

テクフィデラカプセル 120mg
テクフィデラカプセル 240mg

第2部（モジュール2）：CTDの概要（サマリー）

2.6.1 緒言

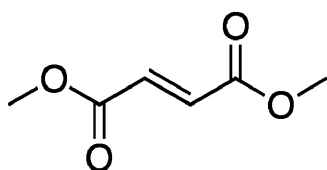
バイオジェン・ジャパン株式会社

略語・略号一覧

略号	略していない表現	
	英語	日本語
BCS	biopharmaceutics classification system	生物薬剤学分類システム
BID	bis in die	1日2回
CTD	common technical document	コモン・テクニカル・ドキュメント
DMF	dimethylfumarate: BG00012	フマル酸ジメチル：BG00012
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
ICH	international Conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
MMF	monomethyl fumarate	フマル酸モノメチル
MS	multiple sclerosis	多発性硬化症
Nrf2/NFE2L2	nuclear factor erythroid-derived 2-like 2	
TCA cycle	tricarboxylic acid cycle	クエン酸回路

バイオジェン社は、多発性硬化症（MS）の治療薬として1日2回（240 mg BID）経口投与する腸溶コーティングマイクロ錠を充填したゼラチンカプセル製剤 BG00012 を開発した。BG00012 の有効成分は、分子式 $C_6H_8O_4$ 、分子量 144.13 g/mol のフマル酸のジメチル化誘導体であるフマル酸ジメチル（DMF）であり、生物薬剤分類体系（BCS）のクラス 1（高透過性、高溶解性）に属する分子である。化学構造を図 1 に示す。DMF は無臭の白色結晶性粉末である。本剤の添加物はいずれも、一般的に内服錠に使用されており、動物由来の添加物は使用していない。本剤中の各添加物の含量は、FDA の「承認医薬品の添加物の検索」で公表されている最高濃度以下である。

図 1 BG00012（DMF：フマル酸ジメチル）の構造式



DMF は速やかに吸収され、フマル酸モノメチル（MMF）に変換され、更にフマル酸に代謝され、TCA 回路に入る。フマル酸エステルは細胞の好気呼吸（TCA 回路）に不可欠な天然分子である。

多発性硬化症の正確な病因は不明だが、免疫系が疾患に関与していることを示すエビデンスがある。免疫細胞の活性化及び中枢神経系への浸潤によって広範囲の細胞障害が起こる。これは主に炎症性刺激因子及び反応性フリーラジカルの異常産生及び放出が原因である。これらの有毒な分子が最終的に細胞死を引き起こすことにより、脱髄、神経変性を起こして発症、身体機能障害が進行する。DMF の効力は、有害な傷害に対する主な生体防御系の核内因子である Nrf2 抗酸化経路の活性化を介すると考えられている。DMF の非臨床安全性評価は、長期経口投与を意図する医薬品に関する ICH ガイドラインに準拠している。

テクフィデラカプセル 120mg
テクフィデラカプセル 240mg

第2部（モジュール2）：CTDの概要（サマリー）

2.6.2 薬理試験の概要文

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

	頁
2.6.2.1	まとめ..... 8
2.6.2.2	効力を裏付ける試験 (In vitro) 10
2.6.2.2.1	フマル酸エステル類等の機能解析のための ARE ルシフェラーゼレポーター遺 伝子安定導入細胞株の樹立 (試験番号 RSCH-2011-020) 10
2.6.2.2.2	BG00012 の作用機序の検討に用いる Nrf2 及び Keap1 遺伝子特異的 siRNA のス クリーニング (試験番号 RSCH-2011-021) 11
2.6.2.2.2.1	ウェスタンブロット法による Nrf2 検出用抗 Nrf2 抗体のスクリーニング(試 験番号 RSCH-2011-022) 13
2.6.2.2.3	フマル酸ジメチル (DMF) による Nrf2 活性化 (in vitro 試験) (試験番号 RSCH-2011-024) 13
2.6.2.2.4	フマル酸ジメチル (DMF) の in vitro における抗炎症作用 (試験番号 RSCH-2011-023) 16
2.6.2.2.5	LPS 誘導性アストロサイト及びミクログリア活性化応答におけるフマル酸ジメ チル及びフマル酸モノメチルの作用 (試験番号 RSCH-2012-023) 18
2.6.2.2.6	酸化ストレスに対するフマル酸エステルによる Nrf2 経路を介した中枢神経系 細胞保護作用 (試験番号 RSCH-2011-028) 21
2.6.2.3	効力を裏付ける試験 (In vivo) 25
2.6.2.3.1	げっ歯類におけるフマル酸ジメチルの薬力学的作用 (試験番号 RSCH-2011-025) 26
2.6.2.3.2	げっ歯類リウマチ性関節炎モデル: ラットコラーゲン誘導性関節炎におけるフ マル酸ジメチルの効果 (試験番号 RSCH-2011-026) 29
2.6.2.3.3	Sprague-Dawley (SD) ラットにおけるマロン酸エステル誘導性線条体病変体積 の DMF による抑制 (試験番号 RSCH-2011-027) 32
2.6.2.3.4	Brown Norway ラット慢性実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE): 多発性硬化症 (MS) モデルにおけるフマル酸ジメチルの効果 (試験番号 RSCH-2011-029) 35
2.6.2.3.5	ラット慢性実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルにおけるフマル酸ジメチ ルの細胞レベル・分子レベルでの効果の解析 (試験番号 RSCH-2011-030) 38
2.6.2.3.6	マウス臓器・組織におけるフマル酸ジメチルに対する薬力学的作用の用量-反応 性及び経時変化 (試験番号 RSCH-2012-024) 42
2.6.2.3.7	クプリゾン/ラパマイシン神経変性モデルにおけるフマル酸ジメチルの効果 (試験番号 RSCH-2012-026) 45
2.6.2.4	In vitro 副次的薬理試験..... 50
2.6.2.4.1	フマル酸ジメチル及びフマル酸モノメチルの in vitro 受容体結合試験 (試験番号 RSCH-2013-023) 50
2.6.2.5	安全性薬理試験..... 52
2.6.2.5.1	中枢神経系に対する影響..... 52

2.6.2.5.1.1	マウスにおけるレセルピン体温低下作用に対する Fumaderm 経口投与の影響 (試験番号 5350/89)	52
2.6.2.5.1.2	マウスにおける自発運動量に対する Fumaderm 経口投与の影響 (試験番号 5348/89)	53
2.6.2.5.1.3	マウスにおける侵害刺激反応に対する Fumaderm 経口投与の影響 (試験番号 5356/89)	53
2.6.2.5.1.4	マウスにおけるヘキソバルビタール麻酔作用に対する Fumaderm 経口投与の影響 (試験番号 5351/89)	53
2.6.2.5.2	心血管系及び呼吸器系に対する影響.....	54
2.6.2.5.2.1	クローン化 hERG 発現哺乳類細胞に対する DMF の影響(試験番号 PD03-17) 54	
2.6.2.5.2.2	クローン化 hERG 発現哺乳類細胞に対するフマル酸モノメチル (MMF) の影響 (試験番号 PD03-21)	54
2.6.2.5.2.3	イヌ心臓プルキンエ線維における活動電位に対する DMF の影響 (試験番号 PD03-18)	54
2.6.2.5.2.4	イヌ心臓プルキンエ線維における活動電位に対するフマル酸モノメチル (MMF) の影響 (試験番号 PD03-22)	55
2.6.2.5.2.5	ビーグル犬の心血管系及び呼吸器系に対する DMF 経口投与の影響を検討する安全性薬理試験 (試験番号 PD03-19)	56
2.6.2.5.2.6	ビーグル犬の心血管系及び呼吸器系に対する DMF 経口 (カプセル製剤) 投与の影響 (試験番号 P00012-14-04)	57
2.6.2.5.3	反復投与毒性試験における心血管系評価.....	58
2.6.2.6	薬力学的薬物相互作用試験.....	58
2.6.2.7	考察及び結論.....	60
2.6.2.8	参考文献.....	62

表目次

	頁
表 1 ARE レポーター遺伝子導入細胞株に対する Nrf2 転写活性化物質 (DMF、MMF 及び tBHQ) の作用 (ルシフェラーゼ発光強度比)	11
表 2 Nrf2 及び Keap1 遺伝子特異的 siRNA.....	12
表 3 Keap1 ペプチドフラグメントのシステイン修飾量の比較.....	14
表 4 フマル酸ジメチル及びフマル酸モノメチルの受容体スクリーニング	51
表 5 試験番号 PD-3-19 の試験デザイン	56
表 6 試験番号 P00012-14-04 の試験デザイン	57

図目次

	頁
図 1 DLD-1/ARE 細胞を用いた DMF 刺激による Nrf2 及び Keap1 遺伝子特異的 siRNA のスクリーニング.....	12
図 2 In vitro における DMF 及び MMF による Nrf2 タンパク質の安定化.....	15
図 3 LPS 刺激した RAW264.7 マクロファージ細胞株を用いた DMF による TNF- α 産生の阻害.....	16
図 4 RAW264.7 マクロファージ細胞株及びラットアストロサイトを DMF 処理したときの LPS 刺激に対する応答の阻害作用.....	17
図 5 DMF による骨髄由来マクロファージのサイトカイン産生抑制における Nrf2 の関連性....	18
図 6 野生型マウス初代培養アストロサイトにおける LPS 誘導性 TNF- α 産生の MMF による変化.....	19
図 7 Nrf2-/-マウス初代培養アストロサイトにおける LPS 誘導性 TNF- α 産生の MMF による変化.....	19
図 8 野生型及び Nrf2-/-マウス初代培養ミクログリアにおける LPS 誘導性 TNF- α 産生の DMF による変化.....	20
図 9 中枢神経系における DMF による抗酸化応答の Nrf2 依存性.....	21
図 10 中枢神経系細胞における DMF 及び MMF による Nrf2 量の増加.....	22
図 11 MMF のグルタチオン及び ATP 増加を介した細胞酸化還元電位の増加.....	23
図 12 酸化的攻撃を受けたアストロサイトにおける DMF 及び MMF による直接的な細胞保護作用.....	24
図 13 アストロサイトの MMF による細胞保護作用の Nrf2 依存性.....	25
図 14 マウス各組織での DMF の薬力学的作用.....	27
図 15 DMF 高用量投与後の一部の組織における 24 時間までの薬力学的作用.....	28
図 16 DMF の薬力学的作用の Nrf2 依存性.....	29
図 17 げっ歯類関節炎モデルにおける関節炎スコアに対する DMF の抑制効果.....	30
図 18 げっ歯類関節炎モデルにおける肢関節炎に対する DMF の病理組織学的抑制効果.....	31
図 19 げっ歯類関節炎モデルにおけるマクロファージ浸潤に対する DMF の抑制.....	32
図 20 マロン酸エステル誘導性線条体病変体積に対する DMF の効果.....	33
図 21 マロン酸エステル誘導性障害ラットにおけるアポモルヒネ誘導回転行動に対する DMF の効果.....	34
図 22 有毒なマロン酸エステル線条体注入に対する DMF 前投与による in vivo 神経細胞保護作用.....	34
図 23 ラット慢性 EAE モデルにおける DMF の効果.....	36
図 24 EAE モデルにおける薬効に対する投薬回数の影響.....	37
図 25 ラット EAE モデルにおける DMF 反復投与に対する薬力学的反応.....	39
図 26 ラット EAE モデルでの脊髄における脱髄及び中枢神経系組織の変性の DMF による抑制.....	40

図 27	ラット EAE モデルの脊髄における炎症細胞の活性化及び蓄積の DMF による抑制.....	41
図 28	中枢神経系組織における DMF による転写プロファイリングの経時変化.....	42
図 29	Nrf2 ^{-/-} 及び野生型マウスにおける 100 mg/kg フマル酸ジメチルによる転写の経時変化...	43
図 30	クプリゾン+ラパマイシン投与マウス血漿における MMF 曝露量.....	45
図 31	クプリゾン+ラパマイシン投与マウスにおける DMF による軸索損傷の減少.....	46
図 32	クプリゾン+ラパマイシン投与マウスにおける DMF による脳梁の有髄線維の増加.....	47
図 33	クプリゾン+ラパマイシン投与マウスにおける DMF による脳梁の髄鞘パラメーター における超微細形態変化の抑制.....	48
図 34	クプリゾン+ラパマイシン投与マウスにおける DMF による脳梁の総軸索数の増加.....	49

略語・略号一覧

略号	略していない表現	
	英語	日本語
3D-EM	Three-dimensional electron microscopy	3次元電子顕微鏡
Akr1b8	aldo-keto reductase family 1 member B8	アルドケト還元酵素ファミリー1サブファミリーB (マウス)
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid	α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸
ANOVA	analysis of variance	分散分析
APC	allophycocyanin	アロフィコシアニン
AP	action potential	活動電位
APD	action potential duration	活動電位持続時間
ARE	antioxidant response element	抗酸化反応エレメント
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
AUC	area under the concentration-time curve	血清中濃度時間曲線下面積
BID	twice daily	1日2回
CC	Corpus callosum	脳梁
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	-
CCL10	chemokine (C-C motif) ligand 10	-
CD	cluster of differentiation	-
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	相補デオキシリボ核酸
CIA	collagen induced arthritis	コラーゲン誘導関節炎
C _{max}	concentration maximum	最高濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
CR	cuprizone diet plus rapamycin injections	クプリゾン+ラパマイシン
CTD	common technical document	コモン・テクニカル・ドキュメント
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	
DMF	dimethyl fumarate; BG00012	フマル酸ジメチル : BG00012
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis	実験的自己免疫性脳脊髄炎
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	-
FACS	fluorescence activated cell sorting	フローサイトメトリー
GABA	γ -amino-butyric-acid	γ -アミノ酪酸
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (NADP+)
GFAP	glial fibrillary acidic protein	グリア細胞線維性酸性タンパク質、アストロサイトマーカー
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GSR	glutathione reductase	グルタチオン還元酵素
hAstro	human astrocytes	ヒトアストロサイト
HEK293	human embryonic kidney 293 cells	-
hERG	human ether-a-go-go-related gene	ヒト遅延整流性カリウムチャンネル遺伝子
hNur	human neurons	ヒト神経細胞
hOPC	human Oligodendrocyte precursor cells	ヒトオリゴデンドロサイト前駆細胞
HPMC	hydroxypropyl-methylcellulose	ヒドロキシプロピルメチルセルロース
IBA-1	ionized calcium binding adapter molecule 1	-
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度

2.6.2 薬理試験の概要文

フマル酸ジメチル

略号	略していない表現	
	英語	日本語
IL	interleukin	インターロイキン
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1	-
KO	knockout	ノックアウト
LPS	lipopolysaccharide	リポ多糖
MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein	ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質
MMF	monomethyl fumarate	フマル酸モノメチル
mRNA	messenger RNA	メッセンジャーRNA
MS	multiple sclerosis	多発性硬化症
NA	not applicable	該当なし
ND	not determined	測定せず
NMDA	n-methyl-D-aspartate	N-メチル-D-アスパラギン酸
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase (quinone 1)	NAD(P)H デヒドロゲナーゼ (キノン1)
Nrf2	nuclear factor (erythroid-derived-2)-like 2	-
NTR	N-terminal region	N 末端領域
OPCs	oligodendrocyte precursor cells	オリゴデンドロサイト前駆細胞
PCR	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PD	pharmacodynamics	薬力学
QD	once daily	1日1回
qPCR	quantitative polymerase chain reaction	定量ポリメラーゼ連鎖反応
QTc	corrected QT interval	補正 QT 時間
ROI	region of interest	関心領域
rOPC	rat oligodendrocyte precursor cells	ラットオリゴデンドロサイト前駆細胞
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
siRNA	small interfering ribonucleic acid	低分子干渉 RNA
SEM	standard error of the mean	標準誤差
tBHQ	tert-Butylhydroquinone	tert-ブチルヒドロキノン
Th	helper T cells	ヘルパーT細胞
Th1	type 1 helper T cells	I型ヘルパーT細胞
Th17	IL-17-expressing helper T cells	IL-17産生性ヘルパーT細胞
Th2	type 2 helper T cells	II型ヘルパーT細胞
TLR4	toll-like receptor 4	Toll様受容体4
TMRE	tetramethyl rhodamine methyl ester	テトラメチルローダミンメチルエステル
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
TNFR:Fc	tumor necrosis factor receptor immunoglobulin Fc fusion protein	Fc融合TNF受容体
WT	wild-type	野生型
w/w	weight to weight	-

2.6.2.1 まとめ

多発性硬化症 (MS) は発症機序が多面的であり、複数の経路を経て進行する。免疫細胞が活性化され、中枢神経系に浸潤すると、活性フリーラジカルの異常産生及び放出、並びに炎症性刺激によって、細胞障害が広がることがある。これらの有毒な因子が組み合わさって細胞死を起し、細胞死は脱髄、神経変性を起こして発症、身体機能障害の進行を来す。非臨床及び臨床データから、DMF は末梢細胞、中枢神経系細胞・組織の抗炎症反応及び神経保護反応の両方を直接促進することが示され、MS の病因に複数の段階で関与する作用機序を有することが裏付けられた。MS の進行を増悪させることが知られている経路に対する DMF のこれら複数の作用は、MS 患者に対して高い治療効果を示すことが期待され、また、既承認薬とは異なる新規の治療法になることが期待される。

DMF の薬力学 (PD) 及び生体機能に対する作用は主に、多様な有害刺激に対する一次的な細胞防御系である Nrf2 抗酸化応答経路の活性化を介したものであると考えられる。DMF は、*in vitro* 非臨床試験 (2.6.2.2.4 項、試験番号 RSCH-2011-023) で、炎症性刺激に対するマクロファージ活性化及びその後の炎症性サイトカインの産生を抑制することを示した。マウス初代培養アストロサイト及びミクログリアにおいて、DMF は用量依存性に、LPS による炎症マーカーを Nrf2 経路依存性に減少させることを示した (2.6.2.2.5 項、試験番号 RSCH-2012-023)。DMF はまた、コラーゲン誘導関節炎 (CIA) モデル (2.6.2.3.2 項、試験番号 RSCH-2011-026) 及びげっ歯類の実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデル (2.6.2.3.4 項、試験番号 RSCH-2011-029 ; [Linker et al., 2011](#)) などの *in vivo* 炎症に対して治療効果を示した。DMF はまた、最近実施したヒト及び動物の免疫細胞を用いた *ex vivo* 試験から、炎症性細胞応答を炎症性 (Th1、Th17) サイトカイン発現パターンから抗炎症性 (Th2) サイトカイン発現パターンへの偏位を促進する可能性が示唆された ([Ghoreschi et al., 2011](#))。これらの結果はいずれも、多発性硬化症患者における脳病変及び再発を有意に減少させた臨床効果と一致する ([M2.7.3])。

DMF はまた、これらの抗炎症作用に加え、中枢神経系細胞において直接的に神経保護反応を促進した。DMF は、初代培養アストロサイト及びニューロンの酸化刺激後の細胞生存率を改善し (2.6.2.2.6 項、試験番号 RSCH-2011-028)、有害な酸化ストレスによる神経変性を直接的に抑制することを示した。これらの結果は、DMF 依存性の髄鞘及び軸索保護作用が示された EAE 試験 (2.6.2.3.4 項、試験番号 RSCH-2011-029 ; [Linker et al., 2011](#)) 結果と一致した。DMF はまた、*in vivo* 急性神経毒性損傷モデル (2.6.2.3.3 項、試験番号 RSCH-2011-027 ; 2.6.2.3.7 項、試験番号 RSCH-2012-026) 又は神経変性疾患の遺伝的モデル ([Ellrichmann et al., 2011](#)) で、様々な有害刺激により生じる神経損傷を抑制する治療効果を示した。これらの試験の多くでは、遺伝的又は生化学的手法によって Nrf2 を欠損又は低下させた結果、有効性又は治療効果が低下したことから、DMF の治療効果は Nrf2 経路依存性であった (2.6.2.2.6 項、試験番号 RSCH-2011-028 ; [Linker et al., 2011](#))。これらの損傷及び刺激法はいずれも、MS において生じる損傷機序と関連性が高い。したがってこれらの非臨床試験全体から、DMF は、Nrf2 経路の活性化を介して多面的に作用することで、末梢及び中枢神経系細胞の両方において炎症反応を抑制し、有害な損傷から中枢神経系細胞

2.6.2 薬理試験の概要文

フマル酸ジメチル

の細胞保護作用を推進することも示された。これらの非臨床試験結果は、臨床試験の画像及び機能評価の結果と一致し、DMF が中枢神経系で神経を保護するベネフィットを促進する可能性があることを示唆している ([M2.7.3])。

ICH 7A ガイドラインに従って安全性薬理コアバッテリー試験を実施し、中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に対する本薬の作用を評価した。中枢神経系安全性薬理試験は、有効成分フマル酸ジメチル (DMF) {56% (w/w)} 及びフマル酸モノエチル塩 (Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 及び Zn^{2+} 塩) の混合物である Fumaderm[®] を用いて実施された。Fumaderm の所見には、有効成分として DMF のみを含有する BG00012 の作用が含まれていると考えられる。これらの試験では、マウスを用いて、Fumaderm が体温 (2.6.2.5.1.1 項、試験番号 5350/89)、自発運動量 (2.6.2.5.1.2 項、試験番号 5348/89)、侵害刺激反応 (2.6.2.5.1.3 項、試験番号 5356/89) 及び麻酔による睡眠時間 (2.6.2.5.1.4 項、試験番号 5351/89) に対する影響を評価した。非臨床反復投与毒性試験における一般状態観察及び病理組織学的検査結果から、中枢神経系に関連する変化は認められなかった ([M2.6.6])。また臨床試験において、BG00012 の投与に関連のある (疾患に関連しない) 中枢神経系に関連する重篤な有害事象は認められなかった ([M2.7.4])。試験結果及び動物実験の倫理面も考慮した結果、Fumaderm を用いて実施されたこれらの試験は、DMF の非臨床中枢神経系安全性プロファイルを特徴付けるのに十分であると判断された。

呼吸器系及び心血管系安全性薬理試験は、DMF を用いて実施された。In vitro における心血管系安全性薬理試験では、ヒト ether-a-go-go-related gene (hERG) カリウムチャンネルに対する評価を実施した。その結果、DMF はチャンネル機能にほとんど影響を及ぼさないことが示された (2.6.2.5.2.1 項、試験番号 PD03-17 ; 2.6.2.5.2.2 項、試験番号 PD03-21)。DMF はまた、摘出イヌプルキンエ線維を用いた ex vivo 試験で、活動電位の再分極にほとんど影響を及ぼさないことが示された (2.6.2.5.2.3 項、試験番号 PD03-18 ; 2.6.2.5.2.4 項、試験番号 PD03-22)。これらの結果から、BG00012 が心電気伝導度を阻害して正常な心調律に影響を与える可能性は低いものと思われた。またイヌを用いて、in vivo で心血管系及び呼吸機能を非 GLP 1 試験及び GLP 1 試験で評価した (2.6.2.5.2.5 項、試験番号 PD03-19 ; 2.6.2.5.2.6 項、試験番号 P00012-14-04)。覚醒イヌモデルを用いて 24 時間モニタリングしたとき、DMF は呼吸数、最大胸腔内圧、体温又は動脈血液ガスに影響を及ぼさなかった。心電図において DMF に関連した異常な不整脈、伝導障害又は QTc 延長又はその他の異常は認められなかった。非 GLP 心血管系及び呼吸器系試験では、DMF の用量依存性の影響が投与後約 3 時間から心拍数 (増加) 及び動脈圧 (低下) に認められたが、その全投与動物に認められた嘔吐による可能性がある。GLP 心血管系及び呼吸器系試験では、DMF 投与 2 時間後に有害ではない心拍数のわずかな増加及び RR 間隔のわずかな減少が認められた。テレメトリー非装着カニクイザルを用いたピボタルな反復投与毒性試験で、いくつかの時点で心電図検査を実施した結果、異常所見は認められなかった (試験番号 P00012-05-08 [M2.6.6.3.4.2])。総じて、これまでの in vitro 及び in vivo 安全性薬理試験結果から、DMF は中枢神経系、呼吸器系又は心血管系に有害な影響を及ぼすとは予測されることが示唆された。これらの結果は、臨床試験において BG00012 に関連した心血管系又は呼吸器系への影響が認められなかったことと一致している ([M2.7.4])。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験 (In vitro)

DMF の効力を裏付ける試験は、細胞を用いた *in vitro* 試験及び動物を用いた *in vivo* 試験の両方で実施した。臨床製剤は、有効成分 DMF 及び添加物から成る腸溶性コーティングマイクロ錠をゼラチンカプセルに充填したものである。しかし、ほとんどの非臨床試験では、この臨床製剤を使用することは不可能であった。そのため *in vivo* 試験では、粉末状の DMF を種々の溶媒に溶解又は懸濁して投与した。DMF 経口投与の薬物動態解析から、DMF は全身循環前に速やかにフマル酸モノメチル (MMF) に代謝されることが示された ([M2.6.4])。したがって DMF の経口投与後、組織及び細胞は主に MMF に曝露される。そのため、作用機序を解析した *in vitro* 細胞試験では、MMF を用いた。親化合物 DMF に対して一過性に曝露される可能性を除外することはできないため、実施可能な場合には、DMF と MMF を並行して比較した。本項に示した要約から、DMF 及び MMF の主な薬理活性は、*in vitro* 試験及び *in vivo* 試験のいずれでも同等であることが示された。一部の試験では、DMF は Nrf2 経路活性化能が MMF に比べて高いと考えられたが、その下流に対する作用は MMF と DMF でおおむね同等であった。

2.6.2.2.1 フマル酸エステル類等の機能解析のための ARE ルシフェラーゼレポーター遺伝子安定導入細胞株の樹立 (試験番号 RSCH-2011-020)

記載箇所：参考[M4.2.1.1-1] RSCH-2011-020

DMF の作用を解析した初期の試験において、DMF の作用の 1 つとして細胞の抗酸化応答を制御するマスター転写因子である Nrf2 経路を活性化することが確認された (2.6.2.2.3 項、試験番号 RSCH-2011-024)。ARE は、Nrf2 が特異的に結合する DNA 配列であり、多くの抗酸化及び解毒応答遺伝子のプロモーター領域に存在する。DMF、MMF 等の化合物による Nrf2 活性化を検討するため、ハイスループット細胞測定系を開発した。本試験では、親細胞 DLD-1 及び MCF7 に ARE ルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定導入した細胞株を作製した。これらの検討では、強力な Nrf2 活性化物質である t-ブチルヒドロキシキノン (tBHQ) を陽性対照として使用した。ARE DNA 配列 (GACAAAGCACCCGT) の 8 回タンデムリピートをルシフェラーゼ遺伝子上流に組み入れたルシフェラーゼレポーター遺伝子配列を培養細胞株 DLD-1 及び MCF7 に導入し、安定したトランスフェクト細胞株を複数単離した。安定導入した ARE:ルシフェラーゼ配列の活性を評価するため、細胞測定系を構築した。これらの細胞株を DMF、MMF 又は tBHQ で刺激した結果を表 1 に示した。Nrf2 をサイレンシングする small interfering RNA (siRNA) を用いた結果から、これらの細胞株がルシフェラーゼを発現させた刺激は Nrf2 依存性であることが示された (2.6.2.2.2 項、試験番号 RSCH-2011-021)。

表 1 ARE レポーター遺伝子導入細胞株に対する Nrf2 転写活性化物質 (DMF、MMF 及び tBHQ) の作用 (ルシフェラーゼ発光強度比)

レポーター遺伝子	陰性対照細胞株に対するルシフェラーゼ発光強度比		
	DMF (15 μM)	MMF (500 μM)	
DLD-1/ARE.D1	8	53	
DLD-1/ARE.E2	16	77	
DLD-1/ARE.B7	4	317	
DLD-1/ARE.F10 (-)対照	1	2	
	DMF (50 μM)	MMF (500 μM)	tBHQ (500 μM)
MCF7/ARE.D3	60	228	265
MCF7/ARE.B6	18	149	108
MCF7/ARE.G7	10	92	84
MCF7/ARE.E10 (-)対照	1	1	0

Data source : [M4.2.1.1-1] RSCH-2011-020-Table 1

DLD-1 又は MCF7 細胞の各クローン細胞株を各濃度の DMF、MMF 又は tBHQ と 24 時間インキュベートしたときのルシフェラーゼ活性測定結果を陰性対照細胞株発光強度比で示した。

