2.6.1 緒言

2.6.1.1 ベルモスジル

ベルモスジルは、T 細胞免疫応答のバランス調整、細胞骨格系再構築及びエフェクターT 細胞の機能獲得において中心的な役割を果たす Rho GTPase シグナル伝達経路の下流に存在する Rho 結合コイルド・コイル領域含有タンパク質キナーゼ（ROCK）2 に対する選択的かつ競合的阻害薬であり、新規作用機序の慢性移植片対宿主病（cGVHD）治療薬として開発された。

2.6.1.2 名称及び化学構造式

1）一般名

INN Belumosudil

JAN 日本名 ベルモスジルメシル酸塩

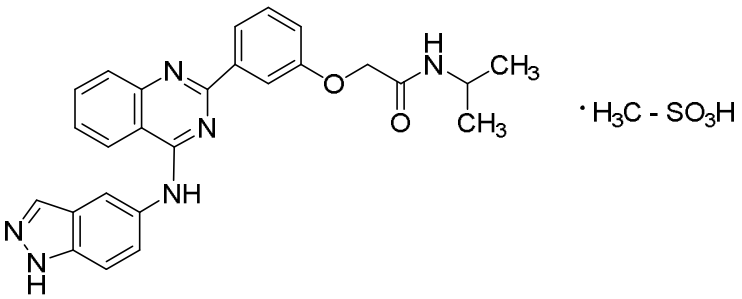
英名 Belumosudil Mesilate

2）化学名

日本名 2-(3-{4-[(1*H*-インダゾール-5-イル)アミノ]キナゾリン-2-イル}フェノキシ)-*N*-(プロパン-2-イル)アセトアミド 一メタンスルホン酸塩

英 名 2-(3-{4-[(1*H*-Indazol-5-yl)amino]quinazolin-2-yl}phenoxy)-*N*-(propan-2-yl)acetamide monomethanesulfonate

3）化学構造式



2.6.1.3 薬理学的性質

ベルモスジルは T 細胞免疫応答のバランス調整やエフェクターT 細胞の機能獲得において中心的な役割を果たす Rho GTPase シグナル伝達経路の下流に存在する ROCK2 を選択的かつ競合的に阻害する。in vitro 試験において、ベルモスジルは、cGVHD の病態形成に関与するナイーブ T 細胞のインターロイキン（IL）-17 産生ヘルパーT17（Th17）細胞や濾胞性ヘルパーT（Tfh）細胞への分化を抑制し、同時に免疫抑制を担う制御性 T（Treg）細胞への分化を亢進し、Treg 細胞の免疫抑制機能を増強する T 細胞免疫応答の調整作用を有することが確認された。また、線維芽細胞の線維性コラーゲン産生及び細胞増殖を抑制することから、抗線維化作用を有することが確認された。in vivo 試験において、ベルモスジルは cGVHD で問題となる肺組織の線維化、皮膚病変並びに自己免疫性炎症反応などの病態進行を改善し、その効果には、in vitro 試験で確認された T 細胞免疫応答の調整作用や抗線維化作用が寄与していると考えられ、cGVHD 治療薬としての有用性が認められた。

2.6.1.4 効能・効果及び用量・用法

本申請における効果・効能及び用法・用量は以下のとおりである。

【効果・効能】

造血幹細胞移植後の慢性移植片対宿主病（ステロイド剤の投与で効果不十分な場合）

【用法・用量】

本剤は、通常、成人及び 12 歳以上の小児にはベルモスジルとして 200 mg を 1 日 1 回食後に経口投与する。

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 4
2.6.2.1 まとめ 4
2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験 5
2.6.2.1.1.1 ベルモスジルの in vitro ROCK 阻害活性評価 5
2.6.2.1.1.2 ベルモスジルの in vitro における T 細胞免疫応答の調整作用 5
2.6.2.1.1.3 ベルモスジルの in vitro における抗線維化作用 5
2.6.2.1.1.4 ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける T 細胞免疫応答の調整作用及び症状改善作用 6
2.6.2.1.1.5 cGVHD 病態と関連する症状を呈するモデルマウスにおける T 細胞免疫応答の調整作用及び抗線維化作用 6
2.6.2.1.2 副次的薬理試験 6
2.6.2.1.2.1 ベルモスジルの各種キナーゼ、細胞表面上の受容体及びイオンチャネルに対する作用 6
2.6.2.1.2.2 ベルモスジルの線維化シグナル伝達経路の阻害作用 6
2.6.2.1.3 安全性薬理試験 7
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.2.2.1 ベルモスジルの in vitro ROCK 阻害活性評価 7
2.6.2.2.2 ベルモスジル代謝物の ROCK2 に対する阻害活性評価 8
2.6.2.2.3 ベルモスジルの in vitro 評価系における T 細胞免疫応答の調整作用 8
2.6.2.2.3.1 ベルモスジルの Th17 細胞におけるサイトカイン産生抑制作用 8
2.6.2.2.3.2 Th17 細胞活性化に必要な転写因子に対するベルモスジルの発現抑制作用 9
2.6.2.2.3.3 ベルモスジルの Treg 細胞活性化に必要な転写因子に対する発現亢進作用及び Treg 細胞に対する分化亢進並びに機能増強作用 10
2.6.2.2.3.4 Tfh 細胞に対するベルモスジルの分化抑制作用 11
2.6.2.2.4 ベルモスジルの in vitro 評価系における抗線維化作用 12
2.6.2.2.4.1 ヒト肺線維芽細胞に対するベルモスジルのコラーゲン産生抑制作用 12
2.6.2.2.4.2 ヒト肺線維芽細胞におけるベルモスジルの結合組織成長因子の発現抑制作用 13
2.6.2.2.5 in vivo 評価系におけるベルモスジルの薬理学的作用 13
2.6.2.2.5.1 ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける肺機能改善作用 13
2.6.2.2.5.2 ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける用量依存的な肺機能改善作用 14
2.6.2.2.5.3 ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける肺のコラーゲン及び抗体沈着の抑制作用 15
2.6.2.2.5.4 マウス cGVHD モデルにおけるベルモスジルの胚中心反応の抑制作用及び Tfh 細胞に対する分化抑制作用 15
2.6.2.2.5.5 マウス強皮症様 cGVHD モデルにおけるベルモスジルの皮膚症状改善作用 16
2.6.2.2.5.6 ブレオマイシン誘発マウス肺線維症モデルにおけるベルモスジルの抗線維化作用 17
2.6.2.2.6 cGVHD 病態と関連する症状を呈するモデルマウスに対するベルモスジルの薬理学的作用 18
2.6.2.2.6.1 マウス SLE モデルにおけるベルモスジルの SLE 症状改善作用 18
2.6.2.2.6.2 マウス SLE モデルにおけるベルモスジルの T 細胞免疫応答の調整作用 20
2.6.2.2.6.3 マウス CIA モデルにおけるベルモスジルの T 細胞免疫応答の調整作用及び CIA 症状改善作用 21

2.6.2.3 副次的薬理試験 22
2.6.2.3.1 各種キナーゼ、細胞表面上の受容体及びイオンチャネルに対する作用 22
2.6.2.3.2 ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いたベルモスジルの細胞毒性評価 23
2.6.2.3.3 ヒト及びマウス線維芽細胞におけるベルモスジルの mTOR シグナル伝達抑制作用 23
2.6.2.3.4 ヒト結合組織線維肉腫細胞におけるベルモスジルの mTOR シグナル伝達を調節する S6K 及び AMPK に対する作用 24
2.6.2.3.5 ヒト結合組織線維肉腫細胞におけるベルモスジルの HIF-1α 発現抑制作用 25
2.6.2.4 安全性薬理試験 26
2.6.2.4.1 中枢神経系に対する作用 26
2.6.2.4.1.1 ラットを用いた中枢神経系に対する影響評価 26
2.6.2.4.2 心血管系に対する作用 27
2.6.2.4.2.1 hERG カリウムイオンチャネル電流に対する作用評価 27
2.6.2.4.2.2 イヌを用いた心血管系に対する影響評価 27
2.6.2.4.3 呼吸系に対する作用 28
2.6.2.4.3.1 ラットを用いた呼吸系に対する影響評価（初回試験） 28
2.6.2.4.3.2 ラットを用いた呼吸系に対する影響評価（確認試験） 28
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 29
2.6.2.6 考察及び結論 30
2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験 30
2.6.2.6.2 副次的薬理試験 30
2.6.2.6.3 安全性薬理試験 31
2.6.2.7 参考文献 31

略号一覧

略号	省略していない用語	備考
AMPK	AMP-activated protein kinase	AMP 活性化プロテインキナーゼ
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
Bcl6	B-cell/CLL lymphoma 6	B 細胞/CLL リンパ腫 6
cGVHD	chronic graft versus host disease	慢性移植片対宿主病
CD	cluster of differentiation	分化抗原群
CIA	collagen induced arthritis	コラーゲン誘導関節炎
Col1α1	collagen type I alpha 1 chain	I 型コラーゲン α1 鎖
CK	casein kinase	カゼインキナーゼ
CTGF	connective tissue growth factor	結合組織成長因子
CXCR	C-X-C chemokine receptor	CXC ケモカイン受容体
dsDNA	double stranded DNA	二本鎖 DNA
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着法
FoxP3	forkhead box P3	フォークヘッドボックス P3
GABA	gamma amino butyric acid	γ－アミノ酪酸
HIF	hypoxia inducible factor	低酸素誘導因子
IL	interleukin	インターロイキン
IFN	interferon	インターフェロン
IRF	interferon regulatory factor	インターフェロン調節因子
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーRNA
mTOR	mammalian target of rapamycin	ラパマイシン標的タンパク質
PD1	programmed cell death protein 1	プログラム細胞死タンパク質 1
PNA	peanut agglutinin	ピーナッツアグルチニン
PCR	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
Rho GTPase	Rho guanosine triphosphate phosphatase	Rho グアノシン三リン酸ホスファターゼ
ROCK	Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase	Rho 結合コイルド・コイル領域含有タンパク質キナーゼ
RORγt	retinoic acid receptor-related orphan receptor γt	レチノイン酸受容体関連オーファン受容体 γt
S6K	S6 kinase	S6 キナーゼ
SLE	systemic lupus erythematosus	全身性エリテマトーデス
STAT	signal transducer and activator of transcription	シグナル伝達兼転写活性化因子
Tfh	T follicular helper	濾胞性ヘルパーT
TGF	transforming growth factor	トランスフォーミング増殖因子
Th17	T helper 17	ヘルパーT17
Treg	regulatory T	制御性 T
TK	toxicokinetics	トキシコカイネティクス
hERG	human ether-à-go-go-related gene	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル
HIF	hypoxia inducible factor	低酸素誘導因子
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
IC_{50}	50% inhibition concentration	50%阻害濃度
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
ICH	International Council for Harmonisation	医薬品規制調和国際会議

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

Rho グアノシン三リン酸ホスファターゼ(Rho GTPase)は、様々なエフェクター分子と相互作用し、アクチン細胞骨格、細胞運動、増殖、接着などの多くの細胞内プロセスの制御に関与している[1)]。

Rho 結合コイルド・コイル領域含有タンパク質キナーゼ（ROCK）は、Rho GTPase のエフェクター分子として同定されたセリン・スレオニンキナーゼであり、ROCK1 及び ROCK2 の 2 つのアイソフォームが存在する[2)]。ROCK1 及び ROCK2 のキナーゼ領域は高い相同性を示すが、生体内での分布や機能は互いに異なることが知られている。なかでも ROCK2 は平滑筋、心筋、骨格筋、肺や脳などに広く分布し[3)]、近年、T 細胞免疫応答のバランス調整及びエフェクターT 細胞の機能獲得などの免疫機能調整に寄与することが示唆されている[4), 5)]。また、ROCK は線維化促進因子の下流で機能し、線維化シグナル伝達の制御に関与する[6)]。

ベルモスジルメシル酸塩は選択的に ROCK2 を阻害することで、慢性移植片対宿主病（cGVHD）の病態に強く関与するナイーブ T 細胞のインターロイキン（IL）-17 産生ヘルパーT17（Th17）細胞及び濾胞性ヘルパーT（Tfh）細胞への分化とそれに続く炎症性サイトカイン産生を抑制するとともに、制御性 T（Treg）細胞への分化とそれに続く抗炎症性サイトカイン産生を亢進し、免疫調整作用を発揮する。さらに、Tfh 細胞の分化を抑制することで、B 細胞と Tfh 細胞の相互作用により生じる胚中心反応とそれに続く自己抗体の産生を抑制することが示されている。また、本薬は線維芽細胞のコラーゲン産生及び細胞増殖を抑制することにより、抗線維化作用を発揮する。これらの作用に基づき、cGVHD の病態を改善する新規作用機序を有する治療薬として期待される。そこで、ベルモスジルメシル酸塩の効力を裏付ける試験として、一連の in vitro および in vivo 試験を実施した。

in vitro 試験では、ROCK 阻害活性及び T 細胞免疫応答の調整作用並びに抗線維化作用を検討した。in vivo 試験では、細気管支閉塞又は皮膚症状を伴うマウス cGVHD モデルにおいて、肺機能改善作用及び皮膚症状改善作用を検討した。また、cGVHD 症状の一つである肺線維化を発現するブレオマイシン誘発マウス肺線維症モデルにおいて、抗線維化作用を検討した。さらに、cGVHD 病態と関連する自己免疫性炎症反応を発現するマウス全身性エリテマトーデス（SLE）モデル及びマウスコラーゲン誘導関節炎（CIA）モデルにおいて、T 細胞免疫応答の調整作用及び自己免疫性炎症反応の抑制作用を検討した。

副次的薬理作用については、各種キナーゼ、細胞表面上の受容体及びイオンチャネルに対する作用並びに線維化シグナル伝達経路の阻害作用を検討した。

安全性薬理試験では、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する影響を評価し、いずれも医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドライン及び医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準ための安全性薬理試験を医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に遵守して実施した。

なお、2.6.2 項におけるベルモスジルメシル酸塩の投与量及び濃度は、ベルモスジル（遊離塩基）換算値を表記した。

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

2.6.2.1.1.1 ベルモスジルの in vitro ROCK 阻害活性評価

ベルモスジルメシル酸塩は、T 細胞免疫応答のバランス調整、細胞骨格系再構築及びエフェクター T 細胞の機能獲得において中心的な役割を果たす Rho GTPase シグナル伝達経路の下流に存在する ROCK2 阻害薬である。ROCK には ROCK1 と ROCK2 の 2 つのアイソフォームが存在し[2]、末梢血管平滑筋細胞由来 ROCK1 及び ROCK2 を用いた酵素阻害活性評価において、ベルモスジルの ROCK1 に対する 50%阻害濃度（IC_{50}）は 3 µmol/L 以上であったのに対し、ROCK2 阻害の IC_{50} 値は 0.081 µmol/L であった。

また、ROCK2 に対する阻害様式についてラット脳から抽出した ROCK2 を用いて in vitro 試験で検討した結果、ベルモスジルはアデノシン三リン酸（ATP）競合的阻害薬であることが示された。さらに、ベルモスジル及びその代謝物（*N*-脱アルキル体の M1 及び加水分解体の M2）の末梢血管平滑筋細胞由来 ROCK2 に対する阻害活性を in vitro 試験で検討した結果、ベルモスジル、M1 及び M2 の Ki 値は、それぞれ 40、55 及び 338 nmol/L となり、ROCK2 に対するベルモスジル及び M1 の阻害活性は高く、M2 の阻害活性は低かった。

2.6.2.1.1.2 ベルモスジルの in vitro における T 細胞免疫応答の調整作用

Th17 細胞及び Tfh 細胞の活性化は cGVHD の病態形成に大きく関与する[7), 8)]。また、ROCK2 の活性化は Th17 細胞の分化誘導に必要な特異的転写因子インターフェロン調節因子（IRF）4 及びレチノイン酸受容体関連オーファン受容体 γt（RORγt）の発現並びにシグナル伝達兼転写活性化因子（STAT）3 のリン酸化の亢進を介して、IL-21 及び IL-17 などの炎症性サイトカイン産生を亢進することが知られている[9), 10), 11)]。一方、Treg 細胞は自己免疫応答を防ぐ保護作用を示す[12), 13), 14)]。

健康被験者由来の末梢血単核球を用いたベルモスジルの T 細胞免疫応答の調整作用評価において、ベルモスジルは Th17 細胞活性化に必要な STAT3 のリン酸化阻害や転写因子である IRF4 及び RORγt の発現抑制作用を示し、Th17 細胞及び Tfh 細胞への分化抑制作用を示した[15), 16)]。また、炎症性サイトカインである IL-21 及び IL-17 産生を抑制した[15)]。一方で、転写因子 STAT5 のリン酸化を亢進することで、Treg 細胞への分化と Treg の免疫抑制機能を増強し、それに続く抗炎症性サイトカイン IL-10 産生を亢進した[15)]。

2.6.2.1.1.3 ベルモスジルの in vitro における抗線維化作用

cGVHD の代表的な臨床所見として線維化を伴う肺機能低下及び皮膚病変が観察される[17)]。また、ROCK は線維化促進因子の下流で機能し、線維化シグナル伝達の制御に関与する[6)]。

LL-24 ヒト肺線維芽細胞を用いたベルモスジルの抗線維化作用評価において、ベルモスジルは組織線維化に関与する線維性細胞外基質の主要構成成分である I 型コラーゲン α1 鎖（Col1α1）のメッセンジャーRNA（mRNA）発現及び Col1α1 の前駆体であるプロコラーゲン 1α の分泌を抑制した。さらに、ベルモスジルは組織線維化シグナル伝達経路を活性化させる結合組織成長因子（CTGF）[18)]の mRNA 発現を抑制した。ベルモスジルのプロコラーゲン 1α の分泌抑制作用、CTGF の発現抑制作用は、抗線維化薬であるニンテダニブやピルフェニドンよりも強力又は同等であった。

2.6.2.1.1.4 ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける T 細胞免疫応答の調整作用及び症状改善作用

ベルモスジルの cGVHD に対する免疫調整作用及び症状改善作用を検討するために、複数のマウス cGVHD モデルを用いた in vivo 試験を実施した。細気管支閉塞を伴うマウス cGVHD モデルにおいて、ベルモスジルは肺線維化及び肺機能の悪化を抑制した[19)]。また、B 細胞応答の指標である胚中心反応を抑制し、胚中心反応を促す Tfh 細胞数並びに自己抗体産生に関わる成熟 B 細胞数を減少させた[19)]。マウス強皮症様 cGVHD モデルにおいて、ベルモスジルは皮膚病態の進行を抑制し、皮膚 GVHD スコアを改善した[19)]。

