目次

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 3
2.6.1 緒言 3
2.6.1.1 SMN 蛋白の機能及び脊髄性筋萎縮症における *SMN2* スプライシング修飾薬リスジプラムの作用 3
2.6.1.2 リスジプラムの作用機序 5
2.6.1.3 承認申請の概要 5
2.6.1.4 参考文献 6

図一覧

図 2.6.1.1-1 SMA 治療における *SMN2*スプライシング修飾薬リスジプラムの役割 4
図 2.6.1.2-1 類縁化合物 SMN-C の *SMN2*スプライシング修飾における分子メカニズムの仮説 5

略語一覧

略語	英名	和名
5'ss	5' splice site	-
ESE2	Exonic splicing enhancer 2	-
SMA	Spinal muscular atrophy	脊髄性筋萎縮症
SMN	Survival of motor neuron	-
SMN1	Survival of motor neuron 1	Survival of motor neuron 1遺伝子
SMN2	Survival of motor neuron 2	Survival of motor neuron 2遺伝子
snRNP	Small nuclear ribonucleoprotein	低分子リボ核蛋白
U1 snRNA	U1 small nuclear RNA	U1 核内低分子 RNA

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

2.6.1.1 SMN 蛋白の機能及び脊髄性筋萎縮症における *SMN2*スプライシング修飾薬リスジプラムの作用

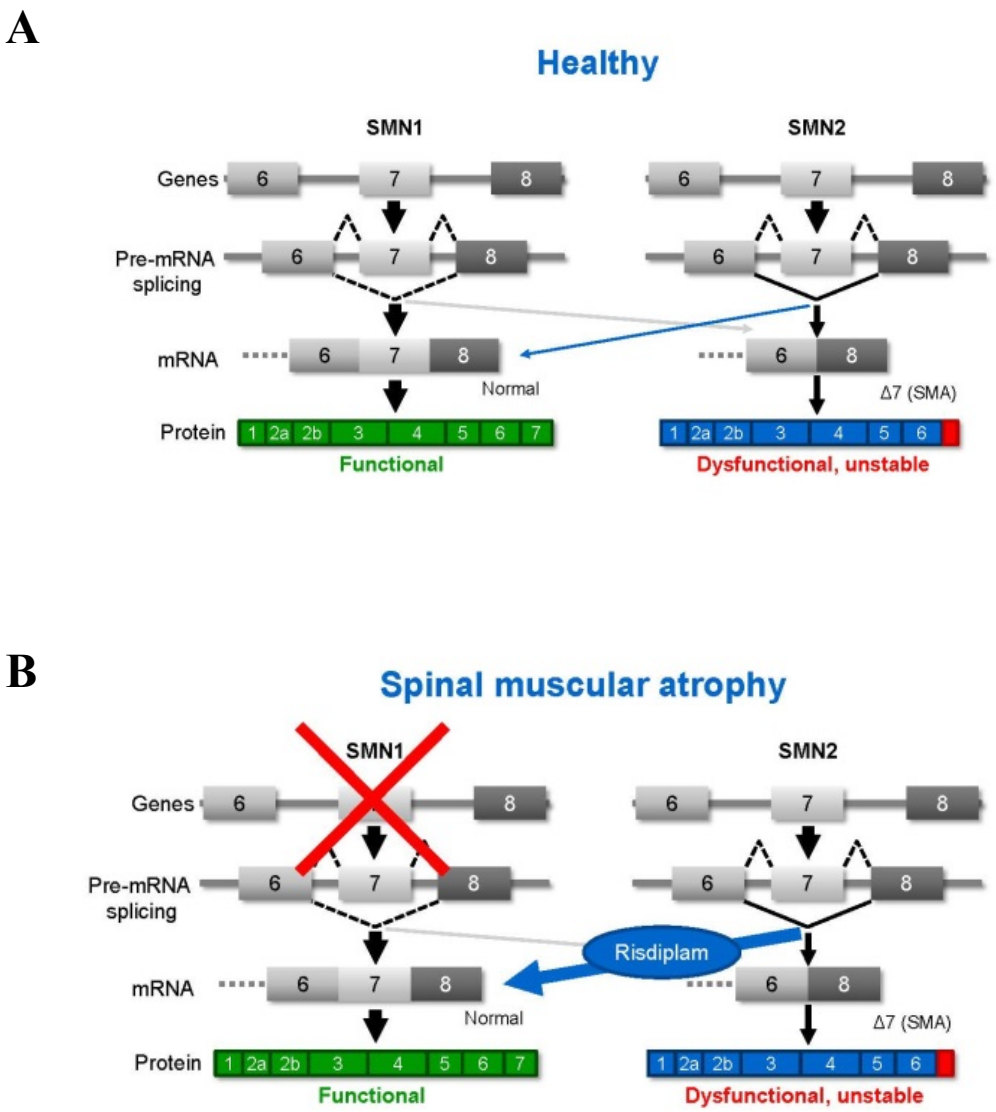
リスジプラムは経口投与により脊髄性筋萎縮症（SMA）の原因である survival of motor neuron 1（*SMN1*）のパラロガス遺伝子である *SMN2*の選択的スプライシングを修飾し，エクソン7を含んだ完全長 *SMN2* mRNA を増加させる活性を指標として選抜された低分子化合物である[1) 2)]。リスジプラムは，*SMN2* pre-mRNA の選択的スプライシングにおいて，エクソン7を欠いたΔ7 mRNA からエクソン7を含んだ完全長 mRNA へと産生をシフトさせることで，完全長 *SMN2* mRNA 及び機能性 SMN 蛋白の産生を促進する。これにより，リスジプラムは SMA 患者の SMN 蛋白の欠乏に起因する病態の進展を抑制すると考えられる（図 2.6.1.1-1）。

SMN 蛋白は細胞の核及び細胞質に存在し，神経細胞以外の細胞種及び組織においても広く発現が認められる。SMN 蛋白は，pre-mRNA スプライシングや低分子リボ核蛋白（snRNP）の生合成，転写，ストレス応答，アポトーシス，軸索輸送，細胞骨格の制御などにおいて，さまざまな結合蛋白と複合体を形成することで関与する。しかしながら，SMN 蛋白の欠乏が SMA 患者でみられる下位運動ニューロンの変性をもたらすメカニズム，及び運動ニューロン以外の組織で発現する SMN 蛋白の SMA 病態への関与は明らかになっておらず，今後の解明が待たれる[3) 4)]。

ヒトの *SMN* 遺伝子には *SMN1*及び *SMN2*があり，ヒト以外の動物種では，ヒトの *SMN1*に相当する *Smn* 遺伝子のみが保存されている。*SMN2*はエクソン7の6番目の塩基に翻訳上は同義となる C → T 変異を有するため，*SMN2* pre-mRNA が選択的スプライシングにより大部分はエクソン7が排除されたΔ7 mRNA として産生される。Δ7 mRNA は *SMN2*の成熟した全 mRNA のほぼ90%を占め，最終的には速やかに分解される不安定な SMNΔ7蛋白として翻訳される。その一方で，機能性 SMN 蛋白となる完全長の *SMN2* mRNA は全体のおよそ10%の割合でしか産生されない（図 2.6.1.1-1 A）。

SMA は下位運動ニューロンの進行性の消失による筋力低下を特徴とする常染色体劣性の神経筋疾患であり，*SMN1*のホモ接合性の欠失（全症例の95%）又は変異によって引き起こされる。したがって，*SMN2*にのみ機能性 SMN 蛋白の供給を依存する SMA 患者において，*SMN2*の選択的スプライシングを修飾することで完全長の機能性 SMN 蛋白の産生を増加させることは，病態を引き起こす根本原因を手当てする効果的な治療手段の1つであると考えられる（図 2.6.1.1-1 B）[4) 5)]。

図 2.6.1.1-1　SMA 治療における *SMN2*スプライシング修飾薬リスジプラムの役割



A：ヒトは *SMN1*及び *SMN2*を持ち，健常者では *SMN1*によって機能性 SMN 蛋白の大部分が供給されている。*SMN2*は点変異により選択的スプライシングが変化し，一部はエクソン7を含む完全長 mRNA となるものの，そのほとんどはエクソン7を欠いた Δ7 mRNA となり，不安定な SMNΔ7蛋白として産生される。そのため，*SMN2*の機能性 SMN 蛋白の産生への寄与は小さい。

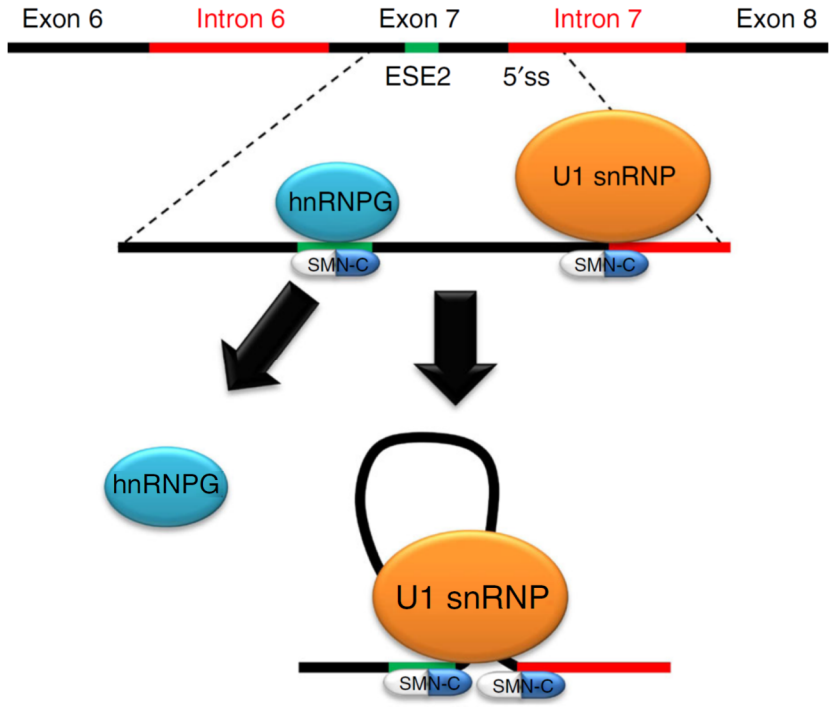
B：SMA 患者では *SMN1*が欠失しているか又は変異により不活性化しており，機能性 SMN 蛋白の供給は *SMN2*のみに依存している。リスジプラムは，*SMN2*の選択的スプライシングをエクソン7の組込みを促進する方向へ是正し，機能性 SMN 蛋白の産生を増加させる作用を持つ薬剤である。この作用により，SMA 患者の SMN 蛋白の欠乏により起こる病態の進展を抑制することが期待できる。

SMA＝脊髄性筋萎縮症，SMN＝survival of motor neuron，*SMN1*＝survival of motor neuron 1 遺伝子，*SMN2*＝survival of motor neuron 2 遺伝子

2.6.1.2　リスジプラムの作用機序

リスジプラムが *SMN2*スプライシングを修飾する分子メカニズムは，リスジプラムの類縁化合物を用いた解析からその作用機序に関する仮説が提唱されている（図 2.6.1.2-1）[6)]。リスジプラムは，*SMN2* pre-mRNA のエクソン7に存在し mRNA へのエクソン7組込みを制御する配列の1種である ESE2（exonic splicing enhancer 2），並びにエクソン7－イントロン7領域の5’ss（splice site）及び U1 snRNA（U1 small nuclear RNA）により構成される RNA ヘリックス構造の異なる2領域に結合すると考えられる。これらの結合を介して *SMN2* pre-mRNA 上に集積したリボ核蛋白質複合体を安定化させることで *SMN2* mRNA へのエクソン7の組込みを促進するものと予想される。

図 2.6.1.2-1　類縁化合物 SMN-C の *SMN2*スプライシング修飾における分子メカニズムの仮説



リスジプラムの類縁化合物 SMN-C は ESE2及び5’ss / U1 snRNA ダイマーに結合する。SMN-C は，hnRNP G と競合的に ESE2に結合し，SMN-C / ESE2 / U1 snRNP 複合体の形成を促すことで，SMN2 pre-mRNA スプライシングを修飾していると考えられる。

ESE2 = exonic splicing enhancer 2, 5’ss = splice site, snRNA = small nuclear RNA, U1 snRNP = U1 small nuclear ribonucleoprotein, hnRNP G = heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G.

（参考文献6)　Figure 7を改変）

非臨床試験では，*SMN2*スプライシング修飾薬としてのリスジプラムの薬理作用及び特異性の確認，並びに経口投与による薬物動態及び毒性の評価を行い，SMA に対する新規治療薬としての妥当性を検討した。これらの非臨床試験結果を概要文及び概要表に記した。

2.6.1.3　承認申請の概要

本申請で予定している効能・効果及び用法・用量については，2.2に記載した。

2.6.1.4 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) Naryshkin NA, Weetall M, Dakka A, Narasimhan J, Zhao X, Feng Z, et al. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. Science. 2014;345:688-93.
3) Schrank B, Götz R, Gunnersen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, et al. Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:9920-5.
4) Nurputra DK, Lai PS, Harahap NI, Morikawa S, Yamamoto T, Nishimura N, et al. Spinal muscular atrophy: from gene discovery to clinical trials. Ann Hum Genet. 2013;77:435-63.
5) Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: a timely review. Arch Neurol. 2011;68:979-84.
6) 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.