二重測定の平均値

MDMF : フマル酸ジメチル、MMF : フマル酸モノメチル、tBHQ : tert-ブチルヒドロキノン

本試験では、in vitro 用量反応試験及び細胞毒性試験で使用可能なレポーター遺伝子安定導入 DLD-1 細胞株 (クローン D1、E2、B7) 及び MCF7 細胞株 (クローン D3、B6、G7) を作製した。これらのレポーター安定発現細胞株は、広濃度範囲で DMF 及び MMF 濃度依存性の反応を示した。これらの細胞株はまた、他の化合物の Nrf2 経路活性化能を比較検討するうえでも使用可能である。本試験の条件下で、MCF7 細胞に対する Nrf2 依存性ルシフェラーゼ発現刺激能は、MMF と tBHQ で同等であった。顕著な反応が観察されたことから、これらの安定発現細胞株は Nrf2 活性化物のスクリーニングに有用であることが示された。

2.6.2.2.2 BG00012 の作用機序の検討に用いる Nrf2 及び Keap1 遺伝子特異的 siRNA のスクリーニング (試験番号 RSCH-2011-021)

記載箇所 : 参考[M4.2.1.1-2] RSCH-2011-021

DMF の作用機序及び作用過程における Nrf2 の必要性を検討するため、siRNA を介した遺伝子サイレンシングを検討した。Nrf2 又は Keap1 を効果的に低減する (それぞれ Nrf2 機能喪失又は Nrf2 機能亢進に該当する) siRNA を同定した。Nrf2 及び Keap1 に対する複数の siRNA (■■■■社 及び ■■■■社) は、ARE:ルシフェラーゼ配列安定導入 DLD-1 細胞を DMF で刺激することにより、スクリーニングした (2.6.2.2.1 項、試験番号 RSCH-2011-020)。スクリーニングした siRNA 配列を表 2 に示す。

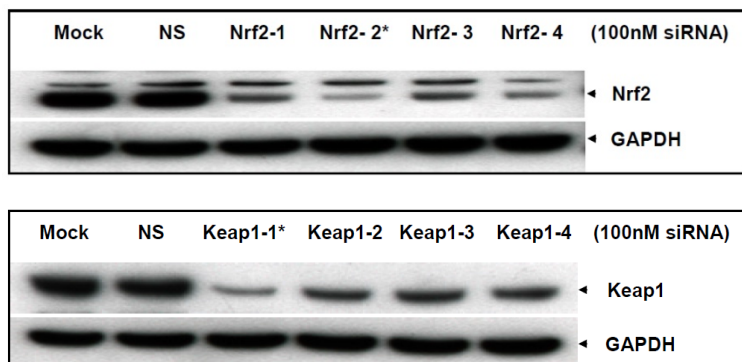
表 2 Nrf2 及び Keap1 遺伝子特異的 siRNA

siRNA	供給元	製品名	センス配列	アンチセンス配列
Nrf2-1			GAGAAAGAAUUGCCUGUAAUU	5'-PUUACAGGCAAUUCUUUCUCUU
Nrf2-2			CCAAAGAGCAGUUCAAUGAUU	5'-PUCAUUGAACUGCUCUUUGGUU
Nrf2-3			UAAAGUGGCUGCUCAGAAUUU	5'-PAUUCUGAGCAGCCACUUUAUU
Nrf2-4			UGACAGAAGUUGACAAUUAUU	5'-PUAAUUGUCAACUUCUGUCAUU
Nrf2-Q3			r(AGAUUUAGAUCUUUGAAA)dTdT	r(UUUCAAAUGAUCUAAAUCU)dTdG
Nrf2-Q4			r(CAUUGAUGUUUCUGAUCUA)dTdT	r(UAGAUCAAGAAUCAUAAUG)dGdG
Keap1-1			GGACAAACCGCCUUAAUUCUU	5'-PGAUUUAAGGCGGUUUGUCCUU
Keap1-2			CAGCAGAACUGUACCGUUUUU	5'-PAACAGGUACAGUUCUGCUGUU
Keap1-3			GGGCGUGGCUGUCCUCAUUUU	5'-PAUUGAGGACAGCCACGCCUUU
Keap1-4			CGAAUGAUCACAGCAAUGAUU	5'-PUCAUUGCUGUGAUCAUUCGUU
Keap1-Q1			r(GAAUGAUCACAGCAAUGAA)dTdT	r(UUCAUUGCUGUGAUCAUUC)dGdC
Keap1-Q2			r(GGGAGUACAUCUACAUGCA)dTdT	r(UGCAUGUAGAUGUACUCCC)dGdG

Data source : [M4.2.1.1-2] RSCH-2011-021-Table 1

各 siRNA を導入された DLD-1 細胞は、Nrf2 又は Keap1 タンパク質の発現を抑制されていた(図 1)。標的タンパク質を抑制する程度は、個々の siRNA によって異なった (Nrf2-2 と Nrf2-3 の比較及び Keap1-1 と Keap1-3 の比較)。ウェスタンブロッティングのローディング量が総タンパク質量として同程度であることを確認するため、普遍的に存在するタンパク質であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) も用いた。

図 1 DLD-1/ARE 細胞を用いた DMF 刺激による Nrf2 及び Keap1 遺伝子特異的 siRNA のスクリーニング



Data source : [M4.2.1.1-2] RSCH-2011-021-Figure 1, Figure 2

これらの試験結果から、遺伝子サイレンシング活性は [redacted] 社の Nrf2-2 及び Keap1-1 (図 1 中、「*」で示す) で最も高く、Nrf2-2 及び Keap1-1 が以降の試験に最も適した siRNA であることが確認された。

2.6.2.2.2.1 ウェスタンブロット法による Nrf2 検出用抗 Nrf2 抗体のスクリーニング (試験番号 RSCH-2011-022)

記載箇所：参考[M4.2.1.1-3] RSCH-2011-022

DMF の想定される作用機序及び本薬の投与によって影響を受ける Nrf2 シグナリング経路の役割を詳細に検討するために、Nrf2 発現量をウェスタンブロット法を用いて解析する必要がある。市販及び非市販の抗 Nrf2 抗体を対象として、内因性 Nrf2 の検出感度及び特異性についてスクリーニング評価を実施した。アカデミーの共同研究者より提供を受けたウサギポリクローナル抗体 (抗 Nrf2-NTR、[Nguyen et al., 2003](#)) は、ウェスタンブロット法で頑健かつ特異的なシグナルを示した。そのため以降の試験では、同抗体を使用した。██████████ 社から販売されているヤギ Nrf2 (T-19) ポリクローナル抗体もまた、頑健かつ特異的なシグナルが検出されたことから、ウェスタンブロット法でヒト Nrf2 を検出する際に有用であることが示された。

2.6.2.2.3 フマル酸ジメチル(DMF)による Nrf2 活性化(in vitro 試験)(試験番号 RSCH-2011-024)

記載箇所：参考[M4.2.1.1-4] RSCH-2011-024

DMF は、細胞の抗酸化遺伝子及び解毒遺伝子の活性化を促す求電子性の Michael 受容体である。転写因子 Nrf2 は抗酸化及び解毒遺伝子群の中心的な制御因子である。そのため、DMF 及びその関連化合物 (MMF など) について、Nrf2 活性化能及び Nrf2 依存性遺伝子の転写誘導能を検討した。DMF は、Nrf2 の阻害因子 (Keap1) における主要なシステイン残基をアルキル化することによって Keap1 の定常状態での Nrf2 分解誘導能を阻害し、Nrf2 を直接活性化させた。その結果、Nrf2 タンパク質レベルが増加し、Nrf2 が核内に蓄積した。DMF による活性化により核内に移行した Nrf2 は、ARE DNA 配列に結合することによって、ARE プロモーターからの転写を活性化させた。DMF で処理した細胞では Nrf2 標的遺伝子の活性化が認められたが、siRNA によって Nrf2 をノックダウンした細胞では同様の Nrf2 標的遺伝子の活性化は認められなかった。したがって DMF は、Nrf2 活性化を介して、抗酸化遺伝子及び解毒遺伝子発現を誘導したことが示された。

DMF 又は MMF による Nrf2 活性化機序を検討するため、██████████ 細胞にラット Keap1 遺伝子をトランスフェクトした。トランスフェクト 48 時間後、細胞を DMF 又は MMF で 6 時間処理した。細胞抽出物を分離し、Keap1 を免疫精製した。これらの細胞から分離した外因性のラット Keap1 を質量分析法によって解析した結果、Keap1 の Cys-151 を含むペプチド断片に共有結合修飾が認められた (表 3)。この結果から、DMF 及び MMF のいずれも、Nrf2 活性化に必要な Keap1 の活性チオールを直接アルキル化することが示された ([Kobayashi et al., 2009](#))。他のシステイン含有ペプチドも DMF 及び MMF の両方によって修飾されたが (表 3)、そのアルキル化修飾率は、Cys-151 含有ペプチドが 65%超であったのに対し、いずれも 25%未満であった。これら他の修飾の同定及び活性への影響の評価は継続中である。以上の解析から、Keap1 の Cys-151 含有ペプチドが、DMF 及び MMF によるアルキル化の主な標的であることが示唆された。

表 3 Keap1 ペプチドフラグメントのシステイン修飾量の比較

Gel B : DMF 刺激

m/z (質量電荷比)	ペプチド	チャージ	イオン強度	分子量換算値	比率
731.03246	CVLHVMNGAVMYQIDSVVR	3	1280000	2190.07392	21
749.36398	CVLHVMNGAVMYQIDSVVR + 112 Da	3	4760000	2245.06848	79
923.37571	CPEGAGDAVMYASTECK	2	5070000	1844.73578	96
950.87333	CPEGAGDAVMYASTECK + 112 Da	2	212000	1899.73102	4
890.39577	CESEVFHACIDWVK	2	3570000	1778.77590	83
917.89233	CESEVFHACIDWVK + 112 Da	2	733000	1833.76902	17
427.71860	CHALTPR	2	4460000	853.42156	96
455.21610	CHALTPR + 112 Da	2	170000	908.41656	4
538.26354	CEILQADAR	2	12000000	1074.51144	98
565.76130	CEILQADAR + 112 Da	2	292000	1129.50696	2

Gel E : MMF 刺激

m/z (質量電荷比)	ペプチド	チャージ	イオン強度	分子量換算値	比率
731.03246	CVLHVMNGAVMYQIDSVVR	3	482000	2190.07392	31
755.36766	CVLHVMNGAVMYQIDSVVR + 130 Da	3	1070000	2263.07952	69
538.26354	CEILQADAR	2	10900000	1074.51144	98
574.76540	CEILQADAR + 130 Da	2	187000	1147.51516	2
731.69677	QEEFFNLSHCQLATLISR	3	10100000	2192.06685	90
756.03230	QEEFFNLSHCQLATLISR + 130 Da	3	1090000	2265.07344	10
923.37570	CPEGAGDAVMYASTECK	2	3500000	1844.73576	99
959.87760	CPEGAGDAVMYASTECK + 130 Da	2	41900	1917.73956	1
419.67920	YDCPQR	2	5660000	837.34276	95
456.18181	YDCPQR + 130 Da	2	273000	910.34798	5
890.39501	CESEVFHACIDWVK	2	3540000	1778.77438	94
926.89745	CESEVFHACIDWVK + 130 Da	2	235000	1851.77926	6
745.87660	SGVGVAVTMEPCRK	2	1630000	1489.73756	80
782.37934	SGVGVAVTMEPCRK + 130 Da	2	409000	1562.74304	20

Data source : [M4.2.1.1-4] RSCH-2011-024-Table 1

Cys 残基はトリプシン消化前にヨードアセトアミドでアルキル化した (+ 57 Da)。化合物の添加によってアルキル化された Cys はヨードアセトアミドによって修飾されない。

DMF 及び MMF によるペプチド修飾の要約を表 3 に示す。赤枠内に Keap1 ペプチドの相対モル比 (イオン強度に基づき算出) を示す。各ペプチドの結果のうち下段は DMF 又は MMF によって修

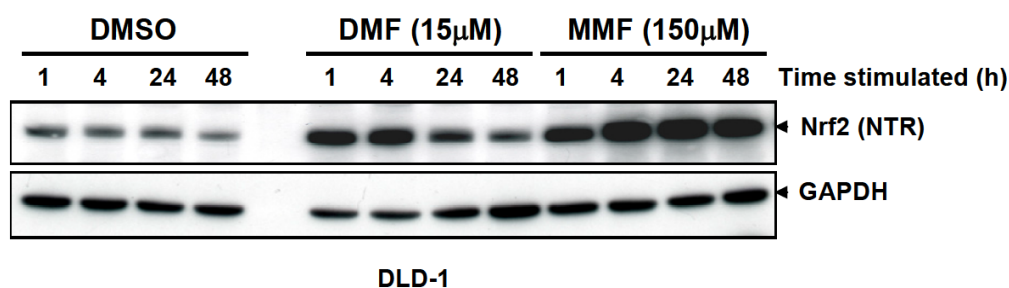
飾されたペプチドを示す。Keap1 は、同定された他のペプチドに比べて、修飾率が最も高かった。

DMF は、Cys-151 を含むペプチドフラグメントに 112 Da 付加したフラグメントを生成させ、MMF は 130 Da 付加したフラグメントを生成させた。130 Da の付加は MMF の分子量を正確に反映する。一方、112 Da は DMF の分子量 144 Da より 32 Da 少ないことから、DMF と MMF は異なるメカニズムによって Keap1 の Cys-151 をアルキル化することが示唆される。

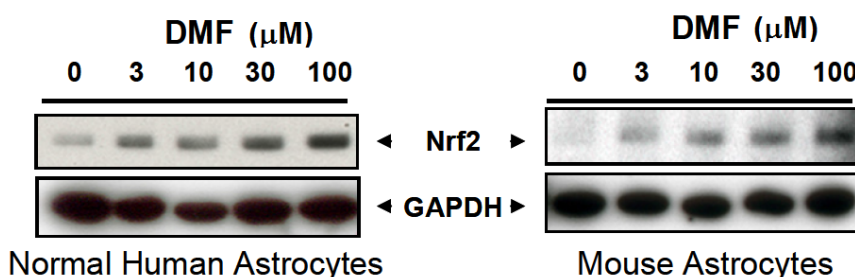
Keap1 の相互作用が妨害されて Nrf2 分解が減少すると、細胞内に Nrf2 が蓄積するはずである。次に、*in vitro* で様々な細胞株を DMF 及び MMF で処理し、Nrf2 蓄積量をウェスタンブロッティングで解析した。GAPDH をブロッティング解析におけるローディング量の対照とした。

図 2 *In vitro* における DMF 及び MMF による Nrf2 タンパク質の安定化

A



B



NTR : N 末端領域

Data source : [M4.2.1.1-4] RSCH-2011-024-Figure 2

DMF 及び MMF で DLD-1 細胞を刺激したことより Nrf2 タンパク質は安定化された (図 2A)。DMF 及び MMF で健常人から採取したアストロサイト又はマウスアストロサイトを刺激すると、Nrf2 タンパク質は安定化された (図 2B)。さらに、ヒト又はマウスアストロサイトを用いて、DMF 又は MMF による Nrf2 安定化機構を解析した。その結果、DMF 又は MMF 処理により、Nrf2 は核内に移行し、ARE プロモーター配列に結合できるようになったことが示された。DMF はまた、既知の Nrf2 の標的遺伝子として知られる NAD(P)H デヒドロゲナーゼ (キノン 1) (NQO1)、グルタチオン還元酵素 (GSR) 及びアルド - ケト還元酵素 1B10 (Akr1b10) の発現も誘導した。Nrf2 siRNA サイレンシング配列を用いた結果から、この誘導は Nrf2 依存性であることが示された。

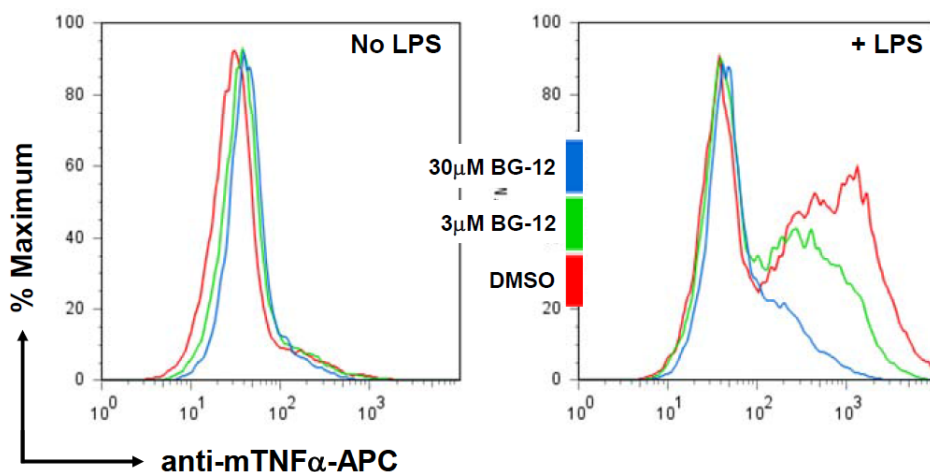
以上、DMF は、Keap1 の Cys-151 を直接共有結合修飾した。この結合によって Nrf2 と Keap1 との結合が阻害され、細胞質内に Nrf2 が蓄積した。この蓄積された安定化 Nrf2 が核内に移行し、ARE を有する遺伝子の転写を活性化した。したがって、これらの試験結果から、DMF 又は MMF 依存性の Nrf2 経路活性化によって、抗酸化応答遺伝子の活性化を引き起こすことが示唆された。

2.6.2.2.4 フマル酸ジメチル(DMF)の in vitro における抗炎症作用(試験番号 RSCH-2011-023)

記載箇所：参考[M4.2.1.1-5] RSCH-2011-023

DMF は、神経炎症性疾患の治療において臨床効果を示し (Kappos et al., 2008)、非臨床炎症モデルで有効性を示すことが示唆されている (2.6.2.3.2 項、試験番号 RSCH-2011-026 ; 2.6.2.3.4 項、試験番号 RSCH-2011-029 ; Linker et al., 2011)。本試験では、リポ多糖 (LPS) による TLR-4 刺激を介した in vitro 炎症モデルを用いて、DMF の抗炎症作用機序を検討した。マクロファージ及びアストロサイト DMF で前処理すると、LPS 刺激後の炎症反応が抑制され、炎症性サイトカインの産生が減少した。マウスマクロファージでは、転写因子 Nrf2 は LPS 刺激によるサイトカイン産生の抑制に関連したが、高濃度の DMF は、Nrf2 経路に依存せずサイトカイン産生を抑制した。このサイトカイン抑制は、細胞生存に対する LPS 刺激の影響がないバックグラウンドにおいて認められた。

図 3 LPS 刺激した RAW264.7 マクロファージ細胞株を用いた DMF による TNF-α 産生の阻害

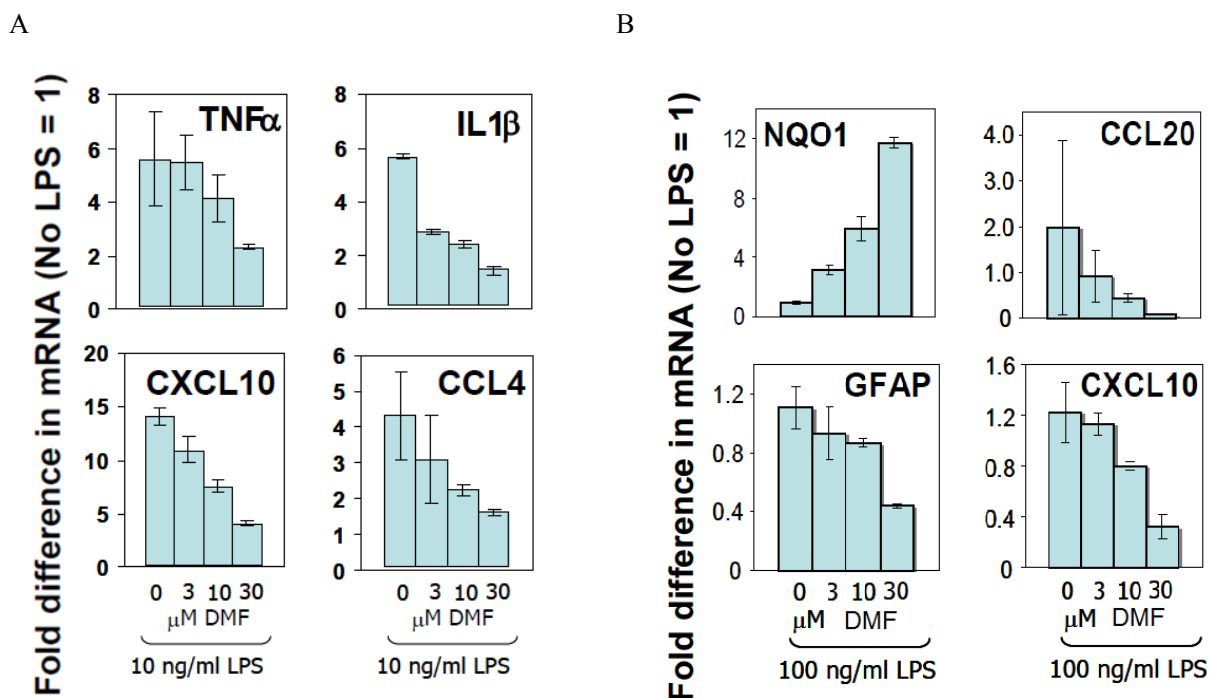


Data source : [M4.2.1.1-5] RSCH-2011-023-Figure 1

APC : アロフィコシアニン

RAW264.7 細胞における細胞内サイトカインのフローサイトメトリー (FACS) 解析から、LPS (1 ng/ml) 刺激による TNF-α 産生が、DMF 処理によって抑制されることが示された (図 3)。細胞の TNF-α 発現は、FACS 解析によりモニタリングされた。LPS で刺激すると TNF-α 陽性細胞の増加が引き起こされたが (図中赤線)、この TNF-α 陽性細胞の増加は DMF 処理によって抑制された (図中緑線及び青線)。

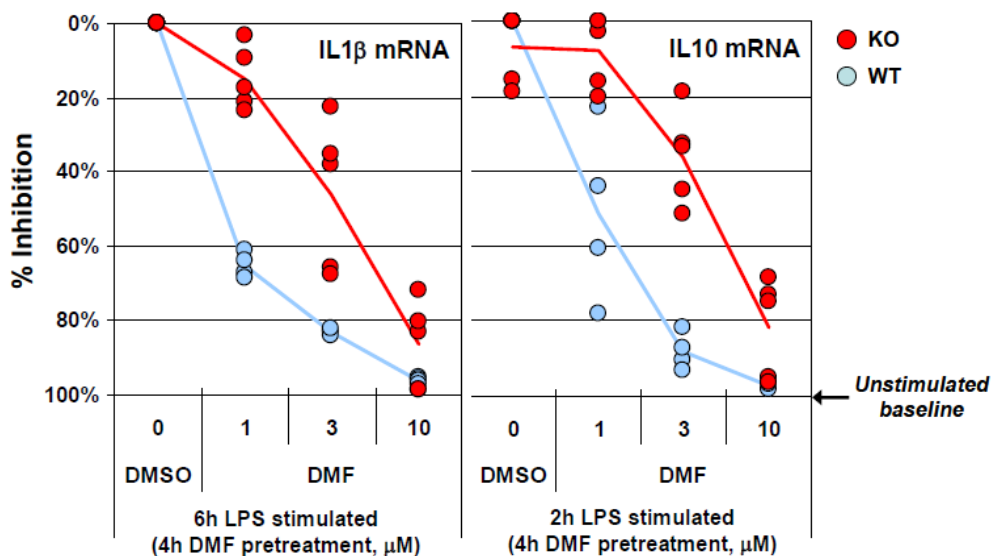
図 4 RAW264.7 マクロファージ細胞株及びラットアストロサイトを DMF 処理したときの LPS 刺激に対する応答の阻害作用



Data source : [M4.2.1.1-5] RSCH-2011-023-Figure 2, Figure 3
 平均値 \pm 標準偏差 (n = 3)

定量的逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法から、RAW264.7 マクロファージ細胞株を DMF で 2 時間前処理後に LPS で 4 時間刺激すると、遺伝子発現の変化が抑制されたことが示された (図 4A)。RAW264.7 マクロファージ細胞を LPS で刺激すると炎症反応が誘導され、TNF- α 、IL1- β 、CXCL10 及び CCL4 の発現増加が認められた。DMF 前処理によって、これらの炎症性メディエーターの発現が濃度依存的に抑制された。同様に、ラットアストロサイトでも、DMF 前処理によって LPS 刺激で誘導される炎症性メディエーターの発現が抑制された。DMF 前処理はラットアストロサイトの Nrf2 標的遺伝子 NQO1 の発現を濃度依存的に誘導し、アストロサイトの活性化マーカーである GFAP 遺伝子発現を抑制した (図 4B)。

図 5 DMF による骨髄由来マクロファージのサイトカイン産生抑制における Nrf2 の関連性



Data source : [M4.2.1.1-5] RSCH-2011-023-Figure 5

4重又は5重測定におけるサイトカイン産生 (IL-1β 又は IL-10 の mRNA) 阻害%。ベースラインにおける発現量を 100%阻害とする。

WT : 野生型マウス骨髄由来マクロファージ、KO : Nrf2 ノックアウトマウス骨髄由来マクロファージ

DMF は高濃度 (3 及び 10 μM DMF) で、野生型及び Nrf2 ノックアウトマウス (Nrf2^{-/-}) 骨髄由来マクロファージの LPS (5 ng/ml) 刺激による IL1-β 及びインターロイキン 10 (IL-10) mRNA 産生を抑制した (図 5)。しかし低濃度 (1 μM DMF) では、野生型骨髄由来マクロファージの LPS 刺激に対する応答が阻害されたが、Nrf2 ノックアウト骨髄由来マクロファージの LPS 刺激に対する応答は阻害されず、DMF は Nrf2 依存性及び非依存性の両方の抗炎症機序を有することが示唆された。

以上、DMF はマクロファージ細胞株、初代培養骨髄由来マクロファージ及びアストロサイトをを用いた *in vitro* 炎症モデルで、LPS によって誘導される炎症反応を抑制した。Nrf2 は、マウス骨髄由来マクロファージで DMF による LPS 応答抑制に関連するが、LPS 応答抑制に必須ではないことが示された。

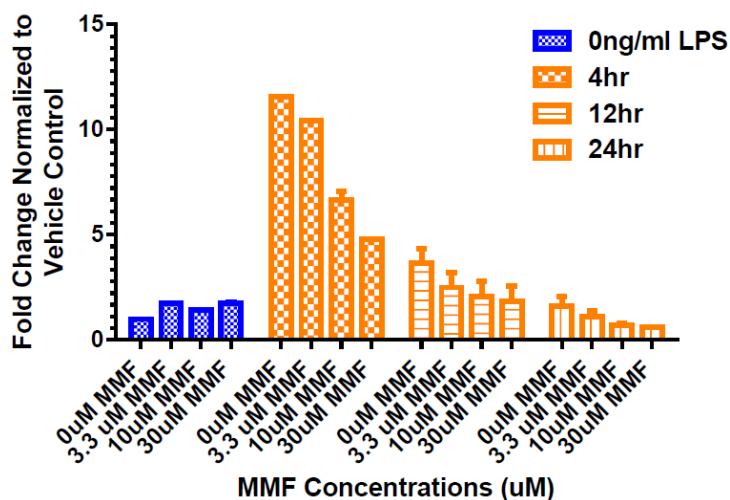
2.6.2.2.5 LPS 誘導性アストロサイト及びミクログリア活性化応答におけるフマル酸ジメチル及びフマル酸モノメチルの作用 (試験番号 RSCH-2012-023)

記載箇所 : 参考[M4.2.1.1-6] RSCH-2012-023

細胞を LPS で刺激すると、TL4R 受容体と LPS の相互作用を介した様々な炎症性サイトカインの産生を引き起こす。このサイトカイン産生は、MOG によって誘導された実験的自己免疫性脳脊髄炎 (MOG-EAE) 等、*in vivo* 炎症モデルの多くにおける炎症経路の活性化に類似する。DMF 及び MMF による *in vitro* における LPS 誘導性炎症応答の抑制作用を明らかにするために、マウス初代培養アストロサイト及びミクログリアにおける炎症マーカー TNF-α の産生レベルの変化を定量的

PCR 法を用いて測定した。Nrf2^{-/-}マウスのアストロサイト及びミクログリアを用いて、DMF 及び MMF による炎症マーカーの抑制における Nrf2 の役割も検討した。

