2.4.2 薬理試験（2.6.2 項）

臨床に関する概括評価（2.5 項）でも述べたように、HC は、ヒトの CVD における確立されたリスク因子である。血清中の LDL-C を低下させると CVD リスクの低下につながるため、血清中 LDL-C の低下が CVD の薬物治療の第一目標となっている（Cholesterol Treatment Trialists' Collaboration, 2010、Grundy et al, 2004）。肝細胞表面 LDLR の再利用は、血清中 LDL-C 濃度の調節において極めて重要な役割を果たす（Brown et al, 1997）。

PCSK9 は、LDLR の再利用及び調節に重要な役割を果たすことが明らかになっている（Horton et al, 2007、Brown and Goldstein, 2006）。PCSK9 はセリンプロテアーゼのサブチリシンファミリーの一員であり、主に肝臓で発現する（Zaid et al, 2008、Seidah & Pratt, 2012）。PCSK9 は、分泌後、細胞表面の LDLR と直接結合して細胞内に取り込まれ、さらにリソソームに輸送されるメカニズムを通じて肝細胞表面 LDLR の減少を引き起こす。肝臓 LDLR が減少すると、循環血液中の LDL-C 濃度が上昇する。非臨床モデルにおいては、PCSK9 が LDLR や LDL-C の調節に重要な役割を持つことがわかっているが、ヒトにおいても PCSK9 が LDL-C 濃度の調節、ひいては CVD の発生に関与することが、以下の様に遺伝的な解析により示されている。ヒトを対象とした試験において、PCSK9 遺伝子の機能獲得型突然変異は、血清中 LDL-C 濃度の上昇（300 mg/dL 超）及び早期 CVD（Abifadel et al, 2003）と関連しており、機能喪失型（LOF）突然変異は血清中 LDL-C 濃度の低値（100 mg/dL 以下）と関連することが示されている（Cohen et al, 2005）。ヘテロ接合性 LOF 突然変異を持つ被験者では、これを持たない被験者と比較して血清中 PCSK9 濃度が低く、15 年間における CVD 発生率は 88%も低下している（Cohen et al, 2006）。さらに、複合ヘテロ接合体 LOF 突然変異を持つ 2 名の被験者では、PCSK9 が完全に喪失し、血清中 LDL-C 濃度が極めて低かった（20 mg/dL 未満）が、健康に対する影響は観察されなかった（Hooper et al, 2007、Zhao et al, 2006）。

evolocumab は、ヒト PCSK9 に対して高い親和性を有する遺伝子組換えヒト IgG2 モノクローナル抗体であり、PCSK9 と LDLR の相互作用を阻害する（図 2.4-1）。以下に示す *in vitro* 及び *in vivo* の効力を裏付ける試験は、2.6.2.2.1 項及び 2.6.2.2.2 項にて詳述する。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

in vitro の平衡結合試験から、evolocumab のヒト PCSK9 に対する高い結合親和性が明らかになった（K_D = 16 pmol/L）（報告書 R20080178）。evolocumab のカニクイザルの PCSK9 及びハムスター PCSK9 に対する結合親和性（それぞれ K_D = 8 及び 14 pmol/L）は、ヒトの PCSK9 に対する結合親和性と同等であったが（報告書 R20080178）、マウスの PCSK9 に対する結合親和性ははるかに低かった（K_D = 17000 pmol/L）。探索的試験では、evolocumab の結合親和性はラットの PCSK9 に対して非常に低く、ウサギ血清では検出可能な PCSK9 は認められなかった。これらの結合データに基づき、ハムスター及びカニクイザルを対象として *in vivo* で evolocumab の非臨床薬理評価を実施した。

PCSK9 は、プロ蛋白転換酵素ファミリーの分泌性糖タンパク質である。このファミリーのタンパク質は、プロドメイン、保存されたサブチリシン様触媒ドメイン、並びに可変 C 末端システイン及びヒスチジンリッチドメイン等の共通の構造的特徴を持つ（Seidah & Pratt, 2012）。evolocumab は

PCSK9 に対する抗原特異性を示し、プロ蛋白転換酵素ファミリーのほかのメンバー（PCSK1、PCSK2、PCSK4、PCSK7、並びに furin 等）とは結合しなかった（3.2.S.3.1 項及び 3.2.S.4.2 項）。

