トルリシティ皮下注 0.75 mg アテオス

2.4　非臨床試験の概括評価

日本イーライリリー株式会社

目次

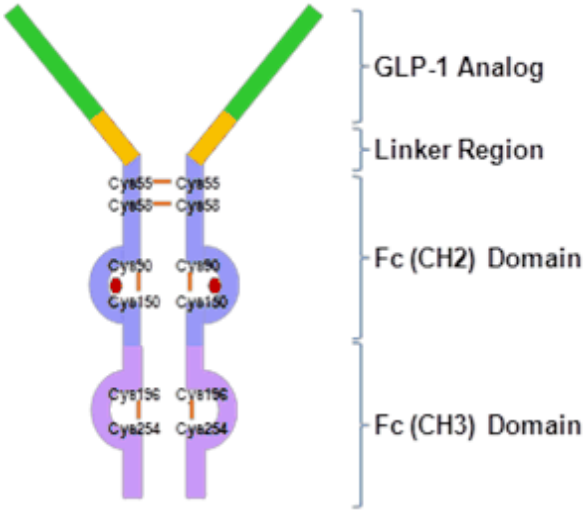
2.4　非臨床試験の概括評価 2
2.4.1　非臨床試験計画概略 2
2.4.2　薬理試験 3
2.4.2.1　In Vitro における GLP-1 受容体に対する結合及び受容体活性化作用 4
2.4.2.2　In Vitro 膵島細胞におけるグルコース濃度依存的なインスリン分泌に対する作用 4
2.4.2.3　In Vitro における抗体依存性細胞傷害に対する作用 4
2.4.2.4　ラット及びサルを用いた静脈内グルコース負荷試験におけるデュラグルチドのインスリン分泌亢進作用 5
2.4.2.5　ラット及びサルを用いたグルコースの段階的注入試験におけるデュラグルチドのインスリン分泌亢進作用 5
2.4.2.6　安全性薬理試験 5
2.4.3　薬物動態試験 6
2.4.4　毒性試験 7
2.4.4.1　反復投与毒性試験 7
2.4.4.2　がん原性試験 8
2.4.4.3　生殖発生毒性試験 9
2.4.4.4　甲状腺 C 細胞に対する影響 10
2.4.4.4.1　ラット及び rasH2 トランスジェニックマウスを用いたがん原性試験 11
2.4.4.4.2　甲状腺 C 細胞に対する影響に関する補足的毒性試験 12
2.4.4.4.2.1　ラットを用いた 1 年間反復投与毒性試験 13
2.4.4.4.2.2　サルを用いた 1 年間反復投与毒性試験 13
2.4.4.4.3　甲状腺 C 細胞に対する影響に関する要約 14
2.4.4.5　膵臓に対する影響 14
2.4.4.5.1　反復投与毒性試験及びがん原性試験 15
2.4.4.5.2　膵外分泌腺に対する影響に関する補足的毒性試験 16
2.4.4.5.2.1　Zucker 糖尿病肥満ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験 16
2.4.4.5.2.2　サルを用いた 1 年間反復投与毒性試験 16
2.4.4.5.3　膵臓に対する影響に関する要約 17
2.4.5　総括及び結論 18
2.4.6　図表 21
2.4.7　参考文献 22

略語一覧

ADCC	抗体依存性細胞傷害
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積
cAMP	環状アデノシン一リン酸
C_{ave}	平均血漿中濃度
CDC	補体依存性細胞傷害
Cys	システイン
dP/dt_{max}	左心室内圧最大立ち上がり速度
DPP-4	ジペプチジルペプチダーゼ-4
EC_{50}	50%効果濃度
ELISA	酵素結合免疫吸着測定
FDA	米国食品医薬品局
GIP	胃抑制ペプチド
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GLP-1	グルカゴン様ペプチド-1
HEK	ヒト胎児腎臓由来
hERG	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
HIP	Human islet amyloid polypeptide
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
Ig	免疫グロブリン
IVGTT	静脈内グルコース負荷
K_i	阻害定数
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
NFAT	活性化 T 細胞核内因子
NOAEL	無毒性量
NOEL	無影響量
PanIN	膵上皮内腫瘍
QTc	補正 QT
SGI	グルコースの段階的注入
SPA	シンチレーション近接アッセイ
SPR	表面プラズモン共鳴
TK	トキシコキネティクス
T_{max}	最高血漿中濃度到達時間
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick-end labeling
ZDF	Zucker 糖尿病肥満

2.4　非臨床試験の概括評価

LY2189265（以下、デュラグルチド）は、長時間作用型ヒトグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）受容体作動薬である。デュラグルチドはアミノ酸置換を行ったヒト GLP-1 アナログと改変ヒト免疫グロブリン(Ig)G4-Fc 領域とが小型ペプチドリンカーで共有結合し、そのサブユニット 2 分子がジスルフィド結合した融合タンパク質である（図 2.4-1）。ジペプチジルペプチダーゼ-4（DPP-4）による不活性化を回避し、かつ免疫原性を軽減することを目的として GLP-1 アナログ領域のアミノ酸配列が改変されており、デュラグルチドの GLP-1 アナログ領域と天然型ヒト GLP-1 (7-37) との相同性は約 90%である。また、GLP-1 アナログ領域に IgG4-Fc 領域を結合することでクリアランスを低下させており、さらに、抗体産生及び免疫学的細胞傷害の原因となる高親和性 Fc 受容体との相互作用を抑制するためにデュラグルチドの IgG4-Fc 領域に改変が加えられている（Glaesner et al. 2010）。



改変型ヒト GLP-1 アナログ領域（GLP-1 Analog）、ペプチドリンカー（Linker Region）及び改変型ヒト IgG4 の Fc 領域［Fc (CH2) Domain 及び Fc (CH3) Domain］を示す。赤線はシステイン（Cys）残基を介したサブユニット内及びサブユニット間でのジスルフィド結合を示す。赤い記号は N-グリコシル化部位（アスパラギン残基 126）を示す。

図 2.4-1　デュラグルチドの構造

2.4.1　非臨床試験計画概略

デュラグルチドの非臨床試験は日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインに従って実施し、長期間臨床適応されるバイオテクノロジー応用医薬品に求められる事項を満たしている。主要な毒性試験、トキシコキネティクス（TK）試験及び安全性薬理試験は、試験実施時に有効であった医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準(GLP)を遵守して実施した。薬効薬理試験は、適切な科学的基準及び社内の科学的ガイドラインに則って実施した。

薬効薬理試験では、デュラグルチドの GLP-1 受容体に対する特異性、in vitro 及び in vivo におけるインスリン分泌作用並びに in vivo における作用持続性を検討した。また、サル

を用いた単回投与心血管系安全性薬理試験及び安全性薬理評価（心血管系、呼吸器系及び中枢神経系）を組み込んだ反復投与毒性試験を評価した。

デュラグルチドの薬物動態は、反復皮下投与したときの TK 試験成績に基づいて評価した。血漿中デュラグルチド濃度は酵素結合免疫吸着測定（ELISA）法で測定した。

デュラグルチドの毒性は、マウス、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験（マウスは 1 ヵ月間、ラットは最長 6 ヵ月間、サルは最長 9 ヵ月間）、ラット及び rasH2 トランスジェニックマウスを用いたがん原性試験、ラット及びウサギを用いた一連の生殖発生毒性試験並びに新生児ラットを用いた毒性試験において評価した。また、GLP-1 受容体作動薬の安全性リスクとして懸念されている甲状腺 C 細胞腫瘍及び膵炎/膵癌の発現に対するデュラグルチドの影響を評価するため、上述の毒性試験に加えて正常動物（ラット及びサル）並びに糖尿病モデルラットを用いた補足的毒性試験を実施した。デュラグルチドのエフェクター機能に対する作用は in vitro 薬理試験で評価したほか、反復投与毒性試験の一部として補体活性化を評価した。

2.4.2　薬理試験

GLP-1 は、プレプログルカゴンからプロセッシングを受けることで産生されるグルカゴン関連ペプチドである。GLP-1 は Gs タンパク質共役型 7 回膜貫通型受容体である GLP-1 受容体に結合し、環状アデノシン一リン酸（cAMP）経路を介してその作用を発揮する（Holst 2007）。GLP-1 の配列は哺乳類で同一である（Holst 2007）。また、GLP-1 受容体は動物種間で相同性が高く、ラットとヒトの相同性は 91%、サルとヒトでは 98%である（Knudsen et al. 2012）。GLP-1 が作用する主な標的組織は、膵β細胞、胃腸管系及び求心性末梢感覚神経である。GLP-1 は、β細胞からのグルコース依存性インスリン分泌を亢進させるとともに、α細胞からの食後グルカゴン分泌を抑制することでグルコース恒常性に寄与している（Holst 2007）。また、GLP-1 は食欲を抑制して摂食量を低下させること、胃内容排出を抑制することが明らかにされており（Holst 2007）、体重増加を来しにくいことが期待される。GLP-1 は DPP-4 によって速やかに不活性化され、体内から消失するため、生体内での作用が持続する長時間作用型 GLP-1 受容体作動薬としてデュラグルチドを開発した（Glaesner et al. 2010）。

主要な薬効薬理試験成績を以下に示す。

- デュラグルチドは、ラット、カニクイザル及びヒトの GLP-1 受容体に選択的に結合し、活性化させた。
- ラット及びサル膵島細胞を用いた in vitro 試験において、デュラグルチドは高濃度グルコース存在下で濃度依存的にインスリン分泌を亢進させた。
- ラットに一過性の高血糖を惹起したモデル（静脈内グルコース負荷、以下 IVGTT）にデュラグルチドを単回皮下投与したとき、デュラグルチドの用量に依存してインスリン分泌が亢進した。
- ラット及びカニクイザルに一過性の高血糖を惹起したモデル（グルコースの段階的注入、以下 SGI）にデュラグルチドを単回又は週 1 回反復皮下投与したとき、インスリン分泌が亢進した。

- デュラグルチドは、in vitro 試験において抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性を示さなかった。