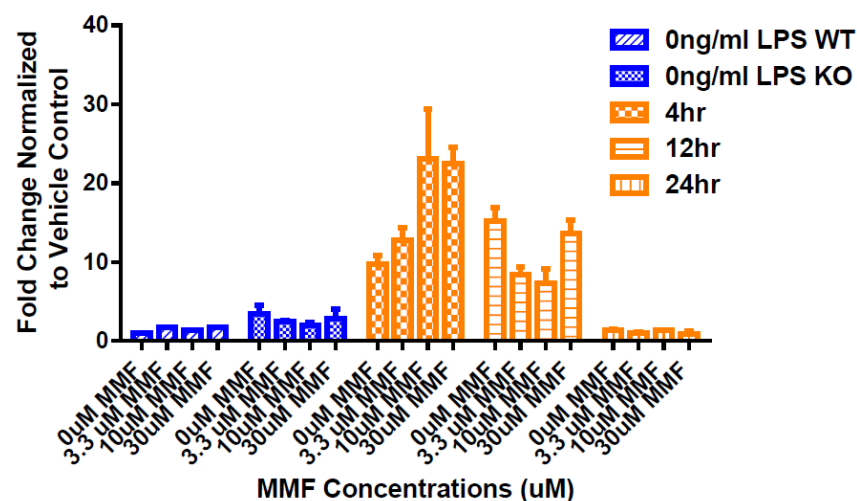
図 6 野生型マウス初代培養アストロサイトにおける LPS 誘導性 TNF- α 産生の MMF による変化



Data source : [M4.2.1.1-6] RSCH-2012-023-Figure 1
 溶媒対照値で補正した遺伝子発現量の変化 (平均値 ± 標準偏差、n = 2)。

野生型マウスの初代培養アストロサイトは、0、3.3、10 又は 30 μM の MMF で 24 時間処理した後 LPS 刺激した。LPS 刺激は、細胞を 1 ng/mL の LPS に 1 回 4、12 又は 24 時間曝露させて行った。試料ウェルをレプリケートにして試験を実施し、定量的 PCR 法により TNF- α の変化を解析した。炎症マーカー TNF- α を解析した結果は、MMF で細胞を処理すると本マーカーの用量依存性の減少を示した (図 6)。

図 7 Nrf2^{-/-}マウス初代培養アストロサイトにおける LPS 誘導性 TNF- α 産生の MMF による変化

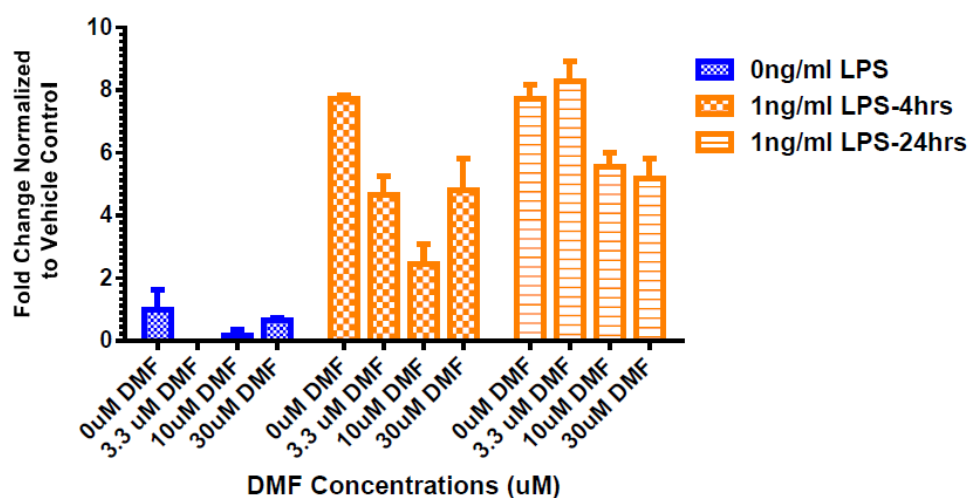


Data source : [M4.2.1.1-6] RSCH-2012-023-Figure 2
 溶媒対照値で補正した遺伝子発現量の変化 (平均値 ± 標準偏差、n = 2)。

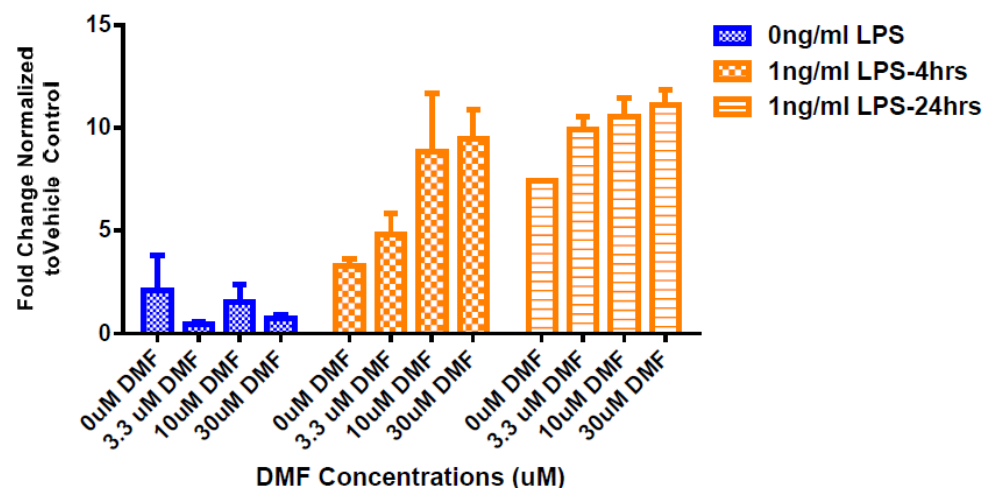
Nrf2^{-/-}マウスの初代培養アストロサイトは、0、3.3、10 又は 30 μM の MMF で 24 時間処理した後 LPS 刺激した。細胞は LPS 単回 1 ng/mL の用量に 4、12 又は 24 時間曝露した。試料ウェルをレプリーケートにして試験を実施し、定量的 PCR 法により TNF- α の変化を解析した。炎症マーカー TNF- α を解析した結果、MMF で細胞を処理すると本マーカーの用量依存性の減少が抑制され、DMF の抗炎症反応において Nrf2 が重要な役割を担っていることが示唆された (図 7)。

図 8 野生型及び Nrf2^{-/-}マウス初代培養ミクログリアにおける LPS 誘導性 TNF- α 産生の DMF による変化

野生型マウスミクログリア：TNF- α の定量的 PCR 解析結果



Nrf2^{-/-}マウスミクログリア：TNF- α の定量的 PCR 解析結果



Data source : [M4.2.1.1-6] RSCH-2012-023-Figure 4

溶媒対照値で補正した遺伝子発現量の変化 (平均値 \pm 標準偏差、n = 2)。

Nrf2^{-/-}及び野生型マウス初代培養ミクログリアは、0、3.3、10 又は 30 μM の MMF で 24 時間処理した後 LPS 刺激した。細胞は LPS 単回 1 ng/mL の用量に 4、12 又は 24 時間曝露した。試料ウェ

ルをレプリケートにして試験を実施し、ELISA 法により TNF- α の変化を解析した。炎症マーカー TNF- α を解析した結果は、MMF で細胞を処理すると野生型細胞で本マーカーの用量依存性の減少を示したが、Nrf2-/-細胞では減少が抑制されたことから、Nrf2 依存性であることを示した (図 8)。

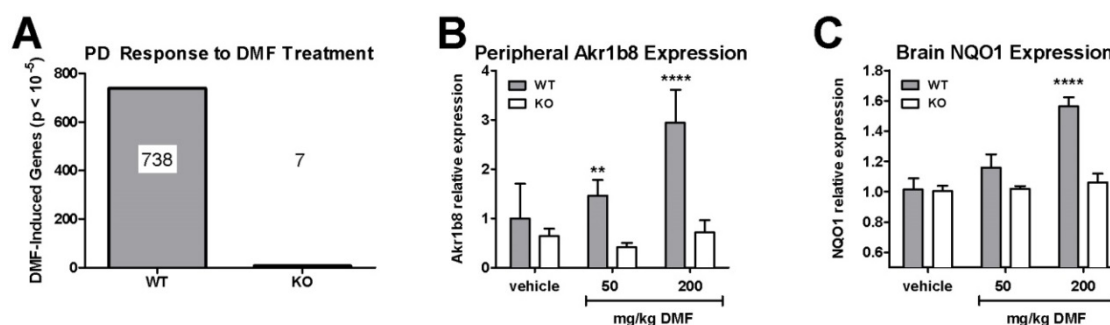
野生型マウスを DMF で処理して LPS 誘導性炎症マーカーの細胞内変化を評価する一環として、野生型マウス初代培養アストロサイトは、0、3.3、10 又は 30 μ M の DMF で 24 時間処理した後、異なる濃度 (1、10 又は 100 ng/mL) の LPS に 4 時間曝露した。試料ウェルをレプリケートにして試験を実施し、定量的 PCR 法により TNF- α 及び IL-1 β の変化を解析した。炎症マーカー TNF- α 及び IL-1 β を解析した結果は、DMF 処理細胞でこれらマーカーの用量依存性の減少を示した (データは示さず)。以上、DMF 及び MMF はアストロサイト及びミクログリアにおいて複数の時点で LPS 誘導性炎症マーカー (TNF- α 及び IL-1 β) を用量依存性に減少させた。DMF 及び MMF と関連した LPS 誘導性炎症マーカーの減少は、Nrf2 転写因子の欠損がこの変化を喪失させたことから、Nrf2 に依存性であった。

2.6.2.2.6 酸化ストレスに対するフマル酸エステルによる Nrf2 経路を介した中枢神経系細胞保護作用 (試験番号 RSCH-2011-028)

記載箇所：参考[M4.2.1.1-7] RSCH-2011-028

酸化ストレスは、MS 等の複数の神経変性疾患の発症に中心的な役割を担っている。そのため、抗酸化機能を増強する治療は臨床的に有用である。本試験では、初代培養中枢神経系由来細胞で、酸化的損傷に対する細胞の抵抗性に関する DMF 及び MMF の直接的な細胞保護作用を検討し、この細胞保護作用における Nrf2 経路の依存性及び機能を検討した (図 9)。中枢神経系細胞を DMF 又は MMF で処理すると、活性 Nrf2 レベルの増加とともに (図 10)、主な抗酸化剤標的遺伝子のアップレギュレーションが認められた。また DMF 又は MMF 処理によって、細胞内酸化還元電位、グルタチオン、ATP レベル及びミトコンドリア膜電位が濃度依存的に増加した (図 11)。アストロサイト又はニューロンを DMF 又は MMF で処理した試験では、急性の有害な酸化ストレス後の細胞生存率が有意に改善した (図 12)。この細胞生存率に対する効果は、Nrf2 発現量を減少させたアストロサイトでは認められなかった (図 13)。

図 9 中枢神経系における DMF による抗酸化応答の Nrf2 依存性



Data source : [M4.2.1.1-7] RSCH-2011-028-Figure 1

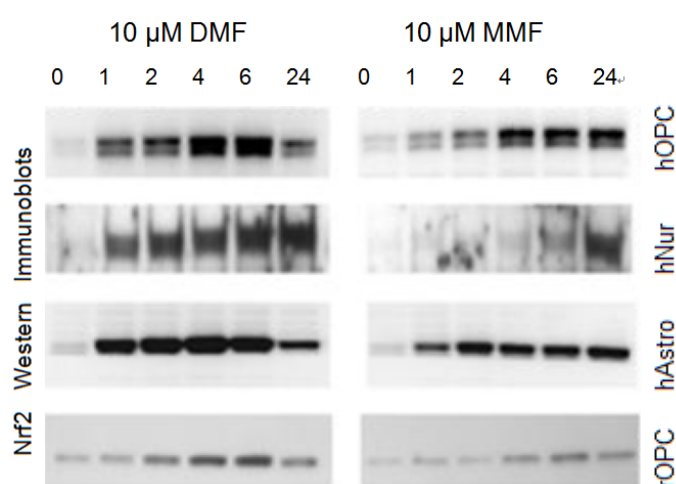
A : 野生型 (WT, n = 5) 及び Nrf2^{-/-}マウス (KO, n = 5) に DMF (200 mg/kg) を投与したとき、溶媒対照に比べて有意に誘導された遺伝子数

B : 各投与における Akr1b8 遺伝子発現の変化率 (平均値±標準偏差, n = 5)。

C : 各投与における NQO1 遺伝子発現の変化率 (平均値±標準偏差, n = 5)。

DMF 投与後の薬力学応答を検討するため、野生型マウス又は機能的 Nrf2 遺伝子欠損 (Nrf2^{-/-}) マウス (Itoh et al., 1997) に、DMF を 0、50 又は 200 mg/kg の用量で強制経口投与し、投与 4 時間後に組織の広範囲な転写活性化プロファイリングを行った。DMF を 200 mg/kg の用量で投与したとき、野生型マウスでは脾臓で 738 種類の特異的遺伝子発現が誘導されたが ($p < 10^{-5}$ 、対応のない両側 t-test)、Nrf2^{-/-}マウスでは 7 種類の遺伝子発現の変化しか認められなかった (これらの Nrf2 非依存性に発現する遺伝子を明確に分類することはできず、それらの間に共通経路も認められなかった) (図 9A)。この結果から、DMF の特異的な作用は Nrf2 を介していることが示された。定量的 PCR を用いて脾臓組織をより詳細に解析し、野生型及び Nrf2^{-/-}マウス間で Akr1b8 遺伝子発現レベルの差を検討した。その結果、DMF による Akr1b8 遺伝子発現の誘導は、Nrf2 依存性であることが示された (図 9B)。脳組織を用いて同様の解析を実施し、NQO1 の転写レベルを定量した。その結果、DMF による NQO1 遺伝子の発現も Nrf2 依存性であった (図 9C)。図 9B 及び C には、溶媒対照群と多重比較を行う Bonferroni の事後補正を用いた二元配置分散分析 (ANOVA) によって認められた統計学的有意差を**** $p < 0.0001$ 及び*** $p < 0.01$ で示す。DMF 依存性の PD 応答の組織特異性を検討するため、更なる解析を現在実施中である。これらの試験から、転写活性化における DMF 依存性の薬力学的応答は、末梢及び中枢神経組織のいずれでも主に Nrf2 経路を介していることが示された。これらの転写反応は、本試験では Nrf2 依存性であったが、DMF の別の作用機序が関与している可能性や他の非転写経路が関与する可能性を否定するものではない。

図 10 中枢神経系細胞における DMF 及び MMF による Nrf2 量の増加

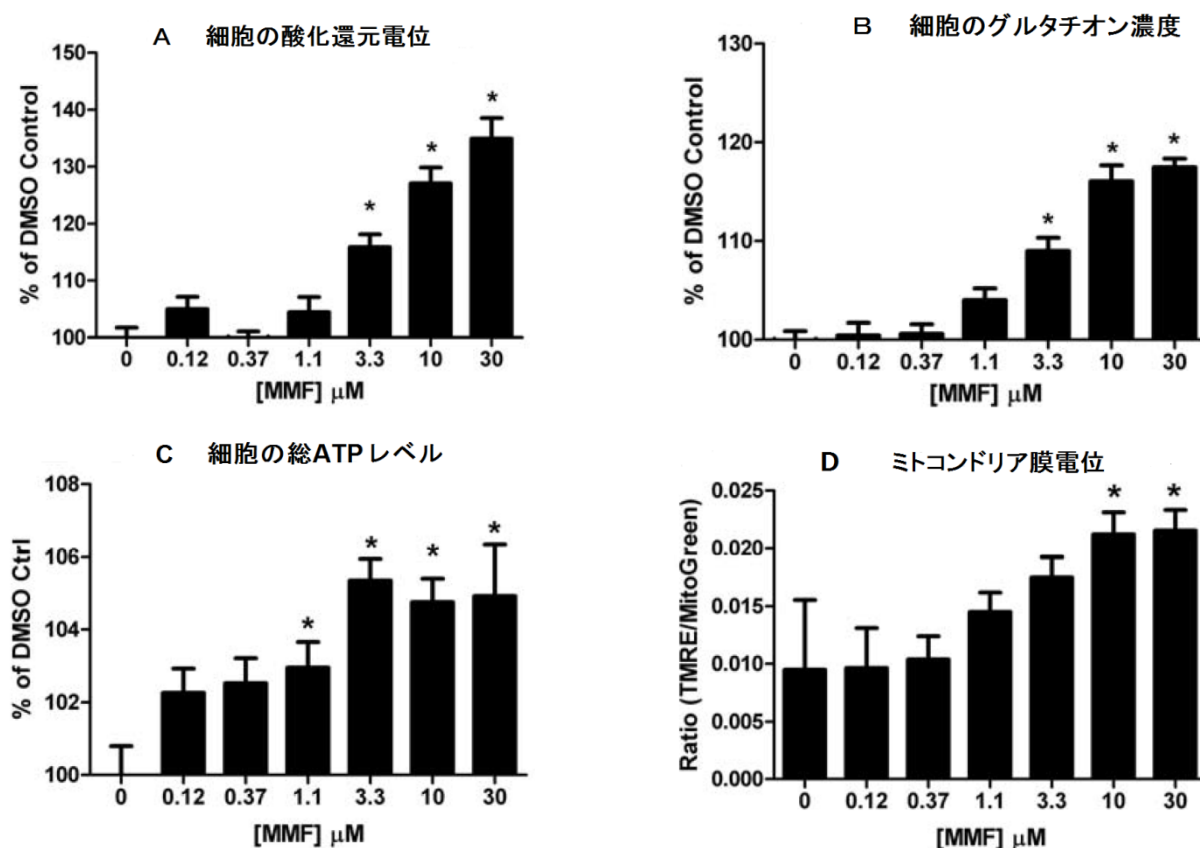


Data source : [M4.2.1.1-7] RSCH-2011-028-Figure 2

ヒトオリゴデンドロサイト前駆細胞 (hOPC)、ヒト海馬ニューロン (hNur)、ヒトアストロサイト

(hAstro) 及びラットオリゴデンドロサイト前駆細胞 (rOPC) の初代培養細胞を、10 μM の DMF 又は MMF で処理し、24 時間までの様々な時点で回収した。ウェスタンブロット法を用いて、細胞抽出液の Nrf2 を解析した。本解析から、DMF 及び MMF のいずれも、中枢神経系由来の様々な種類の細胞において Nrf2 の安定化及び蓄積を引き起こすことが示された (図 10)。

図 11 MMF のグルタチオン及び ATP 増加を介した細胞酸化還元電位の増加

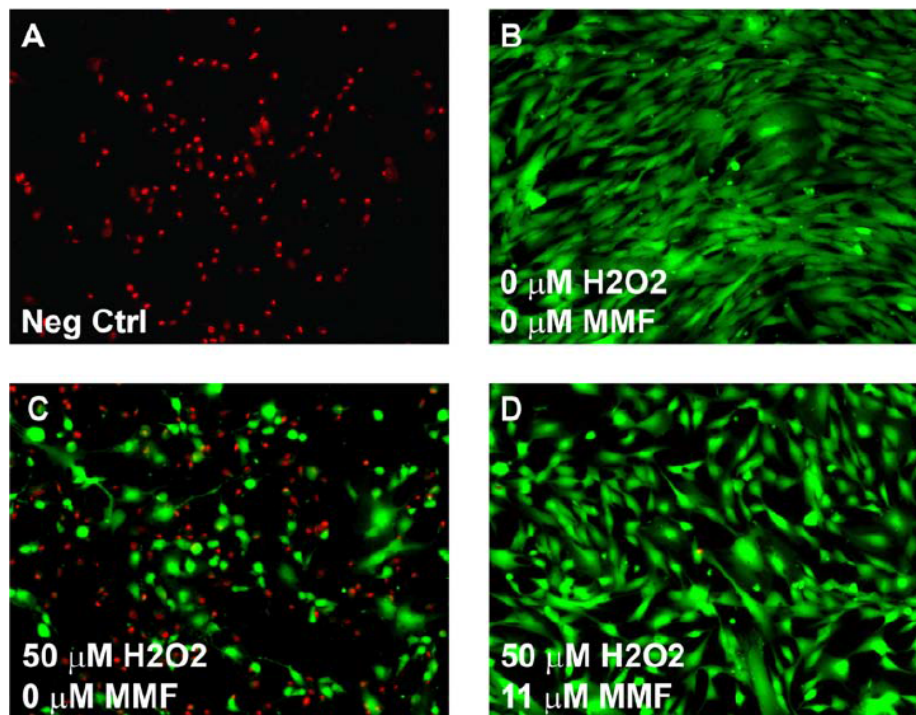


Data source : [M4.2.1.1-7] RSCH-2011-028-Figure 4
 A~D : 平均値 \pm 標準偏差 (n = 8)。

DMF は代謝促進作用を示すと考えられ、DMF で処理したアストロサイトでは、酸化ストレス抵抗性の増加及びミトコンドリア機能亢進が認められた。ヒトアストロサイトを段階希釈濃度の MMF で処理し、細胞の酸化還元電位 (図 11A) 及びグルタチオン濃度 (図 11B) を評価した。酸化還元電位及びグルタチオン濃度の両方の評価で増加が認められたことから、細胞の酸化還元能が MMF 依存性に増加することが示され、酸化ストレスの軽減に有効であると考えられた。同様の評価法で、総 ATP レベル (図 11C) 及びミトコンドリア膜電位 (図 11D) も、MMF 処理に応じて増加した。これらの結果から、MMF がミトコンドリアの変化を促進し、有害ストレスに対して保護するミトコンドリアの機能を亢進させたことが示された。図 11A、B 及び C は、対照である DMSO 処理細胞に対する割合 (%) で示した。ミトコンドリア膜電位 (図 11D) は、細胞内ミトコンドリア量で補正するため、MitoFluor™ Green 強度に対する TMRE 強度の比 (平均値) で示した。標準偏差をエラーバーで示した。最小サンプル数 n = 8 であった。* $p < 0.05$ は、DMSO

対照に対して多重比較を行う Dunnett の事後補正を用いた一元配置分散分析 (ANOVA) による。

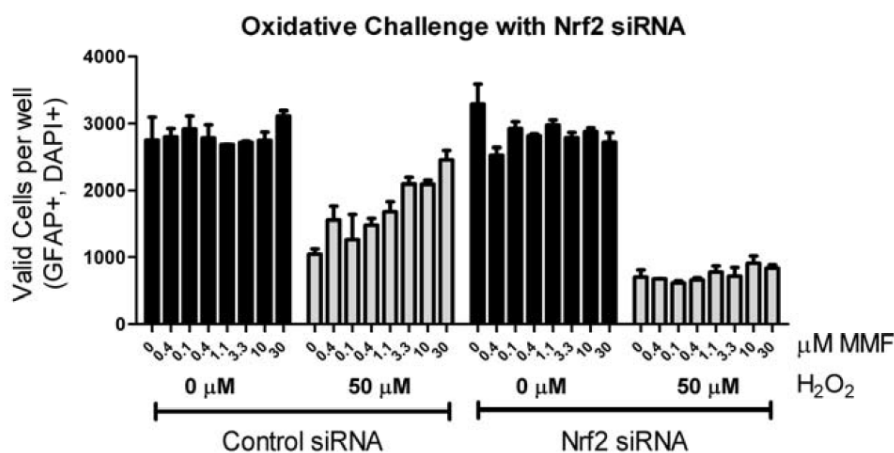
図 12 酸化攻撃を受けたアストロサイトにおける DMF 及び MMF による直接的な細胞保護作用



Data source : [M4.2.1.1-7] RSCH-2011-028-Figure 5

上記で観察された代謝刺激による酸化ストレスに対する保護機能亢進を確認するため、アストロサイトを段階希釈濃度の MMF で処理後、酸化ストレスに短時間曝露した後回収した。「生細胞」染色試薬 CalceinAM (緑色) 及び「死細胞」染色試薬エチジウムホモダイマー (赤色) を用いて標識し、生細胞画像解析を実施した。陰性対照細胞は、細胞膜透過性を付与するため、0.1%サポニンでプレインキュベーションした。陰性対照細胞は明らかに「死細胞」染色試薬で染色されたが(図 12A)、DMSO で処理した陽性対照細胞は「生細胞」染色試薬で均一に染色された(図 12B)。DMSO で処理したアストロサイトに 50 μM の H₂O₂ を負荷した結果、非負荷対照 (図 12B) と比べて細胞生存率が低下し、生細胞が顕著に減少し死細胞が増加したことが示された (図 12C)。11 μM の MMF で処理したアストロサイトに H₂O₂ を負荷した場合は、酸化ストレスに対する顕著な保護作用が認められ、細胞生存率が維持された (図 12D)。

図 13 アストロサイトの MMF による細胞保護作用の Nrf2 依存性



Data source : [M4.2.1.1-7] RSCH-2011-028-Figure 7

平均値 ± 標準偏差 (n = 4)

酸化ストレスに対する MMF による細胞保護作用における Nrf2 の必要性を検討するため、ヒトアストロサイトに対照（非特異的 siRNA）又は Nrf2 特異的 siRNA をトランスフェクトした。その結果、トランスフェクト後 48 時間まで、DMF 又は MMF による Nrf2 転写誘導が阻害された。対照又は Nrf2 siRNA 導入アストロサイトを段階希釈濃度の MMF で処理後、上記と同様の方法を用いて 50 μM の H₂O₂ を負荷し、生細胞数を評価した。対照 siRNA は作用を及ぼさず、対照 siRNA を導入した細胞では H₂O₂ 誘導毒性に対する保護作用が MMF 依存的に認められた。それに対し Nrf2 siRNA を導入した細胞では、MMF に対する応答及び生細胞保護作用は認められなかった。これらの結果から、MMF 処理による細胞保護反応には Nrf2 が必要であることが示された。(図 13)。

これらの結果から、本試験で示された DMF 及び MMF による転写における薬力学的作用は Nrf2 依存性であることが示された。DMF 及び MMF は、アストロサイト、ニューロン及びオリゴデンドロサイト前駆細胞などの様々な中枢神経系細胞に抗酸化応答を発現させた。抗酸化応答が誘導された中枢神経系細胞では、酸化ストレス負荷後の生存率の改善が認められ、有害な酸化ストレスに対する抵抗性が付与された。酸化ストレスに対して細胞を保護する機能的作用には、Nrf2 が必要であることが示された。

2.6.2.3 効力を裏付ける試験 (In vivo)

DMF の作用機序及び薬力学的作用を更に検討するために、in vivo 試験で動物モデルにおける DMF 投与の効果を評価した。In vitro 試験の結果と一致し、DMF は、げっ歯類に経口投与した後、脳、十二指腸、空腸及び脾臓などの複数の標的臓器で Nrf2 経路を活性化させた (2.6.2.3.1 項、試験番号 RSCH-2011-025; 2.6.2.2.6 項、試験番号 RSCH-2011-028; 2.6.2.3.5 項、試験番号 RSCH-2011-030)。また、DMF は、in vitro 試験で認められた DMF 及び MMF の分子レベルでの抗炎症作用 (2.6.2.2.4 項、試験番号 RSCH-2011-023) と一致し、関節炎モデル動物 (CIA、2.6.2.3.2 項、試験番号 RSCH-2011-026) 及び MS モデル動物 (EAE、2.6.2.3.4 項、試験番号 RSCH-2011-029) の in vivo

