

5-アミノレブリン酸 (5-ALA)

志村 優

Institute of Human Genetics, Helmholtz Zentrum München, Munich, Germany

千葉県こども病院 遺伝診療センター 代謝科

HelmholtzZentrum münchen
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt



千葉県こども病院
CHIBA CHILDREN'S HOSPITAL



Outline

1. 5-ALAとは？

- 5-ALAの基礎知識

- 5-ALAの医薬品応用

2. ミトコンドリア病に対する5-ALA の効果

3. Leigh脳症に対する医師主導治験

Outline

1. 5-ALAとは？

- 5-ALAの基礎知識

- 5-ALAの医薬品応用

2. ミトコンドリア病に対する5-ALA の効果

3. Leigh脳症に対する医師主導治験

ALA（アラ）とは？～生命の根源物質と呼ばれる理由～①

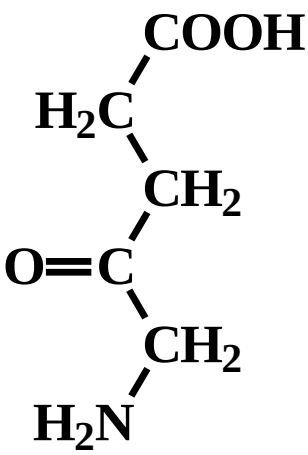
5-アミノレブリン酸を、略称としてALAと称している。

5-**A**mino **L**evulinic **A**cid (**ALA**)

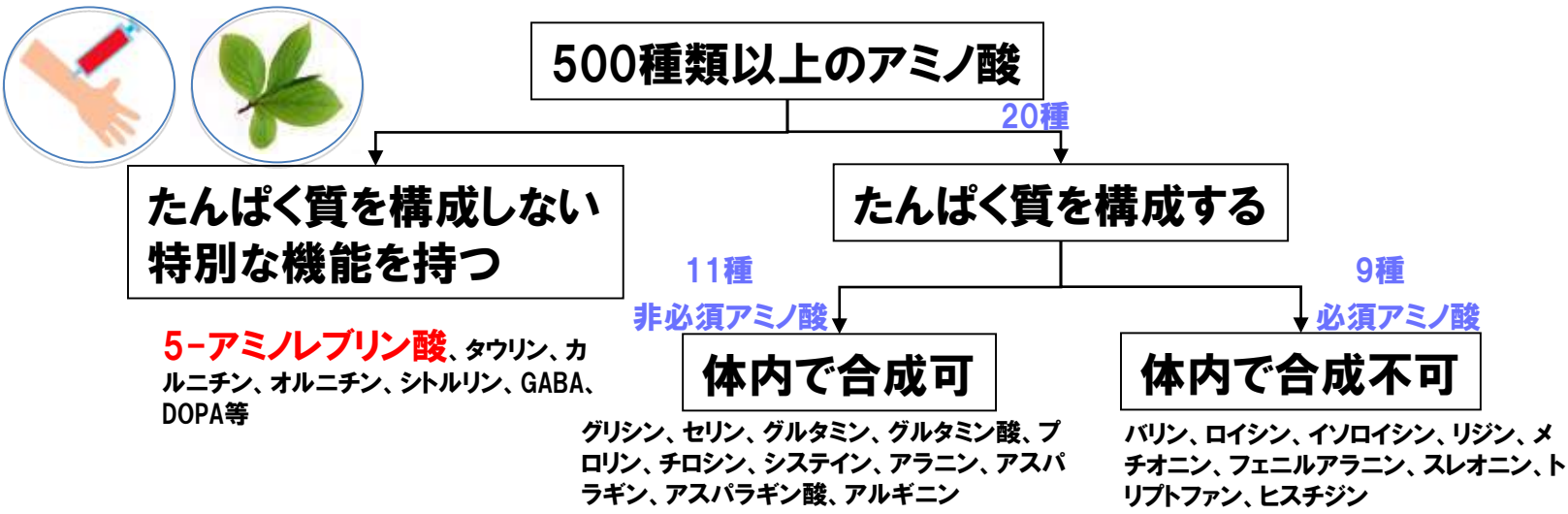
ALAは36億年前の原始の地球で誕生。

「**生命の根源物質**」と呼ばれる**天然のアミノ酸**。

- ・たんぱく質を構成しない
- ・血液の素となるヘモグロビンの素
- ・細胞がエネルギーを作るために必須の物質

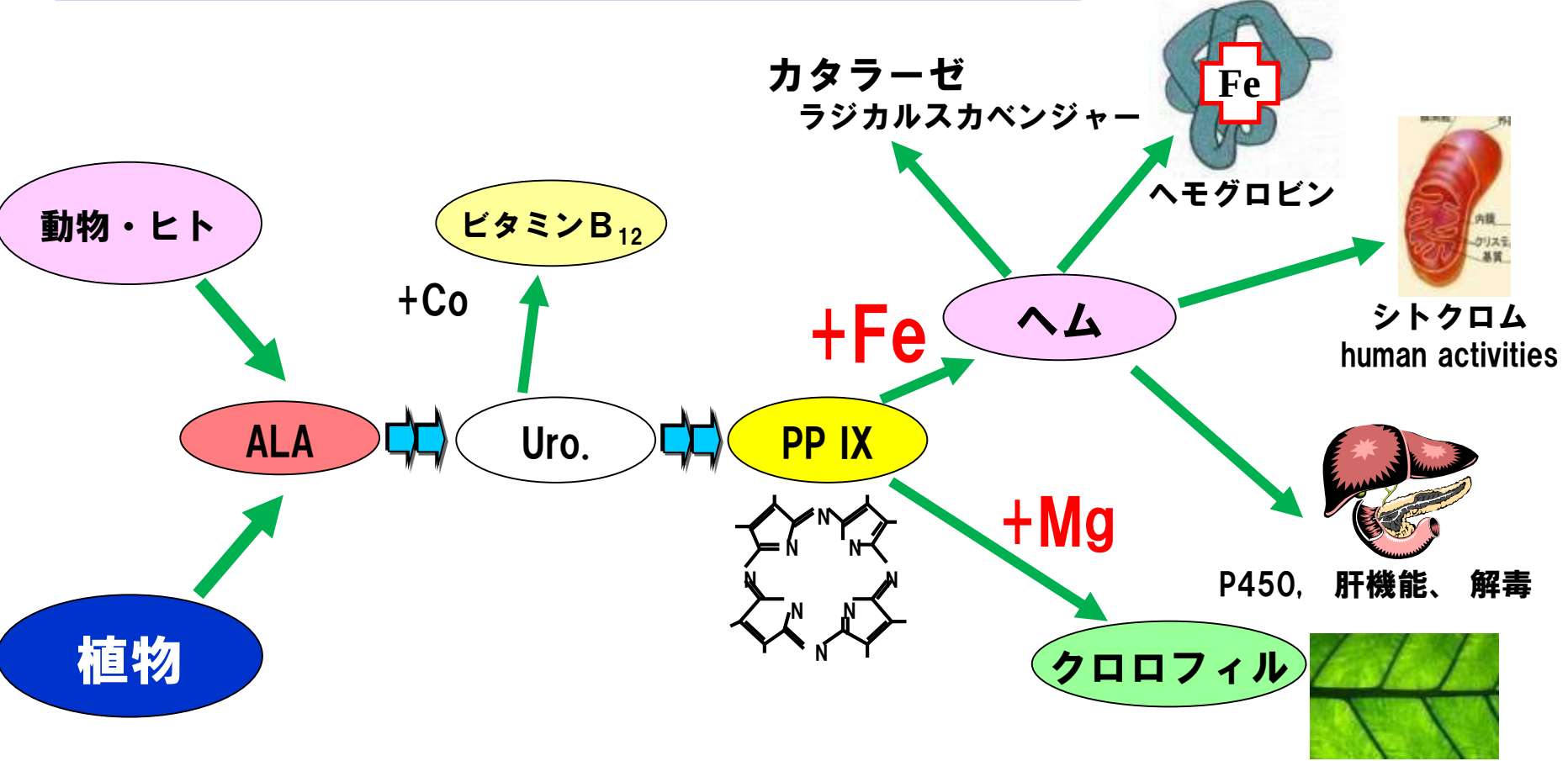


元々、人の体内にあるアミノ酸の一種で、血液や葉緑素の源になる物質。



ALA（アラ）とは？～生命の根源物質と呼ばれる理由～②

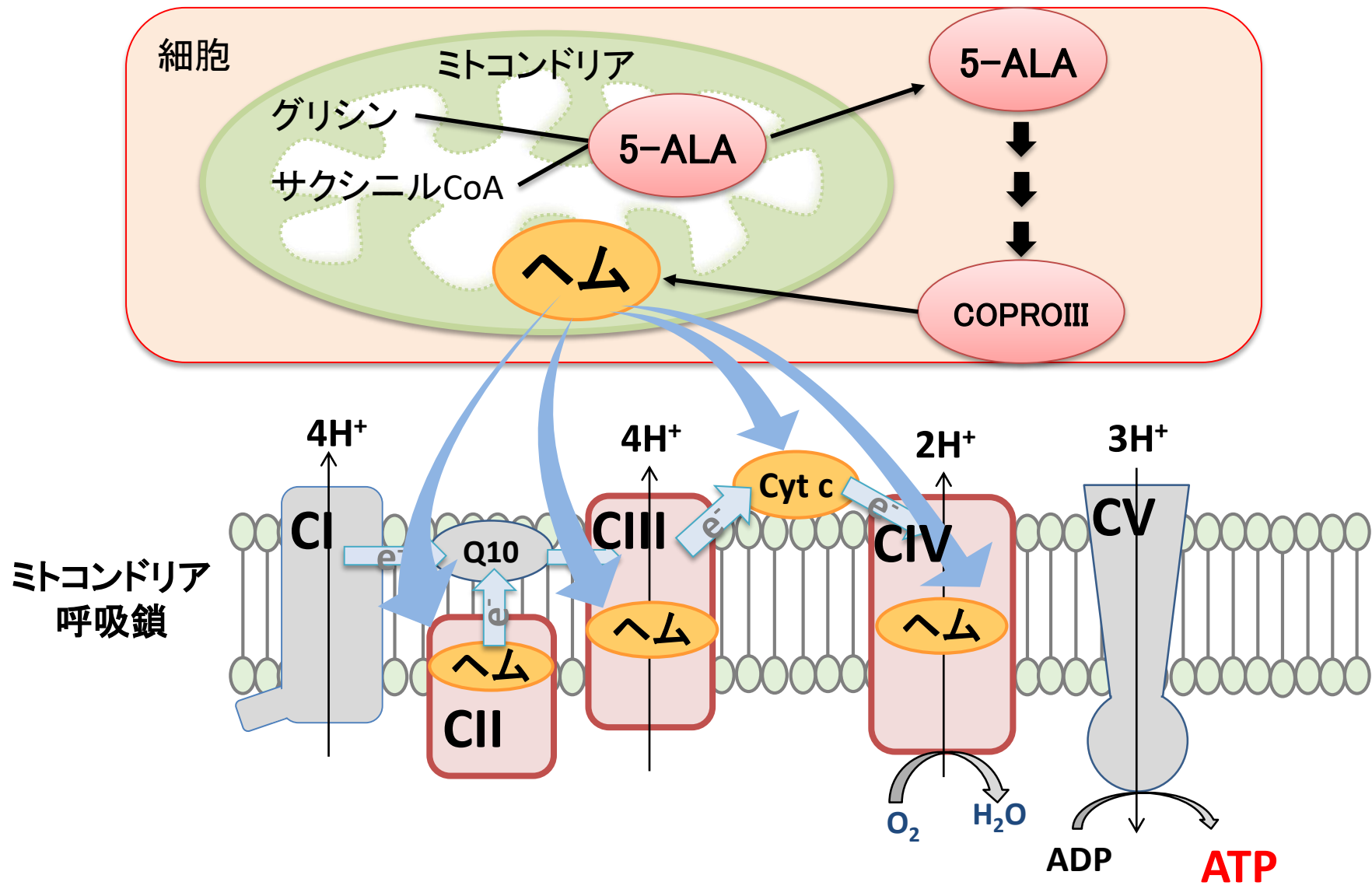
ALAは、カラダの中で多彩な機能を担う物質。
ALAが起点となって体内で様々な物質の前駆体となる。



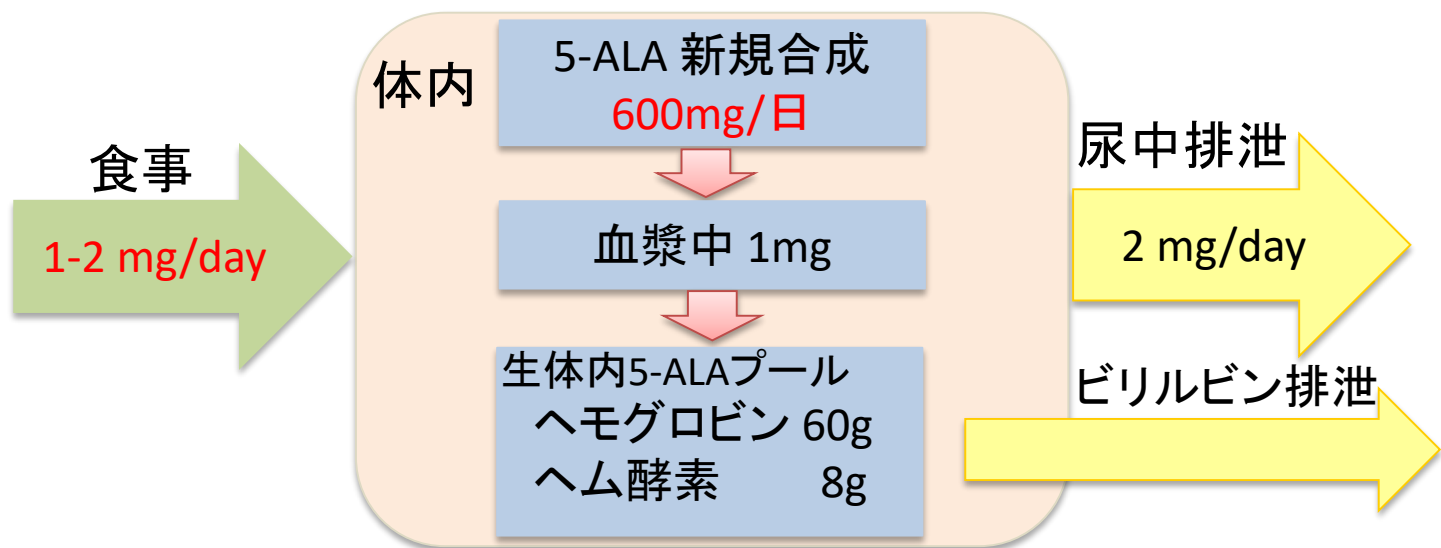
ALAとミネラルの組み合わせが極めて重要

ヘムとミトコンドリアの関係は？

ヘムはミトコンドリア呼吸鎖複合体II, III, IVおよびシトクロムcを構成



5-ALA 体内での動態

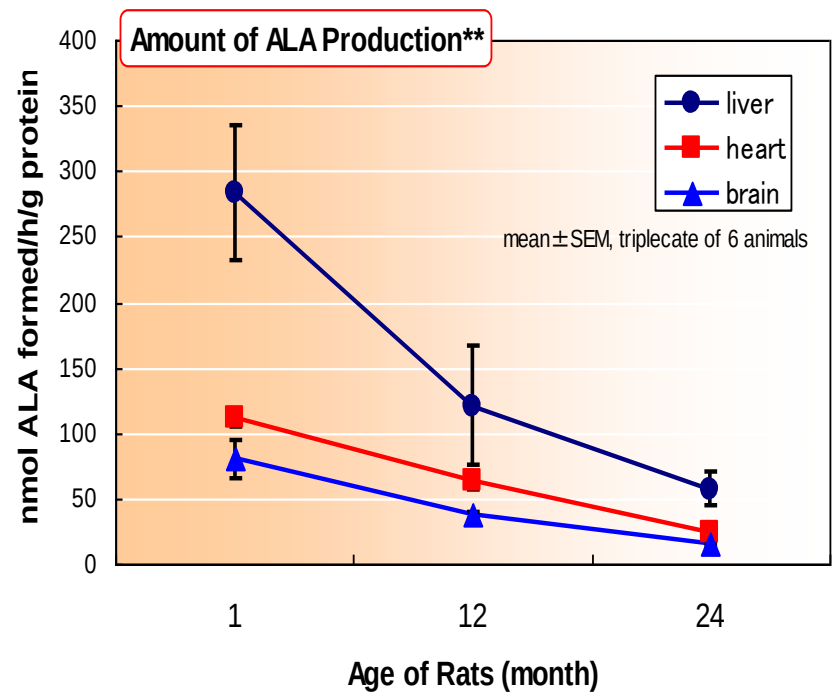


食材	5-ALA 含有量 (mg/kg)	発酵製品	5-ALA 含有量 (mg/kg)
タコ	1.0	パン用酵母	140
椎茸	0.60	焼酎粕	70
イカ	0.50	酒粕	9-26
バナナ	0.40	酒類・他	5-ALA 含有量 (mg/L)
ピーマン	0.23	料理酒	0.3-13
ほうれん草	0.18	みりん	0.4-6
トマト	0.13	酒	0.9-4.5
牛ひき肉	0.13	酢	0-1.5
じゃがいも	0.12	ワイン	1.22-1.4
		しょうゆ	0.3

