タルグレチンカプセル 75 mg

製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.1　緒言

株式会社ミノファーゲン製薬

目次

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表....3
2.6.1　緒言....3
2.6.1.1　名称及び化学構造式....3
2.6.1.2　ベキサロテンの薬理作用....3
2.6.1.3　予定する効能・効果....3
2.6.1.4　予定する用法・用量....3

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

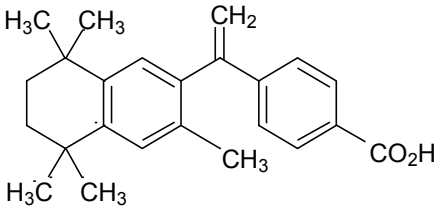
2.6.1.1 名称及び化学構造式

ベキサロテンの名称及び化学構造式は以下の通りである。

一般名： INN Bexarotene
JAN ベキサロテン（日本名）、Bexarotene（英名）

化学名： 4-[1-(3,5,5,8,8-ペンタメチル-5,6,7,8-テトラヒドロナフタレン-2-イル)エテニル]安息香酸（日本名）
4-[1-(3,5,5,8,8-Pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)ethenyl] benzoic acid（英名）

構造式：



分子式： $C_{24}H_{28}O_2$

分子量： 348.48

2.6.1.2 ベキサロテンの薬理作用

ベキサロテンは、臨床で皮膚 T 細胞性リンパ腫（CTCL）に対して 1 日 1 回の経口投与で効力を発揮する、選択的なレチノイド X 受容体（RXR）活性化薬である。ベキサロテンの結合により活性化された RXR は、ホモ二量体、及びペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体（PPAR）、肝臓 X 受容体（LXR）、核内受容体 NGFI-B 等、他の核内受容体とヘテロ 2 量体を形成し、それらを転写活性化させる。ベキサロテンは、細胞増殖阻害作用、アポトーシスの誘導作用、G1 期停止作用を示し、これらは RXR のホモ/ヘテロ二量体形成を介すると考えられる。また、ベキサロテンは、動物発癌モデルにおいて化学予防作用を示し、疾患進展抑制作用を持つ可能性が示唆される。さらに、ベキサロテンは CTCL 由来 HH 細胞の異種移植モデルにおいて、異種移植片の増殖を抑制する。これらの薬理作用によって、ベキサロテンは CTCL の疾患進展を抑制し、改善させると推定される。

2.6.1.3 予定する効能・効果

皮膚 T 細胞性リンパ腫

2.6.1.4 予定する用法・用量

通常､成人にはベキサロテンとして 1 日 1 回体表面積あたり 300 mg を食後経口投与する。なお、 患者の状態により適宜増減、休薬する。

タルグレチンカプセル 75 mg

製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）

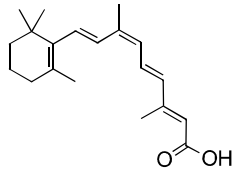
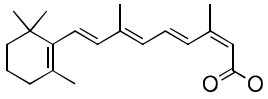
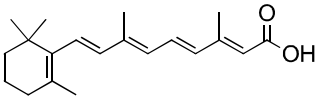
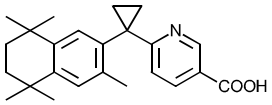
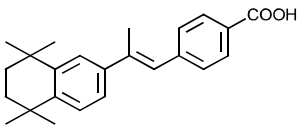
2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.2　薬理試験の概要文

株式会社ミノファーゲン製薬

目次

2.6.2　薬理試験の概要文 5
2.6.2.1　まとめ 5
2.6.2.1.1　効力を裏付ける試験 5
2.6.2.1.2　副次的薬理試験 7
2.6.2.1.3　安全性薬理試験 7
2.6.2.2　効力を裏づける試験 8
2.6.2.2.1　RXR に対する作用 8
2.6.2.2.2　細胞増殖に対する作用 15
2.6.2.2.3　CTCL 由来細胞に対する効果 25
2.6.2.2.4　化学予防効果 29
2.6.2.2.5　その他の抗腫瘍作用 36
2.6.2.2.6　代謝物の薬理作用 40
2.6.2.2.7　その他の薬理試験 42
2.6.2.3　副次的薬理試験 45
2.6.2.4　安全性薬理試験 51
2.6.2.4.1　中枢神経系に及ぼす影響 51
2.6.2.4.2　心血管系に及ぼす影響 52
2.6.2.4.3　呼吸器系に及ぼす影響 53
2.6.2.5　薬理学的薬物相互作用試験 54
2.6.2.6　考察及び結論 54
2.6.2.6.1　ベキサロテンの作用機序 54
2.6.2.6.2　副次的薬理試験 56
2.6.2.6.3　安全性薬理試験 56
2.6.2.7　図表 57
2.6.2.8　参考文献一覧 57

略号一覧

略号	一般名(略称)又は化学名	化学構造式
9-cis	9-cis-レチノイン酸	
13-cis	13-cis-レチノイン酸	
ATRA	All-trans-レチノイン酸	
LGD100268	2-[1-(3,5,5,8,8-Pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthyl)cyclopropyl]pyridine-5-carboxylic acid	
TTNPB	4-[(E)-2-(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチル-2-ナフタレニル)-1-プロペニル]安息香酸	

略号一覧（続き）

略号	省略していない表現 (英語)	省略していない表現 (日本語)
AIDS-KS	AIDS-Kaposi's sarcoma	AIDS-カポジ肉腫
AML	Acute Myeloid Leukemia	急性骨髄性白血病
ANOVA	Analysis of variance	分散分析
AOX	Acyl CoA Oxidase	アシル CoA オキシダーゼ
APL	Acute Promyelocytic Leukemia	急性前骨髄球性白血病
APTT	Activated Partial Thromboplastin Time	活性化部分トロンボプラスチン時間
BE	Bifunctional Enzyme	2 機能性酵素
BHA	Butyl hydroxyanisole	ブチルヒドロキシアニソール
CD38	Cluster of Differentiation 38	---
cDNA	Complementary DNA	相補的 DNA
CTCL	Cutaneous T-Cell Lymphomas	皮膚 T 細胞性リンパ腫
db/db マウス	---	diabetic 肥満マウス
DMBA	7,12- Dimethylbenz(a)anthracene	7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	ジメチルスルホキシド
ER	Estrogen Receptor	エストロゲン受容体
G1 期停止	---	細胞周期の G1 期に停止
HDL	High-Density Lipoprotein	高密度リポ蛋白質
HepG2	---	ヒト肝がん由来細胞株
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell	ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC50	50% Inhibitory Concentration	50%阻害濃度
IHC	Immunohistochemistry	免疫組織化学
Kd	Coefficient of Dissociation	結合定数
LDL	Low-Density Lipoprotein	低密度リポ蛋白質
LXR	Liver X Receptor	肝臓 X 受容体
NGFI-B	Nerve Growth Factor Induced gene-B	神経成長因子誘導遺伝子-B
NMU	N-Nitroso-N-Methylurea	N-ニトロソ-N-メチル尿素
NSCLC	Non-Small-Cell Lung Cancer,	非小細胞肺癌
p21	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor1	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 1
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell	末梢血単核球
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor	ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体
PT	Prothrombin Time	プロトロンビン時間
PXR	Pregnane X Receptor	プレグナン X 受容体
RAR	Retinoic Acid Receptor	レチノイン酸受容体
RXR	Retinoid X receptor	レチノイド X 受容体
SD ラット	Sprague-Dawley Rat	Sprague-Dawley ラット
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate	2-O-テトラデカノイルホルボール-13-酢酸
VDR	Vitamin D Receptor	ビタミン D 受容体

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

2.6.2.1.1.1 RXR に対する作用

ベキサロテンは、*in vitro* 試験系（受容体発現系及びレポーター遺伝子試験系）において、RXR_{α}、RXR_{β}、RXR_{γ} に対し結合して転写活性化した。一方、RAR_{α}、RAR_{β}、RAR_{γ} に対しては、RXR に比べて弱い親和性しか示さず、ほとんど転写活性化しなかった。また、9-cis が RXR、RAR 双方を、ATRA が RAR のみを転写活性化するのに対して、ベキサロテンは RXR に選択的に結合ー転写活性化した。

表 2.6.2.1-1 ベキサロテンの RXR、RAR サブタイプに対する Kd 及び転写活性化 EC50

レチノイド受容体サブタイプ	Kd (nM)[1)]	転写活性化 EC50 (nM)[2)]
RXR_{α}	30	25
RXR_{β}	14	27
RXR_{γ}	15	19
RAR_{α}	6928	>10000
RAR_{β}	>10000	>10000
RAR_{γ}	4804	>10000

1) 2.6.2.2.1(1)参照、2) 2.6.2.2.1(2)参照、各数値は平均値

RXR と他の核内受容体を導入したレポーター遺伝子試験系において、ベキサロテンは RXR:$PPAR_{\alpha}$、RXR:$PPAR_{\gamma}$、RXR:NGFI-B、RXR:LXR、RXR:PXR を顕著に転写活性化した。一方、RXR:RAR_{α}、RXR:RAR_{β}、RXR:RAR_{γ}、RXR:VDR、RXR:TR では、強い活性化は見られず、これらの組合せが RXR 非許容的であるという知見と矛盾しなかった。RXR:PPAR の場合には、ベキサロテンと共に PPAR 基質が作用すると、より強い転写活性化を示した。

2.6.2.1.1.2 細胞増殖に対する作用

種々の増殖性細胞の *in vitro* 培養試験系を用いて、ベキサロテンの DNA 合成、細胞数、生細胞数、アポトーシス誘導、細胞周期に対する作用を検討した。

AIDS-カポジ肉腫由来細胞培養系にベキサロテンを作用させたとき、ベキサロテン濃度依存的な DNA 合成の低下が観察された。また、ヒト卵巣癌及び AML から採取した細胞の初代培養系にベキサロテンを作用させたとき、ベキサロテン添加群では対照群と比べて、ベキサロテン濃度依存的な生細胞数の減少が認められた。同様に、ヒト多発性骨髄腫由来 RPMI8226 細胞及びヒト子宮頸癌由来 ME180 細胞の培養系にベキサロテンを作用させたとき、ベキサロテン濃度依存的な細胞数の減少が認められた。このとき、ME180 細胞で DNA 断片化が観察され、細胞数の減少にアポトーシスが関与している可能性が示唆された。

ヒト前骨髄球性白血病由来 HL60 細胞の培養系に RAR を選択的に転写活性化するレチノイド ATRA を作用させたとき、DNA 合成の低下及び濃度依存的な細胞分化誘導が認められた。

一方、ベキサロテンを作用させた場合には、DNA 合成の低下及び細胞分化の誘導は観察されなかった。一方、ベキサロテン濃度依存的なアポトーシス誘導が認められた。それに対し、RAR を選択的に転写活性化するレチノイド TTNPB では、アポトーシス誘導作用は認められなかった。

ヒト正常乳腺上皮由来 184 細胞及び乳癌由来 T47D 細胞の培養系にベキサロテンを作用させたとき、対照に比べて DNA 合成及び細胞数が減少しており、細胞増殖の阻害が認められた。184 細胞ではアポトーシス誘導が観察されておらず、細胞周期の G1 期停止が認められ、ベキサロテンの細胞周期への作用が示唆された。

2.6.2.1.1.3 CTCL 由来細胞に対する効果

CTCL 由来の HH（菌状息肉症/セザリー症候群以外の CTCL 由来）及び HuT78（セザリー症候群由来）細胞の培養系にベキサロテンを作用させると、濃度依存的な生細胞率の減少が認められた。

CTCL 由来の HH（菌状息肉症/セザリー症候群以外の CTCL 由来）細胞を異種移植したマウスに、ベキサロテンを経口投与したとき、腫瘍組織の成長（異種移植後の腫瘍容積及び腫瘍重量）を対照群に比べて有意に抑制した。

2.6.2.1.1.4 化学予防効果

ベキサロテンは、NMU 誘導-ラット乳癌モデルに経口投与したとき、対照群と比べて統計的に有意に 1 次腫瘍を完全退縮させた。この作用は、陽性対照のタモキシフェン皮下投与よりも強かった。また、ベキサロテンは 2 次腫瘍の予防・遅延に対しても効果を示した。また、タモキシフェン耐性腫瘍を持つ NMU 誘導-乳癌モデルに、タモキシフェンとベキサロテンを併用投与したとき、タモキシフェン単独投与に比べて有意な完全退縮の比率の上昇が認められた。また、ベキサロテンは、NMU 誘導-ラット乳癌モデルにおいて、腫瘍発生率及び腫瘍個数を有意に抑制し、化学予防効果を示した。同様に、Sencar マウス 2 段階発癌モデルにおいても化学予防効果を示した。

2.6.2.1.1.5 その他の抗腫瘍作用

ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞の異種移植モデルに対して、抗腫瘍効果を示した。また、ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞及び乳癌細胞に対して、*in vitro* で細胞増殖阻害効果を示した。一方、ヒト肺癌由来細胞については、*in vitro* での細胞増殖阻害効果は認められたが、異種移植動物では腫瘍に対する効果は認められなかった。また、前立腺癌動物モデルでは、抗腫瘍効果は認められなかった。

2.6.2.1.1.6 代謝物の薬理作用

動物、ヒトでの主要な酸化的代謝物である 6-/7-水酸化体、6-/7-オキソ体のレチノイド受容体（RAR、RXR 各サブタイプ）に対する結合定数及び転写活性化活性を検討した。検討した

代謝物のいずれも、RAR、RXR に対してベキサロテンよりも弱い薬理作用しか持たず、薬効への寄与は低いと考えられた。

2.6.2.1.1.7 その他の薬理試験

急性前骨髄球性白血病（APL）由来細胞及びヒト末梢血単核細胞（PBMC）における CD38 mRNA 発現に対する効果を検討したところ、ベキサロテンはレチノイド応答遺伝子の CD38 mRNA 発現を誘導していた。臨床試験から得られた PBMC における CD38 mRNA 発現量の結果を併せて考えると、臨床での投与量ではレチノイド応答遺伝子である CD38 mRNA を動かすのに十分な血中濃度が得られていると考えられた。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

ニュージーランドウサギにベキサロテンを投与したとき、血漿中の総コレステロール濃度、トリグリセリド濃度は上昇し、一方、HDL-及び LDL-コレステロール濃度に関しては変化がなかった。SD ラットにベキサロテンを投与したとき、血漿中 HDL-コレステロール濃度は上昇し、一方、他のコレステロール画分では変化はなかった。また、HepG2 細胞を用いたレポーター遺伝子試験系では、ベキサロテンは濃度依存的、かつ RXR 依存的に ApoA1 プロモーターを転写活性化した。ベキサロテンは、RXR_{α} を介して *in vitro* 及び *in vivo* で $PPAR_{\alpha}$ を転写活性化した。また、この経路を介して db/db マウスの血漿中トリグリセリド濃度を低下させることが示唆された。HSD ラットで、ベキサロテン投与によって上昇した血漿中トリグリセリド濃度は、フェノフィブラートを用いることにより改善したが、ナイアシン及びロバスタチンでは、有意な改善は認められなかった。また、ZDF ラットでは、ベキサロテンによるトリグリセリド濃度上昇にトリグリセリドのクリアランス低下が関与していることが示唆された。また、ベキサロテンは、SD ラットの血液凝固能に対して影響する可能性が示唆された。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験として、ラット及びイヌを用いて中枢神経系、心血管系及び呼吸器系への影響の有無について検討した。ベキサロテンの QT 間隔に対する影響の有無についてはヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）を安定的に導入したヒト胎児腎臓由来（HEK）293 細胞を用いてホールセルクランプ法で評価した。

ベキサロテンを 100 mg/kg までラットに単回投与又は 4 日間連続投与しても中枢神経系及び呼吸器系機能への影響は見られず、ベキサロテンを 60 mg/kg までラットに 4 日間連続投与しても血圧及び心拍数に影響は認められなかった。ベキサロテンを 10 mg/kg までをイヌに単回投与しても心血管系機能への影響は見られなかった。hERG 試験ではベキサロテンは 0.3 μmol/L（灌流後濃度：0.171 μmol/L）まで hERG 電流に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.2　効力を裏づける試験

2.6.2.2.1　RXR に対する作用

(1) ベキサロテンの $RXR_{\alpha, \beta, \gamma}$ 及び $RAR_{\alpha, \beta, \gamma}$ に対する結合性

添付資料番号：4.2.1.1-1　（参考）

[目的] $RXR_{\alpha, \beta, \gamma}$ 及び $RAR_{\alpha, \beta, \gamma}$ に対する結合を調べ、本薬の RXR 各サブファミリーに対する親和性と選択性について検討する。

[方法] Sf21 昆虫細胞系にヒト RXR_{α}、RXR_{β}、RXR_{γ}、RAR_{α}、RAR_{β}、又は RAR_{γ} 遺伝子を導入・発現させ、細胞粗抽出液を部分精製して得られた画分を用いた。RXR に対する結合性は ^{3}H 標識 9-cis-retinoic acid（9-cis、RXR の天然基質で RXR と RAR の両方に親和性を有する）に対する競合を、RAR に対する結合性は ^{3}H 標識 all trans retinoic acid （ATRA、RAR 選択的な親和性を有する）に対する競合を、それぞれ調べることによって評価した。結合定数 Kd は、Log/Logit 変換及びチェンープルソフ式を用いて算出した。

[成績] 結果を表 2.6.2.2-1 に示す。ベキサロテンの RXR_{α}、RXR_{β}、RXR_{γ} 発現系に対する Kd はそれぞれ 30、14、15 nM （平均値）と算出された。また、RAR_{α}、RAR_{β}、及び RAR_{γ} 発現系に対する Kd はそれぞれ 6298、10000、4804 nM と算出された。
本薬の $RXR_{\alpha, \beta, \gamma}$ に対する Kd（30、14、15 nM）は、競合基質として用いた 9-cis（7、7、17 nM）と大きく変わらず、ほぼ同等の結合能を有すると考えられた。一方、$RAR_{\alpha, \beta, \gamma}$ に対する Kd は、6298、>10000、4804 nM と $RXR_{\alpha, \beta, \gamma}$ の場合に比べて高く、親和性が低いと考えられた。

[結論] ベキサロテンは、レチノイドを基質とする受容体 RXR、RAR の内、RXR に対して高い親和性を有すると考えられた。

表 2.6.2.2-1　RXR サブタイプ及び RAR サブタイプに対する
ベキサロテン、9-cis 及び ATRA の Kd (nM)

	RXR_{α}	RXR_{β}	RXR_{γ}	RAR_{α}	RAR_{β}	RAR_{γ}
ベキサロテン	30 (17)	14 (5)	15 (3)	6298 (827)	>10000	4804 (899)
9-cis	7 (1.4)	7 (1.4)	17 (1)	15.2 (0.2)	13.4 (4)	14.7 (1.8)
ATRA	350 (3.7)	881 (8.6)	288 (7)	15.4 (1.7)	13.2 (2.5)	18 (1)

Kd は、3 回測定による少なくとも 6 実験から得られた平均値(標準誤差)

(2) ベキサロテンによる RXR 転写活性化試験

添付資料番号：4.2.1.1-2　（参考）

[目的] ベキサロテンによる RXR の転写活性化を、レポーター遺伝子試験系を用いて調べる。

[方法] アフリカミドリザル腎臓由来 CV-1 細胞に、ヒト RXR_{α}、RXR_{β}、RXR_{γ}、RAR_{α}、RAR_{β}、又は RAR_{γ} の cDNA をベクターにより移入した。同時に、内部標準の β-ガラクトシダーゼ及び活性化 RXR 又は RAR に対するホルモン応答性プロモーターとルシフェラーゼの cDNA を含むプラスミドの移入も行い、レポーター遺伝子試験（cis-trans 試験）系を構築した。ベキサロテンにより活性化された RXR 又は RAR によって発現するルシフェラーゼを、生物発光を測定して評価した。ベキサロテン存在下、38 時間インキュベートした後、発現したルシフェラーゼを生物発光により測定した。ベキサロテン濃度 10^{-12}～10^{-5} M での生物発光強度の変化から、RXR、RAR 各サブタイプに対する EC50 を算出した。

[成績] 成績を表 2.6.2.2-2 に示す。RXR_{α}、RXR_{β}、RXR_{γ} 転写活性化の EC50 の平均値は、それぞれ 25、27 及び 19 nM であった。一方、RAR_{α}、RAR_{β}、RAR_{γ} に対する EC50 の平均値は、いずれも>10,000 nM であった。また、表 2.6.2.2-2 に示されるように、ベキサロテンは、$RXR_{\alpha, \beta, \gamma}$ を転写活性化した。一方、$RAR_{\alpha, \beta, \gamma}$ については検討した範囲では、ほとんど転写活性化しなかった。

[結論] ベキサロテンは、レチノイドを基質とする受容体 RXR と RAR の内、RXR を選択的に転写活性化したと考えられた。これは、結合での選択性と同様であった。

表 2.6.2.2-2 受容体サブタイプに対するベキサロテンによる転写活性化プロファイル

受容体とサブタイプ名	EC50 平均値(nM)	95%信頼区間
RXR_{α}	25	22 - 29
RXR_{β}	27	24 - 31
RXR_{γ}	19	17 - 22
RAR_{α}	>10000	---
RAR_{β}	>10000	---
RAR_{γ}	>10000	---

(n=10)