目次

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 6
2.6.2.2.1 *In vitro* 試験 6
2.6.2.2.1.1 *SMN2* mRNA スプライシング修飾作用 6
2.6.2.2.1.2 SMN 蛋白発現作用 6
2.6.2.2.1.3 ヒト主要代謝物 M1 の *SMN2* mRNA スプライシング修飾作用 7
2.6.2.2.2 *In vivo* 試験 8
2.6.2.2.2.1 SMNΔ7 マウスにおける SMN 蛋白発現作用 8
2.6.2.2.2.2 C/C アレルマウスにおける SMN 蛋白発現作用 10
2.6.2.2.2.3 SMNΔ7 マウスにおける疾患表現型の改善 11
2.6.2.3 副次的薬理試験 19
2.6.2.3.1 副次的スプライシング標的の検討 19
2.6.2.3.2 リスジプラム及びヒト主要代謝物 M1 の FOXM1 スプライシングに対する影響 22
2.6.2.3.3 その他のオフターゲットの検討 22
2.6.2.4 安全性薬理試験 23
2.6.2.4.1 心血管系に対する影響（*in vitro* hERG 試験） 23
2.6.2.4.2 心血管系に対する影響（カニクイザルテレメトリー試験） 23
2.6.2.4.3 中枢神経系に対する影響（ラット Irwin 試験） 23
2.6.2.4.4 呼吸系に対する影響（ラット全身プレチスモグラフィ試験） 23
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 24
2.6.2.6 考察及び結論 24
2.6.2.7 図表 25
2.6.2.8 参考文献 25

表一覧

表 2.6.2.2.2.1-1 SMNΔ7マウスの脳及び筋肉におけるリスジプラム濃度及び SMN 蛋白量 9
表 2.6.2.2.2.2-1 C/C マウスの脳及び筋肉におけるリスジプラム濃度及び SMN 蛋白量 11
表 2.6.2.2.2.3-1 SMNΔ7マウスを用いた長期投与試験の群構成 11
表 2.6.2.2.2.3-2 SMNΔ7マウスの生存率及び生存期間 12
表 2.6.2.2.2.3-3 SMNΔ7マウスの体重増加 14

図一覧

図 2.6.2.2.1.1-1 SMA I 型患者由来線維芽細胞及び健常ヒト全血細胞 *SMN2* mRNA に対するスプライシング修飾作用 6
図 2.6.2.2.1.2-1 SMA I 型患者由来線維芽細胞及び同患者 iPS 細胞由来運動神経細胞におけ

る SMN 蛋白産生誘導 7
図 2.6.2.2.1.3-1 ヒト主要代謝物 M1の 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スプライシング修飾 8
図 2.6.2.2.2.1-1 SMNΔ7マウスの脳及び大腿四頭筋における SMN 蛋白量の増加 9
図 2.6.2.2.2.2-1 C/C アレルマウスの脳及び大腿四頭筋における SMN 蛋白量の増加 10
図 2.6.2.2.2.3-1 SMNΔ7マウスの生存率及び生存期間 12
図 2.6.2.2.2.3-2 SMNΔ7マウスの体重増加 13
図 2.6.2.2.2.3-3 SMNΔ7マウスの神経筋接合の回復（短期試験） 15
図 2.6.2.2.2.3-4 SMNΔ7マウスの神経筋接合の回復（長期試験） 16
図 2.6.2.2.2.3-5 SMNΔ7マウスの正向反射の改善 17
図 2.6.2.2.2.3-6 SMNΔ7マウスの尾部組織壊死の減少 18
図 2.6.2.2.2.3-7 SMNΔ7マウスの眼周辺組織壊死の減少 19
図 2.6.2.3.1-1 SMA I 型患者由来線維芽細胞のトランスクリプトーム解析 20
図 2.6.2.3.1-2 リスジプラム処理 SMA I 型患者由来線維芽細胞における *STRN3* 及び *SLC25A17* のスプライシング変動 21
図 2.6.2.3.1-3 リスジプラム処理 SMA I 型患者由来線維芽細胞における *FOXM1* 及び *MADD* のスプライシング変動 21
図 2.6.2.3.2-1 SMA I 型患者由来線維芽細胞における FOXM1のスプライシング変動 22

略語一覧

略語	英名	和名
5'ss	5' splice site	-
APLP2	Amyloid precursor-like protein 2	-
COX	Cyclooxygenase	シクロオキシゲナーゼ
EC_{50}	50% effective concentration	50%効果濃度
EC_{90}	90% effective concentration	90%効果濃度
EDL	Extensor digitorum longus	長指伸筋
ESE	Exonic splicing enhancer	-
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
HTRF	Homogeneous time resolved fluorescence	均一時間分解蛍光測定法
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
L4	Lumbar section 4	第4腰髄
MADD	MAP kinase activating death domain	-
MST	Median survival time	生存期間中央値
NMJ	Neuromuscular junction	神経筋接合部位
NOEL	No observed effect level	無影響量
PND	Postnatal day	生後日数
SLC25A17	Solute carrier family 25, member 17	-
SMA	Spinal muscular atrophy	脊髄性筋萎縮症
SMN	Survival of motor neuron	-
STRN3	Striatin, calmodulin binding protein 3	-
vGlut1	Vesicular glutamate transporter 1	-

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

リスジプラムは，経口投与により *SMN2*の選択的スプライシングを修飾する低分子化合物である。リスジプラムは，*SMN2* pre-mRNA の選択的スプライシングにおいて，エクソン7を欠いたΔ7 mRNA からエクソン7を含んだ完全長 mRNA を産生する方向にシフトさせることで，完全長 *SMN2* mRNA 及び機能性 SMN 蛋白の産生を促進する。

リスジプラムの *in vitro* における薬理作用を，SMA I型患者由来の線維芽細胞*，同線維芽細胞に由来する人工多能性幹細胞（iPS 細胞）から作製された脊髄運動神経細胞，及び健常ヒト全血細胞を用いて検討した。*In vivo* 試験では，ヒト *SMN2*を導入した SMA マウスモデルである C/C アレルモデル，及び更に重篤な疾患表現型を示す SMNΔ7モデルを用いてリスジプラムの薬理作用を検討した。副次的薬理試験では，リスジプラムの副次的なスプライシング標的を包括的なトランスクリプトーム解析により同定し，リスジプラム及びそのヒト主要代謝物 M1 によるオフターゲットのスプライシングについて検討した。

これらの非臨床薬理試験の結果より，リスジプラムは *SMN2* pre-mRNA スプライシングを特異的に修飾することで，標的組織における機能性 SMN 蛋白の発現量を向上させ，SMN モデルにおける疾患表現型の改善に寄与することが明らかとなった。これらのことから，リスジプラムの SMA を対象とした新規治療薬としての開発の妥当性が裏付けられた。

1) 効力を裏付ける試験

リスジプラムは，SMA I 型患者由来の線維芽細胞を用いた *in vitro* 試験において，完全長 *SMN2* mRNA を増加させ，エクソン7を欠損した *SMN2*Δ7 mRNA を減少させた。リスジプラムの機能性 SMN 蛋白の産生に対する影響を検討するため，SMA I 型患者由来線維芽細胞及び SMA I 型患者 iPS 細胞から作製した脊髄運動神経細胞における SMN 蛋白量を評価した。リスジプラムで処理していない細胞を基準とした SMN 蛋白の最大増加率は両細胞種において60～80%であり，同程度であった。

次に，健常ヒト全血細胞をリスジプラムで処理することで完全長 *SMN2* mRNA の発現の変化を評価した。その結果，リスジプラムで処理した細胞は未処理細胞と比較し，*SMN1* mRNA の発現の変動はなかったが，*SMN2* mRNA の発現はリスジプラムの濃度依存的にエクソン7が組み込まれた完全長 *SMN2* mRNA が増加する方向へ是正され，*SMN2*Δ7 mRNA 発現を減少させた。この試験のスプライシング修飾効果は，リスジプラム 100 nmol/L を超える濃度から顕著となることが明らかとなった。また，リスジプラムのヒト主要代謝物 M1（RO7112063）は *SMN2* mRNA スプライシング修飾活性を示さなかった。

C/C アレルマウスにリスジプラム（1日あたり1，3又は10 mg/kg，経口）又は溶媒を10日間投与し，生後3日目の SMNΔ7マウスにリスジプラム（1日あたり0.1，0.3，1又は3 mg/kg，腹腔内）又は溶媒を7日間投与した。その結果，両 SMA モデルのリスジプラム投与群の脳では用量依存的な SMN 蛋白量の増加を認め，溶媒投与群と比較して，C/C アレルマウスでは10 mg/kg で，SMNΔ7マウスでは1～3 mg/kg で，SMN 蛋白量が2～3倍へ増加した。また，C/C アレルマウス（10 mg/kg）の筋組織中ではヘテロ接合マウスと比較し SMN 蛋白量に差はなかった。SMNΔ7マウスの SMN 蛋白量はヘテロ接合マウスの蛋白量と比較して，脳では41%及び筋組織では59%まで増加した。

次に，SMNΔ7マウスにリスジプラム又は溶媒を，生後3～23日目までは1日1回腹腔内投与し，

---

* 副次的薬理試験の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。

生後24日目以降は1日1回経口投与した。140日間の観察期間にヘテロ接合体の同腹児は2例のみが死亡した一方，溶媒投与群のマウスは生後21日目までにすべて死亡し，生存期間中央値（MST）は10.5日であった。リスジプラムの投与により生存期間が延長し，低用量群（生後23日目までは0.1 mg/kg で腹腔内投与，その後は0.3 mg/kg で経口投与）では，生後26日目まで軽微ではあるが有意な MST の延長が認められた。中用量群（生後23日目までは0.3 mg/kg で腹腔内投与，その後は1 mg/kg で経口投与），中／高用量群（生後23日目までは1 mg/kg で腹腔内投与，その後は3 mg/kg で経口投与）及び高用量群（生後23日目までは3 mg/kg で腹腔内投与，その後は10 mg/kg 経口投与）で生後140日目まで生存した個体の割合は，それぞれ60%，82%，73%で，ヘテロ接合体の同腹児における生後140日目時点の生存率83%と差はなかった。SMNΔ7マウスの体重は観察期間を通じてほとんど増加せず，低用量群でわずかに増加した。中用量群，中／高用量群及び高用量群の生後140日目時点での体重増加率は，SMA に関連する表現型を示さないヘテロ接合体の同腹児を基準として，それぞれ67%，82%，91%であり，用量依存的に改善した。また，生後16日目までの正向反射などの運動行動や生後140日目時点での成熟マウスの尾及び眼における組織壊死といった二次的な表現型に用量依存的な改善が認められたことから，この試験で採用した2つの高用量群には，動物に対して生存期間の延長だけではない付加的な利益がもたらされた可能性が示された。更に，リスジプラムを投与したSMNΔ7マウスの組織学的評価において，溶媒と比較し，vGlut1陽性シナプス数，運動神経軸索数，神経支配が完全な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た。

2) 副次的薬理試験

リスジプラムにより選択的スプライシングが修飾される遺伝子を同定するため，SMA I 型患者由来線維芽細胞における包括的な転写プロファイリングを検討した。その結果，溶媒対照と比較しリスジプラム121 nmol/L（*SMN2* mRNA スプライシング修飾効果が90%を超える濃度であり，本濃度を90%効果濃度 EC_{90}と称する［EC_{50}よりも10倍高い濃度］）で処理した患者由来細胞では，*SMN2*以外に *STRN3*，*SLC25A17*のスプライシングが影響を受けることが判明した。また，リスジプラムの最大効果を明らかにするために選択した濃度（EC_{90}よりも更に5倍高い濃度；605 nmol/L）において *FOXM1*及び *MADD* 等のスプライシングが影響を受けたが，濃度121 nmol/L ではそれらの遺伝子のスプライシングに影響は認められなかった。

これらの遺伝子の内，細胞周期を正に制御する転写因子をコードする *FOXM1*については，選択的スプライシングに基づく生物活性の調節機序が報告されている[1)]。すなわち，ヒト及び高等霊長類では，転写活性のないバリアントである *FOXM1A* にはエクソン9が含まれており（完全長［FL］），転写活性のあるバリアントである *FOXM1B/C* ではエクソン9が欠失している（Δ9）。*FOXM1A*（FL）及び *FOXM1B/C*（Δ9）に特異的な定量的リアルタイム PCR 法により，リスジプラム処理後に *FOXM1*の選択的スプライシングが修飾され，FL アイソフォームの量を増加させ，Δ9アイソフォームの量を減少させることが確認された。

これまでのところ *STRN3*，*SLC25A17*の特異的機能や選択的スプライシングの調節がもたらす結果に関する文献情報はないが，*MADD* バリアントのアポトーシスへの関与が報告されていることから，*MADD* 及び *FOXM1*の毒性所見との関連性を2.6.6に記載した。

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。

3)　安全性薬理試験

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］試験），カニクイザルを用いた *in vivo* 心血管系試験（テレメトリー試験），ラットを用いた中枢神経系試験（Irwin 変法）及びラットを用いた呼吸系試験（全身プレチスモグラフィー）において，リスジプラムの心血管系，中枢神経系及び呼吸系に対する有害な影響は認められなかった。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　*In vitro* 試験

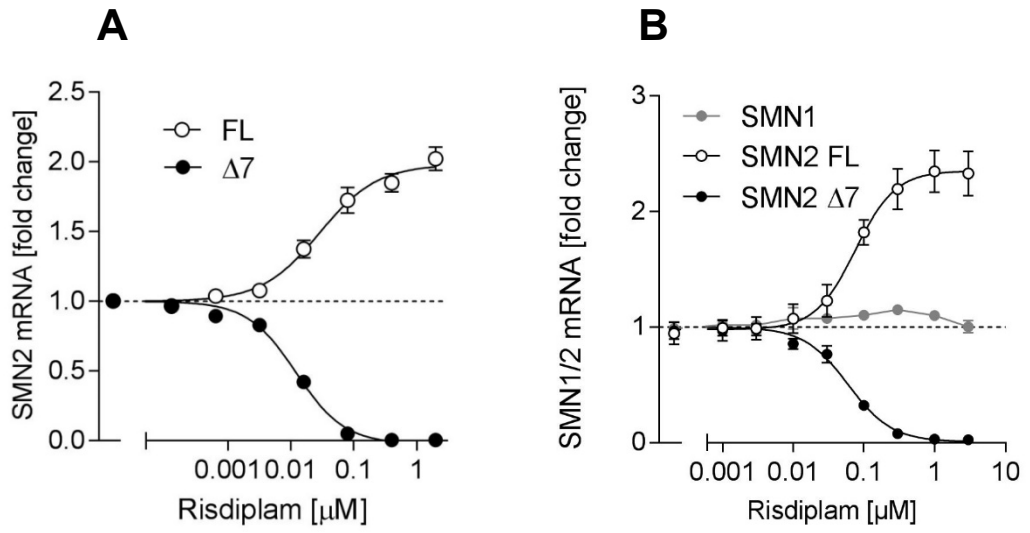
2.6.2.2.1.1　*SMN2* mRNA スプライシング修飾作用

（資料番号4.2.1.1-1及び4.2.1.1-2）

リスジプラムの 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 *SMN2* mRNA スプライシング修飾を評価した。SMA I 型患者由来線維芽細胞においてリスジプラムは，濃度依存的にエクソン7を含んだ完全長 *SMN2* mRNA を増加させ，50%効果濃度（EC_{50}値）は29 ± 7 nmol/L であった。また，エクソン7を欠損した *SMN2*Δ7 mRNA を減少させ，50%阻害濃度（IC_{50}値）は12 ± 1 nmol/L であった（図 2.6.2.2.1.1-1）。リスジプラムによるスプライシング修飾作用は121 nmol/L 以上で飽和した。

