ラパリムスゲル0.2%

製造販売承認申請書添付資料

第2部（モジュール2）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

ノーベルファーマ株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 4
2.6.1 緒言 4

略語・略号一覧

略語・略号	内容
mTOR	哺乳類ラパマイシン標的タンパク質（mammalian target of rapamycin）
TSC	結節性硬化症（tuberous sclerosis complex）

試験製剤一覧

製剤	使用された試験（資料番号）	処方
ラパリムスゲル（本剤）	＜[redacted]にて製造＞ 4.2.3.1-1、4.2.3.2-1、4.2.3.2-3、4.2.3.2-4、4.2.3.4-1 参、4.2.3.4-2、4.2.3.5.4-1、4.2.3.6-1、4.2.3.6-2、＜[redacted]にて製造（最終製剤）＞ 4.2.2.2-1、4.2.3.6-3、4.2.3.7-7	シロリムス濃度 0～0.8%のエタノール含有水性ゲル剤。添加物としてカルボキシビニルポリマー、エタノール、トリエタノールアミン、精製水を含む。
	＜大阪大学薬剤部にて製造＞ 4.2.3.2-2、 4.2.3.5.4-2、4.2.3.7-2、4.2.3.7-3、 4.2.3.7-4、4.2.3.7-5 参、4.2.3.7-6 参	大阪大学が製造したシロリムス濃度 0～0.8%のエタノール含有水性ゲル剤。添加物としてカルボキシビニルポリマー、エタノール、[redacted]、精製水を含む。
シロリムス軟膏	＜研究者の施設にて製造＞ 4.2.1.1-1 参 ＜大阪大学薬剤部にて製造＞ 4.2.3.7-5 参	シロリムス濃度 0～0.8%の軟膏。添加物として、ワセリンを含む。
その他のシロリムス外用剤	＜大阪大学薬剤部にて製造＞ 4.2.3.7-5 参、4.2.2.2-1	シロリムス濃度 0～0.8%のイソプロピルアルコール製剤。

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

ラパリムスゲル（以下、「本剤」）0.2%は、ゲル 1 g 中にシロリムス 2 mg を含み、添加物としてカルボキシビニルポリマー、エタノール、トリエタノールアミン及び精製水を含んだ無色透明の外用ゲル剤である。

シロリムスはワイス社（現ファイザー社（米国））により免疫抑制剤として開発され、腎移植における免疫抑制を効能・効果として 1999 年 9 月米国で承認され、現在までに米国を含む海外 97 ヵ国・地域で承認されている。国内ではノーベルファーマ社が 2014 年 7 月に「ラパリムス錠 1 mg」の販売名でリンパ脈管筋腫症を効能・効果とする世界で初めての承認を取得している。

今般、本剤の申請にあたっての対象疾患は結節性硬化症（TSC）に伴う血管線維腫であるが、この疾患に対する効能・効果を取得した治療薬は国内外を問わず未だない。

血管線維腫は、TSC に伴う皮膚病変で過誤腫の一種であり、5 歳以上の結節性硬化症患者の 70～80%以上に認められている[1),2)]。TSC は、その原因遺伝子である TSC1 及び／又は TSC2 の異常により、下流の哺乳類ラパマイシン標的タンパク質（mTOR：mammalian target of rapamycin）の活性化が起こり、細胞の増殖や分化が促進されて、全身に過誤腫が生じる疾患である。従って、mTOR 阻害作用を有するシロリムスを経口投与することにより過誤腫の一種である血管線維腫などの皮膚病変に対する治療効果が期待される。しかしながら、シロリムスを経口投与した場合、間質性肺炎をはじめとする重篤な副作用の発生が憂慮される。今般申請する本剤は皮膚透過性に優れた薬剤である。本剤は、結節性硬化症に伴う皮膚病変の一種である過誤腫（顔面血管線維腫）に対する有効な治療薬となることが期待される。

