目次

2.4 非臨床試験の概括評価 5
2.4.1 非臨床試験計画概略 5
2.4.1.1 薬理試験 5
2.4.1.2 薬物動態試験 5
2.4.1.3 毒性試験 6
2.4.1.4 GLP 及びガイドライン適合性 7
2.4.1.5 原薬及び製剤中の不純物，並びに製剤添加物 7
2.4.2 薬理試験 8
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 8
2.4.2.1.1 *In vitro* 試験 8
2.4.2.1.2 *In vivo* 試験 8
2.4.2.2 副次的薬理試験 9
2.4.2.2.1 副次的スプライシング標的の同定 9
2.4.2.2.2 その他酵素，レセプター及びイオンチャネルとの相互作用 9
2.4.2.3 安全性薬理試験 9
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 10
2.4.3 薬物動態試験 10
2.4.3.1 分析法 10
2.4.3.2 吸収 10
2.4.3.3 分布 10
2.4.3.4 代謝 11
2.4.3.5 排泄 11
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 11
2.4.4 毒性試験 11
2.4.4.1 急性毒性試験 11
2.4.4.2 反復投与毒性試験 12
2.4.4.3 遺伝毒性試験 18
2.4.4.4 がん原性試験 18
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 18
2.4.4.6 新生児を用いた試験 19
2.4.4.7 毒性発現の機序に関する試験 20
2.4.4.8 その他の毒性試験 20
2.4.4.9 動物からヒトへの外挿（曝露量，臨床との関連） 20
2.4.5 総括及び結論 23
2.4.6 図表 26
2.4.7 参考文献 26

表一覧

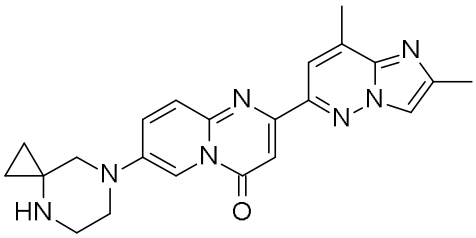
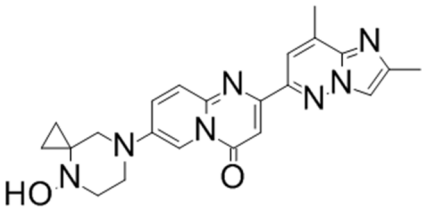
表 2.4.4.9-1 主要な毒性標的器官に対する NOAEL での曝露量と臨床試験での曝露量上限との比較..... 21

略語一覧

略語	英名	和名
5'ss	5' splice site	–
AUC	Area under the concentration-time curve	濃度–時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24h}$	Area under the concentration-time curve from time 0 to 24 h	0～24時間までの濃度–時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24h,\ ss}$	Area under the concentration-time curve from time 0 to 24 h at steady state	定常状態における0～24時間までの濃度–時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳癌耐性蛋白
CL	Clearance	全身クリアランス
C_{max}	Maximum concentration	最高濃度
COX	Cyclooxygenase	シクロオキシゲナーゼ
CYP	Cytochrome P450	シトクロム P450
ERG	Electroretinogram	網膜電図
ESE2	Exonic splicing enhancer 2	–
F	Bioavailability	バイオアベイラビリティ
FMO	Flavin-containing monooxygenase	フラビン含有モノオキシゲナーゼ
FOXM1	Forkhead box protein M1	–
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hERG	Human ether-à-go-go-related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
iPSCs	Induced pluripotent stem cells	人工多能性幹細胞
K_I	Concentration of inhibitor resulting in 50% of the maximum enzyme inactivation	最大不活性化速度の50%の速度をもたらす阻害薬の濃度
K_{inact}	Maximum inactivation rate constant	最大不活性化速度定数
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム型質量分析
MADD	MAP kinase activating death domain	–
MATE	Multidrug and toxin extrusion	–
MATE2-K	Multidrug and toxin extrusion protein 2	–
MDR1	Multidrug resistance 1	–
MMD	Microcystic macular degeneration	小嚢胞性黄斑変性
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NOGEL	No observed genotoxic effect level	遺伝毒性の無影響量
OAT	Organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	Organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	Organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
P-gp	P-glycoprotein	P-糖蛋白
RPE	Retinal pigment epithelium	網膜色素上皮
QWBA	Quantitative whole-body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー

略語	英名	和名
SD-OCT	Spectral domain-optical coherence tomography	スペクトラルドメイン光干渉断層法
SMA	Spinal muscular atrophy	脊髄性筋萎縮症
SRSF6	Splicing factor, arginine/serine-rich 6	–
$t_{1/2}$	Elimination half-life	消失相の半減期
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
VEP	Visual evoked potentials	視覚誘発電位
V_{ss}	Volume of distribution at steady-state	定常状態の分布容積

リスジプラムと代謝物（M1）

名称	化学構造式	化学名
リスジプラム (RO7034067, RG7916) $C_{22}H_{23}N_7O$ MW: 401.46 g/mol		7-(4,7-diazaspiro[2.5]octan-7-yl)-2-(2,8-dimethylimidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl)pyrido-4*H*-[1,2-*a*]pyrimidin-4-one
代謝物 M1 (RO7112063) $C_{22}H_{23}N_7O_2$ MW: 417.46 g/mol		2-(2,8-dimethylimidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl)-7-(4-hydroxy-4,7-diazaspiro[2.5]octan-7-yl)-pyrido[1,2-*a*]pyrimidin-4-one

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

脊髄性筋萎縮症（SMA）を対象とするリスジプラム（以下，リスジプラム又は本薬）の新規治療薬としての妥当性を評価するために，リスジプラムの薬効薬理，薬物動態及び毒性に関する特性を以下の非臨床試験により検討した。

2.4.1.1 薬理試験

リスジプラムの薬理作用及び特異性を *in vitro* 及び *in vivo* の試験で評価した。*In vitro* 試験では，SMA I 型患者由来線維芽細胞*，SMA I 型患者由来線維芽細胞から誘導した運動神経細胞，及び健常ヒト全血細胞を使用し，エクソン7を組込んだ完全長 *SMN2* mRNA の産生に加え，SMN 蛋白量に対するリスジプラムの効果を検討した。SMA I 型患者由来線維芽細胞におけるヒト主要代謝物 M1の *SMN2*のスプライシング修飾への影響も検討した。*In vivo* 薬理試験では，SMA モデルである SMNΔ7マウス及び C/C マウスを用いてリスジプラムの SMN 蛋白の発現及び疾患表現型への影響を検討した。マウスは，ヒト *SMN1*のホモログである *Smn1*のみを保持している。*SMN2*はヒトのみが持つ遺伝子であり，マウスを含め他の動物種には存在しないため，マウスにおける *Smn1*欠損は胎生致死となるが，これらの2種類のモデルマウスではヒト *SMN2* を導入することで，重症度の異なる SMA の疾患表現型が再現されている。

副次的薬理試験では，各種の酵素，レセプター及びイオンチャネル等に対するリスジプラムのオフターゲット標的を検討するとともに，潜在的なスプライシング標的を探索するために SMA I 型患者由来線維芽細胞における包括的なトランスクリプトーム解析を行った。これにより同定された副次的なスプライシング標的に関しては他種の細胞や非臨床毒性試験においても評価した。

安全性薬理に関しては，医薬品規制調和国際会議（ICH）S7A（平成13年6月21日 医薬審発第902号 安全性薬理試験ガイドラインについて）に準拠したコアバッテリー試験として心血管系（カニクイザル），中枢神経系（ラット）及び呼吸系（ラット）に関する試験を実施し，更に *in vitro* 心血管系試験（ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子［hERG］K^+電流に与える影響）も実施した。

2.4.1.2 薬物動態試験

リスジプラムの非臨床薬物動態試験は，主にラット及びカニクイザルを，一部マウス及びウサギを用いて行った。マウス，ラット及びカニクイザルは幼若動物での評価も実施した。これらの動物種は薬理又は毒性試験に用いた動物種である。*In vitro* 代謝試験はラット，カニクイザル及びヒトの肝ミクロソーム，肝細胞，並びに発現系ヒト cytochrome P450（シトクロム P450，CYP）を用いて実施した。薬物相互作用試験のうち CYP に関しては，ヒト肝ミクロソームを用いてリスジプラム及びヒトの主要代謝物である N-水酸化体 M1の阻害能を，ヒト肝細胞を用いて誘導能を *in vitro* で試験した。トランスポーターについては，ヒトの各トランスポーターを発現させた各種細胞でリスジプラム及び代謝物 M1との相互作用の可能性について *in vitro* で評価した。

以下に実施した薬物動態試験項目を示す。

---

* 潜在的なスプライシング標的を探索するための包括的なトランスクリプトーム解析で使用した細胞は，SMA I 型患者由来の PNN1-46細胞である。それ以外の試験で使用した細胞は，試験を実施した際には SMA I 型に分類されていたが，現在では[redacted]の[redacted]により SMA II 型患者由来の細胞へ再分類されている。したがって，以降の SMA I 型患者由来の細胞を用いた試験（包括的トランスクリプトーム解析試験を除く）に関する記載も同様に SMA II 型患者由来の細胞を使用したものである。

1) 吸収
- 野生型又はヒト P-糖蛋白（P-gp，MDR1）を発現させた LLC-PK1 細胞を用いたリスジプラム及び代謝物 M1 の膜透過性評価
- ヒト乳癌耐性蛋白（BCRP）を発現させた MDCKII 細胞を用いたリスジプラム及び代謝物 M1 の膜透過性評価
- 雄ラットにリスジプラムを単回経口及び静脈内投与後の血漿中未変化体濃度評価
- 雄カニクイザルにリスジプラムを単回経口及び静脈内投与後の血漿中未変化体濃度評価
- 幼若ラットにリスジプラムを単回経口投与後の血漿中未変化体濃度評価
- 雄のラット，ウサギ及びカニクイザルにリスジプラムを単回又は反復経口投与後の血漿中未変化体及び代謝物 M1 濃度評価
- 雌雄のラット及びカニクイザルにリスジプラムを反復経口投与後の血漿中未変化体の曝露評価（トキシコキネティクス，TK）

2) 分布
- マウス，ラット，ウサギ，カニクイザル及びヒト血漿における *in vitro* 蛋白結合評価
- 幼若のマウス，ラット及びカニクイザル血漿における *in vitro* 蛋白結合評価
- ラット，カニクイザル及びヒトにおける *in vitro* 血球移行評価
- *In vitro* メラニン結合性評価
- SMA モデルマウス，ラット（白色及び有色）及びカニクイザルにリスジプラムを単回又は反復投与した際の組織内未変化体の分布評価
- ラット（白色及び有色）に本薬の ^{14}C 標識体（以下，[^{14}C] RO7034067）を経口又は静脈内投与後の組織内放射能分布評価（定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）法を使用）
- 妊娠ラットに[^{14}C] RO7034067 を単回経口投与後の組織内放射能分布評価（QWBA 法を使用）

3) 代謝
- *In vitro* 代謝
  ラット，カニクイザル及びヒトの肝ミクロソーム，肝細胞及び CYP 発現系を用いた *in vitro* 代謝評価
- *In vivo* 代謝
  ラット血漿，尿，糞及び胆汁中，並びにカニクイザル血漿中代謝物プロファイルの評価

4) 排泄
- ラット（白色及び有色）に[^{14}C] RO7034067 を単回経口又は静脈内投与後の尿，糞及び胆汁中排泄の評価
- 授乳ラットに[^{14}C] RO7034067 を単回経口投与後の乳汁中排泄の評価

5) 薬物動態学的薬物相互作用
- リスジプラム又は代謝物 M1 による *in vitro* CYP 阻害評価
- リスジプラム又は代謝物 M1 による *in vitro* CYP 誘導評価
- 各トランスポーターの基質又は阻害評価

2.4.1.3 毒性試験

リスジプラムの薬理学的標的はヒトのみに存在する *SMN2*遺伝子であるため，毒性試験で通常用いられる動物種はリスジプラムの薬理学的活性に対して反応性を有さない。ヒト *SMN2*遺伝子のトランスジェニック動物については，多数の動物を入手できないこと，本モデル動物の取り扱い及び実験操作が困難であり，生理学的及び病理学的特徴についても十分な背景データが存在しないことから，リスジプラムの毒性試験において，本モデル動物を使用することは適

