus medialis; WT = wild type
Cryo sections (8 µm in thickness) were stained with an anti-dysferlin antibody. One cross section per animal was examined. Each image is representative of 5-8 mice per group.
Source: Study Report No. RRB200-017, Figure 9

大腿四頭筋での結果と同様に、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群の上腕三頭筋での LAMP1 及び LC3 II 発現レベル並びにジスフェルリン細胞内蓄積は、ALGLU 投与群よりも顕著に低下した（図 2.6.2- 45、図 2.6.2- 46 及び図 2.6.2- 47）。上腕三頭筋では、rhGAA 投与に対する反応性に各筋線維間で差がみられ、長頭よりも外側頭で効果が顕著であった。ジスフェルリンの IHC 解析では、上腕三頭筋の長頭内でも部位の違いが認められた（図 2.6.2- 47）。長頭全体では、投薬による明らかな影響は認められなかったが、末梢（表層）領域ではジスフェルリンの細胞内蓄積が著しく減少し、ALGLU 投与群と比較して、シパグルコシダーゼ アルファ単独又はミグルスタット併用投与群では、広範で一貫した作用が認められた。

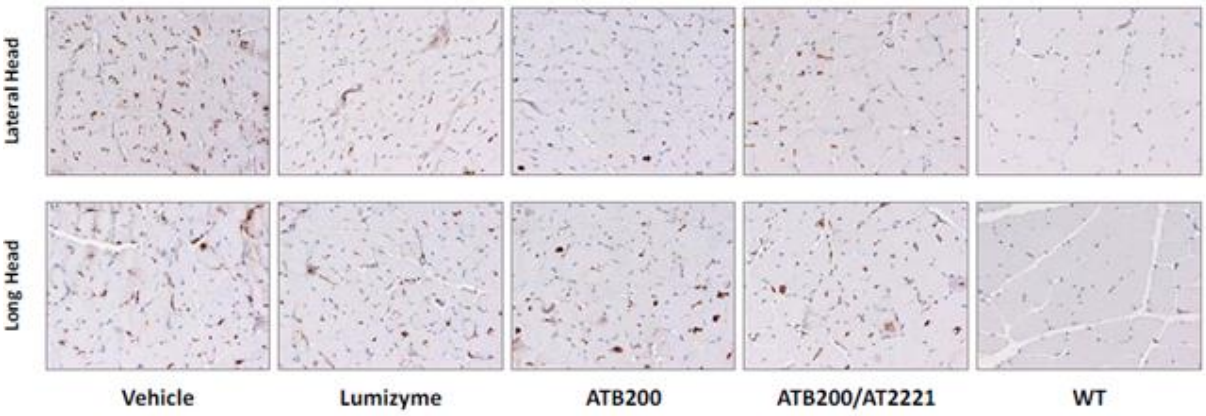
以上の結果から、長期のシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与により、シパグルコシダーゼ アルファ単独又は ALGLU と比較して、グリコーゲン蓄積、ライソゾーム拡張、オートファジー障害及び細胞膜損傷が回復し、最終的に筋機能が改善することが示された。

図 2.6.2- 45　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用（隔週 12 回）投与による *Gaa* KO マウス上腕三頭筋での LAMP1 発現に対する作用（IHC 解析）



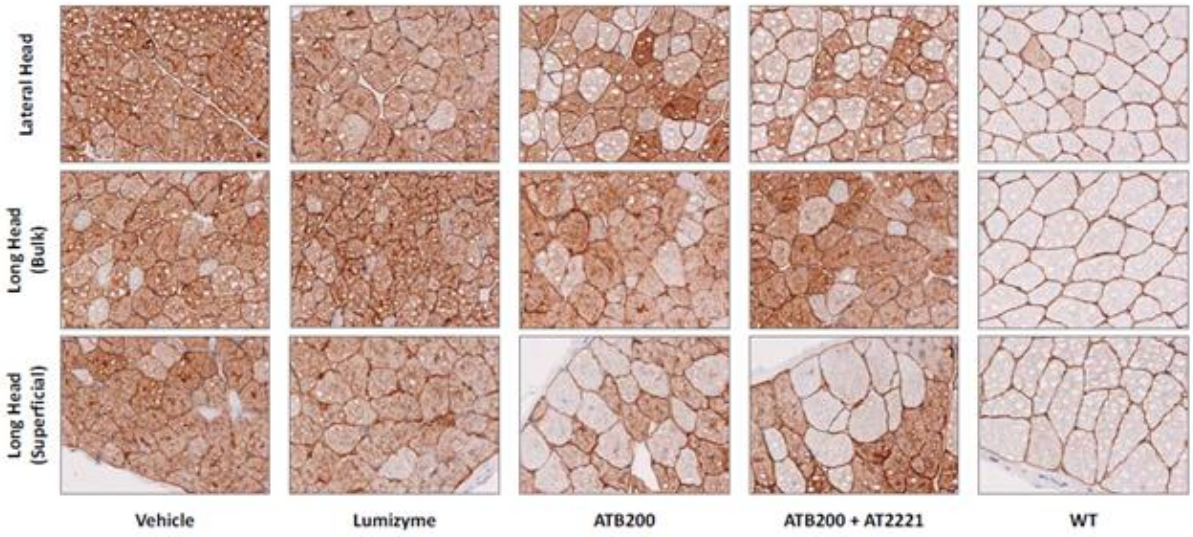
Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IHC = immunohistochemistry; KO = knock-out; LAMP1 = lysosome-associated membrane protein 1; Lumizyme = alglucosidase alfa; WT = wild type
Paraffin sections (5 μm in thickness) were stained with an anti-LAMP1 antibody. One cross section per animal was examined. Each image is representative of 5-8 mice per group. Magnification = 200x.
Source: Study Report No. RRB200-017, Figure 10