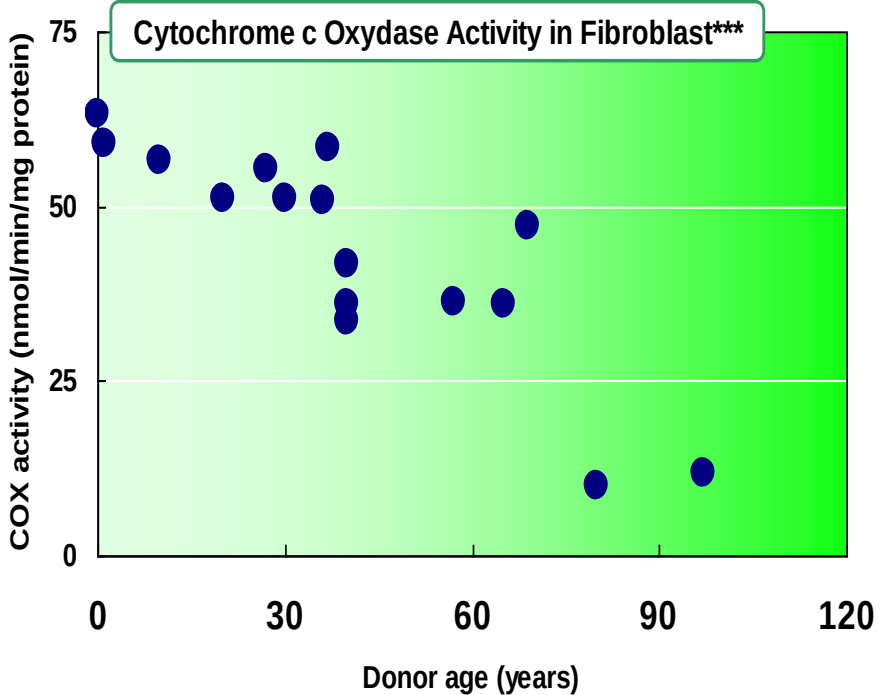
Rodriguez, B.L., et al (2012) *Crin Transl Schi*, 5, 314-20.

ALAを生産する能力は年齢に従って減少

生物が体内でALAを生産する能力は、
加齢に伴い減少する



酸素呼吸に必要なCOX活性 (complex IV)
も年齢に従い減少する



ヘム合成の律速段階であるALAが減少するため、ヘムも欠乏

* Atemna *et al* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14807–14812
** based on data from Paterniti *et al* (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* **191**, 792–797
*** Traced and modified from Jun-Ichi Hayashi *et al* (1994) *J Biol. Chem.* **269**, 6878–6883

ヘム欠乏は老化の原因の一つ

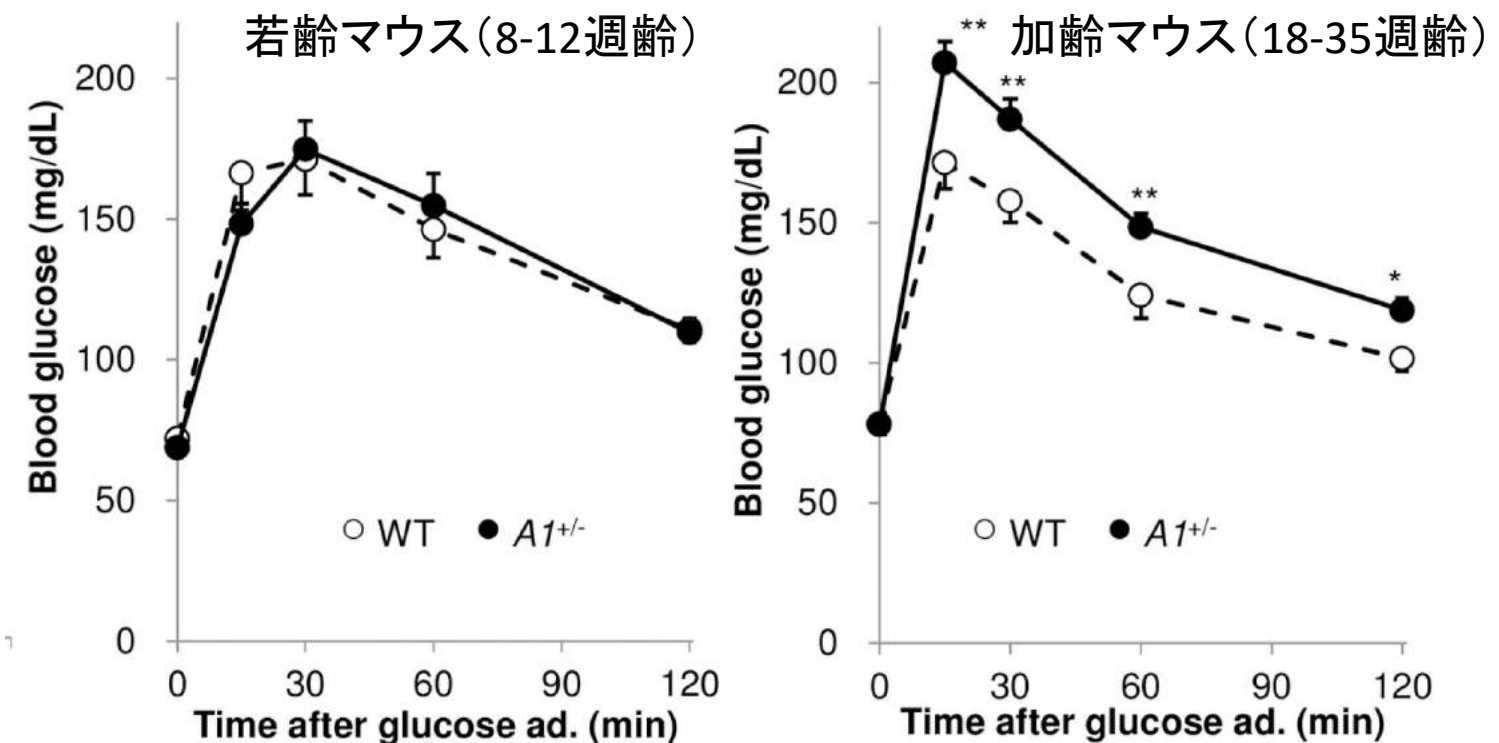
	ヘム欠乏症	加齢／神経変性
Complex IV活性	低下	低下
鉄	蓄積	蓄積
酸化ストレス	上昇	上昇
アミロイド前駆体タンパク質	二量体形成・凝集	二量体形成・凝集
NO合成酵素活性	上昇	上昇
細胞周期・分化	分化・増殖障害	アクソン消失, 神経細胞死
代謝	低下(ミトコンドリア)	低下
Ca代謝	障害	障害
フェロケラターゼ活性	上昇	上昇(老化細胞)
ヘム合成能	低下	低下

H Atamna., *et al*/(2012) *PNAS* **99**, 14807–12

ヘム欠乏症の症状は老化の諸症状と類似している

ALA不足は年齢依存的に糖代謝異常を引き起こす

ALA合成能低下マウスに対する糖負荷試験 (ALAS1ヘテロノックアウトマウス)

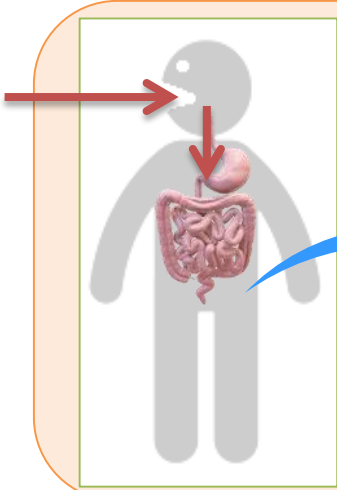


Saitoh S., et al (2018) *PLoS One* 13, e0189593

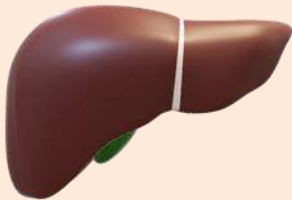
ALA、ヘム合成失調が糖代謝調節に関与している可能性

ALAの経口摂取後の体内動態

外生
5-ALA



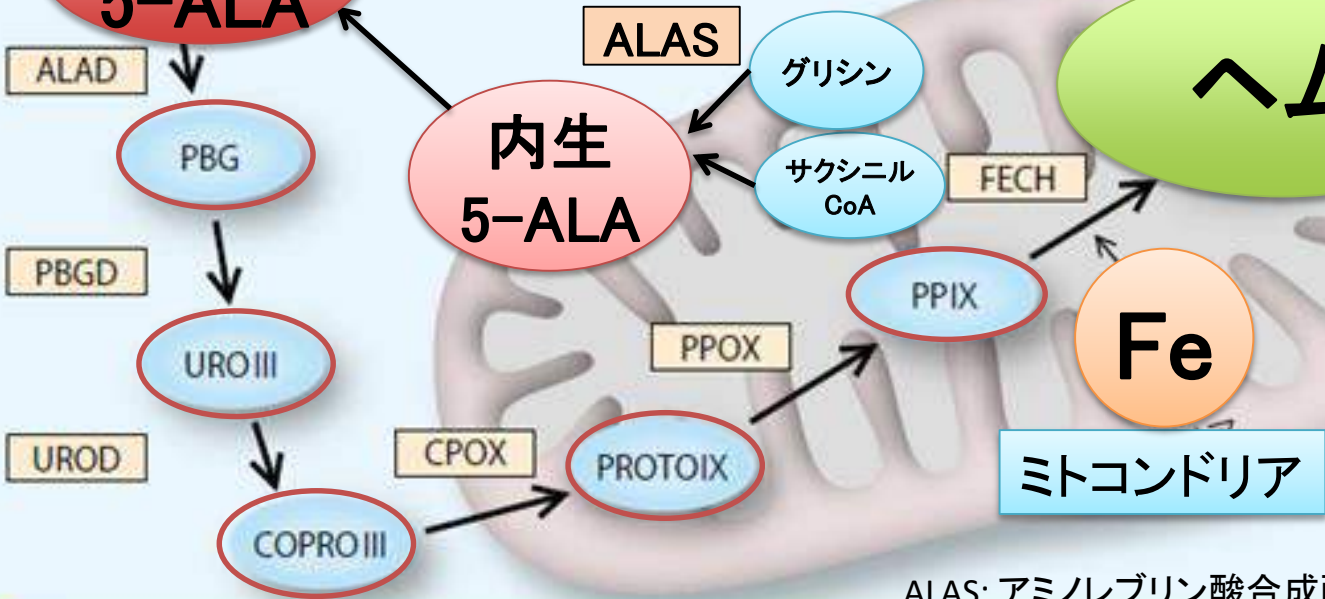
経口投与した5-ALAは上部消化管でほぼ全て吸収され
全身に分布、血液脳関門も通過。



細胞

外生・内生
5-ALA

PEP-T1等のペプチドトランスポーターで細胞内に取り込まれ、ポルフィリン代謝経路を経てミトコンドリアへ送達。

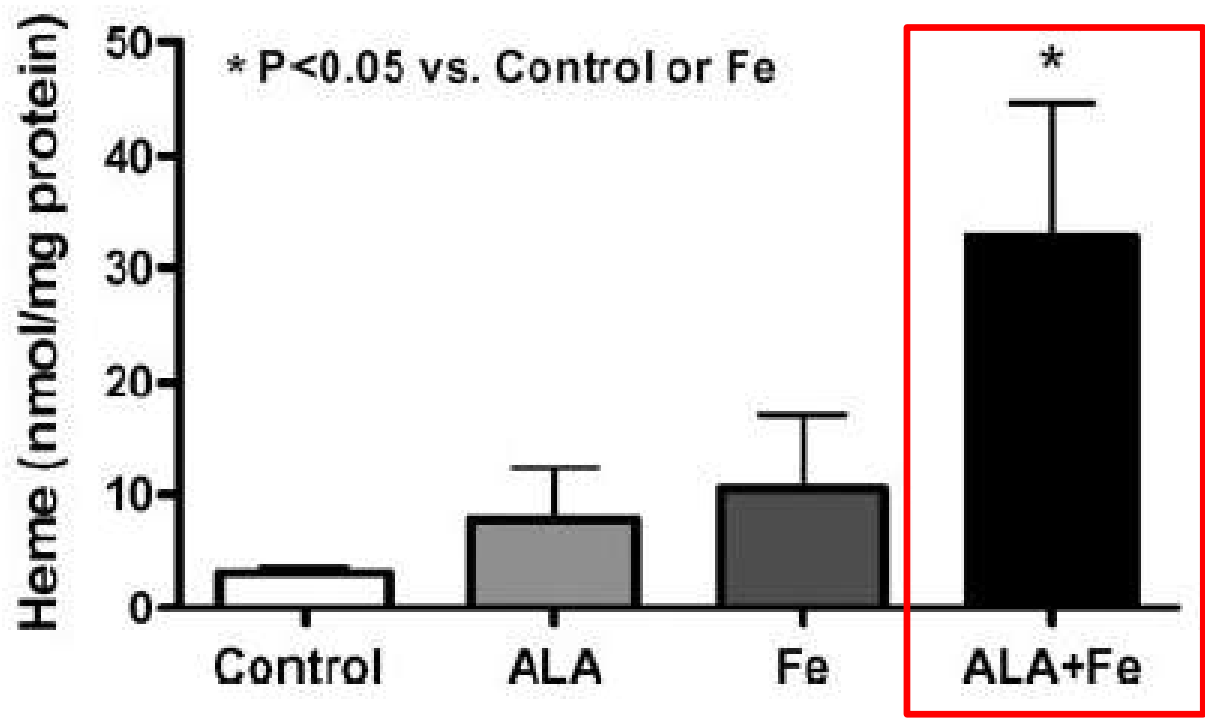


※ヘムそのものを投与すると、分解酵素が強く誘導され、分解されてしまう。

ALAS: アミノレブリン酸合成酵素

ALA + 鉄の投与でヘムが増加

ウシ肺動脈細胞に0.1 mM 5-ALA, Feを投与



Organ culture: The bovine pulmonary arteries cultured overnight with the each compound at 37°C.