2.4.2.1 In Vitro における GLP-1 受容体に対する結合及び受容体活性化作用

シンチレーション近接アッセイ（SPA）法を用いた競合的リガンド／受容体結合試験において、ヒト GLP-1 受容体に対するデュラグルチドの結合の阻害定数（K_i）は 4.20 ± 0.45 nM であった（bTDR225 試験）。一方、ヒト胃抑制ペプチド（GIP）受容体及びヒトグルカゴン受容体に対するデュラグルチドの K_i 値はそれぞれ>697 nM 及び >1360 nM であり、デュラグルチドのヒト GLP-1 受容体に対する特異性が示された。

ヒト GLP-1 受容体発現細胞株を用いたレポーター遺伝子アッセイにおいて、GLP-1 受容体の活性化により産生される cAMP を測定した（bTDR01 試験）。その結果、デュラグルチドはヒト GLP-1 受容体に対してアゴニストとして作用し、その 50%効果濃度（EC_{50}）は 12.6 ± 2.5 pM であった。

2.4.2.2 In Vitro 膵島細胞におけるグルコース濃度依存的なインスリン分泌に対する作用

膵β細胞では、GLP-1 による GLP-1 受容体の活性化によりグルコース濃度依存的にインスリン分泌が亢進する。ラット膵島細胞腺腫細胞株並びに Sprague Dawley ラット及びカニクイザル由来の膵島細胞を用いてデュラグルチドのインスリン分泌亢進作用を評価した（DBT56 試験）。その結果、高濃度グルコース（16.8 mM）存在下でのみデュラグルチドの濃度に依存したインスリン分泌の亢進が認められ、低濃度グルコース（2.8 mM）存在下ではインスリン分泌の亢進は認められなかった。したがって、デュラグルチドのインスリン分泌作用はグルコース濃度に依存的であることが示された。

2.4.2.3 In Vitro における抗体依存性細胞傷害に対する作用

エフェクター機能の発現リスクを最小化するため、デュラグルチドの Fc 領域には、ADCC 及び補体依存性細胞傷害（CDC）発現の可能性の低い IgG4 アイソタイプが選択されている（Brüggemann et al. 1987; Burton and Woof 1992）。また、Fcγ 受容体に対する結合親和性を低下させるため、Fcγ 受容体との結合部位に改変が加えられている。ヒト GLP-1 受容体を安定的に発現したヒト胎児腎臓由来（HEK）293 細胞株を標的細胞とし、ヒト末梢血単核球細胞をエフェクター細胞としてデュラグルチドの ADCC 活性を評価した（bTDR04 試験）。その結果、デュラグルチドによる ADCC 活性は認められなかった。また、活性化 T 細胞核内因子（NFAT）レポーター細胞株及び GLP-1 受容体遺伝子を安定発現させた HEK293 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにおいても、デュラグルチドは ADCC 活性を示さなかった。これらの in vitro 試験成績と一致して、サル 1 ヵ月間毒性試験（P00054 試験）においてデュラグルチドは補体分解産物 C3a 及び Bb の血漿中濃度に影響を及ぼさなかった。

2.4.2.4 ラット及びサルを用いた静脈内グルコース負荷試験におけるデュラグルチドのインスリン分泌亢進作用

Sprague Dawley ラット及びカニクイザルを用いた IVGTT 試験において、デュラグルチドのインスリン分泌亢進作用を評価した。ラット（bTDR02 試験）では、デュラグルチド 30 nmol/kg（1.79 mg/kg）の皮下投与 72 時間後においてもグルコース濃度依存的なインスリン分泌の亢進が認められた。一方、サル（OAAX03 試験）ではデュラグルチド（0.1 mg/kg）の皮下投与による明らかなインスリン分泌の亢進は認められなかったが、これは一般状態の異常を伴わない散発的な低血糖が認められたためと考えられた。

2.4.2.5 ラット及びサルを用いたグルコースの段階的注入試験におけるデュラグルチドのインスリン分泌亢進作用

グルコース注入濃度を段階的に増加させる SGI 試験において、デュラグルチドのインスリン分泌亢進作用を評価した。Sprague Dawley ラットの単回皮下投与試験（bTDR03 試験）並びにカニクイザルの単回皮下投与試験（6180-702 試験）及び反復皮下投与試験（6180-773 試験）において、デュラグルチド投与によるグルコース濃度依存的なインスリン分泌の亢進が認められた。カニクイザルの反復皮下投与試験では、デュラグルチドを 0.1 mg/kg の用量で週 1 回、試験 3、10、17 及び 24 日に皮下投与した。その結果、試験 28 日（最終投与の 4 日後）においても、デュラグルチド投与によるグルコース濃度依存的なインスリン分泌の亢進が認められ、作用の持続性が示された。

2.4.2.6 安全性薬理試験

サルを用いた単回投与心血管系安全性薬理試験並びに安全性薬理評価（心血管系、呼吸器系及び中枢神経系）を組み込んだ反復投与毒性試験を実施した。非 GLP 遵守下で実施した in vitro hERG（ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子）試験では、溶媒に含まれるクエン酸緩衝液（pH 6.5）によって hERG チャネル電流が阻害され、デュラグルチドの影響を正確に評価することができなかった。

サルを用いた単回投与心血管系安全性薬理試験及び反復投与毒性試験において、デュラグルチド投与による散発的な心拍数の上昇及び補正 QT（QTc）間隔の延長が認められた。心拍数の上昇は GLP-1 受容体を介した薬理作用に関連した変化と考えられた（Barragán et al. 1994）。サルを用いた単回投与心血管系安全性薬理試験（[redacted]010.08 試験）では、1 及び 10 mg/kg 群で心拍数及び左心室内圧最大立ち上がり速度（dP/dt_{max}）の持続的な上昇が認められ、また 10 mg/kg 群の投与 24 時間後にのみ QTc 間隔の延長が認められた。サルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験（P00054 試験）では、1、3 及び 10 mg/kg 群で QTc 間隔の延長が認められたが、心拍数の上昇は認められなかった。サルを用いた 3 ヵ月間（7608-192 試験）及び 9 ヵ月間反復投与毒性試験（7608-235 試験）では、1 ヵ月間反復投与毒性試験と類似した用量において毒性学的に重要な心拍数及び QTc 間隔の変化は認められなかった。QT/QTc 評価試験（第 2.7.4.5.9.7 項）及び国内外の第 II 相/第 III 相臨床試験（第 2.7.4.4.2 項）では、臨床的に問題となる QT/QTc 間隔の延長は認められていない。これらの試験成績を踏まえると、サルにデュラグルチドを投与したときに認められた散発

的な QTc 間隔の延長はヒトにおけるリスクを示唆するものではないと考えられた。サルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験において、呼吸器系並びに中枢神経系、行動及び体温に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。

2.4.3 薬物動態試験

マウス、ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験において、デュラグルチドを週 2 回反復皮下投与したときの TK を評価した。また、妊娠ラット及びウサギの器官形成期にデュラグルチドを 3 日ごとに反復皮下投与したときの TK を評価した。新生児ラットを用いた毒性試験においても TK を評価した。デュラグルチドの血漿中濃度は ELISA 法で測定した。抗デュラグルチド抗体の測定はサルを用いた反復投与毒性試験でのみ実施し、表面プラズモン共鳴（SPR）法又はブリッジング ELISA 法を用いた。デュラグルチドは天然型アミノ酸で構成されるタンパク質で、一般的なタンパク質の異化経路により低分子のペプチドになり、最終的にアミノ酸まで分解されると考えられる。したがって、分布、代謝、排泄及び薬物動態学的薬物相互作用に関する試験は実施しなかった。試験成績の要約を以下に示す。

- マウス、ラット、ウサギ及びサルにデュラグルチドを反復皮下投与したとき、全身曝露量は用量依存的に増加した。曝露量に明らかな性差は認められなかった。反復皮下投与時の最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）はラットで 12～48 時間、サルで 6 ～25 時間であった。消失半減期はサルで約 7 日であった。ラット及びサルでは、投与期間の延長に伴って曝露量が増加し、週 2 回の反復投与による蓄積が認められた。
- サルを用いた反復投与毒性試験において、明らかな免疫原性は認められなかった。3 ヵ月間（7608-192 試験）及び 9 ヵ月間反復投与毒性試験（7608-235 試験）では、抗デュラグルチド抗体は検出されなかった。1 ヵ月間反復投与毒性試験（P00054 試験）では GLP-1 アナログに対する抗体反応が一部の試料で認められたが、血漿中デュラグルチド濃度が抗デュラグルチド抗体検出系における干渉濃度より高く、免疫原性の評価が実施できなかった。
- ラットを用いた反復投与毒性試験では試験期間を通して曝露が持続したこと並びに薬理作用に関連した変化が認められたことから、明らかな免疫原性はないと判断した。マウスを用いた短期がん原性試験（8224144 試験）、ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（[redacted]-353119 試験）及びラットを用いた 1 年間反復投与毒性試験（8236888 試験）においては、抗デュラグルチド抗体の産生に起因すると考えられる反復投与による曝露量の減少が認められた。しかしながら、これらの試験では薬理作用に関連した摂餌量減少及び体重低下が試験期間を通して認められたことから、毒性評価に十分な曝露量が得られたと考えられた。ラットを用いた長期がん原性試験（8203405 試験）においては、反復投与による曝露量の減少は認められなかった。

2.4.4　毒性試験

デュラグルチドの毒性は、マウス、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験（マウスは 1 ヵ月間、ラットは最長 6 ヵ月間、サルは最長 9 ヵ月間）、ラット及び rasH2 トランスジェニックマウスを用いたがん原性試験、ラット及びウサギを用いた一連の生殖発生毒性試験において評価した。また、GLP-1 受容体作動薬の安全性リスクとして懸念されている甲状腺 C 細胞腫瘍及び膵炎/膵癌の発現に対するデュラグルチドの影響を評価するため、上述の毒性試験に加えて正常動物（ラット及びサル）並びに糖尿病モデルラットを用いた補足的毒性試験を実施した。さらに、GLP-1 受容体作動薬の投与が性成熟や中枢神経系の発達に影響を及ぼす可能性を海外規制当局から指摘されたことを踏まえ、新生児ラットを用いた毒性試験を実施し、ラットの性成熟／生殖機能と中枢神経系の発達に対するデュラグルチドの影響を評価した。