(3) RXR 転写活性化試験－他のレチノイドとの比較：

添付資料番号：4.2.1.1-3　（参考）

[目的] ベキサロテンによる RXR の転写活性化を、他のレチノイドと比較する。

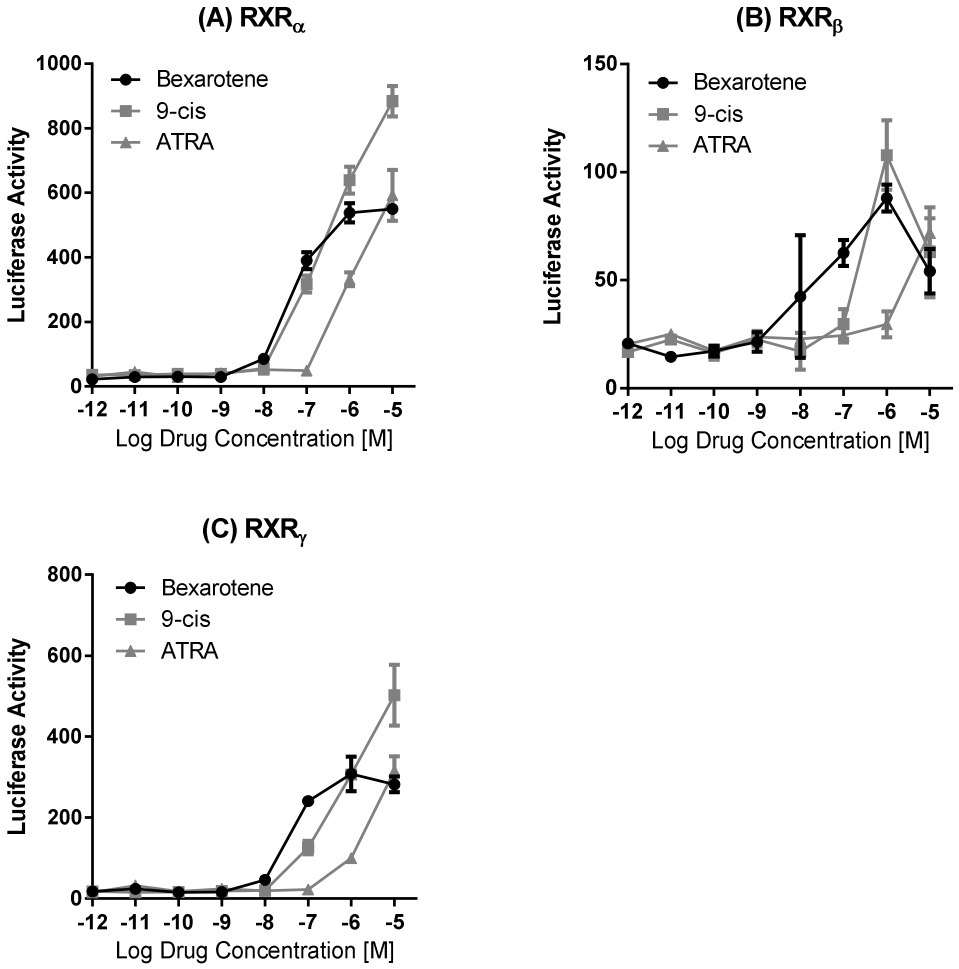
[方法] アフリカミドリザル腎臓由来 CV-1 細胞に、ヒト RXR_{α}、RXR_{β}、又は RXR_{γ} の cDNA を乗せたベクター、内部標準の β-ガラクトシダーゼ及び活性化 RXR に対するホルモン応答性プロモーターとルシフェラーゼの cDNA を含むプラスミドを移入し、cis-trans 試験系を構築した。ベキサロテン、9-cis、又は ATRA により活性化された RXR によって発現するルシフェラーゼを、生物発光を測定して評価した。ベキサロテン、9-cis 又は ATRA 存在下、36 時間インキュベートした後、発現したルシフェ

ラーゼを生物発光により測定した。基質濃度 10^{-12}～10^{-5} M での生物発光強度のプロファイルを比較した。

[成績] 図 2.6.2.2-1 に示すように、いずれの RXR サブタイプにおいても、ベキサロテンは 10^{-8} M 以上の濃度で RXR を活性化させた。ATRA は、より高い 10^{-6}～10^{-5} M の濃度においてのみ RXR を活性化した。9-cis は、ベキサロテンより若干高い 10^{-7} M 以上の濃度で RXR を活性化した。

[結論] ベキサロテンは、検討した全ての RXR サブタイプに対し、9-cis や ATRA よりも強い転写活性化作用を示した。

図 2.6.2.2-1　各種レチノイド（ベキサロテン、9-cis、ATRA）による $RXR_{\alpha, \beta, \gamma}$ 転写活性化－濃度プロファイルの比較



平均値±標準誤差

(4) ベキサロテンによる RXR:核内受容体（NR）ヘテロ 2 量体の活性化：

添付資料番号：4.2.1.1-3（参考）

[目的] ベキサロテンが RXR:NR のヘテロ 2 量体形成を介して、NR を転写活性化させるかを確認する。

[方法] アフリカミドリザル腎臓由来 CV-1 細胞に、ヒト RXR_{α} 及び NR（RAR_{α}、RAR_{β}、RAR_{γ}、VDR、TR、$PPAR_{\alpha}$、$PPAR_{\gamma}$、NGFI-B、LXR 又は PXR）を共発現させた。また、内部標準の β-ガラクトシダーゼ及び活性化 NR に対応するホルモン応答性プロモーターとルシフェラーゼの形質導入を共に行い、2 つの核内受容体を同時形質移入したレポーター遺伝子試験系を構築した。ベキサロテンにより転写活性化されるヘテロ 2 量体によって発現するルシフェラーゼを、生物発光を測定して評価した。陽性対照として各 NR に対する基質を使用した。ベキサロテン又は陽性/陰性対照存在下、36 時間インキュベートした後、発現したルシフェラーゼを生物発光により測定した。発光強度は、内部標準 β ガラクトシダーゼの活性により補正した。各核内受容体に対する試験デザインを表 2.6.2.2-3 にまとめた。

[成績] 図 2.6.2.2-2 に示すように、検討した条件では、ベキサロテンは RXR:RAR_{α} 及び RXR:TR をほとんど活性化しなかった。また、RXR:VDR、RXR:RAR_{β}、RXR:RAR_{γ}、に対し弱い転写活性化作用しか示さなかった。一方、RXR:LXR を顕著に転写活性化した。図 2.6.2.2-3 に示すように、ベキサロテンは RXR:$PPAR_{\alpha}$ 及び RXR:$PPAR_{\gamma}$ に対する転写活性化作用も示した。これらについては、RXR 基質（ベキサロテン）、PPAR の基質（ゲムフィブロジル又は BRL49653）単独の場合に比べて、両者が共存した方がより強い転写活性化が観察された。$PPAR_{\gamma}$ については、レポーターのホルモン応答性エレメントを $PPAR_{\gamma}$ 特異的な CYP4A1、ARE6、ARE7 に変更して更に検討したところ、図 2.6.2.2-4 に示すように、弱い転写活性化作用しか認められなかった。図 2.6.2.2-5 に示すように、ベキサロテンは RXR:NGFI-B を顕著に転写活性化した。また、図 2.6.2.2-6 に示すように、ベキサロテンは RXR:PXR を顕著に転写活性化した。また、PXR を直接転写活性化することが示唆された。

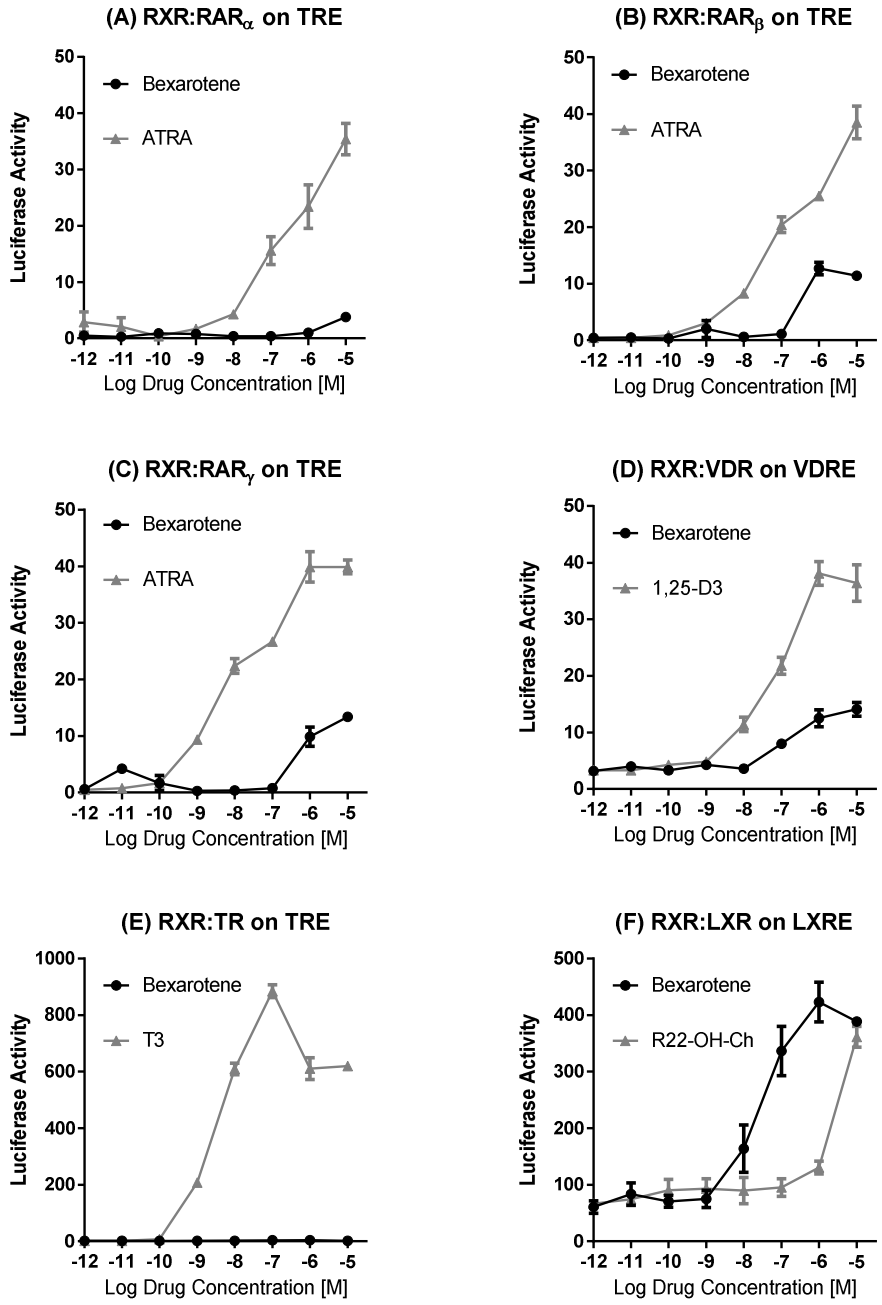
[結論] 検討した受容体ヘテロ 2 量体の組合せの内、ベキサロテンは RXR:$PPAR_{\alpha}$、RXR:$PPAR_{\gamma}$、RXR:NGFI-B、RXR:LXR、RXR:PXR を顕著に転写活性化した。一方、RXR:RAR_{α}、RXR:RAR_{β}、RXR:RAR_{γ}、RXR:VDR、RXR:TR では、強い活性化は見られず、これらの組合せが RXR 非許容的であるという知見と矛盾しなかった。RXR:PPAR の場合には、ベキサロテンと共に PPAR 基質が作用すると、より強い転写活性化を示した。$PPAR_{\gamma}$ において、レポーターの応答性エレメントによっては転写活性化が認められず、全ての $PPAR_{\gamma}$ 下流経路が活性化されるとは限らないことを示唆した。

表 2.6.2.2-3 試験デザインのまとめ

	NR	基質(濃度)	評価方法	レポーター
(A)	RAR_{α}	BEX[2] (10^{-12}～10^{-5} M) ATRA (10^{-12}～10^{-5} M)	基質間で生物発光強度の濃度プロファイルを比較	TREpalx2.tk.luc
(B)	RAR_{β}	BEX (10^{-12}～10^{-5} M) ATRA (10^{-12}～10^{-5} M)	基質間で生物発光強度の濃度プロファイルを比較	TREpalx2.tk.luc
(C)	RAR_{γ}	BEX (10^{-12}～10^{-5} M) ATRA (10^{-12}～10^{-5} M)	基質間で生物発光強度の濃度プロファイルを比較	TREpalx2.tk.luc
(D)	VDR[1]	BEX (10^{-12}～10^{-5} M) 1,25-D3[3] (10^{-12}～10^{-5} M)	基質間で生物発光強度の濃度プロファイルを比較	DR(3)x2.tk.luc
(E)	TR[4]	BEX (10^{-12}～10^{-5} M) T3[5] (10^{-12}～10^{-5} M)	基質間で生物発光強度の濃度プロファイルを比較	TREpalx2.tk.luc
(F)	LXR[6]	BEX (10^{-12}～10^{-5} M) R22-OH-Ch[7] (10^{-12}～10^{-5} M)	基質間で生物発光強度の濃度プロファイルを比較	LXREx2.tk.luc
(G)	$PPAR_{\alpha}$[8]	BEX (10^{-6} M) GEM [9] (10^{-4} M)	DMSO、BEX、GEM、BEX+GEM 間で生物発光強度を比較	AOX PPRE BE PPRE
(H)	$PPAR_{\gamma}$[8]	BEX (10^{-6} M) BRL[10] (10^{-6} M)	DMSO、BEX、BRL、BEX+BRL 間で生物発光強度を比較	AOX PPRE BE PPRE
(I)	$PPAR_{\gamma}$	BEX (10^{-7} M) BRL ($5x10^{-6}$ M)	DMSO、BEX、BRL、BEX+BRL 間で生物発光強度を比較	3xCYP4A1.tk.luc 3xARE6.tk.luc 3xARE7.tk.luc
(J)	NGFI-B[11]	BEX (10^{-11}～10^{-5} M)	発現系[RXR-、NGFI-B-]、[RXR-、NGFI-B+]、[RXR+、NGFI-B-]、[RXR+、NGFI-B+]間で生物発光強度の濃度プロファイルを比較	NBRE reporter(-65).pro.luc
(K)	PXR[12]	BEX (10^{-6} M)	発現系[RXR-、PXR-]、[RXR-、PXR+]、[RXR+、PXR-]、[RXR+、PXR+]間で生物発光強度を比較	CYP3A1.tk.luc

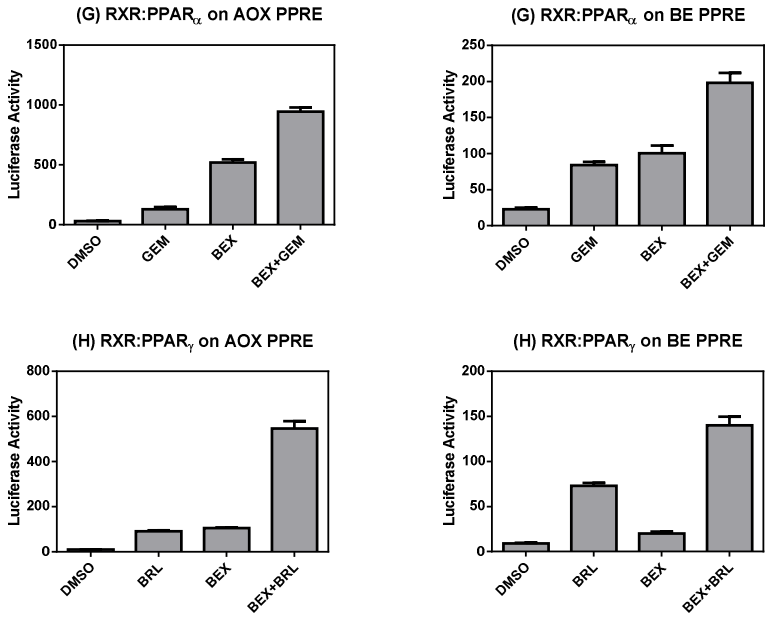
1) ビタミン D 受容体、2) ベキサロテン、3) 1,25-デヒドロキシビタミン D3、4) 甲状腺ホルモン受容体、5) 甲状腺ホルモン T3、6) 肝臓 X 受容体、7) 22(R)-ヒドロキシコレステロール、8) ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 α, γ、9) ゲムフィブロジル、10) BRL49653、11)核内受容体 NGFI-B、12) プレグナン X 受容体

図 2.6.2.2-2　ベキサロテンによる RXR:RAR$_\alpha$、RXR:RAR$_\beta$、RXR:RAR$_\gamma$、RXR:VDR、RXR:TR、RXR:LXR の転写活性化ー濃度プロファイル



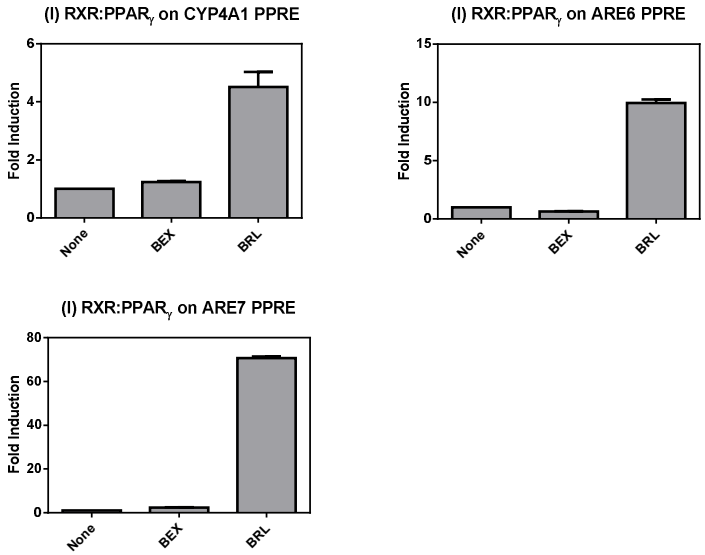
レポーターNR 応答性エレメント：　TREpal [RAR$_{\alpha,\beta,\gamma}$, 及び TR]、DR(3) [VDR]、LXRE [LXR]
平均値±標準誤差、実験条件:表 2.6.2.2-3 (A)～(F)

図 2.6.2.2-3　ベキサロテン（BEX）による(G)RXR:PPARα又は(H)RXR:PPARγの転写活性化



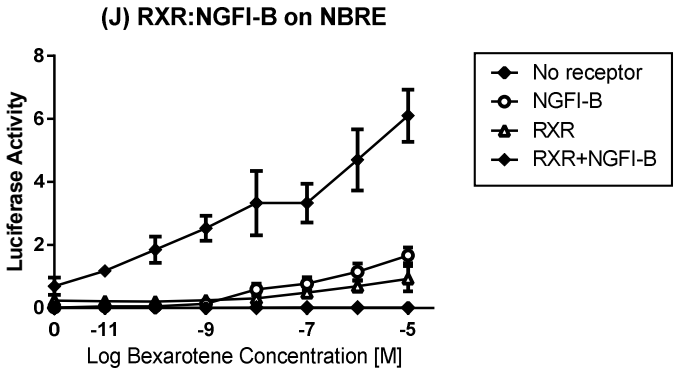
レポーターPPAR 応答性エレメント（Acyl CoA Oxidase: AOX 及び Bifunctional Enzyme: BE）間の比較
平均値＋標準偏差、GEM：ゲムフィブロジル(PPARα陽性対照)、BRL: BRL49653(PPARγ陽性対照)
実験条件: 表 2.6.2.2-3(G)、(H)

図 2.6.2.2-4　ベキサロテン（BEX）による RXR:PPARγの転写活性化



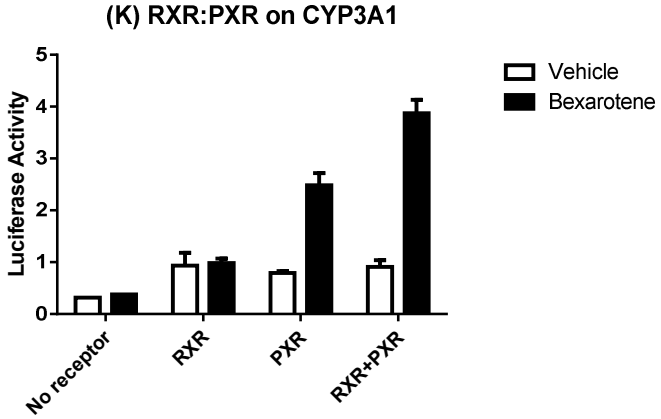
特異的レポーター(PPARγ応答性エレメント：CYP4A1、ARE6、ARE7)での検討
平均値＋標準誤差、BRL: BRL49653(PPARγ陽性対照)
実験条件: 表 2.6.2.2-3(I)

図 2.6.2.2-5　ベキサロテンによる RXR:NGFI-B の転写活性化



4 種の発現細胞間での比較：No receptor: [RXR-、NGFI-B-]、NGFI-B: [RXR-、NGFI-B+]、RXR: [RXR+、NGFI-B-]、RXR+NGFI-B=[RXR+、NGFI-B+]
レポーターNGFI-B 応答性エレメント：NBRE (21-hydroxylase NBRE reporter[-65])
横軸 0=対照
平均値±標準誤差
実験条件: 表 2.6.2.2-3(J)

図 2.6.2.2-6　ベキサロテンによる RXR:PXR の転写活性化



4 種の発現細胞間での比較：No receptor: [RXR-、PXR-]、RXR: [RXR+、PXR-]、PXR: [RXR-、PXR+]、RXR+PXR=[RXR+、PXR+]
レポーターPXR 応答性エレメント：CYP3A1
平均値+標準誤差
実験条件: 表 2.6.2.2-3(K)

2.6.2.2.2　細胞増殖に対する作用

(1) AIDS-カポジ肉腫（AIDS-KS）由来細胞培養系に対する増殖抑制作用：

添付資料番号：4.2.1.1-4（参考）

[目的] AIDS-KS 由来細胞でのベキサロテンの細胞増殖抑制作用を調べる。

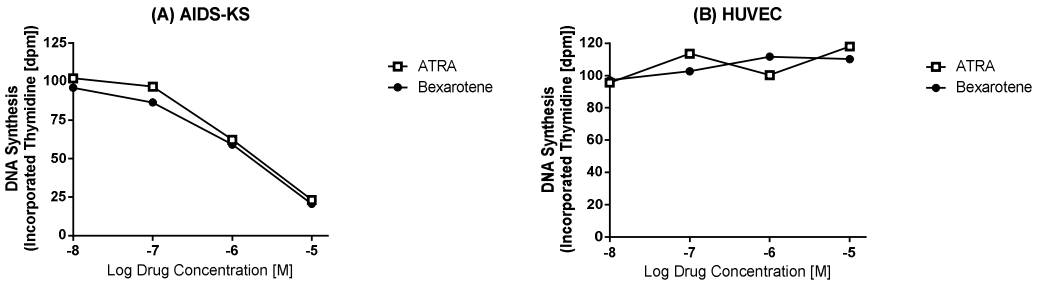
[方法] AIDS-KS 細胞は、体幹・上肢にカポジ肉腫を有する若い HIV-1 陰性のホモセクシャル男性から生検採取した組織片より得た。細胞は、ゼラチン化したフラスコで血清