切でないと考えられた。このことから，動物を用いた毒性試験データの妥当性については，主に動物及びヒトにおいて生じる本薬の副次的な mRNA スプライシング標的に対して生じる変化に基づき判断した。具体的には，本薬についての SMA 患者由来線維芽細胞，ヒト及びカニクイザルの誘導幹細胞，並びにカニクイザル脾臓組織を用いた検討において，副次的標的遺伝子のスプライシングにそれぞれ類似した変化が認められたことから，カニクイザルがヒトにリスジプラムを投与した際の安全性を外挿する上で，最も適切な動物種と考えられた。その他，本薬の安全性を評価するための動物種として，マウス，ラット及びウサギを使用した。また，SMA に対する治療は主に新生児及び小児を対象とするが，成人の患者も治療対象に含まれることから，リスジプラムの非臨床安全性評価は，成獣及び幼若動物を用いて実施した。

リスジプラムの非臨床毒性試験プログラムを以下に記載する。

- マウス，ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験
- 遺伝毒性試験として，細菌を用いた復帰突然変異試験，*in vitro* 小核試験及び *in vivo* 小核／コメット試験，小核誘発の機序に関する探索的 *in vitro* 試験，並びに *in vivo* での小核誘発に関する用量反応解析
- rasH2 トランスジェニックマウスを用いた 26 週間投与によるがん原性試験
- ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験
- 幼若ラットを用いた反復投与毒性試験
- 毒性発現機序（網膜変性及び副次的スプライシング標的に対する作用）に関する探索的試験（*in vitro* 及び *in vivo*）
- 光毒性試験（*in vitro*）及び皮膚感作性試験

リスジプラムのヒト主要代謝物である N-水酸化体 M1（RO7112063）については，*in vivo* において不安定であり，開発初期においてバリデートされた測定法が使用できなかったため，ラット及びカニクイザルを用いた主要な毒性試験における代謝物 M1の曝露評価はできなかった。その後，代謝物 M1の測定法をバリデートし，毒性試験におけるラット，ウサギ及びカニクイザルの無毒性量（NOAEL）での血漿中 M1曝露量とヒト臨床用量での M1曝露量とを比較した結果，1種類の動物種（ラット）でヒト曝露量の1/2を超えていることを確認した（2.4.3.2）。代謝物 M1については，*SMN2*に対するスプライシング修飾作用を有さず，副次的スプライシング標的，各種受容体及びイオンチャネルに対するオフターゲット作用の評価においても，代謝物 M1に特有の作用がないことを確認した。このことから，代謝物 M1の曝露量に基づく安全性マージンの評価は行わなかった。

なお，本薬の *in vitro* 及び *in vivo* の薬理学的及び毒性学的プロファイルから薬物乱用のリスクは示唆されなかった（2.4.5）ことから，本薬についての独立した薬物乱用性に関する動物試験は実施しなかった。ヒトでの薬物乱用リスクに関連するデータ及び考察については，2.7.4.5.6に記載した。

2.4.1.4 GLP 及びガイドライン適合性

リスジプラムの主要な毒性試験及び安全性薬理試験は，ICH ガイドラインに準拠し，米国食品医薬品局（FDA）の GLP 規制（21 CFR Part 58）又は経済協力開発機構（OECD）の GLP 原則[C(97)186/最終]を遵守し，OECD のデータ相互受入制度のメンバー国において実施した。追加の補足的な毒性，薬理及び薬物動態試験については，科学的かつ綿密な非 GLP 試験として実施した。また，一部の試験については，OECD テストガイドラインも考慮して実施した。

2.4.1.5 原薬及び製剤中の不純物，並びに製剤添加物

主要な毒性試験において用いたリスジプラムは，市販用と同様の合成ルートで製造した原薬ロットを使用した。不純物については，ICH Q3A(R2)（平成14年12月16日 医薬審発第1216001

号 新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドラインの改定について）（一部改正：平成18年12月4日 薬食審査発1204001号）に適合した規格を設定し，市販用の合成ルートで製造した原薬において，安全性確認を必要とする不純物が存在しないことを確認した（3.2.S.3.2.1.1.1）。したがって，不純物に関する追加の毒性評価は必要ないと判断した。また，リスジプラム原薬中の潜在的な遺伝毒性不純物については，ICH M7（平成27年11月10日 薬生審査発1110第3号 潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドラインについて）において規定されている許容値を下回るよう管理されている（3.2.S.3.2.1.1.2）。

リスジプラムの臨床製剤に含まれる添加物について，小児及び成人での使用時における安全性評価を行った結果，経口投与製剤における個々の添加物について，安全性上の懸念がないことを確認した[2)]。安息香酸ナトリウムの小児における潜在的リスク（黄疸）が確認されたが，リスジプラム製剤において含まれる量は少なく，臨床での使用条件下において有害な影響は生じないと考えられた。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

リスジプラムが *SMN2* pre-mRNA の選択的スプライシングを修飾することで，エクソン7を含む完全長 mRNA の産生を促進し，SMN 蛋白量を増加させる効果を *in vitro* 及び *in vivo* の試験で検討した。*In vivo* 試験では重症度の異なる2種類の SMA モデルマウスを用いてリスジプラムの効果を評価した。

2.4.2.1.1 *In vitro* 試験

リスジプラムは SMA I 型患者由来線維芽細胞及び健常ヒト全血細胞において，*SMN2* mRNA の選択的スプライシングを，濃度依存的にエクソン7を含める方向へ是正した。選択的スプライシングの是正は，エクソン7を含んだ完全長 *SMN2* mRNA の増加及びエクソン7を欠失した *SMN2* Δ7 mRNA の減少により確認した。これらの試験における SMN 蛋白量は，両細胞種においてほぼ同程度であり，最大で60～80%増加した。また，リスジプラムは *SMN2*のみに作用し，*SMN1*の発現量に影響を与えなかった。

2.4.2.1.2 *In vivo* 試験

In vivo におけるリスジプラムの効果を検討するために，ヒト *SMN2*を導入した SMA マウスモデルである SMNΔ7マウス及び C/C アレルマウスを使用した。SMNΔ7マウスは，マウス *Smn1* を破壊したホモ接合体に，ヒト完全長 *SMN2*及びエクソン7欠失ヒト *SMN2* (Δ7)を導入したマウスである。SMNΔ7マウスは成熟するまで生存せず，SMA I 型に類似した症状を示す。出生前より症状が発症するため，生後にリスジプラムの投与を開始しても完全に回復することはなく，リスジプラムの高用量投与群においても死亡する個体が存在する。それとは対照的に，C/C アレルマウスは非常に軽度の疾患表現型を示し，生後すぐにリスジプラム投与を開始する必要がある SMNΔ7マウスとは異なり，幼若～成熟期まで投与開始を遅らせて薬力学的解析を行うことができる。両モデルマウスでは，内因性 *Smn1* ヘテロ接合の同腹マウスは SMA に関連した疾患表現型を示さないことから，陽性対照として試験に組み入れた。

リスジプラムの SMNΔ7マウス及び C/C アレルマウスにおける SMN 蛋白の増加作用を評価した。その結果，両モデルマウスの筋肉及び脳における SMN 蛋白の増加が確認され，溶媒投与群と比較して SMNΔ7マウスでは3～3.4倍，C/C アレルマウスでは1.5～2倍となった。C/C アレルマウスでは，高用量投与群の SMN 蛋白量は陽性対照のヘテロ接合体同腹マウスのものと同等まで回復したが，より重篤なモデルである SMNΔ7マウスでは，リスジプラム投与によってもヘテロ接合体の同腹マウスのレベルまでには回復しなかった。

リスジプラムはSMA I型の疾患モデルであるSMNΔ7マウスの平均生存期間を用量依存的に改善した。溶媒投与したSMNΔ7マウスの生存期間中央値は3週間であるが，リスジプラムを投与したSMNΔ7マウスの生存期間中央値は6カ月を超えるまで延長した。生後220日目まで継続した試験では，リスジプラムは生存期間の延長に関連し，体重の増加にも寄与することが明らかとなった。

生後3～14日目のSMNΔ7マウスにリスジプラムを投与することにより，第3～5腰髄（L3～5）のvesicular glutamate transporter 1 (vGlut1) 陽性シナプス数，L4の運動神経軸索数，正常な構造を持つ神経筋接合部の割合，及び長指伸筋の線維サイズを用量依存的かつ有意に増加させることで，神経筋接合部の機能喪失を顕著に抑制した。リスジプラムによる同様の効果は生後3～220日目まで長期投与した試験においても確認しており，リスジプラムはL3～5のvGlut1陽性シナプス数及びL4の脊髄神経腹側軸索数を陽性対照とほぼ同等までに増加させ，神経筋接合部の神経支配及び筋肉の重量も回復させた。また，リスジプラムは，神経筋機能を評価する正向反射を回復させ，尾部及び眼周辺の組織壊死を減少させた。

2.4.2.2　副次的薬理試験

以下の副次的薬理試験を実施し，リスジプラムの特異性を評価した。

1) リスジプラムの*SMN2*以外の副次的スプライシング標的の探索
2) レセプター，酵素及びイオンチャネル等との相互作用

2.4.2.2.1　副次的スプライシング標的の同定

リスジプラムは，転写プロファイリング解析により*SMN2*に対するEC_{90}値である121 nmol/Lにおいて，*STRN3*及び*SLC25A17*の選択的スプライシングに影響を与えることが明らかとなった[1)]。これら2つの遺伝子はEC_{90}値に相当する更に5倍高い濃度（605 nmol/L）においてもスプライシングに変動が認められた。*STRN3*及び*SLC25A17*の選択的スプライシングの変動が機能に与える影響に関する公開情報はない。

リスジプラム（605 nmol/L）は*FOXM1*及び*MADD*を含め11種類の遺伝子のスプライシングに影響を与えたが，遺伝子発現量には影響を与えなかった。*FOXM1*は細胞周期の制御に，また*MADD*はアポトーシスに関与することが知られているため，毒性所見との関わりを2.4.4 毒性試験に記載した。

ヒト主要代謝物M1の*SMN2*及び*FOXM1*に対する*in vitro*でのスプライシング修飾活性を，SMA I型患者由来線維芽細胞を用いて評価した。この細胞において，ヒト主要代謝物M1のスプライシング修飾活性は認められなかった。

2.4.2.2.2　その他酵素，レセプター及びイオンチャネルとの相互作用

リスジプラム及びヒト主要代謝物M1のオフターゲット活性を，酵素アッセイ及び放射性リガンド結合アッセイにて検討した。酵素アッセイではヒト19種，並びに放射性リガンド結合アッセイではヒト69種及びラット13種，計101種類の標的に対して試験を実施した。

酵素アッセイにおいて，リスジプラム及びヒト主要代謝物M1は，10 µmol/Lの濃度でシクロオキシゲナーゼ（COX）1及びCOX2に対して84%を超える阻害を示し，それらのIC_{50}値はいずれも約2（1.8～2.9）µmol/Lであった。また，アセチルコリンエステラーゼに対して77%を超える阻害を示し，そのIC_{50}値は0.6 µmol/L（リスジプラム）及び2.1 µmol/L（代謝物M1）であった。放射性リガンド結合アッセイにおいて，リスジプラム（10 µmol/L）はヒスタミンH_3レセプターに対して78%（IC_{50}値：4.2 µmol/L），ムスカリンM_1レセプターに対して54%（IC_{50}値：6.4 µmol/L）の阻害活性を示したが，代謝物M1（10 µmol/L）による阻害活性は50%未満であった。更に，リスジプラム（10 µmol/L）は初回の放射性リガンドアッセイにおいてδオピオイドレセプターを62%阻害したが，再試験では35%しか阻害しなかった。