GLP-1 受容体のアミノ酸配列は動物種間で相同性が高く、ヒトと同様にげっ歯類及びサルにおいてデュラグルチドの薬理作用が確認されている。開発早期に実施したラットを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験では Fischer 344 ラットを用いたが、その後イーライリリー・アンド・カンパニーの標準的な毒性試験で用いられる系統が変更され、以降の毒性試験では Sprague Dawley ラットを用いた。デュラグルチドの毒性プロファイルは両系統のラットで類似しており、系統の変更は毒性評価に影響しないと判断した。非げっ歯類には、高用量を投与可能であること、顕著な免疫原性を示さないこと並びに他の GLP-1 受容体作動薬の毒性評価に多く用いられていることから、カニクイザルを選択した。胚・胎児発生に関する試験の第二の動物種には、薬理作用が確認されているニュージーランドホワイトウサギを選択した。

デュラグルチドの臨床での用法・用量は 0.75 mg を週 1 回皮下投与であるが、毒性を感度よく検出するため、毒性試験では曝露が持続し、かつ長期間の反復投与が可能な週 2 回皮下投与を選択した。

デュラグルチドは天然型アミノ酸で構成されるタンパク質であり、核酸や染色体と直接に相互作用する可能性は低いため、遺伝毒性試験は実施していない。

眼及び皮膚並びに中枢神経系への分布は限られていることから、光安全性試験並びに薬物依存性試験は実施していない。

ラット及びサル反復投与毒性試験において免疫系器官に対する影響は認められなかったことから、独立した免疫毒性試験は実施していない。

デュラグルチドは抗原と結合する Fab 領域を有さないため、組織交差反応性試験は実施していない。

2.4.4.1　反復投与毒性試験

ラットに 20 mg/kg までの用量でデュラグルチドを週 2 回、反復皮下投与した 1 ヵ月間（R00359 試験）、3 ヵ月間（7608-191 試験）及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験（7608-236 試験）において、デュラグルチド投与による用量依存的な摂餌量減少及びそれに伴う体重低下が認められた。摂餌量減少は試験 1 週に顕著であり、ラットを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験では高用量群（16.29 mg/kg）の試験 1～3 日の摂餌量は溶媒対照群と比較して

およそ 70%減少した。摂餌量減少は試験期間を通して認められたが、投与の継続により回復傾向を示した。同群の投与期間終了時の体重は、溶媒対照群と比較しておよそ 19%低下した。摂餌量及び体重の変化は GLP-1 受容体を介した薬理作用に関連した変化と考えられ（Drucker 1998; Meier and Nauck 2005; Drucker 2006; Rossi and Nicolucci 2009）、また動物の健康状態に悪影響を及ぼすものではなかった。標的器官毒性は認められなかった。1 ヵ月間反復投与毒性試験では摂餌量減少及び体重低下に関連した軽度の病理組織学的変化が認められたが、より長期の試験では認められなかったことから毒性学的な重要性は低いと考えられた。

サルに 10 mg/kg までの用量でデュラグルチドを週 2 回、反復皮下投与した 1 ヵ月間（P00054 試験）、3 ヵ月間（7608-192 試験）及び 9 ヵ月間反復投与毒性試験（7608-235 試験）における主要な変化は、ラットと同様に用量依存的な摂餌量減少及びそれに伴う体重低下であった。高用量群（8.15 mg/kg 以上）の一部の個体で、試験初期に嘔吐又は輸液の投与を必要とする脱水症状が認められた。これらの所見は一過性で試験の継続により回復したが、サルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験において 8.15 mg/kg 群の雌 1 例は状態が悪化したため試験 17 日に安楽殺した。したがって、サルにおいて 8.15 mg/kg は最大耐用量に近いと考えられた。嘔吐及び脱水症状は GLP-1 受容体を介した胃内容排出抑制作用に関連すると考えられた（Meier and Nauck 2005）。

サルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験において、補体分解産物 C3a 及び Bb に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。反復投与毒性試験において免疫系器官の重量及び組織像に対する影響は認められなかったため、独立した免疫毒性試験は実施していない。サルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験において免疫毒性を評価した結果、抗 Keyhole limpet hemocyanin（KLH）IgM 及び IgG 抗体の産生及びイムノフェノタイピングにおけるデュラグルチド投与の影響は認められなかった。反復投与毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験の一部として局所刺激性を評価した結果、毒性学的に重要な投与部位反応及び炎症は認められなかった。一部の毒性試験ではデュラグルチド投与による投与部位の炎症又は出血が認められたが、溶媒対照群と比較して重症度の上昇はわずかであった。

以上、ラットを用いた最長 6 ヵ月間及びサルを用いた最長 9 ヵ月間の反復投与毒性試験において、デュラグルチド投与による主要な変化は薬理作用に関連した摂餌量減少及びそれに伴う体重低下であった。標的器官毒性は認められず、ラットを用いた 6 ヵ月間及びサルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験における無毒性量（NOAEL）はそれぞれ 16.29 mg/kg 及び 8.15 mg/kg と判断した［AUC に基づくとそれぞれ臨床用量の 264 倍及び 774 倍（表 2.4-3）］。

2.4.4.2 がん原性試験

雌雄ラットにデュラグルチドを 5 mg/kg までの用量で週 2 回、反復皮下投与してがん原性を評価した（8203405 試験）。当試験では溶媒対照群の死亡率が高く、生存数が 20 例/性/群を下回ったため、米国食品医薬品局（FDA）の Executive Carcinogenicity Assessment Committee と協議の上、当初計画した 104 週より早い 93 週で試験を終了したが、がん原

性評価に十分な数の個体が試験 80 週以上まで生存した。当試験ではデュラグルチド投与による生存率の上昇が認められ、これは体重低下に関連する変化と考えられた（Keenan et al. 1997）。試験期間を通して曝露は持続し、また薬理作用に関連した用量依存的な摂餌量減少及び体重低下が認められた。当試験では、デュラグルチド投与による甲状腺 C 細胞の過形成及び腫瘍の発現頻度の上昇が認められた。膵臓を含む他の組織では、腫瘍の発現頻度の上昇は認められなかった。

GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドを投与したマウスで甲状腺 C 細胞腫瘍が報告されたことを受け（Knudsen et al. 2010）、マウスを用いたがん原性試験の実施を FDA から要求された。そこで、雌雄 rasH2 トランスジェニックマウスにデュラグルチドを 3 mg/kg までの用量で週 2 回、26 週間反復皮下投与する短期がん原性試験を実施した（8224144 試験）。当試験では、薬理作用に関連した摂餌量減少及び体重低下は主に雄に認められた。試験終了時の体重及び試験期間を通した体重増加量は、デュラグルチド投与群の雄では溶媒対照群よりも低かったが、雌では溶媒対照群よりも高かった。病理組織学的検査において、がん原性を示唆する所見は認められなかった。デュラグルチドを投与した全用量群で C 細胞の細胞質肥大/カルシトニン染色性の軽微な増加が認められたが、過形成及び腫瘍は認められなかった。また、膵臓の壊死、炎症及び増殖性変化は認められなかった。当試験では、試験 176 日の曝露量は試験 1 日に比べておよそ 1/2 以下であり抗デュラグルチド抗体の産生が示唆されたが、薬理作用に関連した摂餌量及び体重の変化並びに C 細胞の病理組織学的変化が認められたことから、試験期間を通して毒性評価に十分な曝露量が得られたと考えられた。

ラット及びrasH2トランスジェニックマウスを用いたがん原性試験で認められたC細胞の所見は、他の試験成績も含めて第 2.4.4.4 項で包括的に考察した。

2.4.4.3 生殖発生毒性試験

雄又は雌ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（[redacted]-353113 試験及び[redacted]-353112 試験）において、薬理作用に関連した摂餌量減少及び体重低下が認められた。16.3 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量のおよそ 264 倍（表 2.4-3）］で精子形態、交尾率、受精率、受胎率及び胚生存率に対する影響は認められなかった。雌ラットでは 4.89 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量のおよそ 60.7 倍（表 2.4-3）］以上の用量において、発情周期の軽微な延長、黄体数の軽度の減少並びにこれに関連した着床数及び生存胎児数の減少が認められた（[redacted]-353112 試験）。これらの所見は摂餌量及び体重の変化に関連すると考えられ、また交尾率、受精率、受胎率及び胚生存率に対する影響が認められなかったことから、毒性学的な重要性は低いと判断した。

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験（[redacted]-353116 試験）において、母動物の摂餌量減少及び体重低下に関連して、1.63 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量の 22.5 倍（表 2.4-3）］以上の用量で胎児の体重低下が認められたほか、4.89 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量の 71.1 倍（表 2.4-3）］の胎児で生存率のわずかな低下及び骨化変異が認められた。また、ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（[redacted]-353119 試験）において、母動物の摂餌量減少及び体重低下に関連して、0.41 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量

の 21.2 倍（表 2.4-3）］で胎児骨格に対する影響が認められた。他の GLP-1 受容体作動薬と同様に（EMA 2006; FDA 2010; EMA 2012; FDA 2012）、デュラグルチドのラット及びウサギ胎児骨格に対する影響は母動物の摂餌量減少及び体重低下に関連して認められたことから、胎児発生に対する直接的な作用を示唆する所見ではないと考えられた。

ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（[redacted]-353253 試験）において、Biel 型水迷路を用いた F1 児（生後 70 日）の記憶評価の試行 2 回目に、1.63 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量の 26.8 倍（表 2.4-3）］の F1 雌で溶媒対照群と比較して統計学的に有意な平均回避時間の延長及び平均エラー数の増加が認められた。この所見は、母動物の摂餌量減少及び体重低下が認められた用量で認められた。デュラグルチド投与による記憶障害は記憶評価の試行 1 回目には認められなかったことから、再現性は明らかでない。また、同用量群の F1 雄並びに 0.49 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量の 7.29 倍（表 2.4-3）］の F1 児では記憶障害は認められなかった。