培地下単層培養し、ゼラチンコーティングした 96 穴プレートに再播種して用いた。18 時間培養後、無血清培地に交換して更に 24 時間培養後、ベキサロテン又は ATRA（陽性対照）を添加した無血清培地に交換した。1 μCi/well [^{3}H]チミジンを培地に加え、24 時間後の DNA への取込み量を放射能で測定し、培養系での細胞増殖を直接評価した。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞培養系に対しても、同様にチミジン取込みの影響を検討した。

[成績] 図 2.6.2.2-7 に示すように、10^{-8}～10^{-5} M で、ベキサロテンは陽性対照の ATRA と同様に AIDS-KS 由来細胞の DNA 合成（チミジン取込み）を、濃度依存的に阻害した。一方、ヒト臍帯静脈内皮細胞培養系では ATRA、ベキサロテン共に DNA 合成の低下は見られなかった。

[結論] AIDS-KS 由来細胞培養系において、ベキサロテンの濃度依存的な増殖抑制作用が認められた。

図 2.6.2.2-7　ベキサロテンの(A) AIDS-KS 由来細胞及び(B)ヒト臍帯静脈内皮細胞培養系の DNA 合成（チミジン取込み）に対する影響



(2) ヒト腫瘍細胞初代培養系に対する増殖抑制作用：

添付資料番号：4.2.1.1-5（参考）

[目的] ベキサロテンのヒト腫瘍細胞初代培養系に対する増殖抑制作用を調べる。

[方法] オンコテック社で採取、初代培養された 25 株の腫瘍細胞を使用した（卵巣癌：4、子宮頸癌：4、メラノーマ：4、大腸癌：4、乳癌：3、急性骨髄性白血病（AML）：5、ミューラー管腫瘍：1）。

初代培養系（固形癌）：腫瘍組織は、5 mL の培地（10% 牛胎仔血清、ペニシリン/ストレプトマイシン、2 mM グルタミン含有 RPMI1640）中、脱凝集・分散・洗浄して試験に供した。ベキサロテンの増殖抑制効果は、Extreme Drug Resistance（EDR）法により評価した。

EDR 法：腫瘍細胞を 0.12%軟寒天培地に分散し、24 穴プレート上の寒天下層（0.4%）上に細胞数約 20000 で播種し、翌日 1～100 nM の終濃度となるようにベキサロテンを添加し、3 日間培養後、2 日間[^{3}H]チミジンを曝露（5 mCi/well）する。その後、

寒天培地を溶かしガラス繊維フィルター上に集細胞し、生存細胞%をベキサロテン群と対照群の比較から算出した。

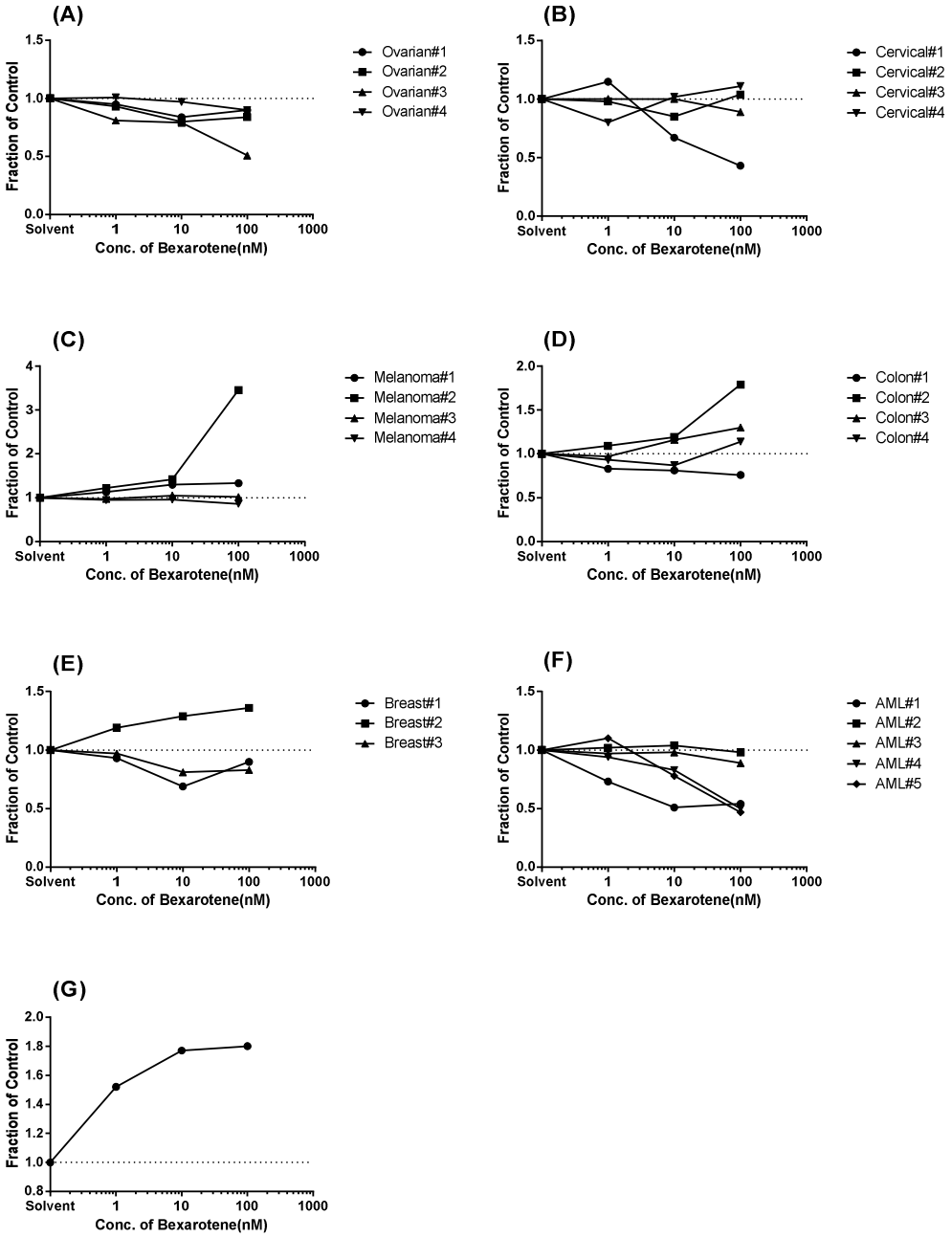
初代培養系（AML）：患者より採取した細胞を、リンパ球分離液中で遠心分離し、分離・濃縮して試験に供した。ベキサロテンの増殖抑制効果は、Differential Staining Cytotoxicity（DISC）法により評価した。

DISC 法: 白血病性の細胞を 1～100 nM のベキサロテン添加/非添加で 4 日間培養後、死細胞をニグロシン存在/非存在下ファストグリーンで染色し、計数内部標準として一定量のアヒル赤血球を加えた。標本は、遠心法で顕微鏡用スライド上に集細胞し、生細胞をヘマトキシリン・エオシン染色又はロマノフスキー染色した。白血病性細胞の生細胞数は、色素排除試験及び形態学的観察を行い、内部標準のアヒル赤血球細胞と比較することにより求めた。ベキサロテンの効果は、ベキサロテン群と対照群の生細胞数を比較することにより評価した。

[成績] 結果を、生細胞数の対照群に対する比率として図 2.6.2.2-8 に要約する。卵巣癌の 4 例中 4 例、AML の 5 例中 4 例において、ベキサロテンによる増殖抑制が認められた。また、濃度依存的又は高濃度で定常状態に到達する傾向が観察された。一方、その他の癌から得られた細胞においては、株により、又はベキサロテン濃度により増殖抑制、増殖刺激、といった雑多な応答が示され、一定の傾向は認められなかった。

[結論] ベキサロテンを各種癌由来の腫瘍細胞初代培養系に作用させたとき、卵巣癌（4/4）及び AML（4/5）由来細胞では細胞生存率は低下したものの、その他の細胞では生存細胞率は減少／不変／上昇が癌腫内で同時に観察され、一定の傾向を示さなかった。個体数及び試料数が限られ、実験繰返し数が N=1 であったため、本試験の結果だけからでは本薬の細胞増殖に対する効果について結論を得ることは困難であった。

図 2.6.2.2-8　ヒト腫瘍細胞初代培養に対するベキサロテンの増殖抑制作用



(A) 卵巣癌、(B) 子宮頸癌、(C) メラノーマ、(D) 大腸癌、(E) 乳癌、(F) AML、(G)ミューラー管腫瘍
各折れ線プロットは、1 名の患者から採取された癌組織由来の細胞から得た。

(3) ヒト子宮頸癌細胞及び骨髄腫細胞の増殖に対する影響：

添付資料番号：4.2.1.1-6（参考）

[目的] ベキサロテンの細胞増殖に対する影響をヒト多発性骨髄腫及びヒト子宮頸癌由来細胞を用いて調べる。

[方法] 評価には、ヒト多発性骨髄腫由来 RPMI8226 細胞及びヒト子宮頸癌由来 ME180 細胞を用いた。細胞増殖は、4 日間培養での生細胞数と DNA 合成、及び 6 日間培養での細胞数をそれぞれ対照群に対する比率として評価した。生細胞数は、テトラゾリウム塩を用いて反応時間 4 時間で評価し、DNA 合成は[^{3}H]標識チミジンの取込み量で評価した。また、細胞数は、トリパンブルー染色により評価した。細胞培養は、RPMI8226: 1000 細胞/well、ME180: 2000 細胞/well の播種数で、96 穴プレートを用いて 37℃、5%CO_2 でそれぞれ 10%牛胎仔血清含有の RPMI 培地及び McCoy's 5a 培地で行った。

[成績] 4 日間培養時の生細胞数で評価した場合、RPMI8226 細胞では 1 μM で 50%以上の減少が見られたのに対し、ME180 細胞では 20%程度の減少にとどまった（図 2.6.2.2-9）。また、DNA 合成で評価したときも同様であった。一方、より長い 6 日間の培養時の細胞数で評価したとき、ベキサロテンは RPMI8226 及び ME180 細胞の細胞増殖を共に濃度依存的に阻害し、1 μM では ME180 細胞において RPMI8226 細胞よりも更に顕著な 98%の減少が認められた（図 2.6.2.2-10）。このとき、ME180 細胞では DNA の断片化が認められ、こうした細胞増殖の阻害にアポトーシスが関与していることが示唆された。

[結論] ベキサロテンが由来の異なる細胞の増殖を抑制する効果が確認された。また、ヒト子宮頸癌由来 ME180 細胞での結果から、細胞増殖抑制効果にはアポトーシス誘導が関与していることが示唆された。

図 2.6.2.2-9 ベキサロテンの(A)ヒト多発性骨髄腫由来 RPMI8226 細胞及び(B)ヒト子宮頸癌由来 ME180 細胞の細胞増殖（4 日間培養での生細胞数による評価）に対する影響

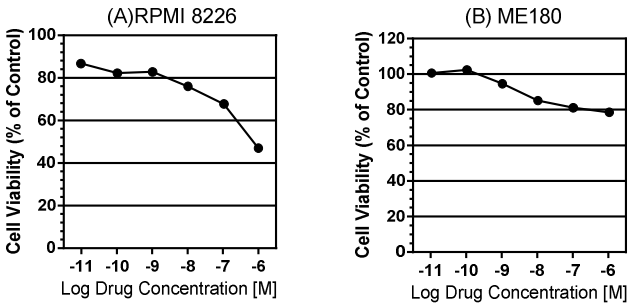
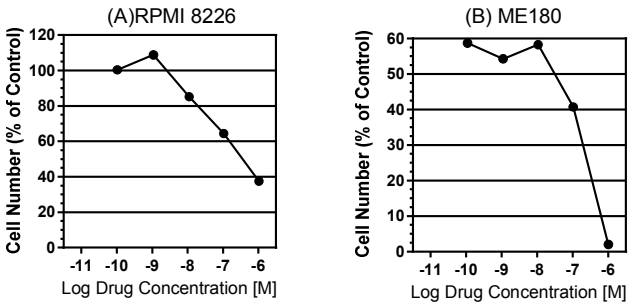


図 2.6.2.2-10 ベキサロテンの(A)ヒト多発性骨髄腫由来 RPMI8226 細胞及び(B)ヒト子宮頸癌由来 ME180 細胞の細胞増殖（6 日間培養での細胞数）に対する影響



(4) ヒト前骨髄球性白血病由来 HL60 細胞に対するアポトーシス誘導作用：

添付資料番号：4.2.1.1-7（参考）

[目的] ヒト前骨髄球性白血病由来 HL60 細胞に対するベキサロテンの細胞増殖抑制及びアポトーシス誘導作用を検討する。

[方法] HL60 細胞は、96 穴プレートに 1000 細胞/well で播種し、ベキサロテン又は ATRA 存在下培養し、各評価に用いた。細胞増殖は、1μCi /well [^{3}H]チミジン添加培地で 96 時間培養後のチミジン取込み量から DNA 合成量として評価した。細胞分化は、報告されているニトロブルーテトラゾリウム（NBT）法の変法により評価し、生細胞数は、600 nm での濁度から評価した。アポトーシス誘導は、DNA の断片化、細胞形態学的観察、及びトランスグルタミナーゼ活性から評価した。DNA 断片化は、Lanotte らの報告に類似した条件で行い、ベキサロテン存在/非存在下 96 時間培養した後に細胞を溶解し、遠心により低分子量 DNA を分離してアガロースゲル電気泳動を行い、断片化した DNA を臭化エチジウム染色により紫外線下観察した。また、細胞形態学的観察は、ディフ・クイック染色液で染色し、光学顕微鏡で形態学的変化を観察した。トランスグルタミナーゼ活性の測定は、Davies らの報告に類似の条件で行い、[^{3}H]プトレシンの時間及びカルシウムイオン依存的なカゼインへの取込みを評価した。

[成績] 図 2.6.2.2-11(A)に示すように、RAR 選択的レチノイド ATRA が HL60 細胞のチミジン取込みを阻害したのに対して、RXR 選択的なベキサロテンは、検討された濃度では阻害を示さなかった。また、図 2.6.2.2-11(B)に示すように、検討した 10^{-9}～10^{-6} M の範囲では、RXR 選択的なベキサロテンは、HL60 細胞で細胞分化の指標である NBT 陽性細胞の割合を増加させることはなかった。一方、RAR 選択的な ATRA は、NBT 陽性細胞の割合を濃度依存的に増加させ、EC50 は 2.0 μM 付近であった。

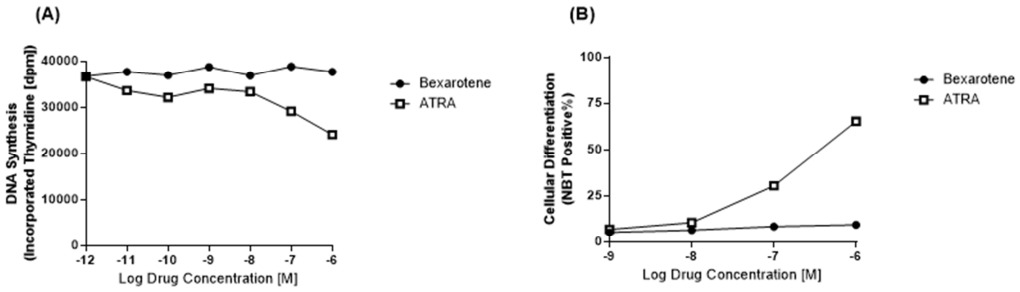
アポトーシス誘導（トランスグルタミナーゼ活性）：図 2.6.2.2-12 に示すように、RXR 選択的なベキサロテンは、HL60 細胞系に対してトランスグルタミナーゼ活性

を濃度依存的に誘導し、その EC50 は 6.0 nM であった。一方、RAR 選択的なレチノイドである TTNPB では、トランスグルタミナーゼ活性の誘導は見られなかった。

アポトーシス誘導（DNA 断片化及び細胞形態学的観察）：表 2.6.2.2-4 にまとめたように、HL60 及び NB4 細胞で、ベキサロテンは DNA 断片化を誘導し、エンドヌクレアーゼがヌクレオソーム DNA に作用したときの特徴である 180～220 bp の DNA 片が観察された。また、凝縮した核・細胞質、細胞膜の多数の小疱形成、並びにアポトーシス小体形成を含む細胞形態学的な変化が認められた。

[結論] ATRA が HL60 細胞系に対して細胞増殖抑制作用を示したのに対し、ベキサロテンは示さなかった。同様に、ベキサロテンは ATRA で認められた細胞分化作用も示さなかった。しかし、ベキサロテンは、HL60 細胞に対して DNA 断片化、トランスグルタミナーゼ活性の誘導、アポトーシス小体形成といった複数のアポトーシス誘導の兆候を示した。

図 2.6.2.2-11　ベキサロテン(●)、ATRA(□)の HL60 細胞の(A)細胞増殖及び(B)細胞分化に対する影響



(A) 細胞増殖は、DNA 合成(チミジン取込み量)で評価。96 時間ベキサロテン又は ATRA 存在下培養後に、[^{3}H]チミジンを添加して測定。4 回の測定の平均値。

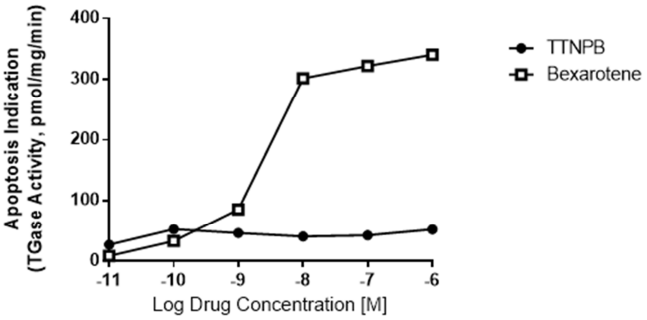
(B) 細胞分化は、NBT 法の変法により分化細胞の特徴である青黒色のフォルマザン顆粒形成の割合%を指標として評価。最低限 300 細胞を総数として評価。

表 2.6.2.2-4　HL60 及び NB4 細胞系におけるベキサロテンによるアポトーシス誘導に関する結果の要約

	DNA 断片化	アポトーシス小体
対照	－	－
ベキサロテン	＋	＋

HL60 及び NB4 細胞系を、ベキサロテン存在/非存在下で培養。DNA 断片化と形態学的変化を観察。それぞれの細胞系で独立した 3 回の実験から要約を得た。

図 2.6.2.2-12　ベキサロテン(□)、TTNPB(●)の HL60 細胞における
アポトーシス誘導に対する効果



ベキサロテン：RXR 選択的アゴニスト、TTNPB：RAR 選択的アゴニスト
アポトーシス誘導は、トランスグルタミナーゼ活性より評価。トランスグルタミナーゼ活性は、時間依存、カルシウムイオン依存的な[^{3}H]プトレシンのカゼインへの取込みにより測定。

(5) 細胞周期に対する影響：

添付資料番号：4.2.1.1-8（参考）

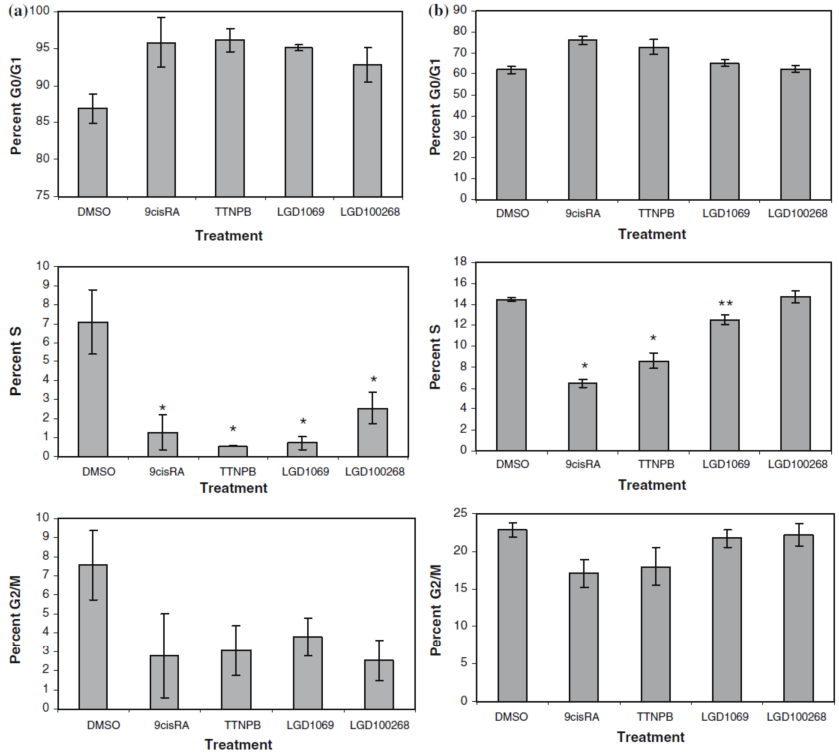
[目的] 各種レチノイドにより細胞増殖抑制が起きるヒト正常乳腺上皮由来 184 細胞及び乳癌由来 T47D 細胞を用い、ベキサロテン及び他のレチノイドの細胞周期に対する影響を調べる。

[方法] レチノイドとして、RAR 選択的な TTNPB、RXR 選択的なベキサロテン及び LGD 100268、及び RAR と RXR の両方を活性化する 9-cis を用いた。実験系として、ヒト正常乳腺上皮由来 184 細胞と乳癌由来 T47D 細胞を使用した。細胞増殖は、ベキサロテンを含むレチノイド 10^{-6} M 存在/非存在下 8～12 日間培養したときの 490 nm での濁度を継時的に測定することより生細胞数を評価した。細胞周期は、[^{3}H]チミジン取込み量、及びフローサイトメトリーにより評価した。フローサイトメトリーは、10^{-6} M のベキサロテン及び他のレチノイド存在/非存在下（DMSO 対照）、72 時間培養した細胞をヨウ化プロピジウム染色し、3 回計数して平均値+/-標準偏差として算出して行った。結果に対して、Student の t-検定を行った。Rb 及びサイクリン D1 蛋白質の定量は、マウス抗サイクリン D1 抗体及びマウス抗 Rb 抗体を用いたウェスタンブロット法により行った。