2.6.2.1.1.5 cGVHD 病態と関連する症状を呈するモデルマウスにおける T 細胞免疫応答の調整作用及び抗線維化作用

cGVHD 症状の一つである肺線維化を発現するブレオマイシン誘発マウス肺線維症モデルにおいて、ベルモスジルは肺線維化率及び肺線維化スコアを減少させた。また、cGVHD 病態と共通する自己免疫性炎症反応を生じるマウス SLE モデルやマウス CIA モデルにおいて、ベルモスジルは、自己免疫応答及び免疫抑制に関与する転写因子の発現調節を介して T 細胞免疫応答を調整し、臨床所見としてみられる自己免疫性炎症反応を抑制した[15), 16)]。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

2.6.2.1.2.1 ベルモスジルの各種キナーゼ、細胞表面上の受容体及びイオンチャネルに対する作用

in vitro キナーゼアッセイ及び放射性標識リガンド結合アッセイにより、ROCK2 以外の各種キナーゼ、細胞表面上の受容体及びイオンチャネルに対するベルモスジルのオフターゲット作用を評価した結果、カゼインキナーゼ（CK）2、アデノシン A_{2A} 受容体及びアデノシン A_3 受容体に対する結合親和性がみられ、その IC_{50} 値はそれぞれ 0.1、0.66 及び 0.13 μmol/L であった。CK2 の機能的影響は不明であり、アデノシン A_3 受容体の機能に対する影響は認められなかった（IC_{50} > 10 μmol/L）。ベルモスジルはアデノシン A_{2A} 受容体に対してアンタゴニスト活性を示し、その IC_{50} 値は 0.35 μmol/L（158 ng/mL）であった。アデノシン A_{2A} 受容体は、大脳基底核のようなドパミンが豊富な領域にある神経細胞（γ－アミノ酪酸（GABA）を伝達物質とする中型の有棘細胞）に主に発現し、ドパミン作動性シグナルや運動機能調節に関与している[20)]が、ベルモスジルの中枢移行性は非常に低く【2.6.4.4.1】、自発運動量の増加等の当該受容体に関連すると考えられる影響はいずれの in vivo 試験においてもみられていないことから、アデノシン A_{2A} 受容体に対するオフターゲット作用が臨床上問題となる可能性は低いと考えられた。

2.6.2.1.2.2 ベルモスジルの線維化シグナル伝達経路の阻害作用

WI-38 ヒト肺線維芽細胞及び HT-1080 ヒト結合組織線維肉腫細胞株において、ベルモスジルはコラーゲン産生に関与するラパマイシン標的タンパク質（mTOR）シグナル伝達経路のエフェクターキナーゼであるリボソームタンパク質 S6 キナーゼ（S6K）活性化を阻害した。また、NIH3T3 マウス線維芽細胞の増殖を抑制した。以上の結果から、ベルモスジルは筋線維芽細胞のコラーゲン産生などに関与する mTOR シグナル伝達経路及び線維芽細胞の増殖を阻害し、cGVHD の病態において問題となる組織線維化を抑制することが示唆された。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

ベルモスジルの中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対する影響を評価した。

中枢神経系への影響を評価するため、ラットにベルモスジルメシル酸塩を 50、175 及び 350 mg/kg の用量で単回経口投与した結果、350 mg/kg 群の雄で自発活動量減少、同群雌で体温低下が一過性にみられた。これらの変化は一過性かつ軽度な変化であり、臨床上の懸念が生じる可能性は低いと考えられた。

心血管系に対する影響として、ベルモスジル及びその代謝物 M1 は human ether-à-go-go-related gene（hERG）チャネル電流の阻害作用を示し、その IC_{50} 値はそれぞれ 0.59 µmol/L（272 ng/mL）及び 1.46 µmol/L（616 ng/mL）であった。この濃度は、ヒトにベルモスジル 200 mg を 1 日 1 回投与したとき（臨床用量）のベルモスジルの最高血漿中非結合型濃度の約 11 倍であった。M1 については、ベルモスジルより阻害作用が弱く臨床では微量【2.7.2.3.1】であることから、影響する可能性は低いと考えられた。また、イヌにベルモスジルメシル酸塩を 25、75 及び 150 mg/kg の用量で単回経口投与したテレメトリー試験において、QTc 間隔を含めた心電図に異常はみられなかった。さらに、イヌに 25、75 及び 200/125 mg/kg/日の用量で 4 週間反復経口投与した毒性試験【2.6.6.3.5】においても心電図異常はみられなかった。これら試験の最高用量におけるベルモスジル及び M1 の C_{max} は 2019～7330 ng/mL 及び 417～1590 ng/mL であり、臨床用量における C_{max} のそれぞれ 0.8～3.2 倍及び 7.9～30 倍であった。加えて、QT/QTc 間隔に及ぼす影響について評価した臨床試験【2.7.2.2.2.2.9】においてもベルモスジルの QTc 延長作用はみられなかった。これらのことから、ベルモスジルの QTc 延長リスクは低いと考えられた。その他の心血管系への影響として、150 mg/kg 群の雌で収縮期血圧、拡張期血圧及び平均動脈圧のわずかな低下がみられたが、軽度な変化であり、臨床上の懸念が生じる可能性は低いと考えられた。

呼吸系への影響を評価するため、ラットにベルモスジルメシル酸塩を 50、175 及び 350 mg/kg を単回経口投与した結果、初回試験では 175 mg/kg 以上の群で分時換気量の低下及び 350 mg/kg 群の雄で呼吸数及び一回換気量の低下がみられた。一方で、初回試験の再現性を確認するため同用量で実施した確認試験では、最高用量の 350 mg/kg まで呼吸系への影響は認められなかった。両試験で同程度の曝露量がみられており、再現性は認められなかったことから、ベルモスジルは呼吸系に対する薬理作用を有さないと考えられた。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 ベルモスジルの in vitro ROCK 阻害活性評価

【2.6.3.2】：4.2.1.1-01：KD025-NCP-2（参考資料）

末梢血管平滑筋細胞由来 ROCK1 及び ROCK2 タンパク、[γ^{33}P]ATP 及び S6K を含む溶液中に、ベルモスジルメシル酸塩（0～10 µmol/L）を添加し、[γ^{33}P]S6K の放射活性を指標にベルモスジルの酵素阻害活性を評価した。その結果、ベルモスジルの ROCK1 に対する IC_{50} 値は 3 µmol/L 以上を示し、ROCK2 に対する IC_{50} 値は 0.081 µmol/L であった。このことからベルモスジルは ROCK2 特異的な阻害作用を示すことが明らかとなった（図 2.6.2-1A）。

さらに、ラット脳から抽出した ROCK2、[γ^{33}P]ATP 及び S6K を含む溶液中に、ベルモスジルメシル酸塩（0.05 µmol/L）又は Y-27632（非選択的 ROCK 阻害薬、0.1 µmol/L）添加し、[γ^{33}P]S6K の放射活性を指標にベルモスジルの ROCK2 阻害様式を評価した。その結果、ベルモスジルは ATP 競合的阻害作用を示すことが認められた（図 2.6.2-1B）。

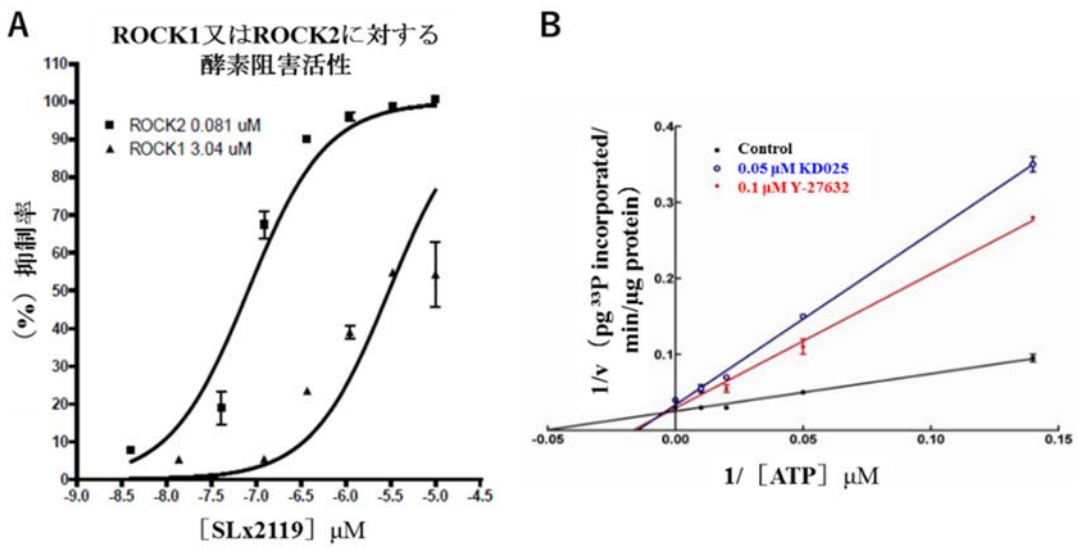


図 2.6.2-1 ベルモスジルの ROCK1 又は ROCK2 に対する酵素阻害活性

A; ベルモスジルの ROCK1 又は ROCK2 に対する酵素阻害活性曲線
B; ベルモスジルの阻害様式（Lineweaver-Burk プロット）陽性対照として ATP と競合して ROCK1/2 酵素活性を阻害する Y-27632 を用いた。SLx2119＝ ベルモスジルメシル酸塩

2.6.2.2.2　ベルモスジル代謝物の ROCK2 に対する阻害活性評価

【2.6.3.2】：4.2.1.1-01：KD025-NCP-2（参考資料）

末梢血管平滑筋細胞由来 ROCK2 タンパクを用い、ベルモスジル及び代謝物（M1 並びに M2）の ROCK2 に対する阻害活性を評価した。その結果、ベルモスジル、M1 及び M2 の Ki 値は、それぞれ 40、55 及び 338 nmol/L となり、ROCK2 に対するベルモスジル及び M1 の阻害活性は高く、M2 の阻害活性は低かった（表 2.6.2-1）。

表 2.6.2-1 ROCK2 に対するベルモスジル及びその代謝物の阻害活性

Ki（nmol/L）	Belumosudil	M1	M2
ROCK2	40 ± 5	55 ± 2	338 ± 55

2.6.2.2.3 ベルモスジルの in vitro 評価系における T 細胞免疫応答の調整作用

2.6.2.2.3.1 ベルモスジルの Th17 細胞におけるサイトカイン産生抑制作用

【2.6.3.2】：4.2.1.1-02：Zanin-Zhorov-2014（参考資料）

免疫応答を担う Th17 細胞によって産生される炎症性サイトカイン分泌に対するベルモスジルの抑制作用を検討した。

健康被験者由来の分化抗原群（CD）4 陽性 T 細胞に対し、ベルモスジルメシル酸塩（0～10 μmol/L）、抗 CD3/28 抗体、IL-1β 及びトランスフォーミング増殖因子（TGF）-β を反応させ、Th17 細胞への分化を誘導する条件下で培養した。その後、培養上清中の IL-21、IL-17 産生量を酵素結合免疫吸着法（ELISA）により測定した。その結果、ベルモスジルは、IL-21 及び IL-17 産生を有意に抑制した。

以上の結果から、ベルモスジルは Th17 細胞が産生する炎症性サイトカイン分泌を抑制することが示唆された（図 2.6.2-2）[15]。

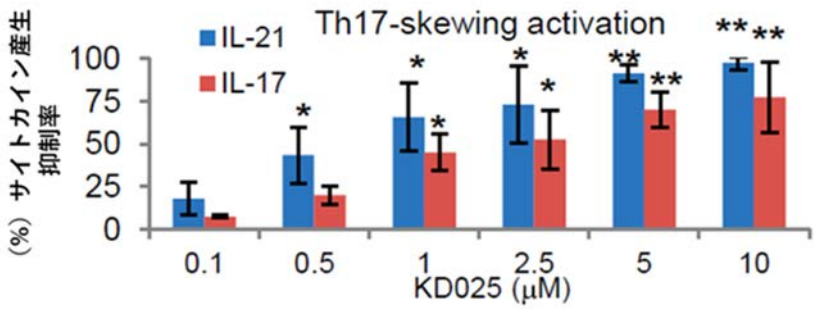


図 2.6.2-2 ベルモスジルの Th17 細胞における IL-21、IL-17 産生に対する作用

健康被験者由来の CD4 陽性 T 細胞に対し、ベルモスジルメシル酸塩、抗 CD3/28 抗体（5 μg/mL）、IL-1β（50 ng/mL）及び TGF-β（5 ng/mL）を反応させ、Th17 細胞への分化を誘導する条件下で培養後、ELISA 法により培養上清中の各種サイトカイン（IL-21, IL-17）産生量を測定した。* P < 0.05, ** P < 0.01, vs 媒体処理群（two-tailed Student's t-test）
KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

2.6.2.2.3.2 Th17 細胞活性化に必要な転写因子に対するベルモスジルの発現抑制作用

【2.6.3.2】：4.2.1.1-02：Zanin-Zhorov-2014（参考資料）

免疫応答を担う Th17 細胞活性化に必要な転写因子 IRF4、RORγt 及びリン酸化 STAT3（pStat3）に対するベルモスジルの発現抑制作用を検討した。

健康被験者由来の CD4 陽性 T 細胞に対し、ベルモスジルメシル酸塩（0～10 μmol/L）、抗 CD3/28 抗体、IL-1β 及びトランスフォーミング増殖因子（TGF）-β を反応させ、Th17 細胞への分化を誘導する条件下で培養した。その後、Th17 細胞特異的転写因子 IRF4、RORγt、リン酸化 STAT3 量をウエスタンブロッティングにより測定した。その結果、ベルモスジルは IRF4、RORγt の発現量及びリン酸化 STAT3 量を濃度依存的に減少させた（図 2.6.2-3）[15]。以上の結果から、ベルモスジルは Th17 細胞特異的転写因子の発現及び活性化を阻害することで、Th17 細胞の活性化を抑制することが示唆された。

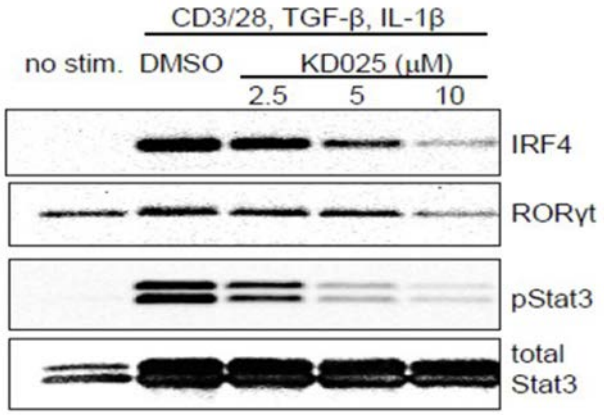


図 2.6.2-3 ベルモスジルの Th17 細胞活性化に必要な転写因子に対する発現抑制作用

健康被験者由来の CD4 陽性 T 細胞に対し、ベルモスジルメシル酸塩、抗 CD3/28 抗体（5 μg/mL）、IL-1β（50 ng/mL）及び TGF-β（5 ng/mL）を反応させ、Th17 細胞への分化を誘導する条件下で培養後、ウエスタンブロッ

ティングにより細胞溶解液中の IRF4、RORγt、リン酸化 STAT3、総 STAT3（total Stat3）を検出した。
KD025 = ベルモスジルメシル酸塩, DMSO = ジメチルスルホキシド

2.6.2.2.3.3 ベルモスジルの Treg 細胞活性化に必要な転写因子に対する発現亢進作用及び Treg 細胞に対する分化亢進並びに機能増強作用

【2.6.3.2】：4.2.1.1-02：Zanin-Zhorov-2014（参考資料）

免疫抑制を担う Treg 細胞の活性化に必要な転写因子フォークヘッドボックス P3（Foxp3）及びリン酸化 STAT5（pSTAT5）に対するベルモスジルの発現亢進作用及び Treg 細胞分化亢進作用を検討した。

健康被験者由来の CD4 陽性 T 細胞に対し、ベルモスジルメシル酸塩（0～10 µmol/L）、抗 CD3/28 抗体、IL-1β 及び TGF-β を反応させ、Th17 細胞及び Treg 細胞への分化を誘導する条件下で培養した。その後、リン酸化 STAT5（pStat5）量（図 2.6.2-4A,C）、Foxp3 を発現する Treg 細胞割合（図 2.6.2-4D）、Treg 細胞が産生する抗炎症性サイトカイン IL-10 量（図 2.6.2-4E）をそれぞれ、ウエスタンブロッティング、フローサイトメトリー、ELISA により測定した。その結果、ベルモスジルはリン酸化 STAT5 量、Foxp3 陽性 Treg 細胞割合及び IL-10 産生量を増加させた [15]。

さらに、Treg 細胞は免疫応答に関与する T 細胞の増殖を抑制することから、ベルモスジルの Treg 機能増強作用を検討した。

ベルモスジルメシル酸塩（0～20 µmol/L）を事前処理した Treg 細胞と健康被験者由来の末梢血単核球を共培養し、末梢血単核球中の CD4 陽性 T 細胞の存在割合をフローサイトメトリーにより測定することで Treg 細胞の細胞増殖抑制能を評価した（図 2.6.2-4F）。その結果、Treg 細胞非存在下で 74.1%（activation）であった CD4 陽性 T 細胞の存在割合は Treg 細胞存在下で 40.7%（+Tregs）に減少し、さらにベルモスジルを事前処理した Treg 細胞存在下では 19.7%（+Tregs KD025）に減少し、ベルモスジル（20 µmol/L）は Treg 細胞による CD4 陽性 T 細胞の増殖抑制作用を増強した [15]。以上の結果から、ベルモスジルは Treg 細胞活性化に関与する転写因子の発現を亢進することで、Treg 細胞への分化亢進と Treg 細胞の機能を増強することが示唆された。

