タピナロフ

第 2 部 CTD の概要（サマリー）
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.1 緒言

日本たばこ産業株式会社

目次

2.6.1 緒言 3

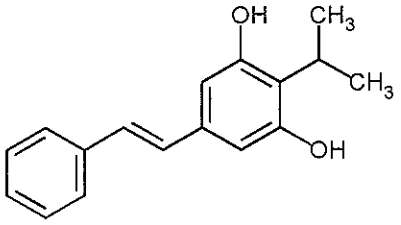
2.6.1 緒言

タピナロフ［JTE-061 又は DMVT-505，旧名：GSK2894512A，GSK2894512，STI-1001 又は WBI-1001，（5-[(1*E*)-2-Phenylethen-1-yl]-2-(propan-2-yl)benzene-1,3-diol）］は天然物であるスチルベノイド誘導体の完全合成品である。タピナロフは細胞質に存在するリガンド依存性転写因子である芳香族炭化水素受容体（AhR）に対するアゴニスト作用を介して治療効果を発揮する非ステロイド性，低分子の AhR 調節薬である。

タピナロフは本邦では日本たばこ産業株式会社及び鳥居薬品株式会社が，尋常性乾癬及びアトピー性皮膚炎（AD）の外用剤として開発中である。なお，海外では Dermavant Sciences, Inc.（Dermavant 社）が 18 歳以上の尋常性乾癬患者に対する外用剤として 2022 年 5 月に米国でタピナロフクリーム 1%の承認を取得し，現在，小児尋常性乾癬及び AD の外用剤としても開発中である。タピナロフクリーム 0.5%又は 1%は，尋常性乾癬及び AD の皮膚病変への局所治療用の白色のクリームである。タピナロフクリームは，非臨床試験では 8%まで，臨床試験では 2%までの濃度が評価されている。

JTE-061 の化学的性質：

化学名：　5-[(1*E*)-2-Phenylethen-1-yl]-2-(propan-2-yl)benzene-1,3-diol
コード名：　JTE-061（開発コード番号），JTP-0189249（化合物番号）
一般的名称：　タピナロフ（英名 Tapinarof）
CAS 番号：　79338-84-4
分子式：　$C_{17}H_{18}O_2$
分子量：　254.32
化学構造式：



タピナロフの原薬及び製剤の薬理作用，薬物動態（PK）及び毒性は，本項に示す試験で詳細に評価している。

効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験に関して，尋常性乾癬及び AD での有効性に関連する Dermavant 社米国申請資料並びに日本たばこ産業株式会社において新たに実施した *in vitro* 及び *in vivo* 試験により，タピナロフの作用機序及び薬理作用を評価した。さらに，安全性薬理試験として，ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネルアッセイ系を用いた *in vitro* 試験，並びに Sprague Dawley（SD）ラット，Dunkin Hartley モルモット及び Göttingen ミニブタへのそれぞれ皮下，経皮及び静脈内投与による *in vivo* 試験を実施した。

一連の *in vitro* 試験，並びに CD-1 マウス，SD ラット，Wistar Han ラット，New Zealand White ウ

サギ及び Göttingen ミニブタを用いた *in vivo* 試験により，タピナロフの PK，吸収，分布，代謝，排泄（ADME）及び薬物相互作用（DDI）を評価した。これらの試験で使用した動物種及び系統には，タピナロフの毒性評価に使用した動物種及び系統が含まれていた。初期の試験では，タピナロフの非標識体又は標識体（[^{14}C]-タピナロフ）を経口，静脈内，皮下又は経皮投与した後の全身曝露量を評価した。その後の試験では，皮下又は経皮投与によってのみ評価を実施した。タピナロフ及び代謝物の全身曝露を最大化するために皮下投与を選択した。経皮投与毒性試験にはタピナロフのクリーム剤を使用し，皮下投与毒性試験及び *in vitro* 毒性試験にはタピナロフの溶液を使用した。PK 及びトキシコキネティクス（TK）解析には，高感度で信頼性が高い生体試料分析法を使用した。生体試料分析法は，ガイダンスに従って，必要に応じてバリデーションを実施した。

タピナロフの分布，代謝及び排泄試験を実施した。ヒト，ミニブタ，ウサギ，ラット及びマウス血漿，並びにヒト及びミニブタ皮膚を用いたタピナロフの *in vitro* 蛋白結合試験と，ラットを用いたタピナロフ皮下投与後の定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）試験を実施した。タピナロフの代謝経路を明らかにするために *in vitro* 代謝試験を実施した。また，タピナロフの代謝物組成分析を経皮投与後のヒト血漿，尿及び皮膚サンプル，皮下投与後のラット及びマウス試料で実施した。マウス及びラットそれぞれ 2 試験でタピナロフを皮下投与して排泄を検討し，別の 1 試験でミニブタに経皮投与して排泄を検討した。*In vitro* 及びミニブタ皮膚で，タピナロフの DDI を評価した。

単回経皮投与毒性試験，並びにマウス及びラットの最長 13 週間，ウサギの最長 28 日間及びミニブタの最長 39 週間の反復経皮投与毒性試験を含む一連の毒性試験において，タピナロフの安全性を評価した。高曝露条件下における毒性を評価する目的で，タピナロフを用いたラットの最長 26 週間の反復皮下投与毒性試験を実施した。皮下投与によるラット及びウサギの胚・胎児発生に関する試験，ラットの受胎能に関する試験，並びにラットの出生前及び出生後の発生に関する試験を実施した。タピナロフのラット皮下投与による幼若動物毒性試験として，用量設定試験，10 週間反復投与試験及びタピナロフが腎臓に及ぼす影響を検討する試験を実施した。タピナロフの変異原性及び染色体異常誘発能を，細菌及びほ乳類培養細胞を用いた *in vitro* 試験並びにげっ歯類を用いた *in vivo* 小核試験で評価した。さらに，タピナロフの経皮投与（処方 F）及び皮下投与後のがん原性を，マウス経皮投与及びラット皮下投与によるがん原性試験で評価した。タピナロフの光毒性，皮膚感作性及び眼刺激性を評価する局所毒性試験を実施した。

タピナロフクリーム 1%の製造販売承認申請の概要を表 1 に示す。非臨床試験パッケージ（薬理，ADME 及び毒性データ）は，尋常性乾癬及び AD の局所治療を適応として申請するタピナロフクリーム 1%の 1 日 1 回，適量を患部に塗布するという用法・用量を支持している。タピナロフは非ステロイド性，低分子の AhR 調節薬であり，既存薬とは異なる特徴的な作用機序を有することが薬理試験により示されている。これまでに実施された非臨床試験及び臨床試験で経皮投与後に認められた曝露量が低かったことから，タピナロフの局所塗布後に CYP が全身性に誘導される可能性は低いことが，ADME データパッケージから示唆される。本製造販売承認申請に含まれる非臨床安全性パッケージは，尋常性乾癬及び AD の局所治療を適応としてタピナロフクリーム 1%の 1 日 1 回塗布の承認を申請することを支持するものである。

表 1　タピナロフクリーム 1%の製造販売承認申請の概要

申請区分	医療用医薬品（1）新有効成分含有医薬品
販売名	ブイタマークリーム 1%
一般名	タピナロフ（英名：Tapinarof）
含量	1 g 中にタピナロフを 10 mg 含有する。
効能・効果	アトピー性皮膚炎 尋常性乾癬
用法・用量	1 日 1 回，適量を患部に塗布する。

タピナロフ

第 2 部 CTD の概要（サマリー）
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.2 薬理試験の概要文

日本たばこ産業株式会社

目次

略号及び用語の定義一覧 4

2.6.2 薬理試験の概要文 6

2.6.2.1 まとめ 6
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 10
2.6.2.2.1 *In Vitro* 作用 10
2.6.2.2.2 *In Vivo* 作用 15
2.6.2.3 副次的薬理試験 27
2.6.2.4 安全性薬理試験 29
2.6.2.4.1 *In Vitro* 安全性薬理試験 32
2.6.2.4.2 *In Vivo* 安全性薬理試験 33
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 35
2.6.2.6 考察及び結論 35
2.6.2.7 図表 37
2.6.2.8 参考文献 38

表目次

表 1 タピナロフの効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験の一覧 7
表 2 マウス IL-23 誘発皮膚炎モデルにおける病理組織学的変化に対するタピナロフの作用 17
表 3 マウス DNFB 誘発皮膚炎モデルにおける病理組織学的変化に対するタピナロフの作用 23
表 4 タピナロフの安全性薬理試験一覧 30
表 5 安全性薬理試験に使用したタピナロフのバッチ番号及び製剤処方 31

図目次

図 1 ヒト末梢血単核細胞における CYP1A1 の mRNA 発現に対するタピナロフの作用 11
図 2 ヒト末梢血単核細胞における IL-17A 産生に対するタピナロフの作用 12
図 3 ヒト末梢血単核細胞における IL-4 産生に対するタピナロフの作用 12
図 4 ヒト末梢血単核細胞における NQO1 の mRNA 発現に対するタピナロフの作用 13
図 5 マウス IL-23 誘発皮膚炎モデルにおける耳介腫脹に対するタピナロフの作用 17
図 6 マウス IL-23 誘発皮膚炎モデルにおける病理組織学的変化に対するタピナロ

フの作用（真皮への炎症細胞浸潤，顕微鏡写真の代表例）.....18
図 7　マウス IL-23 誘発皮膚炎モデルにおける耳介中 CYP1A1 の mRNA 発現に対するタピナロフの作用.....19
図 8　マウス IL-23 誘発皮膚炎モデルにおける耳介中 NQO1 の mRNA 発現に対するタピナロフの作用.....19
図 9　マウス IL-23 誘発皮膚炎モデルにおける耳介中 IL-17A 量に対するタピナロフの作用.....20
図 10　マウス DNFB 誘発皮膚炎モデルにおける耳介腫脹に対するタピナロフの作用.....23
図 11　マウス DNFB 誘発皮膚炎モデルにおける病理組織学的変化に対するタピナロフの作用（真皮への炎症細胞浸潤，顕微鏡写真の代表例）.....24
図 12　マウス DNFB 誘発皮膚炎モデルにおける耳介中 CYP1A1 の mRNA 発現に対するタピナロフの作用.....25
図 13　マウス DNFB 誘発皮膚炎モデルにおける耳介中 NQO1 の mRNA 発現に対するタピナロフの作用.....25
図 14　マウス DNFB 誘発皮膚炎モデルにおける耳介中 IL-4 量に対するタピナロフの作用.....26
図 15　マウス DNFB 誘発皮膚炎モデルにおける経皮水分蒸散量に対するタピナロフの作用.....26

略号及び用語の定義一覧

略号及び用語	定義
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride，2,2'-アゾビス（2-アミジノプロパン）二塩酸塩
AD	Atopic dermatitis，アトピー性皮膚炎
AhR	Aryl hydrocarbon receptor，芳香族炭化水素受容体
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator，芳香族炭化水素受容体核内輸送体
bHLH-PAS	basic helix loop helix-per-arnt-sim
CB	Cannabinoid receptor，カンナビノイド受容体
C_{max}	Maximum observed plasma concentration，最高血漿中濃度
CYP	Cytochrome P450，チトクローム P450
DEX	Dexamethasone，デキサメダゾン
DMSO	Dimethyl sulfoxide，ジメチルスルホキシド
DNFB	2,4-dinitrofluorobenzene，2,4-ジニトロフルオロベンゼン
EC; EC_{50}	Excitatory concentration; concentration causing half-maximal effect determined in vitro，興奮性濃度；in vitro 試験で最大の活性化作用又は最大作用の 50%を示す濃度
FICZ	6-formylindolo(3,2-b)carbazole，6-ホルミルインドロ（3,2-b）カルバゾール
FLG	Filaggrin，フィラグリン
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
HaCaT	Immortalized human keratinocytes cell line，ヒト不死化角化細胞株
HEK293 細胞	Human embryonic kidney cells 293，ヒト胎児腎細胞 293
hERG	Human ether-à-go-go related gene，ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HO-1, HMOX1	Heme oxygenase 1，ヘムオキシゲナーゼ-1
HRNR	Hornerin，ホルネリン
Hsp90	Heat shock protein 90，90kDa 熱ショック蛋白質
5HT	5-hydroxy tryptamine，セロトニン
IC_{50}（IC_{25}，IC_{75}）	Half-maximal (50%) inhibitory concentration（25% or 75% inhibitory concentration），50%阻害濃度（25%，75%阻害濃度）
I_{Kr}	Rapidly activating component of delayed rectifier potassium current，急速（即時）活性型遅延整流カリウム電流
IL	Interleukin，インターロイキン
IMQ	Imiquimod，イミキモド
INV	Involucrin，インボルクリン
LT	Leukotriene，ロイコトリエン
MAO-B	Monoamine oxidase B，モノアミンオキシダーゼ B
mRNA	Messenger ribonucleic acid，メッセンジャー（伝令）リボ核酸
NET	Norepinephrine transporter，ノルエピネフリントランスポーター
NHBE	Normal Human Bronchial Epithelial，正常ヒト気管支上皮
NK1	Neurokinin 1，ニューロキニン 1

略号及び用語	定義
NQO1	NAD(P)H:quinone dehydrogenase 1，NAD(P)H デヒドロゲナーゼ（キノン）1
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OATP1B1	Organic anion transporting polypeptide 1B1，有機アニオン輸送ポリペプチド 1B1
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell，末梢血単核細胞
PDE	Phosphodiesterase，ホスホジエステラーゼ
PHA	Phytohemagglutinin，フィトヘマグルチニン
PMA	Phorbol myristate acetate，ホルボールミリステート酢酸塩
pXC_{50}，pEC_{50}，pIC_{50}	pXC_{50} is the negative logarithm of the concentration for which half maximal effect is achieved and XC can refer to either activator (EC) or inhibitor (IC) properties of the compound，pXC50 は 50%効果濃度の負の対数で，XC は刺激（EC）又は阻害（IC）作用を示す
PXR	Pregnane X receptor，プレグナン X 受容体
QTc	Corrected QT interval，補正 QT 間隔
RHE	Reconstructed human epidermis，再構築ヒト表皮
ROS	Reactive oxygen species，活性酸素種
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction，逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
SD	Sprague Dawley
siRNA	Small interfering RNA，短鎖干渉 RNA
STK24	Serine/threonine-protein kinase 24，セリン－スレオニン蛋白質キナーゼ 24
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin，2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシン
TEWL	Transepidermal water loss，経皮水分蒸散量
Th	T helper，ヘルパーT

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

尋常性乾癬の病態形成には，T 細胞から産生されるインターロイキン（IL）-17A や 17 型ヘルパーT（Th17）細胞の活性化・維持に関わる IL-23 が重要な役割を担っており，これらサイトカインを標的とした生物学的製剤が既に上市されている[1]。T 細胞から産生されるサイトカインは表皮細胞を活性化し，その結果，表皮細胞の角化亢進，炎症性細胞の浸潤などを伴った病変を形成すると考えられている[2]。

アトピー性皮膚炎（AD）の病態形成には，免疫学的異常と皮膚バリア機能異常が関与することが知られている[3]。免疫学的異常については，T 細胞が AD の炎症において中心的な役割を果たしており，AD の病変部位には IL-4 や IL-13 を産生する 2 型ヘルパーT（Th2）細胞が多く存在している。IL-4 や IL-13 を標的とした生物学的製剤は AD において著効を示し，これらサイトカインの病態への関与が明らかとなっている[4, 5]。一方，皮膚バリア機能異常については，角質層の異常に起因する皮膚の乾燥が認められ，角質層の形成において特に重要な役割を担うフィラグリン（FLG）は，その機能喪失と皮膚バリア機能異常との関連性が示されている[6]。

タピナロフは非ステロイド性，低分子の芳香族炭化水素受容体（AhR）調節薬である。タピナロフはリガンド依存的な転写因子である AhR の活性化を介して，炎症性サイトカインの発現を低下させる。また，タピナロフは Nuclear factor erythroid 2-related factor 2（Nrf2）経路を活性化させ，抗酸化分子の遺伝子発現を誘導する[7, 8]。さらに，皮膚バリア機能に関連する蛋白質の発現を調節する[7, 8]。タピナロフは既存の抗炎症作用を主作用とする薬剤とは異なり，抗炎症作用，抗酸化作用及び皮膚バリア機能改善作用を有することから，尋常性乾癬及び AD の新たな治療選択肢になると考えられる。

