目次

1 薬理学的特性、化学構造及び製剤に関する情報 4
1.1 薬理学的特性 4
1.2 有効成分 4
1.2.1 名称 4
1.2.2 構造式 4
1.2.3 分子式 4
1.2.4 分子量 4
1.3 製剤情報 5
2 申請する効能・効果及び用法・用量 6
2.1 効能・効果 6
2.2 用法・用量 6

表目次

表 2.6.1-1　パロバロテン製剤（カプセル剤）の組成.....5

略号及び用語の説明

略語又は用語	日本語	英語
BMP	骨形成タンパク質	bone morphogenetic protein
HO	異所性骨化	heterotopic ossification
JAN	日本医薬品一般的名称	Japanese Accepted Name
MRHD	最大推奨臨床用量	maximum recommended human dose
RARγ	レチノイン酸受容体γ	retinoic acid receptor gamma
Smad	—	Suppressor of Mothers against Decapentaplegic

1　薬理学的特性、化学構造及び製剤に関する情報

1.1　薬理学的特性

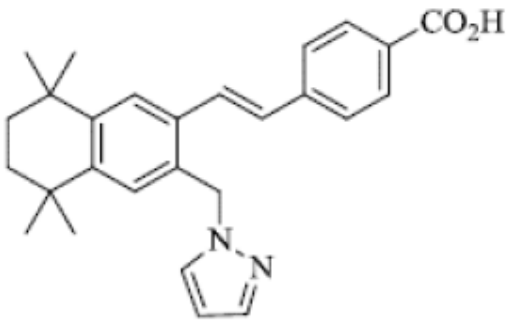
パロバロテンは経口投与可能なレチノイン酸受容体γ（RARγ）選択的アゴニストであり、筋損傷部位における肥満細胞浸潤及び線維増殖性応答を抑制する。また、パロバロテンは骨形成タンパク質（BMP）-Suppressor of Mothers against Decapentaplegic（Smad）シグナル伝達を抑制して、間葉系幹細胞の分化を軟部組織へと転換して正常な組織修復へ導くことにより、軟骨形成を強力に阻害する。パロバロテンは、損傷誘発性異所性骨化（HO）及び進行性骨化性線維異形成症動物モデルにおける HO を抑制することが示されている。

1.2　有効成分

1.2.1　名称

日本医薬品一般的名称（JAN）	パロバロテン（日本名）、Palovarotoene（英名）
化学名	4-[(1*E*)-2-{5,5,8,8-テトラメチル-3-[(1*H*-ピラゾール-1-イル)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロナフタレン-2-イル}エテニル]安息香酸
開発コード	CLM-001 RO3300074 R667 AMC09（[redacted]）、AMC11（[redacted]） RO3300074-000（[redacted]）、RO3300074-003（[redacted]） QFA01R03300074（Roche Biosciences における開発コード）

1.2.2　構造式



1.2.3　分子式

$C_{27}H_{30}N_2O_2$

1.2.4　分子量

414.54

1.3 製剤情報

パロバロテンは、5 種類の含量（1、1.5、2.5、5 又は 10 mg）で粉末として白色不透明の 0 号ゼラチン硬カプセルに充填され提供される。製剤に含まれる添加剤はいずれも[redacted]に適合している。これらの添加剤はいずれも医薬品への使用が承認されており、成人及び小児に対する安全上の懸念はない。

パロバロテン製剤（カプセル剤）の組成を表 2.6.1-1 に示す。

表 2.6.1-1　　パロバロテン製剤（カプセル剤）の組成

成分名	配合目的
パロバロテン	有効成分
乳糖水和物	賦形剤
ポビドン	結合剤
クロスカルメロースナトリウム	崩壊剤
ラウリル硫酸ナトリウム	界面活性剤
結晶セルロース	賦形剤
ステアリン酸マグネシウム	滑沢剤

2　申請する効能・効果及び用法・用量

2.1　効能・効果

パロバロテンの予定する適応症は、8 歳以上の女性又は 10 歳以上の男性の進行性骨化性線維異形成症における異所性骨化の軽減である。

2.2　用法・用量

通常、成人及び 14 歳以上の小児には、パロバロテンとして 1 日 1 回 5 mg を食事中又は食直後に経口投与する（連続投与）。フレアアップ時には 1 日 1 回 20 mg を 4 週間、その後 1 日 1 回 10 mg を 8 週間の計 12 週間食事中又は食直後に経口投与する（フレアアップ時投与）。症状が早期に消失した場合にもフレアアップ時投与を継続する。持続的な症状がある場合は 1 日 1 回 10 mg の投与を 4 週単位で延長し症状が消失するまで継続する。

8 歳以上 14 歳未満の女性及び 10 歳以上 14 歳未満の男性には、下表を参考に、患者の体重を考慮して調整した用量を食事中又は食直後に経口投与する。

14 歳未満の小児における体重による調整用量

体重	連続投与	フレアアップ時投与	
		1～4 週目	5～12 週目
10 kg 以上 20 kg 未満	2.5 mg	10 mg	5 mg
20 kg 以上 40 kg 未満	3 mg	12.5 mg	6 mg
40 kg 以上 60 kg 未満	4 mg	15 mg	7.5 mg
60 kg 以上※	5 mg	20 mg	10 mg

※成人及び 14 歳以上の小児には 60 kg 以上に対する用量を投与する。

目次

1 まとめ 6
2 効力を裏付ける試験 9
2.1 *In vitro* 薬理試験 10
2.1.1 受容体結合親和性及び転写活性化能 10
2.1.2 RARγ アゴニストによる Smad シグナル伝達阻害作用 11
2.1.3 RARγ アゴニストの細胞分化に対する作用 14
2.2 *In vivo* 薬理試験 17
2.2.1 損傷誘発性マウス HO モデル 17
2.2.2 自然発症マウス HO モデル 27
3 副次的薬理試験 29
4 安全性薬理試験 30
4.1 CNS 30
4.2 心血管系 31
4.2.1 *In vitro* 試験 31
4.2.2 *In vivo* 試験 32
4.3 呼吸系 33
4.4 腎・泌尿器系 34
4.5 胃腸管系 34
4.6 代謝物の安全性薬理試験 35
5 薬力学的薬物相互作用試験 36
6 考察及び結論 37
7 図表 38
参考文献 39

表目次

表 2.6.2-1　パロバロテン及び主要代謝物の RAR に対する結合親和性及び転写活性化能 11

表 2.6.2-2　R206H 変異ヒト FOP 線維芽細胞株における pSmad1/5 タンパク質発現量に対するパロバロテンの作用（ウェスタンブロット法による半定量的解析） 13

表 2.6.2-3　FOP 患者及びマウス HO モデルの臨床的及び遺伝的特徴の比較 17

表 2.6.2-4　Q207D 変異マウスに損傷 3 又は 7 日後からパロバロテン 2 週間投与を開始したときの投薬終了時の HO 容積（microCT 解析） 20

表 2.6.2-5　パロバロテンを投与した Q207D 変異マウスにおける筋損傷 2 週間後の HO 容積（microCT 解析） 22

表 2.6.2-6　副腎皮質ホルモンを投与した Q207D 変異マウスにおける筋損傷 2 週間後の HO 容積（microCT 解析） 24

表 2.6.2-7　各種投与レジメンでパロバロテンを投与した Q207D 変異マウスにおける筋損傷 2 週間後の HO 容積及び大腿骨長 25

表 2.6.2-8　安全性薬理試験の一覧 30

表 2.6.2-9　パロバロテンの主要代謝物による hERG カリウム電流阻害 35

図目次

図 2.6.2-1　BMP2 処理 ATDC5 細胞に対する RARγ アゴニストの Smad リン酸化抑制作用 12

図 2.6.2-2　R206H 変異ヒト FOP 線維芽細胞株における pSmad1/5 タンパク質発現量に対するパロバロテンの作用（ウェスタンブロット法による半定量的解析） 14

図 2.6.2-3　BMP2 による ATDC5 細胞の軟骨細胞分化に対する RARγ アゴニストの阻害作用 15

図 2.6.2-4　BMP2 による MSC 骨格形成能に対する RARγ アゴニストの作用 16

図 2.6.2-5　BMP 移植マウスモデルにおける各種レチノイドの HO 形成阻害作用 18

図 2.6.2-6　RARγ アゴニスト作用の特異性 19

図 2.6.2-7　Q207D 変異マウスに損傷 4 日前からパロバロテン 2 週間投与を開始したときの HO 形成阻害作用 21

図 2.6.2-8　Q207D 変異マウスでの HO 形成阻害作用に対するパロバロテンの用量反応関係 23

図 2.6.2-9　パロバロテンを投与した R206H 変異マウス FOP モデルにおける筋損傷後 2 週間時点での microCT 解析 27

略号及び用語の説明

略語又は用語	日本語	英語
ACVR1	アクチビン A 受容体 1 型	activin A receptor, type 1
Adeno-Cre	Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス	adenovirus expressing Cre recombinase
ALK2	アクチビン受容体様キナーゼ 2	activin receptor-like kinase 2
ALP	アルカリホスファターゼ	alkaline phosphatase
$APD_{60/90}$	60／90%再分極時の活動電位持続時間	action potential duration at 60/90% repolarization
AUC	濃度－時間曲線下面積	area under the concentration versus time curve
AUC_{0-24}	投与 0 から 24 時間後までの濃度－時間曲線下面積	area under the concentration versus time curve from time 0 to 24 hours post-dose
BHA	ブチルヒドロキシアニソール	butylated hydroxyanisole
BHT	ブチルヒドロキシトルエン	butylated hydroxytoluene
BMP	骨形成タンパク質	bone morphogenetic protein
ca	構成的活性型	constitutively active
CHO	チャイニーズハムスター卵巣	Chinese hamster ovary
CLM-001	パロバロテンの開発コード（別称：RO3300074、R667、RO3300074-000 及び RO3300074-003）	developmental code of palovarotene (other names: RO3300074, R667, RO3300074-000 and RO3300074-003)
C_{max}	最高血漿中濃度	maximum plasma concentration
CNS	中枢神経系	central nervous system
COPD	慢性閉塞性肺疾患	chronic obstructive pulmonary disease
EC_{50}	50%有効濃度	concentration at half-maximum response
ECG	心電図	electrocardiogram
ED_{50}	50%有効用量	dose at half-maximum response
E_{max}	最大効果	maximum effect
FOP	進行性骨化性線維異形成症	fibrodysplasia ossificans progressiva
GFP	緑色蛍光タンパク質	green fluorescent protein
HED	ヒト等価用量	human equivalent dose
HEK	ヒト胎児腎	human embryonic kidney
hERG	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子	human ether-à-go-go-related gene
HO	異所性骨化	heterotopic ossification
IC_{50}	50%阻害濃度	half-maximal inhibitory concentration
K_i	阻害定数	inhibition constant
KO	ノックアウト	knockout
M1a/b	パロバロテンの 6,7 位水酸化体（識別コード：RO3305642/RO3308507）	6,7-dihydroxy metabolite of palovarotene (RO3305642/RO3308507)
M2	パロバロテンの 6 位水酸化体（識別コード：RO3304835）	6-hydroxy metabolite of palovarotene (RO3304835)

略号及び用語の説明（続き）

略語又は用語	日本語	英語
M3	パロバロテンの 7 位水酸化体（識別コード：RO3305210）	7-hydroxy metabolite of palovarotene (RO3305210)
M4a	パロバロテンの 6 位オキソ体（識別コード：RO3304974）	6-oxo metabolite of palovarotene (RO3304974)
M4b	パロバロテンの 7 位オキソ体（識別コード RO3305659）	7-oxo metabolite of palovarotene (RO3305659)
microCT	マイクロコンピュータ断層撮影法	microcomputed tomography
MO	多発性骨軟骨腫	multiple osteochondromas
MRHD	最大推奨臨床用量	maximum recommended human dose
MSC	間葉系幹細胞	mesenchymal stem cells
OC	オステオカルシン	osteocalcin
pSmad	リン酸化 Smad	phosphorylated Smad
RA	全トランス型レチノイン酸	all-trans retinoic acid
RAR (α/β/γ)	レチノイン酸受容体（α/β/γ）	retinoic acid receptor (alpha/beta/gamma)
SEAP	分泌型アルカリホスファターゼ	secreted alkaline phosphatase
Smad	—	Suppressor of Mothers against Decapentaplegic
TK	トキシコキネティクス	toxicokinetics
WT	野生型	wild-type

1　まとめ

パロバロテン（開発コード：CLM-001）は、経口投与可能なレチノイン酸受容体（RAR）γ選択的アゴニストであり、進行性骨化性線維異形成症（FOP）の治療薬として開発された。

FOP は疼痛を伴う反復性の軟部組織腫脹（フレアアップ）並びに筋肉、腱及び靭帯における異所性骨形成を特徴とする、非常に稀で、重度の機能障害をもたらす遺伝子疾患である。FOP は小児期から成人期を通して進行し、小児期にかなりの身体障害が生じる（Kaplan 2018）。FOP はアンメット・メディカル・ニーズの高い疾患である。

FOP は、骨形成タンパク質（BMP）I 型受容体であるアクチビン A 受容体 1 型（ACVR1）／アクチビン受容体様キナーゼ 2（ALK2）をコードする ACVR1/ALK2 遺伝子の単一の機能獲得型変異により生じる（Kaplan 2009）。ACVR1/ALK2 遺伝子の機能獲得型変異（最も典型的な変異は R206H）により、BMP-Suppressor of Mothers against Decapentaplegic（Smad）1/5/8 シグナル伝達経路の異常な活性化を介して軟骨形成及び異所性骨形成が促進されることで、正常な損傷修復機序による結合組織（筋肉、腱及び靭帯）の再生が妨げられる（Kaplan 2012）。FOP では、骨化性筋炎としても知られる異所性骨化（HO）が、炎症及び組織破壊からなる異化期とそれに続く組織形成からなる同化期の 2 段階で進行する（Shore 2010）。

成人及び小児（8 歳以上の女性及び 10 歳以上の男性）の FOP における HO の軽減を目的として、パロバロテンを 1 日 1 回経口投与する。成人及び 14 歳以上の小児における連続投与では 5 mg/日を投与する。フレアアップ時には用量を増量する。最大推奨臨床用量（MRHD）は 20 mg/日であり、14 歳未満の小児には体重により調節した用量を投与する。

効力を裏付ける試験では、パロバロテンとその主要代謝物の RAR に対する結合親和性及び RAR を介する転写活性化能の評価、パロバロテンの軟骨形成及び HO 形成に対する作用機序の解明、並びに損傷誘発性及び自然発症マウス HO／FOP モデルにおけるパロバロテンの有効性評価を目的とした *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。