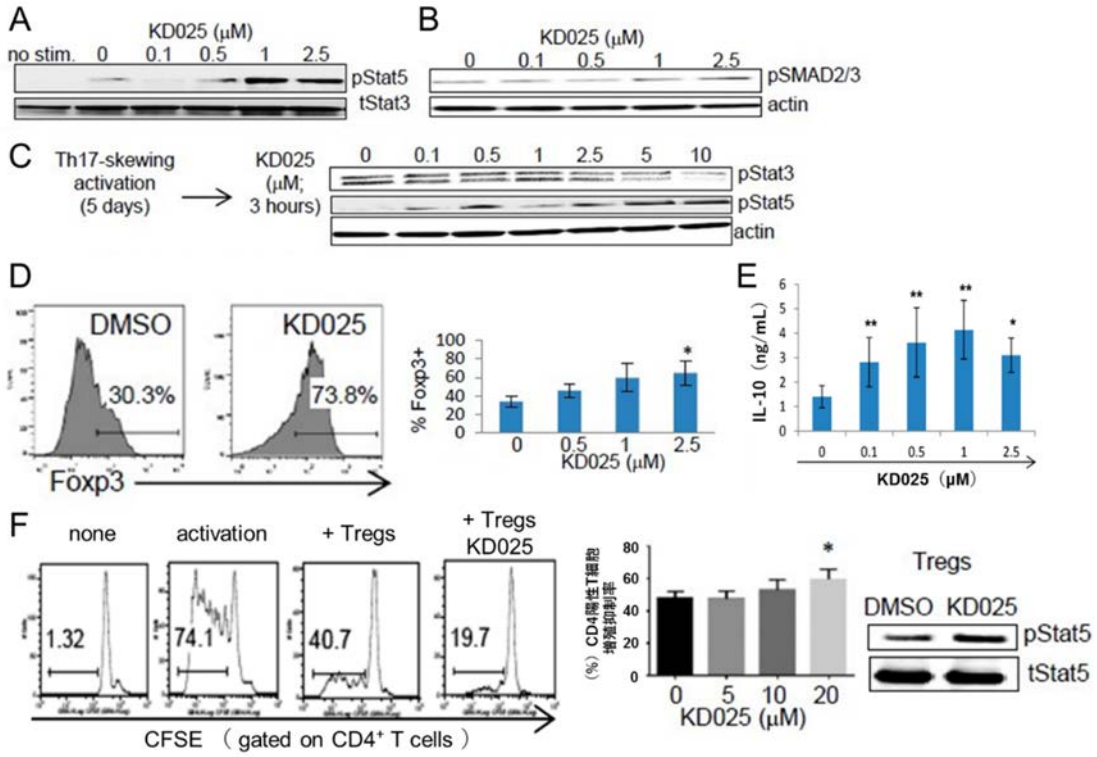


図 2.6.2-4 ベルモスジルの Treg 細胞活性化に必要な転写因子の発現亢進作用及び Treg 細胞に対する分化亢進並びに機能増強作用

健康被験者由来の CD4 陽性 T 細胞に対し、ベルモスジルメシル酸塩（0～10 µmol/L）、抗 CD3/28 抗体（5 µg/mL）、IL-1β（50 ng/mL）及び TGF-β（5 ng/mL）を反応させ、Th17 細胞及び Treg 細胞への分化を誘導する条件下で 48 時間（A,B）又は 120 時間（D）培養した。
A-C; Th17 細胞及び Treg 細胞分化誘導条件下において、ウエスタンブロッティングにより細胞溶解液中のリン酸化 STAT5（pStat5）、総 STAT3（tStat3）、リン酸化 STAT3（pStat3）、SMAD2/3、アクチンを検出した。
D; フローサイトメトリーにより Treg 細胞の分化や機能発現に必要な Foxp3 転写因子を発現する Treg 割合を算出した。独立した 3 試験のうちのフローサイトメトリー計測の代表例を示した。
E; ELISA により Treg 細胞が産生する抗炎症性サイトカイン IL-10 産生量を測定した。独立した 5 試験を統合して解析した。DMSO = ジメチルスルホキシド
F; フローサイトメトリーにより蛍光標識した CD4 陽性 T 細胞割合を算出。独立した 7 試験を統合して解析した。平均値±SEM, *P < 0.05, ** P < 0.01, vs 媒体処理群（two-tailed Student's t-test）
KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

2.6.2.2.3.4 Tfh 細胞に対するベルモスジルの分化抑制作用

【2.6.3.2】：4.2.1.1-03：Weiss-2016（参考資料）

Tfh 細胞は、B 細胞の成熟や抗体産生を調節する CD4 陽性 T 細胞の一種であり、Tfh 細胞への分化異常は過剰な自己抗体産生を誘導し、cGVHD の病態の増悪に寄与する[8]。そこで、Tfh 細胞に対するベルモスジルの分化抑制作用を検討した。

健康被験者由来の CD4 陽性 T 細胞に対し、ベルモスジルメシル酸塩（0～10 µmol/L）を処理し、Tfh 細胞への分化に必要な IL-21 を反応させる条件（IL-21）、Th17 細胞への分化に必要な抗 CD3/28 抗体及び IL-1β 並びに TGF-β を反応させる条件（Th17）、両培養条件を組み合わせた条件（Th17+IL-21）で培養した。その後、Tfh 細胞割合をフローサイトメトリーにより測定した。その結果、いずれの培養条件においてもベルモスジルは Tfh 細胞割合を減少させ、その分化抑制作用は培養 5 日間でも確認された（図 2.6.2-5A,B）[16]。

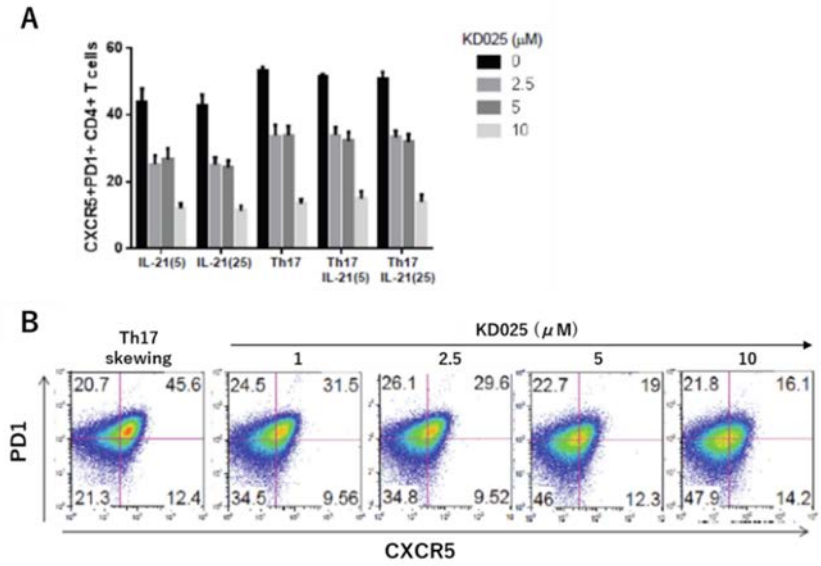


図 2.6.2-5 Tfh 細胞に対するベルモスジルの分化抑制作用

健康被験者由来の CD4 陽性 T 細胞に対し、ベルモスジルメシル酸塩を処理し、IL-21（0、5 又は 25 ng/mL）のみを反応させる条件（IL-21）、抗 CD3/28 抗体（5 µg/mL）、IL-1β（50 ng/mL）及び TGF-β（5 ng/mL）を反応させる条件（Th17）又は両培養条件を組み合わせた条件（Th17+IL-21）で 48 時間（A）又は 120 時間（B）培養し、Th17 細胞及び Tfh 細胞への分化を誘導した。

A; Tfh 細胞マーカーとして蛍光標識された抗 CD4 抗体、抗プログラム細胞死タンパク質 1（PD1）抗体、抗 CXC ケモカイン受容体（CXCR）5 抗体を染色し、フローサイトメトリーにより PD1 と CXCR5 が共陽性の CD4 陽性 T 細胞割合を測定した。独立した 3 試験を統合して解析,平均値±SEM
B; 独立した 3 試験のうちのフローサイトメトリー計測の代表例を示した。
KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

2.6.2.2.4 ベルモスジルの in vitro 評価系における抗線維化作用

2.6.2.2.4.1 ヒト肺線維芽細胞に対するベルモスジルのコラーゲン産生抑制作用

【2.6.3.2】：4.2.1.1-04：KD025-NCP-3（参考資料）

組織線維化に関与する線維性細胞外基質の主要構成成分である I 型コラーゲン α1 鎖（Col1α1）産生に対するベルモスジルの抑制作用を検討した。

LL-24 ヒト肺線維芽細胞に対し、ベルモスジルメシル酸塩（1.1、3.3 又は 10 μmol/L）を処理し、Col1α1 の mRNA 発現量を定量ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により測定した。その結果、ベルモスジルは Col1α1 の mRNA 発現を濃度依存的に阻害した（図 2.6.2-6A）。

さらに、LL-24 ヒト肺線維芽細胞に対し、ベルモスジルメシル酸塩（1.0、3.0 又は 9.0 μmol/L）、ニンテダニブ（抗線維化薬、1.0、3.0 又は 9.0 μmol/L）、ピルフェニドン（抗線維化薬、1.0、3.0 又は 9.0 μmol/L）のいずれかを処理し、Col1α1 の前駆体であるプロコラーゲン 1α のタンパク量を ELISA 法により測定した。その結果、ベルモスジルはプロコラーゲン 1α の分泌を濃度依存的に阻害した（図 2.6.2-6B）。一方、ニンテダニブとピルフェニドンはいずれもコラーゲン産生を 50%以上阻害できなかった。以上の結果から、ベルモスジルは線維性細胞外基質のコラーゲン産生を阻害し、組織線維化を抑制することが示唆された。

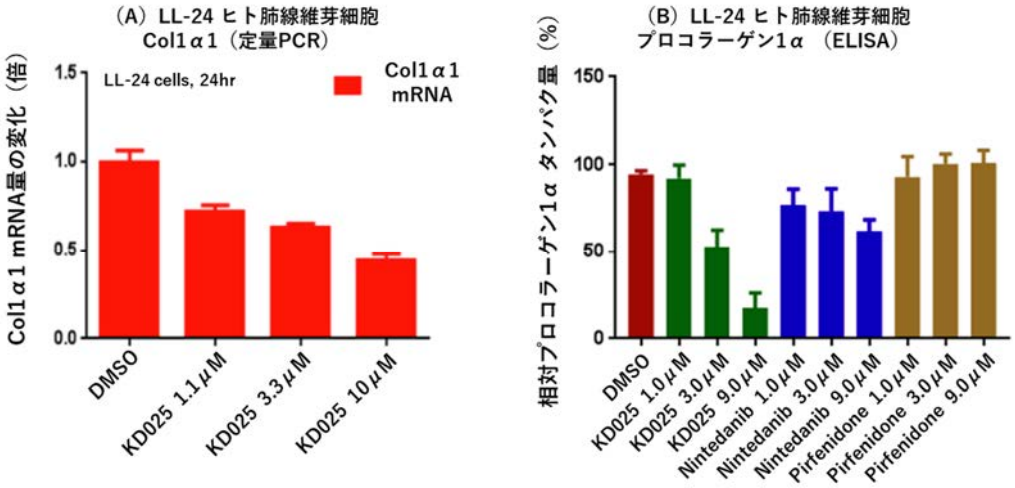


図 2.6.2-6 ベルモスジルの LL-24 ヒト肺線維芽細胞コラーゲン産生抑制作用

A; ベルモスジルメシル酸塩を処理し、24 時間培養後に定量 PCR により Col1α1 の mRNA 発現量を測定した。
B; ベルモスジルメシル酸塩、ニンテダニブ又はピルフェニドンのいずれかを処理し、24 時間培養後に ELISA により培養上清中のプロコラーゲン 1α タンパク量を測定した。
KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

2.6.2.2.4.2 ヒト肺線維芽細胞におけるベルモスジルの結合組織成長因子の発現抑制作用

【2.6.3.2】：4.2.1.1-04：KD025-NCP-3（参考資料）

組織線維化シグナル伝達経路を活性化させる CTGF に対するベルモスジルの発現抑制作用を検討した。

LL-24 ヒト肺線維芽細胞に対し、ベルモスジルメシル酸塩（1.0、3.0 又は 9.0 µmol/L）又はピルフェニドン（1.0、3.0 又は 9.0 µmol/L）を処理し、CTGF の mRNA 量を定量 PCR により測定した。その結果、ベルモスジルは CTGF の mRNA 発現を濃度依存的に阻害した（図 2.6.2-7）。また、その阻害作用はピルフェニドンよりも強力であった。以上の結果から、ベルモスジルは CTGF の発現を阻害し、組織線維化を促進するシグナル伝達を抑制することが示唆された。

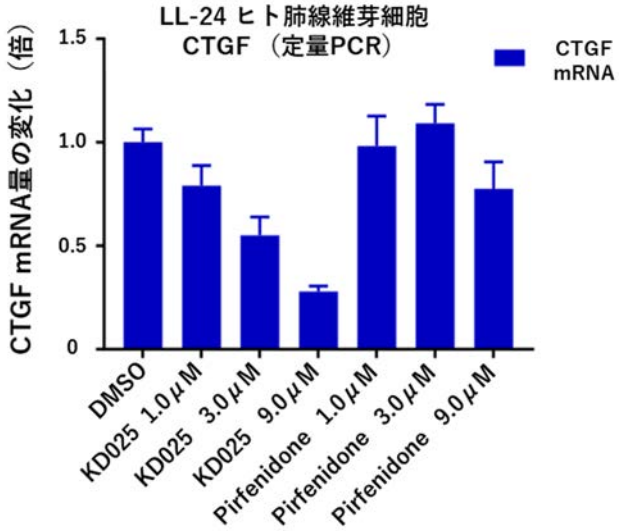


図 2.6.2-7 ベルモスジルの LL-24 ヒト肺線維芽細胞の CTGF mRNA 発現抑制作用

ベルモスジルメシル酸塩、ピルフェニドンのいずれかを処理し、24 時間培養後に定量 PCR により CTGF の mRNA 発現量を測定した。

2.6.2.2.5 in vivo 評価系におけるベルモスジルの薬理学的作用

2.6.2.2.5.1 ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける肺機能改善作用

【2.6.3.2】：4.2.1.1-05：KD025-NCP-cGVHD-1（参考資料）

cGVHD 症状として発現する肺機能低下に対するベルモスジルの肺機能改善作用を検討した。B10.BR マウス（8 例/群）に移植 3 及び 2 日前にシクロホスファミド（120 mg/kg）を腹腔内投与及び放射線照射（8.5 Gy）を実施し、尾静脈より C57BL/6 の骨髄細胞（1×10^7 個）を単独又は脾細胞（1×10^6 個）と共に移植することにより細気管支閉塞を伴うマウス cGVHD モデルを作製した。cGVHD 症状を発現する移植後 28 日目より、媒体対照（0.4%メチルセルロース）又はベルモスジルメシル酸塩（100 mg/kg/日）を腹腔内投与し、移植後 56 日目に肺機能（容量、抵抗性、弾性及びコンプライアンス）を測定した。その結果、ベルモスジル投与により肺機能の改善が認められた（図 2.6.2-8A-D）。一方で、マウスの体重及び生存率にベルモスジル投与の影響は認められなかった（図 2.6.2-8E,F）。

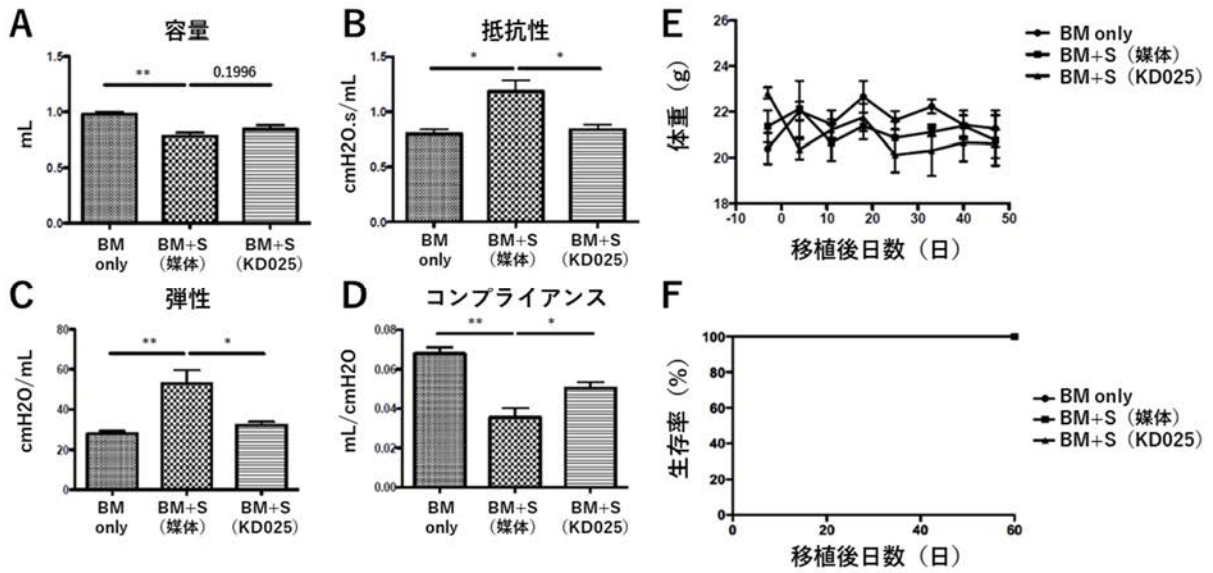


図 2.6.2-8 ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける肺機能改善作用
移植 56 日後に麻酔下でプレチスモグラフィーを用いて肺機能を測定した。
A; 容量, B; 抵抗性, C; 弾性, D; コンプライアンス
E; 骨髄移植後のマウス体重量変化, F; 骨髄移植後のマウス生存曲線
各群 8 例, 平均値±SEM, * P < 0.05, ** P < 0.01, vs BM + 媒体投与群（two-tailed Student's t-test）
BM = 骨髄細胞移植, S = 脾細胞移植, KD025 = ベルモスジルメシル酸塩
図の一部を改変

2.6.2.2.5.2 ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける用量依存的な肺機能改善作用

【2.6.3.2】：4.2.1.1-06：KD025-NCP-cGVHD-2（参考資料）
【2.6.3.2】：4.2.1.1-07：Flynn-2016（参考資料）

cGVHD 症状として発現する肺機能低下に対するベルモスジルの肺機能改善作用の用量依存性を検討した。

B10.BR マウス（8 例/群）に移植 3 及び 2 日前にシクロホスファミド（120 mg/kg）を腹腔内投与及び放射線照射（8.5 Gy）を実施し、尾静脈より C57BL/6 の骨髄細胞（1×10^7 個）を単独又は脾細胞（1×10^6 個）と共に移植することにより細気管支閉塞を伴うマウス cGVHD モデルを作製した。cGVHD 症状を発現する移植後 28 日目より、媒体対照（0.4%メチルセルロース）又はベルモスジルメシル酸塩（30、100 又は 150 mg/kg/日）を腹腔内投与し、移植 56 日目に肺機能（抵抗性、弾性及びコンプライアンス）を測定した。その結果、ベルモスジルの投与用量依存的に肺機能が改善した（図 2.6.2-9）。