2.4.2.3 安全性薬理試験

In vitro 心血管系試験（hERG 試験）において，リスジプラムは最高濃度の4.7 µmol/L（非結合型濃度として約2 µg/mL）で，hERG K^+電流に対する阻害作用を示さなかった。カニクイザルテレメトリー試験では，最高用量の7.5 mg/kg（投与後3時間の血漿中濃度[雌雄合算]：894 ± 236 ng/mL）まで，血圧及び左心室内圧パラメータ，心拍数，心電図，並びに体温への影響は認められなかった。ラットを用いた中枢神経系試験（Irwin 変法）では，最高用量の10 mg/kg まで，一般行動，自律神経系及び運動神経系，並びに体温への影響は認められず，ラットを用いた呼吸系試験（全身プレチスモグラフィ）では，最高用量の9 mg/kg まで，呼吸系パラメータ（1回換気量，分時換気量，呼吸数，最大吸気流量，最大呼気流量，PenH〔気道抵抗の間接的指標〕，吸気時間及び呼気時間）への影響は認められなかった。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 分析法

マウス，ラット，ウサギ及びカニクイザルの血漿並びに組織中のリスジプラム又は主代謝物M1の濃度は，試料を除蛋白後 LC-MS/MS 法を用いて定量した。ラット，ウサギ及びカニクイザルによる TK 試験では，バリデートされた測定法を用い，他の探索的な試験を含む DMPK 試験にはバリデーション試験としては行っていないものの，測定法としての信頼性が確保された方法を用いた。リスジプラムは光に感受性を示すため，操作は遮光下で行った。代謝物 M1は光に感受性を示すと同時に試料保存中及び測定操作中に酸化的分解を受けるため、試料に酸化防止剤としてアスコルビン酸（10 mmol/L）を添加し，操作は氷冷下（約4℃）で行った。これらの操作法は20[redacted]年[redacted]月以降開始の試験に適用した。

[^{14}C] RO7034067を投与後の各組織中放射能濃度は，定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）法で測定し，血液，血漿，尿中等の放射能濃度は，試料を溶解処理後又は直接シンチレーション溶液に混合し，液体シンチレーションカウンター（LSC）で測定した。

2.4.3.2 吸収

リスジプラムは *in vitro* で良好な膜透過性を有し，MDR1の基質にならない。リスジプラムをラット及びカニクイザルに経口投与したとき，これらの動物種のバイオアベイラビリティ（F）はそれぞれ平均で>100%（ラット）及び43%（サル）と良好であった。リスジプラムをラット及びカニクイザルに静脈内投与したとき，これらの動物種において，リスジプラムの全身クリアランス（CL）はおおよそ5～10 mL/min/kg と小さく，消失相の半減期（$t_{1/2}$）は約5 h であった。定常状態の分布容積（V_{ss}）はおおよそ2～3 L/kg と中程度であった。

ラット及びカニクイザルにリスジプラムを26週及び39週間反復経口投与した TK 試験において，曝露量は投与量にほぼ比例して増加し，雌雄の差は認められなかった。最終投与後の曝露量は初回投与後と比較して最大で約3倍であり，顕著な蓄積性は認められなかった。

毒性試験の主な評価動物種であるラット，ウサギ及びカニクイザルの NOAEL での M1曝露量をヒトの臨床用量での M1曝露量と比較した結果，1種類の動物種（ラット）でヒトの曝露量の1/2を超えていた（2.6.4.3.3参照）。

2.4.3.3 分布

リスジプラムの血漿蛋白結合率をヒト，サル，ラット，ウサギ及びマウスで評価した結果，結合率は試験したすべての動物種において類似しており，非結合型分率として10%～16%の範囲であった。ラットの非結合型分率は日齢に依存し，幼若であるほど高かった。一方，ヒトの

血漿蛋白結合率は年齢に依存せず，ほぼ一定であった。

有色ラット及びカニクイザルにリスジプラムを経口投与したときの未変化体の各組織中濃度，及び有色ラットに[^{14}C] RO7034067を経口投与した QWBA 試験の放射能分布結果より，リスジプラム又は放射能のメラニン含有組織（眼の脈絡膜・網膜色素上皮，虹彩及び強膜）への強い親和性が確認された。また，リスジプラムは各組織に広く分布し，標的組織と考えられる脳及び筋肉への分布も認められた。

幼若マウス（生後10日齢）又は C/C アレルマウスにリスジプラムを腹腔内又は経口投与したところ，リスジプラムの脳中曝露は血漿中曝露とほぼ同様であった。

妊娠16日目のラットに[^{14}C] RO7034067を単回経口投与したところ，放射能の胎児への移行が認められた。

2.4.3.4 代謝

リスジプラムの代謝は，ヒトにおいて N-水酸化代謝物 M1への経路，ピペラジン環の開裂による M2，M5及び M7の生成，並びにカルボン酸体 M10及び硫酸抱合体の M18生成といった経路が推定された。各代謝物はラット及びカニクイザルでも認められている。

リスジプラムは肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験系で代謝的に安定であり，ヒト肝ミクロソームと1 h インキュベーション後での試料中未変化体の残存率は89%であった。代謝物では M1（試料中の3.8%）が最も多く認められた。[^{14}C] RO7034067をヒトの肝臓，腎臓及び小腸ミクロソームと NADPH 存在下37°C で60 min インキュベーション後，代謝物プロファイル及び代謝酵素の寄与について評価した結果，代謝の寄与は肝臓が最も大きく，[^{14}C] RO7034067の消失率は肝が24%，次いで腎臓（9%），小腸（2%）の順であった。

リスジプラムは主に代謝によって消失するが，*in vivo* でも比較的安定であり，ラット及びカニクイザルに経口投与後の血漿試料中の薬物存在形態は未変化体が84～99%と主であった。代謝物は定性的には *in vitro* 試験の結果と同様であり，主として M1であった。主要代謝関与酵素はフラビン含有モノオキシゲナーゼ（FMO）及び CYP3A であると考えられた。

2.4.3.5 排泄

[^{14}C] RO7034067を白色及び有色ラットに経口投与後，放射能の排泄は白色及び有色ラットで同様であり，主として糞中に排泄（それぞれ87%及び82%）され，尿中への排泄はそれぞれ約8%及び約7%と少なかった。放射能の排泄は速やかであり，24 h 以内に投与量の65%以上が尿糞中に回収された。168 h までにはケージ洗浄液中の放射能を含めて投与量の94.1%（両ラットの平均）の放射能が回収（糞中：85.4%，尿中：7.74%）された。

授乳ラット（分娩後約10日目）に[^{14}C] RO7034067を単回経口投与後，放射能は乳汁に移行し，乳汁及び血漿中放射能はいずれも投与後2 h にピークを示した。その後それぞれ14及び8 h の半減期で消失した。乳汁中濃度は血漿中に比較して高く，乳汁対血漿中濃度比の平均は1.25～3.5であった。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験系において，リスジプラムは CYP3A4を除く CYP 各分子種に対して阻害も誘導も起こさなかった。リスジプラムは CYP3A4に対しては弱い阻害能を有し，代謝物 M1は CYP3A4に対して時間依存性の阻害能を示した。また，リスジプラムは MDR1，OATP1B1，OATP1B3，OAT1又は OAT3を阻害しなかったが，OCT2，MATE1及び MATE2-K に対する阻害能が認められた。

2.4.4　毒性試験

2.4.4.1　急性毒性試験

リスジプラムの独立した単回投与毒性試験は実施していないが，本薬の急性毒性に関する情報は，反復投与毒性試験又は小核試験（ラット）の高用量投与群において得られている。マウス，ラット，ウサギ及びカニクイザルにおいて，それぞれ最高用量の100，100，16及び20 mg/kg を投与したとき，初回投与翌日までに死亡例は認められなかった。マウスでは，30 mg/kg/日以上で投与4日目以降に一般状態の異常（円背位，活動性低下，立毛又は粗毛等），体重減少及び摂餌量減少（100 mg/kg/日のみ）が認められ，これらの用量では，顕著な網状赤血球の低下が認められた。ラットでは，100 mg/kg/日までの用量を3日間投与したとき，一般状態の異常は認められなかったが，25 mg/kg/日以上で骨髄毒性が認められた。ウサギでは，16 mg/kg/日までの用量を8日間投与したとき，一般状態の異常は認められなかったが，16 mg/kg/日で顕著な摂餌量低下及び軽度の体重減少が認められた。カニクイザルでは，20 mg/kg/日の2日間投与後に重篤な一般状態異常（活動性低下，緩徐な動作，円背位，振戦）及び体重減少（9～12%）が認められ，2回目投与の2日後に安楽死処置を実施した。

2.4.4.2　反復投与毒性試験

主要な反復投与毒性試験として，ラットを用いた26週間まで，及びカニクイザルを用いた39週間までの試験を実施した。また，rasH2トランジェニックマウスを用いた26週間投与によるがん原性試験の用量設定のため，同系の野生型マウスを用いた4週間までの反復投与試験を実施した。

リスジプラムの反復投与毒性試験で認められた毒性学的に意義のある所見は，主に副次的スプライシング標的への作用に関連して，細胞増殖サイクルの速い器官において認められ，すべての有害所見が細胞の代謝回転に依存して回復又は回復傾向を示した。唯一の例外として，カニクイザルにおいて網膜変性が認められたが，この変化は本薬を長期間投与した後の，終末分化した細胞集団に対する影響であり，非可逆的変化と考えられた。

また，リスジプラムの反復投与による死亡又は状態悪化例がマウス，ラット及びカニクイザルで認められたが，いずれの動物種においても消化管及び骨髄への影響が，死亡又は状態悪化の主な原因と考えられた。カニクイザルでは，高用量投与で皮膚に対する重度の影響も認められた。

1)　副次的スプライシング標的に対する作用

副次的薬理試験及び毒性発現の機序に関する試験において，リスジプラムによる *in vitro* 及び *in vivo* での毒性発現に重要と考えられる副次的スプライシングの標的として，*FOXM1*及び *MADD* が同定された（2.4.2.2.1，2.4.4.7）。*FOXM1*は細胞周期，*MADD* はアポトーシスに関連することが知られており，これらの分子に対する作用は細胞周期調節に混乱を生じさせ，上皮細胞にアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。

a.　消化管への影響

ラット2週間投与試験において，7.5 mg/kg/日の雌で，十二指腸，空腸及び回腸の陰窩における軽微なアポトーシス増加が認められた。また，ラット4週間投与試験の9 mg/kg/日では，雌雄の十二指腸，空腸，回腸及び盲腸，並びに雌の直腸にアポトーシス／単細胞壊死の増加が認められた。これらの変化の程度はいずれも概ね軽微～軽度であり，発現頻度も低く，休薬により完全に回復したことから，有害な所見ではないと判断した。ラット26週間投与試験では，3 mg/kg/日以上で十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸，直腸の陰窩及び／又は硬口蓋に軽微な単細胞壊死がみられ，高用量の7.5 mg/kg/日では，より広範かつ高頻度に発生し，同群の早期死亡／安楽死処置例においてこれらの変化がより明らかであった。

ラット26週間投与試験では用量依存的なカリウム及びクロールの低値が観察されており，これらの変化も全身状態悪化と関連している可能性が考えられた。これらの消化管に対する影響は，8週間の休薬期間終了時には認められなかった。また，幼若ラット13週間投与試験の7.5 mg/kg/日では，単細胞壊死（主に回腸及び空腸）が認められた。

カニクイザル2週間用量設定試験（非 GLP）では，6 mg/kg/日の雄の空腸で粘膜固有層の空胞化がみられ，雌の空腸では粘膜固有層のアポトーシス増加が認められた。粘膜固有層のアポトーシス増加は，同試験の用量漸増期間の高用量投与（20 mg/kg/日の2回投与）後においても認められた。なお，引き続いて実施したカニクイザル2週間投与試験（GLP）では，高用量の6 mg/kg/日まで消化管の変化は認められず，39週間投与試験においても，高用量の7.5/5 mg/kg/日まで消化管の変化は認められなかった。