効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験に関しては，尋常性乾癬及び AD での有効性に関連する Dermavant 社米国申請資料（参考資料）並びに日本たばこ産業株式会社において新たに実施した *in vitro* 及び *in vivo* 試験（評価資料）により，タピナロフの作用機序及び薬理作用を評価した。さらに，安全性薬理試験として，ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネルアッセイ系を用いた *in vitro* 試験，並びに Sprague Dawley（SD）ラット，Dunkin Hartley モルモット及び Göttingen ミニブタへのそれぞれ皮下，経皮及び静脈内投与による *in vivo* 試験を実施した。一部の試験［*in vitro* hERG 試験（報告書番号 20[redacted]N163780）及びモルモット心血管系試験］を除き，安全性薬理試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施した。

タピナロフの効力を裏付ける試験，副次的薬理試験及び安全性薬理試験の要約を，以降の項に示す。実施した試験一覧を GLP 適合性とともに，表 1 及び表 4 に示す。安全性薬理試験に使用したタピナロフのバッチの一覧表を，製剤処方の情報とともに，表 5 に示す。

表 1　タピナロフの効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験の一覧

試験の種類	投与方法	実施施設	報告書番号/ CTD 番号	区分
効力を裏付ける試験				
***In Vitro* 試験**				
AhR に対する作用				
BioMAP 表現型アッセイシステムを用いたプロファイル解析	*In vitro*	[redacted]	20[redacted]N177130/ CTD4.2.1.1-1	参考
AhR に対する結合作用	*In vitro*	[redacted]	20[redacted]N258742/ CTD4.2.1.1-2	参考
ヒト末梢血単核細胞における AhR 活性化に対する作用	*In vitro*	JT	JTE061-PH-001/ CTD4.2.1.1-3	評価
サイトカイン産生に対する作用				
ヒト末梢血単核細胞におけるサイトカイン産生に対する作用	*In vitro*	JT	JTE061-PH-002/ CTD4.2.1.1-4	評価
ヒト皮膚におけるサイトカインの遺伝子発現に対する作用	*In vitro*	STFL	20[redacted]N233731_01/ CTD4.2.1.1-5	参考
抗酸化作用				
ヒト末梢血単核細胞における抗酸化分子の遺伝子発現に対する作用	*In vitro*	JT	JTE061-PH-001/ CTD4.2.1.1-3	評価
ヒト表皮角化細胞における抗酸化関連遺伝子の発現に対する作用	*In vitro*	GSK	20[redacted]N229880_01/ CTD4.2.1.1-6	参考
ヒト気管支上皮細胞を用いた抗酸化遺伝子発現における Nrf2 及び AhR の寄与（メカニズム解析）	*In vitro*	GSK	20[redacted]N231554_01/ CTD4.2.1.1-7	参考
皮膚バリア遺伝子の発現に対する作用				
初代ヒト角化細胞及び再構築ヒト表皮モデルにおける皮膚バリア関連遺伝子の発現に対する作用	*In vitro*	GSK	20[redacted]N330920/ CTD4.2.1.1-8	参考
***In Vivo* 試験**				
皮膚炎に対する作用				
マウス IL-23 誘発皮膚炎に対する作用（尋常性乾癬）	Dermal	JT	JTE061-PH-004/ CTD4.2.1.1-9	評価
マウス IMQ 誘発皮膚炎に対する作用（尋常性乾癬）	Dermal	GSK	20[redacted]N230720_01/ CTD4.2.1.1-10	参考
マウス IMQ 誘発皮膚炎に対する作用（尋常性乾癬，AhR 欠損マウスを用いたメカニズム解析）	Dermal	GSK	20[redacted]N297549/ CTD4.2.1.1-11	参考
マウス DNFB 誘発皮膚炎に対する作用（AD）	Dermal	JT	JTE061-PH-003/ CTD4.2.1.1-12	評価

試験の種類	投与方法	実施施設	報告書番号/ CTD 番号	区分
副次的薬理試験				
スクリーニング及び化合物プロファイリング（SCP）パネルアッセイ	*In vitro*	GSK	20[redacted]N176987/ CTD4.2.1.2-1	参考
Enhanced X-screen profiling（eXP）パネル試験	*In vitro*	GSK	20[redacted]N176990/ CTD4.2.1.2-2	参考
選択した標的及びパネル	*In vitro*	GSK	20[redacted]N177110/ CTD4.2.1.2-3	参考
選択した標的及びパネル	*In vitro*	GSK	20[redacted]N233675_01/ CTD4.2.1.2-4	参考
細胞生存率	*In vitro*	JT	JTE061-PH-002/ CTD4.2.1.1-4	評価
		WEL	20[redacted]N163776/ CTD4.2.1.2-5	参考
		GSK	20[redacted]N175756/ CTD4.2.1.2-6	参考
		GSK	20[redacted]N230011_01/ CTD4.2.1.2-7	参考
		STFL	20[redacted]N230308_01/ CTD4.2.1.2-8	参考

CYP＝チトクローム P450；DNFB＝2,4-ジニトロフルオロベンゼン；IMQ＝イミキモド

実施施設：GSK = GlaxoSmithKline；JT = Japan Tobacco Inc.；[redacted] = [redacted]；STFL = Stiefel；WEL = Welichem Biotech, Inc.

各種標的プロファイリングの成績や BioMAP 表現型アッセイから得られた生物学的応答プロファイルの結果より，タピナロフの標的分子は AhR である可能性が考えられた。AhR に対する結合試験では，タピナロフの AhR への直接結合が認められた。AhR の活性化の指標としてチトクローム P450（CYP）1A1 の遺伝子発現を評価した結果，タピナロフはヒト末梢血単核細胞（PBMC）及びヒト表皮角化細胞において，CYP1A1 の遺伝子発現を誘導した。以上の結果から，タピナロフの標的分子が AhR であり，タピナロフが AhR 経路を活性化することが確認された。

尋常性乾癬及び AD の病態形成にはサイトカインが中心的な役割を果たしており，尋常性乾癬では Th17 サイトカイン，AD では Th2 サイトカインが病態に深く関わっている[9, 10]。タピナロフは T 細胞刺激剤［phytohemagglutinin（PHA）及び phorbol myristate acetate（PMA）］によるヒト PBMC からの IL-17A（Th17 サイトカイン）及び IL-4（Th2 サイトカイン）産生を抑制した。またヒト皮膚を用いた試験において，タピナロフは Th17 細胞誘導刺激下において IL-17A の発現を抑制した。皮膚の炎症下では，活性酸素が増加し，慢性炎症性皮膚疾患における細胞及び組織障害の一因となっている[11, 12]。タピナロフはヒト PBMC 及びヒト表皮角化細胞において抗酸化分子の遺伝子発現を誘導し，抗炎症作用に寄与していることが示唆された。AD においては免疫学的異常に加え，皮膚バリア機能異常が存在する[3]。タピナロフはヒト表皮角化細胞において，皮膚バリア機能関連分子［インボルクリン（INV），ホルネリン（HRNR），FLG］の遺伝子発現を誘導し，AD での皮膚バリア機能を改善する可能性が示された。

尋常性乾癬に対する有効性について，マウス IL-23 誘発皮膚炎モデル及びマウスイミキモド（IMQ）誘発皮膚炎モデルを用いて評価した。マウス IL-23 誘発皮膚炎モデルを用いた評価では，タピナロフは耳介腫脹及び病理組織学的変化を 0.01%以上の用量で抑制し，皮膚炎に対する有効

性を示した。耳介ではIL-17A量の減少や抗酸化分子の遺伝子発現誘導も認められた。マウスIMQ誘発皮膚炎モデルを用いた検討では，表皮の肥厚，皮膚症状及びIL-17Aを含む各種Th17関連サイトカインの発現がタピナロフによって抑制された。さらに，これらの作用はAhR欠損により消失したことから，タピナロフによる皮膚炎抑制作用はAhRを介していることが示唆された。

ADに対する有効性について，マウス2,4-ジニトロフルオロベンゼン（DNFB）誘発皮膚炎モデルを用いて評価した。タピナロフは耳介腫脹及び病理組織学的変化を0.01%以上の用量で抑制し，皮膚炎に対する有効性を示した。耳介ではIL-4量の減少や抗酸化分子の遺伝子発現誘導も認められ，タピナロフによる抗炎症作用が確認された。さらに皮膚バリア機能に対する作用として経皮水分蒸散量（TEWL）の増加がタピナロフにより抑制された。

タピナロフは副次的薬理スクリーニングの結果から，ほとんどの標的分子に対して作用を示さなかったか，弱い作用しか示さなかった。AhRの他にタピナロフが作用（50%作用濃度が1 μmol/L以下）を示した標的分子は，Nrf2，カンナビノイド受容体（CB）2，モノアミンオキシダーゼB（MAO-B），CYP2C9，CYP2D6及びCYP1A2であった。Nrf2及びCB2に対しては活性化，MAO-B，CYP2C9，CYP2D6及びCYP1A2に対しては阻害活性を示した。細胞の生存に対する影響については，複数の細胞種において3 μmol/L若しくは10 μmol/Lのタピナロフによって，生細胞数の減少が認められた。

安全性薬理試験でタピナロフは濃度依存的にhERGチャネルテール電流を阻害することが示された。50%阻害濃度（IC_{50}）1.02 μg/mLは，臨床での最高血漿中濃度（C_{max}：2.44 ng/mL，DMVT-505-2104試験）における血漿中非結合型タピナロフ濃度（0.017 ng/mL，*in vitro* ヒト血漿蛋白結合率の99.3%を基に算出）の60,000倍であった。心血管系の所見として，テレメーターを装着したモルモットに最大6%のタピナロフを経皮投与したとき，特記すべき影響は認められなかった。また，テレメーターを装着したミニブタにタピナロフを静脈内投与したとき，1 mg/kg以上の用量で平均動脈圧の低下，3 mg/kg以上の用量でPR間隔の短縮が認められたが，いずれも可逆的な変化であった。10 mg/kgまでの静脈内投与は心拍数，脈圧，QA間隔及びPR間隔以外の心電図パラメータに対して影響を及ぼさず，心電図波形の異常又は不整脈の所見も認められなかった。さらに，ミニブタの28日間，13週間及び9ヵ月間経皮投与毒性試験においてもQT間隔の延長は認められなかった。以上のことから，タピナロフが補正QT間隔（QTc）の延長及び多形性心室頻拍（Torsades de Pointes）を誘発する可能性は低いと考えられた。

ラットに10 mg/kgまでのタピナロフを単回皮下投与したとき，中枢神経系及び呼吸系に及ぼす重大な影響は認められなかった。神経学的所見（Irwinの変法）としては，10 mg/kgで筋緊張の低下及び異常行動（左斜頸：1例）が認められたにすぎず，関連した神経学的所見も伴わなかったため，生理学的意義は低いと考えられた。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In Vitro* 作用

2.6.2.2.1.1 AhR に対する作用

(1) BioMAP 表現型アッセイシステムを用いたプロファイル解析 [報告書番号 20[redacted]N177130]

(参考資料：CTD4.2.1.1-1)

BioMAP 表現型アッセイシステム（BioMAP）にてタピナロフのプロファイルを解析した。BioMAP は，薬理活性物質の生理学的情報収集を目的としたヒト初代培養細胞ベースの疾患モデルを含んでいる。本試験で用いた BioMAP は，ヒト細胞（血管内皮細胞，末梢血単核細胞，B 細胞，上皮細胞，T 細胞，マクロファージ，線維芽細胞，角化細胞及び平滑筋細胞）を疾患特異的シグナル経路活性化物質で刺激し，様々な病態を模倣した 12 種類の試験系から成る。

検討したバイオマーカーのうち，炎症，免疫機能，組織リモデリング及び抗増殖活性に関与する 25 種類以上のバイオマーカーに対し，タピナロフは 1 評価濃度又は複数の評価濃度において調節作用を示した。

また，用いた対照化合物のうち，6-formylindolo(3,2-b) carbazole（FICZ）がタピナロフと類似したプロファイルを示した。FICZ は AhR の生理的リガンドと考えられており，タピナロフの標的分子は AhR であると推定された。

さらに，タピナロフのプロファイルをベンチマーク化合物（既存の尋常性乾癬，AD 治療薬等）と比較した。タピナロフは，既存の抗炎症薬（デキサメタゾン，クロベタゾールプロピオン酸エステル，フルチカゾンプロピオン酸エステル，カルシトリオール，タクロリムスなど）とは異なる作用機序を有することが示唆された。

(2) AhR に対する結合作用 [報告書番号 20[redacted]N258742]

(参考資料：CTD4.2.1.1-2)

ヒト及びマウス AhR に対するタピナロフの結合作用を検討した。

蛍光シグナルの変化を指標とした結合評価系により，タピナロフはヒト及びマウス AhR-AhR 核内輸送体（AhR-ARNT）ヘテロ二量体に直接結合することが示された。AhR は bHLH-PAS（basic helix loop helix-per-arnt-sim）ファミリーに属するタンパク質である。AhR 以外の bHLH-PAS ファミリーと ARNT の二量体に対して，タピナロフは AhR-ARNT と同等の結合を示さなかったことから，タピナロフの結合部位は AhR 側であると考えられた。また，競合試験を実施したところ，AhR のリガンドとして知られている 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin（TCDD）は，AhR-ARNT ヘテロ二量体へのタピナロフの結合に対して強い競合活性を示さず，タピナロフは AhR-ARNT ヘテロ二量体上の TCDD 結合部位とは異なる部位又はポケットに結合することが示唆された。さらに，タピナロフがマウス及びヒト AhR に結合することが表面プラズモン共鳴法による速度論的試験によっても確認された。

以上の結果より，タピナロフは AhR に直接結合することが示唆された。

(3) ヒト末梢血単核細胞における AhR 活性化に対する作用［報告書番号 JTE061-PH-001／試験番号 [redacted]B061HP01］

（評価資料：CTD4.2.1.1-3）

ヒト PBMC を用いて，AhR の活性化に対するタピナロフの作用を CYP1A1 の mRNA 発現量を指標に評価した。

ヒト PBMC を T 細胞刺激剤（Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28）で 48 時間刺激後，タピナロフを添加した（0.01，0.1 及び 1 μmol/L）。タピナロフ添加 24 時間後に細胞を回収し，CYP1A1 の mRNA 発現量を定量的なリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法により測定した。

タピナロフは有意に CYP1A1 の mRNA 発現量を増加させ（図 1），タピナロフによる AhR 活性化作用が示された。

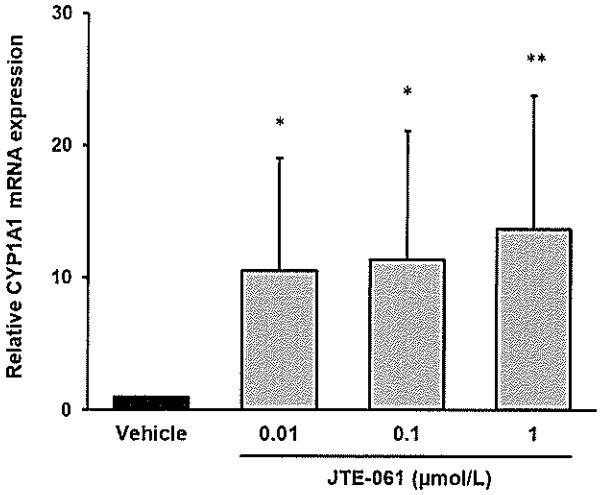


図 1　ヒト末梢血単核細胞における CYP1A1 の mRNA 発現に対するタピナロフの作用

平均値と正の標準偏差（n = 4）
*, $p < 0.025$; **, $p < 0.005$ vs. Vehicle (Shirley-Williams test)
JTE-061: タピナロフ

2.6.2.2.1.2 サイトカイン産生に対する作用

(1) ヒト末梢血単核細胞におけるサイトカイン産生に対する作用［報告書番号 JTE061-PH-002／試験番号 [redacted]B061HP02］

（評価資料：CTD4.2.1.1-4）

尋常性乾癬及び AD の病態形成には Th17 サイトカイン及び Th2 サイトカインが中心的な役割を果たしている[9, 10]。ヒト PBMC における Th17 サイトカイン（IL-17A）及び Th2 サイトカイン（IL-4）産生に対するタピナロフの作用を評価した。

タピナロフ存在下で，ヒト PBMC を T 細胞刺激剤（PHA 及び PMA）で刺激し，約 48 時間後の培養上清について IL-17A 及び IL-4 濃度を測定した。

タピナロフは，IL-17A（図 2）及びIL-4 濃度（図 3）を濃度依存的に低下させた。同培養条件において，タピナロフは 10 μmol/L で生細胞数を 50%以下に減少させた。

以上の結果より，タピナロフは，PHA 及び PMA によって刺激されたヒト PBMC においてサイトカインの産生を抑制し，Th17 細胞及び Th2 細胞の活性化を抑制することが示された。