非臨床試験において、薬理試験に係る効力を裏付ける試験は、シロリムスの局所投与に関して、文献検索をして得られた公表論文を主体にまとめた。安全性薬理試験は、ラパリムス錠の承認申請時に提出済みであることから新たな試験は実施しなかった。薬物動態試験については、安全性薬理試験と同様にラパリムス錠の申請時に経口及び静注投与したときの試験成績（分布、代謝、排泄、相互作用）は提出済みであることから、新たな試験として経皮投与後のシロリムスの血液中動態試験及びヒト皮膚を用いた in vitro 皮膚透過性試験を実施した。毒性試験については、本剤の皮膚への長期投与に対する影響に関する知見がないことから、ラットの 13 週間反復経皮投与毒性試験、サルの 13 週間及び 39 週間反復経皮投与毒性試験のほか、マウスの皮膚二段階発がんモデルによるがん原性試験を実施した。なお、ラットの 26 週間反復投与毒性試験については、ラットの 13 週間反復投与毒性試験で投与経路の違い（経皮又は経口投与）による毒性プロファイルに差がないことから実施しなかった。また、本剤の対象患者には幼児、小児が含まれることから、幼若ラットを用いた試験を実施した。その他、局所刺激性試験、光毒性試験、皮膚感作性、皮膚光感作性試験及び不純物の in silico 変異原性予測についても検討した。なお、毒性試験は検討試験を除いてすべて GLP に準拠して実施した。

2.6.1.1 参考文献

1) 金田眞理, 吉田雄一, 久保田由美子　他.　結節性硬化症の診断基準および治療ガイドライン. 日皮会誌. 2008;118:1667-1676 ＜4.3.1-1 参＞

2) Schwartz RA, Fernández G, Kotulska K, Jóźwiak S. Tuberous sclerosis complex: advances in diagnosis, genetics, and management. J Am Acad Dermatol. 2007;57:189-202 ＜4.3.1-2 参＞

ラパリムスゲル0.2%

製造販売承認申請書添付資料

第2部（モジュール2）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2　薬理試験の概要文

ノーベルファーマ株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.6.2 薬理試験の概要文 4
2.6.2.1 まとめ 4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 4
2.6.2.2.1 マウスの結節性硬化症モデルにおけるシロリムス局所適用による腫瘍縮小作用 . . 4
2.6.2.3 副次的薬理試験 5
2.6.2.4 安全性薬理試験 5
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 5
2.6.2.6 考察及び結論 5
2.6.2.7 参考文献 7

略語・略号一覧

略語・略号	内容
mTOR	哺乳類ラパマイシン標的タンパク質（mammalian target of rapamycin）
PEG	ポリエチレングリコール（polyethylene glycol）
TSC	結節性硬化症（tuberous sclerosis complex）
VEGF	血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth factor）

試験製剤一覧

製剤	使用された試験（資料番号）	処方
ラパリムスゲル（本剤）	＜[redacted]にて製造＞ 4.2.3.1-1、4.2.3.2-1、4.2.3.2-3、4.2.3.2-4、4.2.3.4-1 参、4.2.3.4-2、4.2.3.5.4-1、4.2.3.6-1、4.2.3.6-2、 ＜[redacted]にて製造（最終製剤）＞ 4.2.2.2-1、4.2.3.6-3、4.2.3.7-7	シロリムス濃度 0～0.8%のエタノール含有水性ゲル剤。添加物としてカルボキシビニルポリマー、エタノール、トリエタノールアミン、精製水を含む。
	＜大阪大学薬剤部にて製造＞ 4.2.3.2-2、 4.2.3.5.4-2、4.2.3.7-2、4.2.3.7-3、 4.2.3.7-4、4.2.3.7-5 参、4.2.3.7-6 参	大阪大学が製造したシロリムス濃度 0～0.8%のエタノール含有水性ゲル剤。添加物としてカルボキシビニルポリマー、エタノール、[redacted]、精製水を含む。
シロリムス軟膏	＜研究者の施設にて製造＞ 4.2.1.1-1 参 ＜大阪大学薬剤部にて製造＞ 4.2.3.7-5 参	シロリムス濃度 0～0.8%の軟膏。添加物として、ワセリンを含む。
その他のシロリムス外用剤	＜大阪大学薬剤部にて製造＞ 4.2.3.7-5 参	シロリムス濃度 0～0.8%のイソプロピルアルコール製剤。

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

ヌードマウスの結節性硬化症(TSC)モデルにおいてシロリムスの経皮投与(軟膏を局所塗布)は腫瘍増殖抑制作用を示した。このことから、シロリムス軟膏の局所塗布は結節性硬化症に伴う顔面血管線維腫の治療に対し有効性が期待される治療法と考えられた。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 マウスの結節性硬化症モデルにおけるシロリムス局所適用による腫瘍縮小作用

(添付資料<4.2.1.1-1 参>)