図 2.6.2- 46　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用（隔週 12 回）投与による *Gaa* KO マウス上腕三頭筋での LC3 II 発現に対する作用（IHC 解析）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IHC = immunohistochemistry; KO = knock-out; LC3 = microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3; Lumizyme = alglucosidase alfa; WT = wild type
Paraffin sections (5 μm in thickness) were stained with an anti-LC3 antibody. One cross section per animal was examined. Each image is representative of 5-8 mice per group. Magnification = 200x.
Source: Study Report No. RRB200-017, Figure 11

図 2.6.2- 47　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用（隔週 12 回）投与による *Gaa* KO マウス上腕三頭筋でのジスフェルリン細胞内蓄積に対する作用（IHC 解析）



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IHC = immunohistochemistry; KO = knock-out; Lumizyme = alglucosidase alfa; WT = wild type
Cryo sections (8 µm in thickness) were stained with an anti-dysferlin antibody. One cross section per animal was examined. Each image is representative of 5-8 mice per group. Magnification = 200x.
Source: Study Report No. RRB200-017, Figure 12

2.1.2.8　臨床使用条件下（4 時間室温で放置）でのシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与によるグリコーゲン減少作用

報告書番号：RRB200-056、添付資料番号：4.2.1.1.13

臨床使用を想定した rhGAA 4 時間静脈内投与の模倣投与条件として、シパグルコシダーゼ アルファ投与液を 4 時間室温に放置後、シパグルコシダーゼ アルファを単独又はミグルスタット（経口投与）との併用で *Gaa* KO マウスに投与したときのシパグルコシダーゼ アルファの薬物動態（PK）プロファイル（Module 2.6.4, Section 3.2.4）及び有効性を評価した。

Gaa KO マウスに溶媒、シパグルコシダーゼ アルファ（20 mg/kg）又は ALGLU（20 mg/kg）を隔週 2 回静脈内投与した（表 2.6.2- 15）。新しいバイアルから用時調製したシパグルコシダーゼ アルファ及び ALGLU 投与液を室温で 4 時間放置後、マウスに投与した。シパグルコシダーゼ アルファ投与群 1 群には、静脈内投与 30 分前にミグルスタットを経口投与した。いずれの群にも DPH は投与しなかった。2 回目（最終）投与 14 日後にマウスを安楽死させ、血漿及び組織（心臓、横隔膜、舌、肝臓、大腿四頭筋、上腕三頭筋及び腓腹筋）を採取し、アミログルコシダーゼ法によりグリコーゲン量を測定した。

表 2.6.2- 15　　408 試験の群構成

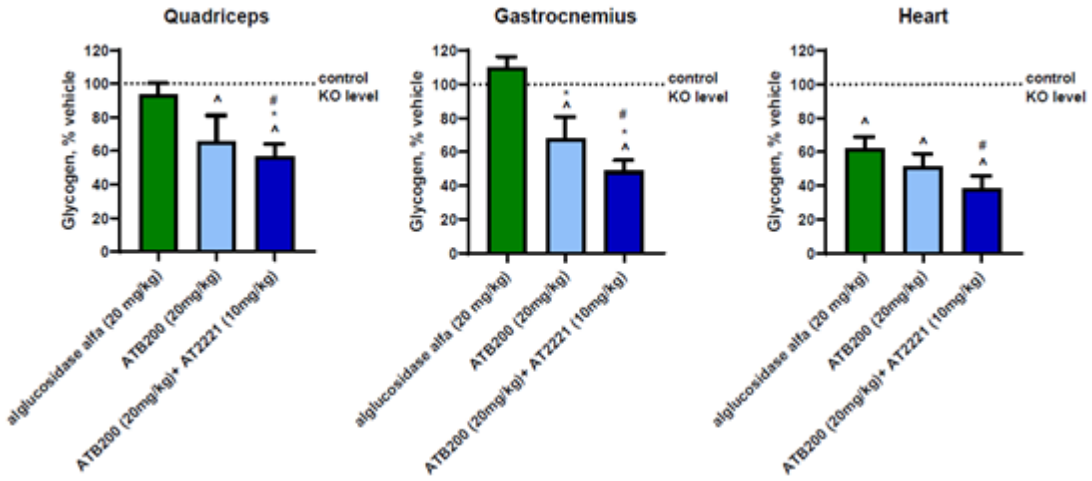
Group	No. of Animals and Sex	Treatment (mg/kg, IV)	Miglustat (mg/kg, PO)
1	8M	vehicle	N/A
2	8M	alglucosidase alfa 20	N/A
3	8M	cipaglucosidase alfa 20	N/A
4	8M	cipaglucosidase alfa 20	10

Abbreviations: IV = intravenous, M = male; N/A = not applicable, PO = oral
For each administration, enzyme dosing solutions were prepared from freshly reconstituted vials of drug product and incubated for 4 hours at room temperature before administration. Miglustat was administered orally, 30 minutes prior to IV of cipaglucosidase alfa