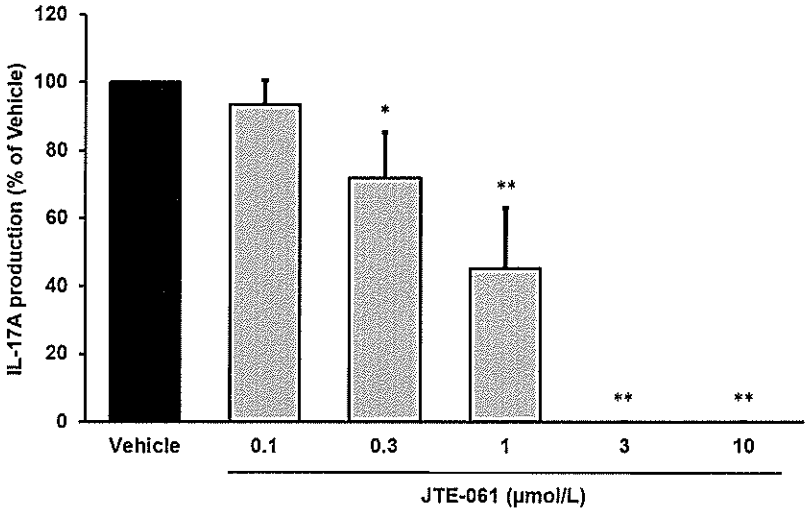


図 2　ヒト末梢血単核細胞における IL-17A 産生に対するタピナロフの作用

平均値と標準偏差（n = 4）
*, p < 0.025; **, p < 0.005 vs. Vehicle (Shirley-Williams test)
JTE-061: タピナロフ

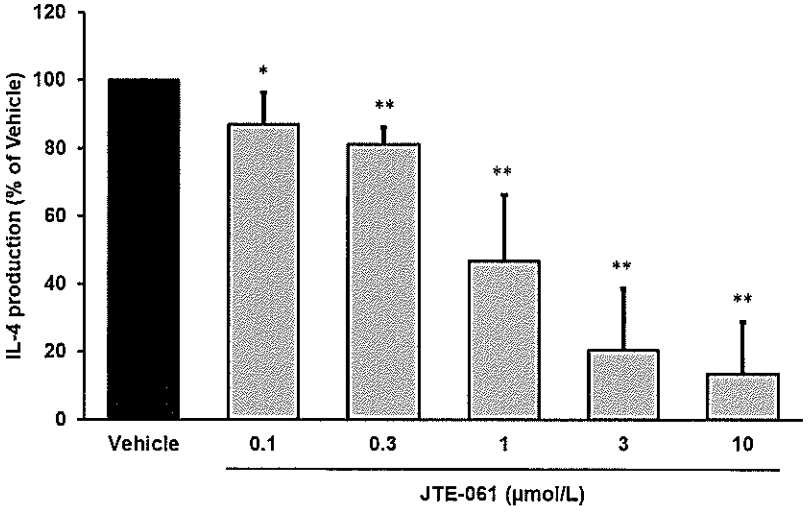


図 3　ヒト末梢血単核細胞における IL-4 産生に対するタピナロフの作用

平均値と標準偏差（n = 4）
*, p < 0.025; **, p < 0.005 vs. Vehicle (Shirley-Williams test)
JTE-061: タピナロフ

(2) ヒト皮膚におけるサイトカインの遺伝子発現に対する作用 [報告書番号 20[redacted]N233731_01]

(参考資料：CTD4.2.1.1-5)

ヒト皮膚における Th17 サイトカインの発現に対するタピナロフの阻害作用を検討した。

タピナロフで前処理後，Th17 誘導刺激条件下で培養したヒト皮膚を用いて，IL-17A，IL-17F 及び IL-22 の mRNA 発現量を定量的リアルタイム RT-PCR 法により測定した。

タピナロフは IL-17A の mRNA 発現量を有意に減少させたのに対し，IL-22 の mRNA 発現量を有意に増加させた。また，タピナロフは IL-17F の mRNA 発現量を減少させたが，その作用は統計学的に有意ではなかった。

以上の結果より，タピナロフは尋常性乾癬の治療において，IL-17A の産生を抑制することが示唆された。

2.6.2.2.1.3 抗酸化作用

(1) ヒト末梢血単核細胞における抗酸化分子の遺伝子発現に対する作用 [報告書番号 JTE061-PH-001／試験番号[redacted]B061HP01]

(評価資料：CTD4.2.1.1-3)

ヒト PBMC を用いて，タピナロフの抗酸化作用を抗酸化分子である NAD(P)H:quinone dehydrogenase 1 (NQO1) の mRNA 発現量を指標に評価した。本試験では 2.6.2.2.1.1 (3) にて得られたサンプルを用いた。

タピナロフは有意に NQO1 の mRNA 発現を増加させ（図 4），タピナロフの抗酸化作用が示された。

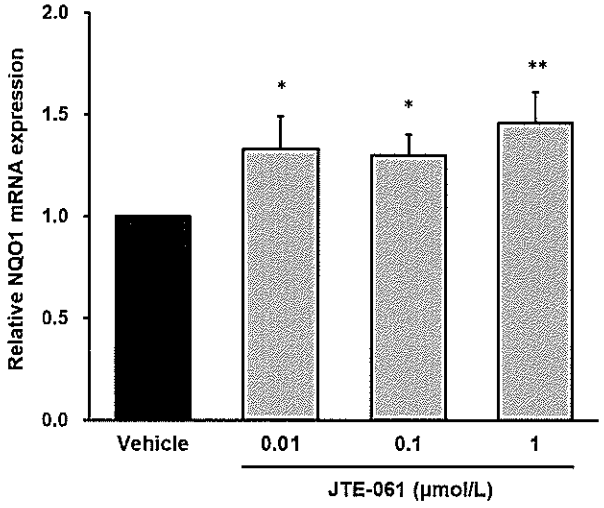


図 4 ヒト末梢血単核細胞における NQO1 の mRNA 発現に対するタピナロフの作用

平均値と正の標準偏差 (n = 4)
*, $p < 0.025$; **, $p < 0.005$ vs. Vehicle (Shirley-Williams test)
JTE-061: タピナロフ

（2）ヒト表皮角化細胞における抗酸化関連遺伝子の発現に対する作用［報告書番号 20[redacted]N229880_01］

（参考資料：CTD4.2.1.1-6）

ヒト初代角化細胞及びヒト不死化角化細胞株（HaCaT）を用いて，酸化的ストレスに対するタピナロフの抑制作用を活性酸素種（ROS）産生及び定常状態での抗酸化分子の mRNA 発現量を指標に検討した。

ROS 感受性蛍光プローブを用いた定量的なハイコンテント画像解析において，フリーラジカル発生剤であるアゾビス化合物［2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride ; AAPH］により角化細胞で誘導される ROS 生成は，タピナロフの同時添加又は前処理によって抑制されることが示唆された。

タピナロフは 2 種類の抗酸化分子［ヘムオキシゲナーゼ-1（HO-1，HMOX1）及び NQO1］の mRNA 発現量を増加させた。これらの作用は，非ストレス下の細胞及び AAPH 処理細胞の両方で認められた。

以上の結果より，タピナロフはヒト角化細胞において，ROS 産生阻害作用及び抗酸化作用を示すことが明らかとなった。これらの作用は，炎症性サイトカインに対するタピナロフの既知の抑制作用と協調して，炎症カスケードを抑制する可能性を示している。

（3）ヒト気管支上皮細胞を用いた抗酸化遺伝子発現における Nrf2 及び AhR の寄与（メカニズム解析）［報告書番号 20[redacted]N231554_01］

（参考資料：CTD4.2.1.1-7）

タピナロフの作用機序を解析するため，タピナロフにより誘導される抗酸化遺伝子の発現に対する Nrf2 又は AhR の欠失による影響を検討した。

ヒト肺由来の正常ヒト気管支上皮（NHBE）細胞に Nrf2 又は AhR siRNA を導入後，タピナロフを添加した。添加 6 時間又は 24 時間後，抗酸化遺伝子の発現量を定量的リアルタイム RT-PCR 及び NanoString 技術により測定した。

定量的リアルタイム RT-PCR 実験において，タピナロフは Nrf2 依存的かつ AhR 非依存的に NQO1 遺伝子の発現を増加させた。NanoString 遺伝子発現プロファイリングにおいて，Nrf2 依存性遺伝子パネルに含まれる数種類の遺伝子がタピナロフによって影響を受け，その多くは Nrf2 又は AhR に部分的に依存した。特に，タピナロフによる NQO1 遺伝子の発現増加には Nrf2 の発現を必要とするが，HMOX1 の発現増加には AhR の発現を必要とした。

これらの結果より，タピナロフの作用が Nrf2 シグナル伝達経路と AhR シグナル伝達経路の両方に部分的に依存することが示唆された。

2.6.2.2.1.4 皮膚バリアに対する作用

（1）初代ヒト角化細胞及び再構築ヒト表皮モデルにおける皮膚バリア関連分子の発現に対する作用［報告書番号 20[redacted]N330920］

（参考資料：CTD4.2.1.1-8）

初代ヒト角化細胞及び再構築ヒト表皮（RHE）モデルを用いて，表皮バリア機能に対するタピ

ナロフの作用を皮膚バリア機能関連分子の mRNA 発現量を指標に検討した。

増殖又は分化条件下で培養し，コンフルエントに達した初代ヒト角化細胞にタピナロフを添加した。添加 24，48 及び 72 時間後，タピナロフはいずれの培養条件においても初代ヒト角化細胞の CYP1A1 の mRNA 発現量を増加させ，タピナロフによる AhR 経路の活性化作用が確認された。また，タピナロフは増殖及び分化条件下の初代ヒト角化細胞において 72 時間後に FLG，48 時間及び 72 時間後に HRNR，分化条件下の初代ヒト角化細胞においては 72 時間後に INV の mRNA 発現量をそれぞれ増加させた。

さらに，未成熟な再構築ヒト表皮モデルを分化条件下で 3 日間培養後，タピナロフを添加した。添加 24，48 及び 72 時間後，タピナロフは再構築ヒト表皮モデルの CYP1A1 の mRNA 発現量を増加させ，タピナロフによる AhR の活性化作用が確認された。初代ヒト角化細胞と同様，タピナロフは分化条件下の再構築ヒト表皮モデルで 48 及び 72 時間後に HRNR，72 時間後に INV の mRNA 発現量を増加させた。

以上の結果より，タピナロフは皮膚バリア機能関連分子（FLG，INV 及び HRNR）の遺伝子発現を誘導し，皮膚バリア機能を改善する可能性が示された。

2.6.2.2.2 *In Vivo* 作用

2.6.2.2.2.1 皮膚炎に対する作用

(1) マウス IL-23 誘発皮膚炎に対する作用（尋常性乾癬） [報告書番号 JTE061-PH-004／試験番号 ■B061PS01]

（評価資料：CTD4.2.1.1-9）

マウス IL-23 誘発皮膚炎モデルを用いて，タピナロフを反復経皮投与した際の皮膚炎に対する作用を評価した。

雌性マウスの左耳介内に IL-23 溶液を 1 日目より 1 日 1 回計 3 回投与した（1，2 及び 3 日目）。タピナロフ（0.01%，0.1%及び 1%エタノール溶液）又は媒体を 1 日目から 3 日目まで 1 日 1 回左耳介表裏に 10 μL ずつ反復経皮投与した。陽性対照物質としてデキサメタゾン（DEX）0.005%溶液を同様に投与した。1 日目及び 4 日目に左耳介厚を測定し，その変化量（耳介腫脹）を算出した。4 日目の耳介厚測定後，左耳介を採取し，病理組織学的検査を行った。耳介腫脹と病理組織学的変化を主評価項目として，タピナロフの皮膚炎に対する作用を評価した。また，採取した耳介を用いて，mRNA 発現量（CYP1A1 及び NQO1）及び IL-17A 量を測定した。

タピナロフは耳介腫脹を抑制し，その作用は 0.01%以上の用量で有意であった（図 5）。また，タピナロフは 0.01%より耳介皮膚の病理組織学的変化（真皮への炎症性細胞浸潤，表皮肥厚及び痂皮形成）を抑制した（表 2，図 6）。一方，DEX 0.005%は耳介腫脹を有意に抑制し（図 5），耳介皮膚の病理組織学的変化を抑制した（表 2，図 6）。

タピナロフは耳介において CYP1A1 の mRNA 発現量を増加させ，AhR 経路の活性化作用が確認された（図 7）。また，タピナロフは抗酸化分子である NQO1 の mRNA 発現量を増加させ，抗酸化作用を示した（図 8）。さらに，タピナロフは耳介において Th17 サイトカインである IL-17A 量を減少させ，抗炎症作用を示した（図 9）。

以上の結果より，マウス IL-23 誘発皮膚炎モデルにおいて，タピナロフは皮膚炎を抑制することが明らかとなった。

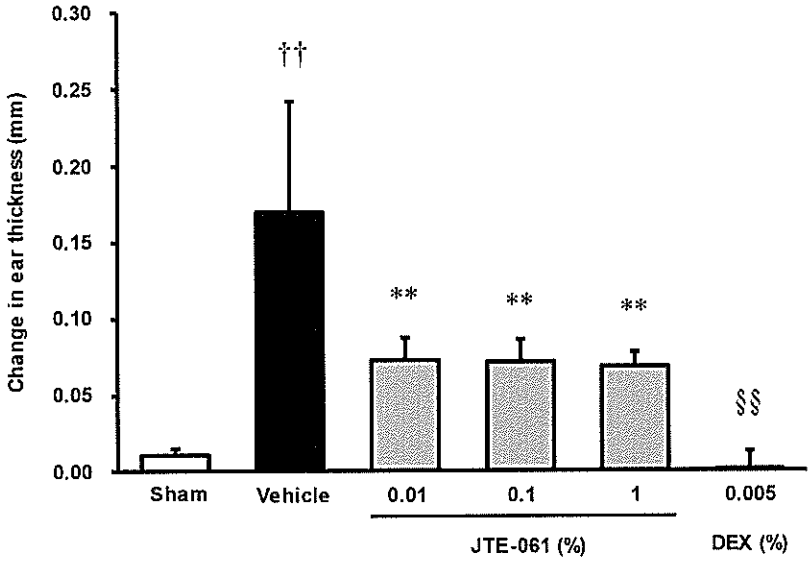


図 5 マウス IL-23 誘発皮膚炎モデルにおける耳介腫脹に対するタピナロフの作用

平均値と標準偏差（n = 10）
統計解析を閉手順により実施した。
††, $p < 0.01$; Sham vs. Vehicle (Aspin-Welch's *t*-test)
§§, $p < 0.01$; Vehicle vs. DEX 0.005% (Aspin-Welch's *t*-test)
**, $p < 0.01$; Vehicle vs. JTE-061 0.01%, 0.1% and 1% (Steel test)
JTE-061: タピナロフ, DEX: デキサメタゾン

表 2 マウス IL-23 誘発皮膚炎モデルにおける病理組織学的変化に対するタピナロフの作用

Finding	Grade [a)]	Sham	Vehicle	JTE-061			DEX
				0.01%	0.1%	1%	0.005%
Infiltration, Inflammatory cell, Dermis	−	10	0	4	5	5	10
	±	0	4	6	5	5	0
	+	0	5	0	0	0	0
	2+	0	1	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0	0	0
Acanthosis	−	10	3	8	8	7	10
	±	0	6	2	2	3	0
	+	0	1	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0	0	0
Crust	−	10	5	8	8	6	10
	±	0	3	2	2	4	0
	+	0	2	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0	0	0

a) −: No abnormal finding, ±: Very slight, +: Slight, 2+: Moderate, 3+: Severe, n = 10
JTE-061: タピナロフ, DEX: デキサメタゾン