[成績] 正常乳腺上皮由来 184 細胞及び乳癌細胞由来 T47D 細胞の細胞増殖を、ベキサロテン及び他のレチノイドは顕著に抑制した。これらの細胞の細胞周期に対して、ベキサロテン及び他のレチノイドは G1 期停止効果を示した（図 2.6.2.2-13）。このとき、T47D 細胞では、カスパーゼ 3 の活性が上昇してアポトーシス誘導が認められたが、184 細胞では認められなかった。これらの結果から、184 細胞ではベキサロテン及び他のレチノイドによる細胞増殖抑制は、アポトーシスではなく G1 期停止によるものである可能性が示唆された。G1 期の細胞周期に関与することが知られている Rb 蛋白質のリン酸化について調べると、DMSO に比べいずれのレチノイドにおいてもリン酸化比率が減少していた（図 2.6.2.2-14）。さらに、上流蛋白質の一つであるサイクリン D1 についても調べると、RXR に特異的なベキサロテン及び LGD 100268 においてのみ DMSO に比べて低下する傾向が認められた。

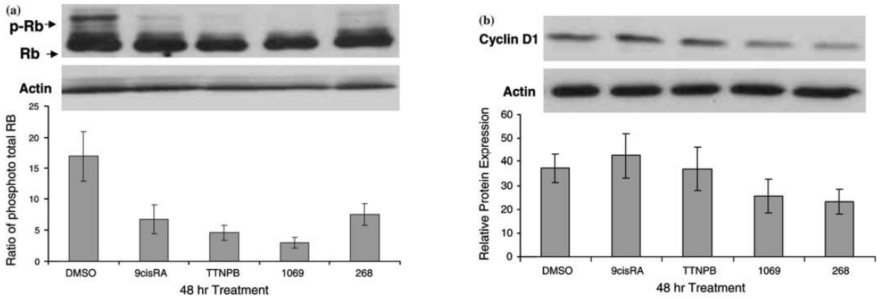
[結論] ベキサロテン及び他のレチノイドの細胞増殖抑制効果には、アポトーシス誘導に加えて、細胞周期の G1 期停止も関与している可能性が示唆された。

図 2.6.2.2-13 ベキサロテン及び他のレチノイド（10^{-6} M）存在下/非存在下培養した(a)ヒト正常乳腺上皮由来 184 細胞及び(b)乳癌由来 T47D 細胞における細胞周期



平均値±標準偏差(N=3)、72 時間培養後のヨウ化プロピジウム染色－フローサイトメトリーによる結果（対照：DMSO）、LGD1069：ベキサロテン、LGD100268：RXR 選択的レチノイド、TTNPB: RAR 選択的レチノイド、9cisRA: 9-cis、RXR・RAR 双方を活性化するレチノイド
*: P<0.001、**: p<0.005(共に両側)

図 2.6.2.2-14 ベキサロテン及び他のレチノイド存在下/非存在下培養したヒト正常乳腺上皮由来 184 細胞での(a)リン酸化 Rb 蛋白質のリン酸化比率及び(b)サイクリン D1 蛋白質発現量



平均値±標準偏差(N=3)、β アクチンで標準化した値。DMSO：対照、9cisRA: 9-cis、RXR・RAR 双方を活性化するレチノイド、TTNPB: RAR 選択的レチノイド、1069: ベキサロテン、268: LGD100268、RXR 選択的レチノイド

2.6.2.2.3　CTCL 由来細胞に対する効果

(1) CTCL 由来細胞に対する *in vitro* 抗腫瘍作用

添付資料番号：4.2.1.1-9（評価資料）

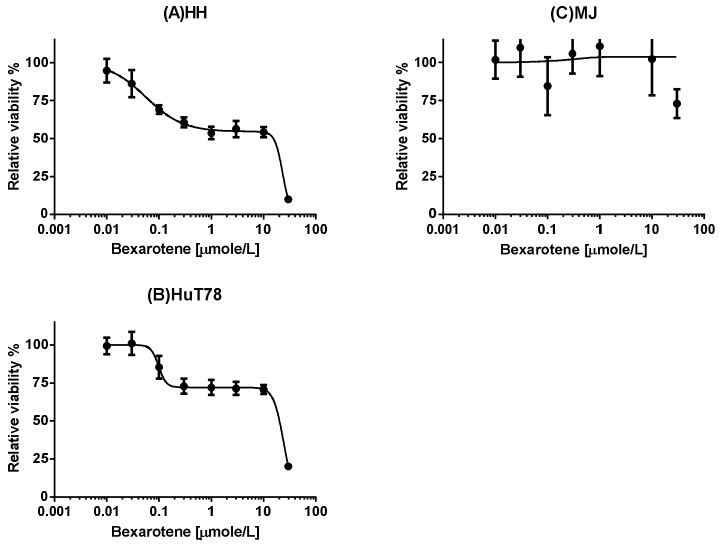
[目的] ヒト皮膚 T 細胞性リンパ腫（CTCL）由来細胞の *in vitro* での増殖に対するベキサロテンの効果を検討する。

[方法] ヒト CTCL 細胞として、HH 細胞（菌状息肉症/セザリー症候群以外の CTCL 由来）、HuT78 細胞（セザリー症候群由来）、及び MJ 細胞（菌状息肉症由来）を使用した。細胞数 10^4/well で播種し、0.01～30 μM のベキサロテン存在/非存在下で 96 時間培養を行い、cell counting kit で生細胞数を測定し、対照群に対する割合から細胞生存率を算出した。

[成績] HH 細胞及び HuT78 細胞では、ベキサロテン濃度依存的な細胞生存率の減少が観察され、途中でプラトーが見られる二相性の減少であった（図 2.6.2.2-15(A)及び(B)）。低濃度側、高濃度側の IC50 は、HH 細胞では 0.06 μM と 23.28 μM、HuT78 細胞では 0.10 μM と 24.32 μM であった。一方、MJ 細胞では濃度依存的な細胞生存率の減少は認められなかった。

[結論] ベキサロテンは、CTCL 由来の HH（菌状息肉症/セザリー症候群以外の CTCL 由来）及び HuT78（セザリー症候群由来）細胞に対して、*in vitro* で濃度依存的な抗腫瘍効果を示した。

図 2.6.2.2-15 ベキサロテンのヒト CTCL 由来(A)HH 細胞、(B)HuT78 細胞、及び(C)MJ 細胞の細胞生存率に対する阻害効果



平均値±標準偏差(n=6)

(2) CTCL 由来細胞異種移植モデルに対する抗腫瘍作用

添付資料番号：4.2.1.1-10（評価資料）

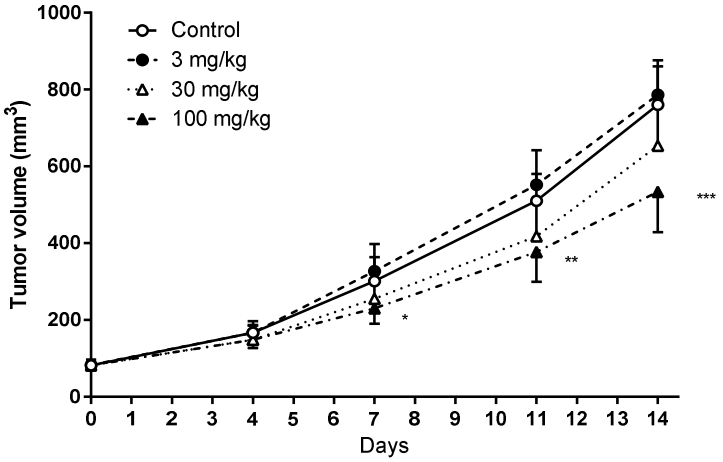
[目的] ヒト皮膚 T 細胞性リンパ腫（CTCL）由来 HH 細胞を皮下に移植した免疫不全マウスを用いてベキサロテンの抗腫瘍効果を検討する。

[方法] CTCL 由来細胞の内、生着可能で異種移植モデルが構築可能であった HH 細胞を使用した。*in vitro* で培養した HH 細胞を 5 週齢の雌 CB17/Icr-*Prkdc*^{scid}/CrlCrlj マウスの右背部皮下に $5\times10\times10^6$ cells/0.1 mL/body の条件で移植した。2 週間投与、4 週間投与それぞれについて、3、30、100 mg/kg 及び 対照（媒体投与）群を設定した（各 n=10）。平均腫瘍容積が 82.8 mm^3 に到達した時点（細胞移植後 10 日、Day 0 と設定）で群分けを行った。Day 0～13（2 週間投与群）又は Day 0～27（4 週間投与群）にベキサロテン又は媒体（マクロゴール 400/ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート/3(2)-t-ブチル-4-ヒドロキシアニソール/ポリビニルピロリドン K 90/日本薬局方 注射用水）を 1 日 1 回経口投与した。実験期間中、体重及び腫瘍径（長径及び短径）を測定し、体重から体重変化率を、腫瘍径から腫瘍容積をそれぞれ算出した。

[成績] ベキサロテン投与群において腫瘍増殖の抑制傾向が認められた。本試験条件下において、HH 担がん免疫不全マウスの一般状態に重篤な影響を及ぼすことなく、100 mg/kg の 2 週間投与は腫瘍容積及び腫瘍重量に、30 及び 100 mg/kg の 4 週間投与は腫瘍容積に、それぞれ有意な抗腫瘍効果を示した。

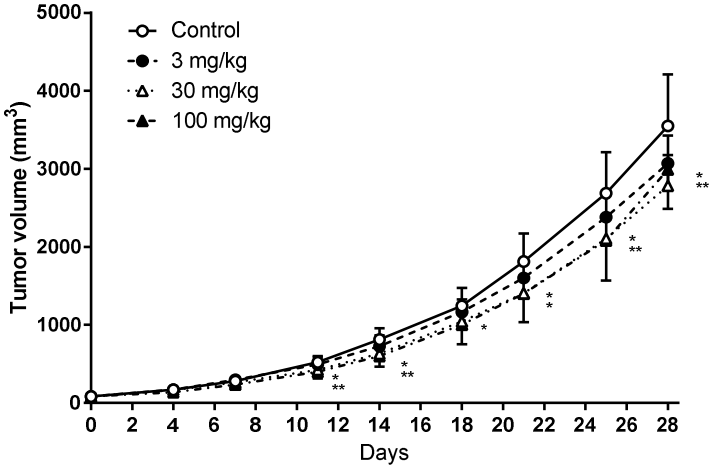
[結論] ベキサロテンは、CTCL 由来の HH（菌状息肉症/セザリー症候群以外の CTCL 由来）細胞異種移植動物において、有意な抗腫瘍効果を示した。

図 2.6.2.2-16 ベキサロテンを 2 週間投与したときの CTCL 由来 HH 細胞異種移植モデルでの腫瘍容積に対する効果



平均値±標準偏差(n=10)
*、**、***： 対照群に対する有意差、100 mg/kg 投与群：Day 7 (p=0.0402)、Day 11 (p=0.0034)、Day 14 (p=0.0001)

図 2.6.2.2-17 ベキサロテンを 4 週間投与したときの CTCL 由来 HH 細胞異種移植モデルでの腫瘍容積に対する効果



平均値±標準偏差(n=10)
*、**：対照群に対する有意差、30 mg/kg 投与群：Day 11 (p=0.0457)、Day 14 (p=0.0136)、Day 21 (p=0.0121)、Day 25 (p=0.0111)、Day 28 (p=0.0038、)、100 mg/kg 投与群：Day 11 (p=0.0072)、Day 14 (p=0.0036)、Day 18 (p=0.0335)、Day 21 (p=0.0105)、Day 25 (p=0.0085)、Day 28 (p=0.0417)

表 2.6.2.2-5 ベキサロテンを 2 週間及び 4 週間投与したときの CTCL 由来 HH 細胞異種移植モデルでの腫瘍重量に対する効果

投与期間	群	投与量 (mg/kg)	動物数	腫瘍重量 [1] (g)	IR%[2]
2 週間	対照	0	10	0.986 ± 0.178	-
	ベキサロテン	3	10	1.072 ± 0.151 (p=0.4822)	-8.7
		30	10	0.912 ± 0.121 (p=0.5906)	7.5
		100	10	0.790 ± 0.174* (p=0.0233)	19.9
4 週間	対照	0	10	3.833 ± 0.573	-
	ベキサロテン	3	10	3.555 ± 0.431 (p=0.4485)	7.3
		30	10	3.360 ± 0.444 (p=0.0938)	12.3
		100	10	3.377 ± 0.495 (p=0.1103)	11.9

投与量: 1 日当たりの用量
1) 平均値±標準偏差
2) IR%: 腫瘍増殖阻害率=(1-(ベキサロテン各投与群の平均腫瘍重量 / 対照群の平均腫瘍重量))×100
*: 対照群に対して有意差あり

2.6.2.2.4　化学予防効果

(1) NMU 誘導-ラット乳癌モデルにおける腫瘍退縮作用

添付資料番号：4.2.1.1-11、4.2.1.1-12（参考）

[目的] NMU によって誘導されるラット乳癌に対する治療効果を、タモキシフェンと比較・検討する。

[方法] 雌 SD ラットに 5 mg/100 g で NMU を静注して腫瘍の誘導を行った。5 週間後、横断面積を測定する。データ解析には、4 日以内に発生し横断面積が 75 mm^2 に達した腫瘍を 1 次腫瘍（又は 1 次腫瘍群）とし、それ以降発生し、75 mm^2 に達した腫瘍を 2 次腫瘍として取り扱った。基準に達した腫瘍を得た動物は、毎日無作為に各治療群（媒体対照群、ベキサロテン 10、30、又は 100 mg/kg （経口）群、タモキシフェン 150 又は 800 μg/kg（皮下）群、投与量は 1 日当たりの用量）に群分けされた。それぞれの群は、13-16 匹の動物で構成した。6 週間治療を行い、以下に示すような Rose らの方法と類似のカテゴリーによって、治療効果を判定した。

- 進行（Progression）：治療期間中成長し、かつ最終面積が治療開始時の面積よりも 40%超大きくなる。
- 静止（Stasis）： 治療期間中治療開始時に比べ、面積で 40%超の変化がない
- 部分退縮（Partial regression）：治療開始時の面積よりも 40%超退縮する。又は、腫瘍面積で 40%超の退縮が 2 回以上連続して認められる。
- 完全退縮（complete regression）：腫瘍が測定できない、又は触知できない。

[成績] 図 2.6.2.2-18 に示すようにベキサロテン投与群は対照（媒体投与）群に比べて、統計的に有意な完全退縮を示した。対照群では、87%の 1 次腫瘍が進行を続け、自発的な完全退縮は全く認められなかった。それに対して、ベキサロテン 100 mg/kg 投与群では 72.2%の 1 次腫瘍が完全退縮し、対照群と比べ統計学的に有意な差が認められた。また、16.7%の 1 次腫瘍が部分退縮した。進行が続いたのは、11.1%に過ぎなかった。タモキシフェン（800 μg/kg）の効果は、ベキサロテンよりも小さく、33.3%の完全退縮、33.3%の部分退縮、4.8%の静止であった。そして、タモキシフェン投与群では、28.6%の 1 次腫瘍が進行していた。完全退縮に関して、タモキシフェン投与群でも、対照群に対して統計的に有意な差が示されたが、その効果はベキサロテンよりも小さかった。図 2.6.2.2-19 に、ベキサロテン及びタモキシフェン投与群でのラット-NMU 誘導腫瘍に対する効果の用量反応性を示した。タモキシフェン投与群での完全退縮は高用量側 800 μg/kg では 33.3%であったが、低用量側 150 μg /kg では 5.6%と最小限の効果にとどまった。それに対し、ベキサロテン投与群での完全退縮効果は、用量 10、30、100 mg/kg に対して 10.5、27.8、72.2%と明確な用量反応性が認められた。

2 次腫瘍の予防又は遅延に対する効果を検討するために、治療期間（6 週間）中の 2 次腫瘍の腫瘍量（個体当たりの腫瘍面積和）と個体当たりの平均腫瘍（1 次、2 次腫瘍）個数について調べた。腫瘍面積和は対照群で 498 mm^2 であるのに対し、ベ

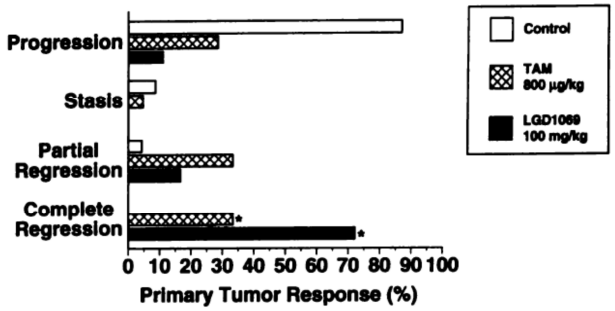
キサロテン投与群では、投与量が 10、30、100 mg/kg と増すにつれて、376、121、95 mm^2 と用量依存的に減少し、100 mg/kg 投与群では対照群に対して 81%の減少が認められた。それに対して、タモキシフェン投与群では高用量・低用量共に 72%程の減少であり、用量依存性は認められなかった（図 2.6.2.2-20）。これらの結果から、NMU 誘導ラット乳癌では、ベキサロテンは 1 次腫瘍に対してだけではなく、2 次腫瘍に対しても効果を有すると考えられた。また、動物当たりの平均腫瘍数は対照群では 3.63 であるのに対し、図 2.6.2.2-21 に示すようにタモキシフェン 800 µg/kg 投与群では 1.33 まで減少した。ベキサロテン投与群では、用量依存的に減少し、100 mg/kg で 0.69 まで減少した。1 次腫瘍だけでなく、全腫瘍を対象にした場合、タモキシフェン投与群では 20%の動物でしか完全退縮していないのに対し、ベキサロテン投与群では 46%の動物で完全退縮が認められた。

低用量のベキサロテンとタモキシフェンを併用したときの完全退縮に対する効果を検討した。1 次腫瘍の完全退縮は、ベキサロテン 10 mg/kg 単独又はタモキシフェン 150 µg/kg 単独投与では、それぞれ 10.5%及び 5.6%の動物でしか認められなかった。一方、それらを併用した場合には、26.3%の動物で 1 次腫瘍の完全退縮が認められた。この結果から、タモキシフェンとベキサロテンの作用機序は、重複していないことを示唆していると考えられた。

ベキサロテン 100 mg/kg 投与、媒体投与動物の腫瘍組織を採取し、IHC により腫瘍組織への BrdU 取込みで評価する細胞増殖へのベキサロテンの効果を調べた。IHC 画像における抗 BrdU 抗体による染色面積の比率から増殖指数を算出した。対照群に比べて、ベキサロテン 100 mg/kg 投与群では統計的に有意に増殖指数が減少した。この結果から、ベキサロテンは NMU 誘導ラット乳癌において細胞増殖を低下させていると考えられた。

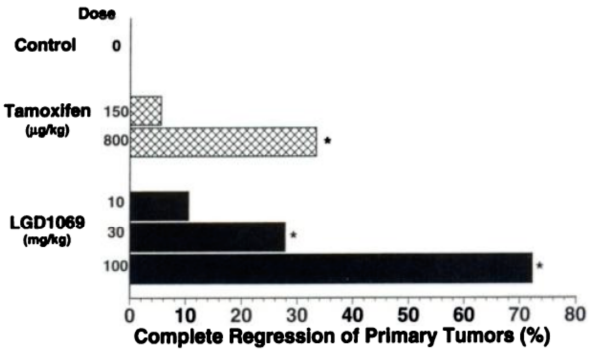
[結論] ベキサロテンは、NMU 誘導-ラット乳癌モデルにおいて、1 次腫瘍を用量依存的に退縮させ、その効果は、検討された用量ではタモキシフェンよりも顕著であった。また、ベキサロテンはタモキシフェンよりも顕著かつ用量依存的に、動物当たりの 2 次腫瘍の腫瘍量及び 1 次及び 2 次腫瘍の総個数を減少させ、2 次腫瘍の予防、遅延効果を示した。その作用機序はタモキシフェンのものとは異なると考えられ、腫瘍組織での顕著な細胞増殖抑制によるものと考えられた。

図 2.6.2.2-18 NMU 誘導-ラット乳癌モデルにおけるベキサロテン及びタモキシフェンの 1 次腫瘍に対する治療効果 （治療効果カテゴリーの分布）



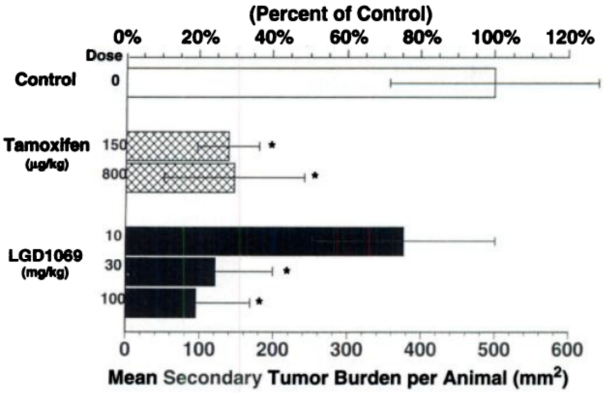
LGD1069: ベキサロテン(100 mg/kg)6 週間経口投与(n=13)、TAM: タモキシフェン(800 µg/kg)6 週間皮下投与(n=15)したときの 1 次腫瘍に対する各治療効果カテゴリーの相対度数分布、*:p<0.005、フィッシャーの直接確率検定。

図 2.6.2.2-19 NMU 誘導-ラット乳癌モデルにおけるベキサロテン及びタモキシフェンの 1 次腫瘍に対する治療効果（用量依存性）



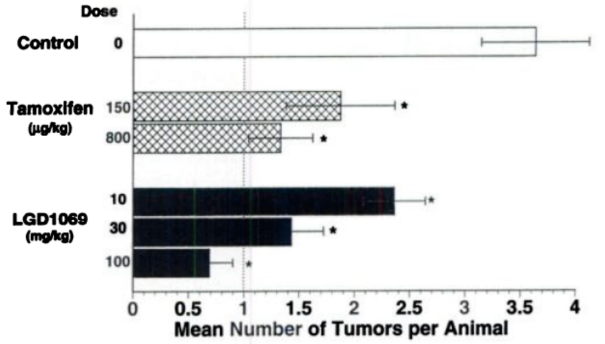
LGD1069: ベキサロテン(10～300 mg/kg)6 週間経口投与(n=13~15)、Tamoxifen: タモキシフェン(150、800 µg/kg)6 週間皮下投与(n=15)したときの 1 次腫瘍が完全退縮した動物の割合、*:p<0.05、フィッシャーの直接確率検定。

