TABLE OF CONTENTS

1. 緒言 2

LIST OF TABLES

Table 1 アプレミラストの用量漸増スケジュール 2

LIST OF FIGURES

Figure 1 アプレミラスト（CC-10004）の化学構造式 2

1. 緒言

アプレミラストは、標的分子であるホスホジエステラーゼタイプ 4（PDE4）の阻害を介して種々の炎症性経路を調整する新規経口薬である。アプレミラストは、尋常性乾癬、関節症性乾癬、アトピー性皮膚炎、炎症性腸疾患及びベーチェット病等、多様な炎症性因子が関与している疾患に対する新たな治療薬として開発されている。局所療法が不適と判断された、又は、局所療法で十分な効果が得られなかった尋常性乾癬、関節症性乾癬に対する治療を効能効果として承認申請を行った。

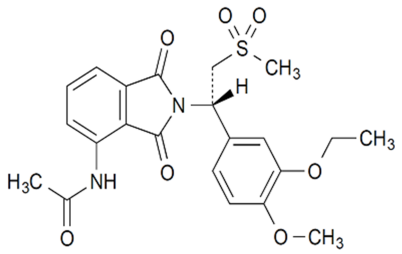
ホスホジエステラーゼタイプ 4（PDE4）を阻害する低分子の経口 PDE4 阻害薬で、細胞内で炎症性及び抗炎症メディエーターのネットワークを調節する。PDE4 は cAMP に特異的な PDE で、主に炎症性細胞に分布している。アプレミラストは、PDE4 を阻害することで細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、IL-17、TNF-α、IL-23、及び他の炎症性サイトカインの産生を抑制することにより炎症反応を抑制する。

アプレミラストの尋常性乾癬及び関節症性乾癬治療での用法及び用量は、通常、成人には Table 1 に示す用量漸増スケジュールにしたがい経口投与し、6 日目以降はアプレミラストとして 30 mg を 1 日 2 回、朝夕に経口投与するものである。

Table 1　アプレミラストの用量漸増スケジュール

1 日目	2 日目		3 日目		4 日目		5 日目		6 日目以降	
朝	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕
10 mg	10 mg	10 mg	10 mg	20 mg	20 mg	20 mg	20 mg	30 mg	30 mg	30 mg

Figure 1　アプレミラスト（CC-10004）の化学構造式



[英　名]
N-{2-[(1*S*)-1-(3-Ethoxy-4-methoxyphenyl)-2-(methylsulfonyl)ethyl]-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol- 4-yl}acetamide
[日本名]
N-{2-[(1*S*)-1-(3-エトキシ-4-メトキシフェニル)-2-(メチルスルホニル)エチル]-1,3-ジオキソ-2,3-ジヒドロ-1*H*-イソインドール-4-イル}アセトアミド

アプレミラストは *S*-エナンチオマーであり、1 箇所のキラル中心を有する。アプレミラストの *R*-エナンチオマー（CC-10007）への転移は動物及びヒトの生体内では起こらない。

アプレミラストの薬力学的特性としては、ヒト末梢血単核球細胞及び T 細胞由来サイトカイン産生の調節、抗炎症作用、抗侵害受容作用及び抗血管新生作用があげられる。In vitro 試験では、アプレミラストの特異性及び効果を種々の酵素及び細胞系を用いて評価し、同様にアプレミラストの代謝物の薬理活性も評価した（2.6.2.2 項）。アプレミラストの in vivo での作用は、急性の関節リウマチ、皮膚での炎症、尋常性乾癬、潰瘍性大腸炎及び筋萎縮性側索硬化症の動物モデルを用いて評価した（2.6.2.2 項、2.6.2.3 項）。また、セレブロンへの結合に加え、非ホジキンリンパ腫細胞に対する作用も評価した（2.6.2.3 項）。さらに、フォルスコリン、プロスタグランジン E2、メトトレキサート及びエタネルセプトとアプレミラストとの薬力学的薬物相互作用を評価した（2.6.2.5 項）。

アプレミラストの動物での薬物動態（吸収、分布、代謝、排泄）について in vivo 及び in vitro 試験で評価した（2.6.4.3 項、2.6.4.4 項、2.6.4.5 項、2.6.4.6 項）。併用薬との薬物動態での相互作用について種々の in vitro 試験で評価した（2.6.4.7 項）。

非臨床安全性薬理試験（2.6.2.4 項）により、アプレミラストの中枢神経系、呼吸系、心血管系、消化器系に対する潜在的な作用を評価した。さらに、in vitro ヒト ether-à-go-go related gene（hERG）試験で hERG カリウム電流（IKr）に対するアプレミラストの潜在的作用を評価した。

非臨床安全性プログラムとして、マウス及びラットの単回投与毒性試験（経口及び静脈内投与）（2.6.6.2 項）、マウスでは最長 6 ヵ月間、サルでは最長 12 ヵ月間の反復投与毒性試験（2.6.6.3 項）、遺伝毒性試験コアバッテリー（Ames 試験、in vitro 染色体異常試験及び in vivo 小核試験、2.6.6.4 項）、マウス及びラットの 2 年間がん原性試験並びにその投与量設定のための 3 ヵ月間投与最大耐量（MTD）検討試験（2.6.6.5 項）、マウス及びサルでの生殖発生毒性試験（2.6.6.6 項）、局所刺激性試験（2.6.6.7 項）を計画した。ラットでの *S*-エナンチオマー（アプレミラスト）及び *R*-エナンチオマーの毒性プロファイルを比較する試験も実施した。加えて、マウスの複数組織に観察された炎症性変化の進展及び回復性の経時的変化並びに炎症反応のバイオマーカーを評価するため、毒性発現機序に関する試験を実施した（2.6.6.8 項）。アプレミラストの光毒性は BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いて in vitro 試験で評価した（2.6.6.8 項）。また、幼若マウスを用いて 2 試験（2 週間投与用量設定試験、並びに回復期間、生殖機能及びイムノフェノタイピングの評価を含む 13 週間投与毒性試験及びトキシコキネティクス試験）も実施した（2.6.6.8 項）。アプレミラスト原薬中に同定された不純物の 1 つ（RC6）は、in silico 評価では化学構造上、遺伝毒性を示す可能性があったことから、Ames 試験で変異原性を検討した（2.6.6.8 項）。毒性試験は ICH ガイドラインに従い実施した。主要な非臨床試験は GLP に準拠して実施した。

アプレミラストのトキシコキネティクスパラメータは in vivo 毒性試験で評価した。ヒトで同定された主な 2 つの代謝物（M3［*O*-脱メチル体］及び M12［*O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体］）もマウス及びサルの長期投与試験で評価した（2.6.6.3 項）。

非臨床薬理、薬物動態及び毒性に関する概要はそれぞれ 2.6.2 項、2.6.4 項及び 2.6.6 項、非臨床薬理、薬物動態及び毒性に関する図表はそれぞれ 2.6.3 項、2.6.5 項及び 2.6.7 項に記載した。

TABLE OF CONTENTS

略語・略号一覧 3
1. まとめ 6
2. 効力を裏付ける試験 10
2.1. アプレミラストの in vitro 薬理活性 10
2.1.1. In vitro 試験系 10
2.1.1.1. ホスホジエステラーゼタイプ 4 阻害作用 10
2.1.1.2. 各種酵素及び受容体に対する作用 11
2.1.2. 炎症性反応に対する各種細胞系を用いた評価 13
2.1.2.1. アプレミラストの炎症性及び抗炎症性遺伝子発現に対する作用 13
2.1.2.2. 炎症性サイトカインに対する作用 14
2.1.2.3. ホスホジエステラーゼ阻害に対する反応の動物種間比較 15
2.1.2.4. TNF-α 産生に対する作用 15
2.1.2.5. 細胞増殖に対する作用 15
2.1.2.6. IL-7 遺伝子発現に対する作用 16
2.1.2.7. 1 型、2 型、及び 17 型ヘルパーT 細胞免疫反応に関連する疾患に対する潜在的治療効果 16
2.1.2.8. 好中球 - 内皮細胞接着に対する作用 17
2.1.2.9. シクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）酵素機能に対する作用 17
2.1.3. ヒト臍帯静脈内皮細胞でのアプレミラストの抗血管新生作用 19
2.1.4. アプレミラスト代謝物の薬理活性 21
2.2. アプレミラストの in vivo 薬効薬理試験 22
2.2.1. アプレミラストの抗関節炎及び抗炎症効果 22
2.2.2. ヒト皮膚又は乾癬 NK 細胞を異種移植した Beige-重症複合免疫不全マウスモデルでの乾癬様所見に対する治療効果 23
2.2.3. 雌 SKH-1 マウス皮膚に対するアプレミラストの抗アポトーシス作用 25
2.2.4. T 細胞及び B 細胞移入モデルに対するアプレミラストの作用 26
3. 副次的薬理試験 27
3.1. アプレミラストのヒトセレブロンへの結合の評価 27
3.2. ラット及びフェレットでの薬物動態及び薬力学的作用 27
3.3. 非ホジキンリンパ腫 B 細胞株に対するアプレミラストの作用 28
3.4. In vivo 動物モデルを用いた試験及び補助的試験 28
3.4.1. 大腸炎モデルに対するアプレミラストの作用 28

3.4.2. 肺炎症及び喘息モデルに対するアプレミラストの作用 29
3.5. 痛風様炎症及び腹膜炎モデルに対するアプレミラストの作用 30
3.6. 皮膚ループス細胞モデルに対するアプレミラストの作用 30
3.7. 筋萎縮性 側索硬化症モデルに対するアプレミラストの作用 31
3.8. 神経因性疼痛 Bennett モデルでのアプレミラストの鎮痛作用の評価 31
4. 安全性薬理試験 32
4.1. Irwin の変法を用いたマウス中枢神経系及び行動試験 32
4.2. 麻酔下イヌでの心血管系及び呼吸器系に対する作用 32
4.3. クローン化された hERG 遺伝子発現哺乳類細胞でのイオン電流の測定 33
4.4. マウスの胃腸管運動に対する作用 33
5. 薬力学的薬物相互作用 34
6. 考察及び結論 37
7. 参考文献 39

LIST OF TABLES

Table 1 アプレミラストの各種ホスホジエステラーゼに対する阻害活性及び選択性 11
Table 2 組換えヒトホスホジエステラーゼに対するアプレミラストの阻害活性 11
Table 3 試験した細胞表面受容体及び酵素 12
Table 4 定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）法による各種サイトカインの遺伝子発現及びエンザイムイムノアッセイ（ELISA）法によるタンパク質発現の測定結果 14
Table 5 アプレミラストの細胞での薬理作用 18
Table 6 アプレミラスト及びその代謝物のホスホジエステラーゼタイプ 4 及び TNF-α 阻害 21
Table 7 ヒト皮膚又は乾癬 NK 細胞を異種移植した Beige-重症複合免疫不全マウスモデルでのアプレミラストの in vivo での抗乾癬効果の概要 25
Table 8 ヒト皮膚又は乾癬 NK 細胞を異種移植した Beige-重症複合免疫不全マウスモデルでのアプレミラストの in vivo での乾癬炎症マーカーの免疫組織化学染色 25
Table 9 2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸誘発大腸炎マウスモデルでのアプレミラスト、テトミラスト及び 5-アミノサリチル酸の薬理反応 29
Table 10 ヒト皮膚又は乾癬ナチュラルキラー細胞を異種移植した Beige-重症複合免疫不全マウスモデルでのメトトレキサートのアプレミラスト併用又は非併用時の in vivo 抗乾癬効果の概要 36
Table 11 ヒト皮膚又は乾癬ナチュラルキラー細胞を異種移植した Beige-重症複合免疫不全ベージュマウスモデルでの in vivo での乾癬炎症マーカーの免疫組織化学染色 36

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
AHR	Airway hyperresponsiveness	気道過敏性
Akt	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog	セリンスレオニンキナーゼ Akt
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis	筋萎縮性側索硬化症
ATF-1	Activating transcription factor-1	活性化転写因子-1
AUC	Area under the concentration-time curve	濃度時間曲線下面積
AUC_{24h}	Area under the concentration-time curve calculated to the last observable concentration at 24 h	時間 0 から 24 時間までの濃度時間曲線下面積
BAL	Bronchoalveolar lavage	気管支肺胞洗浄
BID	Twice daily	1 日 2 回
BMM	Bone marrow derived mononuclear cells	骨髄単核細胞
BMP-6	Bone morphogenic protein 6	骨形成タンパク質 6
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	環状アデノシン 1 リン酸
CCI	Chronic constriction injury	慢性絞扼損傷
CIA	Collagen induced arthritis	コラーゲン誘発関節炎
COX-2	Cyclooxygenase-2	シクロオキシゲナーゼ-2
CRBN	Cereblon	セレブロン
CRE	Cyclic AMP-responsive element	環状アデノシン 1 リン酸応答配列
CREB	CRE binding protein	環状アデノシン 1 リン酸応答配列結合タンパク質
CysA	Cyclosporin A	シクロスポリン A
DMSO	Dimethly sulfoxide	ジメチルスルホキシド
EC_{50}	Concentration of drug producing 50% of E_{max}（maximum effect of a drug produces）	50%有効濃度
ED_{50}	50% effective dose	50%有効用量
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	エンザイムイムノアッセイ
ETAN	Etanercept	エタネルセプト
fMLP	*N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine	*N*-ホルミル-メチオニン-ロイシン-フェニルアラニン
GM-CSF	Granulocyte monocyte colony-stimulating Factor	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
HARBS	High-affinity rolipram binding site	高親和性ロリプラム結合部位
HDF	Human dermal fibroblast	ヒト皮膚繊維芽細胞
HEK293	Human embryonic kidney 293 cells	ヒト胎児腎臓 293 細胞
HEKa	Human epidermal keratinocytes、 adult	ヒト成人表皮ケラチノサイト
HEKn	Human epidermal keratinocytes、 neonatal	ヒト新生児表皮ケラチノサイト
HEL	Hen egg lysozyme	ニワトリ卵白リゾチーム
hERG	Human ether-a-go-go related genes	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HIF	Hypoxia inducible factor	低酸素誘導因子
HLA-DR	Human leukocyte antigen DR	ヒト白血球抗原-DR
HPBMC	Human peripheral blood mononuclear cells	ヒト末梢血単核球細胞
hPDC	Human plasmacytoid dendritic cells	ヒト形質細胞様樹状細胞
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells	ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC_{50}	Concentration of drug producing 40% inhibition	40%阻害濃度
IC_{50}	Concentration of drug producing 50% inhibition	50%阻害濃度
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1	細胞間接着分子-1
IFN	Interferon	インターフェロン

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
IgE	Immunoglobulin E	イムノグロブリン E
IKr	Ikr potassium channel current	カリウム電流
IL	Interleukin	インターロイキン
IL-6R	Interleukin-6 receptor	インターロイキン-6 受容体
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	誘導型一酸化窒素合成酵素
IP	Intraperitoneally	腹腔内
IP-10	Interferon-gamma inducible protein-10	インターフェロン-γ 誘導タンパク質-10
IRF7	Interferon regulatory factor 7	インターフェロン調節因子 7
IV	Intravenous	静脈内
LPMC	Lamina propria mononuclear cells	粘膜固有層単核細胞
LPS	Lipopolysaccharide	リポ多糖
LTB4	Leukotriene B_4	ロイコトリエン B4
LY6E	Lymphocyte antigen 6E	リンパ球抗原 6 複合体ローカス E
mAb	Monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MCP-1	Monocyte chemosttractant protein-1	単球遊走因子-1
MEK	Mouse epidermal keratinocytes	マウス表皮ケラチノサイト
MIG	Monokine induced by interferon-gamma	インターフェロン-γ 誘導モノカイン
MIP	Macrophage inflammatory protein	マクロファージ炎症性タンパク質
MMP	Matrix metalloproteinase	マトリックスメタロプロテアーゼ
MRP	Myeloid related protein	ミエロイド関連タンパク質
MTX	Methotrexate	メトトレキサート
MxA	Myxovirus resistance gene A	ミクソウイルス耐性遺伝子 A
NF-κB	Nuclear factor-kappa B	核内因子-κB
NHLF	Normal human lung fibroblasts	正常ヒト肺線維芽細胞
OASL	2'-5'-Oligoadenylate synthetase-like protein	2', 5'-オリゴアデニル酸合成酵素様タンパク質
OPG	Osteoprotegerin	オステオプロテゲリン
OVA	Ovalbumin	卵白アルブミン
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1	プラスミノーゲン活性化抑制因子-1
pDC	Plasmacytoid dendritic cells	形質細胞様樹状細胞
PDE	Phosphodiesterase	ホスホジエステラーゼ
PGE2	Prostaglandin E2	プロスタグランジン E2
PHA	Plant hemagglutinin	植物性血球凝集素
PKA	Protein kinase A	プロテインキナーゼ A
PO	Orally	経口
PRED	Prednisilone	プレドニゾロン
QD	Quaque die	1 日 1 回
RA	Rheumatoid arthritis	関節リウマチ
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa B	核内因子 κB 活性化受容体因子
RANKL	Ligand for receptor activator of nuclear factor kappa B	核内因子 κB 活性化受容体因子リガンド
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted	インターロイキン-8 スーパーファミリーに属するサイトカインの一種
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
SCID	Severe combined immunodeficiency	重症複合免疫不全
SEB	Staphylococcal enterotoxin B	ブドウ球菌エンテロトキシン B
SOD1	Superoxide dismutase1	スーパーオキシドジスムターゼ 1
sRANKL	Soluble ligand for receptor activator of nuclear factor kappa B	可溶性核内因子 κB 活性化受容体リガンド
TGF-β1	Transforming growth factor-beta1	トランスフォーミング増殖因子-β1

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
Th1	Helper T cell type 1	1 型ヘルパーT 細胞
Th2	Helper T cell type 2	2 型ヘルパーT 細胞
Th17	Helper T cell type 17	17 型ヘルパーT 細胞
TLR9	Toll-like receptor 9	Toll 様受容体 9
TNBS	2, 4, 6-Trinitrobenzenesulfonic acid	2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha	腫瘍壊死因子-α
UC	Ulcerative colitis	潰瘍性大腸炎
UVB	Ultraviolet B	B 領域紫外線
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1	血管細胞接着分子-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子
WBC	White blood cell	白血球

1. まとめ

尋常性乾癬及び関節症性乾癬は慢性炎症性疾患であり、乾癬患者としては世界で 1 億 2000 万人以上、国内では 43 万人が罹患していると報告されている（久保田, 2013）。海外では、これら乾癬患者の 10%～30%が関節症性乾癬を発現し、いずれも長期の治療が必要とされることが報告されている（Gottlieb, 2008、Gladman, 2005、Chandran, 2010）。国内では乾癬患者の 5%～7%に関節症性乾癬が発現するとされている（難病情報センター, 2014）。これらの疾患では、樹状細胞（DC）、単球、マクロファージ、好中球、T 細胞、B 細胞、ケラチノサイト、軟骨細胞、滑膜細胞において複数の炎症性及び抗炎症性メディエーターの調節不全が認められている（Lowes, 2007、Fuentes-Duculan, 2010）。ホスホジエステラーゼタイプ 4（PDE4）酵素は環状アデノシン 1 リン酸（cAMP）の選択的な加水分解酵素である（Burnouf, 2002）。PDE4 は上記のような免疫を担当する細胞に存在する細胞内酵素であり、炎症性サイトカインの産生を促進している。一方、cAMP は腫瘍壊死因子-α（TNF-α）、インターロイキン（IL）-7、IL-23 といった炎症性サイトカインの産生を抑制し、逆に抗炎症性サイトカインである IL-10 等の産生を促進させる。尋常性乾癬や関節症性乾癬等の慢性炎症では、患部の免疫細胞内に存在する PDE4 が免疫の調節に重要な役割を担っており、炎症性サイトカインの過剰生産を促進しているとされる（Nestle FO, 2009）。

アプレミラストは、尋常性乾癬や関節症性乾癬の患部免疫細胞の炎症性サイトカイン産生を促進する PDE4 を選択的に阻害する新規経口投与治療薬であり、PDE4 の阻害により細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、プロテインキナーゼ A（PKA）を活性化し、転写因子ファミリーの環状アデノシン 1 リン酸応答配列結合タンパク質／活性化転写因子-1（CREB/ATF-1）のリン酸化・活性化をもたらす。また、PKA を活性化することにより、核内因子-κB（NF-κB）の転写活性を抑制する。その結果、誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）、TNF-α、IL-17 及び IL-23 といった炎症性メディエーターの産生を抑制し、IL-10 のような抗炎症性サイトカインの産生を亢進させる。このような広範囲な炎症性及び抗炎症性メディエーターの調整作用により変化が生じ（Houslay, 2005、Baumer, 2007、Takahashi, 2002）、尋常性乾癬及び関節症性乾癬の皮膚や関節での炎症症状が改善に導かれると考えられる。このように、アプレミラストは、単一のメディエーターを標的とするものではなく、炎症性及び抗炎症性シグナルのカスケード上流の免疫バランスを回復することに重点を置いた、尋常性乾癬や関節症性乾癬に対する安全性の高い新たな治療薬となりうると考えられた。

効力を裏付ける試験

アプレミラストの PDE4 阻害作用について in vitro の系で試験し、本剤が選択的な PDE4 阻害剤であることを確認した。また、細胞レベルの試験において、ヒト末梢血単核球細胞（HPBMC）、ヒト形質細胞様樹状細胞（hPDC）、ヒト新生児表皮ケラチノサイト（HEKn）、ヒト粘膜固有層単核細胞（LPMC）、ヒト全血、初代培養マウス表皮ケラチノサイト（MEK）といった一連の細胞を用いた実験において、炎症性サイトカインである TNF-α 産生を阻害した。HPBMC では、アプレミラストは抗炎症性サイトカインである IL-10 産生を増大させる一方で、TNF-α、インターフェロン（IFN）-γ、IL-12A 及び IL-23A といった炎症性サイトカインの遺伝子発現を阻害した。また、アプレミラストは自己免疫疾患の病態に関与する形質細胞様樹状細胞（pDC）において、1 型インターフェロンである IFN-α の産生を阻害した。

アプレミラストは初代培養ヒト T 細胞由来の 1 型ヘルパーT 細胞（Th1）産生サイトカインである顆粒球単球コロニー刺激因子（GM-CSF）、IFN-γ、IL-2、インターロイキン-8 スーパーファミリーに属するサイトカインの一種（RANTES）、TNF-α、及び 2 型ヘルパーT 細胞（Th2）産生サイトカインである IL-5、IL-10、IL-13 更に自己免疫疾患の病態形成に関与することが知られている 17 型ヘルパーT 細胞（Th17）から産生されるサイトカインである IL-17 の産生を阻害した。アプレミラストは複数のサイトカイン受容体及びサイトカイン遺伝子の発現を阻害した。また、アプレミラストは、IL-8 及びロイコトリエン B4（LTB4）の産生、接着分子 CD18 及び CD11b（Mac-1）の発現、並

びに IL-8 によって誘発される好中球の遊走を含む様々な炎症反応を阻害した。さらに、アプレミラストは臨床用量付近の濃度において、骨破壊に関与する破骨細胞形成を有意に阻害した。

アプレミラストの代謝物のうち、M7 及び M17 が in vitro で PDE4 活性及び TNF-α 産生に対して強い阻害作用を示した。代謝物 M7 及び M17 のそれらの薬理作用はアプレミラストよりも弱く、血漿中アプレミラスト濃度に対する割合も 1%未満と極めて少量であることから、代謝物 M7 及び M17 の薬力学的作用に対する明らかな寄与はほとんどないと考えられた。

In vivo での抗炎症作用については、急性炎症、リウマチ様炎症及び皮膚炎症の動物モデルを用いて薬理効果を検討した。マウスにエンドトキシンであるリポ多糖（LPS）を曝露させた急性炎症モデルでは、アプレミラストの経口投与によって血清中の TNF-α レベル上昇の著しい抑制（50%有効用量［ED_{50}］= 0.05 mg/kg）が認められ、アプレミラストの抗炎症作用が示唆された。抗コラーゲンモノクローナル抗体（mAb）・LPS 混合により誘発したリウマチ様の炎症モデルであるマウス関節炎モデルを用い、デキサメタゾン又はエタネルセプト（ETAN）と比較検討した。その結果、アプレミラスト（5 mg/kg、経口［PO］）はデキサメタゾン（1 mg/kg、PO）及び ETAN（5 及び 25 mg/kg、腹腔内［IP］）と同様に関節炎の活動性（足蹠浮腫）を有意に抑制した。また、ETAN（5 mg/kg、IP）と併用した場合のアプレミラスト（5 mg/kg、PO）の関節炎抑制効果は相加的であった。関節リウマチ（RA）患者由来のヒト滑膜細胞において、アプレミラストは TNF-α 産生を阻害し、コラーゲン誘発関節炎（CIA）モデルでは 5 及び 25 mg/kg の用量で、炎症症状の軽減とともに組織学的重症度も軽減した。また、コラーゲンで免疫したマウスから得た培養リンパ節細胞において、アプレミラストはコラーゲン又は抗 CD3 mAb 刺激による T 細胞増殖並びに TNF-α 及び IFN-γ 産生を阻害した。さらに、ラットカラゲニン誘発炎症／痛覚過敏モデルにおいて、アプレミラストは足蹠浮腫の有意な軽減とともに、機械刺激及び熱刺激のいずれに対しても、生物学的に意味のある疼痛閾値の上昇をもたらした。

ヒト皮膚又は乾癬ナチュラルキラー（NK）細胞誘発マウス異種移植乾癬モデルにおいては、アプレミラスト（2.5 mg/kg、PO、1 日 2 回［BID］）は乾癬様病変の重症度及び発現頻度を低下させ、表皮の肥厚及びケラチノサイトの増殖を抑え、移植皮膚片の TNF-α、ヒト白血球抗原-DR（HLA-DR）及び細胞間接着分子-1（ICAM-1）の発現を抑制した。

副次的薬理試験

催奇形性に関係するヒトセレブロン（CRBN）への結合能について試験した。サリドマイドが催奇形性を有することは良く知られているが、サリドマイドによる催奇形性は主に E3 ユビキチンリガーゼ基質補助受容体の CRBN を介して起こることが報告されている（Ito, 2010）。アプレミラストはサリドマイドと構造的に一部類似するため、CRBN への結合性を検討した。ヒト U266 MM 細胞抽出物中のヒト内因性 CRBN をアプレミラスト、CRBN 結合の陽性対照 CC-5013（レナリドミド）又は溶媒対照の 1%ジメチルスルホキシド（DMSO）と比較検討した。その結果、アプレミラストはヒト内因性 CRBN に結合しなかった。

催吐作用の可能性について薬物動態（PK）及び薬力学（PD）的作用の観点から検討した。PDE4 阻害剤の良く知られている薬理作用として催吐作用がある（Robichaud, 1999）。嘔吐を示すフェレットにアプレミラスト（0.1～30 mg/kg）を単回経口投与した。血漿中半減期は 3.8 時間であった。フェレットに投与後 1 時間でのアプレミラスト濃度は肺で最も高く、次に血漿中で、最も低値であったのは脳であった。3 mg/kg までの用量を投与したフェレットにおいて嘔吐症状の発現はみられず、10 mg/kg 投与群では空吐はみられたが、実際の嘔吐はみられなかった。

非ホジキンリンパ腫 B 細胞株に対する増殖抑制作用について検討した。非ホジキンリンパ腫（Farage）細胞に対して、アプレミラスト（0～100 µmol/L）は弱い増殖抑制作用を示した。

2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）誘発マウス大腸炎モデルに対する改善作用を検討した。アプレミラストは体重減少を用量依存的に軽減した。2.5 mg/kg の用量では下痢が減少し、遠位

大腸の粘膜損傷の重症度が陽性対照の 5-アミノサリチル酸（5-ASA、炎症性腸疾患の標準的治療法での第一選択治療薬）と同程度まで軽減した。

肺の炎症モデル及び喘息モデルに対する作用について、ラット肺好中球増多症モデルではアプレミラストを経口及び気管内投与し、無麻酔フェレットにおいてはアプレミラストを経口投与して検討した。アプレミラストはこれらのモデル動物において肺の炎症を抑制した。メタコリン誘発喘息マウスモデルにおいては、アプレミラスト（PO 投与）は卵白アルブミン（OVA）で誘発した気道過敏性（AHR）を有意に抑制した。また、ex vivo 試験ではモルモット気管平滑筋弛緩能試験において、モルモット気管を 8%～64%弛緩させた。アレルゲン誘発気管支痙攣のモルモットモデルでは、OVA 誘発気管支痙攣をわずかに低下させる傾向を示したが、用量反応性は認められなかった。

マウス痛風様炎症及び腹膜炎モデルに対する作用を検討した。アプレミラスト（PO 投与）は空気嚢痛風様炎症モデルにおいて有意な抗炎症効果を示さず、誘発した痛風様腹膜炎にも作用しなかったが、高用量の 12.5 mg/kg の用量では TNF-α 及びマクロファージ炎症性タンパク質（MIP）-1α の低下傾向を示した。

皮膚ループス細胞モデルに対する作用について評価した。各種皮膚ループス細胞モデルにおいて、IFN-α 及び TNF-α タンパク質産生を有意に阻害した。また、IFN 誘導性ループス遺伝子の発現を有意に阻害した。1 型 IFN による遺伝子及びタンパク質発現に対するアプレミラストの薬理作用により 1 型 IFN を抑制することが示唆されたことより、皮膚エリテマトーデスに対して有効である可能性が示唆された。

マウス筋萎縮性側索硬化症（ALS）モデルに対する作用について評価した。アプレミラストを混餌投与した結果、アプレミラスト高用量群では、雌雄マウスともに生存日数のわずかな延長（2～4 日、$p = 0.82$）が、また、低用量群では、雌では生存日数が 13.8 日、雄では 8 日延長した。

ラット神経因性疼痛 Bennett モデルでの鎮痛作用について評価した。アプレミラスト（PO 投与）は、疼痛緩和を示さなかった。

安全性薬理試験

アプレミラストの安全性薬理試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用試験として実施し、中枢神経系、呼吸器系、心血管系及び消化器系に対する作用を評価した。

マウス中枢神経系及び行動への影響

マウスにアプレミラストをゾンデを用いて強制単回 PO 投与した。Irwin の変法による評価では、500 mg/kg 投与群では行動上の変化又は生理的変化は認められなかった。1000 mg/kg 投与群では、軽度の流涙や眼瞼下垂が認められた。2000 mg/kg 投与群では、Day 2 に 1/6 例が死亡した。