ラット及びカニクイザルを用いた *in vivo* RNA 配列解析における *MADD* 転写産物の変化（2.4.4.7）は，当該用量で消化管上皮にアポトーシスが認められたことに一致していた。

b. 膵臓への影響

ラット26週間投与試験において，消化管所見に加えて膵臓外分泌部上皮における有害でないと考えられる軽微～軽度で可逆的な単細胞壊死が認められた。本所見はすべての用量（1, 3及び7.5 mg/kg/日）で認められ，発現頻度は用量に依存していたが，1及び3 mg/kg/日における頻度は低かった。公表データによると，げっ歯類の膵臓では散発性の単細胞死が認められることがあり，これは正常組織の恒常性維持の一部であり，背景変化と考えられている[3)]。したがって，1及び3 mg/kg/日で認められた変化はラットの背景病変に含まれると考えられ，有害な所見ではないと判断した。なお，7.5/5 mg/kg/日を投与した有色ラット26週間投与試験では，膵臓に対する影響は認められなかった。

c. 皮膚／皮下組織，舌／食道，喉頭への影響

カニクイザル5日間漸増投与試験で20 mg/kg/日の2回目投与後に安楽死処置した個体において，皮膚／皮下組織，舌及び食道における錯角化，舌及び食道の上皮におけるアポトーシス増加，声帯ヒダのびらん／潰瘍，並びに喉頭の側壁上皮のアポトーシスが認められた。また，カニクイザル2週間投与試験の4及び／又は6 mg/kg/日では，声帯ヒダの上皮変性及び喉頭の炎症，並びに喉頭腹側壁のびらん／潰瘍，及び扁平上皮化生が認められた。6 mg/kg/日では，皮膚における錯角化，炎症，びらん／潰瘍及び表皮過形成（肉眼的な表皮剥離と一致）も認められた。これらの所見は2週間の休薬により回復した。カニクイザル39週間投与試験では，高用量の7.5 mg/kg/日で皮膚への影響（紅潮，表皮脱落／剥離）が認められた。この変化は投与10日目以降に明らかとなり，全身状態の悪化がみられたため，投与開始後13日目から2週間にわたり投与を中断した。その後，用量を5 mg/kg/日に減量し投与を再開したが，39週間の投与期間を通じて表皮脱落／剥離が間欠的に観察された。これらの肉眼的所見は，皮膚（眼瞼皮膚を含む）の病理組織学的所見（表皮過形成）と一致していた。皮膚の変化は，22週間の休薬期間中に完全に回復した。

カニクイザルで認められた皮膚，舌／食道及び喉頭の所見における肉眼的及び病理組織学的特徴は，*FOXM1*の調節不全を示したヒト皮膚／ケラチノサイトについての公表データ[4)–6)]と類似していた。表皮で認められた錯角化及び扁平上皮過形成は，リスジプラムの表皮における *FOXM1* mRNA スプライシングへの干渉に対する反応の一つであると考えられた。しかし，表皮過形成を含むこれらの作用は完全な可逆性を示し，また，ラット及びカニクイザルの慢性毒性試験，幼若ラットの13週間投与試験，並びに rasH2トランスジェニックマウスを用いた26週間投与によるがん原性試験において，前がん病変又は腫瘍性病変への進展を示す変化は認められなかった（2.4.4.4）。

d. 胸腺への影響

ラット26週間投与試験において，7.5 mg/kg/日の雌雄で，胸腺のリンパ系細胞の減少が認められ，肉眼的な胸腺の小型及び胸腺重量の低値と一致していた。胸腺の小型は有色ラット26週間投与試験の7.5/5 mg/kg においても認められた（病理組織学的検査は未実施）。カニクイザルでは，2週間投与試験の6 mg/kg/日の雄，及び39週間投与試験の7.5/5 mg/kg/日の雌で，胸腺萎縮，胸腺重量の低値，及び／又は肉眼的な胸腺の小型が認められた（血液学的検査におけるリンパ球減少と一致）。これらの所見は，細胞周期及びアポトーシス因子に対する本薬の副次的なスプライシング作用と一致する。しかしながら，いずれも軽微～軽度の変化であり，休薬により完全に回復したことから，有害な変化でないと考えられた。

e. 血液／骨髄への影響

骨髄は，ラット小核試験において本薬の毒性標的として特定された（2.4.4.3）。高用量（25 mg/kg/日）において，正染性（成熟）赤血球に対する多染性（幼若）赤血球の比率に50%を超える低下が認められ，骨髄毒性が示唆された。ラット4週間投与試験では，最高用量（9 mg/kg/日）の雌のみで，多染性赤血球の割合の平均値に約50%の低下が認められた。しかし，これは骨髄毒性とみなせるほどの明らかな変化ではなく，細胞形態は対照群と概ね同様であった。この所見は明らかにリスジプラム投与に関連していたが，変化の程度は小さく，可逆的であった。マウス4週間投与試験の20/16 mg/kg/日，ラット26週間投与試験の7.5 mg/kg/日，及び有色ラット26週間投与試験の7.5/5 mg/kg/日の投与期間中に認められた一部の死亡／安楽死例では明らかな骨髄毒性が認められ，これらの個体では，組織学的な骨髄細胞減少及び消化管所見が死因と判断された。骨髄の変化は，血液学的検査における白血球，好中球，リンパ球，赤血球パラメータ，網状赤血球及び血小板の減少と関連していた。マウス及びラットでの反復投与による骨髄毒性は，約15,000 ng•h/mL（AUC_{0-24h}）の曝露量との関連が認められた。カニクイザルでは，投与期間が2週間以内の試験において，死亡が発現しない用量での血液学的影響は認められなかった。20 mg/kg/日を2日間経口投与したカニクイザルでは，重篤な全身状態悪化により早期の安楽死処置を行ったが，雌雄の大腿骨及び／又は胸骨で骨髄萎縮が認められ，骨髄細胞減少を特徴としていた。カニクイザル39週間投与試験では，7.5/5 mg/kg/日の雄及び3 mg/kg/日以上の雌で赤血球パラメータの減少が認められ，更に3 mg/kg/日以上の雌雄で網状赤血球の増加，3 mg/kg/日以上の雌で血小板及び血小板容積比率の増加（反応性血小板増多症）が認められた。また，7.5/5 mg/kg/日の雌ではリンパ球の減少も認められた。これらの変化は，骨髄の組織学的変化が認められない用量で発現した。

f. 雄性生殖細胞への影響

ラット26週間投与試験において，3 mg/kg/日以上で精巣の精細管変性／萎縮（重量低値及び肉眼的な小型及び／又は軟化と関連）及び二次的な精巣上体の精子減少（重量低値及び肉眼的な小型と関連）が認められ，7.5 mg/kg/日の雄1例では精巣上体管上皮の変性／壊死も認められた。精巣に対する影響は，有色ラットに7.5/5 mg/kg/日を26週間投与したときの早期死亡例においても確認された。離乳後直ちに（生後22日目）投与を開始した幼若ラット13週間投与試験では，7.5 mg/kg/日で精細管上皮の変性／壊死及びそれに伴う精巣上体の精子減少症／無精子症が認められた。同用量では更に，形態異常を有する精子数の増加と，関連する精子濃度及び精子運動能の低下が認められた。このような所見が認められたにもかかわらず，雄ラットの生殖能は対照群の個体と同様であった。また，生後4～31日目まで投与を行った幼若ラット4週間投与試験では，2.5 mg/kg/日で投与期間終了時の精巣及び精巣上体重量が対照群と比較して低値を示し，病理組織学的検査では，2.5 mg/kg/日のすべての雄で軽微～軽度の精細管上皮変性が認められた。8週間の休薬期間終了時において精巣及び精巣上体重量はわずかに低下したままであったが，病理組織学的な異常は認められず，精子検査及び雄の生殖能にも異常は認められなかった。

カニクイザル2週間投与試験では，高用量の6 mg/kg/日の2例（ともに完全な性成熟個体ではなかった）において，多核細胞を伴う雄性生殖細胞の変性が認められた。中用量（4 mg/kg/日）及び6 mg/kg/日の休薬期間終了時剖検の雄は性的に未成熟であったことから，本試験における精巣毒性の NOAEL は，低用量の2 mg/kg/日と判断した。なお，2週間投与用量設定試験では，3 mg/kg/日の雄1例が性成熟に達しており，同個体では精巣への影響は認められなかった。カニクイザル39週間投与試験については，投与開始時2歳齢の若齢動物を使用したため，ほとんどの個体において，投与期間終了時においても精巣が未成熟の状態であった。このことから，39週間投与試験において，リスジプラムの精巣に対する影響を評価することはできなかった。

精子細胞に対する作用については，回復性を有する減数分裂のパキテン期における特異的な変性性変化が，別の *SMN2*スプライシング修飾薬である RO6885247（本薬の先行化合物として Roche 社により SMA を対象として開発が進められていたが，開発を中止した品目）において報告されている[1)]。これは SMA 患者由来線維芽細胞，ヒト及びカニクイザル iPSCs，並びにカニクイザルの *in vivo* 脾臓組織において，リスジプラム及び RO6885247 に特有な副次的スプライシング標的として，*FOXM1*が同定されたことに一致している。ラットでは，*in vivo* において *FOXM1*のスプライシングバリアントは影響を受けていないと考えられるが，アポトーシス関連遺伝子である *MADD* のスプライシングバリアントに対する影響がみられており，アポトーシス促進性のバリアントである *IG20*の発現増強がみられた。

*FOXM1*は精母細胞に高発現しているが，精祖細胞では発現量が低いことが知られている[6)，7)]。また，*FOXM1*は精母細胞のパキテン期において特異的に発現していると考えられている[8)]。一方，*MADD* は精子形成過程における生殖細胞の細胞死に役割を果たしていると考えられている[9)]。パキテン期精母細胞の枯渇に関する同様の所見は，ラットにメトキシ酢酸を単回投与したときに生じることが報告されている[10)]。この生殖細胞の枯渇は可逆的であり，メトキシ酢酸の単回投与後70日以内に回復し，ラットの精巣におけるすべての精子形成ステージは質的に正常であった。

リスジプラムにおいて認められた所見は，別の*SMN2*スプライシング修飾薬（RO6885247）でみられた所見と一致しており，このことから，クラスエフェクトである可能性が考えられる[11)]。この作用機序として，本薬の主要な副次的スプライシング標的である *FOXM1*及び *MADD* に対する作用の可能性が示唆される。リスジプラムについては，カニクイザルの雄性生殖細胞における詳細なステージ解析を実施していないが，雄性生殖細胞の減数分裂におけるパキテン期において *FOXM1*の発現が著しく高くなることが知られていることから，RO6885247を投与したカニクイザルで認められたパキテン期特異的な細胞周期停止は，リスジプラムにも当てはめることができると考えられる。

2)　網膜変性

本薬に先行して開発されていた別の *SMN2*スプライシング修飾薬である RO6885247では，カニクイザルを用いた39週間投与試験の投与期間終了時における病理組織学的検査により，網膜が毒性の標的として特定された[12)]。RO6885247で観察された網膜所見を考慮し，本薬のカニクイザルを用いた39週間投与試験では，網膜の機能的及び形態学的変化を検出する検査として網膜電図（ERG）及びスペクトラルドメイン光干渉断層法（SD-OCT）を，投与20週目以降（35週目まで3回ずつ実施）及び22週間の休薬期間中（休薬期間の22週目まで3回ずつ実施）に組み入れた。なお，本薬のカニクイザルを用いた2週間投与試験では，最高用量の6 mg/kg/日（個体別の最大曝露量：15100 ng•h/mL [$AUC_{0\text{-}24h}$]）まで，網膜への影響は認められなかった。

39週間投与試験の ERG では，7.5/5 mg/kg/日のほとんどの個体で，ERG 電位の減少が20週目以降の投与期間を通じて認められ，3 mg/kg/日においても軽微な影響が認められた。影響が認められた個体では，桿状体媒介性の暗順応 b 波の明らかな減弱が認められたが，a 波に対する影響は弱かった。このことから，本薬の作用は，視細胞の活性化そのものに対するよりも，網

膜色素上皮（RPE）細胞への作用を介した視細胞の双極性刺激伝達への影響が大きいと推察された。内顆粒層の双極細胞は，小嚢胞腔／空胞が生じた領域に存在し，高い曝露量が得られた7.5/5 mg/kg/日の個体では網膜中心部にも変化が認められた。なお，7.5/5 mg/kg において，視覚誘発電位（VEP）反応に影響はみられなかったことから，網膜神経節細胞の軸索から視床及び大脳皮質への投射は影響を受けていないものと推察された。