次に，健常ヒト全血細胞においてリスジプラムは，濃度依存的に完全長 *SMN2* mRNA を増加させ，EC_{50}値は75 ± 19 nmol/L であった。また，*SMN2*Δ7 mRNA を減少させ，IC_{50}値は60 ± 8 nmol/L であった（図 2.6.2.2.1.1-1）。本試験において *SMN1* mRNA 発現の変動は認められなかった。また，リスジプラムのスプライシング修飾作用に関して同様の試験結果がヒト主要代謝物においても再現されている（2.6.2.2.1.3）。

図 2.6.2.2.1.1-1　SMA I 型患者由来線維芽細胞及び健常ヒト全血細胞 *SMN2* mRNA に対するスプライシング修飾作用



A: SMA I 型患者由来線維芽細胞，又は **B:** 健常ヒト全血細胞をリスジプラム存在下で24時間培養し，完全長 *SMN2* mRNA（FL）及びエクソン7欠損 *SMN2* mRNA（Δ7）の発現量を，定量的リアルタイム PCR 法を用いて測定した。各プロットは平均 ± 標準誤差を示し，A（n = 2～4），B（n = 3）である。

Δ7 = エクソン 7 を欠失した *SMN2* mRNA，FL = 完全長，SMN = survival of motor neuron

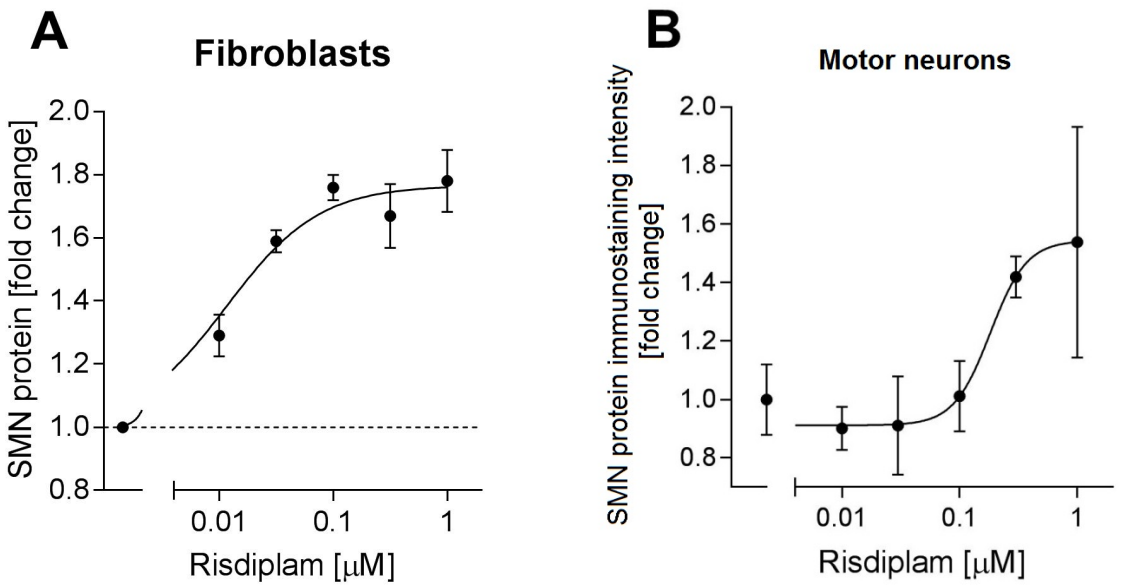
（資料番号4.2.1.1-2 Figure 2及び4より改変）

2.6.2.2.1.2　SMN 蛋白発現作用

（資料番号4.2.1.1-2）

リスジプラムは，SMA I 型患者由来線維芽細胞（図 2.6.2.2.1.2-1 A）において溶媒で処理した場合と比較して SMN 蛋白発現を80%上昇させ，その EC_{50}値は12 ± 3 nmol/L であった。また，SMA I 型患者 iPS 細胞由来運動神経細胞（図 2.6.2.2.1.2-1 B）においても SMN 蛋白発現を60%上昇させ，その EC_{50}値は182 ± 114 nmol/L であった。

図 2.6.2.2.1.2-1　SMA I 型患者由来線維芽細胞及び同患者 iPS 細胞由来運動神経細胞における SMN 蛋白産生誘導



A：SMA I 型患者由来線維芽細胞をリスジプラム存在下で 48 時間培養後に細胞抽出液を調製し，HTRF 法により SMN 蛋白量を測定した。各プロットは平均 ± 標準誤差（n = 3）を示し，溶媒で処理した細胞における発現量と比較している。**B：**SMA I 型患者 iPS 細胞より誘導した運動神経細胞をリスジプラム存在下で 72 時間培養し，SMN 蛋白に対する蛍光免疫染色により SMN 蛋白量を測定した。各プロットは平均 ± 標準誤差（n = 3）を示し，溶媒で処理した細胞における発現量と比較している。
HTRF 法= 均一時間分解蛍光測定法，SMN = survival of motor neuron

（資料番号4.2.1.1-2 Figure 3より改変）

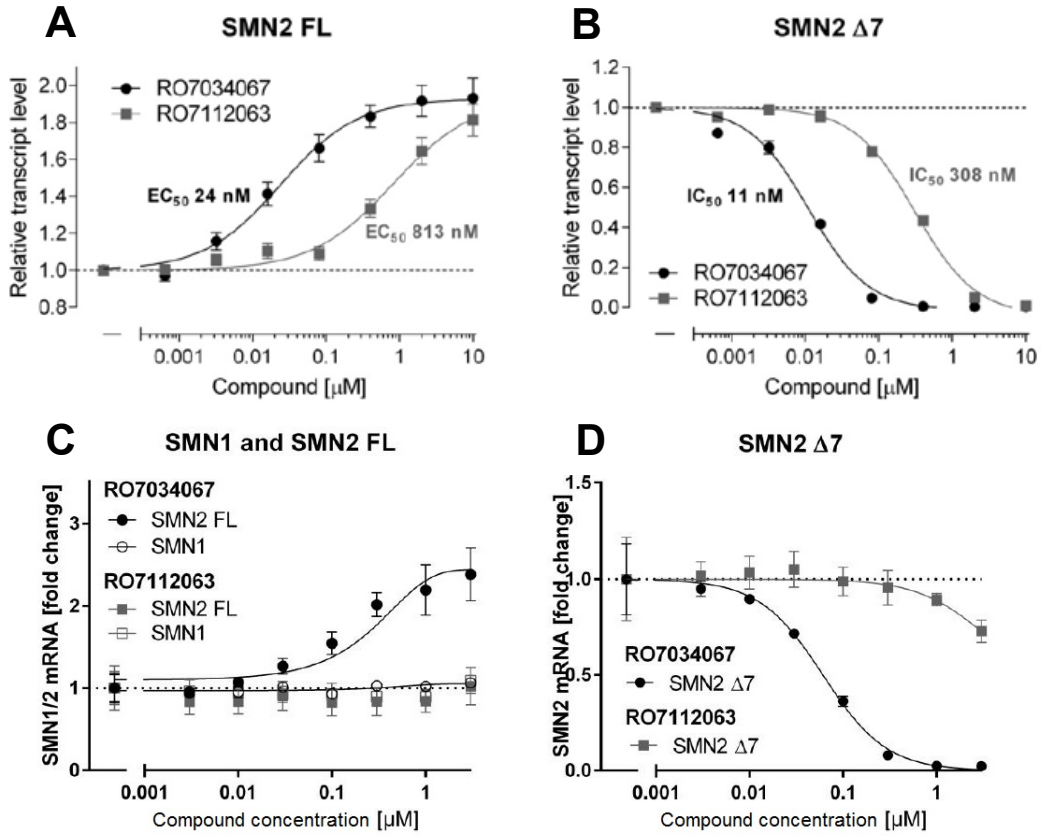
2.6.2.2.1.3　ヒト主要代謝物 M1の *SMN2* mRNA スプライシング修飾作用

（資料番号4.2.1.1-3）

ヒト主要代謝物 M1（詳細は2.6.4を参照）の SMA I 型患者由来線維芽細胞における *SMN2* mRNA スプライシング修飾に対する活性を定量リアルタイム PCR により評価した。その結果，ヒト主要代謝物 M1のスプライシング修飾活性は非常に弱く，完全長 *SMN2* mRNA を増加させる時の EC_{50}値は813 nmol/L であり，リスジプラムの EC_{50}値である24 nmol/L と比較して34倍高かった（図 2.6.2.2.1.3-1 A）。また，ヒト主要代謝物 M1の *SMN2*Δ7 mRNA の産生を減少させる時の IC_{50}値は308 nmol/L であり，リスジプラムの IC_{50}値である11 nmol/L と比較して28倍高かった（図 2.6.2.2.1.3-1 B）。

健常ヒト全血細胞において，リスジプラムは完全長 *SMN2* mRNA の産生を2倍まで増加させたが，ヒト主要代謝物 M1の *SMN2* mRNA 及び *SMN2*Δ7 mRNA に対するスプライシング修飾に対する作用は濃度3 µmol/L まで検出されなかった（図 2.6.2.2.1.3-1 C 及び D）。

図 2.6.2.2.1.3-1　ヒト主要代謝物 M1の 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スプライシング修飾



A，B：SMA I 型患者由来線維芽細胞，**C，D：**健常ヒト全血細胞をリスジプラム（RO7034067）又はそのヒト主要代謝物 M1（RO7112063）の存在下で 24 時間（A，B）及び 4 時間（C，D）培養後に，完全長 *SMN2* mRNA（FL）及びエクソン 7 欠損 *SMN2* mRNA（Δ7）の発現を定量リアルタイム PCR で測定した。各プロットは平均 ± 標準誤差を示し，A（n = 8），B（n = 8），C（n = 3）及び D（n = 3）である。溶媒で処理した細胞における各遺伝子の発現量と比較している。

Δ7 = エクソン 7 を欠失した *SMN2* mRNA，FL = 完全長

（資料番号4.2.1.1-3 Figure 2及び 3より改変）

2.6.2.2.2　*In vivo* 試験

2.6.2.2.2.1　SMNΔ7マウスにおける SMN 蛋白発現作用

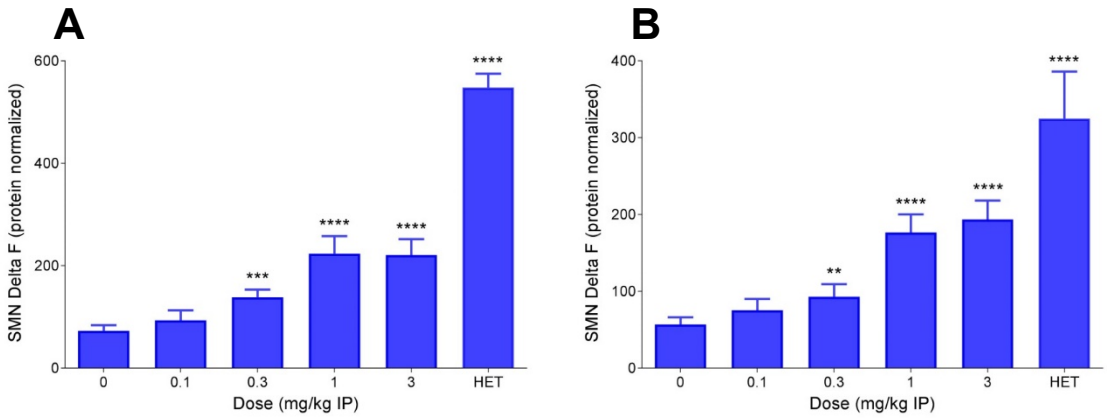
（資料番号4.2.1.1-4）

SMA モデルである SMNΔ7マウスを用いてリスジプラムの *in vivo* における SMN 蛋白発現への効果を評価した。SMNΔ7マウスは，内因性 *Smn1*を遺伝的に欠損させた上で，ヒト全長 *SMN2*及びエクソン7欠失ヒト *SMN2*を導入したマウスであり，SMA I 型に類似した重篤な神経筋変性や組織壊死を示し，成熟前生後3週間以内に死亡するモデルマウスである。

SMNΔ7マウスに溶媒又はリスジプラム（0.1, 0.3, 1 又は3 mg/kg）を生後3日目から9日目まで1日1回の頻度で腹腔内投与した。ヘテロ同腹マウス（HET）は1コピーのマウス *Smn1*アレルを保持するが，SMA に関連する疾患表現型を示さないため，陽性対照として試験系に組み込んだ。最終投与の1時間後，脳と大腿四頭筋を採取し，SMN 蛋白量を測定した。その結果，リスジプラム投与群では用量依存的にかつ統計学的に有意に SMN 蛋白量が増加し，溶媒投与群と比較して最大で3～3.4倍の SMN 蛋白が検出された（P<0.01，ANOVA 多重比較検定）（図

2.6.2.2.2.1-1及び表 2.6.2.2.2.1-1）。しかしながら，いずれのリスジプラム投与群においても HET の SMN 蛋白量までの回復は達成されなかった。

図 2.6.2.2.2.1-1　SMNΔ7マウスの脳及び大腿四頭筋における SMN 蛋白量の増加



生後初期の SMNΔ7 マウスの腹腔内に溶媒又はリスジプラムを 1 日 1 回，7 日間（生後 3 日目から 9 日目まで）投与した。**A**：脳，及び**B**：大腿四頭筋を薬剤投与 1 時間後に採取し，各組織における SMN 蛋白量を HTRF 法で測定した。測定試料中の総蛋白量で標準化した SMN 蛋白の蛍光シグナル（SMN Delta F）をグラフ化し，平均 ± 標準偏差で示した。X 軸 0 Dose（mg/kg IP）が SMNΔ7 マウス溶媒投与群を示す。
** P<0.01; *** P<0.001; **** P<0.0001　（溶媒投与 SMNΔ7 マウスに対する ANOVA 多重比較検定）
IP = 腹腔内，HET = *Smn1* ヘテロ接合マウス，HTRF 法= 均一時間分解蛍光測定法