新生児ラットを用いた毒性試験（[redacted]-353304 試験）において、ラットに生後 7 日からデュラグルチドを反復皮下投与し、生後 70 日に Biel 型水迷路を用いて学習・記憶評価を実施したとき、最高用量の 7 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量の 149 倍（表 2.4-3）］の雌雄にデュラグルチド投与の影響は認められなかった。ラットを用いた出生前・出生後試験（[redacted]-353253 試験）において F1 雌に記憶障害が認められたときの母動物の曝露量の約 5.6 倍に相当する用量を新生児ラットに直接投与した場合に記憶障害が認められなかったことを踏まえると、F1 雌に認められた記憶障害の毒性学的な重要性は低いと考えられた。他の GLP-1 受容体作動薬の生殖発生毒性試験においても出生児の記憶に対する影響は評価されているものの、評価手法が異なるためデュラグルチドとの比較はできなかった。また、新生児ラットを用いた毒性試験（[redacted]-353304 試験）では、7 mg/kg 群の雌に膣開口時期及び春機発動の早期化と成長ホルモン濃度の上昇が認められたほか、7 mg/kg 群の雄に黄体形成ホルモン及び成長ホルモン濃度の上昇（性成熟個体）並びにエストロゲン濃度の上昇（未成熟及び性成熟個体）が認められた。しかしながら、これらの変化は 7 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量の 149 倍（表 2.4-3）］においてのみ認められ、関連する器官重量の変化、病理組織学的変化並びに雌雄の生殖機能や胚生存率に対する影響は認められなかったことから、毒性学的な重要性は低いと考えられた。性成熟に関する NOAEL は 2 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量の 34.9 倍（表 2.4-3）］と判断した。

生殖発生毒性試験及び新生児ラットを用いた毒性試験の主要な結果は添付文書に記載する予定である。

2.4.4.4 甲状腺 C 細胞に対する影響

リラグルチド、エキセナチド週 1 回投与製剤及びリキシセナチドなどの長時間作動型 GLP-1 受容体作動薬を長期投与したげっ歯類において、C 細胞の過形成及び腫瘍が認められている（FDA 2010; Knudsen et al. 2010; Parks and Rosebraugh 2010; EMA 2012; FDA 2012）。GLP-1 受容体作動薬の薬理作用は多岐に渡るが（Drucker 2006）、腫瘍の発生は甲状腺 C 細胞に限定されている。GLP-1 受容体はラット C 細胞株だけでなく、ヒト過形成性 C 細胞病変及びヒト甲状腺髄様癌（C 細胞腫瘍）にも発現が確認されている（Vertongen et al.

1994; Körner et al. 2007; Gier et al. 2012a）。GLP-1 受容体の検出に用いられた抗体の特異性は明らかではなく、結果の解釈には注意が必要であるものの（Panjwani et al. 2013; Pyke and Knudsen 2013）、C 細胞における GLP-1 受容体の発現量はサル及びヒトと比較してげっ歯類で高いことが示唆されている（Körner et al. 2007; Knudsen et al. 2010）。げっ歯類と異なり、サル又はイヌを用いた毒性試験においては GLP-1 受容体作動薬の投与による C 細胞の増殖性変化は認められていない（EMA 2006; FDA 2010; EMA 2012; FDA 2012）。GLP-1 受容体作動薬に対する C 細胞の反応性の動物種差が GLP-1 受容体の発現量の違いによるものなのか、あるいは非げっ歯類において C 細胞のわずかな変化を検出することが困難であるためなのかは明らかでない。GLP-1 受容体作動薬の C 細胞に対する影響は製造販売承認申請時に各国の規制当局によって注意深く評価され、添付文書に記載されている。

デュラグルチドのラット及びサルを用いた反復投与毒性試験において C 細胞の病理組織学的変化は認められなかったが、これらの試験は GLP-1 受容体作動薬の C 細胞に対する影響が明らかになる以前に実施されたため、甲状腺の機能及び組織像に関する詳細な評価を行わなかった。そこで、ラット及び rasH2 トランスジェニックマウスを用いたがん原性試験の他に、補足的毒性試験として C 細胞量及び血中カルシトニン濃度の測定を組み込んだ 1 年間反復投与毒性試験を実施し、ラット及びサルの C 細胞に対するデュラグルチドの影響を詳細に評価した。以下の項では、C 細胞に対する影響を評価した試験成績及びヒトへのリスクを包括的に考察する。

2.4.4.4.1　ラット及び rasH2 トランスジェニックマウスを用いたがん原性試験

ラットを用いた長期がん原性試験（8203405 試験）において、0.5 mg/kg 以上の用量で C 細胞腺腫並びに C 細胞腺腫/癌（合算）の発現頻度が溶媒対照群と比較して統計学的に有意に上昇した（表 2.4-1）。また、統計学的有意差はないものの 5 mg/kg 群で C 細胞癌の発現頻度が数的に上昇した。5 mg/kg 群の雌雄及び 1.5 mg/kg 群の雄では C 細胞のびまん性過形成の発現頻度が統計学的に有意に上昇し、0.5 mg/kg 以上の群の雌で C 細胞の限局性過形成の発現頻度が統計学的に有意に上昇した。雄ラットでは限局性過形成の発現頻度は低下したが、これは腺腫の発現頻度が上昇したことによる相対的な変化と考えられた。

表 2.4-1 ラット長期がん原性試験における甲状腺 C 細胞過形成、腺腫及び癌の発現頻度

性	雄					雌				
用量（mg/kg）	0	0.05	0.5	1.5	5	0	0.05	0.5	1.5	5
評価例数	60	59	60	60	60	60	59	60	60	60
甲状腺 C 細胞　びまん性過形成	9	9	16	19*	28**	7	6	12	11	25**
甲状腺 C 細胞　限局性過形成	39	28†	25‡	25‡	15‡	7	11	20**	20**	20**
甲状腺 C 細胞　腺腫	10	14	25*	24**	31#	7	6	19**	19*	32#
甲状腺 C 細胞　癌	1	0	2	2	4	1	0	1	1	4
甲状腺 C 細胞　腺腫/癌（合算）	11	14	27**	24**	33#	8	6	20*	20*	35#

* p≤0.05（上昇）

** p≤0.01（上昇）

p≤0.005（傾向検定）又は p≤0.01（高頻度腫瘍について高用量の比較）

† p≤0.05（低下）

‡ p≤0.01（低下）

デュラグルチドのラットを用いた長期がん原性試験（8203405 試験）において認められた C 細胞の過形成及び腫瘍の発現頻度の上昇は、他の GLP-1 受容体作動薬で報告されている変化と類似したものであった。デュラグルチドでは腫瘍に関する無影響量（NOEL）を 0.05 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量の 0.829 倍（表 2.4-3）］と決定することができ、非遺伝毒性的機序による発がん物質に特徴的な閾値の存在が示唆された。本 NOEL では体重低下が認められ、薬理作用を発現する用量と考えられた。C 細胞癌の発現頻度の上昇は 5 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量の 95.0 倍（表 2.4-3）］にのみ認められたが、リラグルチド及びエキセナチド週 1 回投与製剤のラットを用いた 2 年間がん原性試験では臨床用量と同程度の曝露量においても C 細胞癌が認められている（FDA 2010, 2012）。リキシセナチドでは臨床用量のおよそ 900 倍の曝露量で C 細胞癌が認められている（EMA 2012）。

デュラグルチドの rasH2 トランスジェニックマウスを用いた短期がん原性試験（8224144 試験）においては、C 細胞の変化を高感度に検出するため甲状腺のカルシトニン染色を実施した。その結果、デュラグルチドを投与した全用量群で C 細胞の細胞質肥大/カルシトニン染色性の軽微な増加が認められたが、過形成及び腫瘍は認められなかった。

2.4.4.4.2 甲状腺 C 細胞に対する影響に関する補足的毒性試験

C 細胞に対するデュラグルチドの影響を明らかにするため、ラット及びサルを用いた 1 年間反復投与毒性試験において C 細胞量及び機能の変化を詳細に評価した。C 細胞量は甲状腺の病理組織学的検査［ヘマトキシリン・エオジン染色並びにカルシトニン/Ki67（増殖マーカー）共染色］、カルシトニン/Ki67 共染色細胞比率による細胞増殖性の半定量的評価、並びに連続したカルシトニン染色切片の 3 次元画像解析（形態計測学的評価）により定量した C 細胞容積に基づいて評価した。C 細胞機能は血中カルシトニン濃度（ベースライン及びカルシウム刺激時）に基づいて評価した。カルシウム刺激を行うことで、C 細胞量のわずかな変化を検出することが可能と考えられた。さらに、C 細胞容積と血漿中カルシトニン濃度の相関性を統計学的に解析した。これらの複数の評価項目を総合することで、標準的な毒性試験よりも詳細に C 細胞に対するデュラグルチドの影響を評価する

ことが可能と考えられた。また、ラットを用いた 1 年間反復投与毒性試験では C 細胞量及び機能の変化を経時的に評価し、過形成及び腫瘍の発生より早期に C 細胞量のびまん性増加が認められるか明らかにすることも目的とした。

2.4.4.4.2.1 ラットを用いた 1 年間反復投与毒性試験

雄ラットにデュラグルチドを週 2 回、52 週間反復皮下投与し、試験 12、24、36 及び 52 週に C 細胞量及び血漿中カルシトニン濃度（ベースライン及びカルシウム刺激時）を評価した（8236888 試験）。当試験の用量は、ラットを用いた長期がん原性試験（8203405 試験）で検討した最高用量であり、C 細胞の過形成、腺腫及び癌の発現頻度の上昇が認められた 5 mg/kg を選択した［AUC に基づくと臨床用量のおよそ 95.0 倍（表 2.4-3)］。12 ～ 24 ヵ月齢のラットでは C 細胞の自然発生病変が高頻度に認められることから（Martín-Lacave et al. 1999）、これらの影響を除外するため投与期間は 52 週間（標準的な寿命の約 1/2）とした。

当試験では試験 52 週にのみ、5 mg/kg 群で C 細胞の限局性/多巣性の肥大/過形成の発現頻度の上昇が認められた。これらの変化は試験 52 週より早期の評価時点では認められなかった。また、いずれの評価時点においても形態計測学的評価により定量した C 細胞容積に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。C 細胞容積に対する影響が認められなかったことに一致して、C 細胞のびまん性過形成の発現頻度の上昇や血漿中カルシトニン濃度の上昇は認められなかった。なお、溶媒対照群及び 5 mg/kg 群の両群で C 細胞容積は加齢に伴って増加したことから、評価系の感度は適切と考えられた。これらの試験成績から、少なくても 52 週間までの反復投与では C 細胞量のびまん性増加は認められないことが示された。