試験では 6 週齢以下のヌードマウス (CD-1nuBR 系) を 64 匹用いた。マウス脇腹の皮内に 2.5×10^6 個の NTC/T2null (Tsc2-/-、Trp53-/-) 細胞を投与して結節性硬化症モデルを作製した。脇腹に発生した腫瘍が目視により確認できた後、caliper を用いて 5 回(月～金曜日の 5 日間)/週、腫瘍サイズを計測した。腫瘍体積の算出は長さ×広さ×広さ×0.5 の公式を用い、腫瘍体積が約 200 mm^3 に達してからシロリムス製剤 (シロリムス軟膏又はシロリムス溶液) 又はその vehicle (基剤のみ) の投与を 3 回／週 (月、水及び金曜日) のスケジュールで実施し、腫瘍体積が 3000 mm^3 になった時点で安楽死させた。腫瘍体積が 200 mm^3 に達しなかった 3 匹及び試験とは無関係の脱水による顕著な体重減少で安楽死させた 1 匹を除き、60 匹を試験結果の解析に用いた。

シロリムス軟膏を作製するにあたっては、シロリムスをエタノールに溶解し、2 種類の濃度のストック溶液を作製し (40 及び 20 mg/mL)、-20℃で保存した。次に 40 及び 20 mg/mL の各ストック溶液 10μL をエッペンドルフチューブに入れ、この中に 50 mg の石油ゼリー(ワセリン)を加えて混合することにより、それぞれシロリムス軟膏 0.8%及び 0.4%とした。これらの軟膏は、綿棒を用いてマウスに塗布した。塗布後の綿棒又はエッペンドルフチューブには調製量の 60%が付着していたことから、実際に適用されるシロリムスの用量は、0.8%軟膏の場合で 0.16 mg、0.4%軟膏の場合では 0.08 mg に相当した。シロリムス軟膏の薬理効果と比較するために、シロリムス溶液をマウスの腹腔内に投与する群 (シロリムス溶液群) を設けた。 シロリムス溶液群におけるシロリムスの投与量は 0.16 mg とした。20 mg/mL のストック溶液を用いて最終的なシロリムスの濃度が 0.8 mg/mL になるよう 5%PEG (ポリエチレングリコール) 及び 5% Tween-80 を含む溶液を加えて希釈した。0.16 mg のシロリムスを投与量するために希釈溶液 0.2 mL を腹腔内に投与した。シロリムスの濃度、投与量、投与部位及び例数は表 2.6.2-1 に示した。

表 2.6.2-1 シロリムスの濃度、例数、投与量、投与方法及び投与部位

各群	例数（匹）	投与量(mg)	投与方法	投与部位
Control（基剤のみ）	12	-	直接塗布	腫瘍
軟膏 0.4%、20 mg	15	0.08	直接塗布	腫瘍
軟膏 0.8%、20 mg	13	0.16	直接塗布	腫瘍

腫瘍体積に対するシロリムス投与後 29 日目の結果を表 2.6.2-2 に示す。シロリムスの投与開始から 29 日目の腫瘍の平均体積は 0.4%直接塗布群で 1568±155 mm^3、0.8%直接塗布群で 1212±118 mm^3 と、それぞれ Control 群の 2736±321 mm^3 に比べ有意に腫瘍体積は縮小した。

表 2.6.2-2 腫瘍体積に対するシロリムスの作用

	各群		
	Control	シロリムス軟膏 0.4%直接塗布	シロリムス軟膏 0.8%直接塗布
29 日目の腫瘍体積(mm^3)	2736±321	1568±155*	1212±118**

Data:mean±SEM、*p=0.0014、**p<0.0001 vs Control 群

以上の結果から、ヌードマウスの結節性硬化症モデルにおいてシロリムス軟膏による局所塗布は腫瘍体積を抑制することが認められた。

2.6.2.3 副次的薬理試験

該当試験を実施していない。

2.6.2.4 安全性薬理試験

該当試験を実施していない。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験を実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

血管線維腫は、結節性硬化症（TSC）に伴う皮膚病変で過誤腫の一種であり、5 歳以上の結節性硬化症患者の 70～80%以上に認められている[1)2)]。TSC の原因は、その遺伝子である TSC1 又は TSC2 の遺伝子変異により、それぞれの遺伝子がコードするタンパク質である hamartin 又は tuberin が異常となり、下流の mammalian target of rapamycin（mTOR）というセリン・スレオニンキナーゼの抑制的制御が不能となることで起こる。すなわち TSC では mTOR が活性化され、