本試験（408 試験）では、投与後 1 時間以内に 4 匹（ALGLU 投与群 1 匹、シパグルコシダーゼ アルファ単独投与群 3 匹）が死亡し、ほとんどはアナフィラキシー反応によるものであった。全ての死亡は投与後 1 時間以内に発生した。

これまでの試験結果と同様に、シパグルコシダーゼ アルファ投与群は ALGLU 投与群と比較して有意なグリコーゲン減少作用を示した（図 2.6.2- 48）。大腿四頭筋、腓腹筋及び心臓を含む疾患関連組織で、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群は、シパグルコシダーゼ アルファ単独投与群と比較して、一貫して有意なグリコーゲン減少作用を示した。シパグルコシダーゼ アルファ単独では 4 時間静脈内投与で in vivo 活性が低下する可能性があるが（2.1.1.2 項）、本試験結果から、ミグルスタットの併用によりその有効性が維持されることが示唆された。

図 2.6.2- 48　　室温で 4 時間放置後のシパグルコシダーゼ アルファを単独又はミグルスタットとの併用投与（隔週 2 回）による *Gaa* KO マウス組織中グリコーゲン減少作用



Abbreviations: ANOVA = analysis of variance; AT2221 = miglustat, ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; IV =intravenous, KO = knock-out; SD = standard deviation
The "percentage of vehicle" was calculated for each individual animal using the mean value of glycogen levels in the vehicle group. Data represent mean ± SD, n = 5-8 animals/group. Multiple comparison (Tukey's method) and trend analysis were conducted following one-way ANOVA using Prism GraphPad version 8.0: ^ represents $p < 0.05$ compared to vehicle levels; * represents $p < 0.05$ compared to alglucosidase alfa group; and, # represents $p < 0.05$ for trend analysis from left to right for all columns, suggesting a trend of further glycogen reduction with cipaglucosidase alfa/miglustat over cipaglucosidase alfa alone.
Source: Study Report No. RRB200-056, Figure 2

3　副次的薬理試験

ミグルスタットを用いた新たな副次的薬理試験は、単独又はシパグルコシダーゼ アルファとの併用投与のいずれでも実施していない。

4　安全性薬理試験

4.1　ミグルスタット

ミグルスタットの潜在的催不整脈作用を評価するため、GLP 適用 hERG 試験を実施した。

4.1.1　In vitro 試験

4.1.1.1　心血管系

報告書番号：201027.BIJ、添付資料番号：4.2.1.3.1

hERG を発現させたヒト胎児腎（HEK）293 細胞を用いて、カリウムチャネル電流に対するミグルスタット（100 及び 1000 µmol/L）の作用をホールセルパッチクランプ法（33～35°C）で評価した。

ミグルスタットの hERG カリウムチャネル電流阻害率（平均値 ± 標準誤差、n=3）は、100 及び 1000 µmol/L でそれぞれ-3.1 ± 1.1%及び-3.4 ± 2.2%であり（溶媒対照は 1.1 ± 1.2%）、いずれの濃度でも溶媒と比較して明らかな阻害作用を示さなかった。50%阻害濃度（IC_{50}）は算出できず、1000 µmol/L を超えると推察された。陽性対照のテルフェナジンの阻害率（平均値 ± 標準偏差、n=2）は、60 nmol/L で 88.9 ± 2.4%であり、試験系の検出感度が確認された。

4.2　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用

4.2.1　In vivo 試験

4.2.1.1　中枢神経系、心血管系及び呼吸系

報告書番号：[redacted].423.10、添付資料番号：4.2.3.2.1

シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与による安全性薬理評価は、カニクイザルを用いた GLP 適用反復投与毒性試験の一部として実施した。シパグルコシダーゼ アルファ単独、ミグルスタット単独又はシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用によりカニクイザルに 13 週間隔週（7 回）投与した。シパグルコシダーゼ アルファは 2 時間かけて静脈内投与し、ミグルスタットは経鼻胃管投与した。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群にはそれぞれ 50/25 mg/kg 又は 100/175 mg/kg のシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタットを投与した。一般状態観察（1 日 2 回、投与日は更にシパグルコシダーゼ アルファ投与 1 及び 3 時間後）、詳細な観察（週 1 回）及び理学的検査（馴化期間中に 1 回並びに Week 4 及び 13 に各 1 回）において中枢神経系への作用を示唆する所見は認められなかった。試験終了時の剖検では、いずれの動物の組織にも所見は認められなかった。さらに、脳及び脊髄を含む組織の病理組織学的検査においても、投薬に関連した所見は認められなかった。観察された所見はいずれも対照群及び投薬群で同程度の発生頻度及び重症度であったか、1 匹の動物でのみ観察されたか、用量依存性を伴わなかった又はカニクイザルで一般的に認められる所見であった。また、心電図パラメータ（Week 3 及び 11）及び呼吸数（Week 4 及び 13）にも投薬の影響は観察されなかった。

5　薬力学的薬物相互作用試験

ミグルスタットの薬力学的薬物相互作用試験は、単独又はシパグルコシダーゼ アルファとの併用投与のいずれでも実施していない。

6　考察及び結論

ALGLU は一定の効果をもたらしているが、その治療効果は不十分であるとされている（Toscano and Schoser 2013; van der Ploeg et al. 2017; Wyatt et al. 2012）。その原因の一つとして、ALGLU は疾患関連筋組織への標的指向性に乏しいことが考えられる。シパグルコシダーゼ アルファは、ポンペ病治療を目的とする次世代型酵素製剤として開発された新規 rhGAA であり、非臨床開発プログラムでは、標的指向性の改善を検討した。