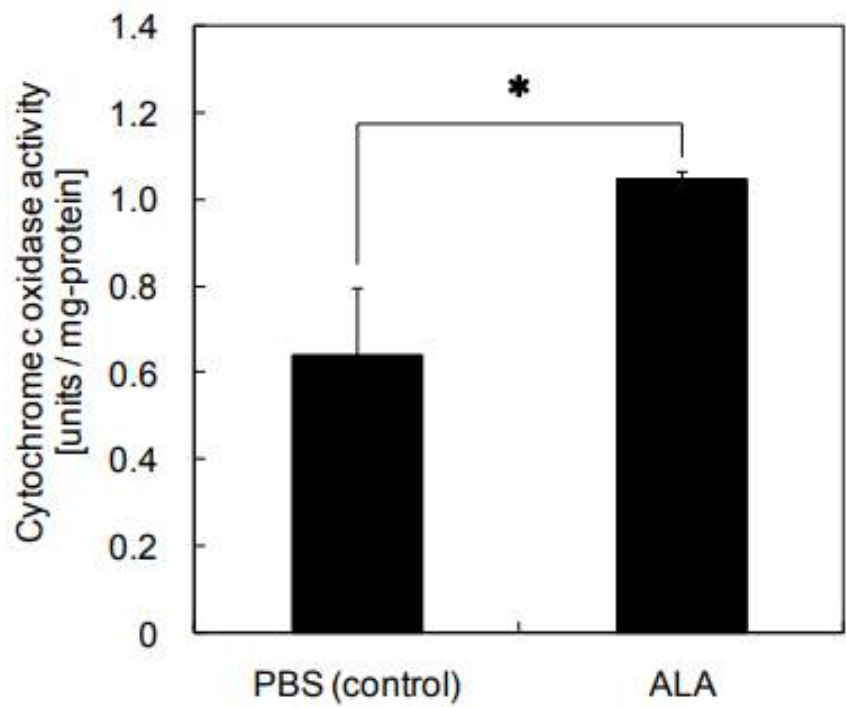
※ヘムそのものを投与すると、ヘム分解酵素(ヘムオキシゲナーゼ1)が強く誘導され、分解されてしまう。

Mingone, C.J., et al (2006) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L337-344

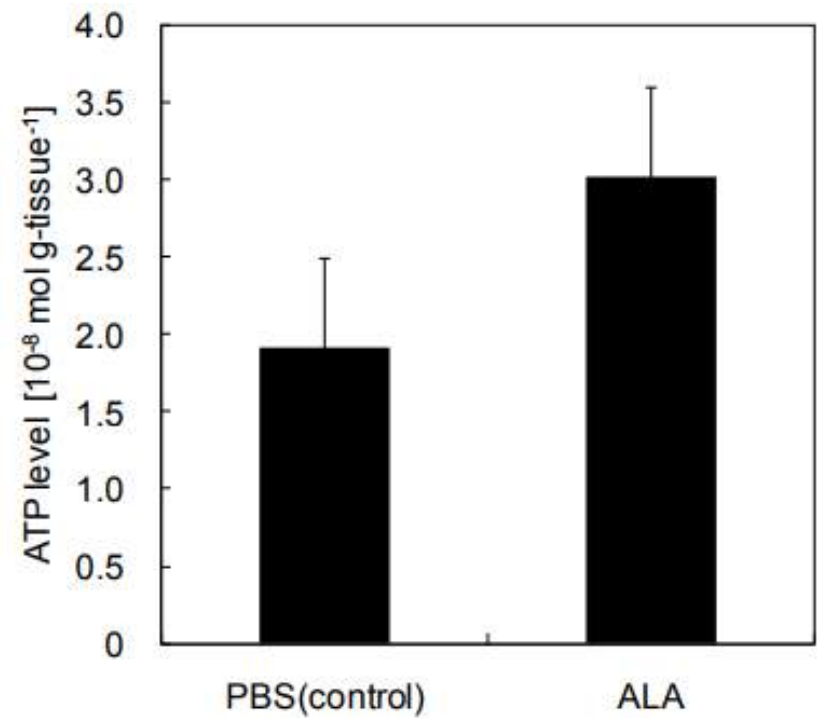
ALA + 鉄の投与でcomplex IV, ATP産生量が増加

マウスに15週間 10 mg/kg 5-ALAを経口投与

肝 Complex IV 活性



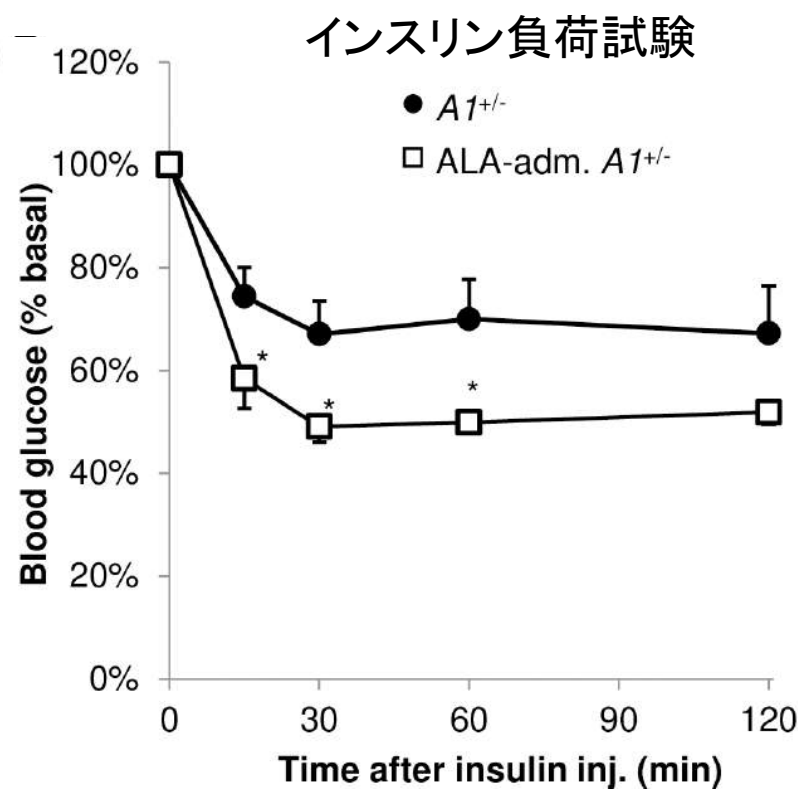
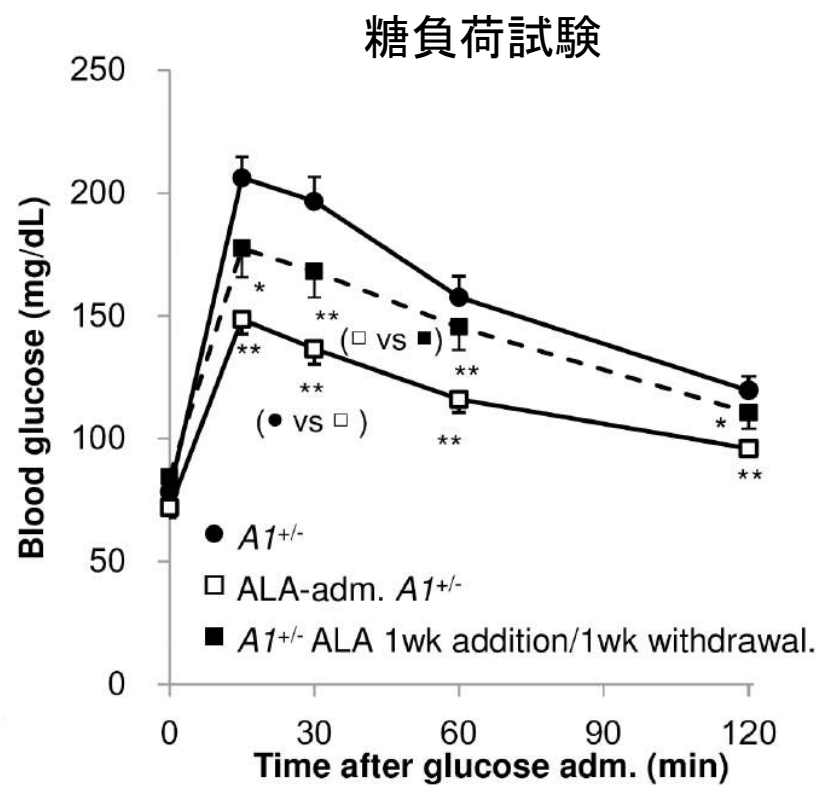
肝 ATP産生量