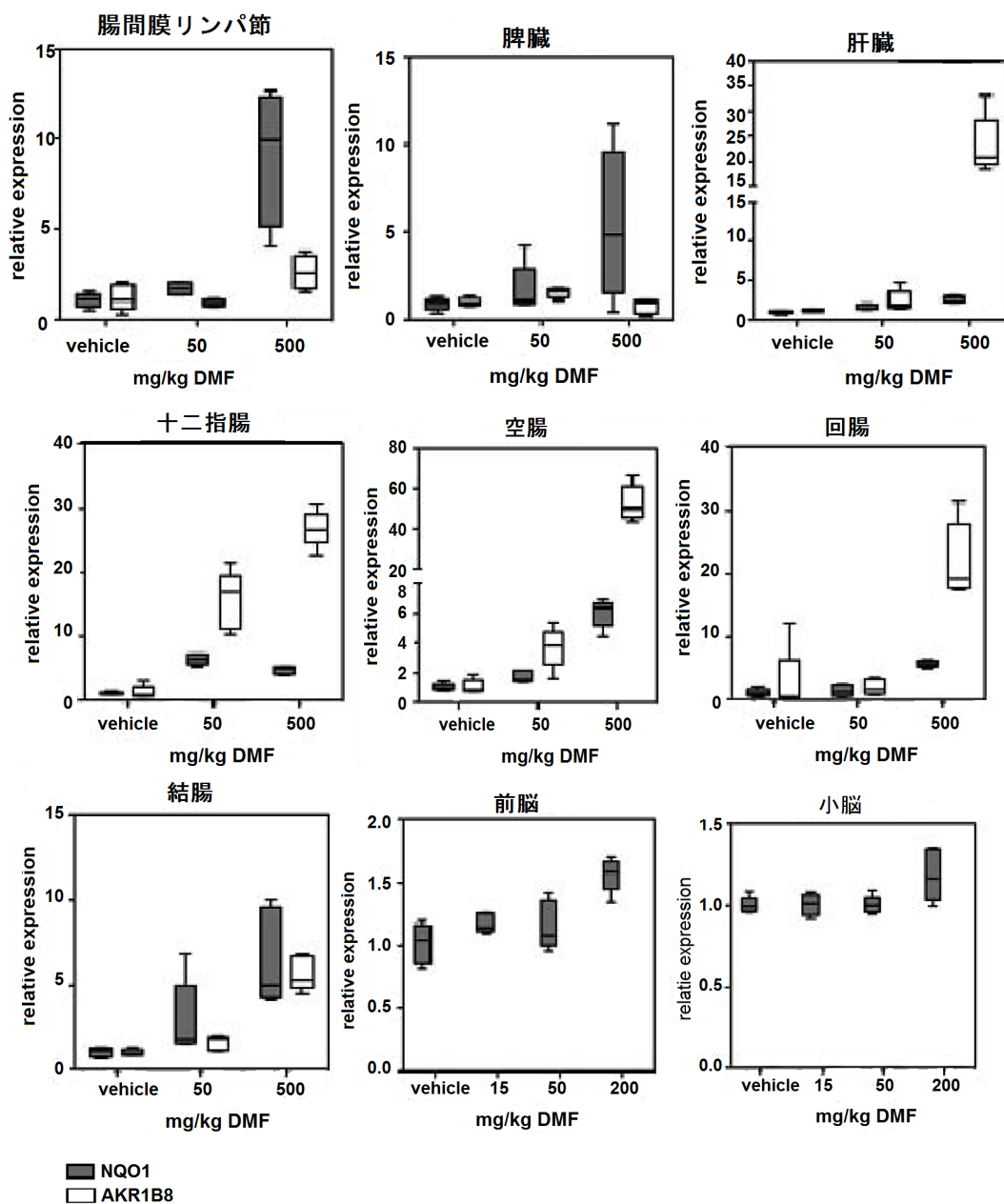
試験系で炎症性疾患活動の低下に有効であった。また、DMF は、*in vitro* で観察された細胞保護作用と一致し、有害物質の *in vivo* 投与後の神経変性の抑制に有効であった (2.6.2.3.3 項、試験番号 RSCH-2011-027 ; 2.6.2.2.6 項、試験番号 RSCH-2011-028)。これらの試験結果から、DMF が一貫した抗炎症作用及び細胞保護作用を有することが示された。

2.6.2.3.1 げっ歯類におけるフマル酸ジメチルの薬力学的作用 (試験番号 RSCH-2011-025)

記載箇所 : [M4.2.1.1-8] RSCH-2011-025

健全なげっ歯類を用いて、DMF の薬力学的作用を *in vivo* で検討した。DMF を単回投与したマウス及びラットから組織を採取し、定量的遺伝子発現解析によって薬力学的作用を検討した。DMF に対する細胞応答を解析した *in vitro* 試験結果から、Nrf2 応答性の高い 2 種類の遺伝子 NQO1 及び Akr1b8 が同定された (2.6.2.2.3 項、試験番号 RSCH-2011-024)。これらの 2 種類の遺伝子を薬力学的転写マーカーとして用いて、*in vivo* で DMF 投与に対する薬力学的反応を検討した。これらの試験結果から、DMF に対する薬力学的反応は組織の種類によって異なることが示された。リンパ組織では NQO1 が主に発現したが、胃腸組織では Akr1b8 が主に発現した (図 14)。また、用量及び DMF 投与後の時間効果を検討した。その結果、DMF に対する薬力学的反応は、極めて高用量の 500 mg/kg 投与時に特定の Nrf2 応答遺伝子発現が 24 時間まで持続することが示され、15 mg/kg の低用量でも一部の組織では検出可能であった (図 15)。Nrf2 ノックアウト (Nrf2^{-/-}) 動物を用いた結果では、*in vivo* での転写活性化に対する DMF 及び MMF の薬力学的作用は、Nrf2 依存性であることが示された (図 16)。

図 14 マウス各組織での DMF の薬力学的作用



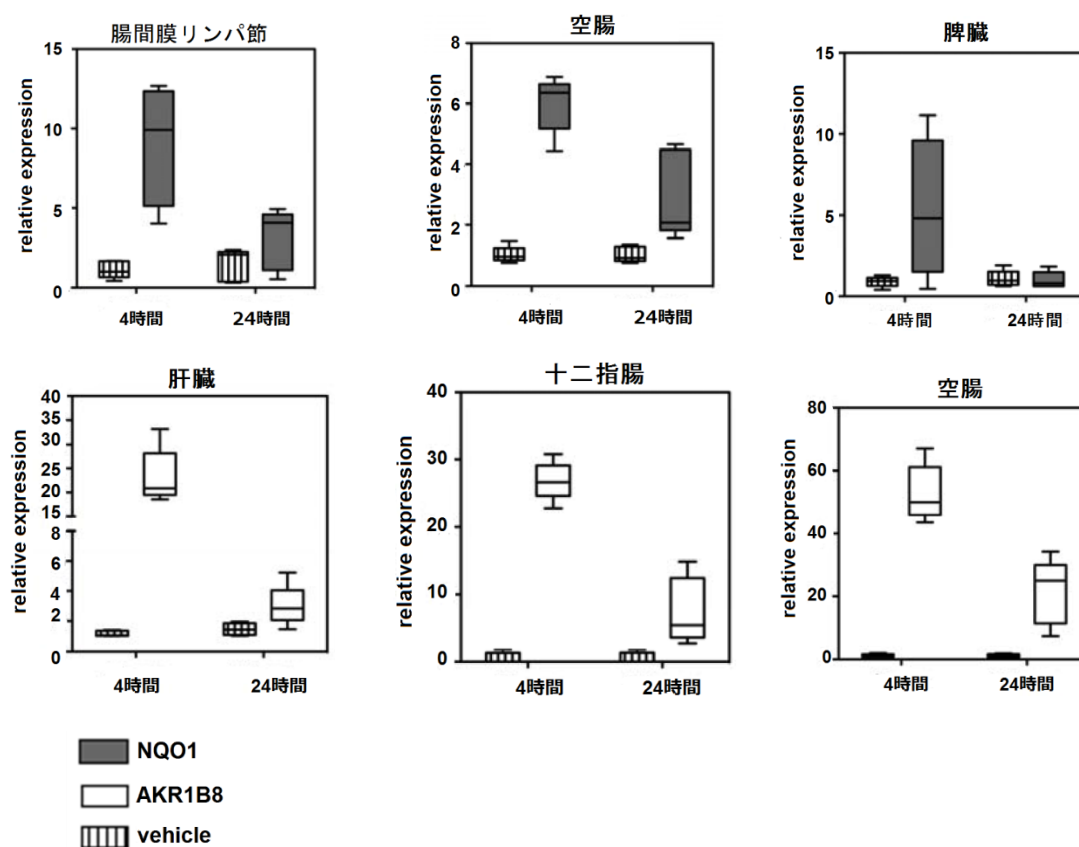
Data source : [M4.2.1.1-8] RSCH-2011-025-Figure 1

箱ひげ図で最小値、25、50、75 パーセンタイル、最大値を示す (n = 5)

C57BL/6 マウス (野生型) に溶媒、50 又は 500 mg/kg で DMF を投与し、投与 4 時間後に、定量的 RT-PCR (qRT-PCR) 法を用いて NQO1 及び Akrlb8 を測定した (図 14)。複数の組織 (十二指腸、空腸、脾臓、回腸、結腸、前脳、肝臓、腸間膜リンパ節及び小脳) で転写活性化に対する薬力学的作用を解析した。その結果、DMF に対する反応は、組織によって異なることが示された。具体的には、NQO1 は脾臓で高レベルに発現したが、Akr1b8 は十二指腸で高レベルに発現した。空腸では NQO1 及び Akrlb8 の両方が発現し、特に Akrlb8 は高レベルに発現した。これらの結果から、in vivo で経口投与後に DMF が Nrf2 応答遺伝子として既知の遺伝子を発現させることが示

された。

図 15 DMF 高用量投与後の一部の組織における 24 時間までの薬力学的作用

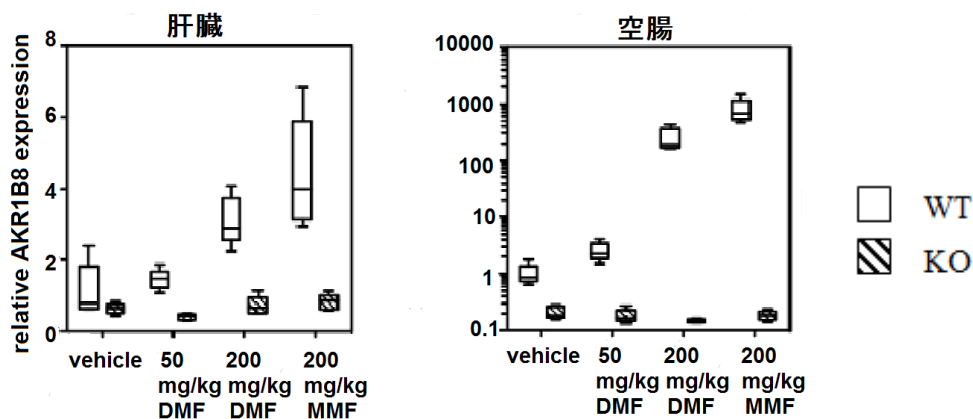


Data source : [M4.2.1.1-8] RSCH-2011-025-Figure 2

箱ひげ図で最小値、25、50、75 パーセンタイル、最大値を示す (n = 5)

転写活性化に対する薬力学的作用の経時変化を検討するため、C57BL/6 マウスに DMF を 500 mg/kg の高用量で単回経口投与し、投与 4 及び 24 時間後に転写産物を測定した。投与 4 時間後では検討した全ての組織で強い薬力学的作用が認められたが、それ以降の時間では遺伝子及び組織の種類によって観察された薬力学的作用の強さは異なった。腸間膜リンパ節、脾臓、肝臓、十二指腸及び空腸の結果を図 15 に示した。NQO1 の発現は、腸間膜リンパ節及び空腸では投与 24 時間後まで持続し、脾臓では発現レベルがベースライン値と同程度に戻った。全般的に、Akr1b8 の発現は、多くの組織で比較的長く持続した。十二指腸及び空腸並びに程度はより小さいが肝臓では、投与 24 時間後で Akr1b8 の発現が認められた。複数の試験で、DMF をより低用量の生理学的用量で投与した場合、投与後 24 時間で測定可能な薬力学的作用は認められなかった (図 15、図 16)。これらの結果から、DMF 投与の薬力学的作用は、対象遺伝子及び組織によって経時変化が異なることが示された。高用量の DMF 投与後の一部の遺伝子発現は、投与後 24 時間まで持続したが、他の遺伝子発現は比較的一過性であった。DMF の用量、MMF 曝露量及び薬力学的作用時間の関連性の詳細については現在検討中である。

図 16 DMF の薬力学的作用の Nrf2 依存性



Data source : [M4.2.1.1-8] RSCH-2011-025-Figure 5

箱ひげ図で最小値、25、50、75 パーセンタイル、最大値を示す (n=5)。

野生型及び Nrf2 ノックアウトマウスを用いて、in vivo での DMF 投与に対する薬力学的反応における Nrf2 遺伝子の必要性を検討した。本検討では、DMF 投与後、肝臓及び消化管で Ak1b8 転写レベルを測定することによって、DMF 及び MMF に対する薬力学的作用を評価した。野生型マウスでは DMF 及び MMF で同程度の薬力学的作用が認められたが、Nrf2^{-/-}マウスでは Ak1b8 発現は検出されなかった (図 16)。

これらの結果から、DMF は、in vivo で正常げっ歯類への単回経口投与後、薬力学的作用を発現することが示された。DMF の薬力学的作用は複雑であり、Nrf2 の標的遺伝子は組織によって異なると考えられた。ほとんどの薬力学的作用は投与 4 時間後まで強く認められたが、薬力学的作用の持続時間は様々であり、遺伝子及び組織の種類によって異なっていた。臨床用量を上回る用量を投与しても、24 時間までに薬力学的作用は消失又はベースライン値まで戻ったことから、特に DMF をより低い生理学的用量で投与した場合には、Nrf2 経路を効果的に活性化するためには、DMF を 1 日に複数回投与する必要があることが示唆された。Nrf2 ノックアウトマウスへの DMF 又は MMF の投与後では、遺伝子を発現する DMF の薬力学的作用は検出されなかったことから、DMF 及び MMF 依存性の薬力学的作用には Nrf2 が必要であることが示唆された。

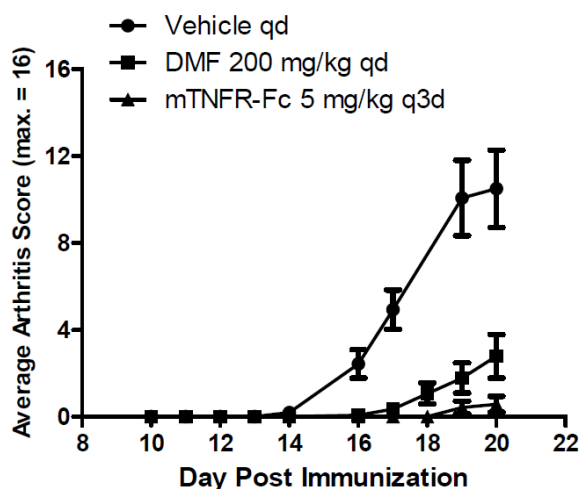
2.6.2.3.2 げっ歯類リウマチ性関節炎モデル：ラットコラーゲン誘導性関節炎におけるフマル酸ジメチルの効果 (試験番号 RSCH-2011-026)

記載箇所：参考[M4.2.1.1-9] RSCH-2011-026

DMF の抗炎症作用を、足蹠へのコラーゲン投与によって誘導したラット急性炎症関節炎モデルで検討した。足蹠腫脹及び関節周囲への免疫細胞浸潤を評価した結果、溶媒投与では 20 日間の試験期間中、疾患活動性が認められた (図 17、図 18 及び図 19)。DMF を 1 日 1 回経口投与すると疾患活動性及び炎症細胞浸潤が有意に減少し、その結果は陽性対照である Fc 融合 TNF 受容体 (TNFR:Fc) と同程度であった (図 17、図 18 及び図 19)。DMF の抗炎症作用を細胞及び分子レ

ベルで解析するため、細胞及び分子の変化を *ex vivo* で検討した。脾臓細胞サブセットを評価した結果、DMF は T 又は B 細胞数に大きな影響を与えないことが示された。本モデルでは、疾患経過中に脾臓で骨髄性細胞が増加したが、DMF 及び TNFR:Fc 投与では脾臓の骨髄性細胞が有意に減少し、TNFR:Fc 投与での減少の程度は DMF より大きかった。*ex vivo* の分子解析から、疾患経過中に足蹠で炎症性サイトカイン遺伝子発現が増加したが、DMF 投与によってこの発現は阻害された。同様に、マクロファージ及びマクロファージ活性化に関連する遺伝子の発現も疾患経過中に増加したが、これらの発現増加は DMF 投与によって阻害された。

図 17 げっ歯類関節炎モデルにおける関節炎スコアに対する DMF の抑制効果

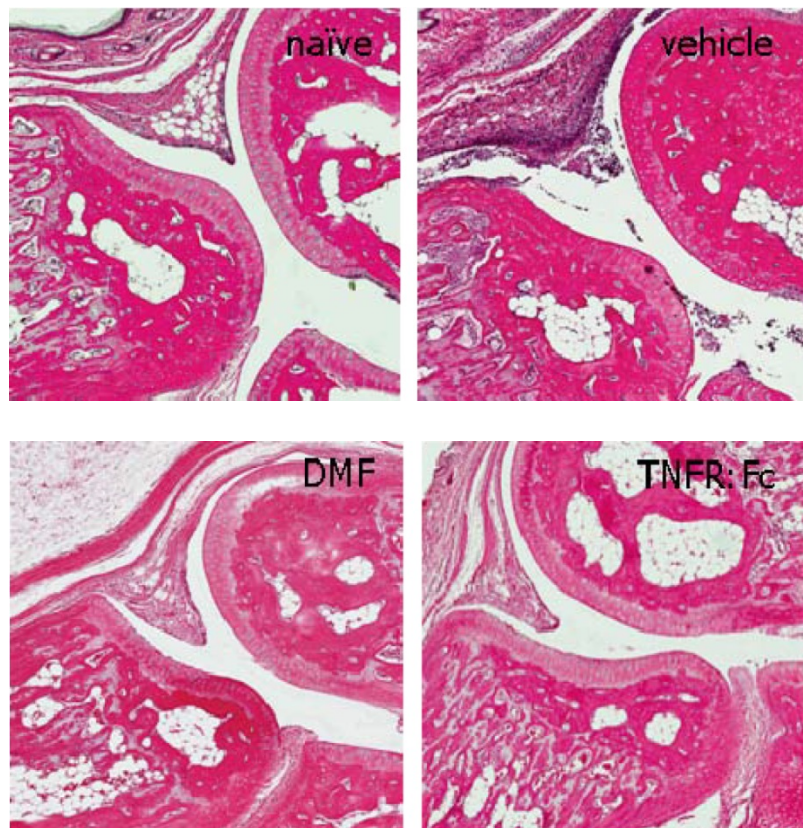


Data source : [M4.2.1.1-9] RSCH-2011-026-Figure 1

平均値 ± 標準偏差 (溶媒対照及び DMF 群は n = 7、mTNFR-Fc 群は n = 5)

コラーゲン免疫動物にヒドロキシプロピルメチルセルロース (溶媒)、DMF 又は TNFR:Fc のいずれかを投与し、関節炎症状を臨床症状スコアを用いて評価した。DMF 200 mg/kg 1 日 1 回投与又は TNFR:Fc 5 mg/kg 3 日ごと投与により、臨床症状スコアによる疾患活動性の発現率及び程度が低下した (図 17)。溶媒投与群の平均最高スコアが 10.57 であったのに対し、DMF 投与群及び TNFR:Fc 投与群の平均最高スコアはそれぞれ 2.76 及び 0.8 と低値であり、疾患活動性の改善が示された。DMF 投与群及び TNFR:Fc 投与群における治療効果は、溶媒投与群に比較して統計学的に有意であった ($p < 0.05$ 、多重比較を行う Dunnett の事後補正を用いた一元配置 ANOVA)。

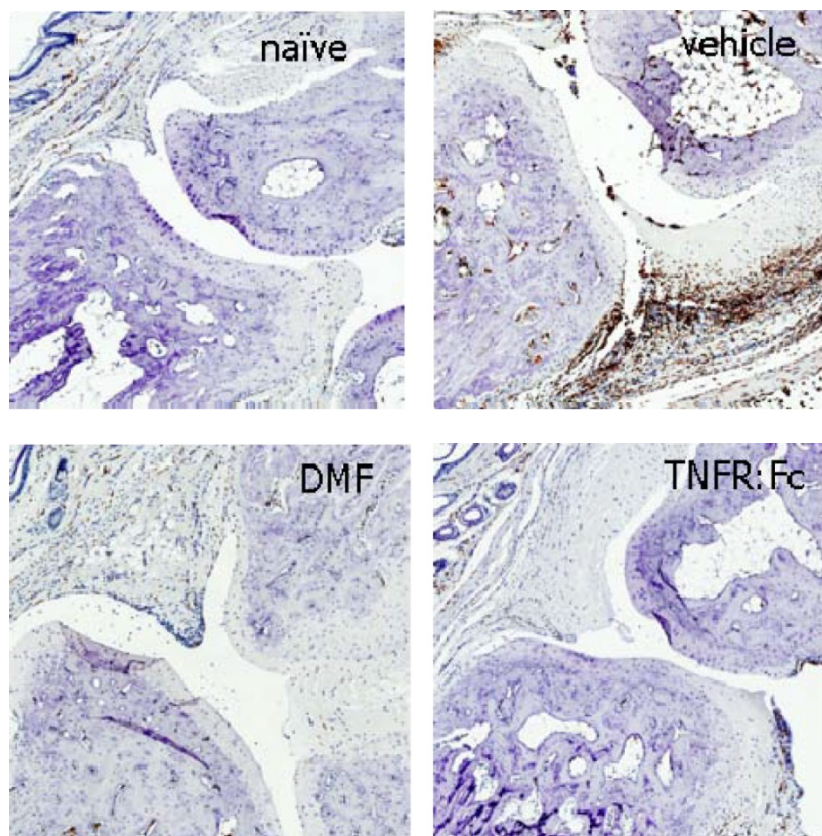
図 18 げっ歯類関節炎モデルにおける肢関節炎に対する DMF の病理組織学的抑制効果



Data source : [M4.2.1.1-9] RSCH-2011-026-Figure 3

図 18 に、コラーゲン免疫後 20 日目における各投与群の中足・指関節のヘマトキシリン・エオシン染色像を示す。溶媒投与群では、7 例全例で関節及び関節周囲への細胞浸潤が顕著であった。DMF 投与群では、試験終了時に足蹠の炎症は 7 例中 5 例でほとんど又は全く認められなかった。

図 19 げっ歯類関節炎モデルにおけるマクロファージ浸潤に対する DMF の抑制



Data source : [M4.2.1.1-9] RSCH-2011-026-Figure 4

図 19 に、疾患誘導後 20 日における各投与群の中足・指関節の IBA-1 免疫染色像を示す。IBA-1 免疫染色により足蹠組織中にマクロファージが認められた（暗褐色に染色）。溶媒投与群では、関節及び関節周囲への IBA-1 陽性マクロファージ浸潤が優勢であった。DMF 投与群及び TNFR:Fc 投与群では、溶媒投与群に比べてマクロファージ浸潤が大きく減少した。

以上、本試験結果では、関節炎の *in vivo* げっ歯類モデルであるコラーゲン誘導性関節炎モデルに DMF の抗炎症作用を示した。DMF は、200 mg/kg の用量で 1 日 1 回投与すると炎症の臨床症状スコアによる疾患活動性の発現率及び程度を低下させた。また、DMF は、炎症性サイトカイン産生及び骨髄性細胞の増殖等、関節部位での細胞浸潤を大きく減少させ、疾患モデルに関連した細胞及び分子レベルでの変化を抑制した。これらの結果から、DMF 経口投与は、本疾患モデルにおいて疾患活動性を低下させ、抗炎症作用を有することが示された。これらの試験結果から、DMF は忍容性が良好な投与で疾患活動性を低下させるのに有効であり、複数の組織・器官で抗炎症作用を発現することが示された。

2.6.2.3.3 Sprague-Dawley (SD) ラットにおけるマロン酸エステル誘導性線条体病変体積の DMF による抑制 (試験番号 RSCH-2011-027)

記載箇所：参考[M4.2.1.1-10] RSCH-2011-027

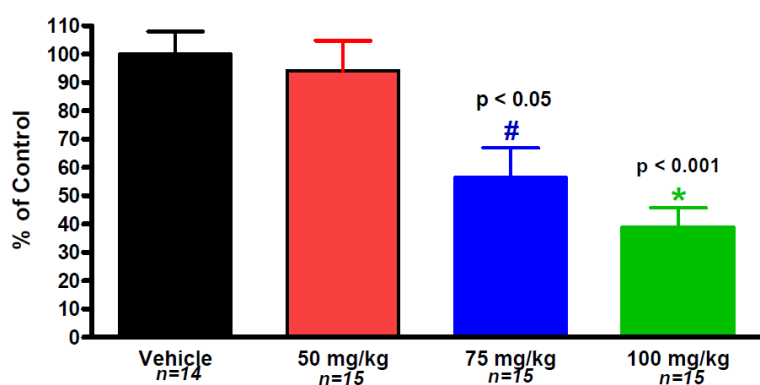
2.6.2 薬理試験の概要文

フマル酸ジメチル

本試験の主要目的は、ラットにおけるマロン酸誘導性線条体片側性病変において DMF の神経保護作用を検討することであった。マロン酸は、神経のエネルギー代謝で中心的な役割を果たすミトコンドリア酵素であるコハク酸デヒドロゲナーゼの阻害剤である。マロン酸を脳の線条体領域に投与することにより、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体拮抗薬の全身投与によって抑制可能な興奮毒性病変が生じる。線条体内マロン酸投与は興奮毒性神経変性モデルとして使用されており、本モデルを用いて DMF の治療効果を検討した。

ラットに DMF を 50、75 又は 100 mg/kg の用量で 1 日 1 回、マロン酸投与前 1 日間及び投与後 4 日間投与した。75 mg/kg 投与群及び 100 mg/kg 投与群では、病変体積の有意な減少（それぞれ 44% 及び 61% 減少）が認められた（図 20）。

図 20 マロン酸エステル誘導性線条体病変体積に対する DMF の効果



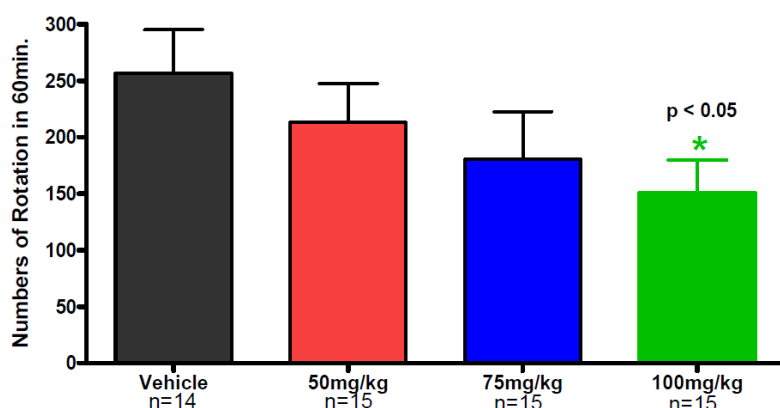
Data source : [M4.2.1.1-10] RSCH-2011-027-Figure 2

対照群に対する割合（平均値 ± 標準偏差）

ラットに、DMF を 0、50、75 又は 100 mg/kg の用量で 1 日 1 回、線条体片側へのマロン酸定位注入前 1 日及び注入後 4 日間強制経口投与した。剖検時、複数の脳切片を用いて立体的解析を行い、チトクローム C 組織化学的手法に基づき呼吸活性を有する生細胞を同定することにより、病変体積を求めた。75 及び 100 mg/kg 群では、病変体積がそれぞれ 44% 及び 61% 有意に減少した。p < 0.05 は Dunnett の事後補正による溶媒対照群に対する多重比較による。

機能維持を評価するため、剖検前日にアポモルヒネを投与した。アポモルヒネはドパミン受容体作動薬であり、運動反応を刺激する。マロン酸投与による線条体組織の変性によって生じる神経学的な不均衡により、マロン酸非投与側の非病変半球は運動出力が大きいため、病変を生じた動物は「病変方向」へ旋回する。DMF 100 mg/kg 投与群では旋回行動が 41% 有意に減少した（図 21）。

図 21 マロン酸エステル誘導性障害ラットにおけるアポモルヒネ誘導回転行動に対する DMF の効果

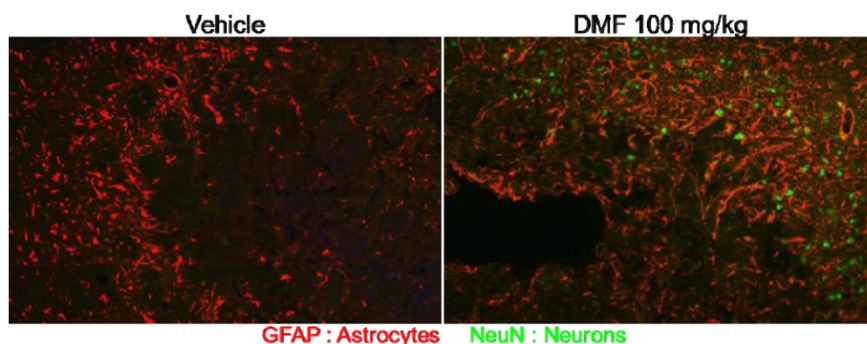


Data source : [M4.2.1.1-10] RSCH-2011-027-Figure 3

平均値 ± 標準偏差

剖検前日にアポモルヒネを皮下注入し、60 分間の総回転数を測定することにより回転行動を評価した。明らかに用量依存性の回転行動の減少傾向が認められ、DMF 100 mg/kg 投与群では溶媒投与群に比べて平均回転数は 41%有意に減少した。p < 0.05 は Dunnett の事後補正による溶媒対照群に対する多重比較による。