- 受容体結合試験及び細胞を用いた転写活性化試験において、パロバロテンは RARα 又は RARβ と比較して RARγ に選択的であることが示された。転写活性化試験において、主要代謝物の転写活性化能の程度はパロバロテンの 1.2%～14%であった。またパロバロテンの 6 位水酸化体（M2）、7 位水酸化体（M3）、6 位オキソ体（M4a）及び 7 位オキソ体（M4b）は RARγ に選択的な活性を示した。
- 細胞を用いた *in vitro* 試験及び BMP 移植マウス HO モデルにおいて、パロバロテンは軟骨細胞の分化に加えて、軟骨形成細胞での BMP2 を介した Smad シグナル伝達を抑制した。パロバロテンは ALK2 活性化変異（R206H）を有する FOP 患者由来の線維芽細胞株での BMP4 を介した Smad シグナル伝達を抑制した。
- 複数の損傷誘発性マウス HO／FOP モデルを用いてパロバロテンの効力を評価した。パロバロテンはいずれのモデルに対しても用量依存的な HO 形成阻害作用を一貫して示し、全ての損傷条件において HO を最大限阻害するには、ヒト等価用量（HED）換算で 20 mg/日が必要であることが示唆された。パロバロテンは、早期の HO 部位で認められる炎症反応及び線維増殖性反応を抑制した。さらに、溶媒投与群では HO 部位

の関節可動域が制限されたが、パロバロテン投与群では維持された。自然発症 HO や母趾奇形など FOP 患者で認められる特徴的な表現型の多くを再現したマウス FOP モデルに対しても、パロバロテンは HO 形成阻害作用を示した。

副次的薬理試験では、潜在的オフターゲット作用を評価するため、受容体及び酵素のスクリーニング試験を実施した。

- パロバロテンの 75 種類の受容体に対する結合親和性及び 24 種類の酵素活性に対する阻害作用を 10 µmol/L（4146 ng/mL）の濃度で評価した。受容体結合試験では、アデノシン A3 受容体、末梢型ベンゾジアゼピン受容体及びオピオイド δ 受容体に対する親和性［50%阻害濃度（IC_{50}）= 1.85～3.94 µmol/L］並びに酵素阻害試験では、5 種類の酵素活性に対する弱い阻害作用（14%～31%）のみが意味のある結果であった。母集団薬物動態解析において、パロバロテンの MRHD（20 mg）を体重補正用量で 1 日 1 回投与したときの最高血漿中濃度（C_{max}）の体重層別の中央値は 138～202 ng/mL（0.333～0.487 µmol/L）であることが示されている（2.7.2.3.4 項）。これらのデータに基づくと、受容体結合及び酵素阻害試験の結果から、パロバロテンがオフターゲット薬理活性によりヒトで有害作用を引き起こす可能性は低いことが推察された。

パロバロテンの安全性薬理試験では、中枢神経系（CNS）、心血管系、腎・泌尿器系及び胃腸管系に対する影響を評価した。呼吸系に対する影響を評価する独立した安全性薬理試験は実施しなかったが、反復投与毒性試験の一部として、呼吸系に対する潜在的な影響を検討した。また、代謝物の安全性薬理試験として、*in vitro* ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）試験を実施した。代謝物の安全性薬理作用は、主要代謝物（M2 又は M3 単独又は M2 及び M3 の混合物）のラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験においても検討した。

- ラットを用いた Irwin 法による CNS への影響を評価する安全性薬理試験では軽度な下痢（軟便）が認められたのみであり、パロバロテン投与による行動評価への影響は認められなかった。
- パロバロテンとその主要代謝物（M2、M3、M4a 及び M4b）を用いた *in vitro* hERG 試験及びパロバロテンのイヌ心プルキンエ線維試験では、臨床的に意義のある濃度で、パロバロテン又は主要代謝物の心血管系に対する潜在的な有害作用は示されなかった。
- 覚醒イヌを用いた 2 つの *in vivo* テレメトリー試験において、心拍数、心調律、血圧又は心電図（ECG）パラメータ（補正 QT 間隔など）への影響は認められなかった。
- 呼吸系への影響を評価する独立した安全性薬理試験は実施しなかったが、ラット、ウサギ及びイヌを用いた反復投与毒性試験並びに幼若ラットを用いた試験の一般状態観察において、呼吸機能への影響を示唆する所見は認められていない。
- ラットを用いた腎機能に関する安全性薬理試験において、尿中電解質排泄の低値が認められたが、臨床的に意義のある変化ではなかった。

- ラットを用いた胃腸管系機能検討試験において、パロバロテンの単回経口投与により胃排出がわずかに遅延したが（胃内容物重量の高値）、腸管運動への影響はみられなかった。
- パロバロテンの代謝物を用いた反復投与毒性試験では、一般状態観察、ECG 検査、血液生化学的検査及び尿検査において主要代謝物の神経系、心血管系、呼吸系、腎・泌尿器系及び胃腸管系に対する影響を示唆する変化は認められなかった。

以上、一連の *in vitro* 及び *in vivo* 薬力学試験において、パロバロテンは RARγ に選択的で、各種 FOP モデルでの HO 形成を効果的に阻害することが示され、パロバロテンが FOP 患者に対して有効性を示す可能性が裏付けられた。

パロバロテン又はその主要代謝物の安全性薬理試験及び反復投与毒性試験の結果から、パロバロテン及び主要代謝物のいずれについても、CNS、心血管系、呼吸系、腎・泌尿器系及び胃腸管系に有害な影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

2　効力を裏付ける試験

FOP は、BMP I 型受容体である ACVR1（別名 ALK2）をコードする遺伝子の単一機能獲得型変異により生じる稀な遺伝性疾患である（Kaplan 2009）。ALK2 変異は、BMP4 及びアクチビン A などの BMP リガンド結合に対する反応を促進させ、基礎活性（リガンド非結合時の活性）を増強する（Lin 2019）。FOP 発症における BMP リガンドの役割は完全には明らかになっていないが、ALK2 活性又はシグナル伝達の増強により Smad タンパク質（Smad1/5/8）と呼ばれる下流エフェクターのリン酸化が一過性に増加すると、間葉系幹細胞（MSC）の軟骨分化が促進し、FOP のモデル細胞及び動物で HO が形成されることが明らかとなっている（Kaplan 2012）。複数の試験において、FOP での ALK2 活性化変異及び BMP シグナル伝達経路の調節不全により、正常な損傷応答及び修復機序が筋再生ではなく骨形成へと転換されることが示唆されている（Shore 2010、Chakkalakal 2012、Convente 2018、Bentzinger 2013）。

FOP の HO は、炎症及び組織破壊からなる異化期と、それに続く成熟した異所性骨を生じる組織形成からなる同化期の 2 段階で進行する（Shore 2010）。異化期での肥満細胞の浸潤（Gannon 1998、Gannon 2001）は、正常組織と比較して FOP 病変の近傍で 40～50 倍多いと推定されている（Gannon 2001）。肥満細胞は FOP マウスモデルでの炎症及び筋組織損傷の重要な要素であり、同モデルで肥満細胞の浸潤又は活性を阻害すると、線維増殖及び HO 形成が抑制される（Convente 2018）。肥満細胞の持続的な動員及び凝集は HO 形成に重要な役割を果たしており、正常な損傷応答及び修復機序による筋再生（筋形成）を阻害することが示されている（2.2.1.3 項、Convente 2018、Gannon 2001）。FOP で認められる異所性骨は正常な骨形成と同じ機序で形成され、MSC の動員、増殖、軟骨細胞への分化、軟骨の成熟・肥大、及び軟骨内骨への移行によって生じる（Kaplan 1993）。

RARγ は他の RAR サブタイプと比較して、軟骨形成細胞（Weston 2003）及び軟骨細胞（Koyama 1999）に選択的に高発現し、リガンド非存在下では転写抑制因子として機能する（Williams 2009）。HO 形成阻害薬としてのレチノイドの開発は、レチノイドシグナル伝達が軟骨形成を強力に阻害すること（Pacifici 1980）、軟骨細胞分化にはリガンド非存在下での RAR の転写抑制活性が必要であること（Weston 2003、Weston 2002）を示す知見に基づいている。

パロバロテンの薬理作用を一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験で評価した。*In vitro* 試験では、パロバロテンとその主要代謝物について受容体結合試験及び転写活性化試験を実施した。パロバロテンの *in vivo* 薬理作用は、損傷誘発性マウス HO モデル 3 種［BMP 移植モデル、構成的活性型（ca）ACVR1/ALK2（Q207D）変異を導入したトランスジェニックモデル及びヒト ALK2（R206H）変異を導入したコンディショナルノックインマウスモデル］及び自然発症 HO や母趾奇形など FOP 患者で認められる表現型の特徴の多くを再現したマウス FOP モデル（Prrx1-R206H）を用いて評価した。

2.1 *In vitro* 薬理試験

パロバロテンとその主要代謝物について、RARα、RARβ 及び RARγ に対する結合親和性及び転写活性化能を評価した。MSC、ヒト FOP 線維芽細胞及び十分に確立された軟骨内骨化の *in vitro* モデルである軟骨形成細胞株（ATDC5）を用いて、RARγ アゴニストの HO 形成阻害作用機序を *in vitro* で明らかにした（Newton 2012）。試験結果を以下の項に示す。

2.1.1 受容体結合親和性及び転写活性化能

At 7801 試験、添付資料番号：4.2.1.1.1

パロバロテン及び 6 つの主要代謝物について、RARα、RARβ 及び RARγ に対する受容体結合親和性及び転写活性化能を評価した（パロバロテンの代謝に関する詳細については、2.6.4.5 項を参照のこと）。

パロバロテンの各 RAR のリガンド結合ドメイン（大腸菌を用いて生成、Apfel 1992）に対する結合親和性を、放射性標識した全トランス型レチノイン酸（RA）を用いた競合アッセイにより評価した（Apfel 1992）。RARγ、RARα 及び RARβ に対するパロバロテンの IC_{50} 値はそれぞれ 450、4700 及び 2900 nmol/L で、RARγ に対する結合選択性は RARα の 10 倍、RARβ の 6 倍であった（表 2.6.2-1）。パロバロテンは RARγ に選択的なレチノイドアゴニストであることが示された。

レチノイド機能活性の指標として、パロバロテンの各 RAR を介した転写活性化能を、細胞を用いた分泌型アルカリホスファターゼ（SEAP）レポーター遺伝子アッセイ（Apfel 1992）により評価した。パロバロテンの RARγ、RARα 及び RARβ を介する転写活性化能の 50%有効濃度（EC_{50}）値はそれぞれ 8.1、94.2 及び 25.0 nmol/L で、RARγ に対する選択性は RARα の 12 倍、RARβ の 3 倍以上であった（表 2.6.2-1）。また、パロバロテンの 6 つの主要代謝物［6,7 位水酸化体（M1a 及び M1b）、M2、M3、M4a 及び M4b］についても、転写活性化能を評価した。M1a 及び M1b の転写活性化能は検出下限に近く、受容体に選択的ではなかった。一方、M2、M3、M4a 及び M4b は、RARγ に選択的な部分アゴニスト活性を示した。主要代謝物 M2、M3、M4a 及び M4b の RARγ を介した転写活性化能の程度は、パロバロテンのそれぞれ 1.2%、1.7%、14%及び 4.2%であった（表 2.6.2-1）。

表 2.6.2-1　　パロバロテン及び主要代謝物の RAR に対する結合親和性及び転写活性化能

	Binding IC_{50} (nmol/L)			Transactivation EC_{50} (nmol/L)			
Compound	**RARα**	**RARβ**	**RARγ**	**RARα**	**RARβ**	**RARγ**	**RARγ (% Parent)**
Palovarotene	4700	2900	450	94.2	25.0	8.1	N/A
M1a	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	<0.1
M1b	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	7498	0.1
M2	>10000	>10000	>10000	6846	7919	659	1.2
M3	>10000	10000	>10000	6760	2453	469	1.7
M4a	5380	>10000	2730	492	277	56	14
M4b	>10000	>10000	6700	1121	391	191	4.2

Source: Report At 7801 ([redacted] results).
EC_{50}=concentration at half-maximum response; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; M1a/b=6,7-dihydroxy metabolite; M2=6-hydroxy metabolite; M3=7-hydroxy metabolite; M4a= 6-oxo metabolite; M4b=7-oxo metabolite; N/A=not applicable; RAR=retinoic acid receptor.

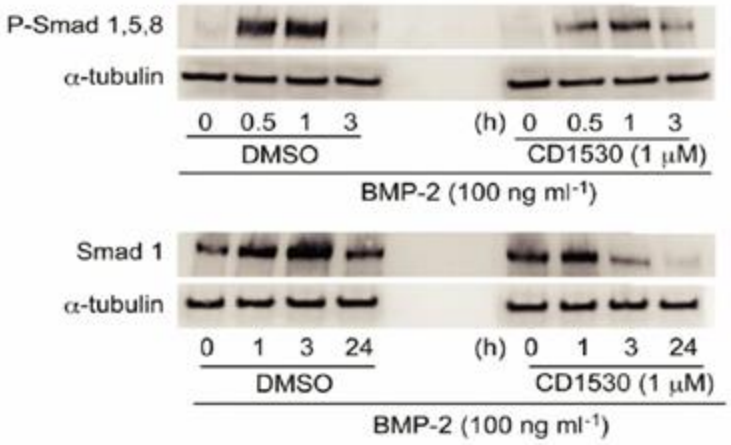
2.1.2　　RARγ アゴニストによる Smad シグナル伝達阻害作用

CLM001-PD-001 試験、添付資料番号：4.2.1.1.2

RARγ アゴニストである CD1530 及びパロバロテンは、BMP 移植マウス HO モデルに対して同様の効果を示し、同クラス化合物の異所性骨形成抑制作用を評価する研究で使用されている。BMP は Smad タンパク質（Smad1、Smad5 及び Smad8）と呼ばれる下流エフェクターの一過性のリン酸化により、ALK 受容体を介してシグナル伝達する（Massagué 1998）。

RARγ アゴニストの HO 形成阻害作用機序を明らかにするため、RARγ アゴニストの存在／非存在下で、ATDC5 培養細胞を組換え BMP2 で処理した（Shimono 2011）。図 2.6.2-1 に示すように、CD1530 で処理した細胞において、リン酸化 Smad（pSmad）タンパク質発現量は 80%以上減少した。これに伴い、Smad1 タンパク質発現量は経時的に著しく減少した。また、RARγ アゴニストで処理した細胞では Smad5 及び調節性の Smad4 タンパク質発現量も同様に減少した。Smad タンパク質発現量の減少は、タンパク質分解への切り替えによるものかを検討するため、プロテアソーム阻害剤の存在／非存在下で、ATDC5 細胞を RARγ アゴニストで処理した。予想通り、RARγ アゴニストによる Smad1 タンパク質発現量の減少は、プロテアソーム阻害剤により抑制された。

図 2.6.2-1　　BMP2 処理 ATDC5 細胞に対する RARγ アゴニストの Smad リン酸化抑制作用



Source: Figure 4b from Shimono 2011
Western blot semi-quantification of Smad1/5/8 phosphorylation levels and overall amount of Smad1 after normalization for equal α-tubulin amounts. BMP-2 (BMP2)=bone morphogenetic protein 2; CD1530=RARγ agonist; DMSO=dimethyl sulfoxide; P-Smad=phosphorylated Smad; RAR=retinoic acid receptor; Smad=Suppressor of Mothers against Decapentaplegic.