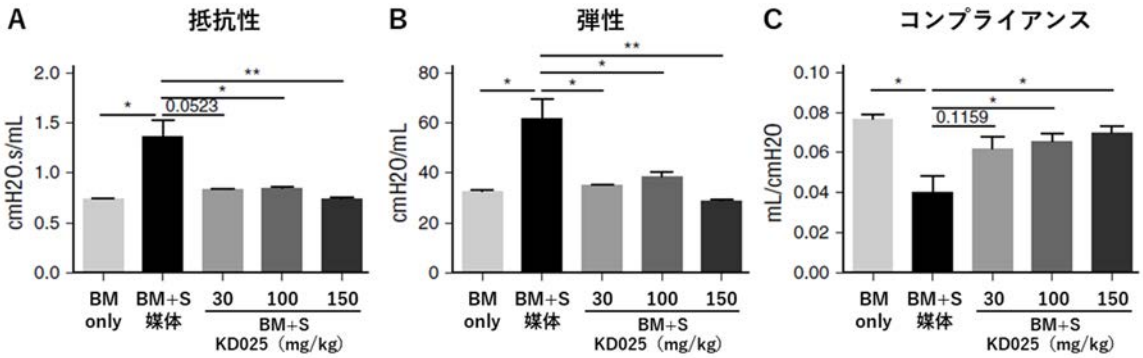


図 2.6.2-9 ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける用量依存的な肺機能改善作用

移植 56 日後に麻酔下でプレチスモグラフィーを用いて肺機能を測定した。
A; 抵抗性, B; 弾性, C; コンプライアンス
各群 8 例（独立した 4 試験を統合して解析）, 平均値±SEM, * P < 0.05, ** P < 0.01, vs BM + 媒体投与群（1-way analysis of variance）, BM = 骨髄細胞移植, S = 脾細胞移植
KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

2.6.2.2.5.3 ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける肺のコラーゲン及び抗体沈着の抑制作用

【2.6.3.2】：4.2.1.1-06：KD025-NCP-cGVHD-2（参考資料）
【2.6.3.2】：4.2.1.1-07：Flynn-2016（参考資料）

cGVHD 症状として発現する肺線維化の増悪には線維性コラーゲンや抗体の組織への沈着が寄与する[21)]。そこで、肺組織におけるベルモスジルの線維性コラーゲン及び抗体沈着の抑制作用を検討した。

B10.BR マウス（8 例/群）に移植 3 及び 2 日前にシクロホスファミド（120 mg/kg）を腹腔内投与及び放射線照射（8.5 Gy）を実施し、尾静脈より C57BL/6 の骨髄細胞（1×10^7 個、Thy1.2 抗体により T 細胞除去）を単独又は脾細胞（1×10^6 個）と共に移植することにより細気管支閉塞を伴うマウス cGVHD モデルを作製した。cGVHD 症状を発現する移植後 28 日目より、媒体対照（0.4%メチルセルロース）又はベルモスジルメシル酸塩（150 mg/kg/日）を腹腔内投与し、移植後 56 日目の肺切片を用いて、細気管支及び血管周辺のコラーゲン沈着及び抗体沈着を病理組織学的に評価した。その結果、ベルモスジル投与により肺のコラーゲン及び抗体沈着が減少した（図 2.6.2-10）[19)]。

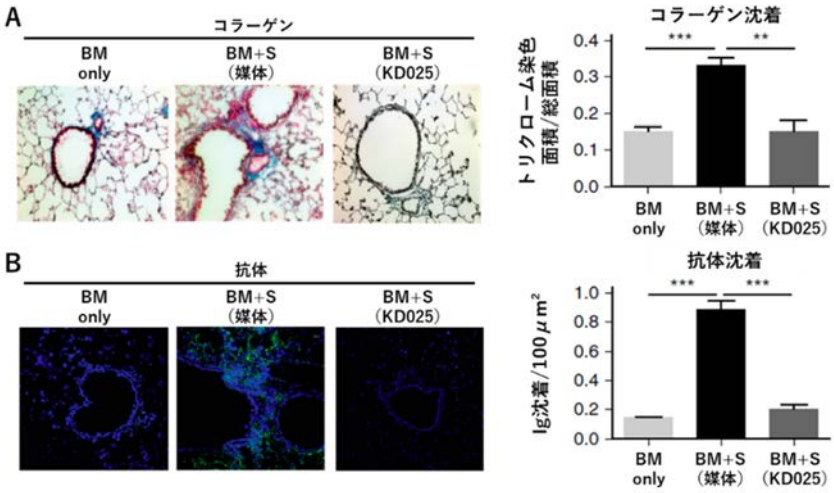


図 2.6.2-10 ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける肺のコラーゲン及び抗体沈着の抑制作用

移植 56 日後に摘出した肺組織をマッソントリクローム染色（A）又は抗マウス Ig 染色（B）し、コラーゲン沈着及び Ig 沈着がみられた面積を測定した。
各群 8 例（独立した 4 試験を統合して解析）, 平均値±SEM, ** P < 0.01, *** P < 0.001, vs BM + 媒体投与群（two-tailed Student's t-test）, BM = 骨髄細胞移植, S = 脾細胞移植, KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

2.6.2.2.5.4 マウス cGVHD モデルにおけるベルモスジルの胚中心反応の抑制作用及び Tfh 細胞に対する分化抑制作用

【2.6.3.2】：4.2.1.1-06：KD025-NCP-cGVHD-2（参考資料）
【2.6.3.2】：4.2.1.1-07：Flynn-2016（参考資料）

免疫応答の際には、脾臓やリンパ節などの二次免疫応答組織において胚中心と呼ばれる微小構造が形成され、胚中心内では B 細胞と Tfh 細胞の相互作用により生じる胚中心反応により抗体が産生される。一方、過剰な胚中心反応により産生される自己抗体は cGVHD の病態の増悪に寄与する[8), 21)]。そこで、ベルモスジルの脾臓の胚中心反応の抑制作用及び Tfh 細胞に対する分化抑制作用を検討した。

B10.BR マウス（8 例/群）に移植 3 及び 2 日前にシクロホスファミド（120 mg/kg）を腹腔内投与及び放射線照射（8.5 Gy）を実施し、尾静脈より C57BL/6 の骨髄細胞（1×10^7 個、Thy1.2 抗体により T 細胞除去）を単独又は脾細胞（1×10^6 個）と共に移植することによりマウス cGVHD モデルを作製した。cGVHD 症状を発現する移植後 28 日目より、媒体対照（0.4%メチルセルロース）又はベルモスジルメシル酸塩（150 mg/kg/日）を腹腔内投与した。移植後 56 日目に摘出した脾臓サンプルを用いて、胚中心反応の指標として胚中心面積を算出し、さらに Tfh 細胞割合をフローサイトメトリーにより測定した。その結果、ベルモスジル投与により、脾臓の胚中心面積及び Tfh 細胞割合は有意に減少した（図 2.6.2-11）[19)]。以上の結果から、ベルモスジルは Tfh 細胞分化を抑制することで、胚中心反応を抑制することが示唆された。

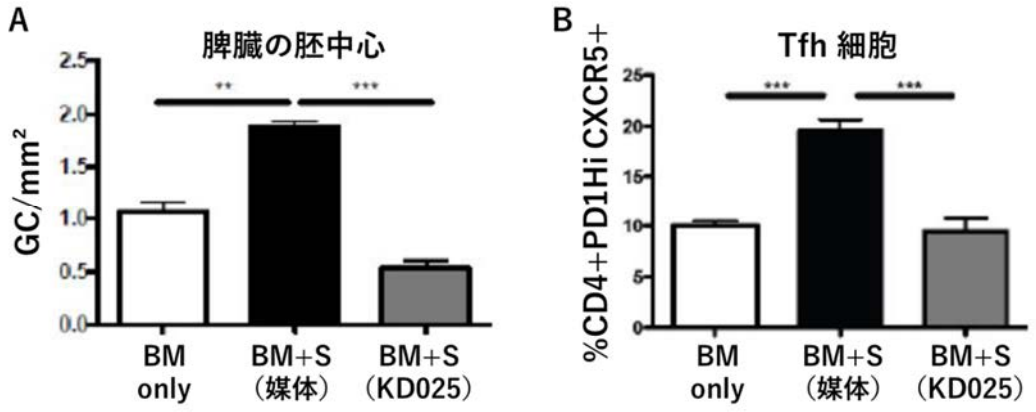


図 2.6.2-11 ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける脾臓の胚中心反応の抑制作用及び Tfh 細胞に対する分化抑制作用

A; 移植 56 日目に摘出した脾臓に対して、胚中心 B 細胞マーカーとしてピーナッツアグルチニン（PNA）を組織染色し、染色されたエリアを胚中心面積として測定した。
B; Tfh 細胞マーカーとして蛍光標識された抗 CD4 抗体、抗 PD1 抗体、抗 CXCR5 抗体を染色し、フローサイトメトリーにより CXCR5 と PD1 が共陽性の CD4 陽性 T 細胞割合を測定した。
各群 8 例（独立した 3 試験を統合して解析），平均値±SEM, ** P < 0.01, *** P < 0.001, vs BM + 媒体投与群（two-tailed Student's t-test）BM = 骨髄細胞移植, S = 脾細胞移植
KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

2.6.2.2.5.5 マウス強皮症様 cGVHD モデルにおけるベルモスジルの皮膚症状改善作用

【2.6.3.2】：4.2.1.1-06：KD025-NCP-cGVHD-2（参考資料）
【2.6.3.2】：4.2.1.1-07：Flynn-2016（参考資料）

cGVHD 症状として発現する皮膚硬化に対するベルモスジルの皮膚症状改善作用を検討した。

BALB/c（H2d）マウス（8 例/群）に放射線照射（7.75 Gy）を実施後、尾静脈より B10.D2 （H2d）マウスの骨髄細胞（1×10^7 個）を単独又は T 細胞（CD4 陽性, 1.8×10^6 個、CD8 陽性, 0.9×10^6 個）を共に移植することにより、マウス強皮症様 cGVHD モデルを作製した。マウスの脱毛面積に応じた皮膚潰瘍に基づいて算出された皮膚 GVHD スコア及び cGVHD 症状（真皮の線維化、脂肪減少、炎症、

表皮界面の変化、毛包の脱落）に基づいて算出された皮膚病理スコアから cGVHD の進行度を経時的に評価した。cGVHD 症状を発現する移植後 19 日目から 47 日目まで、媒体対照（0.4%メチルセルロース）又はベルモスジルメシル酸塩（150 mg/kg/日）を腹腔内投与し、皮膚 GVHD 症状に対するベルモスジルの皮膚症状改善作用を評価した。その結果、移植後 51 日目のベルモスジル投与群の皮膚 GVHD スコア及び皮膚病理スコアは、媒体投与群と比べて有意に低かった（図 2.6.2-12A,B）[19]。また、皮膚病変部組織を病理組織学的に評価したところ、ベルモスジル投与により、媒体投与群でみられた表皮過形成や角化症が抑制された（図 2.6.2-12C）[19]。

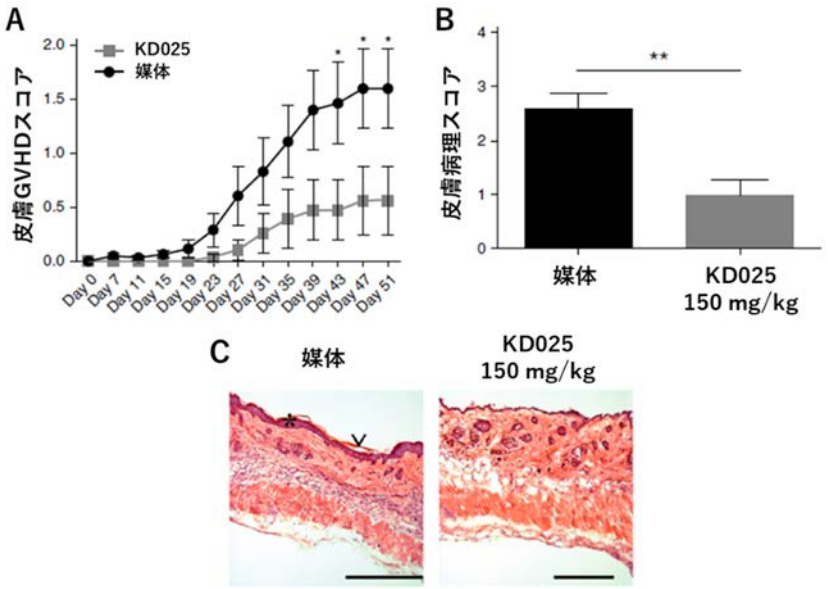


図 2.6.2-12 ベルモスジルのマウス強皮症様 cGVHD モデルにおける皮膚症状改善作用

A; 移植後にマウスの脱毛面積に応じた皮膚潰瘍に基づいて皮膚 GVHD スコアを経時的に算出した。
B; 移植 51 日目に真皮の線維化、脂肪減少、炎症、表皮界面の変化、毛包の脱落に基づいて皮膚病理スコアを算出した。
C; ベルモスジルメシル酸塩又は媒体投与後における皮膚病変部の組織像（*; 表皮過形成, ∨; 角化症, スケールバー ＝500 μm）
各群 8 例（独立した 2 試験を統合して解析）, 平均値±SEM, * P < 0.05, ** P < 0.01 vs 媒体投与群（1-way analysis of variance）
KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

2.6.2.2.5.6 ブレオマイシン誘発マウス肺線維症モデルにおけるベルモスジルの抗線維化作用

【2.6.3.2】：4.2.1.1-08：KDM-01（参考資料）

cGVHD 症状として発現する肺線維化に対するベルモスジルの抗線維化作用を検討した。

C57BL/6 マウス（雄 12 例/群）にブレオマイシン（2.25 U/kg）を気管内投与し、ブレオマイシン誘発マウス肺線維症モデルを作製した。ブレオマイシン投与 8 日後より、媒体対照（0.4%メチルセルロース）又はベルモスジルメシル酸塩（50、100 又は 150 mg/kg/日）を 14 日間経口投与した。その後、炎症反応による肺浮腫の指標として肺湿重量を測定し、さらに肺線維化を病理組織学的に評価した。その結果、媒体投与群でみられた肺湿重量の増加はベルモスジル（100 又は 150 mg/kg/日）投与群で有意に抑制された（図 2.6.2-13A）。また、媒体投与群でみられた肺線維化率の増加はベルモスジル（100 又は 150 mg/kg/日）投与群で有意に抑制された（図 2.6.2-13B）。さらに、アシュクロフ

トスコアに基づいた肺線維化スコアは、媒体投与群と比べてベルモスジル（100 mg/kg/日）投与群で有意に低下した（図 2.6.2-13C）。

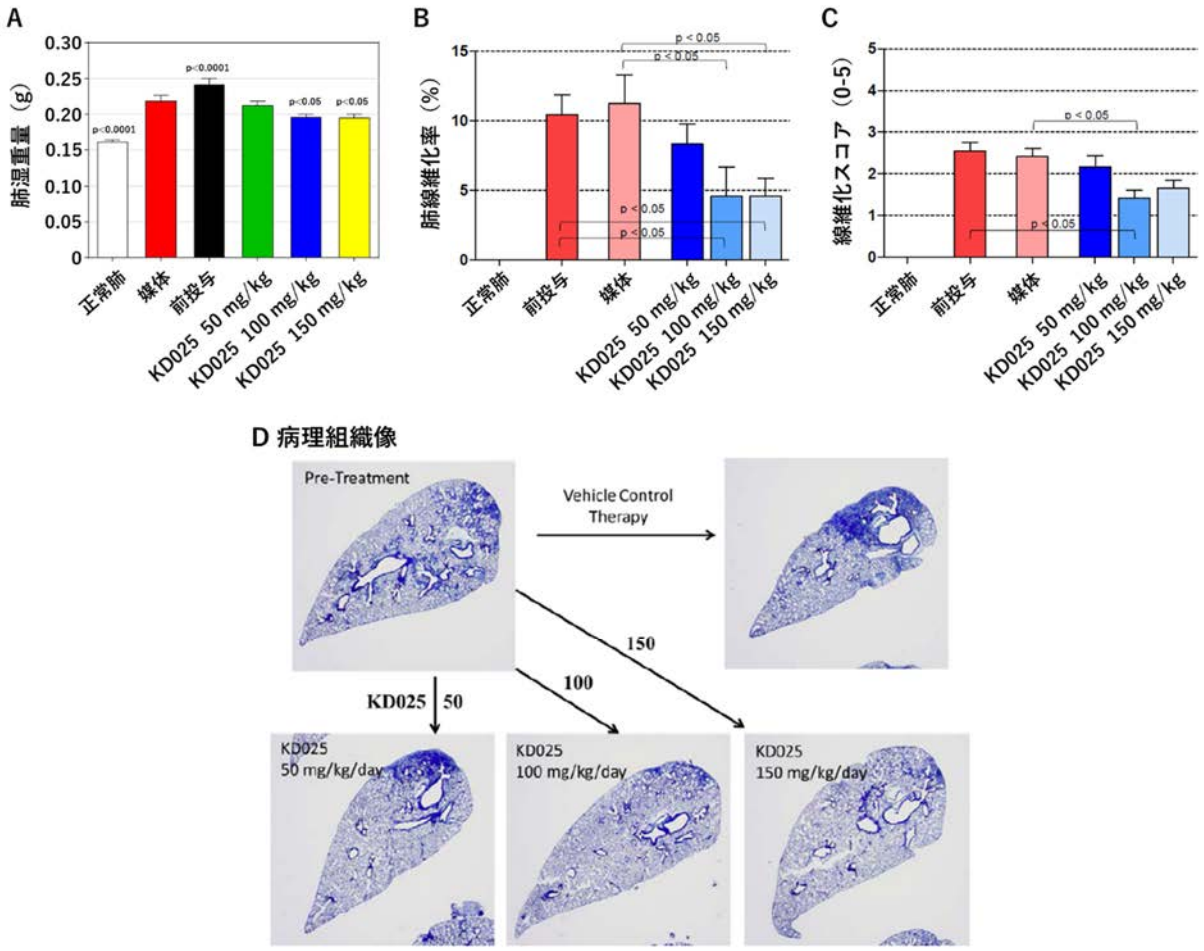


図 2.6.2-13 ベルモスジルのマウス肺線維症モデルにおける抗線維化作用

A; 摘出した肺組織の湿重量を測定した。各群 12 例, 平均値±SEM, P < 0.05, vs 媒体投与群（Holm-Sidak's multiple comparison post-hoc test after 1-way analysis of variance）, P < 0.0001, 正常肺群 vs 前投与群（unpaired t-test）
B; 摘出した肺組織を用いて肺切片を作製し、膠原線維を染色するマッソントリクローム染色後に肺線維化率を算出した。各群 12 例, P < 0.05, vs 前投与群又は媒体投与群 （Dunnett's multiple comparison test after 1-way analysis of variance）
C; アシュクロフトスコアに基づいて組織学的な肺線維化を評価した。各群 12 例, P < 0.05, vs 前投与群又は媒体投与群 （Kruskal-Wallis test）
D; マッソントリクローム染色によるマウス肺病理組織画像
KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