2.4.4.4.2.2 サルを用いた 1 年間反復投与毒性試験

雄サルにデュラグルチドを週 2 回、52 週間反復皮下投与し、血清中カルシトニン濃度（ベースライン及びカルシウム刺激時）を経時的に評価するとともに、試験 52 週に C 細胞量を評価した（8252199 試験）。当試験の用量は、サルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験（7608-235 試験）の最高用量であり、NOAEL である 8.15 mg/kg を選択した［AUC に基づくと臨床用量のおよそ 774 倍（表 2.4-3)］。投与期間はラットと同じく 52 週間と設定した。当試験は生涯投与でなく、またラットを用いた試験よりも評価動物数が少ないことから腫瘍発現率の変化を検出することは難しいが、内分泌組織の過形成を検出するには十分な投与期間及び動物数であったと考えられる。実際に、過剰量のカルシウム及びビタミン D を 1 ヵ月間反復投与したサルにおいて C 細胞の増殖が認められている（Swarup et al. 1979）。

当試験では C 細胞のわずかな毒性学的変化を検出するため、一般的なサル毒性試験よりも 1 群の例数を増やし、また C 細胞の機能及び組織像の変化を多角的に評価したが、デュラグルチド投与による血清中カルシトニン濃度の上昇、甲状腺の重量増加及び組織像の変化、C 細胞の増殖性並びに形態計測学的評価により定量した C 細胞容積の変化は認められなかった。

2.4.4.4.3 甲状腺 C 細胞に対する影響に関する要約

ラット及びサルを用いた 1 年間反復投与毒性試験においては、同様の手法を用いて C 細胞量及び機能を評価したことから、C 細胞の正常な形態を動物種間で比較することが可能であった。すなわち、若齢のラット無処置群及びサル溶媒対照群におけるカルシトニン染色陽性の組織容積はそれぞれ 0.22 mm^3 及び 0.026 mm^3 であり、C 細胞はサル甲状腺よりもラット甲状腺で豊富に存在することが示された。

ラットを用いた 1 年間反復投与毒性試験（8236888 試験）においては、試験 52 週にのみ C 細胞の限局性過形成の発現頻度の上昇が認められたが、C 細胞量のびまん性増加はいずれの評価時点においても認められなかった。したがって、デュラグルチドが C 細胞の GLP-1 受容体を活性化させることで C 細胞量がびまん性に増加し、その後に限局性の過形成及び腫瘍が発生するという仮説は否定された。ラットを用いた長期がん原性試験で認められた C 細胞腫瘍は自然発生病変の発現頻度の上昇が原因と考えられ、少なくても 52 週間以上の長期投与により起こる変化と考えられた。

サルを用いた 1 年間反復投与毒性試験（8252199 試験）においては、C 細胞のわずかな毒性学的変化を検出するため一般的なサル毒性試験よりも 1 群の例数を増やし、また C 細胞の機能及び組織像の変化を多角的に評価したが、臨床用量のおよそ 774 倍の曝露量（表 2.4-3）でも C 細胞に対する影響は認められなかった。したがって、他の GLP-1 受容体作動薬と同様に、デュラグルチドはサルにおいて C 細胞の増殖性変化を引き起こさないと考えられた。

以上、デュラグルチドを投与したラットにおける C 細胞腫瘍の発現頻度の上昇は、臨床用量よりも高い曝露量でのみ認められた。デュラグルチドの毒性試験成績並びに他の GLP-1 受容体作動薬の知見を踏まえると、ラット C 細胞の増殖性変化は非遺伝毒性的機序を介したものと考えられ、またサルと比較してラット C 細胞はデュラグルチドに対する反応性が高いと考えられた。しかしながら、C 細胞の増殖性変化が起こる機序は明らかではなく、ヒトにおける反応性がラットよりもサルに類似するかも明らかでないことから、ヒトにおける安全性の慎重な評価は依然として重要である。したがって、リスク管理計画書に基づき、日常診療下で報告される甲状腺 C 細胞腫瘍を監視するほか、ラットで認められた C 細胞腫瘍を添付文書に記載する予定である。

2.4.4.5 膵臓に対する影響

市販後の自発報告及び文献調査では、GLP-1 受容体作動薬又は DPP-4 阻害剤の投与をうけた患者において急性膵炎が報告されている（Ahmad and Swann 2008; Dore et al. 2011）。一部のレトロスペクティブ解析及びメタ解析では薬剤投与と膵炎/膵癌との関連が示唆されている一方（Elashoff et al. 2011; Butler et al. 2013; Singh et al. 2013）、関連を否定する解析結果も報告されており（Garg et al. 2010; Dore et al. 2011）、一貫した結果は得られていない。薬剤投与との関連をレトロスペクティブに解析することの限界に加え、一般集団と比較して 2 型糖尿病患者では膵炎のリスクが高いことが結果の解釈を困難にしている（Keech et al. 2005; Noel et al. 2009; Girman et al. 2010）。

GLP-1 の作用は主に GLP-1 受容体を介して発現すると考えられ、哺乳類において GLP-1 受容体サブタイプは 1 種のみ同定されている。膵臓において GLP-1 受容体は主に β 細胞に発現している（Hörsch et al. 1997）。一部の研究者は膵管上皮細胞に発現する GLP-1 受容体が長期間、過剰に活性化されることで膵腺癌のリスクが増加する可能性を示唆しているが、GLP-1 受容体が膵管上皮細胞に発現するかは明らかでなく、発現するとしても膵外分泌機能における役割は不明である（Xu et al. 1999, 2006; Gier et al. 2012a; Panjwani et al. 2013; Pyke and Knudsen 2013）。

GLP-1 受容体作動薬の膵外分泌腺に対する影響を明らかにするため、正常動物や糖尿病モデル動物を用いた非臨床試験が複数実施されているが、ヒトと同様に一貫した結果は得られていない。GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチド、エキセナチド、リキシセナチド、semaglutide 及び albiglutide 並びに DPP-4 阻害剤であるシタグリプチンを投与したげっ歯類又は非げっ歯類において、膵臓に対する有害な作用は認められていない（EMA 2006; Koehler et al. 2009; FDA 2010; Tatarkiewicz et al. 2010; EMA 2012; FDA 2012; Nyborg et al. 2012; Forest et al. 2013; Mirabile et al. 2013; Gotfredsen et al. 2014）。また、糖尿病を呈さない正常なげっ歯類（15,480 匹）及びサル（2,475 匹）を用いて 50 種のインクレチン関連薬について実施された毒性試験を対象とした FDA によるメタ解析において、膵臓に対する明らかな有害作用は同定されていない（Egan et al. 2014）。一方、Nachnani らは exendin-4 を投与した非糖尿病ラットで膵炎が認められたことを報告している（Nachnani et al. 2010）。Gier らによる同様の試験（非糖尿病ラットに同用量の exendin-4 を投与）では膵炎は認められなかったが、主膵管及び膵管腺の増殖性変化が認められている（Gier et al. 2012b）。また、エキセナチドを投与したラットでは、膵臓の障害を示唆する病理組織学所見が認められている（Yu et al. 2012）。糖尿病モデル動物を用いた試験においても、一貫した結果は得られていない。リラグルチド（Vrang et al. 2012）、エキセナチド（Tatarkiewicz et al. 2013）又はシタグリプチン（Forest et al. 2013）を投与した Zucker 糖尿病肥満（ZDF）ラットにおいて膵炎を示唆する生化学的検査値や組織像の異常は認められていないが、エキセナチドを投与した高脂肪食負荷マウスでは膵臓の障害が増悪することが報告されている（Rouse et al. 2013; Zhang et al. 2013）。動物及びヒトにおけるこれらの知見を踏まえ、GLP-1 受容体作動薬を投与されている患者からの膵炎など膵臓の有害事象報告は注意深く評価する必要があるとされている（EMA 2013; Hummer 2013）。

以下の項では、デュラグルチドの標準的な毒性試験及びがん原性試験に加えて、膵臓に対する影響を詳細に評価した ZDF ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験及びサルを用いた 1 年間反復投与毒性試験の成績を示し、ヒトの膵外分泌腺に対する影響に関するリスクを包括的に考察する。

2.4.4.5.1 反復投与毒性試験及びがん原性試験

ラット及びサルを用いたデュラグルチドの反復投与毒性試験において、膵外分泌腺の病理組織学的変化は認められなかった。

ラットを用いた長期がん原性試験（8203405 試験）においても、デュラグルチド投与による膵臓の病理組織学的変化や、膵内分泌腺又は膵外分泌腺腫瘍の発現頻度の上昇は認め

られなかった。これらの試験では膵体部の単一組織切片について病理組織学的検査を実施したのみであり、複数の組織切片の病理組織学的検査や膵腺房細胞損傷のマーカーであるアミラーゼ及びリパーゼ活性の測定は実施しなかった。rasH2 トランスジェニックマウスを用いた短期がん原性試験（8224144 試験）においては、膵臓全体を縦軸方向に薄切して膵頭部、体部及び尾部を含む広い領域について病理組織学的検査を実施したが、膵外分泌腺に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。

2.4.4.5.2 膵外分泌腺に対する影響に関する補足的毒性試験

2.4.4.5.2.1 Zucker 糖尿病肥満ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験

一般集団と比較して 2 型糖尿病患者では膵炎のリスクが高いことから（Keech et al. 2005; Noel et al. 2009; Girman et al. 2010）、糖尿病モデル動物を用いて膵外分泌腺に対するデュラグルチドの影響を評価することは重要である。そこで、雄 ZDF ラットにデュラグルチドを 5 mg/kg までの用量で週 2 回、13 週間反復皮下投与し、膵外分泌腺バイオマーカー及び膵臓の組織像に対する影響を評価した（504758 試験）。