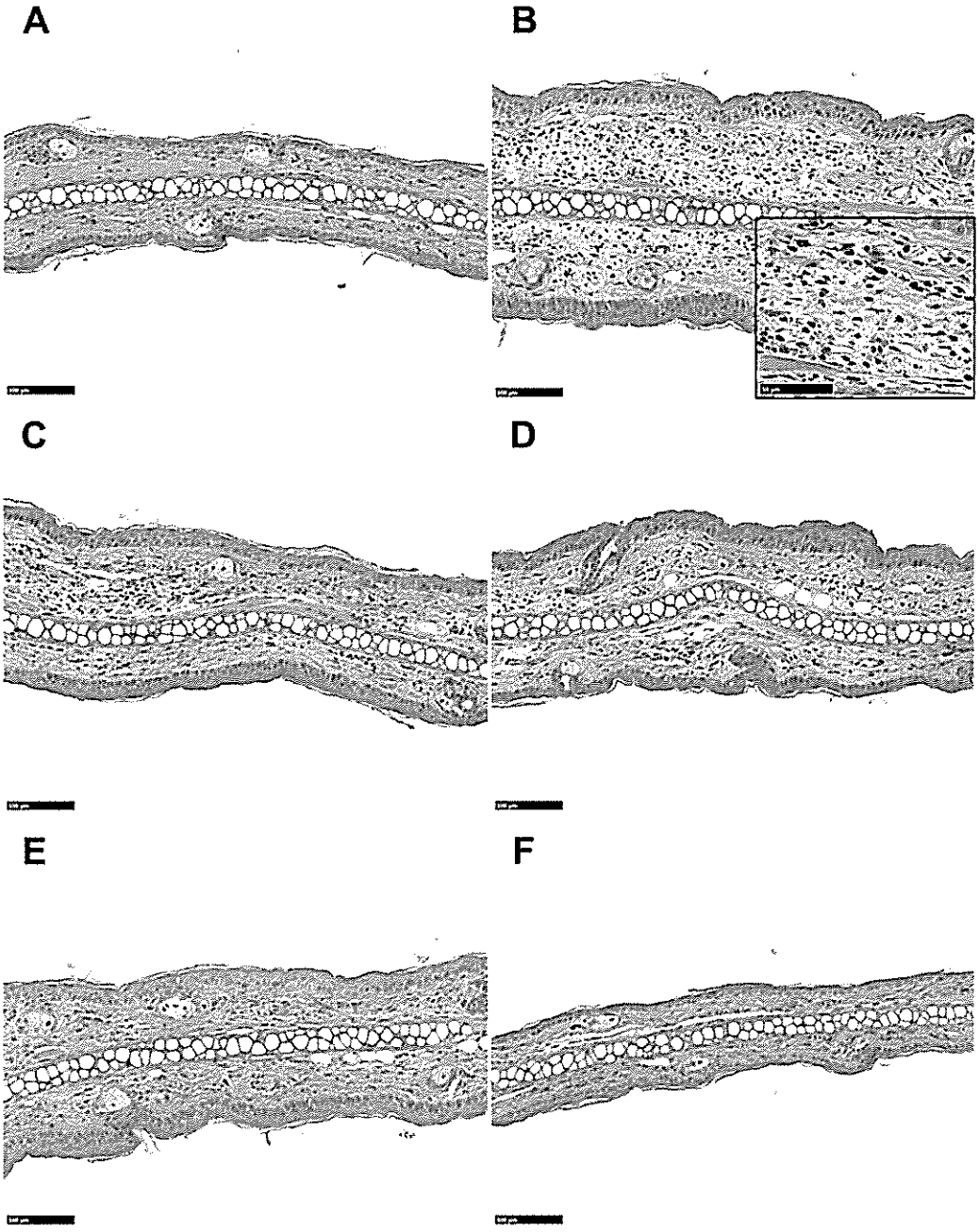


図 6 マウス IL-23 誘発皮膚炎モデルにおける病理組織学的変化に対するタピナロフの作用（真皮への炎症細胞浸潤，顕微鏡写真の代表例）

A: Sham, B: Vehicle, C: タピナロフ 0.01%, D: タピナロフ 0.1%, E: タピナロフ 1%,
F: デキサメタゾン 0.005%
Hematoxylin and eosin stain, Bar = 100 μm (B 内拡大図: Bar = 50 μm)

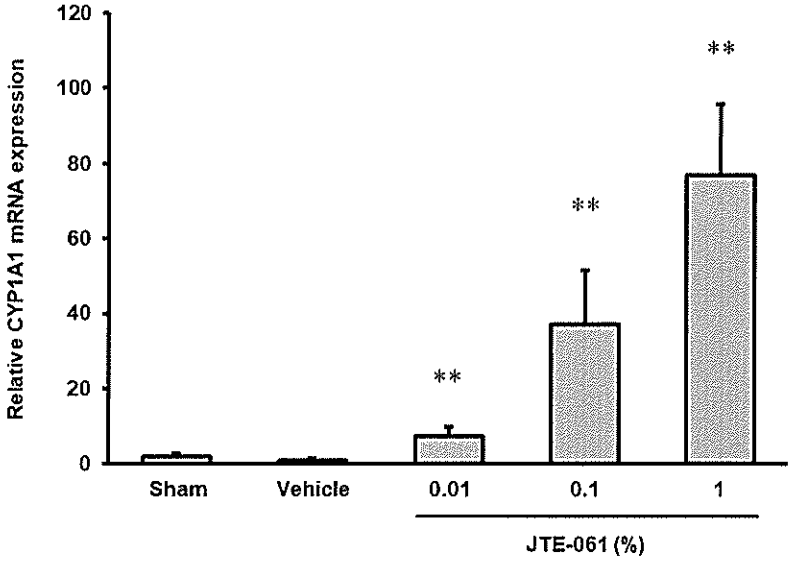


図 7　マウス IL-23 誘発皮膚炎モデルにおける耳介中 CYP1A1 の mRNA 発現に対するタピナロフの作用

平均値と正の標準偏差（n = 10）
**, p < 0.01; Vehicle vs. JTE-061 0.01%, 0.1% and 1% (Dunnett's test)
JTE-061: タピナロフ

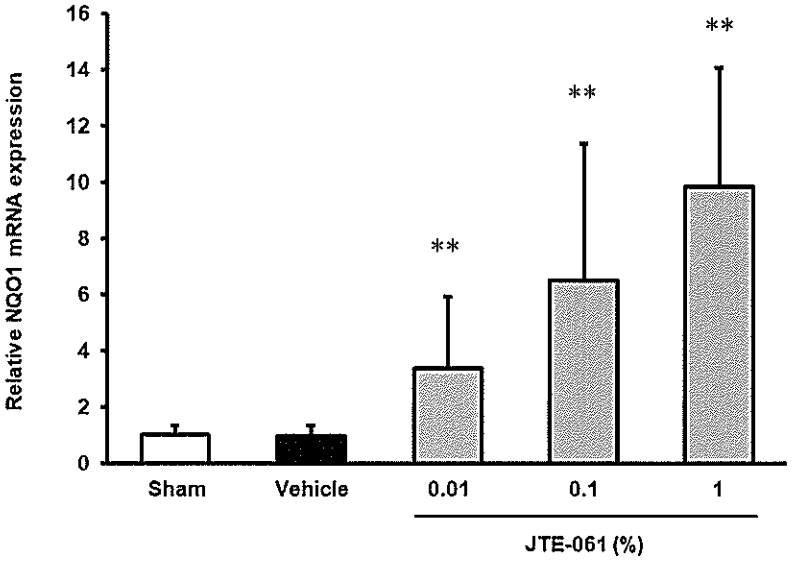


図 8　マウス IL-23 誘発皮膚炎モデルにおける耳介中 NQO1 の mRNA 発現に対するタピナロフの作用

平均値と正の標準偏差（n = 10）
**, p < 0.01; Vehicle vs. JTE-061 0.01%, 0.1% and 1% (Dunnett's test)
JTE-061: タピナロフ

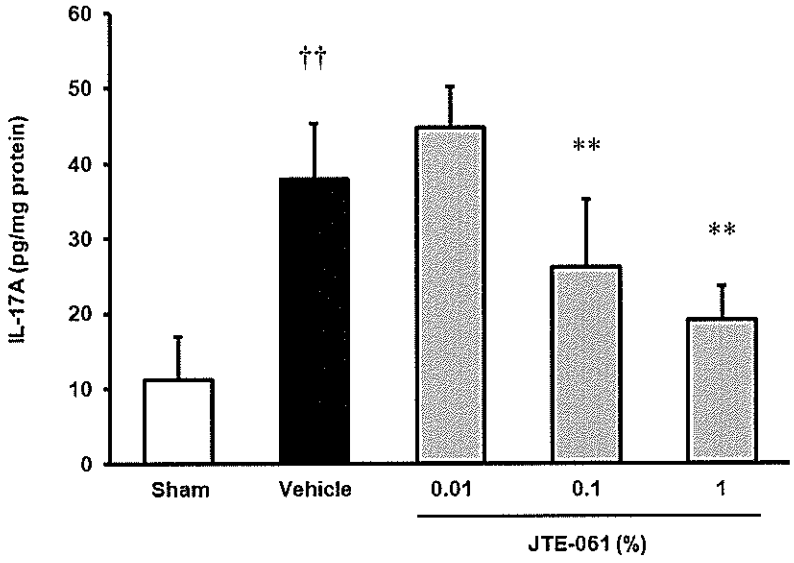


図 9　マウス IL-23 誘発皮膚炎モデルにおける耳介中 IL-17A 量に対するタピナロフの作用

平均値と標準偏差（n = 10）
統計解析を閉手順により実施した。
††, $p < 0.01$; Sham vs. Vehicle (Student's *t*-test)
**, $p < 0.01$; Vehicle vs. JTE-061 0.1% and 1% (Dunnett's test)
JTE-061: タピナロフ

(2) マウス IMQ 誘発皮膚炎に対する作用（尋常性乾癬）［報告書番号 20[redacted]N230720_01］

（参考資料：CTD4.2.1.1-10）

マウス IMQ 誘発皮膚炎モデルを用いて，タピナロフを反復経皮投与した際の皮膚炎に対する作用について検討した。

雌性マウスの背部に 5% IMQ を 10 日間反復塗布した。タピナロフは軟膏（1%）又はエタノール剤（0.1%，0.3%及び 1%）として 13 日間経皮投与した。タピナロフの有効性の指標として皮膚症状スコア（紅斑及びプラークから算出），Th17 関連サイトカイン（IL-17A，IL-17F，IL-19 及び IL-22 又は IL-23A）の発現及び表皮厚を測定した。

タピナロフは皮膚症状スコアを改善した。タピナロフは皮膚の Th17 関連サイトカインの遺伝子発現を抑制した。1%軟膏では IL-17A，IL-17F，IL-19 及び IL-23A，エタノール剤ではすべての用量で IL-17A，IL-17F，IL-19 及び IL-22 に対する作用が認められた。また，皮膚の組織学的解析において，タピナロフ 1%軟膏は IMQ により誘発される表皮肥厚を 51%抑制した。タピナロフ 0.1%，0.3%及び 1%エタノール剤において，それぞれ 35%，52%及び 53%の抑制が認められた。

以上より，マウス IMQ 誘発皮膚炎モデルにおいて，タピナロフは皮膚炎を抑制し，その作用は今回用いたいずれの処方においても認められた。

(3) マウス IMQ 誘発皮膚炎に対する作用（AhR 欠損マウスを用いたメカニズム解析）［報告書番号 20[redacted]N297549］

（参考資料：CTD4.2.1.1-11）

AhR 欠損マウス及び AhR 発現対照マウス（ヘテロ接合体同腹マウス）を用いて，IMQ により誘発した皮膚炎に対するタピナロフの作用を検討した。タピナロフ 1%エタノール剤を用い，各種皮膚指標（皮膚症状スコア，Th17 関連サイトカインの発現，表皮厚）を測定した。

AhR 発現対照マウスでは，タピナロフの局所投与による皮膚症状スコアの改善が認められたが，AhR 欠損マウスでは認められなかった。皮膚の遺伝子発現の検討において，IL-17A，IL-17F，IL-19，IL-22，IL-23A 及び IL-1β に対するタピナロフの抑制作用が示されたが，その作用は AhR 発現対照マウスでのみ認められ，AhR 欠損マウスでは認められなかった。

皮膚の組織学的解析において，タピナロフ 1%エタノール剤は AhR 発現対照マウスの表皮肥厚に対して有意な抑制作用を示した。一方，AhR 欠損マウスでは，タピナロフの有意な作用は認められなかった。

以上の結果より，AhR 欠損マウスを用いた IMQ 誘発皮膚炎モデルにおいて，タピナロフは明らかな局所作用を示さず，AhR 発現対照マウスで認められたタピナロフの作用は AhR を介していることが示唆された。

(4) マウス DNFB 誘発皮膚炎に対する作用（AD）［報告書番号 JTE061-PH-003／試験番号 [redacted]B061AD01］

（評価資料：CTD4.2.1.1-12）

マウス DNFB 誘発皮膚炎モデルを用いて，タピナロフを反復経皮投与した際の皮膚炎に対する作用を評価した。

雌性マウスの左耳介の表裏に 0.15% DNFB を 1 日目より計 5 回塗布した（1，5，8，12 及び 15 日目）。タピナロフ（0.01%，0.1%及び 1%エタノール溶液）を 1 日目から 15 日目まで 1 日 1 回左耳介の表裏に 10 μL ずつ反復経皮投与した。陽性対照物質としてタクロリムス水和物を用い，その 0.1%溶液を同様に反復経皮投与した。1，2，8，9，15 及び 16 日目に左耳介厚を測定し，1 日目から各測定日までの耳介厚の変化量（耳介腫脹）を算出した。16 日目の耳介厚測定後，耳介における TEWL を測定した後，左耳介を採取し，病理組織学的検査を行った。耳介腫脹と病理組織学的変化を主評価項目として，タピナロフの皮膚炎に対する作用を評価した。また，採取した耳介を用いて，mRNA 発現量（CYP1A1 及び NQO1）及び IL-4 量を測定した。

タピナロフは耳介腫脹を抑制し，その作用は 16 日目において 0.01%以上の用量で有意であった（図 10）。また，タピナロフは用量の増加に応じて耳介皮膚の病理組織学的変化（真皮への炎症細胞浸潤，表皮肥厚及び痂皮形成）を抑制した（表 3，図 11）。タクロリムス水和物 0.1%は耳介腫脹を有意に抑制し（図 10），耳介皮膚の病理組織学的変化を抑制した（表 3，図 11）。

タピナロフは耳介において CYP1A1 の mRNA 発現量を増加させ，AhR 経路の活性化作用が確認された（図 12）。また，タピナロフは，抗酸化分子である NQO1 の mRNA 発現量を増加させ，抗酸化作用を示した（図 13）。タピナロフは耳介において炎症性サイトカインである IL-4 量を減少させ（図 14），抗炎症作用を示した。さらに，タピナロフは耳介において皮膚バリア機能の指

標である TEWL の増加を抑制した（図 15）。

以上の結果より，マウス DNFB 誘発皮膚炎モデルにおいて，タピナロフは皮膚炎を抑制すると共に，皮膚バリア機能の低下を抑制することが明らかとなった。

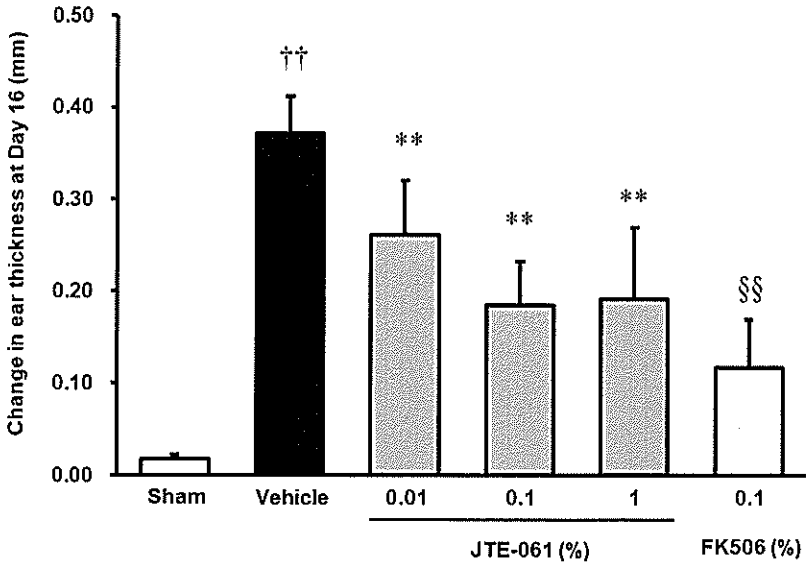


図 10 マウス DNFB 誘発皮膚炎モデルにおける耳介腫脹に対するタピナロフの作用

平均値と標準偏差（n = 10）
統計解析を閉手順により実施した。
††, $p < 0.01$; Sham vs. Vehicle (Aspin-Welch's *t*-test)
§§, $p < 0.01$; Vehicle vs. FK506 0.1% (Student's *t*-test)
**, $p < 0.01$; Vehicle vs. JTE-061 0.01%, 0.1% and 1% (Dunnett's test)
JTE-061: タピナロフ, FK506: タクロリムス水和物