酵素結合免疫測定法（ELISA）では、evolocumab はヒト PCSK9 とヒト LDLR との相互作用を阻害した（50%阻害濃度［IC_{50}］= 1.94 ± 0.32 nmol/L［平均 ± SD、n = 3］）（報告書 R20080177）。

PCSK9 と LDLR との相互作用を阻害する作用から予想される通り、evolocumab は、培養 HepG2 細胞（ヒト肝細胞系）における LDLR 蛋白濃度を上昇させ（報告書 R20080222）、HepG2 細胞への LDL-C の取込みを増加させた（50%最大濃度［EC_{50}］= 129.6 ± 22.3 nmol/L［平均 ± SD、n = 3］）（報告書 R20080176）。

スタチンは、ヒドロキシメチルグルタリル補酵素 A［HMG CoA］還元酵素を標的とすることによりコレステロールの生合成を阻害する主要な脂質低下薬のクラスであり、LDL コレステロール及び CVD リスクを低下させる（Cholesterol Treatment Trialists' Collaboration［CTTC］, 2010）。市販のスタチンであるメビノリンは、予測通り培養 HepG2 細胞における LDLR 蛋白濃度を増加させた。evolocumab とメビノリンの併用は、evolocumab 単独あるいはメビノリン単独と比較してより LDLR 蛋白を増加させた（報告書 R20080222）。

evolocumab の *in vivo* における作用をハムスター及びカニクイザルで評価した。ハムスターでは、evolocumab の投与により肝臓 LDLR 蛋白濃度が増加し、非高比重リポ蛋白コレステロール（non-HDL-C: LDL-C と超低比重リポ蛋白コレステロール［VLDL-C］の合計）の血清中濃度が有意に低下した。カニクイザルでは肝臓 LDLR 蛋白に対する作用は評価していないが、血清中 LDL-C 濃度は有意に低下した（報告書 R20080179 及び R20090025）。

ハムスターでは、evolocumab の *in vivo* 投与により、高比重リポ蛋白コレステロール（HDL-C）の血清中濃度が低下した（報告書 R20080179）。ヒトと異なり、ハムスターでは HDL は LDLR のリガンドである（Goulinet and Chapman, 1993）。

カニクイザルでは、evolocumab の投与が血清中リポ蛋白に及ぼす作用について、SC 単回投与（0.05、0.2、0.5、3、10、30 mg/kg）で検証した（報告書 R20090025 及び 111322 試験［2.6.4.1.1.1.1 項］）。evolocumab は、0.05 mg/kg 群を除く全投与群で LDL-C の平均値を低下させた（$P < 0.01$）。その後、LDL-C はベースラインの水準に回復し、回復に要した時間（効果持続時間）は用量に依存していた。カニクイザルでは、evolocumab の投与に伴い HDL-C あるいはトリグリセリドは変化しなかった。111322 試験では、血清中 PCSK9 の低下がすみやかに生じ、投与から 1 日以内に血清中非結合型 PCSK9 濃度が定量水準を下回った。非結合型 PCSK9 の低下後、LDL-C の平均値が最低値にまで低下した（投与 1 週間後でおよそ 80%の低下）。PCSK9 濃度がベースラインの水準に回復するのと同時期に LDL-C もベースラインの水準に回復した。evolocumab 曝露量、非結合型 PCSK9 の減少、並びに血清中 LDL-C の低下との間に観察された薬物動態－薬力学的（PK/PD）関連性を図 2.4-2 に示す。