（資料番号4.2.1.1-4 Figure 2より改変）

表 2.6.2.2.2.1-1　SMNΔ7マウスの脳及び筋肉におけるリスジプラム濃度及び SMN 蛋白量

リスジプラム用量 [mg/kg]	脳			大腿四頭筋		
	リスジプラム濃度 [μg/g]	SMN 蛋白量 [HTRF ΔF]	SMN 蛋白増加量 [%]	リスジプラム濃度 [μg/g]	SMN 蛋白量 [HTRF ΔF]	SMN 蛋白増加量 [%]
0 （溶媒）	—	73.0±10.8	—	—	56.9±9.3	—
0.1	BLQ	93.3±19.6	28	BLQ	75.3±14.9	32
0.3	BLQ	139.0±14.9	90	BLQ	93.1±16.3	64
1.0	0.021	224.0±34.3	206	0.093	177.0±23.8	210
3.0	0.050	221.0±30.9	202	0.183	193.0±24.8	240
HET	—	548.0±27.1	651	—	325.0±61.3	471

生後初期の SMNΔ7 マウスの腹腔内にリスジプラム又は溶媒を 7 日間（生後 3～9 日目まで）投与した。最終投与から 1 時間後に脳及び大腿四頭筋を採取し，各組織におけるリスジプラム濃度の測定を実施し，SMN 蛋白量を HTRF 法で測定した。SMN 蛋白の蛍光シグナル（Delta F）を，各組織サンプルの総蛋白量により標準化した。HTRF 法による測定結果及びリスジプラム濃度は平均 ± 標準偏差で示した。各組織における溶媒投与群と比較した SMN 蛋白の増加率を示した。すべてのリスジプラム投与群の血中においてリスジプラムが検出され，各組織の定量下限は，脳は 0.02 μg/g，及び大腿四頭筋は 0.04 μg/g であった。
BLQ = 定量下限以下，HET = マウス *Smn1* ヘテロ接合マウス，HTRF 法 = 均一時間分解蛍光測定法

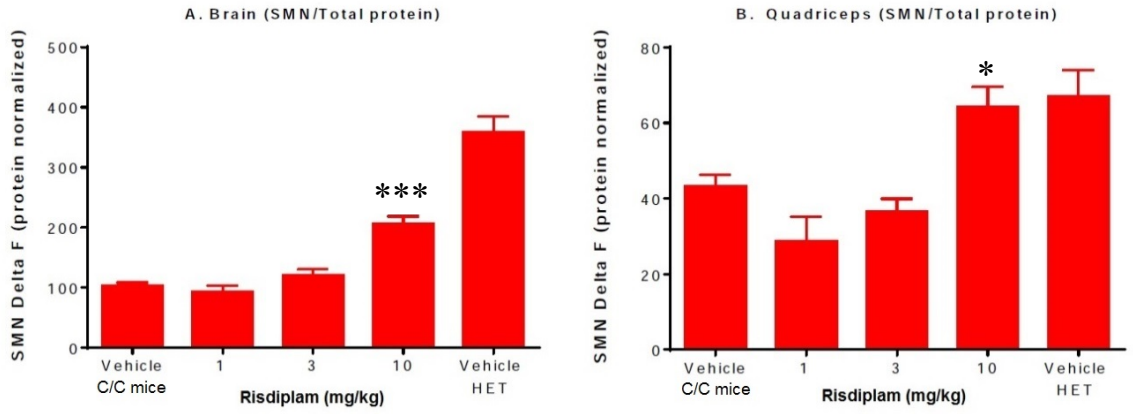
（資料番号4.2.1.1-4 Table 7及び Table 9より改変）

2.6.2.2.2.2 C/C アレルマウスにおける SMN 蛋白発現作用

（資料番号4.2.1.1-5）

C/C アレルモデルマウスの SMA 疾患表現型は SMNΔ7と比較して穏やかであるため，マウスの生後から成熟するまで比較的長期に渡り薬力学的評価を行うことができる。7週齢 C/C マウスに溶媒又はリスジプラム（1，3又は10 mg/kg）を1日1回，10日間，経口投与した。薬剤の最終投与から1時間後に脳及び大腿四頭筋を採取し，SMN 蛋白量を測定した。その結果，すべてのリスジプラム投与群で用量依存的に SMN 蛋白量が増加した（表 2.6.2.2.2.2-1）。脳（図 2.6.2.2.2.2-1 A）及び大腿四頭筋（図 2.6.2.2.2.2-1 B）の両組織で最高用量（10 mg/kg）の投与群のみで統計学的な有意差が検出された。溶媒投与群と比較し SMN 蛋白量は1.5～2倍となった。また，10 mg/kg 投与群の大腿四頭筋では HET とほぼ同等の SMN 蛋白量まで回復した。

図 2.6.2.2.2.2-1 C/C アレルマウスの脳及び大腿四頭筋における SMN 蛋白量の増加



C/C マウス（7 週齢頃）にリスジプラム又は溶媒を 1 日 1 回，10 日間，経口投与した。最終投与から 1 時間後に脳（**A**）及び大腿四頭筋（**B**）を採取し，HTRF 法で SMN 蛋白量を測定した。測定試料中の総蛋白量で標準化した SMN 蛋白の蛍光シグナル（SMN Delta F）をグラフ化し，平均 ± 標準誤差（n = 5）で示した。

* P<0.05; *** P<0.001（溶媒投与 C/C マウスに対する ANOVA 多重比較検定）

HET = ヘテロ接合マウス（マウス *Smn1* 及び C アレルのヘテロ接合マウス），HTRF 法 = 均一時間分解蛍光測定法，C/C マウス = C アレルのホモ接合マウスであり，マウス *Smn1* を欠損したマウス。

（資料番号4.2.1.1-5 Figure 2より改変）

表 2.6.2.2.2.2-1　C/C マウスの脳及び筋肉におけるリスジプラム濃度及び SMN 蛋白量

リスジプラム用量 [mg/kg]	脳			大腿四頭筋		
	リスジプラム濃度 [µg/g]	SMN 蛋白量 [HTRF ΔF]	SMN 蛋白増加量 [%]	リスジプラム濃度 [µg/g]	SMN 蛋白量 [HTRF ΔF]	SMN 蛋白増加量 [%]
0（溶媒）	—	103±12.3	0	—	43.2±7.14	0
1	0.048	92.7±23.4	−10	0.043	29.6±14.8	−34
3	0.246	121±22.1	17	0.320	36.6±7.49	15
10	0.783	207±26.6	101	0.517	64.2±12.1	49
HET	—	359±58.2	248	—	67.2±15.2	56

C/C マウス（7 週齢頃）にリスジプラム又は溶媒を 1 日 1 回 10 日間，経口投与した。最終投与から 1 時間後に脳及び大腿四頭筋を採取し，各組織におけるリスジプラム濃度の測定を実施し，SMN 蛋白量を HTRF 法で測定した。SMN 蛋白の蛍光シグナル（Delta F）を，各組織サンプルの総蛋白量により標準化し，平均 ± 標準偏差（n = 5）で示した。HTRF 法による測定結果及びリスジプラム濃度は平均（n = 5）で示した。また，各組織における溶媒投与群と比較した SMN 蛋白の増加率を示した。各組織の定量下限は，脳及び大腿四頭筋ともに 0.01 µg/g であった。

HET＝ヘテロ接合マウス（マウス *Smn1* 及び C アレルのヘテロ接合マウス），HTRF 法 ＝ 均一時間分解蛍光測定法，C/C マウス＝C アレルのホモ接合マウスであり，マウス *Smn1* を欠損したマウス

（資料番号4.2.1.1-5 Table 6 及び Table 7より改変）

2.6.2.2.2.3　SMNΔ7マウスにおける疾患表現型の改善

リスジプラムを SMNΔ7マウスに投与し，このモデルマウスで特徴的な SMA 疾患に関連した表現型として，マウスの生存率，体重の推移，神経筋接合部位，及び神経筋機能の評価として正向反射及び二次的な組織壊死への影響を検討した。

1)　生存期間の延長

（資料番号4.2.1.1-6）

リスジプラムの SMNΔ7マウスの生存期間に対する効果を評価するために，生後3日目から最終投与日の生後220日目まで溶媒又はリスジプラムを投与した。生後3～23日目まで1日1回腹腔内投与し，生後24日目以降は経口投与を行った。1コピーのマウス内因性 *Smn1*を保持するヘテロ接合マウス（HET）は SMA に関連した疾患表現型を示さないため，陽性対照として試験系に組み込んだ。本試験の投与群の詳細を以下に示す（表 2.6.2.2.2.3-1）。

表 2.6.2.2.2.3-1　SMNΔ7マウスを用いた長期投与試験の群構成

投与群	生後3～23日目までの投与量 QD IP（mg/kg）[a]	生後24～220日目までの投与量 QD PO（mg/kg）[b]
低用量	0.1	0.3
中用量	0.3	1.0
中/高用量	1.0	3.0
高用量	3.0	10.0

IP＝腹腔内; PO＝経口; QD＝1日1回

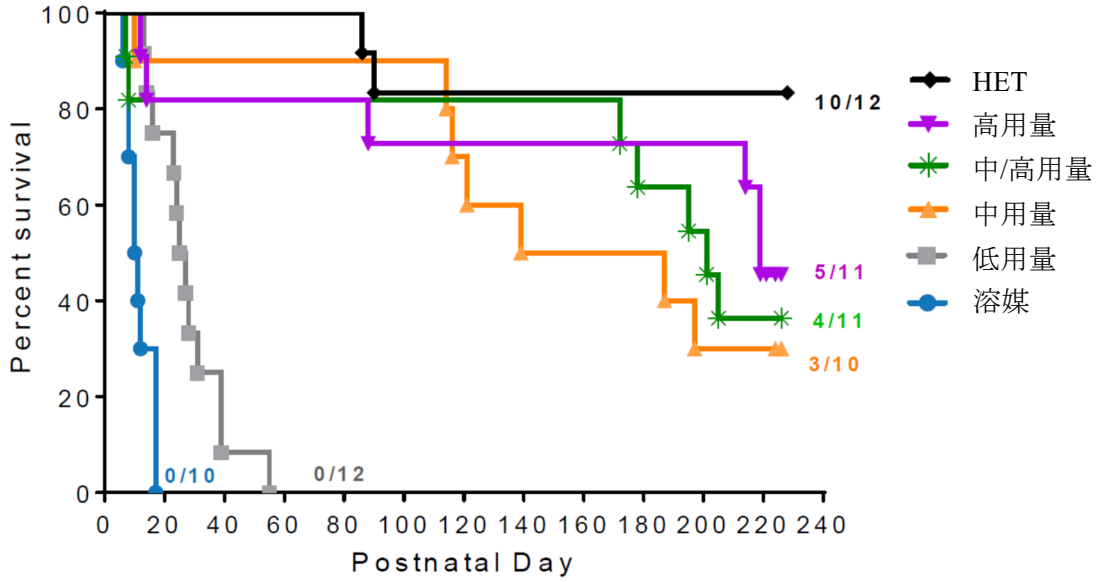
[a] 溶媒: DMSO

[b] 溶媒: 0.5% ヒドロキシプロピルメチルセルロース溶液（HPMC） ＋0.1% Tween 80

（資料番号 4.2.1.1-6 Table 4より改変）

その結果，すべてのリスジプラム投与群は溶媒投与群と比較して統計学的に有意な生存期間の延長を示した。リスジプラム低用量の投与群の生存期間中央値は26日間であり，溶媒投与群の生存期間中央値は10.5日間であったことより，リスジプラムによる生存期間の延長が確認された。更に，この効果は用量依存的に顕著に強くなり，高用量の投与群における生存期間中央値は6カ月を超えた（図 2.6.2.2.2.3-1及び表 2.6.2.2.2.3-2）。

図 2.6.2.2.2.3-1　SMNΔ7マウスの生存率及び生存期間



SMNΔ7 マウスにリスジプラムを生後 3～23 日目では 1 日 1 回腹腔内投与し，以降生後 24～220 日目までは経口投与した。生後 220 日目までの各投与群の個体生存率を示す。各生存曲線の右末端にある数字は，生後 220 日目の生存個体数 / 試験開始時の個体数を示している。

HET = マウス *Smn1* ヘテロ接合マウス，IP＝腹腔内，PO＝経口，Postnatal day＝ 生後日数

（資料番号 4.2.1.1-6 Figure 1 より改変）

表 2.6.2.2.2.3-2　SMNΔ7マウスの生存率及び生存期間

用量（IP/PO）a [mg/kg]	N[b]	生後60日目 生存率 [%]	生後220日目 生存率 [%]	生存期間中央値 [生後日数]
溶媒	10	0	0	10.5
低用量（0.1/0.3）	12	0	0	26.0*
中用量（0.3/1）	10	90	30	163*
中/高用量（1/3）	11	82	36	201*
高用量（3/10）	11	82	45	219*c
HET（溶媒）	12	100	83	>220

雌雄合わせた結果を示す。本試験でリスジプラムの血中濃度は測定していない。

[a] 生後 3～23 日目までは 1 日 1 回腹腔内投与，生後 24～220 日目までは経口投与

[b] 投与開始時の個体数

[c] 陽性対照である HET と統計学的有意差なし（P>0.05，ログランク検定）

* P<0.05, SMNΔ7 マウスの溶媒投与群とのログランク検定

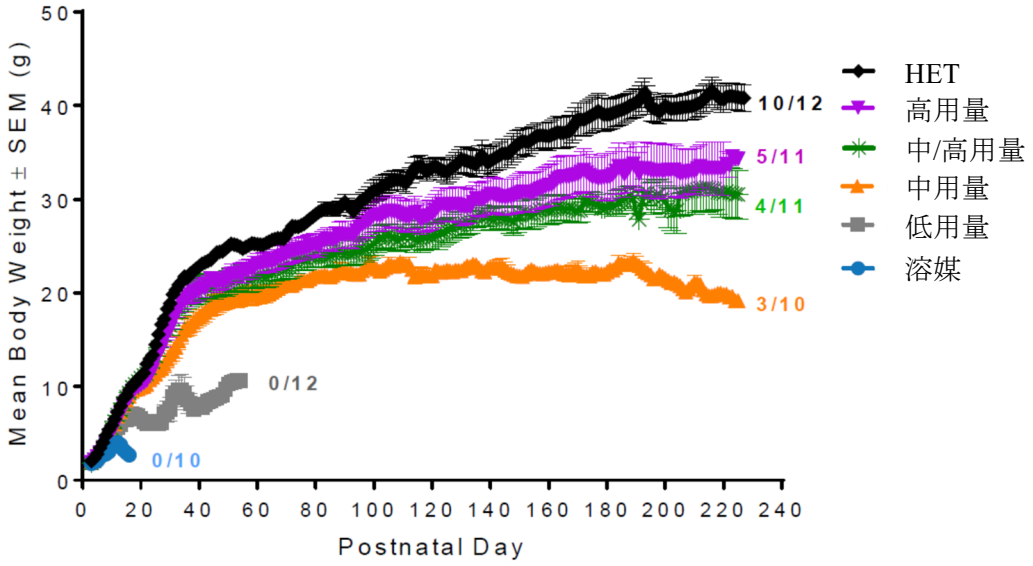
（資料番号4.2.1.1-6 Table 6より改変）

2)　体重の増加

（資料番号4.2.1.1-6）

リスジプラム中用量，中／高用量，及び高用量の投与群では，溶媒投与群と比較して，統計学的に有意に体重が増加した（ランクに基づく ANOVA 検定）（図 2.6.2.2.2.3-2及び表 2.6.2.2.2.3-3）。生後140日目においてリスジプラムの中用量，中/高用量，高用量の投与群の体重は，HET の体重と比較してそれぞれ67%，82%及び91%まで用量依存的に回復した。低用量の投与群は60日目までに死亡し，回復は軽微であった。