図 2.6.2.2-20 NMU 誘導-ラット乳癌モデルにおけるベキサロテン及びタモキシフェンの動物当たりの 2 次腫瘍の総腫瘍量に対する効果



LGD1069: ベキサロテン(10～300 mg/kg)6 週間経口投与、Tamoxifen: タモキシフェン(150、800 μg/kg)6 週間皮下投与したときの腫瘍面積和(平均値±標準誤差)。*: p<0.01(ANOVA with Fisher's LSD、n=13～16)

図 2.6.2.2-21 NMU 誘導-ラット乳癌モデルにおけるベキサロテン及びタモキシフェンの動物当たりの平均腫瘍個数に対する効果



LGD1069: ベキサロテン(10～300 mg/kg)6 週間経口投与、Tamoxifen: タモキシフェン(150、800 μg /kg)6 週間投与したときの腫瘍個数(平均値±標準誤差)。*: p<0.005(ANOVA with Fisher's LSD、n=13～16)

(2) NMU 誘導-ラット乳癌モデルにおけるタモキシフェン耐性腫瘍に対する効果

添付資料番号：4.2.1.1-13（参考）

[目的] NMU によって誘導されるラット乳癌のタモキシフェン耐性腫瘍に対するタモキシフェンとの併用効果を検討する。

[方法] 雌 SD ラットに 5 mg/100 g で NMU を静注して腫瘍の誘導を 2.6.2.2.4(1)と同様に行った。タモキシフェン 800 μg/kg 皮下投与の治療を 6 週間行い、完全退縮を示さなかった動物を選別した。これらの動物に対し、タモキシフェン（800 μg/kg、皮下）単独投与又はタモキシフェン（800 μg/kg、皮下）＋ベキサロテン（100 mg/kg、経口）併用投与を行い、治療効果を 2.6.2.2.4(1)と同様のカテゴリーで評価した。

[成績] タモキシフェン単独投与群では投与開始 20 週目での完全退縮及び部分退縮の比率は、それぞれ 22%及び 11%（計 33%）であった。一方、ベキサロテン併用投与群では完全退縮と部分退縮は併せて 94%にのぼった。また、疾患進行を示す動物はタモキシフェン単独投与群では 56%であったのに対し、ベキサロテン併用投与群では 6%に過ぎなかった。タモキシフェン単独投与群に対してベキサロテン併用投与群では、完全退縮は有意に上昇し、疾患進行は有意に低下した。

[結論] ベキサロテンは、NMU 誘導-ラット乳癌モデルでのタモキシフェン耐性腫瘍において、タモキシフェンとの併用効果を示し、完全退縮及び疾患進行カテゴリーでは有意な併用効果を示した。

(3) NMU 誘導-ラット乳癌モデルにおける腫瘍発生率に対する効果

添付資料番号：4.2.1.1-14（参考）

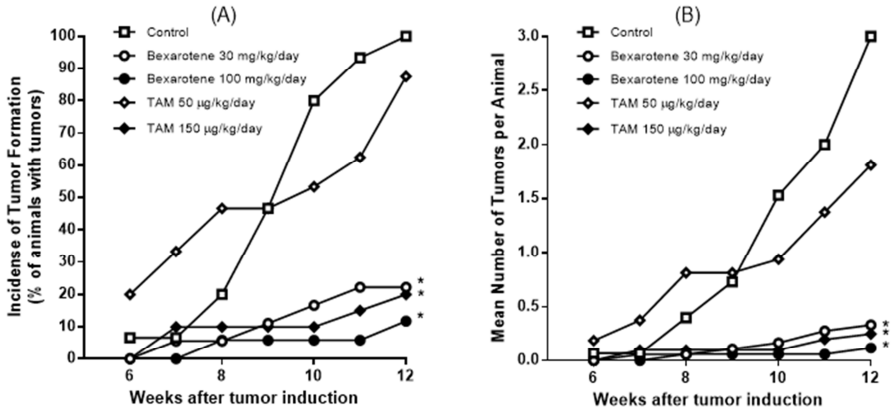
[目的] NMU によって誘導されるラット乳癌の発生率･腫瘍個数に対する化学予防的な抑制効果を、タモキシフェンと比較・検討する。

[方法] 雌 SD ラットに 5 mg/100 g で NMU を静注して腫瘍の誘導を行った。腫瘍誘導開始 1 週間後より、ベキサロテン（30 及び 100 mg/kg、経口）又はタモキシフェン（50 及び 150 μg/kg、皮下）を投与（5 日間/週投与）し、誘導開始 12 週間までの各群における乳癌発生率（腫瘍が発生した動物の比率）及び動物当たりの平均腫瘍個数の経時的な変化を調べた。

[成績] 対照（媒体投与）群、及びタモキシフェン 50 μg/kg 投与群では、腫瘍誘導開始後 12 週目で 80%以上の腫瘍発生率を示した。それに対し、ベキサロテン 30 及び 100 mg/kg 投与群での腫瘍発生率はそれぞれ 22%及び 12%であり、タモキシフェン 150 μg/kg 投与群（20%）と同様に対照群よりも有意に低かった（図 2.6.2.2-22 (A)）。また、腫瘍誘導開始後 12 週目での動物当たりの平均腫瘍個数は、ベキサロテン 30 及び 100 mg/kg 投与群で、それぞれ 0.333、0.118 であり、対照群（3.000）に対して有意に低かった（図 2.6.2.2-22 (B)）。

[結論] ベキサロテンは、NMU 誘導-ラット乳癌モデルにおいて、腫瘍発生率及び腫瘍個数を有意に抑制し、化学予防効果を示した。

図 2.6.2.2-22 ベキサロテン又はタモキシフェン投与/非投与時の(A)腫瘍発生率、及び(B)動物当たりの平均腫瘍個数の経時変化



横軸: 腫瘍誘導開始時からの時間(週)、平均値(n=16～20)
Bexarotene: ベキサロテン、TAM: タモキシフェン
*: p<0.001(ANOVA followed by Fischer's Protected LSD test)

(4) ヒト及び齧歯類乳癌細胞培養系に対する増殖阻害効果（*in vitro*）

添付資料番号：4.2.1.1-15（参考）

[目的] ベキサロテンのヒト及び齧歯類乳癌細胞培養系に対する増殖阻害効果を単独及び4-OH-タモキシフェンとの併用で調べる。

[方法] NMU 誘導-ラット乳癌モデルから採取された 417 細胞、及びヒト乳癌細胞 T47D（ER 発現陽性）を用いて、ベキサロテンの細胞増殖及びクローン原性に対する効果を調べた。また、ヒト乳癌細胞 SK-BR-3（ER 発現陰性）の細胞増殖に対する効果についても検討した。細胞増殖は、T47D 及び 417 細胞について[^{3}H]チミジン取込みにより、T47D 及び SK-BR-3 細胞について BrdU 取込みにより評価した。クローン原性は、417 細胞については足場依存性コロニー形成を、T47D 細胞については足場非依存性コロニー形成を調べることにより評価した。また、T47D 細胞の分化の指標として脂質蓄積を、細胞中のトリグリセリドを測定することにより評価した。

[成績] 前述の *in vivo* NMU 誘導-ラット乳癌モデルの場合と同様に、ベキサロテンは齧歯類乳癌細胞である 417 細胞の増殖を有意に阻害した。また、ベキサロテンは、T47D（ER 発現陽性）及び SK-BR-3（ER 発現陰性）細胞についても共に増殖阻害し、T47D 細胞では 4-OH-タモキシフェン（タモキシフェンの活性体）の増殖阻害作用を増強した。

ベキサロテンは、417 細胞、T47D 細胞のコロニー形成を共に阻害し、クローン原性に対して効果を示した。また、ベキサロテンは T47D 細胞のトリグリセリド蓄積を誘導したが、これはベキサロテンが細胞分化に対する効果を持つ可能性を示唆した。

[結論] *in vitro* 試験の結果は、*in vivo* NMU 誘導-ラット乳癌モデルで得られたベキサロテンの化学予防効果に関する知見を支持した。ベキサロテンは、検討した細胞において、クローン形成性増殖を阻害し、細胞分化に対する影響も示した。

(5) Sencar マウス 2 段階発癌モデルにおける皮膚乳頭腫形成に対する効果

添付資料番号：4.2.1.1-16 （参考）

[目的] Sencar マウス 2 段階発癌モデルにおいて TPA によって誘導される発癌物質のプロモーション期に対するベキサロテンの阻害効果を ATRA 及び 13-cis レチノイン酸（13-cis）と比較して評価する。

[方法] DMBA と TPA の 2 段階刺激による乳頭腫形成に対して感受性の高い雌 Sencar マウスを化学予防効果の評価に使用した。1 週目は皮膚局所に DMBA（10 µg/0.2 mL アセトン溶液）を塗布しイニシェーションを行い、2 週目より TPA（4 µg/0.1 mL アセトン溶液）を皮膚局所に塗布して発癌プロモーションを 24 週間にわたり行った。TPA 塗布を行う期間、ベキサロテン（3、30、又は 60 mg/kg）、13-cis（3、10、又は 30 mg/kg）、ATRA（10 mg/kg）又は媒体（ゴマ油）を経口投与した（週 5 日投与）。ヒトでの PK データを参考にして、ATRA と 13-cis は TPA 塗布の 1 時間前に投与を行った。試験期間中の乳頭腫数と腫瘍容積を評価した。

[成績] 対照群では、14 週目で平均腫瘍個数 15.2、平均腫瘍容積 19.8 mm^3 の乳頭腫が発生した。動物当たりの乳頭腫の腫瘍個数は、14 週目から 19 週目で最大となり以降減少した。一方、腫瘍容積は試験期間にわたって増大し、23 週目では 137.1 mm^3 に達した。

試験開始 14 週目での動物当たりの平均腫瘍個数は、ベキサロテン 3、30、又は 60 mg/kg 投与群で、それぞれ 47%、22%、26%の減少が認められた。腫瘍個数に対するベキサロテンの効果は用量依存的でなく、3 mg/kg 群で最も顕著で、統計的に有意であった。同様に、13-cis 30 mg/kg 投与群、及び ATRA 10 mg/kg 投与群においても統計的に有意な減少が認められた。

試験開始 23 週目での腫瘍容積は、ベキサロテン 3、30、又は 60 mg/kg 投与群では用量依存的に、対照群に対してそれぞれ 7%、55%、80%減少し、60 mg/kg 投与群では統計的に有意な（$p<0.05$）減少を示した。同様に、13-cis 30 mg/kg 投与群、及び ATRA 10 mg/kg 投与群においても統計的に有意な減少が認められた。

[結論] ベキサロテンは、Sencar マウス 2 段階発癌モデルにおいて、乳頭腫のクローン性増殖を阻害していることを示唆した。

2.6.2.2.5　その他の抗腫瘍作用

(1) ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞異種移植モデルにおける増殖抑制効果

添付資料番号：4.2.1.1-17、4.2.1.1-18（参考）

[目的] ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞異種移植ヌードマウスでのベキサロテンのヒト頭頸部扁平上皮癌細胞増殖に対する効果を調べる。

[方法] ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞 HN9N、HN21P、1483 を培養後、雌ヌードマウス皮下に異種移植したモデルを使用した。HN9N、HN21P 細胞については 5～6 週齢の、1483 細胞については 6～8 週齢の NCR nu/nu ヌードマウスを用いた。HN9N、HN21P 細胞の異種移植時には、マトリゲルを使用した。異種移植後、ベキサロテン、ATRA、又は媒体（ゴマ油）を経口投与し、腫瘍容積の経時変化を観察して、腫瘍増殖に対する効果を調べた。

[成績] HN9N 異種移植動物にベキサロテンを 60 mg/kg の投与量で移植後 2 日目から 68 日目まで 1 日 1 回経口投与し、腫瘍容積の変化を調べた。対照群では試験期間をとおして腫瘍容積の明確な低下は認められなかったが、ベキサロテン投与群では移植後 26 日目に最大（24.8±5.4 mm^3）となり、以降低下した。移植後 33 日目以降、ベキサロテン投与群の腫瘍容積は対照群と比較して統計的に有意（$p<0.05$）に低下し、移植後 49 日目には完全退縮した。

HN21P 異種移植動物にベキサロテンを 60 mg/kg、又は ATRA30 mg/kg の投与量で移植後 2 日目から 68 日目まで 1 日 1 回経口投与し、腫瘍容積の変化を調べた。対照群では試験期間をとおして腫瘍容積の明確な低下は認められなかったが、ベキサロテン投与群では移植後 23 日目に最大（8.8 ± 0.9 mm^3）となり、以降対照群よりも統計的に有意なレベルに低下し、37 日目には完全退縮した。ATRA 投与群では移植後 25 日目に最大（14.3 ± 3.8 mm^3）となり、以降対照群よりも統計的に有意なレベルに低下したが、完全退縮とはならなかった。

1483 異種移植動物にベキサロテンを 3～60 mg/kg の投与量で 1 日 1 回（5 日/週）24 日間経口投与し、腫瘍容積の変化を調べた。ベキサロテン投与により、腫瘍容積の縮小は認められなかった。

[結論] ベキサロテンは、HN9N 異種移植モデルにおいて腫瘍容積を縮小させ、完全退縮させた。また、HN21P 異種移植モデルにおいても、同様に腫瘍を完全退縮させた。これに対して ATRA 投与では完全退縮は認められなかった。一方、1483 異種移植モデルではベキサロテンの腫瘍縮小効果は認められなかった。

(2) ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞及び乳癌細胞の増殖阻害効果（*in vitro*）

添付資料番号：4.2.1.1-19（参考）

[目的] ベキサロテンのヒト頭頸部扁平上皮癌細胞及び乳癌細胞の増殖に対する阻害効果を調べる。

[方法] ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞として 1483、SCC25、及び SqCC/Y1 細胞を用いた。乳癌細胞として、MCF-7 及び T47D 細胞を用いた。ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞は 10%牛胎仔血清及び L-グルタミン添加 DMEM:F12 培地を、乳癌細胞は 5%牛胎仔血清及び L-グルタミン添加 IMEM 培地を用いて培養した。

細胞増殖については、SCC25、1483、及び SqCC/Y1 細胞を用いて、[^{3}H]チミジン取込みにより評価した。また、SCC25 及び SqCC/Y1 細胞の細胞増殖には、生細胞数による評価も行った。クローン原性については、1483、SCC25、SqCC/Y1、MCF-7、及び T47D 細胞を用いて、軟寒天でのコロニー形成能から評価した。

[成績] 1 μM のベキサロテン又は ATRA 存在下で SCC25 細胞を 7 日間培養したとき、[^{3}H]チミジン取込みは非存在下で培養したときに比べ、それぞれ 47%、75%低下し、細胞増殖を阻害していることを示した。一方、1483 及び SqCC/Y1 細胞ではチミジン取込みの低下は認められなかった。また、SCC25 細胞に対してベキサロテン 10^{-7}M を 7 日間曝露したとき、生細胞数は統計的に有意に減少した。一方、ATRA では同じ濃度では統計的に有意な減少は認められなかった。これに対して、SqCC/Y1 細胞では、生細胞数は 10^{-9}M の ATRA で統計的に有意な減少が認められたが、ベキサロテンでは 10^{-7}M 以上の濃度でないと統計的に有意な減少は認められなかった。

クローン原性に関しては、ベキサロテン群では 1483 細胞では 10^{-7}M 以上、SqCC/Y1 細胞では 10^{-7}M 以上、MCF-7 細胞では 10^{-7}M 以上、T-47D 細胞では 10^{-7}M 以上の濃度で、対照群に比べて顕著に低下し、統計的に有意な差（$P<0.05$）が認められた。一方、SCC25 細胞では統計的に有意な差は認められたものの、その低下は顕著ではなかった。ベキサロテン 10^{-6}M 存在下、コロニー形成は 1483、SCC25、SqCC/Y1、MCF-7、及び T-47D 細胞でそれぞれ 30%、10%、25%、80%及び 38%阻害された。これに対して、ATRA10^{-6}M でのコロニー形成の阻害率は、それぞれ 54%、8%、55%、83%及び 82%であった。

[結論] ベキサロテン及び ATRA は、SCC25 細胞のチミジン取込みを阻害した。ベキサロテンは SCC25 細胞の生細胞数を減少させた。ベキサロテン及び ATRA は、SqCC/Y1 細胞の生細胞数を減少させた。また、ベキサロテン及び ATRA は、1483、SqCC/Y1、MCF-7、及び T-47D 細胞のコロニー形成を有意に阻害した。

(3) 小細胞肺癌（SCLC）及び非小細胞肺癌（NSCLC）由来細胞に対する効果

添付資料番号：4.2.1.1-20（参考）

[目的] ベキサロテンの SCLC 及び NSCLC 由来細胞の増殖に対する阻害効果を、*in vitro* 細胞培養系及び異種移植モデルを利用して調べる。

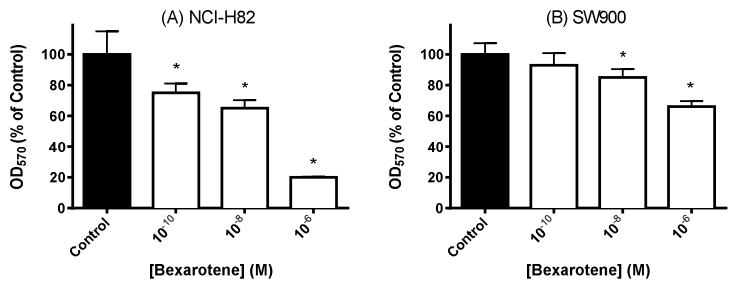
[方法] SCLC 由来細胞として NCI-H82 細胞を 10%牛胎仔血清含有 RPMI1640 培地で培養して用い、NSCLC 由来細胞として SW-900 及び CaLu-3 細胞を 10%牛胎仔血清含有 DMEM 培地で培養して用いた。96 穴プレートに播種後 24 時間後、ベキサロテンを 10^{-10}～10^{-6} M で添加した。細胞増殖は MTT 法を用いて評価した。

異種移植モデルは、NCI-H82 細胞をヌードマウスに 10^{6} 個/サイトの細胞数で移植し、移植 3 日後からベキサロテン（100 mg/kg/day、5 日/週、経口投与）及び/又はシスプラチン（2 mg/kg/day、2 日/週、腹腔内投与）の処理を行い、腫瘍容積の変化を記録した。

[成績] ベキサロテンは、SCLC 由来 NCI-H82 細胞に対して *in vitro* で濃度依存的に細胞増殖抑制効果を示し、10^{-10}M 以上の濃度では対照群に対して統計的に有意な増殖阻害効果が認められた（図 2.6.2.2-23(A)）。また、NSCLC 由来 SW900 細胞に対しても *in vitro* で濃度依存的に細胞増殖抑制効果を示し、10^{-8}M 以上の濃度で統計的に有意な増殖阻害効果が認められた（図 2.6.2.2-23(B)）。一方、NSCLC 由来 CaLu-3 細胞に対しては、ベキサロテンは 10^{-8}M では増殖阻害効果を示さなかったが、インターフェロン-α2b と共に用いるとインターフェロン-α2b の細胞増殖阻害効果を増強した。NCI-H82 異種移植モデルでは、ベキサロテン、シスプラチン単独では対照群に対して有意な腫瘍容積の低下は認められなかった。しかし、ベキサロテン/シスプラチン併用群では移植後 24 日目で対照群に対して有意な低下を示した。

[結論] ベキサロテンは、*in vitro* で SCLC 由来 NCI-H82 細胞及び NSCLC 由来 SW900 細胞の細胞増殖を有意に阻害した。一方、NCI-H82 異種移植モデルでは増殖抑制効果は見られなかった。

図 2.6.2.2-23 ベキサロテンの(A)SCLC 由来 NCI-H82 細胞、及び(B)NSCLC 由来 SW900 細胞の増殖に対する阻害効果（*in vitro*）



平均値+標準誤差

*: 対照群に対して有意差: p<0.05(Student's t-test)

(4) ベキサロテンの前立腺癌モデルに対する効果

添付資料番号：4.2.1.1-21（参考）

[目的] ベキサロテンの前立腺癌モデル（*in vitro*:細胞培養系, *in vivo*:異種移植動物）に対する増殖阻害効果を調べる。

[方法] *in vitro* での増殖抑制は、PC-3 細胞及び LNCaP 細胞を軟寒天上で培養したときのコロニー形成に対するベキサロテンの効果により評価した。また、アンドロゲン依存性の転写活性化に対する効果は、MMTV-LUC レポーター遺伝子を導入した LNCaP 細胞を用いて調べた。異種移植モデルは、LNCaP 細胞を雄胸腺欠損マウスに移植し、ベキサロテンを投与したときの腫瘍増殖を検討した。

[成績] ベキサロテンは、アンドロゲン非依存性の PC-3 細胞の増殖を阻害しなかった。また、アンドロゲン依存性の LNCaP 細胞の増殖に対しても限定的な効果しか示さなかった。ベキサロテンはアンドロゲン依存性の LNCaP 細胞において、合成アンドロゲン R-1881 による MMTV-LUC の転写活性化を阻害した。LNCaP 異種移植動物においては、ベキサロテンは腫瘍抑制効果を示さなかった。

[結論] ベキサロテンは、検討した *in vitro* 及び *in vivo* 前立腺癌モデルに対しては、抗腫瘍効果を示さなかった。

2.6.2.2.6　代謝物の薬理作用

(1) ベキサロテン主要代謝物の薬理活性（*in vitro*）

添付資料番号：4.2.2.4-2、4.2.2.4-3（参考）

[目的] ベキサロテンの主な代謝物（6-/7-水酸化体、及び 6-/7-オキソ体）の *in vitro* での薬理活性を調べる。

[方法] 合成した 6-水酸化体、7-水酸化体、6-オキソ体、7-オキソ体の $RAR_{\alpha,\beta,\gamma}$ 及び $RXR_{\alpha,\beta,\gamma}$ に対する結合は、発現系[2.6.2.2.1(1)]を用いて評価した。また、それらに対する転写活性化作用をレポーター遺伝子試験系[2.6.2.2.1(2)]を用いて調べた。受容体への結合に関しては結合定数（Kd）を、転写活性化についてはレポーター遺伝子試験系における最大活性化（Emax）と 50%活性化濃度（EC50）を評価した。