心血管系及び呼吸器系に対する作用

麻酔ビーグル犬にアプレミラストを静脈内（IV）投与した。0.5 mg/kg では心室収縮能の指標である左室圧一次微分最大値（dP/dt_{max}）にわずかな増加（9%）が認められたことを除いて、脈圧（収縮期血圧 拡張期血圧）や他の心機能パラメータに明らかな影響はみられなかった。高用量群では用量に相関した心拍数及び dP/dt_{max} の中等度増加が認められた。また、これらの群では心拍間隔（RR 間隔）の短縮がみられたが、心拍補正 QT 間隔（QTc）に関してはすべての投与群で影響は認められなかった。呼吸機能に関するパラメータでは、高用量群で最大吸気流量の軽微な上昇がみられたのみで、いずれの投与群においても呼吸深度や呼吸数に影響は認められなかった。また、電位固定したヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）を恒常的に発現させたヒト胎児由来腎臓 293 細胞（HEK293）での K^+イオン電流に対する影響について評価した結果、50%阻害濃度（IC_{50}）は 184.2 μmol/L と推定され、局面型乾癬患者にアプレミラストの推定ヒト最大治療用量である 30 mg（BID）を投与した場合の最高血漿中濃度（C_{max}）の 127 倍であった。

マウスの胃腸管輸送能に対する作用

マウスにアプレミラストを 10～1000 mg/kg の用量で単回 PO 投与したが、消化管運動への影響はみられなかった。

薬力学的薬物相互作用

ヒト白血球（WBC）をプロスタグランジン E2（PGE2）とアプレミラストで併用処理したところ、HPBMC 及び好中球内の cAMP 濃度が用量依存的に、かつ相乗的に増加した。また、正常ヒト肺線維芽細胞（NHLF）をフォルスコリン（1 及び 10 nmol/L）とアプレミラストで併用処理することにより、TNF-α 刺激性 GM-CSF 産生を用量依存的かつ相乗的に阻害した。

TNF 刺激ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）では、アプレミラストと PGE2 を併用した場合に TNF-α に誘発される E-セレクチン及び血管細胞接着分子-1（VCAM-1）の発現が有意に阻害された。このことより、PGE2 存在下でのアプレミラストの抗血管新生作用及び抗炎症作用の作用機序として E-セレクチン及び VCAM-1 阻害が関与する可能性が示唆された。マウス抗コラーゲン mAb カクテル・LPS 誘発実験的関節炎の複合モデルに ETAN（5 mg/kg、IP）とアプレミラスト（5 mg/kg、PO）を併用した時、相加的かつ溶媒対照と比較して有意（$p<0.01$）な関節炎抑制効果が認められた。一方病理組織学的評価では、アプレミラストによる関節炎パラメータの抑制は有意ではなかった。

DBA/1 マウス CIA モデルにおいて、インドメタシン（3 mg/kg、PO）又はメトトレキサート（MTX）（1 mg/kg、IP）と併用したときのアプレミラスト（5 mg/kg、PO）の作用を評価したが、インドメタシン又は MTX の単独投与群とアプレミラストとの併用投与群の間で関節炎スコアに有意差はみられなかった。

ヒト抗 CD3 mAb で刺激した T 細胞及びブドウ球菌エンテロトキシン B（SEB）処理 HPBMC を用いて、関節リウマチや尋常性乾癬に関与するサイトカインに対するアプレミラスト（0.4～1600 ng/mL）の阻害作用をシクロスポリン A（CsA）、ETAN 又は MTX 単独とアプレミラストとの併用により評価した。その結果、アプレミラストは CsA との併用により IL-10、IP-10、MIP-1α、MIP-1β 及び TNF-α 産生を相乗的に阻害した。また、ETAN との併用により IL-10、IP-10 及び MIP-1α 産生を相乗的に阻害し、MIP-1β 及び TNF-α 産生については阻害作用がみられたが、相加的又は相乗的な阻害作用には至らなかった。さらに、MTX との併用では、これら 5 種類のサイトカインに対して、相加的又は相乗的な阻害作用はみられなかった。

海外では既に尋常性乾癬の治療薬として承認されている MTX との併用効果を、マウス異種移植乾癬モデルにより評価した。MTX 単独 1 mg/kg の用量では、乾癬様所見の消失はみられなかったが、1 mg/kg の MTX とアプレミラスト（BID、5 mg/kg/day）を併用した場合には、マウス 5 例中 2 例において中等度の治療効果がみられた。

関節リウマチ由来滑膜線維芽細胞の IL-1β、IL-6 及び IL-6R 刺激による IL-7 産生について、アプレミラストは ETAN 又は MTX との併用処理によりアプレミラスト単独処理の場合よりも更に強力に IL-7 産生を阻害した。対照的に、アプレミラストをプレドニゾロン（PRED）と併用処理した場合にはアプレミラスト単独処理の場合よりも IL-7 産生が促進された。

考察及び結論

アプレミラストの細胞レベルでのサイトカイン調節作用、in vivo での各種動物モデルでの抗炎症作用、異種移植片マウスモデルでの皮膚症状抑制作用の結果から、アプレミラストは尋常性乾癬及び関節症性乾癬患者に有益な治療法になることが示唆された。

2. 効力を裏付ける試験

2.1. アプレミラストの in vitro 薬理活性

2.1.1. In vitro 試験系

尋常性乾癬や関節症性乾癬等の慢性炎症疾患に関連することが報告されている PDE4 に対するアプレミラストの選択的な阻害作用、cAMP 産生増大、各種サイトカイン産生に及ぼす影響について、PDE4 酵素アッセイ系で評価した。また、各種ホスホジエステラーゼ（PDE）、受容体、酵素、キナーゼに対するアプレミラストの影響について、その他のアッセイ系を用いて評価した。

2.1.1.1. ホスホジエステラーゼタイプ 4 阻害作用

［報告書番号 5042-107、添付資料 4.2.1.1.1、評価資料］

［報告書番号 Celgene-PDE-0801、添付資料 4.2.1.1.2、評価資料］

［報告書番号 Celgene-PDE4-1001、添付資料 4.2.1.1.3、評価資料］

1）アプレミラストの PDE 活性（[^{3}H]-cAMP の加水分解）に対する阻害作用を、PDE アイソザイム（U937 ヒト単球由来精製 PDE4、ウシ PDE1、ヒト血小板由来 PDE2、PDE3、PDE5、ウシ網膜桿体由来 PDE6、Hut78 ヒト T 細胞由来 PDE7 及び HUVEC 由来 PDE11）を用いて評価した（Muller, 1998）。アプレミラストの PDE4 特異性については、それぞれの PDE に対する IC_{50} を比較することにより評価した。高親和性ロリプラム結合部位（HARBS）競合結合アッセイは、[^{3}H]-*R*-(-)-ロリプラムを放射性リガンドとしてラット脳細胞質由来 PDE4 を用いて実施した。

結果：PDE4 酵素アッセイの結果、アプレミラストはヒト単球性細胞 U937 から単離した PDE4 に対し、その IC_{50} は 74 nmol/L であり、強力な阻害活性を示し、その阻害活性は選択的であった。アプレミラストの PDE4 に対する阻害の特異性を、10 µmol/L 濃度のアプレミラストを用いて、PDE1、PDE2、PDE3、PDE5、PDE6、PDE7 及び PDE11 の各種 PDE に対する阻害を比較することにより評価した。その結果、アプレミラストは PDE4 を他の PDE よりも約 279～40000 倍選択的に阻害した。アプレミラストは光学的に純粋な *S*-エナンチオマーであり、その PDE4 阻害作用（IC_{50} = 74 nmol/L、Table 1）は、*R*-エナンチオマーである CC-10007（IC_{50} = 611 nmol/L）の約 8 倍強力であった。また、PDE4 阻害剤の HARBS への結合とウサギ胃底腺での胃酸産生の増加とは関連することが報告されているが（Barnette, 1995）、アプレミラストは、ラット脳由来 PDE4 の HARBS に結合した（Table 1、4.2.1.1.1 項）。

2）アプレミラストの PDE 酵素特異性を更に評価する目的で、ヒトの各種 PDE 分子種に対する阻害活性を、蛍光標識した cAMP を基質として用い評価した（IMAP™ TR FRET Screening Express with Progressive Binding Kit を使用）。

結果 1：遺伝子組換えヒト PDE1A、PDE1C、PDE2A、PDE3A、PDE3B、PDE4A1A、PDE4B1、PDE4B2、PDE4C1、PDE4D2、PDE5A1、PDE7A、PDE7B、PDE8A1、PDE9A2、PDE10A1 及び PDE11A4 を用いて評価したが、アプレミラスト（10 µmol/L）は PDE4 分子種（PDE4A1A、PDE4B1、PDE4B2、PDE4C1、PDE4D2）に対して平均約 95%（範囲：91%～99%）の阻害を示した。一方、他の PDE に対しては、アプレミラストは有意な阻害活性を示さず、PDE4 に対するアプレミラストの特異的な阻害作用が確認された（Table 2、4.2.1.1.2 項）。

結果 2：遺伝子組換えヒト PDE4A1A、PDE4B1、PDE4B2、PDE4C1、PDE4D2、PDE4D3 及び PDE4D7 を用いて、アプレミラスト（0.001～10 µmol/L）の作用を評価したところ、IC_{50} 値は、それぞれ 14、43、27、118、33、28 及び 30 nmol/L であった（4.2.1.1.3 項）。

Table 1　アプレミラストの各種ホスホジエステラーゼに対する阻害活性及び選択性

PDE 阻害	アプレミラスト	PDE 選択性比	倍数差
PDE4 IC_{50}（U937 細胞由来、nmol/L）	74（34 ng/mL）	PDE4/PDE4	1
PDE1（10 µmol/L での阻害%）	23%	PDE1/PDE4	>500
PDE2（10 µmol/L での阻害%）	6%	PDE2/PDE4	>10000
PDE3（10 µmol/L での阻害%）	20%	PDE3/PDE4	>1200
PDE5（10 µmol/L での阻害%）	3%	PDE5/PDE4	>3000
PDE6（10 µmol/L での阻害%）	-6%	PDE6/PDE4	>40000
PDE7 IC_{50}（nmol/L）	20500（9400 ng/mL）	PDE7 IC_{50}/PDE4 IC_{50}	279
PDE11 IC_{50}（nmol/L）	> 100000（>46 µg/mL）	PDE11 IC_{50}/PDE4 IC_{50}	>1400
HARBS 結合 IC_{50}（nmol/L）	23（11 ng/mL）	-	-

HARBS = 高親和性ロリプラム結合部位、IC_{50} = 50%阻害濃度、PDE = ホスホジエステラーゼ
Source：4.2.1.1.1 項

Table 2　組換えヒトホスホジエステラーゼに対するアプレミラストの阻害活性

PDE	アプレミラストの阻害活性（10 µmol/L での阻害%）
1A	3
1C	5
2A	5
3A	4
3B	12
4A1A	96
4B1	96
4B2	99
4C1	91
4D2	92
5A1	0.2
7A	11
7B	8
8A1	7
9A2	0
10A1	13
11A4	6

PDE = ホスホジエステラーゼ
Source： 4.2.1.1.2 項

2.1.1.2. 各種酵素及び受容体に対する作用

［報告書番号 8611、添付資料 4.2.1.1.4、評価資料］

［報告書番号 CC-10004-ET-151、添付資料 4.2.1.1.5、評価資料］

［報告書番号 SSBK8217_23649、添付資料 4.2.1.1.6、評価資料］

1）以下の 68 種類の細胞表面受容体及び 17 種類の酵素に対するアプレミラスト（10 µmol/L）の作用を評価した（Table 3、4.2.1.1.4 項）。

結果：アプレミラストはいずれの受容体及び酵素に対しても有意な活性を示さなかった。一方、PDE4 に対しては 95%阻害し、L 型（ベラパミル）カルシウムチャネル受容体へのアゴニストの結合を 52%増加させた。

Table 3　試験した細胞表面受容体及び酵素

試験した細胞表面受容体及び酵素*			
A_1 *(h)*	D1 *(h)*	M （non-selective）	TRH
A_{2A} *(h)*	D2S *(h)*	NK1 *(h)*	V1a *(h)*
A_3 *(h)*	D3 *(h)*	NK2 *(h)*	V2 *(h)*
α_1 （non-selective）	D4.4 *(h)*	NK3 *(h)*	Ca^{2+} channel （L、 DHP site）
α_2 （non-selective）	ET_A *(h)*	Y （non-selective）	Ca^{2+} channel （L、 diltiazem site） （benzothiazepines）
β_1 *(h)*	ET_B *(h)*	N （neuronal） （α-BGTX-insensitive）	Ca^{2+} channel （L、 verapamil site） （phenylalkylamines）
β_2 *(h)*	GABA （non-selective）	Opiate （non-selective）	K^+ ATP channel
AT_1 *(h)*	AMPA	ORL_1 *(h)* （NOP）	K^+V channel
AT_2 *(h)*	Kainate	PCP	SK^+ Ca channel
BZD （central）	NMDA	P2X	Na^+ channel （site 2）
B_1 *(h)*	H_1 *(h)*	P2Y	Cl^- channel
B_2 *(h)*	H_2 *(h)*	5-HT （non-selective）	NE transporter *(h)*
CB_1 *(h)*	H_3	σ （non-selective）	DA transporter *(h)*
CB_2 *(h)*	I_1 （peripheral）	Glucocorticoid *(h)* （GR）	GABA transporter
CCK_A *(h)* （CCK_1）	I_2 （central）	Estrogen *(h)* （ER）	Choline transporter
CCK_B *(h)* （CCK_2）	LTD_4 *(h)*	Progesterone *(h)* （PR）	5-HT transporter *(h)*
CRF_1	MC_4 *(h)*	Androgen *(h)* （AR）	
Phosphodiesterase 1*	Adenylyl cyclase （basal） *	GABA transaminase*	ATPase （NA^+/K^+） *
Phosphodiesterase 2 *(h)* *	Guanylyl cyclase （basal） *	MAO-A *(h)*	
Phosphodiesterase 3 *(h)* *	Protei kinase C*	MAO-B *(h)*	
Phosphodiesterase 4 *(h)* *	Acetylcholine-esterase *(h)* *	Phenylethanolamine -N-methyl transferase*	
Phosphodiesterase 5 *(h)* *	Catechol O-methyl transferase*	Tyrosine hydroxylase*	

2）アプレミラストの Ca^{2+}チャネル（L 型、ベラパミル結合部位）に対する結合について、ラット大脳皮質及び放射性リガンドとして[^{3}H]-D888 を用いて評価した（4.2.1.1.5 項）。

結果：アプレミラスト（10 μmol/L）で認められた L 型（ベラパミル）カルシウムチャネルへのアゴニストの結合が 52%増加した結果は再現されず、偽陽性であると考えられた。

3）255 種類のキナーゼに対するアプレミラスト（10 μmol/L）の阻害プロファイルについて、Invitrogen Z' LYTE® and Adapta®Assays を用いて評価した。Z' LYTE®生化学アッセイは、酵素反応に共役する蛍光に基づく評価系を利用した（4.2.1.1.6 項）。

結果：アプレミラスト（10 μmol/L）は、試験した 255 種類のキナーゼに対して有意な阻害作用を示さなかった。

2.1.2. 炎症性反応に対する各種細胞系を用いた評価

各種細胞内での炎症性反応に対するアプレミラストの薬理作用を評価した。

2.1.2.1. アプレミラストの炎症性及び抗炎症性遺伝子発現に対する作用

［報告書番号 7600-011、添付資料 4.2.1.1.7、評価資料］

［報告書番号 5478-100、添付資料 4.2.1.1.8、参考資料］

［報告書番号 BSK-1073、添付資料 4.2.1.1.9、評価資料］

1）Jurkat T 細胞及び THP-1 単核細胞を用い、アプレミラスト（0.1、1、10 μmol/L）の PKA 基質 CREB のリン酸化及び NF-κB 核内移行に対する作用を Western ブロットにより評価した。環状アデノシン 1 リン酸応答配列（CRE）又は NF-κB によって駆動される転写活性は、CRE 又は NF-κB ルシフェラーゼプラスミドを導入した Jurkat T 細胞及び THP-1 単核細胞を用いて評価した。また、遺伝子発現に対する作用を評価するために、媒体又はアプレミラスト前処置したヒト単球及び HPBMC を LPS により刺激した。1 時間のアプレミラスト前処置の後、ヒト単球及び HPBMC を LPS で 6 及び 24 時間刺激し、遺伝子発現に対するアプレミラストの作用を評価するため、GeneChip®システムを用いてゲノムワイド遺伝子発現解析を実施した（4.2.1.1.7 項）。

結果：アプレミラストは、PKA-CREB 経路を活性化することにより炎症性及び抗炎症性遺伝子の発現を調節して、CRE による遺伝子転写の増大及び NF-κB による遺伝子転写の阻害をもたらした。また、ゲノムワイド遺伝子発現解析の結果から、アプレミラストによる遺伝子調節の標的が複数特定され、アプレミラストが、多くのケモカイン、ケモカイン受容体及び Th1 サイトカイン遺伝子の抑制作用や、抗炎症性因子サイトカインシグナル抑制因子 3、ケモカイン上皮性好中球活性化ペプチド 78、並びに細胞成長因子 EGF の一種であるアンフィレグリン及び骨形成タンパク質 6（BMP-6）をコードしている遺伝子を増加する作用を有することが確認された。

2）健康人の PBMC を用いアプレミラスト（0.00001～10 μmol/L）の潰瘍性大腸炎（UC）バイオマーカーに対する作用を評価した。IFN-γ、IP-10、インターフェロン-γ 誘導モノカイン（MIG）、MIP-2α、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-1、ミエロイド関連タンパク質（MRP）-14、及び TNF-α の 7 種のサイトカインの遺伝子発現及びタンパク質レベルを評価した。合わせて LPS 刺激及び抗 CD3 mAb 刺激 HPBMC を用いて、IL-1β、IL-6、IL-8、IL-12p70、IFN-γ、IP-10、単球遊走因子-1（MCP-1）及び TNF-α の 8 種のサイトカインに対する作用も評価した（Schafer, 2010、4.2.1.1.8 項）。また、ヒト由来の初代培養細胞（正常細胞）をベースにした様々な疾患モデル（BioMAP システム）を用いて、自己免疫疾患と関連性の高い各種細胞系でのアプレミラスト（0.01～10 μmol/L）の作用を評価した（4.2.1.1.9 項）。

結果：アプレミラストは IFN-γ、IFN-γ 誘導タンパク質 10（IP-10）、MIG、MMP-1 及び MRP-14 の遺伝子発現を阻害したが、MIP-2α の遺伝子発現には影響しなかった。また、アプレミラストは IFN-γ、IP-10、MIG 及び TNF-α の産生を阻害したが、MMP-1 産生については増加させた（50%有効濃度［EC_{50}］= 0.017 μmol/L）。ただし、MMP-1 に対する作用は 2 相性であり、0.1～1.0 μmol/L の濃度では産生は増加させたが、10 μmol/L では阻害した（Table 4）。

Table 4　定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）法による各種サイトカインの遺伝子発現及びエンザイムイムノアッセイ（ELISA）法によるタンパク質発現の測定結果

	qRT-PCR 法による遺伝子の発現						
化合物	IFN-γ	IP-10	MIG	MIP-2α	MMP-1	MRP-14	TNF-α
アプレミラスト（10 μmol/L）	↓	↓	↓	↔	↓	↓	↓

	ELISA IC_{50}（μmol/L）によるタンパク質の発現				
	IFN-γ	IP-10	MIG	MMP-1（EC_{50}）	TNF-α
アプレミラスト	0.013	0.0099	0.028	0.017	0.15

↓=低下、↔=作用なし、EC_{50}=50%有効濃度、ELISA=エンザイムイムノアッセイ、IC_{50}=50%阻害濃度、IFN-γ=インターフェロン-γ、IP-10=IFN-γ誘導タンパク質-10、MIG=インターフェロン-γ誘導モノカイン、MIP=マクロファージ炎症性タンパク質、MMP=マトリックスメタロプロテアーゼ、MRP=ミエロイド関連タンパク質、qRT-PCR=定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応、TNF-α=腫瘍壊死因子-α
Source：4.2.1.1.8 項

2.1.2.2. 炎症性サイトカインに対する作用

［報告書番号 5042-107、添付資料 4.2.1.1.1、評価資料］

［報告書番号 5424-11、添付資料 4.2.1.1.10、評価資料］

［報告書番号 7600-043、添付資料 4.2.1.1.11、評価資料］

1）HPBMC を用い LPS（100 ng/mL）刺激による TNF-α、IL-10、IL-12 産生に対するアプレミラスト（0.001～100 μmol/L）の抑制作用を評価した。また、IL-1（50 ng/mL）刺激による TNF-α 産生に対する抑制作用及び CD4 陽性 Th の抗 CD3 及び抗 CD28 抗体刺激による IL-5 産生に対する抑制作用、HPBMC を用いた SEB 誘発 IL-2 及び IFN-γ 産生に対する抑制作用、さらに、*N*-ホルミル-メチオニン-ロイシン-フェニルアラニン（fMLP）誘発 LTB4 産生、CD18 及び CD11b 発現、内皮細胞への接着、ザイモサン誘発 IL-8 産生を含む好中球の様々な反応についても評価した（4.2.1.1.1 項）。

結果：大腸菌（Escherichia coli）等のグラム陰性菌が産生するエンドトキシンである LPS は、TNF-α 等の多くの炎症性サイトカインを産生させる。アプレミラストは T 細胞活性化、及び HPBMC（IC_{50} = 0.077 μmol/L）と全血（IC_{50} = 0.294 μmol/L）での LPS 誘発性の TNF-α 産生を効果的に阻害した（Table 5）。このとき、アプレミラストは LPS 誘発による IL-12 産生を阻害し、逆に IL-10 産生を促進させた。さらに、アプレミラストはヒト末梢血から単離したヘルパー（CD4+）T 細胞での抗 CD3/CD28 mAb 誘発性 IL-5 産生を阻害した（Table 5）。炎症性疾患の過程においては、TNF-α 産生は多くの場合、細菌由来 LPS ではなくサイトカイン IL-1β によって誘発されるが、アプレミラストは HPBMC での IL-1β 誘発性 TNF-α 産生を阻害した。

2）LPS 刺激した HPBMC を用いアプレミラストの種々のサイトカイン産生に対する抑制作用を評価した。マルチプレックスサイトメトリービーズアッセイ（Luminex®）によってアプレミラスト（0.0001～100 μmol/L）の各種のサイトカイン及びケモカイン産生に対する作用を評価した（4.2.1.1.10 項）。

結果：アプレミラストは TNF-α、IL-12、GM-CSF、MIP-1α 及び MCP-1 の産生を阻害するが、IL-1β、IL-8 及び RANTES の産生は阻害しない（IC_{50}>100 μmol/L）ことが示された。一方、アプレミラストは IL-6 及び IL-10 の産生を増加させた。

3）健康人の全血を用い、アプレミラスト（0.5 及び 1.5 μmol/L）の LPS 刺激後のサイトカイン及びケモカイン産生に対する抑制作用を TruCultureTM システムを用いて評価した。各種サイトカイン及びケモカイン阻害作用はマルチプレックス・ビーズアッセイ（Luminex®）によって評価した。

結果：アプレミラストは 0.5 及び 1.5 μmol/L の濃度で、LPS で刺激したヒト全血での TNF-α、IL-12/IL-23 p40、IP-10 及び MCP-1 産生に対して有意な阻害作用を示し（$p<0.001$）、1.5 μmol/L では IL-23 p19 及び総 IL-23 産生に対しても有意な阻害作用を示した（$p<0.001$）。本測定系において、全血の IL-10 産生に対する作用はみられなかった。また、IFN-γ、IL-12 p70、IL-17A 及び IL-22 は定量限界未満であった。本測定系において IL-12 p70 の定量が不可能であったことから、本測定系で発現した IL-12/IL-23 p40 は主に IL-23 p19 複合体として存在することが示唆された（4.2.1.1.11 項）。

2.1.2.3. ホスホジエステラーゼ阻害に対する反応の動物種間比較

［報告書番号 5265-117、添付資料 4.2.1.1.12、評価資料］

ヒト、ラット、マウス及びサルの LPS で刺激した全血を用い、PDE4 阻害剤であるアプレミラスト、シロミラスト及びロフルミラスト（各 0.01～10 μmol/L）の IL-6 産生に対する作用をエンザイムイムノアッセイ（ELISA）法により評価した。

結果：これらの阻害剤は、マウス及びラット全血の LPS 誘導 IL-6 産生を増加（マウスで 3～5 倍、ラットで 2～3 倍）させたのに対し、サル及びヒトの全血ではこのような作用はみられなかった。アプレミラスト、シロミラスト及びロフルミラストは、本質的にヒトの IL-6 産生に対する作用を示さず、サルの IL-6 産生に対する阻害は部分的（最大 50%）であると考えられた。

2.1.2.4. TNF-α 産生に対する作用

［報告書番号 5638-35、添付資料 4.2.1.1.13、評価資料］

pDC は乾癬及び皮膚エリテマトーデスに関与する重要な抗原提示細胞である。Toll 様受容体 9（TLR9）を介してウイルス由来及びアポトーシス細胞由来のオリゴヌクレオチドに反応し、IFN-α 及び TNF-α を産生することで骨髄系 DC、T 細胞、ケラチノサイトを活性化することが知られている。そこで、HPBMC 及び hPDC をアプレミラスト（0.00001～10 μmol/L）で前処理した後、TLR9 アゴニストである CpG-A オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）2216（それぞれ 1 及び 10 μmol/L）で刺激することによって生じる IFN-α 及び TNF-α 産生に対する抑制作用を ELISA 法により評価した。

結果：アプレミラストは、HPBMC での CpG-A ODN 2216 誘発性 IFN-α 産生を IC_{50} 値 0.62 μmol/L で効率的に阻害し、また、TNF-α 産生を IC_{50} 値 0.12 μmol/L で阻害した。hPDC では、アプレミラストは CpG-A ODN 2216 誘発性 IFN-α 及び TNF-α 産生を IC_{50} 値 0.48 μmol/L（IFN-α）及び 0.27 μmol/L（TNF-α）で有効に阻害した。また、アプレミラストは、hPDC の TNF-α 産生を IC_{50} 値 0.50 μmol/L で効率的に阻害した。

2.1.2.5. 細胞増殖に対する作用

［報告書番号 BSK-1073、添付資料 4.2.1.1.9、評価資料］

［報告書番号 5299-083、添付資料 4.2.1.1.14、参考資料］

［報告書番号 5570-044、添付資料 4.2.1.1.15、評価資料］

1）NHLF をアプレミラスト（0.0001～100 μmol/L）存在下で 1 時間インキュベートした後、LPS（1 ng/mL）、TNF-α（10 ng/mL）又はトランスフォーミング増殖因子-β1（TGF-β1）（10 ng/mL）を 24 又は 48 時間添加し、さらに[^{3}H]-チミジンを 24 又は 48 時間取り込ませることにより、本薬の細胞増殖に対する抑制効果を評価した（4.2.1.1.14 項）。

結果：アプレミラストは、24 時間の[^{3}H]-チミジン取込み試験において NHLF に対する弱い抗増殖性作用を示した（LPS、TNF-α 又は TGF-β1 刺激条件下での IC_{50} 値>100 μmol/L）。48 時間の[^{3}H]-チミジン取込み試験では、アプレミラストの抗増殖作用が増強し、LPS、TNF-α 及び TGF-β1 刺激条件下での IC_{50} 値は、それぞれ 92、40 及び 52 μmol/L となった。

2）ヒト皮膚線維芽細胞（HDF）をアプレミラスト（0.00001～10 µmol/L）で 1 時間処理した後、IL-1β（1 ng/mL）、TNF-α（5 ng/mL）又は IFN-γ（20 ng/mL）刺激し、HDF の増殖抑制作用を評価した（4.2.1.1.15 項）。

結果：刺激した HDF の生存に対して、評価可能な抗増殖性作用を示さなかった（IC_{50} 値>10 µmol/L）。本薬の細胞増殖に対する作用は二相性で、0.1 µmol/L で増殖が 30%増大したが、10 µmol/L ではベースラインまで戻った。

3）プラスミノーゲン活性化抑制因子-1（PAI-1）は、線維芽細胞の増殖と関連している。HDF をアプレミラスト（0.00001～10 µmol/L）で処理し、ヒト組換え IL-1β（1 ng/mL）、ヒト組換え TNF-α（5 ng/mL）又はヒト組換え IFN-γ（20 ng/mL）で 24 時間刺激した時の PAI-1 産生に対するアプレミラストの作用を ELISA 法で評価した（4.2.1.1.15 項）。

結果：アプレミラスト（10 µmol/L）は弱い PAI-1 産生阻害作用（約 17%の阻害）を有することが示された。

2.1.2.6. IL-7 遺伝子発現に対する作用

［報告書番号 5673-140、添付資料 4.2.1.1.16、参考資料］

軟骨細胞及び滑膜細胞から産生された T 細胞調節サイトカイン IL-7 は、炎症性関節疾患（関節炎や骨の損傷等）に関与することが報告されており（Long, 2008）、特に、脊椎関節炎及び関節リウマチ患者では滑液中 IL-7 の mRNA 発現及びタンパク質レベルの上昇が認められている（Rihl, 2008）。滑液中 IL-7 の mRNA 発現及びタンパク質レベルの上昇について、初代培養正常軟骨細胞及びリウマチ滑膜線維芽細胞を用いアプレミラスト（0.1、1、10 µmol/L）の単独及び抗リウマチ薬との併用による作用を評価した。抗リウマチ薬は、MTX（400、1600 ng/mL）、ETAN（400、1600 ng/mL）及び PRED（300、600 及び 1600 ng/mL）を使用した。IL-7 遺伝子発現は上記 2 種類の細胞系の薬剤処置後の IL-1β、IL-6 及びインターロイキン-6 受容体（IL-6R）による刺激のありなしの条件下で評価した。滑膜組織のバイオマーカーである ICAM-1 及び αvβ3 インテグリンについても、細胞表面タンパク発現アッセイ法を用いて抑制作用を評価した。

結果：アプレミラストは、IL-1、IL-6 及び IL-6R で刺激した初代培養正常ヒト軟骨細胞での IL-7 遺伝子発現を用量依存的に有意に阻害した。その阻害作用は、MTX 及び ETAN よりも高かったが、PRED よりも弱かった。また、アプレミラストは滑膜組織のバイオマーカーである ICAM-1 及び αvβ3 インテグリンの発現に対して弱い抑制作用を示した。同様に、IL-1、IL-6 及び IL-6R で刺激した関節リウマチ滑膜由来の線維芽細胞においても、アプレミラストは IL-7 遺伝子発現を用量依存的に有意に阻害した。

2.1.2.7. 1 型、2 型、及び 17 型ヘルパーT 細胞免疫反応に関連する疾患に対する潜在的治療効果

［報告書番号 5042-107、添付資料 4.2.1.1.1、評価資料］

［報告書番号 5478-159、添付資料 4.2.1.1.17、評価資料］

1）黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）由来のスーパー抗原である SEB は、特定の T 細胞受容体（TCR）Vβ 領域を有する T 細胞に対する特異的な生理的刺激物質である。HPBMC を SEB で刺激したときに産生される IL-2 及び IFN-γ に対するアプレミラストの作用を評価した。