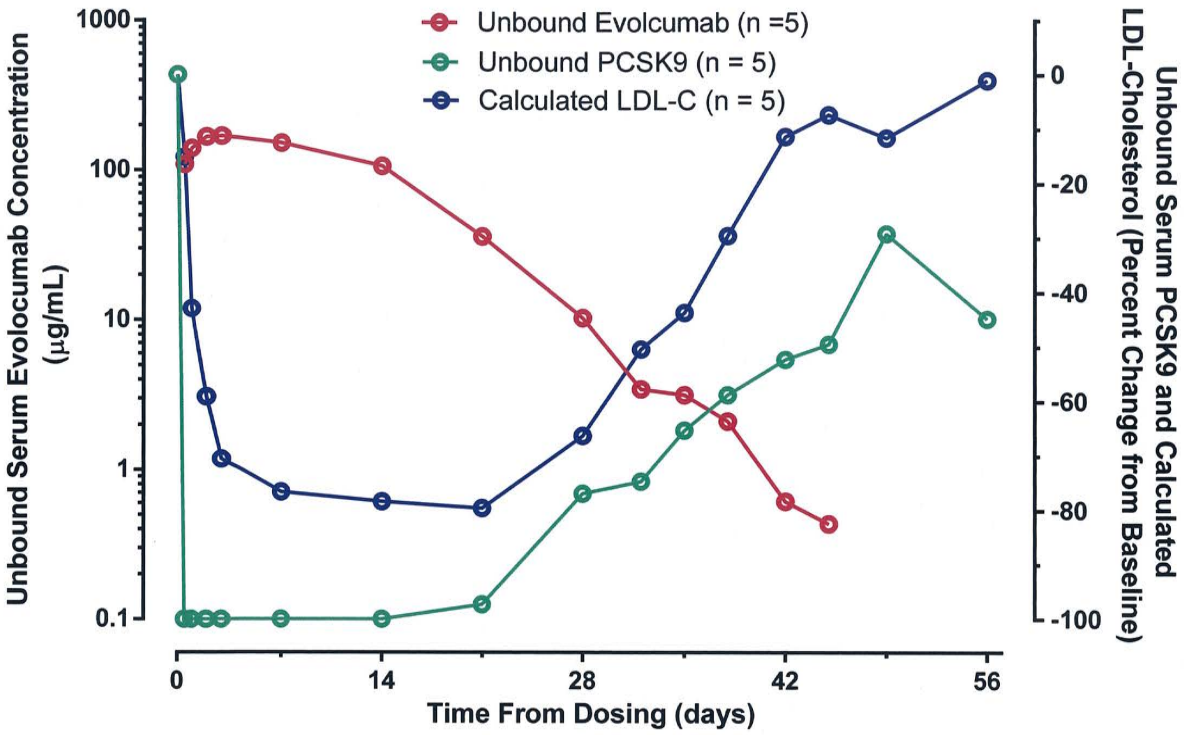


図 2.4-2　evolocumab を 10 mg/kg で単回 SC 投与した後の evolocumab の曝露量、遊離 PCSK9 の減少、並びに血清中 LDL-C の低下との間の PK/PD 関連性（111322 試験）

PCSK9 阻害後の肝臓における LDLR 蛋白濃度の上昇及び血清中コレステロールの低下は、PCSK9 LOF マウスモデル（Graham et al, 2007、Rashid et al, 2005）及び PCSK9 LOF 突然変異を持つヒト（Cohen et al, 2006）の表現型と一致している。

2.4.2.2　副次的薬理試験

PCSK9 は主に肝臓に発現して、肝臓の LDLR を調節しているが（Seidah et al, 2003）、小腸、腎臓、膵臓、脳等のほかの器官でも検出されている（Seidah et al, 2003、Poirier et al, 2006、Langhi et al, 2009）。全身循環血にも遊離 PCSK9 は認められるが、ヒトでの血漿中濃度は、代謝や食事、遺伝など，複数の要因次第で大きく異なる（Lakoski et al, 2009）。例えば LOF 突然変異を持つ個人では検出限界以下であり（Zhao et al, 2006）、血中脂質正常者や脂質低下療法を受けていない HC 患者ではおよそ 300 ng/mL（Koren et al, 2012、Koren et al, 2014、Blom et al, 2014）、また家族性高コレステロール血症（FH）患者では 600 ng/mL を超える（Raal et al, 2012、Stein et al, 2013）。

上記 2.4.2 項に述べたように、PCSK9 の LOF 突然変異では、血清中 LDL-C が低値を示すとともに CVD リスクも低く（Cohen et al, 2006）、また循環血液中に PCSK9 が検出されなくても有害な事象は生じていない（Zhao et al, 2006、Hooper et al, 2007、Cariou et al, 2009）。しかし、報告されている PCSK9 蛋白の分布からすると、PCSK9 には肝臓を介した LDL-C の調節以外の役割があるかもしれない。以下の項では、理論的に想定される PCSK9 の役割の生理的な重要性や、肝臓以外の部位で

evolocumabがPCSK9を阻害した場合に想定される影響、さらに血中LDL-C低下がCVDリスク低減以外に与え得る影響について論じる。

2.4.2.2.1 evolocumabの脳及び認知機能に対する潜在的影響

ヒトの脳はコレステロールを多く必要とし（Dietschy and Turley, 2001、Dietschy and Turley, 2004）、脳内コレステロール恒常性の調節異常は、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、ニーマン・ピック病C型、スミス・レムリ・オピッツ症候群などの慢性神経変性疾患につながるとされている（Goedeke and Fernandez-Hernando, 2014）。従って理論上、脳内のコレステロール恒常性を乱す脂質低下薬は、神経機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。最近では、スタチン薬の使用に伴う認知機能障害（記憶喪失など）が報告されている（Food and Drug Administration［FDA］, 2012）。

