



**iPS細胞創薬に基づいた新規  
筋萎縮性側索硬化症(ALS)治療薬である  
ロピニロール塩酸塩の実用化第1/2a相試験**

**慶應義塾大学医学部生理学教室  
岡野 栄之**



# 私達の研究開発ポリシー

---

- **From Basic to Clinical:** 世界最高レベルの独創的な基礎研究が、これまで治療法のなかった難病の解決を可能にする
- **From Rare to Common:** 希少難病の克服は、万病克服への試金石

**From Familial to Sporadic**

Hideyuki Okano: Cell Stem Cell, 2018



# 主な神経変性疾患

- ・ パーキンソン病
- ・ アルツハイマー病
- ・ 筋萎縮性側索硬化症(ALS)
- ・ 網膜疾患
- ・ 難聴



**10% 家族性**  
**Known Target**  
Syn, Amyloid, SOD1, RP, etc.

**90% 孤発性**  
**Unknown Target**  
Complex genetics/low penetrance  
Environment, Ageing

# 筋萎縮性側索硬化症 (ALS)

Taylor JP, Brown RH Jr, Cleveland DW Nature, 2016



Stephen Hawking

上位・下位運動ニューロンの  
選択的脱落

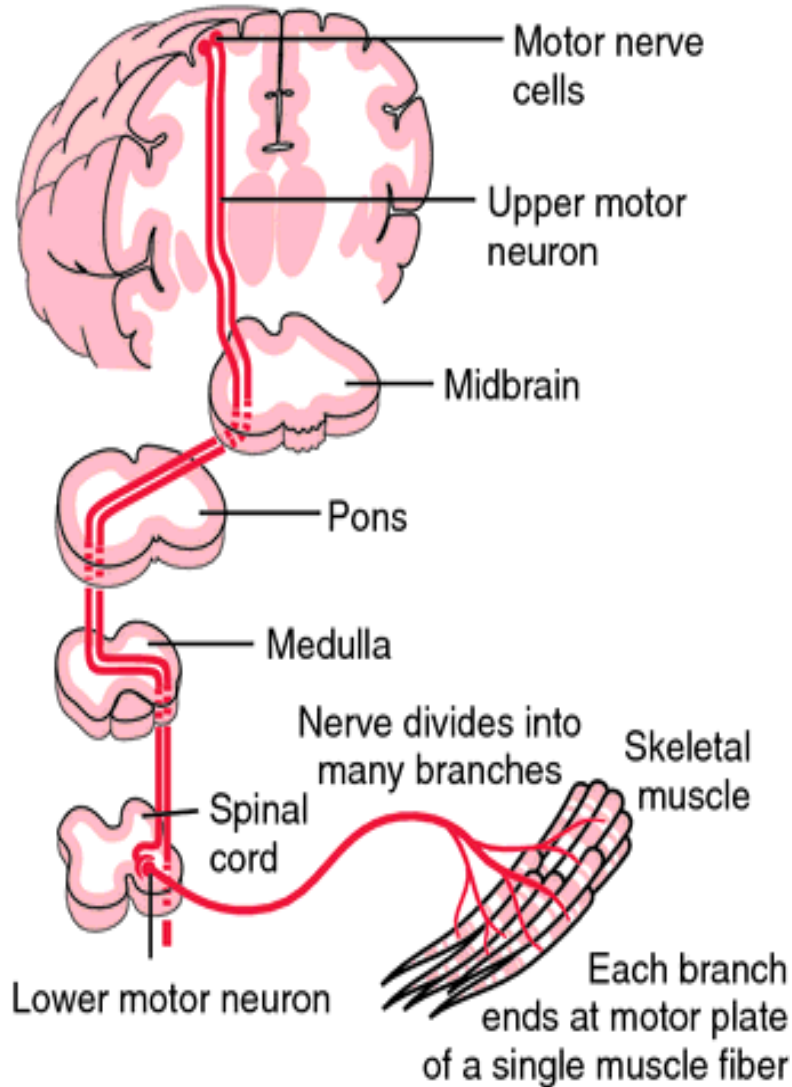
様々な発症メカニズム

5% に認知機能異常  
(前頭側頭型認知症)

5-10% が家族性に発症

# 筋萎縮性側索硬化症 (ALS)

Taylor JP, Brown RH Jr, Cleveland DW Nature, 2016

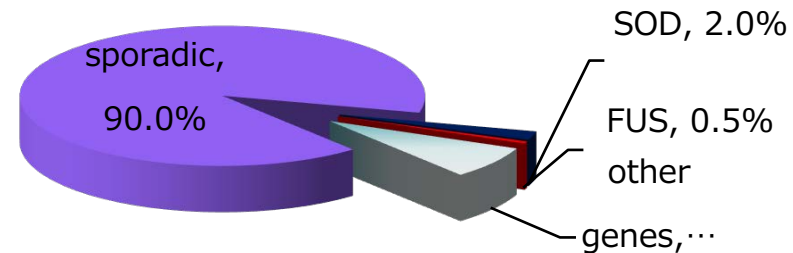


上位・下位運動ニューロンの  
選択的脱落

様々な発症メカニズム

5% に認知機能異常  
(前頭側頭型認知症)