SD-OCT では，3及び7.5/5 mg/kg において種々の程度の構造異常（網膜辺縁部における内節／外節の菲薄化及び外顆粒層の高輝度反射及び菲薄化）が認められ，最も影響の強かった個体では，視神経近傍の内顆粒層における小嚢胞領域を特徴とする小嚢胞性黄斑変性（MMD）が認められた。視神経及びその近傍のラインスキャンにおいて，神経網膜外周組織の菲薄化及び視神経乳頭陥凹は認められず，病理組織学的検査で所見が認められなかったことと一致した。眼底自発蛍光（FAF）イメージングでは，最も明らかな変性性変化として，斑点状低蛍光領域及び辺縁部に限局した過蛍光が認められた。暗領域は主に RPE の消失部位に一致し，高輝度領域は RPE の傷害部位で，その傷害が進行していることが示唆された。SD-OCT で検出された構造異常は，ERG における機能異常と良く相関していた。

病理組織学的検査では，3及び7.5/5 mg/kg/日の一部の個体において SD-OCT による画像所見が病理組織学的変化と相関していた。網膜変性は軽微～軽度と判定され，外顆粒層の多巣性の組織崩壊を特徴とし，視細胞の一部消失，RPE 細胞の多巣性肥大，内顆粒層の菲薄化及び空胞化，並びに神経節細胞層の部分的な消失を伴っていた。神経細胞層及び視神経には組織学的変化が認められなかった。7.5/5 mg/kg/日の一部の個体で実施した免疫組織化学的検査により，網膜変性領域において GFAP（グリア線維性酸性蛋白質）の染色性増加を伴う反応性グリオーシスが認められた（この所見は通常の組織学的検査では検出されなかった）。また，電子顕微鏡検査では，網膜辺縁部の組織学的所見（視細胞変性，外顆粒層内の反応性グリオーシスと解釈される細胞の結節状配列，並びに RPE 肥大［大半の顆粒がメラノソーム］）が確認され，メラノソーム構造及び血管には変化は認められなかった。

39週間投与後の22週間の休薬期間中に，辺縁部の視細胞層消失を伴う網膜変性は回復しなかった。しかし，SD-OCT では，MMD の領域が著しく減少し，休薬期間の8週目にはすでに部分的な減少が認められた。白色斑状の過蛍光領域は，休薬期間中に密度が低くなり，わずかに回復したようであった。網膜層の完全性／網膜辺縁部の構築についても休薬期間中にいくらかの改善が認められたが，広範な細胞消失がみられた領域には変化がなかった。影響が認められた個体の4例中3例では，ERG において減弱した a 波及び b 波の正常レベルへの著しい回復が認められ，網膜における電気生理学的反応の機能障害がほぼ完全に回復したことが示唆された。7.5/5 mg/kg/日の1例では，依然として ERG 反応が対照群より低かった。病理組織学的には，視細胞層の消失及び RPE の肥大を伴う網膜変性が依然として認められたが，内顆粒層の空胞化は消失しており，これが ERG 反応の抑制から回復した理由である可能性が考えられた。全体として，SD-OCT 及び病理組織学的検査で構造的異常が特定された個体と，ERG で機能的異常が特定された個体との間には明確な関連性が認められた。7.5 mg/kg/日において，閃光刺激による VEP 反応が依然として認められたことから，本薬により網膜への影響が生じた個体であっても，網膜神経節細胞やその軸索の視覚野への投射が著しく障害されていることはないと考えられた。

カニクイザルにおいて認められた網膜所見を考慮し，ラット26週間投与試験においても ERG の評価を行ったが，本薬投与による明らかな変化は認められなかった。また，有色ラットを用いた探索的26週間投与試験においても ERG 及び SD-OCT を実施したが，本薬投与に関連した所見は認められなかった。いずれの試験においても，網膜に病理組織学的影響は認められなかった。

現時点において，リスジプラム投与による網膜変性の機序は完全には解明されていない。リスジプラムはメラニンを含有する眼組織へ沈着することが確認されている（2.4.3.3）が，同様のメラニン含有組織への沈着が，別の *SMN2*スプライシング阻害剤である RO6885247でも確認

されている[1)]。両化合物とも，ラット及びカニクイザルに投与したときメラニンに強固に結合し，メラニンからの解離は緩徐であることが確認されている。一方，本薬を有色ラットに投与したとき，カニクイザルを上回る高い網膜組織中濃度が確認されたにも関わらず，網膜における変性所見は認められなかった。このことから，これらの化合物のメラニン結合性自体が網膜毒性に関与するものではないと考えられた。メラニンを含有する RPE 細胞株を用いた *in vitro* 試験において，リスジプラムのリソソーム機能及びオートファジーに対する影響が確認されており（2.4.4.7），この結果から，薬物誘発性のリソソーム機能障害及びオートファゴソーム蓄積が RPE 細胞の細胞内成分の分解過程を阻害し，この作用はリスジプラムの薬理学的作用ではなく，物理化学的性質によって引き起こされた可能性が考えられた。

選択的スプライシングは網膜においても重要な役割を果たしていることが知られているが，カニクイザルにおいて認められた網膜毒性は遅延性の毒性であり，一方，選択的スプライシング及びそれに関連する毒性は投与開始後早期に発現する。また，リスジプラム及び別の *SMN2* スプライシング修飾薬において同定された選択的スプライシング標的に対する作用は，カニクイザルにリスジプラムを7日間反復投与した網膜組織において，皮膚及び脾臓組織で認められた変化と比較して強いものではなかった。したがって，網膜毒性は遅延性に発現すること，また，リスジプラムの投与により認められた網膜毒性以外の主要な毒性変化においては，明らかなスプライシング変化を伴っていたことを考慮すると，この選択的スプライシングの変化がカニクイザルで認められた網膜毒性の主たる原因である可能性は低いと考えられた。

3) その他の所見

ラット26週間投与試験のすべての用量（1，3及び7.5 mg/kg/日）において，用量依存的な副腎の暗色化が認められ，病理組織学的には皮質網状帯及び束状帯における細胞内色素沈着（リポフスチン／セロイドと一致し，肉眼的な暗色化と相関）が認められた。同様の変化は，7.5/5 mg/kg/日を投与した有色ラット探索的26週間投与試験においても認められ，幼若ラット13週間投与試験では肉眼的な副腎の暗色化が観察されたが，病理組織学的な相関は認められなかった。ラット26週間投与試験の副腎における変化は，8週間の休薬期間終了時においても同様の頻度及び程度で残存し，変化の持続性が示唆されたが，休薬群の雌では，色素の大半が網状帯に残存しており，束状帯においては部分的な回復性が示唆された。これは，皮質内の細胞がその寿命（8週間の休薬期間より長い）をかけて髄質方向に移動していく生理学的現象と一致している[13)]。また，ラットにおける副腎皮質の細胞交替は雄の方が雌より遅いことが報告されており[14)]，本試験の雄でみられた束状帯の色素沈着についても，長期間にわたる通常の細胞交替の過程で回復するものと考えられた。ラットにおいて認められた上記の副腎の変化は，組織損傷や他の機能的障害を伴っておらず，休薬により回復する変化と考えられたことから，有害な変化ではないと考えられた。

ラット26週間投与試験の3 mg/kg/日以上で子宮重量の低値が認められ，発情周期の停止に一致する発情休止期への移行がみられた。発情休止期は異常な状態を反映するものではなく，これらの個体の病理組織学的検査で他の所見は認められなかったことから，有害な変化ではないと判断された。7.5 mg/kg/日の雌では，休薬期間終了時に子宮重量の低値が持続していたが，病理組織学的な相関はみられなかった。幼若ラット13週間投与試験では，ラット26週間投与試験と同程度の曝露量において子宮／性周期及び雌受胎能に対する影響は認められず，生殖発生毒性試験（出生前及び出生後の発生に関する試験）における出生児の病理組織学的検査においても，卵巣の原子卵胞及び一次卵母細胞数に異常は認められなかった。

ラット26週間投与試験の7.5 mg/kg/日の雄で，軽微～中等度の乳腺萎縮が認められ，Perl 染色でヘモジデリンと確認された細胞内褐色顆粒状色素の増加を伴っていた。この変化は同程度の曝露量が得られた有色ラット探索的26週間投与試験では認められなかった。ホルモンを介した機序の関与を示唆する所見は認められず，ライデッヒ細胞への影響も認められなかったことから，この所見は有害な変化ではないと考えられた。上記の乳腺の変化は，8週間の休薬期間終

了時には認められなかった。

4) 回復性

リスジプラム投与によりラット及びカニクイザルで認められた毒性学的に意義のある所見は，カニクイザルで認められた網膜における視細胞変性を除き，すべての変化が可逆的又は部分的に可逆的であった。

ラット26週間投与試験及び幼若ラット4週間及び13週間投与試験において認められた精巣変性については，部分的な回復性がみられたのみであった。しかし，本薬においてラットでの回復傾向が確認されていること，また，*SMN2*及び副次的スプライシング標的に対してリスジプラムと同様の作用を有する別のスプライシング修飾薬（RO6885247）では，カニクイザルにおいて精巣所見の回復性が確認されていることから，本薬の精巣に対する影響についても，休薬により完全に回復することが予想される。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

リスジプラムは，細菌を用いた試験において変異原性を示さなかった。しかし，マウス及びヒト細胞株を用いた *in vitro* 試験，並びにラット（*in vivo*）の骨髄赤芽球において小核誘発性を示した。リスジプラムを *in vivo* で投与したとき，骨髄での小核を有する細胞を明らかに増加させる高用量においても，肝臓及び空腸における DNA 傷害性は認められなかった。このことから，小核を有する細胞の増加は，リスジプラムの DNA に対する直接的な作用とは異なる間接的な機序により誘発された可能性が示唆された。小核誘発の機序に関する探索的 *in vitro* 試験では，ヒト細胞株での本薬による小核誘発において，アポトーシス（切断型ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ［cleaved PARP］陽性細胞）の著しい増加及び汎カスパーゼ阻害剤の前処理による小核誘発の抑制が認められ，DNA 以外の標的及びアポトーシスの関与が示唆された。この DNA を直接的な標的としない作用機序の詳細は明らかになっていないが，細胞周期制御及びアポトーシス経路誘導に対して干渉する，本薬の副次的スプライシング標的（*FOXM1*）が関連している可能性が考えられた[15),16)]。包括的な統計学的手法に基づき，本薬の *in vivo* での小核誘発に関する遺伝毒性の無影響量（NOGEL）における曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）は，約3000 ng•h/mL と判断された。NOGEL の値は投与期間延長に応じて増加し，幼若動物は成熟動物よりも感受性が高くないことが推察された。

2.4.4.4 がん原性試験

リスジプラムのがん原性について，rasH2トランスジェニックマウスを用いた26週間投与試験により評価した。最高用量の9 mg/kg/日まで，本薬投与によるがん原性を示唆する所見は認められなかった。なお，本薬は生命を脅かす重篤な疾患に対する治療薬であることから，ICH M3(R2)（平成22年2月19日 薬食審査発0219第4号「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」について）及び ICH S1C(R2)（平成20年11月27日 薬食審査発第1127001号 医薬品のがん原性試験に関するガイドラインの改正について）を考慮し，ラットを用いた2年間投与によるがん原性試験は本薬の承認申請後に開始し，当該試験成績を本薬の製造販売承認後に提出予定である。

リスジプラムの主要な副次的スプライシング標的である *FOXM1*及び *MADD* に対する作用は，薬理学的に，腫瘍増殖促進よりも抗腫瘍原性に関連していると推察される。また，リスジプラムの投与により，副次的スプライシング標的を介した腫瘍抑制遺伝子の機能阻害や発がん経路の活性化は生じないことが予想される。更に，遺伝毒性試験の結果から，リスジプラムは DNA に対する直接的な傷害性を有さないことが確認されている。

カニクイザルにおいて，リスジプラムの投与により表皮過形成が生じることが確認されているが，これについては，副次的スプライシング標的に対する作用との関連性について更に詳細な検討が必要と考えられる。ヒトの皮膚における過形成及び癌のリスク因子として，選択的ス

プライシング因子 *SRSF6*及びその下流の因子が主要な標的となる可能性が示唆されている[17]が，リスジプラムは *SRSF6*及びその下流のスプライシング標的に対していかなる作用も及ぼさなかった[18]。