しかし以下のいくつかの理由により、evolocumabの臨床使用は認知機能に対して影響しないと考えられる。それらは、evolocumabは脳に十分に到達しないこと、PCSK9のLOF突然変異やevolocumabの長期間投与（1年を超える）は、ヒトにおける認知機能障害と関連しないこと、動物試験においてevolocumabが生涯投与試験でも神経行動学的に影響せず、脳病理組織学的にも変化を及ぼさなかったこと、evolocumabの作用機序がスタチンと異なっていること、さらに脳におけるPCSK9機能とコレステロール恒常性についての我々の知見などが挙げられる。以下に、これらについてより詳細に論じる。

2.4.2.2.1.1 中枢神経系におけるPCSK9、LDLR、及び脂質生物学に関する現在の理解

コレステロールは脳の構成物質として重要であり、細胞膜及びニューロンを取り囲むミエリン鞘の主要成分である（Dietschy and Turley, 2004、Saher and Simons, 2010）。脳には血液脳関門（BBB）があるため、他の肝外臓器の様に循環血からリポ蛋白を介してコレステロールが供給されない。このため脳のコレステロールは、脳内での合成にのみ由来する（Pitas et al, 1987、Dietschy and Turley, 2004、Zlokovic et al, 2008）。脳中のコレステロール濃度は、コレステロールの生合成と脳からのステロール代謝物24S-ヒドロキシコレステロールとしての排泄を組み合わせることによって、（循環血液中の濃度とは無関係に）一定に保たれている（Dietschy and Turley, 2004）。また、ヒトの脳におけるコレステロール代謝回転速度は極めて遅い（他の組織の約1/20）（Dietschy and Turley, 2004）。これらの知見は、脳のコレステロール恒常性経路は独自のもので、身体のほかの組織から独立しており、evolocumabによる血清中コレステロール低下作用の影響を受けないことを示唆している。

中枢神経系の発生におけるPCSK9の役割が、マウス胚細胞を用いた*in vitro*試験によって示唆されている（Seidah et al, 2003）。この試験では、PCSK9を遺伝子導入して過剰発現させると神経前駆細胞の分化が促進することが明らかとなった。*in vivo*では、ゼブラフィッシュでPCSK9 mRNAをノックダウンすると、中枢神経系（CNS）の発達障害による出生前死亡が認められた（Poirier et al, 2006）。しかし、より高次の脊椎動物では、複数の研究室から得られたPCSK9ノックアウト（KO）マウス（Rashid et al, 2005、Chen et al, 2010）、あるいは子宮内で薬理学的活性量のevolocumabに曝

露したカニクイザル新生児（2.6.6.6.2 項）の知見、いずれにおいても、形態学的あるいは機能的な CNS の発達障害は認められていない。

発生後の脳をより反映した試験系では、RNAi を介した PCSK9 のノックダウンが、マウス小脳顆粒神経細胞のアポトーシスを減少させることが *in vitro* 試験によって明らかになっている（Kysenius et al, 2012）。一方、PCSK9 の過剰発現は、培養ラットニューロンでアポトーシスを誘発した（Bingham et al, 2006）。これらの *in vitro* データから、脳の PCSK9 はアポトーシスに関与している可能性があり、PCSK9 濃度の低下は細胞の生存を促進するかもしれない。しかしこれらの人為的な操作を加えた *in vitro* 系は、以下のことから *in vivo* での作用を反映していない可能性もある。

成熟したラットでは、脳組織に PCSK9 の mRNA が発現している（Seidah et al, 2003）。また、ヒト脳脊髄液（CSF）でも PCSK9 蛋白が検出されているが、ヒト CSF における PCSK9 濃度は血清濃度の約 1/60 であり、1 日を通じて安定していた（Chen et al, 2014）。これは、血清中 PCSK9 では概日周期／食後の変動がみられるのと対照的である（Persson et al, 2010）。循環血液中の PCSK9 は BBB を通過しないことが明らかにされている（Rousselet et al, 2011）。これらの知見から、脳中の PCSK9 蛋白は局所合成に由来し、循環血液中の濃度とは無関係であると考えられる。