図 2.6.2.2.2.3-2　SMNΔ7マウスの体重増加



SMNΔ7マウスにリスジプラムを生後3～23日目まで1日1回腹腔内投与し，以降，生後24～220日目まで経口投与した。各投与群の個体体重を生後220日目まで測定し，平均 ± 標準誤差で示した。各体重曲線の右末端の数字は，生後220日目における生存個体数 / 試験開始時の個体数を示している。

HET = マウス *Smn1*ヘテロ接合マウス，Postnatal day = 生後日数

（資料番号4.2.1.1-6 Figure 2より改変）

表 2.6.2.2.2.3-3　SMNΔ7マウスの体重増加

用量（IP/PO）[a] [mg/kg]	N[b]	最大体重の中央値 [g]			最大体重日数の中央値 [生後日数]			平均 $AUC_{PND3-220}$ [g ● day][c]		
		All	M	F	All	M	F	All	M	F
溶媒	10	2.95	3.87	2.44	9.00	10.0	7.00	20.6	27.1	10.9
低用量（0.1/0.3）	12	6.64	6.17	7.89	17.5	16.0	19.00	139	111	179
中用量（0.3/1）	10	25.0 *	27.6 *[d]	22.7 *	108 *[d]	107 *[d]	132 *[d]	2917 *	3073 *[d]	2760 *
中/高用量（1/3）	11	31.0 *	33.3 *[d]	27.5 *	190 *[d]	198 *[d]	177 *[d]	3848 *	4262 *[d]	3504 *
高用量（3/10）	11	33.4 *	36.4 *[d]	25.0 *	189 *[d]	191 *[d]	189 *[d]	4205 *[d]	5160 *[d]	3059 *
溶媒（HET）	12	41.1 *	38.0 *	43.2 *	193 *	205 *	192 *	5687 *	4828 *	6547 *

[a] 生後 3～23 日目は 1 日 1 回腹腔内投与，生後 24～220 日目は経口投与

[b] 投与開始時の個体数

[c] 各個体の $AUC_{PND3-220}$ を計算した後，投与群内の平均を算出した。

[d] 陽性対照である HET と統計学的有意差なし（P>0.05, ANOVA 多重比較検定）

* P<0.05, SMNΔ7 マウス溶媒投与群との ANOVA 多重比較検定

$AUC_{PND3-220}$ = 生後 3 日目から生後 220 日目までの体重-時間曲線下面積，F = 雌マウス，HET = マウス *Smn1* ヘテロ接合マウス，IP＝腹腔内，M = 雄マウス，PND = Postnatal day（生後日数），PO＝経口

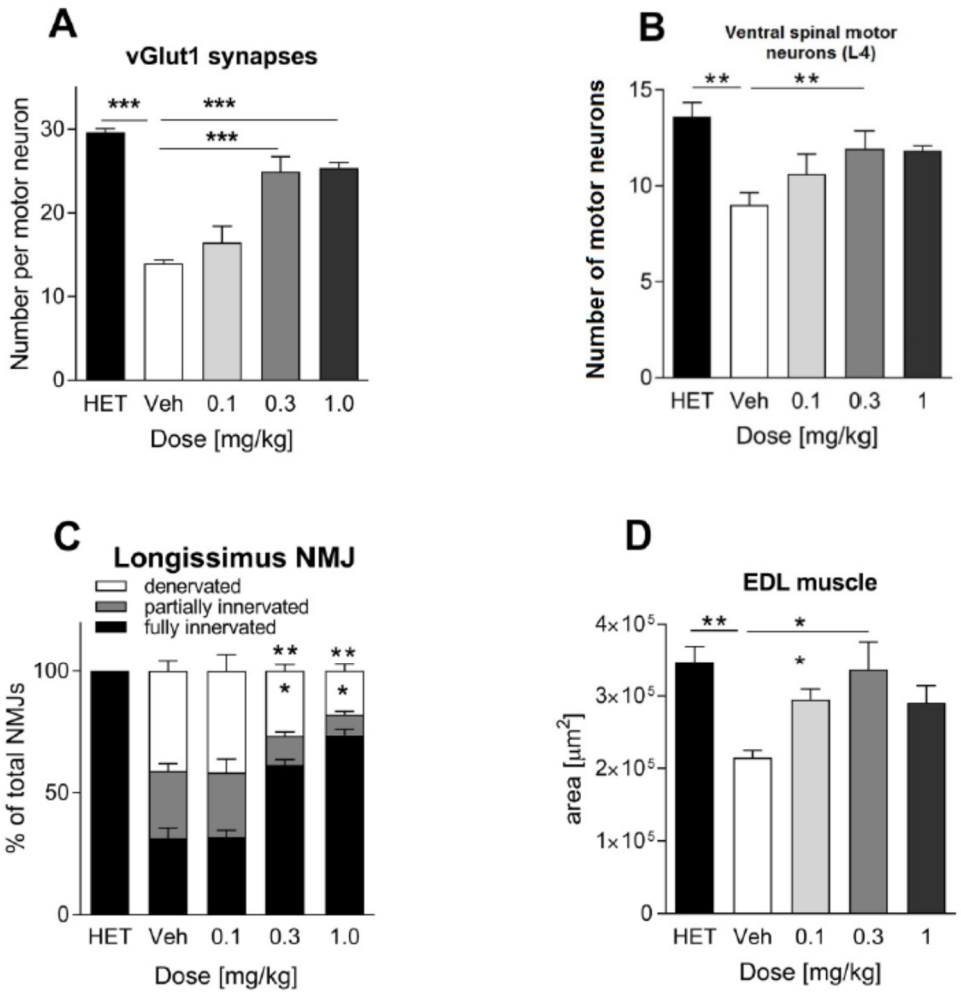
（資料番号4.2.1.1-6 Table 7より改変）

3)　神経筋接合の回復

（資料番号4.2.1.1-2）

SMNΔ7マウスでは，ヘテロ接合体の同腹児と比べて，第3腰髄から第5腰髄（L3～5）の運動ニューロンにおける vGlut1陽性シナプス数の有意な低下，第4腰髄の運動ニューロンの消失，最長筋における神経筋接合部（NMJ）の脱神経，及び長指伸筋（EDL）の筋萎縮が認められる。そこで，SMNΔ7マウスに溶媒又はリスジプラム（0.1，0.3 又は1 mg/kg）を生後3日目から生後14日目まで1日1回腹腔内投与しリスジプラムの効果を評価した。生後14日目の最終投与1時間後に脊髄及び筋肉組織を採取し，それらの組織学的解析を行った。その結果，リスジプラム投与群では，SMNΔ7マウス溶媒投与群と比べて vGlut1陽性シナプス数，運動ニューロン数，神経支配が完全な NMJ の割合，及び EDL の線維サイズに用量依存的かつ有意な増加が認められた（図 2.6.2.2.2.3-3）。

図 2.6.2.2.2.3-3 SMNΔ7マウスの神経筋接合の回復（短期試験）



SMNΔ7 マウスにリスジプラムを生後 3 日目から生後 14 日目まで 1 日 1 回 IP 投与（0.1，0.3 又は 1 mg/kg）した。生後 14 日目に脊髄及び筋肉組織を採取し，それらの免疫組織化学的解析により NMJ 及び筋萎縮を評価した。**A:** L3～5 運動ニューロンにおける vGlut1 陽性シナプス数，**B:** 腹側脊髄 L4 における運動ニューロン数，**C:** 最長筋における機能的な NMJ，**D:** EDL の切片面積

各データは平均 ± 標準誤差（n = 4～10）を示す。

* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001（SMNΔ7 溶媒投与群に対する一元配置 ANOVA 検定及びダネット多重比較検定）

EDL = 長指伸筋，HET = マウス *Smn1* ヘテロ接合マウス，IP = 腹腔内，L3～5 = 第 3～5 腰髄，L4 = 第 4 腰髄，NMJ = 神経筋接合部，Veh = 溶媒，vGlut1 = vesicular glutamate transporter 1

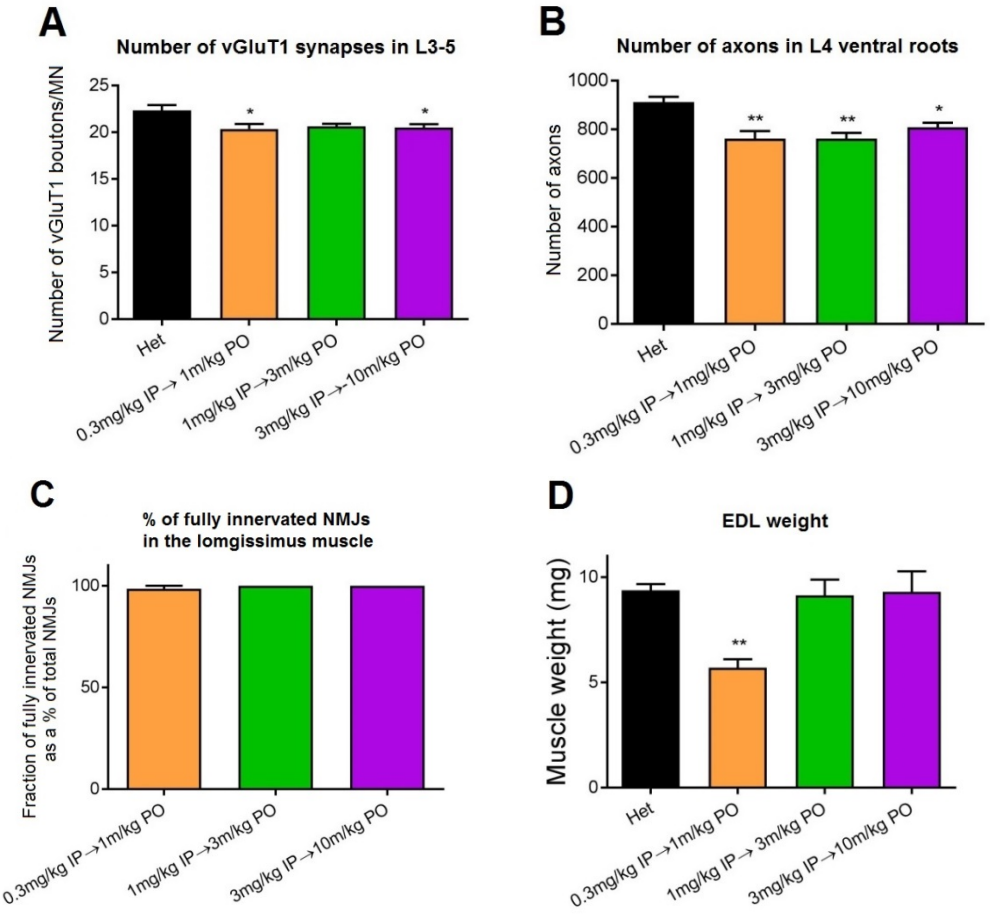
（資料番号4.2.1.1.-2 Figure 7より改変）

（資料番号4.2.1.1-6）

リスジプラムは，投与を生後3日目から生後220日目まで延長した長期試験でも NMJ に対して同様の効果を持つ傾向がみられた（図 2.6.2.2.2.3-4）。しかしながら，L3～5の vGlut1陽性シナプス数及び L4の前根軸索数は陽性対照である HET と比較した場合，統計学的に有意に低値であった（図 2.6.2.2.2.3-4 A 及び B）。リスジプラムを投与しない SMN Δ 7マウスは生後14日目において最長筋の NMJ の顕著な脱神経が観察されるが，リスジプラムを投与したすべての群では神経と完全に接合した NMJ が認められた（図 2.6.2.2.2.3-4 C）。また，中/高用量及

び高用量の投与群において EDL の重量は HET と違いがないまでに回復したが，中用量投与群の EDL 重量は有意に低かった（図 2.6.2.2.2.3-4 D）。

図 2.6.2.2.2.3-4　SMNΔ7マウスの神経筋接合の回復（長期試験）



SMNΔ7 マウスにリスジプラムを生後 3～23 日目まで 1 日 1 回 IP 投与し，以降生後 24～220 日目まで PO 投与した。x 軸に示される 0.3 mg/kg IP→1 mg/kg PO は中用量，1 mg/kg IP→3 mg/kg PO は中/高用量，3 mg/kg IP→10 mg/kg PO は高用量に相当する（表 2.6.2.2.2.3-1）。生後 220 日目に組織を採取し，各評価を実施した。**A:** L3～5 の vGlut1 シナプス数を免疫組織化学染色により定量した。**B:** L4 前根の軸索数を組織学的に定量した。**C:** 神経接合した最長筋を免疫組織染色により定量した。投与群間の統計学的な有意差は認められなかった（P>0.05，一元配置 ANOVA 多重比較検定）**D:** EDL の重量を測定した。
データは平均 ± 標準誤差（n = 3～5）を示す。
* P<0.05, ** P<0.01（HET に対する一元配置 ANOVA 多重比較検定）
HET = マウス *Smn1* ヘテロ接合マウス，EDL = 長指伸筋，IP = 腹腔内，L3～5 = 第 3～5 腰髄，L4 = 第 4 腰髄，MN = 運動ニューロン，NMJ = 神経筋接合部，PO = 経口，vGlut1 = vesicular glutamate transporter 1