2.4.4.5　生殖発生毒性試験

リスジプラムの受胎能及び着床までの初期胚発生への影響については，幼若ラット4週間及び13週間投与試験において評価した。生後4～31日目まで投与を行った幼若ラット4週間投与試験では，2.5 mg/kg/日で投与期間終了時の精巣及び精巣上体重量が対照群と比較して低値を示し，病理組織学的検査では精細管上皮変性が認められた。8週間の休薬期間終了時においても精巣及び精巣上体重量はわずかに低下したままであったが，病理組織学的な異常は認められず，精子検査及び雄の生殖能にも異常は認められなかった。離乳後直ちに（生後22日目）投与を開始した幼若ラット13週間投与試験では，7.5 mg/kg/日で投与期間終了後の交配期間終了時点における精子濃度及び精子運動性の低下，並びに精子の形態異常が認められたが，生殖能（無処置動物との交配及び授胎能）に影響は認められなかった。また，両試験において，雌の生殖能に影響は認められなかった。

胚・胎児発生への影響については，ラットを用いた試験において，7.5 mg/kg/日で母体毒性及び胎児発育阻害が認められたが，催奇形性は認められなかった。一方，ウサギを用いた試験では，顕著な母体毒性がみられた12 mg/kg/日において，胚胎児致死及び胎児形態異常（水頭症）が認められた。

ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する用量設定試験において，リスジプラムを妊娠6日目から授乳6日目まで投与したとき，高用量の7.5 mg/kg/日（TK 測定未実施，ラット胚・胎児発生試験における7.5 mg/kg/日での妊娠15日目の平均 C_{max}：962 ng/mL）で妊娠期間延長及び難産が認められ，6例中3例を安楽死処置した。この変化は，*in vitro* 副次的薬理試験において確認されている，本薬の COX1及び COX2に対する阻害作用（IC_{50}：約800 ng/mL，2.4.2.2.2）に関連した変化の可能性が考えられた。COX1及び COX2阻害により分娩遅延及び難産が発生することが知られており[19]，げっ歯類は特に感受性が高いことが報告されている[20,21]。ラット出生前及び出生後の発生に関する本試験（リスジプラムを妊娠6日目から授乳20日目まで投与）では，最高用量の3 mg/kg/日（妊娠15日目の平均 C_{max}：617 ng/mL，ラットの非結合型分率を16%としたときの非結合型濃度：99 ng/mL）まで，母動物及び出生児（生存性，身体的及び機能的発達［行動学的機能及び生殖能，雌の卵胞数及び卵巣の病理組織学的所見を含む］）に対する影響は認められなかった。

リスジプラム及び *SMN2*のスプライシングに対し同様の薬理活性を示す別の化合物[1,22]において同定された副次的スプライシング標的及び毒性所見から，リスジプラムが雄性生殖細胞に影響を与える可能性が予想された。本薬を投与したラット及びカニクイザルでは精巣の精細管上皮変性が認められ，この作用に対する感受性は，幼若ラットが成熟ラットよりも高く，離乳時から投与を開始したとき特に明らかであった。また，胚・胎児発生に関する試験では，ラット及びウサギにおいて，母体毒性が認められない用量において胎児への影響は認められなかったが，リスジプラムのヒトにおける胚胎児致死及び胎児形態異常誘発の可能性は否定できない。

2.4.4.6　新生児を用いた試験

幼若ラット反復投与試験（用量設定試験）において，離乳前にリスジプラムの投与を開始したとき，離乳後に投与を開始した場合と比較して，忍容性が著しく低くなることが確認された。具体的には，離乳前投与（生後4日目から投与開始）では，3.75 mg/kg/日以上で死亡又は状態悪化例が認められたのに対し，離乳後投与（生後22日目から投与開始）では，9 mg/kg/日まで死亡例は認められず，この忍容性の違いは，離乳前及び離乳後ラットにおけるリスジプラムの非結合型／蛋白結合型濃度及び半減期の違いに相関したもの（2.6.4.9）と考えられた。なお，離乳後に投与を開始した幼若ラットにおける毒性所見及び毒性発現時の曝露量は，成獣と概ね

一致しており，若齢カニクイザル（投与開始時2歳齢）を用いた39週間投与試験においても，幼若動物の成長，発達への影響を示唆する特異的な変化は認められなかった。

ラット（成獣，幼若）及びカニクイザルにおいて，主要な毒性変化が発現する非結合型曝露量は概ね同様であり，離乳前ラットでは消失の遅延が起こっていたことも考慮すると，リスジプラムの非結合型曝露による毒性プロファイルは，幼若動物と成獣で差がないものと考えられた。

なお，SMA 患者を含むヒトにおいて，血漿中リスジプラム（非結合型）濃度は年齢に関わらず同様であることが確認されており（2.6.4.4.4），離乳前ラットで認められた非結合型の高曝露による忍容性低下は，ヒト新生児においては起こらないと考えられる。

2.4.4.7 毒性発現の機序に関する試験

カニクイザル39週間投与試験で認められた網膜変性の機序を明らかにするため，ヒト網膜色素上皮細胞株（ARPE19）を用いた *in vitro* 試験を実施した結果，本薬によるリソソーム機能障害及びオートファゴソーム蓄積作用が，網膜傷害に関連している可能性が示唆された。

また，ヒト／カニクイザル iPSCs を用いた *in vitro* 試験において，本薬を含む *SMN2*スプライシング修飾薬による *FOXM1 B/C* 転写産物バリアント発現に対する作用（ダウンレギュレーション）が認められ，その強さと濃度依存的な有糸分裂停止との間に相関があることが示唆された。*In vivo* においても，リスジプラムを投与したラット及びカニクイザルの組織において，細胞周期に関連する *FOXM1*，アポトーシスに関連する *MADD* を含む複数の遺伝子のスプライシングに対する調節作用が認められ，細胞増殖サイクルの速い器官において認められた毒性所見との関連性が示唆された。

2.4.4.8 その他の毒性試験

リスジプラムは波長240～400 nm の紫外線を吸収することから，潜在的な光毒性リスクを評価するため，マウス線維芽細胞株（Balb/c 3T3）を用いた *in vitro* 試験を実施した。リスジプラムの溶解性に限度がみられた（最高濃度：9 μg/mL）ものの，本試験条件下においてリスジプラムは光毒性を有さないと判断された。また，マウスを用いた皮膚感作性試験（局所リンパ節試験）において，臨床製剤の1～5倍量までの経皮投与，又はヒトでの治療域の曝露量が得られる用量で3日間経口投与したとき，更に，引き続いて経口又は経皮投与により惹起したとき，感作性及び刺激性の徴候は認められなかった。

2.4.4.9 動物からヒトへの外挿（曝露量，臨床との関連）

全体として，リスジプラムの毒性所見は，投与期間の長さに応じて以下の2つのカテゴリーに分類される。

- 副次的スプライシング標的に関連する有害作用（急性／亜急性投与により惹起される細胞増殖サイクルの速い器官に対する作用［催奇形性を含む］）
- 網膜変性（長期間の投与により惹起され，発現メカニズムの詳細は不明）

副次的スプライシング標的を介した作用は，その発現が早く（作用発現の時間的経過は，主要な薬理学的標的である *SMN2*への作用と同様），基本的に可逆的と考えられる。一方，網膜変性は遅延性の毒性であり，視細胞の消失を伴う非可逆的変化と考えられる。

リスジプラムの毒性試験において認められたこれらの毒性所見に基づき，SMA 患者を対象とした臨床試験は，本薬の曝露量上限を設定して実施した。これは，非臨床試験で認められた毒性がヒトに外挿可能であり，いくつかの毒性所見についての安全域は狭いものの，非臨床試験における NOAEL（離乳前ラットでの精巣への影響を除く）までの用量を，すべての年齢かつすべてのタイプの SMA 患者に投与することが正当化できるとの仮定に基づき，安全性が担保できると判断したものである。全体として，カニクイザルで認められた遅延性で非可逆的な

網膜変性を最も重要な有害所見とし，この変化が認められないと考えられる曝露量を上限として設定した。すなわち，動物試験データ，及び重篤で稀な単一遺伝性疾患である SMA において，リスジプラムによる明らかな薬力学的作用が期待できることに基づき，平均 $AUC_{0\text{-}24h,ss}$ として2000 ng•h/mL（2.7.2.3.7）を曝露量上限とすることで安全性が担保できると判断した。なお，げっ歯類におけるリスジプラム投与による毒性所見は類似していたが，試験データからマウスはラットよりも感受性が低いと考えられた。

毒性試験において確認された主要な標的器官に対する NOAEL での曝露量と，臨床試験で設定した曝露量上限との比較による安全域を表 2.4.4.9-1に示した。

表 2.4.4.9-1　主要な毒性標的器官に対する NOAEL での曝露量と臨床試験での曝露量上限との比較

標的器官 [a]	試験の種類	NOAEL (mg/kg/日)	平均 $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng•h/mL) [雄/雌]	曝露量比*
消化管	マウス [b] 4週間	16	21200/15100	10.6/7.6
	ラット4週間	>9 [c]	15300/17700	7.7/8.9
	ラット26週間	3	7010/8830	3.5/4.4
	幼若ラット13週間	3	7160/7830	3.6/3.9
	カニクイザル2週間（用量設定）	3	3130/6720	1.6/3.4
	カニクイザル2週間	>6	12800/11500	6.4/5.8
	カニクイザル39週間	>7.5/5	5880/6470	2.9/3.2
膵臓	ラット26週間	3 [d]	7010/8830	3.5/4.4
皮膚／皮下組織，舌／食道，喉頭	カニクイザル2週間	4	8650/8450	4.3/4/2
	カニクイザル39週間	3	4880/4850	2.4/2.4
血液／骨髄	マウス [b] 4週間	9	9520/10400	4.8/5.2
	ラット26週間	3	7010/8830	3.5/4.4
	カニクイザル39週間	3 (雄) 1.5 (雌)	4880 2060	2.4 1.0
雄性生殖細胞	ラット4週間	>9 [c]	15300	7.7
	ラット26週間	1	2200	1.1
	幼若ラット4週間	1.5	1570	0.8
	幼若ラット13週間	3	7160	3.6
	カニクイザル2週間	2 [e]	2650	1.3
網膜	カニクイザル39週間	1.5	1870/2060 2300 (最高値)	0.9/1.0 1.2
副腎 [f]，子宮／性周期 [g]，乳腺 [h]	ラット26週間	>7.5	16100/15700	8.1/7.9
遺伝毒性（小核誘発）	ラット小核誘発に関する用量反応解析	NA	約3000 [i]	約1.5
胚・胎児発生	ラット	3	4630	2.3
	ウサギ	4	7990	4.0
出生前及び出生後の発生	ラット	3	4230	2.1

$AUC_{0\text{-}24h}$：0～24時間までの濃度–時間曲線下面積，NOAEL：無毒性量，NA：該当なし

*：各毒性所見の NOAEL における曝露量を，臨床試験で設定した曝露量上限（平均 $AUC_{0\text{-}24h,ss}$：2000 ng•h/mL，2.7.2.3.7）で割った値を示した。

a：胸腺についてはラット及びカニクイザルにおいて萎縮性変化が認められたが，いずれも軽微～軽度の変化であり，休薬による回復性が認められたことから有害な変化でないと判断した。また，カニクイザル39週間投与試験での精巣に対する影響は，ほとんどの個体の精巣が未成熟であったことから評価することができなかった。

b：野生型 rasH2マウス

c：9 mg/kg/日で認められた消化管及び雄性生殖細胞の変化は，いずれも有害でないと判断した。

d：すべての用量（1，3及び7.5 mg/kg/日）で変化が認められたが，1及び3 mg/kg/日における変化の程度及び／又

は発現頻度は低いことから有害でないと判断した。
e：6 mg/kg/日で精巣の影響が認められ，4 mg/kg/日のほとんどの個体の精巣が未成熟で評価できなかったことから，NOAELは2 mg/kg/日とした。
f：すべての用量（1，3及び7.5 mg/kg/日）で，有害とは考えられない副腎皮質の色素沈着が認められた。
g：3及び7.5 mg/kg/日で有害とは考えられない子宮重量の低値及び発情周期の停止が認められた。
h：7.5 mg/kg/日の雄で有害とは考えられない乳腺萎縮が認められた。
i：NOGELにおける $AUC_{0\text{-}24h}$ の90%信頼限界の下限値