結果：アプレミラストは SEB 誘発性 IL-2 及び IFN-γ 産生を強く阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 134 ng/mL（291 nmol/L）及び 21 ng/mL（46 nmol/L）であった（Table 5、4.2.1.1.1 項）。

2）アプレミラスト（0.3～5000 nmol/L）の各種サイトカイン免疫調節活性に対する作用を、抗 CD3 mAb 刺激初代培養ヒト T 細胞を用い、各種サイトカインに対する産生阻害作用を評価した。

結果：アプレミラストは Th1 サイトカイン（GM-CSF、IFN-γ、IL-2、RANTES、TNF-α）と Th2 サイトカイン（IL-5、IL-10、IL-13）両者の産生を阻害し、同様に骨破壊を誘導する破骨細胞誘導性 T 細胞 Th17 が産生するサイトカインの、IL-17 の産生を阻害した。アプレミラストのこれら T 細胞由来サイトカイン産生に対する阻害の強さは、IL-5（IC_{50} = 0.03 µmol/L）> IL-17（IC_{50} = 0.09 µmol/L）> IL-10（IC_{50} = 0.19 µmol/L）> IL-13（IC_{50} = 0.28 µmol/L）> TNF-α（IC_{50} = 0.93 µmol/L）> GM-CSF（IC_{50} = 1.0 µmol/L）> IFN-γ（IC_{50} = 1.3 µmol/L）> IL-2（IC_{50} = 2.4 µmol/L）> RANTES（IC_{50} = 4.1 µmol/L）の順であった。これらの結果は、アプレミラストが Th1 サイトカイン産生よりも Th2 サイトカイン産生を強く阻害することを示している。健康被験者で報告（5.3.3.1.1 項）されている最高血漿中濃度（Day 7 の C_{max} = 420 ng/mL）において、理論的なアプレミラストのサイトカイン阻害の程度も評価した。その結果、アプレミラストは 420 ng/mL の濃度で、Th1 サイトカイン産生を 40%（IL-2、RANTES）～50%（TNF-α）の範囲で、Th2 サイトカイン産生を 65%（IL-13）～100%（IL-5）の範囲でそれぞれ阻害した。（Table 5、4.2.1.1.17 項）

2.1.2.8. 好中球 - 内皮細胞接着に対する作用

［報告書番号 5042-107、添付資料 4.2.1.1.1、評価資料］

1）好中球は炎症部位に速やかに動員される骨髄由来白血球である。fMLP は細菌由来のペプチドであり、好中球を活性化して、速やかな脱顆粒、遊走、内皮細胞への接着を誘導する。好中球の顆粒内容物には LTB4 が含まれており、これはアラキドン酸代謝の産物であるとともにそれ自体が好中球刺激物質であり、乾癬による炎症に対して重要な役割を演じていることが報告されている（Iversen, 1997）。好中球を fMLP で刺激したときの LTB4 産生に対するアプレミラストの作用を表した。また、fMLP で刺激したときの好中球での CD18 及び CD11b 発現に対する作用及び好中球の内皮細胞に対する接着に対する作用についても検討した。

結果：アプレミラストは fMLP で刺激した好中球での LTB4 産生を阻害した。また、走化性因子に刺激された好中球の接着は、ある程度 CD18/CD11b（Mac-1）発現によって仲介されることが報告されている（Derian, 1995）。アプレミラストは fMLP による CD18 及び CD11b（Mac-1）の発現をそれぞれ IC_{50} 値 179 ng/mL（390 nmol/L）及び 34 ng/mL（74 nmol/L）で阻害し、さらに、fMLP による好中球の内皮細胞への接着も IC_{50} 値 69 ng/mL（150 nmol/L）で阻害した（Table 5）。

2）出芽酵母由来のザイモサン A は、好中球表面に発現している接着分子である CD11b（Mac-1）に結合して、食作用、細胞の活性化、IL-8 産生の誘導を引き起こすことが報告されている（Au, 1998）。ザイモサン A により誘導される IL-8 産生に対するアプレミラストの作用を評価した。
結果：アプレミラストはザイモサンによる IL-8 産生も IC_{50} 値 43 ng/mL（94 nmol/L）で阻害した。
以上の結果から、アプレミラストは好中球-内皮細胞間の接着を妨害し、その結果、炎症性の傷害に対する細胞反応を抑制し、組織の損傷を軽減すると考えられた（Table 5）。

2.1.2.9. シクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）酵素機能に対する作用

［報告書番号 5197-130、添付資料 4.2.1.1.18、参考資料］

［報告書番号 5299-148、添付資料 4.2.1.1.19、参考資料］

1）PDE4 阻害剤は HPBMC の PGE2 産生を増加させることが示されており（Banner, 1999）、その効果には COX-2 プロモーター内の CRE の活性化が関与している可能性が考えられている（Schroer, 2002）。LPS 又は植物性血球凝集素（PHA）で刺激した PBMC を用い COX-2 タンパク質発現に対するアプレミラスト（0.001～100 µmol/L）の産生阻害作用を Western ブロットにより評価した。また、PGE2 産生への影響を ELISA 法により評価した。

結果：LPS 又は PHA で刺激した HPBMC 内の COX-2 及び PGE2 産生を、アプレミラストは 50%～100%増加させた（Table 5、4.2.1.1.18 項）。

2）次に、HUVEC 又は血小板をそれぞれ血小板又はカルシウムイオノフォア A23187 で刺激した時のプロスタサイクリン及びトロンボキサン産生へのアプレミラストの影響を評価した。

結果：アプレミラストは HUVEC／血小板共培養系又はカルシウムイオノフォア刺激血小板でのプロスタサイクリン及びトロンボキサン産生には影響しなかった。この結果から、アプレミラストは、血栓形成に関与しているプロスタサイクリン及びトロンボキサンの産生には効果を示さないことが示された。（4.2.1.1.19 項）。

Table 5　アプレミラストの細胞での薬理作用

細胞系での作用	**IC_{50}（nmol/L）**	**IC_{50}（ng/mL）**
LPS 誘発性 HPBMC TNF-α 産生阻害	77	35
LPS 誘発性ヒト全血 TNF-α 産生阻害	294	135
LPS 誘発性 HPBMC IL-12 産生阻害	140	64
LPS 誘発性 HPBMC IL-10 産生誘導	EC_{50} = 2300	EC_{50} = 1100
ヒトヘルパー（CD4+）T 細胞 IL-5 産生阻害	890	410
IL-1β 誘発性 HPBMC TNF-α 産生阻害	83	38
SEB 誘発性 HPBMC IL-2 産生阻害	291	134
SEB 誘発性 HPBMC IFN-γ 産生阻害	46	21
fMLP 誘発性好中球 LTB4 産生阻害	2.48	1.14
fMLP 誘発性好中球 CD18 発現抑制	390	179
fMLP 誘発性好中球 CD11b 発現抑制	74	34
fMLP 誘発性好中球 HUVEC 接着抑制	150	69
ザイモサン誘発性好中球 IL-8 産生阻害	94	43
NHLF での TNF-α 刺激 GM-CSF 産生阻害	120	55
LPS 誘導 HPBMC からのマルチプレックスサイトカイン分析	**IC_{50}（nmol/L）**	**IC_{50}（ng/mL）**
TNF-α 産生阻害	110	51
IL-1β 産生阻害	> 100000	> 46000
IL-8 産生阻害	> 100000	> 46000
IL-12 産生阻害	120	55
GM-CSF 産生阻害	7800	3600
MIP-1α 産生阻害	440	200
MCP-1 産生阻害	1300	600
RANTES 産生阻害	> 100000	> 46000
IL-6 産生誘導	EC_{50} = 11000	EC_{50} = 5100
IL-10 産生誘導	EC_{50} = 80	EC_{50} = 37
抗 CD3 mAb 刺激初代培養ヒト T 細胞からのマルチプレックスサイトカイン分析	**IC_{50}（nmol/L）**	**IC_{50}（ng/mL）**
IL-5 産生阻害	30	14
IL-17 産生阻害	90	41
IL-10 産生阻害	190	88
IL-13 産生阻害	280	130
TNF-α 産生阻害	930	430
GM-CSF 産生阻害	1000	470
酵素及び細胞に対する阻害作用	**IC_{50}（nmol/L）**	**IC_{50}（ng/mL）**
IFN-γ 産生阻害	1300	580
IL-2 産生阻害	2400	1100
RANTES 産生阻害	4100	1900

Table 5　アプレミラストの細胞での薬理作用（つづき）

cAMP 及び PGE2 増加に対する作用	EC（nmol/L）	EC（ng/mL）
PGE2 誘発性 HPBMC での cAMP 増加	EC_{50} = 1510	EC_{50} = 695
PGE2 誘発性好中球での cAMP 増加	EC_{50} = 4570	EC_{50} = 2100
LPS 誘発性 HPBMC での PGE2 増加	EC_{150} = 85	EC_{150} = 39
PHA 誘発性 HPBMC での PGE2 増加	EC_{200} = 85	EC_{200} = 39
一酸化窒素及び E-セレクチン産生に対する阻害作用	10 μmol/L での阻害%	
IL-1β 誘発性 HUVEC 一酸化窒素産生阻害	87%	
TNF-α 誘発性 HUVEC E-セレクチン産生阻害	PGE2/アプレミラスト併用で 25%	

cAMP = 環状アデノシン 1 リン酸、EC_{50} = 50%有効濃度、$EC_{150\ (200)}$ = 150%（200%）有効濃度、fMLP = *N*-ホルミル-メチオニン-ロイシン-フェニルアラニン、GM-CSF = 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、HPBMC = ヒト末梢血単核球細胞、HUVEC = ヒト臍帯静脈内皮細胞、IC_{50} = 50%阻害濃度、IFN = インターフェロン、IL = インターロイキン、LPS = リポ多糖、LTB4=ロイコトリエン B4、mAb = モノクローナル抗体、MCP-1 = 単球遊走因子-1、MIP = マクロファージ炎症性タンパク質、NHLF = 正常ヒト肺線維芽細胞、PGE2 = プロスタグランジン E2、PHA = 植物性血球凝集素、RANTES =インターロイキン-8 スーパーファミリーに属するサイトカインの一種、SEB = ブドウ球菌エンテロトキシン B、TNF-α = 腫瘍壊死因子-α
Source：4.2.1.1.1 項、4.2.1.1.10 項、4.2.1.1.18 項、4.2.1.1.17 項、4.2.1.4.1 項、4.2.1.4.2 項

2.1.3. ヒト臍帯静脈内皮細胞でのアプレミラストの抗血管新生作用

［報告書番号 5042-107、添付資料 4.2.1.1.1、評価資料］

［報告書番号 5279-153、添付資料 4.2.1.1.20、参考資料］

［報告書番号 5127-132、添付資料 4.2.1.1.21、参考資料］

［報告書番号 5387-08、添付資料 4.2.1.1.22、参考資料］

［報告書番号 7645-001、添付資料 4.2.1.1.23、参考資料］

血管内皮細胞の遊走及び血管透過性亢進に加え、血管平滑筋細胞の遊走も PDE4 阻害剤によって阻止され、PDE4 酵素が血管新生プロセスに関与することが報告されている（Palmer, 1998、DeFouw, 2001、Netherton, 2005）。血管内皮増殖因子（VEGF）誘発性内皮細胞増殖も、PDE4 酵素活性に一部依存することが明らかにされている（Favot, 2004）。そこで、VEGF 誘発性 HUVEC 増殖及び細胞内シグナル伝達に対するアプレミラストの作用について評価した。

1）HUVEC 細胞を VEGF 又は塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）で刺激した後、アプレミラスト（0.001～100 μmol/L）で 72 時間処置し、細胞増殖への影響を[^{3}H]-チミジン取込みで評価した。HUVEC での VEGF 誘発セリンスレオニンキナーゼ Akt（Akt）リン酸化への影響についても評価した。

結果：アプレミラストは VEGF 誘発性 HUVEC 増殖を濃度依存的に阻害した（IC_{50} = 6.7 μmol/L）。一方、bFGF 誘発性 HUVEC 増殖には阻害作用を示さなかった。また、アプレミラスト（100 μmol/L）は Ser473 部位の Akt リン酸化に対して有意な阻害作用を示したが、Thr308 部位の Akt リン酸化に対しては阻害作用を示さなかった（4.2.1.1.20 項）。

2）ヒト臍帯血管からの発芽形成でのアプレミラスト（0.01～100 μmol/L）の抗血管新生作用を評価した。ヒト臍帯を本剤又は対照として 0.1% DMSO 及びフマギリン（0.1～100 μmol/L）を処置した。

結果：アプレミラストはヒト臍帯血管からの発芽を濃度依存的に阻害（IC_{50} = 0.14 μmol/L）した（4.2.1.1.21 項）。

3）HUVEC 細胞を IL-1β で刺激したときの一酸化窒素産生に対するアプレミラストの作用を評価した。

結果：アプレミラスト（10 µmol/L、4.6 µg/mL）は、IL-1β で 18 時間刺激した HUVEC 細胞での IL-1β 誘発性一酸化窒素産生を 87%阻害した。このことから、アプレミラストが内皮細胞での一酸化窒素合成酵素のアイソザイム発現に対して抑制作用を示す可能性が示唆された（Table 5、4.2.1.1.1 項）。

以上の結果から、アプレミラストが内皮細胞を介した VEGF シグナル伝達及び血管新生プロセス、並びに内皮細胞の増殖を阻害することが示され、関節症性乾癬や尋常性乾癬で起きているような血管新生プロセス（Coates, 2008）に対して何らかの効果がある可能性が示された。

4）低酸素誘導因子（HIF）は、低酸素作用のメディエーターであり、血管新生、転移、乾癬の進展に関与している。HIF アイソフォームは、尋常性乾癬皮膚内で顕著に増大するが、特に HIF-1α は表皮において VEGF-mRNA と同様の発現パターンで増大し、また、HIF-2α は表皮及び真皮毛管内皮細胞の両方において増大することが報告されている（Rosenberger, 2007、Tovar-Castillo, 2007、Ioannou, 2009）。腫瘍抑制因子 p53 は、HIF-1α 血管新生経路の重要な制御因子であることから、低酸素条件下の HUVEC での HIF-1α 及び腫瘍抑制因子 p53 タンパク質発現に対するアプレミラストの作用を評価した。

結果：HIF-1α タンパク質発現の経時変化を評価した結果、HIF-1α は低酸素条件下約 30 分後から蓄積し始め、120～240 分後に最大蓄積が認められることが示された。アプレミラスト（0.01～10 µmol/L）は、HUVEC の低酸素条件下での HIF-1α タンパク質発現を 45%～92.5%阻害した。一方、腫瘍抑制因子 p53 タンパク質発現を 18 時間の時点で約 4～4.5 倍増加させたこと等より、アプレミラストの p53 発現を介した抗血管新生作用を示すことが示唆された（4.2.1.1.22 項）。

5）アプレミラストは乾癬及び関節炎の動物モデルにおいて効果を示し、皮膚及び関節のいずれの炎症過程も抑制する（後述）。破骨細胞は、骨髄単核細胞（BMM）由来の多核細胞であり、骨吸収に関与しており、関節リウマチ又は関節症性乾癬の骨破壊に重要な役割を担っている。また、骨芽細胞は骨形成に関与する単核細胞であるが、骨髄マクロファージ上に破骨細胞形成因子である核内因子-κB 活性化受容体因子リガンド（RANKL、その受容体である核内因子-κB 活性化受容体因子［RANK］を認識するタンパク質）を産生し、破骨細胞の表現型へと分化誘導する。破骨細胞前駆体には RANKL 受容体である RANK が存在し、サイトカインである RANKLE が結合することで活性化される。RANKL 活性は、RANK への RANKL の結合を遮断するオステオプロテゲリン（OPG）により抑制的に制御されている。ヒト骨髄単核球細胞をアプレミラスト（0.1、1 及び 10 µmol/L）の共存又は非共存下でビタミン D 及びデキサメタゾンで処置し破骨細胞を誘導した。細胞を計数し、骨バイオマーカーとして分化している破骨細胞の培養上清中の可溶性核内因子-κB 活性化受容体リガンド（sRANKL）、OPG 及び sRANKL/OPG 比を ELISA により求めた。BMP-6、sRANKL 及び OPG の遺伝子発現は逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法によって測定した。

結果：アプレミラストは、破骨細胞形成を有意に阻害した。この時、10 µmol/L アプレミラストでは破骨細胞培養液中での sRANKL タンパク質発現の低下及び BMP-6 遺伝子発現の増加が観察された。また、こうした変化は骨芽細胞培養液中でも認められた。アプレミラストは破骨細胞及び骨芽細胞の両培養液中において sRANKL/OPG タンパク質比を低下させ、その作用は骨芽細胞に対してより顕著であった。これに対して、陽性対照のロリプラム、アレンドロネート及びスルファサラジンは sRANKL/OPG タンパク質比に対する作用を示さなかった。このことから、アプレミラストは陽性対照化合物とは異なった機序により作用すると考えられた（4.2.1.1.23 項）。

2.1.4. アプレミラスト代謝物の薬理活性

［報告書番号 5275-179、添付資料 4.2.1.1.24、評価資料］

［報告書番号 5347-137、添付資料 4.2.1.1.25、評価資料］

［報告書番号 5424-75、添付資料 4.2.1.1.26、評価資料］

［報告書番号 5638-96、添付資料 4.2.1.1.27、評価資料］

アプレミラストは生体内で開環加水分解体 M1 及び M2、*O*-脱メチル体 M3（ラセミ体：CC-15604、*S*-エナンチオマー：CC-16085）、*O*-脱エチル体 M5、*N*-脱アセチル体 M7、*O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体 M12、*N*-脱アセチル、*O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体 M14、水酸化アセトアミドのグルクロン酸抱合体 M16、及び水酸化アセトアミド M17 を含む複数の代謝物に代謝される。

ヒト尿から単離した M12 を含め、合成したアプレミラストの代謝物（M1/M2、M3、M5、M7、M12、M14、M16、M17）の PDE4 阻害作用及び TNF-α 産生阻害作用を評価した。

結果：評価した代謝物のうち、M7 及び M17（それぞれ CC-10055 及び CC-16401）が in vitro で PDE4 活性及び TNF-α 産生に対して強い阻害作用を示した。しかし、代謝物 M7 及び M17 のそれらの薬理作用はアプレミラストよりも弱く、血漿中アプレミラスト濃度に対する割合も 1%未満と極めて少量であることから、代謝物 M7 及び M17 の薬力学的作用に対する明らかな寄与はほとんどないと考えられた（Table 6、4.2.1.1.24 項、4.2.1.1.25 項、4.2.1.1.26 項、4.2.1.1.27 項、5.3.3.4.4 項、5.3.3.1.2-2 項）。

Table 6　アプレミラスト及びその代謝物のホスホジエステラーゼタイプ 4 及び TNF-α 阻害

化合物	Celgene 社 化合物番号	PDE4 IC_{50} （μmol/L）	TNF-α IC_{50} （μmol/L）
未変化体（アプレミラスト、*S*-エナンチオマー）	CC-10004	0.074	0.077
M1/M2：開環加水分解体（*S*-エナンチオマー）	CC-15091	120	77
M3：*O*-脱メチル体（ラセミ体）	CC-15604	17	16
M3：*O*-脱メチル体（*S*-エナンチオマー）	CC-16085	8.3	5.6
M5：*O*-脱エチル体（ラセミ体）	CC-10047	44	4.9
M7：*N*-脱アセチル体（*S*-エナンチオマー）	CC-10055	0.16	0.13
M12：*O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体（*S*-エナンチオマー）	ヒト尿由来	5.5	IC_{40} = 10
M12：*O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体（*S*-エナンチオマー）	CC-16166	> 100	> 10 （10 μmol/L で 24%）
M14：*N*-脱アセチル、*O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体（*S*-エナンチオマー）	CC-16793	> 80	> 10
M16：水酸化アセトアミドのグルクロン酸抱合体（*S*-エナンチオマー）	CC-16557	6.5	> 10 （10 μmol/L で 24%）
M17：水酸化アセトアミド（*S*-エナンチオマー）	CC-16401	0.094	0.021

IC_{40} = 40%阻害濃度; IC_{50} = 50%阻害濃度; PDE4 = ホスホジエステラーゼ タイプ 4; TNF-α = 腫瘍壊死因子-α。
Source: 4.2.1.1.24 項、4.2.1.1.25 項、4.2.1.1.26 項、4.2.1.1.27 項

2.2. アプレミラストの in vivo 薬効薬理試験

2.2.1. アプレミラストの抗関節炎及び抗炎症効果

［報告書番号 5042-107、添付資料 4.2.1.1.1、評価資料］
［報告書番号 AP279R, AP284R, AP291R、添付資料 4.2.1.1.28、参考資料］
［報告書番号 AP352R、添付資料 4.2.1.1.29、参考資料］
［報告書番号 1270RC35.001、添付資料 4.2.1.1.30、評価資料］
［報告書番号 AP343R、添付資料 4.2.1.1.31、参考資料］
［報告書番号 WEL-01-027、添付資料 4.2.1.1.32、評価資料］
［報告書番号 AP707R, AP830R、添付資料 4.2.1.1.33、参考資料］
［報告書番号 KIR-P03604、添付資料 4.2.1.1.34、評価資料］
［報告書番号 MD-3-2-005-1220、添付資料 4.2.1.1.35、評価資料］
［報告書番号 CLG/001/EM、添付資料 4.2.1.1.36-1、評価資料］
［報告書番号 CLG/001/EM-Histology、添付資料 4.2.1.1.36-2、評価資料］
［報告書番号 CLG/002/EM、添付資料 4.2.1.1.37-1、評価資料］
［報告書番号 CLG/002/EM-Histology、添付資料 4.2.1.1.37-2、評価資料］
［報告書番号 CLG/003/EM、添付資料 4.2.1.1.38-1、評価資料］
［報告書番号 CLG/003/EM-Histology、添付資料 4.2.1.1.38-2、評価資料］

1）急性炎症反応の評価系として用いられている、LPS 誘発性 TNF-α 放出 BALB/c マウスモデル（Corral, 1996）を用いて、アプレミラストの抗炎症効果を評価した。

結果：アプレミラスト（0.01～1 mg/kg、PO）は血清中の TNF-α レベル上昇を強力に抑制し、アプレミラストの抗炎症効果が in vivo 試験でも確認された（4.2.1.1.1 項）。同様に、ラットの LPS 誘発性 TNF-α 放出モデルでも、アプレミラスト（0.1～10 mg/kg、PO）投与で血漿中の TNF-α 誘導が 80%以上抑制された（4.2.1.1.28 項）。

2）急性炎症反応の評価系として知られているラットの空気嚢型炎症モデルにおいても、アプレミラストの抗炎症効果を評価した。

結果：背部皮下に空気嚢作製した雌ラットにアプレミラスト（10 mg/kg、PO）を投与し、1 時間後に空気嚢を 1%カラゲニンで処理したところ、カラゲニン投与 4 時間後の空気嚢での TNF-α レベルは 82%低下した。しかし、カラゲニンで誘発された空気嚢内好中球浸潤に対しては、抑制は認められなかった（4.2.1.1.29 項）。

3）ラットカラゲニン誘発性炎症及び痛覚過敏モデルを用いて、アプレミラストの抗炎症作用及び抗侵害受容作用についても評価した。

結果：本測定系において、アプレミラスト（50 mg/kg、IP）はラット足蹠浮腫を有意に軽減するとともに、投与 3 時間後の機械刺激及び熱刺激に対する疼痛閾値が生物学的に意義のある上昇を示した。このことから、アプレミラストは疼痛抑制を伴う抗炎症効果を有することが示された。より低用量（10 mg/kg）のアプレミラストを経口投与した同様の試験では、アプレミラストはカラゲニン注射による足蹠浮腫に対して作用を示さなかった（4.2.1.1.30 項、4.2.1.1.31 項）。

これらの結果から、アプレミラストは、高用量又は腹腔内投与での炎症性メディエーターの抑制等の機序により、痛みを伴う炎症性疾患の治療に有用となる可能性があることが示唆された。

4）CIA モデルを用いアプレミラスト（1 又は 10 mg/kg）の抗関節炎作用を評価した。

結果：この試験でアプレミラストを雌マウスに PO 投与（Day 21 から 34 に投与）したところ、Day 35 の足蹠浮腫が 1 mg/kg の用量では 49%抑制され、10 mg/kg の用量では 32%抑制された（4.2.1.1.32 項）。

5）CIA モデルを用いアプレミラスト（5 又は 25 mg/kg）の関節炎の重症度に対する作用を評価した。

結果：CIA マウスモデル（雌）を用いてアプレミラスト（5 又は 25 mg/kg、1 日 1 回［QD］）を 17 日間にわたり経口投与したところ、Day 42 の足蹠関節炎パラメータのスコアが顕著に抑制された。さらに、アプレミラスト（5 mg/kg、17 日間 PO 投与）によって関節炎の重症度が低下する傾向が確認された。（4.2.1.1.33 項）。

6）ヒト患者由来の関節リウマチ性滑膜細胞を用いた in vitro 試験及び CIA マウスモデルを用いた in vivo 試験でアプレミラストの抗関節炎効果を評価した。

結果：アプレミラスト（6.25～100 nmol/L）は、関節リウマチ患者由来のリウマチ性滑膜細胞において TNF-α 産生に対して阻害作用を示し、その IC_{50} は 100 nmol/L であった。CIA マウスモデルを用いた in vivo 試験では、アプレミラスト（5 又は 25 mg/kg）投与によって、臨床指標及び組織学的指標のいずれも改善することが確認された（4.2.1.1.34 項）。

7）CIA マウスモデルを用い、アプレミラストが Th17 細胞に及ぼす影響を評価した。

結果：アプレミラスト（10 mg/kg、PO）はマウスの鼡径部リンパ節の ex vivo 又はウシ II 型コラーゲン刺激による IL-17 産生細胞の割合に有意な影響を示さなかったが、IFN-γ 及び IL-6 を有意に増加させた。関節でのサイトカイン mRNA 発現レベルには有意な差は認められなかったことから、IL-6 産生の増加がアプレミラストの抗炎症作用を妨げた可能性がある（4.2.1.1.35 項）。

8）マウスの抗コラーゲン mAb カクテル・LPS 誘発実験的関節炎の複合モデルを用い、アプレミラスト（1～25 mg/kg）の 5 日間反復経口投与後の抗関節炎効果について更に評価した。

結果：アプレミラスト（25 mg/kg、PO）の 5 日間投与は、デキサメタゾン（1 mg/kg）投与と同程度に、関節炎の活動性を有意に抑制した。病理組織学的評価では、アプレミラスト（25 mg/kg）投与群では、関節炎を示唆する所見（滑膜過形成、滑膜絨毛形成、フィブリン沈着、滑膜への炎症細胞浸潤、パンヌス形成、軟骨組織破壊）がいずれもほぼ消失していた（4.2.1.1.36 項）。

9）マウスの抗コラーゲン mAb カクテル・LPS 誘発実験的関節炎の複合モデルを用い、アプレミラスト（5 又は 25 mg/kg、PO）を 11 日間投与し、抗関節炎効果及び病理組織学的評価について ETAN（5 又は 6.25 mg/kg、IP）と比較した。

結果：アプレミラストは 5 及び 25 mg/kg の用量で有意な抗関節炎効果（足蹠浮腫の軽減として測定）を示し、その効果は ETAN と同程度であった。しかし、本試験での病理組織学的評価では、アプレミラストの 5 及び 25 mg/kg の用量での関節炎パラメータの抑制は有意ではなかった（4.2.1.1.37 項、4.2.1.1.38 項）。

2.2.2. ヒト皮膚又は乾癬 NK 細胞を異種移植した Beige-重症複合免疫不全マウスモデルでの乾癬様所見に対する治療効果

［報告書番号 TECH1102006、添付資料 4.2.1.1.39、評価資料］

尋常性乾癬は、表皮のケラチノサイト及び内皮細胞の過剰増殖並びに炎症細胞の浸潤を特徴とする慢性炎症性皮膚疾患である。推定されている尋常性乾癬の発症メカニズムの中核は、活性化したケ

ラチノサイト、DC、好中球、T 細胞が産生するサイトカイン、ケモカイン及び他の炎症性メディエーターである（Bowcock, 2005）。これらの炎症性メディエーターの中で、TNF-α、IL-6、IL-8、IL-12、IFN-γ 及び iNOS は、尋常性乾癬皮膚病変内で増加することが明らかとなっている（Gottlieb, 2005）。また、慢性炎症性疾患である関節症性乾癬は関節及び周囲組織（靭帯、腱、筋肉）の腫脹及び疼痛を特徴とし、最終的には関節破壊及び乾癬様皮膚病変を招来する。関節症性乾癬の皮膚炎及び関節炎では、滑膜表層細胞過形成及び単核細胞（主に CD4+ T 細胞、リンパ球、プラズマ細胞、マクロファージ）浸潤が認められる。関節症性乾癬の炎症性サイトカイン特性としては、滑液中の TNF-α、IL-1β、IL-10 及び MMP-1 レベルの上昇、並びに ICAM-1、VCAM-1 及び HLA-DR の mRNA 発現レベルの増加が挙げられる。特に関節症性乾癬の病因としては TNF-α レベルの上昇が重要である。

マウス異種移植乾癬モデルを用いて、アプレミラスト（2.5 mg/kg BID、計 5 mg/kg/day）の薬理活性を CsA（2.5 mg/kg BID）及び溶媒対照（BID、計 0.1 mL/day）と比較評価した。

結果：正常ドナーの皮膚切片を Beige-重症複合免疫不全（SCID）マウスに異種移植し、尋常性乾癬患者由来 NK 細胞を処理すると、溶媒対照群に乾癬様所見が発現した。これらの皮膚移植片では乾癬と同様の組織学的所見が認められ、著しい表皮肥厚、過角化、錯角化等がみられ、これらに伴って皮膚リンパ球浸潤（一部の部位で集簇巣、他の部位では顆粒層欠如）が認められた。これらの皮膚移植片では、表皮の厚さ及び Ki 67 染色によるケラチノサイト増殖インデックスの有意な増加がみられ、乳頭間突起の伸長も大部分の皮膚移植片で認められた。

これらの乾癬様所見は、CsA の投与により、マウス 7 例中 3 例において完全又は部分的な寛解が認められた。同様に、アプレミラストの投与により、マウス 7 例中 4 例において完全又は部分的な寛解が認められた（Table 7）。これらの寛解には、表皮の形態学的正常化、リンパ球浸潤の消失が含まれる。表皮の厚さ及びケラチノサイト増殖インデックスは組織学的所見と相関し、投与群間で有意差が認められた。特に、アプレミラストは、溶媒対照群と比較して有意に表皮の厚さ及びケラチノサイト増殖インデックスを低下させ、これらのアプレミラストの作用は CsA と同程度であった。皮膚移植片中 TNF-α、ICAM-1、HLA-DR の質的な発現低下もアプレミラスト投与群及び CsA 投与群の両群で認められた（Table 8）。