[成績] 代謝物の RXR 各サブタイプに対する結合は、RAR 各サブタイプに対するよりも強かったが、未変化体に対する結合よりも弱いものであった（表 2.6.2.2-6）。ヒト血漿中最も観察される 6-水酸化体の RXR に対する結合能は最も弱かった（Kd>3000 nM）。

検討した全ての代謝物の、RAR_{β} 及び RAR_{γ} に対する Emax はベキサロテンよりも低かった（表 2.6.2.2-7）。また、代謝物の RAR_{α} に対する Emax（≤22%）は、ベキサロテンの Emax（7%）に対して相対的に高かったが、絶対値としては共に低いものであった。代謝物の RXR 各サブタイプに対する Emax はベキサロテンと同様であった。7-オキソ体の RXR 各サブタイプに対する EC50 は、ベキサロテンに対して少なくとも 3 倍高く、他の 3 つの代謝物は約 10 倍高く、より活性が弱いことを示した。いずれの代謝物も、アンタゴニストとして評価すると、全く活性を示さなかった。

[結論] 検討したベキサロテンの主な代謝物（6-/7-水酸化体、6-/7-オキソ体）は、RAR、RXR に対してベキサロテンよりも弱い薬理作用しか持たず、薬効への寄与は低いと考えられた。

表 2.6.2.2-6 ベキサロテン代謝物の RAR、RXR サブタイプへの結合定数

化合物(N)	Kd (nM)					
	RAR_α	RAR_β	RAR_γ	RXR_α	RXR_β	RXR_γ
6-水酸化体 [a](3)	8171[b]	>10000	>10000	3464±474	4205±1003	4831±1354
6-オキソ体(3)	7901[b]	>10000	>10000	1324±253	2265±634	1702±797
7-水酸化体 [a](3)	8364[b]	>10000	>10000	2483±225	4386±871	2761±750
7-オキソ体(3)	7037[b]	>10000	>10000	288±92	508±168	236±15
ベキサロテン [c](2)	>10000	>10000	>10000	34	78	78
ベキサロテン [d](9)	5950±235	7624±1342	4221±509	32±2	17±2	21±4

平均値±標準誤差
a: ラセミ体、b: 2 個の測定値が>10000、1 個が<10000、c: 代謝物と同時に測定、d: 以前に実施

表 2.6.2.2-7 ベキサロテンの RAR、RXR サブタイプに対する転写活性化

化合物	RAR_α			RAR_β			RAR_γ		
	Emax (%)[b]	EC50(nM)[c]	n[a]	Emax(%)[b]	EC50(nM) [c]	n[a]	Emax(%)[b]	EC50(nM) [c]	n[a]
ベキサロテン	7±1	7013±2987	3	57±17	292±19	2	64±31	1366±560	3
9-cis	112±15	21±2	5	97±3	7±2	3	104±3	3±1	5
6-水酸化体	16±6	4414±1800	6	20±5	2121±152	6	18±5	1092±527	6
6-オキソ体	22±11	4199±1852	6	31±6	1462±328	6	34±8	2043±277	6
7-水酸化体	14±4	5133±2176	6	12±3	2590±419	6	18±9	4377±1889	6
7-オキソ体	13±5	4179±1851	6	15±3	602±259	6	7±3	5165±2792	6
	RXR_α			RXR_β			RXR_γ		
ベキサロテン	77±7	25±9	5	148±11	41±13	4	82±9	25±7	4
9-cis	98±2	27±9	5	103±16	40±17	4	115±26	50±15	4
6-水酸化体	43±8	413±29	6	99±17	462±137	6	49±10	385±90	6
6-オキソ体	69±11	398±35	6	139±14	356±49	6	87±10	420±59	6
7-水酸化体	50±6	447±26	6	131±28	558±71	6	66±6	520±50	6
7-オキソ体	56±6	102±11	6	148±25	169±31	6	72±8	103±22	6

平均値±標準誤差
a: Emax、EC50 を算出したそれぞれの濃度反応曲線数、b: 9-cis の Emax に対する相対値%
c: Emax が 10%より小さい場合は、10000 とする

2.6.2.2.7　その他の薬理試験

(1) 急性前骨髄球性白血病（APL）由来細胞及びヒト末梢血単核細胞（PBMC）における CD38 発現に対する効果

添付資料番号：4.2.1.1-22（参考）

[目的] APL 由来細胞及び PBMC におけるレチノイド応答遺伝子 CD38 mRNA 発現誘導に対するベキサロテンの効果を調べる。

[方法] APL 由来 NB4 細胞をベキサロテン存在（10^{-8}～10^{-5}M）/非存在下 10%牛胎仔血清含有 RPMI1640 培地において培養し、RNA を回収した。また、培養した NB4 細胞を雌 NCR nu/nu ヌードマウスに 10^{6} 個/サイトの細胞数で異種移植した。腫瘍増殖後、ベキサロテンを 300 mg/kg 経口投与し、腫瘍組織の RNA を回収した。回収した RNA 中の CD38 mRNA を定量した。

ex vivo 試験に用いる PBMC は、健常人より単離した。得られた PBMC はベキサロテン存在/非存在下で 72 時間まで培養し、抗ヒト CD38 抗体で染色してフローサイトメトリーで計数した。

また、ベキサロテンの臨床試験（L1069-24 試験）で得られた血液より PBMC を単離し、CD38 mRNA 発現量を測定した。

CD38 mRNA の定量は、ヒト CD38 特異的プローブを用いて、RNase protection アッセイにより行った。フォスフォイメージャーにより放射活性バンドを定量し、ハウスキーピング遺伝子 GAPDH によるローディング量換算を行って相対値として評価した。

[成績] ベキサロテン（10^{-8}～10^{-5}M）を APL 由来 NB4 細胞に *in vitro* で曝露すると、細胞中の CD38 mRNA はベキサロテンの濃度依存的に上昇した（図 2.6.2.2-24(A)）。また、NB4 異種移植動物にベキサロテンを 300 mg/kg 経口投与したとき、腫瘍組織中の CD38 mRNA は投与後経時的に上昇し、8～24 時間の間に低下した（図 2.6.2.2-24(B)）。

単離したヒト PBMC に、*ex vivo* で 10^{-9}～10^{-5} M のベキサロテンを曝露させ、6 時間後の PBMC 中の CD38 mRNA 発現量を測定すると、濃度依存的な誘導が示唆された（図 2.6.2.2-25(A)）。また、同様に CD38 陽性細胞数を調べると、濃度依存的な増加（対照: 31.23%→10^{-5} M: 47.15%）が認められ、CD38 蛋白の誘導が確認された（図 2.6.2.2-25(B)）。

L1069-24 臨床試験から得られた、ベキサロテン投与後に採血された血液から単離した PBMC における CD38 mRNA 発現量を図 2.6.2.2-26 に示す。被験者 561 では、500 mg/m^2/day で投与開始後 PBMC を採取（1 日目、14 日目、29 日目及び 19 週目）、その後 36 週目に 400 mg/m^2/day に減量後 40 週目に PBMC を採取した。ベキサロテン投与後 1 日目に、PBMC での CD38 mRNA 発現量は投与前レベルの 2.8 倍まで上昇した。投与後の経時変化は、動物モデルで見られた変化と同様であった。14 日目に、ベキサロテン投与による PBMC での CD38 mRNA 発現量の上昇は小さくなり、

29 日目にはほとんど変化は見られなかった。19 週目、ベキサロテン投与による PBMC での CD38 mRNA 発現誘導が再び明確に確認された。減量後の 40 週目にはベキサロテン投与による変化は、あったとしてもごく僅かな変化でしかなかった。

被験者 562（300 mg/m^2/day 投与群）では、1 日目にベキサロテン投与による PBMC での CD38 mRNA 発現誘導が確認され、投与後 24 時間にも誘導は続いていた。39 日目のデータは、時点間の変動が大きく結論づけられるものはなかった。

被験者 563（300 mg/m^2/day 投与群）では、動物モデルで見られたのと同様な経時変化が見られたが、ベキサロテン投与による PBMC での CD38 mRNA 発現量の変化はあったとしても、小さかった（<1.4 倍）。

[結論] *in vitro* 評価系では、ベキサロテン曝露により、NB4 細胞及び PBMC での CD38 mRNA 発現は濃度依存的に上昇した。動物モデルでは、投与後 4-8 時間後に CD38 mRNA 発現が誘導された。これらの結果と臨床試験から得られた PBMC における CD38 mRNA 発現量の結果を併せて考えると、臨床での投与量ではレチノイド応答遺伝子である CD38 を動かすのに十分な血中濃度が得られていると考えられた。

図 2.6.2.2-24 ベキサロテンを NB4 細胞に作用させたときの CD38 mRNA 発現誘導への影響: (A)細胞培養系における濃度依存性及び(B)異種移植動物に単回経口投与（300 mg/kg）したときの経時変化

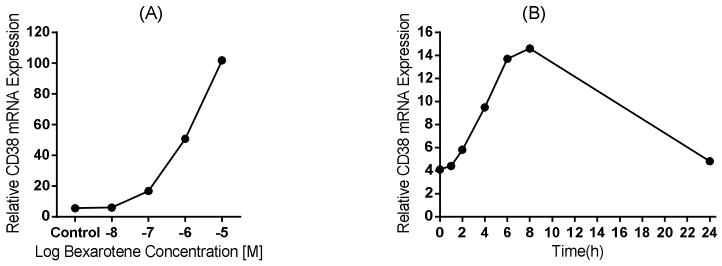


図 2.6.2.2-25 ベキサロテンをヒト PBMC に作用させたときの
(A) CD38 mRNA 及び(B) CD38 蛋白質発現量への影響

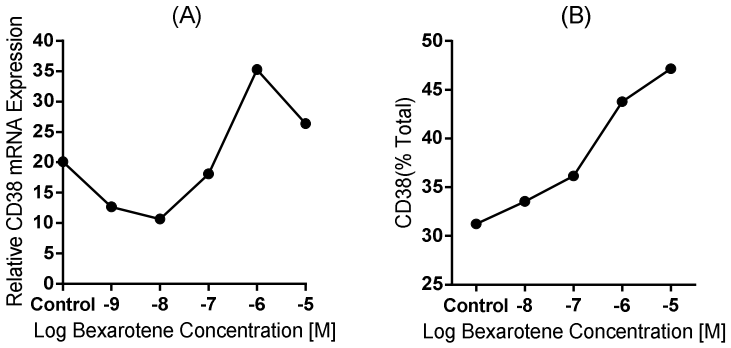
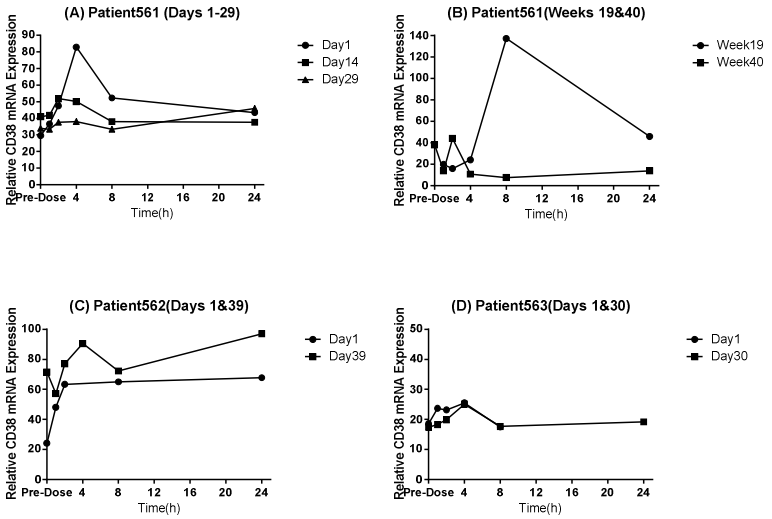


図 2.6.2.2-26 ベキサロテンを患者に投与したときの PBMC における
CD38 mRNA 発現の経時変化



2.6.2.3　副次的薬理試験

(1) ウサギの血漿中脂質への影響

添付資料番号：4.2.1.2-1（参考）

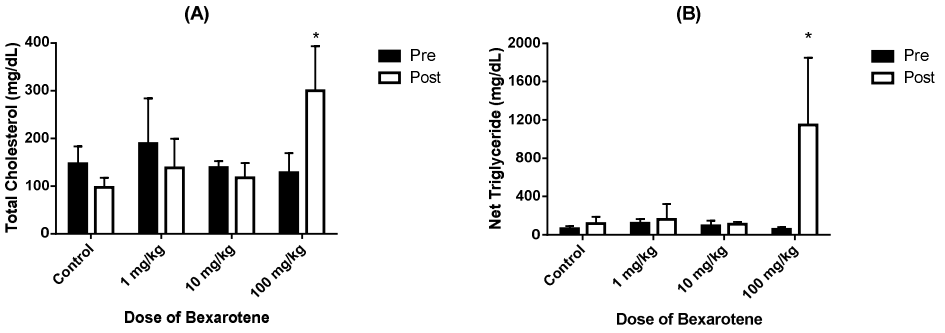
[目的] ベキサロテンを 4 日間ニュージーランドウサギへ投与したときの血漿中脂質画分の濃度への影響を調べる。

[方法] ベキサロテンを 0、1、10 又は 100 mg/kg の投与量で 4 日間雄ニュージーランドウサギへ経口投与し、一般所見を観察すると共に採血して血漿中の総コレステロール、トリグリセリド及び HDL-及び LDL-コレステロールの濃度を測定した。

[成績] 全ての血漿試料は、高脂血症様であった。投与前後で比較したとき、ベキサロテン 100 mg/kg 投与群でのみ総コレステロール濃度（3 倍）とトリグリセリド濃度（10 倍）において統計的に有意（$p<0.05$）な上昇が認められた（図 2.6.2.3-1）。一方、HDL-及び LDL-コレステロール濃度に関しては、有意な変化は認められなかった。また、ベキサロテンの投与により肝重量の増加、体重の減少が認められた。

[結論] ベキサロテンの投与により、ニュージーランドウサギの血漿中総コレステロール、トリグリセリド濃度が上昇した。一方、HDL-、LDL-コレステロール濃度に関しては変化がなかった。

図 2.6.2.3-1 ベキサロテンをニュージーランドウサギに 4 日間経口投与したときの投与前・後の血漿中(A)総コレステロール及び(B)トリグリセリド濃度の変化



平均値+標準偏差(n=5)
*: 投与前に比べて有意差あり、$p<0.05$ (対応のない t-検定による ANOVA)

(2) 血漿中 HDL-コレステロール及びアポリポ蛋白 A1（ApoA1）への影響

添付資料番号：4.2.1.2-2（参考）

[目的] ベキサロテンの、HDL-コレステロールの構成蛋白質でありプロモーター領域に RXR 応答配列を有する ApoA1、及び HDL-コレステロールへの影響を調べる。

[方法] *in vitro* 試験には、HepG2 細胞培養系を用いて ApoA1 プロモーターのレポーター遺伝子試験系を構築し、RXR_{α} 共発現下、10^{-10}～10^{-6} M のベキサロテンを 24 時間曝露させたときの転写活性化を評価した。

in vivo 試験では、ベキサロテン、ATRA、又は 9-cis をそれぞれ 100 mg/kg の投与量で、雄 SD ラットに 4 日間腹腔内投与（1 日 1 回）したときの血漿中 HDL-コレステロール濃度を比較した。また、0～30 mg/kg の投与量でベキサロテンを雄 SD ラットに 4 日間腹腔内（1 日 1 回）又は経口投与（1 日 1 回）したときの血漿中 HDL-コレステロール濃度を調べた。さらに、0～100 mg/kg の投与量でベキサロテンを雄 SD ラットに 30 日間経口投与（1 日 1 回）したときの血漿中 HDL-コレステロール濃度を調べた。

[成績] *in vitro* 転写活性化試験では、RXR_{α} を共発現した場合にのみ ApoA1 プロモーターは、ベキサロテン濃度依存的に転写活性化された。

ベキサロテン又は他のレチノイドを雄 SD ラットに 4 日間腹腔内投与したとき、ベキサロテン投与群でのみ対照群に比べて統計的に有意な血漿中 HDL-コレステロール濃度の上昇が認められた。また、ベキサロテンの 4 日間腹腔内投与による血漿中 HDL-コレステロール濃度の上昇は、0.3 mg/kg から用量依存的であった。また、ベキサロテンを 4 日間経口投与したときにも、同様に用量依存的な血漿中 HDL-コレステロール濃度の上昇が認められた。さらに、雌 SD ラットに 30 日間経口投与したときにも同様に用量依存的な血漿中 HDL-コレステロール濃度の上昇が認められた。これらの HDL-コレステロール濃度の上昇は、総コレステロールの上昇を伴ったが、他のコレステロール画分とは関連しないと考えられた。

[結論] HepG2 細胞を用いたレポーター遺伝子試験系では、ベキサロテンは濃度依存的、かつ RXR 依存的に ApoA1 プロモーターを転写活性化した。ベキサロテンは、用量依存的に SD ラットの血漿 HDL-コレステロール濃度を上昇させた。

(3) $PPAR_{\alpha}$ 遺伝子活性化に対する影響及び血漿中トリグリセリド濃度に対する影響

添付資料番号：4.2.1.2-3、4.2.1.2-4（参考）

[目的] 高脂血症治療薬フィブラートにより活性化される $PPAR_{\alpha}$ 遺伝子に対するベキサロテンの影響を調べる。

[方法] CV-1 細胞に $PPAR_{\alpha}$ 及び RXR_{α} を導入し、acyl-CoA オキシダーゼ(AOX) PPRE、又は bifunctional enzyme (BE) PPRE をレポーターとしたレポーター遺伝子試験系を構築し、ゲムフィブロジル 100 μM、ベキサロテン 1 μM、又は双方を添加して、転写活性化を調べた。

雄 SD ラットに、ゲムフィブロジル 100 mg/kg、ベキサロテン 30 mg/kg を 7 日間経口投与したときの、肝臓の蛋白質及び RNA を抽出し、ノーザン及びウェスタンブロット法により分析した。

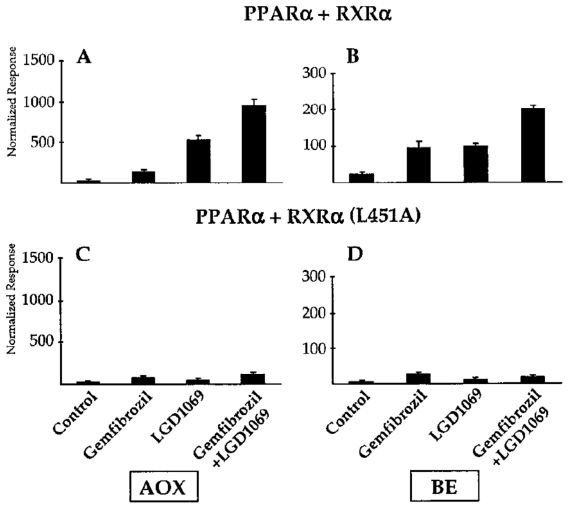
また、雌 C57BLKS/J-m+/+db (db/db)マウスに、3 mg/kg 又は 30 mg/kg のベキサロテンを 14 日間経口投与し、投与開始 3、7、10、及び 14 日目に採血し、トリグリセリドを測定した。

[成績] $PPAR_{\alpha}$ 及び RXR_{α} を導入した細胞では、ベキサロテン及びゲムフィブロジルによって AOX、BE 共に転写活性化され、対照<ゲムフィブロジル 100 μM～ベキサロテン 1 μM <ゲムフィブロジル 100 μM +ベキサロテン 1 μM の順であった（図 2.6.2.3-2 A 及び B)。一方、RXR_{α} の代わりに基質と結合するが活性化はしない RXR_{α}（L451）を導入すると、転写活性化はほとんど認められなかった（図 2.6.2.3-2 C 及び D)。ラットにベキサロテン及び/又はゲムフィブロジルを投与したとき、肝臓から抽出した RNA をノーザンブロット法で調べると、AOX 及び BE の RNA が誘導されていた（図 2.6.2.3-3(A)）。また、肝臓から抽出した蛋白質をウェスタンブロット法で調べると、BE の誘導が確認された（図 2.6.2.3-3(B)）。このとき、BE のバンドの強度は、対照＜ゲムフィブロジル＜ベキサロテン＜ベキサロテン＋ゲムフィブロジルの順であった。

db/db マウスにベキサロテン 3 mg/kg 又は 30 mg/kg の投与量で 14 日間経口投与したとき、血漿中トリグリセリドは投与開始 3 日後付近で一時的に上昇し、14 日後にはベキサロテン投与群の血漿中のトリグリセリド濃度は対照群に比べて 32%低下した（図 2.6.2.3-4）。

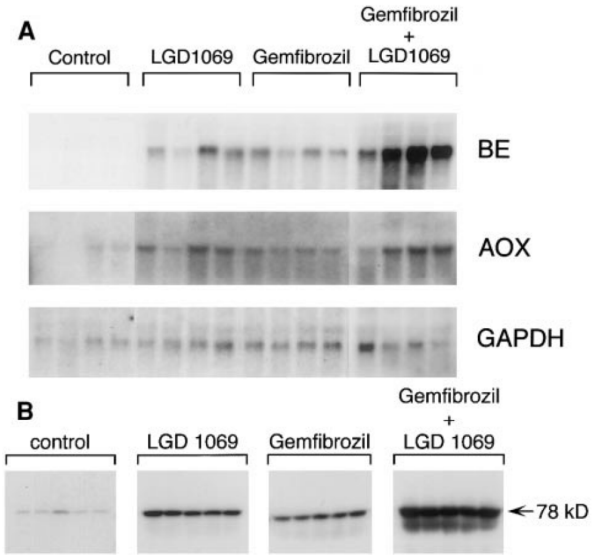
[結論] ベキサロテンは、RXR_{α} を介して *in vitro* 及び *in vivo* で $PPAR_{\alpha}$ を転写活性化した。また、この経路を介して db/db マウスの血漿中トリグリセリド濃度を低下させることが示唆された。