その下流の p70 ribosomal protein S6 kinase（p70S6K）や ribosomal protein S6（S6）などのリン酸化体が増加することで、細胞の増殖・分化が促進されて全身に過誤腫が生じる[3]。また、血管線維腫は血管と間質細胞から構成されており、これらの細胞では血管新生やリンパ管新生を誘導する血管内皮細胞増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor：VEGF）の発現が報告されていることから[4]、腫瘍の血管増生や転移に VEGF が寄与していると考えられる。

シロリムスは、FK506 結合蛋白質に結合して mTOR の活性を阻害することで TSC1 又は TSC2 遺伝子の異常により引き起こされる細胞の増殖を抑制する。さらにシロリムスの VEGF 産生抑制作用も腫瘍の縮小効果に寄与していると考えられる。

海外では TSC 患者の脳腫瘍、腎腫瘍及び肺病変に対し、シロリムスの内服治療が試みられ、良好な治療成績が得られているが、シロリムス投与の中止に伴い腫瘍の再燃が認められる。皮膚病変もこれら腫瘍と同様、mTOR 阻害剤の内服により縮小するが、服用を中止すると再発することが知られている[5]。従って、腫瘍の縮小化を維持するには継続してシロリムスを内服する必要がある。しかしながら、シロリムスの全身投与では免疫抑制作用に伴う種々の副作用が知られており、内服による長期投与は困難であると考えられる[5]。

これらの経緯を踏まえると、結節性硬化症に伴う皮膚病変等に対しては、シロリムスの経皮投与が、有効かつ副作用が少ない投与方法であるとされている。事実、国内及び海外での臨床試験において、TSC に伴う顔面血管線維腫に対するシロリムスの経皮投与が試みられ、有効性が示されている[4)6)7)8)]。効力を裏付ける試験でも、ヌードマウスの結節性硬化症モデルを用いた実験においてシロリムス軟膏 0.4 及び 0.8%を経皮投与したとき、投与後 29 日目の腫瘍体積は有意に減少した（表 2.6.2-2）。シロリムス 0.4 及び 0.8%を非担癌ヌードマウスに経皮投与し、その後 24 時間の血液中濃度を測定したとき、シロリムスの濃度は、それぞれ 5.9±0.5 及び 13.0±2.5 ng/mL であった（添付資料 4.2.1.1-1 参）。これらの濃度は、シロリムスを腎臓移植後の免疫抑制剤として用いたときの血液中濃度（3～15 ng/mL）の範囲内であった。

以上のことから、シロリムスの経皮投与製剤は、結節性硬化症に伴う皮膚病変の一種である過誤腫（顔面血管線維腫）に対し、有効性が期待される外用治療薬であると考えられる。

2.6.2.7 参考文献

1) 金田眞理, 吉田雄一, 久保田由美子 他.　結節性硬化症の診断基準および治療ガイドライン. 日皮会誌. 2008;118:1667-1676 ＜4.3.1-1 参＞

2) Schwartz RA, Fernández G, Kotulska K, Jóźwiak S. Tuberous sclerosis complex: advances in diagnosis, genetics, and management. J Am Acad Dermatol. 2007;57:189-202 ＜4.3.1-2 参＞

3) Chan JY, Wang KH, Fang CL, Chen WY. Fibrous papule of the face, similar to tuberous sclerosis complex-associated angiofibroma, shows activation of the mammalian target of rapamycin pathway: evidence for a novel therapeutic strategy? PLOS ONE. 2014;9(2):e89467 ＜4.3.2-1 参＞

4) Hofbauer GF, Marcollo-Pini A, Corsenca A, et al. The mTOR inhibitor rapamycin significantly improves facial angiofibroma lesions in a patiant with tuberous sclerosis. Brit J Dermatol. 2008;159:473-475 ＜4.3.2-2 参＞

5) Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Nakamura A, Matsumoto S, Katayama I. A topical combination of rapamycin and tacrolimus for the treatment of angiofibroma due to tuberous sclerosis complex (TSC) : a pilot study of nine Japanese patients with TSC of different disease severity. Brit J Dermatol. 2011;165:912-916 ＜4.3.2-3 参＞