これまでの健康成人及びすべての年齢の SMA 患者を対象とした臨床試験において，リスジプラムは平均 $AUC_{0\text{-}24h,ss}$ として2010 ng•h/mL の曝露量まで，安全で良好な忍容性を有することが示されている（2.7.2.3.1.3，2.7.4.9）。臨床試験における安全性評価対象集団の結果から，下記の通り，非臨床毒性試験で特定されたリスジプラムの潜在的リスクについての妥当性が確認できる。

1) 副次的スプライシング標的への作用に関連したリスク

*SMN2*以外の副次的スプライシング標的（遺伝子を含む）に関連するリスクは主に細胞分裂及びアポトーシスに関連したものである。

- 消化管上皮（アポトーシス／単細胞壊死の増加）：ヒト平均曝露量上限の少なくとも 1.6 倍を超える用量で認められた（カニクイザル 2 週間用量設定試験の結果，39 週間投与試験では 2.9 倍の曝露量まで影響は認められなかった）。
- 皮膚，舌／食道，喉頭粘膜（主に錯角化）：ヒト平均曝露量上限の 2.4 倍を超える曝露量で認められた。この変化は用量依存的であり，投与開始後数日から 2 週間以内に発現し，休薬により回復した。
- 骨髄における小核誘発：発生機序はアポトーシスに関連した副次的作用と考えられ，NOGEL が特定されている（ヒト平均曝露量上限の約 1.5 倍）。
- 細胞減少を伴う骨髄抑制：ラットにおいて，小核誘発が発現した用量よりも高い曝露量（ヒト平均曝露量上限の 3.5 倍以上）で認められた。
- 精子数減少及び精細胞周期停止：ヒト平均曝露量上限と同程度又はそれ以下で生じる可能性がある。

これらの変化は，NOAEL を超える用量において多くの動物に認められたことから，いずれもヒトに外挿性のあるリスクと考えられるが，各所見がクラスエフェクト（副次的スプライシング標的への作用に関連した変化）であるとの科学的根拠に基づき，すべての変化が完全に回復するものと考えられた。SMA 患者を対象とした臨床試験では，皮膚／粘膜及び骨髄に関する検査で影響は認められず（2.7.4.2.1.6.1，2.7.4.3.2.1），毒性試験における NOAEL のヒトへの外挿性の妥当性が示された。また，リスジプラムの臨床試験において，ヒト精子に対する有害性評価は実施されていないが，他の低分子 *SMN2*スプライシング修飾薬を含め，いくつかの動物種において類似の所見が認められていることから，この変化はクラスエフェクトと考えられ，ヒトの治療域の曝露量においても起こり得る変化と考えられた[11)]。精細胞の細胞周期停止は，リスジプラム（及び同じクラスの他の *SMN2*スプライシング修飾薬）の選択的スプライシング標的に対する作用と関連し，動物試験では一貫して休薬による可逆性が認められたことから，ヒトの精子形成サイクルに対する有害作用は投与中断により回復すると予想され，臨床試験での評価は必要ないと判断した。この潜在的リスクについては，添付文書に記載し注意喚起を行う。

2) 網膜変性のリスク

リスジプラムの物理化学的性質に関連した変化（副次的スプライシング標的に対する作用ではない）と考えられる遅延性の網膜所見が，カニクイザルへ約5カ月間以上連日経口投与した

際に認められた（この時点より前の網膜所見に関するデータはない）。これらの変化の一部（視細胞変性）は非可逆的であり，ヒト曝露量上限（平均 $AUC_{0\text{-}24h,ss}$：2000 ng•h/mL）の2倍を超える量において認められた。網膜辺縁部における非可逆的な視細胞消失及び内顆粒層における可逆的な小嚢胞腔は，SD-OCT により高感度で明瞭に検出され，病理組織学所見と良く一致していた。SD-OCT により検出された網膜辺縁部の視細胞消失は，ERG で変化が認められた用量よりも低い用量から検出され，一方，ERG での変化は SD-OCT の変化との強い相関が認められた。このことから，SD-OCT により検出される網膜の構造的変化は，ERG により検出される機能的変化よりも低い用量から検出できるものと考えられた。したがって，カニクイザルでのリスジプラム投与により誘発される網膜所見の重症度及び経時的な進行をモニターする適切な検査方法として，SD-OCT を第1に選択し，SMA 患者を含む臨床試験においても，同様の目的で SD-OCT を実施した。これまでの臨床試験において，リスジプラム投与に関連した網膜への影響は認められていない（2.7.4.4.3）。

3) 遺伝毒性のリスク

リスジプラムの細胞分裂及びアポトーシスに対する作用に一致して，DNA 以外の分子に対する作用に基づく骨髄小核誘発作用が認められた。この作用は，DNA に対するものではないことから可逆的であり，影響が次世代細胞に伝達されることはないと考えられた。高用量投与において骨髄細胞減少が認められているが，SMA 患者を対象とした臨床試験では血液学的検査によりモニターしている。リスジプラムは，遺伝毒性及び非遺伝毒性発がん物質の評価に適したトランスジェニック動物モデルにおいて発がん性を示さなかった。

4) 生殖発生毒性のリスク

リスジプラムの細胞分裂及びアポトーシスに対する作用に一致して，本薬を妊娠ウサギに投与したとき，明らかな母体毒性及び胚胎児に対する作用（形態異常及び変異）が認められた。NOAEL における曝露量は，ヒト平均曝露量上限の4.0倍であった。ラットにおいてはヒト平均曝露量上限の5.4倍まで，催奇形性（胎児の形態異常）は認められなかった。しかし，ラットにおいてはわずかな胎児の発育遅延が認められ，母体毒性の NOAEL における曝露量は，ヒト平均曝露量上限の2.3倍であった。臨床試験においては，規定された効果的な避妊法を用いることにより妊娠を予防する措置を取っており，現時点まで妊娠例の報告はない（2.7.4.5.4）。本リスクについては添付文書に記載し注意喚起を行う。

妊娠ラットにリスジプラムを投与したとき，妊娠期間延長及び難産が認められ，COX1及び COX2阻害と関連する可能性が示唆された。ヒトにおいて，COX1及び COX2阻害が分娩に有害な影響を及ぼすことが知られている[19)]。しかし，*in vitro* 副次的薬理試験でのリスジプラムによる COX1及び COX2阻害の IC_{50}が約800 ng/mL であったのに対し，生殖可能年齢の SMA 患者におけるリスジプラムの非結合型 C_{max} の最大値は約25 ng/mL（BP39055試験における C_{max} の最高値：228 ng/mL［2.7.2.3.1.3.1］及びヒトにおける結合型分率：11%［2.6.4.4.1］より算出）であったことから，ヒトにおいて COX1及び COX2阻害に起因した分娩異常は生じないものと考えられた。

放射性標識したリスジプラムの妊娠及び授乳ラット投与試験の結果から，リスジプラムは妊婦の胎盤を通過し，授乳婦の乳汁中に排泄される可能性が示唆された。この結果は，リスジプラムの高い膜透過性を含む物理化学的性状と一致している。

5) 光毒性のリスク

In vitro 試験において，光毒性が認められなかった最高濃度（非結合型）は9000 ng/mL であり，ヒトにリスジプラムを投与した際に光毒性が惹起される可能性は低いと考えられた。

2.4.5 総括及び結論

SMA 患者において SMN 蛋白を増加させることは，SMA の病態の進行を抑制する上で有効であると考えられる。実際に，リスジプラムは，*SMN2* mRNA スプライシング修飾活性を介して特異的に SMN 蛋白の産生を向上させ，重症 SMA モデルマウスの生存期間の延長，神経筋接合部の維持及び運動機能の改善などの有益な効果を示した。

In vitro 試験において，リスジプラムは *SMN2*の選択的スプライシングを修飾し，SMN 蛋白を増加させた。リスジプラムは，SMA I 型患者由来線維芽細胞及び健常ヒト全血細胞におけるヒト *SMN2* pre-mRNA の選択的スプライシングを，エクソン7を欠いた Δ7 mRNA の産生からエクソン7を含んだ完全長 *SMN2* mRNA を産生する方向へシフトさせた。また，リスジプラムは，SMA I 型患者由来線維芽細胞及び SMA I 型患者の iPS 細胞より誘導した運動神経細胞において SMN 蛋白を増加させた。また，ヒト主要代謝物 M1は健常ヒト全血細胞において *SMN2*に対するスプライシング修飾作用をほとんど示さなかった。

In vivo 試験において，リスジプラムの *SMN2* pre-mRNA スプライシングの修飾効果を，ヒト *SMN2*を導入した2種類の SMA マウスモデルを用いて確認した。その結果，リスジプラムは用量依存的に脳及び筋肉において SMN 蛋白量を増加させた。更に，SMA I 型を反映する非臨床モデルである SMNΔ7マウスでは顕著な疾患表現型の回復を示した。すなわち，SMNΔ7マウスは重篤な神経筋機能の異常を呈し，生存期間中央値は生後3週間以下であるが，生後3日目からリスジプラムを投与した群では，神経筋接合部の脱神経の抑制，筋萎縮の減少，及び運動機能の保護が認められ，生存期間中央値は6カ月を超えるまで延長された。

低分子化合物であるリスジプラムの *SMN2*に対する特異的作用の分子メカニズムの仮説は，リスジプラムの類縁化合物を用いた検証により提唱されている。リスジプラムは，*SMN2* pre-mRNA 上の2か所の異なる領域（*SMN2* エクソン7ーイントロン7領域の5'ss 及び ESE2）に結合することで未同定のリボ核蛋白（RNP）複合体を安定化することが重要であると考えられる[23)]。これまでのところ，リスジプラムが結合すると考えられる5'ss は *SMN2*以外の様々な遺伝子にもみつかるが，ESE2は，*SMN2*以外には *STRN3*のみで見出されている。

包括的なトランスクリプトーム解析の結果，リスジプラムは *SMN2*の他にも *STRN3*及び *SLC25A17*の選択的スプライシングを修飾した。しかし，*STRN3*及び *SLC25A17*の選択的スプライシングにより生じたアイソフォームの機能は不明である。また，*SMN2*の EC_{90}値よりも5倍高いリスジプラムを使用した場合，*STRN3*及び *SLC25A17*の他に11遺伝子の選択的スプライシングに影響を与えることが明らかとなった。これらの13種のオフターゲット遺伝子のうち，*FOXM1*及び *MADD* は非臨床毒性試験の結果との関連が示唆される一方で，*STRN3, SLC25A17* 及び *APLP2*の安全性との関連は認められなかった（2.6.6参照）。

In vitro 及び *in vivo* の安全性薬理試験において，リスジプラムは心血管系，中枢神経系及び呼吸系機能に影響を及ぼさないことが示された。潜在的な薬物乱用傾向に関しては，それらに関連する可能性のある受容体及びイオンチャネルに対する作用を評価し，リスジプラムの臨床曝露量において影響が生じる可能性はないことが確認された。マウス，ラット，ウサギ及びカニクイザルを用いた *in vivo* 毒性試験において，リスジプラムの投与による薬物乱用傾向の可能性を示唆する所見は認められなかった。リスジプラム及び代謝物 M1に関連する受容体相互作用として，COX1及び COX2，並びにアセチルコリンエステラーゼに対する作用が確認された。毒性試験において，妊娠ラットにおける妊娠期間延長を除き，COX1及び COX2阻害に関連する有害所見（消化管における出血，潰瘍，びらん）は認められなかった。また，安全性薬理試験において，アセチルコリンエステラーゼ阻害に関連した変化（コリン作動性変化）も認められなかった。ヒト主要代謝物 M1について得られたデータから，リスジプラムと同様のオフターゲット作用及び同程度の IC_{50}値が確認されたことから，リスジプラムの安全性薬理評価において，代謝物 M1の安全性も評価されていると考えられた。

これらの非臨床薬理試験の結果より，リスジプラムは特異的に *SMN2* mRNA の選択的スプライシングを修飾して機能性 SMN 蛋白の産生量を増加させることで，SMA に対して効果を示す