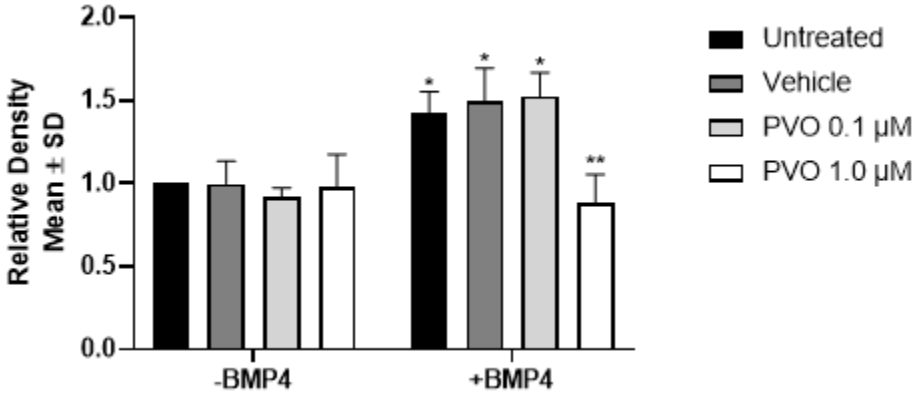
また、R206H 変異ヒト FOP 線維芽細胞株を用いて、pSmad タンパク質発現量に対するパロバロテンの影響を評価した（CLM001-PD-001 試験）。組換え BMP4（100 ng/mL）存在／非存在下で 30 分間処理する前に、溶媒又はパロバロテン（0.1 及び 1 µmol/L）で細胞を 10 分間前処理した。ウェスタンブロット法による半定量的解析結果から、パロバロテン（1 µmol/L）処理細胞では、溶媒処理細胞と比較して、BMP4 誘導 pSmad1/5 タンパク質発現量が統計学的に有意に低下（41%阻害）することが示された（表 2.6.2-2 及び図 2.6.2-2）。BMP4 による pSmad1/5 タンパク質発現量の増加はパロバロテン（1 µmol/L）の前処理で抑制されたが、pSmad1/5 タンパク質の基礎発現量は影響されず、パロバロテン 1 µmol/L 投与群（BMP4 存在／非存在下）及び溶媒投与群（BMP4 非存在下）で同様であった。パロバロテン 0.1 µmol/L では、pSmad1/5 タンパク質発現量に対する抑制作用は認められなかった。

表 2.6.2-2　R206H 変異ヒト FOP 線維芽細胞株における pSmad1/5 タンパク質発現量に対するパロバロテンの作用（ウェスタンブロット法による半定量的解析）

	pSmad1/5 protein expression level[a]					
	Study 1	Study 2	Study 3	Mean		
Treatment	Relative density	Relative density	Relative density	Relative density	%Diff[b]	% Diff[c]
Without BMP4						
Untreated	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	N/A	N/A
Vehicle	1.0552	0.8436	1.0959	0.9982	0	N/A
Palovarotene 0.1 µmol/L	0.9747	0.8606	0.9180	0.9178	-8	N/A
Palovarotene 1.0 µmol/L	1.2022	0.8204	0.9024	0.9750	-2	N/A
With BMP4						
Untreated	1.4692	1.5260	1.2825	1.4259	43*	N/A
Vehicle	1.5248	1.2867	1.6813	1.4976	50*	0
Palovarotene 0.1 µmol/L	1.6711	1.3854	1.5225	1.5263	53*	2
Palovarotene 1.0 µmol/L	1.0816	0.7635	0.7912	0.8788	-12	-41**

Source: Report CLM001-PD-001
a　pSmad1/5 protein expression level normalized to GAPDH and relative to untreated/without BMP4 group.
b　% Diff=(Palovarotene-Vehicle$_{\text{without BMP4}}$)/Vehicle$_{\text{without BMP4}}$ *100.
c　% Diff=(Palovarotene-Vehicle$_{\text{with BMP4}}$)/Vehicle$_{\text{with BMP4}}$ *100.
*　Statistically significant ($p<0.05$) compared to vehicle$_{\text{without BMP4}}$ group. Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.
**　Statistically significant ($p<0.05$) compared to vehicle$_{\text{with BMP4}}$ group. Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.
ANOVA=analysis of variance; BMP4=bone morphogenetic protein 4; Diff=difference; FOP=fibrodysplasia ossificans progressiva; GAPDH=glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; N/A=not applicable; pSmad=phosphorylated Smad; Smad=Suppressor of Mothers against Decapentaplegic

図 2.6.2-2　R206H 変異ヒト FOP 線維芽細胞株における pSmad1/5 タンパク質発現量に対するパロバロテンの作用（ウェスタンブロット法による半定量的解析）



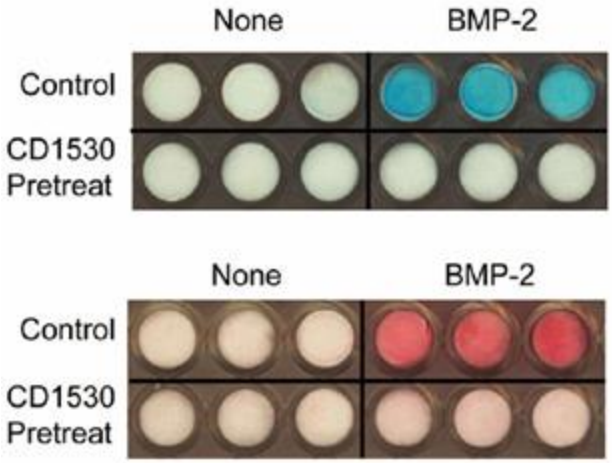
Source: Report CLM001-PD-001
pSmad1/5 protein expression level normalized to GAPDH and relative to untreated -BMP4 group.
*　Statistically significant ($p<0.05$) compared to $vehicle_{without\ BMP4}$ group. Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.
**　Statistically significant ($p<0.05$) compared to $vehicle_{with\ BMP4}$ group. Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.
ANOVA=analysis of variance; BMP4=bone morphogenetic protein 4; GAPDH=glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; pSmad=phosphorylated Smad; SD=standard deviation; Smad=Suppressor of Mothers against Decapentaplegic; PVO=palovarotene.

2.1.3　RARγ アゴニストの細胞分化に対する作用

Smad シグナル伝達と軟骨形成に明らかな関連性があること（Haas 1999、Yoon 2005、Song 2009）、RARγ アゴニストにより pSmad1/5/8 及び Smad1/4/5 タンパク質発現量が抑制されること（2.1.2 項）から、RARγ アゴニストに曝露された前駆細胞は、BMP を介した系統決定及び骨格形成能を失うのかについて検討した（Shimono 2011）。

ATDC5 単層細胞を RARγ アゴニスト CD1530（1 µmol/L）又は溶媒で 2 日間処理し、細胞を剥離、洗浄し、組換え BMP2（100 ng/mL）存在／非存在下、培養液中で増殖させ、軟骨細胞分化を評価した。BMP2 存在下、溶媒処理細胞では、軟骨細胞分化を示唆するアルシアンブルー及びアルカリホスファターゼ（ALP）の強度な染色、軟骨基質の蓄積、並びに軟骨細胞の成熟が認められたが、RARγ アゴニスト処理細胞では認められなかった（図 2.6.2-3）。また、R206H 変異前駆細胞の亜集団において、パロバロテンはアクチビン A による軟骨細胞分化を阻害することが示されている（Lees-Shepard 2018）。

図 2.6.2-3　　BMP2 による ATDC5 細胞の軟骨細胞分化に対する RARγ アゴニストの阻害作用

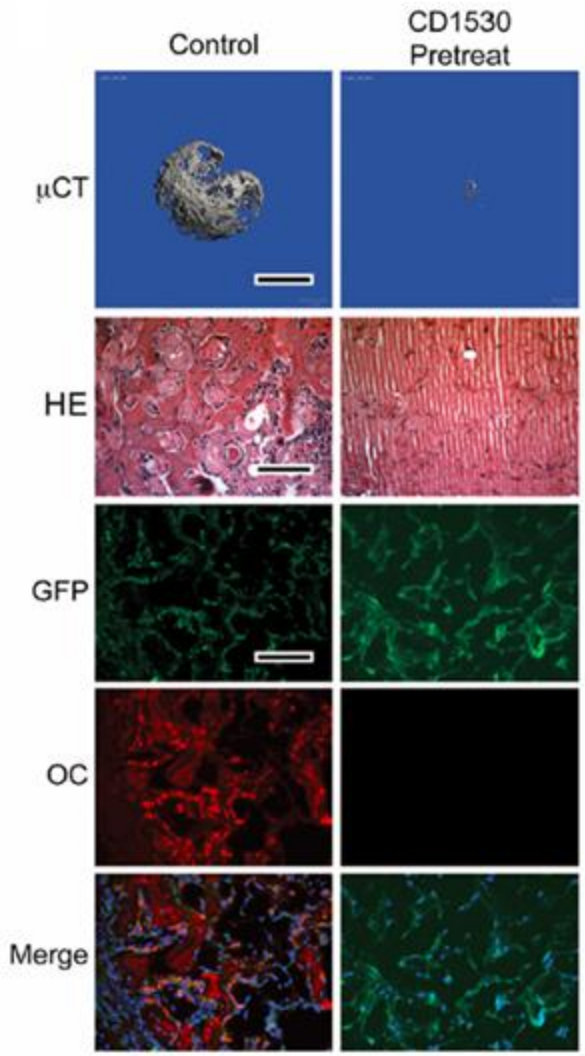


Source: Figure 5a and 5b from Shimono 2011
Alcian blue (upper panel) and alkaline phsophatase (lowe panel) staining of ATDC5 cells.
BMP2=bone morphogenetic protein 2; CD1530=RARγ agonist; RARγ=retinoic acid receptor gamma.

また、骨髄由来 MSC を用いた同様の試験でも、組換え BMP2 による軟骨細胞分化が対照細胞では認められたが、RARγ アゴニスト CD1530 処理細胞では認められなかった。さらに、イムノブロット分析でも CD1530 で 12 時間処理した MSC において Smad1 及び Smad4 の定常状態濃度の低下が確認された。

In vivo でも骨格形成能の喪失が認められるかを評価するため、H2K プロモーターの制御下で緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現するレポーターマウス系統から MSC を採取した。RARγ アゴニスト CD1530 存在／非存在下で細胞を 2～3 日間増殖させ、組換え BMP2 マトリゲルと混合してヌードマウスに皮下移植した。移植細胞は GFP を発現するため、宿主細胞との識別が容易であった。溶媒処理 MSC を移植したマウスでは、2 週間後に多数の GFP 及びオステオカルシン（OC）陽性細胞を含有する軟骨内骨の塊が認められた。GFP 発現 MSC が OC 陽性細胞と共存したことから、骨産生細胞は異種起源であることが示唆された。一方、RARγ アゴニスト処理 MSC を移植したマウスでは、多数の GFP 陽性細胞が存在したにもかかわらず、異所性骨形成は認められず、OC 染色は陰性であった（図 2.6.2-4）。

図 2.6.2-4　　BMP2 による MSC 骨格形成能に対する RARγ アゴニストの作用



Source: Figure 5f from Shimono 2011
Masses of HO were analyzed by μCT, HE staining, OC immunostaining and GFP fluorescence signal. Merged images of GFP and OC images are shown at the bottom. Bar in top panel, 5.0 mm; bar in second panel, 250 μm; and bar in third panel, 150 μm.
BMP2=bone morphogenetic protein 2; CD1530=RARγ agonist; GFP=green fluorescent protein; HE=hematoxylin & eosin; HO=heterotopic ossification; MSC=mesenchymal stem cell; OC=osteocalcin; RARγ=retinoic acid receptor gamma; μCT=microcomputed tomography.

上記 RARγ アゴニストの HO 阻害に関する *in vitro* 活性は、*in vivo* 試験でも評価した（2.2 項）。

これらの結果から、パロバロテンを含む RARγ アゴニストは、BMP2 による軟骨形成及び HO を強力に阻害することが示唆される。RARγ アゴニストは、Smad リン酸化の阻害及びプロテアソームによる Smad タンパク質分解の促進により Smad シグナル伝達を阻害し、MSC の骨格形成細胞への分化を転換させる。このことは、マウス多発性骨軟骨腫（MO）モデルで得られたエビデンスにより裏付けられる。

パロバロテンは、FOP と同じシグナル伝達タンパク質（pSmad1/5/8）を抑制し、MO の軟骨膜で軟骨前駆細胞から軟骨形成細胞への異常な分化を転換させることにより、ALK 受容体シグナル伝達亢進による骨軟骨腫形成を阻害することが示されている（Inubushi 2018）。

2.2 *In vivo* 薬理試験

3 種類の損傷誘発性マウス HO モデル及び自然発症 HO や母趾奇形など FOP 患者で認められる表現型の特徴の多くを再現したマウス FOP モデルを用いて、パロバロテンの有効性を評価した。FOP 患者及びパロバロテンの有効性評価に使用したマウスモデルの臨床的及び遺伝的特徴の比較を表 2.6.2-3 にまとめる。これらのマウスモデルを用いた薬理試験で得られた結果を 2.2.1 項及び 2.2.2 項に記載する。

表 2.6.2-3　　FOP 患者及びマウス HO モデルの臨床的及び遺伝的特徴の比較

Feature	Human FOP	Injury-Based HO Mouse Model			Spontaneous HO Mouse Model
		BMP implant BMP Implant Wild-type mice	Q207D caACVR1/ALK2 (Q207D) Transgenic mice	R206H ACVR1/ALK2 (R206H) Conditional-on Knockin mice	Prrx1-R206H ACVR1/ALK2 (R206H) Conditional-on Knockin mice
Mutant ALK2 gene expression	Global	N/A	Post-natal, local	Post-natal, global	Pre-natal, limbs
ACVR1(R206H) mutation	+	–	–	+	+
Injury-induced HO	+	+	+	+	+
Spontaneous HO	+	–	–	–	+
Malformed great toe	+	–	–	–	+

Source: Adapted Table 1 from Kaplan 2012
ACVR1= activin A receptor, type 1; ALK2= activin-like kinase 2; ca ACVR1=constitutively active ACVR1; FOP= fibrodysplasia ossificans progressive; HO=heterotopic ossification; N/A=not applicable