5-10% が家族性に発症

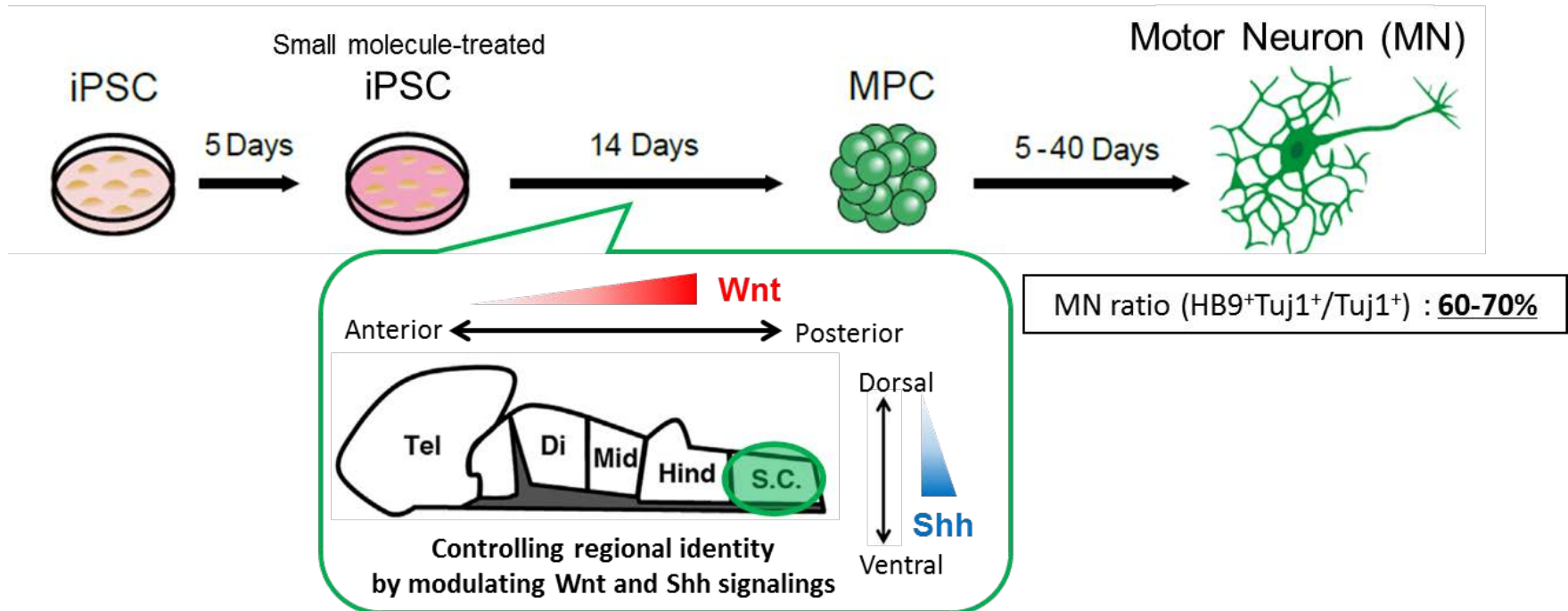


# 家族性ALSの遺伝学

Notation (OMIM)	Chromosome	Gene	Inheritance/onset
ALS1	21q22	SOD1 (1993)	AD / adult
ALS2	2q33	ALS2 (Alsin) (2001)	AR / infantile
ALS3	18q21	?	AD / adult
ALS4	9q34	Senetaxin (2004)	AD / juvenile
ALS5	15q21	Spatacsin (SPG11, 2010)	AR / juvenile
ALS6	16q12	FUS/TLS (2009)	AD / adult
ALS7	20p13	?	AD / adult
ALS8	20q13.3	VAPB (2004)	AD / adult
ALS9	14q11	Angiogenin (2006)	AD / adult
ALS10	1p36.22	TDP-43 (2008)	AD / adult
ALS11	6q21	FIG4 (2009)	AR /
Progressive LMN	2p13	Dynactin p150 subunit (2003)	AD / adult, slow progression
ALS12	10p14-15	Optineurin (OPTN) (2010)	AR, AD / adult
ALS13	12q24	Ataxin-2 (SCA2, 2010)	AD / Susceptible gene (27-39Q)
ALS14	9p13	VCP (2010)	AD / adult
ALS15	Xp11	UBQLN2 (2011)	XD / adult with or without FTD
FTD-ALS1	9p21	C9Orf72 (2011)	AD / adult
ALS16	9p13.3	Sigma1R (2011)	AR / juvenile
ALS17	3p11.2	CHMP2B (2010)	AD?
ALS18	17p13.2	Profilin1 (2012)	AD
ALS19	2q34	ErbB4 (2013)	AD / adult
ALS20	12q13	HNRNPA1 (2013)	AD
ALS21	5q31	Matrin-3 (2014)	AD
ALS22	2q35	TUBA4A (2014)	AD? / with or without FTD
FTD-ALS2	22q11.23	CHCHD10(2014)	AD?
FTD-ALS3	5q35.3	SQSTM1(p62, 2013)	AD?
FTD-ALS4	12q14.2	TBK1(2015)	AD?/ adult, variable phenotype?
ALS23	10q22	ANXA11 (Annexin A11, 2017)	AD / adult
ALS24	4q33	NEK1(2016)	AD? / adult / susceptible gene
ALS25	12q13	KIF5A (2018, aka SPG10)	AD, adult / susceptible gene

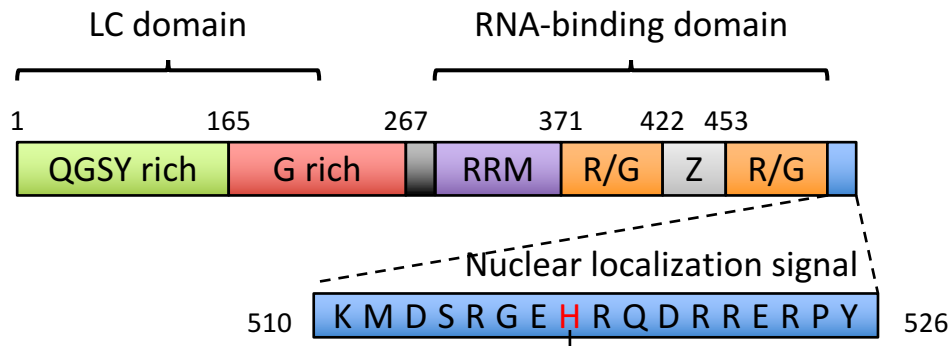
# 迅速かつ高効率な 運動ニューロン分化誘導法の開発

CTraS method  
SB431542,  
Dorsomorphine  
CHIR99021



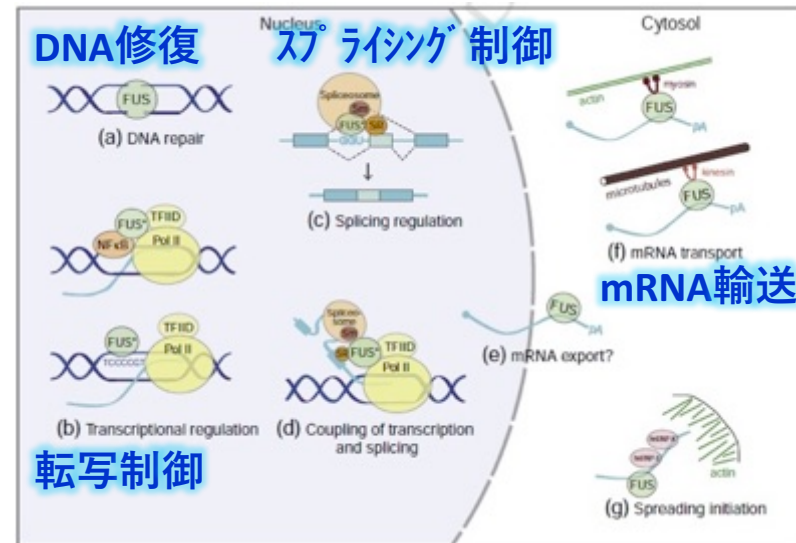
Imaizumi et al., Stem Cell Reports, 2015  
Fujimori et al. Stem Cell Reports, 2017  
Fujimori et al., Nat Med, 2018

# ALS 6 FUS (fused in sarcoma)



**本研究での変異：H517D**

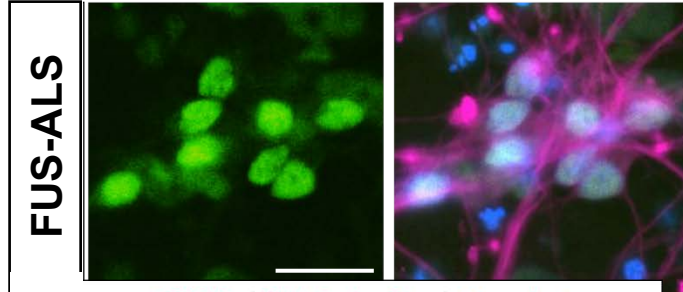
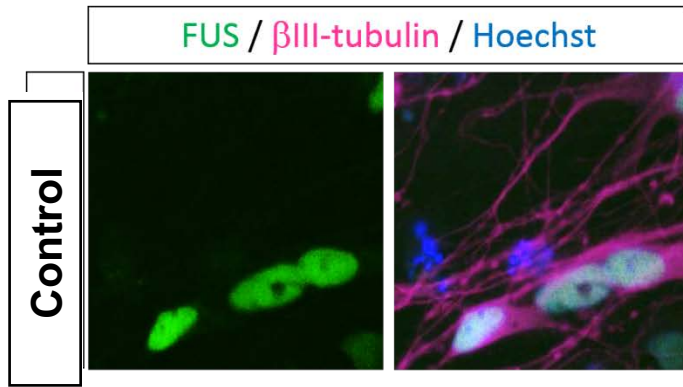
(c. 1550C>G in exon 15 heterozygous)