Table 7　ヒト皮膚又は乾癬 NK 細胞を異種移植した Beige-重症複合免疫不全マウスモデルでのアプレミラストの in vivo での抗乾癬効果の概要

組織学的所見	溶媒対照	CsA （BID、計 5 mg/kg/day）	アプレミラスト （BID、計 5 mg/kg/day）
乾癬様病変	7/7	4/7	3/7
完全寛解	0/7	2/7	3/7
部分寛解	0/7	1/7	1/7
表皮の厚さ （平均値 ± SD）	1450 ± 323 µm	804 ± 302 µm p<0.01 （溶媒対照との比較）	725 ± 184 µm p<0.001 （溶媒対照との比較）
ケラチノサイト増殖インデックス （Ki-67 染色性） （平均値 ± SD）	54.1 ± 8.5%	24.2 ± 14.3% p<0.001 （溶媒対照との比較）	21.2 ± 7.0% p<0.001 （溶媒対照との比較）

BID = 1 日 2 回、CsA=シクロスポリン A、NK=ナチュラルキラー、SD = 標準偏差
Source: 4.2.1.1.39 項

Table 8　ヒト皮膚又は乾癬 NK 細胞を異種移植した Beige-重症複合免疫不全マウスモデルでのアプレミラストの in vivo での乾癬炎症マーカーの免疫組織化学染色

炎症マーカー	TNF-α[a]	HLA-DR[a]	ICAM-1[a]
溶媒対照	多数 7 少数 0 陰性 0	広範 6 局所 0 陰性 1	広範 6 局所 1 陰性 0
アプレミラスト（BID、計 5 mg/kg/day）	多数 3 少数 1 陰性 3	広範 4 局所 0 陰性 3	広範 2 局所 4 陰性 1
シクロスポリン A（BID、計 5 mg/kg/day）	多数 1 少数 4 陰性 2	広範 4 局所 1 陰性 2	広範 3 局所 2 陰性 2

BID = 1 日 2 回、CsA=シクロスポリン A、HLA-DR = ヒト白血球抗原-DR、ICAM-1 = 細胞間接着分子-1、NK=ナチュラルキラー、TNF-α = 腫瘍壊死因子-α、広範 = 表皮全体にわたる拡散性、少数 = TNF-α 陽性細胞が少数、局所 = 局所の発現パターン、多数 = TNF-α 陽性細胞が多数、陰性 = 陰性発現（0%）。
[a] 数字は、各マーカーを発現する移植片の総数を示す（1 群 n = 7）。
Source：4.2.1.1.39 項

2.2.3. 雌 SKH-1 マウス皮膚に対するアプレミラストの抗アポトーシス作用

［報告書番号 AP2599、添付資料 4.2.1.1.40、参考資料］

［報告書番号 5448-74、添付資料 4.2.1.1.41、参考資料］

紫外線はデオキシリボ核酸（DNA）の損傷（DNA ニック）を誘発し、アポトーシス過程を誘導することが知られている。この DNA ニックは、TUNEL 染色（TUNEL）により標識・可視化することができる。TUNEL では、遊離 3'-OH 末端を改変（蛍光）ヌクレオチドで標識することにより、損害を受けたアポトーシス細胞を蛍光発光させて DNA ニックを同定する。B 領域紫外線（UVB）照射時にはケラチノサイトから TNF-α が産生されるため、皮膚エリテマトーデスの病変は日光に曝露した後に出現又は増悪する。

UVB 照射（0.5 J/cm^2）1 時間前に動物にアプレミラスト（25 mg/kg、PO）を投与し、SKH-1 ヘアレスマウス（雌）皮膚に UVB 照射したときのアプレミラストの抗アポトーシス作用を評価した。

結果：アプレミラスト処理群の TUNEL 陽性細胞数が溶媒対照群に比して有意に少ないことが示され（$p<0.01$）、SKH-1 ヘアレスマウス（雌）に対し、UVB 照射 1 時間前にアプレミラストを PO 投与すると、表皮内のアポトーシスによる細胞死が抑制されることが示唆された（4.2.1.1.40 項）。

2.2.4. T 細胞及び B 細胞移入モデルに対するアプレミラストの作用

［報告書番号 MDCG-5、添付資料 4.2.1.1.42、評価資料］

獲得免疫応答に対するアプレミラストの作用を評価するために、ニワトリ卵白リゾチーム（HEL）抗原を認識する抗原特異的 T 細胞及び OVA 抗原を認識する抗原特異的 B 細胞を用いたマウスモデルにおいて評価した。Day -1、雌雄 IgHb マウスに、これらの抗原特異的 T 細胞及び B 細胞を尾静脈注射した。マウスに、Day -1 から Day 12 にわたりアプレミラストを 5 mg/kg の用量で経口投与し、Day 0 に OVA-HEL を皮下投与した。

結果：アプレミラストは T 細胞活性化マーカーである CD69 及び CD25 に対して有意な作用を示さず、B 細胞共刺激分子である CD86、CD40 及び MHC II の発現も変化させなかった。また、マウスへのアプレミラストの投与により、T 細胞の相対的増殖能は変化せず、さらに、OVA 特異的イムノグロブリン（Ig）G1、IgG2a 及び IgMa 産生に対する有意な作用も認められなかった。以上のように、T 細胞及び B 細胞の獲得免疫応答に対して、アプレミラストはほとんど効果を示さなかった。

3. 副次的薬理試験

3.1. アプレミラストのヒトセレブロンへの結合の評価

［報告書番号 2744-121、添付資料 4.2.1.2.1、参考資料］

アプレミラストはサリドマイドと構造的に類似する。サリドマイドは催奇形性を有しているが、催奇形性の主な標的としては E3 ユビキチンリガーゼ基質補助受容体の CRBN が同定されている（Ito, 2010）。サリドマイドは、このアミノグルタルイミド部位を介して CRBN と結合することで（Lopez-Girona, 2012）、催奇形性が生じると考えられている。アプレミラストには、このアミノグルタルイミドは含まれておらず、CRBN と結合しないことが推察された。

サリドマイド類縁体を固定化させたビーズへの CRBN の結合に対する競合的結合試験を実施した。ヒト U266 MM 細胞抽出物中のヒト内因性 CRBN を、アプレミラスト（0.1～100 µmol/L）、アミノグルタルイミドを有する陽性対照 CC-5013（サリドマイド類縁体であるレナリドミド、3 µmol/L）と比較評価した。サリドマイド酸性類縁体を固定化させたフェライトグリシジルメタクリレート（FG）アフィニティビーズをヒト U266 MM 細胞抽出物とインキュベートした後、結合タンパク質をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、サリドマイド類縁体を固定化させた FG ビーズに結合している CRBN を定量的 CRBN 免疫ブロット法により測定した。

結果：レナリドミド（3 µmol/L）とのプレインキュベーションにより、CRBN の FG ビーズへの結合は約 50%低下したが、アプレミラストでは最高濃度の 100 µmol/L でも、低下作用はみられなかった。本試験結果から、アプレミラストはヒト内因性 CRBN に結合しないことが示された。また、アプレミラスト代謝物もアミノグルタルイミドを有しておらず、ヒト内因性 CRBN に結合しないと考えられる。

3.2. ラット及びフェレットでの薬物動態及び薬力学的作用

［報告書番号 GSK 121001、添付資料 4.2.1.2.2、参考資料］

［報告書番号 121401、添付資料 4.2.1.2.3、参考資料］

1）Wistar Han ラットにアプレミラストを 1 mg/kg の用量で単回 PO 又は IV 投与、並びに 10 mg/kg で 7 日間経口投与して、脳及び血漿中でのアプレミラスト濃度について評価した。

結果：アプレミラスト濃度の脳／血漿比は 0.1 以下であり、アプレミラストは P 糖タンパクの基質であると推察された（4.2.1.2.2 項）。

2）また、嘔吐を示すフェレットにアプレミラスト（0.1～30 mg/kg）を単回 PO 投与し、脳及び血漿中でのアプレミラスト濃度について評価した。

結果：フェレットでのアプレミラストの血漿中半減期は 3.8 時間であった。フェレットでのアプレミラスト濃度（1 時間）は肺で最も高く、次に血漿中で高値であり、最も低値であったのは脳であった。脳／血漿比は 0.06～0.27 の範囲であり、ラットと同程度であった。また、肺／血漿比は 1.4～3.4 の範囲であった。PDE4 阻害剤の既知の薬理作用は催吐作用であることが報告されているが（Robichaud, 1999）、3 mg/kg までの用量を投与したフェレットにおいて嘔吐の発現はみられず、10 mg/kg 投与群では空吐症状はみられたが、嘔吐はみられなかった（4.2.1.2.3 項）。

フェレットにおいて 10 mg/kg まで催吐作用が認められなかったのは、アプレミラストの血液脳関門透過性が低いことによるものと推察される。また、アプレミラストはフェレットにおいて肺炎症を抑制したが、これは、肺組織中アプレミラスト濃度がより高かったことに起因すると考えられる。

3.3. 非ホジキンリンパ腫 B 細胞株に対するアプレミラストの作用

［報告書番号 5196-141-155、添付資料 4.2.1.2.4、参考資料］

非ホジキンリンパ腫（Farage）細胞をアプレミラスト（0～100 µmol/L）存在下で 72 時間インキュベートした後に 6 時間の[^{3}H]-チミジン取込みアッセイを行ったところ、弱い抗増殖作用（100 µmol/L で約 11.7～55.6%の増殖阻害）が認められた。

3.4. In vivo 動物モデルを用いた試験及び補助的試験

3.4.1. 大腸炎モデルに対するアプレミラストの作用

［報告書番号 Epistem 06/218c、添付資料 4.2.1.2.5、参考資料］

［報告書番号 Epistem 07-163、添付資料 4.2.1.2.6、参考資料］

1）炎症性腸疾患のモデルである TNBS 誘発大腸炎マウスモデルに対するアプレミラストの効果を評価した。

結果：本モデルにおいて、アプレミラストは体重減少を用量依存的に軽減した。2.5 mg/kg の用量では下痢が減少し、遠位大腸の粘膜損傷の重症度が陽性対照の 5-アミノサリチル酸（5-ASA、炎症性腸疾患の標準的治療法での第一選択治療薬）と同程度まで軽減した。アプレミラストは腸陰窩に対して保護作用を示し、特に陰窩の幅が増加した（Table 9）。アプレミラスト（0.25 mg/kg、BID）はミエロペルオキシダーゼ活性を対照に比して低下させた（4.2.1.2.5 項）。これらの結果はアプレミラストが UC の治療薬となる可能性を示している。

2）TNF-α はクローン病（CD）及び UC の発症にも関与していることが示されている。特に、活動期にある患者の便、腸粘膜固有層及び血液中で TNF-α レベルの上昇が認められ、TNF-α の中和抗体を投与すると CD 及び UC の疾患活動性が軽減することが報告されている（Gordon, 2009、Murch, 1991、Rutgeerts, 2005、Targan, 1997）。TNF-α によって腸管が損傷される経路の 1 つとして、腸管筋線維芽細胞での MMP 産生のアップレギュレーションを介する経路があり、細胞外基質の破壊や組織の分解及び潰瘍形成を招来する（Pender, 2008）。そこで、アメリカヤマゴボウマイトジェンで処理した健康なヒト由来の LPMC での TNF-α 産生に対するアプレミラストの効果を評価した。

結果：アプレミラストは LPMC の TNF-α 産生を有意に 63%低下させた（$p<0.001$）（Gordon, 2009）。さらに、アプレミラストは CD 及び US 患者由来 LPMC の MMP-3 産生を有意に阻害した（$p<0.001$）。アプレミラストによる LPMC の MMP-3 産生抑制に関連して、LPMC での MMP-3 の mRNA 発現レベル及びタンパク質産生がアプレミラストによって用量依存的に有意に抑制された（4.2.1.2.6 項、Gordon, 2009）。

Table 9　2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸誘発大腸炎マウスモデルでのアプレミラスト、テトミラスト及び 5-アミノサリチル酸の薬理反応

処理	下痢便スコア	減少%	粘膜損傷	減少%	陰窩幅（μm）	増加倍数
溶媒	21	-	3.0 ± 0.1	-	46.3 ± 1.5	-
アプレミラスト 0.25 mg/kg、BID)	23	9.5%増加	3.0 ± 0.1	0	50.1 ± 4.8	1.08
アプレミラスト（2.5 mg/kg、BID）	10	52.4	2.6 ± 0.1	13.3	53.7 ± 2.5	1.16
テトミラスト（0.25 mg/kg、BID）	23	9.5%増加	2.7 ± 0.1	10	46.8 ± 2.6	1.01
テトミラスト（2.5 mg/kg、BID）	5	76.2	2.9 ± 0.1	3.3	53.7 ± 2.2	1.16
5-ASA（100 mg/kg、QD）	3	85.7	2.5 ± 0.1	16.7	46.6 ± 2.6	1.01

5-ASA = 5-アミノサリチル酸、BID = 1 日 2 回、QD = 1 日 1 回、TNBS=2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸
データはマウス 6～10 例の平均値（下痢便スコア）又は平均値 ± 標準誤差（粘膜損傷及び陰窩幅）を示す。
すべてのデータは TNBS/溶媒群に対する相対的な減少率又は増加倍数とした。
Source：4.2.1.2.5 項

3.4.2. 肺炎症及び喘息モデルに対するアプレミラストの作用

［報告書番号 121401、添付資料 4.2.1.2.3、参考資料］

［報告書番号 AP576, AP600, AP1025、添付資料 4.2.1.2.7、参考資料］

［報告書番号 AP998R, AP1036R、添付資料 4.2.1.2.8、参考資料］

［報告書番号 AP1217R, AP1356R、添付資料 4.2.1.2.9、参考資料］

［報告書番号 1016668、添付資料 4.2.1.2.10、参考資料］

［報告書番号 DLXJ1000、添付資料 4.2.1.2.11、参考資料］

1）ラット肺好中球増加モデルにおける肺炎症に対するアプレミラストの作用を評価した。

結果：ラット肺好中球増加モデルにおいて、アプレミラストは経口及び気管内投与後に肺炎症を抑制した。雌 CD ラットでのアプレミラストの気管内投与（0.003～0.1 mg/kg）による効力は経口投与（0.1～3 mg/kg）の 10 倍以上高かった（4.2.1.2.7 項）。

2）無麻酔フェレットモデルにおける肺炎症に対するアプレミラストの作用を評価した。

結果：無麻酔フェレットモデルにおいても、アプレミラスト（0.1～30 mg/kg）は経口投与により肺炎症を抑制し（ED_{50} = 0.8 mg/kg）、1～30 mg/kg 投与群では肺好中球増加の抑制（32%～77%の抑制）が認められた。本試験でのアプレミラストの治療係数は 12（嘔吐閾値用量 10 mg/kg／好中球増加に対する ED_{50} = 0.8 mg/kg）と推定された（4.2.1.2.3 項）。

3）メタコリン誘発性喘息マウスモデルに対するアプレミラストの作用を評価した。

結果：メタコリン誘発性喘息マウスモデルにおいて、アプレミラスト（10 mg/kg、PO）は OVA による最終惹起後の AHR を有意に抑制した。また、アプレミラストは雄 BALB/c マウス気管支肺胞洗浄（BAL）中の WBC 数を有意に減少（$p<0.05$）させ、分画細胞数から、BAL 中のリンパ球、マクロファージ及び好酸球数を減少させることが示された。また、アプレミラストは血漿中イムノグロブリン E（IgE）レベル並びに全肺中 RANTES、エオタキシン及び IL-4 レベルも低下させた（4.2.1.2.8 項）。

同様の試験において、アプレミラスト（3 及び 10 mg/kg、PO）は OVA 惹起 48 時間後のメタコリン誘発性 AHR も用量依存的に有意に抑制した。また、アプレミラストの投与により、BAL 中の総

WBC 数が減少した（影響を受けた主な細胞型は好酸球）。アプレミラスト前処理後に上皮下好酸球増加の用量依存的な減衰傾向が認められた。しかし、先に実施した試験（4.2.1.2.8 項）とは異なり、アプレミラストは血漿中 IgE 並びに全肺中 RANTES、IL-4 及びエオタキシンに作用せず、また、杯細胞過形成にも作用しなかった（4.2.1.2.9 項）。

4）アプレミラストの ex vivo での気管平滑筋弛緩能を評価した。

結果：アプレミラスト（0.001～1 µmol/L）は自発張力下のモルモット気管を 8%～64%弛緩させ、50%有効濃度（EC_{50}）値は 310 nmol/L と推定された。アレルゲン誘発性気管支痙攣のモルモットモデルにおいて、OVA に曝露した動物は、惹起 5 分以内にアレルギー性気管支痙攣の増加を示した。アレルゲンによる誘発 4 日前から誘発 1 時間前までアプレミラスト（3 及び 30 mg/kg、PO）を投与したところ、3 mg/kg の前投与は OVA 誘発性気管支痙攣をわずかに低下させる傾向を示したが、30 mg/kg では作用は認められなかった（4.2.1.2.10 項）。

3.5. 痛風様炎症及び腹膜炎モデルに対するアプレミラストの作用

［報告書番号 MD-2-2-005-1169、添付資料 4.2.1.2.12、参考資料］

［報告書番号 MD-2-2-005-1168、添付資料 4.2.1.2.13、参考資料］

BALB/c マウスに 3 mg の尿酸一ナトリウム結晶を、雄には Day 0 に腹腔内注入し、雌には Day 6 に空気嚢に注入することにより痛風様炎症を誘発した。この空気嚢痛風様炎症モデルに対するアプレミラストの作用を評価した。

結果：アプレミラスト（2.5 及び 12.5 mg/kg、炎症誘発 30 分前及び 8 時間後に PO 投与）は空気嚢痛風様炎症モデルにおいて有意な抗炎症効果を示さず、痛風様腹膜炎にも作用しなかった。12.5 mg/kg の用量では TNF-α 及び MIP-1α の低下傾向が認められた。

3.6. 皮膚ループス細胞モデルに対するアプレミラストの作用

［報告書番号 3252-910、添付資料 4.2.1.2.14、参考資料］

TLR9 アゴニストで刺激した HPBMC を皮膚ループスの細胞モデルとして用い、アプレミラストの作用を評価した。

結果：ドナー7 名から得られた HPBMC を 1 µmol/L の TLR9 アゴニスト CpG-A ODN 2216 で刺激すると、IFN-α レベルが 10～1000 倍上昇した。しかし、アプレミラストは 0.5 µmol/L（C_{max} と同程度）及び 5 µmol/L の濃度で、IFN-α 産生を有意に阻害した（$p<0.0001$）。また、アプレミラストは、ケモカイン CXCL9（MIG）、CXCL10（IP-10）、2', 5'-オリゴアデニル酸合成酵素 1（OAS1）、シグナル伝達性転写因子 1（STAT1）及び CXCL11（I-TAC）をコードする IFN 誘導性ループス遺伝子の発現を有意に阻害し、5 µmol/L の濃度ではインターフェロン調節因子 7（IRF7）、ミクソウイルス耐性遺伝子 A（MxA）、2', 5'-オリゴアデニル酸合成酵素様タンパク質（OASL）、リンパ球抗原 6 複合体ローカス E（LY6E）の発現も有意に阻害した。1 µmol/L の TLR9 アゴニスト CpG-A ODN 2216 で刺激したヒト成人表皮ケラチノサイト（HEKa）hPDC では、アプレミラスト（0.25、0.5 及び 1 µmol/L）は IFN-α 及び TNF-α タンパク産生を有意に阻害し（IFN-α：0.25 µmol/L で $p<0.01$、TNF-α：1.0 µmol/L で $p<0.0001$）、また HEKa 内 MxA タンパク質発現も有意に阻害（0.25 µmol/L で $p<0.01$）した。これらの結果から、アプレミラストが皮膚エリテマトーデスの治療において有効である可能性があると考えられた。

3.7. 筋萎縮性 側索硬化症モデルに対するアプレミラストの作用

［報告書番号 DRXL-001-CC-10004、添付資料 4.2.1.2.15、参考資料］

ヒトスーパーオキシドジスムターゼ 1（hSOD1）の変異遺伝子を発現する ALS マウスモデルである雌雄 B6SJL-TgN（SOD1-G93A）dl1 Gur マウスにアプレミラスト（0.025 mg/g 餌及び 0.05 mg/g 餌、それぞれの標的用量は 4 mg/kg/day［0.00025%］及び 8 mg/kg/day［0.005%］）を混餌投与した。アプレミラスト高用量群では、雌雄マウスともに臨床症状発現の遅延（4～6 日、$p<0.05$）及び生存日数のわずかな延長（2～4 日、$p = 0.82$）が認められた。アプレミラスト低用量群では、雌において臨床症状発現に変化はなく、生存日数が 13.8 日延長し（$p = 0.20$）、雄においても臨床症状発現に変化はなく、生存日数が 8 日延長したが（$p = 0.39$）、臨床症状発現に変化はなく、生存日数が 10.9 日延長した（$p = 0.10$）。アプレミラストを混餌投与したマウスでの血漿中アプレミラスト濃度は、雄よりも雌の方が高かった。また、生存日数と血漿中アプレミラスト濃度にはわずかな相関がみられた（$r = 0.26$）。

3.8. 神経因性疼痛 Bennett モデルでのアプレミラストの鎮痛作用の評価

［報告書番号 S07059、添付資料 4.2.1.2.16、参考資料］

神経因性疼痛は慢性かつ重度であり、従来の鎮痛薬が奏効しないことが多く、制御するのは極めて困難である。動物モデルである慢性絞扼損傷（CCI）モデル（Bennett モデル）ではラットの坐骨神経周囲をゆるく結紮することで坐骨神経が脱髄し、自発痛（足を長時間上げる、結紮側の足をなめる等）が誘発される（Wang, 2003）。Sprague-Dawley ラットに CCI 結紮を行った 12～15 日後にアプレミラスト（3 mg/kg、BID、PO）を投与した。機械的アロディニア及び体重負荷の検査によってラットの疼痛感受性を評価した結果、術後 Day 12 及び 15 に鎮痛作用はみられなかった。

4. 安全性薬理試験

4.1. Irwin の変法を用いたマウス中枢神経系及び行動試験

［報告書番号 1398/443、添付資料 4.2.1.3.1、評価資料］

雄マウス（Crl:CD-1［ICR］BR）にアプレミラスト（500、1000、2000 mg/kg）を強制単回 PO 投与した。Irwin の変法による評価は、投与後 30、60、90、180 又は 300 分時点で実施した。

結果：500 mg/kg 群ではマウスの行動上の変化又は生理的変化は認められなかった。1000 mg/kg 群では、流涙や眼瞼下垂が認められたものの、その程度は軽度であり、症状の継続時間も短期間であった。これらの症状は投与後 60 分から発現し、投与後 300 分には消失していた。2000 mg/kg 群では、Day 2 に 1 例が死亡した。主な症状は軽度の無欲、流涙、及び眼瞼下垂で、投与後およそ 60 分から発現し、投与 300 分後には消失していた。また、同群では立毛が Day 2 に 1 例でみられた。先に実施したトキシコキネティクス試験（4.2.3.2.1 項）において、雄マウス（Crl:CD-1［ICR］BR）3 例にアプレミラストを投与した結果、平均 C_{max} は 500 mg/kg で 8650 ng/mL、1000 mg/kg で 9184 ng/mL、2000 mg/kg で 11,940 ng/mL であり、血漿中濃度時間曲線下面積（AUC）ではそれぞれ、112,640 ng•h/mL、117,290 ng•h/mL 及び 158,315 ng•h/mL であった。今回の試験での雄マウスに対する無影響量（NOEL）は 500 mg/kg であり、アプレミラストを 30 mg（BID）の用量で局面型乾癬患者に投与した場合（5.3.3.5.3 項）の AUC = 7308 ng•h/mL、C_{max} = 670 ng/mL と比較して、それぞれ平均 AUC で 15.4 倍、平均 C_{max} で 12.9 倍であった。

4.2. 麻酔下イヌでの心血管系及び呼吸器系に対する作用

［報告書番号 1398/264-D6146、添付資料 4.2.1.3.2、評価資料］

麻酔下雌雄ビーグル犬にアプレミラスト 0.5、1 又は 5 mg/kg（持続投与速度 = 200 mL/h）の 3 用量を漸増法により IV 投与（投与間隔：30 分以上）した。

結果：0.5 mg/kg では心室収縮能の指標である dP/dt_{max} にわずかな増加（9%）が認められたことを除いて、脈圧（収縮期血圧-拡張期血圧）や他の心機能パラメータに明らかな影響は認められなかったため、有害な影響ではないと判断した。高用量群（1 及び 5 mg/kg）では用量に相関した心拍数及び dP/dt_{max} の中等度増加が認められた。また、これらの群では心電図検査において、心拍間隔（RR 間隔）及び QT 間隔の短縮も認められたが、QTc に関してはすべての試験群で影響は認められなかった。呼吸機能に関するパラメータでは、高用量群（5 mg/kg）で最大吸気流量（peak inspiratory flow）の軽微な上昇がアプレミラスト投与の 10 分及び 60 分後に認められた。いずれのアプレミラスト投与においても呼吸深度や呼吸数に影響は認められなかった。これらの結果から、アプレミラストは呼吸器系機能に対して明らかな悪影響は示さないと考えられた。アプレミラスト 0.5、1 又は 5 mg/kg の持続静脈内投与終了後 2 分経過時点での平均 C_{max}（雌雄合算）はそれぞれ、662 ng/mL、1277 ng/mL 及び 5074 ng/mL であった。本試験での無毒性量は 0.5 mg/kg であり、平均 C_{max} は臨床 C_{max}（670 ng/mL）の 1 倍であった。QTc に関しては高用量の 5 mg/kg（臨床［5.3.3.5.3 項］での C_{max} の 7.6 倍）までアプレミラストの影響は認められなかった。

4.3. クローン化された hERG 遺伝子発現哺乳類細胞でのイオン電流の測定

［報告書番号 031206.DFN、添付資料 4.2.1.3.3、評価資料］

hERG を安定的に発現する HEK293 を用い、イオン電流に対するアプレミラストの影響について試験した。

結果：アプレミラストの hERG 電流阻害率（平均値 ± 標準誤差［SEM］）は 16.8 µmol/L で 6.3% ± 0.9%（n = 4）、49.7 µmol/L で 19.3% ± 1.4%（n = 3）、87.5 µmol/L で 28.5% ± 0.6%（n = 3）及び 249.7 µmol/L で 59.0% ± 1.7%（n = 4）、溶媒対照（0.3% DMSO 含有生理食塩液）は 1.6% ± 0.3%（n = 3）であり、hERG 電流阻害に対するアプレミラストの IC_{50} は 184.2 µmol/L（84.8 µg/mL、Hill 係数 1.1）と推定され、アプレミラストの推定最大治療用量である 30 mg BID の用量での局面型乾癬患者での C_{max}（5.3.3.5.3 項）と比較して、127 倍のマージンがあることを確認した。

4.4. マウスの胃腸管運動に対する作用

［報告書番号 CC-10004-TOX-1171、添付資料 4.2.1.3.4、評価資料］

Crl:CD-1（ICR）系の雄マウス（n = 6/群）にアプレミラストを 10、100 又は 1000 mg/kg の用量で単回経口投与した。投与後約 30 分時点で対照群を含むすべての動物に炭粉懸濁液（10 w/v%アラビアゴム水溶液に 5 w/v%の濃度になるよう活性炭を添加、投与容量：10 mL/kg）を投与した。炭末懸濁液投与後 30 分時点（±3 分）で動物を安楽死させ、速やかに腸管を検査に供した。炭末懸濁液の小腸内移動距離と共に小腸の全長を計測し、胃腸管運動に対するアプレミラストの影響の有無を評価した。

結果：いずれのアプレミラスト投与群においても炭末懸濁液の小腸内移動距離（%）や補正された移動距離阻害率（%）に変動は認められなかった。本試験での NOEL は高用量の 1000 mg/kg であると考えられた。先に実施したトキシコキネティクス試験（4.2.3.2.1 項）の成績ではマウスにアプレミラストを 1000 mg/kg/day の用量で投与した場合、平均 AUC_{24h} は 117,290 ng•h/mL、平均 C_{max} は 9184 ng/mL であり、アプレミラストを 30 mg BID の用量で局面型乾癬患者に投与した試験（5.3.3.5.3 項）の AUC 及び C_{max} のそれぞれ 16.0 倍及び 13.7 倍であった。

5. 薬力学的薬物相互作用

［報告書番号 5042-107、添付資料 4.2.1.1.1、評価資料］

［報告書番号 CLG/001/EM、添付資料 4.2.1.1.36-1、評価資料］

［報告書番号 CLG/001/EM-Histology、添付資料 4.2.1.1.36-2、評価資料］

［報告書番号 5369-006-041、添付資料 4.2.1.4.1、参考資料］

［報告書番号 5226-086-5265-012、添付資料 4.2.1.4.2、参考資料］

［報告書番号 MDCG6、添付資料 4.2.1.4.3、評価資料］

［報告書番号 5589-97、添付資料 4.2.1.4.4、評価資料］

［報告書番号 TECH10282009、添付資料 4.2.1.4.5、評価資料］

1）PGE2 は単球、T 細胞や他の白血球表面のプロスタノイド受容体に結合して細胞内の cAMP 濃度を増加させ、細胞応答を阻害する。PGE2 とアプレミラストを併用処理したときの cAMP に対する作用について評価した。

結果：PGE2 とアプレミラストを併用処理したとき、HPBMC 及び好中球内の cAMP 濃度が用量依存的に、かつ相乗的に増加した。アプレミラストは HPBMC 及び好中球の両者において PGE2 を介した細胞内 cAMP 濃度増加を増強させることが示された（4.2.1.1.1 項）。

2）また、cAMP を産生するアデニル酸シクラーゼの活性化剤であるフォルスコリンとアプレミラストを併用処理したときの NHLF における作用を評価した。

結果：フォルスコリン（1 及び 10 nmol/L）とアプレミラストを併用処理すると、NHLF での TNF-α 刺激性 GM-CSF 産生が用量依存的かつ相乗的に阻害された。この結果から、アプレミラストは異常組織のリモデリングに伴う肺線維芽細胞の動員及び GM-CSF 活性を調節することが示唆された（4.2.1.4.1 項）。

3）血管新生には、内皮細胞の増殖・遊走に続く毛細管形成を伴う。E-セレクチンは、細胞接着分子であるとともに重要な血管新生メディエーターであり、血管増殖性疾患患者や炎症性疾患患者において上昇する。HUVEC において TNF-α で誘発される E-セレクチン及び他の接着分子の発現に対する作用を、アプレミラストの単独及び PGE2 との併用により評価した。

結果：アプレミラスト及び PGE2 の併用により、TNF-α で誘発される E-セレクチン及び VCAM-1 の発現が有意に阻害された。これらの結果から、PGE2 存在下でのアプレミラストの抗血管新生薬及び抗炎症薬としての作用機序に E-セレクチン及び VCAM-1 阻害が関与する可能性が示唆された（4.2.1.4.2 項）。