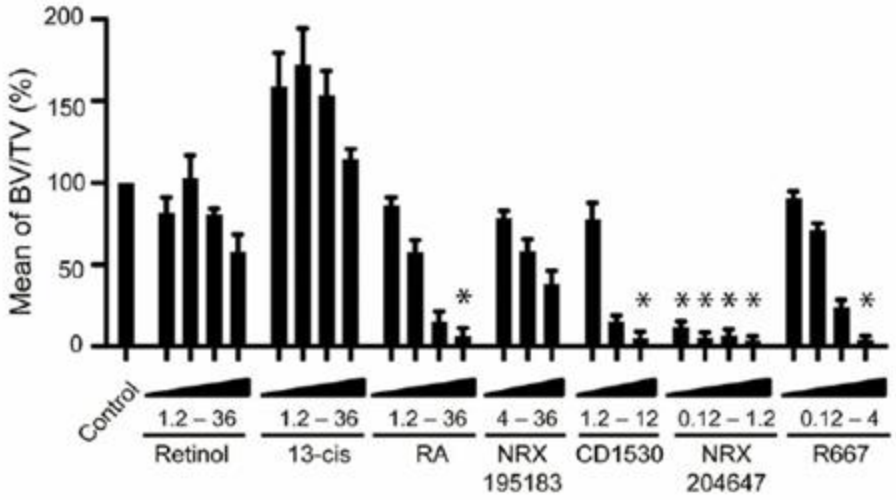
2.2.1　損傷誘発性マウス HO モデル

2.2.1.1　BMP 移植マウス HO モデルにおけるパロバロテンを含む RARγ アゴニストの HO 形成阻害作用

マトリゲルと組換え BMP2 の混合物を 2 ヵ月齢の野生型（WT）マウスに皮下投与して作製した BMP 移植マウス HO モデルを用いた初期の動物試験で、RARγ アゴニストの HO 形成阻害が薬剤のクラスエフェクトであることが示された（Shimono 2011）。移植直後、各用量のレチノイドをマウスに 1 日 1 回経口投与した。投与開始 12 日後にマイクロコンピュータ断層撮影法（microCT）により溶媒投与群とレチノイド投与群の異所性骨における骨量（骨量／全骨組織量）を測定することで、HO 形成阻害作用を評価した。各試験における溶媒投与群の値を 100%

とし、投薬群の相対値を算出した。各群の例数は少なくとも 8 例とした。結果（平均±標準誤差）を図 2.6.2-5 に示す。

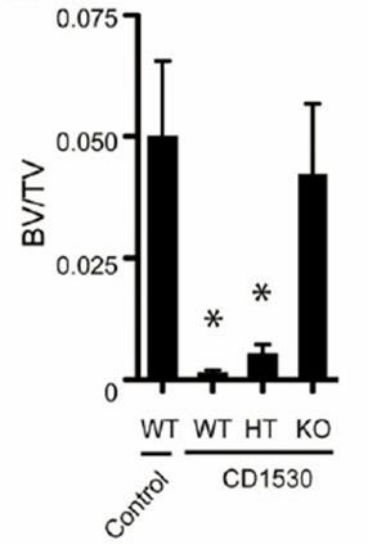
図 2.6.2-5　　BMP 移植マウスモデルにおける各種レチノイドの HO 形成阻害作用



Source: Figure 2b from Shimono 2011
* p<0.01 vs control, one-way ANOVA followed by Boneferroni/Dunn's multiple comparison tests.
13-cis=13-cis retinoic acid, RAR pan-agonist; ANOVA=analysis of variance; BMP=bone morphogenetic protein; BV/TV=bone volume/total volume; CD1530=RARγ agonist; HO=heterotopic ossification; NRX 204647=RARγ agonist; NRX 195183=RARα agonist; R667=palovarotene, RARγ agonist; RA=all-trans-retinoic acid, RAR pan-agonist; RAR=retinoic acid receptor; RARα=RAR alpha; RARγ=RAR gamma.

HO 形成阻害は部分的で、その阻害に高用量を必要とした汎アゴニストである RA 及び RARα アゴニスト（NRX 195183）と比較して、RARγ 選択的アゴニスト（CD1530、NRX 204647、パロバロテン）の有効性は非常に高かった。別の汎アゴニストである 13-cis レチノイン酸投与後の骨形成は、溶媒投与群より大きくなった。溶媒投与群と比較して、各用量［0.12～4 mg/kg（HED 換算で 0.6～19 mg/日）］のパロバロテン投与群では用量依存的な HO 形成阻害作用が認められた（図 2.6.2-5）。また、RARγ がないノックアウト（KO）マウスでは HO 形成阻害作用は完全になくなるが、ヘテロ接合型 RARγ 及び WT マウスではその作用が維持されることから、HO 形成阻害は RARγ サブタイプのみを介していることも明らかとなった（図 2.6.2-6）。

図 2.6.2-6　　RARγ アゴニスト作用の特異性



Source: Figure 2d from Shimono 2011
* p<0.01 vs control.
BV/TV=bone volume/total volume; CD1530=RARγ agonist; HT=RARγ heterozygous; KO=RARγ-null mice; RARγ=retinoic acid receptor gamma; WT=RARγ wild-type.

これらの結果から、HO 形成阻害作用は RARγ サブタイプのみを介することから、薬剤のクラスエフェクトであることが明らかとなった。また、適切な治療開始時期を検討するため、BMP 移植マウスモデルで HO を誘発後、各時点で RARγ アゴニストの有効性を評価した。RARγ アゴニストである CD1530 は投与開始を移植 6 日後まで遅らせた場合でも、投与開始 8 日後に HO 形成阻害作用を示した。移植後 6 日間は HO の軟骨形成期に相当し、既に軟骨が存在する。しかし、投薬開始を移植 12 日後まで遅らせた場合、HO 形成阻害作用は全く認められなかった。移植後 12 日間は HO の骨形成期に相当し、既に骨が存在する。これらの結果から、RARγ アゴニストは軟骨形成細胞の分化及び軟骨形成（軟骨細胞分化前の線維増殖期）の阻害により HO 形成阻害作用を示すが、HO の骨形成期（骨化期）は阻害しないことが示唆される。

2.2.1.2　損傷誘発性 Q207D 変異マウス FOP モデルにおけるパロバロテンの HO 形成阻害作用

三品らが開発した ACVR1/ALK2（Q207D）変異 Cre 誘発性 FOP トランスジェニックマウスモデル（Fukuda 2006）を用いて、パロバロテンの HO 形成阻害作用を評価した。同モデルは、構造的活性型 ACVR1/ALK2 をコードする導入遺伝子、caACVR1/ALK2（Q207D）変異を条件付きで発現する。同モデルは、局所損傷及び導入遺伝子活性化後に異所性軟骨内骨を形成し、病変部位で Smad シグナル伝達を増強し、FOP に典型的な異所性軟骨内骨化の病理組織像を再現する。FOP 患者で Q207D 変異は認められないが、パロバロテンの薬力学的作用を更に検討するための強力なツールとして損傷誘発性 Q207D 変異マウス FOP モデルを選択し、HO 形成に対する治療開始時期（2.2.1.2.1 項）、用量反応関係（2.2.1.2.2 項）、副腎皮質ホルモンの影響（2.2.1.2.3 項）及び各種投与レジメン（2.2.1.2.4 項）を検討した。

2.2.1.2.1 治療開始時期の検討

001 試験、添付資料番号：4.2.1.1.3
CLM001-PD-002 試験、添付資料番号：4.2.1.1.4

Q207D 変異マウス FOP モデルでの HO 形成に適切な試験条件を確立するために実施した予備試験の一環として、HO 形成後に各時点でパロバロテンの有効性を評価し、適切な治療開始時期を検討した。

16 日齢のホモ接合 Q207D 変異マウスの大腿筋後部に、導入遺伝子を活性化する Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス（Adeno-Cre）及び炎症反応（筋損傷）を誘導するカルディオトキシンを筋肉内投与し、HO を惹起した（CLM001-PD-002 試験）。筋損傷 3 又は 7 日後から、パロバロテン 2.94 mg/kg/日（HED 換算で 10 mg/日）又は溶媒の 1 日 1 回 2 週間経口投与を開始した。各群の例数は 9 匹以上とした。2 週間の投薬終了時、microCT 解析により HO 容積を評価した。本試験の結果を表 2.6.2-4 に要約する。

表 2.6.2-4 Q207D 変異マウスに損傷 3 又は 7 日後からパロバロテン 2 週間投与を開始したときの投薬終了時の HO 容積（microCT 解析）

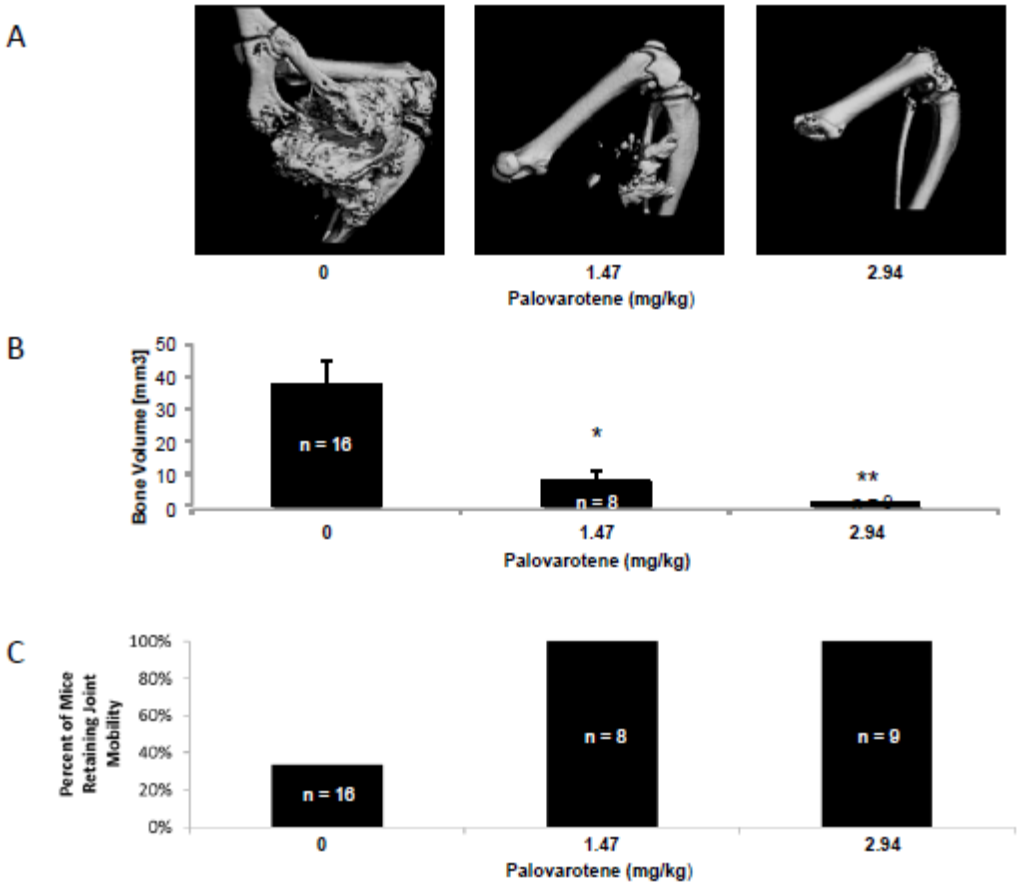
Treatment / Time at Initiation	Dose (mg/kg/day)	Dose (mg HED)[a]	N	Mean (SD) Heterotopic BV	
				mm^3	%[b]
Vehicle / Delayed by 3 days post injury	0	0	9	8.47 (11.7)	100
Palovarotene / Delayed by 3 days post injury	2.94	10	10	0.552 (0.875)	6.5
Vehicle / Delayed by 7 days post injury	0	0	10	7.58 (7.92)	100
Palovarotene / Delayed by 7 days post injury	2.94	10	10	2.20 (1.46)	29

Source: Report CLM001-PD-002
[a] HED=animal dose in mg/kg x (animal weight in kg/human weight in kg)$^{0.33}$. Assumes 0.01 kg mouse and 60 kg human (FDA 2005).
[b] % relative to their respective vehicle control group.
BV=bone volume; HED=human equivalent dose; HO=heterotopic ossification; microCT= microcomputed tomography; SD=standard deviation.

損傷 3 日後までパロバロテン 2 週間投与の開始を遅らせた場合、HO 平均容積は溶媒対照の 6.5%であった（抑制率 93.5%）。しかし、損傷 7 日後までパロバロテンの 2 週間投与開始を遅らせた場合、パロバロテンの HO 平均容積は溶媒対照の 29%となり、抑制率は 71%に減弱した（表 2.6.2-4）。

初期に実施した 001 試験では、筋損傷 4 日前にパロバロテン 1.47 又は 2.94 mg/kg/日（HED 換算で 5 又は 10 mg/日）の 2 週間経口投与を開始した。その結果、2.94 mg/kg/日のパロバロテンにより Q207D 変異マウスの HO 形成は完全に阻害され、関節可動域も完全に維持された（図 2.6.2-7）（Lindborg 2018）。

図 2.6.2-7　　Q207D 変異マウスに損傷 4 日前からパロバロテン 2 週間投与を開始したときの HO 形成阻害作用



Source: Report 001. Fig.1 from Lindborg 2018
A: microCT images of bone at the injection site obtained prior to necropsy after 19 days of dosing, and 14 days post-injury in mice administered vehicle control (0), or 1.47 or 2.94 mg/kg palovarotene.
B: Bone volume (mm3) in mice administered vehicle control (0), or 1.47 or 2.94 mg/kg palovarotene.
C: Percentage of mice administered vehicle control (0), or 1.47 or 2.94 mg/kg palovarotene retaining joint mobility.
* p<0.05; ** p<0.01 (One-way ANOVA with Tukey-Kramer post-hoc analysis)
ANOVA=analysis of variance; HO=heterotopic ossification; microCT=microcomputed tomography

これらの結果から、パロバロテンの HO 阻害作用には、投薬を早期に開始することが重要であることが示唆された。また、パロバロテンを含む RARγ アゴニストは、軟骨形成細胞の分化及び軟骨形成（軟骨細胞分化前の線維増殖期）の阻害により HO 形成阻害作用を示すが、HO の骨形成期（骨化期）は阻害しないことを示唆するこれまでの所見（2.2.1.1 項）が更に裏付けられた。したがって、以降の効力を裏付ける試験では、パロバロテンの HO 形成阻害作用を検討した。