* : Student's t-test P<0.05

ALA経口投与で、耐糖能、インスリン応答性が回復

ALA合成能低下マウス(耐糖能異常)に対してALA(300mg/kg)を1週間投与

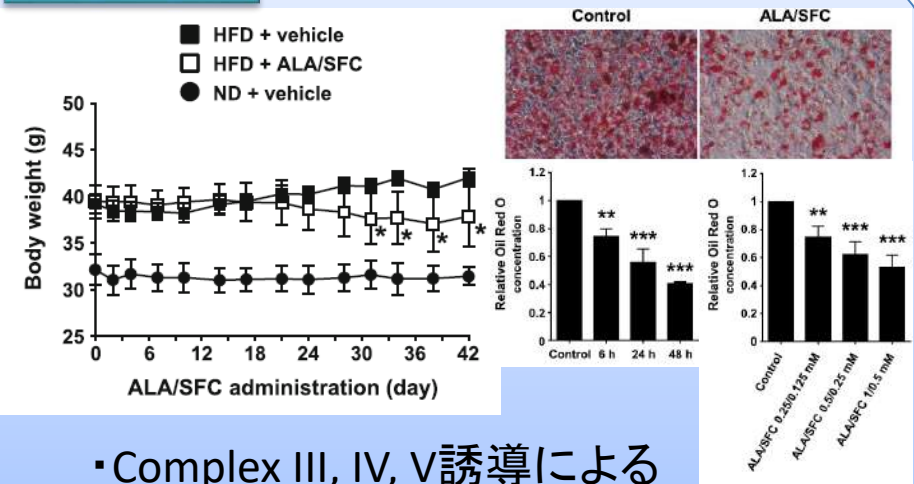


Saitoh S., et al (2018) *PLoS One* 13, e0189593

ヒトにおいてもALA投与により食後血糖値とHbA1cが改善することが報告されている

その他のALA摂取による効果

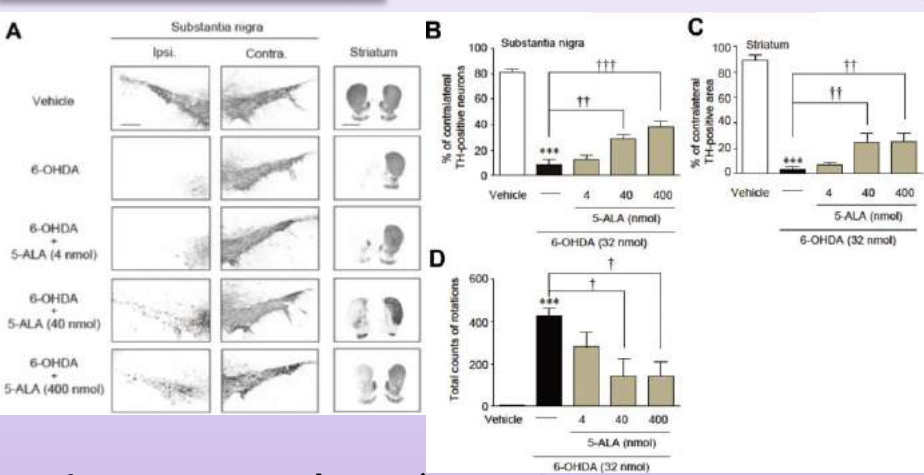
脂質代謝



・Complex III, IV, V誘導による脂質代謝能の改善、体重減少

Ota U., et al (2017) BMC Pharmacol Toxicol 18:7

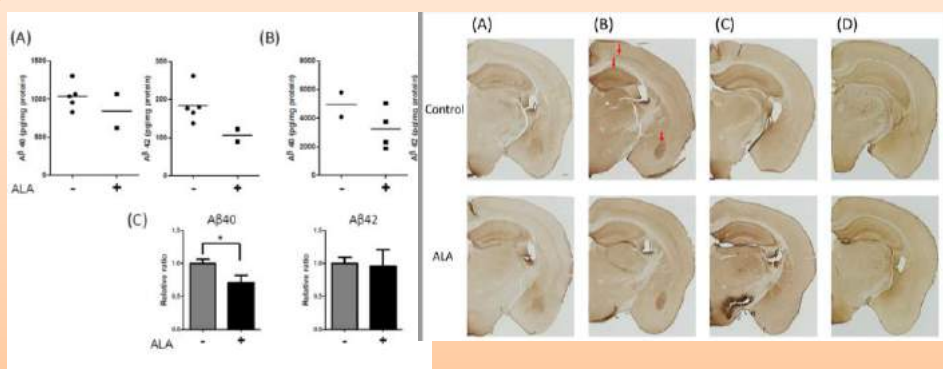
パーキンソン病



・パーキンソン病モデルマウスにおいて神経保護作用あり

Hijioka M., et al (2020) J Pharmacol Sci 144:183-187

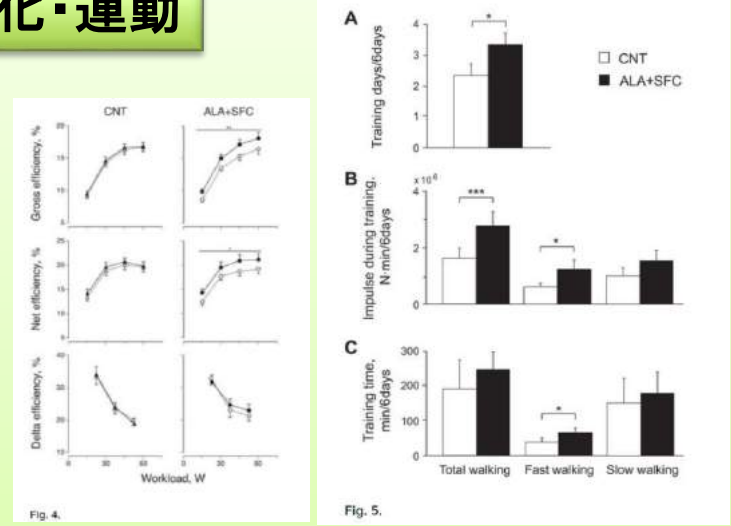
アルツハイマー病



・ミトコンドリア機能維持により、アミロイドβペプチド減少

Omori C., et al (2016) Nutritional neuroscience 20, 538-546

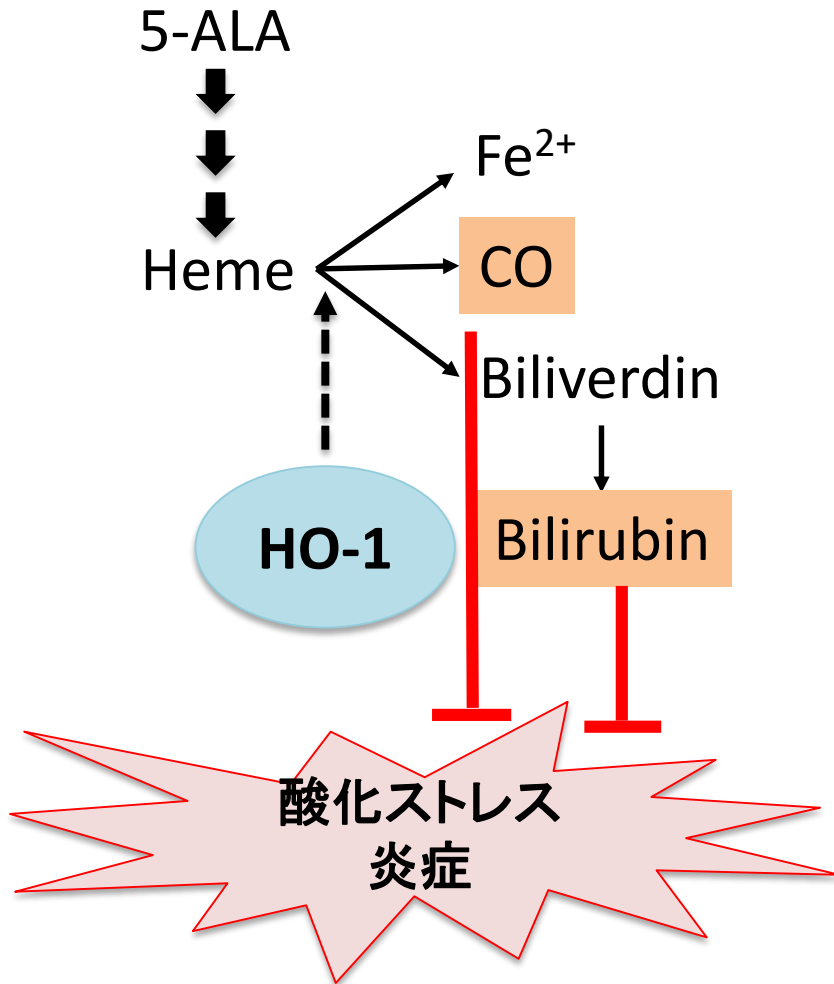
老化・運動



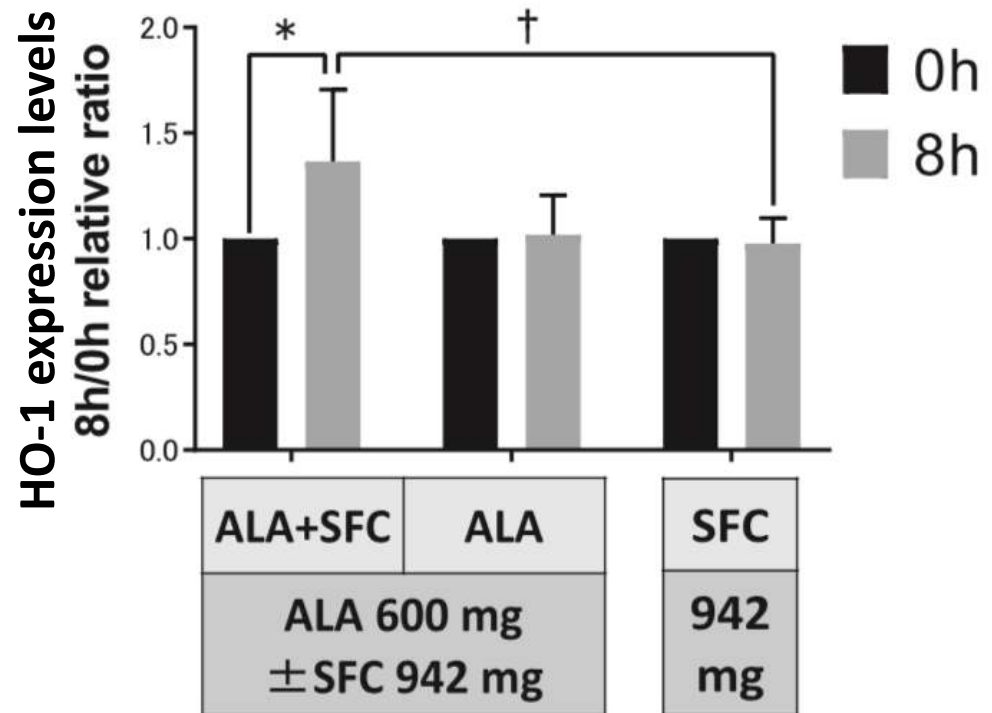
・高齢女性において、運動効率を改善。

Masuki S., et al (2016) J Appl Physiol 120, 87-96

ヘム分解産物である
CO, Bilirubinは
抗酸化、抗炎症作用をもつ



ALA/SFCは、HO-1発現を誘導



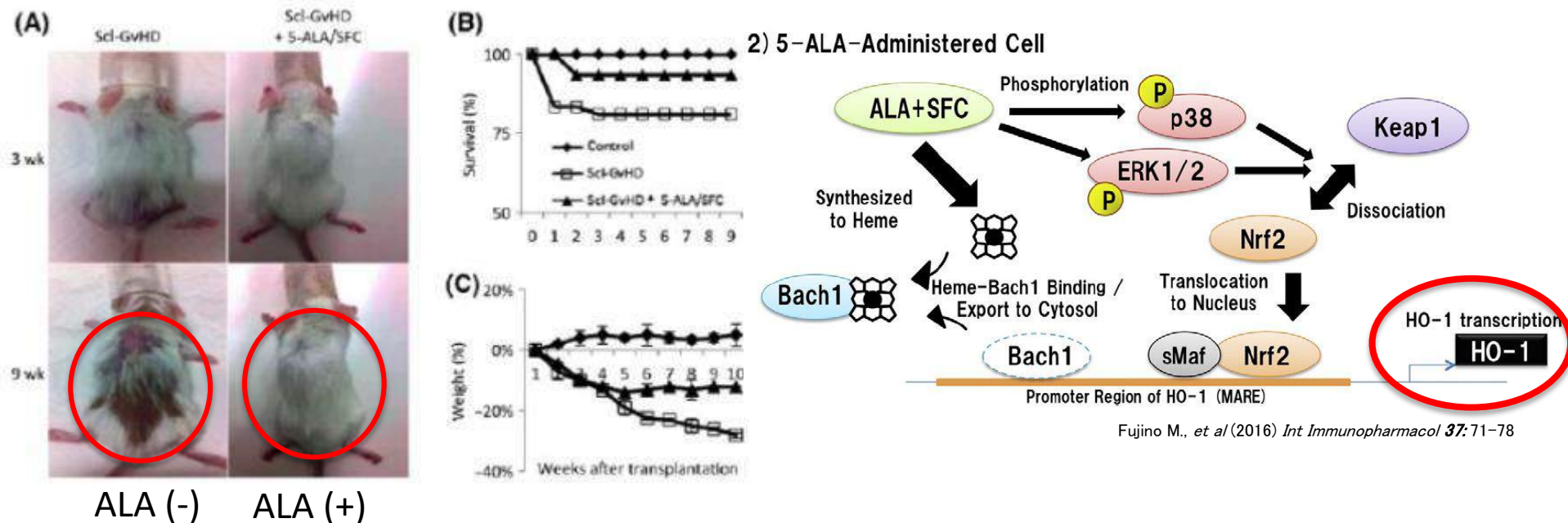
SFC: クエン酸第一鉄ナトリウム

Ito et al. Eur J Pharmacol. 2018;833: 25-33

5-ALA/SFCがGVHD誘発性強皮症の発症を抑制

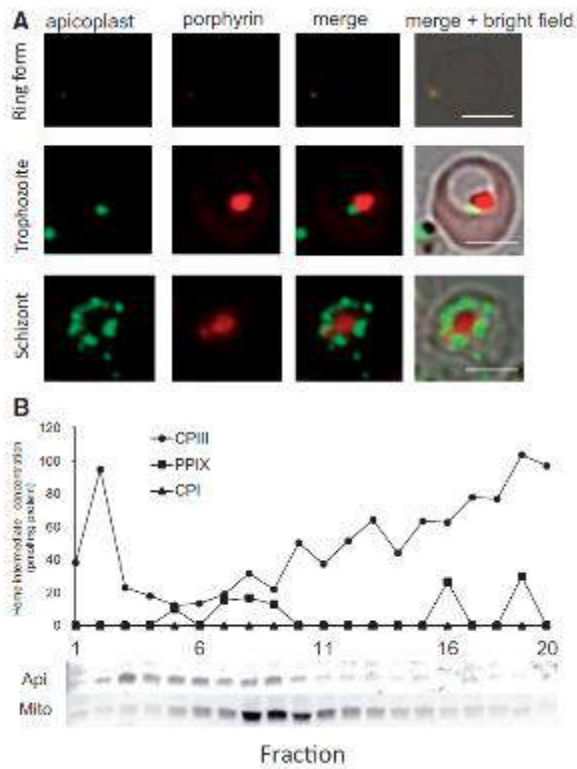
GVHDモデルマウスに5-ALA/SFCを投与

※GVHD(移植片対宿主病): 移植された免疫細胞が、患者さんの正常な臓器を攻撃。



- HO-1の誘導を介して、TGF- β , 炎症性サイトカイン, I型コラーゲンの産生を抑制し、GVHD誘発性強皮症の発症を抑制した。

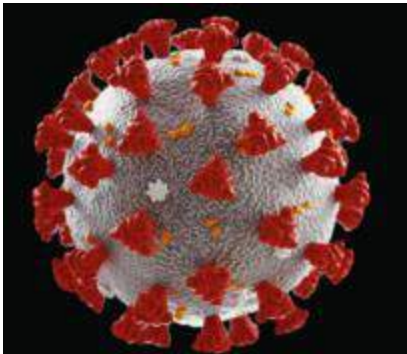
マラリアの増殖を阻害



- 5-ALAとSFC投与によりヘム中間代謝産物がマラリアに異常蓄積し、活性酸素を誘導することで、マラリアの成育を阻害。

Komatsuya K et al. (2013) J. Biochem. 154: 501-504

SARS-CoV-2の感染抑制効果





国立大学法人
長崎大学
NAGASAKI UNIVERSITY



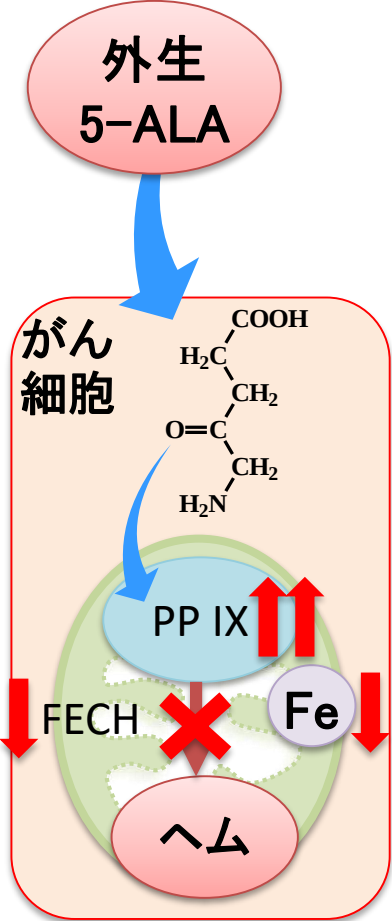
neopharma Japan

報道機関各位

2020年10月29日
国立大学法人長崎大学
ネオファーマジャパン株式会社

長崎大学による新型コロナウイルス感染症（COVID-19）患者に対する
5-アミノレブリン酸（5-ALA）を用いた特定臨床研究開始のお知らせ

- 細胞を用いた実験で、5-ALAがSARS-CoV-2の感染を阻害。
- ヒトのCOVID-19感染症を対象に特定臨床研究が進められている。



膀胱がんに対する5-アミノレブリン酸による
蛍光膀胱鏡を用いた光線力学診断

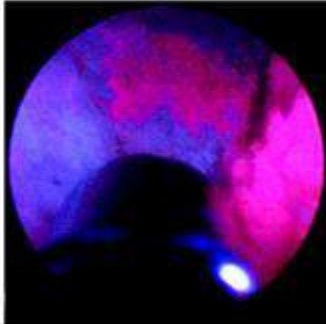
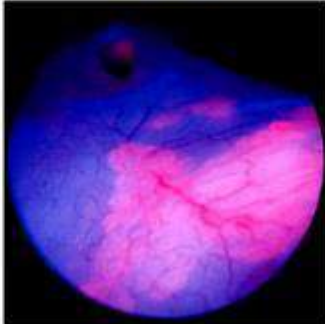
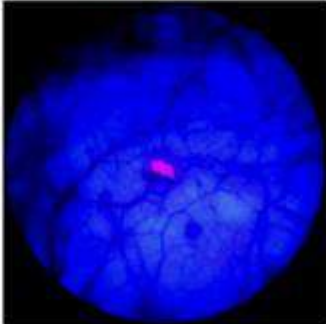
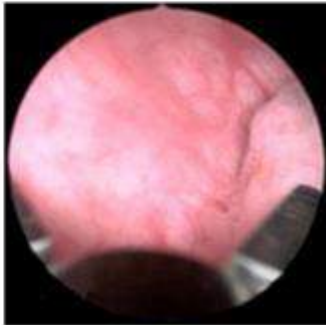
微小ながん

平坦ながん

隆起がん
に連続する
平坦ながん

従来の膀胱鏡
による観察

蛍光膀胱鏡
による観察



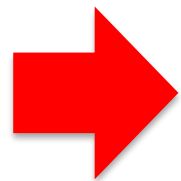
- がん細胞では5-ALA投与により
PPIXが蓄積

<https://tmdu.tokyo/advanced/pdd.html>

- ヘムの前駆体であるプロトポルフィリンIXが蓄積し、その光感受性を利用した癌の
診断や、光照射により活性酸素を発生させることでがん細胞を死滅させる技術が
実用化されている。

5-ALAの明らかにされている効果

- 糖・脂質代謝、神経変性疾患、加齢性変化、ミトコンドリア機能を改善。
- HO-1による細胞保護効果。
- マラリアの増殖抑制、SARS-CoV-2の感染抑制。
- がんの診断・治療薬として有効。
- 既に“サプリメント”として広く利用されている。