4）ETAN（5 mg/kg、IP）と併用したときのアプレミラスト（5 mg/kg、PO）の抗関節炎効果を、マウスの抗コラーゲン mAb カクテル・LPS 誘発実験的関節炎の複合モデルにおいて評価した。

結果：アプレミラストと ETAN の併用により相加的かつ溶媒対照と比較して有意（$p<0.01$）な足蹠浮腫の軽減がみられ、抗関節炎効果が認められた。一方、病理組織学的評価では、有意な抗関節炎効果は認められなかった（4.2.1.1.37 項）。

5）インドメタシン又は MTX と併用したときのアプレミラストの作用を、DBA/1 マウス CIA モデルにおいて評価した。

結果：全体的にアプレミラストの単独投与により足蹠スコア及び測定値が一部低下したものの、抗関節炎効果はみられなかった。また、インドメタシン（3 mg/kg、PO）又は MTX（1 mg/kg、IP）の

単独投与群とインドメタシン又は MTX とアプレミラスト（5 mg/kg、PO）との併用投与群の間で関節炎スコアに有意な差はみられず、相互作用はなかった（4.2.1.4.3 項）。

6）ヒト抗 CD3 mAb で刺激した T 細胞（2 日間インキュベート）及び SEB 処理 HPBMC（アプレミラストを 1 時間処理した後、SEB を添加して 18 時間インキュベート）を用いて、関節リウマチ及び尋常性乾癬と関連するサイトカインの阻害に対するアプレミラスト（0.4～1600 ng/mL）の作用を CsA、ETAN 又は MTX との併用により評価し、CsA、MTX 又は ETAN 単独でのサイトカイン産生の阻害がアプレミラストの添加により増大するか否かについて評価した。

結果：SEB 処理 HPBMC 検体では、アプレミラストは、CsA との併用により IL-10、IP-10、MIP-1α、MIP-1β 及び TNF-α 産生を相乗的に阻害した。また、アプレミラストは ETAN との併用により IL-10、IP-10 及び MIP-1α 産生を相乗的に阻害した。MIP-1β 及び TNF-α 産生については、阻害はみられたが、相互作用はみられなかった。さらに、アプレミラストと MTX との併用も、これら 5 種類のサイトカインの阻害に薬剤間の相互作用はみられなかった（4.2.1.4.4 項）。

7）マウス異種移植乾癬モデルでは、アプレミラスト（BID、計 5 mg/kg/day）の薬理活性を MTX（0.3～3 mg/kg/day、IP）及び溶媒対照（BID、計 0.1 mL/day）と比較評価した。正常ドナーの皮膚切片を SCID マウスに異種移植し、尋常性乾癬患者由来 NK 細胞を処理すると、溶媒対照群に乾癬様所見が発現した。これらの所見は、著しい表皮肥厚、過角化、錯角化等であり、これらに伴って皮膚リンパ球浸潤（一部の部位で集簇巣、他の部位では顆粒層欠如）が認められた。これらの皮膚移植片では、表皮の厚さ及びケラチノサイト増殖インデックスの有意な増加がみられ、乳頭間突起の伸長も大部分の皮膚移植片で認められた。また、真皮乳頭では血管周囲のリンパ球浸潤を伴う血管拡張が認められた。全体として、これらの皮膚移植片では乾癬と同様の組織学的所見が認められたが、皮膚炎の一部の徴候が併発していた。このマウス異種移植モデルに対するジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤である MTX 及びアプレミラストの作用を、単独又は併用投与により評価した。

結果：MTX は、海外では尋常性乾癬の全身性治療薬として用いられているが、マウス異種移植乾癬モデルにおいて、乾癬の組織学的所見を消失させることが確認された。MTX0.3 及び 1 mg/kg 単独群では、いずれの移植片でも乾癬様所見の消失がみられなかったが、MTX 1 mg/kg とアプレミラスト（BID、計 5 mg/kg/day）の併用群では、マウス 5 例中 2 例において中等度の治療効果を示した（Table 10）。一方、MTX 2 及び 3 mg/kg 単独群では、大半のマウスにおいて乾癬様所見が完全に消失した（Table 10）。毒性所見に関しては、MTX 2 mg/kg 単独群及び MTX 1 mg/kg とアプレミラストの併用群では毒性変化は認められなかったのに対し、MTX 3 mg/kg 単独群ではすべての投与マウスにおいて毒性変化及び死亡誘発がみられた（4.2.1.4.5 項）。

8）マウス異種移植モデルに対するアプレミラストの薬効を免疫組織化学染色により評価した。

結果：主に溶媒対照群の移植片並びに MTX 0.3 及び 1 mg/kg 群の移植片において、表皮に沿って TNF-α 誘導が認められた。一方、MTX 2 及び 3 mg/kg 群では、表皮に TNF-α 陽性発現を示した移植片は少数であった（Table 11）。表皮で観察された TNF-α 陽性パターンと同様に、真皮に沿っても TNF-α 陽性細胞が認められ、TNF-α 陽性発現を示した真皮細胞が溶媒対照群の移植片及び MTX 0.3 mg/kg 投与群の移植片で認められたものの、すべての MTX 投与群で TNF-α 陽性移植片が溶媒対照群と比較して少なかった（Table 11）。IFN-γ 陽性細胞は TNF-α 発現分布パターンと同様であったが、CD16 陽性細胞はより少なかった（Table 11、4.2.1.4.6 項）。

Table 10 ヒト皮膚又は乾癬ナチュラルキラー細胞を異種移植した Beige-重症複合免疫不全マウスモデルでのメトトレキサートのアプレミラスト併用又は非併用時の in vivo 抗乾癬効果の概要

組織学的所見	乾癬様	完全寛解	表皮の厚さ（平均値 ± SD）	増殖率（Ki-67 染色性）（平均値 ± SD）
溶媒	4/4	0/4	846 ± 369 µm	34% ± 3%
0.3[a]	3/3	0/3	1062 ± 88 µm	39% ± 6%
1 [a]	3/3	0/3	945 ± 84 µm	30% ± 10%
2 [a]	1/5	4/5	816 ± 321 µm	25% ± 14%
3 [a]	0/4	4/4	619 ± 210 µm	13% ±3%
1[a] +アプレミラスト [b]	3/5	2/5	1245 ± 134 µm	32% ± 12%

SD = 標準偏差
[a] メトトレキサートの用量（mg/kg）
[b] 5 mg/kg/day（2.5 mg/kg、1 日 2 回）
Source：4.2.1.4.5 項

Table 11 ヒト皮膚又は乾癬ナチュラルキラー細胞を異種移植した Beige-重症複合免疫不全ベージュマウスモデルでの in vivo での乾癬炎症マーカーの免疫組織化学染色

炎症マーカー	TNF-α 誘導（表皮）	TNF-α 発現（真皮細胞）	インターフェロン γ 陽性細胞	CD16+皮膚細胞の発現
溶媒	4/4	4/4	2/3	1/3
0.3[a]	3/3[b]	2/3[c]	2/3	1/3[d]
1[a]	2/3	1/3	1/3	1/3
2[a]	1/5	2/5	2/5	1/5
3[a]	1/4	2/4	NA	NA
1[a] + アプレミラスト [e]	1/5	1/5	1/5	2/5

IFN=インターフェロン、MTX=メトトレキサート、NA=該当データなし、TNF-α = 腫瘍壊死因子-α
[a]MTX の用量（mg/kg）
[b]TNF-α 発現陽性移植片数／総移植片数
[c] 著明な TNF-α 陽性皮膚細胞を有する移植片数／総移植片数
[d] 著明な CD16 陽性皮膚細胞を有する移植片数／総移植片数
[e] 5 mg/kg/day（2.5 mg/kg、BID）
Source：4.2.1.4.6.項

9）IL-1β、IL-6 及び IL-6R で刺激した関節リウマチ由来滑膜線維芽細胞に対するアプレミラストの作用を評価した。

結果：IL-1β、IL-6 及び IL-6R で刺激した関節リウマチ由来滑膜線維芽細胞において、アプレミラストは ETAN 又は MTX との併用によりアプレミラスト単独の場合よりも、IL-7 発現を強くかつ有意に阻害した。一方、アプレミラストを PRED と併用したときは、アプレミラスト単独よりも IL-7 発現が促進された（4.2.1.1.16 項）。

6. 考察及び結論

尋常性乾癬及び関節症性乾癬等はサイトカインレベルの上昇を伴う慢性炎症性自己免疫疾患の一つである。これらの疾患では、DC、単球、マクロファージ、好中球、T 細胞、B 細胞、ケラチノサイト、軟骨細胞、滑膜細胞において複数の炎症性及び抗炎症性メディエーターの調節不全が認められている（Lowes, 2007、Fuentes−Duculan, 2010）。活性化 T 細胞及び分泌型炎症性サイトカインは、尋常性乾癬患者で認められる皮膚病変を誘発すると考えられている（Mehlis, 2003、Bowcock, 2005）。

PDE4 は上記のような免疫担当細胞に存在する細胞内酵素であり、炎症性サイトカインの産生を促進している。一方、PDE4 により選択的に分解される cAMP は、TNF-α、IL-7、IL-23 といった炎症性サイトカインの産生を抑制し、逆に抗炎症性サイトカインと言われる IL-10 等の産生を促進させる。尋常性乾癬や関節症性乾癬等の慢性炎症では、患部の免疫細胞内に存在する PDE4 が免疫の調節に重要な役割を担っており、炎症性サイトカインの過剰生産を促進している（Nestle FO, 2009）。

アプレミラストは、尋常性乾癬や関節症性乾癬の患部免疫細胞（Th1、Th2、Th17 等）の炎症性サイトカイン産生を促進する PDE4 を選択的に阻害する PO 投与可能な新規の免疫調整剤であり、PDE4 の阻害により細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、これにより PKA が活性化され、転写因子ファミリーの CREB/ATF-1 がリン酸化され、活性化される。また、PKA の活性化は、NF-κB の転写活性も抑制する。その結果、iNOS、TNF-α、IL-17 及び IL-23 といった炎症性メディエーターの産生を抑え、IL-10 のような抗炎症性サイトカインの発現を促進させる。このような広範囲なの炎症性及び抗炎症性メディエーターの調節作用により（Houslay, 2005、Baumer, 2007、Takahashi, 2002）、尋常性乾癬及び関節症性乾癬の皮膚や関節での炎症症状を改善すると考えられる。

非臨床薬理試験から、アプレミラストは免疫担当細胞である単球、T 細胞、好中球及びケラチノサイト等において細胞内 cAMP レベルを上昇させる PDE4 に対して、選択的阻害作用を示すことが確認されている。ヒト細胞モデルにおいて、アプレミラストは尋常性乾癬や関節症性乾癬において炎症の進展に重要な役割を持つ TNF-α 及び IL-12 の産生を阻害し、これとは反対に単球での抗炎症性サイトカインである IL-10 産生を増加させた。ヒト抗 CD3 mAb で刺激した T 細胞においても、アプレミラストは初代培養ヒト T 細胞の IFN-γ、GM-CSF、IL-2、IL-5、IL-10、IL-13、IL-17、RANTES 及び TNF-α といった炎症性サイトカインの産生を阻害した。さらに、複数のサイトカイン、サイトカイン受容体及びサイトカイン遺伝子を抑制した。加えて、アプレミラストは IL-8 及び LTB4 の産生や、接着分子である CD18 及び CD11b（Mac-1）の発現、並びに fMLP によって誘発される好中球の遊走を含む様々な炎症にかかわる応答を阻害した。また、ヒト血漿中での臨床到達可能な濃度で、関節での骨破壊を促進する破骨細胞形成を有意に阻害した。

以上のような in vitro での試験結果は、アプレミラストが Th1、Th2 又は Th17 といった免疫担当細胞が病態生理に関与している尋常性乾癬や関節症性乾癬のような疾患に対して、薬効を示す可能性を示唆している。

動物モデルにおいては、LPS をマウスに全身曝露させたときの血清中 TNF-α レベルの上昇がアプレミラスト PO 投与により強力に抑制されることが認められ、アプレミラストが抗炎症作用を示す可能性が示唆された。抗コラーゲン mAb カクテル・LPS 誘発実験的関節炎の複合モデルでは、アプレミラストを陽性対照であるデキサメタゾン及び ETAN と比較した。その結果、アプレミラスト（5 及び 25 mg/kg、PO）はデキサメタゾン（1 mg/kg、PO）及び ETAN（5 mg/kg、IP）と同様に関節炎の活動性を有意に抑制した。ETAN（5 mg/kg、IP）との併用時のアプレミラスト（5 mg/kg、PO）の抗関節炎効果は相加的であった。ヒト皮膚又は乾癬 NK 細胞により誘発した乾癬異種移植モデルにおいては、アプレミラスト（2.5 mg/kg、PO、BID）は乾癬様病変の発現頻度及び重症度を低下させ、尋常性乾癬の皮膚症状として代表的な表皮の肥厚及びケラチノサイトの増殖を低減し、炎症性マーカーである TNF-α、ICAM-1、HLA-DR の産生を抑制した。アプレミラストは、関節リウマチ患者由

来ヒト滑膜細胞の TNF-α 産生を阻害し、CIA モデルでは 5 及び 25 mg/kg の用量で臨床的及び組織学的重症度を軽減した。また、コラーゲンで免疫したマウスから得た培養リンパ節細胞においては、アプレミラストはコラーゲン又は抗 CD3 mAb 刺激による T 細胞増殖並びに TNF-α 及び IFN-γ 産生を抑制した。さらに、ラットカラゲニン誘発性炎症及び痛覚過敏モデルにおいて、アプレミラスト（50 mg/kg、IP）は足蹠浮腫を有意に軽減するとともに、機械刺激及び熱刺激に対するいずれの疼痛閾値に対しても生物学的に関連のある上昇が認められたことから、疼痛抑制を伴う抗炎症効果を有することが示され、in vivo 試験においても、尋常性乾癬や関節症性乾癬での炎症症状の軽減やこれら疾患に対して薬効を示す可能性が示唆された。

アプレミラストの代謝物のうち、M7 及び M17 が in vitro で PDE4 活性及び TNF-α 産生に対して強い阻害作用を示した。代謝物 M7 及び M17 のそれらの薬理作用はアプレミラストよりも弱く、血漿中アプレミラスト濃度に対する割合も 1%未満と極めて少量であることから、代謝物 M7 及び M17 の薬力学的作用に対する明らかな寄与はほとんどないと考えられた。

アプレミラストは HUVEC／血小板共培養系又はカルシウムイオノフォア刺激血小板でのプロスタサイクリン及びトロンボキサン産生には影響しなかったことより、COX-2 の酵素活性を阻害する他の薬剤とは異なり、理論的にこの機序を介した血管血栓又は塞栓のような有害事象発生に対するリスクはないと考えられた。

副次的薬理試験では、構造的に類似しているサリドマイドの催奇形性の主要な標的である CRBN に対する結合性を評価したが、アプレミラストは CRBN に結合せず、催奇形性の可能性は低いことが示唆された。なお、マウスとサルによる動物試験では催奇形性はみられていない。PDE4 阻害剤でみられる催吐作用をフェレットで試験したが、ほとんど影響はみられず催吐作用は低いことが示唆された。

安全性薬理試験では、マウスの中枢神経系、行動機能及び消化管運動においてアプレミラストに起因する重大な安全性上の問題はないことが確認された。また、イヌの心血管機能及び呼吸機能においても重大な安全性上の問題はみられなかった。サルの 12 ヵ月までの反復投与毒性試験では、投与に関連した ECG パラメータ及び心拍数の異常はみられなかった（4.2.3.2.11 項、4.2.3.2.12 項、4.2.3.2.13 項）。また、12 ヵ月間反復投与毒性試験での最高用量は 600 mg/kg/day であった（平均 AUC_{24h} = 34,772 ng·h/mL［臨床曝露量の 4.8 倍］、平均 C_{max} = 3,450 ng/mL［臨床 C_{max} 値の 5.1 倍］）（5.3.3.5.3 項）。また、カリウム電流（IKr）に対するアプレミラストの IC_{50} は 184.2 µmol/L と推定され（84.8 µg/mL、Hill 係数 = 1.1）、アプレミラストの推定最大治療用量である 30 mg BID の用量でのヒトでの C_{max}（5.3.3.5.3 項）と比較して、127 倍のマージンがあることが確認された。ヒトでの QT/QTc 評価試験では、アプレミラストの 50 mg BID までの用量で評価したが、アプレミラストは QT/QTc 間隔、心拍数、ヒト臨床試験においてバイタルサイン及び臨床検査パラメータに対して影響を示さなかった（5.3.3.1.4.1 項）。

以上より、アプレミラストは、薬理学的プロファイルから尋常性乾癬及び関節症性乾癬において治療効果を示すと考えられる。アプレミラストは PDE4 を阻害して細胞内 cAMP 濃度を上昇させることで、PKA を活性化し、転写因子ファミリーCREB/ATF-1 のリン酸化・活性化をもたらす。また、PKA の活性化により NF-κB 転写活性のダウンレギュレーションも誘発する。その結果として、iNOS、TNF-α、IL-17 及び IL-23 の産生低下等の広範囲の炎症性及び抗炎症性メディエーターに変化が生じ（Houslay, 2005、Baumer, 2007、Takahashi, 2002）、皮膚及び関節での炎症の病態生理が改善されると考えられる。アプレミラストは、単一のメディエーターを標的とするのでなく、カスケード上流の炎症性及び抗炎症性シグナルのバランスを回復させる新たな作用機序を有した尋常性乾癬及び乾癬性関節症の治療薬として期待される。

7. 参考文献

久保田潔, 佐藤嗣道, 大場延浩, 上島有加里. ナショナルレセプトデータベースの活用可能性を探る：乾癬の疫学研究から. 日本薬剤疫学会学術総会抄録集; 2013 Oct 16-17; 東京. 19: 39.

難病情報センター. 乾癬性関節炎：疫学調査による新しい疾患概念に基づく乾癬性関節炎の診断基準と重症度分類の確立. 難病情報センター Web site. http://www.nanbyou.or.jp/kenkyuhan_pdf2014/gaiyo008.pdf/. Accessed Jan 28, 2016.

Au BT, Teixeira MM, Collins PD, Williams TJ. Effect of PDE4 inhibitors on zymosan-induced IL-8 release from human neutrophils: synergism with prostanoids and salbutamol. Br J Pharmacol 1998 Mar;123(6):1260-6.

Banner KH, Hoult JR, Taylor MN, Landells LJ, Page CP. Possible contribution of prostaglandin E2 to the antiproliferative effect of phosphodiesterase 4 inhibitors in human mononuclear cells. Biochem Pharmacol 1999;58(9):1487-95.

Barnette MS, Grous M, Cieslinski LB, Burman M, Christensen SB, Torphy TJ. Inhibitors of phosphodiesterase IV (PDE IV) increase acid secretion in rabbit isolated gastric glands: correlation between function and interaction with a high-affinity rolipram binding site. J Exp Ther 1995;273(3):1396-402.

Baumer W, Hoppmann J, Rundfeldt C, Kietzmann M. Highly selective phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of allergic skin diseases and psoriasis. Inflamm Allergy Drug Targets 2007 Mar;6(1):17-26.

Bowcock AM, Krueger JG. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. Nat Rev Immunol 2005 Sep;5(9):699-711.

Burnouf C, Pruniaux MP. Recent advances in PDE4 inhibitors as immunoregulators and anti-inflammatory drugs. Curr Pharm Des 2002;8(14):1255-96.

Chandran V, Raychaudhuri SP. Geoepidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriatic arthritis. J Autoimmun. 2010 May;34(3):J314-21.

Coates LC, Anderson RR, Fitzgerald O, Gottlieb AB, Kelly SG, Lubrano E, et al. Clues to the pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis from imaging: a literature review. J Rheumatol 2008 Jul;35(7):1438-42.

Corral LG, Muller GW, Moreira AL, Chen Y, Wu M, Stirling D, et al. Selection of novel analogs of thalidomide with enhanced tumor necrosis factor alpha inhibitory activity. Mol Med 1996 Jul;2(4):506-15.

DeFouw LM, DeFouw DO. Differential phosphodiesterase activity contributes to restrictive endothelial barrier function during angiogenesis. Microvasc Res 2001 Nov;62(3):263-70.

Derian CK, Santulli RJ, Rao PE, Solomon HF, Barrett JA. Inhibition of chemotactic peptide-induced neutrophil adhesion to vascular endothelium by cAMP modulators. J Immunol 1995 Jan 1;154(1):308-17.

Favot L, Keravis T, Lugnier C. Modulation of VEGF-induced endothelial cell cycle protein expression through cyclic AMP hydrolysis by PDE2 and PDE4. Thromb Haemost 2004 Sep;92(3):634-45.

Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinas M, Zaba LC, Nograles KE, Pierson KC, Mitsui H, et al. A subpopulation of CD163-positive macrophages is classically activated in psoriasis. J Invest Dermatol 2010 Oct;130(10):2412-22.

Gladman DD, Antoni C, Mease P, Clegg DO, Nash P. Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. Ann Rheum Dis 2005 Mar;64 Suppl 2:ii14-7.

Gordon JN, Prothero JD, Thornton CA, Pickard KM, Di Sabatino A, Goggin PM, et al. CC-10004 but not thalidomide or lenalidomide inhibits lamina propria mononuclear cell TNF-α and MMP-3 production in patients with inflammatory bowel disease. J Crohns Colitis 2009 Sep;3(3):175-82.

Gottlieb AB. Psoriasis: emerging therapeutic strategies. Nat Rev Drug Discov 2005 Jan;4(1):19-34.

Gottlieb AB, Strober B, Krueger JG, Rohane P, Zeldis JB, Hu CC, et al. An open-label, single-arm pilot study in patients with severe plaque-type psoriasis treated with an oral anti-inflammatory agent, Apremilast. Curr Med Res Opin 2008 May;24(5):1529-38.

Houslay MD, Schafer P, Zhang KY. Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. Drug Discov Today 2005 Nov 15;10(22):1503-19.

Ioannou M, Sourli F, Mylonis I, Barbanis S, Papamichali R, Kouvaras E, et al. Increased HIF-1 alpha immunostaining in psoriasis compared to psoriasiform dermatitides. J Cutan Pathol 2009 Dec;36(12):1255-61.

Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. Science 2010 Mar 12;327(5971):1345-50.

Iversen L, Kragballe K, Ziboh VA, Significance of leukotriene-A4 hydrolase in the pathogenesis of psoriasis. Skin Pharmacol 1997;10(4):169-77.

Long D, Blake S, Song XY, Lark M, Loeser, RF. Human articular chondrocytes produce IL-7 and respond to IL-7 with increased production of matrix metalloproteinase-13. Arthritis Res Ther 2008;10(1):R23.

Lopez-Girona A, Mendy D, Ito T, Miller K, Gandhi AK, Kang J, et al. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. Leukemia 2012 Nov;26(11):2326-35.

Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. Nature 2007 Feb 22;445(7130):866-73.

Mehlis SL, Gordon KB. The immunology of psoriasis and biologic immunotherapy. J Am Acad Dermatol 2003 Aug;49(2 Suppl):S44-50.

Muller GW, Shire MG, Wong LM, Corral LG, Patterson RT, Chen Y, et al. Thalidomide analogs and PDE4 inhibition. Bioorg Med Chem Lett 1998;8(19):2669-74.

Murch SH, Lamkin VA, Savage MO, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. Gut 1991 Aug;32(8):913-7.

Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. N Engl J Med 2009 Jul 30;361(5):496-509.

Netherton SJ, Maurice DH. Vascular endothelial cell cyclic nucleotide phosphodiesterases and regulated cell migration: implications in angiogenesis. Mol Pharmacol 2005 Jan;67(1):263-72.

Palmer D, Tsoi K, Maurice DH. Synergistic inhibition of vascular smooth muscle cell migration by phosphodiesterase 3 and phosphodiesterase 4 inhibitors. Circ Res 1998;82(8):852-61.

Pender SL. Do metalloproteinases contribute to tissue destruction or remodeling in the inflamed gut? Inflamm Bowel Dis 2008 Oct;14 Suppl 2:S136-7.

Rihl M, Kellner H, Kellner W, Barthel C, Yu DT, Tak PP, et al. Identification of interleukin-7 as a candidate disease mediator in spondylarthritis. Arthritis Rheum 2008 Nov;58(11):3430-5.

Robichaud A, Tattersall FD, Choudhury I, Rodger IW. Emesis induced by inhibitors of type IV nucleotide phosphodiesterase (PDE IV) in the ferret. Neuropharmacology 1999 Feb;38(2):289-97.

Rosenberger C, Solovan C, Rosenberger AD, Jinping L, Treudler R, Frei U, et al. Upregulation of hypoxia-inducible factors in normal and psoriatic skin. J Invest Dermatol 2007 Oct;127(10):2445-52.

Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. N Engl J Med 2005 Dec 8;353(23):2462-76.

Schafer PH, Parton A, Gandhi AK, Capone L, Adams M, Wu L, et al. Apremilast, a cAMP phosphodiesterase-4 inhibitor, demonstrates anti-inflammatory activity in vitro and in a model of psoriasis. Br J Pharmacol 2010 Feb;159(4):842-55.

Schroer K, Zhu Y, Saunders MA, Deng WG, Xu XM, Meyer-Kirchrath J, et al. Obligatory role of cyclic adenosine monophosphate response element in cyclooxygenase-2 promoter induction and feedback regulation by inflammatory mediators. Circulation 2002 Jun 11;105(23):2760-5.

Takahashi N, Tetsuka, T, Uranishi H, Okamoto T. Inhibition of the NF-kappaB transcriptional activity by protein kinase A. Eur J Biochem 2002 Sep;269(18):4559-65.

Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. N Engl J Med 1997 Oct 9;337(15):1029-35.

Tovar-Castillo LE, Cancino-Díaz JC, García-Vázquez F, Cancino-Gómez FG, León-Dorantes G, Blancas-González F, et al. Under-expression of VHL and over-expression of HDAC-1, HIF- 1alpha, LL-37, and IAP-2 in affected skin biopsies of patients with psoriasis. Int J Dermatol 2007 Mar;46(3):239-46.

Wang LX, Wang ZJ. Animal and cellular models of chronic pain. Adv Drug Deliv Rev 2003 Aug 28;55(8):949-65.

TABLE OF CONTENTS

略語・略号一覧 2
2.6.3.1. 薬理試験：一覧表 4
2.6.3.2. 効力を裏付ける試験 12
2.6.3.3. 副次的薬理試験 32
2.6.3.4. 安全性薬理試験 40
2.6.3.5. 薬力学的薬物相互作用試験 42

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
AHR	Airway hyperresponsiveness	気道過敏性
Akt	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog	セリンスレオニンキナーゼ Akt
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis	筋萎縮性側索硬化症
BID	Twice daily	1 日 2 回
BMP-6	Bone morphogenic protein 6	骨形成タンパク質 6
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	環状アデノシン 1 リン酸
CCI	Chronic constriction injury	慢性絞扼損傷
COX-2	Cyclooxygenase-2	シクロオキシゲナーゼ-2
CRBN	Cereblon	セレブロン
CRE	Cyclic AMP responsive element	環状アデノシン 1 リン酸応答配列
CREB	CRE binding protein	環状アデノシン 1 リン酸応答配列結合タンパク質
EC_{50}	Concentration of drug producing 50% of E_{max}（maximum effect of a drug produces）	50%有効濃度
ED_{50}	50% effective dose	50%有効用量
ENA-78	Epithelial-derived neutrophil-activating peptide-78	上皮性好中球活性化ペプチド-78
ETAN	Etanercept	エタネルセプト
fMLP	*N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine	*N*-ホルミル-メチオニン-ロイシン-フェニルアラニン
GM-CSF	Granulocyte monocyte colony-stimulating factor	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
HARBS	High-affinity rolipram binding site	高親和性ロリプラム結合部位
HDF	Human dermal fibroblast	ヒト皮膚線維芽細胞
HEK293	Human embryonic kidney 293 cell	ヒト胎児腎臓 293 細胞
HEKa	Human epidermal keratinocytes, adult	ヒト成人表皮ケラチノサイト
HEKn	Human epidermal keratinocytes, neonatal	ヒト新生児表皮ケラチノサイト
hERG	Human ether-a-go-go related genes	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HIF	Hypoxia inducible factor	低酸素誘導因子
HLA-DR	Human leukocyte antigen-DR	ヒト白血球抗原-DR
HPBMC	Human peripheral blood mononuclear cells	ヒト末梢血単核球細胞
hPDC	Human plasmacytoid dendritic cells	ヒト形質細胞様樹状細胞
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells	ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC_{40}	Concentration of drug producing 40% inhibition	40%阻害濃度
IC_{50}	Concentration of drug producing 50% inhibition	50%阻害濃度
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1	細胞間接着分子-1
IFN	Interferon	インターフェロン
IgE	Immunoglobulin E	イムノグロブリン E
IL	Interleukin	インターロイキン
IL-6R	Interleukin-6 receptor	インターロイキン-6 受容体
IP	Intraperitoneally	腹腔内
IP-10	Interferon-gamma inducible protein-10	インターフェロン-γ 誘導タンパク質-10
IV	Intravenous	静脈内
LPS	Lipopolysaccharide	リポ多糖
LTB4	Leukotriene B4	ロイコトリエン B4
LY6E	Lymphocyte antigen 6E	リンパ球抗原 6 複合体ローカス E
mAb	Monoclonal antibody	モノクローナル抗体

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ
MCP-1	Monocyte chemosttractant protein-1	単球遊走タンパク質-1
MEK	Mouse epidermal keratinocytes	マウス表皮ケラチノサイト
MIG	Monokine induced by interferon-gamma	インターフェロン-γ誘導モノカイン
MIP	Macrophage inflammatory protein	マクロファージ炎症性タンパク質
MMP	Matrix metalloproteinase	マトリックスメタロプロテアーゼ
MRP	Myeloid related protein	ミエロイド関連タンパク質
MTX	Methotrexate	メトトレキサート
MxA	Myxovirus resistance gene A	ミクソウイルス耐性遺伝子 A
NF-κB	Nuclear factor-kappa B	核内因子-κB
NHLF	Normal human lung fibroblasts	正常ヒト肺線維芽細胞
OASL	2'-5'-Oligoadenylate synthetase-like protein	2'-5'-オリゴアデニル酸合成酵素様タンパク質
OPG	Osteoprotegerin	オステオプロテゲリン
OVA	Ovalbumin	卵白アルブミン
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1	プラスミノーゲン活性化抑制因子-1
pDC	Plasmacytoid dendritic cells	形質細胞様樹状細胞
PDE	Phosphodiesterase	ホスホジエステラーゼ
PGE2	Prostaglandin E2	プロスタグランジン E2
PHA	Plant hemagglutinin	植物性血球凝集素
PKA	Protein kinase A	プロテインキナーゼ A
PO	Orally	経口
RA	Rheumatoid arthritis	関節リウマチ
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa B	核内因子 κB 活性化受容体因子
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted	インターロイキン-8 スーパーファミリーに属するサイトカインの一種
SCID	Severe combined immunodeficiency	重症複合免疫不全
SEB	Staphylococcal enterotoxin B	ブドウ球菌エンテロトキシン B
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3	サイトカインシグナル抑制因子 3
SOD1	Superoxide dismutase1	スーパーオキシドジスムターゼ 1
sRANKL	Soluble ligand for receptor activator of nuclear factor kappa B	可溶性核内因子 κB 活性化受容体リガンド
TGF-β1	Transforming growth factor-beta 1	トランスフォーミング増殖因子-β1
TLR9	Toll-like receptor 9	Toll 様受容体 9
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid	2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha	腫瘍壊死因子-α
UVB	Ultraviolet B	B 領域紫外線
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1	血管細胞接着分子-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮細胞増殖因子
αvβ3	Integrin alpha V and beta 3	αvβ3 インテグリン