図 22 有毒なマロン酸エステル線条体注入に対する DMF 前投与による in vivo 神経細胞保護作用



Data source : [M4.2.1.1-10] RSCH-2011-027-Figure 4

ラット脳切片を染色後免疫蛍光顕微鏡検査法で解析し、特定の種類の中枢神経系細胞を同定し位置を確認した病変像を図 22 に示す。DMF 100 mg/kg 投与群では溶媒投与群に比べて、マロン酸投与領域近位で生存ニューロン（緑色の細胞）の数が増加した。アストロサイトは、溶媒投与群及び DMF 投与群のいずれでも病変境界付近で生存しているように見えた。ニューロンマーカー（NeuN）は緑色、アストロサイトマーカー（GFAP）は赤色で示されている。図 22 は 10 倍拡大像である。

以上、DMF 75 mg/kg 又は 100 mg/kg 投与群では、マロン酸誘導病変体積がそれぞれ 44%及び 61%

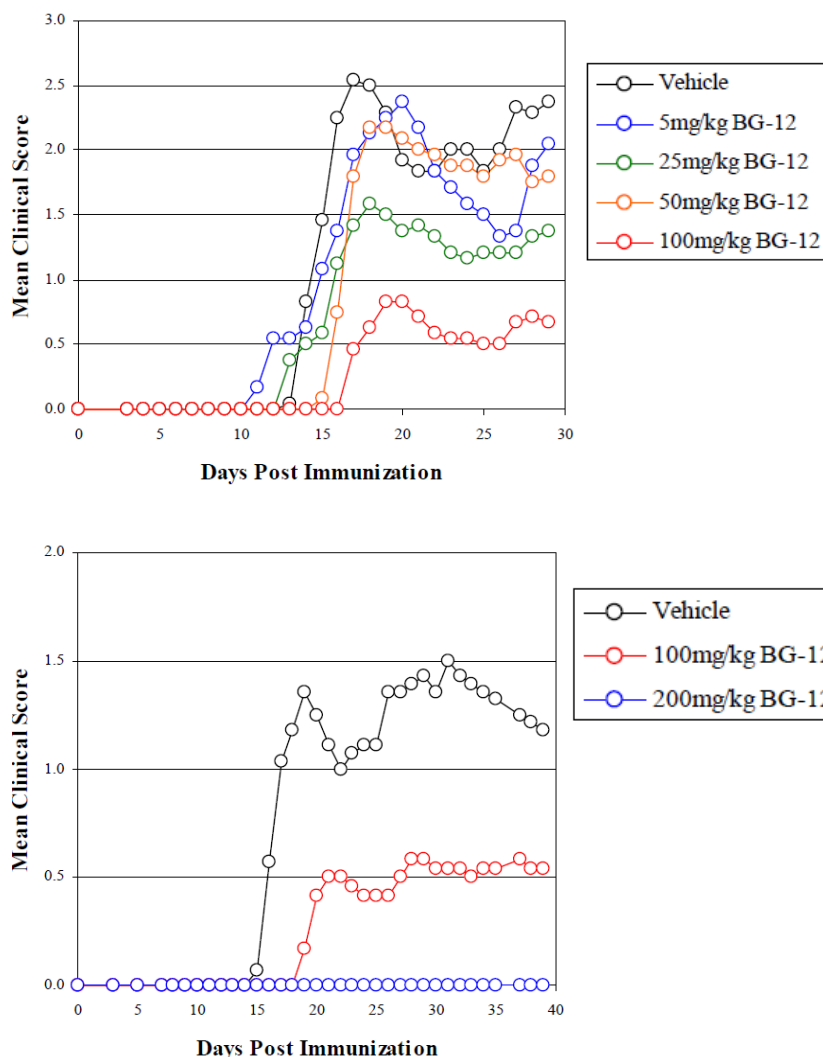
有意に減少した。DMF 100 mg/kg 投与群ではまた、旋回行動も有意に 41%減少した。DMF 投与後、マロン酸誘導性病変モデルにニューロン特異的な免疫染色を実施した結果、明らかなニューロン保護が認められた。DMF がマロン酸誘導線条体病変を小さくし、神経及び行動機能を保護したことから、DMF による in vivo での神経保護作用が示唆された。

2.6.2.3.4 Brown Norway ラット慢性実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) : 多発性硬化症 (MS) モデルにおけるフマル酸ジメチルの効果 (試験番号 RSCH-2011-029)

記載箇所 : 参考[M4.2.1.1-11] RSCH-2011-029

げっ歯類 EAE モデルは、MS の前臨床モデルとして広く用いられている。本モデルでは、Brown Norway ラットを、MOG で免疫し、進行性運動障害及び神経変性に至る自己免疫反応を誘導する。本試験では、DMF の経口投与量及び投与頻度と有効性の関連性を検討した。DMF の投与は免疫後 3 日から開始した。1 日 1 回投与における DMF の有効量は EAE の症状が部分的に軽減した 100 mg/kg であり、200 mg/kg 1 日 1 回投与では EAE の疾患活動性が完全に阻止された (図 23)。50 mg/kg 以下の用量では溶媒対照群との間に有意差は認められなかった (図 23)。この有効性に対する用量反応関係は、同動物モデルの肝臓及び脾臓における Nrf2 応答遺伝子発現に対する用量反応関係とよく一致した (2.6.2.3.5 項、試験番号 RSCH-2011-030)。有効用量以下の DMF の 1 日用量 (50 mg/kg) を 1 日 2 回投与しても改善は認められなかった (図 24)。疾患活動性を不完全に軽減する部分有効量 (100 mg/kg) を 1 日 2 回投与すると、本モデルにおける行動障害を完全に改善する完全有効用量となった。DMF の完全有効 1 日用量 (200 mg/kg) は、隔日投与しても同様に有効であった。

図 23 ラット慢性 EAE モデルにおける DMF の効果



Data source : [M4.2.1.1-11] RSCH-2011-029-Figure 2, Figure 1

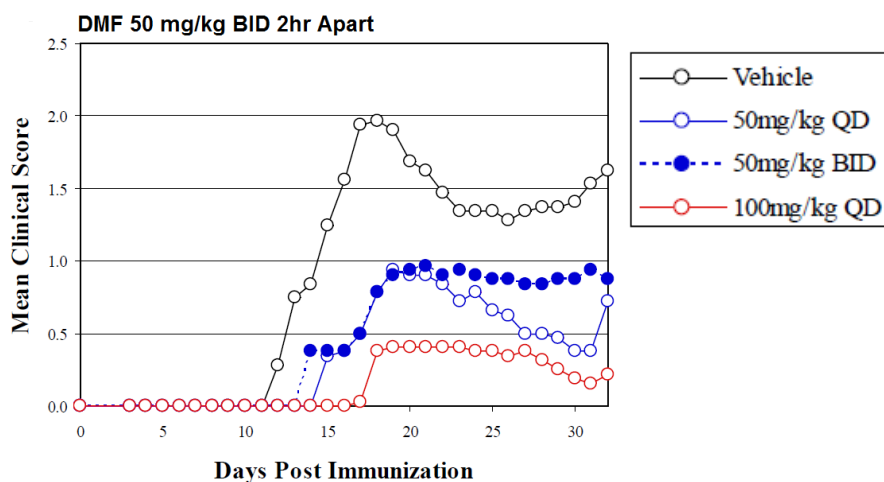
平均値を示し、エラーバーは視認性不良となるため示さない (n = 10)。

EAE の臨床症状は一般に免疫後 11~17 日目に発現し、毎日以下のスコアにより評価した (0.5 = 尾端の不全麻痺、1 = 尾の完全麻痺、1.5 = 尾の不全麻痺及び後肢の軽度の不全麻痺、2.0 = 片側性、重度の後肢の不全麻痺、2.5 = 両側性、重度の後肢の麻痺、3 = 両側性の後肢の完全麻痺、3.5 = 完全両側性の後肢の完全麻痺及び片側性の前肢の不全麻痺、4 = 完全麻痺、瀕死状態又は死亡)。

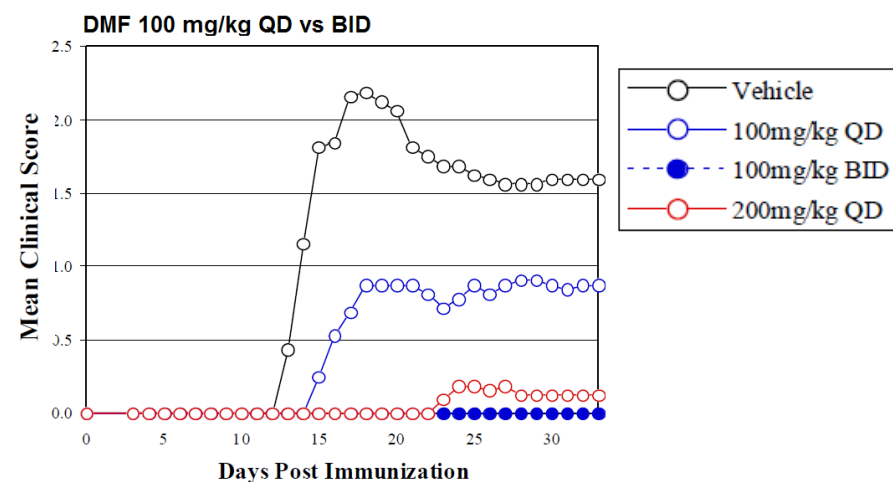
DMF の用量と有効性の関連性をラット慢性 EAE モデルで検討するため、免疫後 3 日目から DMF を 0、5、25、50、100 又は 200 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与した。臨床症状スコアを用いて行動及び運動能力を評価した。5、25 及び 50 mg/kg 投与では、溶媒対照投与と同様の EAE 臨床症状が認められた。200 mg/kg 投与では、EAE の臨床症状を示した個体はなかった。100 mg/kg 投与群では、軽度の EAE 臨床症状が一部の個体で認められた。これらの結果から、ラット慢性 EAE モデルで、DMF の 200 mg/kg 1 日 1 回投与は完全に有効であり、100 mg/kg 1 日 1 回投与は部分的に有効であることが示された。

図 24 EAE モデルにおける薬効に対する投薬回数の影響

A



B



Data source : [M4.2.1.1-11] RSCH-2011-029-Figure 3, Figure 5
 平均値を示し、エラーバーは視認性不良となるため示さない (n = 10)。
 EAE の臨床スコアは図 21 と同じ。

次に、投与頻度が EAE の有効性に与える影響を検討した。一連の検討は 50、100、200 mg/kg の用量で、1 日 1 回 (QD) から 1 日 2 回 (BID) の投与頻度で実施した。QD 投与で有効用量の閾値以下である 50 mg/kg を BID 投与して 1 日曝露量を増加させたときに臨床有効性が改善するかどうかを検討した (図 24A)。100 mg/kg QD 投与では、50 mg/kg QD 又は BID 投与に比べて EAE の症状スコアが減少したが、50 mg/kg の QD 投与から BID 投与への変更による有効性の改善は観察されなかった。次に、QD 投与における部分的有効用量 (100 mg/kg) を BID 投与し、QD 投与における完全有効用量である 200 mg/kg と比較した (図 24B)。興味深いことに、100 mg/kg BID 投与は、200 mg/kg QD 投与と類似した有効性を示した。本検討結果は、先の検討結果と一致し、100 mg/kg QD 投与は溶媒対照投与に比べて有意に有効であったが、200 mg/kg QD 投与の有効性と同程度ではなかった。

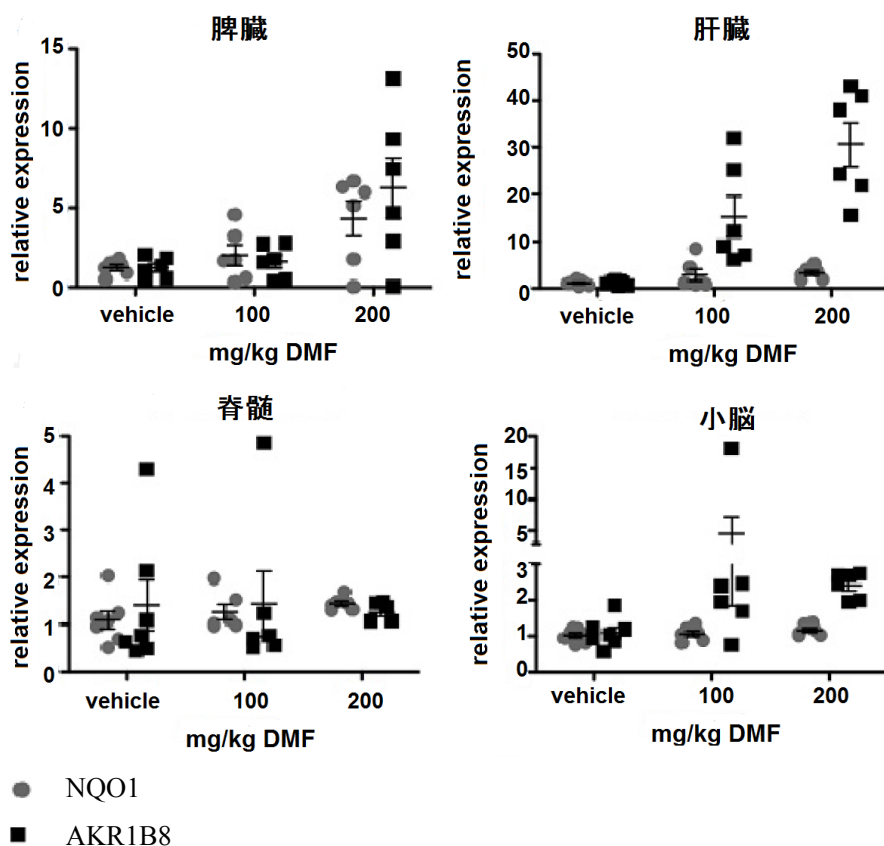
本試験では、多発性硬化症に対する Brown Norway ラット EAE モデルで、DMF の用量及び投与頻度と有効性の関連性を検討した。QD 投与における EAE モデル動物の行動及び運動障害を有意に軽減する最小有効量は、100 mg/kg であった。QD 投与では有効量の閾値以下の用量 (50 mg/kg) を BID 投与して曝露量を倍にしても、有効性は改善しなかった。50 mg/kg BID 投与と 100 mg/kg QD 投与の全身曝露量 (曲線下面積、AUC) は類似していると推測されるため、DMF の最高濃度 (C_{max}) が有効性を決定していることが示唆された。しかし、QD 投与において部分的に有効な用量 (100 mg/kg) の BID 投与は、QD 投与における完全有効用量である 200 mg/kg と類似した有効性を示したことは、この結論と一致しない。この結果から、全身曝露量 (AUC) も本モデルでの有効性の決定に関与していることが示唆された。EAE が炎症及び神経変性の両方の病態を発現する複雑なモデルであることを踏まえると、この MS 動物モデルで観察された有意な有効性に、DMF のどの薬物動態パラメーター (C_{max} 、AUC 又はその両方) が関与しているのか、また、どの保護作用 (抗炎症作用、神経保護作用又はその両方) が関与しているかは不明である。

2.6.2.3.5 ラット慢性実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルにおけるフマル酸ジメチルの細胞レベル・分子レベルでの効果の解析 (試験番号 RSCH-2011-030)

記載箇所：参考[M4.2.1.1-12] RSCH-2011-030

前の試験では、多発性硬化症のマウスモデルであるげっ歯類の実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルで DMF の有効性について報告した (2.6.2.3.4 項、試験番号 RSCH-2011-029 ; Linker et al., 2011)。DMF の作用機序を更に検討するため、ラット EAE モデルで DMF の用量反応関係を検討した試験で採取した組織を用いて、既知の Nrf2 標的遺伝子の mRNA 発現解析及び組織学的解析を実施した。これらの結果から、DMF を長期間 (32 日間) 1 日 1 回投与した EAE モデル動物における薬力学的作用は、正常ラットへの DMF 単回投与で観察された薬力学的作用 (図 25、2.6.2.3.1 項、試験番号 RSCH-2011-025) と類似していることが示された。溶媒 (プラセボ) 対照群の腰髄組織の組織学的検査では、白質領域に広範囲な脱髄及び細胞変性を伴った著明な組織損傷及び炎症性浸潤が認められた (図 26)。DMF はまた、アストロサイト、マクロファージ及びミクログリアの活性化、並びに T 細胞浸潤も抑制した (図 27)。

図 25 ラット EAE モデルにおける DMF 反復投与に対する薬力学的反応

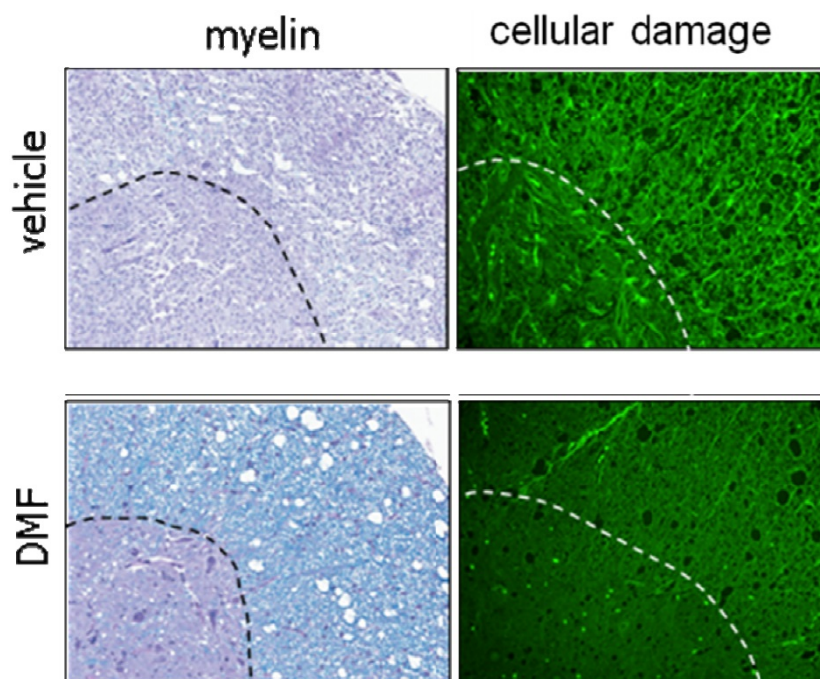


Data source : [M4.2.1.1-12] RSCH-2011-030-4.2. Pharmacodynamic response to DMF is similar in EAE and healthy rats

個体値及び平均値 ± 標準偏差 (n = 6)

DMF 応答遺伝子である NQO1 及び AKR1B8 の mRNA 発現を、ラット EAE 試験 (2.6.2.3.4 項、試験番号 RSCH-2011-029) 終了時に採取した複数の組織を用いて検討した。正常げっ歯類で DMF 単回投与時の薬力学的作用を評価した試験結果 (2.6.2.3.1 項、試験番号 RSCH-2011-025) と一致して、慢性 32 日間 EAE モデルでも NQO1 及び AKR1B8 の発現増加が認められ、その発現レベルは DMF の用量依存性に増加した。脾臓及び肝臓では、NQO1 及び AKR1B8 の発現レベルの増加が認められた。中枢神経系では、小脳及び脊髄を評価した結果、NQO1 及び AKR1B8 の発現レベルの増加は 3 倍未満であった。

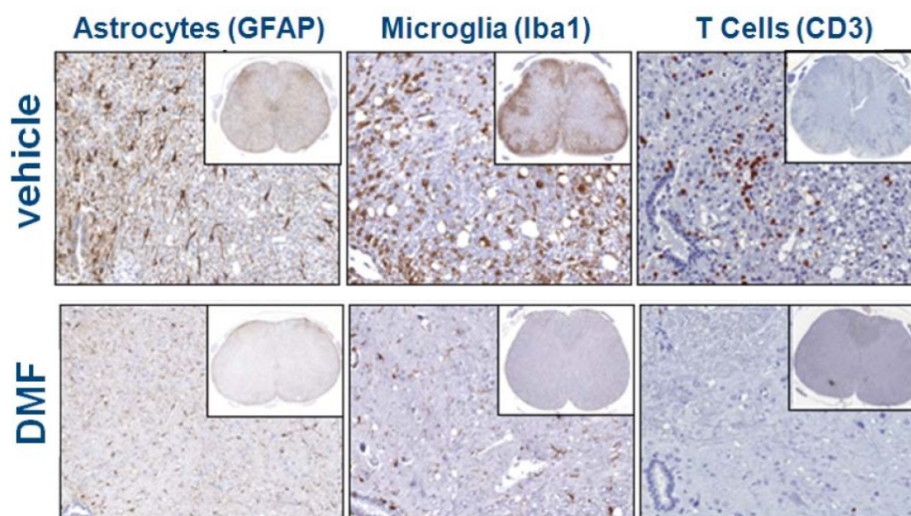
図 26 ラット EAE モデルでの脊髄における脱髄及び中枢神経系組織の変性の DMF による抑制



Data source : [M4.2.1.1-12] RSCH-2011-030-4.3. DMF inhibits demyelination and reduces CNS tissue degradation in EAE spinal cords

腰髄切片を用いて、髄鞘含量（Luxol Fast Blue 染色、[図 26](#) 左）及び中枢神経系変性（Fluoro Jade 染色、[図 26](#) 右）を評価した。溶媒対照投与及び DMF 100 mg/kg 投与の代表的な組織染色像を [図 26](#) に示す。破線は、白質（右上）と灰白質（左下）の境界を示す。髄鞘染色は、DMF 投与動物の脊髄白質では至る所に認められたが、溶媒対照投与動物の脊髄では疾患に伴う脱髄によって著しく減少していた。同様に、DMF 投与群の脊髄では中枢神経系変性はほとんど認められなかったが、溶媒対照投与後の EAE 脊髄では広範な中枢神経系損傷が Fluoro Jade 染色で観察された。これらの結果から、DMF は、ラット EAE モデルで脱髄及び中枢神経系変性を抑制することが示された。

図 27 ラット EAE モデルの脊髄における炎症細胞の活性化及び蓄積の DMF による抑制



Data source : [M4.2.1.1-12] RSCH-2011-030-4.4. DMF reduces activation and accumulation of inflammatory cells in EAE spinal cords

アストロサイト及びマクローファージ/ミクログリアの活性化マーカー（それぞれ GFAP 及び IBA-1）、並びに T 細胞浸潤（CD3）を免疫染色した腰髄切片像を図 27 に示す。EAE 動物モデルの溶媒投与動物の脊髄では、活性化したアストロサイト及びマクローファージ/ミクログリア、並びに T 細胞が高頻度で認められた（図 27 上段）。それに対し DMF 100 mg/kg 投与動物の脊髄組織は、無処置動物の脊髄（図は示さず）とほとんど識別不可能であり、炎症細胞の蓄積はほとんど又は全く認められなかった。

DMF は、用量反応性に脱髄及び変性を抑制し、EAE 脊髄の遺伝子発現解析から、アストロサイト及びミクログリア活性化マーカーの DMF 用量反応性の減少が認められ、これら 2 種類の細胞による組織学的変化が確認された。また、他の複数の炎症性メディエーター、特にマクローファージ及びミクログリアの活性化及び動員に関与するメディエーターの遺伝子発現は、DMF の投与によって抑制されることが確認された（データは示さず）。

以上、本試験から、DMF は、ラット慢性再発性 EAE モデルの行動及び運動スコアを改善し(2.6.2.3.4 項、試験番号 RSCH-2011-029)、神経炎症の組織学的プロファイル及び mRNA 発現プロファイルを改善するのに有効であった。DMF はまた、白質の構造的完全性を保持するのに有効であり、DMT 投与群の脊髄の神経変性を有意に抑制した。また、本試験では、EAE モデルで観察された DMF 長期投与時の薬力学的作用は、正常げっ歯類で観察された単回投与時の薬力学的作用 (2.6.2.3.1 項、試験番号 RSCH-2011-025) と類似していることが示され、本試験の試験期間中に Nrf2 依存的な薬力学的作用に対する寛容性は生じなかった。これらの試験結果から、ラット EAE モデルにおける DMF の抗炎症及び組織保護作用が示された。

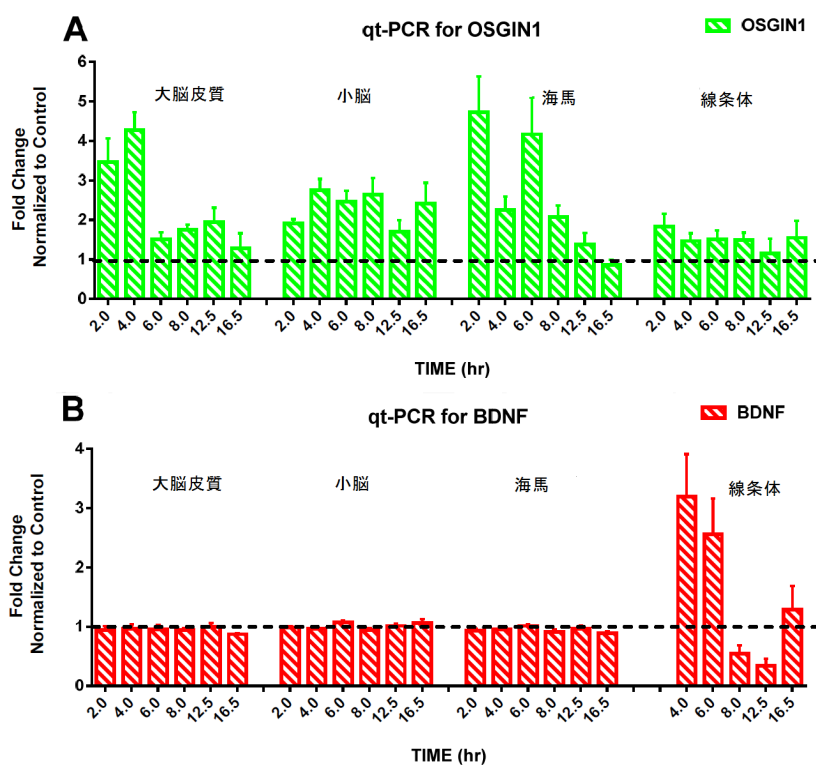
2.6.2.3.6 マウス臓器・組織におけるフマル酸ジメチルに対する薬力学的作用の用量-反応性及び経時変化（試験番号 RSCH-2012-024）

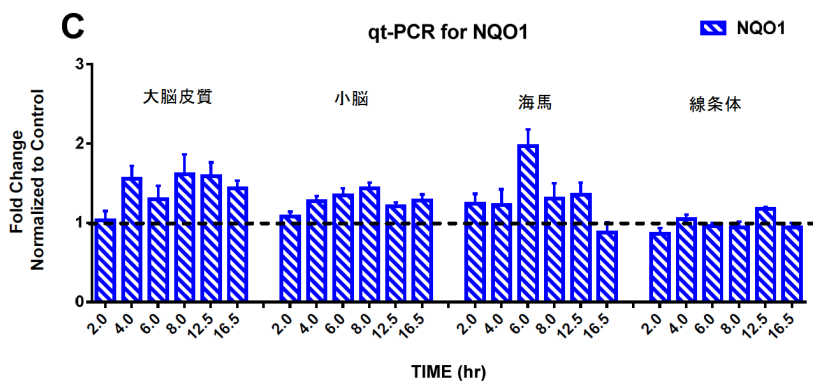
記載箇所：参考[M4.2.1.1-13] RSCH-2012-024

DMF が Nrf2 の標的遺伝子を発現させるように Nrf2 を制御していることを示す明らかなエビデンスがあるが、これらの変化からどのようにして免疫修飾作用又は細胞保護作用あるいはその両方が起こるのか、あるいは DMF 活性は Nrf2 発現を介したものだけなのか又は Nrf2 発現を介さない機序が存在するかどうかは不明である。これらの可能性の検討を始めるため、標的遺伝子発現のどのような変化が DMF の作用による可能性があるのか、また、これらの過程における Nrf2 の必要性を明らかにするため、DMF を投与した野生型及び Nrf2^{-/-}マウスにおける中枢神経系及び末梢組織における転写活性の変化を測定し、DMF の薬力学的作用を比較した。