ミトコンドリア病に対する効果は？



Outline

1. 5-ALAとは？

-5-ALAの基礎知識

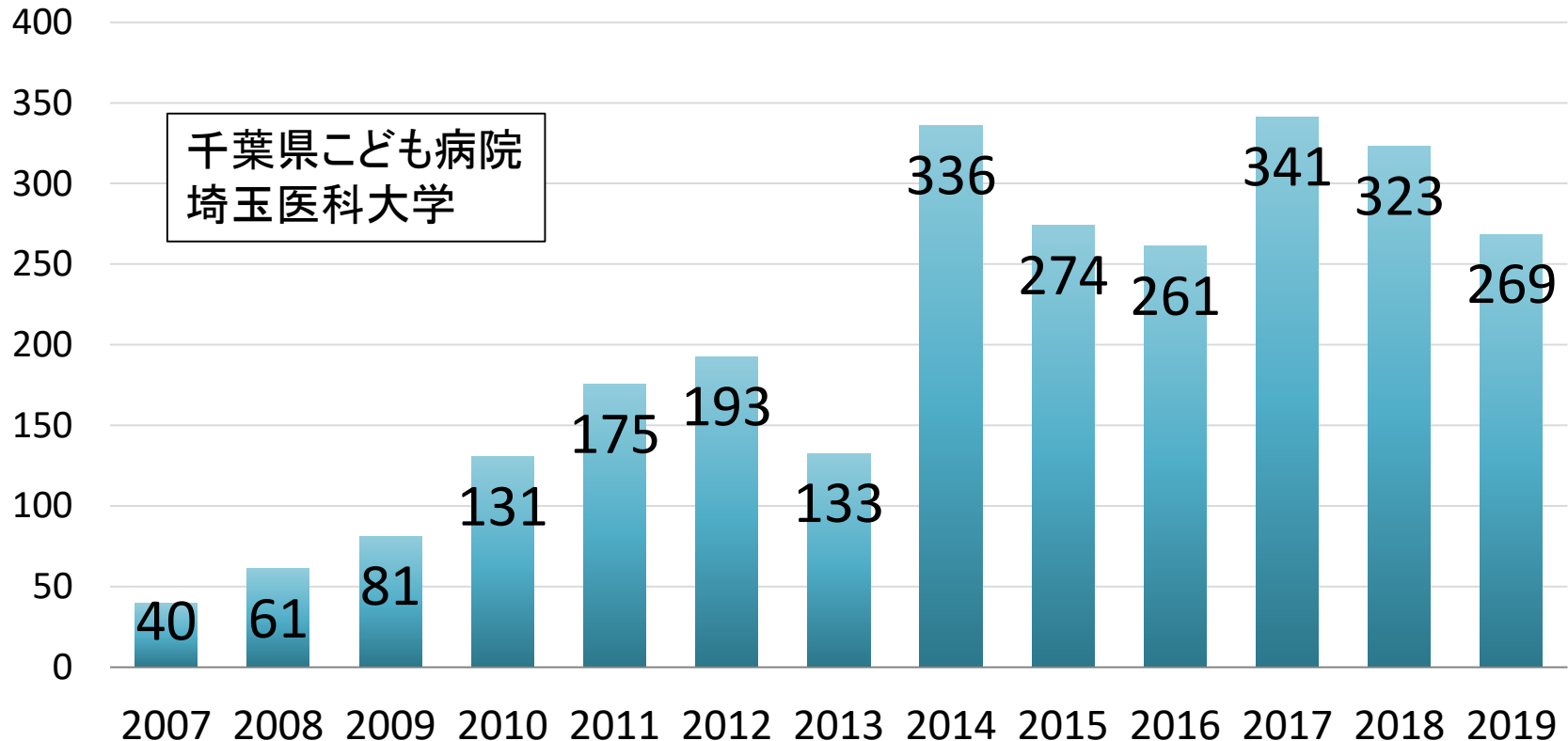
-5-ALAの医薬品応用

2. ミトコンドリア病に対する5-ALA の効果

3. Leigh脳症に対する医師主導治験

年間約300症例前後の依頼

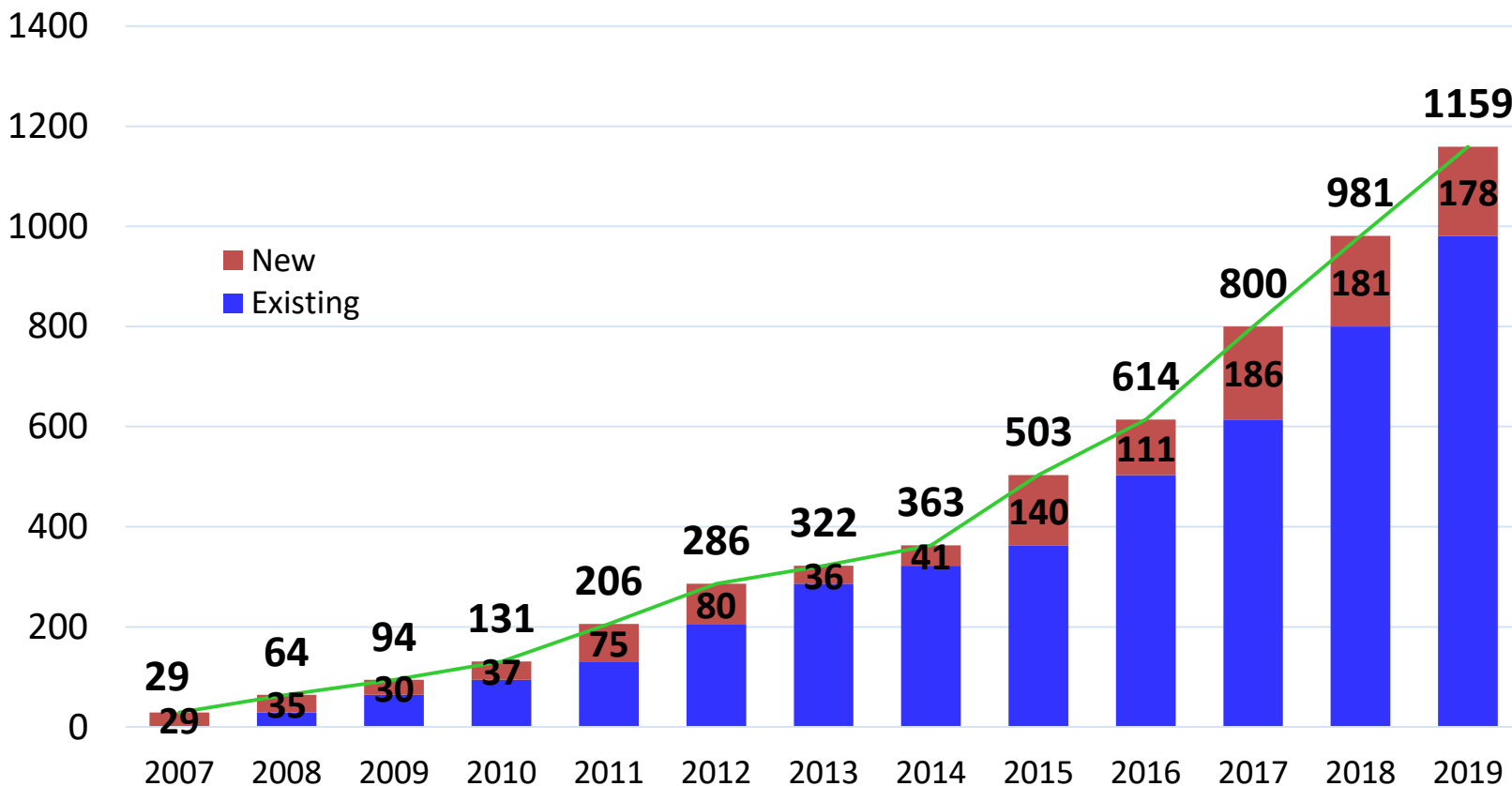
症例数



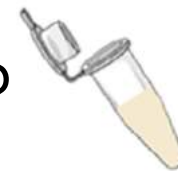
- 2021年1月までに、累計2800症例の各種組織、血液、尿サンプル等が送付され、解析が行われている。

1159例の臨床情報・生化学・遺伝子診断データ、サンプルが保存

症例数



- 800症例以上の皮膚線維芽細胞が保存されている



No.	ID	性別	発症年齢	臨床診断	酵素診断	遺伝子	遺伝子変異
1	Pt25	F	5 m	IMD	CI	ACAD9	c.811T>G:p.C271G/ c.1766-2A>G
2	Pt27	M	1 y	LS	CIV	SURF1	c.743C>A:p.A248D/ c.743C>A:p.A248D
3	Pt67	M	0 d	IMD	CI	NDUFB11	c.391G>A:p.E131K (hemizygous)
4	Pt100	M	8 m	ND	CI	NDUFV2	c.580G>A:p.E194K/ 2kb deletion
5	Pt101	M	11 m	LS	CI	NDUFAF6	c.371T>C:p.I124T/ c.805C>G:p.H269D
6	Pt276	M	1 y 11 m	MH	CI+IV	MRPS23	c.119C>G:p.P40R/ c.119C>G:p.P40R
7	Pt346	F	0 d	IMD	CI	ECHS1	c.176A>G:p.N59S/ c.476A>G:p.Q159R
8	Pt1177	F	9 m	LS	CI	NDUFV2	c.427C>T:p.R143X/ c.580G>A:p.E194K

IMD; 乳児ミトコンドリア病, LS; Leigh脳症, ND; 神経変性疾患, MH; ミトコンドリア肝症

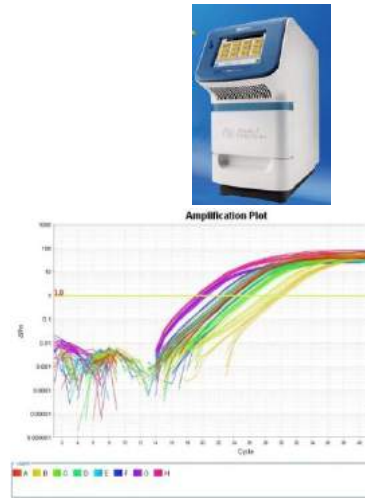
- 正常皮膚線維芽細胞と8例のミトコンドリア病患者由来線維芽細胞を用いて、5-ALAのミトコンドリア機能への効果を検討した。

実験方法

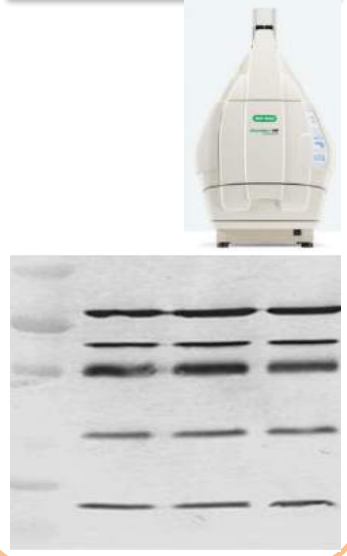


測定項目

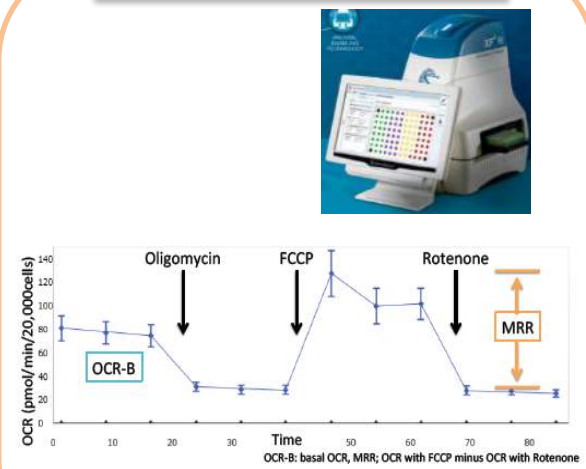
遺伝子発現



タンパク質発現



酸素消費量(MRR)