成熟した脳では、LDLR も発現している（Herz and Bock, 2002）。脳における LDLR の通常の機能の特徴は十分に明らかにされていないが、CNS 内の細胞間のコレステロール輸送に関与し、軸索成長を支え、また 24S-ヒドロキシコレステロールの排泄を促すと仮定されている（Dietschy and Turley, 2004）。脳内では、LDLR はアポリポ蛋白 E（ApoE）と結合し、それを調節することも明らかになっている（Herz, 2009、Kim et al, 2009）。ApoE の配列変異は、アルツハイマー病（AD）のよく知られたリスク因子である（Strittmatter et al, 1993、Rhinn et al, 2013、Yu et al, 2014）。ApoE の配列変異が、AD 患者にみられる老人斑の主要成分であるアミロイドβペプチド（Aβ）の分解及び除去に影響するからである（Tanzi et al, 2005、Haass et al, 2007）。マウスの脳では、LDLR の過剰発現により ApoE 濃度が顕著に低下し（最大 90%）、顕著な Aβ凝集の減少及び Aβクリアランスの増加が認められた（Kim et al, 2009）。これらのデータは、マウスモデルの脳における LDLR の増加が、神経変性のリスクを低下させることを示している。

Liu らは、PCSK9 KO マウスの脳では LDLR 濃度が上昇していないことから、肝臓とは異なり、脳では PCSK9 は LDLR を調節していない可能性を示唆している（Liu et al, 2010）。脳において PCSK9 による LDLR 調節機能がないことのメカニズムは十分には理解されていない。しかしながら近年の *in vitro* 試験では、PCSK9 抵抗性線維芽細胞においては PCSK9 が細胞内に移動後に LDLR から解離して大半が PCSK9 単体でリソソームに進んで分解され、再利用されるのは少量だけであることが明らかになっており（Nguyen et al, 2014）、脳においてもこうしたメカニズムが関係しているかもしれない。

Liu らは、LDLR に対する作用の欠如に加えて、彼らの PCSK9 KO マウス系統の脳ホモジネートではβ部位アミロイド前駆体蛋白（APP）切断酵素 1（BACE1）の発現あるいは Aβの沈着に変化がなかったことを報告した（Liu et al, 2010）。これらのデータは、BACE1 及び Aβの脳濃度が上昇するとした、別の系統の PCSK9 KO マウスにおける以前の報告と対照的である（Jonas et al, 2008）。この 2008 年の報告では、脳 LDLR 濃度は記載されていない。BACE1 の CSF 濃度は AD リスクの予測因子とされているが（Vassar et al, 2004、Zhong et al, 2007）、ヒトの CSF では PCSK9 と BACE1 の濃

度間に相関関係はみられないことから（Chen et al, 2014）、Liu らの結果の方が、ヒトから得られているデータと、より一致していると考えられる。

これらの結果は、PCSK9 LOF 一塩基変異多型（SNP）rs11591147 を持つ、約 6000 名の高齢者（年齢 70 歳以上 82 歳以下）を対象とした近年の試験で、血清中コレステロールは低下していたが、認知能力に対する影響はなかった（Postmus et al, 2013）ことと一致している。同様に、AD 症例 1270 名を含む認知症患者 1567 名を対象に高密度連鎖平衡マッピングにより脂質代謝に関与する 25 遺伝子を解析した報告では、認知症と ApoE（既知の AD リスク因子）関連遺伝子マーカーとの関連性は予想どおりみられたが、PCSK9 の配列変異との関連性はなかった（Reynolds et al, 2010）。

結論として、PCSK9 はヒトの脳に極めて低濃度で存在し（血清濃度のおよそ 1/60）、局所的に合成され（全身循環に由来しない）、循環血液中の PCSK9 とは無関係に調節される。CNS 中に認められた PCSK9 の濃度は、認知機能障害の既知のリスク因子と相関していない。また、脳における LDLR の増加に伴って AD のリスク因子の濃度が低下しているが、脳では LDLR は PCSK9 に反応しないように思われる。脳における PCSK9 の機能的役割は明確になっていないが、PCSK9 機能低下と関連した SNP を持つ高齢者に認知機能障害は認められていない。そのため、脳の PCSK9 阻害は、脳の機能あるいは病態生理に影響しないと予想される。また、以下の 2.4.2.2.1.3 項に述べるように、evolocumab は薬理学的に妥当性がある濃度で脳に到達する可能性は低いと考えられる。

2.4.2.2.1.2　スタチン関連性認知機能障害

FDA は、2012 年に、スタチンの使用に伴う記憶喪失、物忘れ、健忘、記憶障害、錯乱等の、まれで重篤ではない可逆性の認知機能障害の報告に言及したスタチンに関する薬物安全性通知を発行した（FDA, 2012）。FDA はこの通知を、FDA の有害事象報告システム（AERS）のデータベース、既報の医学文献（症例報告及び観察研究：Orsi et al, 2001、Wagstaff et al, 2003、Zamrini et al, 2004、Zandi et al, 2005、Zhou et al, 2007、Evans et al, 2009、Parker et al, 2010、Benito-León et al, 2010、Beydoun et al, 2011、Bettermann et al, 2012）、並びに無作為化臨床試験（Muldoon et al, 2000、Muldoon et al, 2004、Trompet et al, 2010、Feldman et al, 2010）の検討結果に基づいて発行したと述べている。

近年の疫学的分析では、スタチンが認知機能に及ぼす有害な作用はないことが示唆されているが、明確な結論に達するには、より大規模で、より優れたデザインに基づいた試験が必要であると考えられている（Jukema et al, 2012、Richardson et al, 2013、Swiger et al, 2013、Rojas-Fernandez et al, 2014）。

スタチンに関連した認知機能障害について一般的に提唱されるメカニズムは、スタチンが脳のコレステロール合成を阻害し、神経髄鞘形成を妨げ、神経伝導欠損及び神経機能障害に至るというものである（Golomb et al, 2004、Klopfleisch et al, 2008、Miron et al, 2009、Saher and Simons, 2010、McGuinness et al, 2013）。

こうしたメカニズムや、evolocumab 等モノクローナル抗体 PCSK9 阻害剤がスタチンとは物理化学的特性が異なること、並びに CNS における PCSK9、LDLR、脂質生物学に関する知見に基づくと、スタチンによる神経認知リスクが evolocumab にあてはまる可能性は低いと考えられる。この結論を裏付ける科学的根拠を以下に述べる。

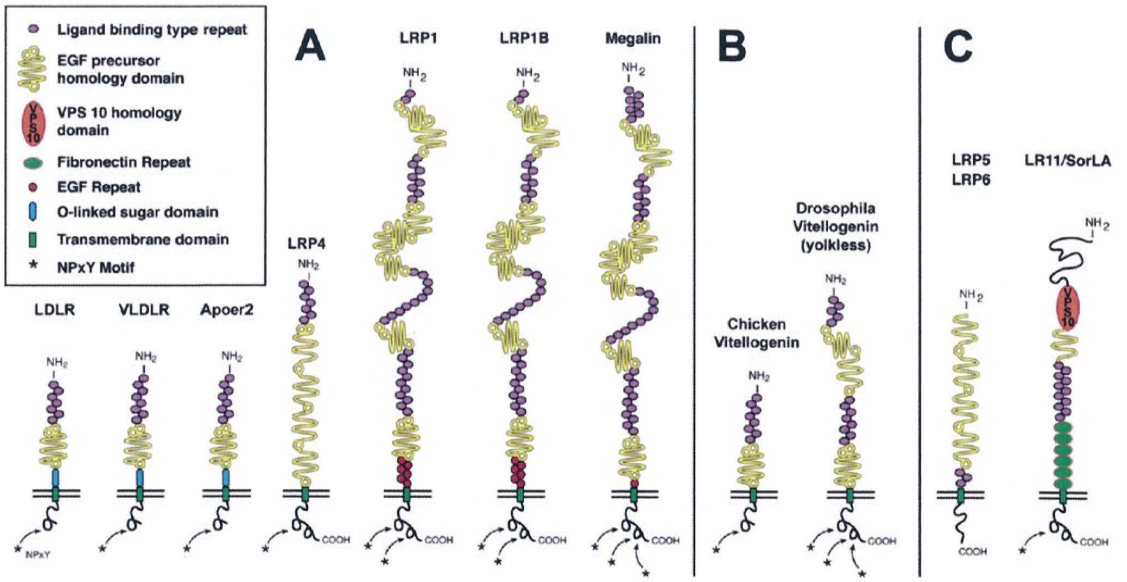
2.4.2.2.1.3　スタチンによる認知機能障害と evolocumab の関連性