当試験ではデュラグルチドを投与した全用量群で総アミラーゼ活性及び膵アミラーゼ活性の軽度の上昇が認められたが、膵臓の障害により通常認められる変化と比較してその程度は小さく、またリパーゼ活性の上昇や膵臓の炎症を示唆する病理組織学的所見は認められなかった。また、デュラグルチドを投与した全用量群で総膵管及び関連する腺を含む小葉間膵管における膵管上皮の増加の発現頻度及び重症度の上昇が認められた。しかし、サイトケラチン 19（上皮マーカー）と Ki67（増殖マーカー）又は TdT-mediated dUTP nick-end labeling（TUNEL、アポトーシスマーカー）との共染色において膵管細胞の増殖やアポトーシスの減少は示唆されなかったことから、膵管上皮の増加は毒性と判断しなかった。膵管上皮の増加が細胞増殖に対する影響を反映するのか、または細胞の分化過程に対する影響を反映するのかは不明であった。また、5 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量の 48.6 倍（表 2.4-3）］で膵腺房の好中球性炎症の発現頻度及び重症度の上昇が認められた。当所見はデュラグルチド投与に関連した毒性と判断したが、局在性であり、他に関連する所見が認められなかったことから膵炎を示唆する変化ではないと考えられた。その他の病理組織学的変化として、腺房萎縮（混合細胞性炎症を伴う/伴わない）の発現頻度及び重症度の上昇並びに島細胞の過形成が認められた。腺房萎縮及び島細胞の過形成は ZDF ラットの自然発生病変として知られており、溶媒対照群にも低頻度に認められたことから、膵外分泌腺の自然発生病変の発現頻度及び重症度がデュラグルチド投与により軽度に上昇したと考えられた。膵外分泌腺の組織像及び機能に関する NOAEL は 1.5 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量の 13.4 倍（表 2.4-3）］と判断した。

2.4.4.5.2.2 サルを用いた 1 年間反復投与毒性試験

雄サルにデュラグルチドを 8.15 mg/kg の用量で週 2 回、52 週間反復皮下投与し、膵外分泌バイオマーカー及び膵臓の組織像に対する影響を評価した（8252199 試験）。当試験では標準的な反復投与毒性試験では実施しなかったアミラーゼ及びリパーゼ活性の測定並びに体系的かつプロスペクティブな膵臓の病理組織学的検査を実施した（膵頭部、体部

及び尾部横断切片のヘマトキシリン・エオジン染色及び膵頭部横断切片の Ki67 染色）。すべての膵臓切片について、認定獣医病理学者が標準的な病理組織学的検査を実施した後、一次レビュー及びピアレビューに続いて獣医病理学者及び臨床病理学者からなる病理学ワーキンググループによるレビューを実施した。この際、ヒト膵上皮内腫瘍（PanIN）に相当する膵管の異形成性又は増殖性病変の有無を詳細に評価した。

当試験では 8.15 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量のおよそ 774 倍（表 2.4-3）］の 4/19 例で小葉間膵管における杯細胞数の軽微から中等度の増加が認められたが（表 2.4-2）、一般状態や血液生化学的検査値の変化、膵臓の炎症性又は増殖性所見、膵管の拡張や閉鎖は認められなかったことから毒性と判断しなかった。膵管内腔上皮細胞及び腺上皮細胞の Ki67 染色細胞比率並びにアミラーゼ及びリパーゼ活性に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。

表 2.4-2　　サル 1 年間毒性試験における膵杯細胞数の増加

		デュラグルチド
性		雄
用量（mg/kg）		0	8.15
膵臓			
	検査例数	20	19
小葉間導管の杯細胞増加			
	なし	14	12
	軽微	6	3
	軽度	0	2
	中等度	0	2

2.4.4.5.3　膵臓に対する影響に関する要約

医薬品製造販売承認申請のために実施されたリラグルチド（FDA 2010; Nyborg et al. 2012）、エキセナチド（EMA 2006; FDA 2012）及びリキシセナチド（EMA 2012）の毒性試験と同様に、デュラグルチドの反復投与毒性試験及びがん原性試験において膵臓の炎症、壊死、過形成及び腫瘍は認められなかった。ZDF ラット及びサルを用いた補足的毒性試験においては、膵外分泌腺バイオマーカーの測定及び膵臓の詳細な病理組織学的検査を実施し、膵臓に対するデュラグルチドの影響を詳細に評価した。その結果、ZDF ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験（504758 試験）において膵外分泌腺の自然発生病変の発現頻度及び重症度の軽度の上昇並びに膵管上皮の増加が認められたほか、サルを用いた 1 年間反復投与毒性試験（8252199 試験）において小葉間膵管における杯細胞数の軽微から中等度の増加が認められた。

試験方法が異なるため結果の解釈には注意が必要であるものの、毒性試験成績を薬剤間で比較することは膵臓に対するデュラグルチドの影響を考察する上で有用である。デュラグルチドを投与した ZDF ラットにおいて認められた膵管上皮の増加は、exendin-4 を投与した非糖尿病ラットで認められた主膵管及び膵管腺の増殖性変化と質的に類似していると考えられた（Gier et al. 2012b）。両試験ともに膵臓の頭部から複数の組織切片を作成して詳細な病理組織学的検査を実施しており、このためにデュラグルチドを含む GLP-1 受容体作動薬の標準的な毒性試験やリラグルチド又はエキセナチドを投与した ZDF ラット

（Vrang et al. 2012; Tatarkiewicz et al. 2013）では認められなかった膵管の変化が検出された可能性がある。非糖尿病ラット及び糖尿病モデルラット［ZDF ラット及び human islet amyloid polypeptide（HIP）ラット］では、膵管の正常な形態に大きなばらつきが認められている（Chadwick et al. 2013）。したがって、デュラグルチドを投与した ZDF ラット及び exendin-4 を投与した非糖尿病ラットで認められた膵管の増殖性変化は、生理的な変動の範囲である可能性が考えられた。

ZDF ラットだけでなく非糖尿病ラットにおいても膵管の増殖性変化が報告されていることから、糖尿病モデル動物だけでなく非糖尿病ラットを用いた反復投与毒性試験の成績もデュラグルチドの膵管に対する影響を評価する上で有用と考えられた。デュラグルチドのラットを用いた長期がん原性試験（8203405 試験）において、最高用量の 5 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量の 95.0 倍（表 2.4-3)］で膵臓の病理組織学的変化は認められなかった。したがって、ZDF ラットで認められた膵管上皮の増加が長期投与により膵管の異形成や膵癌に進行する可能性は低いと考えられた。膵管腺癌は顕著な線維組織（スキラス）反応を伴うことが多く、局所破壊的かつ転移性である。したがって、長期がん原性試験において膵管腺癌が発生した場合には、剖検及び病理組織学的検査で検出することが可能であったと考えられる。

ラットと異なり、デュラグルチドのサルを用いた 1 年間反復投与毒性試験（8252199 試験）においては、8.15 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量のおよそ 774 倍（表 2.4-3)］で膵管上皮の増加や膵管腺の変化は認められなかった。当試験では 4/19 例で小葉間膵管における杯細胞の軽度から中等度の増加が認められたが、膵外分泌腺バイオマーカーの変化、膵臓の炎症、壊死、異形成性の膵管増殖、ヒト PanIN に相当する病変並びに粘液化生、核の極性消失などの膵癌の徴候を示唆する変化は認められなかった。デュラグルチドのサルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験（7608-235 試験）や、リラグルチド（Nyborg et al. 2012）、semaglutide（Gotfredsen et al. 2014）又は albiglutide（Mirabile et al. 2013）を投与したサルでは杯細胞の増加は認められていない。デュラグルチドのサルを用いた 1 年間反復投与毒性試験ではわずかな毒性学的変化を検出するため、一般的なサル毒性試験よりも 1 群の例数を増やし、また膵臓の広範な領域について体系的な病理組織学的評価を実施したため、他の試験では認められなかった変化を検出することができた可能性が考えられた。

以上の毒性試験成績を踏まえると、デュラグルチドはラット及びサルにおいて膵炎/膵癌を誘発しないと考えられた。デュラグルチド投与により、糖尿病モデルラットでは膵管上皮の増加が、サルでは小葉間膵管における杯細胞の増加が認められたが、長期投与により膵管の異形成や膵癌が発生する可能性は低いと考えられた。

2.4.5 総括及び結論

デュラグルチドはヒト GLP-1 受容体に特異的に結合し、膵島細胞を用いた in vitro 試験においてグルコース濃度依存的にインスリン分泌を亢進させた。また、ラット又はサルを用いたグルコース負荷試験（IVGTT 及び SGI 試験）において、グルコース濃度依存的なインスリン分泌の亢進が認められ、サルにおいては反復投与による作用の持続が示された。

薬物動態は、反復皮下投与時の TK 試験成績に基づいて評価した。マウス、ラット、ウサギ及びサルにデュラグルチドを反復皮下投与したとき、曝露量が用量依存的に増加し、曝露の持続が認められた。ラット及びサルへの反復投与により曝露量の軽度の蓄積が認められ、投与期間の延長に伴って曝露量は増加した。一方、一部の毒性試験では反復投与により曝露量の減少が認められ、抗デュラグルチド抗体の産生が示唆されたが、デュラグルチドの薬理作用に関連した摂餌量減少及び体重低下が試験期間を通して認められたことから、デュラグルチドの薬物動態及び毒性は適切に評価されていると考えられた。

ラットを用いた最長6ヵ月間及びサルを用いた最長9ヵ月間の反復投与毒性試験において、デュラグルチド投与による主要な変化は薬理作用に関連した摂餌量減少及びそれに伴う体重低下であった。標的器官毒性は認められず、臨床用量における曝露量と比較して十分な安全域が示された（表 2.4-3）。サルを用いた試験の一部で散発的な QTc 間隔の延長が認められたが、試験間で一貫した結果は得られなかった。また、QT/QTc 評価試験及び国内外の第 II 相/第 III 相臨床試験では臨床的に問題となる QT/QTc 間隔の延長は認められていないことから、サルにデュラグルチドを投与したときに認められた散発的な QTc 間隔の延長はヒトにおけるリスクを示唆するものではないと考えられた。

ラットを用いた長期がん原性試験において、甲状腺 C 細胞の過形成及び腫瘍の発現頻度の上昇が認められた。C 細胞量及び機能に対する影響を詳細に評価したデュラグルチドの補足的毒性試験並びに他の GLP-1 受容体作動薬の知見を踏まえると、ラット C 細胞の増殖性変化は非遺伝毒性的機序を介したものと考えられ、またサルと比較してラット C 細胞はデュラグルチドに対する反応性が高いと考えられた。しかしながら、C 細胞の増殖性変化が起こる機序は明らかではなく、ヒトにおける反応性がラットよりもサルに類似するかも明らかでないことから、ヒトにおける安全性の慎重な評価は依然として重要である。したがって、リスク管理計画書に基づき、日常診療下で報告される甲状腺 C 細胞腫瘍を監視するほか、ラットで認められた C 細胞腫瘍を添付文書に記載する予定である。

GLP-1 受容体作動薬の安全性リスクとして膵炎/膵癌が懸念されているが、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験において臨床用量のそれぞれ 264 倍及び 774 倍の曝露量（表 2.4-3）でも膵臓の炎症、壊死、過形成及び腫瘍は認められなかった。膵臓に対する影響を詳細に評価した ZDF ラットを用いた補足的毒性試験において、デュラグルチド投与により膵外分泌腺の自然発生病変の発現頻度及び重症度の軽度の上昇並びに膵管上皮の増加が認められた。しかし、ラットを用いた長期がん原性試験において膵臓の病理組織学的変化は認められなかったことから、ZDF ラットで認められた変化が長期投与により膵管の異形成や膵癌に進行する可能性は低いと考えられた。ZDF ラットと異なり、サルを用いた補足的毒性試験においては、8.15 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量のおよそ 774 倍（表 2.4-3)］で膵管上皮の増加や膵管腺の変化は認められなかった。当試験では 4/19 例で小葉間膵管における杯細胞の軽度から中等度の増加が認められたが、膵外分泌腺バイオマーカーの変化、膵臓の炎症、壊死、異形成性の膵管増殖、ヒト PanIN に相当する病変並びに粘液化生、核の極性消失などの膵癌の徴候を示唆する変化は認められなかった。これらの試験成績を総合すると、デュラグルチドはラット及びサルにおいて膵炎/膵癌を誘発しないと考えられた。

表 2.4-3 デュラグルチドの主要な毒性試験で検討した用量と臨床用量との曝露量比

動物種 用量	$AUC_{0-\tau}$、定常状態 (μg·hr/mL)	C_{ave} (μg/mL)	曝露量比 [a]
ヒト			
0.75 mg、週 1 回投与	8.57[b]	0.0510	-
反復投与毒性試験			
マウス 1 ヵ月間（8224143 試験）[c]			
100 mg/kg/週 2 回 [d]	8696	90.6	1776
10 mg/kg/週 2 回	1145	11.9	234
1 mg/kg/週 2 回	99.3	1.03	20.3
ラット 1 ヵ月間（R00359 試験）[e]			
20 mg/kg/週 2 回 [d]	1724	18.0	352
6 mg/kg/週 2 回	739	7.69	151
2 mg/kg/週 2 回	237	2.47	48.4
ラット 3 ヵ月間（7608-191 試験）[f]			
16.29 mg/kg/週 2 回 [d]	1181	12.3	241
4.89 mg/kg/週 2 回	277	2.89	56.6
1.63 mg/kg/週 2 回	124	1.29	25.3
ラット 6 ヵ月間（7608-236 試験）[g]			
16.29 mg/kg/週 2 回 [d]	1295	13.5	264
4.89 mg/kg/週 2 回	297	3.10	60.7
1.63 mg/kg/週 2 回	121	1.26	24.7
サル 1 ヵ月間（P00054 試験）[h]			
10 mg/kg/週 2 回 [d]	3921	40.8	801
3 mg/kg/週 2 回	1072	11.2	219
1 mg/kg/週 2 回	360	3.75	73.5
サル 3 ヵ月間（7608-192 試験）[i]			
8.15 mg/kg/週 2 回 [d]	3034	31.6	620
1.63 mg/kg/週 2 回	682	7.10	139
0.41 mg/kg/週 2 回	155	1.61	31.7
サル 9 ヵ月間（7608-235 試験）[j]			
8.15 mg/kg/週 2 回 [d]	3792	39.5	774
1.63 mg/kg/週 2 回	718.9	7.49	147
0.41 mg/kg/週 2 回	205.5	2.14	42.0
がん原性試験			
ラット長期がん原性（8203405 試験）[k]			
5.0 mg/kg/週 2 回	465	4.84	95.0
1.5 mg/kg/週 2 回	159	1.66	32.5
0.5 mg/kg/週 2 回	59.6	0.621	12.2
0.05 mg/kg/週 2 回 [l]	4.06	0.042	0.829
rasH2 トランスジェニックマウス短期がん原性（8224144 試験）[m]			
3.0 mg/kg/週 2 回 [l]	37.0	0.385	7.56
1.0 mg/kg/週 2 回	23.3	0.243	4.76
0.3 mg/kg/週 2 回	8.63	0.090	1.76

（続く）

表 2.4-3 デュラグルチドの主要な毒性試験で検討した用量と臨床用量との曝露量比（続き）

動物種 用量	$AUC_{0-\tau}$、定常状態 (μg·hr/mL)	C_{ave} (μg/mL)	曝露量比 [a]
生殖発生毒性試験			
ラット胚・胎児発生に関する試験（[redacted]-353116 試験）[n]			
4.89 mg/kg/3 日ごと	348.14	3.63	71.1
1.63 mg/kg/3 日ごと	110.06	1.15	22.5
0.49 mg/kg/3 日ごと [o]	35.0	0.365	7.15
ウサギ胚・胎児発生に関する試験（[redacted]-353119 試験）[p]			
0.41 mg/kg/3 日ごと	77.94	1.08	21.2
0.12 mg/kg/3 日ごと [o]	26.52	0.368	7.22
0.04 mg/kg/3 日ごと	7.05	0.0979	1.92
ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（[redacted]-353253 試験）[q]			
1.63 mg/kg/3 日ごと	131	1.365	26.8
0.49 mg/kg/3 日ごと [o]	35.7	0.372	7.29
0.2 mg/kg/3 日ごと	15.3	0.159	3.12
新生児ラットを用いた試験（[redacted]-353304 試験）[r]			
7.0 mg/kg/3 日ごと [s]	547	7.60	149
2.0 mg/kg/3 日ごと [t]	128	1.78	34.9
0.5 mg/kg/3 日ごと	35.0	0.486	9.53
補足的毒性試験			
ZDF ラット 3 ヵ月間（504758 試験）[u]			
5.0 mg/kg/週 2 回	238	2.48	48.6
1.5 mg/kg/週 2 回 [d]	65.4	0.681	13.4
0.5 mg/kg/週 2 回	21.2	0.221	4.33

略号：AUC = 血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{ave} = 平均血漿中濃度、NOAEL = 無毒性量、NOEL = 無影響量

a 曝露量比 =［（動物における $AUC_{0-\tau}$）／τ 時間］／［（ヒトにおける AUC_{0-168h}）／168 時間］
b 日本人 2 型糖尿病患者にデュラグルチドを 0.75 mg の用量で週 1 回、反復皮下投与したときの AUC_{0-168h} の幾何平均値（H9X-JE-GBDP 試験）
c 試験 29 日の AUC
d 標的器官毒性に関する NOAEL
e 試験 32 日の AUC
f 試験 92 日の AUC
g 試験 183 日の AUC
h 試験 28 日の AUC
i 試験 92 日の AUC
j 試験 274 日の AUC
k 試験 52 週の AUC
l 腫瘍に関する NOEL
m 試験 176 日の AUC
n 妊娠 15 日の AUC
o 胚・胎児発生に関する NOAEL
p 妊娠 19 日の AUC
q 哺育 4 日の AUC
r 生後 91 日の AUC
s 一般毒性、発生神経毒性、生殖毒性及び胚毒性に関する NOAEL
t 性成熟に関する NOAEL
u 試験 88 日の AUC

2.4.6 図表

図表は本文中の適切な箇所に記載した。

2.4.7 参考文献

Ahmad SR, Swann J. Exenatide and rare adverse events. N Engl J Med. 2008;358:1969-1972.

Barragán JM, Rodriguez RE, Blázquez E. Changes in arterial blood pressure and heart rate induced by glucagon-like peptide-1-(7-36) amide in rats. Am J Physiol. 1994;266:E459-466.

Brüggemann M, Williams GT, Bindon CI, Clark MR, Walker MR, Jefferis R, et al. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. J Exp Med. 1987;166:1351-1361.

Burton DR, Woof JM. Human antibody effector function. Adv Immunol. 1992;51:1-84.

Butler AE, Campbell-Thompson M, Gurlo T, Dawson DW, Atkinson M, Butler PC. Marked expansion of exocrine and endocrine pancreas with incretin therapy in humans with increased exocrine pancreas dysplasia and the potential for glucagon-producing neuroendocrine tumors. Diabetes. 2013;62:2595-2604.

Chadwick KD, Roy D, Fletcher AM, Parrula C, Bergholm AM, Mangipudy R, et al. 2013. Occurrence of Spontaneous Pancreatic Lesions in Normal and Diabetic Rats May Confound the Nonclinical Assessment of Glucagon-like Peptide (GLP)-1-Elevating Therapies. Poster presentation at the NIDDK-NCI Workshop on Pancreatitis, Diabetes, and Pancreatic Cancer, June 12-13, Bethesda, MD, USA.

Dore DD, Bloomgren GL, Wenten M, Hoffman C, Clifford CR, Quinn SG, et al. A cohort study of acute pancreatitis in relation to exenatide use. Diabetes Obes Metab. 2011;13:559-566.

Drucker DJ. Glucagon-like peptides. Diabetes. 1998;47:159-169.

Drucker DJ. The biology of incretin hormones. Cell Metab. 2006;3:153-165.

Egan AG, Blind E, Dunder K, de Graeff PA, Hummer BT, Bourcier T, et al. Pancreatic safety of incretin-based drugs--FDA and EMA assessment. N Engl J Med. 2014;370:794-797.