2.6.3.1. 薬理試験：一覧表

2.6.3.1.1. 効力を裏付ける試験

被験物質：アプレミラスト

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	区分	添付資料番号
In vitro ヒト白血球での新規ホスホジエステラーゼ（PDE）4 型阻害薬 CC-10004 の抗炎症活性	U937 ヒト単球性細胞由来 PDE4、ウシ PDE1、ヒト血小板由来 PDE2、PDE3 及び PDE5、ウシ網膜桿体外節由来 PDE6、Hut78 ヒト T 細胞由来 PDE7、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）由来 PDE11 リポ多糖（LPS）刺激ヒト末梢血単核球細胞（HPBMC）、ザイモサン A 及び *N*-ホルミル-メチオニン-ロイシン-フェニルアラニン（fMLP）刺激好中球、ヒト全血及びブドウ球菌エンテロトキシン B（SEB）及び抗 CD3 モノクローナル抗体（mAb）刺激 $CD4^+$T 細胞、 16,16-dimethyl-PEG2/インターロイキン（IL）-1 刺激 HUVEC	in vitro	Celgene, Warren, NJ	5042-107	評価資料	4.2.1.1.1
PDE 阻害試験 Celgene 社の 4 化合物に対する酵素阻害試験	17 種の遺伝子組換えヒト PDE	in vitro	[redacted]	Celgene-PDE-0801	評価資料	4.2.1.1.2
PDE 阻害試験 Celgene 社の 6 化合物に対する酵素阻害試験	7 種の遺伝子組換えヒト PDE4	in vitro	[redacted]	Celgene-PDE4-1001	評価資料	4.2.1.1.3
In vitro 薬理、薬物動態及び毒性試験：4 化合物に関するダイバーシティプロファイル＋CYP450 阻害＋ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）の試験	多数の細胞表面受容体及び複数種の酵素	in vitro	[redacted] France	8611	評価資料	4.2.1.1.4
CC-10004 の in vitro 薬理試験	ラット大脳皮質由来 Ca^{2+}チャネル（L 型、ベラパミル結合部位）	in vitro	[redacted] France	CC-10004-ET-151	評価資料	4.2.1.1.5
CC-220 及び CC-10004（アプレミラスト）の SelectScreen による生化学的キナーゼプロファイリング	キナーゼ／ペプチド混合物	in vitro	[redacted]	SSBK8217_23649	評価資料	4.2.1.1.6

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	区分	添付資料番号
単球、HPBMC、Jurkat T 細胞及び THP-1 単球性細胞でのアプレミラストの転写制御並びに遺伝子発現に及ぼす影響	Jurkat T 細胞及び THP-1 単球性細胞、LPS 刺激ヒト単球及び HPBMC	in vitro	Celgene, Warren, NJ	7600-011	評価資料	4.2.1.1.7
HPBMC での PDE4 阻害薬 CC-10004、CC-11050 及びテトミラスト並びにシクロスポリン A の潰瘍性大腸炎バイオマーカープロファイリング	LPS 刺激 HPBMC	in vitro	Celgene, Summit, NJ	5478-100	参考資料	4.2.1.1.8
BioMAP プロファイリング試験	HUVEC、冠動脈平滑筋細胞（CASM3C）、HSM3C、HPBMC、単球由来マクロファージ、ヒト皮膚線維芽細胞（HDF）、ケラチノサイト	in vitro	[redacted]	BSK-1073	評価資料	4.2.1.1.9
LPS 刺激 HPBMC での PDE4 阻害薬 CC-10004、CC-10082、CC-11050、CC-14046 及び CC-14064 の種々のサイトカインプロファイリング	LPS 刺激 HPBMC	in vitro	Celgene, Summit, NJ	5424-11	評価資料	4.2.1.1.10
TruCulture システムを用い LPS 刺激を行ったヒト全血でのアプレミラストのサイトカイン及びケモカイン産生に及ぼす影響	LPS 刺激ヒト全血	in vitro	Celgene, Summit, NJ	7600-043	評価資料	4.2.1.1.11
LPS 刺激ヒト、ラット、マウス及びサル全血での IL-6 産生に及ぼす PDE4 阻害薬 CC-10004、CC-10082（シロミラスト）、CC−11050 及び CC−14064（ロフルミラスト）並びに免疫調整薬（IMiD）CC-5013 の影響	LPS 刺激ヒト、ラット（Sprague-Dawley）、マウス（CD-1）及びサル（カニクイザル）のヘパリン処理全血	in vitro	Celgene, Warren, NJ	5265-117	評価資料	4.2.1.1.12
CpG-A オリゴデオキシヌクレオチド刺激した HPMBC 及び形質細胞様樹状細胞（pDC）での PDE4 型阻害薬 CC-11050 及びアプレミラスト（CC-10004）のインターフェロン（IFN）-α 及び腫瘍壊死因子-α（TNF-α）産生に及ぼす影響	CpG-A ODN2216 刺激 HPBMC 及び pDC	in vitro	Celgene, Summit, NJ	5638-35	評価資料	4.2.1.1.13
IMiD 及び PDE4 阻害薬の正常ヒト肺線維芽細胞（NHLF）増殖並びにトランスフォーミング増殖因子-β1（TGF-β1）産生に及ぼす影響	LPS、TNF-α 及び TGF-β1 刺激 NHLF	in vitro	Celgene, Warren, NJ	5299-083	参考資料	4.2.1.1.14
PDE4 阻害薬及び IMiD の HDF 増殖並びにプラスミノーゲン活性化抑制因子 1（PAI-1）産生に及ぼす影響	TNF-α、IFN-α 及び IL-1-β 刺激初代培養 HDF	in vitro	Celgene, Summit, NJ	5570-044	評価資料	4.2.1.1.15

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	区分	添付資料番号
In vitro 初代培養軟骨細胞及び関節リウマチ滑膜線維芽細胞での CC-10004 及び CC-11050 の抗リウマチ薬併用時及び非併用時での滑膜マーカーに及ぼす影響	IL-1＋IL-6＋インターロイキン-6 受容体（IL-6R）刺激又は非刺激初代培養ヒト軟骨細胞及び関節リウマチ滑膜線維芽細胞	in vitro	Celgene, Summit, NJ	5673-140	参考資料	4.2.1.1.16
抗 CD3mAb 刺激ヒト T 細胞での PDE4 阻害薬 CC−10004 及び CC-11050 の種々のサイトカインプロファイリング	抗 CD3mAb 抗体刺激 T 細胞	in vitro	Celgene, Summit, NJ	5478-159	評価資料	4.2.1.1.17
HPBMC での IMiD、PDE4 阻害薬及びチュブリン阻害薬のシクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）発現及びプロスタグランジン E2（PGE2）産生に及ぼす影響	LPS 又は植物性血球凝集素（PHA）刺激 HPBMC	in vitro	Celgene, Warren, NJ	5197-130	参考資料	4.2.1.1.18
内皮細胞／血小板共培養系でのサリドマイド、IMiD（レナリドミド［CC-5013］、CC-11006 及び CC-10015）並びに PDE4 阻害薬（CC-10004 及び CC-11050）のトロンボキサン B2 及びプロスタサイクリン産生に及ぼす影響	HUVEC／血小板共培養系及びカルシウムイオノフォア刺激血小板	in vitro	Celgene, Warren, NJ	5299-148	参考資料	4.2.1.1.19
HUVEC での PDE4 阻害薬 CC-10004 及び CC-11050 のセリンスレオニンキナーゼ Akt（Akt, v-akt murine thymoma viral oncogene homolog［タンパク質キナーゼ B］）リン酸化に及ぼす影響	HUVEC	in vitro	Celgene, Summit, NJ	5279-153	参考資料	4.2.1.1.20
ヒト臍帯血管リングを用いた IMiD 及び PDE4 阻害化合物の抗血管新生活性スクリーニング	ヒト臍帯血管	in vitro	Celgene, Summit, NJ	5127-132	参考資料	4.2.1.1.21
内皮細胞での CC-10004 及び CC-11050 の抗血管新生活性に関する評価	HUVEC	in vitro	Celgene, Summit, NJ	5387-08	参考資料	4.2.1.1.22
In vitro 初代培養ヒト破骨細胞及び骨芽細胞でのアプレミラストの影響	骨髄単核球細胞、正常ヒト骨芽細胞	in vitro	Celgene, Summit, NJ	7645-001	参考資料	4.2.1.1.23
CC-10004 の代謝物 M1、M2、M3（ラセミ体）、M5（ラセミ体）及び M7 の PDE4 及び TNF-α 阻害活性	ヒト単球性細胞 U937 から精製した PDE4 及び LPS 刺激 HPBMC	in vitro	[redacted] and Celgene, Warren, NJ	5275-179	評価資料	4.2.1.1.24
CC-10004 代謝物 M12（[^{14}C]-*O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体）の PDE4 及び TNF-α 阻害活性	ヒト単球性細胞 U937 から精製した PDE4 及び LPS 刺激 HPBMC	in vitro	Celgene, Summit, NJ	5347-137	評価資料	4.2.1.1.25

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	区分	添付資料番号
CC-10004 の代謝物 M3（*S*-エナンチオマー）、M12（合成）、M16 及び M17 の PDE4 及び TNF-α 阻害活性	ヒト単球性細胞 U937 及び LPS 刺激 HPBMC から精製した PDE4	in vitro	Celgene, Summit, NJ	5424-75	評価資料	4.2.1.1.26
CC-10004（アプレミラスト）の代謝物 M14（*N*-脱アセチル、*O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体）の PDE4 及び TNF-α 阻害活性	ヒト単球性細胞 U937 及び LPS 刺激 HPBMC	in vitro	Celgene, Summit, NJ	5638-96	評価資料	4.2.1.1.27
In vitro ヒト白血球での新規 PDE4 阻害薬 CC-10004 の抗炎症活性	ヒト白血球、雌 BALB/c マウス	in vitro 及び 経口投与	Celgene, Warren, NJ	5042-107	評価資料	4.2.1.1.1
雌 CD ラットに CC-11050 又は CC-10004 を前投与したときの LPS 誘発血清 TNF-α に及ぼす影響	CD ラット	経口投与	Celgene, San Diego, CA	AP279R, AP284R, AP291R	参考資料	4.2.1.1.28
ラット空気嚢モデルでの好中球浸潤及び TNF-α 産生に及ぼす CC-11050、CC-10004 又は CC-10082 前投与の影響	雌 CD ラット	経口投与	Celgene, San Diego, CA	AP352R	参考資料	4.2.1.1.29
ラットを用いたカラゲニン誘発痛覚過敏での CC-2001、CC-4047、CC-5013、CC-11006、CC-10004、CC-11050、CC-401 及び CC-145715 の影響	雄 Sprague-Dawley ラット	腹腔内(IP)投与	[redacted]	1270RC35.001	評価資料	4.2.1.1.30
ラットを用いたカラゲニン誘発足蹠浮腫での CC-11050、CC-10004、CC-11085 又は CC-10082 前投与の影響	雌 CD ラット	経口投与	Celgene, San Diego, CA	AP343R	参考資料	4.2.1.1.31
マウス II 型コラーゲン関節炎モデル	雄 DBA/l LacJ マウス	経口投与	[redacted]	WEL-01-027	評価資料	4.2.1.1.32
マウスコラーゲン誘発関節炎（CIA）モデルでの PDE4 阻害薬 CC-11050、CC-10004、CC-14046 及び CC-14064 の影響	雌 DBA/l LacJ マウス	経口投与	Celgene, San Diego, CA	AP707R, AP830R	参考資料	4.2.1.1.33
CIA での CC-10004 及び CC-11050 の治療効果	雄 DBA/1 OlaHsd マウス、関節リウマチ患者の滑膜細胞	IP 投与 及び in vitro	[redacted] UK	KIR-P03604	評価資料	4.2.1.1.34
マウス CIA モデルでのアプレミラスト投与の TH-17 細胞に及ぼす影響の評価	雄 DBA/1 マウス	経口投与	[redacted] UK	MD-3-2-005-1220	評価資料	4.2.1.1.35

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	区分	添付資料番号
mAb/LPS 誘発実験的マウス関節炎モデルでの抗関節炎活性の評価	雄 BALB/c マウス	経口投与	[redacted] Switzerland	CLG/001/EM	評価資料	4.2.1.1.36-1
mAb/LPS 誘発実験的マウス関節炎モデルでの抗関節炎活性の評価（病理組織学的評価）	雄 BALB/c マウス	経口投与	[redacted] Switzerland	CLG/001/EM-Histology	評価資料	4.2.1.1.36-2
mAb/LPS 誘発実験的マウス関節炎モデルでの抗関節炎活性の評価	雄 BALB/c マウス	経口投与	[redacted] Switzerland	CLG/002/EM	評価資料	4.2.1.1.37-1
mAb/LPS 誘発実験的マウス関節炎モデルでの抗関節炎活性の評価（病理組織学的評価）	雄 BALB/c マウス	経口投与	[redacted]	CLG/002/EM-Histology	評価資料	4.2.1.1.37-2
mAb/LPS 誘発実験的マウス関節炎モデルでの抗関節炎活性の評価	雄 BALB/c マウス	経口投与	[redacted] Switzerland	CLG/003/EM	評価資料	4.2.1.1.38-1
mAb/LPS 誘発実験的マウス関節炎モデルでの抗関節炎活性の評価（病理組織学的評価）	雄 BALB/c マウス	経口投与	[redacted]	CLG/003/EM-Histology	評価資料	4.2.1.1.38-2
CC-11050 及び CC-10004 による乾癬様症状の治療	Beige-重症複合免疫不全（SCID）マウスに移植した健康成人ドナーの皮膚	経口投与	[redacted] Israel	TECH1102006	評価資料	4.2.1.1.39
雌 SKH-1 マウス皮膚への B 領域紫外線（UVB）照射に対する PDE4 阻害薬アプレミラスト及び CC-11050 の抗アポトーシス作用	雌 SKH-1 ヘアレスマウス	経口投与	Celgene, San Diego, CA	AP2599	参考資料	4.2.1.1.40
初代培養ヒト新生児表皮ケラチノサイト（HEKn）及び初代培養マウス表皮ケラチノサイト（MEK）でのサリドマイド（CC-2001）、ポマリドミド（CC-4047）、レナリドミド（CC-5013）、アプレミラスト（CC-10004）、CC-10015、CC-11006、CC-11050、CC-13097、CC-15965、CC-16016、CC-16057、CC-16122、CC-16123 及び CC-16125 の UVB 誘発 TNF-α 産生に対する阻害作用	UVB 照射されたヒト及びマウスケラチノサイト	in vitro	Celgene, Summit, NJ	5448-74	参考資料	4.2.1.1.41
マウス T 細胞及び B 細胞移入モデルでの CC-10004 の評価	雌雄 IgHb マウス	経口投与	[redacted] UK	MDCG5	評価資料	4.2.1.1.42

2.6.3.1.2. 副次的薬理試験

被験物質：アプレミラスト

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	区分	添付資料番号
CC-10004（アプレミラスト）はヒトセレブロン（CRBN）と結合しない	ヒト U266 多発性骨髄腫細胞	in vitro	Celgene, San Diego, CA	2744-121	参考資料	4.2.1.2.1
Celgene 社の 5 つの PDE4 阻害薬のラット及びフェレットでの薬物動態及び ADME データの最終サマリー報告	雌雄 Wistar Han ラット及びフェレット	経口投与 静脈内(IV)投与	[redacted]	GSK 121001	参考資料	4.2.1.2.2
フェレットの肺好中球増多症及び嘔吐モデルでの治療係数	雄フェレット	経口投与	[redacted]	121401	参考資料	4.2.1.2.3
In vitro B 細胞性非ホジキンリンパ腫 Farage 細胞株での CC-4047、CC-5013、CC−5079 及び CC-10004 の抗増殖作用	B 細胞性非ホジキンリンパ腫細胞	in vitro	Celgene, Warren, NJ	5196-141-155	参考資料	4.2.1.2.4
2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）誘発大腸炎モデルでの CC-10004、CC-11050 及びテトミラストの効果	雄 BDF1 マウス	経口投与	[redacted] UK	Epistem 06/218c	参考資料	4.2.1.2.5
TNBS 誘発大腸炎モデルでの CC-10004、CC-11050 及びテトミラストの効果：遺伝子発現についての追加解析	雄 BDF1 マウス	経口投与	[redacted] UK	Epistem 07-163	参考資料	4.2.1.2.6
ラット LPS 誘発肺好中球増多症モデルでの CC-10004 の作用	雌 CD-IGS ラット	経口投与 気管内投与	Celgene, San Diego, CA	AP576, AP600, AP1025	参考資料	4.2.1.2.7
マウス卵白アルブミン（OVA）誘発喘息モデルでの CC-10004 の作用	雄 BALB/c マウス	経口投与	Celgene, San Diego, CA	AP998R, AP1036R	参考資料	4.2.1.2.8
マウス OVA 誘発喘息モデルでの CC-11050 及び CC-10004 の作用	雄 BALB/c マウス	経口投与	Celgene, San Diego, CA	AP1217R, AP1356R	参考資料	4.2.1.2.9
化合物 CG-126（CC-10004）及び CG-127（CC-11050）の MDS Pharma Services による薬理試験データ報告	Dunkin Hartley モルモット気管	ex vivo	[redacted] Taiwan	1016668	参考資料	4.2.1.2.10
能動感作、麻酔下及び人工呼吸下のモルモットでの CC-10004 及び CC-11050 のアレルゲン誘発気管支攣縮に対する作用	雄 Dunkin Hartley モルモット	経口投与	[redacted] UK	DLXJ1000	参考資料	4.2.1.2.11
マウス痛風性腹膜炎モデルでの CC-10004 及び CC-11050 の評価	雄 C57/B16 マウス	経口投与	[redacted] UK	MD-2-2-005-1169	参考資料	4.2.1.2.12

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	区分	添付資料番号
マウス痛風性空気嚢炎症モデルでの CC-10004 及び CC-11050 の評価	雌 BALB/c マウス	経口投与	[redacted] UK	MD-2-2-005-1168	参考資料	4.2.1.2.13
皮膚ループス細胞モデルでの PDE4 阻害薬 CC-11050 及びアプレミラスト並びに JNK 阻害薬 CC-930 の 1 型 IFN に起因する病態生理に及ぼす影響	CpG-A ODN 2216 刺激 HPBMC、pDC 及び HEKa 共培養系	in vitro	Celgene, Summit, NJ	3252-910	参考資料	4.2.1.2.14
CC-10004：筋萎縮性側索硬化症（ALS）マウスモデルである G93A スーパーオキシドジスムターゼ 1（SOD1）マウスでの病態オンセット及び寿命の変化	雌雄 B6S JL-TgN（SOD1-G93A）dl 1 Gur マウス	経口投与	[redacted]	DRXL-001-CC-10004	参考資料	4.2.1.2.15
神経因性疼痛モデルである Bennett（慢性絞扼損傷［CCI］）モデルでの被験物質の鎮痛作用の評価	雄 Sprague-Dawley ラット	経口投与	[redacted]	S07059	参考資料	4.2.1.2.16

2.6.3.1.3. 安全性薬理試験

被験物質：アプレミラスト

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	GLP 適用	区分	添付資料番号
CC-10004：マウスにおける経口投与後の一般状態及び行動試験	雄 CD1 マウス	経口投与	[redacted] UK	1398/443	適	評価資料	4.2.1.3.1
CC-10004：麻酔イヌにおける静脈内投与後の心血管系及び呼吸器系に及ぼす影響	雌雄ビーグル犬	静脈内投与	[redacted] UK	1398/264-D6146	適	評価資料	4.2.1.3.2
哺乳類細胞に発現させたクローン化 hERG チャネルに及ぼす CC-10004 の影響	ヒト胎児腎臓 293 細胞（HEK293）	in vitro	[redacted]	031206.DFN	適	評価資料	4.2.1.3.3
CC-10004：雄 CD-1 マウスでの経口投与後の胃腸管運動に及ぼす影響	雄 CD1 マウス	経口投与	[redacted]	CC-10004-TOX-1171	適	評価資料	4.2.1.3.4

2.6.3.1.4. 薬力学的相互作用試験

被験物質：アプレミラスト

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	区分	添付資料番号
In vitro ヒト白血球での新規 PDE4 阻害薬 CC-10004 の抗炎症活性：PGE2 誘発環状アデノシン 1 リン酸（cAMP）上昇に及ぼす影響	HPBMC 及び好中球	in vitro	Celgene, Warren, NJ	5042-107	評価資料	4.2.1.1.1
NHLF での PDE4 阻害薬及び IMiD の顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）産生に及ぼす影響	TNF-α 刺激 NHLF	in vitro	Celgene, Warren, NJ	5369-006-041	参考資料	4.2.1.4.1
TNF-α 刺激 HUVEC での 16, 16-dimethyl PGE2 の共存、非共存下の CC-10004 並びに CC-4047 の細胞接着分子に及ぼす影響	TNF-α 刺激 HUVEC	in vitro	Celgene, Warren, NJ	5226-086-5265-012	参考資料	4.2.1.4.2
mAb/LPS 誘発実験的マウス関節炎モデルでの抗関節炎活性の評価	雄 BALB/c マウス	経口投与	[redacted] Switzerland	CLG/002/EM	評価資料	4.2.1.1.37-1
mAb/LPS 誘発実験的マウス関節炎モデルでの抗関節炎活性の評価（病理組織学的評価）	雄 BALB/c マウス	経口投与	[redacted]	CLG/002/EM-Histology	評価資料	4.2.1.1.37-2
CC-10004：CIA モデルでの CC-1004 のメトトレキサート（MTX）及びインドメタシンとの併用の評価	雄 BALB/c マウス	経口投与	[redacted] UK	MDCG6	評価資料	4.2.1.4.3
刺激された T 細胞での PDE4 阻害薬 CC-10004 及び CC-11050 のシクロスポリン A、MTX 及びエタネルセプト（ETAN）共存下での関節リウマチ及び乾癬に関連するサイトカイン産生に及ぼす影響	抗 CD3mAb 刺激 T 細胞及び SEB 処置 HPBMC	in vitro	Celgene, Summit, NJ	5589-97	評価資料	4.2.1.4.4
アプレミラスト併用 MTX による乾癬様症状の治療	Beige-SCID マウスに移植した健常人ドナーの皮膚	経口投与	[redacted] Israel	TECH10282009	評価資料	4.2.1.4.5
In vitro 初代培養軟骨細胞及び関節リウマチ滑膜線維芽細胞での CC-10004 及び CC-11050 の抗リウマチ薬併用及び非併用時の滑膜マーカーに及ぼす影響	IL-1+IL-6+IL-6R 刺激初代培養ヒト軟骨細胞及び関節リウマチ滑膜線維芽細胞	in vitro	Celgene, Summit, NJ	5673-140	参考資料	4.2.1.1.16

2.6.3.2. 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1. In vitro ヒト白血球での新規ホスホジエステラーゼ（PDE）4 型阻害薬 CC-10004 の抗炎症活性

2.6.3.2.1.1. ホスホジエステラーゼ 4 特異性試験

試験系	in vitro U937 ヒト単球性細胞由来及びラット脳由来 PDE4、ウシ PDE1、ヒト血小板由来 PDE2、PDE3 及び PDE5、ウシ網膜桿体外節由来 PDE6、Hut78 ヒト T 細胞由来 PDE7、HUVEC 由来 PDE11
被験物質	アプレミラスト
投与量	0.001～100 μmol/L
処置期間	30 分間
特記すべき所見	アプレミラストはヒト単球性細胞 U937 から単離した PDE4 に対し 74 nmol/L の 50%阻害濃度（IC_{50}）の阻害作用を示した。また、アプレミラストはラット脳由来 PDE4 の高親和性ロリプラム結合部位（HARBS）に結合する（IC_{50} = 23 nmol/L）。アプレミラスト（10 μmol/L）は PDE4 を他の PDE（PDE1、PDE2、PDE3、PDE5、PDE6、PDE7 及び PDE11）よりも約 279～40,000 倍選択的に阻害した。アプレミラスト（*S*-エナンチオマー）は、その *R*-エナンチオマーである CC-10007（IC_{50} = 611 nmol/L）より約 8 倍強い PDE4 阻害作用を有した。
添付資料番号	4.2.1.1.1

2.6.3.2.1.2. 細胞系アッセイでのサイトカイン調節

試験系	in vitro LPS 及び SEB 刺激 HPBMC ザイモサン A、fMLP 刺激好中球 LPS 刺激ヒト全血 抗 CD28 及び抗 CD3mAb 刺激 $CD4^+$T 細胞 IL-1β 刺激 HUVEC
被験物質	アプレミラスト
投与量	0.001～100 μmol/L
処置期間	30 分間
特記すべき所見	アプレミラストは HPBMC で、LPS 誘発性 TNF-α 産生及び IL-12 産生を抑制した（それぞれ、IC_{50} = 77、140 nmol/L）。また、SEB 誘発性 IFN-γ 及び IL-2 産生を抑制（それぞれ、IC_{50} = 46、291 nmol/L）し、IL-1β 誘発性 TNF-α 産生を抑制（IC_{50} = 83 nmol/L）し、LPS 誘発性 IL-10 産生を促進した。 アプレミラストは、全血での LPS 誘発性 TNF-α 産生を抑制した（IC_{50} = 294 nmol/L）。さらに、アプレミラストは $CD4^+$ T 細胞による IL-5 産生を抑制し（IC_{50} = 890 nmol/L）、好中球では fMLP 誘起ロイコトリエン B4（LTB4）を抑制した（IC_{50} = 2.5 nmol/L）。また、fMLP による CD18 及び CD11b の遺伝子発現を抑制し（それぞれ、IC_{50} = 390、74 nmol/L）、HUVEC への接着を抑制（IC_{50} = 150 nmol/L）、ザイモサン誘起 IL-8 産生を抑制した（IC_{50} = 94 nmol/L）。アプレミラストは HUVEC で、IL-1β 誘起酸化窒素産生を部分的に抑制した（87%）
添付資料番号	4.2.1.1.1

2.6.3.2.2. Celgene 社の 4 化合物に対する酵素阻害試験

試験系	in vitro 種々の遺伝子組換えヒト PDE
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050、CC-14039、CC-14082
投与量	10 μmol/L
処置期間	60 分間
特記すべき所見	アプレミラストの PDE 特異性について遺伝子組換えヒト PDE を用いて評価した。本試験系で、アプレミラストは PDE4（A1A、B1、B2、C1、D2）に対して平均約 95%（範囲：91%～99%）の阻害を示し、PDE4 での選択性は明確ではなかった。また、評価した他の PDE に対しては、アプレミラストは有意な阻害活性を示さなかった。
添付資料番号	4.2.1.1.2

2.6.3.2.3. ホスホジエステラーゼ阻害試験：Celgene 社の 6 化合物に対する酵素阻害試験

試験系	in vitro 遺伝子組換えヒト PDE4
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050、CC-13066、CC-16052、CC-10082、CC-14064、陽性対照（ロリプラム）
投与量	0.001～10 μmol/L
処置期間	60 分間
特記すべき所見	アプレミラストの PDE4A1A、B1、B2、C1、D2、D3 及び D7 に対する IC_{50} はそれぞれ、14、43、27、118、33、28 及び 30 nmol/L であった。
添付資料番号	4.2.1.1.3

2.6.3.2.4. ダイバーシティプロファイル

試験系	in vitro 種々の細胞表面受容体及び複数種の酵素
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）
投与量	10 μmol/L
処置期間	15 分間～24 時間
特記すべき所見	アプレミラスト（10 μmol/L）の 68 種類の細胞表面受容体への結合プロファイル及び 17 種類の酵素に対する阻害プロファイルを調べた。その結果、アプレミラストは試験した受容体及び酵素のいずれに対しても有意な活性を示さなかったが、PDE4 を 95%阻害し、L 型（ベラパミル）カルシウムチャネル受容体への結合を 52%増加させた（アゴニスト結合）。
添付資料番号	4.2.1.1.4

2.6.3.2.5. CC-10004 の in vitro 薬理試験

試験系	in vitro ラット大脳皮質由来 Ca^{2+}チャネル（L 型、ベラパミル結合部位）
被験物質	アプレミラスト
投与量	0.01～30 µmol/L
処置期間	120 分間
特記すべき所見	10 µmol/L のアプレミラストが L 型（ベラパミル）カルシウムチャネル受容体への結合を 52%増加させた（2.6.3.2.4.項）が、本試験ではこの結果は再現されず、偽陽性であると考えられた。
添付資料番号	4.2.1.1.5

2.6.3.2.6. CC-220 及び CC-10004（アプレミラスト）の SelectScreen による生化学的キナーゼプロファイリング

試験系	in vitro キナーゼ／ペプチド混合物
被験物質	アプレミラスト及び CC-220
投与量	10 µmol/L
処置期間	60 分間
特記すべき所見	キナーゼ阻害プロファイルを [redacted] の [redacted] を用いて調べた結果、アプレミラスト（10 µmol/L）は評価した 255 種類のキナーゼに対して明らかな阻害作用を示さなかった。
添付資料番号	4.2.1.1.6

2.6.3.2.7. 単球、ヒト末梢血単核球細胞、Jurkat T 細胞及び THP-1 単球性細胞でのアプレミラストの転写制御並びに遺伝子発現に及ぼす影響

試験系	in vitro Jurkat T 細胞及び THP-1 単球性細胞、LPS 刺激ヒト単球及び HPBMC
被験物質	アプレミラスト
投与量	0.1～10 µmol/L
処置期間	30 分間～6 時間
特記すべき所見	アプレミラストは、プロテインキナーゼ A（PKA）- 環状アデノシン 1 リン酸応答配列結合タンパク（CREB）経路を活性化することにより炎症性／抗炎症性遺伝子の発現を調節して、環状アデノシン 1 リン酸応答配列（CRE）による遺伝子転写の増大及び核内因子-κB（NF-κB）による遺伝子転写の阻害をもたらした。LPS で刺激した HPBMC 及び単球を用いアプレミラストの遺伝子発現に対する作用を評価した結果、アプレミラストによる遺伝子調節の標的が複数特定された。これらには、多くのケモカイン、ケモカイン受容体及びヘルパーT 細胞（Th）1 サイトカイン遺伝子の抑制作用や、抗炎症性因子サイトカインシグナル抑制因子 3（SOCS3）、ケモカイン上皮性好中球活性化ペプチド-78（ENA-78）、並びに成長因子のアンフィレグリン（AREG）及び骨形成タンパク質 6（BMP-6）をコードしている遺伝子の増加作用が含まれる。
添付資料番号	4.2.1.1.7