（資料番号4.2.1.1-6 Figure 9, 10, 11及び12より改変）

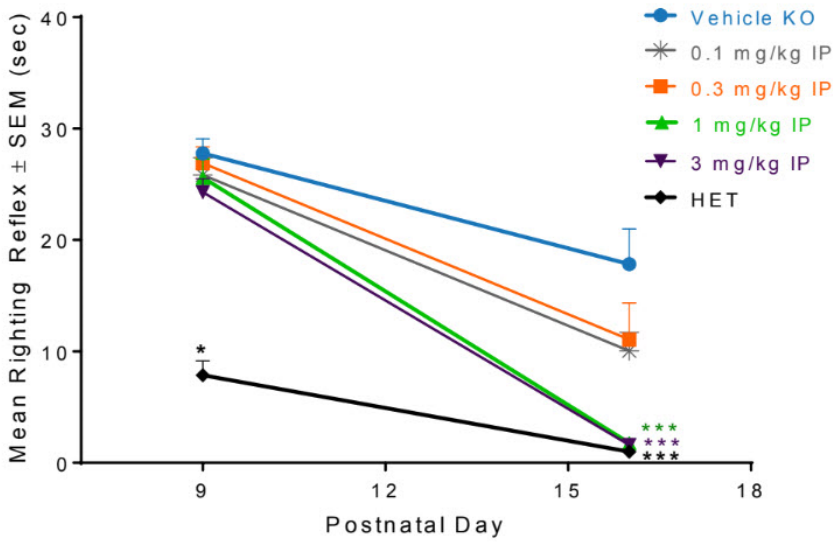
4)　正向反射の改善

（資料番号4.2.1.1-6）

SMNΔ7マウスへリスジプラムを投与することにより用量依存的に正向反射を改善した（図 2.6.2.2.2.3-5）。生後9日目で HET マウスは正向反射を示すが，SMNΔ7マウスはリスジプラム投与の有無に関わらず正向反射を示すことができない。しかしながら，リスジプラムを2週間弱投与した生後16日目の SMNΔ7マウスにおいて用量依存的に正向反射が改善した。高用量及び中/高用量の投与群において HET との差は認められなかったのに対し，中用量及び低用量の

投与群では正向反射の改善は認められたものの，その効果は弱かった。

図 2.6.2.2.2.3-5 SMNΔ7マウスの正向反射の改善



SMNΔ7 マウスにリスジプラム又は溶媒を生後 3 日目から生後 16 日目まで 1 日 1 回，IP 投与し，生後 9 日目及び生後 16 日目で姿勢を正せるまでの時間を測定した。投与量は，高用量：3 mg/kg，中/高用量：1 mg/kg．中用量：0.3 mg/kg，低用量：0.1 mg/kg であり，データは平均 ± 標準誤差を示す。* P<0.05, *** P<0.001 （溶媒投与群との一元配置 ANOVA 検定）。生後 16 日目の溶媒投与群における生存個体が少なかったため（n = 2），溶媒投与群に対する中用量及び低用量の投与群の統計学的有意差を決定することはできなかった。生後 9 日目及び生後 16 日目における生存個体数はそれぞれ以下の通り。HET（n = 12, n = 12），高用量投与群（n = 9, n = 11），中/高用量投与群（n = 9, n = 9），中用量投与群（n = 10, n = 9），低用量投与群（n = 11, n = 9），溶媒投与群（n = 8, n = 2）。
HET = マウス *Smn1* ヘテロ接合マウス，IP = 腹腔内

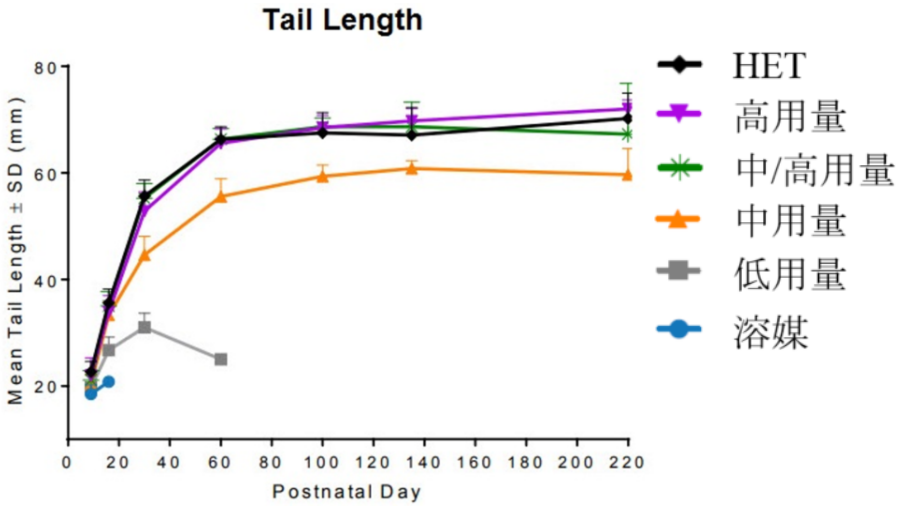
（資料番号4.2.1.1-6 Figure 6より改変）

5) 組織壊死の減少

（資料番号4.2.1.1-6）

SMA 患者の遠位組織における組織壊死が報告されている[5)]。また，SMNΔ7マウス[6)]も眼，耳，及び手足等で壊死を起こし，特に尾部組織の壊死により尾は短小化する。リスジプラムのSMNΔ7マウス尾部組織壊死に対する影響を尾の長さを測定することで検討した。その結果，リスジプラムの中用量，中/高用量，及び高用量投与群において顕著な回復を認め，尾の長さは HET と同等まで回復した（図 2.6.2.2.2.3-6）。

図 2.6.2.2.2.3-6 SMNΔ7マウスの尾部組織壊死の減少

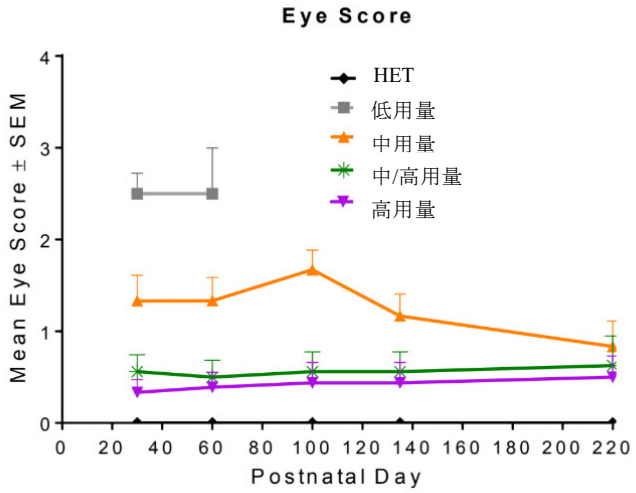


SMNΔ7マウスにリスジプラムを生後3～23日目まで1日1回 IP 投与し，以降，生後24～220日まで PO 投与した。組織壊死の程度をマウスの尾の長さを測定することで定量した。データは平均 ± 標準偏差を示す。各群の投与量及び測定時における個体数は以下の通り。HET：生後9, 16及び30日目 n = 12, 生後60日目 n = 11, 生後100, 135及び220日目 n = 10；高用量（3 mg/kg IP 後 10 mg/kg PO）：生後9日目 n = 11, 生後16, 30及び60日目 n= 9, 生後100及び135日目 n = 8, 生後220日目 n = 6；中/高用量（1 mg/kg IP 後 3 mg/kg PO）：生後9, 16, 30, 60及び135日目 n = 9, 生後220日目 n = 4；中用量（0.3 mg/kg IP 後 1 mg/kg PO）：生後9日目 n = 10, 生後16, 30, 60及び100日目 n = 9, 生後135日目 n = 6, 生後220日目 n = 3；低用量（0.1 mg/kg IP 後 3 mg/kg PO）：生後9日目 n = 12, 生後16日目 n = 9, 生後30日目 n = 3, 生後60日目 n = 1；溶媒投与群：生後9日目 n = 10, 生後16日目 n = 2
HET = マウス *Smn1* ヘテロ接合マウス，IP = 腹腔内，PO = 経口

（資料番号4.2.1.1-6 Figure 7より改変）

また，リスジプラムは眼周囲の組織壊死も半定量的な評価尺度による判定で減少させた。中/高用量及び高用量の投与群では組織壊死の明らかな減少が確認できたが，それでも組織壊死は残存しており，評価期間中の重症度は評価開始から変わらなかった（図 2.6.2.2.2.3-7）。

図 2.6.2.2.2.3-7　SMNΔ7マウスの眼周辺組織壊死の減少



SMNΔ7マウスにリスジプラムを生後3～23日目まで1日1回 IP 投与し，以降，生後24～220日目は PO 投与した。生後30, 60, 100, 135及び220日目において，眼周辺の組織壊死をスコア0（組織壊死なし）からスコア3（重度の組織壊死）までの半定量的な評価尺度によりスコア化し，各投与群の平均スコアを算出した。スコア0：正常，瞼に異常を認めない。スコア1：低度の組織壊死。瞼に弱い炎症がある。スコア2：中程度の組織壊死。瞼に強い炎症があり，瞼が半分程度閉じている。スコア3：重度の組織壊死。重度の炎症と組織壊死により瞼が完全に閉じている。データは平均 ± 標準誤差を示す。各群の投与量，測定日及び測定数は以下の通り。HET：生後30及び60日目 n = 24，生後100, 135及び220日目 n = 20；高用量（3 mg/kg IP 後 10 mg/kg PO）：生後30及び60日目 n = 18，生後100及び135日目 n= 16，生後220日目 n = 12；中/高用量（1 mg/kg IP 後 3 m/kg PO）：生後30, 60, 100及び135日目 n = 18，生後220日目 n = 8；中用量（0.3 mg/kg IP 後 1 mg/kg PO）：生後30, 60及び100日目 n = 18，生後135日目 n = 12，生後220日目 n = 6；低用量（0.1 mg/kg IP 後 3 mg/kg PO）：生後30日目 n = 6，生後60日目 n = 2。なお，溶媒投与群は生後30日目まで生存できないため本図には示されていない。
HET = マウス *Smn1* ヘテロ接合マウス，IP = 腹腔内，PO = 経口

（資料番号4.2.1.1-6 Figure 8より改変）

2.6.2.3　副次的薬理試験

In vitro トランスクリプトーム解析によりリスジプラムの *SMN2*エクソン7への特異性が示された。SMA I 型患者由来線維芽細胞においてリスジプラムは *STRN3*及び *SLC25A17*のスプライシングに影響を与えるが，転写には関与しないことが明らかとなった。90%効果濃度（EC_{90}）よりも5倍高い濃度のリスジプラムは，11種類の遺伝子のスプライシングに影響を与え，それらの中には細胞周期の調節に関わる *FOXM1*及び 細胞生存に関わる *MADD* が含まれていた。

2.6.2.3.1　副次的スプライシング標的の検討

（資料番号4.2.1.1-1［4.2.1.2-1］）

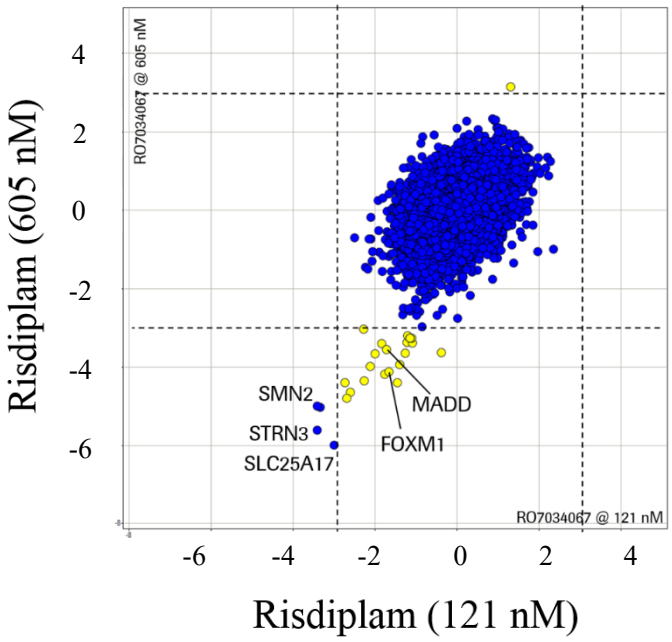
潜在的なオフターゲット効果を調べるために，SMA I 型患者由来線維芽細胞を用いた包括的トランスクリプトーム解析を実施した。その結果，リスジプラムは *SMN2*のスプライシングを

修飾することで完全長 *SMN2* mRNA を増加させるとともに，Δ7 *SMN2* mRNA を減少させ，この時の EC_{90}値は121 nmol/L であった。そのため，本転写プロファイリング解析では，リスジプラムの処理濃度として121 nmol/L，及び更に高濃度の605 nmol/L を採用した。各スプライスバリアントに対して標準化した mRNA 測定値を算出し，バリアントの比率（及び変動率[ΔlogFC]）を溶媒処理サンプルの対応する値と比較した。その値が0である場合は，溶媒処理とリスジプラム処理サンプルにおけるバリアント比率が同一であったことを示している。

295,000種のスプライシング事象を解析した結果，*STRN3*及び *SLC25A17*のスプライシングは*SMN2*エクソン7スプライシングと同等の変動率（ΔlogFC ～3）があることが明らかとなった（図 2.6.2.3.1-1）。なお，リスジプラムの121 nmol/L 及び605 nmol/L の両濃度において，*STRN3*及び *SLC25A17*のスプライスバリアント変動はみられたが，これらの遺伝子の転写量に顕著な変化はみられなかった（図 2.6.2.3.1-2）。

EC_{90}値よりも5倍高い濃度である605 nmol/L で細胞を処理した場合，更に先に述べた *FOXM1* 及び *MADD* も含め，11種類の遺伝子がスプライシングに影響を受けることが明らかとなった。これらの追加的な遺伝子群は121 nmol/L（EC_{90}）で細胞を処理した場合には検出されなかった（図 2.6.2.3.1-1）。なお同様に，リスジプラムの121 nmol/L 及び605 nmol/L の両濃度において，*FOXM1*及び *MADD* のスプライスバリアント変動はみられたが，これらの遺伝子の転写量に顕著な変化はみられなかった（図 2.6.2.3.1-3）。