外因性 GAA の細胞内取込み及びライソゾームへの送達は、CI-MPR への結合に依存しており（Chavez et al. 2007; Zhou et al. 2011）、この結合には GAA 上の M6P 含有 *N*-結合型糖鎖が関与する（Chavez et al. 2007; McVie-Wylie et al. 2008; Zhou et al. 2011）。ALGLU よりも筋肉組織への取込みを改善するため、M6P、特に bis-M6P 含量の高い rhGAA を産生する新規の細胞株及び製造工程を用いて、シパグルコシダーゼ アルファを製造した（Tong and Kornfeld 1989）。この糖鎖構造の最適化により、シパグルコシダーゼ アルファは ALGLU と比較して標的 CI-MPR に対して高い結合親和性を示し、ポンペ病患者由来細胞内への取込みが改善された

rhGAA を含むライソゾーム酵素は、ライソゾーム内の酸性 pH で最も安定である。rhGAA は静脈内投与後に血液の中性 pH に曝されると、ライソゾーム送達前に酵素活性が著しく失われ（血中で 4 時間後には約 70%の活性が失われる）、ポンペ病患者で十分な治療効果が得られない可能性がある（Khanna et al. 2012）。そのため、シパグルコシダーゼ アルファに低分子型酵素安定化剤ミグルスタットを併用し、各種非臨床試験を実施した。

ミグルスタットが中性 pH（緩衝液中）でシパグルコシダーゼ アルファを安定化することが in vitro 試験で示され、シパグルコシダーゼ アルファがライソゾーム内（酸性 pH）へ送達される前に、ミグルスタットが生理的 pH 下での変性や不可逆的な不活性化を最小限に抑えることが示唆された（2.1.1.1 項）。ヒト血中で 37℃、4 時間インキュベーション後、シパグルコシダーゼ アルファの活性は約 70%低下したが、臨床で到達可能な濃度であるミグルスタット（17 µmol/L）の併用により、活性は約 30%低下しただけであった（2.1.1.2 項）。以上のデータから、シパグルコシダーゼ アルファ単独では 4 時間静脈内投与で酵素活性が著しく低下し、in vivo での有効性が得られない可能性があること、またミグルスタットの併用によりシパグルコシダーゼ アルファが安定化し、生理的 pH での酵素活性低下が抑制されるため、シパグルコシダーゼ アルファの治療効果が最大限に高まることが示唆された。

ポンペ病の表現型を再現する *Gaa* KO マウスモデル（Raben et al. 1998）を用いて、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与による in vivo 有効性を評価した。その結果、シパグルコシダーゼ アルファ（5、10 及び 20 mg/kg）の隔週静脈内投与により、全ての疾患関連組織で酵素活性が用量依存的に増加し、筋肉組織中のグリコーゲン量が減少した（2.1.2.1 及び 2.1.2.2 項）。シパグルコシダーゼ アルファ 5 mg/kg の有効性は ALGLU 20 mg/kg と同程度であり、シパグルコシダーゼ アルファ 10 及び 20 mg/kg の効力は ALGLU 20 mg/kg よりも有意に高かったことから、シパグルコシダーゼ アルファは効力及び有効性が改善されていることが示された。なお、*Gaa* KO マウスにシパグルコシダーゼ アルファ 10 mg/kg を投与したときの血漿中 GAA 活性［血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）］は、ALGLU 20 mg/kg 投与時の 1/6 であり（Module 2.6.5, Section 3B.2）、シパグルコシダーゼ アルファの有効性が改善されたことが裏付け

られる。以上のデータから、M6P、特に bis-M6P 含量が高いシパグルコシダーゼ アルファは、in vivo でのライソゾーム標的指向性が改善され、その結果、グリコーゲン減少作用が増強されていることが示唆された。

各用量のミグルスタット併用によりシパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg のグリコーゲン減少作用が増強された（2.1.2.2 項）。併用による増強作用は、シパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg 及びミグルスタット 10 mg/kg の併用投与で最も顕著であり、シパグルコシダーゼ アルファ単独又は ALGLU のグリコーゲン減少作用よりも優れていた（2.1.2.1、2.1.2.2 及び 2.1.2.4 項）。ALGLU で同程度のグリコーゲン減少作用を得るには、より高用量（100 mg/kg）が必要であると報告されている（Hawes et al. 2007）。用量設定試験の結果から、ミグルスタットは 10 mg/kg でシパグルコシダーゼ アルファに対する結合及び安定化作用が最適になることが示唆された。高用量（30 mg/kg）で更なる増強作用は得られず、低用量（1 及び 3 mg/kg）よりも効果が低い場合もあったことから、若干の酵素阻害作用を示す可能性が示された。

以上の結果から、ミグルスタット 10 mg/kg の併用によりシパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg の有効性が増強されることが示された。この併用による増強作用は、臨床使用を想定した rhGAA 4 時間静脈内投与の模倣投与条件（シパグルコシダーゼ アルファ投与液を 4 時間室温に放置後、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与）でも認められた（2.1.2.8 項）。