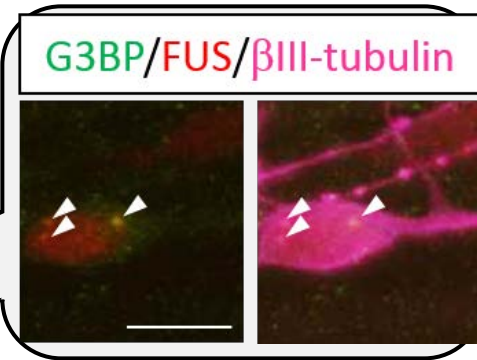
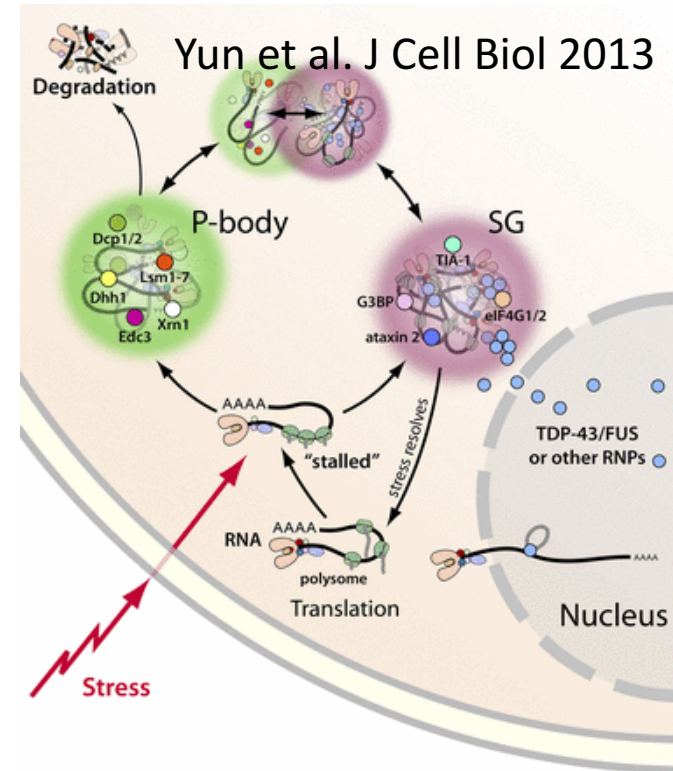
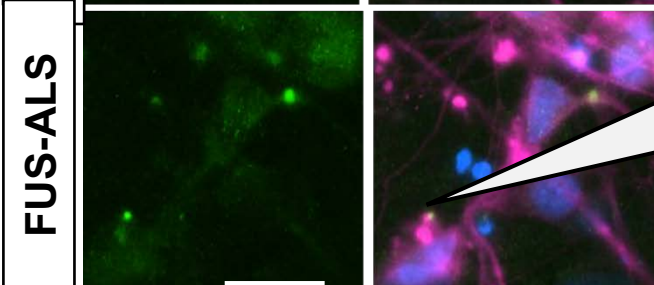
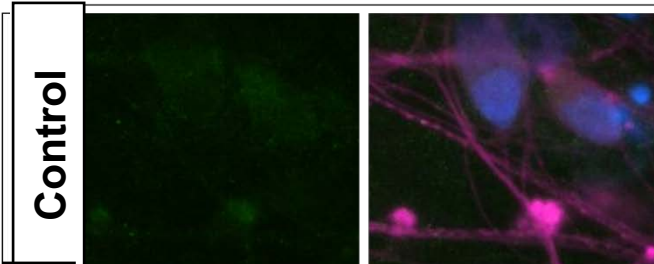
*Mol Cell Neurosci*, 2013

- 家族性ALSの原因遺伝子の一つ（元来は脂肪肉腫の癌化誘導因子として同定）
- 日本人のALS患者のうち、約1%がFus遺伝子異常を有する
- RNA結合タンパク質であり、遺伝子の発現やスプライシングに関わる
- LCドメインとRNA結合ドメインの存在により、容易に液-液相分離を起こし凝集体を形成する
- C末端に核移行シグナルを有する
- 本研究にて用いたALS患者細胞は核移行シグナル上にH517Dヘテロ変異を有する

# FUS 遺伝子変異を有するALS患者由来iPSCsから誘導した運動ニューロンは、FUS蛋白質の局在異常とストレス顆粒形成を示す



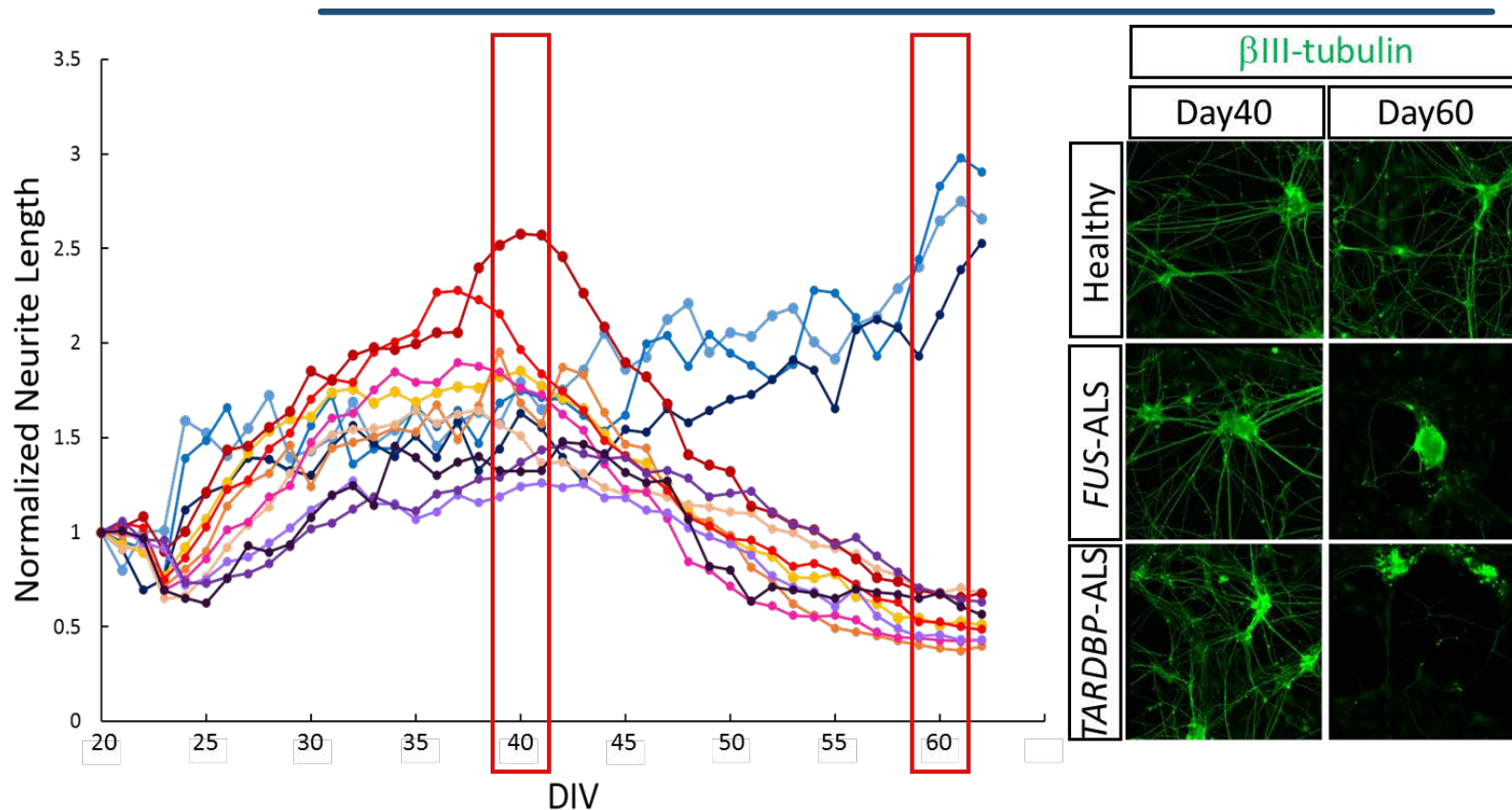
G3BP /  $\beta$ III-tubulin / Hoechst



# 筋萎縮性側索硬化症 ～神経突起長解析～



Fujimori et al.: Nature Medicine | VOL 24 | OCTOBER 2018 | 1579–1589



Healthy donor

- 201B7
- WD39
- KA11

*FUS*-ALS

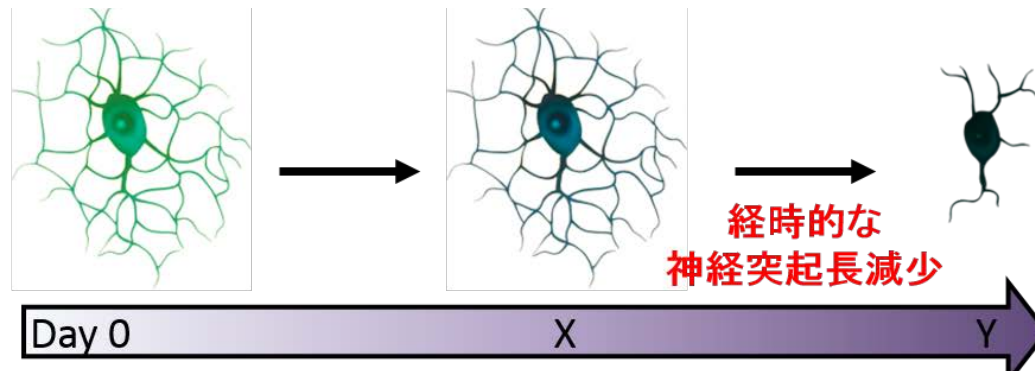
- FALS-2e2
- FALS-2e3
- FALS-2e23
- FALS-e46
- FALS-e48
- FALS-e54

*TARDBP*-ALS

- A3411
- A21412
- A21428

ALS10 (TDP43) iPS cells: A gift from Prof. Haruhisa Inoue at CiRA  
Egawa et al.: Sci Transl Med 2013