表 3 マウス DNFB 誘発皮膚炎モデルにおける病理組織学的変化に対するタピナロフの作用

Finding	Grade [a)]	Sham	Vehicle	JTE-061			FK506
				0.01%	0.1%	1%	0.1%
Infiltration, Inflammatory cell, Dermis	−	10	0	0	0	1	2
	±	0	0	0	0	2	3
	+	0	0	3	5	2	4
	2+	0	0	6	5	5	1
	3+	0	10	1	0	0	0
Acanthosis	−	10	0	0	0	2	3
	±	0	0	3	4	1	4
	+	0	7	6	6	7	3
	2+	0	3	1	0	0	0
	3+	0	0	0	0	0	0
Crust	−	10	0	0	0	2	4
	±	0	0	4	2	2	4
	+	0	6	6	8	6	2
	2+	0	4	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0	0	0

a) −: No abnormal finding, ±: Very slight, +: Slight, 2+: Moderate, 3+: Severe, n = 10
JTE-061: タピナロフ, FK506: タクロリムス水和物

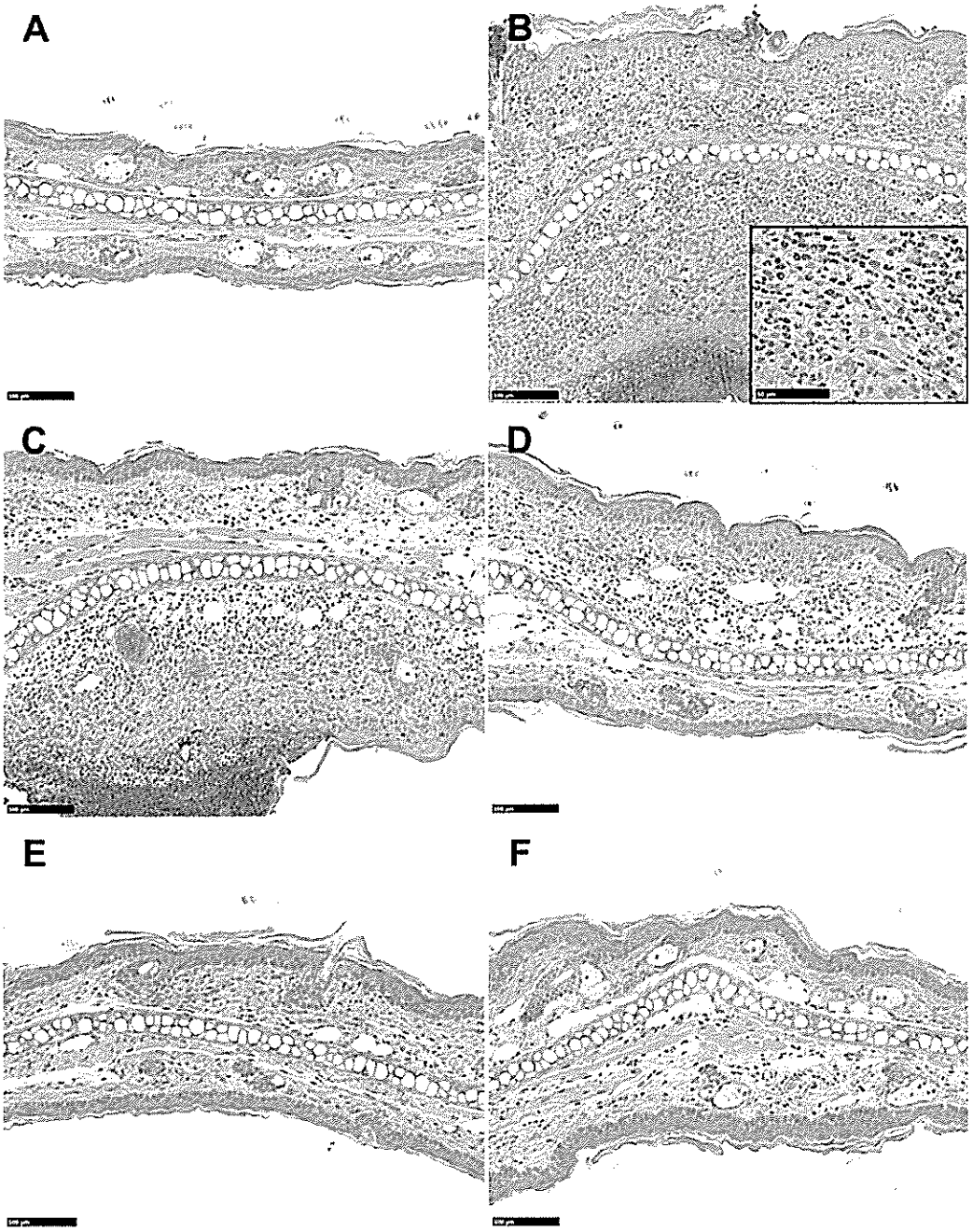


図 11 マウス DNFB 誘発皮膚炎モデルにおける病理組織学的変化に対するタピナロフの作用（真皮への炎症細胞浸潤，顕微鏡写真の代表例）

A: Sham, B: Vehicle, C: タピナロフ 0.01%, D: タピナロフ 0.1%, E: タピナロフ 1%,
F: タクロリムス水和物 0.1%
Hematoxylin and eosin stain, Bar = 100 μm (B 内拡大図: Bar = 50 μm)

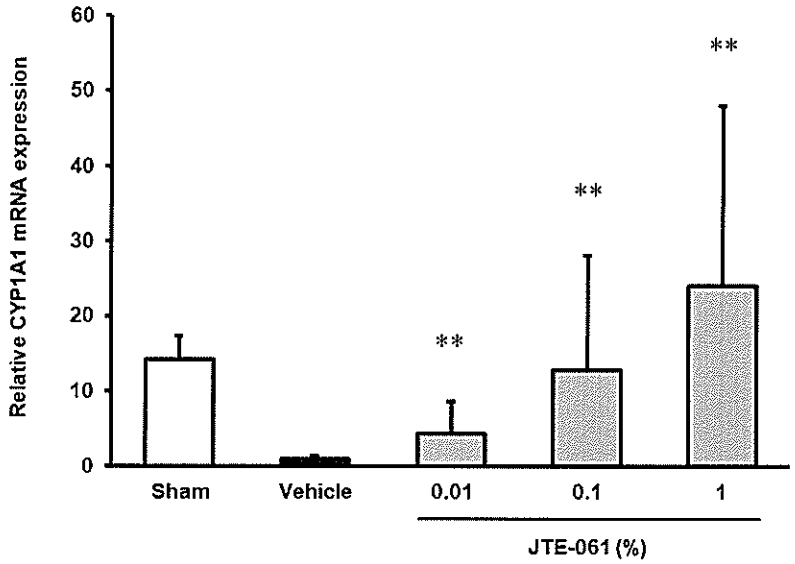


図 12 マウス DNFB 誘発皮膚炎モデルにおける耳介中 CYP1A1 の mRNA 発現に対するタピナロフの作用

平均値と正の標準偏差（n = 10）
**, p < 0.01; Vehicle vs. JTE-061 0.01%, 0.1% and 1% (Dunnett's test)
JTE-061: タピナロフ

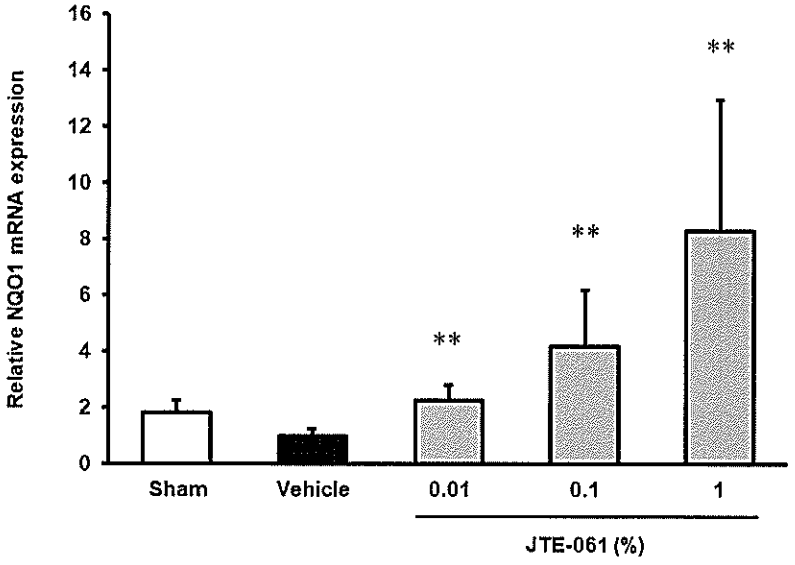


図 13 マウス DNFB 誘発皮膚炎モデルにおける耳介中 NQO1 の mRNA 発現に対するタピナロフの作用

平均値と正の標準偏差（n = 10）
**, p < 0.01; Vehicle vs. JTE-061 0.01%, 0.1% and 1% (Dunnett's test)
JTE-061: タピナロフ

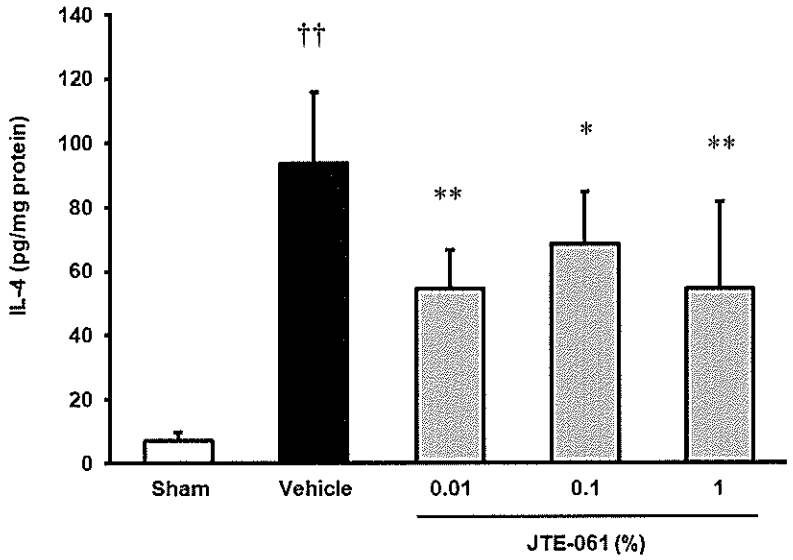


図 14 マウス DNFB 誘発皮膚炎モデルにおける耳介中 IL-4 量に対するタピナロフの作用

平均値と標準偏差（n = 10）
統計解析を閉手順により実施した。
††, $p < 0.01$; Sham vs. Vehicle (Aspin-Welch's *t*-test)
*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; Vehicle vs. JTE-061 0.01%, 0.1% and 1% (Dunnett's test)
JTE-061: タピナロフ

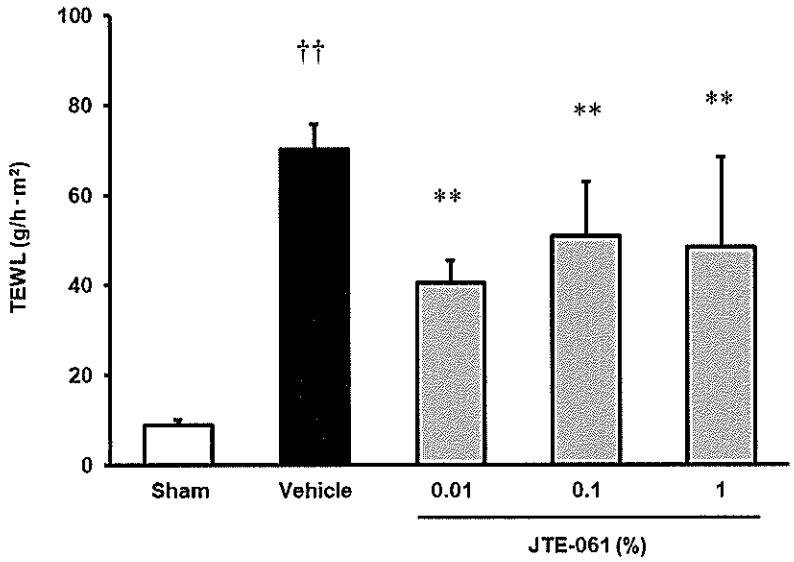


図 15 マウス DNFB 誘発皮膚炎モデルにおける経皮水分蒸散量に対するタピナロフの作用

平均値と標準偏差（n = 10）
統計解析を閉手順により実施した。
††, $p < 0.01$; Sham vs. Vehicle (Aspin-Welch's *t*-test)
**, $p < 0.01$; Vehicle vs. JTE-061 0.01%, 0.1% and 1% (Steel test)
JTE-061: タピナロフ

2.6.2.3 副次的薬理試験

(1) スクリーニング及び化合物プロファイリング（SCP）パネルアッセイ［報告書番号 20[redacted]N176987］

（参考資料：CTD4.2.1.2-1）

GSK 社の *in vitro* スクリーニング及び化合物プロファイリング（SCP）パネルアッセイで得られたタピナロフの選択性プロファイルを検証した。この SCP パネルアッセイは，様々な *in vitro* アッセイからなる pre-candidate profiling パネル（PCP），化合物の副次的薬理作用及び選択性プロファイルを評価する enhanced cross (X) screen パネル（eXP）アッセイ並びにその他の関連するプロファイリングからなる。

評価した標的分子パネルに対するアッセイのうち，XC_{50} が 1 μmol/L 未満（すなわち pXC_{50} が 6 以上）であったアッセイは，Nrf2（NFE2L2）によるレポーター遺伝子 NQO1 の活性化（pEC_{50} = 7.8），CYP2C9 に対する阻害（pIC_{50} = 7.5），CYP2D6 に対する阻害（pIC_{50} = 6.1）及び CYP1A2 に対する阻害（pIC_{50} = 6.0）であった。タピナロフは 109 種類のアッセイにおいて活性がない又は弱い活性（pXC_{50} < 5）を示した。

(2) Enhanced Cross Screen Profiling（eXP）パネル試験［報告書番号 20[redacted]N176990］

（参考資料：CTD4.2.1.2-2）

タピナロフの選択性プロファイルを enhanced Cross (X) Screen Profiling（eXP）パネルで検証した。本試験では 6 つの標的クラスからなる合計 38 種類の薬理学的な標的分子（53 のアッセイに相当）に対するタピナロフの活性を機能，活性及び結合アッセイにより評価した。eXP の標的分子はその大部分が臨床有害事象及び／又は薬物の副作用に関連する分子で構成されている。いずれのデータも 3 回以上の試験及び濃度反応曲線から算出した。

タピナロフは eXP アッセイの大半で活性がない又は弱い活性を示した。

タピナロフが $XC_{50} \leq 1$ μmol/L（$pXC_{50} \geq 6$）の活性を示した標的：AhR（pEC_{50} = 7.0），CB2（pEC_{50} = 6.8）及び MAO-B（pIC_{50} = 6.1）；タピナロフが 10 μmol/L > XC_{50} > 1 μmol/L（5 < pXC_{50} < 6）の範囲の活性を示した標的：pregnane xenobiotic receptor（PXR，pEC_{50} = 5.8 及び 5.7），ホスホジエステラーゼ（PDE）4B（pIC_{50} = 5.7），セロトニン（5HT）2C（pIC_{50} = 5.6），ノルエピネフリントランスポーター（NET，pIC_{50} = 5.3），ニューロキニン 1（NK1，pIC_{50} = 5.2）及び有機アニオン輸送ポリペプチド 1B1（OATP1B1，pIC_{50} = 5.1）

eXP には，培養哺乳類細胞へのタピナロフの *in vitro* 曝露により誘発される表現型の変化を評価するアッセイ，すなわち，Cell Health アッセイ（細胞毒性の測定），BlueScreen HC アッセイ（GADD45 遺伝子誘導の測定）及びリン脂質アッセイ（リン脂質蓄積の測定）も含まれている。Cell Health アッセイの 3 つのパラメータに対するタピナロフの活性は以下の通りであった。膜透過性（pIC_{50} = 4.6，IC_{50} = 25.1 μmol/L），ミトコンドリア膜電位（pIC_{50} = 4.8，IC_{50} = 15.8 μmol/L），核形態（pIC_{50} = 4.8，IC_{50} = 15.8 μmol/L）

(3) 選択した標的及びパネル [報告書番号 20[redacted]N177110]

(参考資料：CTD4.2.1.2-3)

選択した標的及びパネルにおけるタピナロフの作用を検討した。ロイコトリエン (LT) A4 加水分解酵素，CB1 及び CB2，317 種類のキナーゼのパネル，22 種類の核内受容体のパネル，メラニン生合成経路を評価する皮膚黒色素胞に対するタピナロフの活性を測定した。