シパグルコシダーゼ アルファを単独又はミグルスタット併用で *Gaa* KO マウスに投与したとき、ALGLU に比べて骨格筋ライソゾーム中の成熟型 GAA（76 kDa）が増加し（2.1.2.3 項）、シパグルコシダーゼ アルファの骨格筋ライソゾームに対する標的指向性の改善を示す初めての直接的エビデンスが得られた。シパグルコシダーゼ アルファは、ALGLU に比べて M6P 含量が高く、CI-MPR に対して高い結合親和性を示すため、ライソゾーム標的指向性が改善されたと考えられる。標的指向性の改善により、筋肉組織でのグリコーゲン減少作用が大幅に増強され、筋病変が改善される。

実際に、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与は、ポンペ病の 2 つの重要な病理学的特徴であるライソゾーム拡張を抑制し、オートファジー障害を改善する可能性が示された。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与により、ライソゾーム関連マーカーである LAMP1 の発現レベル及び発現パターンが正常化し（2.1.2.4、2.1.2.5、2.1.2.6、2.1.2.7 項）、グリコーゲン減少作用と一致した結果が得られた。また、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与により、オートファジー関連マーカーである LC3 II 及び p62 が著しく減少したことから（2.1.2.4、2.1.2.5、2.1.2.6、2.1.2.7 項）、ポンペ病患者でのオートファジー障害を回復させることができるという最初のエビデンスが得られた（Xu et al. 2019）。現時点で、ALGLU を長期投与したポンペ病患者や *Gaa* KO マウスの骨格筋（グリコーゲンが除去された筋線維やライソゾームの肥大が少ない筋線維を含む）で、既存のオートファジーが減少あるいは回復したという報告はない（Prater et al. 2013; Raben et al. 2003）。オートファジー障害は ERT の効果に悪影響を及ぼす可能性があり（Fukuda et al. 2006; Raben et al. 2007）、これらの結果は、ALGLU に対するシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用療法の優位性を更に示している。

興味深い点として、シパグルコシダーゼ アルファは、ALGLU とは異なり（Hawes et al. 2007; Raben et al. 2003; Raben et al. 2005; Thurberg et al. 2006）、ヒラメ筋のような I 型及び II 型線維をどちらも含む骨格筋に対しても有効であることが示された（2.1.2.4 項）。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用で LAMP1 発現が改善された筋組織のうち、大腿四頭筋及び横隔膜は大部分（90%超）が II 型線維で構成される重要な骨格筋である（Gregorevic et al. 2002; Klover et al. 2009）。これらの結果から、シパグルコシダーゼ アルファは ALGLU よりも幅広い骨格筋線維に対して効果を示すことが示された。

また、シパグルコシダーゼ アルファの隔週 2 回投与により、*Gaa* KO マウスのジスフェルリン細胞内蓄積が減少した（2.1.2.6 項）。現時点でポンペ病の病態におけるジスフェルリンの正確な役割は明らかになっていないが、これまでに得られているデータから、多くの筋ジストロフィー及びミオパチーでジスフェルリンの発現レベル及び／又は発現パターンの変化が認められており、ジスフェルリンの筋機能への関与が示唆されている（Gallardo et al. 2011; Tagawa et al. 2003）。これらの結果は、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用によるポンペ病表現型の改善作用を裏付けている。

Gaa KO マウスの筋機能を握力及びワイヤーハング試験を用いて月 1 回 6 ヵ月間評価した結果、*Gaa* KO マウスの溶媒投与群では WT マウスと比較して、握力及び特にワイヤーハング試験の両方で成績が悪く、加齢に伴い悪化した。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群は、握力試験で ALGLU 投与群よりも統計学的に有意な改善を示し、ワイヤーハング試験では ALGLU 投与群と比較して改善傾向が認められた（2.1.2.7 項）。これらの結果は、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用で認められた生化学的及び組織学的解析結果と一致しており、ALGLU と比較してポンペ病表現型の改善効果が高いことが示された。

なお、ミグルスタット単独投与による組織中 GAA 活性に対する作用、グリコーゲン減少作用並びにポンペ病疾患関連組織マーカーである LAMP1、LC 3 II 及び／又はジスフェルリンの発現に対する作用は認められなかったことから（2.1.2.6 項）、ミグルスタット併用によるシパグルコシダーゼ アルファの有効性の増強は、シパグルコシダーゼ アルファの作用を介してのみ発揮されることが示された。

シパグルコシダーゼ アルファの proof of concept／in vivo 有効性は、スモールスケールで製造したリサーチグレードバッチを隔週 2、4 又は 6 回投与することにより確認した（2.1.2.1 及び 2.1.2.2 項）。シパグルコシダーゼ アルファの非臨床開発中、治験薬を供給するために製造工程がスケールアップされた。最適な PK 及び in vivo 有効性を保持するため、重要な特性（高含量の bis-M6P 及びシアル酸）を有するシパグルコシダーゼ アルファを製造することが重要であった。EB2（原薬）及び GMP4（製剤）の単独又はミグルスタット併用で *Gaa* KO マウスに隔週 2 回静脈内投与し、有効性を比較した（2.1.2.6 項）。いずれのバッチでも、グリコーゲン減少作用、GAA 活性及びポンペ病疾患関連組織マーカー（LAMP1、LC3 II 及びジスフェルリン）に対する作用は同程度であった。

安全性薬理試験では、ミグルスタットの潜在的催不整脈作用を評価するため、GLP 適用 hERG 試験を実施した結果、1000 µmol/L まで明らかな阻害作用を示さなかった（4.1.1.1 項）。カニクイザルを用いた GLP 適用反復投与毒性試験の一部として、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグル

スタット併用投与による安全性薬理評価を実施した結果、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対して投与に関連した明らかな所見は認められなかった（4.2.1.1 項）

一連の薬理試験結果から、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与によるポンペ病の表現型に対する改善作用は ALGLU よりも優れていることが示され、同併用投与をポンペ病患者に対する次世代酵素製剤として開発することの妥当性が裏付けられた。

7　　参考文献

Aartsma-Rus A, van Putten M. Assessing functional performance in the mdx mouse model. J Vis Exp. 2014(85):e51303.