ことが示唆された。

リスジプラムは *in vitro* で良好な膜透過性を有し，MDR1の基質にならない。また，主に肝臓で代謝され，小腸での代謝寄与は小さい。これら *in vitro* での試験結果から推察されるように，リスジプラムをラット及びカニクイザルに経口投与したとき，これらの動物種での F はそれぞれ平均で>100%（ラット）及び43%（サル）と良好であった。静脈内投与後のリスジプラムの CL はおおよそ5～10 mL/min/kg と小さく，$t_{1/2}$は約5時間であった。V_{ss} は2～3 L/kg と中程度であり各動物種の全身水分量[24)] を超える値であった。ラット及びカニクイザルにリスジプラムを1日1回26及び39週間反復経口投与したとき，曝露量は投与量にほぼ比例して増加した。最終投与後の曝露量は初回投与後と比較して最大で約3倍であり，顕著な蓄積性は認められなかった。

リスジプラムの血漿中での蛋白結合率は，ヒト，サル，ラット，ウサギ及びマウスにおいて非結合型分率として10%～16%の範囲であった。ヒト血漿中の主な結合蛋白はアルブミンであり，α1酸性蛋白への結合は認められない。ラットの非結合型分率及び血漿中未変化体半減期は日齢に依存し，幼若であるほど非結合型分率が高く半減期は長かったが，離乳後は成熟動物と同様な値となった。一方で，ヒトの血漿蛋白結合率は年齢に依存しなかった。

ラット及びカニクイザルにリスジプラムを経口投与したときの各組織中未変化体濃度，並びにラット QWBA 試験の結果，リスジプラムは有色動物の眼のメラニン含有組織で高い濃度を示し，リスジプラムのメラニンへの強い親和性が示唆された。また，標的組織である脳及び筋肉を含む各組織に速やかに分布した。この結果は，リスジプラムが脳及び筋肉において SMN 蛋白量の増加を導いた薬理試験の結果（2.4.2.1.2）と一致するものである。妊娠ラットを用いた分布試験の結果では，放射能の胎児への移行が確認されており，添付文書の妊婦の項において注意喚起を行う。

リスジプラムは *in vitro* 及び *in vivo* で代謝的に安定であり，ラット及びカニクイザルに経口投与後の血漿中の主な存在形態は未変化体である。主代謝物はヒトを含めてすべての動物種で同じであり，N-水酸化体の M1である。主な代謝関与酵素は，FMO 及び CYP3A である。代謝物 M1のヒト血漿中曝露量を毒性試験におけるラット，ウサギ及びカニクイザルの NOAEL での血漿中 M1曝露量と比較した結果，1種類の動物種（ラット）でヒトの曝露量の1/2を超えていたことから，毒性試験においてヒト主代謝物 M1の安全性は評価されていると考える（2.6.4.3.3参照）。

ラット及びカニクイザルにおいてリスジプラム及びその代謝物はほぼ完全に尿糞中に排泄され，大部分は糞中への未変化体としての排泄であった。

リスジプラムは CYP3A4の基質になり，弱い阻害能（IC_{50}値11 µmol/L）も有し，代謝物 M1は CYP3A4に対して時間依存性の阻害能（K_{inact} 値は0.063 min^{-1}，K_I 値は13.7 µmol/L）を有する。しかし，ミダゾラムとの併用による臨床薬物相互作用試験の結果，ミダゾラムを併用してもミダゾラムの曝露量に臨床的に重要な違いはみられず（2.7.2.2.1.4），イトラコナゾールを用いた臨床薬物相互作用試験の結果（2.7.2.2.1.1.4）も，CYP3A4の阻害によるリスジプラムの薬物動態への影響はわずか（$AUC_{0\text{-}120h}$ で11%増加，C_{max} で9%低下）であった。これら両試験の結果より，リスジプラムの CYP3A4を介した薬物相互作用の可能性は低いと考える。リスジプラムは OCT2，MATE1及び MATE2-K に対しては阻害能を有し，MATE1及び MATE2-K に対するリスジプラムの IC_{50}値はそれぞれ0.15 µmol/L（約60 ng/mL）及び0.09 µmol/L（約36 ng/mL）であり，これらトランスポーターの基質となる他剤と併用した場合に薬物相互作用が生じる可能性を完全に除外することはできない。本剤の実臨床での使用を考えた場合，これらトランスポーターの阻害剤との併用の可能性は低いと考えられるが，注意は必要である。

マウス，ラット及びカニクイザルを用いた反復投与試験における毒性所見として，主に細胞増殖サイクルが速い器官（消化管，膵臓，皮膚／皮下組織，舌／食道，喉頭，血液／骨髄，胸

腺及び精巣）に変化が認められた。これらの変化は，可逆的又は部分的に可逆的であり，その回復性は，休薬期間の長さ及び各器官における細胞の代謝回転に依存していた。カニクイザル39週間投与試験では網膜変性が認められ，視細胞層の消失を含む病理組織学所見は回復しなかったが，ERG による視覚機能及び SD-OCT による形態学的所見は，休薬により部分的な回復性を示した。細菌を用いた復帰突然変異試験において，遺伝子突然変異誘発作用は認められなかったが，マウス及びヒト細胞株を用いた *in vitro* 試験，並びにラット（*in vivo*）の骨髄赤芽球において小核誘発性が認められた。リスジプラムによる直接的な DNA 傷害性は認められなかったことから，間接的な機序が小核誘発の原因である可能性が示唆された。rasH2トランスジェニックマウスを用いた26週間投与によるがん原性試験において，リスジプラムによる発がん性を示唆する変化は認められなかった。雄の幼若ラットにリスジプラムを13週間投与したとき，精子濃度及び精子運動性の低下，並びに精子の形態異常が認められたが，無処置動物との交配及び授胎能の評価において影響は認められなかった。ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験において，リスジプラムによる母体毒性及び胎児発育阻害が認められたが，催奇形性（胎児形態異常）は認められなかった。ウサギでは，顕著な母体毒性が認められた用量で，胚胎児致死及び催奇形性が認められた。ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験では，高用量の3 mg/kg/日まで，母動物及び出生児に対する影響は認められなかった。リスジプラムは波長240～400 nm の紫外線を吸収するが，*in vitro* 試験において光毒性を示さなかった。またマウスを用いた試験において，本薬は感作性を示さなかった。

一般毒性試験で認められた所見の多くは，臨床試験において設定した曝露量上限（平均 $AUC_{0\text{-}24h,ss}$：2000 ng•h/mL）と同程度又は僅かに超える曝露量から発現したが，概ね軽微～軽度の変化であり，網膜変性（視細胞変性）を除き，すべての変化が可逆的であると考えられた。また，この曝露量上限に従い実施した臨床試験において，網膜変性は認められていない。臨床試験において，生殖機能に関連した安全性評価は実施していないが，毒性試験で特定された雄性生殖細胞及び胚・胎児発生に対する潜在的リスクについては，添付文書に記載し注意喚起を行う。以上をまとめると，リスジプラム投与による潜在的毒性は，いずれも臨床においてモニター及び管理可能であり，本薬が生命を脅かす重篤な遺伝性疾患である SMA に対する治療薬であることを考慮すると，リスク／ベネフィットの観点から，いずれも許容できるものと考えられた。

以上，リスジプラムの薬効薬理，薬物動態及び安全性のプロファイルを検討した非臨床試験の結果は，SMA に対する新規治療薬としてのリスジプラムの妥当性を支持するものであった。

2.4.6 図表

図表は本文中に挿入した。

2.4.7 参考文献

1） Ratni H, Ebeling M, Baird J, Bendels S, Bylund J, Chen KS, et al. Discovery of risdiplam, a selective survival of motor neuron-2 (SMN2) gene splicing modifier for the treatment of spinal muscular atrophy (SMA). J Med Chem. 2018;61:6501-17.

2） SMN2 (RO7034067): Toxicological assessment report on excipients in an oral drug formulation (Ro703-4067/F12) for pediatric use. Roche 社報告書 1077240, 20[redacted].

3） Nolte T, Brander-Weber P, Dangler C, Deschl U, Elwell MR, Greaves P, et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the gastrointestinal tract, pancreas and salivary glands of the rat and mouse. J Toxicol Pathol 2016;29:1S-124S.

4） Gemenetzidis E, Elena-Costea D, Parkinson EK, Waseem A, Wan H, Teh MT. Induction of human epithelial stem/progenitor expansion by FOXM1. Cancer Res 2010;70:9515-26.

5） Teh MT, Gemenetzidis E, Chaplin T, Young BD, Philpott MP. Upregulation of FOXM1 induces

genomic instability in human epidermal keratinocytes. Mol Cancer 2010;9:45.

6) Ye H, Kelly TF, Samadani U, Lim L, Rubio S, Overdier DG, et al. Hepatocyte nuclear factor 3/fork head homolog 11 is expressed in proliferating epithelial and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues. Mol Cell Biol 1997;17:1626-41.

7) Chaudhary J, Mosher R, Kim G, Skinner MK. Role of winged helix transcription factor (WIN) in the regulation of Sertoli cell differentiated functions: WIN acts as an early event gene for follicle-stimulating hormone. Endocrinology 2000;141:2758-66.

8) O'Donnell L, Pratis K, Wagenfeld A, Gottwald U, Müller J, Leder G, et al. Transcriptional profiling of the hormone-responsive stages of spermatogenesis reveals cell-, stage-, and hormone-specific events. Endocrinology 2009;150:5074-84.

9) Blanco-Rodríguez J. A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis. Int J Androl 1998;21:236-48.

10) Bartlett JM, Kerr JB, Sharpe RM. The selective removal of pachytene spermatocytes using methoxy acetic acid as an approach to the study in vivo of paracrine interactions in the testis. J Androl 1988;9:31-40.

11) Testicular seminiferous degeneration with selective survival of motor neuron-2 (SMN2) gene splicing modifying agents: a common off-target class effect. Roche 社報告書 1093542 (version 2), 20[redacted].

12) RO6885247: 39-week oral (gavage) administration toxicity study in the cynomolgus monkey with a 26-week recovery phase (incl. Amendment 1). Roche 社報告書 1060167 (AMENDED), 20[redacted].

13) Kataoka Y, Ikehara Y, Hattori T. Cell proliferation and renewal of mouse adrenal cortex. J Anat 1996;188:375-81.

14) Malendowicz LK, Jachimowicz B. Sex differences in adrenocortical structure and function. XI. Autoradiographic studies on cell proliferation and turnover in the adrenal cortex of the male and female rat and its dependence on testosterone and estradiol. Cell Tissue Res 1982;227:651-7.

15) Costa RH. FoxM1 dances with mitosis. Nat Cell Biol 2005;7:108-10.

16) Laoukili J, Kooistra MR, Brás A, Kauw J, Kerkhoven RM, Morrison A, et al. FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. Nat Cell Biol 2005;7:126-36.

17) Jensen MA, Wilkinson JE, Krainer AR. Splicing factor SRSF6 promotes hyperplasia of sensitized skin. Nat Struct Mol Biol 2014;21:189-97.

18) Possible treatment effect of RO7034067 on SRSF6. Roche 社報告書 1092960, 20[redacted].

19) Urrego D, Liwa AC, Cole WC, Wood SL, Slater DM. Cyclooxygenase inhibitors for treating preterm labour: What is the molecular evidence? Can J Physiol Pharmacol 2019;97:222-31.

20) Chester R, Dukes M, Slater SR, Walpole AL. Delay of parturition in the rat by anti-inflammatory agents which inhibit the biosynthesis of prostaglandins. Nature 1972;240:37-8.

21) Reese J, Paria BC, Brown N, Zhao X, Morrow JD, Dey SK. Coordinated regulation of fetal and maternal prostaglandins directs successful birth and postnatal adaptation in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:9759-64.

22) Ratni H, Karp GM, Weetall M, Naryshkin NA, Paushkin SV, Chen KS, et al. Specific correction of alternative survival motor neuron 2 splicing by small molecules: Discovery of a potential novel medicine to treat spinal muscular atrophy. J Med Chem 2016;59:6086-100.

23) Sivaramakrishnan M, McCarthy KD, Campagne S, Huber S, Meier S, Augustin A, et al. Binding to SMN2 pre-mRNA-protein complex elicits specificity for small molecule splicing modifiers. Nat Commun 2017;8:1476.

24) Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. Pharm Res 1993;10:1093-5.