タピナロフは評価した 317 キナーゼのうち 316 キナーゼに対し，活性がない又は弱い活性を示した。セリン-スレオニン蛋白質キナーゼ 24 (STK24) (別名，哺乳類 STE20 様キナーゼ 3) に対してのみ，タピナロフは 10 μmol/L の濃度で酵素活性を 50%以上阻害した (すなわち $pIC_{50} \geq 5$)。また，タピナロフは，評価した 22 種類の核内受容体を活性化しないと考えられた。

タピナロフは CB1 ($pIC_{50} = 5.2$) 及び CB2 ($pIC_{50} = 5.0$) に対する結合能を示したことから，これらの受容体経路を活性化又は阻害する可能性が示された。また，タピナロフはモルモット LTA4 加水分解酵素に対する弱い阻害作用 ($IC_{50} = 44.3$ μmol/L) を示し，LTB4 産生を減少させる作用が示唆された。さらに，皮膚黒色素胞アッセイにおいて，タピナロフは細胞内のメラニンレベルを低下させたことから，メラニン生合成経路を阻害する可能性が示された。

(4) 選択した標的及びパネル [報告書番号 20[redacted]N233675_01]

(参考資料：CTD4.2.1.2-4)

AhR に対する各種アッセイ (アゴニスト作用，アンタゴニスト作用，リガンド競合性及び結合性)，コシャペロン Heat Shock Protein 90 (Hsp90) 結合アッセイ，免疫細胞の Th17 細胞を用いた IL-17 及び IL-22 産生アッセイ，PBMC を用いた LTB4 アッセイ，17 種類のサブタイプからなる PDE アッセイパネルにおけるタピナロフの活性を測定した。

タピナロフは Th17 に分化させた細胞における IL-17 産生を強く阻害した ($pIC_{50} = 8.5$)。Th17 サイトカインは尋常性乾癬における皮膚炎症並びに病態生理に重要な役割を果たすが，タピナロフはこの Th17 サイトカインを調節する可能性が示された。PBMC を用いたアッセイでは，タピナロフは LTB4 産生に対して弱い阻害作用を示した ($pEC_{50} = 5.2$)。

AhR に対するアゴニスト作用を評価するアッセイにおいて，AhR 下流遺伝子 CYP1A1 の誘導を測定した結果，タピナロフの pEC_{50} は 7.9 であった。タピナロフは AhR に対して部分アゴニスト及びアンタゴニスト活性を示さなかったことから，AhR の活性化に対して，また AhR-Hsp90-XAP2 複合体の核内への移行に対して完全アゴニストであることが示唆された。AhR アンタゴニスト CH223191 及び Hsp90 アンタゴニスト BIIB 021 を用いた CYP1A1 レポーター遺伝子アッセイによりリガンド競合性を評価したところ，タピナロフはナチュラルリガンドである FICZ やサロゲートリガンドである TCDD とは異なる様式で AhR 複合体に相互作用することが示された。リガンド競合試験において，AhR アンタゴニスト CH223191 はタピナロフの作用 (AhR の核内移行) を左方シフトさせた。一方，Hsp90 アンタゴニスト BIIB 021 はタピナロフの作用を右方シフトさせた。

17 種類の PDE サブタイプに対して，タピナロフは阻害活性を示さない又は弱い阻害活性を示した (pEC_{50} の範囲：4.0～4.6)。本試験で評価したすべての PDE サブタイプのうち，PDE7A 活性に対する阻害作用 ($pEC_{50} = 4.6$) が最も強かった。

(5)細胞生存率[報告書番号 JTE061-PH-002／試験番号 [redacted]B061HP02, 報告書番号 20[redacted]N163776, 20[redacted]N175756, 20[redacted]N230011_01, 20[redacted]N230308_01]

(評価資料：CTD4.2.1.1-4)

(参考資料：CTD4.2.1.2-5, 4.2.1.2-6, 4.2.1.2-7, 4.2.1.2-8)

ヒト PBMC, ヒト pan T 細胞, ヒト $CD4^+$ T 細胞, ヒト表皮角化細胞など複数の細胞種において, タピナロフは 3 μmol/L 若しくは 10 μmol/L の濃度で生細胞数を減少させた。

2.6.2.4 安全性薬理試験

タピナロフの安全性薬理学的影響を検討するため, 一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。SD ラットを用いた試験で, 皮下投与による中枢神経系及び呼吸系に及ぼす影響を検討した。心血管系に及ぼす影響を, hERG 電流評価を用いた *in vitro* 試験, テレメーターを装着した Donkin Hartley モルモット及び Göttingen ミニブタに経皮又は静脈内投与した *in vivo* 試験で検討した。実施した試験一覧を GLP 適合性とともに, 表 4 に示す。安全性薬理試験に使用したタピナロフのバッチの一覧表を, 製剤処方の情報とともに, 表 5 に示す。

表 4　タピナロフの安全性薬理試験一覧

試験の種類	動物種（系統）／試験系	例数／性別／群	投与方法	投与量又は投与濃度	投与期間	GLP	試験施設	報告書番号	CTD 番号
In vitro									
hERG	HEK293 細胞	NA	*in vitro*	100.0, 200.0, 660.0, 2000.0 ng/mL	NA	非適	[redacted]	20[redacted]N163780	4.2.1.3-1
hERG	HEK293 細胞	NA	*in vitro*	0.03, 0.09, 0.29, 0.88, 2.94, 8.83 µg/mL	NA	適	GSK	20[redacted]N170846	4.2.1.3-2
In vivo									
中枢神経系	ラット（SD）	6M	皮下	1, 3, 10 mg/kg	単回	適	[redacted]	20[redacted]N163789	4.2.1.3-3
呼吸系	ラット（SD）	8M	皮下	1, 3, 10 mg/kg	単回	適	[redacted]	20[redacted]N163787	4.2.1.3-4
心血管系	モルモット（Dunkin Hartley）	4M/F	経皮	1%, 4%, 6%	単回 [a]	非適	[redacted]	20[redacted]N163784	4.2.1.3-5
心血管系	ミニブタ（Göttingen）	4M	静脈内（ボーラス）	1, 3, 10 mg/kg	単回	適	[redacted]	20[redacted]N170119	4.2.1.3-6

a. 各濃度群を 6 時間連続モニタリング
F＝雌；GLP＝ 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；hERG＝ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子；HEK293 細胞＝ヒト胎児腎細胞 293；M＝雄；NA＝該当せず；SD＝Sprague Dawley
試験施設：[redacted]＝[redacted]；[redacted]＝[redacted]；GSK＝GlaxoSmithKline；[redacted]＝[redacted]；[redacted]＝[redacted]

表 5　安全性薬理試験に使用したタピナロフのバッチ番号及び製剤処方

バッチ又はロット番号	試験種類	動物種（系統）又は試験系	投与期間	報告書番号	投与濃度	製剤処方
[redacted]	hERG	HEK293 細胞	NA	20[redacted]N163780	100.0, 200.0, 660.0, 2000.0 ng/mL（終濃度）	DMSO
[redacted]	心血管系	モルモット（Dunkin Hartley）	単回 [a]	20[redacted]N163784	1%, 4%, 6%	WBI-1001 製剤
[redacted]	hERG	HEK293 細胞	NA	20[redacted]N170846	0.03, 0.09, 0.29, 0.88, 2.94, 8.83 µg/mL（終濃度）	DMSO
[redacted]	心血管系	ミニブタ（Göttingen）	単回	20[redacted]N170119	1.0, 3.0, 10 mg/mL	30% w/w Captisol®水溶液 pH [redacted] ± [redacted] に調整
[redacted]	中枢神経系	ラット（SD）	単回	20[redacted]N163789	3.33, 10, 33.3 mg/mL	プロピレングリコール
[redacted]	呼吸系	ラット（SD）	単回	20[redacted]N163787	3.33, 10, 33.3 mg/mL	プロピレングリコール

DMSO＝ジメチルスルホキシド；hERG＝ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子；HEK293 細胞＝ヒト胎児腎細胞 293；NA＝該当せず；SD＝Sprague Dawley
a. 各濃度群を 6 時間連続モニタリング

2.6.2.4.1 *In Vitro* 安全性薬理試験

2.6.2.4.1.1 hERG 発現 HEK293 細胞を用いたタピナロフの hERG 阻害作用の評価［報告書番号 20[redacted]N163780］

（参考資料：CTD4.2.1.3-1）

hERG チャネルを安定発現させた HEK293 細胞を用いて，急速（即時）活性型遅延整流カリウム電流（I_{Kr}）テール電流に対するタピナロフの影響をホールセルパッチクランプ法にて検討した。媒体対照溶液の条件下で電流を記録した後，細胞（1 濃度あたり n = 7）に漸増濃度のタピナロフを順次曝露した。目標濃度は 100.0，200.0，660.0 及び 2000.0 ng/mL とした。最終希釈液（100.0，200.0，660.0 及び 2000.0 ng/mL）中のタピナロフ濃度について[redacted]で検証したところ，濃度測定値はそれぞれ定量下限未満，32，146 及び 914 ng/mL であった。原因として，–80°C で凍結保存するまでの 3 ヵ月の間にタピナロフの安定性が失われた可能性が考えられた。検証用検体中のタピナロフの分解が疑われたものの，本試験では，最初に設定した評価濃度でテール電流に対する影響は認められなかった。試験に必要な被験物質添加液は，品質保証担当者（Quality Assurance Officer）の監督下で試験当日に調製した。すべての添加液について調製計算は正しいことが確認されたため，本試験に必要とされるタピナロフ添加液が使用されたと結論付けた。本試験の結果は，品質保証担当者の監督下で調製した添加液に基づき解釈している。

本試験に用いた評価濃度は，それまでに得られているすべての非臨床データを考慮したものであるとともに，臨床での曝露量を超える（30 倍の安全域を大きく超える）と考えられる濃度であり，また，動物の心機能に対するタピナロフの作用を評価する上でも有益な濃度である。

各濃度のタピナロフを添加後に 3 分間の平衡化時間を設けた後，電流を記録した。矩形波パルス（full pulse）を 2 回与え，それぞれの電流を記録した。ランダムノイズを低減するため，解析時に 2 回分の電流の平均を求めた。全データポイントを電流の経時的減少（ランダウン）で補正した。電流の経時的減少は，対照条件下で被験物質曝露と同一時間の測定を行うことにより評価した。I_{Kr} テール電流の振幅は，ベースライン電流（脱分極パルスを加える前に記録した平均電流）と，15 mV から–55 mV への再分極パルスの開始時に記録した一過性の最大電流との差として算出した。I_{Kr} テール電流振幅を細胞膜容量で除することによって電流密度を算出した。

タピナロフはいずれの評価濃度においても，I_{Kr} テール電流密度に対して統計学的に有意な阻害を示さなかった。対照条件（細胞外液）下での電流密度とタピナロフ（100.0，200.0，660.0 及び 2000.0 ng/mL）存在下の電流密度について対応のある Student の t 検定で比較したところ，設定した統計学的な有意水準（$p \leq 0.05$）を満たさなかった。

これらの結果から，タピナロフは hERG 遺伝子によりコードされ I_{Kr} 様電流を担うタンパク質に対して，2000.0 ng/mL の濃度まで相互作用を示さないと結論付けられた。

2.6.2.4.1.2 hERG 発現 HEK293 細胞で記録される hERG テール電流に対するタピナロフの作用［報告書番号 20[redacted]N170846］

（評価資料：CTD4.2.1.3-2）

hERG チャネルに対するタピナロフの作用を検討するため，hERG チャネルを安定発現させた HEK293 細胞にタピナロフを適用した際の hERG テール電流を測定した。

タピナロフ，媒体又は E-4031（対照物質）への曝露前後に，hERG テール電流振幅の最大値を測定した。本試験では，以下の処理群を設定した：タピナロフ（1 濃度あたり 3～5 細胞），0.3%（v/v）DMSO（5 細胞）及び E-4031（2 細胞）。媒体処理群では，0.3%（v/v）DMSO 適用液への約 10 分間の曝露により，対照値と比較して，hERG 電流の平均値が 12.4%減少した。媒体処理後の 2 細胞で E-4031（100 nmol/L）の作用を評価したところ，hERG 電流の平均値が，E-4031 添加前の値と比較して 87.8%阻害された。

タピナロフは，0.3%（v/v）DMSO 適用液に溶解可能な最高濃度 115.64 μmol/L（29.41 μg/mL）で最初に評価した。この最高濃度の適用後，細胞が不安定となり，細胞膜と電極との密着状態が不十分になったため，hERG 電流を記録できなかった。続いて，これより低濃度で試験を実施した。その後，濃度 0.12，0.35，1.16，3.47，11.56 及び 34.7 μmol/L（それぞれ 0.03，0.09，0.29，0.88，2.94 及び 8.83 μg/mL）のタピナロフが及ぼす影響を評価し，濃度反応関係をプロットした。阻害作用の IC_{25}，IC_{50} 及び IC_{75} 値はそれぞれ 1.72，4.02 及び 9.37 μmol/L（0.44，1.02 及び 2.38 μg/mL）と推定された。

タピナロフを一連の濃度で評価したところ，媒体処理細胞と比較して，hERG チャネルテール電流を濃度依存的に阻害することが示された。

2.6.2.4.2 *In Vivo* 安全性薬理試験

2.6.2.4.2.1 ラットへのタピナロフ皮下投与による中枢神経系の安全性薬理試験［報告書番号 20[redacted]N163789］

（評価資料：CTD4.2.1.3-3）

ラットにタピナロフを単回皮下投与し，中枢神経系に及ぼす影響を評価した。雄性 SD ラット 24 匹を 4 群にランダムに割り付けた（各群 6 匹）。各群に媒体対照（プロピレングリコール），1，3 又は 10 mg/kg のタピナロフを 0.30 mL/kg で単回皮下投与した。

投与前，並びに投与約 1，2，4，6 及び 48 時間後に，Irwin の変法による神経学的評価（ホームケージ内での観察，ハンドリングでの観察，オープンフィールドでの観察，刺激に対する反応の観察など）により認められた所見に基づき，中枢神経系に及ぼす影響を評価した。さらに，一般的な毒性指標（死亡及び一般状態変化）も記録した。

一般状態の異常及び死亡は認められなかった。いずれの動物も，計画的安楽死の時点（投与 48 時間後の Irwin 法による観察の実施後）まで生存した。10 mg/kg 群で，筋緊張の低下及び異常行動（左斜頸）が認められた。10 mg/kg 群における筋緊張の低下は遅い評価時点に多く観察されたことから，タピナロフの 10 mg/kg 投与に関連するものと考えられた。筋緊張の低下は関連する神経学的所見を伴わなかったため，生理学的意義は低いと考えられた。異常行動（左斜頸）は，10 mg/kg 群の 6 例中 1 例で投与 4，6 及び 48 時間後に認められた。左斜頸が認められたのは 10 mg/kg 群の 1 例のみであり，関連する神経学的所見を伴わなかったため，生理学的意義は低いと考えられた。Irwin の変法のその他いずれの観察項目に対しても影響は認められなかった。

2.6.2.4.2.2 ラットへのタピナロフ皮下投与によるヘッドアウト式プレチスモグラフィーを用いた呼吸系の安全性薬理試験［報告書番号 20[redacted]N163787］

（評価資料：CTD4.2.1.3-4）

ラットにタピナロフを皮下投与し，1 回換気量，呼吸数及び分時換気量を指標として呼吸系に及ぼす影響を評価した。雄性 SD ラット 32 匹を 4 群に無作為化割り付けした（各群 8 匹）。各群に媒体対照（プロピレングリコール），1，3 又は 10 mg/kg のタピナロフを 0.30 mL/kg で単回皮下投与した。

投与前日の約 2.5～2.75 時間（ベースライン），投与後の 6 時間以上，及び投与の約 46.5 時間後から約 2.7 時間にわたり，プレチスモグラフィーデータを連続収集した。プレチスモグラフィーのパラメータは，ベースライン時，投与 1～6 時間後までの 30 分ごとの平均値及び投与 48 時間後から 30 分間の平均値として解析した。さらに，一般的な毒性指標（死亡及び一般状態変化）も記録した。

一般状態の異常及び死亡は認められなかった。いずれの動物も，計画的安楽死の時点（試験 3 日目の最後のプレチスモグラフィーデータ収集後）まで生存した。1，3 又は 10 mg/kg のタピナロフ単回皮下投与は，1 回換気量，呼吸数及び分時換気量に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.2.3 モルモットへのタピナロフ経皮投与によるテレメーターを用いた心血管系に及ぼす影響の評価［報告書番号 20[redacted]N163784］