Augusto V, Roberto C, Rocha Campos G. SKELETAL MUSCLE FIBER TYPES IN C57BL6J MICE. Journal of Morphological Sciences. 2004;21(2):89-94.

Bijvoet AG, van de Kamp EH, Kroos MA, Ding J-H, Yang BZ, Visser P, et al. Generalized glycogen storage and cardiomegaly in a knockout mouse model of Pompe disease. Hum Mol Genet. 1998;7(1):53-62.

Cárdenas AM, González-Jamett AM, Cea LA, Bevilacqua JA, Caviedes P. Dysferlin function in skeletal muscle: possible pathological mechanisms and therapeutical targets in dysferlinopathies. Exp Neurol. 2016;283:246-54.

Chavez CA, Bohnsack RN, Kudo M, Gotschall RR, Canfield WM, Dahms NM. Domain 5 of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor preferentially binds phosphodiesters (mannose 6-phosphate N-acetylglucosamine ester). Biochemistry. 2007;46(44):12604-17.

Drost MR, Hesselink RP, Oomens CW, van der Vusse GJ. Effects of non-contractile inclusions on mechanical performance of skeletal muscle. J Biomech. 2005;38(5):1035-43.

Egan D, Kim J, Shaw RJ, Guan KL. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. Autophagy. 2011;7(6):643-4.

Fukuda T, Ahearn M, Roberts A, Mattaliano RJ, Zaal K, Ralston E, et al. Autophagy and mistargeting of therapeutic enzyme in skeletal muscle in Pompe disease. Mol Ther. 2006;14(6):831-9.

Gallardo E, de Luna N, Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, Gonzalez-Quereda L, Flix B, et al. Comparison of dysferlin expression in human skeletal muscle with that in monocytes for the diagnosis of dysferlin myopathy. PLoS One. 2011;6(12):e29061.

Gregorevic P, Plant DR, Leeding KS, Bach LA, Lynch GS. Improved contractile function of the mdx dystrophic mouse diaphragm muscle after insulin-like growth factor-I administration. The American journal of pathology. 2002;161(6):2263-72.

Hawes ML, Kennedy W, O'Callaghan MW, Thurberg BL. Differential muscular glycogen clearance after enzyme replacement therapy in a mouse model of Pompe disease. Mol Genet Metab. 2007;91(4):343-51.

He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annu Rev Genet. 2009;43:67-93.

Inoki K, Kim J, Guan KL. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2012;52:381-400.

Khanna R, Flanagan JJ, Feng J, Soska R, Frascella M, Pellegrino LJ, et al. The pharmacological chaperone AT2220 increases recombinant human acid α-glucosidase uptake and glycogen reduction in a mouse model of Pompe disease. PLoS One. 2012;7(7):e40776.

Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. Nat Cell Biol. 2011;13(2):132-41.

Klover P, Chen W, Zhu BM, Hennighausen L. Skeletal muscle growth and fiber composition in mice are regulated through the transcription factors STAT5a/b: linking growth hormone to the androgen receptor. FASEB J. 2009;23(9):3140-8.

Kohler L, Puertollano R, Raben N. Pompe Disease: From Basic Science to Therapy. Neurotherapeutics. 2018;15(4):928-42.

Lim JA, Li L, Raben N. Pompe disease: from pathophysiology to therapy and back again. Front Aging Neurosci. 2014;6:177.

Lim JA, Li L, Shirihai OS, Trudeau KM, Puertollano R, Raben N. Modulation of mTOR signaling as a strategy for the treatment of Pompe disease. EMBO Mol Med. 2017;9(3):353-70.

Lim JA, Sun B, Puertollano R, Raben N. Therapeutic Benefit of Autophagy Modulation in Pompe Disease. Mol Ther. 2018;26(7):1783-96.

McDade JR, Michele DE. Membrane damage-induced vesicle-vesicle fusion of dysferlin-containing vesicles in muscle cells requires microtubules and kinesin. Hum Mol Genet. 2014;23(7):1677-86.

McVie-Wylie AJ, Lee KL, Qiu H, Jin X, Do H, Gotschall R, et al. Biochemical and pharmacological characterization of different recombinant acid alpha-glucosidase preparations evaluated for the treatment of Pompe disease. Mol Genet Metab. 2008;94(4):448-55.

Moreland RJ, Jin X, Zhang XK, Decker RW, Albee KL, Lee KL, et al. Lysosomal acid α-glucosidase consists of four different peptides processed from a single chain precursor. J Biol Chem. 2005;280(8):6780-91.

Niesen FH, Berglund H, Vedadi M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. Nat Protoc. 2007;2(9):2212.

Piccolo F, Moore SA, Ford GC, Campbell KP. Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb--girdle muscular dystrophies. Ann Neurol. 2000;48(6):902-12.