図 2.6.2.3-2 ベキサロテン及びゲムフィブロジルによる $PPAR_{\alpha}$ レポーター遺伝子の転写活性化



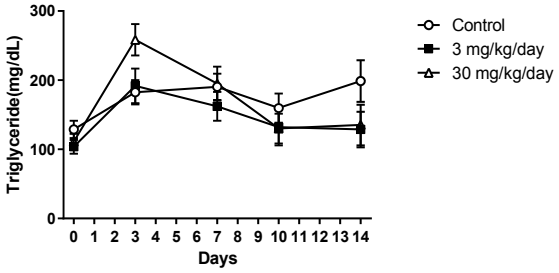
A: $PPAR_{\alpha}$、RXR_{α} を導入。レポーター：AOX-PPRE。B: $PPAR_{\alpha}$、RXR_{α} を導入。レポーター: BE PPRE。
C: $PPAR_{\alpha}$、RXR_{α}(L451A)を導入。レポーター: AOX-PPRE。D: $PPAR_{\alpha}$、RXR_{α}(L451A)を導入。レポーター: BE PPRE。
Gemfibrozil: ゲムフィブロジル 100 μM、LGD1069: ベキサロテン 1 μM
平均値＋標準偏差

図 2.6.2.3-3 ベキサロテン及びゲムフィブロジルをラットに経口投与したときの肝臓中(A)RNA のノーザンブロット(AOX 及び BE)及び(B)蛋白質のウェスタンブロット(BE)



LGD1069: ベキサロテン 30 mg/kg、Gemfibrozil: ゲムフィブロジル 100 mg/kg を 7 日間経口投与した SD ラットの肝臓から得られた RNA 又は蛋白質
GAPDH: ハウスキーピング遺伝子

図 2.6.2.3-4 雌 db/db マウスにベキサロテン 3 mg/kg 又は 30 mg/kg を 1 日 1 回 14 日間反復投与したときの血漿中トリグリセリド濃度推移



平均値±標準誤差(n=7～12)

(4) ベキサロテンによる血漿中脂質上昇に対する高脂血症治療薬の効果

添付資料番号：4.2.1.2-5（参考）

[目的] 動物実験及び臨床で確認されているベキサロテン投与による血漿中トリグリセリド上昇に対する高脂血症治療薬の効果を調べる。

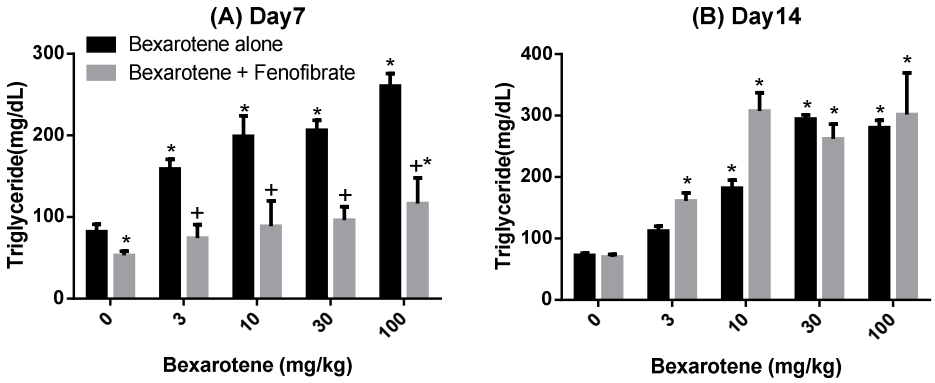
[方法] 雄 Zucker Diabetic Fatty （ZDF）ラット及び雌雄 Harlan SD（HSD）ラットに対し、ベキサロテン単独又はベキサロテンと高脂血症治療薬（ナイアシン、ロバスタチン、フェノフィブラート）併用を投与し、血漿中のトリグリセリド濃度を測定した。それに加えて、血清中アポリポ蛋白 A1 及び A2（ApoA1 及び ApoA2）と HDL の濃度

についても測定した。一部の組織試料については、ApoA1、ApoA2、ApoC-III、リポ蛋白リパーゼ（LPL）、肝臓リパーゼ　（HL）RNA の濃度・活性について測定した。

[成績] ベキサロテンは、HSD ラットにおいて用量依存的に血漿中トリグリセリド濃度を上昇させ、100 mg/kg で 14 日間投与した時、対照群と比べて最大 402%上昇させた。一方、フェノフィブラート 100 mg/kg を併用すると、7 日間投与では血漿中トリグリセリド濃度を統計的に有意に低下させた（図 2.6.2.3-5(A)）。このフェノフィブラートによる血漿中トリグリセリド濃度の低下作用は、フィブラートをベキサロテン投与前の投与、ベキサロテンと同時投与、又はベキサロテンによる血漿中トリグリセリド上昇が起きた後の投与の、いずれの場合においても認められ、血漿中トリグリセリド濃度を 40%程度低下させた。一方、14 日間投与の場合には、こうした改善作用は認められず（図 2.6.2.3-5(B)）、フェノフィブラートの効果は、時間の経過に伴ってなくなると考えられた。ベキサロテン投与によって、血清中 ApoA1 濃度は最大 44%上昇し、ApoA2 濃度は最大 121%上昇した。本試験では、HDL 濃度は対照群と比して統計的に有意に最大 30%上昇した。ナイアシン及びロバスタチンでは、ベキサロテンによって上昇したトリグリセリド濃度の有意な低下は見られなかった。糖尿病モデル動物である ZDF ラットでは、ベキサロテンは用量依存的に血漿中トリグリセリドを対照群と比べて最大 297%上昇させた。ベキサロテンによるトリグリセリド上昇の可能性のあるメカニズムを調べるために、組織を摘出し LPL 活性を測定した。その結果、心臓及び筋肉中の LPL 活性がそれぞれ 83%及び 58%低下していた。一方、心臓での LPL mRNA 発現量を調べると、変化していなかった。これらの結果から、トリグリセリドのクリアランスの低下が血清中濃度上昇の一因と推察された。さらに、肝臓中のリパーゼ活性の低下も認められ、この推察を支持した。Apo-CIII の一過性で用量非依存的な上昇が認められ、トリグリセリドの産生量の上昇は起きていないことが推察された。

[結論] HSD ラットで、ベキサロテン投与によって上昇した血漿中トリグリセリド濃度は、フェノフィブラートを用いることにより改善した。しかし、その効果は時間の経過により低下した。また、ナイアシン及びロバスタチンでは、有意な改善は認められなかった。また、ZDF ラットでのベキサロテンによるトリグリセリド濃度上昇の一因として、トリグリセリドのクリアランス低下が関与していることが示唆された。

図 2.6.2.3-5 ベキサロテン 3～100 mg/kg を単独又はフェノフィブラート 100 mg/kg と併用して HSD ラットに(A)7 日間及び(B)14 日間投与したときの血漿中トリグリセリド濃度



平均値+標準誤差(n=6)
*: 対照(媒体投与)群と比べて有意差あり(P<0.05)
+: 対応するベキサロテン単独投与群と比べて有意差あり(P<0.05)

(5) SD ラットの血液凝固能に対する影響

添付資料番号：4.2.1.2-6（参考）

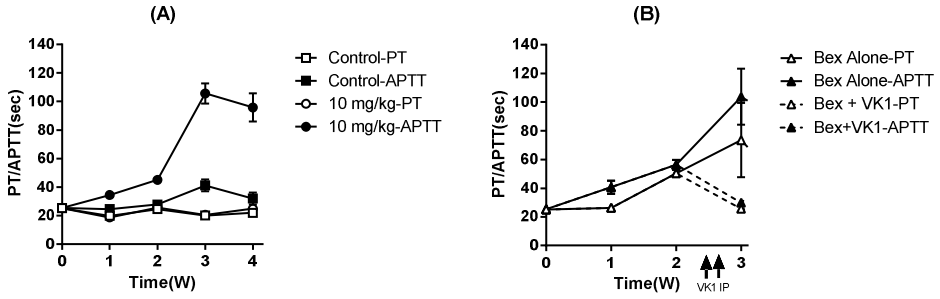
[目的] ベキサロテン混餌投与のプロトロンビン時間（PT）及び活性型部分トロンボプラスチン時間（APTT）延長に対する影響及びビタミン K による回復性について検討する。

[方法] 雄 SD ラットにベキサロテン-ゴマ油懸濁液を、0、10、100 mg/kg の投与量で 29 日間混餌投与し、PT、APTT を測定した。

[成績] ベキサロテンを 2 週間経口投与したとき、APTT は 2 倍延長し（図 2.6.2.3-6(A)）、これらの動物での一般状態は悪化した。ビタミン K1 を 10 mg/kg 腹腔内投与すると、投与 4 日後 PT と APTT は回復し（図 2.6.2.3-6(B)）、一般状態は 24 時間以内に回復した。一方、ビタミン K1 非投与群では、PT 及び APTT は延長したままであり、6/8 の動物が出血のため死亡した。一方、ビタミン K1 投与群では、死亡は見られなかった。

[結論] ベキサロテン（ゴマ油懸濁液）を SD ラットに 2 週間混餌投与すると、凝固障害が起き、出血による死亡が見られた。こうした障害は、ビタミン K1 投与により回復した。

図 2.6.2.3-6 ラットに(A)ベキサロテン単独又は(B)ベキサロテン及びビタミン K1 を併用して 4 週間投与したときの PT 及び APTT の変化



(A) ベキサロテン又は投与媒体を 10 mg/kg 混餌投与
(B) Bex: ベキサロテン、Bex+VK1: ベキサロテン 100 mg/kg を単独混餌投与し、投与開始後 17 及び 18 日目にビタミン K1 を腹腔内投与し、ベキサロテン投与を継続する。
平均値±標準誤差

2.6.2.4　安全性薬理試験

2.6.2.4.1　中枢神経系に及ぼす影響

2.6.2.4.1.1　ラットの中枢神経系に及ぼす影響

添付資料番号：4.2.1.3-1（評価）

安全性薬理試験の一環として、ベキサロテンを雄ラットに単回経口投与したときの中枢神経系に及ぼす影響を、Irwin の多次元観察法に準じて一般症状及び行動を観察することにより検討した。24 匹のラット［系統 Crl:CD(SD)、6 週齢］を 4 群（n=6）に振り分け、媒体［マクロゴール 400（PEG400）/モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン（Tween20）/3(2)-t-ブチル-4-ヒドロキシアニソール（BHA）/ポリビニルピロリドン K-90（PVP K-90）/日本薬局方注射用水］並びにベキサロテンの 3、30 及び 100 mg/kg を投与した。投与液量は 10 mL/kg として強制経口投与した。投与量は海外で実施された臨床試験の治療用量（300 mg/m^2）における C_{max} と「ベキサロテンのラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験[2.6.6.3.7、4.2.3.2-8]における初回投与時の C_{max}（雄）の値を参考に、ラットにおいてヒト治療用量における C_{max} と同程度の C_{max} が期待できる 3 mg/kg を低用量とし、中間用量及び高用量は 30 及び 100 mg/kg を設定した。投与前及び投与後 0.5、1、2、4、8、24 時間において、観察を実施した。

いずれの用量においても、投与後 24 時間まで一般症状及び行動に影響は認められず、ベキサロテンは 100 mg/kg までラットの中枢神経系に影響を及ぼさないと考えられた。

2.6.2.4.1.2　ラットの中枢神経系に及ぼす影響

添付資料番号：4.2.1.3-2（参考）

ベキサロテンを投与量 0（ゴマ油）、10、30、100 mg/kg で 1 群 10 例の雄 SD ラットに 1 日 1 回、4 日間強制経口投与し、動物の行動、自発運動量、感覚／運動反射、抗痙攣作用（100 mg/kg

投与群でのみ 150 mA の電気ショックに対する反応）、体重及び体温を測定した。その結果、10 mg/kg 投与群で投与 1 日目の体温が対照群と比較して有意に低下し、30 mg/kg 投与群で 2 日目の体温が有意に上昇したが、いずれも正常範囲内（37.0～38.5℃）であり、その生物学的意義はないと考えられた。電気ショックに対する反応より、本薬は抗痙攣作用を示さないことが示唆され、他の測定項目にも中枢神経系への影響は見られなかった。なお、10 mg/kg 投与群で 3 及び 4 日目までの体重増加量が対照群と比較して有意に増大したが、全投与群の体重変動は同様に推移した。

したがって、ベキサロテンを投与量 100 mg/kg までラットに 4 日間連続投与しても、中枢神経系に影響は認められなかった。

2.6.2.4.2　心血管系に及ぼす影響

2.6.2.4.2.1　hERG 電流に及ぼす影響

添付資料番号：4.2.1.3-3（評価）

安全性薬理試験の一環として、hERG 電流に及ぼすベキサロテンの影響を、hERG チャネル［human ether-à-go-go 関連遺伝子によりコードされ、心筋の急速活性型遅延整流カリウムチャネル（Ikr）を構成］を安定発現させた HEK293 細胞にそれぞれベキサロテンの 0.03、0.1 及び 0.3 μmol/L の 3 濃度を約 10 分間灌流適用し、灌流前後の hERG 電流をホールセルクランプ法で測定した。また、陽性対照として選択的 Ikr 阻害剤の E-4031（0.1 μmol/L）を被験物質と同様に適用した。ベキサロテンの適用濃度は細胞外液に対するベキサロテンの溶解度が 0.3 μmol/L であったことから、0.3 μmol/L を最高濃度に設定し、以下公比約 3 で 0.1 及び 0.03 μmol/L を設定した。また、細胞に対するベキサロテンの曝露濃度を評価するため、0.03、0.1 及び 0.3 μmol/L の濃度の適用液を 10 分間灌流システムに灌流させた後、ベキサロテンの濃度を測定したところ、ベキサロテンの濃度は、それぞれ 0.0167、0.0569 及び 0.171 μmol/L であった。陽性対照物質 E-4031 は 0.1 μmol/L において hERG 電流を有意に抑制したのに対し、ベキサロテンは 0.3 μmol/L（灌流後濃度：0.171 μmol/L）まで hERG 電流に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.2.2　無麻酔イヌの心血管系に及ぼす影響

添付資料番号：4.2.1.3-4（評価）

安全性薬理試験の一環として、ベキサロテンを雄ビーグル犬に単回経口投与したときの心血管系に及ぼす影響を検討した。血圧、心拍数、心電図を覚醒非拘束下でテレメトリー法により測定した。4 頭の雄ビーグル犬に、媒体（PEG400/Tween 20/BHA/PVP/日本薬局方注射用水）並びにベキサロテンの 1、3 及び 10 mg/kg の 4 用量をラテン方格法により各 1 回ずつ 7 日間の間隔を設け投与した。投与液量は 5 mL/kg として強制経口投与した。投与量は海外で実施された臨床試験の治療用量（300 mg/m^2）における C_{max} と「ベキサロテンのイヌを用いた 39 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験[2.6.6.3.13、4.2.3.2-14]における初回投与時の C_{max}（雄）の値を参考に、イヌにおいてヒト治療用量における C_{max} と同程度の C_{max}

が期待できる 1 mg/kg を低用量とし、公比 3 で 3 及び 10 mg/kg を設定した。投与前及び投与後 1、2、4、8、24 時間において、血圧（収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧）、心拍数及び心電図パラメータ（PR 間隔、QRS 時間、QTc 間隔）を解析した。

いずれの用量においても、投与後 24 時間まで血圧、心拍数又は心電図パラメータに影響は認められなかった。一般状態について、10 mg/kg の 1 例に白色泡状吐物が投与後 4 時間に認められたが、解析時点において安定した血圧及び心電図波形が得られていたことから、この所見は本試験の心血管系の評価に影響するものではないと考えられた。

以上のことから、ベキサロテンは 10 mg/kg までイヌの心血管系に影響を及ぼさないと考えられた。

2.6.2.4.2.3　ラットの心血管系に及ぼす影響

添付資料番号：4.2.1.3-5（参考）

ベキサロテンを投与量 0（ゴマ油）、10、30、60 mg/kg で 1 群 10 例の雄 SD ラット（投与前日に血圧測定及び心拍数測定のため腹部大動脈にカニューレを装着）に 1 日 1 回、4 日間強制経口投与し、血圧、心拍数、血液学的検査及び血液生化学的検査を実施した。その結果、対照群で 2 日目及び 10 mg/kg 投与群で 3 日目の平均血圧が投与前値と比較して有意に上昇し、60 mg/kg 投与群で 1 日目の血圧が有意に低下したが、いずれも正常範囲内の変動であり、それらの生物学的意義はないと考えられた。また、対照群で 1 日目の心拍数が投与前値と比較して有意に上昇し、10 及び 30 mg/kg 投与群で 3 日目並びに 4 日目の心拍数が投与前値と比較して有意に低下したが、いずれも正常範囲内の変動であり、生物学的意義はないと考えられた。血液学的検査では、投与群のプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間が対照群と比較して有意に変化したが、いずれも正常範囲内の変化であり、生物学的意義はないと考えられた。血液生化学的検査では、アルカリホスファターゼ、ナトリウム及びグロブリンに有意な変化が認められ、本薬の影響によるものと考えられた。なお、30 mg/kg 投与群の 1 例が 2 日目に死亡したが、死因は不明であった。

2.6.2.4.3　呼吸器系に及ぼす影響

2.6.2.4.3.1　ラットの呼吸器系に及ぼす影響

添付資料番号：4.2.1.3-6（評価）

安全性薬理試験の一環として、ベキサロテンを雄ラットに単回強制経口投与したときの呼吸器系に及ぼす影響を検討した。呼吸数、1 回換気量、1 分間当たりの換気量を覚醒非拘束下で whole body plethysmograph 法により測定した。32 匹のラット［系統 Crl:CD(SD)、6 週齢］を 4 群（n=8）に振り分け、媒体（PEG400/Tween 20/BHA/PVP/日本薬局方注射用水）並びにベキサロテンの 3、30 及び 100 mg/kg を投与した。投与液量は 10 mL/kg として強制経口投与した。投与量は海外で実施された臨床試験の治療用量（300 mg/m^2）における C_{max} と「ベキサロテンのラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験[2.6.6.3.7、4.2.3.2-8]における初回投与時の C_{max}（雄）の値を参考に、ラットにおいてヒト治療用量にお

ける C_{max} と同程度の C_{max} が期待できる 3 mg/kg を低用量とし、中間用量及び高用量は 30 及び 100 mg/kg を設定した。投与前及び投与後 0.5、1、2、4、8、24 時間において、呼吸機能の測定を実施した。

いずれの用量においても、呼吸数、1 回換気量、1 分間当たりの換気量に影響は認められず、ベキサロテンは 100 mg/kg までラットの呼吸器系に影響を及ぼさないと考えられた。

2.6.2.5　薬理学的薬物相互作用試験

該当試験なし。

2.6.2.6　考察及び結論

2.6.2.6.1　ベキサロテンの作用機序

(1) RXR に対する結合と転写活性化

ベキサロテンは *in vitro* 試験において、検討した他のレチノイドと異なり、レチノイド受容体の内、RXR サブファミリーに対して選択的に結合し、転写活性化した。また、他のレチノイドと異なり、ベキサロテンは RAR サブファミリーにほとんど結合ー転写活性化せず、RXR に対して選択的であった[2.6.2.2.1(1), (2), (3)]。ベキサロテンの RXR に対する高い選択性は他のレチノイドでは見られない特徴であり、ベキサロテンは他のレチノイドと異なる生理活性を発揮すると考えられた。

RXR はホモ 2 量体 [1] 及びヘテロ 2 量体形成 [2] [3] を介して、自身及び他の核内受容体経路を活性化することが知られている。RXR ホモ 2 量体に関しては、RXR のアポトーシス誘導に関与していることが、構造生物学的研究から報告されている [4]。また、ヘテロ 2 量体に関しては、結合相手の核内受容体の下流経路を活性化すると考えられる。ベキサロテンは $RXR:PPAR_{\alpha}$、$RXR:PPAR_{\gamma}$、RXR:NGFI-B、RXR:LXR、RXR:PXR ヘテロ 2 量体を顕著に転写活性化し、$RXR:PPAR_{\alpha,\gamma}$ では、PPAR 側の基質と協調的にヘテロ 2 量体を活性化した[2.6.2.2.1 (4)]。こうした各種 2 量体の転写活性化を介してベキサロテンは薬理作用を発現していると考えられた。

(2) 細胞増殖に対する作用

種々の増殖性の細胞を用いた *in vitro* 培養系にベキサロテンを作用させると、対照に比べて細胞数/生細胞数/DNA 合成が低下し、ベキサロテンが細胞増殖を阻害することを示した。このとき、アポトーシス誘導が観察され、ベキサロテンがアポトーシス誘導を介して細胞増殖を阻害する可能性が考えられた[2.6.2.2.2 (1)～(3)]。また、HL60 細胞では、RXR を選択的に活性化するベキサロテンがアポトーシスを誘導したのに対し、RAR を活性化するレチノイドはアポトーシスを誘導せず、細胞分化を誘導した[2.6.2.2.2 (4)]。

RXR の活性化によりアポトーシスが誘導されること [5]、レチノイド受容体の内、RXR はアポトーシス誘導に関与し、RAR は分化に寄与すること [6]、及び他の RXR 選択的レチノイドによるアポトーシス誘導と細胞増殖阻害 [7] について報告されている。これらの RXR 及び RAR に関する報告は、ベキサロテンから得られた知見を支持した。以上のことから、ベキサ

ロテンは RXR を転写活性化することを介して、アポトーシス誘導－細胞増殖阻害といった薬理作用を発揮すると考えられた。

また、ベキサロテンは、ヒト正常乳腺上皮由来 184 細胞において、G1 期停止作用を示した[2.6.2.2.2 (5)]。このとき、アポトーシス誘導は観察されなかったが、対照に比べて細胞増殖が抑制されており、細胞周期の停止による増殖の抑制が示唆された。RXR の活性化による p21 を介した G1 期停止による細胞周期への影響について報告されており [8)]、ベキサロテンが RXR 活性化を介する G1 期停止を誘導し、細胞増殖を抑制する可能性も考えられた。

(3) CTCL 由来細胞に対する効果

ベキサロテンは、CTCL 由来の HH（菌状息肉症/セザリー症候群以外の CTCL 由来）及び HuT78（セザリー症候群由来）細胞に対して、*in vitro* で濃度依存的な抗腫瘍効果を示した[2.6.2.2.3 (1)]。また、ベキサロテンは、CTCL 由来の HH（菌状息肉症/セザリー症候群以外の CTCL 由来）細胞異種移植動物において、有意な抗腫瘍効果を示した[2.6.2.2.3 (2)]。ベキサロテンが、CTCL 由来細胞に対してアポトーシスを誘導して、増殖を阻害することが報告されており [9)]、ベキサロテンの CTCL 由来細胞に対する抗腫瘍効果は、アポトーシス誘導による細胞増殖阻害によるものと考えられた。