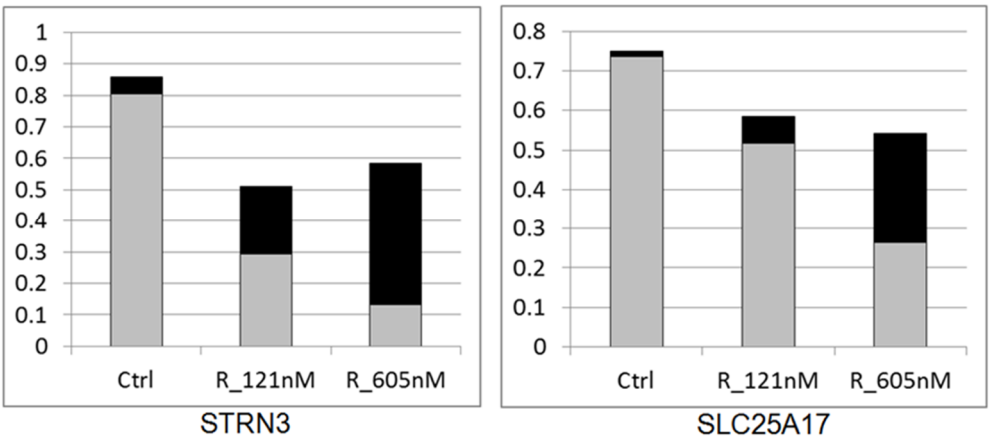
図 2.6.2.3.1-1 SMA I 型患者由来線維芽細胞のトランスクリプトーム解析



リスジプラムで処理した SMA I 型患者由来線維芽細胞における包括的なスプライシング事象を溶媒で処理した場合のものと比較した。スプライシング事象は，低濃度リスジプラム [121 nmol/L]（x 軸）及び高濃度リスジプラム [605 nmol/L]（y 軸）における完全長のスプライシング及びあるエクソンをスキップしたスプライシングの変動をΔlogFC（log 倍）で示し，溶媒処理のものとカットオフ値をΔlogFC ± 3（図中の破線）として比較した。その結果，*SMN2, SLC25A17* 及び *STRN3* のスプライシングが両濃度のリスジプラムの影響を受けることが明らかになった（図左下の 3 プロット）。また，11 遺伝子（黄色のプロット）が高濃度のリスジプラム処理により影響を受けた。

（資料番号4.2.1.1-1 [4.2.1.2-1] Figure 8より改変）

図 2.6.2.3.1-2 リスジプラム処理 SMA I 型患者由来線維芽細胞における *STRN3*及び *SLC25A17*のスプライシング変動

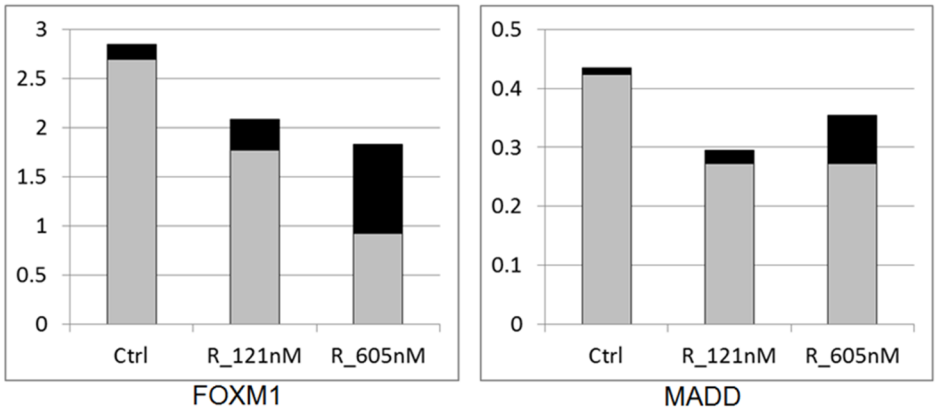


STRN3 及び *SLC25A17* のスプライスバリアント（灰色）とリスジプラム処理により代替されたスプライスバリアント（黒色）の発現量を示す。一般的に両バリアントは共通の一か所のスプライスサイトより生じる。例えば，あるスプライシングでは 1 つのエクソンをスキップし，またある場合は 2 つのエクソンをスキップするが，両スプライシングは同一のスプライス提供部位が使用される。各処理方法において，灰色部分と黒色部分を足し合わせることで両バリアントの発現量となる。

Ctrl = DMSO，DMSO = ジメチルスルホキシド，R = リスジプラム

（資料番号4.2.1.1-1 [4.2.1.2-1] Figure 10より改変）

図 2.6.2.3.1-3 リスジプラム処理 SMA I 型患者由来線維芽細胞における *FOXM1*及び *MADD* のスプライシング変動



FOXM1 及び *MADD* のスプライスバリアント（灰色）とリスジプラム処理により代替されたスプライスバリアント（黒色）の発現量を示す。

Ctrl = DMSO，DMSO = ジメチルスルホキシド，R = リスジプラム

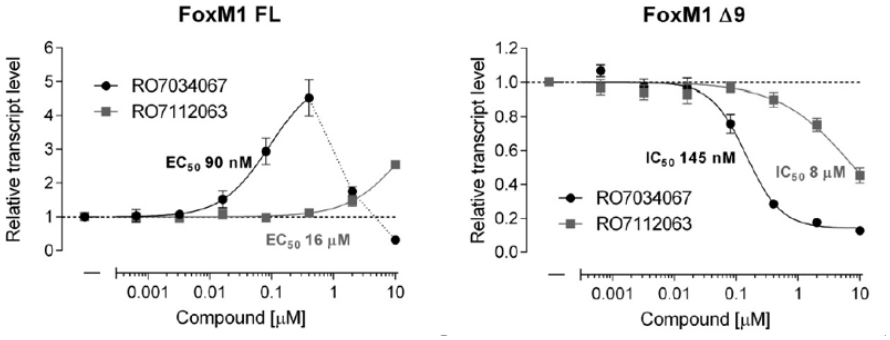
（資料番号4.2.1.1-1 [4.2.1.2-1] Figure 12より改変）

2.6.2.3.2　リスジプラム及びヒト主要代謝物 M1 の FOXM1 スプライシングに対する影響

（資料番号4.2.1.1-3）

完全長 *FOXM1* mRNA（*FOXM1* FL）及びエクソン9を欠失した *FOXM1* Δ9 mRNA に対する特異的プライマーによる定量的 PCR により，リスジプラム及びヒト主要代謝物 M1の SMA I 型患者由来線維芽細胞における *FOXM1*スプライシングに対する影響を検討した。その結果，リスジプラムは完全長 *FOXM1* FL を増加させ（EC_{50}値は90 nmol/L），*FOXM1* Δ9を減少させた（IC_{50}値は145 nmol/L）が，ヒト主要代謝物 M1の EC_{50}値は16 μmol/L，IC_{50}値は8 μmol/L となり，リスジプラムよりも55～178倍高い値を示し，ヒト主要代謝物 M1の副次的スプライシング効果は非常に弱いと考えられた。

図 2.6.2.3.2-1　SMA I 型患者由来線維芽細胞における FOXM1のスプライシング変動



SMA I 型患者由来線維芽細胞をリスジプラム（RO7034067）又はヒト主要代謝物 M1（RO7112063）の存在下で 24 時間培養後に，完全長 *FOXM1* mRNA（FL）及びエクソン 9 欠損 *FOXM1* mRNA（Δ9）の発現を定量的リアルタイム PCR にて解析した。溶媒処理細胞における発現量に対する変化を示す。データは平均 ± 標準誤差（n = 8）を示す。

（資料番号4.2.1.1-3 Figure 2より改変）

2.6.2.3.3　その他のオフターゲットの検討

（資料番号 4.2.1.2-2）

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より検討した。薬剤濃度は10 μmol/L とし，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 COX1 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。なお，機能的な特性（アゴニスト，アンタゴニスト等）は検討していない。

2.6.2.4 安全性薬理試験

リスジプラムの安全性薬理試験として，*in vitro* 心血管系試験（hERG 試験），カニクイザルを用いた *in vivo* 心血管系試験（テレメトリー試験），ラットを用いた中枢神経系試験（Irwin 変法）及びラットを用いた呼吸系試験（全身プレチスモグラフィー）を GLP（医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準）下で実施した。

2.6.2.4.1 心血管系に対する影響（*in vitro* hERG 試験）

（資料番号 4.2.1.3-2）

hERG チャネルを発現させたチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いて，リスジプラムの hERG K^+電流に与える影響を0.02～4.7 μmol/L の濃度範囲で検討した（マニュアルパッチクランプ法）。リスジプラムは最高濃度の4.7 μmol/L まで，hERG K^+電流に対する阻害作用を示さなかった。

なお，本試験に先立ち実施した非 GLP 試験（オートパッチクランプ法）においても，5 μmol/L（名目濃度）までの濃度において hERG K^+電流に対する影響は認められなかった（4.2.1.3-1）。

2.6.2.4.2 心血管系に対する影響（カニクイザルテレメトリー試験）

（資料番号 4.2.1.3-3）

テレメトリー送信機を埋植したカニクイザル（雌雄各3例）にリスジプラムを0，1，3又は7.5 mg/kg の用量でクロスオーバー法により経口投与した。各投与間に少なくとも2日間の休薬期間を設定し，テレメトリー測定終了後に，トキシコキネティクス評価のための最終投与を行った。

リスジプラムを7.5 mg/kg までの用量で投与したとき，投与後24時間までの全身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。

したがって，リスジプラムのカニクイザル心血管系に対する無影響量（NOEL）は，7.5 mg/kg（投与後3時間の血漿中濃度[雌雄合算]：894 ± 236 ng/mL）以上と判断した。

2.6.2.4.3 中枢神経系に対する影響（ラット Irwin 試験）

（資料番号 4.2.1.3-4）

Wistar Hannover ラット（各群雄8例）にリスジプラムを0（溶媒），1，3又は10 mg/kg の用量で単回経口投与し，投与前，投与後30分，1，2，5及び24時間後に Irwin 法による一般行動，自律神経系及び運動神経系に与える影響の評価を行った。本試験では体温への影響についても評価した。

10 mg/kg までの用量において，いずれの評価項目にもリスジプラムの影響は認められず，NOEL は10 mg/kg 以上と判断した。

2.6.2.4.4 呼吸系に対する影響（ラット全身プレチスモグラフィ試験）

（資料番号 4.2.1.3-5）

Wistar Hannover ラット（各群雄8例）にリスジプラムを0（溶媒），1，3又は9 mg/kg の用量で単回経口投与し，非拘束覚醒下での呼吸機能パラメータを全身プレチスモグラフィにより取得した。

対照群と比較して，リスジプラムの9 mg/kg までの用量による投与後4時間までの呼吸系パラメータ（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）に影響は認められず，NOEL は9 mg/kg 以上と判断した。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

本申請にあたり該当する試験は実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

1) 効力を裏付ける試験

*SMN1*及びそのパラロガスである *SMN2*より発現する SMN 蛋白は，運動ニューロンの発達及び生存に関与する。また，ヒトにおいては *SMN1*欠損が SMA の原因の1つであり，*SMN2*コピー数及び SMN 蛋白の発現量と SMA の重症度が相関する。これらのことから，SMA 患者において SMN 蛋白量を増加させることは SMA の病態進展の抑制において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，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疾患表現型に対し有益な効果を示した。

In vitro 試験において，リスジプラムの薬理活性は *SMN2*の選択的スプライシングを修飾し，SMN 蛋白量を増加させることであることを示した。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 蛋白量を増加させた。

In vivo 試験において，リスジプラムの *SMN2* pre-mRNA スプライシングに対する修飾の効果を，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標的組織である脳及び筋肉において SMN 蛋白量を増加させた。更に，SMA の神経筋組織と非常に類似した病理を示す SMNΔ7マウスモデルでは[8)]，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関連症状を呈し，平均余命は生後3週間以内であるが，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，平均生存期間は6カ月を超えるまで延長された。

2) リスジプラムの特異性

低分子化合物であるリスジプラムが *SMN2*に対して特異的に作用する分子メカニズムの仮説は，リスジプラムの開発時に試験ツールとして使用されていた類縁化合物を用いた検証結果より提唱されている[9)]。それによるとリスジプラムが *SMN2* pre-mRNA 上の5'ss 及び ESE2という2カ所の異なる領域に結合することで未同定のリボ核蛋白複合体を安定化することが重要であると考えられる。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 *SMN2* エクソン7ーイントロン7領域の5'ss は *SMN2*以外の様々な遺伝子にも見つかるが，5'ss 及び ESE2が共に見出される遺伝子は，*SMN2*以外には *STRN3*のみである。*STRN3*は機能未知の遺伝子であり，リスジプラムによりエクソン6及びエクソン7の選択的スプライシングが修飾されることが明らかになっている。

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。EC_{90}値よりも5倍高い605 nmol/L のリスジプラムを使用した場合，それらの他に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）。

*FOXM1*は細胞周期の制御因子をコードする。ヒト及び毒性試験の対象動物のカニクイザルにおいては，転写活性を持たない *FOXM1A* バリアントはエクソン9を含む完全長 mRNA より産生され，転写活性を持つ *FOXM1B/C* バリアントは，エクソン9を含まない Δ9 mRNA より産生される[7) 8) 9) 10)]。したがって，*FOXM1A* バリアントの増加とそれに伴う *FOXM1B/C* バリア

ントの減少は，細胞周期の進行を阻害することが予想される。*FOXM1*及び *MADD* のスプライシング修飾の変動がもたらす機能的結果を細胞周期解析及び RNA シークエンシング解析を通して考察し，2.6.6に記載した。

3) 安全性薬理／副次的薬理

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。また，リスジプラム及びヒト主要代謝物 M1についての酵素，レセプター及びイオンチャネルとの相互作用試験において，いくつかのオフターゲット標的が同定され，最も強力な阻害作用が COX1及び COX2（IC_{50}値：約2 μmol/L），並びにアセチルコリンエステラーゼ（リスジプラム及び代謝物 M1の IC_{50}値：0.6 μmol/L 及び 2 μmol/L）で認められた。これらの作用が安全性に及ぼす影響の可能性については，2.4.4.9に記載した。

4) ヒト主要代謝物 M1

リスジプラムのヒト主要代謝物 M1は，*in vitro* において *SMN2*及び副次的スプライシング標的遺伝子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ことから，臨床用量におけるヒトへの影響は極めて限定的であると考えられた。

以上，これらの非臨床薬理試験の結果より，リスジプラムは *SMN2* mRNA のスプライシングを特異的に修飾して機能性 SMN 蛋白を増加させることで，臨床における SMA の病態進展を効果的に抑制すると考えられる。

2.6.2.7 図表

図表は本文中に挿入した。

2.6.2.8 参考文献

1） Costa RH. FoxM1 dances with mitosis. Nat Cell Biol 2005;7:108-10.
2） 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.
3） Laoukili J, Stahl M, Medema RH. FoxM1: at the crossroads of ageing and cancer. Biochim Biophys Acta 2007;1775:92-102.
4） 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.
5） Araujo AQ, Araujo M, Swoboda KJ. Vascular perfusion abnormalities in infants with spinal muscular atrophy. J Pediatr 2009;155:292-4.
6） Meyer K, Marquis J, Trüb J, Nlend Nlend R, Verp S, Ruepp MD, et al. Rescue of a severe mouse model for spinal muscular atrophy by U7 snRNA-mediated splicing modulation. Hum Mol Genet 2009;18:546-55.
7） Passini MA, Bu J, Richards AM, Kinnecom C, Sardi SP, Stanek LM, et al. Antisense oligonucleotides delivered to the mouse CNS ameliorate symptoms of severe spinal muscular atrophy. Sci Transl Med 2011;3:72ra18.
8） Butchbach ME, Edwards JD, Burghes AH. Abnormal motor phenotype in the SMNDelta7 mouse model of spinal muscular atrophy. Neurobiol Dis 2007;27:207-19.
9） 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;8:1476-88.