（参考資料：CTD4.2.1.3-5）

テレメーターを装着したモルモットを用いて，1%，4%及び 6%（それぞれ 20，80 及び 180 mg/kg）のタピナロフ（WBI-1001 クリーム剤）の経皮投与（雌雄各 4 匹）が心血管系に及ぼす影響を評価した。雌雄 Dunkin Hartley モルモットを，装着したテレメーターで連続モニタリングし，漸増濃度のタピナロフに曝露した（各濃度に 6 時間曝露）。血行動態の評価項目として，試験期間を通して平均動脈圧，収縮期動脈圧及び拡張期動脈圧をモニタリングした。心臓電気生理に対する本薬の影響を評価するため，心拍数，QT 間隔，QTc，QRS 幅及び PR 間隔も測定した。

6%までのタピナロフ投与による動脈圧（収縮期，平均，拡張期）に対する顕著な影響は認められなかった。6%クリーム剤への曝露早期（1～8 時間）には，大部分の時間に軽度の心拍数の上昇が認められた。塗布 6 時間後の心拍数増加（16%）は統計学的に有意であったものの，安全性上重要でないと判断された。

6%クリーム剤への曝露時間中，ごく軽度だが統計学的に有意な PR 間隔の短縮が認められた。これらの PR 間隔の変化は生理学的に重要でないと判断された。心電図の QRS 幅に対する影響はみられなかった。

6%クリーム剤では，心拍数の上昇と同時に，QT 間隔がごく軽度に短縮した（6%の短縮）。タピナロフへの曝露時間中，QTc の平均値も短縮した。QTc のうち，Van de Water の式で補正した QT 間隔はすべての濃度で統計学的に有意な短縮を示し，Bazett の式及び Fridericia の式で補正した QT 間隔は 6%クリーム剤でのみ統計学的に有意な短縮を示した。これらの変化はいずれも，安全性上重要でないと判断された。

概して，テレメーターを装着したモルモットを 6%までのタピナロフクリーム剤に曝露したとこ

ろ，心血管系に対する特記すべき影響は認められなかった。最高濃度で心拍数が軽度に変化したほか，すべての濃度でQTcの濃度非依存性の短縮が認められたが，これらの変化は有害な影響でないと判断された。したがって，本試験では，心血管系に対するタピナロフクリーム剤の無毒性量は6%であった。

2.6.2.4.2.4 覚醒下の雄ミニブタへのタピナロフ静脈内投与による心血管系に対する影響の評価 [報告書番号 20[redacted]N170119]

（評価資料：CTD4.2.1.3-6）

投与間隔を7日間とした4×4ラテン方格デザインにて，テレメーターを装着した雄Göttingenミニブタに媒体（30% w/w Captisol®/SBEbCD水溶液），並びに1，3及び10 mg/kgのタピナロフを1.0 mL/kgでそれぞれ単回急速静脈内投与した。収縮期動脈圧，拡張期動脈圧，平均動脈圧，心拍数，脈圧，QA間隔（心収縮力の指標），心電図パラメータ（PR間隔，QRS幅，QT間隔及びQTc）及び体温を，投与後24時間以上にわたり連続測定した。一般状態の異常の有無も観察した。

本薬に関連のある一般状態の異常又は死亡は認められなかった。

1，3及び10 mg/kg単回静脈内投与の0.8～4時間後に，いずれの用量でも同様に平均動脈圧の低下が認められた（8～16 mmHg又は7%～13%の低下）。3及び10 mg/kg投与の2～4時間後には，軽度のPR間隔の短縮も認められた（3～8 msec又は3%～6%の短縮）。いずれも可逆的な変化であった。

1, 3及び10 mg/kgの単回静脈内投与で，タピナロフ投与に関連すると考えられる心拍数，脈圧，QA間隔，体温，QRS幅，QT間隔，QTcに対する影響，並びに心電図の波形異常及び不整脈は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

タピナロフの薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

タピナロフはAhRとの直接的な結合やAhRの下流分子であるCYP1A1の発現誘導から，AhRに対する調節作用を有する化合物であることが明らかとなった。タピナロフはヒトPBMC及びヒト皮膚において，Th17あるいはTh2サイトカインの産生を抑制した。また，タピナロフはヒトPBMC及びヒト表皮角化細胞において，抗酸化分子の遺伝子発現を誘導することにより抗酸化作用を発現し，その作用が抗炎症作用に寄与することが示唆された。さらに，タピナロフはヒト表皮角化細胞において，FLG，INV及びHRNRの皮膚バリア機能関連分子の遺伝子発現を誘導し，皮膚バリア機能を改善する可能性が示された。

尋常性乾癬の特徴を有するマウスIL-23誘発皮膚炎モデルにおいて，タピナロフは反復経皮投与によって，耳介腫脹，耳介の組織学的変化（真皮への炎症細胞浸潤，表皮肥厚及び痂皮），耳介中IL-17A産生を抑制し，皮膚での炎症を抑制した。さらに，タピナロフは抗酸化分子であるNQO1の遺伝子発現を誘導した。皮膚炎に対する作用は，マウスIMQ誘発皮膚炎モデルにおいても同様に認められた。

AD の特徴を有するマウス DNFB 誘発皮膚炎モデルにおいて，タピナロフは反復経皮投与によって，耳介腫脹，耳介の組織学的変化（真皮への炎症細胞浸潤，表皮肥厚及び痂皮），耳介中 IL-4 産生を抑制し，皮膚での炎症を抑制した。さらに，タピナロフは抗酸化分子である NQO1 の遺伝子発現を誘導した。また，タピナロフは TEWL の増加を抑制し，皮膚バリア機能の低下を抑制した。

副次的薬理試験において，タピナロフはほとんどの標的分子に対して作用を示さない又は弱い作用しか示さなかった。AhR の他にタピナロフが作用（50%作用濃度が 1 μmol/L 以下）を示した標的分子は，Nrf2，カンナビノイド受容体（CB）2，モノアミンオキシダーゼ B（MAO-B），CYP2C9，CYP2D6 及び CYP1A2 であった。Nrf2 及び CB2 に対しては活性化，MAO-B，CYP2C9，CYP2D6 及び CYP1A2 に対しては阻害活性を示した。また，細胞の生存に対する影響は，複数の細胞種において認められ，3 μmol/L 若しくは 10 μmol/L のタピナロフによって細胞生存率が低下した。

タピナロフの安全性薬理学的影響を検討するため，一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。心血管系に及ぼす影響を，hERG 電流評価を用いた *in vitro* 試験，テレメーターを装着した Dunkin Hartley モルモット及び Göttingen ミニブタに経皮又は静脈内投与した *in vivo* 試験で検討した。SD ラットを用いた試験で，皮下投与による中枢神経系及び呼吸系に及ぼす影響を検討した。

心血管系に及ぼす影響を *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験で検討した。hERG チャネルアッセイでは，一連の濃度範囲のタピナロフを検討した。媒体処理細胞と比較して，タピナロフは hERG チャネルテール電流を濃度依存的に阻害することが示された。阻害作用の IC_{25}，IC_{50} 及び IC_{75} 値はそれぞれ 1.72，4.02 及び 9.37 μmol/L（0.44，1.02 及び 2.38 μg/mL）と推定された。IC_{50} 値は，臨床での最高血漿中濃度（C_{max}: 2.44 ng/mL，DMVT-505-2104 試験）における血漿中非結合型タピナロフ濃度（0.017 ng/mL，*in vitro* ヒト血漿蛋白結合率の 99.3%を基に算出）の 60,000 倍であった。hERG チャネル電流阻害の IC_{50} 値に対して，30 倍超の安全域が得られたことから，臨床で QTc 延長を引き起こす可能性は低いと考えられた[13]。

In vivo 試験として，モルモットへのタピナロフの経皮投与，並びにミニブタへのタピナロフの静脈内投与で検討した。テレメーターを装着したモルモット（雌雄 4 匹ずつ）にタピナロフクリーム 0%，1%，4%又は 6%を皮膚に塗布した。6%までのタピナロフを経皮投与したとき，心血管系に対する特記すべき影響は認められなかった。テレメーターを装着した雄ミニブタにタピナロフを 0，1，3 及び 10 mg/kg の用量で単回静脈内投与した。1 mg/kg 以上の用量で投与 0.8～4 時間後に平均動脈圧の可逆的な低下（8～16 mmHg 又は 7%～13%）が認められた。また，3 mg/kg 以上の用量で投与 2～4 時間後に PR 間隔の可逆的な短縮（3～8 msec 又は 3%～6%）が認められた。1，3 及び 10 mg/kg の単回静脈内投与で，本薬投与に関連すると考えられる心拍数，脈圧，QA 間隔，体温，QRS 幅，QT 間隔及び QTc に対する影響，並びに心電図の波形異常及び不整脈は認められなかった。1 及び 10 mg/kg 投与時の推定 C_{max} 値はそれぞれ 335 及び 5130 ng/mL であり（2.6.4.3.2.2.2.1 項，報告書番号：20[redacted]N163550），臨床試験でのヒト C_{max} 実測値 2.44 ng/mL と比較するとそれぞれ 137 倍及び 2102 倍であった。さらに，ミニブタの 28 日間，13 週間及び 9 ヵ月間経皮投与毒性試験においても QT 間隔に対する影響は認められなかった。以上のことから，タピ

ナロフが QTc の延長及び多形性心室頻拍（Torsades de Pointes）を誘発する可能性は低いと考えられた。

雄性 SD ラットにタピナロフを単回皮下投与し，中枢神経系及び呼吸系に及ぼす影響を評価した。中枢神経系の安全性薬理試験で 10 mg/kg で認められた筋緊張の低下（本薬に関連した変化と考えられた）及び異常行動（左斜頸：1 例のみ）を除いて，タピナロフを 10 mg/kg までの用量で皮下投与した SD ラットでは中枢神経系及び呼吸系に及ぼす重大な影響は認められなかった。これらの安全性薬理試験の結果，モルモットへの 6%クリームの経皮投与，ミニブタへの 10 mg/kg までの静脈内投与及びラットへの 10 mg/kg までの皮下投与で，タピナロフは心血管系，呼吸系及び中枢神経系に重大な影響を及ぼさないことが示された。

以上のことから，非ステロイド性の AhR 調節薬であるタピナロフは，抗炎症作用，抗酸化作用及び皮膚バリア機能改善作用を有することから，抗炎症作用を主作用とする既存の外用剤とは異なる特長を持った尋常性乾癬及び AD の治療薬になることが期待される。

2.6.2.7 図表

文章中に記載した。

2.6.2.8 参考文献

1. Bugaut H, Aractingi S. Major role of the IL17/23 axis in psoriasis supports the development of new targeted therapies. Front Immunol. 2021 Feb 25;12:621956.

2. Hawkes JE, Chan TC, Krueger JG. Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies. J Allergy Clin Immunol. 2017 Sep;140(3):645-53.

3. Yang G, Seok JK, Kang HC, Cho YY, Lee HS, Lee JY. Skin barrier abnormalities and immune dysfunction in atopic dermatitis. Int J Mol Sci. 2020 Apr 20;21(8):2867.

4. Paller AS, Silverberg JI, Cork MJ, Guttman-Yassky E, Lockshin B, Irvine AD, et al. Efficacy and safety of dupilumab in patients with erythrodermic atopic dermatitis: A Post Hoc Analysis of 6 Randomized Clinical Trials. JAMA Dermatol. 2023 Mar 1;159(3):255-66.

5. Worm M, Francuzik W, Kraft M, Alexiou A. Modern therapies in atopic dermatitis: biologics and small molecule drugs. J Dtsch Dermatol Ges. 2020 Oct;18(10):1085-92.

6. Kim BE, Leung DY. Epidermal barrier in atopic dermatitis. Allergy Asthma Immunol Res. 2012 Jan;4(1):12-6.

7. Smith SH, Jayawickreme C, Rickard DJ, Nicodeme E, Bui T, Simmons C, et al. Tapinarof is a natural AhR agonist that resolves skin inflammation in mice and humans. J Invest Dermatol. 2017 Oct;137(10):2110-9.

8. Furue M, Hashimoto-Hachiya A, Tsuji G. Aryl hydrocarbon receptor in atopic dermatitis and psoriasis. Int J Mol Sci. 2019 Oct 31;20(21):5424.

9. Song A, Lee SE, Kim JH. Immunopathology and immunotherapy of inflammatory skin diseases. Immune Netw. 2022 Feb 14;22(1):e7.

10. Guttman-Yassky E, Krueger JG. Atopic dermatitis and psoriasis: two different immune diseases or one spectrum? Curr Opin Immunol. 2017 Oct;48:68-73.

11. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. Antioxid Redox Signal. 2014 Mar 1;20(7):1126-67.

12. Baek J, Lee MG. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. Redox Rep. 2016 Jul;21(4):164-9.

13. Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, et al. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. Cardiovasc Res. 2003 Apr 1;58(1):32-45.

タピナロフ

第 2 部 CTD の概要（サマリー）
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.3 薬理試験の概要表

日本たばこ産業株式会社

目次

2.6.3 Pharmacology Tabulated Summary 3
2.6.3.1 Pharmacology Overview 3
2.6.3.1.1 List of Primary and Secondary Pharmacodynamic Studies Performed with Tapinarof 3
2.6.3.1.2 List of Safety Pharmacology Studies Conducted with Tapinarof 5
2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics 6
2.6.3.2.1 Summary of Primary Pharmacology Studies Performed with Tapinarof 6
2.6.3.3 Secondary Pharmacodynamics 10
2.6.3.3.1 Summary of Secondary Pharmacology Studies Performed with Tapinarof 10
2.6.3.4 Safety Pharmacology 12
2.6.3.4.1 Summary of Safety Pharmacology Studies Performed with Tapinarof 12

2.6.3 Pharmacology Tabulated Summary

Note: Tapinarof (JTE-061) is referred to as DMVT-505, GSK2894512A, GSK2894512 or WBI-1001 in some study reports.

2.6.3.1 Pharmacology Overview

2.6:3.1.1 List of Primary and Secondary Pharmacodynamic Studies Performed with Tapinarof

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	GLP	Report No./ Location in CTD
Primary Pharmacodynamics				
***In Vitro* Pharmacodynamics**				
Effect on AhR				
Profiling in BioMAP Phenotypic Assay Systems	Primary human cell-based assays	*In vitro*	No	20[redacted]N177130/ 4.2.1.1-1
AhR Binding	Murine and human AhR-ARNT heterodimers	*In vitro*	No	20[redacted]N258742/ 4.2.1.1-2
AhR Activation	Human PBMCs	*In vitro*	No	JTE061-PH-001/ 4.2.1.1-3
Effect on Cytokine Production				
Cytokine Production	Human PBMCs	*In vitro*	No	JTE061-PH-002/ 4.2.1.1-4
Cytokine Gene Expression	Human skin	*In vitro*	No	20[redacted]N233731_01/ 4.2.1.1-5
Effect on Antioxidant Activity				
Antioxidant Gene Expression	Human PBMCs	*In vitro*	No	JTE061-PH-001/ 4.2.1.1-3
Antioxidant-Related Gene Expression	Human primary and HaCaT immortalized keratinocytes	*In vitro*	No	20[redacted]N229880_01/ 4.2.1.1-6
Contribution of Nrf2 and AhR to Antioxidant Gene Expression (Mechanism of Action)	Human bronchial epithelial cells	*In vitro*	No	20[redacted]N231554_01/ 4.2.1.1-7
Effect on Skin Barrier Gene Expression				
Skin Barrier-Related Gene Expression	Human primary keratinocytes and reconstructed human epidermis	*In vitro*	No	20[redacted]N330920/ 4.2.1.1-8

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	GLP	Report No./ Location in CTD
***In Vivo* Pharmacodynamics**				
Effect on Dermatitis				
IL-23-Induced Dermatitis (Psoriasis)	C57BL/6J mouse	Dermal	No	JTE061-PH-004/ 4.2.1.1-9
IMQ-Induced Dermatitis (Psoriasis)	Balb/c mouse	Dermal	No	20[redacted]N230720_01/ 4.2.1.1-10
IMQ-Induced Dermatitis (Psoriasis, Mechanism of Action)	B6.129-Ahr<tm1Bra>/J -/- (AhR deficient) and B6.129-Ahr<tm1Bra>/J +/- (AhR sufficient heterozygote littermates) mouse	Dermal	No	20[redacted]N297549/ 4.2.1.1-11
DNFB-Induced Dermatitis (Atopic Dermatitis)	Balb/c mouse	Dermal	No	JTE061-PH-003/ 4.2.1.1-12
Secondary Pharmacodynamics				
Screening and Compound Profiling (SCP) Panel Assays	127 assays measuring activities of various receptors, transporters, kinases, enzymes, ion channels, nucleotide-binding, protein-protein interaction, transcription and cellular toxicity	*In vitro*	No	20[redacted]N176987/ 4.2.1.2-1
Enhanced X-screen Profiling (eXP) Panel Study	eXP	*In vitro*	No	20[redacted]N176990/ 4.2.1.2-2
Selected Targets and Panels	LTA4 hydrolase, CB1 and CB2 receptors, panel of 317 kinases, panel of 22 nuclear receptors and dermal melanophore	*In vitro*	No	20[redacted]N177110/ 4.2.1.2-3
Selected Targets and Panels	Assays for AhR (agonist, antagonist, ligand competition and binding), co-chaperon Hsp90 binding, IL-17 and IL-22 production in Th17 cell, LTB4 in PBMC and panel of 17 PDEs	*In vitro*	No	20[redacted]N233675_01/ 4.2.1.2-4
Cell Viability	Human PBMCs Human pan T and $CD4^+$ T-cells Human keratinocytes	*In vitro*	No	JTE061-PH-002/ 4.2.1.1-4 20[redacted]N163776/ 4.2.1.2-5 20[redacted]N175756/ 4.2.1.2-6 20[redacted]N230011_01/ 4.2.1.2-7 20[redacted]N230308_01/ 4.2.1.2-8