2.6.2.2.6 cGVHD 病態と関連する症状を呈するモデルマウスに対するベルモスジルの薬理学的作用

2.6.2.2.6.1 マウス SLE モデルにおけるベルモスジルの SLE 症状改善作用

【2.6.3.2】：4.2.1.1-03：Weiss-2016（参考資料）
【2.6.3.2】：4.2.1.1-09：20131203-1（参考資料）

Th17 細胞が産生する炎症性サイトカイン IL-17 及び IL-21 は SLE の病因として知られており、SLE では自己抗体産生、皮膚硬化、腎炎などの GVHD と共通した自己免疫性炎症反応を呈する[22), 23), 24)]。

ベルモスジルの免疫調整作用を更に裏づけるために、マウス SLE モデルにおけるベルモスジルの自己免疫性炎症反応の改善作用を検討した。

マウス SLE モデル MRL/MpJ-*Fas*^{lpr}/J（雌 15 例/群）に対して、タンパク尿が観察され始めた 11 週齢目より、媒体対照（0.4%メチルセルロース）又はベルモスジルメシル酸塩（100 mg/kg/日）を 17 週齢目まで経口投与した。陽性対照として、免疫抑制薬シクロホスファミド（50 mg/kg、週 1 回）を 17 週齢目まで腹腔内投与した。週 1 回、尿中タンパク濃度に基づいた臨床スコアを算出し、17 週齢目の実験終了時に腎臓の組織観察に基づいた腎臓組織スコア、腎臓機能を反映する血中尿素窒素量及び SLE 病態を反映する血中抗二本鎖 DNA（dsDNA）抗体量を測定した。また、11 週齢目時点で組織採取した未処置群（雌 5 例/群）の各測定値を病理所見のベースラインとした。その結果、媒体投与群と比べてベルモスジル投与により臨床スコア及び腎臓組織スコアが改善した（図 2.6.2-14A,B）[16]。さらに、実験終了時の血中尿素窒素量及び血中抗 dsDNA 抗体量は媒体投与群と比べて低かった（図 2.6.2-14C,D）[16]。

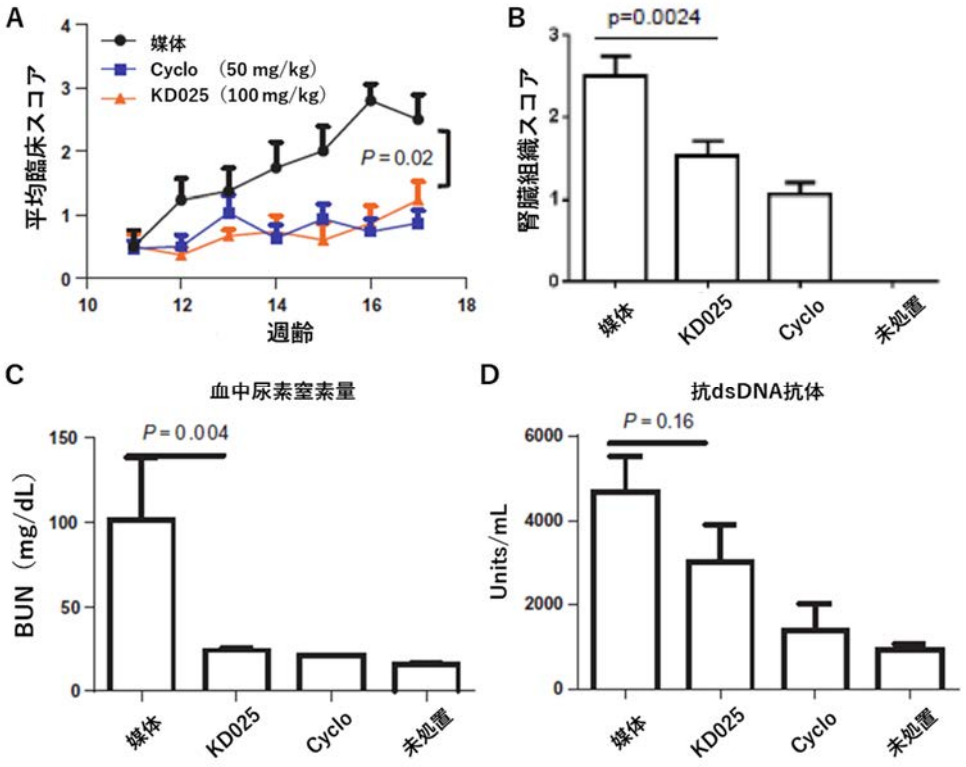


図 2.6.2-14 マウス SLE モデルにおけるベルモスジルの SLE 症状改善作用

A; ベルモスジルメシル酸塩の投与開始後、自己免疫性腎傷害の指標である尿中タンパク濃度に基づいて臨床スコアを算出した。
B; 摘出した腎組織を用いて作製した腎切片を PAS 染色し、メサンギウム細胞や糸球体細胞数の増加、炎症性滲出液と被膜癒着形成、糸球体構造の消失などの所見に基づいて腎臓組織スコアを算出した。P-value vs 媒体投与群（Mann-Whitney 検定）
C; 実験終了時の腎臓機能を反映する血中尿素窒素量を測定した。P-value vs 媒体投与群（Mann-Whitney 検定）
D; 実験終了時の SLE 病態を反映する血中抗 dsDNA 抗体濃度を ELISA により算出した。P-value vs 媒体投与群（Mann-Whitney 検定）
ベルモスジルメシル酸塩、シクロホスファミド、媒体投与群は各 15 例, 未処置群は 5 例,平均値±SEM
Cyclo＝ シクロホスファミド, KD025＝ ベルモスジルメシル酸塩

2.6.2.2.6.2 マウス SLE モデルにおけるベルモスジルの T 細胞免疫応答の調整作用

【2.6.3.2】：4.2.1.1-03：Weiss-2016（参考資料）
【2.6.3.2】：4.2.1.1-09：20131203-1（参考資料）

ベルモスジルの自己抗体産生に関与する胚中心反応に必要な Tfh 細胞及び成熟 B 細胞に対する分化抑制作用並びに胚中心反応の抑制作用を検討した。

マウス SLE モデル MRL/MpJ-*Fas*^{lpr}/J（雌 15 例/群）に対して、タンパク尿が観察され始めた 11 週齢目より、媒体対照（0.4%メチルセルロース）又はベルモスジルメシル酸塩（100 mg/kg/日）を 17 週齢目まで経口投与した。陽性対照として、免疫抑制薬シクロホスファミド（50 mg/kg、週 1 回）を 17 週齢目まで腹腔内投与した。17 週齢目に脾臓を摘出し、脾臓リンパ球数、Tfh 細胞並びに成熟 B 細胞割合をフローサイトメトリーにより測定した。その結果、シクロホスファミド投与群では脾臓中の総リンパ球数を顕著に減少させる一方で、ベルモスジル投与群では脾臓中の総リンパ球数を維持しながら、Tfh 細胞並びに成熟 B 細胞割合を減少させた（図 2.6.2-15A）[16]。また、ベルモスジル投与群では媒体投与群と比べて胚中心反応が有意に抑制された（図 2.6.2-15B）[16]。

さらに、Th17 細胞活性化に必要な転写因子リン酸化 STAT3 に対するベルモスジルの発現抑制作用及び免疫抑制に必要な転写因子リン酸化 STAT5 の活性化作用並びに Tfh 細胞の発生に必要な転写因子 B 細胞/CLL リンパ腫 6（Bcl6）の発現抑制作用を検討した。その結果、ベルモスジル投与群では媒体投与群と比べてリン酸化 STAT3（pSTAT3）量及び Bcl6 量が減少し、リン酸化 STAT5（pSTAT5）量が増加した（図 2.6.2-15C）[16]。一方で、シクロホスファミド投与群ではリン酸化 STAT5 量は増加しなかった（図 2.6.2-15C）[16]。

以上の結果から、ベルモスジルは Tfh 細胞の分化抑制により自己抗体産生を抑制すると同時に、Treg 細胞の活性化に必要なリン酸化 STAT5 量を増加させることで、免疫抑制作用を発揮し、SLE 症状を改善することが示唆された。

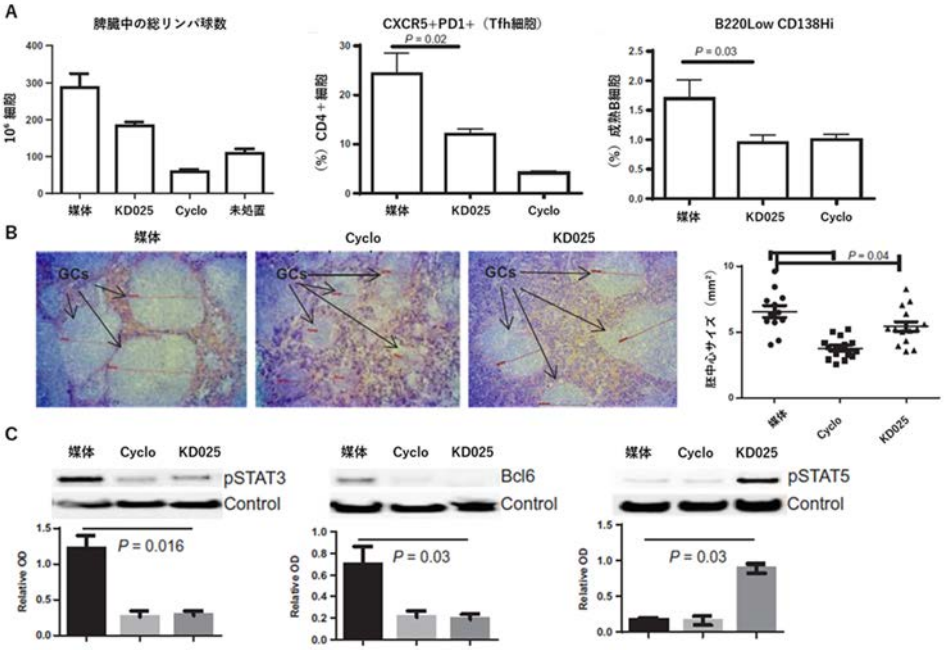


図 2.6.2-15 マウス SLE モデルにおけるベルモスジルの T 細胞免疫応答の調整作用

A; フローサイトメトリーにより脾臓リンパ球数、Tfh 細胞（CD4+CXCR5+PD1+）割合、成熟 B 細胞（B220Low CD138Hi）割合を算出した。各群 15 例, 平均値±SEM
B; 脾臓切片をヘマトキシリン・エオジン染色し、各投与群における脾臓胚中心の面積を算出した（矢印; 胚中心）。各群 15 例, P-value vs 媒体投与群（Bonferroni 補正 Mann-Whitney 検定）

C; 脾臓リンパ球の細胞溶解液を用いてウエスタンブロッティングによりリン酸化 STAT3 及び Bcl6 並びにリン酸化 STAT5 を検出した。P-value vs 媒体投与群（Mann-Whitney 検定）
Cyclo = シクロホスファミド, KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

2.6.2.2.6.3 マウス CIA モデルにおけるベルモスジルの T 細胞免疫応答の調整作用及び CIA 症状改善作用

【2.6.3.2】：4.2.1.1-02：Zanin-Zhorov-2014（参考資料）
【2.6.3.2】：4.2.1.1-10：KD025-NCP-CIA-1（参考資料）

Th17 細胞の活性化は関節リウマチの病因として知られており[24]、関節滑膜への免疫細胞の浸潤による関節炎及び関節拘縮は cGVHD 症状の一つである。そこで、マウス関節炎モデルにおけるベルモスジルの臨床所見の改善作用を検討した。

DBA/1J マウス（雄 10 例/群）にニワトリ由来 II 型コラーゲンを皮内注射し、マウス CIA モデルを作製した。その後、指や関節の腫脹、四肢の硬直などの臨床所見に基づいて関節炎の重症度を CIA スコアとして算出した。媒体対照（0.4%メチルセルロース）又はベルモスジルメシル酸塩（50、100 又は 200 mg/kg/日）を 28 日間腹腔内投与し、期間中の CIA スコアを経時的に算出した。その結果、初回投与から 25 日経過時の CIA スコアは、媒体投与群と比べてベルモスジル投与群で濃度依存的に減少した（図 2.6.2-16A）[15]。また、初回投与から 28 日経過時に採取した関節組織を病理組織学的に評価したところ、媒体投与群でみられた関節へのリンパ球浸潤はベルモスジル投与群で抑制された（図 2.6.2-16A）[15]。

さらに、Th17 細胞分化に必要な転写因子 IRF4、RORγt 及びリン酸化 STAT3 に対するベルモスジルの発現抑制作用並びに Treg 細胞分化に必要なリン酸化 STAT5 の発現亢進作用を検討した。

マウス CIA モデルより脾細胞を採取し、IL-17 及び IL-21 産生 CD4 陽性細胞割合及び RORγt 陽性細胞割合をフローサイトメトリーにより測定した。また、IRF4 及びリン酸化 STAT3 量並びにリン酸化 STAT5 量をウエスタンブロッティングにより検出した。その結果、ベルモスジル投与群では IL-17 及び IL-21 並びに RORγt 産生 CD4 陽性 T 細胞割合が減少した（図 2.6.2-16B）[15]。また、ベルモスジル投与群では濃度依存的に IRF4 の発現及びリン酸化 STAT3 量が減少する一方で、リン酸化 STAT5 量が増加した（図 2.6.2-16C）[15]。以上の結果から、in vivo で確認されたベルモスジルによる臨床所見の改善は、各種転写因子の発現調節を介した Th17 細胞の分化抑制及び Treg 細胞の分化亢進によりもたらされることが示唆された。

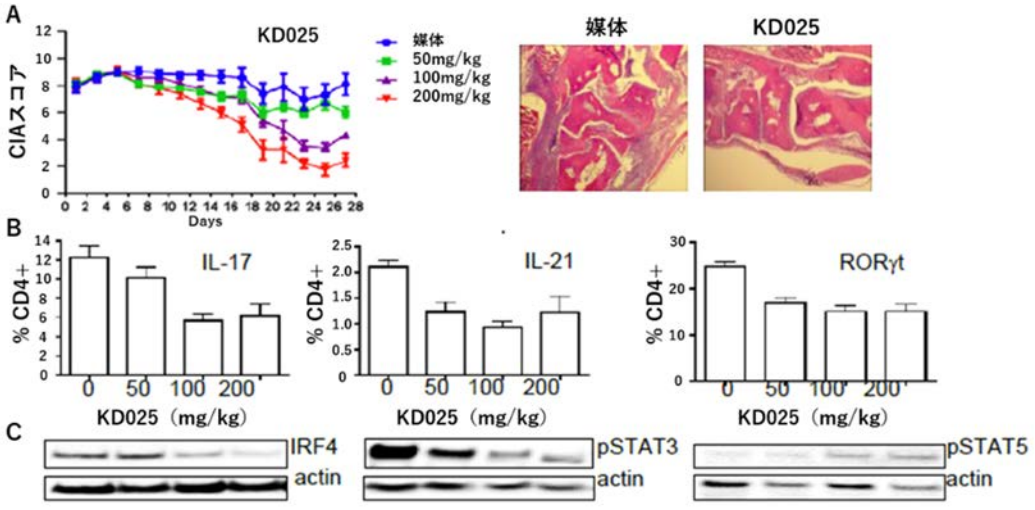


図 2.6.2-16 マウスコラーゲン誘導関節炎（CIA）モデルにおけるベルモスジルの T 細胞免疫応答の調整作用

A; ベルモスジルメシル酸塩の投与開始後、指や関節の腫脹、四肢の硬直などの臨床所見に基づいて CIA スコアを算出した。実験終了時、足関節切片をヘマトキシリン・エオジン染色し、リンパ球浸潤を観察した。各群 10 例,平均値±SEM
B; フローサイトメトリーにより IL-17、IL-21、RORγt を発現する CD4 陽性 T 細胞割合を算出した。各群 10 例, 平均値±SD
C; ウエスタンブロッティングにより IRF4 及びリン酸化 STAT3 並びにリン酸化 STAT5 を検出した。
KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 各種キナーゼ、細胞表面上の受容体及びイオンチャネルに対する作用

【2.6.3.3】：4.2.1.1-01：KD025-NCP-2（参考資料）
【2.6.3.3】：4.2.1.2-01：[redacted]-0007414-1237849（参考資料）

ベルモスジルの ROCK2 に対する選択性を評価するため、表 2.6.2-2 に示すキナーゼパネル並びに AGC、CMGC、TK、TKL、STE、CAMK 及び CK1 キナーゼファミリーを対象とした約 220 種のキナーゼパネルに対する阻害作用を評価した。その結果、CK2 に対する阻害作用がみられ、その IC_{50} 値は 0.1 µmol/L 以下であった。その他キナーゼに対する阻害作用は認められなかった（IC_{50} > 5 µmol/L）。CK2 は生体内に広範に分布しセリン・スレオニンキナーゼ活性を有するキナーゼであり、細胞周期等に関与していることが知られている。細胞内の様々な分子が基質となることが報告されているが、個々の基質リン酸化の生理学的な意義は一部を除き不明な点も多い。CK2 は mTOR シグナル伝達経路の活性制御に関与することが報告されているが、ベルモスジルは CK2 阻害剤と異なる経路で mTOR シグナル伝達経路を制御することが示唆されており（2.6.2.3.4）、機能的影響は不明である。また、表 2.6.2-3 に示す各種細胞表面上の受容体及びイオンチャネルに対するベルモスジルのオフターゲット作用を放射性標識リガンド結合アッセイにより評価した。その結果、ベルモスジルはアデノシン A_{2A} 及び A_3 受容体に結合を示し、その IC_{50} 値はそれぞれ 0.66 及び 0.13 µmol/L であった。結合がみられたアデノシン A_{2A} 及び A_3 受容体の機能に対する影響を検証するため、細胞機能評価を実施した結果、いずれの受容体に対してもアゴニスト活性を示さず、アデノシン A_3 受容体に対してはアンタゴニスト活性もみられなかった（IC_{50} > 10 µmol/L）。アデノシン A_{2A} 受容体に対してベルモスジルはアンタゴニスト活性を示し、その IC_{50} 値は 0.35 µmol/L（158 ng/mL）であった。この濃度は、ヒトにベルモスジル 200 mg を 1 日 1 回投与したとき（臨床用量）のベルモスジルの最高血漿中非結合型濃度 24 ng/mL と比較して 6.6 倍であった。アデノシン A_{2A} 受容体は、大脳基底核のようなドパミンが豊富な領域にある神経細胞（GABA を伝達物質とする中型の有棘細胞）に主に発現し、ドパミン作動性シグナルや運動機能調節に関与している[20)]。一方、ベルモスジルの中枢移行性は非常に低く【2.6.4.4.1】、自発運動量の増加等の当該受容体に関連すると考えられる影響はいずれの in vivo 試験においてもみられていない。