10）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.

目次

2.6.3 薬理試験概要表 3
2.6.3.1 薬理試験一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.3.3 副次的薬理試験 9
2.6.3.4 安全性薬理試験 10
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 11

表一覧

表 2.6.3.1-1 薬理試験一覧表 3
表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験 5
表 2.6.3.3-1 副次的薬理試験 9
表 2.6.3.4-1 安全性薬理試験 10

略語一覧

略語	英名	和名
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
C_{max}	Maximum concentration	最高濃度
CNS	Central nervous system	中枢神経系
COX	Cyclooxygenase	シクロオキシゲナーゼ
EC_{50}	50% effective concentration	50%効果濃度
FOXM1	Forkhead box protein M1	-
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
HTRF	Homogeneous time resolved fluorescence	均一時間分解蛍光測定法
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
IP	Intraperitoneal	腹腔内
NMJ	Neuromuscular junction	神経筋接合部位
NOEL	No observed effect level	無影響量
PND	Postnatal day	生後日数
PO	Per os (by mouth; orally)	経口
SD	Standard deviation	標準偏差
SLC25A17	Solute carrier family 25, member 17	-
SMA	Spinal muscular atrophy	脊髄性筋萎縮症
SMN	Survival of motor neuron	-
STRN3	Striatin, calmodulin binding protein 3	-
vGlut1	Vesicular glutamate transporter 1	-

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1-1 薬理試験一覧表

Test Article: risdiplam

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	CTD Location
Primary Pharmacodynamics				
Evaluation of alternative splicing changes in SMA patient-derived fibroblasts (qRT-PCR)	*in vitro*	—	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.1.1-1
Pharmacological characterization of risdiplam in experimental models of SMA	*in vitro*, *in vivo*	— IP/PO	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.1.1-2
Effects of risdiplam and RO7112063 (M1 metabolite) on *SMN2* and *FOXM1* splicing *in vitro* and ex vivo	*in vitro*, ex vivo	—	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.1.1-3
Effect of risdiplam on SMN protein levels in neonatal SMNΔ7 mice	SMNΔ7 mouse	IP	[redacted] USA)	4.2.1.1-4
Effect of risdiplam on SMN protein levels in adult SMA C/C-allele mice	SMA C/C-allele knockout mouse	PO	[redacted] USA)	4.2.1.1-5
Effect of risdiplam on survival of SMNΔ7 mice	SMNΔ7 mouse	IP / PO	[redacted] USA)	4.2.1.1-6
Secondary Pharmacodynamics				
Evaluation of alternative splicing changes in SMA patient-derived fibroblasts (qRT-PCR)	*in vitro*	—	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.1.2-1 (4.2.1.1-1)
Off-target profiling with risdiplam and RO7112063 (human metabolite of risdiplam) using radioligand binding and enzymatic assays	*in vitro*	—	[redacted], F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.1.2-2

表 2.6.3.1-1 薬理試験一覧表（続き）

Test Article: risdiplam

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	CTD Location
Safety Pharmacology				
Effect on hERG K^+ current	*in vitro*	—	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.1.3-1
Effect on hERG K^+ current (GLP)	*in vitro*	—	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.1.3-2
Effect on cardiovascular system, heart rate and blood pressure (telemetry)	Monkey/Cynomolgus	PO/gavage	[redacted]	4.2.1.3-3
Effect on CNS, Irwin test	Rat/HanWistar	PO/gavage	[redacted]	4.2.1.3-4
Effect on respiratory function (whole-body plethysmography)	Rat/HanWistar	PO/gavage	[redacted]	4.2.1.3-5
Pharmacodynamic Drug Interactions				
No dedicated studies of this type were conducted.				

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験

Test Article: risdiplam

Study Type	Test System	Test Method	Key Results	Report No.	CTD Location
Evaluation of alternative splicing changes in SMA patient-derived fibroblasts (qRT-PCR)	GM03813 Type 1 SMA patient-derived fibroblasts*	*in vitro* 24 h 0.1 nM–2 µM	Risdiplam showed strong efficacy to increase *SMN2* transcript exon 7 inclusion (*SMN2* full-length transcript) with an EC_{50} of 29±7 nM (mean±SEM) and to decrease the levels of the truncated *SMN2* transcript (lacking exon 7; SMN2Δ7) with an IC_{50} of 12±1 nM (mean±SEM). This effect saturated (>90%) at 121 nM risdiplam.	1066987	4.2.1.1-1
Pharmacological characterization of risdiplam in experimental models of SMA (qRT-PCR, HTRF, immunofluorescent staining and light microscopy)	human GM03813 Type 1 SMA patent-derived fibroblasts	*in vitro* 24 h 0.1 nM–2 µM	Dose-dependent *SMN2* alternative splicing changes.	1066984	4.2.1.1-2
	human GM03813 Type 1 SMA patient-derived fibroblasts	*in vitro* 48 h 10 nM – 1 µM	Dose-dependent SMN protein production.		
	human Type 1 SMA patient-derived motor neurons*	*in vitro* 72 h 10 nM–1 µM	Dose-dependent SMN protein production.		
	human whole blood from healthy donors	*in vitro* 4 h 1 nM – 3 µM	Dose-dependent *SMN2* alternative splicing changes.		

* 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。

表 2.6.3.2-1　効力を裏付ける試験（続き）

Test Article: risdiplam

Study Type	Test System	Test Method	Key Results	Report No.	CTD Location
Pharmacological characterization of risdiplam in experimental models of SMA (cont.)	SMA C/C-allele mice	*in vivo* PO, daily for 10 d (adult) Dose: 0, 1, 3, 10 mg/kg/day	Dose-dependent SMN protein increase in brain and muscle.	1066984	4.2.1.1-2
	SMNΔ7 mice	*in vivo* IP, daily for 6 d (neonate, PND3) Dose: 0, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/kg/day	Dose-dependent SMN protein increase in brain and muscle.		
	SMNΔ7 mice	*in vivo* daily for 218 d (PND3–220) Dose: 0, 0.1/0.3, 0.3/1, 1/3, 3/10 mg/kg IP/PO (switch at PND23)	Efficacy on body weight increase and animal survival prolongation. (see study 1093133 for data until PND220)		
	SMNΔ7 mice	*in vivo* IP, daily for 12 d (PND3–14) Dose: 0, 0.1, 0.3, 1 mg/kg	Efficacy on proprioceptive input, motor neuron numbers, motor axons, NMJ innervation, and muscle atrophy.		

表 2.6.3.2-1　効力を裏付ける試験（続き）

Test Article: risdiplam

Study Type	Test System	Test Method	Key Results	Report No.	CTD Location
Effects of risdiplam and metabolite M1 (RO7112063) on *SMN2* and *FOXM1* splicing (qRT-PCR) (Test article: risdiplam and RO7112063)	human GM03813 Type 1 SMA patient-derived fibroblasts	*in vitro* 24 h incubation Concentration: up to 3 and 10 µM	Dose-dependent *SMN2* and *FOXM1* alternative splicing changes upon risdiplam treatment. The potency of metabolite M1 (RO7112063) was 30-fold lower as compared to risdiplam on *SMN2* splicing, and >50 fold lower on *FOXM1* splicing.	1078515	4.2.1.1-3
	human whole blood from healthy donors	*in vitro* 4 h incubation Concentration: up to 3 µM	Dose-dependent *SMN2* alternative splicing changes when treated with risdiplam. The expression of *SMN1* was not affected. Upon treatment with metabolite M1 (RO7112063), there were no changes in *SMN1*, *SMN2* FL and *SMN2Δ7* mRNA levels up to a concentration of 3 µM.		
Effect of risdiplam on SMN protein levels in neonatal SMNΔ7 mice	SMNΔ7 mouse	*in vivo* IP, dosed daily for 7 days (PND3-9) at 0, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/kg/day	Dose-dependent increase in SMN protein levels in the brain and quadriceps of SMNΔ7 mice. A maximum SMN protein level increase of 3–3.4-fold was observed as compared to controls at ≥1 mg/kg/day.	1063288	4.2.1.1-4
Effect of risdiplam on SMN protein levels in adult C/C-allele mice	SMA C/C-allele knockout mouse	*in vivo* PO, dosed daily for 10 days (7 weeks old) at 0, 1, 3, 10 mg/kg/day	Dose-dependent increase in SMN protein levels in the brain and quadriceps. The calculated dose to increase brain SMN protein levels by 50% was 5.77 mg/kg/day. The increase in brain SMN protein levels was statistically significant at 10 mg/kg/day.	1065078	4.2.1.1-5

表 2.6.3.2-1　効力を裏付ける試験（続き）

Test Article: risdiplam

Study Type	Test System	Test Method	Key Results	Report No.	CTD Location
Effect of risdiplam on survival of SMNΔ7 mice	SMNΔ7 mouse	*in vivo* 218 d (PND3–220), once daily Dose: 0, 0.1/0.3, 0.3/1, 1/3, 3/10 mg/kg IP/PO (switch on PND23)	Risdiplam treatment dose-dependently rescued SMNΔ7 mice resulting in long-term survival, normalized weight gain, and improved motor function. Immunostaining of tissues from treated mice showed that the hallmark pathologies of SMA were ameliorated. Risdiplam was effective at promoting long-term survival and preventing most of the disease phenotypes at doses of 1 mg/kg IP/3 mg/kg PO and 3 mg/kg IP/10 mg/kg PO. Risdiplam promoted long-term survival but did not completely prevent disease manifestation at the lower dose of 0.3 mg/kg IP/1 mg/kg PO.	1093133	4.2.1.1-6

2.6.3.3 副次的薬理試験

表 2.6.3.3-1 副次的薬理試験

Test Article: risdiplam

Study Type	Test System	Test Method	Key Results	Report No.	CTD Location
Evaluation of alternative splicing changes in SMA patient-derived fibroblasts (qRT-PCR)	GM03813 Type 1 SMA patient-derived fibroblasts	*in vitro* 24 h 0.1 nM–2 µM (for *SMN2*) 18 h 121 nM, 605 nM (for alternative splicing)	The human genes *FOXM1*, *STRN3* and *SLC25A17* were identified as being alternatively spliced by risdiplam.	1066987	4.2.1.1-1
Off-target profiling of risdiplam and metabolite M1 (RO7112063) (radioligand binding and enzymatic assays) (including profiling for abuse potential) (Test article: Risdiplam and RO7112063)	Radioligand binding and enzymatic assays (radioligand binding: 69 human and 13 rat sites; 19 human enzymatic sites).	*in vitro* Concentration: 1 nM–10 µM	Risdiplam and metabolite M1 inhibited COX-1 and 2 by > 84% (IC_{50} ~2 µM) and acetylcholinesterase by > 77% (IC_{50} ~0.6 µM for risdiplam, and ~2 µM for M1) at 10 µM. Risdiplam also inhibited radioligand binding at histamine H_3 (78%, IC_{50}=4.2 µM) and muscarinic M_1 (54%, IC_{50}=6.4 µM) receptors. δ-opioid receptor inhibition was 62% at primary screening, and 35% in a follow-up assay at 10 µM. The functional properties, i.e. agonist or antagonist, were not explored due to solubility constraints.	1087510	4.2.1.2-2

2.6.3.4 安全性薬理試験

表 2.6.3.4-1 安全性薬理試験

Test Article: risdiplam

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Dose[a] (mg/kg)	Sex/No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Location in CTD
Cardiovascular system	Recombinant hERG channel expressed in CHO cells	—	0.1-5 μM (nominal conc.)	1-2 cells/conc.	There was no significant reduction in the outward K^+ current up to 5 μM.	No	4.2.1.3-1
Cardiovascular system	Recombinant hERG channel expressed in CHO cells	—	0.02-4.7 μM	3 cells/conc.	There was no significant reduction in the outward K^+ current up to 4.7 μM.	Yes	4.2.1.3-2
Cardiovascular system	Monkey/ Cynomolgus	PO/gavage	0, 1, 3, 7.5	3M, 3F/ dose	There were no effects on cardiovascular parameters. **NOEL: ≥7.5 mg/kg** (Total C_{max}: 894 ± 236 ng/mL [mean±SD])	Yes	4.2.1.3-3
Central nervous system	Rat/HanWistar	PO/gavage	0, 1, 3, 10	8M/dose	There were no effects on general behavior, locomotor activity, motor coordination, sensory/motor reflexes or body temperature. **NOEL: ≥10 mg/kg.**	Yes	4.2.1.3-4
Respiratory system	Rat/HanWistar	PO/gavage	0, 1, 3, 9	8M/dose	There were no effects on respiratory parameters. **NOEL: ≥9 mg/kg.**	Yes	4.2.1.3-5

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

[a] Single dose unless specified otherwise.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし