

過去の報告書・英訳・論文掲載の事例

- iPS 細胞等をもとに製造される細胞組織加工製品の造腫瘍性に関する議論のまとめ  
(第 1 期：細胞組織加工製品専門部会)
  1. 日本語版 . . . . P2
  2. 英語版 . . . . P11
  
- 抗悪性腫瘍薬開発における非臨床試験の活用に関する提言  
(第 2 期：非臨床試験の活用に関する専門部会)
  3. 日本語版 . . . . P24
  4. 論文掲載 . . . . P52

平成25年8月20日

## iPS 細胞等をもとに製造される細胞組織加工製品の造腫瘍性に関する議論のまとめ

細胞組織加工製品専門部会 部会長 中畑龍俊  
細胞組織加工製品専門部会 副部会長 岡野栄之

### 1. はじめに

独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)科学委員会細胞組織加工製品専門部会(以下、本専門部会と略)は、細胞組織加工製品に関し、iPS 細胞等の安全性に関する大きな懸念事項である「造腫瘍性」について、科学的見地から議論を重ね、とりまとめを行った。

細胞組織加工製品の開発を適切に推進するためには、科学的に想定される懸念事項に対し、現時点で認識し得る問題をできる限り整理した上で、実施可能性をも考慮した対応がなされるべきである。ただし、細胞組織加工製品の開発に関しては、今まさに様々な研究が進行中であり、現時点での知見は限られている。したがって、本専門部会は、可能な限りの現状分析と対応を提示するものの、近い将来関連データが集積された段階で随時検討を重ねる必要があることを併せて提言するものである。

「造腫瘍性(tumorigenicity)」とは、動物に移植された細胞集団が増殖することにより悪性または良性の腫瘍を形成する能力をいう。ヒト iPS 細胞やヒト ES 細胞は、元来、奇形腫形成という造腫瘍性を有しており、この点がヒト体細胞・体性幹細胞とは大きく異なる。これらの多能性幹細胞に由来する細胞組織加工製品においては、未分化の多能性幹細胞の残留・混入等により異所性組織や腫瘍が形成されるおそれがあるため、最終製品の造腫瘍性の評価と適切な管理が重要な課題である。

細胞組織加工製品の安全性を確保するために、今回、本専門部会は、「造腫瘍性」に焦点を当て関連する課題を整理した。具体的には、現時点でどのような科学的試験方法が存在するか、さらに、個別の試験方法の実力と限界についての現状をまとめ、考え得る対応案を提示した。したがって、本報告は細胞組織加工製品の開発に関する科学的見地からのまとめであって、細胞組織加工製品の薬事承認のための要件等を示すものではない。

### 2. 細胞組織加工製品における造腫瘍性

細胞組織加工製品の由来細胞の種類(体細胞、体性幹細胞、iPS 細胞等)は多様である。また、最終製品ごとに必要な細胞数は、例えば、網膜色素上皮細胞製品では  $10^4$ 個、心筋細胞製品では  $10^8 \sim 10^9$  個と様々である。さらに、由来する細胞についても、自己、同種、及び

HLA ホモ接合型の同種のものが想定される。その上、細胞組織加工製品の臨床利用に際しては、その様態(例:細胞懸濁液や細胞シート等)、適用の経路、適用部位、免疫抑制剤の使用の有無、患者の病状の緊急性等、様々なケースが想定される。したがって、このような多様性に基づき、造腫瘍性の評価においては、総合的な考察が求められる。実際、このような考え方は、米国・EU の規制当局のガイドライン及び厚生労働省指針でも見て取れるが、現時点では細胞組織加工製品及びその由来細胞に関する造腫瘍性評価の公的ガイドラインは存在しない。(注1)

細胞組織加工製品の造腫瘍性を評価する上で、「製造に用いる(幹)細胞の造腫瘍性と最終製品の造腫瘍性との相関・因果関係は未解明である」という点は重要であり、多能性幹細胞をもとに製造される細胞組織加工製品に関して、ことに iPS 細胞由来細胞組織加工製品の場合、その由来する iPS 細胞ストック等における造腫瘍性と最終製品としての iPS 細胞等加工製品の造腫瘍性は区別して検討しなければならない。

### 3. iPS 細胞等に由来する細胞組織加工製品における未分化細胞・造腫瘍性細胞の混入及び造腫瘍性の評価

iPS 細胞等に分化を誘導して製造した最終製品が造腫瘍性を有する場合、その原因として、未分化な iPS 細胞等の混在、及び分化誘導の過程で造腫瘍性を有する細胞が生じた可能性が想定される。これらを実験系として評価する方法としては幾つかの試験系が存在する。

造腫瘍性を持つおそれのある未分化 iPS 細胞等の混入を評価する試験系としては、未分化多能性細胞特異的なマーカーの発現を指標にしたフローサイトメトリーや定量的 RT-PCR (qRT-PCR) が挙げられる。しかし、いずれも一定の頻度以下の未分化多能性幹細胞の混入は検出できず、最終製品を未分化多能性幹細胞培養条件に戻して培養して iPS 細胞等のコロニーが出現しないことの確認など新たな検査法の確立が重要である。

一方、これらの試験方法は、使用した未分化細胞マーカーを発現していない(すなわち想定外の)造腫瘍性細胞を検出することはできない。したがって、製造工程中において意図しない形質転換により生じる造腫瘍性を有する細胞をいかに検出するかは、重要な課題である。

悪性形質転換細胞を検出するための試験系としては、軟寒天コロニー形成試験、フォーカス形成試験、成長因子非依存性増殖アッセイ、ヌードマウスへの皮下移植による造腫瘍性試験(注1 WHO TRS878 を参照)等が挙げられるが、これらの方法はもともと細胞株ないしセル・バンクのような比較的均一な細胞集団の特性解析を目的としており、ごく少数の造腫瘍性を有する細胞に起因する造腫瘍性を評価するためには、ヒトへの外挿性も含め、十分な感度があるかどうかには注意する必要がある。

造腫瘍性細胞を包括的かつ高感度で検出する試験法としては、NOG マウスもしくは NSG マウス等の重度免疫不全マウスへの皮下移植による造腫瘍性試験が考えられる。ただし、こ

これらの系における定量化の方策・標準化は未整備である。

細胞組織加工製品に関する上記の試験系はすべて、最終製品における造腫瘍性を有する細胞の混入量あるいは有無を試験するものである。上述の通り最終製品は多様な要素を持つと想定されるので、個々の最終製品ごとに、許容される造腫瘍性細胞の混入量を考察し、それを検出する試験法を確立した上で、カットオフ値を定める必要がある。(注2)

iPS 細胞等加工製品の造腫瘍性に関する一つの懸念として、「生着する微小環境が腫瘍形成に影響を及ぼすか否か」が挙げられる。これを非臨床で検証する系としては、重度免疫不全マウス等を用い、ヒトでの適用部位に相当する部位に当該製品を適用して造腫瘍性を試験する方法が考えられる。ただし、その臨床への外挿性は未だ検証されておらず今後の課題である。

#### 4. iPS 細胞等に由来する細胞組織加工製品の製造に用いるヒト(同種)由来 iPS 細胞の造腫瘍性の評価と管理

iPS 細胞ストックは、特定の最終製品の製造を想定して開発されているものではなく、多様な最終製品の製造に用いることを想定したヒト(同種)由来 iPS 細胞のコレクションである。米国NIH等、海外でもヒト iPS 細胞コレクションが樹立されつつある。そこで、本専門部会では、一般論として、このようにコレクションされた臨床用ヒト iPS 細胞の造腫瘍性をどのように評価、管理するべきかについて議論した。

最終製品の造腫瘍性の評価は、上述の通り、重要であるが、最終製品の造腫瘍性は、その由来 iPS 細胞コレクションにおける個々の iPS 細胞の造腫瘍性及び最終製品に至る分化誘導のプロセス(製造工程)に依存する可能性がある。共通の iPS 細胞からそれぞれ固有の特性を持つ多様な最終製品が製造されると同時に、多数の患者に同一の最終製品が適用される可能性も想定される。最終製品中の細胞の分化度・増殖性等の特性によって、または適用される母集団が大きくなることによって腫瘍を発症する患者が出現してくるおそれがある。したがって、この場合、製造に用いる iPS 細胞について造腫瘍性の評価を厳密に行う必要がある。ヒトの iPS 細胞が発がんに関与するとした場合、主な懸念事項として、「継続的な細胞増殖を誘導する遺伝子異常」と「ゲノムの不安定性」が考えられ、これらについて討議した。

「継続的な細胞増殖を誘導する遺伝子異常」は、いくつかの発がんに関与する遺伝子変異の積み重なりによる異常と考えられている。したがって、発がんに関与する遺伝子変異を持つ細胞が患者に導入された場合、がんの発症リスク上昇が懸念される。iPS 細胞の遺伝子異常誘発に関して、レトロウイルスを用いた遺伝子導入では必ずホストのゲノムに遺伝子が組み込まれるが、それに比べ、現在行われているプラスミド(エピソームベクター)による遺伝子導入ではホストのゲノムに遺伝子が導入される確率は低い。しかしながら、ホストのゲノムに遺伝子やプラスミド断片が導入される可能性は否定できないため、導入の手法は問わずに iPS 細胞の作製に用いた初期化遺伝子がホストのゲノムに組み込まれていないことを検証することが重要となる。初期化遺伝子等の残留が、PCR によって検出できるような場合には、そ

の細胞の造腫瘍性が高まっていることが懸念される。PCR については、検出感度を把握した上で実施することが重要であり、実施可能性にも留意した上で、できるだけ高感度であることが望ましい。なお、プラスミド断片の挿入について検出可能な新規検査法(アレイ、全ゲノムシーケンス、濃縮トラップ法等)の開発も望まれる。また、エピソーマルベクターに含まれるプロモーター及びエンハンサー配列はゲノムに挿入された際に内在性遺伝子を活性化させる危険性がある。そのため、初期化遺伝子に加えてプロモーター及びエンハンサー配列の有無についても PCR で検査することが望ましい。

iPS 細胞が樹立された後、基礎的な情報として、核型、及び全エクソンの塩基配列に異常がないか確認しておくべきと考えられる。現時点で発がんへの関与が判明している遺伝子を【表 1】に例示する。これらの遺伝子の変異やそれに基づくアミノ酸置換が iPS 細胞で生じていないこと(新たな付加変異がないこと)の確認は重要である。ただし、発がんへの関与が報告されている遺伝子は【表 1】以外にも存在し、また、がん関連遺伝子に関する知見・情報は日々刷新されている。したがって、【表 1】の内容は随時更新する必要があることを付記する。他方、がん遺伝子及びがん抑制遺伝子を網羅的に確認することは実際上困難である。また、確認対象の遺伝子の設定の仕方によっては実際の発がんへの寄与が極めて少ない遺伝子の変異のみを含むような iPS 細胞までも最終製品の製造に用いるには不適切として排除することになり、合理的でなくなるおそれがある。試験に際しては、細胞の種類、製造方法、あるいは対象疾患や使用目的等も踏まえて、COSMIC 等の既存のがんゲノム変異データベースも参考にして、合理的な範囲で確認対象とする遺伝子を決める必要がある。

もう一つの大きな問題は「ゲノムの不安定性」である。ゲノムの不安定性により、生体内でがんにとって有利なクローンがセレクションされると考えられている。がん細胞にとってゲノムの不安定性は進化の駆動力であり、一般的に、がんは全てゲノムの不安定性を獲得していると考えられる。長期的にはゲノムの不安定性は発がんに大きく寄与するものと考えられ、このことは iPS 細胞に外来性のがん原性遺伝子が残るかどうかとは異なる問題であることに留意する必要がある。また、ES 細胞が初期胚由来であるのに対して、iPS 細胞は分化細胞を人為的にリプログラミングするため、エピジェネティックな構造も含め、不安定性がより高いことが考えられる。

ヒトにおける多くのがんは、増殖に強く寄与する遺伝子(おそらく数個から 20 個程度)の変異が蓄積して生じるため、晩発性の発がんが促進されないようにするためには、通常の細胞よりもゲノムの変異率が上がっていないことを確認しておく必要がある。例えば、基礎的なデータとして、iPS 細胞を継代培養した際のゲノムの変異率について、通常の細胞レベルと比較してどの程度であるかを確認しておくことは有用と考えられる。確認方法の一例としては、経時的なエクソンシーケンスが挙げられる。例えば、元の細胞と 10 継代後の細胞の全エクソンを比較し、その変異率を通常の細胞のレベルと比較するというやり方等が考えられる。また、分化誘導を行う場合には、分化誘導後のゲノム(エクソン)の変異率のデータも有用と考えられる。

なお、染色体の構造異常を来すものと、塩基配列異常を来すものは必ずしもオーバーラップしない。したがって、継代培養後のゲノム(エクソン)の配列情報は核型解析の情報の代替にはならない。

また、臨床用ヒト iPS 細胞ストック作製においては、幾つかの遺伝子を導入したことに伴う事象と、培養に伴うゲノムの不安定性の2種類の問題が考えられるが、現時点の科学では、両者を区別することなく、導入操作時及び継代した後のゲノムの不安定性について確認することが現実的である。全エクソン解析は、ゲノム変異におけるサブポピュレーションの解析も行えることから、この目的に使用することが可能と考えられる。

臨床用ヒト iPS 細胞ストックの造腫瘍性に関し、遺伝子レベルでの確認を行う場合、ゲノムの変異や同一人物由来の体細胞の遺伝子配列のある程度の多様性が、健常人にも認められることは注意すべきである。iPS 細胞の作製過程で新たに生じた変異を同定し、それががん関連のアミノ酸変異を起こすものかという視点での検討も必要である。ドナー由来の変異の取扱いについては慎重に対応する必要があるが、同意を取得した範囲を踏まえて、細胞組織加工製品の安全性を確保するよう適切に対応する必要がある。

## 5. おわりに

本専門部会では、今回、細胞組織加工製品の開発において懸念されるリスクとして「造腫瘍性」を取り上げ、特にiPS細胞に焦点を絞って議論を行った。その結果、現段階での造腫瘍性リスクに関する知識及びその評価法についての一定の整理がなされた。

本専門部会においては、iPS 細胞等に由来する細胞組織加工製品の造腫瘍性について、そのリスクをゼロにすることは現在の科学技術では困難であること、また、一方で、疾患というリスク及びその時間的経過により増大するリスクを抱えた患者から細胞組織加工製品の実用化が期待されていることについては明確なコンセンサスが得られた。そのことを承知した上で、現時点で活用可能な手段を合理的な範囲で活用し、できるだけリスクを減らすよう努力する必要がある。本報告書は、このような観点で、現時点での見解をまとめたものである。

なお、iPS 細胞等に由来する細胞組織加工製品については、分化誘導過程での造腫瘍性の増強の有無やエピジェネティックな要因による造腫瘍性等、今回、議論していない課題も存在し、今後の議論が必要と考えられる。また、臨床適用される最終製品は多様な形態となることが想定され、その特性を踏まえて適用すべき試験を適切に選択した上で、臨床適用においてはできるだけ長期フォローを行うことが必要と考えられる。

細胞組織加工製品の開発は日進月歩である。先端的な分野であるほど、「誰もが未経験」であるために、品質や安全性確保は困難になる。その克服には、既存の評価技術の活用を諮ると共に新規評価法の開発を継続的に推進する努力が必要である。本専門部会では、今後も細胞組織加工製品の品質、有効性及び安全性をいかに評価するか、について最新の知識を収集し、かつ叡智を集めて議論をつくしながら、現時点で利用可能な科学技術の可能性と限界について科学的コンセンサスを醸成する努力を継続して行く所存である。

表1 がん関連遺伝子の例(Gene Symbol で表示)

ABL1	CBFA2T3	ERCC4	GATA1	MEN1	NUP214	SH3GL1
ABL2	CBLB	ERCC5	GATA3	MET	NUP98	SMAD4
ACVR1B	CBLC	ERCC6	GNA11	MITF	PALB2	SMARCA4
AFF3	CCND1	ETV4	GNAQ	MLH1	PAX8	SMARCB1
AKAP9	CCND2	ETV6	GNAS	MLH3	PBRM1	SMO
AKT1	CCND3	EVI1	GOLGA5	MLL	PDE4DIP	SOCS1
AKT2	CDC73	EWSR1	GOPC	MLL2	PDGFB	SRGAP3
ALK	CDH1	EXT1	GPC3	MLL3	PDGFRA	SRSF2
APC	CDH11	EXT2	H3F3A	MLLT3	PDGFRB	SS18
ARHGEF12	CDK6	EZH2	HMGA1	MPL	PIK3CA	STAT3
ARID1A	CDKN2A	FAM123B	HMGA2	MSH2	PIK3R1	STK11
ARID2	CDKN2C	FANCA	HNF1A	MSH6	PIM1	SUFU
ASXL1	CDX2	FANCB	HRAS	MUTYH	PLAG1	SUZ12
ATF1	CEBPA	FANCC	IDH1	MYB	PML	SYK
ATM	CHEK1	FANCD2	IDH2	MYC	PMS2	TCF3
ATR	CHEK2	FANCE	IKZF1	MYCL1	POLE	TCL1A
ATRX	CIC	FANCF	IL2	MYCN	POLH	TET2
AXIN1	COL1A1	FANCG	IL7R	MYD88	PPARG	TFG
AXIN2	CREB1	FANCI	IRF4	MYST3	PPP2R1A	TLX1
BAP1	CREBBP	FANCI	JAK2	NCOA2	PRKAR1A	TNFAIP3
BCL11A	CTNBN1	FANCL	JUN	NCOA4	PTCH1	TP53
BCL11B	CYLD	FANCM	KDM5C	NF1	PTEN	TPR
BCL2	DAXX	FANCP	KDM6A	NF2	PTPN11	TSC1
BCL3	DDB2	FBXW7	KDR	NFE2L2	RAD51C	TSC2
BCL6	DDIT3	FEV	KIT	NFKB2	RAF1	TSHR
BCOR	DDX5	FGFR1	KRAS	NIN	RB1	USP6
BCR	DDX6	FGFR1OP	LCK	NONO	REL	VHL
BHD	DEK	FGFR2	LMO2	NOTCH1	RET	WRN
BLM	DICER	FGFR3	MAF	NOTCH2	RNF213	WT1
BMPR1A	DNMT3A	FH	MAFB	NPM1	ROS1	XPA
BRAF	EGFR	FLCN	MAML2	NR4A3	RUNX1	XPC
BRCA1	ELK4	FLT3	MAP2K4	NRAS	SDHB	ZNF521
BRCA2	EP300	FOXL2	MDM2	NSD1	SDHD	
CARD11	ERBB2	FOXP1	MDM4	NTRK1	SETD2	
CARS	ERCC3	FUS	MED12	NTRK3	SF3B1	

がん関連遺伝子に関し、Cancer Research 72:636-644, 2012 及び外部有識者(柴田龍弘先生)提出資料(※)より作成。

※:外部有識者提出資料は、家族性腫瘍の原因遺伝子として報告されているもの(米国 NCBI の OMIM(Online Mendelian Inheritance in Man)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>))、これまでの報告からがんにおいて最初の体細胞変異と想定されるもの及びがん変異データベース(英国サンガーセンターの COSMIC(<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>))等において高頻度に認められる(上位20位)遺伝子(全てのがん種についての全体集合)をリスト化した資料。

注1:細胞組織加工製品の品質・安全性確保に関しては、既に厚生労働省より「ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」(平成20年2月8日薬食発第0208003号)、「ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」(平成20年9月12日薬食発第0912006号)、「ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成24年9月7日薬食発0907第2号)、「ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成24年9月7日薬食発0907第3号)、「ヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成24年9月7日薬食発0907第4号)、「ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成24年9月7日薬食発0907第5号)、「ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」(平成24年9月7日薬食発0907第6号)などの指針が発出されている。現在、細胞の造腫瘍性試験に関する国際的なガイドラインとして唯一存在するのは、世界保健機関(WHO)の生物薬品標準化専門委員会第47次報告(1998)(Technical Report Series No. 878, TRS 878)Annex I「生物薬品製造用の *in vitro* 基材としての動物細胞の使用の要件」である。WHO TRS 878にある造腫瘍性試験の内容は、極めて大雑把に言えば、「ヌードマウス等の動物10匹に $10^7$ 個の細胞を投与して16週間観察し、陽性対照としてはHeLa細胞などを用いる」というものであり、この試験の目的は、生物薬品用細胞基材となる細胞株の均一なバンク(セル・バンク)の造腫瘍性の程度又は有無を正確に把握することにある。造腫瘍性の程度的大幅な変化又はその有無に変化が生じた場合、細胞特性に何らかの異常が起こった指標となる。つまり、既知あるいは未知のウイルス感染、変異原性物質やストレスによる遺伝子変異・発がん遺伝子活性化など、原因はいずれにせよ、セル・バンクの安定性上の異常が発生したことを検出するための方策として、セル・バンクの造腫瘍性を細胞特性指標の一つとして評価し、品質管理に活用することがWHO TRS 878では必要とされている。ここで注意しなければならないのは、その適用対象である。WHO TRS 878の適用対象は、あくまでワクチンやタンパク質製剤など、ヒトに投与される生物薬品を製造する際に *in vitro* 基材として用いられるヒト又は動物由来の細胞であって、「患者に移植する細胞」及び「治療を目的に患者に移植する細胞株の原料となる細胞」は、対象外とされている。

注2:iPS細胞等加工製品中の未分化iPS細胞ないし造腫瘍性細胞の混入の評価の最終的な目的は、製品中の細胞の増殖異常の検出にある。したがって、iPS細胞等加工製品の場合、厚生労働省の指針である「ヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成24年9月7日薬食発0907第4号)及び「ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成24年9月7日薬食発0907第5号)に例示されている非臨床安全性試験に関する確認事項の中でも「培養期間を超えて培養した細胞について、目的外の形質転換を起こしていないことや目的細胞以外の細胞が異常増殖していないことを明らかにすること」が重要となる。



<参考> 委員名簿・開催日程等

1. 委員名簿（敬称略）

飯原 弘二	国立循環器病研究センター 脳血管部門長・脳神経外科部長
○岡野 栄之	慶應義塾大学医学部 生理学教室 教授
尾崎 博	東京大学大学院農学生命科学研究科 教授
澤 芳樹	大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座心臓血管外科学 教授
榛村 重人	慶應義塾大学医学部 准教授
末盛 博文	京都大学 再生医科学研究所 胚性幹細胞研究分野 准教授
高田 英俊	九州大学大学院医学研究院 成長発達医学 准教授
高橋 和利	京都大学 iPS 細胞研究所 講師
豊田 雅士	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター 研究副部長
◎中畑 龍俊	京都大学 iPS 細胞研究所 副所長
中村 利孝	独立行政法人国立国際医療研究センター 総長特任補佐
松井 茂之	名古屋大学大学院医学系研究科 教授
間野 博行	東京大学大学院医学系研究科 教授
森尾 友宏	東京医科歯科大学大学院 発生発達病態学分野 准教授
※佐藤 陽治	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 部長

（◎：部会長 ○：副部会長 ※：臨時委員）

2. 開催日程等

○第三回細胞組織加工製品専門部会

開催日時：平成 24 年 12 月 26 日

検討事項：提供された話題を踏まえ討議

話題提供：高橋和利委員 iPS 細胞の品質評価について

○第四回細胞組織加工製品専門部会

開催日時：平成 25 年 2 月 6 日

検討事項：提供された話題を踏まえ討議

話題提供：間野博行委員 発がんメカニズムとその検証法

○第五回細胞組織加工製品専門部会

開催日時：平成 25 年 4 月 25 日

検討事項：提供された話題を踏まえ討議

話題提供：佐藤陽治臨時委員 再生医療製品（細胞組織加工製品）の造腫瘍性評価

○第六回細胞組織加工製品専門部会

開催日時：平成 25 年 5 月 15 日

検討事項：提供された話題を踏まえ討議

外部有識者からの話題提供：公益財団法人先端医療振興財団 松山晃文氏  
再生医療とレギュラトリーサイエンス

○第七回細胞組織加工製品専門部会

開催日時：平成 25 年 7 月 16 日

検討事項：提供された話題を踏まえ討議及び造腫瘍性について取りまとめ

外部有識者からの話題提供：国立がん研究センター 柴田龍弘氏  
iPS 細胞における造腫瘍性リスク評価に関して  
日本医科大学 島田隆氏  
遺伝子治療の現状と課題

August 20, 2013

## **Current Perspective on Evaluation of Tumorigenicity of Cellular and Tissue-based Products Derived from induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)\* and iPSCs as Their Starting Materials**

Tatsutoshi Nakahata, Chair, Cellular and Tissue-based Products Subcommittee

Hideyuki Okano, Vice-chair, Cellular and Tissue-based Products Subcommittee

### **1. Introduction**

The Cellular and Tissue-based Products Subcommittee (hereinafter, the subcommittee) of the Science Board to Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) has held multiple discussions from the scientific point of view on “tumorigenicity” that is the major safety concern of induced pluripotent stem cells (iPSCs)\* for cellular and tissue-based products, and come to conclusion at present of the issues.

In order to appropriately promote the development of cellular and tissue-based products, measures should be taken to address scientifically appreciable matters of concern by clarifying the issues that are at present recognizable while taking feasibility into consideration. The available information is limited, hence various research projects are currently underway for development of cellular and tissue-based products. While the subcommittee presents the analysis of the current situation and measures available, it also recommends that subsequent review be performed when relevant data is accumulated in the near future.

---

\* iPSCs only includes iPS cells and does **not** include embryonic stem cells (ESCs) nor somatic stem cells.

†This English translation of the document submitted to PMDA by the Science Board is intended to be a reference material to provide convenience for users. In the event of inconsistency between the Japanese original and this English translation, the former shall prevail. The PMDA will not be responsible for any consequence resulting from the use of this English version.

”Tumorigenicity” is defined as the ability of a cell population transplanted into an animal to give rise to malignant or benign tumors by proliferation. Human iPSCs and human embryonic stem cells (ESCs) are naturally tumorigenic, giving rise to teratoma upon transplantation, and these cells significantly differ from human somatic cells/somatic stem cells in this respect. Cellular and tissue-based products derived from these pluripotent stem cells may lead to formation of ectopic tissue or tumors due to residual or contaminant undifferentiated pluripotent stem cells. Therefore, assessment and appropriate management of tumorigenicity of the final product are important issues.

In order to ensure the safety of cellular and tissue-based products, the subcommittee summarized relevant issues focusing on “tumorigenicity.” Specifically, we reviewed the scientific methods for examining tumorigenicity available at present regarding the capabilities and limits of each test method, and presented the points for consideration. This report presents a summary on the development of cellular and tissue-based products from a scientific point of view, and not the requirements for regulatory approval of cellular and tissue-based products.

## **2. Tumorigenicity of Cellular and Tissue-based Products**

Cellular and tissue-based products are derived from various types of cells (somatic cells, somatic stem cells, ESCs and iPSCs). The number of cells which constitute the final product varies by products: for example,  $10^4$  cells for retinal pigment epithelial cell product and  $10^8$  to  $10^9$  cells for cardiomyocyte product. Other variations include sources of the cells that are used, such as autologous, allogeneic, and HLA-homozygous allogeneic cells. In addition, considerable variety is expected in clinical application of cellular and tissue-based products including its form (e.g., cell suspension and cell sheet), route of application, site of application, use of immunosuppressant, urgency of patients’ condition. Therefore, comprehensive discussion is required for assessment of tumorigenicity with respect to such diversity. In fact, such a point of view is perceptible in the related guidelines by regulatory authorities in the US and the EU, and those by Japan’s Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW). However, there are no official guidelines for assessment of tumorigenicity of cellular and tissue-based products and cells of which these products are derived at present. (Note 1)

For the assessment of tumorigenicity of cellular and tissue-based products, it is important to note that the correlation or causal relationship between tumorigenicity of the (stem) cells used for manufacturing and that of the final product has not been

elucidated. For cellular and tissue-based products manufactured from pluripotent stem cells, particularly iPSCs, tumorigenicity will be examined separately for the iPSCs-stock, etc. from which the products are derived, and for the final products derived from iPSCs.

### **3. Assessment on the Undifferentiated Cells/Tumorigenic Cell Contaminants and Tumorigenicity in Cellular and Tissue-based Products Derived from iPSCs**

If the final products manufactured by induced differentiation to iPSCs are tumorigenic, the tumorigenicity may be attributed to contamination by undifferentiated iPSCs or emergence of tumorigenic cells in the induced differentiation. There are several test systems for the assessment of these issues.

Test systems for assessment of contamination with potentially tumorigenic undifferentiated iPSCs include flow cytometry that utilize undifferentiated pluripotent cell-specific markers and quantitative RT-PCR (qRT-PCR). However, neither of them can detect contamination with undifferentiated pluripotent stem cells below a significant level of contamination, and thus it is important to establish a new method of testing. For example, it may be conceivable to subject the final product to the conditions for undifferentiated pluripotent stem cell culture, and assess the potential formation of colonies of iPSCs.

These test methods cannot detect tumorigenic cells that do not express undifferentiated pluripotent cell markers (i.e., unexpected tumorigenic cells). Therefore, detection of cells with tumorigenicity that arise due to unintended transformation during the manufacturing process is of significant importance.

Test systems for detection of malignant transformations include soft agar colony formation assay, focus formation assay, growth factor-independent growth assay, and tumorigenicity test by subcutaneous transplantation to nude mice (refer to Note 1, WHO TRS878). However, these methods were originally intended to be used for a characterization of a relatively homogeneous cell population, such as cell line or cell bank. Therefore, it should be taken into consideration whether these methods are sufficiently sensitive for detection of small number of tumorigenic cells within a population, as well as whether the results from these assay can be extrapolated to human use.

The tumorigenicity test by subcutaneous transplantation to severely immunodeficient mice, such as NOG mice or NSG mice, may be considered to be a test method that allows comprehensive and highly sensitive detection of tumorigenic cells. However,

measures for quantitation/standardization have not been established for these systems.

All the above test systems for cellular and tissue-based products test the amount or presence/absence of contamination of cells with tumorigenicity in the final products. As described above, final products are diverse, and thus, for each final product, it is necessary to discuss a practically safe level of tumorigenic cell contamination, establish test method that can detect it, and then determine a cut-off value. (Note 2)

One of the concerns regarding tumorigenicity of iPSCs-derived products is whether or not the microenvironment at engraftment affects tumorigenesis. As a system for nonclinical validation for this matter, there is a method that tests tumorigenicity by applying the relevant product to the site of test animals such as severely immunodeficient mice that corresponds to the application site for humans. However, extrapolation of this assay to clinical application has not been verified and will remain an issue in the near future.

#### **4. Assessment and Management of Tumorigenicity of Human (Allogeneic) iPSC Cells Used for Manufacturing iPSCs-derived Products**

iPSCs-stock is not intended to be developed for manufacturing of a specific final product but is a collection of human (allogeneic) iPSCs for manufacturing various final iPSCs-derived products. The iPSCs-collection is being established overseas as well, including at NIH in the United States. Accordingly, the subcommittee discussed how tumorigenicity of these human iPSC cell collections for clinical applications should be assessed and managed as a general consideration.

Although assessment of tumorigenicity of the final product is important as described above, tumorigenicity of the final product could possibly depend on that of each iPSC line in the iPSCs-collection from which the product is derived and/or on the process of induced differentiation for the final product (manufacturing process). Various final products with different intrinsic properties are manufactured from an iPSC line in the collection, while the same final product may be applied to a number of patients. Some patients may develop tumors depending on the properties of cells in the final product including level of differentiation and proliferativity, or the increase in the population size. Therefore, in this case, tumorigenicity of iPSCs used for manufacturing will be assessed in a thorough manner. If human iPSCs are to be involved in carcinogenesis in human application, “genetic abnormality that induces persistent cell proliferation” and “genomic instability” are considered to be the main concerns. Thus, the subcommittee discussed these points.

”Genetic abnormality that induces persistent cell proliferation” is considered to be an

abnormality caused by accumulation of several gene mutations related to carcinogenesis. Therefore, there is a concern over the increased risk of developing cancer if cells with genetic mutations related to carcinogenesis are introduced into patients via cellular and tissue-based products. In terms of induced genetic mutations in iPSCs, the risk of the insertion of exogenous gene fragments into the host genome is lower by the current gene transfer technique using plasmid (episomal vector) compared to gene transfer using retrovirus vector in which genes are always inserted into the host genome. However, the possibility of gene insertion to the host genome cannot be excluded and it is important to validate that the pluripotency inducing transgenes used for generation of iPSCs are not inserted into the host genome regardless of the approach used for transgene delivery. If exogenous pluripotency-inducing transgenes are detected by PCR, the risk of tumorigenicity of the cells may be increased. The test should be performed with sufficient knowledge on the detection sensitivity of PCR, which should be as high as feasibly possible. It is further ideal if test methods that detect plasmid fragment insertions are developed (array, whole genome sequencing, concentration and trap method, etc.). In addition, there is a concern that the promoter and enhancer sequence in the episomal vector could activate the endogenous genes adjacent to it, when inserted in the genome. Therefore, PCR should be conducted not only on the exogenous pluripotency genes, but also for the promoter and enhancer sequences.

Following the establishment of iPSCs, karyotype and abnormality in DNA sequences of all exons should be confirmed as the basic characterization. The genes that have been revealed to be causally implicated to carcinogenesis at present are listed in [Table 1]. It is important to confirm that mutations of these genes and consequent amino acid substitutions have not occurred (no new additional mutations) in the iPSCs. However, there are genes that have been reported to be related to carcinogenesis besides those listed in [Table 1] and knowledge/information on cancer-related genes is being renewed daily. Therefore, we note that the content of [Table 1] should be updated as necessary. Comprehensive detection of mutations in oncogenes and cancer-suppressing genes is difficult in practice. Also, depending on the set of the target gene examined, it may not be reasonable to exclude all the iPSCs with gene mutations whose actual contribution to carcinogenesis is extremely small as to being inappropriate for use for manufacturing of final products. When setting up such tests, target genes to be examined should be determined in a reasonable way based on the type of cells, manufacturing process, target disease and purpose of use, etc. with reference to existing cancer genome mutation database, such as COSMIC.

Another major issue is “genomic instability”. Genome instability is considered to

facilitate the selection of subclones that are advantageous to carcinogenesis *in vivo*. Genome instability is a driving force for evolution of cancer cells and all cancers are considered in general to have acquired some forms of genomic instability. Genome instability significantly contributes to oncogenesis in the long run, and it should be noted that it is a different issue from whether exogenous oncogenic genes remain in iPSCs or not. Also, it may be said that epigenetic instability of iPSCs can be high since they are derived by artificial reprogramming of differentiated cells, compared to ESCs that are derived from early embryos.

Majority of cancers in humans occur by accumulation of genetic hits that strongly contribute to proliferation (probably several to approximately 20 genes); therefore, it should be confirmed that the genomic mutation rate is not increased in iPSCs compared to normal cells in order to prevent promotion of delayed carcinogenesis. For example, it is considered useful to confirm the level of the genomic mutation rate compared to that of normal cells as the basic data when iPSCs are subcultured. An example of a method for confirmation is exome sequencing over time. For example, all exons of the genome in the original cells and 10<sup>th</sup> passage cells may be sequenced, and then the respective mutation rate in iPSCs may be compared to that of the normal cells. In addition, mutation rate data of the genome (exome) following induction of differentiation may also be useful in cases where differential induction is performed.

Moreover, those that result in chromosomal structural abnormalities do not necessarily overlap with those that result in nucleotide sequence abnormalities. Therefore, sequence information of the genome (exon) following subculture cannot be a substitute for information on karyotype analyses.

Also, there are two types of potential issues in the establishment of human iPSCs-stock for clinical applications: 1. the events associated with the introduction of several exogenous genes, and 2. genome instability associated with cell culture process. Under the present scientific knowledge, it is practically appropriate to analyze the genome instability at the time of gene introduction and after certain passage number without regard to the two possible causes. Analysis of all exons may be applied for this purpose since it also allows analysis of subpopulations in the event of genomic mutations.

For confirmation of tumorigenicity of human iPSCs-stock for clinical applications at the genetic level, it should be noted that genomic mutations and diversity of gene sequences in autologous somatic cells are also observed in healthy individuals. An investigation should also be performed from the point of view of identification of new mutations that occur through the process of generation of iPSCs and confirmation of whether these mutations induce amino acid substitution related to carcinogenesis. While



deliberate measures are required for evaluation of donor-originated mutations, appropriate measures should be taken to ensure the safety of cellular and tissue-based products with consideration for the scope of the consent obtained at cell donation.

## **5. Closing remarks**

The subcommittee focused on “tumorigenicity” as a risk concerned with the development of cellular and tissue-based products and discussed the matter specifically with iPSCs. As a result, the knowledge available on the risk of tumorigenicity and the methods for assessment of tumorigenicity were summarized to a certain extent.

In the subcommittee, a clear consensus has been achieved on the fact that the present scientific technology cannot completely eliminate the risk of tumorigenicity of cellular and tissue-based products derived from iPSCs while practical application of these products is anticipated for patients with diseases at risk that may increase with time. Upon acknowledging this fact, efforts should be made to make use of the means available at present within a reasonable extent and to reduce the risk as much as possible. This report summarizes opinions at present based on such view.

In addition, cellular and tissue-based products derived from iPSCs are also associated with issues that are not discussed here, including presence/absence of increased tumorigenicity during the process of induced differentiation and tumorigenicity due to epigenetic factors, etc., and therefore, further discussion is necessary regarding such issues. Furthermore, final products for clinical applications are expected to take various forms. Therefore, it is considered necessary to appropriately select suitable tests based on the properties of each final product and to perform follow-up studies as long as possible for the clinical application.

The development of cellular and tissue-based products is rapidly advancing. The more advanced the field is, the more difficult it is to ensure quality and safety because nobody has sufficient experience. Efforts for continuously promoting development of novel assessment methods as well as discussion on the use of existing assessment techniques are required to overcome these difficulties. The subcommittee will continue its efforts to develop scientific consensus on the possibilities and limits of scientific technologies currently available, collecting the latest information and holding full discussions with accumulated knowledge on how the safety and efficacy of cellular and tissue-based products should be assessed.

Table 1.

Examples of Cancer Related Genes in Gene Symbol

ABL1	CBFA2T3	ERCC4	GATA1	MEN1	NUP214	SH3GL1
ABL2	CBLB	ERCC5	GATA3	MET	NUP98	SMAD4
ACVR1B	CBLC	ERCC6	GNA11	MITF	PALB2	SMARCA4
AFF3	CCND1	ETV4	GNAQ	MLH1	PAX8	SMARCB1
AKAP9	CCND2	ETV6	GNAS	MLH3	PBRM1	SMO
AKT1	CCND3	EVI1	GOLGA5	MLL	PDE4DIP	SOCS1
AKT2	CDC73	EWSR1	GOPC	MLL2	PDGFB	SRGAP3
ALK	CDH1	EXT1	GPC3	MLL3	PDGFRA	SRSF2
APC	CDH11	EXT2	H3F3A	MLLT3	PDGFRB	SS18
ARHGEF12	CDK6	EZH2	HMGA1	MPL	PIK3CA	STAT3
ARID1A	CDKN2A	FAM123B	HMGA2	MSH2	PIK3R1	STK11
ARID2	CDKN2C	FANCA	HNF1A	MSH6	PIM1	SUFU
ASXL1	CDX2	FANCB	HRAS	MUTYH	PLAG1	SUZ12
ATF1	CEBPA	FANCC	IDH1	MYB	PML	SYK
ATM	CHEK1	FANCD2	IDH2	MYC	PMS2	TCF3
ATR	CHEK2	FANCE	IKZF1	MYCL1	POLE	TCL1A
ATRX	CIC	FANCF	IL2	MYCN	POLH	TET2
AXIN1	COL1A1	FANCG	IL7R	MYD88	PPARG	TFG
AXIN2	CREB1	FANCI	IRF4	MYST3	PPP2R1A	TLX1
BAP1	CREBBP	FANCI	JAK2	NCOA2	PRKAR1A	TNFAIP3
BCL11A	CTNNB1	FANCL	JUN	NCOA4	PTCH1	TP53
BCL11B	CYLD	FANCM	KDM5C	NF1	PTEN	TPR
BCL2	DAXX	FANCP	KDM6A	NF2	PTPN11	TSC1
BCL3	DDB2	FBXW7	KDR	NFE2L2	RAD51C	TSC2
BCL6	DDIT3	FEV	KIT	NFKB2	RAF1	TSHR
BCOR	DDX5	FGFR1	KRAS	NIN	RB1	USP6
BCR	DDX6	FGFR1OP	LCK	NONO	REL	VHL
BHD	DEK	FGFR2	LMO2	NOTCH1	RET	WRN
BLM	DICER	FGFR3	MAF	NOTCH2	RNF213	WT1
BMPR1A	DNMT3A	FH	MAFB	NPM1	ROS1	XPA
BRAF	EGFR	FLCN	MAML2	NR4A3	RUNX1	XPC
BRCA1	ELK4	FLT3	MAP2K4	NRAS	SDHB	ZNF521
BRCA2	EP300	FOXL2	MDM2	NSD1	SDHD	
CARD11	ERBB2	FOXP1	MDM4	NTRK1	SETD2	
CARS	ERCC3	FUS	MED12	NTRK3	SF3B1	

This table is based on an article (*Cancer Research* 72:636-644, 2012) and a material\* provided by an external expert (Dr. Tatsuhiro Shibata) on cancer related genes.

\* A list including:

- (1) familial cancer genes reported in the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) of NCBI, US;
- (2) genes presumably responsible for primary somatic cell mutation in cancer, found from literature search;

(3) frequently found genes (within the top 20th inclusive of the universal set of all cancers) the mutation database (UK Sangar Center COSMIC <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/etc.>).

Note 1: In order to ensure the quality and safety of cellular and tissue-based products, guidelines have already been issued by the MHLW including “Guideline on Ensuring the Quality and Safety of Drug Product, etc. Derived from Processing of Human (Autologous) Cells and Tissue” (PFSB Notification No. 0208003 of the Pharmaceutical and Food Safety Bureau, dated February 8, 2008), “Guideline on Ensuring the Quality and Safety of Drug Product, etc. Derived from Processing of Human (Allogenic) Cells and Tissue” (PFSB Notification No. 0912006 dated September 12, 2008), “Guideline on Ensuring the Quality and Safety of Drug Product, etc. Derived from Processing of Human (Autologous) Somatic Stem Cells” (PFSB Notification No. 0907-2 dated September 7, 2012), “Guideline on Quality and Safety Assurance of Drug Product, etc. Derived from Processing of Human (Allogenic) Somatic Stem Cells” (PFSB Notification No. 0907-3 dated September 7, 2012), “Guideline on Ensuring the Quality and Safety of Drug Product, etc. Derived from Processing of Human (Autologous) iPS(-like) Cells” (PFSB Notification No. 0907-4 dated September 7, 2012), “Guideline on Ensuring the Quality and Safety of Drug Product, etc. Derived from Processing of Human (Allogenic) iPS(-like) Cells” (PFSB Notification No. 0907-5 dated September 7, 2012), and “Guideline on Ensuring the Quality and Safety of Drug Product, etc. Derived from Processing Human ES Cells (PFSB Notification No. 0907-6 dated September 7, 2012). At present, the only international guideline addressing tumorigenicity tests of cells is “Requirements for the use of animal cells as *in vitro* substrates for the production of biologicals” in the Annex I of the 47th Report by Expert Committee on Biological Standardization (1998) (Technical Report Series No. 878, TRS 878) by World Health Organization (WHO). The tumorigenicity test described in WHO TRS 878 is briefly summarized as follows; “ $10^7$  animal cells are administered to 10 animals, such as nude mice, and observed for 16 weeks. HeLa cells, etc. are recommended as the positive control.” The purpose of this test is to accurately grasp the level or presence/absence of tumorigenicity of a homogeneous bank of cell strain (cell bank) that is used as the cell substrate for biologics. A major change in the level of tumorigenicity or change in its presence/absence indicates an occurrence of certain abnormalities in cell characteristics. Therefore, WHO TRS 878 specifies that it is necessary to assess

tumorigenicity of the cell bank as one of the indicators of cell characteristics and use it for quality control as a measure for detection of occurrence of abnormalities in stability of the cell bank, regardless of the cause being infection with known or unknown viruses or genetic mutation or activation of oncogenes due to mutagenic substance or stress, etc. However, attention should be paid to its scope of application. WHO TRS 878 is only applied to human- or animal-derived cells that are used as *in vitro* substrates for manufacturing biotechnological /biological products for clinical applications including vaccines and protein drugs, and “cells for transplantation to patients” and “cells as the materials of cell lines that are transplanted into patients for treatment purposes” are not included in the scope.

Note 2: The ultimate objective of assessment of contamination by undifferentiated iPSCs or tumorigenic cells in iPSCs-derived products is to detect abnormal proliferation of cells in the product. Therefore, for iPSCs-derived products, it is important “to confirm on the absence of unintended transformation and/or abnormal proliferation of cells other than the target cells in cells that are cultured beyond the culture period” among matters to be confirmed in nonclinical safety studies that are exemplified in the guidelines by MHLW, “Guideline on Ensuring Quality and Safety of Drug Product, etc. Derived from Processing of Human (Autologous) iPS(-like) Cells” (PFSB Notification No. 0907-4 dated September 7, 2012) and “Guideline on Quality and Safety Assurance of Drug Product, etc. Derived from Human (Allogenic) iPS(-like) Cells” (PFSB Notification No. 0907-5 dated September 7, 2012).

## Reference (members and meetings)

### 1. Members

Koji Iihara

Head of Cerebrovascular department/Director of Neurosurgery, National Cerebral and Cardiovascular Center

\*Hideyuki Okano

Professor, Department of Physiology, Keio University School of Medicine

Hiroshi Ozaki

Professor, Department of Veterinary Pharmacology, Graduate School of Agriculture and Life Science, the University of Tokyo

Yoshiki Sawa

Professor, Department of Cardiovascular Surgery, Graduate School of Medical, Osaka University

Shigeto Shinmura.

Associate Professor, School of Medicine, Keio University

Hirofumi Suemori

Associate Professor, Field of Stem Cell Research, Institute of Frontier Medical Science, Kyoto University

Hidetoshi Takada

Associate Professor, Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Kazutoshi Takahashi

Lecturer, Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University

Masashi Toyoda

Deputy Director, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital and Institute of Gerontology

\*\*Tatsutoshi Nakahata

Deputy Director, Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University

Toshitaka Nakamura

Presidential Special Aide, National Center for Global Health and Medicine

Shigeyuki Matsui

Professor, Nagoya University Graduate School of Medicine

Hiroyuki Mano

Professor, Department of Cellular Signaling, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

Tomohiro Morio

Associate Professor, Department of Pediatrics and Developmental Biology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

Yoji Sato (Temporary member)

Head, Division of Cellular & Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences

(\*\* Chair, \* Vice-chair)

## 2. Meetings

- 3rd Cellular and Tissue-based Products Subcommittee  
Date: December 26, 2012  
Topic: Discussion of given topics  
Contribution: Kazutoshi Takahashi, Quality assessment of iPS cells
  
- 4th Cellular and Tissue-based Products Subcommittee  
Date: February 6, 2013  
Topic: Discussion of given topics  
Contribution: Hiroyuki Mano, Mechanism of carcinogenesis and its verification methods
  
- 5th Cellular and Tissue-based Products Subcommittee  
Date: April 25, 2013  
Topic: Discussion of given topics  
Contribution: Yoji Sato, Tumorigenicity assessment of regenerative medicine (cellular and tissue-based products)
  
- 6th Cellular and Tissue-based Products Subcommittee  
Date: May 15, 2013  
Topic: Discussion on given topics  
Contribution by external experts: Akifumi Matsuyama (Foundation for Biomedical Research and Innovation), Regenerative medicine and regulatory science
  
- 7th Cellular and Tissue-based Products Subcommittee  
Date: July 16, 2013  
Topic: Discussion on given topics and development of report on tumorigenicity  
Contribution by external experts:  
Tatsuhiko Shibata (National Cancer Center), Risk assessment on tumorigenicity of iPS cells  
Takashi Shimada (Nippon Medical School), Current situation and future of gene therapy

※ 本文は、科学委員会「非臨床試験の活用に関する専門部会」における議論の取りまとめ報告書として作成された。その英語に翻訳されたもの、” Report on the use of non-clinical studies in the regulatory evaluation of oncology drugs” は日本癌学会の機関誌である Cancer Science 誌に掲載された (Cancer Sci., 107(2):189-202, February 2016, DOI 10.1111/cas.12857, <http://onlinelibrary.wiley.com/enhanced/doi/10.1111/cas.12857>)。論文はオープンアクセスとしてクリエイティブコモンズの CC-BY-NC-ND ライセンスにて出版された。CC-BY-NC-ND では論文の書誌情報および論文へのリンクを表示し、かつ非営利目的であり元の論文を改変(翻訳を含む)しなければ第三者が論文を自由に再配布できる。(CC-BY-NC-ND についての詳細は <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/uk/>)

平成 28 年 2 月 29 日

## 抗悪性腫瘍薬開発における非臨床試験の活用に関する提言

非臨床試験の活用に関する専門部会 部会長 入村 達郎  
非臨床試験の活用に関する専門部会 副部会長 佐谷 秀行

### 1. はじめに

本文は、医薬品医療機器総合機構科学委員会の「非臨床試験の活用に関する専門部会」において、抗悪性腫瘍薬の安全性の評価や承認審査における非臨床試験の位置付けについて、議論した内容を整理したものである。

#### 1-1 腫瘍生物学の進展と抗悪性腫瘍薬開発の変遷

いわゆる化学療法剤を中心とする抗悪性腫瘍薬開発の歴史は、がんの生物学的な理解の歴史とおよそ表裏一体の関係にある。がん細胞とは無制限に増殖し続ける細胞であると考えられ、DNA 複製や細胞分裂を阻害する物質ががんの治療薬として用いられる時代が 1950 年代来比較的長く続き、この概念は現在も不変である (1)。さらにがん細胞に特有な代謝経路の発見は代謝拮抗薬を生み出した (2)。がん細胞が生存し増殖するために必須でがん細胞に特有な分子機構、細胞機構は新たに発見されており、これらを標的とする治療薬が新たに開発されている (3)。1960 年代に開始されたウイルス発がんの研究はがん遺伝子の発見を (4)、がんの遺伝的背景の研究はがん抑制遺伝子の発見を導いた (5)。その過程で、遺伝子の変異、欠損、重複、転座 (6-9)などががんの原因であることも明



らかになった。これらを背景に 1990 年代にがんの分子標的治療薬が登場した (10)。がんが細胞分化の異常だという考えも受け入れられ、分化誘導物質の有効性が示された (11, 12)。さらに、固形がんは血管、線維芽細胞、免疫系の細胞など宿主由来の細胞と共に腫瘍組織を形成しており、これらの細胞が腫瘍の増殖に必須であることも示され、これらの細胞の機能やがん細胞との相互作用を標的とする治療薬の有効性が示された (13)。免疫系を調節することによるがんの治療薬の作用機序には個体全体の機能の調節がかかわっていると考えられるに至っている (14)。

## 1-2 非臨床試験の薬効評価・安全性予測における位置付け

抗悪性腫瘍薬の開発の諸段階において、非臨床試験は必須である。特に有効性の確認と安全性評価が臨床試験以前に行われることは必須であり、それらの重要性や必要とされる非臨床試験の種類は、抗悪性腫瘍薬の種類や作用機序によって大きく異なる。特に最近開発されているがん細胞と宿主との相互作用を標的とする治療薬においては、要求される試験の内容ががん細胞に直接作用する物質とは大きく異なることは言うまでもない。

一方腫瘍生物学の発展の過程で、多くの実験モデル（モデル動物、*ex vivo* 試験、*in vitro* 試験）が開発され、それらは抗悪性腫瘍薬の薬効評価・安全性予測に極めて有用である。本文ではこれらの背景をふまえて、現在使用されている非臨床試験法について、それらの有用性、長所と短所、評価できる範囲、限界などについて整理し、新しい抗悪性腫瘍薬の開発が安全かつ迅速に遂行され、それらを必要としている患者が速やかに使用できることを目指す。

## 2. 動物実験モデルによる抗悪性腫瘍薬の評価

数あるがんの動物実験モデルのなかでも、移植モデルはこれまでに抗悪性腫瘍薬の非臨床における評価において重要な役割を担ってきた。移植モデルには大きく分けてヒトのがん細胞を使った異種移植（xenograft）モデルと、マウスのがん細胞を用いてマウスに移植する同種移植モデルが挙げられる。一方で、移植モデルでの評価結果は、開発候補品の臨床での薬効の予測や、効果が認められるがん腫の予測に限界があるのではないかという指摘もある。

化学発がんモデルに始まる発がんモデルは、昨今の遺伝子改変動物作製技術の進歩により、より臨床病態に近いと考えられるモデルの作製が可能となってきた。一方、発がんモデルでの薬効評価は移植モデルと比較して、簡便性と再現性が劣る、評価期間が長い、など改善すべき課題はあるものの、より実際のがんに近いモデルとして期待されている。各動物実験モデルによる抗悪性腫瘍薬の評価の特徴について表 2-1 にまとめる

### 2-1 移植モデル

がん細胞株の皮下移植による異所性の移植モデルの場合は、がんが増殖抑制効果が顕著に認められる際に、腫瘍径の測定による効果判定が容易である利点がある。また腫瘍組織の採取も簡便である。一方でほとんど上皮系組織由来のがん細胞にとって皮下という場所は、「異所」であり、それぞれのがん細胞由来組織が持っている本来の特性を *in vivo* において反映していない可能性が指摘されている。この点において、同所移植モデルは少なくとも種差は引き続き考慮する必要があるが、組織微小環境は考慮されたモデルであると考えられる。実験的転移モデルは原発巣を遊離したがん細胞が血管内に侵入するまでのステップを完全にスキップしているが、がん細胞の血管侵入後のプロセスを評価できるモデルだと考えられる。簡便性、再現性は非常に高いが、血管内に相当数のがん細胞が播種されるという点では実際の転移と乖離があると考えられる。自然転移モデルは同所または異所に移植したがん細胞が原発腫瘍から遠隔臓器へ転移する過程を反映するモデルであり、臨床病態により近い移植モデルだと考えられる。一方で、動物モデルで自然転移するがん細胞株は非常に限られており、また実験結果がばらつくことも多いのも特徴である。患者由来がん組織を

用いる patient-derived xenograft (PDX) は特に個別化がん治療において、患者個々の病態を反映する動物モデルとして近年注目されている。

## 2-2 発がんモデル

発がんモデル動物には大きく分けて化学発がんモデルと遺伝子改変モデル (gene-engineered mouse モデル : GEM モデル) の 2 つがある。薬効評価系としては、特に GEM モデルに関して、がんの原因となるような遺伝子の変異から誘導されるがんに対する薬効評価ができるという点、また自然発症がん (autochthonous tumor) での評価が可能であるという点で優れている。表 2-2 にまとめるように、通常型遺伝子変異 (conventional mutation) を導入した動物モデルでは困難であった変異の導入の時期・組織特異性が、様々な誘導型遺伝子変異 (conditional mutation) を導入することで可能となり、よりヒトの病態に近いモデルマウスが作製されるようになった。一方で薬理試験に必要な個体数の確保に困難である場合があることに加えて、マウス系統の作製・維持、発症組織の特異性や病理学的な再現性、がん発症までの潜伏期間などがモデルマウスにより大きく異なり、それぞれの発がんモデルマウスの特性を十分理解する必要がある。現在では小動物に向けた *in vivo* イメージングモダリティを活用することで、病態が複雑な動物モデルでも薬効を定量的評価する方法が開発・導入されつつある。表 2-3 にまとめるように、数多くの遺伝子改変動物モデルがヒト疾患に類似する病態を示すことが報告されている。

## 2-3 伴侶動物による自然発症モデル

イヌ、ネコなどの伴侶動物 (コンパニオン動物) においても寿命延長による高齢化や遺伝的な要因で、がんの発症は増加傾向にあり、死亡原因の 1 位となっている。特に 10 歳を超える大型犬種の場合、死因の 47% はがんであるとされる (<http://www.vetcancersociety.org/members/>, The Veterinary Cancer Society の白書にもとづく)。大型犬の多い欧米では、こうしたがんの早期診断や治療薬開発に積極的である。大型犬のがんの病態と発がん転移メカニズムはヒトとの類似性が高いことから(15)、欧米では大型犬の自然発症がんを新薬開発のモデル動物として扱う研究は早くから行われてきた(16)。我が国においても、現在イヌ

の死因の54%ががんであり（動物保健会社日本アニマル倶楽部調査報告「犬・猫死亡原因・病気 TOP10」）、2位の心臓病17%とかけはなれた主要因である。このような背景から、イヌの腫瘍に対してヒトの診断および治療法開発研究が盛んに進められている。これら成果を受けて、日本動物臨床医学会ではコンパニオン動物の自然発症がんを治療モデルとした、ヒト医薬品開発における非臨床試験での位置づけを議論しており、実際の利用に向けて、管理体制やルール作りに向けた準備が始まっている。

表 2-1 各動物実験モデルによる抗悪性腫瘍薬の評価の特徴

モデル	概要		長所	短所	
マウスがんモデル	移植モデル	異所モデル 細胞株を皮下接種して検討	腫瘍増殖や生存への製剤の影響を腫瘍増殖など容易に検討することが可能	がん細胞株を直接接種しているため、間質などが十分に存在せず、ヒトがん組織を完全に再現できていない 動物モデルでのデータがヒトの臨床効果と乖離がみられることがある	
		同所モデル がん細胞が由来する組織もしくは転移先の臓器にがん細胞株を接種して、検討	がん細胞が本来存在するべき臓器にあるため、微小環境を考慮した検討が可能	臓器にがん細胞株を接種するため、手技が煩雑である 腫瘍が体外に存在しない場合は経時的な腫瘍増殖の解析が困難	
化学発がんモデル		発がん物質の投与やUV照射などの外部刺激で発生する腫瘍を用いて検討	炎症など、発がん制御に関わる現象を再現することが可能	手技が煩雑であり、個体間のはらつきが生じる場合がある 評価に必要なマウスの個体数を確保することが困難なことがある。 期間が長期に渡る	
GEMモデル		がんの原因となるような遺伝子の変異から発生する腫瘍を用いて検討	原因遺伝子や発生組織に関してヒトがんと比較的近い検討が可能	複数の変異アリルを導入する場合には、マウスの系統の維持・確保が困難なことがある 正確にヒトがんの組織型を再現しない場合がある また腫瘍発生頻度・期間の点で、薬効評価には適さない場合もある	
ヒトがんモデル	移植モデル	細胞株	ヒトがん細胞株もしくは腫瘍組織をマウスに移植 xenograftとなるため免疫不全マウスを用いて実施	多様ながん腫・遺伝的背景を持つ細胞株が利用可能。汎用性が高い	臨床像を反映できているかが疑問視されている
		PDX	患者由来組織を移植 xenograftとなるため免疫不全マウスを用いて実施	病巣を模倣	使用の制限や汎用性が問題
イヌ自家発症モデル	自家腫瘍	イヌ自家発がん症例を用いて実施 獣医臨床試験	臨床像を反映できている可能性が高い	個体数を確保することが困難なことがある	

抗悪性腫瘍薬の非臨床試験で主に用いられる場合に各動物実験モデルの長所となる特徴と、起こり得る問題点についてまとめた。

表 2-2 各遺伝子改変動物モデルの特徴

変異型	通常型遺伝子変異	誘導型遺伝子変異		
変異導入	必要なし	ウイルス感染による変異導入 (adex-Creなど)	組織特異的変異導入 (GFAP-Cre, FABP-Creなど)	誘導型変異導入 (R26-CreERT2, Tyr-CreERT2など)
胎生致死遺伝子の変異動物 作製	不可能	可能	可能	可能
組織特異性	制御不能 必ずしもヒトと同じ組織に 腫瘍を作製できない	組織特異的／局所の変異導入が可 能、ヒト腫瘍と同じ組織に腫瘍を作 製できる	細胞レベルでの選択的変異導入が可能、 腫瘍起源細胞を再現できる	組織／細胞レベルで選択的変異導入が可能
時期特異性	不可能	任意の時期に変異導入が可能	プロモーター特性に依存する 変異誘導タイミングの同定は困難	プロモーター特性に依存する 変異誘導タイミングの制御が可能
変異導入操作の簡便性	不要	極めて煩雑 可能な組織に限られる	不要	必要だが比較的簡便
変異導入効率	優れている (100%)	低い	プロモーター特性に依存する 比較的高い腫瘍発生効率	プロモーター特性に依存する 高い腫瘍発生効率を得ることが困難
腫瘍均一性	個体間のばらつきが少ない	個体間のばらつきが大きい 作業者の習熟度に依存する	個体間のばらつきが少ない	個体間のばらつきが少ない 作業者の習熟度に依存する
個体数の確保	容易	困難	容易	可能だが、変異誘導操作が煩雑
系統維持	一般的には容易 (標的遺伝 子に依存、ヘテロ動物で腫 瘍が発生する場合は困難)	容易	複数の変異アリルを持つ動物を維持する 必要があり煩雑	複数の変異アリルを持つ動物を維持する必 要があり煩雑

抗悪性腫瘍薬の非臨床試験で主に用いられる場合に各遺伝子改変動物モデルの長所となる特徴と、起こり得る問題点についてまとめた。

表 2-3 ヒト疾患と遺伝子変異に対応するがんモデルマウス

ヒト疾患		マウスモデル			
がん腫	変異遺伝子	変異遺伝子	変異型	変異誘導	発生腫瘍
髄芽腫	RB1	Rb1/Tp53	conditional KO/conditional KO	GFAP-Cre	髄芽腫(17)
		Rb1/Bmi1	conditional KO/conditional activation	GFAP-Cre	髄芽腫(18)
	PTCH1	Ptch1	conditional KO	math1-cre/GFAP-Cre	髄芽腫(19)
ゴーリン症候群	PTCH1	Ptch1	conventional		髄芽腫、横紋筋肉腫(20)
脳下垂体腫瘍	RB1	Rb1	conventional KO		脳下垂体腫瘍(21, 22)
		Rb1	conditional KO	Pomc-Flp	脳下垂体腫瘍(23)
肺がん	KRAS	Kras	conventional KO (sporadic activation)		肺がん(24)
	BRAF	Braf	conditional activation	Adex-Cre	肺がん(25, 26)
	RB1	Rb1/Tp53/Pten	conditional KO/conditional KO/conditional KO	CGRP-CreER	肺がん(27)
			conventional activation (SPC promoter)		肺がん(28)
	EML4-ALK	EML4-ALK	conditional activation	Tet system	肺がん(29)
	KIF5B-RET	KIF5B-RET	conventional activation (SPC promoter)		肺がん(30)
	EZR-ROS1	EZR-ROS1	conventional activation (SPC promoter)		肺がん(31)
乳がん	PIK3CA	Pik3ca	conditional activation	MMTV-Cre	乳がん(32)
	TRP53	Pik3ca/Tp53	conditional activation/conditional KO	MMTV-Cre	乳がん、白血病(33)
	PTEN	Pten	conditional KO (stromal fibroblast)	Fsp-Cre	乳がん(34)
	ERBB2	ErbB2	conventional activation (MMTV promoter)		乳がん(35, 36)
		ErbB2/Pten	conditional activation/conventional KO	MMTV-Cre	乳がん(37)
	RB1	Rb1/Tp53	conditional KO/conditional KO	MMTV-Cre	乳がん(38)
遺伝性乳がん	BRCA1	Brca1/Tp53	conditional KO/conventional KO	BLG-Cre	乳がん(39)
		Brca1/Chk2	conditional KO/conventional KO	Wap-Cre	乳がん(40)
	BRCA2	Brca2/Tp53	conditional KO/conventional KO	K14-Cre	乳がん、皮膚腫瘍(41)
大腸がん	APC	Apc/Kras	conditional KO/conditional activation	Adex-Cre	大腸がん(42)
	KRAS	Apc/Kras	conditional KO/conditional activation	Fapbl-Cre	大腸がん(43)
	PTEN	Apc/Pten	conditional KO/conditional KO	Cyp1a1-CreERT2	消化管腫瘍(44)
	Smad4	Apc/Smad4	conventional KO/conventional KO		消化管腫瘍(45)

KO

家族性大腸腺腫症 (FAP)	APC	Apc	conventional KO		消化管腫瘍(46-48)	
		Apc	conditional KO	Adex-Cre	消化管腫瘍(49)、肝臓がん(50)	
遺伝性非ポリポーシス大腸がん (HNPCC)	MSH3	Msh3	conventional KO		リンパ腫(51)	
		MSH6	Msh6	conventional KO	リンパ腫(51)、消化管腫瘍、皮膚、子宮がん(52)	
		Msh3/Msh6	conventional KO		リンパ腫(51)、消化管腫瘍(53)、皮膚腫瘍(52)	
カウデン症候群	PTEN	Pten	conventional KO		消化管腫瘍、リンパ腫、副腎腫瘍、乳がん、前立腺がん(54, 55)	
膵臓がん	KRAS	Kras/Tp53	conditional activation/conditional KO	pdx1-cre	膵臓がん(56)	
		Kras/Tgfr2	conditional activation/conditional KO	Ptf1a-cre	膵臓がん(57)	
		Kras/Pten	conditional activation/conditional KO	pdx1-cre	膵臓がん(58)	
子宮体がん	PTEN	Pten/Mig6	conditional KO/conditional KO	PR-Cre	子宮体がん(59)	
		Pten/Tp53	conditional KO/conditional KO	PR-Cre	子宮体がん(60)	
卵巣がん	KRAS	Kras/Pten	conditional activation/conditional KO	Adex-Cre	卵巣がん(61)	
		APC	Apc	conditional KO	Pgr-Cre	卵巣がん(62)
		BRCA2	Brca2/Tp53	conditional KO/conventional KO	K18-Cre	卵巣がん(63)
前立腺がん	BRCA2	Brca2/Tp53	conditional KO/conventional KO	Pbsn-Cre	前立腺がん(64)	
皮膚腫瘍	BRAF	Braf	conditional activation	Tyr-CreERT2	悪性黒色腫(65)	
		Braf/Pten	conditional activation/conditional KO	Tyr-CreERT2	悪性黒色腫(66)	
	PTCH1	Ptch1	conditional KO	R26-CreERT2	基底細胞腫(19)	

ヒトがんでは変異が報告されている遺伝子を標的とした遺伝子改変マウスのなかから、発生組織を再現するモデルマウスを列挙した。これら以外にも、多くの学術的に優れたがんモデルマウスが作製されているが、本表では、非臨床試験に適した比較的単純な変異アレルをもつモデルマウスを優先的に取り上げた。病理学的にはヒトと完全に一致しないモデルマウスや、腫瘍発生率、変異誘導操作の煩雑性などの点から、非臨床試験に用いるには、多くの時間と労力を必要とするものが含まれていることに留意すべきである。



### 3. がん細胞に直接作用する抗悪性腫瘍薬の評価

これまでの抗悪性腫瘍薬開発は、直接がん細胞の増殖・分裂を標的とした創薬、ならびにがん細胞の代謝特性を標的とした創薬が中心であった。特に近年はがんドライバー遺伝子の発見から、それらに関わるシグナル伝達経路を標的とした分子標的薬の開発に加え、がん細胞に特徴的なタンパク質分解系、エピゲノム、代謝系に着目した創薬アプローチが進められている。分子標的薬はこれまでにチロシンキナーゼ阻害剤 (tyrosine kinase inhibitors: TKI) やマルチキナーゼ阻害剤 (multi-targeted kinase inhibitors: MTKI) の開発、さらには細胞周期に関わる分子メカニズムを標的とした薬剤などが開発されてきた。正常細胞に比べてがん細胞に対してより優位に細胞傷害性を示す薬剤として見出されたいわゆる抗がん剤も、その後の作用機序解析により、特定の細胞内分子に対して作用することで細胞傷害性を発揮していることが分かり、その意味では広義の分子標的薬と解釈することができる。しかし、ここでは、がん細胞において過剰に活性化している分子やその分子を含むシグナルを明らかにしたうえで、それを標的としてスクリーニングや分子デザインによって開発した薬剤を分子標的薬と定義している。これら分子標的薬の動物モデルでの評価に加えて、がん細胞のタンパク質分解系、エピゲノム、代謝系などを標的とする治療薬の評価について表 3 にまとめる。

#### 3-1 チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) またはその他のキナーゼ阻害剤の評価

TKI としては EGFR 阻害剤 (ゲフィチニブ、エルロチニブ、ラパチニブ、アファチニブ)、HER2 阻害剤 (ラパチニブ、アファチニブ)、ALK 阻害剤 (クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブ)、BCR-ABL 阻害剤 (イマチニブ、ダサチニブ、ニロチニブ、ポナチニブ、ボスチニブ)、KIT 阻害剤 (イマチニブ)、SRC 阻害剤 (ダサチニブ、ボスチニブ)、JAK 阻害剤 (ルキシソリチニブ)、BTK 阻害剤 (イブルチニブ)、MEK 阻害剤 (トラメチニブ)、またはその他のキナーゼ阻害剤として BRAF 阻害剤 (ベムラフェニブ、ダブラフェニブ)、PI3K 阻害剤 (イデラリシブ)、mTOR 阻害剤 (テムシロリムス、エベロリムス) などがあり (カッコ内はそれぞれの一般名称)、さらに現在 p38、AKT、p70S6K、IGF1R、PDGFR、FGFR、MET、ROS1、RET などを標的とした創薬も進められている。

これらの阻害剤の非臨床モデルでの薬効評価には標的（変異）遺伝子陽性細胞の移植モデルや遺伝子改変モデルマウスなどが用いられ、一般的にドライバー活性が特に強力〔相互排他性の高い発がん機能獲得（gain-of-function）変異〕な場合は、oncogene addiction の程度が高く、比較的 *in vivo* での薬効を予測・検証しやすい。また標的分子の自己リン酸化や下流因子のリン酸化などで薬力学的な作用機序の検証が比較的容易であることも特徴である。一方でがん細胞株は樹立の過程で選択圧やストレスを受け、性質を変化させている可能性があり、また代替細胞株では当該がん腫の etiology（発生母地・発生過程）を正確には再現できないという欠点も持ち合わせる。

### 3-2 マルチキナーゼ阻害剤（MTKI）の評価

MTKI としては RAF/VEGFR-2/PDGFR- $\beta$  阻害剤（ソラフェニブ）、VEGFR2/PDGFR- $\beta$ /KIT/FLT3 阻害剤（スニチニブ）、VEGFR/KIT/PDGFR 阻害剤（パゾパニブ）、RET/VEGFR2/EGFR 阻害剤（バンデタニブ）、VEGF/PDGF 阻害剤（アキシチニブ）、VEGFR/RET/KIT/PDGFR/RAF 阻害剤（レゴラフェニブ）、MET/RET/VEGFR/KIT/FLT-3/TIE-2/TRKB/AXL 阻害剤（カボザンチニブ）、VEGFR/FGFR/PDGFR/SRC/LCK/LYN/FLT-3 阻害剤（ニンテダニブ）などが挙げられる。MTKI の開発では、TKI と同様の非臨床モデルでの評価が可能であるが、がん細胞側の複数のキナーゼに作用するために病態を再現しうる代替細胞株を準備することが一般的に困難である。また標的分子に VEGFR/FGFR/PDGFR などが含まれる場合は血管新生抑制効果により *in vivo* の結果が *in vitro* で再現できない可能性もある。実例としてパゾパニブは多くのがん細胞株に対して直接的な増殖抑制作用を示さないが、血管新生阻害により *in vivo* 腫瘍増殖を抑制することが挙げられる (67)。また MTKI は複数の作用点があるため、一般的に薬力学的な作用機序の確認が複雑になる。

### 3-3 細胞周期を標的とする治療薬の評価

細胞周期に関わる分子標的薬として CDK4/6 阻害剤（パルボシクリブ）が挙げられる。他にも WEE1、CDC7、CHK1、CHK2、ATR、Aurora、PLK、Mitotic kinesin などを標的とした創薬も進められている。これらの標的についても TKI

と同様に標的分子もしくはその調節因子に異常（例えば CCND1・CDK6 増幅、CDKN2 欠失・変異など）を有するがん細胞株もしくは遺伝子導入代替細胞株の移植モデルで薬効評価が可能である。

### 3-4 タンパク質分解系を標的とする治療薬の評価

タンパク質分解系を標的とする治療薬としては proteasome 阻害剤（ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ）が挙げられる。関連標的分子としては NEDD8-activating enzyme や ubiquitin-activating enzyme、またタンパク質フォールディングに関わる HSP90 や GRP78 が考えられる。このカテゴリーに属する開発候補薬は、先行薬の適応がん腫である多発性骨髄腫の細胞株を用いた移植モデルで評価することで薬効を予測・確認しやすいと考えられる。一方、作用点が多岐にわたるため詳細な作用機序・薬効予測マーカーが明確でない場合が多い。また非臨床と臨床で薬効を示すがん腫が一致しない可能性も考えられ、非臨床モデルでの結果に立脚した適応がん腫の予測には限界がある。したがって適応拡大に向けては、最新の基礎研究成果および多種のがん腫を対象とした第Ⅰ相臨床試験の成績が参考となる。

### 3-5 ゲノム・エピゲノムを標的とする治療薬の評価

エピゲノムを標的とする治療薬としては DNA methyltransferase/DNMT 阻害剤（アザシチジン、デシタビン）や histone deacetylase/HDAC 阻害剤（ボリノスタット、パノビノスタット、ロミデプシン、ベリノスタット）などが挙げられる。これらエピゲノムを標的とする治療薬は実際に臨床で適応とされているがん腫以外の腫瘍モデルにおいて薬効が得られているケースがある (68)。さらにこれらの阻害剤は作用点がゲノムワイドに存在するため、詳細な作用機序・薬効予測マーカーが明確でない場合が多い。一方、ゲノムの修復系を標的とする治療薬として poly(ADP-ribose) polymerase/PARP 阻害剤（オラパリブ）が挙げられる。PARP 阻害剤の評価については、PARP と BRCA が合成致死の関係にあるため、BRCA を変異・失活したがん細胞株の同種・異種移植モデルを用いると薬効を予測・確認しやすい (69, 70)。一方で BRCA 以外の合成致死因子が多数存在すると想定されるが、ほとんどは基礎研究レベルの知見であり、

それぞれの臨床的妥当性は十分には確立されていない。また非臨床レベルで薬効が確認されても臨床では前治療によって合成致死性が解消してしまうケースがあることも念頭に置くべきである（例 EWS-FLI1 陽性ユーイング肉腫 (71, 72)）。

### 3-6 代謝系を標的とする治療薬の評価

代謝系を標的とする治療薬としては isocitrate dehydrogenase/IDH や fatty acid synthase/FAS などを標的とした薬剤が挙げられる。IDH 阻害剤の評価では IDH1(R132)・IDH2(R172)変異陽性急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia: AML)・神経膠腫細胞株の異種移植モデルを用いることで薬効を予測・確認しやすい (73)。また変異特異的な代謝産物 (oncometabolite) である 2-ヒドロキシグルタル酸をモニタすることにより、薬力学的な作用機序の検証が可能である

oncometabolite が存在しない標的分子の場合、より広い範囲のがん腫で薬効が得られる可能性もある一方で、作用機序・薬効予測マーカーが不明のため薬効試験をデザインしにくい。

表3 がん細胞に直接作用する抗悪性腫瘍薬の評価

分類	標的分子	評価法（薬効試験）	特性	問題点
チロシンキナーゼ	EGFR、HER2、ALK、BCR-ABL、KIT、SRC、JAK、BTK、IGF1R、PDGFR、FGFR、MET、ROS1、RETなど	1) 標的（変異）遺伝子陽性細胞の移植モデル 標的（変異）遺伝子を有するがん細胞株(74) 標的（変異）遺伝子を導入した代替細胞株(75) (Ba/F3など) 2) 遺伝子改変モデルマウス(28)	ドライバー活性が特に強力である場合、oncogene addictionの程度が高く、薬効の予測・確認が容易(76) 陰性比較対照として耐性細胞の作製が容易 標的分子の自己リン酸化や下流因子のリン酸化などで薬力学的な作用機序の検証が容易	1) がん細胞株は樹立の過程で選択圧やストレスを受け、性質を変化させている可能性がある 2) 代替細胞株では当該癌腫のetiology（発生母地・発生過程）を正確には再現できない
マルチキナーゼ	RAF、VEGFR-2、PDGFR-β、KIT、FLT3、RET、EGFR、MET、RET、TIE-2、TRKB、AXL、SRC、LCK、LYNなど	上述1) 2) のとおり(30) 血管新生阻害効果については、マウスMatrigelプラグ法など(77)	ドライバー活性が特に強力なキナーゼを標的分子に含む場合は、薬効の予測・確認が容易(30)	上述1) 2) に加えて、がん細胞側の複数のキナーゼに作用する場合は、病態を再現した代替細胞株を遺伝子導入で作製することは困難 標的に血管新生抑制効果が含まれる場合、細胞レベルの結果が動物レベルで再現されない可能性が高い(67) 複数の作用点があるため、薬力学的な作用機序の検証が複雑
MAPK経路	MEK、BRAF、p38など	標的経路（標的分子もしくははその上流因子）に異常を有するがん細胞株もしくは遺伝子導入代替細胞株の移植モデル(78, 79) 遺伝子改変モデルマウス(26)	ドライバー活性が特に強力な場合は、薬効の予測・確認が容易(80) 下流因子のリン酸化などで薬力学的な作用機序の検証が容易	上述1) 2) に加えて、3) 大腸がんなど、がん腫によっては当該分子のドライバー活性が強力でなく、共存する（＝相互排他的でない）他のドライバー経路が腫瘍増殖に寄与するため、十分な薬効が得られないことがある(80)
PI3K/mTOR経路	PI3K、mTOR、AKT、p70S6Kなど	標的経路（標的分子もしくははその上流因子）に異常を有するがん細胞株もしくは遺伝子導入代替細胞株の移植モデル(81) 遺伝子改変モデルマウス(32)	ドライバー活性が特に強力な場合は、薬効の予測・確認が容易(82) 下流因子のリン酸化などで薬力学的な作用機序の検証が容易	上述1) 2) 3) のとおり
細胞周期	CDK4/6、WEE1、CDC7、CHK1、CHK2、ATR、Aurora、PLK、Mitotic kinesinなど	標的分子もしくははその調節因子に異常を有するがん細胞株もしくは遺伝子導入代替細胞株の移植モデル(83)	左記の異常を有するがん細胞株であれば、薬効が得られる可能性がある	上述1) 2) 3) のとおり
タンパク質分解系	Proteasome、関連標的分子（NEDD8-activating enzyme、Ubiquitin-activating enzyme、HSP90、	多発性骨髄腫細胞株の同種・異種移植モデル(84)	先行薬の適応癌腫である多発性骨髄腫の細胞株を用いることにより、薬効の予測・確認が容易	上述1) に加え 4) 非臨床と臨床で薬効を示すがん腫が一致しないことがある

ゲノム・エピゲノム	DNMT、 関連分子（Histone methyltransferase、 Histone demethylase）	骨髄異形成症候群 （MDS）細胞株の同 種・異種移植モデル （85） 遺伝子改変NSGマウス にMDS細胞株を移植し たMDS病態モデル（86）	MDSモデルマウスは他の移植モ デルと比べてより忠実に病態を 再現	上述 1) 4) に加え、細胞株は比 較的希少であり、これを用いたモ デル系が全ての患者の病態を反 映しているとは言い難い 5) 作用点がゲノムワイドに存在 し、詳細な作用機序・薬効予測マ ーカーは不明
	HDAC	大腸がん・前立腺が ん・肺がん細胞株など の同種・異種移植モデ ル（68）	左記以外のがん腫でも薬効が得 られる可能性あり	上述 1) 4) 5) のとおり。 医薬品としての現在の適応は皮 膚T細胞リンパ腫・末梢T細胞リ ンパ腫である
	PARP1・PARP2、 関連分子（DNA-PK、 Telomerase）	がん抑制遺伝子 BRCA1もしくは BRCA2を変異・失活し たがん細胞株の同種・ 異種移植モデル（69、 70）	PARP1/2とBRCA1/2が合成致死 の関係にあるため、後者を変異・ 失活したがん細胞株を用いるこ とにより、薬効の予測・確認が容 易	上述 1) 4) のとおり。 BRCA1/2以外の合成致死因子が 多数存在すると想定されるが、ほ とんどは基礎研究レベルの知見 であり、それぞれの臨床的妥当性 は十分には確立されていない 非臨床レベルで薬効が確認され ても、臨床レベルでは前治療によ って合成致死性が解消してしま うケースがあると想定される （72）
代謝系	IDH1・IDH2（変異 型）、FASなど	IDH1(R132)・ IDH2(R172)変異陽性 急性骨髄性白血病 （AML）・神経膠腫細胞 株の異種移植モデル （73）	変異の有無により、薬効を予測・ 検証しやすい。変異特異的な代謝 産物（oncometabolite）をモニタ することにより、薬力学的な作用 機序の検証が可能（73）。 oncometaboliteが存在しない標 的分子の場合、より広い範囲のが ん腫で薬効が得られる可能性あ り	oncometaboliteが存在しない標 的分子の場合、作用機序・薬効予 測マーカーが不明のため、 evidence-basedな薬効試験のデ ザインが困難

国内外で承認薬・治験薬が存在する標的分子を分類し、それぞれの代表的な非臨床試験（評価法）を列挙した。その有用性・利便性から、評価結果は原著論文の出版データや抗悪性腫瘍薬の承認申請資料に採用されている。一方、これらの手法には、表 2-1 に示された技術的制限に加え、標的分子もしくは疾患の特性・未解明性に起因する限界・問題点が存在することにも留意すべきである。

## 4. がん細胞の宿主との相互作用を標的とする抗悪性腫瘍薬の評価

腫瘍微小環境のがん細胞の増殖や悪性化、さらには薬剤耐性や治療抵抗性における重要性がこれまでの研究成果から明らかにされている。これら腫瘍微小環境は組織としてがん細胞増殖を支持するのみならず、液性因子や細胞間接着による間質（stroma）細胞とがん細胞の相互作用によって直接的または間接的にがん細胞機能に影響しうる。一般的にこのような腫瘍微小環境を考慮した薬効評価は *in vitro* で再現することは困難であり、適切な動物モデルの活用が重要である。

### 4-1 血管新生を標的とする抗悪性腫瘍薬の評価

がん細胞の増殖において、生体内で栄養分および酸素の供給路を確保するために新たな血管造成（血管新生）が必須であり、血管新生が行われないと腫瘍は一定の大きさ以上には増殖できないと言われている。新生血管はがん細胞の増殖のみならず遠隔臓器への転移も含めた悪性化に関与することも示唆されている。血管新生を標的とする治療薬は VEGF 阻害剤（ベバシズマブ）に代表されるように、がん細胞に対する直接の効果を期待するものでなく、様々な「血管新生因子」の活性阻害による機序を持ち、主に新生血管を形成する血管内皮細胞に対する効果によるものである。それゆえ非臨床試験における薬効評価には宿主（実験動物）側の要素も大きく関わるため、適切な評価モデルの考慮が必要である。血管新生を標的とする治療薬の評価について表 4-1 にまとめる。

移植モデルにおいて、用いるがん細胞（がん細胞株または patient-derived sample など）が治療薬の標的となる血管新生因子を産生しているか否か、さらにヒトがん細胞を用いるケースはその産生される血管新生因子が異種間で交差性を示すか、これらを考慮することが薬効評価に適切であるか判断するために重要である。がん細胞移植モデルまたはがん細胞を用いない血管新生モデル（Matrigel プラグ法、CAM 法、hollow fiber 法など）においても、非臨床試験に用いる動物種において評価する治療薬の異種交差性について考慮することが重要である。

### 4-2 腫瘍間質を標的とする抗悪性腫瘍薬の評価

腫瘍はがん細胞のみならずそれを取り巻く間質から構成されており、これら腫瘍間質を構成する多様な細胞（線維芽細胞、間葉系細胞、炎症細胞など）や細胞外マトリックス（フィブロネクチン、コラーゲン、ラミニン、プロテオグリカンなど）は、がん細胞との相互作用を介して増殖・浸潤・転移など悪性化や抗悪性腫瘍薬への抵抗性獲得に深く関与している。現状ではこれら腫瘍間質のみを標的とする治療薬の開発は多くないが、今後注目される治療標的である。腫瘍間質を標的とする治療薬の評価について表 4-1 にまとめる。

腫瘍間質を標的とする治療薬の非臨床試験における薬効評価においても、血管新生を標的とする際と同様に宿主側の要素が大きく関わるため、評価には適切な動物モデルが用いられる必要がある。例えばヒトがん細胞移植モデルでは腫瘍間質に存在する線維芽細胞の一部は骨髄から遊走してくる間葉系幹細胞（mesenchymal stem cells: MSC）由来であることが報告されている。またヒトがん細胞移植モデルの場合、免疫不全マウス（ヌードマウス、scid マウス、NOD/scid マウス、NOG マウスなど）が用いられ、それぞれ宿主側の免疫学的な環境が異なる。免疫不全マウスではそもそもヒト生体内における免疫応答は再現することは不可能であり、異種移植細胞に対する免疫応答が欠けているため、得られる結果の評価に注意する必要がある。いずれの場合においても間葉系細胞はこれら免疫不全動物でも比較的正常に維持されているため、標的が間葉系細胞に対して異種交差性を示す場合については動物モデルでも薬効を予測できる可能性がある。

#### 4-3 免疫応答を介した腫瘍増殖の抑制とその評価

宿主免疫応答は腫瘍微小環境を構成する極めて重要な要素である。これまで抗腫瘍免疫応答を正または負に制御するメカニズムを調節することにより宿主の抗腫瘍免疫応答を増強し、がんを排除する検討が進められてきた。なかでも昨今の CTLA-4 阻害剤（イピリムマブ、トレメリムマブ）や PD-1 阻害剤（ニボルマブ、ペンブロリズマブ）に代表されるチェックポイント阻害剤の開発は、抗腫瘍免疫応答を抑制する分子を標的とした新たな抗悪性腫瘍薬として非常に注目されている。

ここで注目すべき点は、これらの治療薬が抗腫瘍活性を示すには、上述の腫瘍間質を標的とする治療薬と同様に宿主側の要素（免疫応答）が大きく関わっ



ていることである。よって、腫瘍増殖の抑制にかかる標的が免疫応答に依存する治療薬の非臨床試験における評価については、適切な動物モデルの選択は必ずしも容易ではない。一方で作用機序を明確にすることは重要であり、マウスモデルであれば異なる実験系（細胞株、動物系統）において同様の機序で抗腫瘍活性が示されることを明らかにすることが望ましいとされている。しかしながら非臨床モデルでの結果に立脚した適応がん腫の予測には限界がある。したがって適応がん腫の決定には、最新の基礎研究成果および第Ⅰ相臨床試験の成績が参考となる。動物モデルでHLAに依存するような医薬品（がんワクチン療法など）では、ヒト化マウスを用いることも考えられる。一方で安全性を予測する上では、可能な限り標的分子に関して動物実験レベルの情報を活用することも十分に検討するべきである。免疫応答に依存する腫瘍増殖の抑制を標的とする治療薬の評価について表4-2にまとめる。

表 4-1 血管新生ならびに腫瘍間質（炎症性微小環境を含む）を標的とする抗悪性腫瘍薬の評価

分類	標的	評価法（薬効試験）	特性	問題点
血管新生を標的とする治療薬	血管新生因子（リガンド） 例）VEGF 抗体	1) マウスがんモデル 2) ヒトがんモデル 3) 血管新生モデル（Matrigel プラグ法、CAM 法、hollow fiber 法など）	マウス／ヒト移植モデルの場合、治療薬や標的が異種交差性を示す場合は評価が容易 GEM モデルは標的分子欠損の表現系によって作用機序の確認が可能	1) マウス移植モデル、GEM モデル、3) 血管新生モデルは治療薬の異種交差性について考慮が必要 化学発がんモデルでの薬効評価は困難 2) ヒトがんモデルは標的のマウスにおける異種交差性の考慮が必要
	受容体／受容体シグナル 例）TKI (VEGFRs)	上述 1) 2) 3) のとおり	1) マウス移植モデル、2) ヒトがんモデル（細胞株移植、PDX）はマウス血管新生に対する効果を評価可能 GEM モデルは標的遺伝子改変動物の表現系によって作用機序の確認が可能	上述 1) 2) のとおり
	血管新生因子の産生 例）mTOR inhibitor	上述 1) 2) 3) のとおり	1) マウス移植モデル、2) ヒトがんモデル（細胞株移植、PDX）はマウス血管新生に対する効果を評価可能 GEM モデルは標的分子欠損の表現系によって作用機序の確認が可能	1) マウス移植モデル、GEM モデルは治療薬の異種交差性について考慮が必要。3) 血管新生モデルは血管新生因子の産生を伴わないため薬効評価は困難 2) ヒトがんモデルは標的のマウスにおける異種交差性の考慮が必要
腫瘍間質を標的とする治療薬	薬剤耐性／感受性、増殖／転移、炎症など	1) マウス／ヒト移植モデル（皮下移植モデル、同所移植／転移モデル）、がん細胞—間質細胞共移植モデル 2) GEM モデル	1) マウス／ヒト移植モデルの場合、治療薬や標的が異種交差性を示す場合は評価が容易 2) GEM モデルは標的分子欠損の表現系によって作用機序の確認が可能	1) 移植モデルは治療薬（マウス）または標的（ヒト）の異種交差性について考慮が必要。ヒトがん皮下移植モデルは微小環境が反映され難いため薬効評価は困難 2) GEM モデルは異種交差性の考慮が必要。化学発がんモデルでの薬効評価は困難

血管新生ならびに腫瘍間質の評価に使用される動物（主にマウス）モデルを分類した。これらの治療薬の薬効は宿主細胞とがん細胞の相互作用、または宿主因子に依存することから、治療薬ならびに治療標的分子の種間（主にヒトとマウス間）での交差性に配慮することが重要である。

表 4-2 免疫応答を介した腫瘍増殖の抑制とその評価

モデル	概要	特性	問題点
同種移植モデル	<p>同種（主にマウス）がん細胞株を皮下接種する異所移植モデル、がん細胞由来臓器に移植する同所移植モデル、または尾静脈などから接種する転移モデル</p> <p>抗原を強制発現させた細胞株（OVA(87, 88)、HA(89)、CEA(90)など）や、免疫原性が明らかになっている細胞株（B16メラノーマ(91)、Meth A(92)、colon 26(93)など）を用いる</p>	<p>がん細胞に対する免疫応答の経時的な解析、作用機序の検証が可能</p> <p>がん抗原が同定されている株では、腫瘍特異的な免疫応答の解析が可能</p> <p>同所移植、または転移モデルではがん細胞が本来存在すべき臓器にあるため、免疫担当細胞の臓器への浸潤の解析に適する</p>	<p>異所移植では腫瘍間質などが十分に存在せず、免疫学的にもヒトがん組織を完全に再現できていない可能性</p> <p>同所・転移モデルは手技が煩雑であり、定量的ながん細胞増殖のモニタリングが困難</p>
マウス発がんモデル	<p>発がん物質（MCA、AOM/DSS、DMBA/TPAなど）やUVなどの外部刺激や遺伝子異常（p53欠損、SV40 T抗原の強制発現、APC欠損など）を持ったマウスで発がんするモデル</p>	<p>発がん過程への免疫応答の関わりが検討可能である</p> <p>臨床でのがん病態に比較的近いモデル</p>	<p>手技が煩雑であるとともにマウスの系統を確保することが困難</p> <p>実験期間が長期に渡る</p> <p>一部のモデルを除いてがん抗原が同定されておらず、抗原特異的な免疫応答の検討が困難</p>
異種（ヒトがん）移植モデル	<p>ヒト細胞株もしくは患者由来腫瘍組織をマウスに移植する。異種移植（Xenograft）となるため、免疫不全マウス（ヌードマウス、SCIDマウス、NOGマウスなど）を用いる</p>	<p>ヒトがん細胞や腫瘍組織を用いるため、ヒト（がん患者自身）の免疫担当細胞を用いた抗腫瘍活性の解析が可能</p>	<p>ヒト免疫系を完全に再現している訳ではないため、免疫応答の解析には限界が多い</p> <p>ヒト免疫細胞移入したヒト化マウスの有用性については今後の検討課題</p>

がん免疫療法の評価で使用される動物（主にマウス）モデルを分類した。がん免疫療法の薬効は宿主の免疫系に依存することから、複数のモデルを併用することも検討するべきである。その際、それぞれの長所／短所として列挙した限界・問題点が存在することを考慮して、適切な組み合わせの検討も必要である。

## 5. 新たな概念にもとづく抗悪性腫瘍薬の評価

がんの新たな生物学的特性が明らかになるにつれて、以上にまとめた抗悪性腫瘍薬の開発標的に加えて、近年「がん幹細胞」の概念をはじめとする新たな概念に基づく抗悪性腫瘍薬の開発が進められている。

### 5-1 がん幹細胞を標的とする抗悪性腫瘍薬の評価

がん幹細胞の概念は血液がんで初めに提唱され、近年では乳がんや脳腫瘍など固形がんにも同様な細胞集団があることが示されている (94)。がん幹細胞は、通常の幹細胞と同じように自己複製能、多方向性分化能、ニッチ依存性を示し、高い自律的腫瘍形成能を持つ。更に、従来の抗がん剤治療や放射線治療に対して高い耐性を示すことから、がんの根治を目指すための重要な標的となる可能性がある。がん幹細胞を標的とする抗悪性腫瘍薬の評価について表 5-1 にまとめる。

### 5-2 その他の抗悪性腫瘍薬の評価

前述のがん幹細胞に加え、その他代表的な新たな概念にもとづく抗悪性腫瘍薬の開発の現状について表 5-2 にまとめる。これらの治療薬の非臨床における評価には、従来の抗悪性腫瘍薬とは異なるアプローチが必要となるケースが考えられ、今後の検討課題である。

表 5-1 がん幹細胞を標的とする抗悪性腫瘍薬の評価

評価方法	概要	特性	問題点
スフェロイド形成能	がん幹細胞は無血清条件下で、特定の増殖因子の存在下で、しかも非接着状態で一個の細胞を発端として増殖し、球状の細胞塊（スフェロイド）を、作る能力を有する。この能力を基準にして薬剤の効果を判定	培養細胞を用いて行うことができる、薬剤の量依存性、時間依存性などを定量的に測定可能	正常の組織幹細胞に対する作用との比較を行わなければ細胞傷害性の薬剤を陽性ととらえる可能性がある
細胞表面マーカー	乳がんでは CD44high/CD24low の分画にがん幹細胞が多く含まれているとされている。フローサイトメトリーによって定量的に測定することが可能	がん幹細胞分画とその他の細胞分画を比較できるため、細胞傷害性薬剤を確認可能	細胞種によってがん幹細胞分画を示す表面マーカーが異なる
ALDH (aldehyde dehydrogenase)	乳がん、消化器系がん、造血系腫瘍では ALDH の活性が高い細胞は抗悪性腫瘍薬治療に対して抵抗性が高く、機能的ながん幹細胞とされている	活性検定システムが安定しており、フローサイトメトリーにより定量化可能	全ての細胞系において ALDH 陽性細胞が必ずしもがん幹細胞の分画ではない
免疫不全マウスへのヒトがん幹細胞移植モデル	ヒトの腫瘍組織から抽出したがん幹細胞を免疫不全マウスに移植し、その腫瘍の増殖に対する薬剤の効果を確認	腫瘍増殖の抑制効果、腫瘍組織中のがん幹細胞数の低下（表面マーカー、ALDH、スフェロイド形成能などで評価）で薬剤の効果を見ることが可能	免疫不全マウスに移植するため、免疫細胞や微小環境との相互作用などがその効果に影響する薬剤の効果確認には使用できない
同系マウスへのマウスがん幹細胞移植モデル	マウスの腫瘍組織から抽出したがん幹細胞を同系マウスに移植し、その腫瘍の増殖に対する薬剤の効果を確認	腫瘍増殖の抑制効果、腫瘍組織中のがん幹細胞数の低下（表面マーカー、ALDH、スフェロイド形成能などで評価）で薬剤の効果を見ることができる、免疫作動薬や微小環境に影響を与える薬剤の効果確認に用いることが可能	ヒトの腫瘍細胞ではないため、たとえ効果がみられてもヒトのがん幹細胞を用いた系で再度確認することが必要な場合がある
腫瘍形成性遺伝子改変動物モデル	遺伝子を改変することによって安定して腫瘍が発生するマウス、ラット、ゼブラフィッシュなどを用いて、がん幹細胞標的薬の評価を行う	自然発症のがんに近く、理想的なモデル	移植モデルに比べて発症が遅いため、評価に時間がかかる

がん幹細胞の機能を評価する方法として一般に用いられているものを列挙した。

表 5-2 抗悪性腫瘍薬開発における新たな概念の例

例	概要	問題点	国際比較 (治験情報など)
核酸医薬	化学合成されたオリゴヌクレオチドをベースとした分子標的薬	患部特異的な DDS、細胞への取り込み効率、肝臓などへの集積の回避	本邦： phase I 国外： phase I～III (OncoGenex 社など)
Oncolytic Virus	腫瘍でのみ増殖活性を発揮するよう改変されたウイルスによる治療	臨床試験、国際共同研究の支援体制、審査制度、ガイドライン整備、公的研究費の不足	本邦： phase I～II 国外： 承認薬 (中国)、phase I～III (米欧)
細胞治療	iPS 細胞を用いた再生医療、免疫細胞療法	がん化の問題、治療効果に関するエビデンスの蓄積	本邦： phase I～II 国外： 承認薬 (米)、phase I～III
ナノ技術に基づく治療薬	ドラッグデリバリーシステム (DDS)への応用、微細粒子を利用した治療 (塞栓療法)	ナノキャリアの使用による安全性の確保、患部特異的な輸送	本邦： phase I～III 国外： 承認薬、phase I～III
コンパニオン診断薬	特定の医薬品の有効性及び安全性を検査するための診断薬	全医薬品に対応する認可試験薬がない、コンパニオン診断薬の承認審査、診療報酬の制度が一部不明瞭	本邦： ALK 融合遺伝子、KRAS 変異、など 国外： BRAF 変異など多数
温熱療法	熱による腫瘍部への抗悪性腫瘍薬誘導	ナノキャリアの使用による安全性の確保	本邦： phase I～II 国外： Phase I～III
イメージング技術を用いた治療	がん細胞を特異的に標識。治療効果評価に有効	全てのがん腫に一律に適用不可能 安全性、有効性の検証	本邦： 開発中 国外： 細胞移植治療の効果判定に実用化
大規模細胞パネル*	多様な細胞種のセットによる候補分子の作用機序を判定	細胞セットの拡大、実際の腫瘍との相違	本邦： JFCR39 国外： NCI60 (アメリカ NCI/NIH)、Oncolines 66 (オランダ NTRC)

新たな概念にもとづく治療薬開発について、国内外で臨床研究の進行中、あるいは臨床研究に近いものに特化した

\* 大規模細胞パネルは、治療薬ではないが新規治療薬の開発に幅広く係るアッセイ系として特記した。

## 6. 終わりに

現在用いられている抗悪性腫瘍薬の非臨床試験を出来るだけ網羅的に列挙し、その種類と特性および問題点について述べた。臨床研究・治験のデザインに必須な動物実験の特徴を整理し、概念の検証に役立つ実験モデルについて、抗悪性腫瘍薬のカテゴリー毎にそれぞれの試験の特徴をまとめた。これにより、抗悪性腫瘍薬開発の全般にわたるレギュラトリーサイエンスの基盤をなす情報を提供することが本文の目的である。

がんのモデルによる試験、すなわち動物実験、*ex vivo* 試験、および *in vitro* 試験は、がんの生物学的な理解と抗悪性腫瘍薬の開発・評価に必須の技術としてがん研究の主要な部分を占めて来たと言っても過言ではない。特にヒトや実験動物由来のがん細胞株は、がんの生物学的な理解を深め、抗悪性腫瘍薬の開発ツールとしても長期にわたって用いられて来た。しかし、遺伝子への複数の異常の蓄積ががんの原因であることが明らかになり、個々のがん細胞の特性はその起源となる細胞や組織の属性だけでなく、異常を持つ遺伝子の種類に依存することも明らかにされた。一方、疾患としてのがんの理解が進み、宿主の細胞との相互作用やこれを司る分子が明らかになり、*in vivo* におけるがん細胞の増殖は *in vitro* では再現が困難な微小環境、免疫環境に強く依存することも明らかになった。本文で紹介したとおり、これら多様ながん・宿主の特性を反映したモデルがこの10年間で相当数開発された。その結果、抗悪性腫瘍薬の探索、開発、臨床開発の途上で有用かつ必須となる非臨床試験の範囲が拡大した。

がんの原因とその増殖と進行を駆動する遺伝子変化は多様であること、宿主細胞、組織、免疫系の役割も、がんの種類、個々のがんの特性、さらに進行のステージによって異なることが明らかになった。これらの科学的なエビデンスに基づいてがん治療における抗悪性腫瘍薬の選択や利用法が今後も見直され続けることが期待される。本文でも述べたように、がんの生物学的な理解を目指して樹立されたモデルが、非臨床試験のためのツールとして役立つことが明らかとなった。臨床試験ですでに有効性・安全性情報が得られている薬と同一クラスの新薬を開発する場合には、それら先行薬の臨床情報をふまえて非臨床モデルの選択を行うことも有用である。このような現状に鑑みて、治験・臨床研究をデザインし結果を解釈する上で、また臨床の現場で使用されている抗悪性腫瘍薬の効果をあらためて評価する上で、適切な非臨床モデルの創出・選択と

活用は、今後ますます重要になると思われる。非臨床試験を最大限活用することによって、より効果的で副作用の少ない抗悪性腫瘍薬の開発、承認、および適切な利用が加速されることを強く望む。



## 参考文献

1. Hurley LH. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):188-200.
2. DeVita VT, Jr., et al. *Cancer Res*. 2008;68(21):8643-53.
3. Dobbelstein M, et al. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(3):179-96.
4. Land H, et al. *Science*. 1983;222(4625):771-8.
5. Hollingsworth RE, et al. *J Natl Cancer Inst*. 1991;83(2):91-6.
6. Croce CM. *Cancer Res*. 1991;51(18 Suppl):5015s-8s.
7. Barrett JC, et al. *Ann N Y Acad Sci*. 1983;407:291-300.
8. Cowell JK. *Annu Rev Genet*. 1982;16:21-59.
9. Bloomfield CD, et al. *Cancer Res*. 1981;41(11 Pt 2):4838-43.
10. Tsuruo T, et al. *Cancer Sci*. 2003;94(1):15-21.
11. Pierce GB, et al. *Cancer Res*. 1988;48(8):1996-2004.
12. Hoffman SJ, et al. *Am J Hematol*. 1988;28(2):124-7.
13. McMillin DW, et al. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(3):217-28.
14. Miller JF, et al. *Cancer Cell*. 2015;27(4):439-49.
15. Pinho SS, et al. *Transl Res*. 2012;159(3):165-72.
16. Paoloni M, et al. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(2):147-56.
17. Marino S, et al. *Genes Dev*. 2000;14(8):994-1004.
18. Westerman BA, et al. *PLoS One*. 2012;7(5):e35943.
19. Yang ZJ, et al. *Cancer Cell*. 2008;14(2):135-45.
20. Zibat A, et al. *Carcinogenesis*. 2009;30(6):918-26.
21. Tonks ID, et al. *Pigment Cell Res*. 2005;18(4):252-64.
22. Hu N, et al. *Oncogene*. 1994;9(4):1021-7.
23. Vooijs M, et al. *Oncogene*. 1998;17(1):1-12.
24. Shaw AT, et al. *Genes Dev*. 2007;21(6):694-707.
25. Andreadi C, et al. *Genes Dev*. 2012;26(17):1945-58.
26. Dankort D, et al. *Genes Dev*. 2007;21(4):379-84.
27. Song H, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(43):17531-6.
28. Soda M, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(50):19893-7.
29. Chen Z, et al. *Cancer Res*. 2010;70(23):9827-36.
30. Saito M, et al. *Carcinogenesis*. 2014;35(11):2452-6.
31. Arai Y, et al. *PLoS One*. 2013;8(2):e56010.

32. Yuan W, et al. *Oncogene*. 2013;32(3):318-26.
33. Adams JR, et al. *Cancer Res*. 2011;71(7):2706-17.
34. Trimboli AJ, et al. *Nature*. 2009;461(7267):1084-91.
35. Finkle D, et al. *Clin Cancer Res*. 2004;10(7):2499-511.
36. Rao GN, et al. *Breast Cancer Res Treat*. 2000;64(3):287-96.
37. Dourdin N, et al. *Cancer Res*. 2008;68(7):2122-31.
38. Cheng L, et al. *Oncogene*. 2010;29(42):5700-11.
39. McCarthy A, et al. *J Pathol*. 2007;211(4):389-98.
40. McPherson JP, et al. *Genes Dev*. 2004;18(10):1144-53.
41. Jonkers J, et al. *Nat Genet*. 2001;29(4):418-25.
42. Hung KE, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(4):1565-70.
43. Haigis KM, et al. *Nat Genet*. 2008;40(5):600-8.
44. Marsh V, et al. *Nat Genet*. 2008;40(12):1436-44.
45. Takaku K, et al. *Cell*. 1998;92(5):645-56.
46. Moser AR, et al. *Science*. 1990;247(4940):322-4.
47. Pollard P, et al. *Gastroenterology*. 2009;136(7):2204-13 e1-13.
48. Oshima M, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(10):4482-6.
49. Shibata H, et al. *Science*. 1997;278(5335):120-3.
50. Colnot S, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(49):17216-21.
51. de Wind N, et al. *Nat Genet*. 1999;23(3):359-62.
52. Edelmann W, et al. *Cell*. 1997;91(4):467-77.
53. Edelmann W, et al. *Cancer Res*. 2000;60(4):803-7.
54. Freeman D, et al. *Cancer Res*. 2006;66(13):6492-6.
55. Marino S, et al. *Development*. 2002;129(14):3513-22.
56. Bardeesy N, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(15):5947-52.
57. Ijichi H, et al. *Genes Dev*. 2006;20(22):3147-60.
58. Hill R, et al. *Cancer Res*. 2010;70(18):7114-24.
59. Kim TH, et al. *Oncogene*. 2010;29(26):3770-80.
60. Daikoku T, et al. *Cancer Res*. 2008;68(14):5619-27.
61. Chen L, et al. *Nature*. 2010;465(7297):492-6.
62. van der Horst PH, et al. *Int J Cancer*. 2014;135(5):1028-37.
63. Szabova L, et al. *Cancer Res*. 2012;72(16):4141-53.
64. Francis JC, et al. *PLoS Genet*. 2010;6(6):e1000995.

65. Dhomen N, et al. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23(1):112-20.
66. Hooijkaas A, et al. *Oncoimmunology.* 2012;1(5):609-17.
67. Hamberg P, et al. *Oncologist.* 2010;15(6):539-47.
68. Butler LM, et al. *Cancer Res.* 2000;60(18):5165-70.
69. Bryant HE, et al. *Nature.* 2005;434(7035):913-7.
70. Farmer H, et al. *Nature.* 2005;434(7035):917-21.
71. Garnett MJ, et al. *Nature.* 2012;483(7391):570-5.
72. Choy E, et al. *BMC Cancer.* 2014;14:813.
73. Rohle D, et al. *Science.* 2013;340(6132):626-30.
74. le Coutre P, et al. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(2):163-8.
75. Warmuth M, et al. *Curr Opin Oncol.* 2007;19(1):55-60.
76. Knight ZA, et al. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(2):130-7.
77. Malinda KM. *Methods Mol Biol.* 2009;467:287-94.
78. Yang H, et al. *Cancer Res.* 2012;72(3):779-89.
79. Gilmartin AG, et al. *Clin Cancer Res.* 2011;17(5):989-1000.
80. Bollag G, et al. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(11):873-86.
81. Chresta CM, et al. *Cancer Res.* 2010;70(1):288-98.
82. Yang Q, et al. *Clin Cancer Res.* 2015;21(7):1537-42.
83. Fry DW, et al. *Mol Cancer Ther.* 2004;3(11):1427-38.
84. LeBlanc R, et al. *Cancer Res.* 2002;62(17):4996-5000.
85. Kimura S, et al. *Anticancer Res.* 2012;32(3):795-8.
86. Rhyasen GW, et al. *Cancer Cell.* 2013;24(1):90-104.
87. Carbone FR, et al. *J Exp Med.* 1988;167(6):1767-79.
88. Brown DM, et al. *Immunology.* 2001;102(4):486-97.
89. Fearon ER, et al. *Cancer Res.* 1988;48(11):2975-80.
90. Robbins PF, et al. *Cancer Res.* 1991;51(14):3657-62.
91. Schreurs MW, et al. *Melanoma Res.* 1997;7(6):463-70.
92. Maeda A, et al. *Eur J Immunol.* 2002;32(8):2300-7.
93. Huang AY, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(18):9730-5.
94. Sugihara E, et al. *Int J Cancer.* 2013;132(6):1249-59.

## Report

# Report on the use of non-clinical studies in the regulatory evaluation of oncology drugs

Yoshihiro Hayakawa,<sup>1,2</sup> Manabu Kawada,<sup>1,3</sup> Hiroyoshi Nishikawa,<sup>1,4</sup> Takahiro Ochiya,<sup>1,5</sup> Hideyuki Saya,<sup>1,6</sup> Hiroyuki Seimiya,<sup>1,7</sup> Ryoji Yao,<sup>1,8</sup> Masahiro Hayashi,<sup>1,9</sup> Chieko Kai,<sup>1,10</sup> Akira Matsuda,<sup>1,11</sup> Tomoki Naoe,<sup>1,12</sup> Atsushi Ohtsu,<sup>1,13</sup> Taku Okazaki,<sup>1,14</sup> Hideo Saji,<sup>1,15</sup> Masataka Sata,<sup>1,16</sup> Haruhiko Sugimura,<sup>1,17</sup> Yuichi Sugiyama,<sup>1,18</sup> Masakazu Toi<sup>1,19</sup> and Tatsuro Irimura<sup>1,20</sup>

<sup>1</sup>Subcommittee on Non-clinical Studies, The Science Board to the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Tokyo; <sup>2</sup>Division of Pathogenic Biochemistry, Department of Bioscience, Institute of Natural Medicine, University of Toyama, Toyama; <sup>3</sup>Institute of Microbial Chemistry, Microbial Chemistry Research Foundation, Numazu-shi; <sup>4</sup>Division of Cancer Immunology, Exploratory Oncology Research and Clinical Trial Center, National Cancer Center, Chiba; <sup>5</sup>Division of Molecular and Cellular Medicine, National Cancer Center Research Institute, Tokyo; <sup>6</sup>Division of Gene Regulation, Institute for Advanced Medical Research, School of Medicine, Keio University, Tokyo; <sup>7</sup>Division of Molecular Biotherapy, Cancer Chemotherapy Center, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo; <sup>8</sup>Division of Cell Biology, Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo; <sup>9</sup>Department of Pharmacy, Toranomon Hospital, Tokyo; <sup>10</sup>Laboratory Animal Research Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo; <sup>11</sup>Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Sapporo; <sup>12</sup>National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Nagoya; <sup>13</sup>Exploratory Oncology Research and Clinical Trial Center, National Cancer Center, Chiba; <sup>14</sup>Division of Immune Regulation, Institute for Genome Research, Tokushima University, Tokushima; <sup>15</sup>Department of Patho-Functional Bioanalysis, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto; <sup>16</sup>Department of Cardiovascular Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School, Tokushima; <sup>17</sup>Department of Tumor Pathology, Hamamatsu University School of Medicine, Shizuoka; <sup>18</sup>Sugiyama Laboratory, RIKEN Innovation Center, RIKEN Cluster for Industry Partnerships, Kanagawa; <sup>19</sup>Department of Breast Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto; <sup>20</sup>Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

**Key words**

Animal model, cancer, drug development, oncology drug, regulatory science

**Correspondence**

Tatsuro Irimura, Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan or Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan.  
Tel: +81-3-3506-9407 (ext 3802) or +81-3-5802-1222; Fax: +81-3-3813-3307;  
E-mail: t-irimura@juntendo.ac.jp

**Funding Information**

The work was conducted as a part of activity of the Science Board of Pharmaceuticals and Medical Devices Agency.

Received October 21, 2015; Revised December 4, 2015; Accepted December 4, 2015

*Cancer Sci* 107 (2016) 189–202

doi: 10.1111/cas.12857

**Progress of Cancer Biology is Closely Linked to Oncology Drug Development**

The history of the development of oncology drugs, so-called chemotherapeutic agents, is closely associated with the progress of the biological understanding of cancer. Based on the concept that cancer cells are capable of unlimited proliferation, substances that inhibit DNA replication or cell division have been used as drugs for cancer treatment for a long period, since the 1950s. Although the concept has remained unchanged to the present day,<sup>(1)</sup> the discovery of cancer cell-specific

Non-clinical studies are necessary at each stage of the development of oncology drugs. Many experimental cancer models have been developed to investigate carcinogenesis, cancer progression, metastasis, and other aspects in cancer biology and these models turned out to be useful in the efficacy evaluation and the safety prediction of oncology drugs. While the diversity and the degree of engagement in genetic changes in the initiation of cancer cell growth and progression are widely accepted, it has become increasingly clear that the roles of host cells, tissue microenvironment, and the immune system also play important roles in cancer. Therefore, the methods used to develop oncology drugs should continuously be revised based on the advances in our understanding of cancer. In this review, we extensively summarize the effective use of those models, their advantages and disadvantages, ranges to be evaluated and limitations of the models currently used for the development and for the evaluation of oncology drugs.

metabolic pathways has led to the development of antimetabolites.<sup>(2)</sup> After the discovery of cancer cell-specific molecular and cellular mechanisms that are essential for the survival and growth of cancer cells, therapeutic drugs targeting these mechanisms, so-called molecular targeted drugs, started to be developed.<sup>(3)</sup> Research into viral oncogenesis, started in the 1960s, led to the discovery of oncogenes,<sup>(4)</sup> and research into the genetic backgrounds of cancers led to the discovery of tumor suppressor genes.<sup>(5)</sup> In the course of such studies, it also became apparent that cancer is caused by genetic abnormalities such as mutations, deletions, duplications, and translocations.<sup>(6–9)</sup> Molecular targeted cancer drugs appeared in the 1990s;<sup>(10)</sup> can-

cer was considered a disease characterized by abnormal differentiation, and the efficacy of differentiation-inducing agents was demonstrated.<sup>(11,12)</sup> Furthermore, it was shown that a solid tumor tissue consists of cancer and host cells such as vascular cells, fibroblasts, and cells in the immune system and that these host cells are essential for tumor growth. Drugs targeting the function of these host cells and their interactions with cancer cells were proven to be effective.<sup>(13)</sup> Based on these findings, it has been thought that regulatory mechanisms for the entire organism are involved in the action of oncology drugs that regulate the immune system.<sup>(14)</sup>

### Significance of Non-Clinical Studies in Efficacy Evaluation and Safety Prediction

Non-clinical studies are necessary at each stage of the development of oncology drugs. Particularly, the efficacy and the safety of a drug must be examined and evaluated before undertaking any clinical study of the drug. Types of non-clinical studies and how critical they are vary depending on the types and mechanisms of action of oncology drugs. Non-clinical studies required to develop drugs targeting cancer–host interactions differ markedly from those on substances having direct killing effects on cancer cells. Many experimental cancer models (animal models, *ex vivo* models, and *in vitro* models) have been developed to investigate carcinogenesis, cancer progression, metastasis, and other aspects in cancer biology. These models turned out to be useful in the efficacy evaluation and the safety prediction of oncology drugs. The present review summarizes the effective use of those models, their advantages and disadvantages, ranges to be evaluated, and limitations of the models used in non-clinical study.

### Evaluation of Oncology Drugs Using Experimental Animal Models

Two classes of experimental animal models for human cancers are currently used for the evaluation of oncology drugs: transplantation models and autochthonous cancer models. Transplantation models have been playing an important role in the non-clinical evaluation of oncology drugs. They are generally categorized into two types, namely xenograft models using human cancer cells and orthograft models using murine cancer cells. There has been some debate that the efficacy evaluation of oncology drugs in transplantation models might not be adequate for predicting the clinical efficacy or the types of cancer for which the drug could be effective. As autochthonous cancer models, chemical carcinogen-induced models were first established and the subsequent technological progress in gene manipulation allowed researchers to produce models harboring the genetic mutations of human cancer. Although a number of technical issues regarding the ability to maximize the utility of these models need to be addressed, such as their usability, reproducibility, and throughput compared with transplantation models, autochthonous cancer models clearly show some promise. In Table 1, we summarize the characteristics of those experimental cancer models used to evaluate the efficacy of oncology drugs in non-clinical studies.

**Transplantation cancer models.** In general, the s.c. (heterotopic) transplantation models with cancer cell lines have been used, and the efficacies of oncology drug response are evaluated based on tumor size. These models are particularly useful when a drug has a marked antiproliferative effect on cancer

cells. It is also easy to access tumor tissue samples from these models for subsequent pharmacodynamic evaluations. Despite such clear advantages, these models may not reflect the actual characteristics of the cancer microenvironment because the s.c. tissue is “heterotopic” for most cancer cells. In this context, orthotopic transplantation models may reproduce the cancer microenvironment more faithfully, although their utility caused by species differences should be considered. To analyze metastasis dissemination of cancer cells, experimental metastasis models have been considered as useful for evaluating drug efficacy in the process after the invasion of cancer cells from the primary tumor into the nearby blood vessel. Although these models have clear advantage in their usability and reproducibility, they cannot reproduce the entire step before the extravasation of cancer cells and may not accurately represent actual metastases by injecting a substantial number of cancer cells into the blood vessel. In this regard, spontaneous metastasis models have been considered to reflect the process of the metastasis of cancer cells more accurately than the heterotopic or orthotopic transplantations. Despite the clear advantages of these models, only a limited number of cancer cell lines are available and the results of experiments often vary. In addition to the above transplantation cancer models with cancer cell lines, patient-derived xenograft models have been considered as emerging animal models recapitulating the clinical condition of individual cancer patients, and therefore attracted much attention on precision treatment.<sup>(15–17)</sup>

**Autochthonous cancer models.** There are two major types of autochthonous cancer models, carcinogen-induced models and gene-engineered mouse (GEM) models. Of these, GEM models have been regarded as a better choice for testing drug efficacy, because the drug effects can be evaluated on autochthonous cancer cells induced by gene mutations resembling human cancer. As summarized in Table 2, there are several pros and cons to using autochthonous cancer models for drug efficacy tests in non-clinical studies. In particular, the timing of tumor occurrence and tissue specificity are often the major concerns of carcinogen-induced models and conventional knockout/transgenic mice. To overcome these issues, conditional gene knockout or gene expression technology provide us with the opportunity to use GEM models that more closely represent the pathology of human cancers. In addition to the above technical difficulties, the administrative challenges, such as maintenance of mouse strains to acquire a sufficient number of mice as well as the characters of each mouse model, including the latency and incidence of tumor and other relevant issues, need to be considered before undertaking efficacy studies testing oncology drugs in GEM models. Nevertheless, new technologies, such as *in vivo* imaging methods for small animals, have been introduced as powerful tools for quantitative evaluation of cancer occurrence and subsequent growth in GEM models. In Table 3, GEM models developing tumors induced by genetic mutations found in corresponding human cancers are summarized.

**Spontaneous cancer models using companion animals.** Even in companion animals, such as dogs and cats, the incidence of cancer has been increasing, likely due to their life extension together with genetic factors. In fact, cancer has become the leading cause of death among those companion animals. In particular, it has been known that the mortality from cancer is reported to be 47% (based on the report by the Veterinary Cancer Society, <http://www.vetcancersociety.org/members/>) in large breed dogs aged 10 years or more. Therefore, the establishment of early diagnosis methods and the development of

**Table 1. Characteristics of preclinical animal models for oncology drug development**

Model	Outline	Advantage	Disadvantage
Mouse cancer model	Transplantation model	Heterotopic model	Models s.c. transplanted with tumor cell lines
	Orthotopic model	Models transplanted tumor cell lines into tissue where they were originated or to which they metastasize	Easy to monitor the drug efficacy on tumor growth by examining visible size
	Autocthonous model	Carcinogen-induced model	Account for tissue microenvironment for cancer cells where originated or metastasized
			Reproduce carcinogenesis-associated events such as host inflammation
			Difficult to monitor tumor growth over time
			Requires complicated methods and expects potential variability among individual animals
			Difficulties in preparing a sufficient number of mice and relatively time-consuming
			Difficult to maintain mouse with multiple mutant alleles
			May not accurately reproduce human cancer types
			Challenges for using drug efficacy evaluation (tumor latency, time for tumor formation etc.)
			Accuracy of the model in its clinical relevance has been questioned in some cases
			Clear restriction in availability and utility
Human cancer model	Transplantation model	Cell line	Transplantation of human cancer cell lines or human tumor tissues into immune-compromised mice
			Direct transplantation of patient-derived cancer tissue into immune-compromised mice
			Use of dogs who naturally develop cancers
			Conduct as veterinary clinical trial
Spontaneous dog cancer model	Naturally occurring canine cancer		Ability for testing human cell lines in relevant tumor types or with genetic backgrounds
			Ability for testing clinical patient-derived tumor tissues
			Share many characteristics with human malignancies
			Difficulties in preparing a sufficient number of dogs

Summary of the characteristics of preclinical animal models and their potential advantages and disadvantages for use in oncology drug development. GEM, gene-engineered mouse; PDX, patient-derived xenograft.

**Table 2. Characters of genetically engineered mouse models**

Mutation type	Conventional mutation		Conditional mutation	
	NA	Viral (e.g. adex-Cre)	Tissue-specific (e.g. GFAP-Cre, FABP-Cre)	Induced (e.g. R26-CreERT2, Tyr-CreERT2)
Mutation induction	NA	Viral (e.g. adex-Cre)	Tissue-specific (e.g. GFAP-Cre, FABP-Cre)	Induced (e.g. R26-CreERT2, Tyr-CreERT2)
Generation of embryonic lethal knockout animals	Not available	Available	Available	Available
Tissue specificity	Uncontrollable Tumors generated are not necessarily present in the same tissues as those in humans	Induce tissue-specific/local mutation Tumors can be generated in the same tissues as those in humans	Induce selective mutation at a cellular level Reproduce cancer initiating cells	Inducible selective mutation at a tissue or cellular level
Time specificity	No	Controllable	Promoter-dependent Uncontrollable	Promoter context Controllable
Induction process	NA	Extremely complicated Tissue limitation	NA	Required (but not complicated)
Induction efficiency	Excellent	Low	Promoter-dependent Relatively high	Promoter-dependent Difficult to achieve high efficiency
Homogeneity of tumors	Relatively consistent	High variability Skill-dependent	Low variability	Low variability Skill-dependent
Acquisition of the number of mice	Easy	Difficult	Easy	Manageable (but requires induction process)
Maintenance of mouse strains	Generally easy (dependent on target genes; difficult in the case of tumor generation in heterozygous mice)	Easy	Complicated to maintain animals having multiple mutant alleles	Complicated to maintain animals having multiple mutant alleles

This table summarizes the advantages and potential problems in various types of genetically engineered mouse models for use in preclinical studies of oncology drugs. NA, not applicable.

therapeutic drugs for cancer in companion animals is being actively pursued in the USA and Europe. Considering the pathology of cancer in large breed dogs seems to be similar to those in humans,<sup>(68)</sup> the utility of spontaneous cancer in large breed dogs for testing new oncology drugs has already been initiated in the USA and Europe.<sup>(69)</sup> In Japan, the leading cause of death in dogs is also cancer with a mortality of 54% (“The Ten Leading Causes of Death in Dogs and Cats” reported by the Animal Insurance System Japan Animal Club), which is much higher than the mortality rate of other diseases such as heart disease (17%). Given these circumstances, studies for developing methods for the diagnosis and treatment of cancer in dogs have been actively initiated. Based on the results of these studies, the Japanese Society of Clinical Veterinary Medicine have been discussing the significance of cancer models using companion animals in non-clinical studies for developing oncology drugs as well as preparing for the establishment of relevant administrative and management systems for its application.

### Evaluation of Oncology Drugs that Directly Target Cancer Cells

The efforts of oncology drug development originally concentrated on the production of drugs that directly target the proliferation or metabolic properties of cancer cells. Along with discovery of oncogenic driver genes, development of molecular targeted drugs has been highlighted, which directly pinpoint signal transduction pathways involving those driver genes, as well as the protein degradation systems, epigenome, and metabolic systems of cancer cells. As molecular targeted drugs, ty-

rosine kinase inhibitors (TKI), multi-targeted kinase inhibitors (MTKI), and drugs that target molecular mechanisms for cell cycle regulation and others have been successfully developed. Although the classical anticancer chemotherapeutic drugs also show cytotoxicity by attacking specific intracellular molecules, the term “molecular targeted drug” in this report is defined as a drug that has been developed through primary identification of a molecule or a signaling pathway as a therapeutic target, which is highly activated or deregulated in cancer cells. Table 4 summarizes the pros and cons for evaluating molecular targeted drugs in non-clinical cancer models. The results produced by the use of these models have been included in the application of new drugs; the models believed to be essential.

**Tyrosine kinase inhibitors and other kinase inhibitors.** Tyrosine kinase inhibitors include epidermal growth factor receptor inhibitors (gefitinib, erlotinib, lapatinib, and afatinib), human epidermal growth factor receptor 2 inhibitors (lapatinib and afatinib), anaplastic lymphoma kinase inhibitors (crizotinib, ceritinib, and alectinib), BCR-ABL inhibitors (imatinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib, and bosutinib), a KIT inhibitor (imatinib), SRC inhibitors (dasatinib and bosutinib), a JAK inhibitor (ruxolitinib), a Bruton’s tyrosine kinase inhibitor (ibrutinib), and a dual kinase MEK inhibitor (trametinib). There are several other kinase inhibitors, including BRAF inhibitors (vemurafenib and dabrafenib), a phosphatidylinositol-3 kinase inhibitor (idelalisib), and mammalian target of rapamycin inhibitors (temsirolimus and everolimus). In addition, drugs that target p38, AKT, p70S6 kinase, insulin-like growth factor 1 receptor, platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), fibroblast growth factor receptor (FGFR), MET, ROS 1, and RET are currently being developed. For evaluating the effica-

Table 3. Mouse models corresponding to genetic mutations in human cancers

Human disease		Mouse model			
Cancer type	Mutated gene	Mutated gene	Mutation type	Mutation induction	Tumor produced
Medulloblastoma	<i>RB1</i>	<i>Rb1/Tp53</i>	Conditional KO/conditional KO	GFAP-Cre	Medulloblastoma <sup>(18)</sup>
		<i>Rb1/Bmi1</i>	Conditional KO/conditional activation	GFAP-Cre	Medulloblastoma <sup>(19)</sup>
	<i>PTCH1</i>	<i>Ptch1</i>	Conditional KO	math1-cre/ GFAP-Cre	Medulloblastoma <sup>(20)</sup>
Gorlin syndrome	<i>PTCH1</i>	<i>Ptch1</i>	Conventional		Medulloblastoma, rhabdomyosarcoma <sup>(21)</sup>
Pituitary gland tumor	<i>RB1</i>	<i>Rb1</i>	Conventional KO	Pomc-Flp	Pituitary gland tumor <sup>(22,23)</sup>
		<i>Rb1</i>	Conditional KO		Pituitary gland tumor <sup>(24)</sup>
Lung cancer	<i>KRAS</i>	<i>Kras</i>	Conventional KO (sporadic activation)	Adex-Cre	Lung cancer <sup>(25)</sup>
	<i>BRAF</i>	<i>Braf</i>	Conditional activation		Lung cancer <sup>(26,27)</sup>
	<i>RB1</i>	<i>Rb1/Tp53/Pten</i>	Conditional KO/conditional KO/ conditional KO		CGRP-CreER
Breast cancer	<i>EML4-ALK</i>	<i>EML4-ALK</i>	Conventional activation (SPC promoter)	Tet system	Lung cancer <sup>(29)</sup>
	<i>EML4-ALK</i>	<i>EML4-ALK</i>	Conditional activation		Lung cancer <sup>(30)</sup>
	<i>KIF5B-RET</i>	<i>KIF5B-RET</i>	Conventional activation (SPC promoter)		Lung cancer <sup>(31)</sup>
	<i>EZR-ROS1</i>	<i>EZR-ROS1</i>	Conventional activation (SPC promoter)		Lung cancer <sup>(32)</sup>
	<i>PIK3CA</i>	<i>Pik3ca</i>	Conditional activation	MMTV-Cre	Breast cancer <sup>(33)</sup>
	<i>TRP53</i>	<i>Pik3ca/Tp53</i>	Conditional activation/conditional KO	MMTV-Cre	Breast cancer, leukemia <sup>(34)</sup>
	<i>PTEN</i>	<i>Pten</i>	Conditional KO (stromal fibroblast)	Fsp-Cre	Breast cancer <sup>(35)</sup>
Hereditary breast cancer	<i>ERBB2</i>	<i>ErbB2</i>	Conventional activation (MMTV promoter)	MMTV-Cre	Breast cancer <sup>(36,37)</sup>
		<i>ErbB2/Pten</i>	Conditional activation/conventional KO		Breast cancer <sup>(38)</sup>
	<i>RB1</i>	<i>Rb1/Tp53</i>	Conditional KO/conditional KO	MMTV-Cre	Breast cancer <sup>(39)</sup>
	<i>BRCA1</i>	<i>Brca1/Tp53</i>	Conditional KO/conventional KO	BLG-Cre	Breast cancer <sup>(40)</sup>
		<i>Brca1/Chk2</i>	Conditional KO/conventional KO	Wap-Cre	Breast cancer <sup>(41)</sup>
Colorectal cancer	<i>BRCA2</i>	<i>Brca2/Tp53</i>	Conditional KO/conventional KO	K14-Cre	Breast cancer, skin tumor <sup>(42)</sup>
	<i>APC</i>	<i>Apc/Kras</i>	Conditional KO/conditional activation	Adex-Cre	Colorectal cancer <sup>(43)</sup>
	<i>KRAS</i>	<i>Apc/Kras</i>	Conditional KO/conditional activation	Fapbl-Cre	Colorectal cancer <sup>(44)</sup>
Familial adenomatous polyposis	<i>PTEN</i>	<i>Apc/Pten</i>	Conditional KO/conditional KO	Cyp1a1- CreERT2	Tumor of the digestive tract <sup>(45)</sup>
	<i>Smad4</i>	<i>Apc/Smad4</i>	Conventional KO/conventional KO		Tumor of the digestive tract <sup>(46)</sup>
	<i>APC</i>	<i>Apc</i>	Conventional KO		Tumor of the digestive tract <sup>(47-49)</sup>
		<i>Apc</i>	Conditional KO	Adex-Cre	Tumor of the digestive tract, <sup>(50)</sup> liver cancer <sup>(51)</sup>
Hereditary non-polyposis colorectal cancer	<i>MSH3</i>	<i>Msh3</i>	Conventional KO		Lymphoma <sup>(52)</sup>
	<i>MSH6</i>	<i>Msh6</i>	Conventional KO		Lymphoma, <sup>(52)</sup> tumor of the digestive tract, skin cancer, uterine cancer <sup>(53)</sup>
		<i>Msh3/Msh6</i>	Conventional KO		Lymphoma, <sup>(52)</sup> tumor of the digestive tract, <sup>(54)</sup> skin tumor <sup>(53)</sup>
Cowden syndrome	<i>PTEN</i>	<i>Pten</i>	Conventional KO		Tumor of the digestive tract, lymphoma, adrenal tumor, breast cancer, prostate cancer <sup>(55,56)</sup>
Pancreatic cancer	<i>KRAS</i>	<i>Kras/Tp53</i>	Conditional activation/conditional KO	pdx1-cre	Pancreatic cancer <sup>(57)</sup>
		<i>Kras/Tgfbr2</i>	Conditional activation/conditional KO	Ptf1a-cre	Pancreatic cancer <sup>(58)</sup>
		<i>Kras/Pten</i>	Conditional activation/conditional KO	pdx1-cre	Pancreatic cancer <sup>(59)</sup>
Endometrial cancer	<i>PTEN</i>	<i>Pten/Mig6</i>	Conditional KO/conditional KO	PR-Cre	Endometrial cancer <sup>(60)</sup>
		<i>Pten/Tp53</i>	Conditional KO/conditional KO	PR-Cre	Endometrial cancer <sup>(61)</sup>
Ovarian cancer	<i>KRAS</i>	<i>Kras/Pten</i>	Conditional activation/conditional KO	Adex-Cre	Ovarian cancer <sup>(62)</sup>
	<i>APC</i>	<i>Apc</i>	Conditional KO	Pgr-Cre	Ovarian cancer <sup>(63)</sup>
Prostate cancer	<i>BRCA2</i>	<i>Brca2/Tp53</i>	Conditional KO/conventional KO	K18-Cre	Ovarian cancer <sup>(64)</sup>
	<i>BRCA2</i>	<i>Brca2/Tp53</i>	Conditional KO/conventional KO	Pbsn-Cre	Prostate cancer <sup>(65)</sup>



Table 3 (Continued)

Human disease		Mouse model			
Cancer type	Mutated gene	Mutated gene	Mutation type	Mutation induction	Tumor produced
Skin tumor	<i>BRAF</i>	<i>Braf</i>	Conditional activation	Tyr-CreERT2	Malignant melanoma <sup>(66)</sup>
		<i>Braf/Pten</i>	Conditional activation/conditional KO	Tyr-CreERT2	Malignant melanoma <sup>(67)</sup>
	<i>PTCH1</i>	<i>Ptch1</i>	Conditional KO	R26-CreERT2	Basal cell tumor <sup>(20)</sup>

Mouse models reproducing generative tissues and mutations found in human cancer. While many other scientifically excellent mouse models for human cancers have been generated, the table preferentially lists those harboring relatively simple mutant alleles suitable for preclinical studies. It should be noted some mouse models do not completely recapitulate pathologies of human cancer.

cies of those kinase inhibitors, transplantation models with target (mutant) gene-positive cancer cells or GEM models driven by target (mutant) genes have been generally used. In general, cancer cells that have potent driver gene mutations (“gain-of-function” mutations) show a high degree of so-called oncogene addiction, and therefore it would be relatively easy to predict or evaluate the drug response *in vivo*. These non-clinical cancer models are also useful for evaluating pharmacodynamics of the drugs by monitoring the phosphorylation status of the target molecules, their downstream factors, or both. Meanwhile, it should also be noted that established cancer cell lines may have altered their phenotypes and characters compared with the original cancers during *in vitro* culture, whereas genetically engineered cell lines may not be able to accurately replicate the etiology of the relevant clinical cancer types.

**Multitargeted kinase inhibitors.** Multitargeted kinase inhibitors include a RAF/vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2)/PDGFR- $\beta$  inhibitor (sorafenib), a VEGFR2/PDGFR- $\beta$ /KIT/FLT-3 inhibitor (sunitinib), a VEGFR/KIT/PDGFR inhibitor (pazopanib), a RET/VEGFR2/EGFR inhibitor (vandetanib), a VEGF/PDGF inhibitor (axitinib), a VEGFR/RET/KIT/PDGFR/RAF inhibitor (regorafenib), a MET/RET/VEGFR/KIT/FLT-3/TIE-2/TRKB/AXL inhibitor (cabozantinib), and a VEGFR/FGFR/PDGFR/SRC/LCK/LYN/FLT-3 inhibitor (nintedanib). Similarly to TKIs, the efficacy of MTKIs can be evaluated in non-clinical cancer models. However, MTKIs target multiple kinases and it is generally difficult to prepare genetically engineered cell lines that reproduce the pathology of the target cancers. In the case of MTKIs that target angiogenic factors, such as VEGFR, FGFR, and PDGFR, accurate prediction of *in vitro* efficacy would be difficult: pazopanib, for example, does not necessarily show a direct antiproliferative effect on many cancer cell lines *in vitro*, but it significantly inhibits tumor growth *in vivo* by blocking angiogenesis.<sup>(74)</sup> Also, because MTKIs could have multiple modes of action, establishment of the proof-of-concept at the pharmacodynamic level in non-clinical cancer models might require a complex procedure.

**Targeting cell cycle.** Palbociclib inhibits cyclin-dependent kinases 4 and 6 (CDK4 and CDK6), which are involved in cell cycle control. Furthermore, drugs targeting various cell cycle regulators, such as WEE1, cell division cycle 7, checkpoint kinase 1 and 2, ATR, Aurora, PLK, and mitotic kinesins, are under clinical development. Efficacies of these drugs can be evaluated using relevant cancer cell lines that have abnormalities in the target molecules or their regulators (e.g. CCND1/CDK6 amplification or CDKN2 deletion/mutation) in transplantation models.

**Targeting protein degradation systems.** Protein degradation systems have been recognized as an emerging therapeutic

target for particular types of cancer. While several target molecules have been described in this category, proteasome inhibitors, such as bortezomib and carfilzomib, have been developed most extensively and approved as anticancer drugs. Meanwhile, other molecular targets include the NEDD8-activating enzyme, the ubiquitin-activating enzyme, and stress proteins that are involved in protein folding, such as heat shock protein 90 and glucose-regulated protein 78. Given that the preferential efficacies of proteasome inhibitors against multiple myeloma have been well established, transplantation models with multiple myeloma cell lines could be applicable for evaluating the efficacy of the drugs in this category. However, there are several potential issues and limitations for predicting the clinical efficacy of these drugs from non-clinical cancer models: detailed mechanisms for the action of the drugs and predictive biomarkers for the drug responses are rather elusive, and cancer types that are susceptible to the anticancer effects of the drugs in non-clinical studies may not be consistent with those in the clinical settings. Therefore, the latest knowledge from basic research and clinical phase I studies on various cancer types should be taken into consideration for additional indication of the drugs.

**Targeting genomes and epigenomes.** The anticancer efficacies of drugs that target cancer epigenomes, such as DNA methyltransferase inhibitors (azacytidine and decitabine) and histone deacetylase (HDAC) inhibitors (vorinostat, panobinostat, romidepsin, and belinostat), have been shown *in vivo*, although the cancer types against which the drugs are effective differ between the non-clinical studies and clinical practice in some cases.<sup>(84)</sup> As these drugs affect many target sites in a genome-wide manner, detailed mechanisms and predictive biomarkers for the drug response often remain elusive. Drugs targeting the genomic repair systems include poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors, such as olaparib. Because there is a synthetic lethal relationship between PARP and tumor suppressors, BRCA1 and 2, it would be relatively easy to predict the therapeutic efficacy of PARP inhibitors by using transplant models of cell lines with BRCA1 or 2 deficiency.<sup>(85,86)</sup> Besides BRCA1/2, it has been also postulated that there are many synthetic lethal factors with PARP inhibition. However, the clinical validity of those candidates has not been fully established. However, it should be also noted that synthetic lethality confirmed in the non-clinical studies (e.g. effect of a PARP inhibitor on EWS-FLI1-positive Ewing’s sarcoma)<sup>(87,89)</sup> could be sometimes abolished by the formerly applied therapies in the clinical settings.

**Targeting cancer cell metabolisms.** Metabolic enzymes favored by cancer cells, such as isocitrate dehydrogenases 1/2 (IDH1/2) and fatty acid synthase, are potential targets for cancer therapy. For IDH1/2 inhibitors, transplant models of IDH1

**Table 4. Evaluation of drugs directly targeting cancer cells**

Classification (type of inhibitors)	Target molecule	Evaluation methods (drug efficacy study)	Characteristics	Problems
Tyrosine kinases	EGFR, HER2, ALK, BCR-ABL, KIT, SRC, JAK, BTK, IGF1R, PDGFR, FGFR, MET, ROS1, RET	(i) Transplantation models of target (mutant) gene positive cancer cells Cancer cell lines with target (mutant) genes <sup>(70)</sup> Alternative cell lines into which target (mutant) genes are transfected <sup>(71)</sup> (e.g. Ba/F3) (ii) GEM models <sup>(29)</sup>	Can predict/evaluate drug efficacy in the model with potent driver gene activities and oncogene addiction <sup>(72)</sup> Can generate resistant cells as negative control Can establish proof-of-concept pharmacodynamically by evaluating autophosphorylation of target kinases or phosphorylation of downstream factors Can predict/evaluate drug efficacy in the model with potent driver gene activities <sup>(31)</sup>	(i) Cancer cell lines may change their phenotypes during the process of their establishment due to selective pressure and stresses (ii) Alternative cell lines may not accurately replicate the etiology of the relevant cancer types
Kinases (multi-targeted)	RAF, VEGFR-2, PDGFR-β, KIT, FLT-3, RET, EGFR, MET, RET, TIE-2, TRKB, AXL, SRC, LCK, LYN	The same as (i) and (ii) above <sup>(31)</sup> For anti-angiogenic agents, Matrigel plug assay could be used <sup>(73)</sup>		In addition to (i) and (ii) above: It is difficult to generate alternative cell lines reproducing the pathology of target cancers by genetic engineering when the drug acts on multiple kinases in the target cancer cells <i>In vitro</i> cell growth assays do not reflect the antiangiogenic action <i>in vivo</i> <sup>(74)</sup> May require complicated pharmacodynamic analyses due to the presence of multiple targets In addition to (i) and (ii) above: (iii) It is difficult to achieve sufficient drug response in some cancer types including colorectal cancer with less potent driver activities, in which other coexisting (i.e. not mutually exclusive) driver pathways contribute to tumor proliferation <sup>(77)</sup> The same as (i), (ii), and (iii) above
MAPK pathway	MEK, BRAF, p38	Cancer cell lines with mutations in the target pathway of interest (target molecule or upstream target) or transplantation animal models with alternative cell lines generated by genetic engineering <sup>(75,76)</sup> GEM models <sup>(27)</sup>	Can predict/evaluate drug efficacy in the model with potent driver gene activities <sup>(77)</sup> Can establish proof-of-concept pharmacodynamically by evaluating phosphorylation of downstream factors	
PI3K/mTOR pathway	PI3K, mTOR, AKT, p70S6K	Cancer cell lines with mutations in the target pathway of interest (target molecule or upstream target) or transplantation animal models with alternative cell lines generated by genetic engineering <sup>(78)</sup> GEM models <sup>(33)</sup>	Can predict/evaluate drug efficacy in the model with potent driver gene activities <sup>(79)</sup> Can establish proof-of-concept pharmacodynamically by evaluating phosphorylation of downstream factors	
Cell cycle	CDK4/6, WEE1, CDC7, CHK1, CHK2, ATR, Aurora, PLK, mitotic kinesins	Cancer cell lines with mutations in the target pathway of interest (target molecule or upstream target) or transplantation animal models with alternative cell lines generated by genetic engineering <sup>(80)</sup>	Drug efficacy may be achieved in cancer cell lines with an abnormality as shown in the left-hand column	The same as (i), (ii), and (iii) above

Table 4 (Continued)

Classification (type of inhibitors)	Target molecule	Evaluation methods (drug efficacy study)	Characteristics	Problems
Protein degradation system	Proteasome, related target molecules (NEDD8-activating enzyme, ubiquitin-activating enzyme, HSP90, GRP78)	Allograft/xenograft models of multiple myeloma cell lines <sup>(81)</sup>	Can predict/evaluate drug efficacy with multiple myeloma cell lines used in the studies of previously developed drugs	In addition to (i) above: (iv) Cancer types for which drugs are effective in preclinical studies may not be consistent with those in clinic
Genome/epigenome	DNMT, related target molecules (histone methyltransferase, histone demethylase)	Allograft/xenograft models of MDS cell lines <sup>(82)</sup> MDS models generated by implanting MDS cell lines into genetically engineered NSG mice <sup>(83)</sup>	MDS mouse models replicate the pathology more accurately than other transplantation animal models	In addition to (i) and (iv) above: Due to a very small number of available cell lines, clinical relevance of the model may be limited (v) Due to the genome-wide distribution of target sites, detailed mechanisms of action and predictive biomarkers for the drug response remain unclear
	HDAC	Allograft/xenograft models of colorectal/prostate/lung cancer cell lines <sup>(84)</sup>	Drug efficacy may be achieved in some cancer types in addition to those shown in the left-hand column	The same as (i), (iv), and (v) above Cutaneous T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma are currently approved for HDAC inhibitors
	PARP1/PARP2, related target molecules (DNA-dependent protein kinase, telomerase)	Allograft/xenograft models of cancer cell lines with <i>BRCA1</i> or <i>BRCA2</i> (tumor suppressor gene) mutation or inactivation <sup>(85,86)</sup>	Can predict/evaluate drug efficacy by using cancer cell lines with <i>BRCA1/2</i> deficiency: there is a synthetic lethal relationship between <i>PARP1/2</i> and <i>BRCA1/2</i>	The same as (i) and (iv) above In addition to <i>BRCA1/2</i> , substantial numbers of synthetic lethal factors are reported, (however, most of them are described only at a basic research level and the clinical relevance has not been fully established) Synthetic lethality may be diminished by pretreatment in the clinical cases even if preclinically confirmed <sup>(87)</sup>
Metabolic systems	IDH1/IDH2 (mutant-type), Fatty acid synthase	Xenograft models of IDH1 (R132)/IDH2 (R172) mutant-positive AML or glioma cell lines <sup>(88)</sup>	Can predict/evaluate drug efficacy by examining the presence of mutation Pharmacodynamic study can be carried out by monitoring mutation-specific metabolites (oncometabolites) <sup>(88)</sup> Drugs targeting molecules that produce no oncometabolites may be effective to a wider range of cancer types	If the target produces no oncometabolites, mechanisms of action or predictive biomarkers for the drug response may not be available and it may be difficult to design evidence-based studies to evaluate the drug response

This table classifies the target molecules of approved/investigational drugs used in Japan, overseas, or both and lists representative non-clinical evaluation methods of these drugs. Due to their usefulness and usability, evaluation results have been used for publication data of original papers and oncology drug application dossiers for approval. Meanwhile, it should be noted that these technologies have technical limitations and contain a number of limitations/problems attributable to the properties or unclarified factors of target molecules and diseases. ALK, anaplastic lymphoma kinase; BTK, Bruton's tyrosine kinase; CDC7, cell division cycle 7; CHK, checkpoint kinase; DMNT, DNA methyltransferase; EGFR, epidermal growth factor receptor; FGFR, fibroblast growth factor receptor; GRP, glucose-regulated protein; HDAC, histone deacetylase; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; HSP, heat shock protein; IDH, isocitrate dehydrogenase; IGF1R, insulin-like growth factor 1 receptor; MDS, myelodysplastic syndromes; mTOR, mammalian target of rapamycin; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; PI3K, phosphatidylinositol-3 kinase; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor.

(R132) or IDH2(R172) mutation-positive AML and glioma cell lines are useful for predicting drug efficacies.<sup>(88)</sup> The pharmacodynamics of these drugs can be evaluated by monitoring the mutation-specific metabolite (oncometabolite), 2-

hydroxyglutaric acid. However, if the target molecule does not produce a characteristic oncometabolite, one may expect a broader spectrum of anticancer efficacies of the inhibitors. In that case, however, it may be relatively difficult to evaluate

**Table 5. Evaluations of drugs targeting angiogenesis and tumor stroma**

Classification	Target	Evaluation method (drug efficacy study)	Characteristics	Problems
Targeting angiogenesis	Angiogenic factors (ligands) e.g. VEGF antibody	(i) Mouse cancer models (ii) Human cancer models (iii) Angiogenesis models (e.g. Matrigel plug assay, CAM assay, hollow fiber assay)	Evaluate in mouse/human cancer transplantation models with drugs and targets exhibit cross-reactivity between species Mechanisms of action can be examined depending on phenotypes of target molecule deficiency in GEM models	(i) Mouse transplantation models, GEM models (ii) Human cancer models: Cross-reactivity of the target molecule in mice should be considered (iii) Angiogenesis models: Consider the cross-reactivity of the drug between species. Generally difficult to evaluate drug efficacy in chemical carcinogen-induced models
	Receptors/receptor signals e.g. TKI (VEGFRs)	As above, (i), (ii), and (iii)	(i) Mouse transplantation models (ii) Human cancer models (cell line transplantation, PDX): The effect of the drug on mouse angiogenesis can be evaluated Mechanisms of action can be examined depending on phenotypes of target molecule deficiency in GEM models	As above, (i) and (ii).
	Production of angiogenesis factors e.g. mTOR inhibitor	As above, (i), (ii), and (iii)	(i) Mouse transplantation models (ii) Human cancer models (cell line transplantation, PDX): The effect of the drug on mouse angiogenesis can be evaluated. Mechanisms of action can be examined depending on phenotypes of target molecule deficiency in GEM models.	(i) Mouse transplantation models, GEM models: Consider the cross-reactivity of the drug between species. (ii) Human cancer models: Cross-reactivity of the target molecule in mice should be considered (iii) Angiogenesis models: Difficult to evaluate drug efficacy due to the lack of angiogenesis factor production
Targeting tumor stroma	Drug resistance/sensitivity, growth/metastasis, inflammation	(i) Mouse/human cancer transplantation model (s.c. transplantation models, orthotopic transplantation/metastasis models), cancer cell–stromal cell co-transplantation models (ii) GEM models	(i) Evaluate in mouse/human cancer transplantation models with drugs and targets exhibit cross-reactivity between species (ii) Mechanisms of action can be examined depending on phenotypes of target molecule deficiency in GEM models	(i) Transplantation models: Consider the cross-reactivity of the drug (mouse) or target (human). Human cancer s.c. transplantation models: Difficult to evaluate drug efficacy due to insufficient involvement of microenvironments (ii) GEM models: Cross-reactivity of the target molecule in mice should be considered. Generally difficult to evaluate drug efficacy in chemical carcinogen-induced models

Animal (mainly mouse) models used for the evaluation of oncology drugs targeting angiogenesis and tumor stroma are classified in this table. As the efficacy of these drugs depends on cancer–host interactions or host factors, consideration should be given to the cross-reactivity of therapeutic drugs and/or their target molecules between species (mainly between humans and mice). CAM, chick chorioallantoic membrane; GEM, gene-engineered mouse; mTOR, mammalian target of rapamycin; PDX, patient-derived xenograft; TKI, tyrosine kinase inhibitor; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, VEGF receptor.

the efficacy of the drugs because the mechanism of action and predictive biomarkers would remain unclear.

### Targeting Cancer Cell–Host Interactions

The importance of microenvironments on the growth, progression, and therapeutic resistance of cancer cells has been drawn much attention. Such tumor microenvironments have been known to support cancer cell proliferation directly or indirectly through interactions between surrounding stroma cells. In general, it is relatively difficult to carry out an appropriate *in vivo* efficacy test for drugs targeting interactions between cancer cell and host microenvironment in non-clinical cancer models.

**Targeting angiogenesis.** It has been widely recognized that generation of new blood vessels into tumor (angiogenesis) is a critical step for cancer cells to be adequately supplied nutrition and oxygen, therefore, it is assumed that tumors are unable to grow progressively without angiogenesis. There are also several relevant studies suggesting that angiogenesis is involved in not only cancer cell proliferation but also cancer cell progression, including metastases to distant organs. As represented by VEGF inhibitors (bevacizumab), drugs targeting angiogenesis may not exert direct antitumor effects on cancer cells, however, should inhibit the activity of various angiogenic factors that mainly affect vascular endothelial cells for generating new

blood vessels. Consequently, non-clinical evaluation of the efficacy of drugs targeting angiogenesis can be greatly affected by host factors in experimental animals; therefore, it is critical to use appropriate models for drug evaluation, as summarized in Table 5.

For carrying out appropriate *in vivo* tests for drugs targeting angiogenesis, it is very important to consider whether cancer cell lines or patient-derived samples produce angiogenic factors for targeting and, moreover, their cross-reactivity in non-clinical cancer models. It is also relevant for other angiogenesis models such as the Matrigel plug assay, chick chorioallantoic membrane assay, or hollow fiber assay.

**Targeting cancer stroma.** Diverse cellular components of tumor stroma (e.g. fibroblasts, mesenchymal cells, and inflammatory cells) and extracellular matrices (e.g. fibronectin, collagen, laminin, and proteoglycan) have been shown to be involved in cancer cell proliferation and progression. Although tumor stroma is expected to be an attractive therapeutic target, the development of drugs targeting cancer stroma is still in the early stages.

Similar to those targeting angiogenesis, non-clinical evaluation of drugs targeting tumor stroma should be greatly affected by host factors. In immune-compromised mice (e.g. nude, SCID, NOD/SCID, and NOG) often used for transplantation models of human cancer cells display a range of different

**Table 6. Evaluations of drugs targeting host immune response**

Model	Outline	Characteristics	Problems
Allograft model	Syngeneic (mainly mouse) cancer cell lines implanted into s.c. as heterotopic transplantation models, or implanted into original tissues/organs in orthotopic transplantation models, or injected into tail vein as metastasis models Use of cell lines with ectopic expression of model antigens (e.g. OVA, <sup>(90,91)</sup> HA, <sup>(92)</sup> CEA <sup>(93)</sup> ) or cell lines known with their immunogenicity (e.g. B16 melanoma, <sup>(94)</sup> Meth A, <sup>(95)</sup> colon 26 <sup>(96)</sup> )	Immune responses against cancer cells can be monitored over time and the mechanism of action can be tested Tumor antigen-specific immune responses can be evaluated where antigens have been specified Orthotopic transplantation models and metastasis models may be better for analyzing tumor-infiltrating lymphocytes considering the organ microenvironment of cancer cells.	Heterotopic transplantation models may not immunologically completely reproduce human cancer tissues due to insufficient tumor stroma Orthotopic/metastasis models require technical skills and are generally difficult for quantitative monitoring of tumor growth.
Carcinogen-induced mouse model	Mouse models developing tumors by challenging with carcinogenic substances (e.g. MCA, AOM/DSS, DMBA/TPA), or external stimuli such as UV, or inducing genetic abnormalities (e.g. p53 deficiency, transduction of SV40T antigen, APC deficiency)	Immune response during the carcinogenic process can be evaluated The clinical cancer pathology is closely represented.	Requires complicated procedure and poses difficulty in maintaining mouse strains Longer experimental period Difficult to evaluate antigen-specific immune response due to the lack of defined tumor antigens with some exceptions
Xenograft (human cancer) model (includes PDX)	Xenograft with human cell lines or patient-derived tumor tissues into immune-compromised mice (e.g. nude mice, SCID mice, NOG mice).	Antitumor activities can be analyzed by using human (cancer patients') immune cells.	Limitation for analyzing immune responses due to its incompetence of the intact immune system Application of humanized mice engrafted with human immune cells clearly requires further investigation

Animal (mainly mouse) models used for evaluating drugs targeting host immune response are classified in this table. As the efficacy of cancer immunotherapy depends on the host's immune system, concurrent use of multiple models should also be considered. In such a case, it is necessary to devise optimal combinations of models to be used, taking into account the potential limitations/problems of each model presented in the table as advantages or disadvantages. AOM, azoxymethane; APC, Adenomatous polyposis coli; CEA, carcinoembryonic antigen; DMBA, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene; DSS, Dextran sulfate sodium; HA, hemagglutinin; MCA, 3-Methylcholanthrene; OVA, ovalbumin; PDX, patient-derived xenograft; TPA, 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate.

immunological environments. Even in these immune-compromised animals, myeloid compartment and mesenchymal cells are known as relatively normal, therefore the efficacy of drugs targeting those stromal cells may be evaluated even in animal models if the target shows cross-reactivity between species.

**Targeting host immune responses.** The immune system has been regarded as an important constituent of the tumor microenvironment. Many series of studies have been undertaken to understand the regulatory mechanisms by which cancer cells control, either positively or negatively, hosts' immune responses. Recent clinical successes of immune checkpoint inhibitors, such as anti-CTLA-4 mAbs (ipilimumab and tremelimumab) and anti-PD-1 mAbs (nivolumab and pembrolizumab) highlight targeting hosts' immune responses against cancer cells as a promising target for drug development.

Obviously, drugs targeting hosts' immune responses should be tested in the appropriate non-clinical cancer models in which the targets are involved in the immune responses against cancer cells, for elucidating the mechanisms of action and predicting potential side-effects. In general, it is ideal to test the importance of drug targets or potential drug candidates in different experimental models (multiple cell lines, different mouse strains). Considering there should be a limitation for predicting cancer types to which the drug shows clinical benefit by testing only in non-clinical models, the results of phase I clinical studies need to be carefully considered. For testing drug candidates in which certain HLA haplotypes are required

to show antitumor effects (e.g. cancer vaccine therapy), an application of humanized mice may be worth considering as non-clinical models. In Table 6, we summarize pros and cons of non-clinical models for testing drugs targeting hosts' immune responses.

### Evaluation of Oncology Drugs Based on New Concepts

Along with gaining our knowledge with the biological characteristics of cancer, there are several new approaches to develop oncology drugs, such as targeting cancer stem cells.

**Targeting cancer stem cells.** The concept of cancer stem cells was originally introduced in hematological malignancies and further extended to solid cancers such as breast cancer and brain tumors.<sup>(97)</sup> Cancer stem cells have been characterized by their self-renewal potential, multidirectional differentiation potential, and niche dependence, similar to other stem cells, in addition to their highly tumorigenic potential. Furthermore, cancer stem cells have been known for their resistance to conventional chemotherapy or radiotherapy; therefore, they may be an emerging target for drug development. In Table 7, we summarize the current methods for testing drugs targeting cancer stem cells in non-clinical evaluations.