# 家族性ALS (ALS6, ALS10)運動ニューロン で観察される表現型



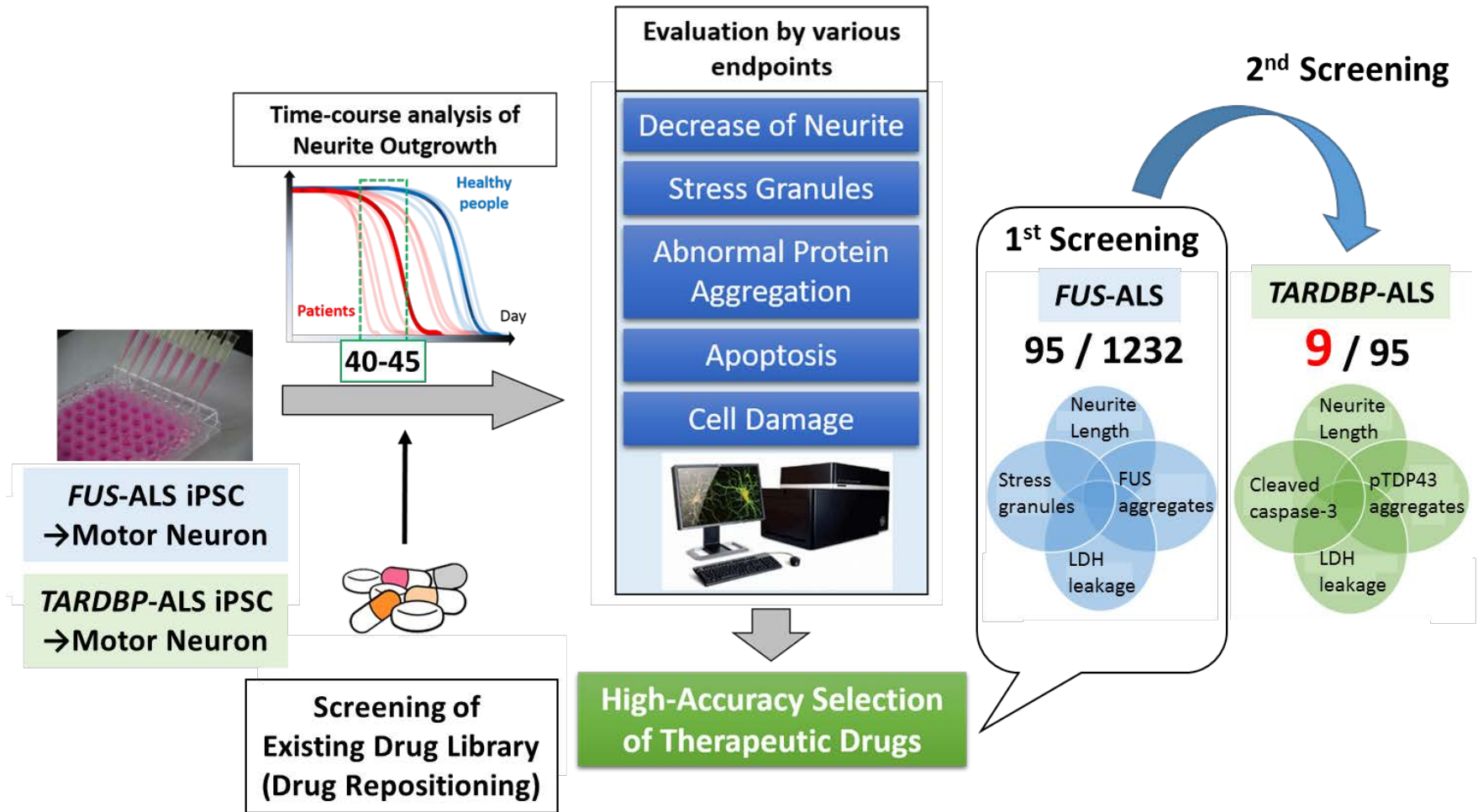
	細胞内の機能変化 (Initial Stage)		致死的な機能的・構造的変化 (End Stage)	
	AL6 (FUS)	ALS10 (TDP-43)	FUS	TDP-43
変異遺伝子	AL6 (FUS)	ALS10 (TDP-43)	FUS	TDP-43
培養期間	0-25	0-20	25-	20-
表現型	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ ストレス顆粒↑</li> <li>・ FUS局在異常</li> <li>・ LDH漏出↑</li> <li>・ Cleaved Caspase-3↑</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ ストレス顆粒↑</li> <li>・ pTDP-43封入体↑</li> <li>・ LDH漏出↑</li> <li>・ Cleaved Caspase-3↑</li> </ul>	神経突起長↓	神経突起長↓



薬剤スクリーニングのエンドポイントとして活用

# 既存薬ライブラリーを用いたALS治療候補薬の同定

High Content Drug Screening System using familial



# 既存薬ライブラリーから得られた9つの候補薬

Fujimori et al.: Nature Medicine | VOL 24 | OCTOBER 2018 | 1579–1589

Drugs	Rank	Dose (μM)	Phenotypic rescue (%)				Rank	Dose (μM)	Phenotypic rescue (%)				BBB permeability
			ALS-iPS carrying <i>FUS</i> mutation						ALS-iPS carrying <i>TARDBP</i> mutation				
			Neurite length	FUS aggregates	Stress granules	LDH leakage			Neurite length	Cleaved Caspase-3	pTDP-43 inclusions	LDH leakage	
Drug-1	9	0.1	-11.7	0.277	22.6	0.100	5	0.1	11.2	6.83	7.44	9.49	No
	6	1	21.2	36.3	45.2	11.0	7	1	10.3	16.4	15.2	17.4	
	4	10	39.3	45.6	66.8	25.9	6	10	30.9	37.5	36.9	29.4	
Drug-2	6	0.1	23.2	-14.2	11.6	11.2	6	0.1	5.39	4.94	4.33	7.43	Yes
	9	1	33.4	14.8	12.6	10.3	3	1	20.4	19.4	15.3	20.3	
	9	10	15.1	20.4	35.4	18.1	5	10	33.2	38.4	29.9	38.3	
Drug-3	7	0.1	11.2	1.68	0.617	11.0	3	0.1	20.4	18.9	18.3	9.44	No
	8	1	21.3	18.8	22.6	22.1	4	1	39.2	29.3	27.6	30.1	
	8	10	22.1	18.6	30.5	20.4	3	10	50.2	39.4	33.9	42.4	
Drug-4	5	0.1	-0.18	11.7	21.7	21.4	9	0.1	-0.33	-1.83	3.87	0.88	No
	7	1	-0.27	29.8	41.1	21.3	9	1	5.83	8.89	6.83	9.38	
	6	10	28.3	17.4	52.3	34.5	9	10	12.4	15.9	20.4	19.8	
Drug-5	1	0.1	65.4	37.7	56.6	44.4	4	0.1	20.3	12.9	10.3	10.4	Yes
	1	1	83.8	53.7	42.3	41.4	5	1	30.2	25.2	20.3	19.1	
	1	10	80.2	63.4	70.0	46.9	8	10	25.9	18.4	19.3	22.1	
Drug-6	2	0.1	43.3	55.8	36.6	33.5	1	0.1	50.4	74.3	56.2	58.3	Yes
	2	1	58.3	54.3	34.4	48.0	1	1	75.3	70.3	69.2	78.1	
	2	10	61.3	74.4	66.1	47.6	1	10	77.2	87.9	74.2	82.4	
Drug-7	4	0.1	12.0	11.6	21.3	22.1	7	0.1	7.2	-0.28	0.67	5.38	No
	4	1	26.3	38.3	20.1	34.1	6	1	20.3	25.6	9.32	18.8	
	5	10	39.0	44.8	33.3	55.5	4	10	50.3	40.2	20.4	39.1	
Drug-8	3	0.1	23.2	37.7	11.6	22.1	2	0.1	28.4	37.4	19.3	33.2	Yes
	3	1	56.2	28.4	16.4	32.0	2	1	40.2	30.5	29.4	40.1	
	3	10	67.4	33.9	33.1	44.5	2	10	60.2	55.2	56.6	50.3	
Drug-9	8	0.1	-11.1	11.3	11.0	0.137	8	0.1	2.13	-1.12	-0.98	7.62	No
	5	1	8.88	48.9	28.6	31.1	8	1	10.2	7.49	3.88	15.9	
	7	10	11.9	22.8	22.7	44.6	7	10	30.1	19.3	16.9	20.6	