Prater SN, Patel TT, Buckley AF, Mandel H, Vlodavski E, Banugaria SG, et al. Skeletal muscle pathology of infantile Pompe disease during long-term enzyme replacement therapy. Orphanet J Rare Dis. 2013;8(1):90.

Raben N, Danon M, Gilbert A, Dwivedi S, Collins B, Thurberg B, et al. Enzyme replacement therapy in the mouse model of Pompe disease. Mol Genet Metab. 2003;80(1-2):159-69.

Raben N, Fukuda T, Gilbert AL, de Jong D, Thurberg BL, Mattaliano RJ, et al. Replacing acid alpha-glucosidase in Pompe disease: recombinant and transgenic enzymes are equipotent, but neither completely clears glycogen from type II muscle fibers. Mol Ther. 2005;11(1):48-56.

Raben N, Nagaraju K, Lee E, Kessler P, Byrne B, Lee L, et al. Targeted disruption of the acid α-glucosidase gene in mice causes an illness with critical features of both infantile and adult human glycogen storage disease type II. J Biol Chem. 1998;273(30):19086-92.

Raben N, Takikita S, Pittis MG, Bembi B, Marie SK, Roberts A, et al. Deconstructing Pompe disease by analyzing single muscle fibers: to see a world in a grain of sand. Autophagy. 2007;3(6):546-52.

Ralston E, Swaim B, Czapiga M, Hwu W-L, Chien Y-H, Pittis M, et al. Detection and imaging of non-contractile inclusions and sarcomeric anomalies in skeletal muscle by second harmonic generation combined with two-photon excited fluorescence. J Struct Biol. 2008;162(3):500-8.

Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. Mol Cell. 2010;40(2):310-22.

Tagawa K, Ogawa M, Kawabe K, Yamanaka G, Matsumura T, Goto K, et al. Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese muscular dystrophy patients. J Neurol Sci. 2003;211(1-2):23-8.

Thurberg BL, Lynch Maloney C, Vaccaro C, Afonso K, Tsai AC, Bossen E, et al. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for Pompe disease. Lab Invest. 2006;86(12):1208-20.

Tong PY, Kornfeld S. Ligand interactions of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Comparison with the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. J Biol Chem. 1989;264(14):7970-5.

Toscano A, Schoser B. Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe disease: a systematic literature review. J Neurol. 2013;260(4):951-9.

van der Ploeg A, Clemens P, Hopkin RJ, Kacena K, Sanson B-J, Laforet P. Long-term efficacy of alglucosidase alfa in late-onset Pompe disease. Mol Genet Metab. 2017;1(120):S134.

Wenk J, Hille A. Quantitation of Mr 46000 and Mr 300000 mannose 6-phosphate receptors in human cells and tissues. Biochem Int. 1991;23(4):723-31.

Wyatt K, Henley W, Anderson L, Anderson R, Nikolaou V, Stein K, et al. The effectiveness and cost-effectiveness of enzyme and substrate replacement therapies: a longitudinal cohort study of people with lysosomal storage disorders. Health Technol Assess. 2012;16(39):1-543.

Xu S, Lun Y, Frascella M, Garcia A, Soska R, Nair A, et al. Improved efficacy of a next-generation ERT in murine Pompe disease. JCI Insight. 2019;4(5):e125358.

Zhou Q, Stefano JE, Harrahy J, Finn P, Avila L, Kyazike J, et al. Strategies for neoglycan conjugation to human acid α-glucosidase. Bioconjug Chem. 2011;22(4):741-51.

Zhu Y, Jiang JL, Gumlaw NK, Zhang J, Bercury SD, Ziegler RJ, et al. Glycoengineered acid alpha-glucosidase with improved efficacy at correcting the metabolic aberrations and motor function deficits in a mouse model of Pompe disease. Mol Ther. 2009;17(6):954-63.

目次

2.6.3.1　薬理試験：一覧表 2
2.6.3.2　効力を裏付ける試験 6
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　薬理学的薬物相互作用試験 8

2.6.3.1　　薬理試験：一覧表

2.6.3.1A　　ミグルスタット

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
N/A					
Secondary Pharmacodynamics					
N/A					
Safety Pharmacology					
Effects on cardiovascular system	hERG assay	N/A	[redacted], [redacted]., USA	201027.BIJ	4.2.1.3.1
Pharmacodynamic Drug Interactions					
N/A					