**Targeting other novel concepts or methods.** In Table 8, we summarize the current status of oncology drug development targeting new concepts other than cancer stem cells, or novel methods for developing new oncology drugs. Non-clinical evaluation of some of those oncology drugs targeting novel

**Table 7. Evaluation of drugs targeting cancer stem cells**

Evaluation method	Outline	Characteristics	Problems
Spheroid formation potential	Culture a single non-adherent cell in the presence of specific growth factors (without serum) to test the capability of forming spheroids	Evaluation can be made using cultured cells, and the dose- and time-dependence can be quantitatively measured	General cytotoxicity of drugs mislead as positive without testing on normal tissue stem cells
Cell surface marker	Measuring the frequency of CD44 high/CD24 low fraction, known as cancer stem cells in breast cancer by flow cytometry	Cytotoxic drugs can be tested by comparing effect on cancer stem cell fraction and others	Surface markers for cancer stem cell fractions differ depending on cancer types
ALDH	ALDH activities positively correlate to chemoresistance and stemness in breast cancer, gastrointestinal tract cancer, and hematological tumors	Established methods for measuring activity by flow cytometry	Not all ALDH-positive cells are cancer stem cells
Xenograft models with human cancer stem cells in immune-compromised mouse	Human cancer stem cells transplanted into immune-compromised mice for testing drug efficacy on tumor formation /growth	Evaluating the inhibitory effect of drugs on tumor formation or growth and cancer stem cell frequency within tumor tissue (assessed based on surface markers, ALDH, and spheroid formation potential)	Not applicable for testing drugs targeting immune responses or microenvironments
Syngeneic mouse models with mouse cancer stem cells	Mouse cancer stem cells transplanted into syngeneic mice for testing drug efficacy on tumor formation /growth	Evaluating the inhibitory effect of drugs on tumor formation or growth and cancer stem cell frequency within tumor tissue (assessed based on surface markers, ALDH, and spheroid formation potential) Applicable for testing drugs targeting immune responses or microenvironments	Efficacy may need to be confirmed in models using human cancer stem cells
Genetically engineered animal models	Testing drugs targeting cancer stem cells using genetically engineered mice, rats, or zebrafish to develop tumors	Ideal models closely resembles an autochthonous tumor	Evaluation requires a prolonged time period because of late onset of cancer compared with transplantation models

This table lists commonly used methods to evaluate cancer stem cell functions. ALDH, aldehyde dehydrogenase.

**Table 8. Emerging new concepts in oncology drug development**

Example	Outline	Problems	International comparison (e.g. clinical study information)
Nucleic acid medicine	Chemically synthesized oligonucleotide	Need to consider appropriate DDS for tumor targeting, efficiency for cellular uptake, organ accumulation such as liver	Japan: Phase I Overseas: Phase I–III (sponsored by OncoGenex Pharmaceuticals Inc., etc.)
Oncolytic virus	Modified viruses reacting specifically against tumors	Requirement for support system of clinical studies/international joint research, review system, guideline establishment, and research funds	Japan: Phase I–II Overseas: Approved (China); phase I–III (USA and Europe)
Cell therapy	Regenerative therapy using iPS cells or immune cell therapy	Tumor development risk Accumulation of evidence for therapeutic efficacies	Japan: Phase I–II Overseas: Approved (USA); phase I–III
Nanotechnology-based drugs	Application to DDS; treatment using microscopic particles (embolization therapy)	Safety concerns by using nano-materials Tumor-specific delivery	Japan: Phase I–III Overseas: Approved; phase I–III
Companion diagnostic drugs	Diagnostic drugs to evaluate the efficacy and safety of specific drugs	Not fully available for all pharmaceutical products Appropriate review system Not fully clear for applying medical service payment system	Japan: <i>ALK</i> fusion gene, <i>KRAS</i> gene mutations, etc. Overseas: <i>BRAF</i> gene mutations, and many others
Hyperthermia	Delivery of antineoplastic agents to a tumor by heat	Safety concerns by using nano-materials	Japan: Phase I–II Overseas: Phase I–III
Imaging-based therapy	Specific labeling of cancer cells; effective for evaluation of treatment effects	Not applicable to all cancer types Requirement for efficacy/safety verification	Japan: Under development Overseas: Practical use in assessment of the effect of cell transplantation therapy
Cancer cell line panel†	Assessment of mechanisms of action of candidate molecules using a set of diverse cell types	Limited number of cell lines (potential expansion) Distinct nature from actual human tumor samples	Japan: Panel of human cancer cell lines (JFCR39) Overseas: NCI-60 cell lines (NCI/NIH, USA); ATCC tumor cell panels (USA); Oncolines™ cancer cell line panel contains 66 cancer cell lines (NTRC, Netherlands)

This table exclusively presents oncology drugs that are being or about to be investigated in Japan and overseas based on new concepts.

†Although “Cancer cell line panel” cannot be classified as a therapeutic drug, it is presented here as an assay that is extensively used in the development of new therapeutic drugs. DDS, drug delivery system; iPS, induced pluripotent stem cells.

concepts may require approaches that are different from those used for the evaluation of conventional oncology drugs.

A deeper understanding of the biological characteristics of cancer is leading to the development of novel oncology drugs based on new concepts such as “cancer stem cells” in addition to the developmental targets presented in earlier sections.

### Concluding Remarks

This review summarizes present non-clinical investigations by listing the common methods currently used for the development of oncology drugs as extensively as possible. Their types, profiles, and problems are briefly described. Characteristics of a variety of animal models, which provide indispensable information to formulate clinical research and clinical trials, are summarized according to each category of oncology drug. Experimental models obtain the proof of evidence at the molecular, cellular, and tissue levels, and unique oncology drugs are also covered. It is hoped that this review provides information to undertake regulatory science relevant to the development of oncology drugs.

Studies with cancer models, including animal experiments, *ex vivo* studies, and *in vitro* studies, are essential technology in cancer biology and have contributed to the development and evaluation of oncology drugs. Particularly, cancer cell lines derived from humans and experimental animals have been

used for decades as indispensable tools for the biological understanding of cancer and for the development of oncology drugs. Properties of cancer cells represented by a cell have been changing cell line, it was discovered that the accumulation of multiple abnormalities in genes causes cancer and that the properties of individual cancer cell lines depend not only on their organ origins but also on the types of abnormal genes. Growing knowledge on cancer as a disease has led to the understanding that interactions between cancer and host cells and the regulatory molecules play critical roles. The growth of tumors strongly depends on tissue microenvironments and immunological milieu that are difficult to reproduce *in vitro*. As shown in this review, a substantial number of models reflecting these various aspects of cancer–host interactions have been developed in the past decade. These models have significantly contributed to the expansion of the range of non-clinical studies and their role, in the exploration, development, and clinical investigation of oncology drugs have become indispensable.

The diversity and the degree of engagement in genetic changes in the initiation of cancer cell growth and progression are widely accepted. The roles of host cells, tissue, and the immune system also vary depending on the type, properties, and the stage of individual tumors are also becoming clear than before. Therefore, the methods used to select and use oncology drugs should continuously be revised based on the

advance in understanding of cancer. As stated earlier in this review, models established for the biological understanding of cancer have proven to be useful as tools for non-clinical investigations. When developing a new drug that is in the same class as those for which efficacy and safety information was already acquired from clinical studies, it is also useful to select non-clinical models based on the clinical information. Collectively, it will become increasingly important to design, to select, and to use appropriate non-clinical models in order to design clinical research and trials. Investigations with these models should be effective in interpreting the results of such investigations and to re-evaluate the effects of oncology drugs used in clinical practice. It is strongly hoped that non-clinical investigation will continuously be successfully used for the

development, approval, and proper use of oncology drugs, which accelerate drug development.

## Acknowledgments

This article was prepared as the summary statement of a subcommittee for non-clinical studies of the Science Board of the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. We are grateful to Takao Yamori, Tetsuo Nagano, Eiji Saito, and all other members in the Regulatory Science Division, Scientific Committee of the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency for their assistance and discussion.

## Disclosure Statement

The authors have no conflict of interest.

## References

- Hurley LH. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 188–200.
- DeVita VT Jr, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* 2008; **68**: 8643–53.
- Dobbelstein M, Moll U. Targeting tumour-supportive cellular machineries in anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2014; **13**: 179–96.
- Land H, Parada LF, Weinberg RA. Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* 1983; **222**: 771–8.
- Hollingsworth RE, Lee WH. Tumor suppressor genes: new prospects for cancer research. *J Natl Cancer Inst* 1991; **83**: 91–6.
- Croce CM. Genetic approaches to the study of the molecular basis of human cancer. *Cancer Res* 1991; **51**(18 Suppl): 5015s–8s.
- Barrett JC, Thomassen DG, Hesterberg TW. Role of gene and chromosomal mutations in cell transformation. *Ann N Y Acad Sci* 1983; **407**: 291–300.
- Cowell JK. Double minutes and homogeneously staining regions: gene amplification in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 1982; **16**: 21–59.
- Bloomfield CD, Lindquist LL, Arthur D et al. Chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1981; **41**(11 Pt 2): 4838–43.
- Tsuruo T, Naito M, Tomida A et al. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci* 2003; **94**(1): 15–21.
- Pierce GB, Speers WC. Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation. *Cancer Res* 1988; **48**: 1996–2004.
- Hoffman SJ, Robinson WA. Use of differentiation-inducing agents in the myelodysplastic syndrome and acute non-lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 1988; **28**: 124–7.
- McMillin DW, Negri JM, Mitsiades CS. The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2013; **12**: 217–28.
- Miller JF, Sadelain M. The journey from discoveries in fundamental immunology to cancer immunotherapy. *Cancer Cell* 2015; **27**: 439–49.
- Siolas D, Hannon GJ. Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. *Cancer Res* 2013; **73**: 5315–9.
- Marangoni E, Poupon MF. Patient-derived tumour xenografts as models for breast cancer drug development. *Curr Opin Oncol* 2014; **26**: 556–61.
- Hidalgo M, Amant F, Biankin AV et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov* 2014; **4**: 998–1013.
- Marino S, Vooijs M, van Der Gulden H, Jonkers J, Berns A. Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev* 2000; **14**: 994–1004.
- Westerman BA, Blom M, Tanger E et al. GFAP-Cre-mediated transgenic activation of Bmi1 results in pituitary tumors. *PLoS ONE* 2012; **7**: e35943.
- Yang ZJ, Ellis T, Markant SL et al. Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell* 2008; **14**: 135–45.
- Zibat A, Uhmman A, Nitzki F et al. Time-point and dosage of gene inactivation determine the tumor spectrum in conditional Ptch knockouts. *Carcinogenesis* 2009; **30**: 918–26.
- Tonks ID, Hacker E, Irwin N et al. Melanocytes in conditional Rb<sup>-/-</sup> mice are normal *in vivo* but exhibit proliferation and pigmentation defects *in vitro*. *Pigment Cell Res* 2005; **18**: 252–64.
- Hu N, Gutschmann A, Herbert DC, Bradley A, Lee WH, Lee EY. Heterozygous Rb-1 delta 20<sup>+/+</sup>mice are predisposed to tumors of the pituitary gland with a nearly complete penetrance. *Oncogene* 1994; **9**: 1021–7.
- Vooijs M, van der Valk M, te Riele H, Berns A. Flp-mediated tissue-specific inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor gene in the mouse. *Oncogene* 1998; **17**(1): 1–12.
- Shaw AT, Meissner A, Dowdle JA et al. Sprouty-2 regulates oncogenic K-ras in lung development and tumorigenesis. *Genes Dev* 2007; **21**: 694–707.
- Andreadi C, Cheung LK, Giblett S et al. The intermediate-activity (L597V) BRAF mutant acts as an epistatic modifier of oncogenic RAS by enhancing signaling through the RAF/MEK/ERK pathway. *Genes Dev* 2012; **26**: 1945–58.
- Dankort D, Filenova E, Collado M, Serrano M, Jones K, McMahon M. A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev* 2007; **21**: 379–84.
- Song H, Yao E, Lin C, Gacayan R, Chen MH, Chuang PT. Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 17531–6.
- Soda M, Takada S, Takeuchi K et al. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 19893–7.
- Chen Z, Sasaki T, Tan X et al. Inhibition of ALK, PI3K/MEK, and HSP90 in murine lung adenocarcinoma induced by EML4-ALK fusion oncogene. *Cancer Res* 2010; **70**: 9827–36.
- Saito M, Ishigame T, Tsuta K, Kumamoto K, Imai T, Kohno T. A mouse model of KIF5B-RET fusion-dependent lung tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2014; **35**: 2452–6.
- Arai Y, Totoki Y, Takahashi H et al. Mouse model for ROS1-rearranged lung cancer. *PLoS ONE* 2013; **8**: e56010.
- Yuan W, Stawiski E, Janakiraman V et al. Conditional activation of Pik3ca (H1047R) in a knock-in mouse model promotes mammary tumorigenesis and emergence of mutations. *Oncogene* 2013; **32**: 318–26.
- Adams JR, Xu K, Liu JC et al. Cooperation between Pik3ca and p53 mutations in mouse mammary tumor formation. *Cancer Res* 2011; **71**: 2706–17.
- Trimboli AJ, Cantemir-Stone CZ, Li F et al. Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. *Nature* 2009; **461**: 1084–91.
- Finkle D, Quan ZR, Asghari V et al. HER2-targeted therapy reduces incidence and progression of midlife mammary tumors in female murine mammary tumor virus huHER2-transgenic mice. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 2499–511.
- Rao GN, Ney E, Herbert RA. Effect of melatonin and linolenic acid on mammary cancer in transgenic mice with c-neu breast cancer oncogene. *Breast Cancer Res Treat* 2000; **64**: 287–96.
- Dourdin N, Schade B, Lesurf R et al. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 deficiency accelerates tumor induction in a mouse model of ErbB-2 mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 2008; **68**: 2122–31.
- Cheng L, Zhou Z, Flesken-Nikitin A et al. Rb inactivation accelerates neoplastic growth and substitutes for recurrent amplification of cIAP1, cIAP2 and Yap1 in sporadic mammary carcinoma associated with p53 deficiency. *Oncogene* 2010; **29**: 5700–11.
- McCarthy A, Savage K, Gabriel A, Naceur C, Reis-Filho JS, Ashworth A. A mouse model of basal-like breast carcinoma with metaplastic elements. *J Pathol* 2007; **211**: 389–98.
- McPherson JP, Lemmers B, Hirao A et al. Collaboration of Brcal and Chk2 in tumorigenesis. *Genes Dev* 2004; **18**: 1144–53.
- Jonkers J, Meuwissen R, van der Gulden H, Peterse H, van der Valk M, Berns A. Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet* 2001; **29**: 418–25.
- Hung KE, Maricevich MA, Richard LG et al. Development of a mouse model for sporadic and metastatic colon tumors and its use in assessing drug treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 1565–70.



- 44 Haigis KM, Kendall KR, Wang Y *et al.* Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet* 2008; **40**: 600–8.
- 45 Marsh V, Winton DJ, Williams GT *et al.* Epithelial Pten is dispensable for intestinal homeostasis but suppresses adenoma development and progression after Apc mutation. *Nat Genet* 2008; **40**: 1436–44.
- 46 Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, Matsui M, Seldin MF, Taketo MM. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell* 1998; **92**: 645–56.
- 47 Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 1990; **247**: 322–4.
- 48 Pollard P, Deheragoda M, Segditsas S *et al.* The Apc 1322T mouse develops severe polyposis associated with submaximal nuclear beta-catenin expression. *Gastroenterology* 2009; **136**: 2204–13 e1-13.
- 49 Oshima M, Oshima H, Kitagawa K, Kobayashi M, Itakura C, Taketo M. Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4482–6.
- 50 Shibata H, Toyama K, Shioya H *et al.* Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science* 1997; **278**: 120–3.
- 51 Colnot S, Decaens T, Niwa-Kawakita M *et al.* Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 17216–21.
- 52 de Wind N, Dekker M, Claij N *et al.* HNPCC-like cancer predisposition in mice through simultaneous loss of Msh3 and Msh6 mismatch-repair protein functions. *Nat Genet* 1999; **23**: 359–62.
- 53 Edelmann W, Yang K, Umar A *et al.* Mutation in the mismatch repair gene Msh6 causes cancer susceptibility. *Cell* 1997; **91**: 467–77.
- 54 Edelmann W, Umar A, Yang K *et al.* The DNA mismatch repair genes Msh3 and Msh6 cooperate in intestinal tumor suppression. *Cancer Res* 2000; **60**: 803–7.
- 55 Freeman D, Lesche R, Kertesz N *et al.* Genetic background controls tumor development in PTEN-deficient mice. *Cancer Res* 2006; **66**: 6492–6.
- 56 Marino S, Krimpenfort P, Leung C *et al.* PTEN is essential for cell migration but not for fate determination and tumorigenesis in the cerebellum. *Development* 2002; **129**: 3513–22.
- 57 Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC *et al.* Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 5947–52.
- 58 Ijichi H, Chytil A, Gorska AE *et al.* Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes Dev* 2006; **20**: 3147–60.
- 59 Hill R, Calvopina JH, Kim C *et al.* PTEN loss accelerates KrasG12D-induced pancreatic cancer development. *Cancer Res* 2010; **70**: 7114–24.
- 60 Kim TH, Franco HL, Jung SY *et al.* The synergistic effect of Mig-6 and Pten ablation on endometrial cancer development and progression. *Oncogene* 2010; **29**: 3770–80.
- 61 Daikoku T, Hirota Y, Tranguch S *et al.* Conditional loss of uterine Pten unfaithfully and rapidly induces endometrial cancer in mice. *Cancer Res* 2008; **68**: 5619–27.
- 62 Chen L, Park SM, Tumanov AV *et al.* CD95 promotes tumour growth. *Nature* 2010; **465**: 492–6.
- 63 van der Horst PH, van der Zee M, Heijmans-Antonissen C *et al.* A mouse model for endometrioid ovarian cancer arising from the distal oviduct. *Int J Cancer* 2014; **135**: 1028–37.
- 64 Szabova L, Yin C, Bupp S *et al.* Perturbation of Rb, p53, and Brca1 or Brca2 cooperate in inducing metastatic serous epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2012; **72**: 4141–53.
- 65 Francis JC, McCarthy A, Thomsen MK, Ashworth A, Swain A. Brca2 and Trp53 deficiency cooperate in the progression of mouse prostate tumorigenesis. *PLoS Genet* 2010; **6**: e1000995.
- 66 Dhomen N, Da Rocha Dias S, Hayward R *et al.* Inducible expression of (V600E) Braf using tyrosinase-driven Cre recombinase results in embryonic lethality. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; **23**(1): 112–20.
- 67 Hooijkaas A, Gadiot J, Morrow M, Stewart R, Schumacher T, Blank CU. Selective BRAF inhibition decreases tumor-resident lymphocyte frequencies in a mouse model of human melanoma. *Oncoimmunology* 2012; **1**: 609–17.
- 68 Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, Reis CA, Gartner F. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Transl Res* 2012; **159**: 165–72.
- 69 Paoloni M, Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**: 147–56.
- 70 le Coutre P, Mologni L, Cleris L *et al.* *In vivo* eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**: 163–8.
- 71 Warmuth M, Kim S, Gu XJ, Xia G, Adrian F. Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery. *Curr Opin Oncol* 2007; **19**(1): 55–60.
- 72 Knight ZA, Lin H, Shokat KM. Targeting the cancer kinome through polypharmacology. *Nat Rev Cancer* 2010; **10**: 130–7.
- 73 Malinda KM. *In vivo* matrigel migration and angiogenesis assay. *Methods Mol Biol* 2009; **467**: 287–94.
- 74 Hamberg P, Verweij J, Sleijfer S. (Pre-)clinical pharmacology and activity of pazopanib, a novel multikinase angiogenesis inhibitor. *Oncologist* 2010; **15**: 539–47.
- 75 Yang H, Higgins B, Kolinsky K *et al.* Antitumor activity of BRAF inhibitor vemurafenib in preclinical models of BRAF-mutant colorectal cancer. *Cancer Res* 2012; **72**: 779–89.
- 76 Gilmartin AG, Bleam MR, Groy A *et al.* GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained *in vivo* pathway inhibition. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 989–1000.
- 77 Bollag G, Tsai J, Zhang J *et al.* Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2012; **11**: 873–86.
- 78 Chresta CM, Davies BR, Hickson I *et al.* AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with *in vitro* and *in vivo* antitumor activity. *Cancer Res* 2010; **70**(1): 288–98.
- 79 Yang Q, Modi P, Newcomb T, Queva C, Gandhi V. Idelalisib: first-in-Class PI3K delta inhibitor for the treatment of chronic lymphocytic leukemia, small lymphocytic leukemia, and follicular lymphoma. *Clin Cancer Res* 2015; **21**: 1537–42.
- 80 Fry DW, Harvey PJ, Keller PR *et al.* Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 2004; **3**: 1427–38.
- 81 LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T *et al.* Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth *in vivo* and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 2002; **62**: 4996–5000.
- 82 Kimura S, Kuramoto K, Homan J *et al.* Antiproliferative and antitumor effects of azacitidine against the human myelodysplastic syndrome cell line SKM-1. *Anticancer Res* 2012; **32**: 795–8.
- 83 Rhyasen GW, Bolanos L, Fang J *et al.* Targeting IRAK1 as a therapeutic approach for myelodysplastic syndrome. *Cancer Cell* 2013; **24**(1): 90–104.
- 84 Butler LM, Agus DB, Scher HI *et al.* Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2000; **60**: 5165–70.
- 85 Bryant HE, Schultz N, Thomas HD *et al.* Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005; **434**: 913–7.
- 86 Farmer H, McCabe N, Lord CJ *et al.* Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005; **434**: 917–21.
- 87 Choy E, Butrynski JE, Harmon DC *et al.* Phase II study of olaparib in patients with refractory Ewing sarcoma following failure of standard chemotherapy. *BMC Cancer* 2014; **14**: 813.
- 88 Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N *et al.* An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science* 2013; **340**: 626–30.
- 89 Garnett MJ, Edelman EJ, Heidorn SJ *et al.* Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature* 2012; **483**: 570–5.
- 90 Carbone FR, Moore MW, Sheil JM, Bevan MJ. Induction of cytotoxic T lymphocytes by primary *in vitro* stimulation with peptides. *J Exp Med* 1988; **167**: 1767–79.
- 91 Brown DM, Fisher TL, Wei C, Frelinger JG, Lord EM. Tumours can act as adjuvants for humoral immunity. *Immunology* 2001; **102**: 486–97.
- 92 Fearon ER, Itaya T, Hunt B, Vogelstein B, Frost P. Induction in a murine tumor of immunogenic tumor variants by transfection with a foreign gene. *Cancer Res* 1988; **48**: 2975–80.
- 93 Robbins PF, Kantor JA, Salgaller M, Hand PH, Fernsten PD, Schlom J. Transduction and expression of the human carcinoembryonic antigen gene in a murine colon carcinoma cell line. *Cancer Res* 1991; **51**: 3657–62.
- 94 Schreurs MW, de Boer AJ, Schmidt A, Figdor CG, Adema GJ. Cloning, expression and tissue distribution of the murine homologue of the melanocyte lineage-specific antigen gp100. *Melanoma Res* 1997; **7**: 463–70.
- 95 Maeda A, Maeda T, Ohguro H, Palczewski K, Sato N. Vaccination with recoverin, a cancer-associated retinopathy antigen, induces autoimmune retinal dysfunction and tumor cell regression in mice. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 2300–7.
- 96 Huang AY, Gulden PH, Woods AS *et al.* The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 9730–5.
- 97 Sugihara E, Saya H. Complexity of cancer stem cells. *Int J Cancer* 2013; **132**: 1249–59.