Drugs 6 and 8 are approved drugs for neurological diseases other than ALS

**Drug6 = ロピニロール塩酸塩**  
**(抗パーキンソン病薬; D2受容体アゴニスト)**

# ロピニロールについてのPMDAのコメント

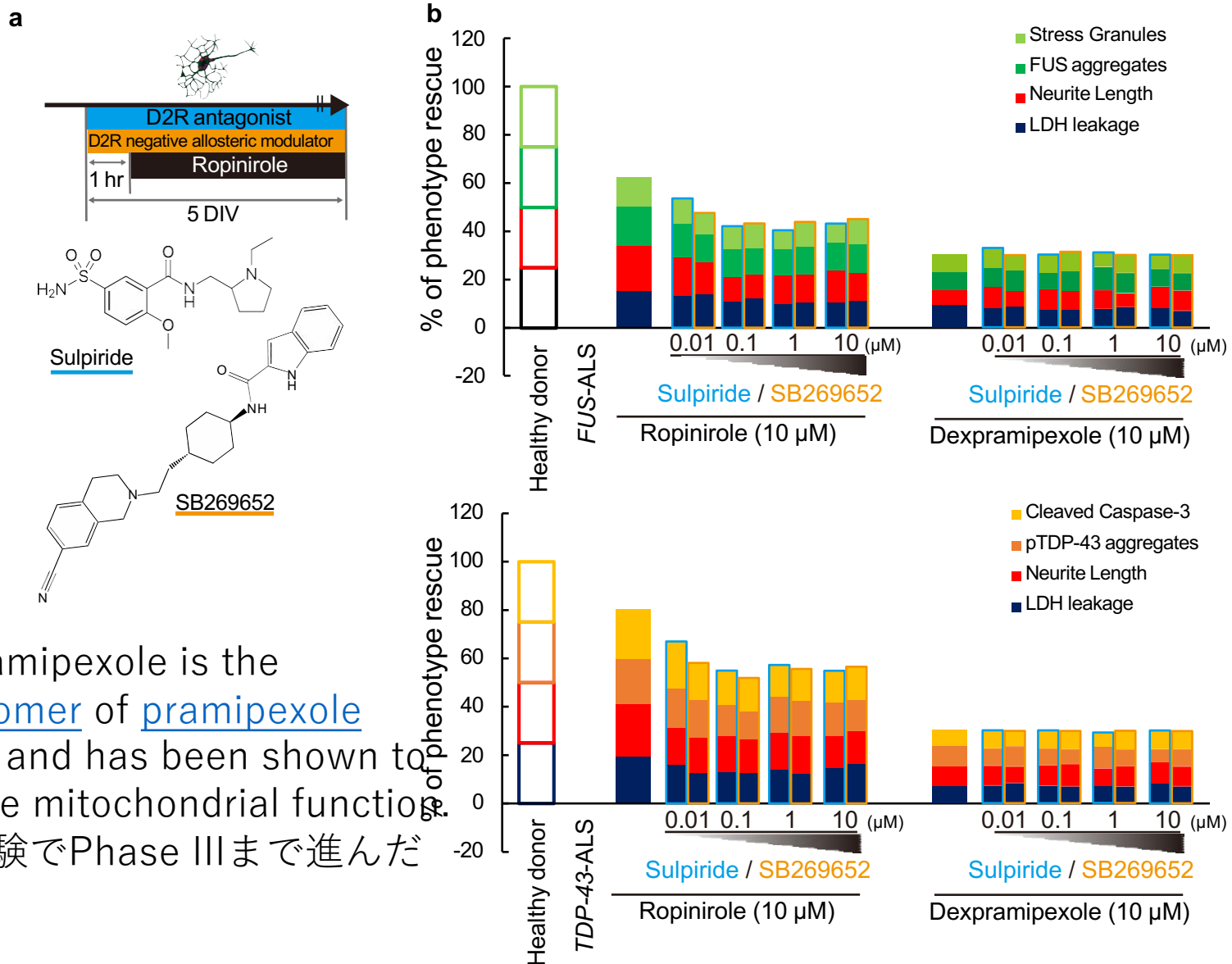


- 病態メカニズムとDrug6の作用メカニズムは？
- ALSの承認薬と比べた優位性
- Placebo controlは？
- 孤発性ALSには効くのか？
- Responder vs Non-Responderは、前もって予想できるのか？

2016年5月16日 PMDA 事前面談

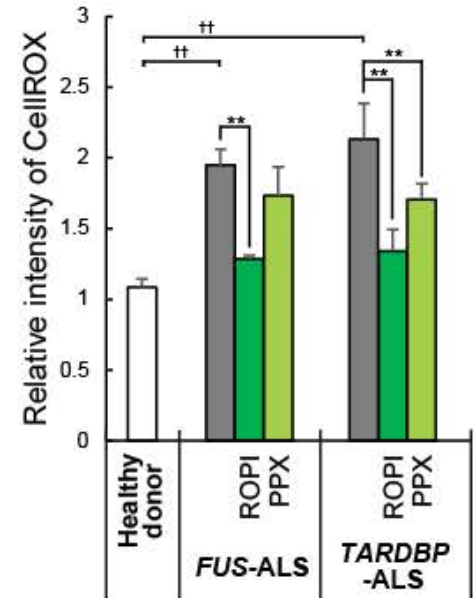
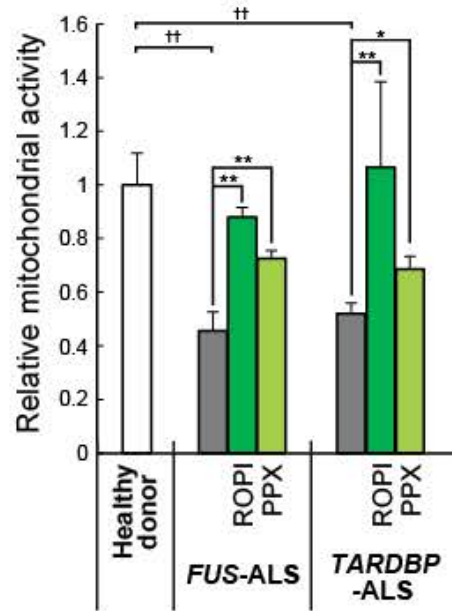
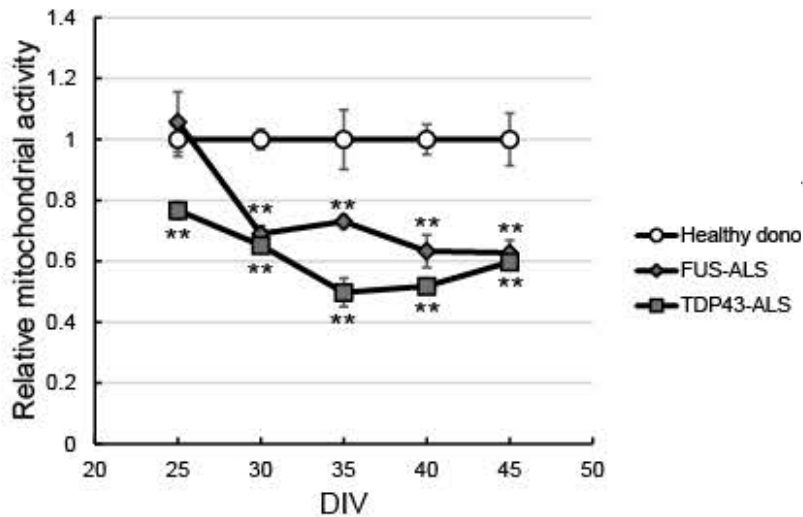
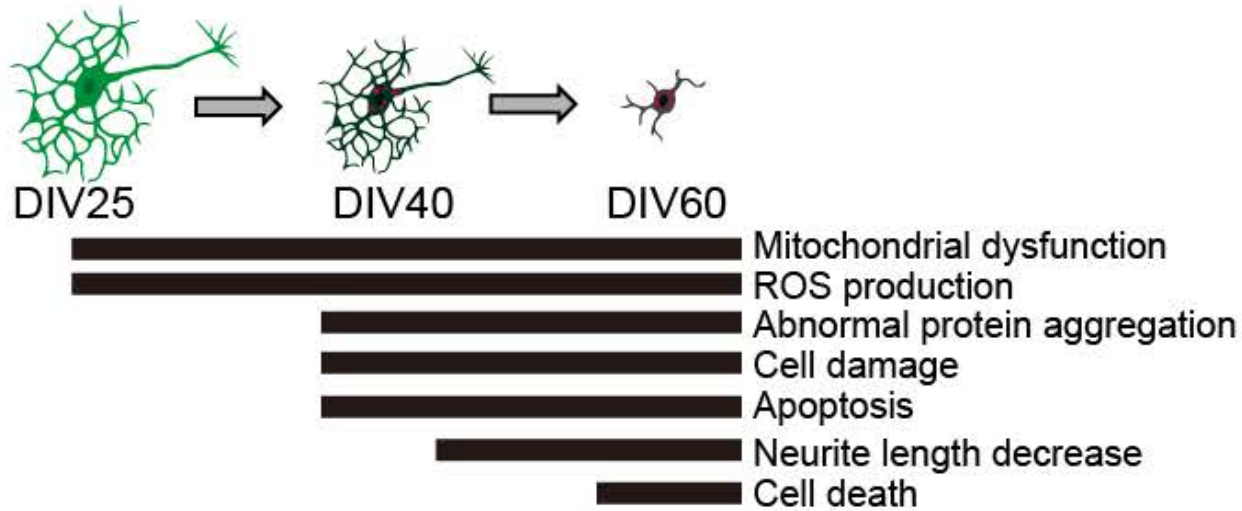
# ROPIによる抗ALS作用は、一部だけD2Rを介する