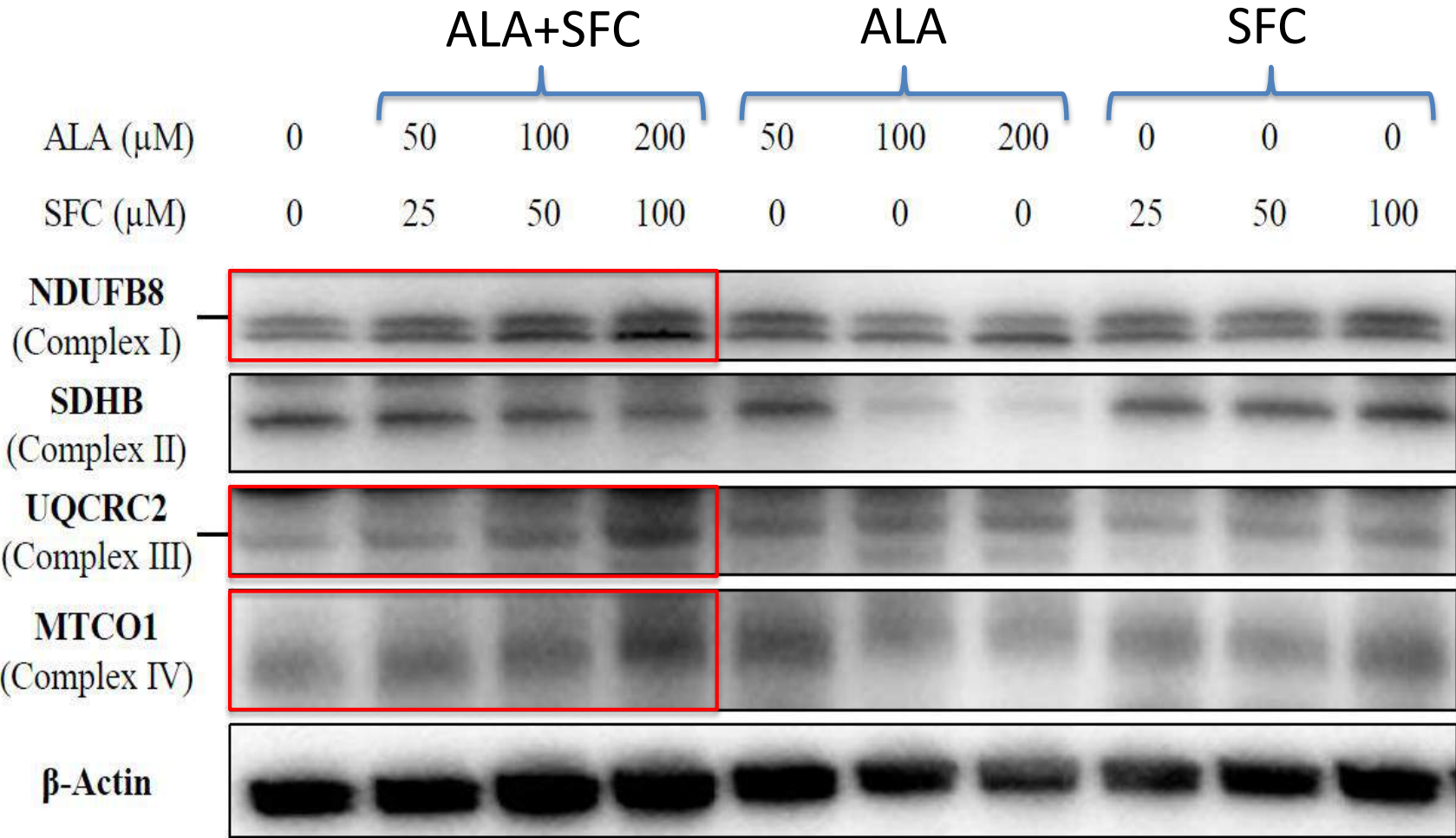
ATP測定



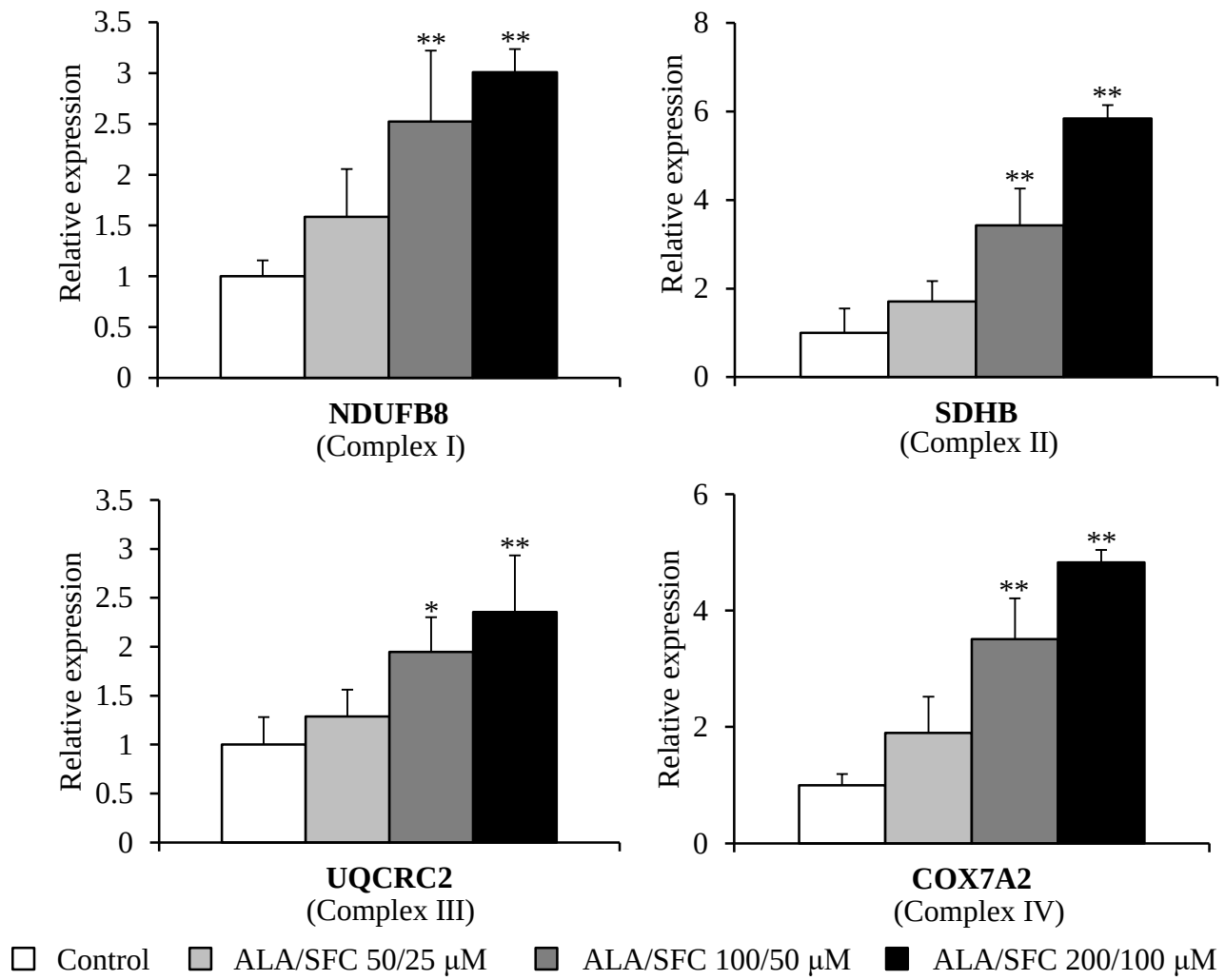
ATP + D-Luciferin+O₂
↓ (Luciferase)
Oxyluciferin
+AMP+PPi+CO₂+Light

OXPHOS関連蛋白・遺伝子発現、ミトコンドリア酸素消費量、ATP産生量、HO-1発現、mtDNAコピー数の解析を行った。

ALA+SFC投与でNDUFB8 (complex I), UQCRC2 (complex III), MTCO1 (complex IV) の蛋白の発現

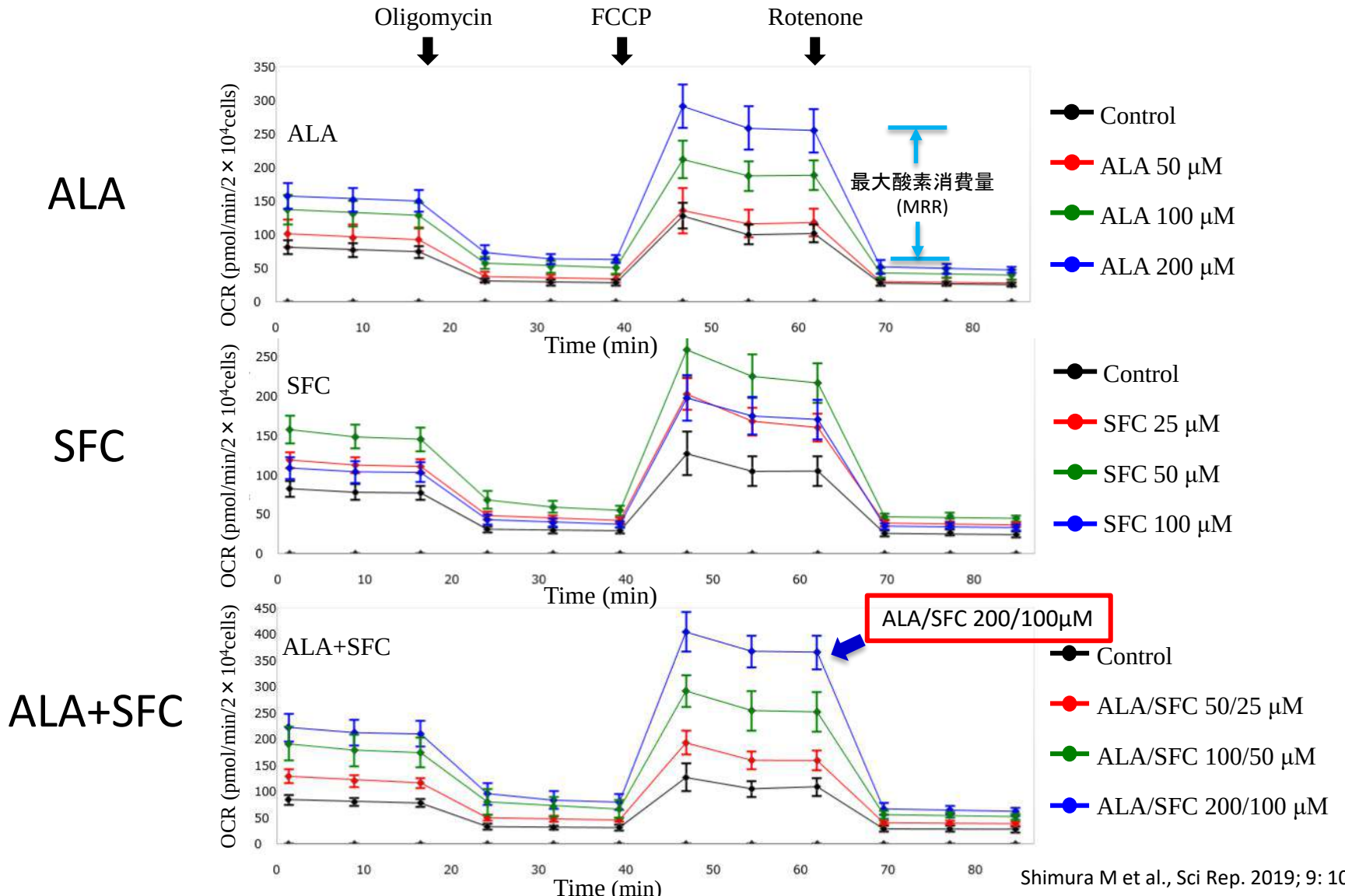


NDUFB8 (complex I), SDHB (complex II), UQCRC2 (complex III), COX7A2 (complex IV) 遺伝子発現は、ALA+SFCの濃度依存性に増加



正常皮膚線維芽細胞に対する5-ALAの効果 -酸素消費量-

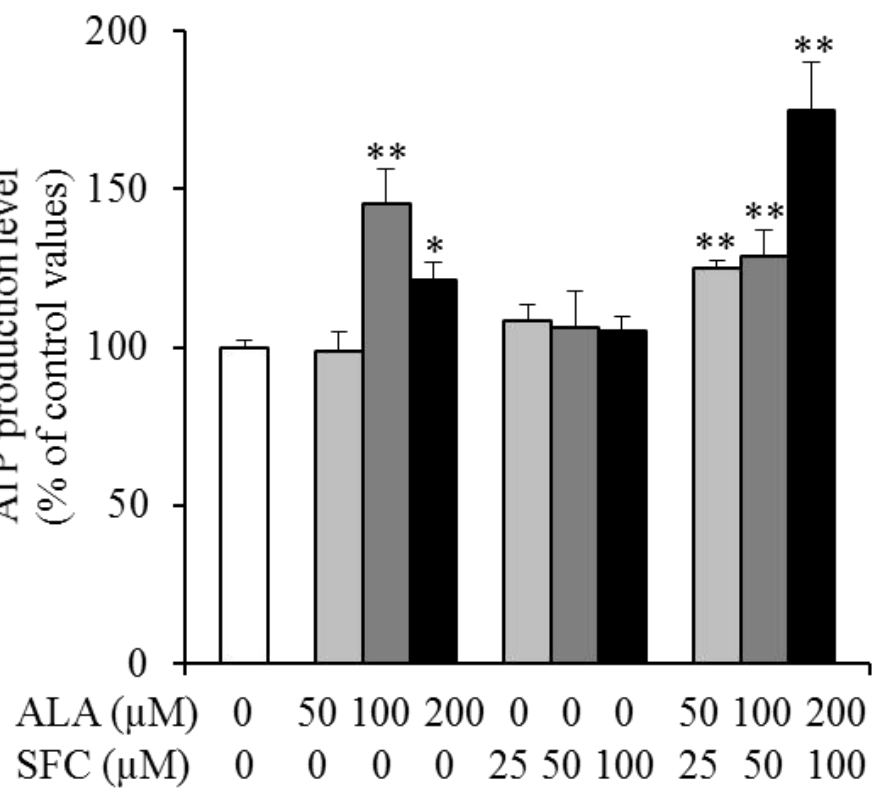
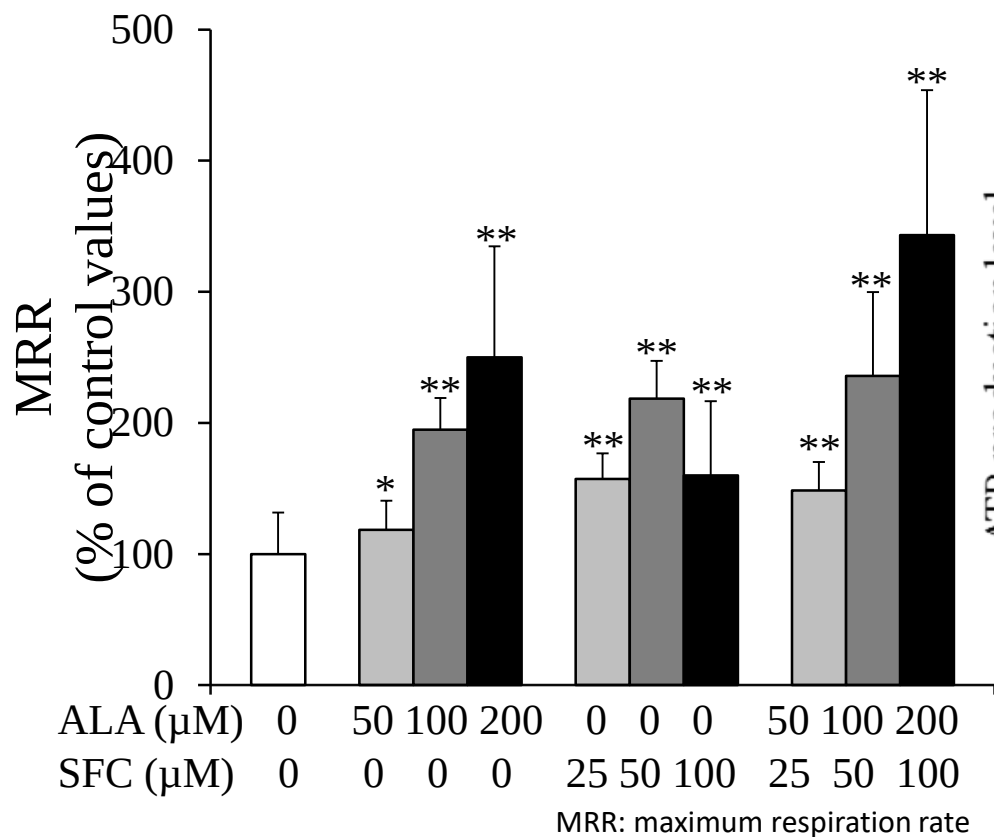
酸素消費量は全条件で上昇、ALA+SFCで最も改善



MRR, ATP産生量はALA+SFC (200/100 μM) で最も増加

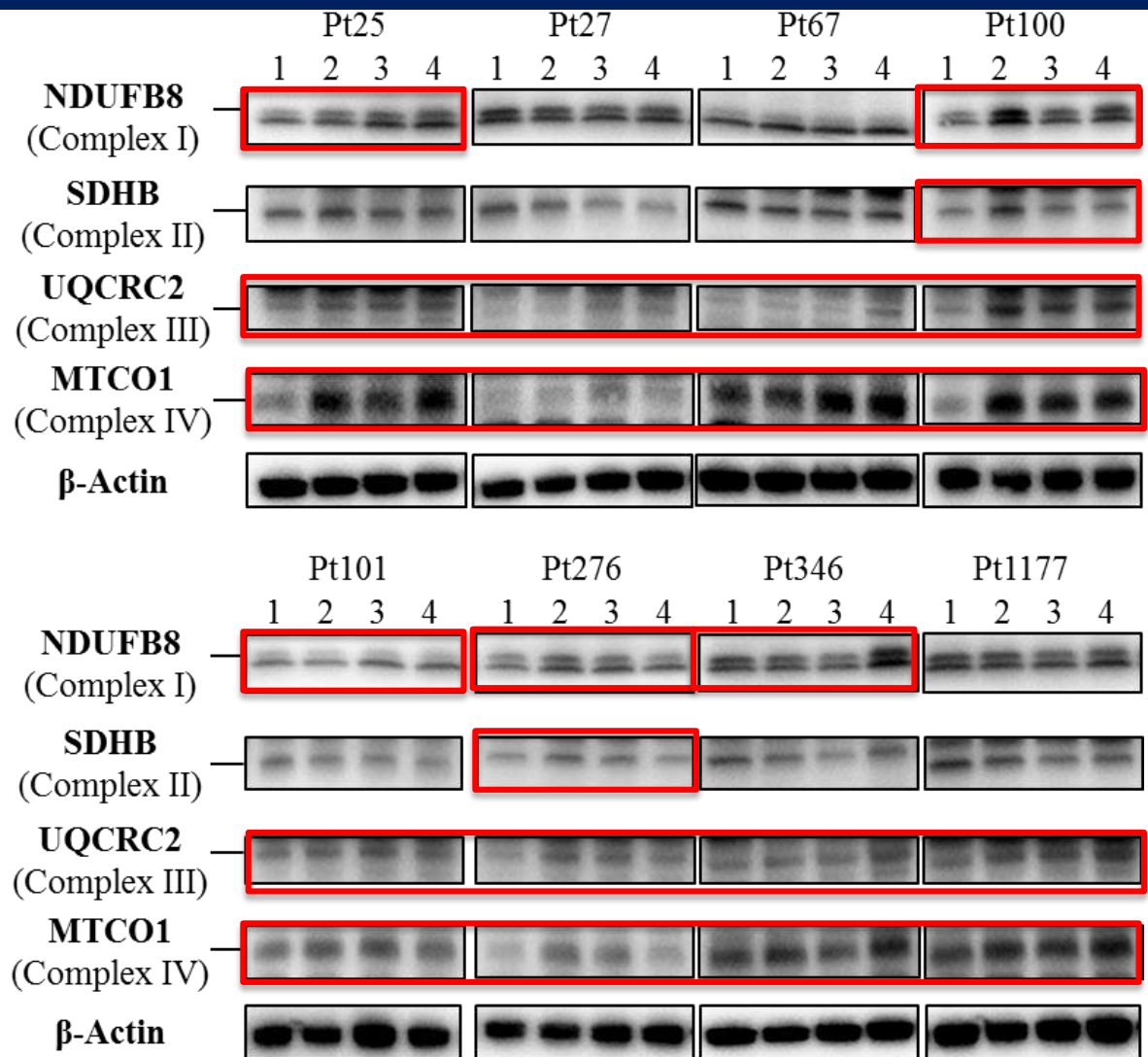
正常細胞におけるミトコンドリア酸素消費量(MRR)