100 mg/kg の DMF を単回経口投与した後の転写変化を解析した結果、3 つの遺伝子 OSGIN1（[図 28A](#)）、BDNF（[図 28B](#)）及び NQO1（[図 28C](#)）の発現が脳で制御されていることが認められた。データは溶媒対照投与動物における変化量で補正した変化率を図に示した。点線は溶媒対照投与動物の補正基準値である 1 を示す。遺伝子の発現制御は 16.5 時間時点までで認められるため、以降の時点のデータは図に示していない。

図 28 中枢神経系組織における DMF による転写プロファイリングの経時変化



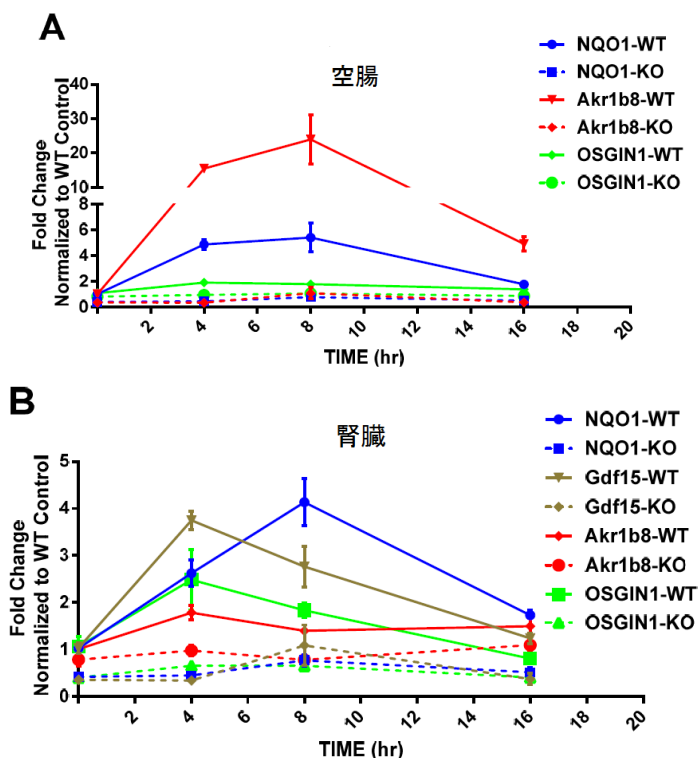


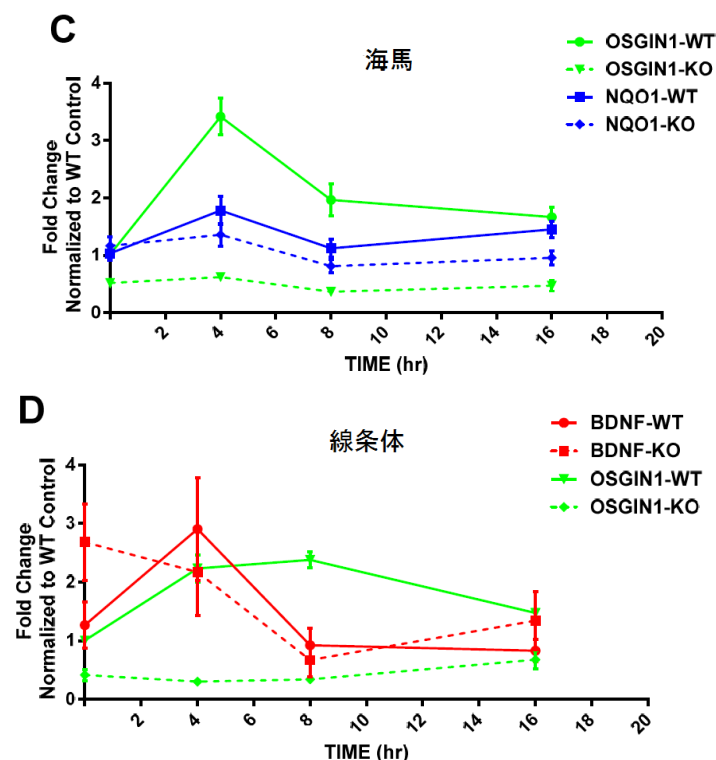
Data source : [M4.2.1.1-13] RSCH-2012-024-Figure 3

平均値 ± 標準偏差 (n = 6)

100 mg/kg の DMF を単回経口投与した後の末梢組織として空腸 (図 29A) 及び腎臓 (図 29B) における選択した遺伝子発現の経時変化、並びに海馬 (図 29C) 及び線条体 (図 29D) における選択した遺伝子発現の経時変化を示す。データは、溶媒対照投与動物における補正基準値を 1 とし て図に示す。図に示した遺伝子は遺伝子発現制御の経時変化の検討結果を基に選択された。

図 29 Nrf2-/-及び野生型マウスにおける 100 mg/kg フマル酸ジメチルによる転写の経時変化





Data source : [M4.2.1.1-13] RSCH-2012-024-Figure 7

平均値 ± 標準偏差 (n = 6)

Nrf2 の欠損により、DMF の単回投与後の末梢組織及び中枢神経系組織における NQO1、AKR1B8、GDF15 及び OSGIN1 遺伝子発現の増加は消失した (図 29)。さらに、Nrf2^{-/-}マウスにおけるこれら遺伝子のベースライン発現レベルは、DMF によって遺伝子発現が増加する野生型マウス組織における対照発現レベルよりも低かった。解析した 5 つの遺伝子で唯一、BDNF 遺伝子は、Nrf2 欠損により DMF 誘導応答が完全に消失しなかった (図 29D)。ばらつきが大きかったものの Nrf2 欠損では BDNF 遺伝子のベースライン発現レベルが野生型よりも高かった。DMF 投与により、これらの増加は野生型マウスの発現レベルと同様に次第に減少した。

Nrf2 の標的候補として OSGIN1 遺伝子を確認した研究報告があるが、本検討は Nrf2 を介した OSGIN1 遺伝子の発現を *in vivo* モデルにおいて最初に確認したものである (Chorley et al., 2012)。また、OSGIN1 遺伝子に関する最新の文献では、本遺伝子の様々なスプライスバリエントが p53 と相互作用して細胞の生死を媒介することが示唆されている (Hu et al., 2012)。どのスプライスバリエントが DMF 投与により制御されるか及び細胞の生存促進に必要なかどうかの検討は進行中である。BDNF 遺伝子は、脳、特に線条体では DMF によって発現が制御されることが示されたが、Nrf2^{-/-}マウスを用いた検討結果から BDNF 遺伝子は Nrf2 依存性ではないことが示唆された。さらに、BDNF 遺伝子のベースライン発現レベルは Nrf2 の欠損によって増加し、DMF はベースラインレベルまで発現レベルを減少させたと考えられる。BDNF 遺伝子は神経栄養機能を有することが示されていることから、これが、DMF が治療効果を表す新規の作用機序である可能性が示唆されるため、現在、この研究がさらに進められている。

以上、本試験における転写プロファイリング結果から、DMF 投与後の遺伝子制御が組織によって異なり、Nrf2 依存性経路が組織によって特有であることが示された。

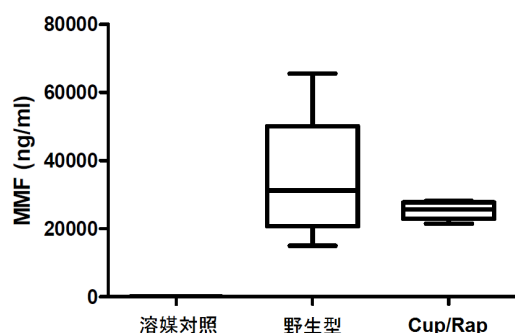
2.6.2.3.7 クプリゾン／ラパマイシン神経変性モデルにおけるフマル酸ジメチルの効果（試験番号 RSCH-2012-026）

記載箇所：参考[M4.2.1.1-14] RSCH-2012-026

本試験の目的は、マウス脱髄モデルに対するフマル酸ジメチル（DMF）の神経保護による治療効果を検討することであった。動物（8週齢雄 C57BL/6J マウス）は、クプリゾン混餌投与＋ラパマイシン注射（CR）を6週間受け、脳梁（CC）に脱髄を誘導された。CR 投与動物の一部は同時に6週間 DMF 又は溶媒対照を投与された。全ての動物は試験最終日の最終投与から30分後に採血した。全ての動物は、6週間目に剖検して神経保護作用を評価した。脳梁における軸索損傷は軸索切断面が卵形のを定量的に評価した。加えて、オリゴデンドロサイト前駆細胞（OPCs）、オリゴデンドロサイト、ミクログリア及びアストログリアに対する DMF の影響を評価した。軸索及びミトコンドリアの超微細構造変化は、3次元電子顕微鏡（3D-EM）を用いて評価された。

動物は、CR＋溶媒（n = 7）投与群、DMF 100 mg/kg（n = 7）投与群（野生型群）及びCR＋DMF 100 mg/kg（n = 6）投与群の3群に分けて評価した。In vivo では DMF は MMF に急速に変換されるため、曝露量として MMF のみを測定した。血漿中の MMF 濃度は野生型群では CR 投与マウスに比べてよりばらつきが大きかった。MMF 濃度は DMF 投与を受けた野生型群及び CR 投与群間で有意差は認められなかったことから、クプリゾン＋ラパマイシン投与は DMF 投与の曝露を変化させないことが示された。MMF 曝露は背景データと一致したことから、試験期間を通して適切に MMF の曝露を受けていた可能性が示された（[図 30](#)）。

図 30 クプリゾン＋ラパマイシン投与マウス血漿における MMF 曝露量



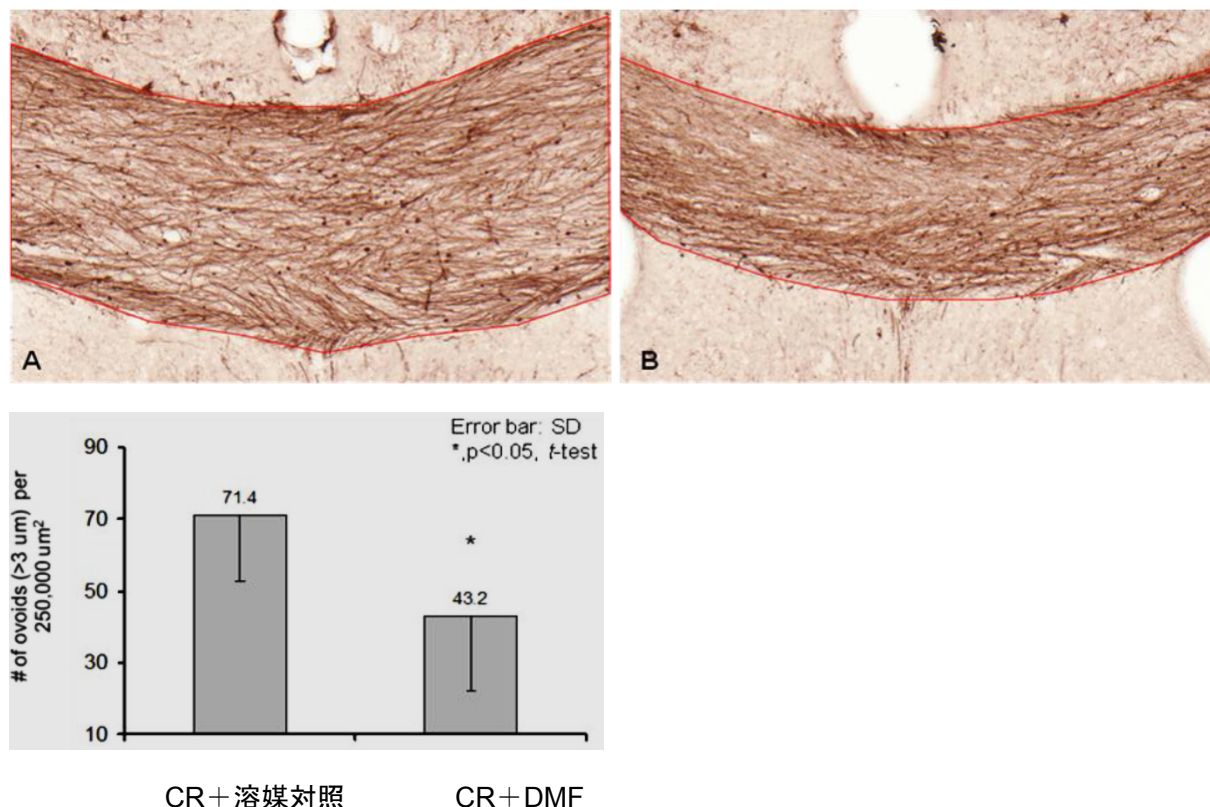
Data source : [M4.2.1.1-14] RSCH-2012-026-RESULTS

溶媒対照、DMF（野生型）及びクプリゾン＋ラパマイシン＋DMF（Cup/Rap）投与動物の MMF 曝露量。各投与群血漿中の MMF 濃度は6週間の最終投与30分後に質量分析法により測定した。測定結果は箱ひげ図で平均値、最小値、25～75パーセンタイル及び最大値を示した（野生型；n = 7、Cup/rap：n = 6）。投与群間で有意差は認められなかった（不等分散の Welch 補正を行う対応のない両側 t-test）。

脱髄線維及び卵形の切断又は終末軸索の確認に SMI32 抗体による低リン酸化ニューロフィラメントの免疫染色を用いた。脳梁の SMI32 染色軸索及び卵形の軸索は、CR を投与されたマウスに頭

著に認められた (図 31A) が、CR を投与されていないマウスには認められなかったことから (データは示さず)、CR 投与が軸索の病理変化を誘導したことが示された。DMF 投与は溶媒対照投与と比較して卵形軸索数を有意に減少させ、形態的に神経を保護することが示された (図 31B)。

図 31 クプリゾン+ラパマイシン投与マウスにおける DMF による軸索損傷の減少



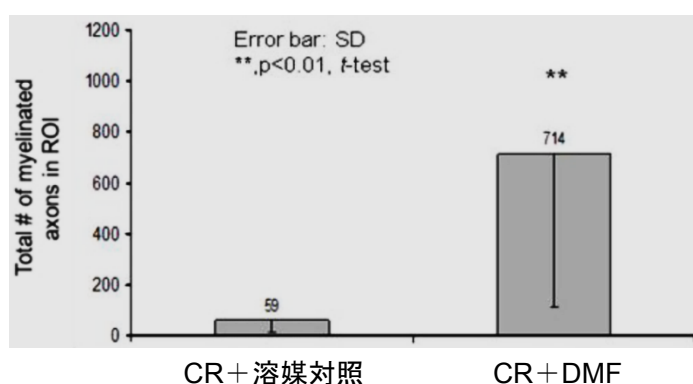
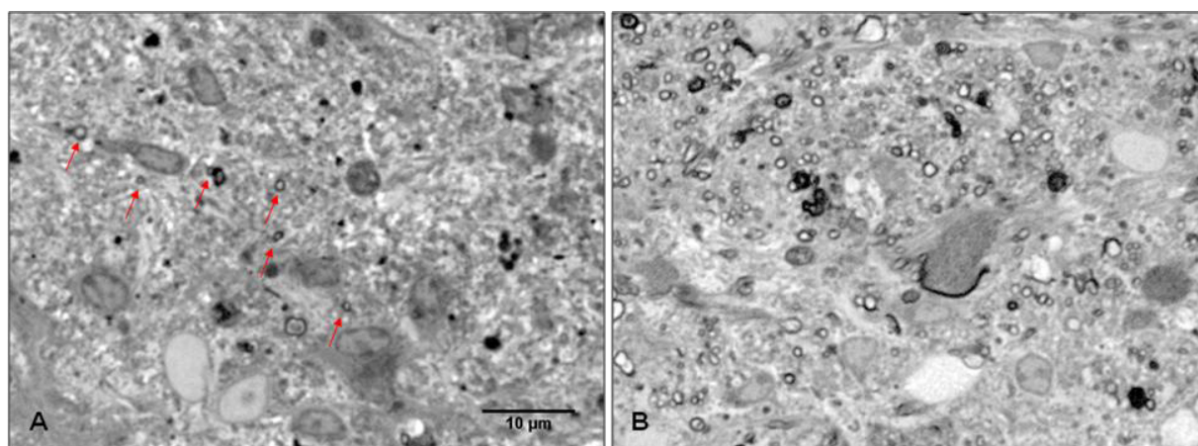
Data source : [M4.2.1.1-14] RSCH-2012-026-Figure 2

脳梁切片は、脱髄線維及び卵形の軸索切断面又は終末軸索の確認のため SMI32 抗体により低リン酸化ニューロフィラメントを免疫染色した。脳梁の SMI32 染色軸索及び卵形軸索は、CR+溶媒を投与されたマウスに顕著に認められた (A) が、CR+DMF 投与により有意に卵形軸索数の減少を示した (B)。グラフ Y 軸は、250,000 μm² の卵形軸索数を示す。CR : クプリゾン混餌+ラパマイシン注射投与、*P < 0.05 (Student's t-test)、各群 n = 6、エラーバーは標準偏差を示す。

SMI32+卵形軸索を定量した結果、DMF 投与動物では、溶媒対照投与動物に比べて、単位面積における卵形軸索数が有意に減少したことが示された (図 31)。

クプリゾン+ラパマイシン (CR) 投与による有髄線維を脳梁切片と同様に軸索染色を行い、有髄線維数を定量した。CR+溶媒投与動物では有髄線維はわずかしか認められなかった (矢印赤、図 32A)。CR+DMF 投与動物では有髄線維数の有意な増加が認められた (図 32B)。DMF は有髄線維の保持及び脳梁で髄鞘の再生を直接的に促進した。

図 32 クプリゾン+ラパマイシン投与マウスにおける DMF による脳梁の有髄線維の増加

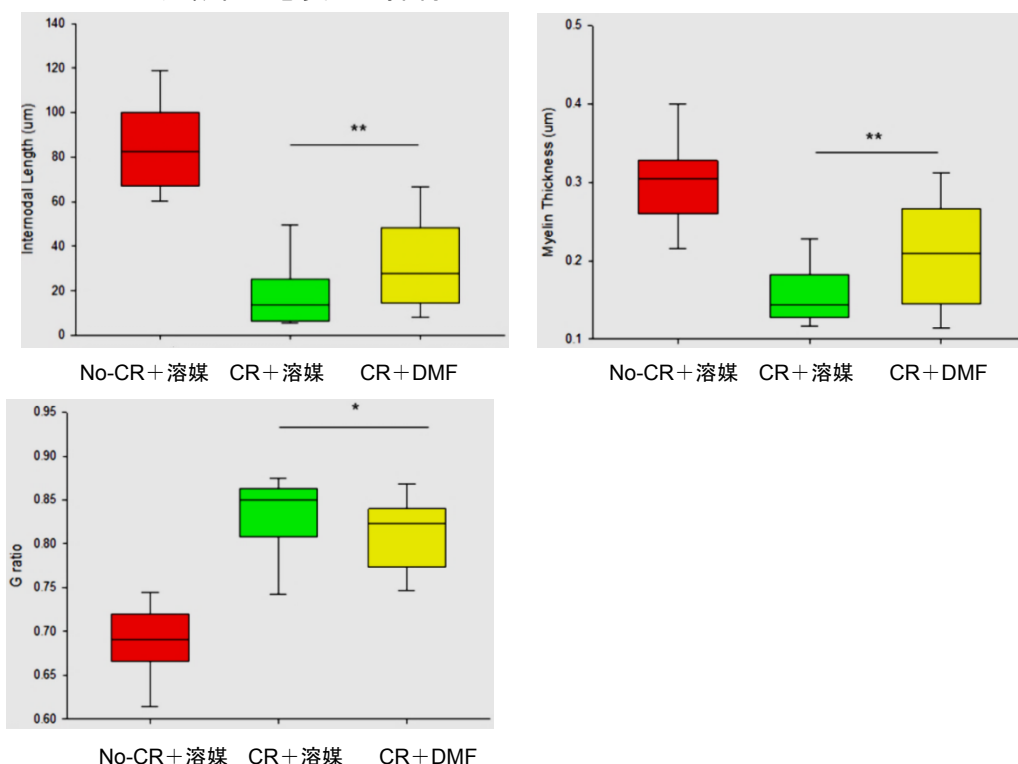


Data source : [M4.2.1.1-14] RSCH-2012-026-Figure 3

脳梁切片は、有髄線維の確認のためパラフェニレンジアミン (PPD) で染色した。有髄線維を定量した結果、DMF 投与動物では、溶媒対照投与動物に比べて、脳梁の単位面積 [関心領域 (ROI)] における有髄線維数が有意に増加したことが示された (A)。グラフ Y 軸は、関心領域 (ROI) の同一面積の有髄線維数を示す。CR: クプリゾン混餌+ラパマイシン注射投与、*P < 0.01 (Student's t-test)、各群 n = 8、エラーバーは標準偏差を示す。

脳梁中の髄鞘の超微細形態を解析するため、溶媒単独 (CR なし)、CR+溶媒及び CR+DMF 投与動物の 3D-EM 標本を解析した。高解像度三次元スタックを用いて、絞輪間部の長さ、髄鞘の厚さ及び G 比 (内側の軸索の直径/外側の髄鞘の直径) を定量した。溶媒単独と比較して、CR 投与では絞輪間部の長さ、髄鞘の厚さ及び G 比の減少が明らかに認められた (図 33)。CR+DMF 投与動物では、CR+溶媒投与動物と比較して、絞輪間部の長さ、髄鞘の厚さ及び G 比に有意な増加が認められた (図 33)。これらの結果から、髄鞘組織形態の改善は超微細形態レベルでも認められ、DMF は髄鞘の形態を改善することが示唆され、CR 投与による病理変化を溶媒単独のベースラインまで回復した。

図 33 クプリゾン+ラパマイシン投与マウスにおける DMF による脳梁の髄鞘パラメーターにおける超微細形態変化の抑制

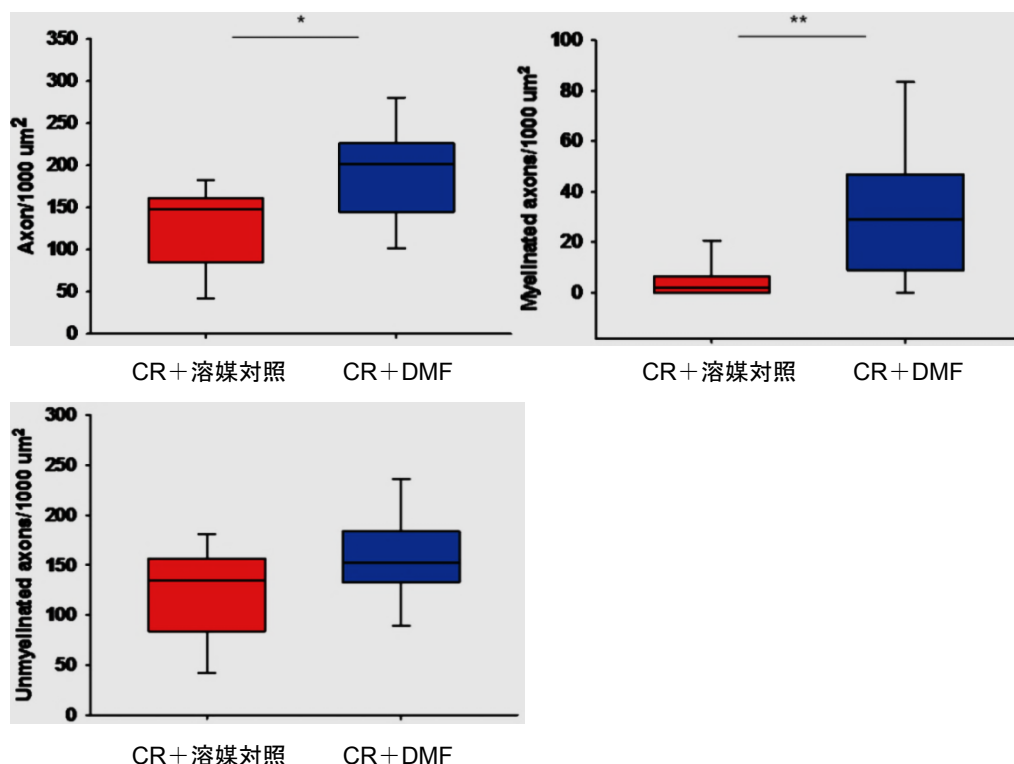


Data source : [M4.2.1.1-14] RSCH-2012-026-Figure 8

3D-EM による髄鞘超微細構造の測定：クプリゾン+ラパマイシン非投与における溶媒投与 (No-CR+溶媒) 及びクプリゾン+ラパマイシン投与における溶媒対照 (CR+溶媒) 又は DMF を投与 (CR+DMF) した動物の脳梁組織片の絞輪間部の長さ (上段左)、髄鞘の厚さ (上段右) 及び G 比 (下段左) を 3D-EM を用いて測定した。DMF 投与により、絞輪間部の長さ (P<0.01)、髄鞘の厚さ (P<0.01) G 比 (P<0.05) の変化が有意に改善された。CR：クプリゾン混餌+ラパマイシン注射投与、G 比：軸索の直径/線維の直径、*P<0.05；**P<0.01 (Mann-Whitney Rank Sum test)、各群 5 例のマウスからの有髄線維 n>35、測定結果は箱ひげ図で平均値、最小値、25~75 パーセンタイル及び最大値を示した。

脳梁の軸索形態をさらに解析するため、脳梁の単位面積における総軸索数、有髄線維数及び無髄線維数を 3D-EM 標本で測定した。軸索の超微細形態に対する治療効果を検討するため、CR+溶媒及び CR+DMF 投与動物に限定して解析した。6 週間の DMF 投与は脳梁の総軸索数及び有髄線維数を有意に増加したが、無髄線維では増加傾向は認められたものの有意差は認められなかった (図 34)。これらの組織の測定結果から、DMF が脱髄誘導モデルで有髄線維の保護を促進することが更に確認された。

図 34 クプリゾン+ラパマイシン投与マウスにおける DMF による脳梁の総軸索数の増加



Data source : [M4.2.1.1-14] RSCH-2012-026-Figure 9

3D-EM による脳梁軸索数の測定。クプリゾン+ラパマイシン投与における溶媒対照 (CR+溶媒) 又は DMF を投与 (CR+DMF) した動物の脳梁組織片 1000 μm² の総軸索数 (上段左)、有髓軸索数 (上段右) 及び無髓線維数 (下段左) を 3D-EM を用いて測定した。CR+溶媒 (赤色の箱) 又は CR+DMF 投与動物 (青色の箱)。DMF 投与により、総軸索数 (有髓及び無髓) が有意に増加 (P < 0.05) したが、無髓線維数は有意ではないが増加傾向がみられた。有髓線維数が有意に増加 (P < 0.01)。絞輪間部の長さ (P < 0.01)。髓鞘の厚さ (P < 0.01) G 比 (P < 0.05) の変化が有意に改善された。CR : クプリゾン混餌+ラパマイシン注射投与、*P < 0.05 ; **P < 0.01 (Mann-Whitney Rank Sum test)、CR+溶媒 n = 9、CR+DMF n = 11、測定結果は箱ひげ図で平均値、25~75 パーセンタイル及び最大値を示した。

試験結果を要約すると、6 週間の CR 投与によって、脳梁に卵形軸索及び脱髓が有意に増加した。CR+DMF 投与マウスは軸索卵形の減少に基づく神経保護の有意な効果 (図 31) 及び溶媒対照投与マウスに比べて脳梁の直径 300 nm を超える軸索の総数が有意に増加した (図 32)。成熟オリゴデンドロサイト数に明らかな差はなく、CR+DMF 投与マウスでは、CR+溶媒対照投与マウスに比べてオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPCs) 数が有意に減少し、髓鞘再生軸索数が有意に増加した。免疫染色を行った結果、CR+DMF 投与マウス及び CR+溶媒対照投与マウス間でアストロサイト及びミクログリア数に差は認められなかった。しかし、CR+DMF 投与マウスでは、活性化ミクログリアが有意に増加した ([M4.2.1.1-14] RSCH-2012-026-Figure 5, Figure 6, Figure 7)。3D-EM を行った結果、DMF 投与動物は総軸索 (有髓及び無髓) 数が有意に増加し (図 34)、髓鞘を有する線維は絞輪間部の長さ、髓鞘の厚さ及び G 比に基づいて髓鞘が再生されたものであることが確認された (図 33)。さらに、DMF は溶媒対照に比べて、脱髓線維における形態及びミトコンドリアの変化を修飾した ([M4.2.1.1-14] RSCH-2012-026-Figure 10)。