2.6.3.2.8. ヒト末梢血単核球細胞でのホスホジエステラーゼ 4 阻害薬 CC-10004、CC-11050 及びテトミラスト並びにシクロスポリン A の潰瘍性大腸炎バイオマーカープロファイリング

試験系	in vitro LPS 刺激 HPBMC
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050、テトミラスト、シクロスポリン A
投与量	0.00001～10 μmol/L
処置期間	刺激開始前：1 時間、刺激開始後：18 時間
特記すべき所見	アプレミラストは IFN-γ、インターフェロン-γ 誘導タンパク質-10（IP-10）、インターフェロン-γ 誘導モノカイン（MIG）、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-1 及びミエロイド関連タンパク質（MRP-14）の遺伝子発現を阻害したが、マクロファージ炎症性タンパク質（MIP）-2α の遺伝子発現には影響しなかった。また、IFN-γ、IP-10、MIG 及び TNF-α の産生を阻害したが、MMP-1 発現を促進させた（50%有効濃度［EC_{50}］ = 0.017 μmol/L）。ただし、MMP-1 に対する作用は二相性であり、0.1～1.0 μmol/L では産生は増加したが、10 μmol/L では阻害された。
添付資料番号	4.2.1.1.8

2.6.3.2.9. BioMAP プロファイリング試験

試験系	in vitro HUVEC、冠動脈平滑筋細胞（CASM3C）、ヒト臍帯動脈平滑筋細胞（HSM3C）、HPBMC
被験物質	アプレミラスト
投与量	0.01～10 μmol/L
処置期間	刺激開始前：1 時間、刺激開始後：24 時間
特記すべき所見	アプレミラストは LPS 誘発性 TNF-α 産生（EC_{50}= 0.057 μmol/L）及び T 細胞活性化を強く抑制した。10 μmol/L のアプレミラストはより低い濃度の場合と比較し、おそらく他の標的への影響により、著しく異なったプロファイルを示した。低濃度のアプレミラスト（0.1 及び 1 μmol/L）は PDE4 阻害作用のプロファイルを示した。アプレミラスト（10 μmol/L）は PAI-1 発現及び線維芽細胞増殖に作用したが、その作用は、0.1 μmol/L の濃度では減弱した。
添付資料番号	4.2.1.1.9

2.6.3.2.10. リポ多糖刺激ヒト末梢血単核球細胞でのホスホジエステラーゼ 4 阻害薬 CC-10004、CC-10082、CC-11050、CC-14046 及び CC-14064 の種々のサイトカインプルファイリング

試験系	in vitro LPS 刺激 HPBMC
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-10082、CC-11050、CC-14046 及び CC-14064
投与量	0.001～100 μmol/L
処置期間	刺激開始前：1 時間、刺激開始後：18 時間
特記すべき所見	アプレミラストは LPS 刺激 HPBMC で TNF-α 産生（IC_{50} = 110 nmol/L）、IL-12 産生（IC_{50} = 120 nmol/L）、GM-CSF 産生（IC_{50} = 7800 nmol/L）、MIP-1α 産生（IC_{50} = 440 nmol/L）及び単球遊走タンパク質-1（MCP-1）産生を阻害するが（IC_{50} = 1300 nmol/L））、また、アプレミラストは、IL-6（EC_{50}= 11,000 nmol/L、最大増加率 98%）及び IL-10（EC_{50}= 80 nmol/L、最大増加率 59%）の産生を促進した。アプレミラストは IL-1β、IL-8 及びインターロイキン-8 スーパーファミリーに属するサイトカインの一種（RANTES）を阻害しなかった（IC_{50} > 100 μmol/L）。
添付資料番号	4.2.1.1.10

2.6.3.2.11. TruCulture システムを用いリポ多糖刺激を行ったヒト全血でのアプレミラストのサイトカイン及びケモカイン産生に及ぼす影響

試験系	in vitro ヒト全血
被験物質	アプレミラスト
投与量	0.5 及び 1.5 μmol/L
処置期間	刺激開始前：1 時間、刺激開始後：18 時間
特記すべき所見	アプレミラストは 0.5 及び 1.5 μmol/L の濃度で、LPS 刺激ヒト全血での TNF-α、IL-12/IL-23 p40、IP-10 及び MCP-1 産生に対して有意な阻害作用を示した（$p < 0.001$）。1.5 μmol/L では IL-23 p19 及び総 IL-23 産生に対しても有意な阻害作用を示した（$p < 0.001$）。本測定系で、全血での IL-10 産生に対する作用はみられなかった。また、IFN-γ、IL-12 p70、IL-17A 及び IL-22 は定量限界未満であった。本測定系で IL-12 p70 の定量が不可能であったことから、本測定系で発現した IL-12/IL-23 p40 は主に IL-23 p19 複合体として存在することが示唆された。
添付資料番号	4.2.1.1.11

2.6.3.2.12. リポ多糖刺激ヒト、ラット、マウス及びサル全血での IL-6 産生に及ぼすホスホジエステラーゼ 4 阻害薬 CC-10004、CC-10082（シロミラスト）、CC-11050 及び CC-14064（ロフルミラスト）並びに免疫調整薬（IMiD） CC-5013 の影響

試験系	in vitro LPS 刺激ヒト、ラット（Sprague-Dawley）、マウス（CD-1）及びサル（カニクイザル）のヘパリン処理全血
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、シロミラスト、CC-11050、ロフルミラスト、IMiD CC-5013
投与量	0.01～10 μmol/L
処置期間	刺激開始前：1 時間、刺激開始後：20 時間
特記すべき所見	評価した PDE4 阻害剤は、ラット及びマウスの全血で IL-6 産生をラットで 2～3 倍、マウスで 3～5 倍増加させたのに対し、サルでは一部の PDE4 阻害剤が阻害し（50%）、ヒトでは作用は認められなかった。
添付資料番号	4.2.1.1.12

2.6.3.2.13. CpG-A オリゴデオキシヌクレオチド刺激したヒト末梢血単核球細胞及びヒト形質細胞様樹状細胞でのホスホジエステラーゼ 4 阻害薬 CC-11050 及びアプレミラスト（CC-10004）のインターフェロン-α 及び腫瘍壊死因子-α 産生に及ぼす影響

試験系	in vitro HPBMC 及びヒト形質細胞様樹状細胞（hPDC）
被験物質	アプレミラスト
投与量	0.00001～10 μmol/L／0.01～10 μmol/L
処置期間	刺激開始前：1 時間、刺激開始後：16 時間
特記すべき所見	HPBMC で、アプレミラストは CpG-A ODN 2216 誘発 IFN-α 産生を IC_{50} 値 0.62 μmol/L で阻害し、また、TNF-α 産生を IC_{50} 値 0.12 μmol/L で阻害した。hPDC で、アプレミラストは CpG-A ODN 2216 誘発 IFN-α 及び TNF-α 産生をそれぞれ IC_{50} 値 0.48 μmol/L 及び 0.27 μmol/L で阻害した。
添付資料番号	4.2.1.1.13

2.6.3.2.14. IMiD 及びホスホジエステラーゼ 4 阻害薬の正常ヒト肺線維芽細胞（NHLF）増殖並びにトランスフォーミング増殖因子-β1（TGF-β1）産生に及ぼす影響

試験系	in vitro LPS、TNF-α 及び TGF-β1 刺激 NHLF
被験物質	アプレミラスト
投与量	<0.0001～100 μmol/L
処置期間	刺激開始前：1 時間、刺激開始後： 24 及び 48 時間
特記すべき所見	アプレミラストは、24 時間の[^{3}H]-チミジンアッセイで NHLF に対する弱い抗増殖作用を示した（LPS［1 ng/mL］、TNF-α［10 ng/mL］又は TGF-β1［10 ng/mL］刺激条件下での IC_{50}＞100 μmol/L）。48 時間の[^{3}H]-チミジンアッセイでは、アプレミラストの抗増殖作用が増強し、LPS、TNF-α 及び TGF-β1 刺激条件下での IC_{50} 値は、それぞれ 92、40 及び 52 μmol/L であった。
添付資料番号	4.2.1.1.14

2.6.3.2.15. ホスホジエステラーゼ 4 阻害薬及び IMiD のヒト皮膚線維芽細胞増殖並びにプラスミノーゲン活性化抑制因子 1（PAI-1）産生に及ぼす影響

試験系	in vitro IL-1β、TNF-α 及び IFN-γ 刺激初代培養 HDF
被験物質	アプレミラスト
投与量	0.00001～10 μmol/L
処置期間	刺激開始前：1 時間、刺激開始後： 24～72 時間
特記すべき所見	HDF を IL-1β（1 ng/mL）、TNF-α（5 ng/mL）又は IFN-γ（20 ng/mL）で刺激したとき、アプレミラストは試験範囲の濃度では HDF 生存に対する増殖抑制作用を示さなかった（IC_{50} > 10 μmol/L）。この作用は、0.1 μmol/L では 30%促進され、10 μmol/L では増殖がベースに戻るという二相性を示した。 10 μmol/L のアプレミラストは弱い PAI-1 阻害作用（約 17%の阻害）を有することが示された。
添付資料番号	4.2.1.1.15

2.6.3.2.16. In vitro 初代培養軟骨細胞及び関節リウマチ滑膜線維芽細胞での CC-10004 及び CC-11050 の抗リウマチ薬併用及び非併用での滑膜マーカーに及ぼす影響

試験系	in vitro IL-1+IL-6+IL-6R 刺激初代培養ヒト軟骨細胞及び関節リウマチ滑膜線維芽細胞
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050
投与量	0.1～10 μmol/L
処置期間	刺激開始前：1 時間、刺激開始後：18 時間
特記すべき所見	アプレミラストは IL-1、IL-6 及び IL-6R で刺激した初代培養正常ヒト軟骨細胞での IL-7 遺伝子発現を用量依存的かつ有意に阻害した。アプレミラストは、MTX 及び ETAN よりも強く IL-7 遺伝子発現を阻害した。この試験は、それぞれの最高血漿中濃度を含む用量範囲で実施した。 一方、アプレミラストの効果はプレドニゾロンよりも低かった。また、刺激した初代培養正常ヒト軟骨細胞で、アプレミラストは滑膜組織のバイオマーカーである細胞間接着分子-1（ICAM-1）及びアルファ-v-ベータ-3（αvβ3）インテグリンの発現に対して弱い抑制作用を示した。同様に、IL-1、IL-6 及び IL-6R で刺激した関節リウマチ滑膜線維芽細胞でも、アプレミラストは IL-7 遺伝子発現を用量依存的かつ有意に阻害した。
添付資料番号	4.2.1.1.16

2.6.3.2.17. 抗 CD3 モノクローナル抗体刺激ヒト T 細胞でのホスホジエステラーゼ 4 阻害薬 CC-10004 及び CC-11050 の種々のサイトカインプロファイリング

試験系	in vitro 抗 CD3mAb 刺激ヒト T 細胞
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050
投与量	0.3～5000 ng/mL
処置期間	2 日間
特記すべき所見	プレートに接着した抗 CD3 mAb 刺激初代培養ヒト T 細胞で、アプレミラストは Th1 サイトカイン（GM-CSF、IFN-γ、IL-2、RANTES、TNF-α）と Th2 サイトカイン（IL-5、IL-10、IL-13）両者の産生を阻害し、同様に Th17 サイトカインである IL-17 の産生を阻害した。アプレミラストの T 細胞由来サイトカインに対する阻害の強さの順序は、IL-5> IL-17> IL-10> IL-13> TNF-α> GM-CSF> IFN-γ> IL-2> RANTES であった。これらの結果は、アプレミラストは Th1 サイトカイン産生よりも Th2 サイトカイン産生を強く阻害することを示している。アプレミラストは健康成人で報告されている最高血漿中濃度（C_{max} = 420 ng/mL、7 日目、[5.3.3.1.1 項]）で、Th1 サイトカイン産生を 40%（IL-2、RANTES）～50%（TNF-α）の範囲で、Th2 サイトカイン産生を 65%（IL-13）～100%（IL-5）の範囲でそれぞれ阻害した。
添付資料番号	4.2.1.1.17

2.6.3.2.18. ヒト末梢血単核球細胞での IMiD、ホスホジエステラーゼ 4 阻害薬及びチュブリン阻害薬のシクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）発現及びプロスタグランジン E2（PGE2）産生に及ぼす影響

試験系	in vitro LPS 又は PHA 刺激 HPBMC
被験物質	アプレミラスト
投与量	0～100 μmol/L
処置期間	刺激開始前：1 時間、刺激開始後：20 時間
特記すべき所見	プレートに接着した抗 CD3 mAb 刺激初代培養ヒト T 細胞で、アプレミラストは Th1 サイトカイン（GM-CSF、IFN-γ、IL-2、RANTES、TNF-α）と Th2 サイトカイン（IL-5、IL-10、IL-13）両者の産生を阻害し、同様に Th17 サイトカインである IL-17 の産生を阻害した。アプレミラストの T 細胞由来サイトカインに対する阻害の強さの順序は、IL-5> IL-17> IL-10> IL-13> TNF-α> GM-CSF> IFN-γ> IL-2> RANTES であった。これらの結果は、アプレミラストは Th1 サイトカイン産生よりも Th2 サイトカイン産生を強く阻害することを示している。アプレミラストは健康成人で報告されている最高血漿中濃度（C_{max} = 420 ng/mL、7 日目、[2.6.5.3.3.1.1 項]）で、Th1 サイトカイン産生を 40%（IL-2、RANTES）～50%（TNF-α）の範囲で、Th2 サイトカイン産生を 65%（IL-13）～100%（IL-5）の範囲でそれぞれ阻害した。
添付資料番号	4.2.1.1.18

2.6.3.2.19. 内皮細胞／血小板共培養系でのサリドマイド、IMiD（レナリドミド［CC-5013］、CC-11006 及び CC-10015）並びにホスホジエステラーゼ 4 阻害薬（CC-10004 及び CC-11050）のトロンボキサン B2 及びプロスタサイクリン産生に及ぼす影響

試験系	in vitro LPS 又は PHA 刺激 HPBMC
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050、サリドマイド、レナリドミド（CC-5013）、CC-11006、CC-10015
投与量	共培養系：0.0001～10 μmol/L、カルシウムイオノフォア：0.00001～10 μmol/L
処置期間	刺激開始前：1 時間、刺激開始後：18 時間
特記すべき所見	アプレミラストは HUVEC／血小板共培養系又はカルシウムイオノフォア刺激血小板でのプロスタサイクリン及びトロンボキサン産生に影響を及ぼさなかった。このことから、アプレミラストはこれらの細胞でエイコサノイド産生に影響しないことが示された。
添付資料番号	4.2.1.1.19

2.6.3.2.20. ヒト臍帯静脈内皮細胞でのホスホジエステラーゼ 4 阻害薬 CC-10004 及び CC-11050 のセリンスレオニンキナーゼ Akt リン酸化に及ぼす影響

試験系	in vitro HUVEC
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）及び CC-11050
投与量	0.001～100 μmol/L
処置期間	増殖試験 = 72 時間、Akt リン酸化試験 = 刺激開始前：1 時間、刺激開始後：15 分間
特記すべき所見	アプレミラストは血管内皮細胞増殖因子（VEGF）誘発性の HUVEC 増殖を濃度依存的に阻害したが（IC_{50} = 6.7 μmol/L）、塩基性線維芽細胞増殖因子誘発性の HUVEC 増殖には阻害作用を示さなかった。また、アプレミラスト（100 μmol/L）は Ser473-Akt リン酸化に対して有意な阻害作用を示した。
添付資料番号	4.2.1.1.20

2.6.3.2.21. ヒト臍帯血管リングを用いた IMiD 及びホスホジエステラーゼ 4 阻害化合物の抗血管新生活性スクリーニング

試験系	in vitro ヒト臍帯血管
被験物質	アプレミラスト
投与量	0.01～100 μmol/L
処置期間	4 weeks
特記すべき所見	アプレミラストはヒト臍帯血管での発芽形成を濃度依存的に阻害（IC_{50} = 0.14 μmol/L）した。
添付資料番号	4.2.1.1.21

2.6.3.2.22. 内皮細胞での CC-10004 及び CC-11050 の抗血管新生活性に関する評価

試験系	in vitro HUVECs
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050
投与量	0.01～100 μmol/L
処置期間	30 分間～36 時間、抗 VEGF 作用の試験では 24 時間
特記すべき所見	アプレミラストは、HUVEC で VEGF 誘発性 VEGF 受容体チロシンリン酸化を 100 μmol/L の濃度で阻害したが、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK）のリン酸化には有意な影響を及ぼさなかった。また、アプレミラスト（0.01～10 μmol/L）は、HUVEC で低酸素条件下 30 分間の低酸素誘導因子（HIF）-1α タンパク質発現を 50%～87%阻害し、2 時間ではそれよりやや強い阻害作用を示した（45～92%）。一方、アプレミラスト（0.1～10 μmol/L）は、腫瘍抑制因子 p53 タンパク質発現を 18 時間の時点で約 4～4.5 倍増加させ、36 時間の時点では 2.3～2.9 倍（55～65%減少）の増加となった。このことから、アプレミラストは低酸素条件下での腫瘍抑制因子 p53 タンパク質発現を最長 36 時間増加させることが示唆された。
添付資料番号	4.2.1.1.22

2.6.3.2.23. In vitro 初代培養ヒト破骨細胞及び骨芽細胞でのアプレミラストの影響

試験系	in vitro 骨髄単核球細胞、正常ヒト骨芽細胞
被験物質	アプレミラスト
投与量	0.1～10 μmol/L
処置期間	7 日間
特記すべき所見	アプレミラストは、0.1～1 μmol/L の濃度で破骨細胞形成を有意に阻害した。この作用に伴って、破骨細胞培養液中での可溶性核内因子 κB 活性化受容体リガンド（sRANKL）タンパク質発現の減少がみられた。また、この変化は骨芽細胞培養液中でも認められた。アプレミラストは破骨細胞及び骨芽細胞の両培養液中で sRANKL/オステオプロテゲリン（OPG）タンパク質比を低下させ、その作用は骨芽細胞に対してより顕著であった。 対照的に、ロリプラム、アレンドロネート及びスルファサラジンは sRANKL/OPG タンパク質比に対する作用を示さなかったことから、アプレミラストは異なった機序により作用すると考えられた。これらの結果から、アプレミラストは骨芽細胞の sRANKL タンパク質発現の低下に関与する機序を介して破骨細胞の発現を阻害することにより、乾癬性関節炎などの疾患での骨破壊を抑制する可能性が示されたが、破骨細胞の核内因子 κB 活性化受容体因子（RANK）発現低下といった他の機序も関与する可能性も考えられる。また、アプレミラストはコルチコステロイドの骨異化作用の防御に有用性を示す可能性がある。
添付資料番号	4.2.1.1.23

2.6.3.2.24. CC-10004 の代謝物 M1、M2、M3（ラセミ体）、M5（ラセミ体）及び M7 のホスホジエステラーゼ 4 及び腫瘍壊死因子-α 阻害活性

試験系	in vitro ヒト単球性細胞 U937 から精製した PDE4 及び LPS 刺激 HPBMC
被験物質	アプレミラスト、M1、M2、M3（ラセミ体）、M5（ラセミ体）及び M7
投与量	0.00025～100 μmol/L
処置期間	PDE4 酵素アッセイ = 45 分間 TNF-α 産生アッセイ = 刺激開始前：1 時間、刺激開始後：18～20 時間
特記すべき所見	代謝物 M7 は PDE4 酵素活性及び LPS 刺激 TNF-α 産生に対して強い阻害作用を示した（それぞれ、IC_{50} = 0.16、0.13 μmol/L）。しかし、それらの作用はアプレミラスト（それぞれ、IC_{50} = 0.074、0.077 μmol/L）よりも弱かった。代謝物 M1/M2、M3 及び M5 は PDE4 酵素活性及び LPS 刺激 TNF-α 産生に対し、アプレミラストと比較して阻害活性が低かった。
添付資料番号	4.2.1.1.24

2.6.3.2.25. CC-10004 代謝物 M12（[^{14}C]-*O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体）のホスホジエステラーゼ 4 及び腫瘍壊死因子-α 阻害活性

試験系	in vitro ヒト単球性細胞 U937 から精製した PDE4 及び LPS 刺激 HPBMC
被験物質	アプレミラスト、M12
投与量	0～100 μmol/L
処置期間	PDE4 酵素アッセイ = 45 分間 TNF-α 産生アッセイ = 刺激開始前：1 時間、刺激開始後：18～20 時間
特記すべき所見	ヒト尿から単離した代謝物 M12 は PDE4 酵素活性及び LPS 刺激 TNF-α 産生を阻害した（それぞれ、IC_{50} = 5.5 μmol/L 及び 40%阻害濃度［IC_{40}］= 10 μmol/L）。M12 の活性はアプレミラストと比較し、それぞれ 1/69 及び 1/909 であった。
添付資料番号	4.2.1.1.25

2.6.3.2.26. CC-10004 の代謝物 M3（*S*-エナンチオマー）、M12（合成）、M16 及び M17 のホスホジエステラーゼ 4 及び腫瘍壊死因子-α 阻害活性

試験系	in vitro ヒト単球性細胞 U937 から精製した PDE4 及び LPS 刺激 HPBMC
被験物質	アプレミラスト、M3（*S*-エナンチオマー）、M12、M16、M17
投与量	0～100 μmol/L
処置期間	PDE4 酵素アッセイ = 45 分間 TNF-α 産生アッセイ = 刺激開始前：1 時間、刺激開始後：18～20 時間
特記すべき所見	代謝物 M17 の PDE4 阻害活性（IC_{50} = 0.094 μmol/L）は、アプレミラストの阻害活性（IC_{50} = 0.047 μmol/L）の 1/2 であった。代謝物 M16、M3 及び M12 では、アプレミラストのそれぞれ、1/138、1/177 及び 1/2000 以下であった。M17 は強い TNF-α 産生阻害作用を示し（IC_{50} = 0.021 μmol/L）、その強さはアプレミラスト（IC_{50} = 0.036 μmol/L）の約 2 倍であった。 M3 は、IC_{50} = 5.6 μmol/L で TNF-α 産生阻害活性を示したが、M12 及び M16 は 10 μmol/L で約 24%の阻害を示すのみであった。未変化体と比べ、M3、M12 及び M16 の TNF-α 産生阻害作用はそれぞれ、1/160、1/280 及び 1/280 であった。
添付資料番号	4.2.1.1.26

2.6.3.2.27. CC-10004（アプレミラスト）の代謝物 M14（*N*-脱アセチル、*O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体）のホスホジエステラーゼ 4 及び腫瘍壊死因子-α 阻害活性

試験系	in vitro ヒト単球性細胞 U937 から精製した PDE4 及び LPS 刺激 HPBMC
被験物質	アプレミラスト、M14
投与量	0.0001～100 μmol/L
処置期間	PDE4：45 分間 HPBMC：LPS 刺激開始前 1 時間、刺激開始後 16～18 時間
特記すべき所見	アプレミラストの代謝物 M14（*N*-脱アセチル、*O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体、CC-16793）は 80 μmol/L で 22%の有意な（$p < 0.01$）PDE4 阻害活性を示したが、これはアプレミラストの約 1/40000 の強さであった。 また、M14（0.001～10 μmol/L）はわずかであるが有意な TNF-α 産生阻害作用を示した（8%［$p < 0.05$］～13%［$p < 0.001$］、$IC_{50} > 10$ μmol/L）。アプレミラストと比較すると、M14 の阻害活性は相対的に不活性であった。 以上の結果から、M14 は 80 μmol/L という非常に高濃度でのみ、有意な PDE4 阻害作用を示し、HPBMC での LPS 刺激 TNF-α 産生の阻害作用もごくわずかであった。これらの結果から、M14 はアプレミラストと比較して極めて弱い PDE4 及び TNF-α 産生に対する阻害作用しか持たないと考えられた。
添付資料番号	4.2.1.1.27

2.6.3.2.28. マウスでの新規ホスホジエステラーゼ 4 阻害薬 CC-10004 の抗炎症活性

試験系	in vivo
動物種	BALB/c マウス
雌雄	雌
動物数	n = 4 （1 mg/kg）、n = 2 （0.1 mg/kg）,及び n = 3 （0.01 mg/kg）.
被験物質	アプレミラスト
投与法	単回経口投与
投与量	0.01、0.1 及び 1 mg/kg
投与期間	3.5 時間
特記すべき所見	アプレミラストは LPS 誘発性血清中 TNF-α レベル上昇を抑制した（50%有効用量［ED_{50}］= 0.05 mg/kg）。
添付資料番号	4.2.1.1.1

2.6.3.2.29. 雌 CD ラットに CC-11050 又は CC-10004 を前投与したときのリポ多糖誘発血清腫瘍壊死因子-α に及ぼす影響

試験系	in vivo
動物種	CD ラット
雌雄	雌
動物数	n = 4／各用量群
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050
投与法	単回経口投与
投与量	0.01、0.1、1.0 及び 10 mg/kg
投与期間	2.5 時間
特記すべき所見	アプレミラストは LPS 誘発性血漿中 TNF-α レベル上昇を抑制した（> 80%）。
添付資料番号	4.2.1.1.28

2.6.3.2.30. ラット空気嚢モデルでの好中球浸潤及び腫瘍壊死因子-α 産生に及ぼす CC-11050、CC-10004 又は CC-10082 前投与の影響

試験系	in vivo
動物種	CD ラット
雌雄	雌
動物数	n = 5～6／群
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050
投与法	単回経口投与
投与量	10 mg/kg
投与期間	5 時間
特記すべき所見	アプレミラスト前処置は空気嚢中 TNF-α レベルを 82%低下させた。
添付資料番号	4.2.1.1.29

2.6.3.2.31. ラットを用いたカラゲニン誘発痛覚過敏での CC-2001、CC-4047、CC-5013、CC-11006、CC-10004、CC-11050、CC-401 及び CC-145715 の影響

試験系	in vivo
動物種	Sprague-Dawley ラット
雌雄	雄
動物数	n = 13／群
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-2001、CC-4047、CC-5013、CC-11006、CC-11050、CC-401 及び CC-145715
投与法	単回 IP 投与
投与量	50 mg/kg
投与期間	2、3、4 時間（疼痛閾値試験）3 時間（浮腫試験）
特記すべき所見	アプレミラストは足蹠浮腫の有意に軽減した。このとき、投与 3 時間後の機械刺激及び熱刺激に対する疼痛閾値に生物学的に意味のある上昇が認められた。
添付資料番号	4.2.1.1.30

2.6.3.2.32. ラットを用いたカラゲニン誘発足蹠浮腫での CC-11050、CC-10004、CC-11085 又は CC-100825 前投与の影響

試験系	in vivo
動物種	CD ラット
雌雄	雌
動物数	n = 5／群
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050、CC-11085 又は CC-100825
投与法	単回経口投与
投与量	10 mg/kg
投与期間	4 時間後
特記すべき所見	アプレミラストはカラゲニン注射による足蹠浮腫に対して作用を示さなかった。
添付資料番号	4.2.1.1.31

2.6.3.2.33. マウス II 型コラーゲン誘発性関節炎（CIA）モデル

試験系	in vivo
動物種	DBA/l LacJ マウス
雌雄	雌
動物数	n = 10／群
被験物質	アプレミラスト
投与法	反復経口投与
投与量	1 及び 10 mg/kg/day
投与期間	14 日間
特記すべき所見	CIA モデルで、アプレミラストは 1 mg/kg の用量で足蹠浮腫を 49%抑制し、10 mg/kg の用量では 32%抑制した。
添付資料番号	4.2.1.1.32

2.6.3.2.34. マウスコラーゲン誘発関節炎（CIA）モデルでのホスホジエステラーゼ 4 阻害薬 CC-11050、CC-10004、CC−14046 及び CC-14064 の影響

試験系	in vivo
動物種	DBA/l LacJ マウス
雌雄	雌
動物数	−
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050、CC-14046、CC-14064、インドメタシン
投与法	反復経口投与
投与量	1、5 及び 25 mg/kg/day
投与期間	17 日間
特記すべき所見	アプレミラスト（5 及び 25 mg/kg）は足蹠関節炎パラメータのスコアを有意に抑制した（AP707 試験）。AP830 試験では関節炎重症度が低下する傾向が確認された。特記すべき点として、AP830 試験での溶媒対照群の関節炎重症度は AP707 試験での対照群よりも低かった。
添付資料番号	4.2.1.1.33

2.6.3.2.35. コラーゲン誘発関節炎での CC-10004 及び CC-11050 の治療効果

2.6.3.2.35.1. in vivo 試験

試験系	in vivo
動物種	DBA/1 OlaHsd マウス
雌雄	雄
動物数	n=14／群
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050
投与法	反復 IP 投与
投与量	5 及び 25 mg/kg/day
投与期間	10 日間
特記すべき所見	アプレミラストは両用量でマウスのコラーゲン誘発関節炎（CIA）の臨床的及び組織学的重症度を有効に低下させた。
添付資料番号	4.2.1.1.34

2.6.3.2.35.2. In vitro 試験

試験系	in vitro 関節リウマチ患者の滑膜細胞（1 例のドナー）
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050
投与量	6.25～100 nmol/L
処置期間	48 時間
特記すべき所見	アプレミラストは関節リウマチ患者由来滑膜細胞の TNF-α 産生を阻害した（IC_{50} = 100 nmol/L）。
添付資料番号	4.2.1.1.34

2.6.3.2.36. マウスコラーゲン誘発関節炎モデルでのアプレミラスト投与の TH-17 細胞に及ぼす影響の評価

試験系	in vivo
動物種	DBA/1 マウス
雌雄	雄
動物数	n=18／群
被験物質	アプレミラスト
投与法	反復経口投与
投与量	10 mg/kg/day
投与期間	0～42 日間
特記すべき所見	アプレミラストは有意な抗関節炎効果を示さなかったが、アプレミラスト又は ETAN 投与により足蹠スコア及び測定値の一部低下が認められた。アプレミラスト投与により、鼡径リンパ節（ex vivo 及びウシ II 型コラーゲン存在下での 5 日間培養液）に存在する IL-17 産生細胞の割合（%）は有意に変化しなかったが、14 日目での IFN-γ 及び 14 日目及び 28 日目での IL-6 レベルは有意に上昇した。
添付資料番号	4.2.1.1.35

2.6.3.2.37. モノクローナル抗体／リポ多糖誘発実験的マウス関節炎モデルでの抗関節炎活性の病理組織学的評価

試験系	in vivo
動物種	BALB/c マウス
雌雄	雄
動物数	n=8／群
被験物質	アプレミラスト
投与法	反復経口投与
投与量	1、5 及び 25 mg/kg/day
投与期間	5 日間
特記すべき所見	アプレミラスト（25 mg/kg）はマウスの抗コラーゲン mAb カクテル・LPS 誘発実験的関節炎の複合モデルで有意な抗関節炎効果を示した。病理組織学的評価では、アプレミラスト投与群で関節炎を示唆する所見はほとんどみられなかった。アプレミラストの 25 mg/kg の用量での抗関節炎効果は、デキサメタゾン 1 mg/kg と同程度であった。
添付資料番号	4.2.1.1.36-1、4.2.1.1.36-2