Fujimori et al.: Nature Medicine | VOL 24 | OCTOBER 2018 | 1579–1589



Dexampramipexole is the [enantiomer](#) of [pramipexole](#) (PPX), and has been shown to improve mitochondrial function. ALS治験でPhase IIIまで進んだ

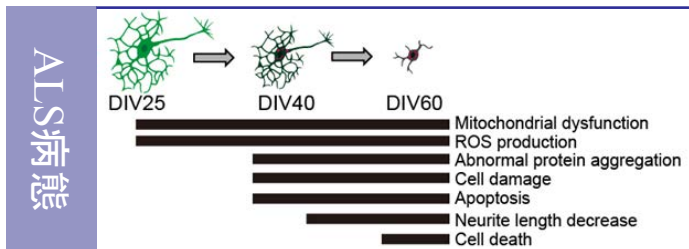
# ROPIは、活性酸素の産生とミトコンドリアの機能低下を抑制



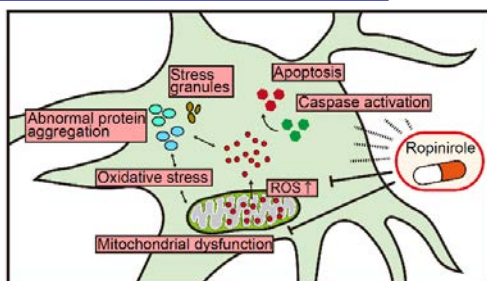
# ロピニロール塩酸塩の作用機序と孤発性ALSへの応用



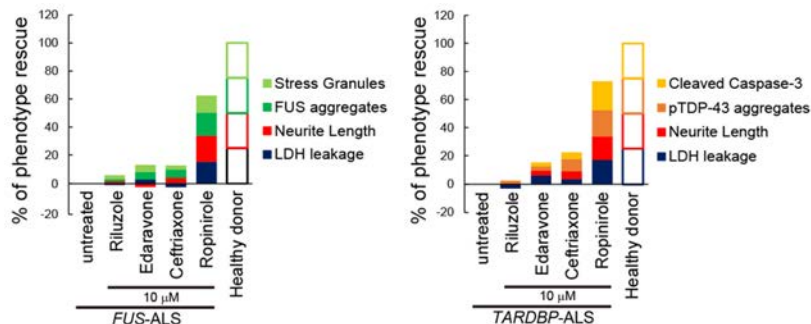
## 活性酸素の産生とミトコンドリアの機能低下を抑制



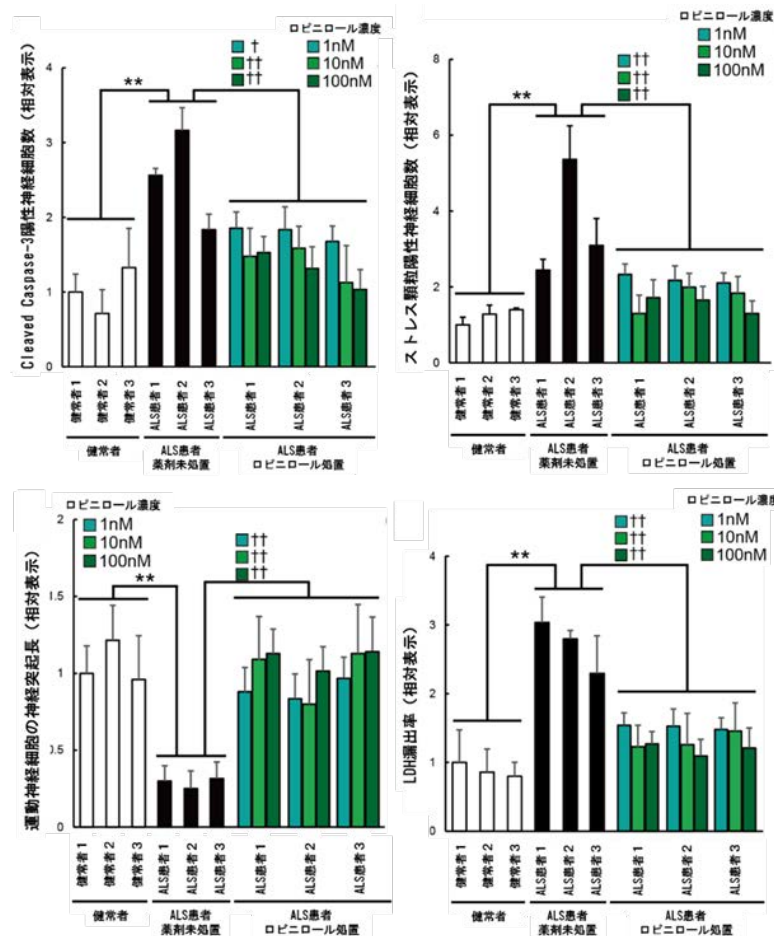
ロピニロール塩酸塩は、ドパミン(D2R)アゴニストである。しかしながら、ALSに対する病態改善効果は、D2Rアゴニスト作用とは異なる複数の機序が想定される。(右図)



我々の構築した薬剤評価系において、ロピニロールは既存のALS治療薬(リルゾール、エダラボン)に対して優位な病態改善効果を示す



## ロピニロールは孤発性ALSにも有効である



用量依存的な病態改善効果

ロピニロール塩酸塩は、用量依存的に、かつ既存のALS治療薬よりも優位に、家族性および孤発性ALS患者の病態改善効果を有する

# In vitro の解析でResponderとNon-Responderは、区別できるか？

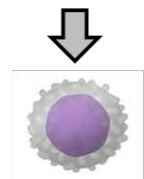
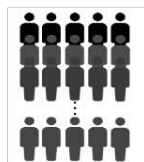
## ALS関連RNA結合性蛋白質の局在異常の解析

Fujimori et al.: Nature Medicine

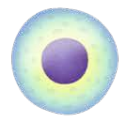
| VOL 24 | OCTOBER 2018 | 1579–1589

**Sporadic** ALS

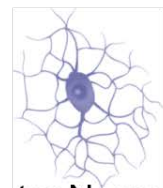
Patients



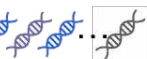
32-case SALS-LCLs (JaCALS)



iPSC (32 cases)



Motor Neuron (MN, 32 cases)

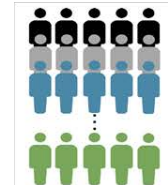


ROPI



Degenerated MN (22 cases)