これらの結果から、DMF の神経保護作用が裏付けられた。卵形軸索の減少及び総軸索数の増加は、

2.6.2 薬理試験の概要文

フマル酸ジメチル

有意な軸索保護を裏付けるものである。また、DMF 投与は、脳梁で髄鞘再生数を増加させた。したがって、DMF は髄鞘を再生する可能性がある。以上の試験結果から、DMF は、獲得免疫系だけでなく自然免疫系に対しても好ましい効果を示す可能性がある。活性化ミクログリアの増加は、ミエリンデブリの除去を促進し、軸索及び髄鞘修復に対してより良い環境をつくり出す可能性がある。

2.6.2.4 In vitro 副次的薬理試験

2.6.2.4.1 フマル酸ジメチル及びフマル酸モノメチルの in vitro 受容体結合試験（試験番号 RSCH-2013-023）

記載箇所：参考[M4.2.1.2-1] RSCH-2013-023

薬物乱用性は、精神活性作用陽性の薬剤の非医療的に使用する作用をいう。Nrf2 転写経路の活性化は薬物乱用傾向が既知の薬物と関連することが知られている作用機序ではないが、DMF 及び MMF の網羅的受容体結合試験は依存性薬物と関連する受容体に活性を示すかどうかの確認になる。FDA による Postmarketing Requirement (PMR) (Approval Letter NDA 204063) に従って DMF 投与の薬物乱用傾向を評価する 3 つの試験を実施した。このうち 2 試験はラットを用いた自己投与試験及び薬物弁別試験であった。([M2.6.6]参照)。

3 つ目の試験は DMF 及び MMF の網羅的 in vitro 受容体結合試験であった。本試験の目的は、DMF 及び MMF が受容体及びリガンド開口性イオンチャンネルに対する放射能標識リガンド結合を変化させる可能性並びに選択した酵素活性に影響する可能性を検討することであった。76 の神経関連受容体、リガンド開口性イオンチャンネル及び酵素として、ドパミン、セロトニン、 γ -アミノ酪酸 (GABA)、オピオイド、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA)、モノアミン、ナトリウムチャンネル、カルシウムチャンネル、カンナビノイド受容体部位及び一酸化窒素合成酵素に対して二重測定でアッセイを行った (表 4)。

表 4 フマル酸ジメチル及びフマル酸モノメチルの受容体スクリーニング

#	Assay	#	Assay
1	Nitric Oxide Synthase, Neuronal (nNOS)	39	Glutamate, NMDA, Polyamine
2	Nitric Oxide Synthase, Endothelial (eNOS)	40	Histamine H1
3	Nitric Oxide Synthase, Inducible (iNOS)	41	Histamine H2
4	Adenosine A1	42	Histamine H3
5	Adenosine A2A	43	Imidazoline I2, Central
6	Adenosine A3	44	Interleukin IL-1
7	Adrenergic α 1A	45	Leukotriene, Cysteinyl CysLT1
8	Adrenergic α 1B	46	Melatonin MT1
9	Adrenergic α 1D	47	Muscarinic M1
10	Adrenergic α 2A	48	Muscarinic M2
11	Adrenergic β 1	49	Muscarinic M3
12	Adrenergic β 2	50	Tachykinin NK1
13	Transporter, Norepinephrine (NET)	51	Neuropeptide Y Y1
14	Bradykinin B1	52	Neuropeptide Y Y2
15	Bradykinin B2	53	Nicotinic Acetylcholine
16	Calcium Channel L-Type, Benzothiazepine	54	Nicotinic Acetylcholine α 1, Bungarotoxin
17	Calcium Channel L-Type, Dihydropyridine	55	Opiate δ 1 (OP1, DOP)
18	Calcium Channel N-Type	56	Opiate κ (OP2, KOP)
19	Cannabinoid CB1	57	Opiate μ (OP3, MOP)
20	Dopamine D1	58	Phorbol Ester
21	Dopamine D2S	59	Platelet Activating Factor (PAF)
22	Dopamine D3	60	Potassium Channel [KATP]
23	Dopamine D4.2	61	Potassium Channel hERG
24	Transporter, Dopamine (DAT)	62	Prostanoid EP4
25	Endothelin ETA	63	Purinergic P2X
26	Endothelin ETB	64	Purinergic P2Y
27	Epidermal Growth Factor (EGF)	65	Rolipram
28	Estrogen ER α 335130	66	Serotonin (5-Hydroxytryptamine) 5-HT1A
29	Transporter, GABA	67	Serotonin (5-Hydroxytryptamine) 5-HT 1B
30	GABAA, Muscimol, Central	68	Serotonin (5-Hydroxytryptamine) 5-HT2A
31	GABAA, Flunitrazepam, Central	69	Serotonin (5-Hydroxytryptamine) 5-HT2B
32	GABAB1A	70	Serotonin (5-Hydroxytryptamine) 5-HT2C
33	Glucocorticoid	71	Serotonin (5-Hydroxytryptamine) 5-HT3
34	Glutamate, AMPA	72	Transporter, Serotonin (5-Hydroxytryptamine) (SERT)
35	Glutamate, Kainate	73	Sigma σ 1
36	Glutamate, NMDA, Agonism	74	Sodium Channel, Site 2
37	Glutamate, NMDA, Glycine	75	Androgen (Testosterone) AR
38	Glutamate, NMDA, Phencyclidine	76	Thyroid Hormone

Data source : [M4.2.1.2-1] RSCH-2013-023-Results

0、10 及び 30 μ M の DMF 及び MMF のアッセイを二重測定で行った。測定濃度は、240 mg の DMF 投与によって一過性に達するヒト最大血漿中濃度が約 15 μ M であることから選択された。各生化学分析に対照物質を含めてアッセイ及び結果の妥当性を確認した。生化学分析結果は特異的結合に対する阻害 (%) / 活性 / 定量値で示し、有意な作用として、二重測定を平均し、DMSO 対照に比較して 50%を超える阻害又は刺激を示した。

試験を行った結果、76 のアッセイ（神経関連受容体、リガンド開口性イオンチャネル及び酵素）

で有意な作用は認められなかったことから、DMF 又は MMF の薬物乱用の可能性は低いことが示された。

2.6.2.5 安全性薬理試験

中枢神経系安全性薬理試験は、Fumaderm[®]原薬〔フマル酸ジメチル (DMF) 56% (w/w)及びフマル酸モノエチル塩 (Ca²⁺、Mg²⁺及び Zn²⁺塩) の混合物〕を用いて実施された。In vitro 心血管系安全性薬理試験は、各試験に適した溶媒を用いて調製した DMF (試験報告書では FAG201 と表記) 又はその一次代謝物であるフマル酸モノメチル (MMF、試験報告書では methyl hydrogen fumarate と表記される場合がある) を用いて実施された。In vivo 呼吸器系及び心血管系安全性薬理試験は、DMF を 8%ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) に懸濁した即放性製剤 (試験報告書では FAG201 と表記) 及び 240 mg マイクロ錠カプセル製剤 (本剤) を用いて実施された。安全性薬理試験の詳細は、2.6.2.5.1、2.6.2.5.2、2.6.2.5.3 項及び[M2.6.3.4]、薬理試験概要表に示した。

2.6.2.5.1 中枢神経系に対する影響

Fumaderm の主成分は DMF であり、Fumaderm の安全性薬理に対する影響は DMF の影響を十分に表す。中枢神経系に対する Fumaderm の影響を検討した試験の用量は、予備試験において、Fumaderm を 800、1200 又は 2000 mg/kg の用量で単回経口投与したとき死亡が観察され、200 又は 400 mg/kg の用量で単回経口投与したとき忍容性が良好であった結果に基づいて選択された。

2.6.2.5.1.1 マウスにおけるレセルピン体温低下作用に対する Fumaderm 経口投与の影響 (試験番号 5350/89)

記載箇所：参考[M4.2.1.3-1] 5350/89

本 GLP 試験の目的は、Fumaderm 経口投与がレセルピンによるマウスの体温低下に与える影響を検討することであった。直腸温を被験物質投与前に 30 分間隔で 2 回測定した。雌 NMRIHAN/BoSPF マウス各群 5 例に Fumaderm を 383 及び 464 mg/kg の用量で経口投与した。対照群 (雌 5 例) には、溶媒〔0.8%ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC)〕を経口投与した。Fumaderm 投与 1 時間後に 5 mg/kg のレセルピンを腹腔内投与した。レセルピンを単独投与した比較対照群も設定した。レセルピン投与 1 時間後から 1 時間間隔で 4 時間、直腸温を測定した。

Fumaderm+レセルピン投与群では、投与前に比べて投与後の体温が低下したが、レセルピン単独投与群の投与後の体温と同程度であった。Fumaderm は 464 mg/kg までの用量で投与したとき、本試験条件下で、レセルピンによる体温低下に有意な影響を与えなかった。

2.6.2.5.1.2 マウスにおける自発運動量に対する Fumaderm 経口投与の影響（試験番号 5348/89）

記載箇所：参考[M4.2.1.3-2] 5348/89

本 GLP 試験の目的は、Fumaderm 経口投与が光電池を設置した円形ケージに収容したマウスの自発運動に与える影響を検討することであった。雌 NMRIHAN/BoSPF マウス各群 5 例に、Fumaderm を 383 及び 464 mg/kg の用量で経口投与した。対照群（雌 5 例）には、溶媒（0.8% HPMC）を経口投与した。投与後、光電池を設置した円形ケージにマウスを収容し、被験物質投与直後から 30 分間隔で 10 分間ずつ、2 時間後まで運動量を記録した。

Fumaderm 投与群及び溶媒対照群間で、測定時間中の光電池のインパルス数に有意差は認められなかった。本試験の条件下では、Fumaderm は 464 mg/kg までの用量でマウスの自発運動量に影響を与えなかった。

2.6.2.5.1.3 マウスにおける侵害刺激反応に対する Fumaderm 経口投与の影響（試験番号 5356/89）

記載箇所：参考[M4.2.1.3-3] 5356/89

本 GLP 試験の目的は、Fumaderm 経口投与がマウスの侵害刺激反応に与える影響を検討することであった（ライジング試験）。雌 NMRIHAN/BoSPF マウス各群 5 例に、Fumaderm を 383 及び 464 mg/kg の用量で経口投与した。対照群（雌 5 例）には、溶媒（0.8% HPMC）を経口投与した。Fumaderm 投与 60 分後、1%酢酸を 10 mL/kg の用量で腹腔内投与し、ライジング反応（後肢関節の後背側への極度の伸展を伴う円背位、尾の挙上、腹筋の波状収縮）を誘発した。酢酸投与後 15 分間、ライジング反応をモニタリングした。

Fumaderm 投与群及び溶媒対照群間でライジング反応数に統計学的有意差は認められなかった。本試験の条件下では、Fumaderm は 464 mg/kg までの用量でマウスの侵害刺激反応に影響を与えなかった。

2.6.2.5.1.4 マウスにおけるヘキソバルビタール麻酔作用に対する Fumaderm 経口投与の影響（試験番号 5351/89）

記載箇所：参考[M4.2.1.3-4] 5351/89

本 GLP 試験の目的は、Fumaderm 経口投与がマウスのヘキソバルビタール麻酔（睡眠時間）に与える影響を評価することであった。雌 NMRIHAN/BoSPF マウス各群 5 例に、Fumaderm を 383 及び 464 mg/kg の用量で経口投与した。対照群（雌 5 例）には、溶媒（0.8% HPMC）を経口投与した。Fumaderm 投与 45 分後に、ヘキソバルビタールを 45 mg/kg の用量で静脈内投与した。低体温を防止するため、各個体をホットプレート（37°C）上に横臥させた。正向反射の回復時点をヘキソバルビタール誘発睡眠時間の終了時点とした（最大観察時間：10 分間）。

2.6.2 薬理試験の概要文

フマル酸ジメチル

正向反射回復時間は、溶媒対照群及び Fumaderm 投与群間で同程度であった。本試験の条件下では、Fumaderm は 464 mg/kg までの用量でマウスのヘキソバルビタール誘発麻酔に影響を与えなかった。

2.6.2.5.2 心血管系及び呼吸器系に対する影響

2.6.2.5.2.1 クローン化 hERG 発現哺乳類細胞に対する DMF の影響 (試験番号 PD03-17)

記載箇所 : [M4.2.1.3-5] PD03-17

本 GLP 試験の目的は、hERG cDNA を安定導入した HEK293 細胞において、DMF の hERG チャネル電流 (IKr、心筋細胞の急速活性型遅延整流カリウムイオン電流) 抑制作用を検討することであった。電流は、パッチクランプ法を用いて生理溶液及び生理的温度下で記録した。DMF は 60、180、600 及び 1500 μM (n = 3 又は 4) の濃度で hERG チャネルを有意に阻害せず ($\leq 3.6\%$)、 IC_{50} は 1500 μM 超であった。本試験の条件下では、溶媒対照 (0.1% DMSO 含有生理食塩水) による hERG 電流は $0.1\% \pm 0.0\%$ {平均値 \pm 標準誤差 (SEM)、n = 4}、陽性対照の 60 nM テルフェナジンによる hERG 電流は $92.9\% \pm 0.8\%$ (平均値 \pm SEM、n = 2) 減少した。

以上、濃度 60~1500 μM の DMF は、hERG 電流振幅にほとんど影響を及ぼさなかった。これらの結果から、濃度 60~1500 μM の DMF は、hERG チャネルを阻害することは予測されない。

2.6.2.5.2.2 クローン化 hERG 発現哺乳類細胞に対するフマル酸モノメチル (MMF) の影響 (試験番号 PD03-21)

記載箇所 : [M4.2.1.3-6] PD03-21

本 GLP 試験の目的は、hERG cDNA を安定導入した HEK293 細胞において、MMF の hERG チャネル電流 (IKr、心筋細胞の急速活性型遅延整流カリウムイオン電流) 抑制作用を検討することであった。電流は、パッチクランプ法を用いて生理溶液及び生理的温度下で記録した。MMF は 60、180、600 及び 1500 μM (n = 3) の濃度で hERG チャネルを有意に阻害せず ($\leq 1.2\%$)、 IC_{50} は 1500 μM 超であった。本試験の条件下では、溶媒対照 (0.1% DMSO 含有生理食塩水) による hERG 電流は $0.2\% \pm 1.3\%$ (平均値 \pm SEM、n = 3)、陽性対照の 60 nM テルフェナジンによる hERG 電流は $86.1\% \pm 2.0\%$ (平均値 \pm SEM、n = 2) 減少した。

濃度 60~1500 μM の MMF は、hERG 電流にほとんど影響を及ぼさなかった。これらの結果から、濃度 60~1500 μM の MMF は、hERG チャネルを阻害することは予測されない。

2.6.2.5.2.3 イヌ心臓プルキンエ線維における活動電位に対する DMF の影響 (試験番号 PD03-18)

記載箇所 : [M4.2.1.3-7] PD03-18

本 GLP 試験の目的は、心筋活動電位に対する DMF の影響を検討することであった。分離イヌプ

ルキンエ線維〔静止電位が-80 mV 超、90%再分極時活動電位持続時間 (APD90) が 250~450 msec、活動電位波形が正常の線維 $n = 4$ 〕を用いて、60、600 及び 1500 μM の濃度で DMF の濃度反応性及び頻度依存性を検討した。安定化期間中、プルキンエ線維を 2 sec の基本周期長で歩調を取った。溶媒対照を用いてベースライン時の APD の頻度依存性を 2、1 及び 0.5 sec の基本周期長で測定した後、平衡化し、被験物質の活動電位を測定した。この一連の手順を、DMF 濃度の低い順に（低濃度から高濃度へ）繰り返した。60%及び90%再分極時の活動電位持続時間（それぞれ APD60 及び APD90）を測定し、刺激頻度（基本周期長 2、1 及び 0.5 sec）ごとに、測定時点ごとの溶媒対照の APD 値で補正した。溶媒対照（0.1% DMSO 含有プルキンエ線維タイロイド液）及び陽性対照（100 μM dl-ソタロール）についても測定を実施した。

DMF は 600 及び 1500 μM の濃度で活動電位振幅を減少させたが、APD60 及び APD90 は溶媒対照の APD60 及び APD90 と同程度であった。一方、dl-ソタロールは、APD60 及び APD90 の両方を統計学的に有意に変化させた ($p < 0.05$)。

DMF による濃度依存性及び頻度依存性の影響は観察されなかった。一方、陽性対照である 100 μM ソタロールは、APD60 及び APD90 を逆頻度依存性に有意に延長させた。したがって、DMF は、摘出イヌプルキンエ線維で活動電位再分極にほとんど又は全く影響を及ぼさないと判断された。

2.6.2.5.2.4 イヌ心臓プルキンエ線維における活動電位に対するフマル酸モノメチル (MMF) の影響 (試験番号 PD03-22)

記載箇所：[M4.2.1.3-8] PD03-22

本 GLP 試験の目的は、MMF の心筋活動電位に対する影響を検討することであった。分離イヌプルキンエ線維（静止電位が-80 mV 超、APD90 が 250~450 msec、活動電位波形が正常の線維 $n = 4$ ）を用いて、60、600 及び 1500 μM の濃度で MMF の濃度反応関係及び頻度依存性を検討した。安定化期間中、プルキンエ線維を 2 sec の基本周期長で歩調を取った。溶媒対照を用いてベースライン時の APD の頻度依存性を 2、1 及び 0.5 sec の基本周期長で測定した後、平衡化し、被験物質の活動電位を測定した。この一連の手順を、MMF 濃度の低い順に（低濃度から高濃度へ）繰り返した。APD60 及び APD90 を測定し、刺激頻度（基本周期長 2、1 及び 0.5 sec）ごとに、当該時点の溶媒対照の APD 値で補正した。溶媒対照（0.1% DMSO 含有プルキンエ線維タイロイド液）及び陽性対照（100 μM dl-ソタロール）についても測定を実施した。

APD60 及び APD90 値は、MMF と溶媒対照で同程度であった。一方、陽性対照の dl-ソタロールは、活動電位（APD60 及び APD90）を統計学的有意に延長させた ($p < 0.05$)。

したがって MMF は、摘出イヌプルキンエ線維における活動電位再分極を延長させないと判断された。

2.6.2.5.2.5 ビーグル犬の心血管系及び呼吸器系に対する DMF 経口投与の影響を検討する
安全性薬理試験 (試験番号 PD03-19)

記載箇所：参考[M4.2.1.3-9] PD03-19

本非 GLP 試験の目的は、DMF 経口投与用懸濁液がテレメトリー装着覚醒ビーグル犬の心血管系及び呼吸器系に与える影響を検討することであった。テレメトリー装置及び血管アクセスポートを外科的に埋め込んだ雄ビーグル犬 4 例を使用した。いずれの個体にも、投与ごとにウォッシュアウト期間を設けて 10 mL/kg の投与容量で計 4 回投与した。各投与終了後は、強制経口投与チューブを約 5 mL の水で洗浄した。投与 1、6、8 及び 12 日目にそれぞれ溶媒 (HPMC)、10、100 及び 1000 mg/kg の DMF を投与した (表 5)。

表 5 試験番号 PD-3-19 の試験デザイン

区分番号	動物数	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与日	投与方法	試験最終日
1	4	溶媒対照	0	投与 1 日目	経口投与	投与 13 日目
2		DMF	10	投与 6 日目		
3		DMF	100	投与 8 日目		
4		DMF	1000	投与 12 日目		

Data source : [M4.2.1.3-9] PD03-19-Experimental Design

いずれの投与日もベースラインデータを取得後、各動物に溶媒又は DMF を経口投与し、24 時間モニタリングした。テレメトリー装置でモニタリングしたパラメーターは、観血的血圧 (収縮期圧、拡張期圧及び平均動脈圧)、心拍数、呼吸数及び呼吸波形 (胸郭内圧) 最大値であった。また、心電図 (1 回の測定時間 20 秒) も、各投与後 24 時間のモニタリング期間中測定した。心電図は、veterinary cardiologist が定性的及び定量的に評価した。動脈血ガス (pH、PCO₂、PO₂、SO₂ 及び HCO₃) 及び体温を測定した。被験物質濃度測定用に血漿を採取した。

溶媒対照又は DMF 投与後のモニタリング期間中に死亡及び投与に関連した重度の有害な影響は認められなかった。100 mg/kg/日以上 の用量で全投与動物に嘔吐が観察された。各投与後に補助的治療が必要と考えられた動物はなく、投与期間中の体重変化はほとんどの動物において± 約 5% の範囲内であった。

溶媒対照投与と比較して、DMF 投与約 3 時間後から約 9~12 時間後までに心拍数が増加した。

DMF を 100 及び 1000 mg/kg の用量で投与した動物における平均動脈圧は、溶媒対照投与動物 (約 100~120 mmHg) に比べて、投与後 3 時間で約 90~100 mmHg に低下し、投与後 13~15 時間まで溶媒対照投与動物より約 10~15 mmHg 低い状態が維持された。心拍数が増加した時期及び動脈圧が低下した時期が全個体で同様であったことから、これらの変化は投与に関連したものであることが示唆された。しかし、DMF 投与動物に観察されたこの血行動態パラメーターの変化に嘔吐が影響していた可能性がある。

呼吸数、最大胸郭内圧、動脈血ガス及び体温はいずれも、試験中を通じて、当該動物種で予測さ

れる正常範囲内であり、DMF 投与及び溶媒対照投与間で類似していた。

DMF 投与に関連すると考えられなかった変化として、洞性頻脈（2例に認められ、イヌにおける正常な変化と考えられた。1例は投与前、他の1例は投与後散発的に認められた）及び第二度房室ブロック（1例で溶媒対照投与後の3時点で認められた）が観察された。心室期外収縮が1例で試験中の6時点で認められたが、投与後に発現したのは6時点中2時点のみであり、用量依存性も認められなかった。したがって、これらの伝導障害及び不整脈は、DMFの投与に関連しないと考えられた。DMF経口投与に関連した異常な不整脈、伝導障害又は質的異常は認められず、DMFはQTc延長を引き起こさなかった。

本試験の条件下では、10～1000 mg/kgの用量でDMFを経口投与した後、100及び1000 mg/kgの用量で嘔吐が発現した。DMF経口投与に関連する可能性がある変化として、投与後約3時間以降に心拍数の増加及び動脈圧の低下が認められた。しかしこれらの変化は、その全投与動物に認められた嘔吐の影響による可能性がある。覚醒イヌモデルでは、24時間モニタリングした結果、呼吸数、最大胸郭内圧、体温、動脈血ガス及び心電図パラメーターにDMF投与に関連した影響は認められなかった。

2.6.2.5.2.6 ビーグル犬の心血管系及び呼吸器系に対する DMF 経口（カプセル製剤）投与の影響（試験番号 P00012-14-04）

記載箇所： [M4.2.1.3-10] P00012-14-04

試験番号 PD03-19（2.6.2.5.2.5 項）で嘔吐によって解釈が困難となった心拍数及び血圧の変化について明らかにするため、イヌ心血管系及び呼吸器系試験を実施した。本 GLP 試験の目的は、雌雄の無麻酔テレメーター装着ビーグル犬の動脈圧、心拍数、体温、第 II 誘導心電図及び呼吸器系パラメーター（呼吸数、1 回換気量及び分時換気量）に対する急性の影響の可能性を検討することであった。前のイヌ心血管系・呼吸器系安全性薬理試験（2.6.2.5.2.5 項、試験番号 PD03-19）で経口投与用懸濁液に関連した可能性のある刺激性及び嘔吐の影響を回避するため、マイクロ錠カプセル製剤の DMF を用いた。

ビーグル犬雌雄各 3 例に動脈圧、体温、心電図及び脳波波形測定機能のあるテレメーター送信器を外科的に埋め込んだ。各動物に約 3 日間隔で溶媒対照及び DMF（240 mg 製剤）を単回投与した（表 6）。

表 6 試験番号 P00012-14-04 の試験デザイン

被験物質	投与量 (mg)	カプセル数	動物数 ^a	
			雄	雌
溶媒対照マイクロ錠	0	1	3	3
DMF マイクロ錠	240	1	3	3

^a 雌雄各 3 例の同じ動物に約 3 日間隔で各投与を行った。

Data source : [M4.2.1.3-10] P00012-14-04-text-Table 2

一般状態観察及び体重測定を行った。ベースライン値を得るため、動脈圧（収縮期、拡張期及び平均）、脈圧、心拍数、心電図波形、体温、呼吸数、1回換気量及び分時換気量を24時間モニタリングした。投与後、上記パラメーターを24時間モニタリングした。

体重には有意な影響は認められなかったが、一般状態の変化のみがDMFと関連した。先に実施した試験結果と一致したことから被験物質と関連すると判断された一般状態の変化は、投与約24時間後で雌2例に認められた嘔吐のみであった。過剰な頭部反転動作、軟便及び粘液便が認められたが、1例のみに認められたため、被験物質とは関連しないと判断された。

心拍数のわずかな増加（対照群の平均値と比較して平均34.9%増加）及びその後のRR間隔のわずかな短縮が投与2時間後で認められた。そのほかの時点（投与4、5、1～6、21～22、23～24、7～18及び19～24時間後）でも、心拍数の有意な増加及びRR間隔の有意な短縮が認められた。投与2時間後の時点以外の心拍数及びRR間隔は正常範囲内であり、薬物動態プロファイルとの関連は認められなかった。投与2時間後の心拍数の増加及びRR間隔の短縮のみが正常範囲を超えた。RR間隔の変化と心拍数の変化は負の相関が認められた。しかし、DMF投与2時間後時点の心拍数及びRR間隔の変化はわずかであり、有害ではないと判断された。

以上、DMF投与2時間後でイヌに嘔吐の一般状態変化、有害ではない心拍数のわずかな増加及びその後のRR間隔のわずかな短縮が認められた。体重、動脈圧、体温、第II誘導心電図並びに呼吸パラメーター（呼吸数、1回換気量及び分時換気量）に影響は認められなかった。

2.6.2.5.3 反復投与毒性試験における心血管系評価

イヌを用いた4週間及び11ヵ月間反復投与毒性試験、並びにカニクイザルを用いた12ヵ月間反復投与毒性試験でも、テレメトリー非装着動物の様々な時点で心電図検査を行った（[M2.6.6.3]）。イヌを用いたDMFの4週間反復経口投与毒性試験（[M2.6.6.3.3.2]、試験番号P00012-04-05）では、1週間投与後に対照群に比べてDMF 50又は100 mg/kg群で8%～12%のQTc延長が認められたが、4週間投与後にはQTc延長は認められなかった。この程度のQTc変化から、ヒトで同様のQT変化が起こることを確実に予測できるとは考えられない（Hammond et al., 2001、Toyoshima et al., 2005）。同試験ではDMFは忍容性不良であり、このような変化の解釈を困難にする顕著な嘔吐、摂餌量減少、体重減少及びその他の二次的な変化が認められた。したがって本試験からは、観察されたQTc延長がDMFの直接的な影響か間接的な影響かは不明である。BG00012（カプセル）を0、25、75/50（忍容性による用量減量）mg/kgの用量でイヌに11ヵ月間反復投与した試験では、投与3、6、9又は11ヵ月目の心電図測定値に影響は認められなかった（[M2.6.6.3.3.3]、試験番号P00012-05-05）。カニクイザルを用いた12ヵ月間反復投与試験でも、投与開始前、投与12、24、38及び52週目の心電図測定値に影響は認められなかった（[M2.6.6.3.4.2]、試験番号P00012-05-08）。

2.6.2.6 薬力学的薬物相互作用試験

多発性硬化症に関連した治療薬を用いた BG00012 の非臨床薬力学的相互作用（複合毒性）試験は実施しなかった。

2.6.2.7 考察及び結論

In vitro の細胞及び分子レベル解析並びに炎症性疾患モデル動物を用いて組織学的及び行動学的評価を行った in vivo 試験の結果から、DMF は強力な抗炎症作用を有することが示された。同様に、DMF の in vitro における酸化ストレスに対する保護作用及び in vivo における神経毒性損傷に対する保護作用から、DMF は神経保護作用を有することも示された。これらの試験結果は、DMF の効力を裏付け、MS 治療における作用機序を解明する手掛かりとなる可能性がある。