以上のことから、ベルモスジルは ROCK2 に対する高い選択性を有し、オフターゲット作用が臨床上問題となる可能性は低いと考えられた。

表 2.6.2-2 キナーゼパネルに対する阻害アッセイ

	Inactive	Active

各種キナーゼ	ROCK1, Abl, Akt1, Akt2, AuroraA, Cdk1, Cdk2, CHK1, c-kit, Erk1, Erk2, p38α, p38β, p38δ, p38γ, DMPK, DRAK, ErbB4, Flt1, Flt4, IKKα, KDR, MAP, MLCK, MRCKα, MRCKβ, MSK1, MSSK1, p70S6K, PDGFα, PHK2, PKA, PKCα, PKGα, PKGβ, PRK1, PRK2, Pyk2, RSK2, Src	CK2, IC_{50}~100 nmol/L

表 2.6.2-3 各種細胞表面上の受容体及びイオンチャネルに対する放射性標識リガンド結合アッセイ

	Inactive	Active
各種細胞表面上の受容体及びイオンチャネル	Adenosine A_1, A_{2B}, Adrenergic α1, α2, Adrenergic β, Dopamine (nonselective), Muscarinic (nonselective), Nicotinic: TTX (+), TTX (-), Norepinephrine Transporter, Opioid, PPARα agonist, PPARα antagonist, PPARγ agonist, PPARγ antagonist, Serotonergic (nonselective), Na+ Type 2, Glutamate: AMPA, KA, NMDA, Glycine (spinal), Glycine (central), Calcium:, Type L, Type N, GABA, P2X, P2Y, Potassium: ATP sensitive, Ca^{++} activated	Adenosine A_{2A}, Adenosine A_3

Abbreviations: AMPA= α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; ATP=adenosine triphosphate; GABA=gamma aminobutyric acid; KA=kainic acid; NMDA=N-methyl-D-aspartate receptor; PPAR=peroxisome proliferator-activated receptor; TTX=tetrodotoxin

2.6.2.3.2 ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いたベルモスジルの細胞毒性評価

【2.6.3.3】：4.2.1.2-02：ADME-KAD-200402（参考資料）

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞に対するベルモスジルの細胞毒性を評価した。ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞に対し、ベルモスジルメシル酸塩（0.009～150 µmol/L）を 48 時間反応させ、生存細胞の指標である ATP とルシフェラーゼを利用した細胞毒性評価法により、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞の生存率を算出した。その結果、0.009～150 µmol/L の濃度域において、有意な細胞毒性は生じなかった（表 2.6.2-4）。

表 2.6.2-4 ベルモスジルのヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞に対する細胞毒性評価

Compound	IC_{50}（µmol/L）	% vehicle control at highest conc.
Belumosudil*	> 150	67.03

* 9.38, 37.5 及び 150 µmol/L の濃度において被験物質の沈殿が観察された。

2.6.2.3.3 ヒト及びマウス線維芽細胞におけるベルモスジルの mTOR シグナル伝達抑制作用

【2.6.3.3】：4.2.1.1-04：KD025-NCP-3（参考資料）

mTOR シグナル伝達経路の活性化は線維性コラーゲン産生を促進し、cGVHD 症状の組織線維化に寄与する[25), 26)]。そこで、ベルモスジルの mTOR シグナル伝達抑制作用を検討した。

WI-38 ヒト肺線維芽細胞株又は HT-1080 ヒト結合組織線維肉腫細胞株に対し、ベルモスジルメシル酸塩（1.0、3.0 又は 10 µmol/L）を処理し、18 時間培養後、mTOR シグナル伝達経路の活性化制御に関与するリボソームタンパク質 S6K の活性化体であるリン酸化 S6K（p-S6K、Thr389）及び総 S6K をウエスタンブロッティングにより検出した。その結果、ベルモスジルは WI-38 ヒト肺線維芽細胞株及び HT-1080 ヒト結合組織線維肉腫細胞株において、濃度依存的に S6K のリン酸化を阻害し、S6K の活性化を抑制した（図 2.6.2-17A,B）。

さらに、NIH3T3 マウス線維芽細胞株に対するベルモスジルの細胞増殖抑制作用を検討した。NIH3T3 マウス線維芽細胞株に対し、ベルモスジルメシル酸塩を 72 時間反応させ、細胞増殖をスルホローダミン B 染色による比色定量により測定した。その結果、ベルモスジルは NIH3T3 マウス線維芽細胞株の増殖を濃度依存的に抑制した（増殖抑制 IC_{50}; 1.6 µmol/L）（図 2.6.2-17C）。以上の結果からベルモスジルは筋線維芽細胞のコラーゲン産生などに関与する mTOR シグナル伝達経路及び線維芽細胞の増殖を阻害し、線維化を抑制することが示唆された。

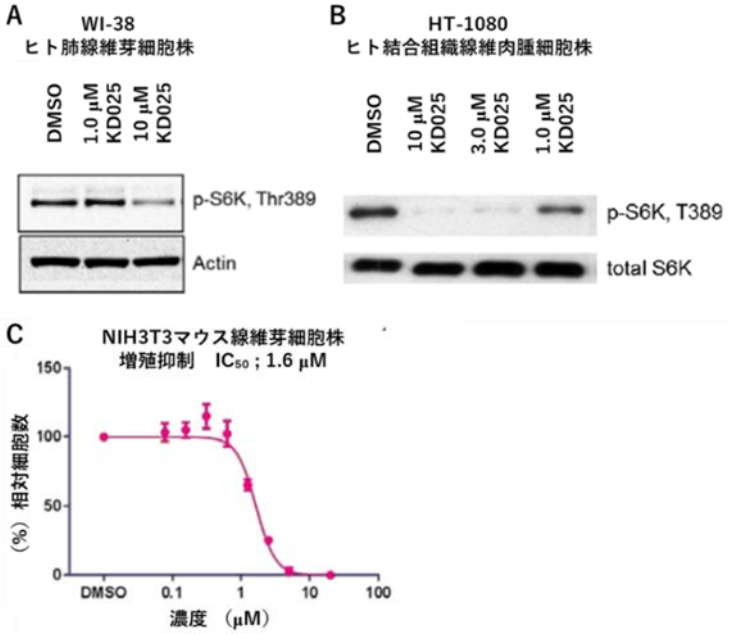


図 2.6.2-17 ベルモスジルのヒト線維芽細胞及びマウス線維芽細胞における mTOR シグナル伝達抑制作用

A; ウエスタンブロッティングによりベルモスジルメシル酸塩を処理した WI-38 ヒト肺線維芽細胞株におけるリン酸化 S6K を検出した。
B; ウエスタンブロッティングによりベルモスジルメシル酸塩を処理した HT-1080 ヒト結合組織線維肉腫細胞株におけるリン酸化 S6K を検出した。
C; ベルモスジルメシル酸塩を処理したマウス NIH3T3 線維芽細胞株の細胞増殖阻害曲線
KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

2.6.2.3.4 ヒト結合組織線維肉腫細胞におけるベルモスジルの mTOR シグナル伝達を調節する S6K 及び AMPK に対する作用

【2.6.3.3】：4.2.1.1-01：KD025-NCP-2（参考資料）

mTOR シグナル伝達経路は CK2 による活性制御を受ける[27)]。そこで、ベルモスジルによる mTOR シグナル伝達の抑制作用が CK2 阻害薬と同一の作用機序で生じるかどうかを検討した。

HT-1080 ヒト結合組織線維肉腫細胞株に対し、ベルモスジルメシル酸塩（10 µmol/L）、Y-27632（非選択的 ROCK 阻害薬、10 µmol/L）、DMAT（CK2 阻害薬、10 µmol/L）のいずれかを一晩反応させた後、mTOR シグナル伝達経路の活性化制御に関与するリン酸化 S6K（p-S6K、Thr389 及び Thr412）をウエスタンブロッティングにより検出した。その結果、Y-27632 及び DMAT 処理群では、リン酸化 S6K がみられる一方で、ベルモスジル処理群ではリン酸化 S6K が顕著に減少した（図 2.6.2-18）。さらに、ベルモスジル処理群において、mTOR シグナル伝達の抑制に働く AMP 活性化プロテインキナーゼ（AMPK）のリン酸化が顕著に亢進したが、Y-27632 及び DMAT 処理群では変化はなかった。

以上の結果から、ベルモスジルは CK2 阻害薬とは異なり AMPK を介して mTOR シグナル伝達を抑制することが示唆された。

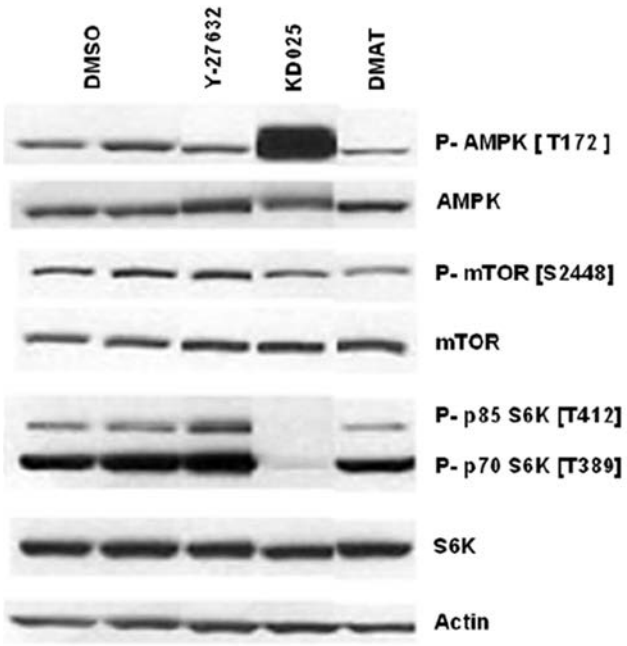


図 2.6.2-18 ベルモスジルの mTOR シグナル伝達を調節する S6K 及び AMPK に対する作用

ウエスタンブロッティングによりベルモスジルメシル酸塩、Y-27632（非選択的 ROCK 阻害薬）、DMAT（CK2 阻害薬）のいずれかを処置した HT-1080 ヒト結合組織線維肉腫細胞株におけるリン酸化 S6K 及びリン酸化 AMPK を検出した。KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

2.6.2.3.5 ヒト結合組織線維肉腫細胞におけるベルモスジルの HIF-1α 発現抑制作用

【2.6.3.3】：4.2.1.1-01：KD025-NCP-2（参考資料）

低酸素誘導因子（HIF）-1α は細胞の代謝や生存に関与する経路を調節する転写因子であり、酸素分圧や mTOR シグナル経路によってその活性が制御されている。HIF-1α は T 細胞の免疫応答に必要な転写因子の発現制御や Th17 細胞及び Treg 細胞の分化調節にも寄与しており、HIF-1α の発現抑制は炎症反応を低下させる [28]。そこで、T 細胞免疫応答を調節する HIF-1α に対するベルモスジルの発現抑制作用を検討した。

HT-1080 ヒト結合組織線維肉腫細胞株に対し、ベルモスジルメシル酸塩（10 μmol/L）又はファスジル（非選択的 ROCK 阻害薬、10 μmol/L）を処理し、正常酸素圧又は低酸素圧条件で 16 時間培養後、ウエスタンブロッティングにより HIF-1α を検出した。その結果、ベルモスジルは正常酸素圧及び低酸素圧条件下で誘導される HIF-1α の発現を抑制した（図 2.6.2-19）。一方で、ファスジルは正常酸素分圧条件での HIF-1α 発現を抑制したものの、低酸素圧条件下で誘導される HIF-1α の発現を抑制しなかった。

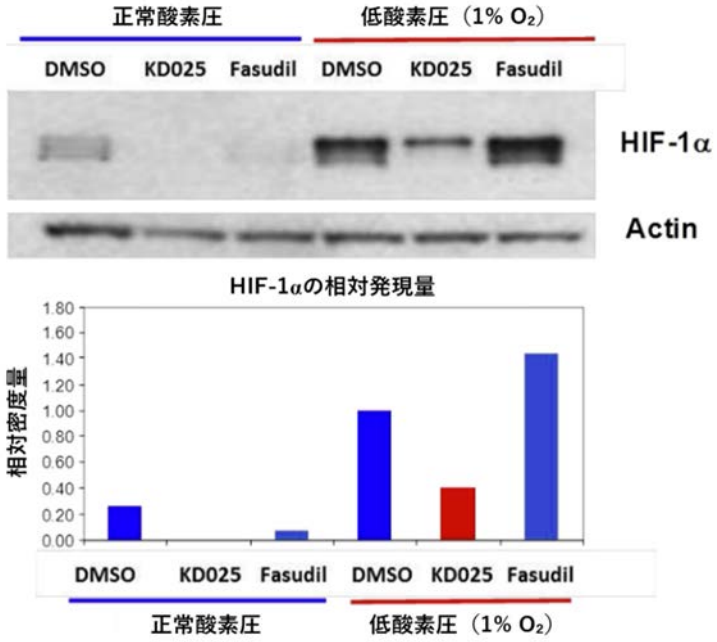


図 2.6.2-19 ベルモスジルの T 細胞免疫応答を調節する HIF-1α 発現抑制作用

HT-1080 ヒト結合組織線維肉腫細胞株に対して、ベルモスジルメシル酸塩又はファスジルのいずれかを処置し、正常酸素圧又は低酸素圧（1% O_2 ）条件で培養後、ウエスタンブロッティングにより HIF-1α を検出した。
KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 中枢神経系に対する作用

2.6.2.4.1.1 ラットを用いた中枢神経系に対する影響評価

【2.6.3.4】：4.2.1.3-01：[redacted]-602031（評価資料）

Sprague Dawley ラット（雌雄各 6 例/群）にベルモスジルメシル酸塩を 0（媒体対照：0.4%メチルセルロース）、50、175 及び 350 mg/kg の用量で単回経口投与し、投与前及び投与後 24 時間までの行動、身体機能及び神経機能に対する影響を Irwin 変法により評価した。また、雌雄各 6 例/群で同様の群構成からなる自発活動量測定群を設け、投与 1 時間後（雌）又は 2 時間後（雄）から 4 時間の活動量を計測した。陽性対照群として、クロルプロマジン 20 mg/kg を同様に投与にした。

350 mg/kg 群において、雄の投与 2 時間 20 分時点で一過性の自発活動量の減少が軽度にみられた。同群の雌では、投与 2 から 6 時間後に投与前と比較し最大 2.2℃ の体温低下が一過性にみられた。陽性対照群では、クロルプロマジン投与による既知の薬理作用の影響が確認された。

2.6.2.4.2 心血管系に対する作用

2.6.2.4.2.1 hERG カリウムイオンチャネル電流に対する作用評価

【2.6.3.4】：4.2.1.3-02：090109.TVM（評価資料）

hERG チャネルを遺伝子導入した HEK293 細胞を用いて、ベルモスジルメシル酸塩、M1 及び M2 の hERG チャネル電流に対する影響をホールセルパッチクランプ法により評価した。陽性対照としてテルフェナジン、比較対照として E-4031 を設定した。

hERG チャネル電流に対する IC_{50} 値は、ベルモスジル及び M1 でそれぞれ 0.59 µmol/L 及び 1.46 µmol/L であり、M2 は 10 µmol/L においても阻害作用を示さなかった。陽性対照のテルフェナジンは、0.06 µmol/L で hERG 電流を 79.5%阻害した。

2.6.2.4.2.2 イヌを用いた心血管系に対する影響評価

【2.6.3.4】：4.2.1.3-03：[redacted]-602029（評価資料）

覚醒下ビーグル犬（雌雄各 4 例/群）にベルモスジルメシル酸塩を 0（媒体対照：ゼラチンカプセル）、25、75 及び 150 mg/kg の用量で単回経口投与し、血圧、心拍数、体温及び心電図パラメータ（PR 間隔、QRS 幅、QT 間隔及び QTcV 間隔）に対する影響をテレメトリー法にて評価した。動物はラテン方格法により割り付け、各群の投与は約 7 日間のインターバルを設定した。また、心血管系に対する影響評価終了後の動物に同様の方法で薬物を投与し、ベルモスジル、M1 及び M2 のトキシコキネティクス（TK）を評価した。

その結果、75 及び 150 mg/kg 群では、餌やカプセル等を含む嘔吐がみられた。150 mg/kg 群の雌では、収縮期血圧、拡張期血圧及び平均動脈圧が対照群のベースラインからの変化量と比較してそれぞれ最大 15、11 及び 11 mmHg の低下がみられた。

TK 評価結果を表 2.6.2-5 に示す。ベルモスジル、M1 及び M2 は用量増加に伴う C_{max} 及び AUC_{0-t} の増加がみられたが、全ての群でベルモスジルの AUC_{0-24h} は最大の個体と最小の個体の比が 100 倍以上であり、個体間変動が非常に大きかったため、定量的な議論は困難であった。また、ベルモスジルの AUC_{0-t} は雄性イヌに比べ、雌性イヌの方が高い傾向が認められた。

表 2.6.2-5 イヌを用いた心血管系に対する影響評価における TK パラメータ

用量 (mg/kg)	性	C_{max} (ng/mL)			AUC_{0-t} (ng·hr/mL)		
		ベルモスジル	M1	M2	ベルモスジル	M1	M2
25	雄	392[a]	27.3[a]	36.8[a]	1954[a]	131[a]	154[a]
	雌	914	91	67.6	3156	296	227
75	雄	1688	269[a,]	158[a]	12417[b]	1821[a]	1228[a]
	雌	2717	386[a]	161[a]	15870	2389[a]	1109[a]
150	雄	2019	417[a]	222[a]	20270	3720[a]	2264[a]
	雌	4224	573	281	40294	5509	3127

a この平均値は 1 つ以上の 0.00 を含むデータを用いて算出した。

2.6.2.4.3 呼吸系に対する作用

2.6.2.4.3.1 ラットを用いた呼吸系に対する影響評価（初回試験）

【2.6.3.4】：4.2.1.3-04：[redacted]-602030（評価資料）

Sprague Dawley ラット（雌雄各 8 例/群）にベルモスジルメシル酸塩を 0（媒体対照：0.4%メチルセルロース）、50、175 及び 350 mg/kg の用量で単回経口投与し、雌は投与直後から投与 5 時間後まで、雄は投与 2 時間後から投与 7 時間後までの呼吸機能（呼吸数、一回換気量及び分時換気量）に対する影響をプレチスモグラフィ法により評価した。陽性対照として、バクロフェン 20 mg/kg を同様に投与にした。また、サテライト群（雌雄 6 例/群）を設定し、ベルモスジル、M1 及び M2 の TK を評価した。

その結果、一般状態の異常はみられなかった。175 mg/kg 以上の群で、分時換気量の低下（雄：最大 12～19%、雌：最大 17～25%）がみられ、350 mg/kg 群の雄では、呼吸数及び一回換気量にそれぞれ最大 11%の低下がみられた。陽性対照群では、バクロフェンの既知の薬理作用と同様の投与による呼吸数の減少、分時換気量の低下及び一回換気量の増加が認められた。