6) Koenig MK, Hebert AA, Roberson J, et al. Topical rapamycin therapy to alleviate the cutaneous manifestations of tuberous sclerosis complex. A double-blind, randomized, controlled trial to evaluate the safety and efficacy of topically applied rapamycin. Drugs R D. 2012;12:121-126 ＜4.3.2-4 参＞

7) Truchuelo T, Díaz-Ley B, Ríos L, Alcántara J, Jaén P. Facial angiofibromas treated with topical rapamycin: an excellent choice with fast response. Dermatol Online J. 2012;18:15 ＜4.3.2-5 参＞

8) Tanaka M, Wataya-Kaneda M, Nakamura A, Matsumoto S, Katayama I. First left-right comparative study of topical rapamycin vs.vehicle for facial angiofibromas in patients with tuberous sclerosis complex. Brit J Dermatol. 2013;169(6):1314-8.doi: 10. 1111/bjd.12567. ＜4.3.2-6 参＞

ラパリムスゲル0.2%

製造販売承認申請書添付資料

第2部（モジュール2）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3　薬理試験概要表

ノーベルファーマ株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.6.3 薬理試験概要表 4
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 4
2.6.3.3 副次的薬理試験 5
2.6.3.4 安全性薬理試験 5
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 5

略語・略号一覧

略語・略号	内容
TSC	結節性硬化症（tuberous sclerosis complex）

試験製剤一覧

製剤	使用された試験（資料番号）	処方
ラパリムスゲル（本剤）	＜[redacted]にて製造＞ 4.2.3.1-1、4.2.3.2-1、4.2.3.2-3、4.2.3.2-4、4.2.3.4-1 参、4.2.3.4-2、4.2.3.5.4-1、4.2.3.6-1、4.2.3.6-2、 ＜[redacted]にて製造（最終製剤）＞ 4.2.2.2-1、4.2.3.6-3、4.2.3.7-7	シロリムス濃度 0～0.8%のエタノール含有水性ゲル剤。添加物としてカルボキシビニルポリマー、エタノール、トリエタノールアミン、精製水を含む。
	＜大阪大学薬剤部にて製造＞ 4.2.3.2-2、 4.2.3.5.4-2、4.2.3.7-2、4.2.3.7-3、 4.2.3.7-4、4.2.3.7-5 参、4.2.3.7-6 参	大阪大学が製造したシロリムス濃度 0～0.8%のエタノール含有水性ゲル剤。添加物としてカルボキシビニルポリマー、エタノール、[redacted]、精製水を含む。
シロリムス軟膏	＜研究者の施設にて製造＞ 4.2.1.1-1 参 ＜大阪大学薬剤部にて製造＞ 4.2.3.7-5 参	シロリムス濃度 0～0.8%の軟膏。添加物として、ワセリンを含む。
その他のシロリムス外用剤	＜大阪大学薬剤部にて製造＞ 4.2.3.7-5 参	シロリムス濃度 0～0.8%のイソプロピルアルコール製剤。

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

	試験の種類	動物種/組織	投与方法	報告書発行年及び実施施設	添付資料
効力を裏付ける試験	マウス結節性硬化症モデルにおけるシロリムス経皮投与による腫瘍体積に対する作用	ヌードマウス（CD-1nuBR）	経皮（塗布）	2008 年　米国ブリガム＆ウィメンズ病院、内科部門、トランスレーショナルメディスン部	〈4.2.1.1-1 参〉

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

筆頭著者・雑誌名	表題	試験目的	動物種／被験物質	試験結果	添付資料
Rauktys A, BMC Dermatology 2008,8:1	Topical rapamycin inhibits tuberous sclerosis tumor growth in a nude mouse model	マウス結節性硬化症モデルでの腫瘍体積に対するシロリムスの作用を検討する。	ヌードマウス（CD-1nuBR）／シロリムス	ヌードマウスの腹部側面に 2.5×10^6 個の NTC/T2 null 細胞（TSC2-/-, Trp53-/-）を注入して作製した結節性硬化症モデルにおいて、0.08 及び 0.16 mg のシロリムス経皮投与（局所塗布）は腫瘍増殖抑制作用を示した。このことから、シロリムス軟膏の局所塗布は結節性硬化症に伴う顔面血管線維腫及び他の皮膚病変の治療に有効であることが示唆される。	〈4.2.1.1-1 参〉

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当する試験を実施していない。

2.6.3.4 安全性薬理試験

該当する試験を実施していない。

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験を実施していない。