正常細胞におけるATP産生量



- 全条件で上昇、ALA/SFC(200/100μM)において最も増加した。
- ATP産生量はSFC単独では増加せず、ALA/SFC(200/100μM)において最も増加した。

患者由来細胞においてもALA+SFCで呼吸鎖関連蛋白の発現亢進



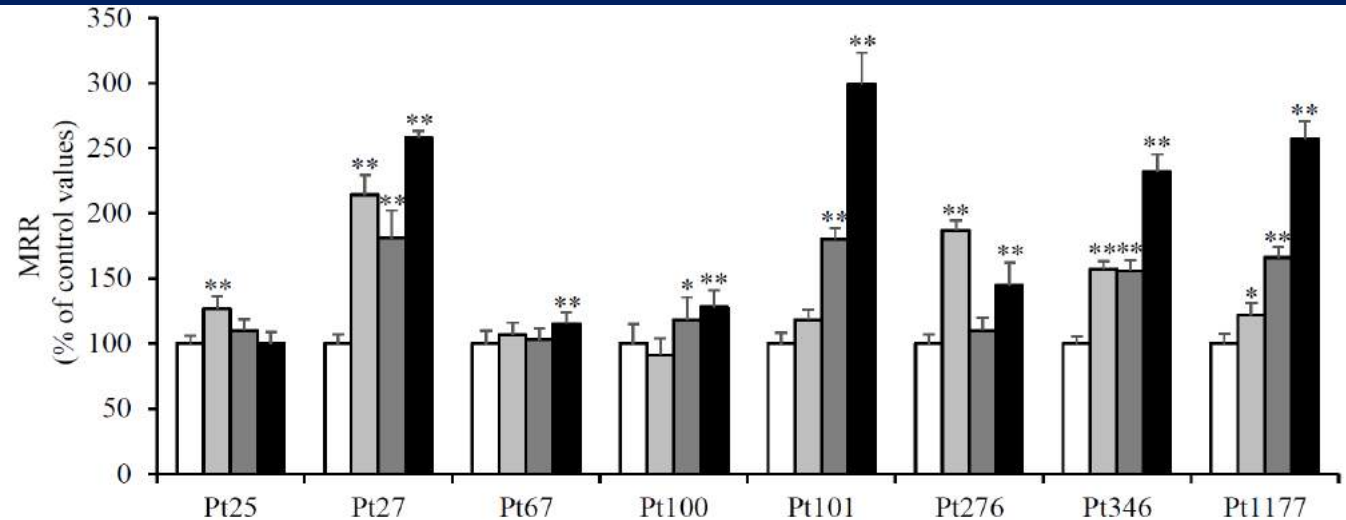
Lane	1	2	3	4
ALA (μM)	0	50	100	200
SFC (μM)	0	25	50	100

UQCRC 2 (Complex III), MTCO1 (Complex IV)は全ての患者細胞において発現が亢進。NDUF8 (Complex I)は5/8、SDHB (Complex II)は2/8症例で発現が増加した。

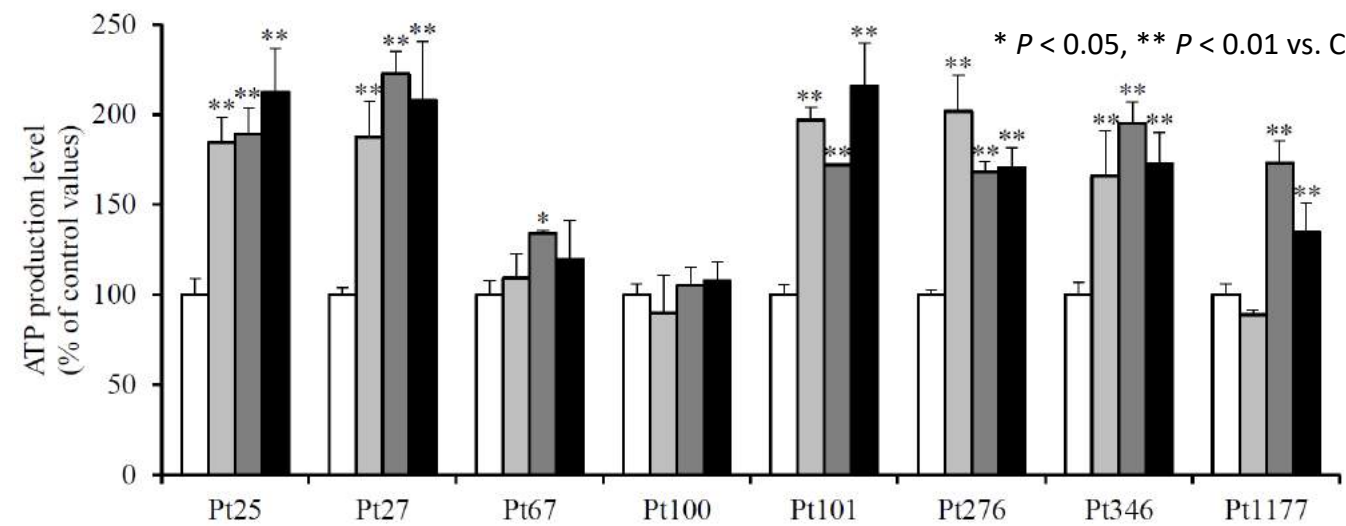
患者由来細胞に対する5-ALAの効果 -酸素消費量 (MRR), ATP産生量-

患者由来細胞においてもALA+SFCで酸素消費量, ATP産生量改善

酸素消費量



ATP産生量



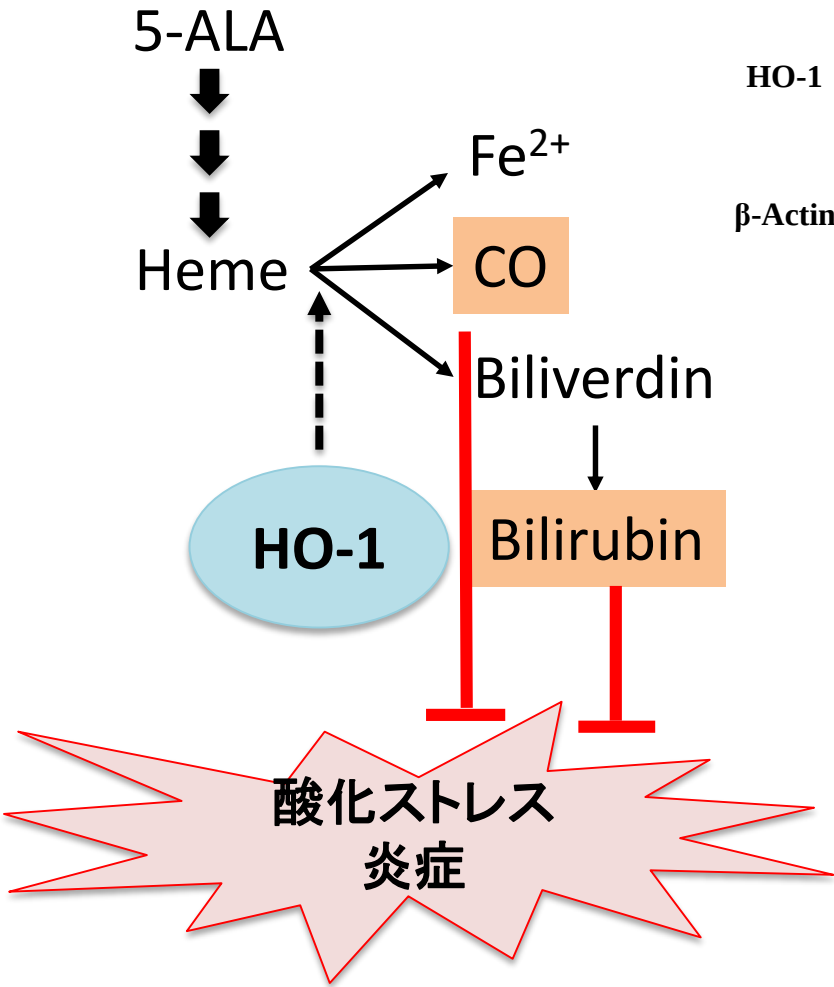
* P < 0.05, ** P < 0.01 vs. Control (Dunnett's test)

□ Control ■ ALA/SFC 50/25 μM ■ ALA/SFC 100/50 μM ■ ALA/SFC 200/100 μM

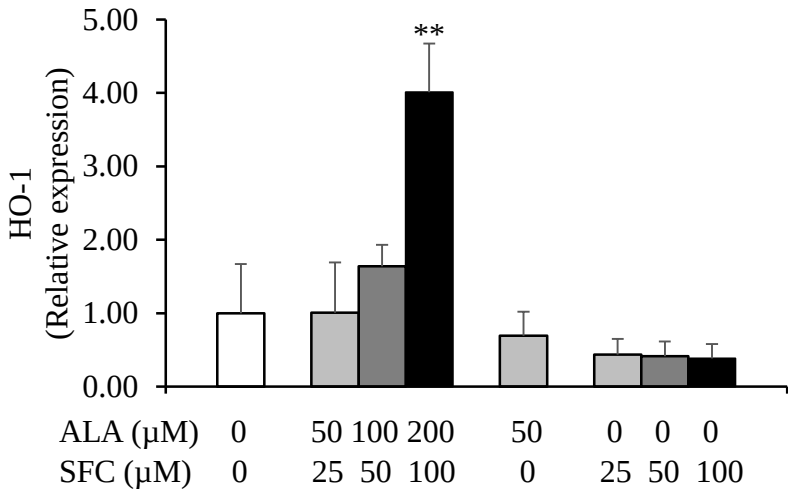
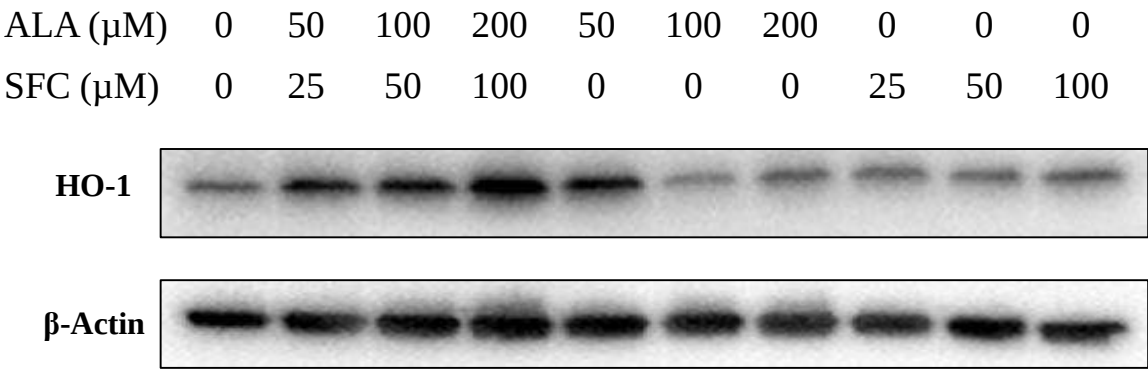
- ALA+SFC含有培地で培養された患者細胞では、全例でMRRの有意な上昇を認めた。ATP産生量は7/8症例で有意に増加した。