(4) 化学予防効果

ベキサロテンは、NMU-誘導ラット乳癌モデル動物の 1 次及び 2 次腫瘍に対して、陽性対照であるタモキシフェンよりも強い腫瘍退縮作用を有していた。また、同モデルで腫瘍発生率と腫瘍個数をタモキシフェン対照群に比べて有意に抑制し、化学予防効果を発揮した[2.6.2.2.4(1), (3)]。タモキシフェン耐性腫瘍でタモキシフェンとの併用効果を有する[2.6.2.2.4 (2)]ことから、ベキサロテンはタモキシフェンの ER を介した効果とは異なる経路（おそらくは RXR を介した経路）で化学予防効果を発揮していることが示唆された。また、齧歯類のその他の癌モデルに対するベキサロテンの化学予防効果についても報告されている [10)]。一方、こうしたベキサロテンの化学予防効果と、本薬の CTCL に対する治療効果との関係については、不明である。

(5) 臨床との関連

以上のように、ベキサロテンは RXR と選択的に結合し、RXR のホモ/ヘテロ 2 量体形成を介して、その下流経路を転写活性化し、アポトーシス誘導及び G1 期停止を伴う細胞増殖阻害作用、化学予防作用等が複合的に作用して、CTCL に対して抗腫瘍効果を発揮すると推定される。臨床的に RXR の関与を直接評価することは困難であるが、ベキサロテン抗腫瘍効果に対する耐性と RXR の消失との間に関連が報告されている [11)] ことから、RXR の関与は間接的に支持されると考えられる。また、ベキサロテンは、他のレチノイドと異なり RXR に選択的であることから、他のレチノイドとは異なる薬理作用を示したものと推察される。CTCL の確立した疾患モデルはないものの、ベキサロテンは CTCL 由来細胞の *in vitro* 培養系及び *in vivo* 異種移植モデルに対して、抗腫瘍効果を示した。なお、ベキサロテンのバイオマーカーとして確立されたものはないが、ベキサロテンの CTCL に対する治療効果と NAV3 遺伝子のコピー数と関連する可能性が報告されている [12)]。

2.6.2.6.2 副次的薬理試験

ニュージーランドウサギにベキサロテンを投与したとき、血漿中の総コレステロール濃度、トリグリセリド濃度は上昇し、一方、HDL-及び LDL-コレステロール濃度に関しては変化がなかった。SD ラットにベキサロテンを投与したとき、血漿中 HDL-コレステロール濃度は上昇し、一方、他のコレステロール画分では変化はなかった。また、HepG2 細胞を用いたレポーター遺伝子試験系では、ベキサロテンは濃度依存的、かつ RXR 依存的に ApoA1 プロモーターを転写活性化した。ベキサロテンは、RXR_{α} を介して *in vitro* 及び *in vivo* で $PPAR_{\alpha}$ を転写活性化した。また、この経路を介して db/db マウスの血漿中トリグリセリド濃度を低下させることが示唆された。HSD ラットで、ベキサロテン投与によって上昇した血漿中トリグリセリド濃度は、フェノフィブラートを用いることにより改善したが、ナイアシン及びロバスタチンでは、有意な改善は認められなかった。また、ZDF ラットでは、ベキサロテンによるトリグリセリド上昇にトリグリセリドのクリアランス低下が関与していることが示唆された。また、ベキサロテンは、SD ラットの血液凝固能に対して影響する可能性が示唆された。

2.6.2.6.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験として、ラット及びイヌを用いて中枢神経系、心血管系及び呼吸器系への影響の有無について検討した。ベキサロテンの QT 間隔に対する影響の有無についてはヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）を安定的に導入したヒト胎児腎臓由来（HEK）293 細胞を用いてホールセルクランプ法で評価した。

ベキサロテンを 100 mg/kg までラットに単回投与又は 4 日間連続投与しても中枢神経系及び呼吸器系機能への影響は見られず、ベキサロテンを 60 mg/kg までラットに 4 日間連続投与しても血圧及び心拍数に影響は認められなかった。ベキサロテンを 10 mg/kg までをイヌに単回投与しても心血管系機能への影響は見られなかった。hERG 試験ではベキサロテンは 0.3 μmol/L（灌流後濃度：0.171 μmol/L）まで hERG 電流に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.7　図表

本文中に記載した。

2.6.2.8　参考文献一覧

1） IJpenberg A, Tan NS, Gelman L, Kersten S, Seydoux J, Xu J, et al. *In vivo* activation of PPAR target genes by RXR homodimers. EMBO J. 2004;23:2083-91. [4.3.1]
2） Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-*cis* retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. Nature. 1992;358:771-4. [4.3.2]
3） Harmsen S, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JHM. The role of nuclear receptors in pharmacokinetic drug-drug interactions in oncology. Cancer Treat Rev. 2007;33:369-80. [4.3.3]
4） Qin S, Okawa Y, Atangan LI, Brown G, Chandraratna RA, Zhao Y. Integrities of A/B and C domains of RXR are required for rexinoid-induced caspase activations and apoptosis. J Steroid Biochem Mol Biol. 2008;112:25-31. [4.3.4]
5） Nagy L, Thomazy VA, Shipley GL, Fesus L, Lamph W, Heyman RA, et al. Activation of retinoid X receptors induces apoptosis in HL-60 cell lines. Mol Cell Biol. 1995;15(7):3540-51. [4.3.5]
6） Agarwal N, Mehta K. Possible involvement of Bcl-2 pathway in retinoid X receptor alpha-induced apoptosis of HL-60 cells. Biochem Biophys Res Commun. 1997;230:251-3. [4.3.6]
7） Liu B, Lee KW, Li H, Ma L, Lin GL, Chandraratna RAS, et al. Combination therapy of insulin-like growth factor binding protein-3 and retinoid X receptor ligands synergize on prostate cancer cell apoptosis *In vitro* and *In vivo*. Clin Cancer Res. 2005;11:4851-6. [4.3.7]
8） Tanaka T, Suh KS, Lo AM, De Luca LM. $p21^{WAF1/CIP1}$ Is a Common transcriptional target of retinoid receptors. J Biol Chem. 2007;282(41):29987-97. [4.3.8]
9） Zhang C, Hazarika P, Ni X, Weidner DA, Duvic M. Induction of apoptosis by bexarotene in cutaneous T-Cell lymphoma cells: relevance to mechanism of therapeutic action. Clin Cancer Res. 2002;8:1234-40. [4.3.9]
10） Lubet RA, Clapper ML, McCormick DL, Pereira MA, Chang WCL, Steele VE, et al. Chemopreventive efficacy of Targretin in rodent models of urinary bladder, colon/intestine, head and neck and mammary cancers. Oncol Rep. 2012;27:1400-6. [4.3.10]
11） Lin JH, Kim EJ, Bansal A, Seykora J, Richardson SK, Cha XY, et al. Clinical and *in vitro* resistance to bexarotene in Adult T cell leukemia: loss of RXR-alpha receptor. Blood. 2008;112:2484-8. [4.3.11]
12） Ranki A, Väkevä L, Sipilä L, Krohn K. Molecular markers associated with clinical response to bexarotene therapy in cutaneous T-cell lymphoma. Acta Derm Venereol. 2011;91:568-73. [4.3.12]

タルグレチンカプセル 75 mg

製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）

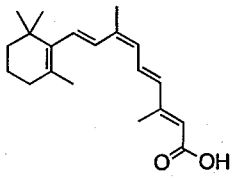
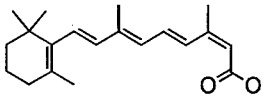
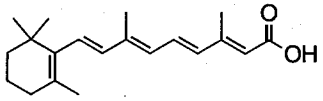
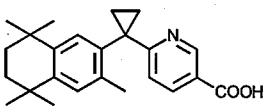
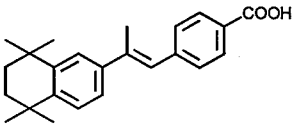
2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.3　薬理試験概要表

株式会社ミノファーゲン製薬

目次

略号一覧 3
2.6.3　薬理試験概要表 5
2.6.3.1　薬理試験：一覧表 5
2.6.3.2　効力を裏付ける試験 11
2.6.3.3　副次的薬理試験 11
2.6.3.4　安全性薬理試験 12
2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験 13

略号一覧

略号	一般名(略称)又は化学名	化学構造式
9-cis	9-cis-レチノイン酸	
13-cis	13-cis-レチノイン酸	
ATRA	All-trans-レチノイン酸	
LGD100268	2-[1-(3,5,5,8,8-Pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthyl)cyclopropyl]pyridine-5-carboxylic acid	
TTNPB	4-[(E)-2-(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチル-2-ナフタレニル)-1-プロペニル]安息香酸	

略号一覧（続き）

略号	省略していない表現 (英語)	省略していない表現 (日本語)
AIDS-KS	AIDS-Kaposi's sarcoma	AIDS-カポジ肉腫
AML	Acute Myeloid Leukemia	急性骨髄性白血病
ANOVA	Analysis of variance	分散分析
AOX	Acyl CoA Oxidase	アシル CoA オキシダーゼ
APL	Acute Promyelocytic Leukemia	急性前骨髄球性白血病
APTT	Activated Partial Thromboplastin Time	活性化部分トロンボプラスチン時間
BE	Bifunctional Enzyme	2 機能性酵素
BHA	Butyl hydroxyanisole	ブチルヒドロキシアニソール
CD38	Cluster of Differentiation 38	---
cDNA	Complementary DNA	相補的 DNA
CTCL	Cutaneous T-Cell Lymphomas	皮膚 T 細胞性リンパ腫
db/db マウス	---	diabetic 肥満マウス
DMBA	7,12- Dimethylbenz(a)anthracene	7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	ジメチルスルホキシド
ER	Estrogen Receptor	エストロゲン受容体
G1 期停止	---	細胞周期の G1 期に停止

HDL	High-Density Lipoprotein	高密度リポ蛋白質
HepG2	---	ヒト肝がん由来細胞株
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell	ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC50	50% Inhibitory Concentration	50%阻害濃度
IHC	Immunohistochemistry	免疫組織化学
Kd	Coefficient of Dissociation	結合定数
LDL	Low-Density Lipoprotein	低密度リポ蛋白質
LXR	Liver X Receptor	肝臓 X 受容体
NGFI-B	NGFI-B Orphan Nuclear Receptor	核内受容体 NGFI-B
NMU	N-Nitroso-N-Methylurea	N-ニトロソ-N-メチル尿素
NSCLC	Non-Small-Cell Lung Cancer,	非小細胞肺癌
p21	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor1	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 1
PMBC	Peripheral Blood Mononuclear Cell	末梢血単核球
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor	ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体
PT	Prothrombin Time	プロトロンビン時間
PXR	Pregnane X Receptor	プレグナン X 受容体
RAR	Retinoic Acid Receptor	レチノイン酸受容体
RXR	Retinoid X receptor	レチノイド X 受容体
SD ラット	Sprague-Dawley Rat	Sprague-Dawley ラット
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate	2-O-テトラデカノイルホルボール-13-酢酸
VDR	Vitamin D Receptor	ビタミン D 受容体

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：ベキサロテン

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	記載箇所	区分
効力を裏付ける試験						
RXR 選択的活性化作用						
発現系 $RXR_{\alpha,\beta,\gamma}$ 及び $RAR_{\alpha,\beta,\gamma}$ に対する結合性	部分精製受容体	*in vitro*	[redacted]	RR-750-93-004	4.2.1.1-1	参考
ベキサロテンによる RXR 転写活性化試験	細胞 (レポーター遺伝子試験系)	*in vitro*	[redacted]	RR-750-93-013	4.2.1.1-2	参考
RXR 転写活性化試験－他のレチノイドとの比較	細胞 (レポーター遺伝子試験系)	*in vitro*	[redacted]	RR-750-98-011	4.2.1.1-3	参考
ベキサロテンによる RXR:核内受容体(NR)ヘテロ二量体の活性化	細胞 (レポーター遺伝子試験系)	*in vitro*	[redacted]	RR-750-98-011	4.2.1.1-3	参考
細胞増殖抑制作用						
AIDS-カポジ肉腫(AIDS-KS)由来細胞培養系に対する成長阻害作用	AIDS-KS 由来細胞	*in vitro*	[redacted]	RR-750-93-007	4.2.1.1-4	参考
ヒト腫瘍細胞初代培養系に対する増殖抑制作用	ヒト腫瘍細胞初代培養系	*in vitro*	[redacted]	RR-750-98-009	4.2.1.1-5	参考
ヒト子宮頚癌細胞及び骨髄腫細胞の増殖に対する影響	多発性骨髄腫由来 RPMI8226 細胞、子宮頸癌由来 ME180 細胞	*in vitro*	[redacted]	RR-750-93-012	4.2.1.1-6	参考
ヒト前骨髄球性白血病由来細胞に対するアポトーシス誘導作用	HL60 細胞	*in vitro*	[redacted]	RR-750-93-008	4.2.1.1-7	参考
細胞周期に対する影響	ヒト正常乳腺上皮由来 184 細胞、乳癌由来 T47D 細胞	*in vitro*	Baylor College of Medicine	K.Wu, et al, Breast Cancer Research and Treatment. 2006; 96(2): 147-157	4.2.1.1-8	参考

続く

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：ベキサロテン

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	記載箇所	区分
効力を裏付ける試験 (続き)						
抗腫瘍作用 (CTCL 由来細胞を用いた試験)						
CTCL 由来細胞に対する *in vitro* 抗腫瘍作用	HH、HuT 78、及び MJ 細胞	*in vitro*	[redacted] 1)	P120544	4.2.1.1-9	評価
CTCL 由来細胞異種移植モデルに対する抗腫瘍作用	HH 細胞異種移植動物	経口投与	[redacted] 1)	P120547	4.2.1.1-10	評価
化学予防作用						
NMU 誘導-ラット乳癌モデルにおける腫瘍退縮作用	NMU 誘導-ラット乳癌モデル	ベキサロテン：経口投与、タモキシフェン：皮下投与	Ligand Pharmaceuticals Inc.	E. D. Bischoff, et al, Cancer Res. 1998;58:479-484	4.2.1.1-11	参考
				RR-750-98-001	4.2.1.1-12	参考
NMU 誘導-ラット乳癌モデルにおけるタモキシフェン耐性腫瘍に対する効果	NMU 誘導-ラット乳癌モデル	ベキサロテン：経口投与、タモキシフェン：皮下投与	[redacted]	RR-750-98-004	4.2.1.1-13	参考
NMU 誘導-ラット乳癌モデルにおける腫瘍発生率に対する効果	NMU 誘導-ラット乳癌モデル	ベキサロテン：経口投与、タモキシフェン：皮下投与	[redacted]	RR-750-98-010	4.2.1.1-14	参考

1) [redacted]

続く

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：ベキサロテン

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	記載箇所	区分
効力を裏付ける試験 (続き)						
化学予防作用 (続き)						
ヒト及び齧歯類乳癌細胞培養系に対する増殖阻害効果 (*in vitro*)	ヒト乳癌由来 T47D、SK-BR-3 細胞、NMU 誘導-ラット乳癌モデル由来 417 細胞	*in vitro*	[redacted]	RR-750-98-014	4.2.1.1-15	参考
Sencar マウス 2 段階発癌モデルにおける皮膚乳頭腫形成に対する効果	Sencar マウス 2 段階発癌モデル	経口投与	[redacted]	RR-740-94-008a	4.2.1.1-16	参考
その他の抗腫瘍作用						
ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞異種移植モデルにおける増殖抑制効果	ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞異種移植動物	経口投与	[redacted]	RR-740-94-007a、	4.2.1.1.-17	参考
ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞異種移植モデルにおける増殖抑制効果	ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞異種移植動物	経口投与	[redacted]	RR-740-93-014.a	4.2.1.1.-18	参考
ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞及び乳癌細胞の増殖阻害効果 (*in vitro*)	ヒト頭頸部扁平上皮癌由来 1483、SCC25、及び SqCC/Y1 細胞、乳癌由来 MCF-7 及び T47D 細胞	*in vitro*	[redacted]	RR-740-93-013	4.2.1.1.-19	参考

続く

タルグレチンカプセル 75 mg
2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：ベキサロテン

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	記載箇所	区分
効力を裏付ける試験 (続き)						
その他の抗腫瘍作用 (続き)						
小細胞肺癌(SCLC)及び非小細胞肺癌(NSCLC)由来細胞に対する効果	SCLC 由来 NCI-H82 細胞、NSCLC 由来 SW-900 及び CaLu-3 細胞、及び NCI-H82 細胞異種移植動物	*in vitro* 及び経口投与	[redacted]	RR-750-98-005	4.2.1.1-20	参考
ベキサロテンの前立腺癌モデルに対する効果	PC-3、LNCaP 細胞及び LNCaP 細胞異種移植動物	*in vitro* 及び経口投与	[redacted]	RR-750-98-006	4.2.1.1-21	参考
代謝物の薬理作用						
ベキサロテン主要代謝物の薬理活性(*in vitro*)	部分精製受容体及び細胞 (レポーター遺伝子試験系)	*in vitro*	Ligand Pharmaceuticals Inc.	RR-845-98-002	4.2.2.4-2	参考
				Stanley R et al, Drug Metabolism and Disposition. 2001; 29(7): 990-8	4.2.2.4-3	参考
その他の薬理試験						
急性前骨髄球性白血病(APL)由来細胞及びヒト末梢血単核細胞(PBMC)における CD38 発現に対する効果	NB4 細胞、PBMC 及び NB4 細胞異種移植動物	*in vitro, ex vivo* 及び経口投与	[redacted]	RR-750-98-012	4.2.1.1-22	参考

続く

タルグレチンカプセル 75 mg
2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：ベキサロテン

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	記載箇所	区分
副次的薬理試験						
ウサギ血漿中脂質への影響	ニュージーランドウサギ	経口投与	[redacted] 及び [redacted]	RR-740-93-016	4.2.1.2-1	参考
血漿中 HDL-コレステロール及びアポリポ蛋白 A1(ApoA1)への影響	*in vitro*: HepG2 細胞、*in vivo*: SD ラット	*in vitro* 及び経口投与	[redacted]	RR-740-93-017.a	4.2.1.2-2	参考
$PPAR_{\alpha}$ 遺伝子活性化に対する影響及び血漿中トリグリセリド濃度に対する影響	*in vitro*: 細胞(レポーター遺伝子試験系)、*in vivo*: SD ラット、db/db マウス	*in vitro* 及び経口投与	[redacted] 及び [redacted]	RR-750-98-013	4.2.1.2-3	参考
			Ligand Pharmaceuticals Inc.	R. Mukherjee, et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998;18:272-276	4.2.1.2-4	参考
ベキサロテンによる血漿中脂質上昇に対する高脂血症治療薬の効果	ZDF、HSD ラット	経口投与	[redacted]	RR-750-98-016	4.2.1.2-5	参考
SD ラットの血液凝固能に対する影響	SD ラット	ベキサロテン: 経口投与、ビタミン K1: 腹腔内投与	[redacted]	RR-740-94-002	4.2.1.2-6	参考

続く

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：ベキサロテン

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	記載箇所	区分
安全性薬理試験						
ラットの中枢神経系に及ぼす影響	ラット／Crl:CD (SD)	経口投与	[redacted] 1	B120666	4.2.1.3-1	評価
ラットの中枢神経系に及ぼす影響	ラット／SD	経口投与	[redacted]	RR-740-93-007	4.2.1.3-2	参考
hERG 電流に及ぼす影響	HEK293 細胞	*in vitro*	[redacted] 1)	B120664	4.2.1.3-3	評価
無麻酔イヌの心血管系に及ぼす影響	イヌ／ビーグル	経口投与	[redacted] 1)	B120662	4.2.1.3-4	評価
ラットの心血管系に及ぼす影響	ラット／SD	経口投与	[redacted]	RR-740-93-006	4.2.1.3-5	参考
ラットの呼吸器系に及ぼす影響	ラット／Crl:CD (SD)	経口投与	[redacted] 1)	B121250	4.2.1.3-6	評価

1) [redacted]

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

概要文中に記載

2.6.3.3 副次的薬理試験

概要文中に記載

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：ベキサロテン

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP 適用	記載箇所 報告書番号	区分
中枢神経 (一般症状及び行動)	ラット／SD	強制経口 単回投与	0、3、30 及び 100 mg/kg	雄 6 例／群	一般症状及び行動に影響なし	適	4.2.1.3-1 B120666	評価
中枢神経 (一般症状、行動及び抗痙攣作用)	ラット／SD	強制経口 1 日 1 回 4 日間投与	0、10、30 及び 100 mg/kg	雄 10 例／群 4 例 (高用量：抗痙攣作用評価用)	一般症状、行動及び抗痙攣作用に影響なし	非適用	4.2.1.3-2 RR-740-93-007	参考
心血管系 (hERG 電流)	hERG チャネル発現 HEK293 細胞	*In vitro*	0、0.03、0.1 及び 0.3 μmol/L (灌流後濃度 0.0167、0.0569 及び 0.171 μmol/L)	5/群	hERG 電流に影響なし	適	4.2.1.3-3 B120664	評価
心血管系 (血圧、心拍数及び心電図パラメータ)	イヌ／ビーグル (覚醒非拘束)	強制経口 単回投与	0、1、3 及び 10 mg/kg	雄 4 例／群 ラテン方格法	血圧、心拍数あるいは心電図パラメータに影響なし	適	4.2.1.3-4 B120662	評価
心血管系	ラット／SD	強制経口 1 日 1 回、 4 日間投与	0、10、30 及び 60 mg/kg	雄 10 例／群	血圧、心拍数及び血液学的検査について、生物学的意義のある変化は認められなかった。血液生化学的検査では、アルカリホスファターゼ、ナトリウム及びグロブリンに有意な変化が認められ、本薬の影響によるものと考えられた。 30 mg/kg 群の 1 例に死亡がみられた(死因不明)。	非適用	4.2.1.3-5 RR-740-93-006	参考
呼吸器系 (呼吸数、1 回換気量、1 分間あたりの換気量)	ラット／SD (覚醒非拘束)	強制経口 単回投与	0、3、30 及び 100 mg/kg	雄 8 例／群	呼吸数、1 回換気量、1 分間あたりの換気量に影響なし	適	4.2.1.3-6 B121250	評価

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

本申請における提出データなし。