Subclassification of SALS cases

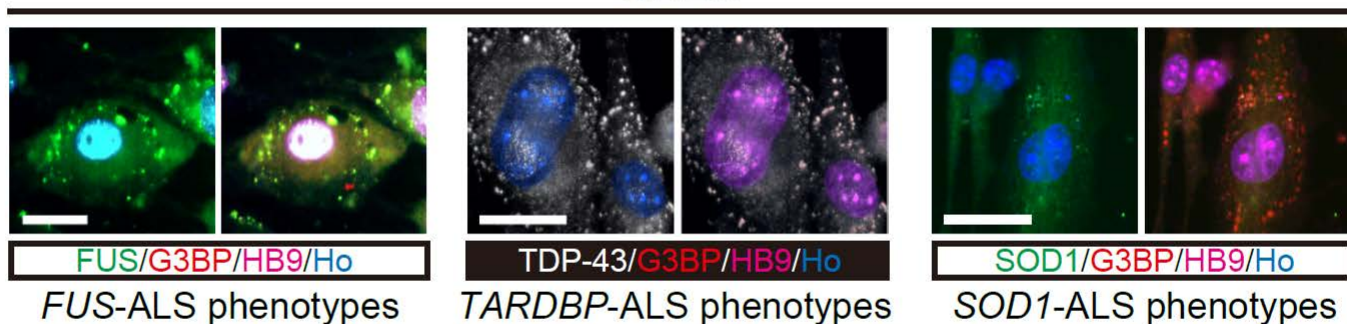
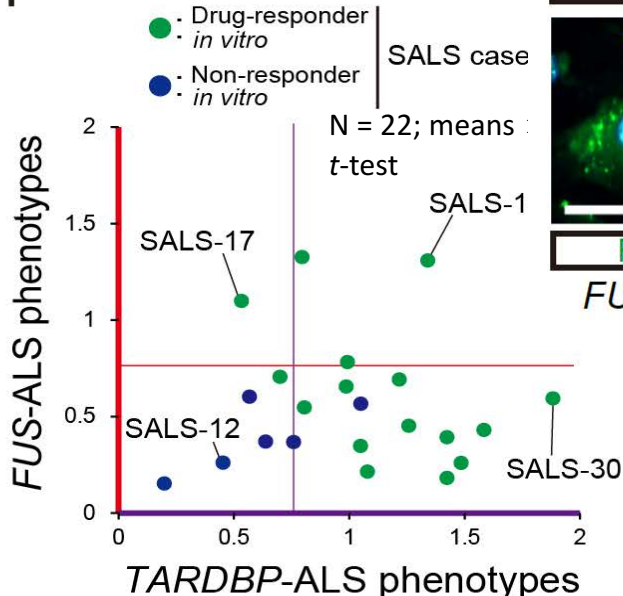


ROPI responder 16/22 (73%)

y

SALS

f



FUS, TDP43 double (+), single (+) groups are ROPI-responders and double (-) groups are Non-responders.

# 本治験についてのPMDAのコメントへの回答



於 2018年2月13日 PMDA 対面助言

- 病態メカニズムとDrug6の作用メカニズムは？
  - > D2R部分依存、ミトコンドリア機能の改善、活性酸素産生抑制
- ALSの承認薬と比べた優位性
  - > 優位性あり (in vitro)
- Placebo controlは？
  - > グラクソ・スミスクライン(GSK)社より提供
- 孤発性ALSには効くのか？
  - > 約70 % に有効 (in vitro)
- Responder vs Non-Responderは、前もって予想できるのか？
  - > ALS関連RNA結合蛋白質の局在異常が指標となる

# ALS のiPS細胞創薬と 多数の孤発性ALS患者由来iPS細胞を用いた検討



nature  
medicine

Articles

<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0140-5>

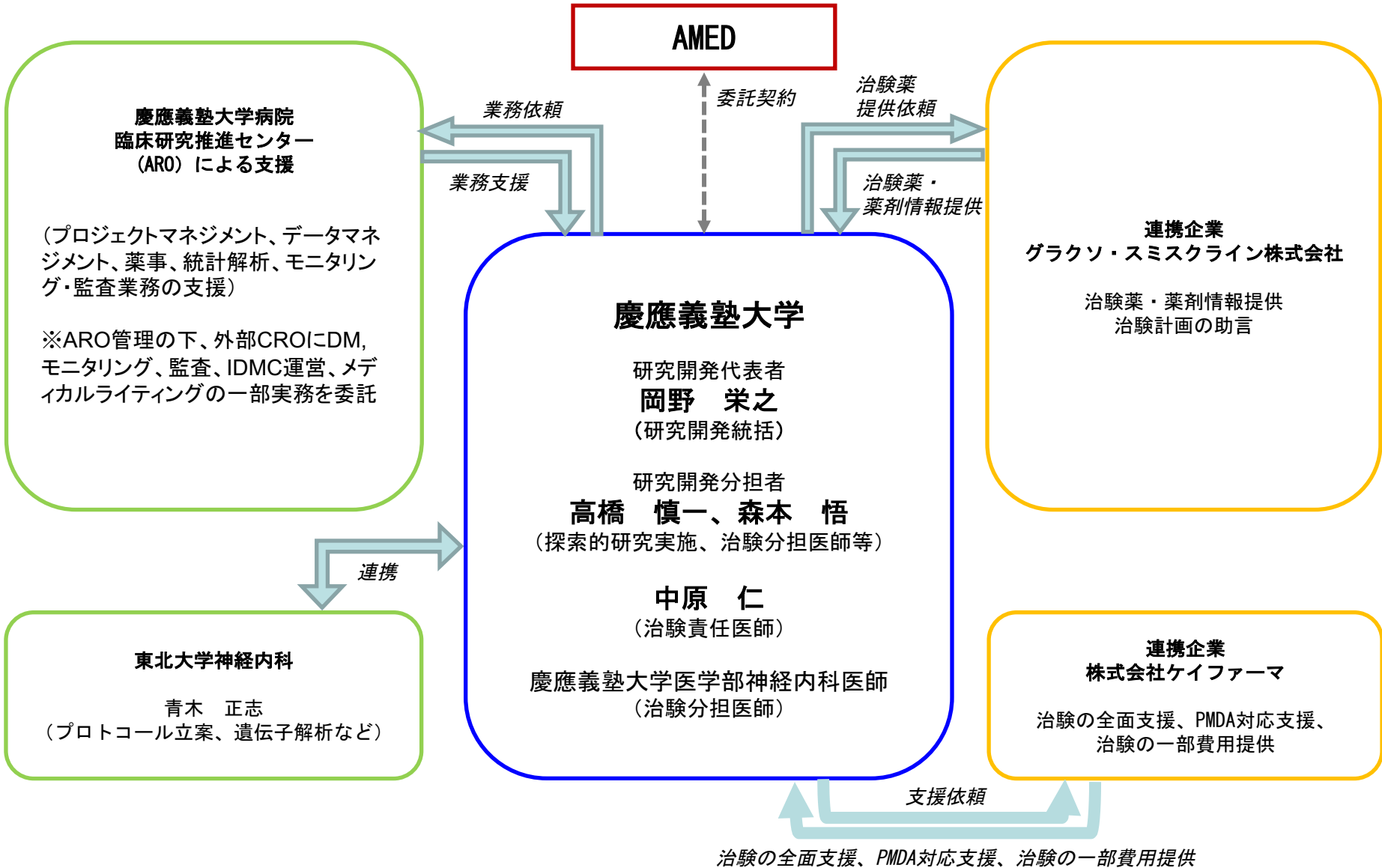
## Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent

Koki Fujimori<sup>1</sup>, Mitsuru Ishikawa<sup>1</sup>, Asako Otomo<sup>2,3,4</sup>, Naoki Atsuta<sup>5</sup>, Ryoichi Nakamura<sup>5</sup>, Tetsuya Akiyama<sup>6</sup>, Shinji Hadano<sup>2,3,7</sup>, Masashi Aoki<sup>6</sup>, Hideyuki Saya<sup>8</sup>, Gen Sobue<sup>5,9</sup> and Hideyuki Okano<sup>1\*</sup>

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a heterogeneous motor neuron disease for which no effective treatment is available, despite decades of research into *SOD1*-mutant familial ALS (FALS). The majority of ALS patients have no familial history, making the modeling of sporadic ALS (SALS) essential to the development of ALS therapeutics. However, as mutations underlying ALS pathogenesis have not yet been identified, it remains difficult to establish useful models of SALS. Using induced pluripotent stem cell (iPSC) technology to generate stem and differentiated cells retaining the patients' full genetic information, we have established a large number of in vitro cellular models of SALS. These models showed phenotypic differences in their pattern of neuronal degeneration, types of abnormal protein aggregates, cell death mechanisms, and onset and progression of these phenotypes in vitro among cases. We therefore developed a system for case clustering capable of subdividing these heterogeneous SALS models by their in vitro characteristics. We further evaluated multiple-phenotype rescue of these subclassified SALS models using agents selected from non-*SOD1* FALS models, and identified ropinirole as a potential therapeutic candidate. Integration of the datasets acquired in this study permitted the visualization of molecular pathologies shared across a wide range of SALS models.