正常皮膚線維芽細胞に対する5-ALAの効果 -HO-1発現-

ヘム分解産物である
CO, Bilirubinは
抗酸化、抗炎症作用をもつ

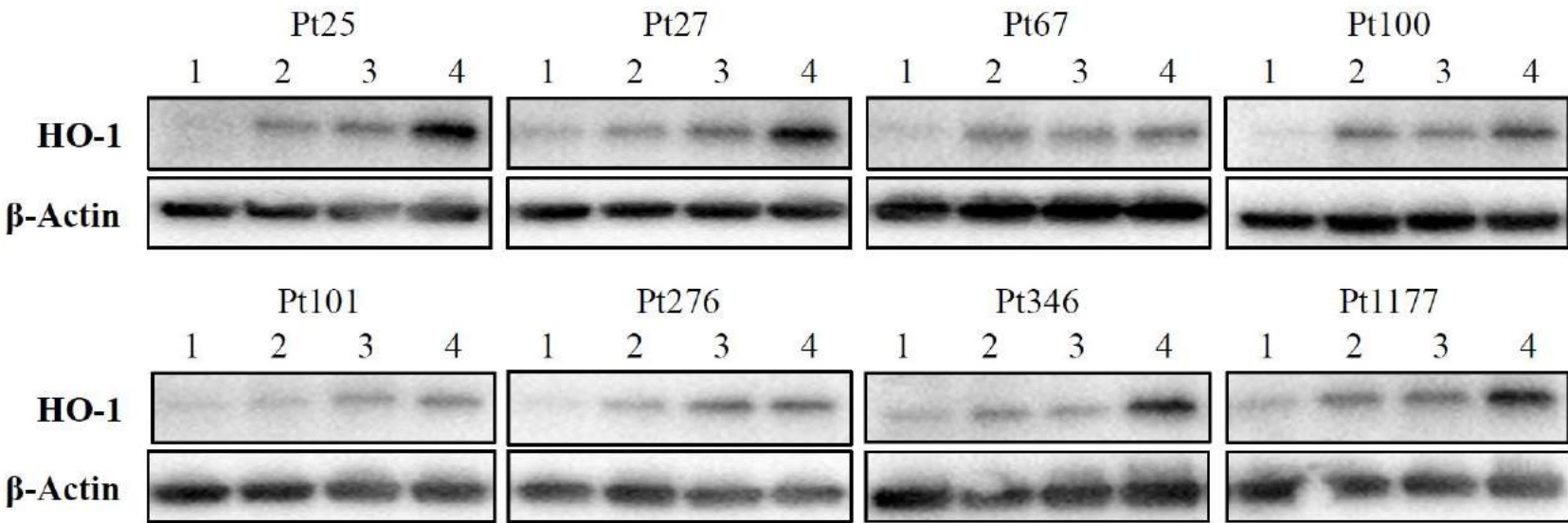


ALA+SFC濃度依存性にHO-1発現亢進



- ALA+SFC含有培地でHO-1蛋白、遺伝子の発現が亢進した。

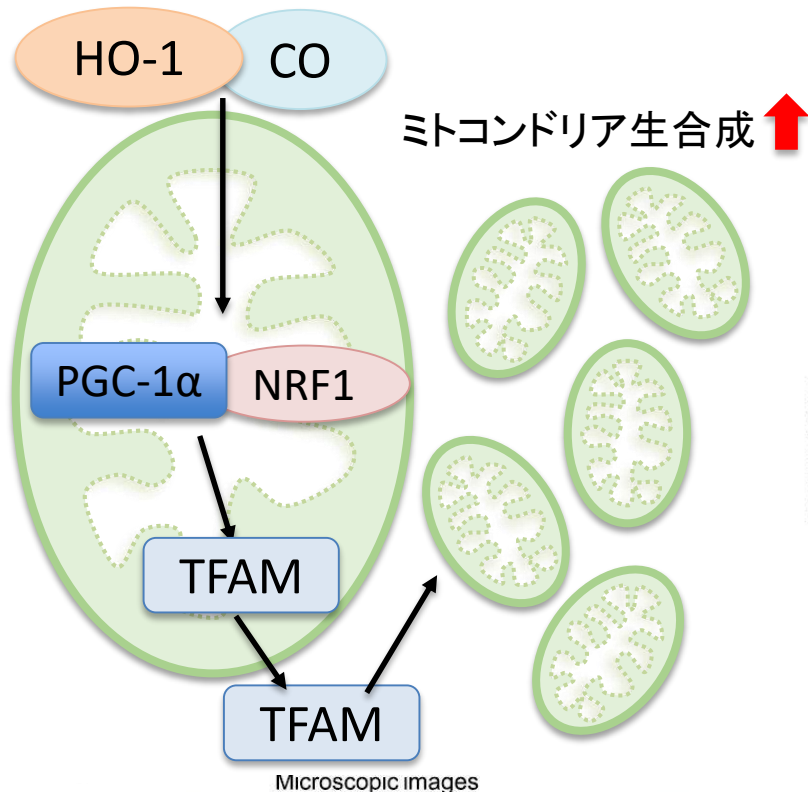
患者由来細胞においてALA+SFCでH0-1蛋白発現亢進



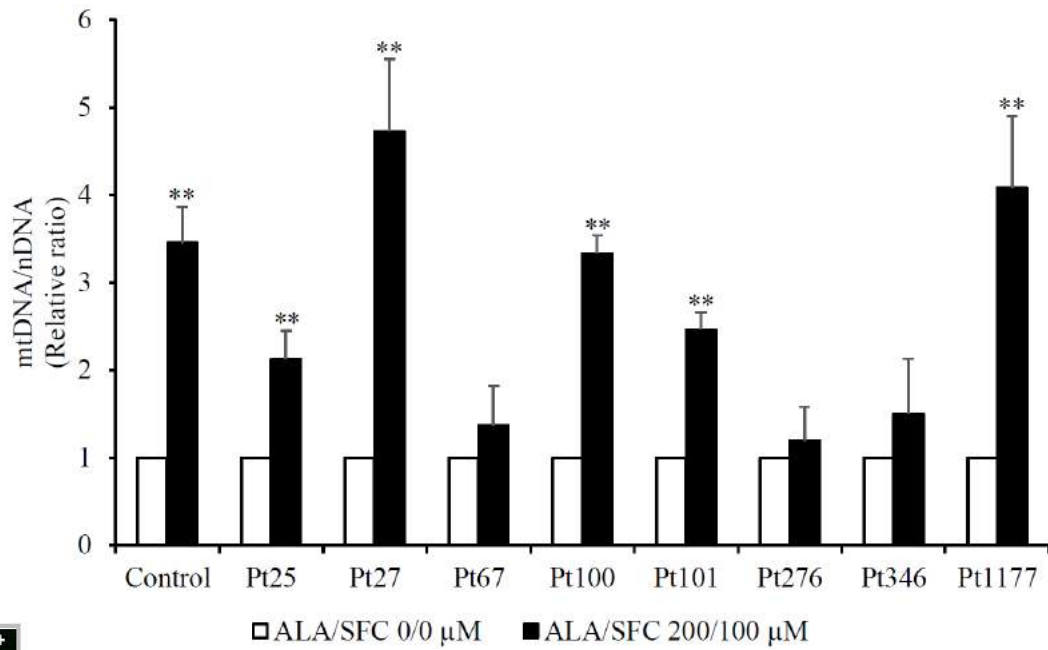
Lane	1	2	3	4
ALA (μ M)	0	50	100	200
SFC (μ M)	0	25	50	100

- 全ての患者由来細胞において、ALA+SFCの濃度依存性にHO-1蛋白の発現亢進が確認された。

患者細胞においてALA+SFCでmtDNAコピー数増加



ALA/SFCによるmtDNAコピー数の変化



mice

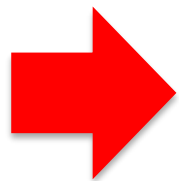
Hull, et al. JCI Insight 1, 85817 (2016)
Fujii C, et al. Sci Rep 21, 7, 4013 (2017)

- HO-1, COはミトコンドリアDNA転写因子であるPGC-1α, NRF1, TFAMの発現を亢進し、ミトコンドリア生合成を促す

- 正常細胞ではALA+SFCにより、約3.5倍 mtDNAコピー数が増加。
- 患者由来細胞では、5/8症例で有意にmtDNAコピー数が増加した。

ミトコンドリア病患者由来細胞に対する 5-ALA+SFCの効果のまとめ

- ミトコンドリア患者由来細胞において、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I～IVの発現亢進。
- ミトコンドリア酸素消費量、ATP産生量を指標としたミトコンドリア機能を改善。
- 抗炎症効果、酸化ストレスの軽減に関与するHO-1の発現亢進。
- ミトコンドリアDNAコピー数が増加。



実際のミトコンドリア病に対する
治療効果は？



Outline

1. 5-ALAとは？

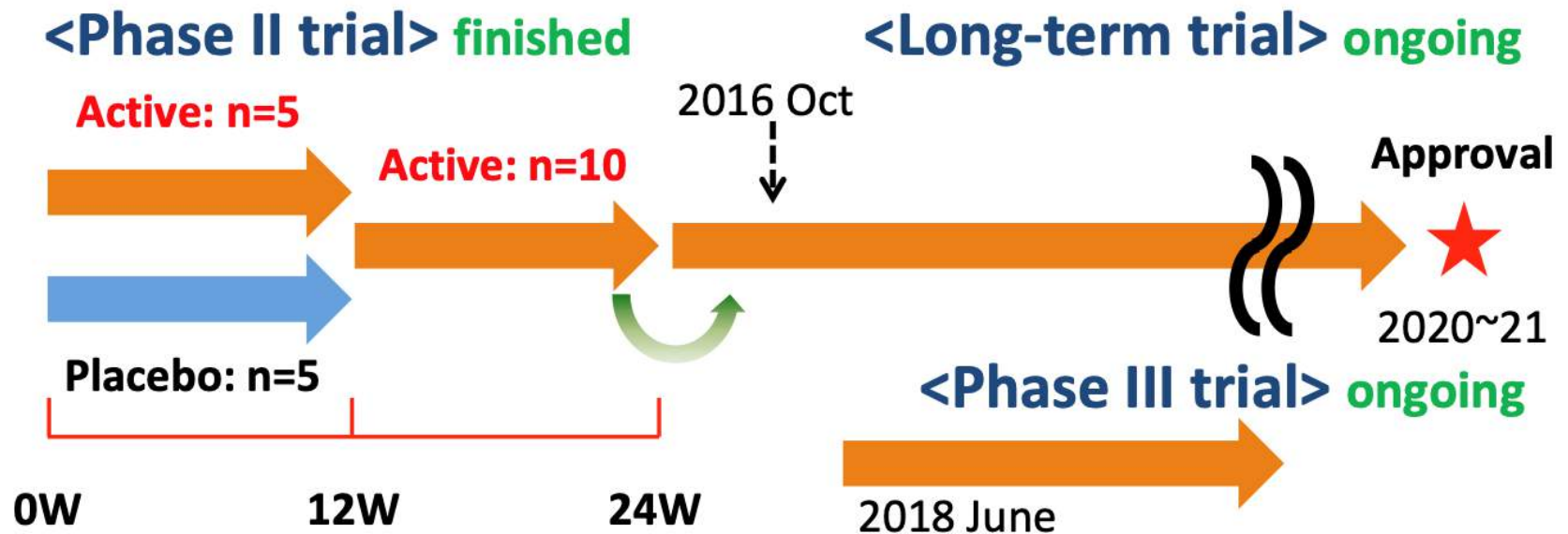
-5-ALAの基礎知識

-5-ALAの医薬品応用

2. ミトコンドリア病に対する5-ALA の効果

3. Leigh脳症に対する医師主導治験

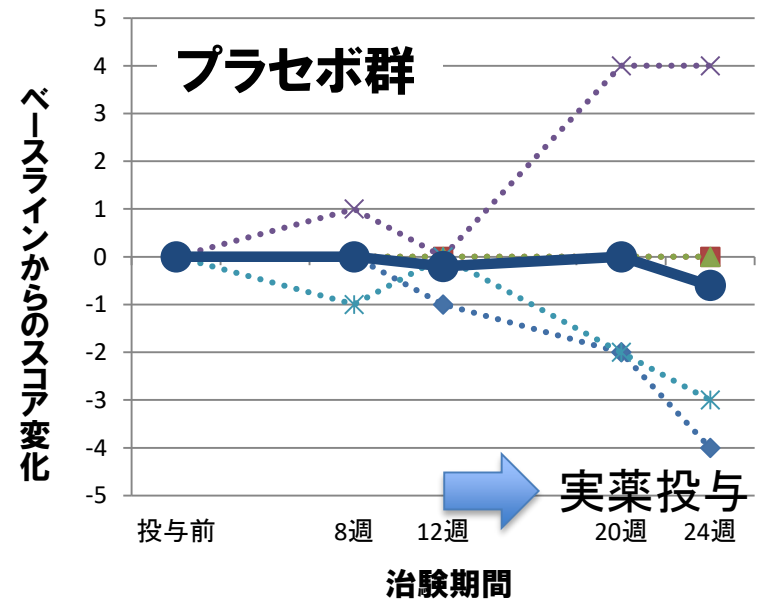
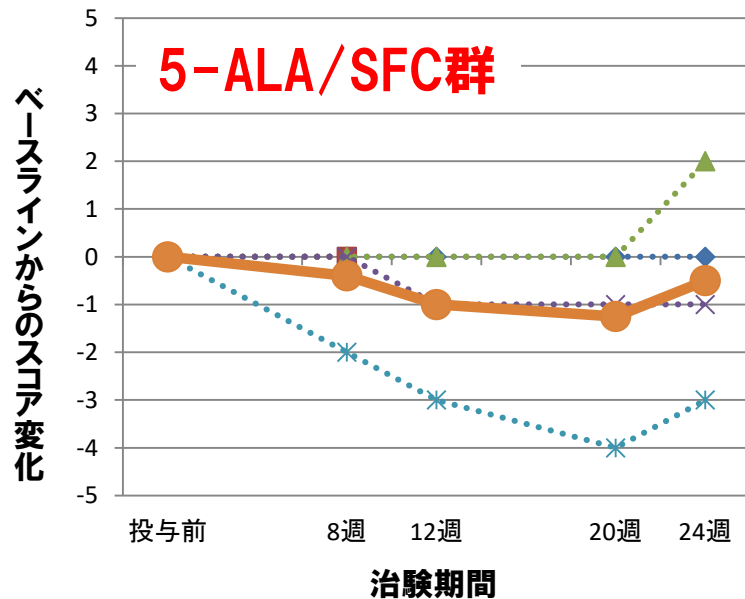
Leigh脳症を対象とした5-ALA+SFCの 多施設共同試験



- 健常成人を対象とした第I相試験はすでに完了し、安全性および忍容性は確認済。
- 第II相試験（探索試験；少数の患者さんで有効性、安全性を調べる）は2016年3月で終了しており、現在第III相試験（検証試験；より多数の患者さんを対象）が進行中。

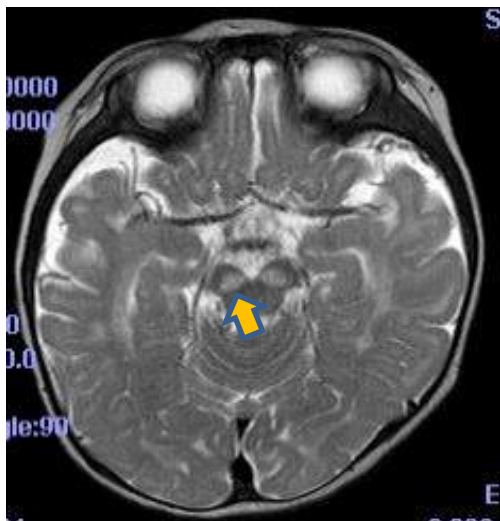
乳幼児ミトコンドリア病スケール (NPMDS) の 経時的変化からみた 5-ALA/SFCの著効

- NPMDSスコアの減少は症状・機能の改善を示す。
- 5-ALA/SFC群のスコアは**投与開始後、徐々に改善**。
(左グラフ オレンジ線、患者5名の平均)
- プラセボ群のスコアは12週目まで改善せず、
13週目より 5-ALA/SFC を投与、20週目以降に改善。
(右グラフ 青線、患者5名の平均)



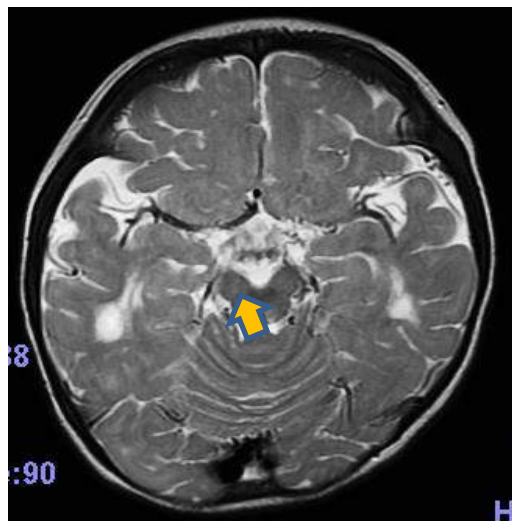
MRI 画像の経時的変化からみた5-ALA/SFCの著効

- 脳幹症状である眼球運動障害が 5-ALA/SFC 投与で著効した症例。
- 脳幹下部両側の橋病変(黄矢印)が著しく改善した。
- 症状、機能改善により確認された 5-ALA/SFC の治療効果が、画像上からも確認された症例。
- Leigh脳症で、両側脳幹病変の画像上での消失報告例は無い。



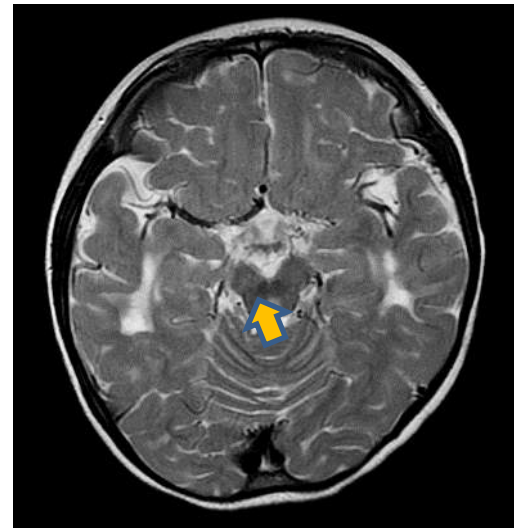
治験開始前

病変を認める



5-ALA/SFC 投与
4ヶ月後

病変部が消失



5-ALA/SFC 投与
18ヶ月後

病変部消失が持続

5-ALA/SFCの投与後に病状が安定

ケース 1: MRI 画像上、脳幹病変が消失した症例

**「眼振消失」「歩行機能の改善」「一人で食事可能」
「言葉が増える」といった臨床評価**

ケース 2: 比較的重症だが、病態進行が安定した症例

**「伝い歩き」「手の動きが良くなる」
「首が据わる」「発語あり」
といった臨床評価**

おわりに

- 5-ALA+SFCがミトコンドリア患者由来細胞においても、ミトコンドリア機能を改善することが明らかになった。
- 今回の研究結果は、5-ALAが残存する呼吸鎖酵素を強化することでミトコンドリア機能を改善させる、「酵素強化療法」としての有用性を示唆している。
- Leigh脳症を中心に医師主導型治験が進行しており、その成果が期待される。