2.6.3.1.2 List of Safety Pharmacology Studies Conducted with Tapinarof

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Gender and No. per Group	Method of Administration	Dose or Concentration	Duration of Dosing	GLP	Report No./Location in CTD
Safety Pharmacology: *In Vitro*							
hERG Assay	HEK293 Cells	NA	*In vitro*	100.0, 200.0, 660.0, 2000.0 ng/mL	NA	No	20[redacted]N163780/4.2.1.3-1
hERG Assay	HEK293 Cells	NA	*In vitro*	0.03, 0.09, 0.29, 0.88, 2.94, 8.83 µg/mL	NA	Yes	20[redacted]N170846/4.2.1.3-2
Safety Pharmacology: *In Vivo*							
Central Nervous System	Rat (SD)	6M	Subcutaneous	1, 3, 10 mg/kg	Single	Yes	20[redacted]N163789/4.2.1.3-3
Respiratory System	Rat (SD)	8M	Subcutaneous	1, 3, 10 mg/kg	Single	Yes	20[redacted]N163787/4.2.1.3-4
Cardiovascular System	Guinea Pig (Dunkin Hartley)	4M/F	Dermal	1%, 4%, 6%	Single[a]	No	20[redacted]N163784/4.2.1.3-5
Cardiovascular System	Minipig (Göttingen)	4M	Intravenous (bolus)	1, 3, 10 mg/kg	Single	Yes	20[redacted]N170119/4.2.1.3-6

a. Continuous monitoring for 6 hours at each concentration.
F = female; GLP = Good Laboratory Practice; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go related gene; NA = not applicable; M = male; SD = Sprague Dawley

2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics

2.6.3.2.1 Summary of Primary Pharmacology Studies Performed with Tapinarof

Test Article: tapinarof						
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Dose**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Report Number/ Location in CTD**
Primary Pharmacodynamics						
***In Vitro* Pharmacodynamics**						
Effect on AhR						
Profiling in BioMAP Phenotypic Assay Systems	Primary human cell-based assays	*In vitro*	NA	NA	Tapinarof demonstrated the ability to modulate more than 25 biomarkers responsible for inflammatory, immune function, tissue remodeling and anti-proliferative activities, at one or more test concentrations employed in this study. FICZ demonstrated a similar profile in the current BioMAP experiment. FICZ has been proposed as a physiological ligand for AhR, suggesting that the target molecule of tapinarof was AhR.	20[redacted]N177130/ 4.2.1.1-1
AhR Binding	Murine and human AhR-ARNT heterodimers	*In vitro*	NA	NA	Tapinarof bound strongly to both murine and human AhR-ARNT heterodimers as determined by fluorescence binding and surface plasmon resonance studies.	20[redacted]N258742/ 4.2.1.1-2
AhR Activation	Human PBMCs	*In vitro*	NA	NA	Tapinarof, when applied at concentrations of 0.01, 0.1 and 1 μmol/L, significantly increased the CYP1A1 mRNA expression in human PBMCs.	JTE061-PH-001/ 4.2.1.1-3
Effect on Cytokine Production						
Cytokine Production	Human PBMCs	*In vitro*	NA	NA	Tapinarof, when applied at concentrations of 0.1, 0.3, 1, 3 and 10 μmol/L, suppressed the IL-17A and IL-4 production in human PBMCs stimulated with PHA and PMA in a concentration-dependent manner.	JTE061-PH-002/ 4.2.1.1-4
Cytokine Gene Expression	Human skin	*In vitro*	NA	NA	Tapinarof inhibited the IL-17A mRNA expression and increased the IL-22 mRNA expression in human skin.	20[redacted]N233731_01/ 4.2.1.1-5

Test Article: tapinarof						
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Dose**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Report Number/ Location in CTD**
Effect on Antioxidant Activity						
Antioxidant Gene Expression	Human PBMCs	*In vitro*	NA	NA	Tapinarof, when applied at concentrations of 0.01, 0.1 and 1 µmol/L, significantly increased the NQO1 mRNA expression in human PBMCs.	JTE061-PH-001/ 4.2.1.1-3
Antioxidant-Related Gene Expression	Human primary and HaCaT immortalized keratinocytes	*In vitro*	NA	NA	Tapinarof suppressed the AAPH-induced ROS formation in keratinocytes determined by quantitative image analysis with a ROS-sensitive fluorescent probe. Tapinarof increased the mRNA expression of two antioxidant genes: HMOX1 and NQO1 in keratinocytes.	20[redacted]N229880_01/ 4.2.1.1-6
Contribution of Nrf2 and AhR to Antioxidant Gene Expression (Mechanism of Action)	Human bronchial epithelial cells	*In vitro*	NA	NA	The activity of tapinarof was partially dependent upon both Nrf2 and AhR, as regulation of select genes, including NQO1 and HMOX1 was disrupted when expression of Nrf2 or AhR was diminished using siRNA.	20[redacted]N231554_01/ 4.2.1.1-7
Effect on Skin Barrier Gene Expression						
Skin Barrier-Related Gene Expression	Human primary keratinocytes and reconstructed human epidermis	*In vitro*	NA	NA	Tapinarof increased the CYP1A1 mRNA expression in keratinocytes and increased the expression of skin barrier genes such as involucrin, hornerin and filaggrin. These effects of tapinarof were also observed in reconstructed human epidermis, suggesting tapinarof induces expression of epidermal barrier genes in primary human keratinocytes.	20[redacted]N330920/ 4.2.1.1-8

Test Article: tapinarof						
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Dose**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Report Number/ Location in CTD**
***In Vivo* Pharmacodynamics**						
Effect on Dermatitis						
IL-23-Induced Dermatitis (Psoriasis)	Mouse C57BL/6J	Dermal	Tapinarof: 0.01%, 0.1%, 1% Dexamethasone: 0.005%	Female, 10	Tapinarof, when applied at doses of 0.01%, 0.1% and 1% in ethanol solution, prevented the ear swelling. Tapinarof also attenuated the histopathological changes (infiltration of inflammatory cells into the dermis, acanthosis and crust) in the ear skin. Tapinarof showed the increases in CYP1A1 and NQO1 mRNA expression in the ear. In addition, tapinarof reduced the IL-17A content in the ear. Dexamethasone, when applied at a dose of 0.005% in ethanol solution, prevented the ear swelling and attenuated the histopathological changes in the ear skin.	JTE061-PH-004/ 4.2.1.1-9
IMQ-Induced Dermatitis (Psoriasis)	Mouse Balb/c	Dermal	0.1%, 0.3%, 1%	Female, 6-10	Tapinarof, when applied at a concentration of 1% in ointment or 0.1%, 0.3% and 1% in ethanolic formulation, reduced epidermal thickening. Tapinarof reduced the expression of Th17 cytokines such as IL-17A and IL-17F in skin..	20[redacted]N230720_01/ 4.2.1.1-10
IMQ-Induced Dermatitis (Psoriasis, Mechanism of Action)	Mouse B6.129-Ahr<tm1Bra>/J -/- (AhR deficient) and B6.129-Ahr<tm1Bra>/J +/- (AhR sufficient heterozygote littermates)	Dermal	1%	Male and Female, ≥ 25	In AhR sufficient mice, tapinarof, when applied at a concentration of 1% in ethanolic formulation, reduced the epidermal thickening and Th17 cytokine expression. In AhR deficient mice, on the other hand, these effects of tapinarof were not observed.	20[redacted]N297549/ 4.2.1.1-11

Test Article: tapinarof						
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Dose**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Report Number/ Location in CTD**
DNFB-Induced Dermatitis (Atopic Dermatitis)	Mouse Balb/c	Dermal	Tapinarof: 0.01%, 0.1%, 1% Tacrolimus monohydorate (FK506 monohydorate): 0.1%	Female, 10	Tapinarof, when applied at doses of 0.01%, 0.1% and 1% in ethanol solution, prevented the ear swelling. Tapinarof also attenuated the histopathological changes (infiltration of inflammatory cells into the dermis, acanthosis and crust) in the ear skin. Tapinarof showed the increases in CYP1A1 and NQO1 mRNA expression in the ear. Tapinarof reduced the IL-4 levels in the ear. In addition, tapinarof suppressed the increase in transepidermal water loss (TEWL) in the ear skin. FK506 monohydorate, when applied at a dose of 0.1% in ethanol solution, prevented the ear swelling and attenuated the histopathological changes in the ear skin.	JTE061-PH-003/ 4.2.1.1-12

NA = not applicable

2.6.3.3 Secondary Pharmacodynamics

2.6.3.3.1 Summary of Secondary Pharmacology Studies Performed with Tapinarof

Test Article: tapinarof						
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Dose**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Report Number/ Location in CTD**
Screening and Compound Profiling (SCP) Panel Assays	127 assays measuring activities of various receptors, transporters, kinases, enzymes, ion channels, nucleotide-binding, protein-protein interaction, transcription, and cellular toxicity	*In vitro*	NA	NA	Nrf2 (NFE2L2) NQO-1 reporter activation, CYP2C9 inhibition, CYP2D6 inhibition, and CYP1A2 inhibition were the assays exhibiting XC_{50} < 1 µmol/L against the panel of molecular targets evaluated in this study. Tapinarof was inactive or weakly active (pXC_{50} < 5.0) in 109 of the assays described in this study.	20[redacted]N176987/ 4.2.1.2-1
Enhanced X-screen Profiling (eXP) Panel Study	eXP assay measuring 38 pharmacological targets (functional, binding, and activity assays) from 6 target classes mostly associated with clinical adverse events and/or drug side effects	*In vitro*	NA	NA	Tapinarof demonstrated activity as an AhR agonist, CB2 agonist, and monoamine oxidase B (MAO-B) inhibitor ($XC_{50} \leq 1$ µmol/L). Tapinarof demonstrated lower levels of activity (10 µmol/L > XC_{50} > 1 µmol/L) as an PXR agonist, PDE4B inhibitor, serotonin 5HT2C antagonist, norepinephrine transporter (NET) antagonist, neurokinin NK1 antagonist and OATP1B1 inhibitor.	20[redacted]N176990/ 4.2.1.2-2
Selected Targets and Panels	LTA4 hydrolase, CB1 and CB2 receptors, panel of 317 kinases, panel of 22 nuclear receptors and dermal melanophore	*In vitro*	NA	NA	Tapinarof showed $pIC_{50} \geq 5$ for STK24, pIC_{50} = 5.2 for CB1, pIC_{50} = 5.0 for CB2 and IC_{50} = 44.3 µmol/L for LTA4 hydrolase. Tapinarof reduced melanin levels in dermal melanophore. Tapinarof did not activate 22 nuclear receptors.	20[redacted]N177110/ 4.2.1.2-3
Selected Targets and Panels	Assays for AhR (agonist, antagonist, ligand competition and binding), co-chaperon Hsp90 binding, IL-17 and IL-22 production in Th17 cell, LTB4 in PBMCs and panel of 17 PDEs	*In vitro*	NA	NA	Tapinarof showed pIC_{50} = 8.5 for IL-17 production, pEC_{50} = 5.2 for LTB4 production and pEC_{50} = 4.0-4.6 for 17 PDEs. Tapinarof was full agonist for AhR (pEC_{50} = 7.9) and interacted with AhR complex in different manners from FICZ (natural ligand) and TCDD (surrogate ligand).	20[redacted]N233675_01/ 4.2.1.2-4

Test Article: tapinarof						
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Dose**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Report Number/ Location in CTD**
Cell Viability	Human PBMCs, Human pan T and $CD4^+$ T-cells, Human keratinocytes	*In vitro*	NA	NA	Tapinarof reduced the cell viability at 3 µmol/L or 10 µmol/L in several cells, such as Human PBMCs, Human pan T and $CD4^+$ T-cells and Human keratinocytes.	JTE061-PH-002/ 4.2.1.1-4 20[redacted]N163776/ 4.2.1.2-5 20[redacted]N175756/ 4.2.1.2-6 20[redacted]N230011_01/ 4.2.1.2-7 20[redacted]N230308_01/ 4.2.1.2-8

NA = not applicable

2.6.3.4 Safety Pharmacology

2.6.3.4.1 Summary of Safety Pharmacology Studies Performed with Tapinarof

Test Article: tapinarof							
Type of Study	**Species/Strain**	**Gender and No. per Group**	**Method of Administration.**	**Dose or Concentration**	**Noteworthy Findings**	**GLP**	**Report Number/Location in CTD**
In Vitro							
hERG Assay	HEK293 Cells	NA	*In vitro*	100.0, 200.0, 660.0, 2000.0 ng/mL	None of the tapinarof concentrations tested caused a statistically significant inhibition on hERG tail current density. Tapinarof did not interact with the protein encoded by the hERG gene, and responsible for the I_{Kr}-like current, at concentrations up to 2000.0 ng/mL.	No	20[redacted]N163780/ 4.2.1.3-1
hERG Assay	HEK293 Cells	NA	*In vitro*	0.03, 0.09, 0.29, 0.88, 2.94, 8.83 µg/mL	Tapinarof was found to inhibit hERG channel tail current in a concentration-dependent manner. The IC_{25}, IC_{50} and IC_{75} values were estimated to be 1.72, 4.02 and 9.37 µmol/L (0.44, 1.02 and 2.38 µg/mL), respectively.	Yes	20[redacted]N170846/ 4.2.1.3-2
In Vivo							
Central Nervous System	Rat (SD)	6M	Subcutaneous	1, 3, 10 mg/kg	No abnormal clinical signs or mortality was observed. Administration of 10 mg/kg tapinarof was associated with low body tone and unusual behavior (head tilt left, observed in a single animal). Administration of 1, 3, and 10 mg/kg tapinarof had no effect on all other observations in the modified Irwin battery.	Yes	20[redacted]N163789/ 4.2.1.3-3
Respiratory System	Rat (SD)	8M	Subcutaneous	1, 3, 10 mg/kg	Administration of 1, 3, or 10 mg/kg tapinarof, as a single subcutaneous injection, had no effect on respiratory function, as measured by tidal volume, respiration rate, and minute volume.	Yes	20[redacted]N163787/ 4.2.1.3-4

Test Article: tapinarof							
Type of Study	**Species/Strain**	**Gender and No. per Group**	**Method of Administration.**	**Dose or Concentration**	**Noteworthy Findings**	**GLP**	**Report Number/Location in CTD**
Cardiovascular System	Guinea Pigs (Dunkin Hartley)	4M/F	Dermal	1%, 4%, 6%	In general, the exposure of telemetered guinea pigs to dermal administrations of up to 6% tapinarof formulation was without notable cardiovascular effect. Slight changes in heart rate at the highest dose coupled with slight, non-dose dependent decreases in corrected QT interval across the dosing range were not considered adverse. The cardiovascular NOAEL for this study was 6% topical tapinarof.	No	20[redacted]N163784/ 4.2.1.3-5
Cardiovascular System	Minipig (Göttingen)	4M	Intravenous (bolus)	1, 3, 10 mg/kg	Single bolus doses of 1, 3 and 10 mg/kg produced reversible decreases in mean arterial blood pressure. Doses of 3 and 10 mg/kg also produced a reversible decrease in PR interval. Other than the above, doses of 1, 3, and 10 mg/kg did not produce any effects on heart rate, pulse pressure, QA interval, body temperature, QRS duration, QT interval, QTc, or any evidence of electrocardiographic waveform abnormalities or arrhythmias that are considered to be related to tapinarof treatment.	Yes	20[redacted]N170119/ 4.2.1.3-6

F = female; GLP = good laboratory practice; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go related gene; I_{Kr} = rapidly activating component of delayed rectifier potassium current; M = male; NA = not applicable; NOAEL = No observed adverse effect level; SD = Sprague Dawley