2.2.1.2.2 用量反応関係の検討

CLM001-PD-002 試験、添付資料番号：4.2.1.1.4

HO 形成阻害に関するパロバロテンの用量反応関係を検討するため、筋損傷を与えた日（生後 19 日）から各用量のパロバロテン［0.294、1.47、2.94 及び 4.41 mg/kg/日（HED 換算で 1、5、10 及び 15 mg/日）］又は溶媒の 1 日 1 回経口投与を開始し、15 日間連日投与した。19 日齢のホモ接合 Q207D 変異マウスの大腿筋後部に、Adeno-Cre 及びカルディオトキシンを筋肉内投与し、HO を惹起した。各群の例数は 8 匹とした。筋損傷 15 日後、microCT 解析により損傷部位の HO 容積を評価した。

3 つの独立した試験の結果から、Q207D 変異マウス FOP モデルにおいて、高用量のパロバロテンはより強い HO 形成阻害作用を示し、明らかな用量反応関係が示された（表 2.6.2-5）。また、これらのデータを用いて用量反応モデル［約 2 mg/kg/日（HED 換算で 7 mg/日）での推定 50%有効用量（ED_{50}）を用いた dual site 最大効果（E_{max}）モデル］を作成した結果、パロバロテン約 6 mg/kg（HED 換算で 20 mg/日）を 1 日 1 回投与した場合、同マウスモデルで更に強い HO 形成阻害作用が得られる可能性が示唆された（図 2.6.2-8）。

表 2.6.2-5 パロバロテンを投与した Q207D 変異マウスにおける筋損傷 2 週間後の HO 容積（microCT 解析）

Dose (mg/kg/day)	Dose (mg HED)[a]	N	Mean (SD) Heterotopic BV					
			Study 1		Study 2		Study 3	
			mm^3	%[b]	mm^3	%[b]	mm^3	%[b]
0	0	8	60.2 (23.8)[c]	100	73.4 (19.1)	100	80.8 (28.1)	100
0.294	1	8	48.8 (15.1)	81	52.7 (26.7)	72	72.0 (34.2)	89
1.47	5	8	40.5 (22.8)	67	36.5 (21.2)	50	39.5 (13.4)	49
2.94	10	8	20.0 (13.0)*	33	13.3 (7.65)*	18	20.3 (12.4)*	25
4.41	15	8	7.20 (4.11)*	12	6.15 (4.51)*	8.4	10.2 (11.2)*	13

Source: Report CLM001-PD-002

[a] HED = animal dose in mg/kg x (animal weight in kg/human weight in kg)$^{0.33}$. Assumes 0.01 kg mouse and 60 kg human (FDA 2005).

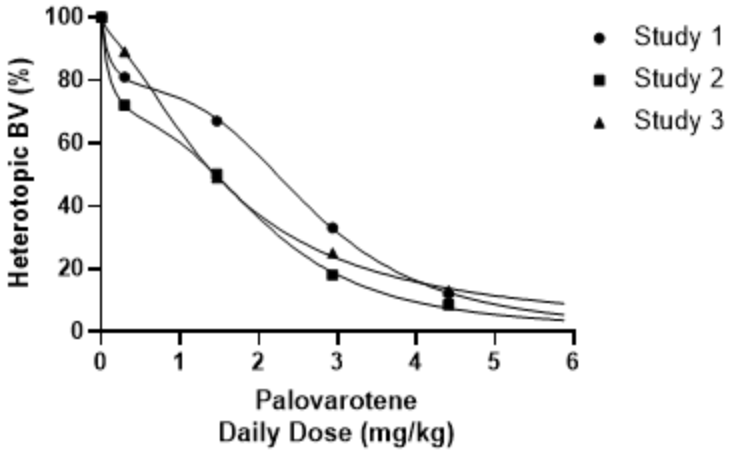
[b] % relative to vehicle control.

[c] N=7.

* Statistically significant ($p<0.05$) compared to vehicle control, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test.

BV=bone volume; HED=human equivalent dose; HO=heterotopic ossification; microCT= microcomputed tomography; SD=standard deviation.

図 2.6.2-8　　Q207D 変異マウスでの HO 形成阻害作用に対するパロバロテンの用量反応関係



Source: Report CLM001-PD-002
Dual site E_{max} model.
ED_{50} at ~ 2 mg/kg/day or ~ 7 mg/day HED
BV=bone volume; ED_{50}=dose at half-maximum response; E_{max}=maximum effect; HED=human equivalent dose; HO=heterotopic ossification.

2.2.1.2.3　　副腎皮質ホルモンの影響

CLM001-PD-002 試験、添付資料番号：4.2.1.1.4

FOP のフレアアップに対する標準療法として、経口プレドニゾンが 1 日 1 回 2 mg/kg（最大 100 mg/日）の用量で 4 日間（最大 400 mg）投与される（Kaplan 2019）。非臨床試験において、損傷誘発性の HO 形成が副腎皮質ホルモン投与により予防又は減弱できることが示唆された（Yu 2008、Sinha 2016）。副腎皮質ホルモン及びパロバロテンの HO 形成阻害作用を評価及び比較するため、Q207D 変異マウスにデキサメタゾン（合成副腎皮質ホルモン）を 4.4 mg/kg/日の用量で 4 又は 15 日間経口投与した。なお、同用量はプレドニゾンの 1 日最大用量（HED 換算で 100 mg/日）と等価であり、合計量は HED 換算でそれぞれ 400 又は 1500 mg/日となる。その他、パロバロテン 2.94 mg/kg/日（HED 換算で 10 mg/日）又は溶媒を 15 日間経口投与する群を設定した。19 日齢のホモ接合 Q207D 変異マウスの大腿筋後部に、Adeno-Cre 及びカルディオトキシンを筋肉内投与し、HO を惹起した。各群 9 匹とし、筋損傷を与えた日に投与を開始した。筋損傷 15 日後、microCT 解析により HO 容積を評価した（表 2.6.2-6）。

表 2.6.2-6　副腎皮質ホルモンを投与した Q207D 変異マウスにおける筋損傷 2 週間後の HO 容積（microCT 解析）

		Mean (SD) Heterotopic BV	
Compound/Dosing Regimen	**N**	**mm^3**	**%[a]**
Vehicle for 15 days	9	59.3 (40.0)	100
Dexamethasone, 4.4 mg/kg for 4 days (prednisone 100 mg HED)	9	56.0 (36.0)	94
Dexamethasone, 4.4 mg/kg for 15 days (prednisone 100 mg HED)	9	22.5 (15.4)	38
Palovarotene, 2.94 mg/kg for 15 days (10 mg HED)[b]	9	17.6 (19.1)*	30

Source: Report CLM001-PD-002
[a] % relative to vehicle control.
[b] HED = animal dose in mg/kg x (animal weight in kg/human weight in kg)$^{0.33}$. Assumes 0.01 kg mouse and 60 kg human (FDA 2005).
* Statistically significant ($p<0.05$) compared to vehicle control. Ordinary one way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.
ANOVA=analysis of variance; BV=bone volume; HED=human equivalent dose; microCT=microcomputed tomography; SD=standard deviation.

プレドニゾンの 1 日最大臨床用量と等価の副腎皮質ホルモンを Q207D 変異マウスに 1 日 1 回 4 日間投与したときの HO 平均容積は溶媒対照の 94%であり、抑制作用は認められなかった。副腎皮質ホルモンの投与を、Q207D 変異マウスの HO 形成期間と考えられる 15 日間に延長すると、Q207D 変異マウスでの HO 平均容積は溶媒対照の 38%に低下したが、統計学的に有意な作用ではなかった。Q207D 変異マウスにパロバロテンを 2.94 mg/kg（HED 換算で 10 mg/日）で 1 日 1 回 15 日間投与したとき、統計学的に有意な HO 平均容積の低下が認められた（溶媒対照の 30%）。以上の結果から、プレドニゾン 100 mg/日（HED 換算）と等価の副腎皮質ホルモンの 1 日 1 回 15 日間［フレアアップ開始（筋損傷時）から HO 形成までの期間として定義される全フレアアップ期間］投与により Q207D 変異マウスの HO 形成は阻害されるが、臨床的に妥当な用量である 100 mg/日の 4 日間投与ではその作用は認められないことが示唆される。

2.2.1.2.4　投与レジメンの検討（探索的試験）

CLM001-PD-002 試験、添付資料番号：4.2.1.1.4

HO 形成阻害作用及び安全性（体重、大腿骨長及び頭殿長）の予測には、パロバロテンの C_{max} 又は全曝露量［濃度－時間曲線下面積（AUC）］のどちらを用いる方が適切かを明らかにするため、本試験を実施した。Q207D 変異マウスにパロバロテンを経口投与したときの体内動態を示すため、母集団薬物動態モデルを構築した。パロバロテンをマウスに 1 日 2 回 15 日間投与したときの推定曝露量を予測するため、シミュレーションした結果、次回投与まで蓄積されないことが予想された。これは、1 日 2 回投与後の C_{max} は 1 日 1 回投与後と同様であることを意味し、1 日 2 回投与時の 1 日曝露量は 1 日 1 回投与時の 2 倍になると予想される。臨床的に妥当な用量（HED 換算で 10 又は 20 mg/日）での各種投与レジメン［1 日 1 回、1 日 2 回又は隔日］を選択し、パロバロテンの HO 又は安全性に対する影響は C_{max} 又は曝露量のどちらに依存するのかを評価した。

19 日齢のホモ接合 Q207D 変異マウスの大腿筋後部に、Adeno-Cre 及びカルディオトキシンを筋肉内投与し、HO を惹起した。各種投与レジメンで、筋損傷を与えた日から 15 日間、パロバロテン又は溶媒を Q207D 変異マウスに経口投与した。各群の例数は 10 匹とした。損傷 15 日後に HO 容積及び大腿骨長を評価した（表 2.6.2-7）。

表 2.6.2-7　各種投与レジメンでパロバロテンを投与した Q207D 変異マウスにおける筋損傷 2 週間後の HO 容積及び大腿骨長

Dose (mg/kg/day)	Dose (mg HED)[a]	C_{max}[b] (ng/mL)	AUC_{0-24}[b] (ng•hr/mL)	N	Mean (SD) Heterotopic BV mm^3	Mean (SD) Heterotopic BV %[c]	Mean (SD) Femur Length mm	Mean (SD) Femur Length %[c]
0	0	0	0	10	90.2 (32.9)	100	11.9 (0.519)	100
2.94 QD	10 QD	160	526	10	16.9 (14.3)*	19	10.8 (0.975)*	91
2.94 BID	10 BID	162	1039	10	3.74 (3.13)*	4.1	9.64 (0.639)*#	81
5.88 QD	20 QD	320	1052	10	6.85 (7.48)*	7.6	9.92 (0.277)*#	83
5.88 qad	20 qad	day 1: 320 day 2: 0	day 1: 1052 day 2: 0	10	48.0 (28.3)†	53	10.8 (0.593)*†	91

Source: Report CLM001-PD-002

[a] HED = animal dose in mg/kg x (animal weight in kg/human weight in kg)$^{0.33}$. Assumes 0.01 kg mouse and 60 kg human (FDA 2005).

[b] From simulation. Extrapolated values at 5.88 mg/kg QD or qad from simulation at 2.94 mg/kg QD.

[c] % relative to vehicle control.

* Statistically significant ($p<0.05$) compared to vehicle control; # statistically significant ($p<0.05$) compared to 2.94 QD; † statistically significant ($p<0.05$) compared to 2.94 BID and 5.88 QD. Heterotopic BV, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test; femur length, Ordinary one way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.
ANOVA=analysis of variance; AUC_{0-24}=area under the concentration versus time curve from time 0 to 24 hours post-dose; BID=twice daily; BV=bone volume; C_{max}=maximum plasma concentration; HED=human equivalent dose; HO=heterotopic bone; qad=every other day; QD=daily; SD=standard deviation.

HO 平均容積が溶媒対照の 53%だったパロバロテン 5.88 mg/kg（HED 換算で 20 mg/日）隔日投与レジメンを除き、2.94 mg/kg（HED 換算で 10 mg/日）1 日 1 回及び 1 日 2 回並びに 5.88 mg/kg（HED 換算で 20 mg/日）の 1 日 1 回投与レジメンでは、Q207D 変異マウスの HO 平均容積が溶媒対照の 4.1%～19%に低下し（抑制率＞80%）、統計学的に有意な作用が認められた。また、統計学的に有意ではないものの、2.94 mg/kg（HED 換算で 10 mg/日）1 日 1 回投与レジメンと比較して、2.94 mg/kg（HED 換算で 10 mg/日）1 日 2 回及び 5.88 mg/kg（HED 換算で 20 mg/日）1 日 1 回投与レジメンによる HO 容積低下の程度が大きい傾向が認められた（表 2.6.2-7）。すべての投与レジメンで、大腿骨長は統計学的に有意に減少した（溶媒対照の 81%～91%に低下、最大抑制率 19%）。パロバロテン投与による骨長の減少は WT 幼若動物でも認められており（2.6.6.3.2 項）、Q207D 変異マウスにおいて変異対立遺伝子は筋損傷部位にのみ局所的に発現し、骨端成長板などその他の組織には発現しないため、WT マウスと同様に認められた。また、2.94 mg/kg（HED 換算で 10 mg/日）1 日 2 回及び 5.88 mg/kg（HED 換算で 20 mg/日）1 日 1 回投与レジメンで、統計学的に有意な体重減少が認められた（それぞれ溶媒対照の 79%及び 85%、最大抑制率 21%）。頭殿長に対する影響は認められなかった。これらの結果から、パロバロテンの 1 日 1 回

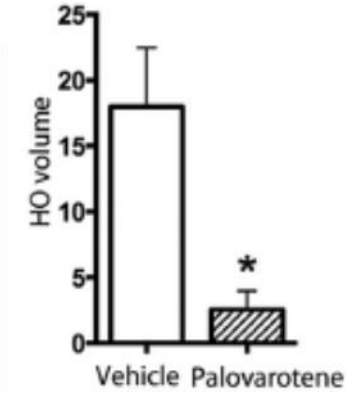
投与により、Q207D 変異マウス FOP モデルにおける安全性／有効性は担保されることが示唆された。

2.2.1.3 損傷誘発性 R206H 変異マウス FOP モデルにおけるパロバロテンの形成阻害作用

損傷誘発性 Q207D 変異マウス FOP モデルと同様に、損傷誘発性 R206H 変異マウス FOP モデルでもパロバロテンによる HO 形成阻害作用が認められた（Chakkalakal 2016）。同モデルは、FOP 患者で最も典型的な変異である ACVR1/ALK2（R206H）変異を有し、導入遺伝子の活性化及び筋損傷後、14 日以内に異所性軟骨内骨が形成され、これが本モデルのフレアアップ期間［フレアアップ発現（筋損傷）から HO 形成］に相当する。軟骨形成は損傷 5～7 日後に認められる。また、R206H 変異マウス FOP モデルでは、早期 FOP 患者で認められるような初期 HO 及びその周囲の筋組織において、pSmad シグナル伝達の増大、強力かつ持続的な局所での線維増殖性反応の増大及び多数の肥満細胞が認められる。肥満細胞の持続的な動員及び凝集は HO 形成に重要な役割を果たしており、正常な損傷応答及び修復機序による筋再生（筋形成）を阻害する（Convente 2018、Gannon 2001）。