TK 評価結果を表 2.6.2-6 に示す。ベルモスジル、M1 及び M2 のいずれも用量増加に伴う C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ の増加がみられた。ベルモスジルの $AUC_{0\text{-}24h}$ は雄性ラットに比べ、雌性ラットの方が高い傾向が認められた。

本試験でみられた呼吸機能パラメータに対する影響について、再現性を確認するための確認試験（2.6.2.4.3.2）を実施した。

表 2.6.2-6 ラットを用いた呼吸系に対する影響評価（初回試験）における TK パラメータ

用量 (mg/kg)	性	C_{max} (ng/mL)			$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·hr/mL)		
		ベルモスジル	M1	M2	ベルモスジル	M1	M2
50	雄	1283	695	375	11468	6222	3182
	雌	3810	295	154	19530	1834	1028
175	雄	3557	905	610	18661	7694	4415
	雌	6411	469	298	65323	7907	4995
350	雄	6354	1536	1026	29110	11229	6853
	雌	7492	553	294	79490	9169	5727

2.6.2.4.3.2 ラットを用いた呼吸系に対する影響評価（確認試験）

【2.6.3.4】：4.2.1.3-05：8289751（評価資料）

ラットを用いた呼吸系に対する影響を評価した初回試験（2.6.2.4.3.1）の再現性を確認するため、Sprague Dawley ラット（雌雄各 8 例/群）にベルモスジルメシル酸塩を 0（媒体対照：0.4%メチルセルロース）、50、175 及び 350 mg/kg の用量で単回経口投与し、投与前 2.5 時間、投与直後から 6 時間、並びに投与 22.5 時間後から 2.5 時間におけるまでの呼吸機能（呼吸数、一回換気量及び分時換気量）に対する影響をプレチスモグラフィ法により評価した。陽性対照として、バクロフェン 30 mg/kg を同様に投与し評価した。また、サテライト群（雌雄各 9 例/群）を設定し、ベルモスジル、M1 及び M2 の TK を評価した。

その結果、いずれの用量においても、一般状態、一回換気量、呼吸数及び分時換気量に対する影響はみられず、初回試験（2.6.2.4.3.1）でみられた作用の再現性は認められなかった。一方、陽性対照群では、バクロフェンの既知の薬理作用である呼吸数の減少及び一回換気量の増加が認められた。

TK 評価結果を表 2.6.2-7 に示す。ベルモスジル、M1 及び M2 のいずれも用量増加に伴う C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ の増加がみられた。ベルモスジルの $AUC_{0\text{-}24h}$ は雄性ラットに比べ、雌性ラットの方が高い傾向が認められた。

表 2.6.2-7 ラットを用いた呼吸系に対する影響評価（確認試験）における TK パラメータ

用量 (mg/kg)	性	C_{max} (ng/mL)			$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·hr/mL)		
		ベルモスジル	M1	M2	ベルモスジル	M1	M2
50	雄	2000	804	543	20300	8400	5100
	雌	3390	287	183	60500	5360	3270
175	雄	3060	933	746	55100	17400	12300
	雌	6450	487	416	86400	6650	5050
350	雄	3940	1230	839	75300	22400	14500
	雌	6570	1100	722	115000	10800	8150

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし。

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験

ベルモスジルは、Rho GTPase シグナル伝達経路の下流に存在する ROCK2 と結合し、0.081 µmol/L の IC_{50} 値で阻害した。

健康被験者由来の末梢血単核球を用いた T 細胞免疫応答の調整作用評価において、ベルモスジルは cGVHD の病態形成に関与するナイーブ T 細胞の Th17 細胞及び Tfh 細胞への分化とそれに続く炎症性サイトカイン分泌の抑制と同時に、免疫抑制に働く Treg 細胞への分化とそれに続く抗炎症性サイトカイン分泌の亢進により免疫調整作用を示した。また抗線維化作用評価において、ベルモスジルは線維性細胞外基質の主要構成成分であるコラーゲンの異常産生及び線維化促進シグナル伝達を阻害し、抗線維化作用を示した。

in vivo 試験において、ベルモスジルは複数のマウス cGVHD モデルで T 細胞免疫応答の調整作用及び抗線維化作用を示した。細気管支閉塞を伴うマウス cGVHD モデルにおいて、ベルモスジルは cGVHD 発病に関与する胚中心反応及び胚中心反応を促進する Tfh 細胞の分化を抑制し、肺機能を改善した。また、マウス強皮症様 cGVHD モデルに対して皮膚症状を軽減し、病態進行を抑制した。さらに、cGVHD 病態と関連する肺線維化を発現するマウス肺線維症モデルに対して肺線維化の軽減作用を示し、自己免疫性炎症反応を発現するマウスモデルに対しても、病態進行を抑制した。これらの臨床所見の改善には、ROCK2 阻害による T 細胞免疫応答及び免疫抑制に関与する転写因子の発現調節が寄与していることが示唆され、ベルモスジルは Th17 細胞や Tfh 細胞の過剰な活性化を病因とする幅広い自己免疫症状に対しても有効である可能性が考えられた。

また、in vivo 試験で用いられたシクロホスファミドはあらゆるリンパ球の増殖を顕著に抑制し、総リンパ球数を減少させることで免疫抑制作用を発揮したが、ベルモスジルは総リンパ球数を維持しながら免疫抑制に働く Treg 細胞分化を誘導することで免疫抑制作用を発揮したことから、骨髄抑制のリスクが低い可能性が考えられた。

以上のことから、ベルモスジルは ROCK2 を選択的に阻害することにより、自己免疫性及び線維性病態を含む cGVHD に対して、免疫調整作用と抗線維化作用を同時に示すことで、治療効果を発揮することが示唆された。

2.6.2.6.2 副次的薬理試験

ROCK2 以外の各種キナーゼ、細胞表面上の受容体及びイオンチャネルに対するベルモスジルのオフターゲット作用を評価した結果、ベルモスジルは CK2 の阻害がみられ、その IC_{50} 値は 0.1 µmol/L 以下であった。CK2 は生体内に広範に分布しセリン・スレオニンキナーゼ活性を有するキナーゼであり、細胞周期等に関与していることが知られている。細胞内の様々な分子が基質となることが報告されているが、個々の基質リン酸化の生理学的な意義は一部を除き不明な点も多い。CK2 は mTOR シグナル伝達経路の活性制御に関与することが報告されているが、ベルモスジルは CK2 阻害剤と異なる経路で mTOR シグナル伝達経路を制御することが示唆されており（2.6.2.3.4）、機能的影響は不明であった。また、アデノシン A_{2A} 受容体に対してアンタゴニスト活性を示し、その IC_{50} 値は 0.35 µmol/L（158 ng/mL）であった。この濃度は、ヒトにベルモスジル 200 mg を 1 日 1 回投与したとき（臨床用量）のベルモスジルの最高血漿中非結合型濃度 24 ng/mL と比較して 6.6 倍であった。アデノシン A_{2A} 受容体は、大脳基底核のようなドパミンが豊富な領域にある神経細胞（GABA を伝達物質とする中型の有棘細胞）に主に発現し、ドパミン作動性シグナルや運動機能調節に関与している[20)]。一方、ベルモスジルの中枢移行性は非常に低く【2.6.4.4.1】、自発運動量の増加等の当該受容体

に関連すると考えられる影響がいずれの in vivo 試験においてもみられていないことから、アデノシン A_{2A} 受容体に対するオフターゲット作用が臨床上問題となる可能性は低いと考えられた。

ベルモスジルは、WI-38 ヒト肺線維芽細胞及び HT-1080 ヒト結合組織線維肉腫細胞株において、コラーゲン産生に関与する mTOR シグナル伝達経路の活性化制御に関与する S6K のリン酸化を阻害した。また、NIH3T3 マウス線維芽細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、cGVHD の病態において問題となる組織線維化に対しても、抑制作用を発揮する可能性が考えられた。

2.6.2.6.3 安全性薬理試験

中枢神経系に対する影響評価において、ラットに 350 mg/kg の用量までベルモスジルメシル酸塩を単回経口投与した結果、350 mg/kg 群の雄で自発活動量の低下、同群の雌で体温低下がいずれも一過性にみられた。これらの変化は一過性かつ軽度な変化であり臨床上問題となる可能性は低いと考えられた。350 mg/kg における C_{max} は臨床用量における曝露量の 2.7～3.1 倍であった。

心血管系に対する影響評価において、ベルモスジル及び M1 は hERG チャネル電流の阻害作用を示し、その IC_{50} 値はそれぞれ 0.59 μmol/L（272 ng/mL）及び 1.46 μmol/L（616 ng/mL）であった。この濃度は、臨床用量におけるベルモスジルの最高血漿中非結合型濃度 24 ng/mL と比較して約 11 倍であった。M1 については、ベルモスジルより阻害活性が弱く臨床では微量【2.7.2.3.1】であることから、影響する可能性は低いと考えられた。また、イヌを用いたテレメトリー試験の最高用量 150 mg/kg まで QTc 間隔を含めた心電図パラメータに異常はみられなかった。さらに、イヌを用いた 4 週間反復投与毒性試験【2.6.6.3.5】の中で実施された心電図検査においても、最高用量 200/125 mg/kg/日まで心電図パラメータに異常はみられなかった。これら試験の最高用量におけるベルモスジル及び M1 の C_{max} はそれぞれ 2019～7330 ng/mL 及び 417～1590 ng/mL であり、臨床用量における C_{max} のそれぞれ 0.8～3.2 倍及び 7.9～30 倍であった。加えて、QT/QTc 間隔に及ぼす影響について評価した臨床試験【2.7.2.2.2.2.9】においてもベルモスジルの QTc 延長作用はみられなかった。これらのことから、ベルモスジルの QTc 延長リスクは低いと考えられた。その他の心血管系に対する作用として、イヌを用いたテレメトリー試験において、150 mg/kg 群の雌で収縮期血圧、拡張期血圧及び平均動脈圧のわずかな低下（対照群のベースラインからの変化量と比較してそれぞれ最大 15、11 及び 11 mmHg）がみられたが、軽度な変化であり臨床上の懸念が生じる可能性は低いと考えられた。150 mg/kg 群の雌における C_{max} は臨床用量における曝露量の 1.8 倍であった。

呼吸系への影響を評価するため、ラットにベルモスジルメシル酸塩を 50、175 及び 350 mg/kg を単回経口投与した結果、初回試験では 175 mg/kg 以上の群で分時換気量の低下（雄：最大 12～19%、雌：最大 17～25%）及び 350 mg/kg 群の雄で呼吸数及び一回換気量にそれぞれ最大 11%の低下がみられた。一方で、初回試験の再現性を確認するため同用量で実施した確認試験では、最高用量の 350 mg/kg まで呼吸系への影響はみられなかった。両試験で同程度の曝露量がみられており、再現性は認められなかったことから、ベルモスジルは呼吸系に対する薬理作用を有さないと考えられた。

2.6.2.7 参考文献

1) 【4.3-01】Tybulewicz VL, Henderson RB. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(9):630-644. doi:10.1038/nri2606
2) 【4.3-02】Julian L, Olson MF. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. *Small GTPases*. 2014;5:e29846. doi:10.4161/sgtp.29846

3) 【4.3-03】Pelosi M, Marampon F, Zani BM, et al. ROCK2 and its alternatively spliced isoform ROCK2m positively control the maturation of the myogenic program. *Mol Cell Biol*. 2007;27(17):6163-6176. doi:10.1128/MCB.01735-06
4) 【4.3-04】Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(6):446-456. doi:10.1038/nrm1128
5) 【4.3-05】Zanin-Zhorov A, Blazar BR. ROCK2, a critical regulator of immune modulation and fibrosis has emerged as a therapeutic target in chronic graft-versus-host disease. *Clin Immunol*. 2021;230:108823. doi:10.1016/j.clim.2021.108823
6) 【4.3-06】Zhou Y, Huang X, Hecker L, et al. Inhibition of mechanosensitive signaling in myofibroblasts ameliorates experimental pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2013;123(3):1096-1108. doi:10.1172/JCI66700
7) 【4.3-07】Teshima T, Maeda Y, Ozaki K. Regulatory T cells and IL-17-producing cells in graft-versus-host disease. *Immunotherapy*. 2011;3(7):833-852. doi:10.2217/imt.11.51
8) 【4.3-08】Shao L, Lie AK, Zhang Y, et al. Aberrant germinal center formation, follicular T-helper cells, and germinal center B-cells were involved in chronic graft-versus-host disease. *Ann Hematol*. 2015;94(9):1493-1504. doi:10.1007/s00277-015-2394-z
9) 【4.3-09】Serody JS, Hill GR. The IL-17 differentiation pathway and its role in transplant outcome. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(1 Suppl):S56-S61. doi:10.1016/j.bbmt.2011.10.001
10) 【4.3-10】Ivanov II, Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol*. 2007;19(6):409-417. doi:10.1016/j.smim.2007.10.011
11) 【4.3-11】Biswas PS, Gupta S, Chang E, et al. Phosphorylation of IRF4 by ROCK2 regulates IL-17 and IL-21 production and the development of autoimmunity in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(9):3280-3295. doi:10.1172/JCI42856
12) 【4.3-12】Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-787. doi:10.1016/j.cell.2008.05.009
13) 【4.3-13】Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, et al. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol*. 2013;14(4):307-308. doi:10.1038/ni.2554
14) 【4.3-14】Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4^{+}CD25^{+} regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330-336. doi:10.1038/ni904
15) 【4.3-15】Zanin-Zhorov A, Weiss JM, Nyuydzefe MS, et al. Selective oral ROCK2 inhibitor down-regulates IL-21 and IL-17 secretion in human T cells via STAT3-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(47):16814-16819. doi:10.1073/pnas.1414189111
16) 【4.3-16】Weiss JM, Chen W, Nyuydzefe MS, et al. ROCK2 signaling is required to induce a subset of T follicular helper cells through opposing effects on STATs in autoimmune settings. *Sci Signal*. 2016;9(437):ra73. doi:10.1126/scisignal.aad8953
17) 【4.3-17】Lee SJ. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2017;129(1):30-37. doi:10.1182/blood-2016-07-686642
18) 【4.3-18】Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, et al. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol*. 2002;4(8):599-604. doi:10.1038/ncb826
19) 【4.3-19】Flynn R, Paz K, Du J, et al. Targeted Rho-associated kinase 2 inhibition suppresses murine and human chronic GVHD through a Stat3-dependent mechanism. *Blood*. 2016;127(17):2144-2154. doi:10.1182/blood-2015-10-678706

20) 【4.3-20】Torvinen M, Marcellino D, Canals M, et al. Adenosine A2A receptor and dopamine D3 receptor interactions: evidence of functional A2A/D3 heteromeric complexes. *Mol Pharmacol*. 2005;67(2):400-407. doi:10.1124/mol.104.003376
21) 【4.3-21】Srinivasan M, Flynn R, Price A, et al. Donor B-cell alloantibody deposition and germinal center formation are required for the development of murine chronic GVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood*. 2012;119(6):1570-1580. doi:10.1182/blood-2011-07-364414
22) 【4.3-22】Apostolidis SA, Crispín JC, Tsokos GC. IL-17-producing T cells in lupus nephritis. *Lupus*. 2011;20(2):120-124. doi:10.1177/0961203310389100
23) 【4.3-23】Alunno A, Bartoloni E, Bistoni O, et al. Balance between regulatory T and Th17 cells in systemic lupus erythematosus: the old and the new. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:823085. doi:10.1155/2012/823085
24) 【4.3-24】Pernis AB. Th17 cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *J Intern Med*. 2009;265(6):644-652. doi:10.1111/j.1365-2796.2009.02099.x
25) 【4.3-25】Lawrence J, Nho R. The Role of the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3):778. doi:10.3390/ijms19030778
26) 【4.3-26】Kim D, Park G, Huuhtanen J, et al. Somatic mTOR mutation in clonally expanded T lymphocytes associated with chronic graft versus host disease. *Nat Commun*. 2020;11(1):2246. doi:10.1038/s41467-020-16115-w
27) 【4.3-27】Jang SW, Hwang SS, Kim HS, et al. Casein kinase 2 is a critical determinant of the balance of Th17 and Treg cell differentiation. *Exp Mol Med*. 2017;49(9):e375. doi:10.1038/emm.2017.132
28) 【4.3-28】Balamurugan K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *Int J Cancer*. 2016;138(5):1058-1066. doi:10.1002/ijc.29519

目次

2.6.3 薬理試験概要表 2
2.6.3.1 薬理試験一覧表 2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 4
2.6.3.3 副次的薬理試験 7
2.6.3.4 安全性薬理試験 8
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 10

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

Test Article: Belumosudil

Type of Study	Targets, Effects or Organ Systems Evaluated	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics	ベルモスジルの in vitro ROCK 酵素阻害活性評価	in vitro	NA	Kadmon	KD025-NCP-2	4.2.1.1-01
	ベルモスジル代謝物の ROCK2 に対する阻害活性評価	in vitro	NA	Kadmon	KD025-NCP-2	4.2.1.1-01
	ベルモスジルの Th17 細胞におけるサイトカイン産生抑制作用	in vitro	NA	Kadmon	Zanin-Zhorov 2014	4.2.1.1-02
	Th17 細胞活性化に必要な転写因子に対するベルモスジルの発現抑制作用	in vitro	NA	Kadmon	Zanin-Zhorov 2014	4.2.1.1-02
	ベルモスジルの Treg 細胞活性化に必要な転写因子に対する発現亢進作用及び Treg 細胞に対する分化亢進並びに機能増強作用	in vitro	NA	Kadmon	Zanin-Zhorov 2014	4.2.1.1-02
	Tfh 細胞に対するベルモスジルの分化抑制作用	in vitro	NA	Kadmon	Weiss 2016	4.2.1.1-03
	ヒト肺線維芽細胞に対するベルモスジルのコラーゲン産生抑制作用	in vitro	NA	Kadmon	KD025-NCP-3	4.2.1.1-04
	ヒト肺線維芽細胞におけるベルモスジルの結合組織成長因子の発現抑制作用	in vitro	NA	Kadmon	KD025-NCP-3	4.2.1.1-04
	ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける肺機能改善作用	Mouse/ B10.BR	Intraperitoneal	[redacted]	KD025-NCP-cGVHD-1	4.2.1.1-05
	ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける用量依存的な肺機能改善作用	Mouse/ B10.BR	Intraperitoneal	[redacted]	KD025-NCP-cGVHD-2 Flynn 2016	4.2.1.1-06 4.2.1.1-07
	ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける肺のコラーゲン及び抗体沈着の抑制作用	Mouse/ B10.BR	Intraperitoneal	[redacted]	KD025-NCP-cGVHD-2 Flynn 2016	4.2.1.1-06 4.2.1.1-07
	マウス cGVHD モデルにおけるベルモスジルの胚中心反応の抑制作用及び Tfh 細胞に対する分化抑制作用	Mouse/ B10.BR	Intraperitoneal	[redacted]	KD025-NCP-cGVHD-2 Flynn 2016	4.2.1.1-06 4.2.1.1-07
	マウス強皮症様 cGVHD モデルにおけるベルモスジルの皮膚症状改善作用	Mouse/BALB/c	Intraperitoneal	[redacted]	KD025-NCP-cGVHD-2 Flynn 2016	4.2.1.1-06 4.2.1.1-07
	ブレオマイシン誘発マウス肺線維症モデルにおけるベルモスジルの抗線維化作用	Mouse/ C57BL/6	Oral	[redacted]	KDM-01	4.2.1.1-08
	マウス全身性エリテマトーデス（SLE）モデルにおけるベルモスジルの SLE 症状改善作用	Mouse/ MRL/MpJ-*Fas*^{lpr}/J	Oral	[redacted]	Weiss 2016 20131203-1	4.2.1.1-03 4.2.1.1-09
	マウス全身性エリテマトーデス（SLE）モデルにおけるベルモスジルの T 細胞免疫応答の調整作用	Mouse/ MRL/MpJ-*Fas*^{lpr}/J	Oral	[redacted]	Weiss 2016 20131203-1	4.2.1.1-03 4.2.1.1-09
	マウスコラーゲン誘導関節炎（CIA）モデルにおけるベルモスジルの T 細胞免疫応答の調整作用及び CIA 症状改善作用	Mouse/ DBA/1J	Intraperitoneal	[redacted]	Zanin-Zhorov 2014 KD025-NCP-CIA-1	4.2.1.1-02 4.2.1.1-10

NA= not applicable.