2.6.3.2.38. モノクローナル抗体／リポ多糖誘発実験的マウス関節炎モデルでの抗関節炎活性の病理組織学的評価

試験系	in vivo
動物種	BALB/c マウス
雌雄	雄
動物数	n=8／群
被験物質	アプレミラスト、ETAN
投与法	反復経口投与（アプレミラスト）、反復 IP 投与（ETAN）
投与量	アプレミラスト 5 及び 25 mg/kg/day、ETAN 5 及び 6.25 mg/kg/day
投与期間	11 日間
特記すべき所見	アプレミラスト（5 及び 25 mg/kg）はマウスの抗コラーゲン mAb カクテル・LPS 誘発実験的関節炎の複合モデルで有意な抗関節炎効果を示した。しかしながら、病理組織学的評価では、アプレミラスト投与群で関節炎を示唆する所見は軽微～中等度であったが、これらの変化は統計学的に有意ではなかった。アプレミラストの 5 及び 25 mg/kg 経口投与での抗関節炎効果は、ETAN の 5 及び 6.25 mg/kg IP 投与での効果と同程度であった。
添付資料番号	4.2.1.1.37-1、4.2.1.1.37-2

2.6.3.2.39. モノクローナル抗体／リポ多糖誘発実験的マウス関節炎モデルでの抗関節炎活性の病理組織学的評価

試験系	in vivo
動物種	BALB/c マウス
雌雄	雄
動物数	n=8／群
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）
投与法	反復経口投与
投与量	5 mg/kg/day
投与期間	11 日間
特記すべき所見	アプレミラストはマウスの抗コラーゲン mAb カクテル・LPS 誘発実験的関節炎の複合モデルで有意な抗関節炎効果を示した。病理組織学的評価では、溶媒対照群で認められた関節炎の程度が軽微から軽度であることが示唆された。このため、アプレミラスト投与による抗関節炎効果を確認できなかった。
添付資料番号	4.2.1.1.38-1、4.2.1.1.38-2

2.6.3.2.40. CC-11050 及び CC-10004 による乾癬様症状の治療

試験系	in vivo
動物種	健康成人ドナーの皮膚を異種移植した Beige- SCID マウス
雌雄	雌雄（マウス）
動物数	n=7／群
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050、シクロスポリン
投与法	反復経口投与
投与量	2.5 mg/kg 1 日 2 回（BID）
投与期間	14 日間
特記すべき所見	アプレミラストの投与により、マウス 7 例中 4 例で乾癬様所見の完全／部分的な寛解が認められた。すなわちシクロスポリンと同様、表皮の肥厚、ケラチノサイトの増殖係数の減少をもたらした。また、アプレミラスト投与群では、皮膚移植片中の TNF-α、ICAM-1、ヒト白血球抗原-DR（HLA-DR）発現の定性的減少も認められた。
添付資料番号	4.2.1.1.39

2.6.3.2.41. 雌 SKH-1 マウス皮膚への B 領域紫外線（UVB）照射に対するホスホジエステラーゼ 4 阻害薬アプレミラスト及び CC-11050 の抗アポトーシス作用

試験系	in vivo
動物種	SKH-1 ヘアレスマウス
雌雄	雌（15～20 g）
動物数	n=5／群
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050
投与法	経口投与
投与量	25 mg/kg
投与期間	UVB 照射前 1 時間
特記すべき所見	UVB を照射したアプレミラスト投与群では、TdT- mediateddUTPnickendlabeling 染色（TUNEL）陽性細胞数が溶媒対照群に比し、有意に少ないことが示された（$p < 0.01$）。
添付資料番号	4.2.1.1.40

2.6.3.2.42. 初代培養ヒト新生児表皮ケラチノサイト（HEKn）及び初代培養マウス表皮ケラチノサイト（MEK）でのサリドマイド（CC-2001）、ポマリドミド（CC-4047）、レナリドミド（CC-5013）、アプレミラスト（CC-10004）、CC-10015、CC-11006、CC-11050、CC-13097、CC-15965、CC-16016、CC-16057、CC-16122、CC-16123 及び CC-16125 の B 領域紫外線誘発腫瘍壊死因子-α 産生に対する阻害作用

試験系	in vitro UVB 照射されたヒト及びマウスケラチノサイト
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、サリドマイド（CC-2001）、ポマリドミド（CC-4047）、レナリドミド（CC-5013）、CC-10015、CC-11006、CC-11050、CC-13097、CC-15965、CC-16016、CC-16057、CC-16122、CC-16123 及び CC-16125
投与量	0.1～10 μmol/L
処置期間	UVB 照射 1 時間前
特記すべき所見	アプレミラストは、UVB 照射により誘発された HEKn 細胞からの TNF-α 放出を有意に阻害した（0.1 μmol/L で 62%、1 μmol/L で 91%）。アプレミラストは、軽度な細胞傷害性増加作用を示し、細胞生存率が低下した。 アプレミラストは HEKn 細胞のアポトーシスを 10 μmol/L の濃度で有意に低下（約 18%）させた。抗 TNF-α 抗体は HEKn 細胞の UVB 照射により誘発されるアポトーシスを防御できなかった。したがって、TNF-α は UVB 照射によるアポトーシスの機序に関与しないと考えられた。MEK 細胞では UVB 照射後の TNF-α 放出がアプレミラストによって用量依存的に有意に阻害されたものの、その阻害率の範囲は 65%～74%（$p < 0.0001$～$p < 0.01$）と狭かった。 アプレミラストは UVB 照射による MEK 細胞に対する細胞毒性を 0.1 μmol/L の濃度で 20%、10 μmol/L で 23%有意に阻害した。 1 μmol/L の濃度での MEK 細胞に対する細胞毒性の阻害は 12%であり、有意ではなかった。
添付資料番号	4.2.1.1.41

2.6.3.2.43. マウス T 細胞及び B 細胞移入モデルでの CC-10004 の移入細胞に及ぼす影響の評価

試験系	in vivo
動物種	IgHb マウス
雌雄	雌雄
動物数	n=30／群
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）
投与法	反復経口投与
投与量	5 mg/kg/day
投与期間	14 日間
特記すべき所見	アプレミラストは CD69 及び CD25 に対して有意な作用を示さず、CD86、CD40 及び MHC II の発現も変化させなかった。しかし、免疫感作したマウスへの投与により、活性化 T 細胞上 CD62L のダウンレギュレーションが妨げられた。一方、マウスへのアプレミラストの投与により、in vitro での Tg T 細胞の相対的増殖能は変化せず、また、OVA 特異的 IgG1、IgG2a 及び IgMa 産生に対する有意な作用も認められなかった。
添付資料番号	4.2.1.1.42

2.6.3.3. 副次的薬理試験

2.6.3.3.1. CC-10004（アプレミラスト）はヒトセレブロンと結合しない

試験系	in vitro ヒト U266 多発性骨髄腫細胞
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）
投与量	0.1～100 μmol/L
処置期間	135 分間
特記すべき所見	アプレミラストは内因性ヒト CRBN に結合しないことが示された。
添付資料番号	4.2.1.2.1

2.6.3.3.2. Celgene 社の 5 つのホスホジエステラーゼ 4 阻害薬のラット及びフェレットでの薬物動態学及び ADME データの最終サマリー報告

試験系	in vivo
動物種	Wistar Han ラット及びフェレット
雌雄	雌雄ラット、雄フェレット
動物数	ラットの IV 投与 n = 1、ラットの経口投与 n = 2、フェレットの経口投与 n=3。
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-10083、CC-11050、CC-10036、CC-10037
投与法	ラット：経口投与、IV 投与 フェレット：経口投与
投与量	ラット：10 及び 50 mg/kg、フェレット：0.1～30 mg/kg
投与期間	7 日間
特記すべき所見	ラットにアプレミラストを投与したとき、脳内濃度は一部を除きおおむね血漿中濃度の 10%以下であった。 フェレットにアプレミラスト 10 mg/kg を経口投与したとき、脳／血漿比は 0.06～027 の範囲であった。また、肺／血漿比は 1.4～3.4 の範囲であった。
添付資料番号	4.2.1.2.2

2.6.3.3.3. フェレットの肺好中球増多症及び嘔吐モデルでの治療係数

試験系	in vivo
動物種	フェレット
雌雄	雄
動物数	n=3
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、 CC-10036、CC-10083、CC-10037、CC-11050
投与法	単回経口投与
投与量	0.1～30 mg/kg
投与期間	LPS 処置前 30 分間及び LPS 処置後 6 時間
特記すべき所見	アプレミラストの嘔吐閾値用量は、10 mg/kg であった。空嘔吐を含む嘔吐が認められた 10 及び 30 mg/kg でのフェレット 1 匹あたりの平均嘔吐回数は 0.5 回であった。 アプレミラストの肺好中球増加抑制の ED_{50} は 0.8 mg/kg であったことから、治療係数は 12 と推定された。
添付資料番号	4.2.1.2.3

2.6.3.3.4. In vitro B 細胞性非ホジキンリンパ腫 Farage 細胞株での CC-4047、CC-5013、CC−5079 及び CC-10004 の抗増殖作用

試験系	in vitro B 細胞性非ホジキンリンパ腫細胞
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-4047、CC-5013、CC-5079
投与量	0～100 μmol/L
処置期間	72 時間、1 ウェル当り 1 μCi [^{3}H]-チミジン添加後 6 時間
特記すべき所見	非ホジキンリンパ腫 Farage 細胞でアプレミラストの弱い抗増殖作用が認められた。
添付資料番号	4.2.1.2.4

2.6.3.3.5. 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）誘発大腸炎モデルでの CC-10004、CC-11050 及びテトミラストの効果

試験系	in vivo
動物種	BDF1 マウス（H. Pylori 菌フリー）
雌雄	雄
動物数	n = 10／群
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050、テトミラスト及び 5-アミノサリチル酸
投与法	反復経口投与
投与量	0.25 及び 2.5 mg/kg（BID）
投与期間	3 日間
特記すべき所見	炎症性腸疾患のモデル TNBS 誘発大腸炎マウスで、アプレミラストは体重減少を用量依存的に軽減した。2.5 mg/kg の用量では下痢を軽減、大腸遠位部の粘膜損傷の重症度が陽性対照薬の 5-アミノサリチル酸と同程度まで軽減した。アプレミラストは腸陰窩に対して正の栄養作用を示し、特に陰窩の幅が増加した。アプレミラスト（0.25 mg/kg、BID）はミエロペルオキシダーゼ活性を対照と比べ低下させた。
添付資料番号	4.2.1.2.5

2.6.3.3.6. 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）誘発大腸炎モデルでの CC-10004、CC-11050 及びテトミラストの効果：遺伝子発現分析についての追加解析

試験系	in vivo
動物種	BDF1 マウス（H. Pylori 菌フリー）
雌雄	雄
動物数	n = 5～8
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050 及びテトミラスト
投与法	反復経口投与
投与量	0.25 及び 2.5 mg/kg（BID）
投与期間	3 日間
特記すべき所見	報告書番号 06/218c の試料を用いた遺伝子発現の追加試験で、IP-10 及び MIG の遺伝子発現量は大腸炎の重症度と相関しないことが示された。
添付資料番号	4.2.1.2.6

2.6.3.3.7. ラットリポ多糖誘発肺好中球増多症モデルでのアプレミラストの作用

試験系	in vivo
動物種	CD-IGS ラット
雌雄	雌
動物数	n = 5／群
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050、テトミラスト及び Dexamethasone-21-acetate
投与法	単回経口投与／単回気管内投与
投与量	経口投与：0.1、0.3、1 又は 3 mg/kg、気管支内投与：0.003、0.01、0.03 又は 0.1 mg/kg
投与期間	経口投与：LPS 処置 1 時間前及び処置 4 時間後。気管支内投与：LPS 処置 30 分前及び処置 4 時間後
特記すべき所見	アプレミラストは LPS 刺激後の肺好中球増加を抑制した（ED_{50} = 0.1～0.3 mg/kg）。 アプレミラストの気管内投与は肺好中球増加を抑制し（ED_{50} = 0.003～0.01 mg/kg）、経口投与の約 10 倍強い効力を示した。
添付資料番号	4.2.1.2.7

2.6.3.3.8. マウス卵白アルブミン誘発喘息モデルでのアプレミラストの作用

試験系	in vivo
動物種	BALB/c マウス
雌雄	雄
動物数	n = 5／群
被験物質	アプレミラスト
投与法	反復経口投与
投与量	1、10 及び 25 mg/kg
投与期間	前投与：1 及び 25 mg/kg：7 日間、10 mg/kg：9 日間、OVA 処置：17 日目、OVA 処置前：1 時間、OVA 処置後：試験終了まで
特記すべき所見	アプレミラストは気道過敏性（AHR）を 1 mg/kg で有意に抑制した（$p<0.01$）。 アプレミラストは AHR を OVA 惹起（22 日目）後 24 及び 48 時間後で有意に抑制した（$p<0.05$）。さらに、アプレミラストは肺のマクロファージ、リンパ球、好酸球、IL-4、RANTES 及びエオタキシンレベルを低下させ、また、血漿中イムノグロブリン E（IgE）レベルを低下させた。
添付資料番号	4.2.1.2.8

2.6.3.3.9. マウス卵白アルブミン誘発喘息モデルでの CC-11050 及び CC-10004 の作用

試験系	in vivo
動物種	BALB/c マウス
雌雄	雄
動物数	n = 5／群
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）及び CC-11050
投与法	反復経口投与
投与量	アプレミラスト 1､3 及び 10 mg/kg
投与期間	8 日間
特記すべき所見	アプレミラスト（3 及び 10 mg/kg）はメタコリン誘発性 AHR を有意に抑制した（$p<0.01$）。アプレミラスト処置は気管支肺胞洗浄液中の総白血球数を低下させ、このとき主に影響を受けたのは好酸球であった。アプレミラスト前処置後で上皮下好酸球増加の用量依存的な抑制傾向が認められた。アプレミラストは血漿中 IgE 並びに全肺中 RANTES、IL-4 及びエオタキシンに作用せず、また、杯細胞過形成にも作用しなかった。
添付資料番号	4.2.1.2.9

2.6.3.3.10. 化合物 CG-126（CC-10004）及び CG-127（CC-11050）の MDS Pharma Services による薬理試験データ報告（Celgene 社用）

試験系	Ex vivo Duncan Hartley モルモット気管
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050
投与量	0.0001～1 μmol/L、n = 2／各用量
処置期間	7 分間
特記すべき所見	アプレミラスト（1 μmol/L）は自発張力下のモルモット気管を 64%弛緩させ、EC_{50} 値は 310 nmol/L と推定された。
添付資料番号	4.2.1.2.10

2.6.3.3.11. 能動感作、麻酔下及び人工呼吸下のモルモットでの CC-10004 及び CC-11050 のアレルゲン誘発気管支攣縮に対する作用

試験系	in vivo
動物種	Dunkin Hartley モルモット
雌雄	雄
動物数	n = 10～15／群
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050、サルブタモール
投与法	反復経口投与、サルブタモールは気管内投与
投与量	3 及び 30 mg/kg、サルブタモールは 50 μg/モルモット
投与期間	5 日間
特記すべき所見	アプレミラスト（3 mg/kg）前処置は OVA 誘発性気管支痙攣をわずかに低下させる傾向が認められたが、30 mg/kg では作用は認められなかった。
添付資料番号	4.2.1.2.11

2.6.3.3.12. マウス痛風様腹膜炎モデルでの CC-10004 及び CC-11050 の評価

試験系	in vivo
動物種	C57/B16 マウス
雌雄	雄
動物数	n = 20／群
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050、インドメタシン
投与法	尿酸一ナトリウム投与 0.5 時間前及び 8 時間後に経口投与、インドメタシンは IP 投与
投与量	2.5 及び 12.5 mg/kg、インドメタシンは 5.0 mg/kg
投与期間	16.5 時間
特記すべき所見	アプレミラスト（2.5 及び 12.5 mg/kg）は、尿酸一ナトリウム決勝を IP 投与することにより惹起させた痛風様の炎症に有意な作用を示さなかった。しかしながら、12.5 mg/kg の用量で TNF-α 及び MIP-1α の低下傾向が認められた。
添付資料番号	4.2.1.2.12

2.6.3.3.13. マウス痛風様空気嚢炎症モデルでの CC-10004 及び CC-11050 の評価

試験系	in vivo
動物種	BALB/c マウス
雌雄	雌
動物数	n = 20／群
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050 及びインドメタシン
投与法	尿酸一ナトリウム投与 0.5 時間前及び 8 時間後に経口投与、インドメタシンは IP 投与
投与量	2.5 及び 12.5 mg/kg、インドメタシンは 5.0 mg/kg
投与期間	16.5 時間
特記すべき所見	アプレミラスト（2.5 及び 12.5 mg/kg）は痛風様空気嚢炎症モデルで有意な抗炎症作用を示さなかった。
添付資料番号	4.2.1.2.13

2.6.3.3.14. 皮膚ループス細胞モデルでのホスホジエステラーゼ 4 阻害薬 CC-11050 及びアプレミラスト並びに JNK 阻害薬 CC-930 の 1 型インターフェロンに起因する病態生理に及ぼす影響

試験系	in vitro HPBMC 及び pDC／ヒト成人表皮ケラチノサイト（HEKa）共培養系
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）、CC-11050、CC-930、レナリドミド（CC-5013）、サリドマイド（CC-2001）
投与量	0.25～5 μmol/L
処置期間	刺激開始前 1 時間、刺激開始後：18 時間
特記すべき所見	Toll 様受容体 9（TLR9）刺激下の HPBMC で、アプレミラストの 0.5 μmol/L （C_{max} と同程度）及び 5 μmol/L 処置は、IFN-α 産生を有意に阻害した。アプレミラスト（0.5 μmol/L）は、ケモカイン CXCL9（MIG）、CXCL10（IP-10）、CXCL11（I-TAC）及びシグナル伝達性転写活性化因子 1（STAT1）の遺伝子発現を有意に阻害した。また、2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素様タンパク質（OASL）、リンパ球抗原 6 複合体ローカス E（LY6E）遺伝子の発現も有意に阻害した。HEKa/hPDC 共培養系で、アプレミラストは IFN-α 及び TNF-α タンパク質産生を阻害し、また HEKa 細胞内ミクソウイルス耐性遺伝子 A（MxA）タンパク質発現も阻害した。これらの結果から、アプレミラストの 1 型 IFN 依存性遺伝子及びタンパク質発現に対する薬理作用が、皮膚エリテマトーデスの治療で 1 型 IFN に起因する病態生理を修飾する可能性が示唆された。
添付資料番号	4.2.1.2.14

2.6.3.3.15. CC-10004：筋萎縮性側索硬化症（ALS）マウスモデルである G93A スーパーオキシドジスムターゼ 1（SOD1）マウスでの病態オンセット及び寿命の変化

試験系	in vivo
動物種	B6S JL-TgN（SOD1-G93A）dl 1 Gur マウス
雌雄	雌雄
動物数	n = 10
被験物質	アプレミラスト
投与法	反復経口投与
投与量	食餌 1 g 当たり 0.025 及び 0.05 mg（それぞれ 4 及び 8 mg/kg/day に相当）
投与期間	36～44 日間
特記すべき所見	ALS マウスモデルにアプレミラストを混餌投与したとき、高用量群（8 mg/kg/day［0.005%］）では、雌雄マウスともに臨床症状発現の有意な遅延（4～6 日、$p < 0.05$）及び生存日数の延長（2～4 日、$p = 0.82$）が認められた。アプレミラスト低用量群（4 mg/kg/day［0.0025%］）では、雌で臨床症状発現に変化はなく、生存日数が 13.8 日延長し（$p = 0.20$）、雄でも臨床症状発現に変化はなく、生存日数が 8 日延長した（$p = 0.39$）。低用量群全体としては、臨床症状発現に変化はなく、生存日数が 10.9 日延長した（$p = 0.10$）。アプレミラストを混餌投与したマウスでの血漿中アプレミラスト濃度は、雄よりも雌の方が高かった。また、生存日数と血漿中アプレミラスト濃度には僅かな相関がみられた（$r = 0.26$）。
添付資料番号	4.2.1.2.15

2.6.3.3.16. 神経因性疼痛モデルである Bennett（慢性絞扼損傷）モデルでの被験物質の鎮痛作用の評価

試験系	in vivo
動物種	Sprague Dawley ラット
雌雄	雄
動物数	n = 10
被験物質	アプレミラスト
投与法	反復経口投与
投与量	3 mg/kg（BID）
投与期間	手術（CCI 結紮）後 4 日間
特記すべき所見	自発痛が誘発される機械的アロディニアの検査の結果、いずれの検査時点でもアプレミラストによる疼痛緩和はみられなかった。アロディニアの結果から、アプレミラスト投与群で溶媒対照群に比べて感受性亢進が初回投与日ではみられ、投与 4 日目ではみられなかった可能性が示唆された。
添付資料番号	4.2.1.2.16

2.6.3.4. 安全性薬理試験

2.6.3.4.1. 中枢神経系

評価対象となる組織	中枢神経系
動物種及び系統	CD-1 マウス
性別、動物数／群	雄、n=6
被験物質	アプレミラスト
投与法	反復経口投与
投与量　投与期間	0、500、1000 又は 2000 mg/kg 単回投与
特記すべき所見	2000 mg/kg：1 例死亡 ≥ 1000 mg/kg：臨床症状 無影響量（NOEL）：500 mg/kg
GLP 適用	適
添付資料番号	4.2.1.3.1

2.6.3.4.2. 心血管系及び呼吸系

評価対象となる組織	心血管系及び呼吸系
動物種及び系統	ビーグル犬（麻酔下）
性別、動物数／群	雌雄、n=4
被験物質	アプレミラスト
投与法	静脈内投与
投与量　投与期間	0、0.5、1 又は 5 mg/kg、少なくとも 30 分間隔で低用量から 3 用量投与
特記すべき所見	呼吸器系：影響なし 心血管系： ≥ 1 mg/kg：心拍数及び心収縮力の増加、RR 及び QT 間隔の短縮 無毒性量（NOAEL）：0.5 mg/kg 5 mg/kg まで QTc に影響なし
GLP 適用	適
添付資料番号	4.2.1.3.2

2.6.3.4.3. 心血管系 hERG カリウムチャネル

評価対象となる組織	心血管系 hERG
動物種及び系統	HEK293
性別、動物数／群	各濃度 n = 3、4、3、3 及び 4
被験物質	アプレミラスト
投与法	in vitro
投与量　投与期間	0、16.8、49.7、87.5 又は 249.7 µmol/L 3 分間
特記すべき所見	IC_{50} = 184.2 µmol/L Hill 係数= 1.1
GLP 適用	適
添付資料番号	4.2.1.3.3

2.6.3.4.4. 消化器系

評価対象となる組織	消化器系
動物種及び系統	CD-1 マウス
性別、動物数／群	雄、n=6
被験物質	アプレミラスト
投与法	経口投与
投与量　投与期間	0、10、100 又は 1000 mg/kg 30 分間
特記すべき所見	消化管運動に影響なし 無影響量（NOEL）：1000 mg/kg
GLP 適用	適
添付資料番号	4.2.1.3.4

2.6.3.5. 薬力学的薬物相互作用試験

2.6.3.5.1. In vitro ヒト白血球での新規ホスホジエステラーゼ 4 阻害薬 CC-10004 の抗炎症活性：プロスタグランジン E2（PGE2）誘発環状アデノシン 1 リン酸（cAMP）上昇に及ぼす影響

試験系	in vitro HPBMC 及び好中球
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）
投与量	0.01～100 μmol/L
処置期間	刺激開始前：1 時間、刺激開始後：1 時間
併用薬	PGE2（10 μmol/L）
特記すべき所見	アプレミラストは PGE2 の共存下で、HPBMC 及び好中球の両者で細胞内 cAMP 濃度を用量依存的かつ相乗的に上昇させることが示された。
添付資料番号	4.2.1.1.1

2.6.3.5.2. 正常ヒト肺線維芽細胞でのホスホジエステラーゼ 4 阻害薬及び IMiD の顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）産生に及ぼす影響

試験系	in vitro TNF-α 刺激 NHLF
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）
投与量	0.00001～100 μmol/L
処置期間	刺激開始前：1 時間、刺激開始後：18 時間
併用薬	フォルスコリン（1 及び 10 nmol/L）
特記すべき所見	アプレミラストはフォルスコリン共存下で、NHLF での TNF-α 刺激による GM-CSF 産生を用量依存的かつ相乗的に阻害した。
添付資料番号	4.2.1.4.1

2.6.3.5.3. 腫瘍壊死因子-α 刺激ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）での 16, 16-ジメチルプロスタグランジン E2 の共存、非共存下の CC-10004 並びに CC-4047 の細胞接着分子に及ぼす影響

試験系	in vitro HUVEC
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）
投与量	10 μmol/L
処置期間	刺激開始前：1 時間、刺激開始後：一夜放置
併用薬	PGE2（10 μmol/L）
特記すべき所見	アプレミラストと PGE2 の併用は、TNF-α 誘発 E-セレクチン及び血管細胞接着分子-1（VCAM-1）の発現を有意に阻害した。この結果から、アプレミラストの抗血管新生作用及び抗炎症作用の機序として PGE2 存在下での E-セレクチン及び VCAM-1 の阻害の可能性が示唆された。
添付資料番号	4.2.1.4.2

2.6.3.5.4. モノクローナル抗体／リポ多糖誘発実験的マウス関節炎モデルでの抗関節炎活性の病理組織学的評価：：治療期間延長及びエタネルセプトとの比較に関する病理組織学的報告

試験系	in vivo
動物種	BALB/c マウス
雌雄	雄
動物数	n = 8/群
被験物質	アプレミラスト
投与法	反復経口投与
投与量	アプレミラスト 5 及び 25 mg/kg/day
投与期間	11 日間
併用薬	ETAN 5 mg/kg/day、IP 投与
特記すべき所見	アプレミラストは ETAN との併用により相加的な抗関節炎効果を示し、溶媒対照群に比べ足蹠浮腫を有意に軽減した（$p < 0.01$）。しかしながら、病理組織学的評価では、アプレミラスト（5 mg/kg）による関節炎パラメータの統計学的に有意な改善は認められなかった。
添付資料番号	4.2.1.1.37-1、4.2.1.1.37-2

2.6.3.5.5. CC-10004：コラーゲン誘発関節炎（CIA）モデルでの CC-10004 のメトトレキサート（MTX）及びインドメタシンとの併用の評価

試験系	in vivo
動物種	DBA/1 マウス
雌雄	雄
動物数	n = 10／群
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）
投与法	反復経口投与
投与量	5 mg/kg/day
投与期間	26 日間
併用薬	MTX（1 mg/kg） インドメタシン（3 mg/kg）
特記すべき所見	アプレミラスト単独投与の抗関節炎作用はみられなかった。また、インドメタシン又は MTX の単独投与群とインドメタシン又は MTX とアプレミラストとの併用投与群の間で関節炎スコアの有意差はみられなかった。
添付資料番号	4.2.1.4.3

2.6.3.5.6. 刺激された T 細胞でのホスホジエステラーゼ 4 阻害薬 CC-10004 及び CC-11050 のシクロスポリン A、メトトレキサート及びエタネルセプト共存下での関節リウマチ及び乾癬に関連するサイトカイン産生に及ぼす影響

試験系	in vitro 抗 CD3 mAb 刺激 T 細胞及び SEB 処理 HPBMC
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）
投与量	0.4～1600 ng/mL
処置期間	SEB 処理開始前： 1 時間、処理開始後：16～18 時間
併用薬	シクロスポリン A、MTX 及び ETAN（0.4～1600 ng/mL）
特記すべき所見	ETAN はヒト抗 CD3 mAb で刺激した T 細胞及び SEB 刺激した HPBMC による TNF-α 産生を、臨床での最高血中濃度（C_{max}）で 90%以上阻害した。 一方、アプレミラストは T 細胞での TNF-α 産生を、1 日 1 回 20 mg を投与したときの C_{max}（約 420 ng/mL）付近で約 60%阻害した。最低血漿中濃度（約 4.9 ng/mL）近傍の濃度でも約 10%阻害した。 SEB 処置した HPBMC で、アプレミラストは少なくとも 1 つの濃度で IL-10、IP-10、MIP-1α、MIP-1β 及び TNF-α 産生に対してシクロスポリン A との併用により相乗的に阻害を示した。 また、アプレミラスト及び ETAN の併用は、IL-10、IP-10 及び MIP-1α 産生を相乗的に阻害したが、MIP-1β 及び TNF-α 産生に対しては非相加的に阻害した。さらに、アプレミラストと MTX の併用は、これら 5 種類のサイトカインを非相加的に阻害した。
添付資料番号	4.2.1.4.4

2.6.3.5.7. アプレミラスト併用メトトレキサートによる乾癬様症状の治療

試験系	in vivo
動物種	Beige-SCID マウスに移植した健常人ドナーの皮膚
雌雄	雄
動物数	n = 3～5／群
被験物質	アプレミラスト
投与法	反復経口投与
投与量	5 mg/kg/day=2.5 mg/kg（BID）
投与期間	10～14 日
併用薬	MTX（0.3～3 mg/kg、IP）
特記すべき所見	MTX 1 mg/kg とアプレミラストの併用は、マウス 5 匹中 2 匹（40%）で中等度の治療効果を示した。一方、MTX 1 mg/kg の単独投与は症状の回復がみられなかった。これらの結果から、乾癬の治療で MTX とアプレミラストの併用効果は極限られたものと考えられた。
添付資料番号	4.2.1.4.5

2.6.3.5.8. In vitro 初代培養軟骨細胞及び関節リウマチ滑膜線維芽細胞での CC-10004 及び CC-11050 の抗リウマチ薬併用及び非併用時の滑膜マーカーに及ぼす影響

試験系	in vitro IL-1+IL-6+IL-6R 刺激又は非刺激初代培養ヒト軟骨細胞及び関節リウマチ滑膜線維芽細胞
被験物質	アプレミラスト（CC-10004）
投与量	0.1～10 μmol/L
処置期間	刺激開始前：1 時間、刺激開始後：18 時間
併用薬	MTX 及び ETAN（400 及び 1600 ng/mL） プレドニゾロン（300 及び 1600 ng/mL）
特記すべき所見	刺激下の関節リウマチ滑膜線維芽細胞で、アプレミラストは ETAN あるは MTX との併用により、IL-7 発現をアプレミラスト単独投与よりも強く、かつ有意に抑制した。 一方、プレドニゾロンの共存下では、アプレミラスト単独と比較して IL-7 発現を増加させた。
添付資料番号	4.2.1.1.16