Elashoff M, Matveyenko AV, Gier B, Elashoff R, Butler PC. Pancreatitis, pancreatic, and thyroid cancer with glucagon-like peptide-1-based therapies. Gastroenterology. 2011;141:150-156.

[EMA] European Medicines Agency. 2006. Scientific discussion: BYETTA (exenatide). Available at: http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000698/WC500051842.pdf. Accessed August 6, 2013.

[EMA] European Medicines Agency. 2012. Summary of Product Characteristics: LYXUMIA (lixisenatide). Available at http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002445/WC500140401.pdf . Accessed August 14, 2013.

[EMA] European Medicines Agency. 2013. Investigation into GLP-1 based diabetes therapies concluded. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2013/07/news_detail_001856.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1. Accessed July 29, 2013.

[FDA] United States Food and Drug Administration. 2010. Summary basis of approval: VICTOZA (liraglutide [rDNA]) injection, NDA 022341, Pharmacology Review, Parts 1-3. Available at: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2010/022341s000TOC.cfm. Accessed August 6, 2013.

[FDA] United States Food and Drug Administration. 2012. Summary basis of approval: BYDUREON (exenatide), extended-release for injectable suspension, NDA 022200, pharmacology review. Available at: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2012/022200Orig1s000TOC.cfm. Accessed August 6, 2013.

Forest T, Holder D, Smith A, Cunningham C, Dey M, Frederick C, et al. 2013. Characterization of the Exocrine Pancreas in the Zucker Diabetic Fatty Rat Model of Type 2 Diabetes Treated with Sitagliptin, a Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor. Poster presentation at the NIDDK-NCI Workshop on Pancreatitis, Diabetes, and Pancreatic Cancer, June 12-13, Bethesda, MD, USA.

Garg R, Chen W, Pendergrass M. Acute pancreatitis in type 2 diabetes treated with exenatide or sitagliptin: a retrospective observational pharmacy claims analysis. Diabetes Care. 2010;33:2349-2354.

Gier B, Butler PC, Lai CK, Kirakossian D, DeNicola MM, Yeh MW. Glucagon like peptide-1 receptor expression in the human thyroid gland. J Clin Endocrinol Metab. 2012a;97:121-131.

Gier B, Matveyenko AV, Kirakossian D, Dawson D, Dry SM, Butler PC. Chronic GLP-1 receptor activation by exendin-4 induces expansion of pancreatic duct glands in rats and accelerates formation of dysplastic lesions and chronic pancreatitis in the $Kras^{G12D}$ mouse model. Diabetes. 2012b;61:1250-1262.

Girman CJ, Kou TD, Cai B, Alexander CM, O'Neill EA, Williams-Herman DE, et al. Patients with type 2 diabetes mellitus have higher risk for acute pancreatitis compared with those without diabetes. Diabetes Obes Metab. 2010;12:766-771.

Glaesner W, Vick AM, Millican R, Ellis B, Tschang SH, Tian Y, et al. Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein. Diabetes Metab Res Rev. 2010;26:287-296.

Gotfredsen CF, Mølck AM, Thorup I, Berg Nyborg NC, Salanti Z, Knudsen LB, et al. The human GLP-1 analogs liraglutide and semaglutide: Absence of histopathological effects on the pancreas in nonhuman primates. Diabetes. 2014;63:2486-2497.

Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. Physiol Rev. 2007;87:1409-1439.

Hörsch D, Göke R, Eissele R, Michel B, Göke B. Reciprocal cellular distribution of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) immunoreactivity and GLP-1 receptor mRNA in pancreatic islets of rat. Pancreas. 1997;14:290-294.

Hummer BT. 2013. FDA surveillance of adverse drug effects. Platform presentation at the NIDDK-NCI Workshop on Pancreatitis, Diabetes, and Pancreatic Cancer, June 12-13, Bethesda, MD, USA.

Keech A, Simes RJ, Barter P, Best J, Taskinen MR, Forder P, et al. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. Lancet. 2005;366:1849-1861.

Keenan KP, Ballam GC, Dixit R, Soper KA, Laroque P, Mattson BA, et al. The effects of diet, overfeeding and moderate dietary restriction on Sprague-Dawley rat survival, disease and toxicology. J Nutr. 1997;127(5 Suppl):851S-856S.

Knudsen LB, Hastrup S, Underwood CR, Wulff BS, Fleckner J. Functional importance of GLP-1 receptor species and expression levels in cell lines. Regul Pept. 2012;175:21-29.

Knudsen LB, Madsen LW, Andersen S, Almholt K, de Boer AS, Drucker DJ, et al. Glucagon-like Peptide-1 receptor agonists activate rodent thyroid C-cells causing calcitonin release and C-cell proliferation. Endocrinology. 2010;151:1473-1486.

Koehler JA, Baggio LL, Lamont BJ, Ali S, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor activation modulates pancreatitis-associated gene expression but does not modify the susceptibility to experimental pancreatitis in mice. Diabetes. 2009;58:2148-2161.

Körner M, Stöckli M, Waser B, Reubi JC. GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues: potential for in vivo targeting. J Nucl Med. 2007;48:736-743.

Larsen PJ, Fledelius C, Knudsen LB, Tang-Christensen M. Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats. Diabetes. 2001;5:2530-2539.

Martín-Lacave I, Bernabé R, Sampedro C, Conde E, Fernández-Santos JM, San Martín MV, et al. Correlation between gender and spontaneous C-cell tumors in the thyroid gland of the Wistar rat. Cell Tissue Res. 1999;297:451-457.

Meier JJ, Nauck MA. Glucagon-like peptide 1(GLP-1) in biology and pathology. Diabetes Metab Res Rev. 2005;21:91-117.

Mirabile R, Kambara T, Gundersen HJ, Maier C. 2013. Stereologic Methods to Estimate Cell Number and Compartment Volume of Acini, Ducts, and Islets in Pancreas of Cynomolgus Monkey Given Albiglutide, a Glucagon like Peptide-1 Receptor Agonist. Poster presentation at the NIDDK-NCI Workshop on Pancreatitis, Diabetes, and Pancreatic Cancer, June 12-13, Bethesda, MD, USA.

Nachnani JS, Bulchandani DG, Nookala A, Herndon B, Molteni A, Pandya P, et al. Biochemical and histological effects of exendin-4 (exenatide) on the rat pancreas. Diabetologia. 2010;53:153-159.

Noel RA, Braun DK, Patterson RE, Bloomgren GL. Increased risk of acute pancreatitis and biliary disease observed in patients with type 2 diabetes: a retrospective cohort study. Diabetes Care. 2009;32:834-838.

Nyborg NCB, Mølck AM, Madsen LW, Knudsen LB. The human GLP-1 analog liraglutide and the pancreas: evidence for the absence of structural pancreatic changes in three species. Diabetes. 2012;61:1243-1249.

Panjwani N, Mulvihill EE, Longuet C, Yusta B, Campbell JE, Brown TJ, et al. GLP-1 receptor activation indirectly reduces hepatic lipid accumulation but does not attenuate development of atherosclerosis in diabetic male *ApoE(-/-)* mice. Endocrinology. 2013;154:127-139.

Parks M, Rosebraugh C. Weighing risks and benefits of liraglutide--the FDA's review of a new antidiabetic therapy. N Engl J Med. 2010;362:774-777.

Pyke C, Knudsen LB. The glucagon-like peptide-1 receptor or not? Endocrinology. 2013;154:4-8.

Rossi MC, Nicolucci A. Liraglutide in type 2 diabetes: from pharmacological development to clinical practice. Acta Biomed. 2009;80:93-101.

Rouse RL, Stewart SR, Rosenzweig BA, Thompson KL, Shea KI, Goodwin DG, et al. Extended exenatide treatment causes pancreatic stress and injury in a rodent model of insulin resistance. The Toxicologist. 2013;132:156. Abstract 725.

Singh S, Chang HY, Richards TM, Weiner JP, Clark JM, Segal JB. Glucagonlike peptide 1-based therapies and risk of hospitalization for acute pancreatitis in type 2 diabetes mellitus: a population-based matched case-control study. JAMA Intern Med. 2013;173:534-539.

Swarup K, Das S, Das VK. Thyroid calcitonin cells and parathyroid gland of the Indian rhesus monkey *Macaca mulatta* in response to experimental hypercalcaemia. Ann Endocrinol (Paris). 1979;40:403-412.

Tatarkiewicz K, Belanger P, Gu G, Parkes D, Roy D. No evidence of drug-induced pancreatitis in rats treated with exenatide for 13 weeks. Diabetes Obes Metab. 2013;15:417-426.

Tatarkiewicz K, Smith PA, Sablan EJ, Polizzi CJ, Aumann DE, Villescaz C, et al. Exenatide does not evoke pancreatitis and attenuates chemically induced pancreatitis in normal and diabetic rodents. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010;299:E1076-E1086.

Vertongen P, Ciccarelli E, Woussen-Colle MC, De Neef P, Robberecht P, Cauvin A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors of types I and II and glucagon-like peptide-I receptors are expressed in the rat medullary carcinoma of the thyroid cell line 6/23. Endocrinology. 1994;135:1537-1542.

Vrang N, Jelsing J, Simonsen L, Jensen AE, Thorup I, Søeborg H, et al. The effects of 13 wk of liraglutide treatment on endocrine and exocrine pancreas in male and female ZDF rats: a quantitative and qualitative analysis revealing no evidence of drug-induced pancreatitis. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012;303:E253-E264.

Xu G, Kaneto H, Lopez-Avalos MD, Weir GC, Bonner-Weir S. GLP-1/exendin-4 facilitates β-cell neogenesis in rat and human pancreatic ducts. Diabetes Res Clin Pract. 2006;73:107-110.

Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both β-cell replication and neogenesis, resulting in increased β-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. Diabetes. 1999;48:2270-2276.

Yu X, Tang H, Huang L, Yang Y, Tian B, Yu C. Exenatide-induced chronic damage of pancreatic tissue in rats. Pancreas. 2012;41:1235-1240.

Zhang J, Stewart S, Xu L, Zhang L, Rosenzweig B, Thompson K, et al. 2013. Extended exenatide treatment causes pancreatic stress and injury in a rodent model of insulin resistance. Poster presentation at the 52nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, March 10-14, San Antonio, TX, USA.