1 ヵ月齢の Acvr1$^{[R206H]FlEx/+}$;Gt(ROSA)26Sor$^{tm1(rtTA*M2)Jae}$;Tg(tetO-Cre)1Jaw マウス（R206H と称される）にドキシサイクリンを投与し、全体的な Cre リコンビナーゼの発現及び ACVR1 が正常に発現する組織に ACVR1^{R206H} を発現させる変異対立遺伝子の発現を誘導した。次に、マウスの大腿四頭筋にカルディオトキシンを投与し、局所炎症、筋損傷及び HO を惹起した。R206H 変異マウスに、パロバロテン［損傷 1～3 日後：4 mg/kg（HED 換算で 19 mg/日）、損傷 4～14 日後：0.6 mg/kg（HED 換算で 3 mg/日）又は溶媒を、筋損傷を与えた日から 14 日間、1 日 1 回経口投与した。損傷 14 日後に実施した microCT 及び 3 次元画像再構成法による解析の結果、溶媒投与群の筋損傷部に大きな HO 組織塊が認められた。また、溶媒投与群では HO を惹起した後肢の運動障害も認められた。パロバロテン投与群では、骨量（骨量／全骨組織量）を指標とした HO 形成が溶媒対照群と比較して有意に抑制され（図 2.6.2-9）、HO を惹起した後肢の関節可動域も維持された。

図 2.6.2-9　　パロバロテンを投与した R206H 変異マウス FOP モデルにおける筋損傷後 2 週間時点での microCT 解析



Source: Fig. 1B from Chakkalakal 2016
Heterotopic bone was qualified as total mineralized tissue volume (vehicle, n=4; palovarotene, n=6). Hached bars represent data from palovarotene-treated mice and white bars vehicle-treated. Data shown mean±SEM; statistic compared palovarotene-treated versus vehicle-treated using an unpaired t-test; * p<0.05
HO=heterotopic ossification; microCT=microcomputed tomography; SEM=standard error of the mean

図 2.6.2-9 に示した結果から、高用量のパロバロテンを短期間投与後、低用量の投与により、HO 形成を阻害できることが示される。損傷誘発性 R206H 変異マウス FOP モデルでは、パロバロテンの高用量をフレアアップ開始時に投与し、14 日間のフレアアップ期間をカバーする残りの期間に低用量を投与した。

溶媒投与群では新たに形成された異所性軟骨組織及び軟骨内骨が存在したが、パロバロテン投与群では存在しないことが、組織化学的分析により確認された。また、パロバロテンは筋損傷誘発性の肥満細胞浸潤及び線維増殖性反応を抑制できることが示された。以上の結果から、R206H 変異マウス FOP モデルにおいて、パロバロテンは動員された前駆細胞を骨形成から筋再生（筋形成）へと転換させることで、筋損傷誘導性 HO の形成を阻害することが示唆される。これらの結果は、パロバロテンの外傷性ラット HO モデルに対する効果によって更に裏付けられ、パロバロテンは抗炎症作用、増殖抑制作用及び遺伝子発現調節など相互に関連した複数のメカニズムを介して HO を阻害することが示唆された（Wheatley 2018）。さらに別の試験では、パロバロテンを含む RARγ 選択的アゴニストが、各種筋損傷モデルにおいて骨格筋損傷の修復を促進する可能性が示唆された（Di Rocco 2015）。

2.2.2　自然発症マウス HO モデル

2.2.2.1　Prrx1-R206H マウス FOP モデルにおけるパロバロテンの HO 形成阻害作用

パロバロテンは損傷誘発性モデルだけでなく、自然発症 HO モデルに対しても HO 阻害作用を示した（Chakkalakal 2016）。Acvr1$^{[R206H]FlEx/+}$:Prrx1-Cre（Prrx1-R206H と称される）マウスモデルでは、発生中の胚での変異型対立遺伝子（ACVR1/ALK2 R206H）の発現が骨格前駆細胞（Prrx1+）集団に限定され、損傷が無くても HO が形成される。この Prrx1-R206H マウスでは、

母趾奇形を始め、FOP 患者で認められる FOP に特徴的な表現型の多くが再現されている。（雄 Prrx1-Cre と交配した）授乳期の雌 Acvr1$^{[R206H]FlEx/+}$マウスに、溶媒又はパロバロテン 2 mg/kg（HED 換算で 10 mg/日）を 1 日 1 回、分娩日から 15 日間連続経口投与した。その後、Prrx1-R206H 出生児に溶媒又はパロバロテン 2 mg/kg（HED 換算で 7 mg/日）を生後 16 日から 30 日まで隔日経口投与した。生後 14 日に運動性を評価し、生後 14 及び 30 日に microCT を用いて HO 容積を評価した。溶媒を投与した Prxx1-R206H マウスでは、後肢の可動域制限及び歩行困難を伴う HO の自然発症が広範に認められた。パロバロテンを投与した Prrx1-R206H マウスでは、HO が著しく軽減し、可動域が改善した。また、異所性骨は前肢でほとんど認められず、後肢では大幅に減少した。これらの結果から、パロバロテンの 1 日 1 回投与により、FOP 患者で生じ得る自然発症 HO の軽減が示唆される。

パロバロテンは Prrx1-R206H マウス FOP モデルの自然発症 HO を軽減するだけでなく、成長板の組織学的な異常増殖及び長管骨の伸長抑制を改善した。組織学的解析の結果、同マウスモデルでは成長板の肥大軟骨細胞層（長骨の伸長に最も関与する部位）の厚さが著しく減少していた。パロバロテンは、Prrx1-R206H マウス FOP モデルの長管骨の成長抑制を改善し、成長板組織構造及び軟骨基質の産生をほぼ正常化した。一方、別の FOP 幼若マウスモデル（Pdgfrα-R206H）において、パロバロテン（0.7 又は 1.5 mg/kg）の 1 日 1 回、4 週間（2～6 週齢の間）腹腔内投与により骨格成長に対する促進作用が認められた（Lees-Shepard 2018）。このように両モデルで異なる結果が得られた理由として、パロバロテンを腹腔内投与時の投与 0 から 24 時間後までの濃度－時間曲線下面積（AUC_{0-24}）及び C_{max} は経口投与時と比較してそれぞれ約 1.6 倍及び 6 倍高いこと（社内データ）及び両モデルの骨端は形態学的に異なっていることが考えられる。

Prrx1-R206H マウスで観察された成長板の形態学的変化は、パロバロテンによりほぼ正常化した。一方、Pdgfrα-R206H マウスの成長板の形態学的特徴は WT 動物と同様であり、高用量のパロバロテンにより異常増殖した（Lees-Shepard 2018）。

3　副次的薬理試験

1008424 試験、添付資料番号：4.2.1.2.1

In vitro スクリーニング試験では、パロバロテンの 75 種類の受容体に対する結合親和性及び 24 種類の酵素活性に対する阻害作用を 10 µmol/L（4146 ng/mL）の濃度で評価した。10 µmo/L で活性が確認された場合は、完全な阻害曲線を得るため、10 段階の濃度でパロバロテンの評価を追加実施した。

受容体結合試験で意味のある結果は、アデノシン A3 受容体［IC_{50} = 3.94 µmol/L、阻害定数（K_i） = 2.71 µmol/L］、末梢型ベンゾジアゼピン受容体（IC_{50} = 2.12 µmol/L、K_i = 1.91 µmol/L）及びオピオイド δ 受容体（IC_{50} = 1.85 µmol/L、K_i = 0.97 µmol/L）に対する親和性のみであった。

酵素阻害試験で意味のある結果（阻害率 10%超）は、ホスホジエステラーゼ I（24%）、ホスホジエステラーゼ IV（18%）、カテプシン G（23%）及びヒト免疫不全ウイルス 1 型プロテアーゼ（31%）及びグアニル酸シクラーゼ（14%）に対する阻害作用のみであった。

RARγ に対するパロバロテンの IC_{50} 値は 450 nmol/L であり（2.1.1 項）、また、母集団薬物動態解析において、パロバロテンの MRHD（20 mg）を体重補正用量で 1 日 1 回投与したときの C_{max} の体重層別の中央値は 138～202 ng/mL（0.333～0.487 µmol/L）であることが示されている（2.7.2.3.4 項）。これらのデータに基づくと、受容体結合及び酵素阻害試験の結果から、パロバロテンがオフターゲット薬理活性によりヒトで有害作用を引き起こす可能性は低いことが推察された。

4　安全性薬理試験

パロバロテン及びその主要代謝物の安全性薬理試験一覧を表 2.6.2-8 に示す。

表 2.6.2-8　　安全性薬理試験の一覧

器官系（試験の種類）（報告書番号）	投与経路	試験系	被験物質	用量 [a]（mg/kg）
CNS（1004719）[b]	経口	ラット／Wistar	パロバロテン	0、0.2、1、5
心血管系（hERG 試験）（1006456）	*In vitro*	CHO 細胞	パロバロテン	1～10 µmol/L
心血管系（hERG 試験）（1005681）	*In vitro*	HEK293 細胞	パロバロテン、並びに M2、M3、M4a 及び M4b	0.3、1、3、10、30 µmol/L
心血管系（活動電位試験）（1006565）[b]	*In vitro*	イヌプルキンエ線維／ビーグル	パロバロテン	0.01、0.1、1、10 µmol/L
心血管系（血行動態及び ECG）（1007995）[b]	経口（カプセル）	テレメトリー装着イヌ／ビーグル [c]	パロバロテン	0、0.04、0.2
心血管系（血行動態及び ECG）（1006978）[b]	経口（カプセル）	テレメトリー装着イヌ／ビーグル [c]	パロバロテン	0、1、10
腎・泌尿器系（尿量及び電解質）（1008099）[b]	経口	ラット／Wistar	パロバロテン	0、0.2、1、5
胃腸管系（胃腸管運動性）（1007751）[b]	経口	ラット／Wistar	パロバロテン	0、0.2、1、5

[a]　特に記載のない限り、mg/kg 体重（単回投与）
[b]　GLP 適用
[c]　イヌ 4 匹からなる 1 群に漸増投与した。
CHO=チャイニーズハムスター卵巣、CNS=中枢神経系、ECG=心電図、GLP=医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、HEK=ヒト胎児腎、hERG=ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子、M2=パロバロテンの 6 位水酸化体、M3=パロバロテンの 7 位水酸化体、M4a=パロバロテンの 6 位オキソ体、M4b=パロバロテンの 7 位オキソ体

4.1　CNS

1004719 試験、添付資料番号：4.2.1.3.1

パロバロテンの CNS に対する潜在的な影響を、Irwin 法による安全性薬理試験によって評価した。

各群 6 匹の雄 Wistar ラット（投与時 6～8 週齢）に溶媒［0.01%ブチルヒドロキシアニソール（BHA）及び 0.01%ブチルヒドロキシトルエン（BHT）を含むミグリオール 812］又はパロバロテン（0.2、1 又は 5 mg/kg）を 2 mL/kg の投与容量で単回経口投与し、Irwin 法により評価した。また、陽性対照としてクロルプロマジン（20 mg/kg）を同様に投与した。投与 0.5、1.5、2.5 及び 5 時間後に、行動評価を実施した。陽性対照群では、クロルプロマジンの既知の薬理活性と一致

する作用が認められた。パロバロテン投与群では、1 mg/kg 以上の用量で投与 1.5～5 時間後に軽度の下痢（軟便）が認められたが、発現頻度及びスコアに用量反応性は認められなかった。パロバロテン投与により、CNS の機能に対する影響を示唆する所見は認められなかった。

0.2 mg/kg 投与群ではパロバロテンによる影響は認められなかった。

マウス、ラット及びイヌを用いた単回投与毒性試験（2.6.6.2 項）並びにイヌを用いた 2 週間反復投与試験（2.6.6.3.4.1 項）において、被験物質投与動物及び溶媒投与動物の両方で、軟便及び／又は粘性便が認められ、便性状に関する所見は溶媒（ミグリオール 812）に起因することが示唆されている。また、ラット及びウサギ用いた反復投与毒性試験（2.6.6.3.1 項及び 2.6.6.3.3 項）並びにイヌを用いた 4 週間及び 39 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.4.2 項、2.6.6.3.4.3 項及び 2.6.6.3.4.4 項）では、パロバロテンをそれぞれ最高 5 mg/kg/日（ラット）、5 mg/kg/日（ウサギ）及び 0.2 mg/kg/日（イヌ）の用量で経口投与した結果、下痢は認められず、いずれの試験においても、CNS の機能に対する作用を示唆する一般状態所見は認められなかった。

これらの結果に基づくと、パロバロテンが CNS の機能に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

4.2 心血管系

パロバロテンの心血管系に対する潜在的な影響を、hERG カリウムチャネルを安定発現するチャイニーズハムスター卵巣（CHO）又はヒト胎児腎（HEK）293 細胞を用いた 2 つの *in vitro* hERG 試験、イヌのプルキンエ線維を用いた *in vitro* 活動電位試験、及びテレメトリー装着覚醒イヌを用いた 2 つの *in vivo* 安全性薬理試験によって評価した。

4.2.1 *In vitro* 試験

4.2.1.1 hERG カリウム電流に対する作用

1006456 試験、添付資料番号：4.2.1.3.2
1005681 試験、添付資料番号：4.2.1.3.3

CHO 細胞又は HEK293 細胞を用いたホールセルパッチクランプ法による 2 つの試験を実施し、パロバロテンの hERG カリウム電流に対する影響を検討した。

探索的 hERG 試験（1006456 試験）では、hERG カリウムチャネルを発現する CHO 細胞を、パロバロテン（1～10 µmol/L）又は陽性対照（E-4031：10 µmol/L）で処理した。パロバロテンの IC_{50} 値は約 7.2 µmol/L（約 2985 ng/mL）であった。また、陽性対照の E-4031 による hERG カリウムチャネルの阻害が認められたことから、試験系の hERG カリウムチャネル阻害に対する感受性が示された。

一方、hERG カリウムチャネルを安定発現する HEK293 細胞を用いた確認試験（1005681 試験）では、パロバロテンを 0.3、1、3、10 及び 30 µmol/L（124、415、1244、4146 及び 12437 ng/mL）の濃度で処理したところ、処理前と比較してそれぞれ 4.5 ± 0.9%、9.9 ± 1.0%、15.2 ± 1.3%、18.0 ± 0.9%及び 33.3 ± 4.6%（n=5、平均値±標準誤差）のカリウム電流阻害（電流振

幅の減少）が認められ、1 µmol/L 以上で統計学的に有意であった(p<0.05)。本試験でも、陽性対照の E-4031 は 100 nmol/L の処理濃度で 86.4 ± 3.5%（n=5、平均値±標準誤差）の hERG チャネル阻害を示し、試験系の hERG カリウムチャネル阻害に対する感受性が確認されている。

以上より、パロバロテンによる hERG カリウム電流の弱い阻害作用の可能性が示唆された。

4.2.1.2 イヌプルキンエ線維の活動電位に対する作用

1006565 試験、添付資料番号：4.2.1.3.4

本試験では、摘出したイヌの心室心筋線維を用いて、0.01、0.1、1 及び 10 µmol/L（n=6）の濃度範囲で活動電位パラメータに対するパロバロテンの作用を検討した。1 及び 0.5 Hz の刺激頻度でペーシングした場合、静止膜電位、最大脱分極速度、活動電位振幅並びに 60%及び 90%再分極時の活動電位持続時間（APD_{60} 及び APD_{90}）に対するパロバロテンの影響は、試験した最高濃度まで認められなかった。また、陽性対照（dl-ソタロール塩酸塩、50 µmol/L）処理時にはいずれの刺激頻度でも統計学的に有意に APD_{60} 及び APD_{90} が延長し、既知の活性と一致する作用が認められたことから、試験系の感受性が示された。

4.2.2 *In vivo* 試験

1007995 試験、添付資料番号：4.2.1.3.5
1006978 試験、添付資料番号：4.2.1.3.6

2 つの安全性薬理試験において、それぞれテレメトリーを装着した覚醒雄ビーグル犬各 4 匹に対し、ゼラチンカプセルに入れた溶媒（0.01%BHA 及び 0.01%BHT を含むミグリオール 812）又はパロバロテンを単回経口投与した。パロバロテンは 0（溶媒）、0.04 及び 0.2 mg/kg（1007995 試験）又は 0（溶媒）、1 及び 10 mg/kg（1006978 試験）の用量でそれぞれ Day 1、2 又は 6 に漸増投与した。投与 30 分前から投与 8 時間後までの心拍数、血圧及び ECG パラメータ（PR、RR、QRS、QT 及び補正 QT 間隔）を評価した。心血管系パラメータ測定後、改めて同用量のパロバロテンを同様に漸増投与して採血し、トキシコキネティクス（TK）評価を実施した。いずれの用量においても、パロバロテンは心拍数、心調律、血圧又は ECG パラメータに影響を及ぼさなかった。10 mg/kg 投与時の C_{max} は 2175 ng/mL、血漿中 AUC_{0-24} は 26500 ng·h/mL であった。

4.3 呼吸系

1007062 試験、添付資料番号：4.2.3.2.2
1009627 試験、添付資料番号：4.2.3.2.3
1013603 試験、添付資料番号：4.2.3.2.4
1020320 試験、添付資料番号：4.2.3.2.6
1009512 試験、添付資料番号：4.2.3.2.9
1013980 試験、添付資料番号：4.2.3.2.11
9000317 試験、添付資料番号：4.2.3.5.4.1
6700132 試験、添付資料番号：4.2.3.5.4.2

パロバロテンの呼吸系の機能に対する潜在的な影響を評価する独立した非臨床試験は実施しなかったが、成熟動物及び幼若動物を用いた反復投与毒性試験の一般状態観察に基づいて評価した。

成熟動物を用いた試験において、ラットにパロバロテンを最高 5 mg/kg/日の用量で 4 週間（2.6.6.3.1.2 項）及び最高 1 mg/kg/日の用量で 26 週間（2.6.6.3.1.3 項及び 2.6.6.3.1.4 項）、1 日 1 回経口投与した。ウサギでは最高 2.5 mg/kg/日の用量で 4 週間、1 日 1 回経口投与した（2.6.6.3.3.2 項）。イヌでは最高 0.2 mg/kg/日の用量で 4 週間（2.6.6.3.4.2 項）及び最高 0.04 mg/kg/日の用量で 39 週間又は 0.025 mg/kg/日の用量で 13 週間の後に 0.120 mg/kg/日の用量で 39 週間（2.6.6.3.4.4 項）、1 日 1 回経口投与した。これらの試験では呼吸系に対する影響を示唆する呼吸数又は呼吸パターンの変化などの一般状態所見は認められなかった。

幼若ラット（投与開始時 3 週齢）を用いた試験では、パロバロテンを最高 2.5 mg/kg/日の用量で 3 週間（用量設定試験）（2.6.6.3.2.1 項）及び最高 1.2 mg/kg/日の用量で 6 週間（2.6.6.3.2.2 項）、1 日 1 回経口投与した。3 週間用量設定試験では、幼若ラットに 0.1、0.5 又は 2.5 mg/kg/日の用量で投与したところ、2.5 mg/kg 群において、一般状態所見として胸骨突出、前肢の異常屈曲、歩行異常及び頻呼吸が認められた。その他の作用として、顕著な成長遅延及び骨成長の低下を反映する血清 ALP 活性の低値が認められた。また、X 線検査では肋骨及び胸骨など多くの骨の形状異常が、剖検では胸骨形態異常が認められた。いずれの用量においても肺重量への影響は認められなかった。一般状態所見の頻呼吸は、胸腔骨の弱体化及び変形に対する代償性反応と考えられた。6 週間投与本試験では、呼吸系に対する影響を示唆する所見は認められなかった。すなわち、呼吸器に関連した一般状態所見、肺重量への影響及び肺の病理組織所見はいずれも認められなかった。

これらの結果に基づくと、パロバロテンが呼吸系の機能に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

4.4 腎・泌尿器系

1008099 試験、添付資料番号：4.2.1.3.7

パロバロテンの腎機能への潜在的な影響を、ラットを用いた安全性薬理試験によって評価した。

各群 10 匹の雄 Wistar ラットに溶媒（0.01%BHA 及び 0.01%BHT を含むミグリオール 812）又はパロバロテン（0.2、1 又は 5 mg/kg）を単回経口投与し、約 30 分後に生理食塩液を 20 mL/kg の投与容量で経口投与した。投与 24 時間後までの 3 時点（生理食塩液投与後 0～3 時間、3～6 時間及び 6～24 時間）で尿を採取した。尿量並びにナトリウム、カリウム及び塩化物濃度を測定し、各時点における電解質排泄量（ナトリウム、カリウム及び塩化物の総排泄量）を算出した。溶媒対照群を含む全ての投与群で投与後 0～3 時間及び 3～6 時間の尿量及び電解質排泄量が投与前値より低値であり、尿排泄に対する溶媒（ミグリオール 812）の影響が示唆された。投与後 24 時間に、1 mg/kg 以上の投与群で塩化物の尿中排泄量の有意な低値（$p<0.05$）が、5 mg/kg 群でナトリウム（$p<0.01$）及びカリウム（$p<0.05$）の尿中排泄量の有意な低値が認められ、パロバロテン投与の影響と考えられた。

成熟及び幼若ラット、ウサギ並びにイヌを用いた反復経口投与毒性試験（2.6.6.3 項）では、臨床病理学的検査（血液生化学的検査及び尿検査）においてパロバロテン投与による直接的な腎機能への影響を示唆する変化は認められていない。また、腎臓の病理組織学的検査において所見は認められなかった。

これらの結果に基づくと、安全性薬理試験で認められた電解質排泄量の変化は臨床的に意義のあるものではなく、パロバロテンが腎機能に有害な影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

4.5 胃腸管系

1007751 試験、添付資料番号：4.2.1.3.8

パロバロテンの胃腸管系の機能への潜在的な影響を、ラットを用いた安全性薬理試験によって評価した。

各群 10 匹の雄 Wistar ラットに溶媒（0.01%BHA 及び 0.01%BHT を含むミグリオール 812）又はパロバロテン（0.2、1.0 又は 5.0 mg/kg）を単回経口投与し、30 分後に炭末懸濁液約 3 mL を強制経口投与した。パロバロテン投与約 90 分後にラットを安楽死させて開腹し、胃内容物重量及び炭末の小腸内移動距離を測定した。全てのパロバロテン投与群で溶媒対照群と比較して胃内容物重量（胃排出の指標）が高値であり、溶媒対照群の 2.6 g に対して 0.2、1.0 及び 5.0 mg/kg 群ではそれぞれ 3.5、3.7 及び 3.0 g であった。胃内容物重量の高値は、0.2 及び 1.0 mg/kg 群で統計学的に有意であったが、高用量では統計学的有意差はみられなかった。いずれの用量においても、小腸全長に対する炭末の移動率に溶媒対照群との差は認められなかった。これらの結果から、パロバロテンは全ての用量でわずかに胃排出を遅延させたが、腸管運動には影響しなかった。

成熟及び幼若ラット、ウサギ及びイヌを用いた反復投与毒性試験（2.6.6.3 項）における一般状態観察では、胃腸管系機能に対する直接作用を示唆する所見は認められなかった。

これらの結果に基づくと、パロバロテンが胃腸管系の機能に有害な影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

4.6 代謝物の安全性薬理試験

1005681 試験、添付資料番号：4.2.1.3.3

ラット、イヌ及びヒトでは、パロバロテンは主に 6 位水酸化体（M2）及び 7 位水酸化体（M3）に代謝され、これらは更に代謝を受け、それぞれパロバロテンの 6 位オキソ体（M4a）及び 7 位オキソ体（M4b）へと変換される。したがって、これらの主要代謝物の安全性薬理評価を実施した。

In vitro hERG 試験（ホールセルパッチクランプ法）において、hERG カリウムチャネルを安定発現する HEK293 細胞を M2、M3、M4a 及び M4b をそれぞれ 0.3、1、3、10 及び 30 µmol/L（平均約 130、430、1290、4290 及び 12900 ng/mL）の濃度で処理し、主要代謝物の hERG カリウム電流阻害能を評価した。結果を表 2.6.2-9 に示す。

表 2.6.2-9　　パロバロテンの主要代謝物による hERG カリウム電流阻害

	% reduction (Mean±SEM)				
Compound	**0.3 µmol/L**	**1 µmol/L**	**3 µmol/L**	**10 µmol/L**	**30 µmol/L**
M2	6.2 ± 1.9	7.9 ± 1.5	13.4 ± 1.9*	14.7 ± 1.0*	14.5 ± 1.2*
M3	9.1 ± 2.5*	14.8 ± 3.5*	26.0 ± 1.8*	32.2 ± 1.8*	38.3 ± 2.0*
M4a	4.2 ± 1.3	8.8 ± 3.1	11.3 ± 2.9*	13.3 ± 2.0*	18.9 ± 2.7*
M4b	3.1 ± 0.9	5.5 ± 0.7	7.6 ± 0.9	10.8 ± 1.2*	14.7 ± 1.4*

Source: Report 1005681, Table 1.
Mean±SEM of % reduction was calculated from the peak current amplitudes after a steady-state level of drug block was achieved relative to the current amplitude before drug was introduced (control), n = 5.
* p<0.05
hERG=human ether-à-go-go-related gene; M2=6-hydroxy metabolite of palovarotene; M3=7-hydroxy metabolite of palovarotene; M4a=6-oxo metabolite of palovarotene; M4b=7-oxo metabolite of palovarotene; SEM=standard error of the mean.

いずれの代謝物についても、hERG カリウム電流の弱い阻害作用の可能性が示唆された。IC_{50} はいずれも検討した最高濃度（30 µmol/L）を上回っていた。

さらに、パロバロテンの代謝物を用いた反復投与毒性試験（2.6.6.8.1.1 項）では、一般状態観察、ECG 検査、血液生化学的検査及び尿検査において主要代謝物の神経系、心血管系、呼吸系、胃腸管系及び腎・泌尿器系に対する影響を示唆する変化は認められなかった。

5　薬力学的薬物相互作用試験

パロバロテンを用いた薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

6　考察及び結論

パロバロテンの薬理作用を一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験で評価した。受容体結合試験及び転写活性化試験において、パロバロテン及びは RARγ 選択的アゴニストであることが示された。転写活性化試験において、主要代謝物（M2、M3、M4a 及び M4b）は RARγ に選択的な部分アゴニスト活性を示したが、RARγ を介した転写活性化能はパロバロテンよりも低かった（1.2%～14%）。

パロバロテンは、ALK2 活性化変異（R206H）を有する FOP 患者由来の線維芽細胞株において、Smad シグナル伝達を阻害した。また、パロバロテンはマウス FOP モデルの筋損傷部位における炎症反応及び線維増殖性反応を抑制した。これらの結果と一致して、パロバロテンは複数の損傷誘発性 HO／FOP マウスモデルにおいて、用量依存的な HO 形成阻害作用を示した。さらに、溶媒投与動物の HO 部位では関節可動域が制限されたのに対し、パロバロテン投与動物では維持された。用量反応モデル解析により、HED 換算で 20 mg/日のパロバロテンにより最大の HO 阻害作用が得られることが示唆された。また、自然発症 HO や母趾奇形など FOP 患者で認められる特徴的な表現型の多くを再現したマウス FOP モデルに対しても、パロバロテンは HO 形成阻害作用を示した。

パロバロテンは、異化期での炎症反応及び組織損傷の軽減及び同化期での軟骨形成阻害により、FOP に対して有効性を示すと考えられる。パロバロテンは、ALK2 変異により過剰に活性化した Smad シグナル伝達を抑制して、MSC の分化を骨組織から軟部組織へと転換して正常な組織修復へ導くことにより、軟骨細胞の分化を阻害する。

副次的薬理試験において各種受容体及び酵素活性に対する作用を評価した結果、パロバロテンがオフターゲット薬理活性によりヒトで有害作用を引き起こす可能性は低いことが推察された。

安全性薬理試験の結果から、パロバロテン及び代謝物は CNS、呼吸系、腎・泌尿器系及び胃腸管系に有害な影響を及ぼさないと考えられた。

心血管系に対する影響評価では、パロバロテンの *in vitro* hERG 試験で hERG カリウムチャネルの弱い阻害作用が認められたが、*in vitro* プルキンエ線維試験及びイヌを用いた *in vivo* テレメトリー試験（最高 10 mg/kg の単回投与）ではパロバロテンに関連した変化はみられなかった。母集団薬物動態解析で MRHD（20 mg）を体重補正用量で 1 日 1 回投与したときの C_{max} の中央値は 138～202 ng/mL であることが示されており（2.7.2.3.8 項）、*in vitro* hERG チャネル阻害の IC_{50}（約 2985 ng/mL）及びイヌで心血管作用が認められない最高用量（10 mg/kg）投与時の C_{max}（2175 ng/mL）を大きく下回るため、パロバロテンが心血管系に有害な影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

代謝物の *in vitro* hERG 試験では、主要代謝物である M2、M3、M4a 及び M4b による hERG カリウムチャネルの弱い阻害作用が認められたが、IC_{50} 値はいずれも 30 µmol/L 超であり、臨床的に意義のある曝露量での hERG カリウムチャネルへの影響は示唆されなかった。さらに、パロバロテンの代謝物を用いた反復投与毒性試験（2.6.6.8.1.1 項）では、一般状態観察、ECG 検査、血液生化学的検査及び尿検査において主要代謝物の神経系、心血管系、呼吸系、胃腸管系及び腎機能に対する影響を示唆する変化は認められなかった。

7　図表

本文中に記載した。

参考文献

Apfel C, Bauer F, Crettaz M, Forni L, Kamber M, Kaufmann F, et al. A retinoic acid receptor alpha antagonist selectively counteracts retinoic acid effects. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(15):7129-33.

Bentzinger CF, Wang YX, Dumont NA, Rudnicki MA. Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. EMBO Rep. 2013;14(12):1062-72.

Chakkalakal SA, Uchibe K, Convente MR, Zhang D, Economides AN, Kaplan FS, et al. Palovarotene Inhibits Heterotopic Ossification and Maintains Limb Mobility and Growth in Mice With the Human ACVR1(R206H) Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) Mutation. J Bone Miner Res. 2016;31(9):1666-75.

Chakkalakal SA, Zhang D, Culbert AL, Convente MR, Caron RJ, Wright AC, et al. An Acvr1 R206H knock-in mouse has fibrodysplasia ossificans progressiva. J Bone Miner Res. 2012;27(8):1746-56.

Convente MR, Chakkalakal SA, Yang E, Caron RJ, Zhang D, Kambayashi T, et al. Depletion of Mast Cells and Macrophages Impairs Heterotopic Ossification in an Acvr1(R206H) Mouse Model of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. J Bone Miner Res. 2018;33(2):269-82.

Di Rocco A, Uchibe K, Larmour C, Berger R, Liu M, Barton ER, et al. Selective Retinoic Acid Receptor γ Agonists Promote Repair of Injured Skeletal Muscle in Mouse. Am J Pathol. 2015;185(9):2495-504.

Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation Research (CDER). Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. July 2005.

Fukuda T, Scott G, Komatsu Y, Araya R, Kawano M, Ray MK, et al. Generation of a Mouse With Conditionally Activated Signaling Through the BMP Receptor, ALK2. Genesis. 2006;44(4):159-67.

Gannon FH, Glaser D, Caron R, Thompson LD, Shore EM, Kaplan FS. Mast Cell Involvement in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. Hum Pathol. 2001;32(8):842-8.

Gannon FH, Valentine BA, Shore EM, Zasloff MA, Kaplan FS. Acute Lymphocytic Infiltration in an Extremely Early Lesion of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. Clin Orthop Relat Res. 1998(346):19-25.

Haas AR, Tuan RS. Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: II. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 requires modulation of N-cadherin expression and function. Differentiation. 1999;64(2):77-89.

Inubushi T, Lemire I, Irie F, Yamaguchi Y. Palovarotene Inhibits Osteochondroma Formation in a Mouse Model of Multiple Hereditary Exostoses. J Bone Miner Res. 2018;33(4):658-66.

Kaplan FS, Al Mukaddam M, Baujat G, Brown M, Cali A, Cho T-J, et al. The medical management of fibrodysplasia ossificans progressiva: current treatment considerations. Proc Intl Clin Council FOP. 2019:1-111.

Kaplan FS, Chakkalakal SA, Shore EM. Fibrodysplasia ossificans progressiva: mechanisms and models of skeletal metamorphosis. Dis Model Mech. 2012;5(6):756-62.

Kaplan FS, Pignolo RJ, Al Mukaddam M, Shore EM. Genetic Disorders of Heterotopic Ossification: Fibrodysplasia Ossificans Progressiva and Progressive Osseous Heteroplasia. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 9th edition.2018.865-70.

Kaplan FS, Tabas JA, Gannon FH, Finkel G, Hahn GV, Zasloff MA. The Histopathology of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. An Endochondral Process. J Bone Joint Surg Am. 1993;75(2):220-30.

Kaplan FS, Xu M, Seemann P, Connor JM, Glaser DL, Carroll L, et al. Classic and atypical fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) phenotypes are caused by mutations in the bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor ACVR1. Hum Mutat. 2009;30(3):379-90.

Koyama E, Golden EB, Kirsch T, Adams SL, Chandraratna RA, Michaille JJ, et al. Retinoid signaling is required for chondrocyte maturation and endochondral bone formation during limb skeletogenesis. Dev Biol. 1999;208(2):375-91.

Lees-Shepard JB, Nicholas SE, Stoessel SJ, Devarakonda PM, Schneider MJ, Yamamoto M, et al. Palovarotene reduces heterotopic ossification in juvenile FOP mice but exhibits pronounced skeletal toxicity. Elife. 2018;7:e40814.

Lin H, Shi F, Gao J, Hua P. The role of Activin A in fibrodysplasia ossificans progressiva: a prominent mediator. Biosci Rep. 2019;39(8):BSR20190377.

Lindborg CM, Brennan TA, Wang H, Kaplan FS, Pignolo RJ. Cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (CD-RAP): A stage-specific biomarker of heterotopic endochondral ossification (HEO) in fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). Bone. 2018;109:153-7.

Massagué J. TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem. 1998;67:753-91.

Newton PT, Staines KA, Spevak L, Boskey AL, Teixeira CC, Macrae VE, et al. Chondrogenic ATDC5 cells: an optimised model for rapid and physiological matrix mineralisation. Int J Mol Med. 2012;30(5):1187-93.

Pacifici M, Cossu G, Molinaro M, Tato F. Vitamin A inhibits chondrogenesis but not myogenesis. Exp Cell Res. 1980;129(2):469-74.

Shimono K, Tung WE, Macolino C, Chi AH, Didizian JH, Mundy C, et al. Potent Inhibition of Heterotopic Ossification by Nuclear Retinoic Acid Receptor-gamma Agonists. Nat Med. 2011;17(4):454-60.

Shore EM, Kaplan FS. Inherited human diseases of heterotopic bone formation. Nat Rev Rheumatol. 2010;6(9):518-27.

Sinha S, Uchibe K, Usami Y, Pacifici M, Iwamoto M. Effectiveness and mode of action of a combination therapy for heterotopic ossification with a retinoid agonist and an anti-inflammatory agent. Bone. 2016;90:59-68.

Song B, Estrada KD, Lyons KM. Smad signaling in skeletal development and regeneration. Cytokine Growth Factor Rev. 2009;20(5-6):379-88.

Weston AD, Blumberg B, Underhill TM. Active repression by unliganded retinoid receptors in development: less is sometimes more. J Cell Biol. 2003;161(2):223-8.

Weston AD, Chandraratna RA, Torchia J, Underhill TM. Requirement for RAR-mediated gene repression in skeletal progenitor differentiation. J Cell Biol. 2002;158(1):39-51.

Wheatley BM, Cilwa KE, Dey D, Qureshi AT, Seavey JG, Tomasino AM, et al. Palovarotene inhibits connective tissue progenitor cell proliferation in a rat model of combat-related heterotopic ossification. J Orthop Res. 2018;36(4):1135-44.

Williams JA, Kondo N, Okabe T, Takeshita N, Pilchak DM, Koyama E, et al. Retinoic acid receptors are required for skeletal growth, matrix homeostasis and growth plate function in postnatal mouse. Dev Biol. 2009;328(2):315-27.

Yoon BS, Ovchinnikov DA, Yoshii I, Mishina Y, Behringer RR, Lyons KM. Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(14):5062-7.

Yu PB, Deng DY, Lai CS, Hong CC, Cuny GD, Bouxsein ML, et al. BMP type I receptor inhibition reduces heterotopic [corrected] ossification. Nat Med. 2008;14(12):1363-9.

目次

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 4
2.6.3.4 安全性薬理試験 5
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 7

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Test Article: Palovarotene and its metabolites

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number/Publication	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
Receptor binding and transactivation potential	Radioligand binding assays and transactivation cell-based reporter gene assays	*In vitro*	[redacted], USA	At 7801	Module 4.2.1.1.1
Smad phosphorylation cell-based assay	FOP fibroblast cell line carrying the ALK2 R206H mutation	*In vitro*	[redacted], USA	CLM001-PD-001	Module 4.2.1.1.2
Efficacy in ALK2 (Q207D) mice – inhibition of HO	ALK2 (Q207D) mice heterozygous	Oral gavage	[redacted], USA	001	Module 4.2.1.1.3
Efficacy in ALK2 (Q207D) mice – inhibition of HO	ALK2 (Q207D) mice homozygous	Oral gavage	[redacted], Canada	CLM001-PD-002	Module 4.2.1.1.4

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: Palovarotene and its metabolites

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number/Publication	Location in CTD
Secondary Pharmacodynamics					
Screening of off-target activities	Radioligand receptor binding and enzymatic activity assays	*In vitro*	[redacted], [redacted], France	1008424	Module 4.2.1.2.1
Safety Pharmacology					
Central nervous system	Rats/Wistar	Oral gavage	[redacted], [redacted], UK	1004719[1]	Module 4.2.1.3.1
Cardiovascular system	CHO cells expressing hERG potassium channel	*In vitro*	[redacted], [redacted], Switzerland	1006456	Module 4.2.1.3.2
Cardiovascular system	HEK 293 cells stably expressing the hERG potassium channel	*In vitro*	[redacted], [redacted], [redacted], USA	1005681	Module 4.2.1.3.3
Cardiovascular system	Canine cardiac Purkinje fibers/Beagle	*In vitro*	[redacted], [redacted], UK	1006565[1]	Module 4.2.1.3.4
Cardiovascular system	Surgically instrumented dogs/Beagle	Oral gavage (capsule)	[redacted], [redacted], UK	1007995[1]	Module 4.2.1.3.5
Cardiovascular system	Surgically instrumented dogs/Beagle	Oral gavage (capsule)	[redacted], [redacted], UK	1006978[1]	Module 4.2.1.3.6
Renal/Urinary system	Rats/Wistar	Oral gavage	[redacted], [redacted], [redacted], USA	1008099[1]	Module 4.2.1.3.7
Gastrointestinal system	Rats/Wistar	Oral gavage	[redacted], [redacted], [redacted], USA	1007751[1]	Module 4.2.1.3.8

[1] GLP compliance statement included.

ALK2=activin receptor-like kinase 2; CHO=Chinese hamster ovary; CTD=common technical document; FOP=fibrodysplasia ossificans progressiva; GLP=Good Laboratory Practice; HEK=human embryonic kidney; hERG=human ether-à-go-go-related gene; HO=heterotopic ossification; M2=6-hydroxy metabolite of palovarotene; M3=7-hydroxy metabolite of palovarotene; M4a=6-oxo metabolite of palovarotene; M4b=7-oxo metabolite of palovarotene; Smad=Suppressor of Mothers against Decapentaplegic.

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2 項を参照

2.6.3.3　副次的薬理試験

2.6.2.3 項を参照

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: Palovarotene and its metabolites

Organ Systems and study type	Test System	Method of Administration (vehicle/formulation)	Doses[1] (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number/ Location in CTD
Central Nervous System Irwin-type study	Rat/Wistar	Oral gavage (Miglyol 812 with 0.01% BHA and 0.01% BHT)	0, 0.2, 1, 5	6 males	There were no findings that suggested an effect on central nervous system function. The only palovarotene-related effect was diarrhea up to 5 hours post-dose at ≥1 mg/kg.	Yes	1004719/ Module 4.2.1.3.1
Cardiovascular System hERG assay	CHO cells expressing hERG potassium channel	*In vitro*	1-10 µmol/L	Not applicable	IC_{50}: approximately 7.2 µmol/L	No	1006456/ Module 4.2.1.3.2
Cardiovascular System hERG assay with palovarotene and palovarotene metabolites M2, M3, M4a and M4b	HEK 293 cells stably expressing the hERG potassium channel	*In vitro*	0.3, 1, 3, 10, and 30 µmol/L for palovarotene and each metabolite	Not applicable	All compounds tested were fairly weak blockers of hERG current amplitude failing to reach a 50% inhibition level at the highest concentration tested of 30 µmol/L.	No	1005681/ Module 4.2.1.3.3
Cardiovascular System Action potential assay	Canine cardiac Purkinje fibers/Beagle	*In vitro*	0.01, 0.1, 1, 10 µmol/L	6 fibers, males and females	No effect on resting membrane potential, depolarization rate, upstroke amplitude, or action potential duration at any concentration.	Yes	1006565/ Module 4.2.1.3.4
Cardiovascular System Hemodynamic and ECG study	Surgically instrumented dog/Beagle	Oral capsule (Miglyol 812 with 0.01% BHA and 0.01% BHT)	0, 0.04, 0.2	4 males[2]	No effect on heart rate, heart rhythm, blood pressure, or ECG parameters for up to 8 hours postdose at any dose level.	Yes	1007995/ Module 4.2.1.3.5

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

Test Article: Palovarotene and its metabolites

Organ Systems and study type	Test System	Method of Administration (vehicle/formulation)	Doses[1] (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number/ Location in CTD
Cardiovascular System Hemodynamic and ECG study	Surgically instrumented dog/Beagle	Oral capsule (Miglyol 812 with 0.01% BHA and 0.01% BHT)	0, 1, 10	4 males[2]	No effect on heart rate, heart rhythm, blood pressure, or ECG parameters for up to 8 hours postdose at any dose level.	Yes	1006978/ Module 4.2.1.3.6
Renal/Urinary System Urine volume/electrolytes	Rat/Wistar	Oral gavage (Miglyol 812 with 0.01% BHA and 0.01% BHT)	0, 0.2, 1, 5	10 males	The only effect of palovarotene was a slightly lower urinary chloride excretion at ≥1 mg/kg and lower urinary sodium and potassium excretion at 5 mg/kg.	Yes	1008099/ Module 4.2.1.3.7
Gastrointestinal System Gastrointestinal motility	Rat/Wistar	Oral gavage (Miglyol 812 with 0.01% BHA and 0.01% BHT)	0, 0.2, 1, 5	10 males	Palovarotene slightly slowed gastric emptying at all dose levels but did not affect intestinal motility at any dose level.	Yes	1007751/ Module 4.2.1.3.8

[1] Milligram per kilogram of body weight, unless specified otherwise. Single dose, unless specified otherwise.
[2] A single group of four dogs was dosed according to the ascending regimen.

BHA=butylated hydroxyanisole; BHT=butylated hydroxytoluene; CHO=Chinese hamster ovary; CTD=common technical document; ECG=electrocardiogram; GLP=Good Laboratory Practice; HEK=human embryonic kidney; hERG=human ether-à-go-go-related gene; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; M2=6-hydroxy metabolite of palovarotene; M3=7-hydroxy metabolite of palovarotene; M4a=6-oxo metabolite of palovarotene; M4b=7-oxo metabolite of palovarotene; No.=number.

2.6.3.5　　薬力学的薬物相互作用試験

該当なし