Nature Medicine | VOL 24 | OCTOBER 2018 | 1579–1589 |

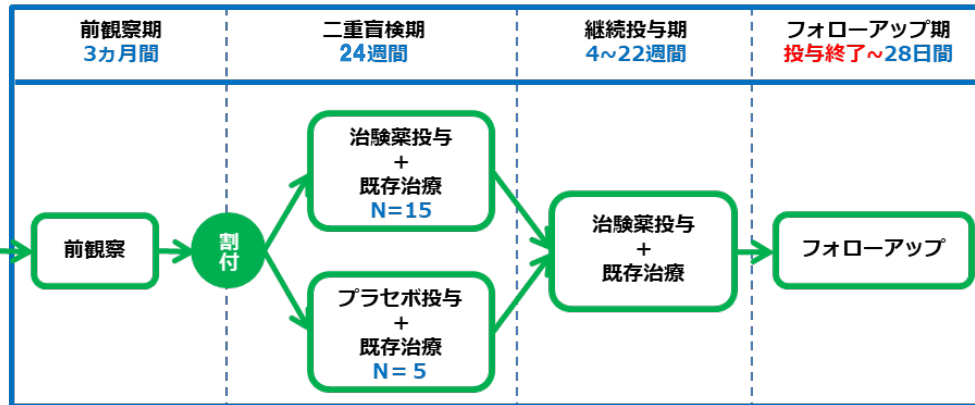
# ALSに対するロピニロール塩酸塩の医師主導治験



# 治験概要



- 【実施施設】 慶應義塾大学病院神経内科(単施設)
- 【全試験期間】 2018年12月～2021年3月
- 【試験デザイン】 二重盲検期:単施設、プラセボ対照、ランダム化、二重盲検  
継続投与期:単施設、非対照、非盲検、実薬継続投与
- 【目標症例数】 家族性あるいは孤発性ALS患者20例(実薬15例、プラセボ5例)
- 【使用薬剤】 レキップCR錠、プラセボ錠(GSK社提供)



## 【評価項目】

- 1) 主要評価項目 ALSに対するロピニロール塩酸塩の安全性および忍容性
- 2) 副次評価項目 治療開始前後でのALSFRS-Rスコアの4週あたりの変化量の比、等
- 3) 探索的評価項目 患者iPS細胞由来神経細胞を用いたin vitro薬効評価と臨床効果の比較、等

## 本試験の特徴

- ・ALSは標準的的症状評価項目(ALSFRS-R)の推移に個人差が非常に大きいいため、臨床症状の定量的評価(筋力計や舌圧計)を導入(症状の評価者を限定)
- ・各種ALS病態関連バイオマーカーの測定(体液中の酸化ストレスや疾患特異的蛋白など)
- ・被験者のiPS細胞から運動ニューロンを分化誘導し、in vitroでの病態発現や薬効を確認

## 被験者募集HPの開設



# 進捗状況



- 2016年 5月16日 第1回PMDA事前面談
- 2017年10月13日 第2回PMDA事前面談
- 2018年 2月13日 PMDA対面助言
- 2018年11月 1日 IRB承認
- 2018年11月16日 治験届提出
- 2018年12月 1日 治験開始**



## 被験者募集状況

治験ホームページ (<https://survey.qlifeweb.jp/lp/als/>) において、webアンケートおよびコールセンター対応(詳細な患者情報・基準適合性確認)にて選択除外基準への適合確認を行いリクルートを実施。

＜2018年12月27日時点で以下の状況＞

- ・Webアンケート回答数： 1,295件
- ・Webアンケート通過数： 221件
- ・コールセンター対応数： 144件
- ・コールセンター通過数： 78件
- ・初回来院調整患者数： **18件**

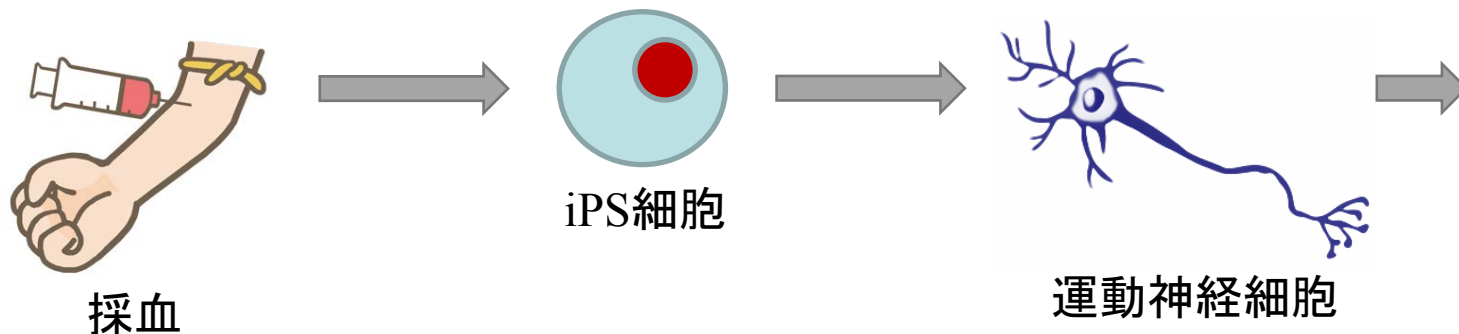
(この他にもメールや電話などでの問い合わせ多数)

リクルートの進捗状況は概ね順調と考えられ、2019年3月頃より本登録基準を満たした患者に対し、薬剤投与開始予定

# 治験の特徴



本治験では、ご参加頂いた**ALS**の患者様を対象に、血液からiPS細胞を作製し、更には**運動ニューロン**に分化誘導することで、患者様ご本人の運動ニューロンの病態および薬剤効果が、治験における実際の臨床的な評価といかに結び付くかについて探索します。



多角的なエンドポイント  
による薬効評価

神経突起長

ストレス顆粒

疾患特異的  
タンパク凝集

LDH漏出

アポトーシス誘導



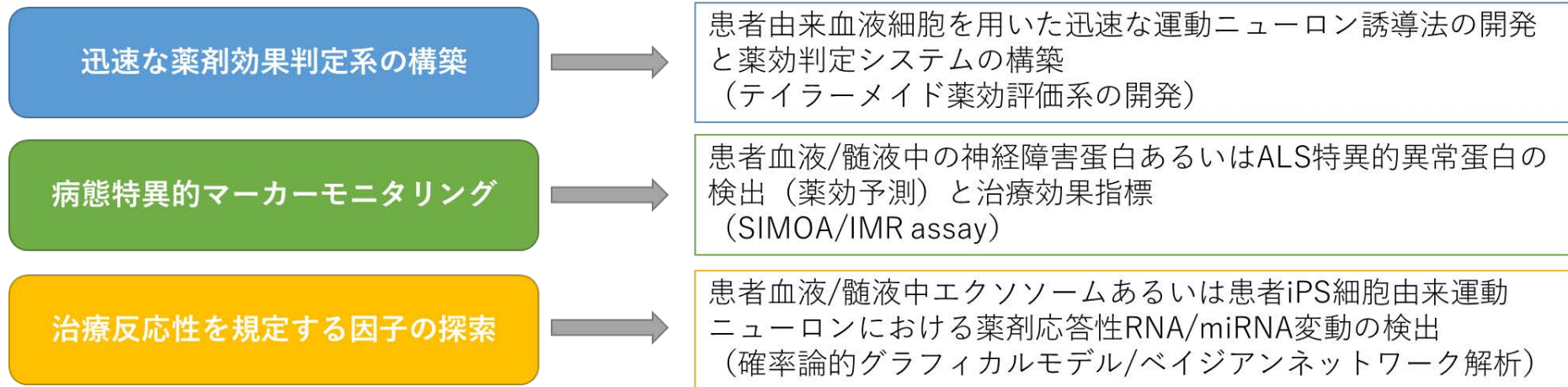
これにより、**iPS細胞創薬のproof of concept**となるのみならず、ALSにおける新たな病態**バイオマーカー**や**迅速な薬剤効果判定法**の開発を行います。

患者由来運動ニューロンの作製および**Responder/Sub-optimal responder**の選定を行い、**効果予測システム**を確立することを目指します。

# 治験と併行した探索研究の具体的項目と目的



## コンパニオン診断技術としての3つの柱



## ロピニロール塩酸塩の有効性

### 早期承認制度を利用した治療薬開発の早期実用化