Type of Study	Targets, Effects or Organ Systems Evaluated	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Secondary Pharmacodynamics	ベルモスジルの各種キナーゼ、細胞表面上の受容体及びイオンチャネルに対する作用	in vitro	NA	Kadmon	KD025-NCP-2, [redacted]-0007414-1237849	4.2.1.1-01 4.2.1.2-01
	ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いたベルモスジルの細胞毒性評価	in vitro	NA	[redacted]	ADME-KAD-200402	4.2.1.2-02
	ヒト及びマウス線維芽細胞におけるベルモスジルの mTOR シグナル伝達抑制作用	in vitro	NA	Kadmon	KD025-NCP-3	4.2.1.1-04
	ヒト結合組織線維肉腫細胞におけるベルモスジルの mTOR シグナル伝達を調節する S6K 及び AMPK に対する作用	in vitro	NA	Kadmon	KD025-NCP-2	4.2.1.1-01
	ヒト結合組織線維肉腫細胞におけるベルモスジルの HIF-1α 発現抑制作用	in vitro	NA	Kadmon	KD025-NCP-2	4.2.1.1-01
Safety Pharmacology [a]	Central Nervous System	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted]	[redacted]-602031	4.2.1.3-01
	hERG Potassium Ion Channel	in vitro	NA	[redacted]	090109.TVM	4.2.1.3-02
	Cardiovascular System	Dog/ Beagle	Oral	[redacted]	[redacted]-602029	4.2.1.3-03
	Respiratory System	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted]	[redacted]-602030	4.2.1.3-04
	Respiratory System	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted]	8289751	4.2.1.3-05
Pharmacodynamic Drug Interactions	No studies conducted					

NA= not applicable. [redacted], [redacted].

a. All safety pharmacology studies were conducted under GLP compliance.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Test Article: Belumosudil

Type of study	Test System /Species/ Strain	Doses (mg/kg)	Method of Administration	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location in CTD
ベルモスジルの in vitro ROCK 酵素阻害活性評価	in vitro	ベルモスジル: 0～10 μmol/L	NA	NA	ベルモスジルの ROCK1 に対する IC_{50} 値は 3 μmol/L 以上を示し、ROCK2 に対する IC_{50} 値は 0.081 μmol/L であった。また、ROCK2 に対して、ATP 競合的阻害作用を示すことが認められた。	No	KD025-NCP-2 (pg. 2-7)	4.2.1.1-01
ベルモスジル代謝物の ROCK2 に対する阻害活性評価	in vitro	ベルモスジル: 0～10 μmol/L	NA	NA	ベルモスジル、M1 及び M2 の Ki 値は、それぞれ 40、55 及び 338 nmol/L となり、ROCK2 に対するベルモスジル及び M1 の阻害活性は高く、M2 の阻害活性は低かった。	No	KD025-NCP-2 (pg. 2-7)	4.2.1.1-01
ベルモスジルの Th17 細胞におけるサイトカイン産生抑制作用	in vitro	ベルモスジル: 0～10 μmol/L	NA	NA	ベルモスジルは Th17 細胞が産生する炎症性サイトカイン IL-21 及び IL-17 産生を有意に抑制した。	No	Zanin-Zhorov 2014	4.2.1.1-02
Th17 細胞活性化に必要な転写因子に対するベルモスジルの発現抑制作用	in vitro	ベルモスジル: 0～10 μmol/L	NA	NA	ベルモスジル（2.5, 5, 10 μmol/L）は濃度依存的に Th17 細胞特異的転写因子 IRF4、RORγ の発現及びリン酸化 STAT3 量を減少させ、Th17 細胞の活性化を抑制した。	No	Zanin-Zhorov 2014	4.2.1.1-02
ベルモスジルの Treg 細胞活性化に必要な転写因子に対する発現亢進作用及び Treg 細胞に対する分化亢進並びに機能増強作用	in vitro	ベルモスジル: 0～10 μmol/L	NA	NA	ベルモスジルは濃度依存的に Treg 細胞の活性化に必要な転写因子 Foxp3 量及びリン酸化 STAT5 量を増大させ、Treg 細胞分化を亢進すると同時に Treg 細胞の免疫抑制機能を増強した。	No	Zanin-Zhorov 2014	4.2.1.1-02
Tfh 細胞に対するベルモスジルの分化抑制作用	in vitro	ベルモスジル: 0～10 μmol/L	NA	NA	ベルモスジル（2.5, 5, 10 μmol/L）は自己抗体産生に関与する Tfh 細胞分化を抑制した。	No	Weiss 2016	4.2.1.1-03

NA= not applicable.

Type of study	Test System/ Species/ Strain	Doses (mg/kg)	Method of Administration	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location in CTD
ヒト肺線維芽細胞に対するベルモスジルのコラーゲン産生抑制作用	in vitro	ベルモスジル: 0～10 μmol/L	NA	NA	ベルモスジル（1.1, 3.3, 10 μmol/L）は組織線維化に関与する線維性細胞外基質の主要構成成分である I 型コラーゲン α1 鎖（Col1α1）の mRNA 発現を濃度依存的に阻害した。また、ベルモスジル（1.0, 3.0, 9.0 μmol/L）は Col1α1 の前駆体であるプロコラーゲン 1α の分泌を濃度依存的に阻害し、その効果は抗線維化薬ニンテダニブ及びピルフェニドンよりも強力であった。	No	KD025-NCP-3 (pg. 2-3)	4.2.1.1-04
ヒト肺線維芽細胞におけるベルモスジルの結合組織成長因子の発現抑制作用	in vitro	ベルモスジル: 0～9.0 μmol/L	NA	NA	ベルモスジル（1.0, 3.0, 9.0 μmol/L）は組織線維化シグナル伝達経路を活性化させる結合組織成長因子（CTGF）の mRNA 発現を濃度依存的に阻害した。その阻害作用は抗線維化薬ピルフェニドンよりも強力であった	No	KD025-NCP-3 (pg. 2-3)	4.2.1.1-04
ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける肺機能改善作用	Mouse/ B10.BR	0, 100	Intraperitoneal (QD) x 28 days	8/group	細気管支閉塞を伴うマウス cGVHD モデルにおいて、ベルモスジル（100 mg/kg/日, i.p.）は肺機能（容量、抵抗性、弾性及びコンプライアンス）を有意に改善した。	No	KD025-NCP-cGVHD-1 (pg. 2-6)	4.2.1.1-05
ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける用量依存的な肺機能改善作用	Mouse/ B10.BR	0, 30, 100, 150	Intraperitoneal (QD) x 28 days	8/group	細気管支閉塞を伴うマウス cGVHD モデルにおいて、ベルモスジル（30、100, 150 mg/kg/日, i.p.）は肺機能（抵抗性、弾性及びコンプライアンス）を用量依存的に有意に改善した。	No	KD025-NCP-cGVHD-2 (pg. 2-7) Flynn 2016	4.2.1.1-06 4.2.1.1-07
ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける肺のコラーゲン及び抗体沈着の抑制作用	Mouse/ B10.BR	0, 150	Intraperitoneal (QD) x 28 days	8/group	細気管支閉塞を伴うマウス cGVHD モデルの肺組織において、ベルモスジル（150 mg/kg/日, i.p.）は細気管支及び血管周辺のコラーゲン沈着及び抗体沈着を有意に抑制した。	No	KD025-NCP-cGVHD-2 (pg. 2-7) Flynn 2016	4.2.1.1-06 4.2.1.1-07
マウス cGVHD モデルにおけるベルモスジルの胚中心反応の抑制作用及び Tfh 細胞に対する分化抑制作用	Mouse/ B10.BR	0, 150	Intraperitoneal (QD) x 28 days	8/group	マウス cGVHD モデルの脾臓組織において、ベルモスジル（150 mg/kg/日, i.p.）は自己抗体産生に関与する胚中心反応及び Tfh 細胞分化を有意に抑制した。	No	KD025-NCP-cGVHD-2 (pg. 2-7) Flynn 2016	4.2.1.1-06 4.2.1.1-07
マウス強皮症様 cGVHD モデルにおけるベルモスジルの皮膚症状改善作用	Mouse/ BALB/c	0, 150	Intraperitoneal (QD) x 28 days	8/group	マウス強皮症様 cGVHD モデルにおいて、ベルモスジル（150 mg/kg/日, i.p.）は皮膚 GVHD スコアおよび皮膚病理スコアを有意に改善した。	No	KD025-NCP-cGVHD-2 (pg. 2-7) Flynn 2016	4.2.1.1-06 4.2.1.1-07
ブレオマイシン誘発マウス肺線維症モデルにおけるベルモスジルの抗線維化作用	Mouse/ C57BL/6	0, 50, 100, 150	Oral (QD) x 14 days	Male （n=12/group）	マウス肺線維症モデルにおいて、ベルモスジル（100, 150 mg/kg/日, p.o.）は肺線維化率及び肺線維化スコアを減少させた。	No	KDM-01 (pg. 25-41)	4.2.1.1-08

NA= not applicable.

Type of study	Test System/ Species/ Strain	Doses (mg/kg)	Method of Administration	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location in CTD
マウス全身性エリテマトーデス（SLE）モデルにおけるベルモスジルの SLE 症状改善作用	Mouse/ MRL/MpJ-*Fas*^{lpr}/J	0, 100	Oral (QD) x 6 weeks	Female (n=15/group)	マウス SLE モデルにおいて、ベルモスジル（100 mg/kg/日, p.o.）は自己免疫性腎傷害と関連する平均臨床スコア及び腎臓組織スコア、腎機能低下を反映する血中尿素窒素量（BUN）、SLE 病態を反映する抗 dsDNA 抗体濃度を減少させた。	No	Weiss 2016 20131203-1 (pg. 2-23)	4.2.1.1-03 4.2.1.1-09
マウス全身性エリテマトーデス（SLE）モデルにおけるベルモスジルの T 細胞免疫応答の調整作用	Mouse/ MRL/MpJ-*Fas*^{lpr}/J	0, 100	Oral (QD) x 6 weeks	Female (n=15/group)	マウス SLE モデルの脾臓組織において、ベルモスジル（100 mg/kg/日, p.o.）は Tfh 細胞や成熟 B 細胞数を減少させ、自己抗体産生に関わる胚中心反応を有意に抑制した。さらに、Th17 細胞活性化に必要な転写因子リン酸化 STAT3 量及び Tfh 細胞の発生に必要な転写因子 Bcl6 量を減少させ、Treg 活性化に必要なリン酸化 STAT5 量を増加させた。	No	Weiss 2016 20131203-1 (pg. 2-23)	4.2.1.1-03 4.2.1.1-09
マウスコラーゲン誘導関節炎（CIA）モデルにおけるベルモスジルの T 細胞免疫応答の調整作用及び CIA 症状改善作用	Mouse/ DBA/1J	0, 100	Intraperitoneal (QD) x 28 days	Male （n=10/group）	マウス CIA モデルにおいて、ベルモスジル（100, 200 mg/kg/日, i.p.）は指や関節の腫脹、四肢の硬直などの所見に基づいた臨床スコアを減少させた。また、Th17 細胞活性化に必要な転写因子 IRF4、RORγt 及びリン酸化 STAT3 量を減少させ、炎症性サイトカイン IL-17 及び IL-21 産生 CD4 陽性細胞を減少させた。さらに、Treg 活性化に必要なリン酸化 STAT5 量を増加させた。	No	Zanin-Zhorov 2014 KD025-NCP-CIA-1 (pg. 2-7)	4.2.1.1-02 4.2.1.1-10

2.6.3.3 副次的薬理試験

Test Article: Belumosudil

Type of study	Test System/ Species/ Strain	Doses (mg/kg)	Method of Administration	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location in CTD
ベルモスジルの各種キナーゼ、細胞表面上の受容体及びイオンチャネルに対する作用	in vitro	ベルモスジル: 0～10 µmol/L	NA	NA	ベルモスジルは CK2、アデノシン A_{2A} 受容体及びアデノシン A_3 受容体に対し結合親和性を示し、その IC_{50} 値はそれぞれ 0.1、0.66 及び 0.13 µmol/L であった。細胞機能評価の結果、アデノシン A_3 受容体の機能に対する影響は認められなかった（IC_{50} > 10 µmol/L）。アデノシン A_{2A} 受容体に対しては、アンタゴニスト活性を示し、その IC_{50} 値は 0.35 µmol/L（159 ng/mL）であった。	No	KD025-NCP-2 (pg. 8-13), [redacted]-0007414-1237849	4.2.1.1-01 4.2.1.2-01
ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いたベルモスジルの細胞毒性評価	HepG2 cells	ベルモスジル: 0～150 µmol/L	NA	NA	0.009-150 µmol/L の濃度域において、ベルモスジルは HepG2 細胞に対して有意な細胞毒性を生じなかった。	No	ADME-KAD-200402 (pg. 5-9)	4.2.1.2-02
ヒト及びマウス線維芽細胞におけるベルモスジルの mTOR シグナル伝達抑制作用	WI-38 cells, HT-1080 cells, NIH3T3 cells	NA	NA	NA	ベルモスジルは WI-38 ヒト肺線維芽細胞株及び HT-1080 ヒト結合組織線維肉腫細胞株において、線維性コラーゲン産生に関わる mTOR シグナル伝達経路の活性化を阻害した。また、ベルモスジルは NIH3T3 マウス線維芽細胞株の増殖を濃度依存的に抑制し、IC_{50} 値は 1.6 µmol/L であった。	No	KD025-NCP-3 (pg. 3-4)	4.2.1.1-04
ヒト結合組織線維肉腫細胞におけるベルモスジルの mTOR シグナル伝達を調節する S6K 及び AMPK に対する作用	HT-1080 cells	ベルモスジル: 0～10 µmol/L	NA	NA	ベルモスジル（10 µmol/L）は線維性コラーゲン産生に関わる mTOR シグナル伝達の抑制に働く ATP 活性化プロテインキナーゼ（AMPK）の活性化を亢進し、非選択的 ROCK 阻害薬や CK2 阻害薬とは異なる作用機序で mTOR シグナル伝達を抑制した。	No	KD025-NCP-2 (pg. 25-28)	4.2.1.1-01
ヒト結合組織線維肉腫細胞におけるベルモスジルの HIF-1α 発現抑制作用	HT-1080 cells	ベルモスジル: 0～10 µmol/L	NA	NA	ベルモスジル（10 µmol/L）は正常酸素圧及び低酸素圧条件下で誘導される T 細胞免疫応答を調節因子 HIF-1α の発現を抑制した。この作用は非選択的 ROCK 阻害薬ファスジルではみられなかった。	No	KD025-NCP-2 (pg. 29-30)	4.2.1.1-01

NA= not applicable.

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: Belumosudil

Organ Systems Evaluated	Test System/ Species/ Strain	Doses (mg/kg)	Method of Administration	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location in CTD
Central Nervous System	Rat/ Sprague Dawley	0 ,50, 175, 350	Oral, Single	M: 6, F: 6	350 mg/kg: Non-adverse transiently lower motor activity in males and non-adverse transiently lower body temperature in females.	Yes	[redacted]-602031	4.2.1.3-01
Cardiovascular System	HEK293 cells	Belumosudil: 0.3 to 2.5 µmol/L M1: 0.3 to 2.3 µmol/L M2: 3 and 10 µmol/L	NA	NA	Belumosudil and M1 inhibited hERG channel activity in a concentration-dependent manner with estimated IC_{50} of 0.6 and 1.5 µM, respectively. M2 had no inhibitory effect in this assay at concentrations up to 10 µM.	Yes	090109.TVM	4.2.1.3-02
Cardiovascular System	Dog/ Beagle	0, 25, 75, 150	Oral, Single	M: 4, F: 4	150 mg/kg: Non-adverse and low magnitude decrease in systolic BP (up to 15 mmHg), diastolic BP (up to 11 mmHg), and mean arterial pressure (up to 11 mmHg) from 1 to 18 hours postdose.	Yes	[redacted]-602029	4.2.1.3-03
Respiratory System (Initial Study[a])	Rat/ Sprague Dawley	0, 50, 175, 350	Oral, Single	M: 8, F: 8	175 mg/kg: A decrease in absolute minute volume in males (up to 12%) and females (up to 17%) 350 mg/kg: A decrease in minute volume in males (up to 19%) and females (up to 25%). Decreases in respiratory frequency (11%) and tidal volume (11%) in males. TK parameters (C_{max} and AUC_{0-24h}) of belumosudil, M1 and M2 are shown in 【2.6.7.3.A】(C_{max}) and 【2.6.7.3.B】(AUC_{0-24h}), respectively. This study was repeated to evaluate the reproducibility of effects (See 8289751)	Yes	[redacted]-602030	4.2.1.3-04
Respiratory System (Confirmatory Study)	Rat/ Sprague Dawley	0, 50, 175, 350	Oral, Single	M: 8, F: 8	No test article effect on mortality, clinical observations, or any component of respiratory function. TK parameters (C_{max} and AUC_{0-24h}) of belumosudil, M1 and M2 are shown in 【2.6.7.3.A】(C_{max}) and 【2.6.7.3.B】(AUC_{0-24h}), respectively.	Yes	8289751	4.2.1.3-05

M= Male, F= Female, NA= not applicable, BP= Blood pressure.

a. Initial respiratory safety pharmacology study was followed up with a confirmatory study; findings did not repeat in confirmatory study.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし。