

201442003A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患実用化研究事業

新規作用機序の多発性硬化症治療薬の開発

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 宮田 敏男

平成27(2015)年 3月

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患実用化研究事業

新規作用機序の多発性硬化症治療薬の開発

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 宮田 敏男

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

新規作用機序の多発性硬化症治療薬の開発 宮田 敏男	----- 1
------------------------------	---------

新規作用機序の多発性硬化症治療薬の開発

業務主任者 宮田 敏男 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

多発性硬化症（MS）は難病（公費対象）であり、その治療法は確立されていない。唯一承認の経口薬フィンゴリモドには問題があり、作用機序が異なり有効性と安全性が高い新たな経口薬が待望されている。

申請者らは、長年PAI-1阻害薬（経口薬）の研究に取り組み、脳移行性の新規PAI-1阻害薬TM5484がMSモデル動物で治療効果を示すことを発見したことを契機として、本研究（平成26～28年度）ではTM5484あるいはその後継品をMS治療のFirst-in-Class（画期的新薬）として開発することを最終目標として、本研究では治験に入るための非臨床研究の完成を目指している。

平成26年度は、その達成目標であるTM5484の臨床移行に必要な非臨床試験について、計画通り目標をほぼ100%達成した。一方、TM5484より脳移行性が高く、MSモデル動物でTM5484と同等以上の薬理作用を有する新規PAI-1阻害薬が見出せる可能性が示された。

業務項目の担当責任者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

宮田 敏男 東北大学大学院医学系研究科 教授

N000010686)。また、野生型マウスに比べてPAI-1欠損マウスで軽減される種々の疾患は、PAI-1阻害薬の投与で改善できることを証明した（Blood 2012、A TVB 2013、Stem Cell 2013）。MSモデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）はPAI-1欠損マウスで抑制されること（Neuropathol Appl Neurobiol. 2008）、再発寛解型多発性硬化症の再発期にPAI-1活性が上昇すること（Tohoku J Exp Med. 1999）から、PAI-1阻害薬（経口薬）のMS治療への応用について検討した。新規のPAI-1阻害化合物450種の中から、in vitro血液脳関門モデル実験系で最も高い脳移行性が推定されたTM5484（10mg/kg/日）を用いて、MSモデル動物のEAE/C57BL6マウスで治療効果を検討した結果、対照としたフィンゴリモドに匹敵する薬効を示すことを発見した。TM5484は、PAI-1活性を抑制することでマクロファージの浸潤を抑制し、神経細胞の生存・再生・シナプスの形成を促進する脳由来栄養因子BDNF含量を有意に上昇させる既存薬とは異なる作用を有する。また、ヒトでの効果を予測するためのサルでの薬理試験では、0.3 mg/kgで有意な薬効を示し、非臨床（非GLP）のAmes試験とhERG試験で陰性（フィンゴリモドは陽性）、ラット2週間経口反復毒性試験の無毒性量が30 mg/kg/日（雄）と安全性が高い開発候補化合物である。米国Wyeth社の臨床試験でドロップアウトしたPAI-749（Lucking A. 2010）とは異なり、ヒト血漿中で作用することも確認している。しかし、MSモデル動物で治療効果を示す有効投与量が高いことが臨床移行した際の課題となる可能性がある。

A. 研究目的

多発性硬化症（MS）は難病（公費対象）であり、第一選択薬はインターフェロン製剤（注射薬）である。唯一承認の経口薬フィンゴリモドは、突然死等の副作用があり、無効患者が約20%、年間再発予防率50%程度と満足できるものではない。その改良を狙ったS1P受容体薬の開発研究は複数あるが、作用機序が異なり有効性と安全性が高い新たな経口薬が待望されている。

申請者らは、長年PAI-1阻害薬（経口薬）の研究に取り組み、脳移行性の新規PAI-1阻害薬TM5484がMSモデル動物で治療効果を示すことを発見した。本研究（平成26～28年度）はTM5484あるいはその後継品をMS治療のFirst-in-Class（画期的新薬）として開発することを最終目標として、本研究では治験に入るための非臨床研究の完成を目指す。

B. 研究方法

本研究における研究代表者や分担研究者は、10年以上に亘ってPAI-1の生理作用の解明とPAI-1阻害薬の開発に取り組んできた（日薬理誌2010）。ヒトPAI-1蛋白構造を基にin silicoで見出したヒット化合物TM5007（ATVB 2008、JCBFM 2010）の誘導体（約450種の新規化合物）からTM5509を見出して、「造血促進」を目標とする医師主導治験を進めている（UMI

そこで、本研究（平成26～28年度）はTM5484あるいはその後継品をMS治療のFirst-in-Class（画期的新薬）

として開発することを最終目標として、本研究では治験に入るための非臨床研究の完成を目指す。具体的には、非臨床薬効薬理試験（作用機序を含む）、GLP安全性試験、薬物動態・代謝試験、治験薬の確保（GMP製造）および製剤化検討までを実施する。また、成果物として、非臨床試験総括報告書（安全性試験についてはGLP）、治験薬GMP製造関連書類、治験薬概要書ならびに医師主導治験実施計画書を作成する。PMDA医薬品戦略相談において、臨床試験への移行承認を得ることを本研究のエンドポイント（マイルストーン）とする。

平成26年度における研究開発計画項目、マイルストーン及び研究開発方法

1. 非臨床 GLP 試験等の非臨床試験に使用する GLP 品を外部委託で合成する。
2. 臨床 P-1 試験までに必要な非臨床 GLP 安全性試験を開始する。具体的には、ブロック A として、①HPLC を用いた分析法バリデーション試験、②特性及び安定性試験、③調製液の濃度分析法バリデーション試験、④hERG 細胞外液中の TM5484 濃度測定法バリデーション試験、⑤LC/MS/MS 法によるラット血漿中 TM5484 の濃度測定法バリデーション試験、⑥LC/MS/MS 法によるサル血漿中 TM5484 の濃度測定法バリデーション試験、⑦カニクイザルにおける単回漸増経口投与予備試験（非 GLP）、⑧カニクイザルにおける 2 週間反復経口投与予備試験（非 GLP）、⑨ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験（GLP）を実施する。
3. 臨床 P-1 試験までに必要な非臨床薬物動態および薬物代謝試験を実施する。具体的には、①ラット及びサルを用いた単回投与バイオアベイラビリティ（BA）試験、②¹⁴C 標識 TM5484 の合成及びそれを使用した薬物動態試験（定量全身オートラジオグラフィ）、凍結肝細胞を用いた比較代謝試験（代謝物構造推定を含む）と血漿蛋白結合率の測定（ラット、サル、ヒト）、③in vitro での薬物代謝酵素（CYP）の分子種の同定と酵素阻害・誘導試験を実施する。
4. MS モデル動物の SJL/N マウスおよび Lewis ラットでの薬効試験を実施し、EAE/C57BL6 マウス以外での薬効を確認する。
5. M5484 の後継品を見出す目的で、構造最適化を実施する。

（倫理面への配慮）

動物実験は動物福祉の立場からの要請や法的規制に充分従い、個体に最も負担の少ない実験手技を用いる。具体的には、東北大学の動物実験専門委員会に本課題にそった申請・承諾を得て、それぞれの「動物実験等に関する規程」に従って施行するので、動物倫理上も問題がない。また、遺伝子組換え実験については、「遺伝子組換え実験申請書」を提出し、承認を得た上で、法・規制に順じた措置を講じて研究を進める。

ICH（日米EU医薬品規制調和国際会議）で新薬承認審査の基準を国際的に統一し、医薬品の特性を検討するための非臨床試験・臨床試験の実施方法やルール等が取りまとめられている項目については、そのガイドラインやガイダンスを遵守して実施する。

GLP非臨床試験は、「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」（厚生省令第21号：平成9年3月26日、一部改正 厚生労働省令第114号 平成20年6月13日）と「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令の一部を改正する省令による改正後の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令の取扱いについて」（薬食発第0613007号：平成20年6月13日付厚生労働省医薬食品局長通知）を遵守して実施する。その他、非臨床試験に関して法・規制基準があるものについても遵守する。

C. 研究結果

平成26年度には以下の成果が得られた。

1. 非臨床GLP試験等の非臨床試験に使用するGLP品（100 g）を外部委託で合成した（大量合成法の検討を含む）
2. 臨床P-1試験までに必要な非臨床GLP安全性試験を開始した。具体的には、ブロックAとして、①HPLCを用いた分析法バリデーション試験、②特性及び安定性試験、③調製液の濃度分析法バリデーション試験、④hERG細胞外液中のTM5484濃度測定法バリデーション試験、⑤LC/MS/MS法によるラット血漿中TM5484の濃度測定法バリデーション試験、⑥LC/MS/MS法によるサル血漿中TM5484の濃度測定法バリデーション試験、⑦カニクイザルにおける単回漸増経口投与予備試験（非GLP）、⑧カニクイザルにおける2週間反復経口投与予備試験（非GLP）、⑨ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験（GLP）を実施した。その結果、サルでは肝・胆道系に対する影響が10 mg/kg/日以上で、腎臓系に対する影響が50 mg/kg/日で見られたことから、ほ乳類ではげっ

歯類よりも低い投与量から発現する可能性が示唆された。なお、TM5484の安全性を明らかにする目的で、平成27年度に実施を計画していたGLP安全性試験ブロックB（①TM5484のラットにおける4週間反復経口投与複合型毒性試験及び2週間回復性試験、②TM5484のカニクイザルにおける4週間反復経口投与毒性試験及び2週間回復性試験、③TM5484の安全性薬理試験-サル心血管系および呼吸系）を年度内に終了予定である。なお、サルでの毒性は、TM5484分子のフラン基に基づく可能性が示唆された。

3. 臨床P-1試験までに必要な非臨床薬物動態および薬物代謝試験を実施する計画であったが、上記のように安全性の確認を重点的に実施することとして、薬物代謝については、in vitroでの薬物代謝酵素（CYP）の分子種の同定を実施した。
4. EAE/C57BL6マウス以外での薬効を確認する目的で、MSモデル動物のSJL/N再発モデルマウスおよびLewisラットでの薬効試験を実施した。その結果、TM5484はSJL/Nマウスで5 mg/kg/日、Lewisラットで2.5 mg/kg/日から有効性を示した。

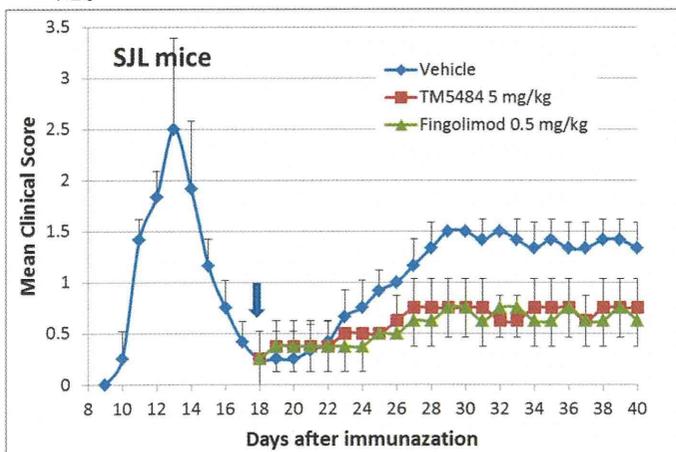


図1. SJL/NマウスにおけるTM5484の再発予防効果

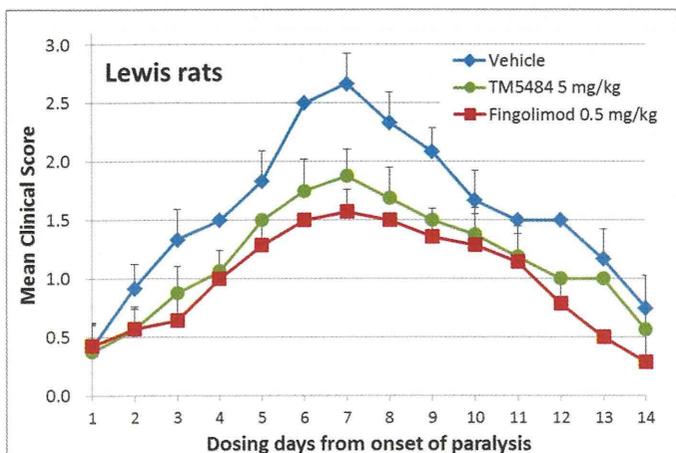


図2. EAE/LewisラットモデルにおけるTM5484の薬効

5. In vitro PAI-1阻害アッセイを用いた構造最適化で、現在臨床開発を進めているTM5509 (UMI N000015590、第I相試験終了) や本研究のプロトタイプTM5484よりPAI-1阻害活性の強い化合物が見出されている。

化合物ID	IC50 (μM)	化合物ID	IC50 (μM)
TM5484	3.56	TM5736	0.665
TM5509	2.82	TM5753	0.564
TM5680	0.393	TM5761	0.578
TM5724	0.282	TM5762	0.452
TM5729	0.404	TM5767	0.910
TM5730	0.225		
TM5731	0.246		

D. 考察

上記の結果から、TM5484については、臨床移行に必要な非臨床試験はほぼ終了した。一方、TM5484より、脳移行性が高く、MSモデル動物でTM5484と同等以上の薬理作用を有する新規PAI-1阻害薬が見出せる可能性が示された。そこで、本研究はTM5484以上の薬理作用を有し、より安全性が高い臨床開発候補化合物を見出すことで、終了年度には当初の計画通り、臨床試験への移行承認を得ることを目指す。

平成27年度は、①TM5484の後継誘導体の中から新たな臨床開発候補化合物を選択する、②新たな臨床開発候補化合物の非臨床GLP安全性試験を開始する、③作用機序検討として、組織レベルでの解析を中心に進める。

E. 結論

平成26年度の達成目標であるTM5484の臨床移行に必要な非臨床試験について、計画通り目標をほぼ100%達成した。一方、TM5484より脳移行性が高く、MSモデル動物でTM5484と同等以上の薬理作用を有する新規PAI-1阻害薬が見出せる可能性が示されたことから、平成27年度は新たな臨床開発候補化合物を選択して、開発研究を進める。

F. 健康危険情報

健康危険情報は無い。

<p>G. 研究発表</p> <p>1. 論文発表</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ibrahim AA, Yahata T, Onizuka M, Dan T, van Ypersele de Strihou C, Miyata T, Ando K. Inhibition of Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Activity Enhances Rapid and Sustainable Hematopoietic Regeneration. <i>Stem Cells</i>. 2014; 32: 946-58 2. Tanaka K, Nakayama M, Kanno M, Kimura H, Watanabe K, Tani Y, Kusano Y, Suzuki H, Hayashi Y, Asahi K, Sato K, Miyata T, Watanabe T. Skin autofluorescence is associated with the progression of chronic kidney disease: A Prospective Observational Study. <i>PLoS One</i>. 2013; 8: e83799. 3. Kimura H, Tanaka K, Kanno M, Watanabe K, Hayashi Y, Asahi K, Suzuki H, Sato K, Sakaue M, Terawaki H, Nakayama M, Miyata T, Watanabe T. Skin Autofluorescence Predicts Cardiovascular Mortality in Patients on Chronic Hemodialysis. <i>Therapeutic Apheresis and Dialysis</i>. 2014;18:461-7. 4. Jo-Watanabe A, Ohse T, Nishimatsu H, Takahashi M, Ikeda Y, Wada T, Shirakawa J I, Nagai R, Miyata T, Nagano T, Hirata Y, Inagi R, Nangaku M. Glyoxalase I reduces glycative and oxidative stress and prevents age-related endothelial dysfunction through modulation of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. <i>Aging Cell</i>. 2014; 13: 519-28. 5. Miyashita M, Arai M, Kobori A, Ichikawa T, Toriumi K, Niizato K, Oshima K, Okazaki Y, Yoshikawa T, Amano N, Miyata T, Itokawa M. Clinical features of schizophrenia with enhanced carbonyl stress. <i>Schizophrenia Bulletin</i>. 2014; 40: 1040-6. 6. Jung I, Piao L, Huh JY, Miyata T, Nam D, Ha H. A novel PAI-1 inhibitor, TM5441, protects high fat diet-induced obesity and adipocyte injury in mice. In press. 7. Kobayashi N, Ueno T, Ohashi K, Yamashita H, Takahashi Y, Sakamoto K, Manabe S, Hara S, Takashima Y, Dan T, Pastan I, Miyata T, Kurihara H, Matsusaka T, Reiser J, Nagata M. Podocyte injury-driven intracapillary plasminogen activator inhibitor type 1 accelerates podocyte loss via beta 1 integrin endocytosis. <i>Am J Physiol Renal Physiol</i>. Epub ahead of print. 8. Placencio VR, Ichimura A, Miyata T, DeClerck YA. Small Molecule Inhibitors of PAI-1 TM5275 and TM5441 Elicit Anti-Angiogenic and Anti-tumorigenic. <i>Journal Molecular Cancer Therapeutics</i>. In press. 9. Miyashita M, Watanabe T, Arai M, Ichikawa T, Toriumi K, Kobori A, Kushima I, Hashimoto R, Fukumoto M, Koike S, Ujike H, Arinami T, Tatebayashi Y, Kasai K, Takeda M, Ozaki M, Okazaki Y, Yoshikawa T, Ama 	<p>no N, Yamamoto H, Miyata T, Itokawa M. Identification of functional variants in AGE R associated with a marked decrease in serum esRAGE levels. <i>Journal of Human Genetics</i>. In press.</p> <ol style="list-style-type: none"> 10. Boe AE, Eren M, Morales-Nebreda L, Murphy SB, Budinger GR, Mutlu GM, Miyata T, Vaughan DE. Nitric oxide prevents alveolar senescence and emphysema in a mouse model. <i>PLoS One</i>. 2015; 10: e0116504. <p>2. 学会発表</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Miyata T. Drug discovery in kidney disease: From serendipity to rationality. ISN Nexus Symposium: New era of drug discovery and clinical trials in kidney disease in Bergamo (Italy). 2014 April 3-6. 2. 宮田敏男. アカデミアからの新薬開発：課題と展望. 革新ナノバイオデバイス研究センター特別セミナー（名古屋大学大学院工学研究科）. 2014.5.9. 名古屋 3. 宮田敏男. アカデミアからの新薬開発：課題と展望. 研究カンファレンス講演（京都大学医学部附属病院呼吸器内科学）. 2014.6.9. 京都 4. Miyata T. Drug discovery : Role and significance of academia. The 13th Kitasato University-Harvard School of Public Health Symposium in Tokyo(Japan). 2014 July 4-5. 5. Miyata T. Drug discovery in kidney disease - From serendipity to rationality -. Karolinska-Tohoku Joint Symposium on Medical Sciences in Sendai(Japan). 2014 November 8-9. 6. 宮田敏男. ドラッグディスカバリー —アカデミアの役割と重要性—. 第11回DIA日本総会（東京ビックサイト）. 2014.11.17. 東京 7. Miyata T. Drug discovery and development: Respective role of academia. Third International Conference on Innovative Biology, Medicine, and Engineering (ICIBME 2015) in Nagoya(Japan). 2015 January 15-16. <p>H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 特許取得 なし 2. 実用新案登録 なし 3. その他 なし
--	---

本報告書は、厚生労働省の平成26年度厚生労働科学研究委託事業(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)))による委託業務として、国立大学法人東北大学が実施した平成26年度「新規作用機序の多発性硬化症治療薬の開発」の成果を取りまとめたものです。