BG00012 投与による薬効に関与する転写活性化に対する作用は、DMF の in vivo 試験及び DMF 又は MMF の in vitro 試験結果から、主に Nrf2 経路の活性化を介すると考えられる (2.6.2.2.3 項、試験番号 RSCH-2011-024 ; 2.6.2.3.1 項、試験番号 RSCH-2011-025 ; 2.6.2.3.5 項、試験番号 RSCH-2011-030)。Nrf2 経路の活性化は、酸化ストレス及びその他の複数の異なる有害ストレスに対する内因性の細胞防御機構である (Johnson et al., 2008)。In vitro 初代培養中枢神経系細胞及び in vivo 試験における脳組織の両方の中枢神経系で、Nrf2 経路が活性化されることが示唆された (2.6.2.3.1 項、試験番号 RSCH-2011-025 ; 2.6.2.2.6 項、試験番号 RSCH-2011-028)。Nrf2 経路の活性化は、抗酸化応答遺伝子の活性化、すなわち有害な酸化ストレスから中枢神経系細胞組織を保護する最終産物 (下流遺伝子、抗酸化物質、抗酸化応答等) の発現増加 (2.6.2.2.6 項、試験番号 RSCH-2011-028 ; 2.6.2.3.6 項、試験番号 RSCH-2012-024) によって確認された。有害なストレスからの細胞防御能の亢進は、MS 患者で発生することが確認されているフリーラジカルストレスから中枢神経系細胞を保護する可能性がある (van Horssen et al., 2010)。MS 患者の中枢神経系では細胞の必須抗酸化物質であるグルタチオンレベルが低いという最近の知見を踏まえると、MMF がグルタチオンレベルを増加させた試験結果は特に重要な可能性がある (Choi et al., 2010, Srinivasan et al., 2010)。クプリゾン+ラパマイシン投与によるマウスの神経変性モデルにおいて (2.6.2.3.7 項、試験番号 RSCH-2012-026)、DMF は、軸索損傷の減少、有髄線維の増加、髄鞘超微細構造変化の抑制、軸索総数の増加の治療効果を示したことから、本治療法は MS の病態の特徴である慢性で進行性の神経変性を改善する可能性が考えられる。

初代培養マクロファージ、マクロファージ細胞株及びアストロサイトを用いた DMF 及び MMF の in vitro 試験では抗炎症作用が明らかに認められた (2.6.2.2.4 項、試験番号 RSCH-2011-023)。いずれの場合でも、DMF 又は MMF 処理によって、LPS 刺激による TLR-4 経路活性化を介した炎症性サイトカイン及びケモカインの産生が全般的に減少する傾向が認められた。これらの薬力学的作用では Nrf2 経路の役割は明確ではなかった。しかし、野生型又は Nrf2 ノックアウトマウス由来のマクロファージを用いた ex vivo 試験では、DMF 又は MMF の抗炎症作用の少なくとも部分的には Nrf2 経路が明らかに必要であったが、Nrf2 非依存性の抗炎症作用も明らかに認められた (2.6.2.2.4 項、試験番号 RSCH-2011-023)。分子レベルでの Nrf2 非依存性の抗炎症作用は不明である。最近の試験では、核内因子 NFκB を介した炎症性シグナルの阻害に DMF が関与していることが示唆されている (Loewe et al., 2002, Seidel et al., 2010, Wilms et al., 2010)。また、マウス初代培養アストロサイト及びミクログリアでは、BG00012 は、LPS による炎症マーカー (TNF-α) 産生を Nrf2 経路依存性に抑制した (2.6.2.2.5 項、試験番号 RSCH-2012-023)。さらに、DMF の作用機

序として、 T_H2 細胞を誘導する樹状細胞サブセット DC2 を誘導すること及び免疫細胞の分化を抗炎症性の T_H2 型に偏位させることが確認されており (Ghoreschi et al., 2011)、NF κ B 経路及び ERK1/2-MSK1 経路の阻害により Th1 及び Th17 細胞への分化が阻害されることが明らかにされている (Peng et al., 2012)。作用機序にかかわらず、これらの抗炎症作用は、MS 等の自己免疫疾患に起こる免疫細胞の異常な活性化を抑制すると推測される。In vitro で観察されたこれらの抗炎症作用は、CIA 関節炎モデル(2.6.2.3.2 項、試験番号 RSCH-2011-026)及び EAE 神経炎モデル(2.6.2.3.4 項、試験番号 RSCH-2011-029) への in vivo DMF 投与後に観察された明らかな抗炎症作用と一致している。これらの結果は、DMF の抗炎症作用を明らかにしたものであり、MS の治療薬とする理論的根拠となる。

副次的薬理試験では、10 及び 30 μ M で DMF 及び MMF の可能性のある広範な薬理的相互作用プロファイルを実験で検討した結果、76 種類の受容体、リガンド開口性イオンチャネル及び酵素のいずれに対しても相互作用は認められなかった (2.6.2.4.1 項、試験番号 RSCH-2013-023)。

安全性薬理試験では、Fumaderm、DMF 及び MMF を評価した。中枢神経系において Fumaderm に関連した影響は認められなかった。Fumaderm は主要有効成分として DMF を含有するため (全フマル酸含量中 56%が DMF)、これらの試験結果から、DMF の中枢神経系における安全性薬理を裏付ける情報が得られた。hERG チャネルの阻害又は摘出プルキンエ線維の活動電位に対する影響について、DMF 又は MMF に関連した変化は認められなかった。

安全性薬理を評価したテレメトリー装着イヌでは、DMF は、投与後 24 時間の心電図、観血的血圧 (収縮期圧、拡張期圧及び平均動脈圧)、心拍数、呼吸数、又は呼吸波形 (胸郭圧) 最大値に有害な影響を与えなかった。DMF は臨床用量を超えた 1000 mg/kg まで、心拍数で補正した QT 間隔 (QTc) 及び心電図に影響はみられず、心電図異常も認められなかった。非 GLP 1 試験では、DMF に関連した心拍数増加及び動脈圧低下が認められたが、全動物で同時期に嘔吐による生理学的ストレス及び採血があった。さらに、これらの所見発現には DMF 投与後から約 3 時間を要しており、本試験では直接測定していないが、最高全身曝露量には、これらの所見の発現時期の 2 時間以上前に到達していたと考えられることから、これらの所見の発現時には、循環血中に本薬がほとんど残っていなかったと考えられ、心拍数及び動脈圧の変化は、本薬曝露に対する直接的な薬理的応答ではなかったと推測するのが妥当である。イヌの GLP 血管系及び呼吸器系試験では、DMF 投与 2 時間後で心拍数のわずかな増加及びその後の RR 間隔のわずかな短縮が認められたが、有害な変化ではないと判断された。最後に、これらの変化は、イヌ及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験では認められなかった。これまでの安全性薬理試験及び反復投与毒性試験の心血管系安全性試験結果を総括すると、DMF 及び MMF は心血管系に有害な影響を与えないことが示された。

以上、非臨床薬理試験から BG00012 の可能性のある作用機序が示され、基礎的な安全性薬理プロファイルが確認された。

2.6.2.8 参考文献

- Choi IY, Lee SP, Denney DR, et al. Lower levels of glutathione in the brains of secondary progressive multiple sclerosis patients measured by 1H magnetic resonance chemical shift imaging at 3 T. *Mult Scler* 2010; 17(3): 289-296. [M4.3-16]
- Chorley BN, Campbell MR, Wang X, et al. Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(15): 7416-7429 [M4.3-17]
- Ellrichmann G, Petrasch-Parwez E, Lee DH, et al. Efficacy of fumaric acid esters in the R6/2 and YAC128 models of Huntington's disease. *PLoS One* 2011; 6(1): e16172. [M4.3-25]
- Ghoreschi K, Brück J, Kellerer C, et al. Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *J Exp Med* 2011; 208(11): 2291-2303. [M4.3-30]
- Hammond TG, Carlsson L, Davis AS, et al. Methods of collecting and evaluating non-clinical cardiac electrophysiology data in the pharmaceutical industry: results of an international survey. *Cardiovasc Res* 2001; 49(4): 741-750. [M4.3-33]
- Hu J, Yao H, Gan F, et al. Interaction of OKL38 and p53 in regulating mitochondrial structure and function. *PLoS One* 2012; 7(8): e43362. [M4.3-41]
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 236(2): 313-322. [M4.3.45]
- Johnson JA, Johnson DA, Kraft AD, et al. The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1147: 61-69. [M4.3-48]
- Kappos L, Gold R, Miller DH, et al. Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet* 2008; 372(9648): 1463-1472. [M4.3-49]
- Kobayashi M, Li L, Iwamoto N, et al. The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol Cell Biol* 2009; 29(2): 493-502. [M4.3-52]
- Linker RA, Lee DH, Ryan S, et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain* 2011; 134(Pt 3): 678-692. [M4.3-61]
- Loewe R, Holnthoner W, Gröger M, et al. Dimethylfumarate inhibits TNF-induced nuclear entry of NF-kappa B/p65 in human endothelial cells. *J Immunol* 2002; 168(9): 4781-4787. [M4.3-64]
- Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB, et al. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 233-260. [M4.3-71]
- Peng H, Guerau-de-Arellano M, Mehta VB, et al. Dimethyl fumarate inhibits dendritic cell maturation via nuclear factor kappa B (NF-kappa B) and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) and mitogen stress-activated kinase 1 (MSK1) signaling. *J Biol Chem* 2012; 287 (33): 28017-38026. [M4.3-74]

- Seidel P, Merfort I, Tamm M, et al. Inhibition of NF-kappa B and AP-1 by dimethylfumarate correlates with down-regulated IL-6 secretion and proliferation in human lung fibroblasts. *Swiss Med Wkly* 2010; 140: w13132. [M4.3-83]
- Srinivasan R, Ratiney H, Hammond-Rosenbluth KE, et al. MR spectroscopic imaging of glutathione in the white and gray matter at 7 T with an application to multiple sclerosis. *Magn Reson Imaging*. 2010; 28(2): 163-170. [M4.3-88]
- Toyoshima S, Kanno A, Kitayama T, et al. QT PRODACT: in vivo QT assay in the conscious dog for assessing the potential for QT interval prolongation by human pharmaceuticals. *J Pharmacol Sci* 2005; 99(5): 459-471. [M4.3-96]
- van Horsen J, Witte ME, Schreibelt G, et al. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812(2): 141-150. [4.3-100]
- Wilms H, Sievers J, Rickert U, et al. Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *J Neuroinflammation* 2010; 7: 30. [M4.3-105]

テクフィデラカプセル 120mg
テクフィデラカプセル 240mg

第2部（モジュール2）：CTDの概要（サマリー）

2.6.3 薬理試験概要表

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

	頁
2.6.3.1 薬理試験：一覧表.....	3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験.....	6
2.6.3.3 副次的薬理試験.....	10
2.6.3.4 安全性薬理試験.....	11
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験.....	13

2.6.3 薬理試験概要表

フマル酸ジメチル

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：BG00012（DMF：フマル酸ジメチル）、MMF（フマル酸モノメチル）及びFumaderm



試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	GLP 適用	試験番号	記載箇所
効力を裏付ける試験						
フマル酸エステル類等の機能解析のためのAREルシフェラーゼレポーター遺伝子安定導入細胞株の樹立	DLD-1不死化細胞 MCF7不死化細胞 [DMF][MMF]	In vitro	Biogen Inc	非適用	RSCH-2011-020	参考 [M4.2.1.1-1]
BG00012 の作用機序の検討に用いるNrf2 及び Keap1 遺伝子特異的 siRNA のスクリーニング	DLD-1不死化細胞	In vitro	Biogen Inc	非適用	RSCH-2011-021	参考 [M4.2.1.1-2]
ウェスタンブロット法による Nrf2 検出用抗 Nrf2 抗体のスクリーニング	DLD-1 不死化細胞	In vitro	Biogen Inc	非適用	RSCH-2011-022	参考 [M4.2.1.1-3]
フマル酸ジメチル (DMF) による Nrf2 活性化 (in vitro 試験)	DLD-1不死化細胞、293FT不死化細胞、ヒト初代培養アストロサイト、ヒト初代培養線維芽細胞、マウス初代培養アストロサイト、ラット初代培養アストロサイト [DMF][MMF]	In vitro	Biogen Inc	非適用	RSCH-2011-024	参考 [M4.2.1.1-4]
フマル酸ジメチル (DMF) の in vitro における抗炎症作用	RAW264.7不死化マクロファージ細胞株、マウス初代培養骨髄由来マクロファージ、ラット初代培養アストロサイト [DMF]	In vitro	Biogen Inc	非適用	RSCH-2011-023	参考 [M4.2.1.1-5]
LPS 誘導アストロサイト及びミクログリア活性化応答に対するフマル酸ジメチル及びフマル酸モノメチルの作用	C57BL/6野生型マウス及び Nrf2 ノックアウトC57BL/6 マウスの初代培養アストロサイト及びミクログリア	In vitro	Biogen Inc	非適用	RSCH-2012-023	参考 [M4.2.1.1-6]
酸化ストレスに対するフマル酸エステルによるNrf2経路を介した中枢神経系細胞保護作用	C57BL/6野生型マウス C57BL/6 Nrf2 ノックアウトマウス ヒト初代培養アストロサイト、ラット初代培養皮質ニューロン [DMF][MMF]	強制経口 In vitro	Biogen Inc	非適用	RSCH-2011-028	参考 [M4.2.1.1-7]

2.6.3 薬理試験概要表

フマル酸ジメチル

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：BG00012（DMF：フマル酸ジメチル）、MMF（フマル酸モノメチル）及びFumaderm

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	GLP 適用	試験番号	記載箇所
げっ歯類におけるフマル酸ジメチルの薬力学的作用	C57BL/6野生型マウス、Nrf2ノックアウトC57BL/6マウス、Brown Norway ラット [DMF]	強制経口	Biogen Inc	非適用	RSCH-2011-025	[M4.2.1.1-8]
げっ歯類リウマチ性関節炎モデル：ラットコラーゲン誘導関節炎におけるフマル酸ジメチルの効果	DA近交系ラット、コラーゲン関節炎モデル [DMF]	強制経口	Biogen Inc	非適用	RSCH-2011-026	参考 [M4.2.1.1-9]
Sprague-Dawley (SD) ラットにおけるマロン酸エステル誘導線条体病変体積のDMFによる抑制	Sprague-Dawleyラット、線条体マロン酸エステル障害 [DMF]	強制経口	Biogen Inc	非適用	RSCH-2011-027	参考 [M4.2.1.1-10]
治療効果 - 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)	Brown Norway ラット、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) [DMF]	強制経口	Biogen Inc	非適用	RSCH-2011-029	参考 [M4.2.1.1-11]
作用機序 - 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)	Brown Norway ラット、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) [DMF]	強制経口	Biogen Inc	非適用	RSCH-2011-030	参考 [M4.2.1.1-12]
薬力学的作用 - Nrf2 依存性遺伝子発現	C57BL/6野生型マウス C57BL/6 Nrf2 ノックアウトマウス [DMF]	強制経口	Biogen Inc	非適用	RSCH-2012-024	参考 [M4.2.1.1-13]
治療効果 - クプリゾン/ラパマイシン神経変性モデル	C57BL/6J マウス、クプリゾン/ラパマイシン神経変性モデル [DMF]	強制経口		非適用	RSCH-2012-026	参考 [M4.2.1.1-14]
副次的薬理試験						
受容体結合試験	放射能標識リガンドの結合試験による神経関連受容体及びリガンド結合性イオンチャネルへの結合並びに酵素活性への影響の検討 [DMF][MMF]	In vitro		非適用	RSCH-2013-023	参考 [M4.2.1.2-1]

2.6.3 薬理試験概要表

フマル酸ジメチル

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：BG00012（DMF：フマル酸ジメチル）、MMF（フマル酸モノメチル）及び Fumaderm

安全性薬理試験						
試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	GLP 適用	試験番号	記載箇所
心血管系/呼吸器系	ビーグル犬 [DMF]	強制経口	■	非適用	PD03-19	参考[M4.2.1.3-9]
心血管系/呼吸器系	ビーグル犬 [DMF]	経口（カプセル）	■	適	P00012-14-04	[M4.2.1.3-10]
hERG 電流への影響（イオン電流）	hERG-発現ヒト胎児腎臓細胞 (HEK-293) [DMF]	In vitro	■	適	PD03-17	[M4.2.1.3-5]
hERG 電流への影響（イオン電流）	hERG-発現ヒト胎児腎臓細胞 (HEK-293) [MMF]	In vitro	■	適	PD03-21	[M4.2.1.3-6]
心筋活動電位	イヌプルキンエ細胞[DMF]	In vitro	■	適	PD03-18	[M4.2.1.3-7]
心筋活動電位	イヌプルキンエ細胞[MMF]	In vitro	■	適	PD03-22	[M4.2.1.3-8]
ヘキサバルビタール誘発睡眠時間	NMRI HAN/Bo SPF マウス [Fumaderm]	強制経口	■	適	5351/89	参考[M4.2.1.3-4]
自発運動	NMRI HAN/Bo SPF マウス [Fumaderm]	強制経口	■	適	5348/89	参考 [M4.2.1.3-2]
侵害刺激反応（ライジングテスト）	NMRI HAN/Bo SPF マウス [Fumaderm]	強制経口	■	適	5356/89	参考 [M4.2.1.3-3]
レセルピン体温低下作用	NMRI HAN/Bo SPF マウス [Fumaderm]	強制経口	■	適	5350/89	参考 [M4.2.1.3-1]

EAE：実験的自己免疫性脳脊髄炎、CRL = Charles River Laboratories、■：■、SPF：特定病原微生物がない、hERG：ヒト遅延整流カリウムイオンチャネル遺伝子

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質：BG00012（DMF：フマル酸ジメチル）、MMF（フマル酸モノメチル）

試験の種類	試験系	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号	記載箇所
In vitro 作用機序、測定系の構築	DLD-1不死化細胞、MCF7不死化細胞	In vitro	0.05 μM 0.15 μM 0.5 μM 1.5 μM 5 μM 15 μM 50 μM 150 μM 500 μM	NA	DMF及びMMFは、Nrf2に依存したAREを含む遺伝子転写系を活性化した。	RSCH-2011-020	参考 [M4.2.1.1-1]
In vitro 作用機序、測定系の構築	DLD-1不死化細胞	In vitro	50 μM	NA	Dharmacon社のNrf2-2のsiRNA及びKeap1-1のsiRNAは活性を有し、特異的反応性を示した。	RSCH-2011-021	参考 [M4.2.1.1-2]
In vitro 作用機序、測定系の構築	DLD-1 不死化細胞	In vitro	50 μM	NA	ウェスタンブロット法によってNrf2特異的な抗体を同定した。	RSCH-2011-022	参考 [M4.2.1.1-3]
In vitro 作用機序、測定系の構築	RAW264.7不死化マクロファージ細胞株、マウス初代培養骨髄由来マクロファージ、ラット初代培養アストロサイト	In vitro	1 μM 3 μM 10 μM 30 μM	NA	In vitroでDMF及びMMFはLPS刺激による炎症反応を抑制することが可能で、マウス骨髄由来のマクロファージでは、LPS応答を抑制した。Nrf2は応答に関与したが、必須ではなかった。	RSCH-2011-023	参考 [M4.2.1.1-5]

2.6.3 薬理試験概要表

フマル酸ジメチル

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：BG00012（DMF：フマル酸ジメチル）、MMF（フマル酸モノメチル）

試験の種類	試験系	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号	記載箇所
In vitro 作用機序、測定系の構築	DLD-1不死化細胞、293FT不死化細胞、ヒト初代培養アストロサイト、ヒト初代培養線維芽細胞、マウス初代培養アストロサイト、ラット初代培養アストロサイト	In vitro	0.05 μM 0.15 μM 0.5 μM 1.5 μM 5 μM 15 μM 30 μM 50 μM 150 μM	NA	DMF及びMMFは、Keap1のCys151を直接修飾した。両化合物は核内Nrf2濃度を増加させ、Nrf2経路下流の抗酸化応答遺伝子の転写を活性化させた。Nrf2は抗酸化応答遺伝子の誘導に必須である。	RSCH-2011-024	参考 [M4.2.1.1-4]
In vitro 作用機序、測定系の構築	C57BL/6野生型マウス及び Nrf2ノックアウトC57BL/6 マウスの初代培養アストロサイト及びミクログリア	In vitro	3.3 μM 10 μM 30 μM	NA	DMF及びMMFは、アストロサイト及びミクログリアにおけるLPSで誘導した炎症性サイトカインの産生を用量依存的及びNrf2依存性に複数の時点で抑制した。	RSCH-2012-023	参考 [M4.2.1.1-6]
In vivo作用機序、薬力学反応	C57BL/6野生型マウス、Nrf2ノックアウトC57BL/6 マウス、Brown Norwayラット	強制経口	5, 15, 25, 50, 100, 200, 500 (mg/kg)	雄 5/群	DMF投与は、野生型マウス及びラットにNrf2抗酸化経路の遺伝子を発現する反応を誘導した。この反応は用量依存的で、Nrf2ノックアウトマウスではDMFに対する薬力学的作用を示さなかった。	RSCH-2011-025	[M4.2.1.1-8]
In vivo作用機序：In vivo治療効果；抗炎症作用	DA 近交系ラット	強制経口	200 (mg/kg)	雌 7/群	DMFの1日1回20日間投与は炎症反応及びコラーゲン関節炎モデルにおける炎症及び炎症性損傷の減少に有効であった。	RSCH-2011-026	参考 [M4.2.1.1-9]

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：BG00012（DMF：フマル酸ジメチル）、MMF（フマル酸モノメチル）

試験の種類	試験系	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号	記載箇所
In vivo作用機序；神経保護作用	Sprague-Dawleyラット	強制経口	30, 50, 75, 100 (mg/kg)	雄 12/群	DMFは、マロン酸エステル誘導性病変体積を減少させるのに有効で、機能的神経障害を有意に改善した。	RSCH-2011-027	参考 [M4.2.1.1-10]
In vivo作用機序；In vitro作用機序；神経細胞保護作用	C57BL/6野生型マウス C57BL/6 Nrf2ノックアウトマウス ヒト初代培養アストロサイト、ラット初代培養皮質ニューロン	強制経口	50, 200 (mg/kg)	雄 6/群	DMFは末梢組織及び中枢神経系組織にNrf2依存性の抗酸化応答を誘導した。	RSCH-2011-028	参考 [M4.2.1.1-7]
		In vitro	0.12 μM 0.37 μM 1.1 μM 3.3 μM 10 μM 30 μM	In vitro	In vitroでDMFは中枢神経系の細胞にNrf2依存性の抗酸化応答を誘導した。これによりNrf2に依存した酸化ストレスに対する細胞保護作用を示した。		
In vivo作用機序；In vivo治療効果	Brown Norwayラット	強制経口	5, 25, 50, 100, 200 (mg/kg)	雄 6/群	DMFは、げっ歯類実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルでの疾患改善に有効であった。200 mg/kgの投与量では完全に疾患を抑制し、100 mg/kgでは疾患を部分的に改善した。100 mg/kg未満では無効であった。	RSCH-2011-029	参考 [M4.2.1.1-11]

2.6.3 薬理試験概要表

フマル酸ジメチル

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：BG00012（DMF：フマル酸ジメチル）、MMF（フマル酸モノメチル）

試験の種類	試験系	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号	記載箇所
In vivo作用機序；In vivo治療効果	Brown Norwayラット	強制経口	5, 25, 50, 100, 200 (mg/kg)	雄 6/群	DMFを1日1回反復投与したとき、単回投与の場合と同様に薬力学的作用が誘導された。DMF投与は、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルでの疾患の進行に関連した神経炎症及び細胞変性を抑制した。	RSCH-2011-030	参考 [M4.2.1.1-12]
In vivo作用機序；薬力学応答	C57BL/6野生型マウス C57BL/6 Nrf2ノックアウトマウス	強制経口	100 mg/kg	雄 6/群	DMFを投与したとき、末梢組織に比べて中枢神経系組織で特定遺伝子発現制御、特に脳におけるOsgin1及びBdnf遺伝子の発現制御が認められた。	RSCH-2012-024	参考 [M4.2.1.1-13]
In vivo作用機序；In vivo治療効果	C57BL/6Jマウス	強制経口	100 mg/kg /日、6週間	雄 15 (CR-) 及び 20 (CR+)/群	DMFは、軸索損傷の減少、有髄線維の増加、髄鞘超微細構造変化を抑制、軸索総数を増加させ、神経保護作用を示した。	RSCH-2012-026	参考 [M4.2.1.1-14]

ARE：抗酸化反応エレメント、NA：該当せず

2.6.3.3 副次的薬理試験

被験物質：BG00012（DMF：フマル酸ジメチル）、MMF（フマル酸モノメチル）

試験の種類	試験系	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号	記載箇所
In vitro受容体結合活性	ヒト、ラット、マウス、ウシ、ウサギ、	In vitro	DMSO (溶媒対照) 10 µM 30 µM	NA	DMF及びMMFは、76種類の神経関連受容体、リガンド開口性イオンチャネル又は酵素に対して意義のある相互作用を示さなかった。	RSCH-2013-023	参考 [M4.2.1.2-1]

NA：該当せず

2.6.3 薬理試験概要表

フマル酸ジメチル

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：BG00012 (FAG201：フマル酸ジメチル)、MMF (フマル酸モノメチル)

評価対象となる組織	試験系	投与方法	用量 (mg/kg)	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号	記載箇所
心血管系/ 呼吸器系	ビーグル犬	強制経口	0, 10, 100, 1000	雄 4	10～1000 mg/kgの投与量範囲におけるDMFの経口投与は、100及び1000 mg/kgの投与量範囲で限定的な有害性の一般状態（嘔吐）が認められ、それ以外は全動物で忍容であった。DMF経口投与に関連した影響は、投与約3時間後で心拍数及び動脈圧に認められた。呼吸数、最大胸腔内圧、体温、動脈血ガス及び心電図パラメーターに対する影響は24時間のモニタリングでは認められなかった。	非適用	PD03-19	参考 [M4.2.1.3-9]
心血管系/ 呼吸器系	ビーグル犬	経口 (カプセル)	プラセボ (0 mg)、240 mg カプセル	雄 3/雌 3	DMF 240 mg : 投与2時間後で有害ではない心拍数のわずかな増加及びRR間隔のわずかな短縮が認められた。嘔吐の発現が認められた。	適	P00012-14-04	[M4.2.1.3-10]
hERG 電流への影響 (イオン電流)	hERG 発現ヒト胎児腎臓細胞 (HEK-293)	In vitro	0, 60, 180, 600, 1500 µM	n=3/ 60, 180, 600 µM n=4/ 0, 1500 µM	DMF による hERG 電流変化は認められなかった。	適	PD03-17	[M4.2.1.3-5]
hERG 電流への影響 (イオン電流) ^a	hERG 発現ヒト胎児腎臓細胞 (HEK-293)	In vitro	0, 60, 180, 600, 1500 µM	n=3/ 60, 180, 600 µM	MMF による hERG 電流変化は認められなかった。	適	PD03-21	[M4.2.1.3-6]
心筋活動電位	イヌ心臓プルキンエ線維	In vitro	0, 60, 600, 1500 µM	n=4/群	DMF によるプルキンエ線維活動電位持続時間 (APD90 及び APD60) の延長は認められなかった。	適	PD03-18	[M4.2.1.3-7]
心筋活動電位	イヌ心臓プルキンエ線維	In vitro	0, 60, 600, 1500 µM	n=4/群	MMF によるプルキンエ線維活動電位持続時間 (APD90 及び APD60) の延長は認められなかった。	適	PD03-22	[M4.2.1.3-8]

^a 本試験はフマル酸モノメチルを用いて実施された。

hERG：ヒト心筋活動電位の最分極を担うカリウムイオンチャネルK_v11.1をコードする遺伝子、APD90：90%再分極時活動電位持続時間、APD60：60%再分極時活動電位持続時間

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

被験物質：Fumaderm

試験項目	動物種/系統	投与方法	用量 (mg/kg)	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
ヘキソバルビタール麻酔作用（誘発麻酔時間）	マウス/ NMRI HAN/Bo SPF	強制経口	383, 464	雌 5/用量	投与後、ヘキソバルビタール麻酔作用に影響は認められなかった。	適	5351/89	参考 [M4.2.1.3-4]
自発運動量	マウス/ NMRI HAN/Bo SPF	強制経口	383, 464	雌/用量	投与後、自発運動量に影響は認められなかった。	適	5348/89	参考 [M4.2.1.3-2]
侵害刺激反応（ライジングテスト）	マウス/ NMRI HAN/Bo SPF	強制経口	383, 464	雌 5/用量	投与後、侵害刺激反応に影響は認められなかった。	適	5356/89	参考 [M4.2.1.3-3]
レセルピン体温低下作用	マウス/ NMRI HAN/Bo SPF	強制経口	383, 464	雌 5/用量	投与後、レセルピン体温低下作用に影響は認められなかった。	適	5350/89	参考 [M4.2.1.3-1]

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

多発性硬化症治療に関して用いたBG00012の非臨床薬物動態学的薬物相互作用試験（毒性学的及び薬物動態学的薬物相互作用の統合解析）は実施していない。