2.6.3.1B　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
In vitro thermostability	Buffer (standard thermal shift assay)	N/A	Amicus Therapeutics, USA	RRB200-010	4.2.1.1.2
In vitro stability	Human whole blood	N/A	Amicus Therapeutics, USA	RRB200-040	4.2.1.1.3
Effect of repeat intravenous administrations of cipaglucosidase alfa with or without miglustat on glycogen levels	*Gaa* KO mice (C57BL/6 and 129, mixed)	cipaglucosidase alfa: IV bolus miglustat: PO (gavage)	Amicus Therapeutics, USA	RRB200-004	4.2.1.1.4
Dose-range finding studies for cipaglucosidase alfa and miglustat co-administration on glycogen reduction	*Gaa* KO mice (C57BL/6 and 129, mixed)	cipaglucosidase alfa: IV bolus miglustat: PO (gavage)	Amicus Therapeutics, USA	RRB200-005	4.2.1.1.5
The effect of various dose combinations of cipaglucosidase alfa / miglustat co-administration on glycogen levels	*Gaa* KO mice (129/SVE)	cipaglucosidase alfa: IV bolus miglustat: PO (gavage)	Amicus Therapeutics, USA	RRB200-025	4.2.1.1.6
In vivo lysosomal targeting of cipaglucosidase alfa	*Gaa* KO mice (129/SVE)	cipaglucosidase alfa: IV bolus miglustat: PO (gavage)	Amicus Therapeutics, USA	RRB200-039	4.2.1.1.7
Histologic assessment of cipaglucosidase alfa with or without miglustat co-administration on glycogen levels, lysosome proliferation, and autophagy	*Gaa* KO mice (129/SVE)	cipaglucosidase alfa: IV bolus miglustat: PO (gavage)	Amicus Therapeutics, USA	RRB200-006	4.2.1.1.8
IHC assessment of cipaglucosidase alfa/miglustat on autophagy in single muscle fibers	*Gaa* KO mice (129/SVE)	cipaglucosidase alfa: IV bolus miglustat: PO (gavage)	Amicus Therapeutics, USA	RRB200-055	4.2.1.1.9

2.6.3.1B　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用（続き）

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics (cont.)					
Comparison of EB and GMP cipaglucosidase alfa alone or co-administration with miglustat on glycogen levels	*Gaa* KO mice (129/SVE)	cipaglucosidase alfa: IV bolus miglustat: PO (gavage)	Amicus Therapeutics, USA	RRB200-014	4.2.1.1.10
Histologic examination of efficacy of EB and GMP cipaglucosidase alfa alone or co-administration with miglustat	*Gaa* KO mice (129/SVE)	cipaglucosidase alfa: IV bolus miglustat: PO (gavage)	Amicus Therapeutic, USA	RRB200-015	4.2.1.1.11
Effect of long-term administration of cipaglucosidase alfa with or without miglustat on muscle biochemistry and function and correlation with glycogen level	*Gaa* KO mice (129/SVE)	cipaglucosidase alfa: IV bolus miglustat: PO (gavage)	Amicus Therapeutics, USA	RRB200-017	4.2.1.1.12
PK and efficacy of cipaglucosidase alfa and miglustat co-administration under clinical dosing scenario	*Gaa* KO mice	cipaglucosidase alfa: IV bolus miglustat: PO (gavage)	Amicus Therapeutic, USA	RRB200-056	4.2.1.1.13
Meena NK, Ralston E, Raben N, Puertollano R. Enzyme Replacement Therapy Can Reverse Pathogenic Cascade in Pompe Disease. Mol Ther Methods Clin Dev. 2020;18:199-214.	*Gaa* KO mice	cipaglucosidase alfa: IV bolus miglustat: PO (gavage)	Cell and Developmental Biology Center, National Heart, Lung, and Blood Institute, NIH, USA	Meena 2020	4.2.1.1.14

2.6.3.1B　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用（続き）

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in CTD
Secondary Pharmacodynamics					
N/A					
Safety Pharmacology					
As part of the repeat-dose toxicity study in NHPs (cipaglucosidase alfa and miglustat co-administration)	Cynomolgus monkey	cipaglucosidase alfa: 2-hour IV infusion miglustat: nasogastric gavage	[redacted], [redacted]., USA	[redacted].423.10	4.2.3.2.1
Pharmacodynamic Drug Interactions					
N/A					

Abbreviations: cont. = continued; CTD = common technical document; EB = engineering batch; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GMP = Good Manufacturing Practice; hERG = human ether-à-go-go-related gene; IHC = immunohistochemistry; IV = intravenous; KO = knock-out; N/A = not applicable; NHP = non-human primate; NIH = National Institutes of Health; PK = pharmacokinetic; PO = oral

2.6.3.2　　効力を裏付ける試験

Module 2.6.2, Section 2 を参照

2.6.3.3　　副次的薬理試験

ミグルスタットを用いた新たな副次的薬理試験は、単独又はシパグルコシダーゼ アルファとの併用投与のいずれでも実施していない。

2.6.3.4　安全性薬理試験

2.6.3.4A　ミグルスタット

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Concentration (µmol/L)	Gender and Number per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number/ Location in CTD
Cardiovascular system (In vitro hERG Assay)	HEK-293 Cells	N/A	100 and 1000	Tested: n = 3 Control: n = 2	Miglustat did not show any potential to inhibit the hERG channel at the tested concentrations.	Yes	201027.BIJ/ 4.2.1.3.1

Abbreviations: CTD = common technical document; GLP = Good Laboratory Practice; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go-related gene; n = number; N/A = not applicable

2.6.3.4B　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and Number per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number/ Location in CTD
Cardiovascular and respiratory system	Cynomolgus Monkey	cipaglucosidase alfa: 2-hour IV infusion miglustat: PO (gavage)	cipaglucosidase alfa: 50 and 100/ miglustat: 25 and 175; QOW for 13 weeks (7 doses)	4M and 4F	No noteworthy treatment-related findings	Yes	[redacted].423.10/ 4.2.3.2.1

Abbreviations: CTD = common technical document; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; M = male; n = number; PO = oral; QOW = every other week

2.6.3.5　　薬理学的薬物相互作用試験

ミグルスタットの薬力学的薬物相互作用試験は、単独又はシパグルコシダーゼ アルファとの併用投与のいずれでも実施していない。