2.4.2.2.1.1 項に述べたように、脳のコレステロール恒常性は循環血中コレステロール濃度と関係せず、evolocumab の血清中コレステロール低下作用には影響を受けないと考えられる。また、循環血液中の PCSK9 は BBB を通過しない（Rousselet et al, 2011）。したがって、evolocumab が CNS に対して影響するのは、脳内において evolocumab が直接作用する場合だけだと考えられる。他の抗体薬と同様、evolocumab の CNS への分布は非常に限定されると推察される（Poduslo et al, 1994、Triguero et al, 1989、Jones and Shusta, 2009、Frank et al, 2011）。循環血液中の抗体の血液濃度に対する脳濃度の割合は、定常状態で 0.1%～0.2%と推定されている（Yu and Watts, 2013）。そのため、患者における evolocumab の既知の循環血液中濃度（2.5 項）に基づくと、evolocumab は脳では薬理学的に意味のある濃度に達しないと予想される。最後に、2.4.2.2.1.1 項に記載したとおり、脳における PCSK9 の局所阻害は、脳の機能あるいは病態生理に影響しないと予想される。

以上の知見は、evolocumab が、CNS 内の PCSK9 に対する局所的な直接作用によっても、またコレステロールや PCSK9 の循環血液中濃度の低下を介した間接的作用によっても、脳中コレステロール濃度に影響しないことを示唆している。この結論は、これまでにどの臨床試験でも evolocumab に関連した神経認知作用が認められていないこと（2.7.4 項）、並びに動物試験において、evolocumab の生涯投与によっても神経行動的変化あるいは脳の病理組織変化が認められていないこと（2.6.2 項及び 2.6.6 項）と一致している。

2.4.2.2.2　PCSK9 が他の LDLR ファミリータンパク質に作用する可能性

LDLR は、超低比重リポ蛋白受容体（VLDLR）、ApoE 受容体 2（ApoER2）、並びに LDLR 関連受容体（LRP's）を含むタンパク質ファミリーのメンバーである。細胞表面受容体の LDLR ファミリーは、リガンド結合リピート、上皮成長因子（EGF）様ドメイン、及び短い細胞質尾部といった複数の構造的特徴を共有している（図 2.4-3）。



LDLR ファミリータンパク質（Dieckmann, 2010）。 A). 主要な哺乳類 LDLR ファミリータンパク質、B). 非哺乳類タンパク質、C). 主要な LDL ファミリータンパク質と構造的特徴を共有するサブグループ

図 2.4-3　LDL 受容体ファミリータンパク質

PCSK9 は主に EGFa ドメインを介して LDLR と結合する（Zhang et al, 2007、Kwon et al, 2008）。ファミリータンパク質間における EGFa ドメインのアミノ酸類似率は 20%～60%である。PCSK9 の LDLR への結合において、LDLR の EGFa ドメインのアミノ酸であるアスパラギン（Asn）295、グルタミン酸（Glu）296、アスパラギン酸（Asp）310、チロシン（Tyr）315、ロイシン（Leu）318 が重要な役割を果たしている（Gu et al, 2013）。Asn、Glu、Asp、Tyr はカルシウム結合及びドメインの折り畳みに関与しており、LDLR、VLDLR、ApoER2、LRP1 に保存されているが、Leu は LDLR のみに存在する（図 2.4-4）。

```
hLDLR   293  GTNECLD-NNGGCSHVCNDLKIGYECLCPDGFQLVAQRRCE
VLDLR   329  HINECLV-NNGGCSHICKDLVIGYECDCAAGFELIDRKTCG
ApoER2  300  GLNECLH-NNGGCSHICTDLKIGFECTCPAGFQLLDQKTCG
LRP1    2915 HINECLSRKLSGCSQDCEDLKIGFKCRCRPGFRLKDDGRTC
LRP4    681  GKNRCGD-NNGGCTHLCLPSGQNYTCACPTGFRKISSHACA
LRP6    588  GSNPCAE-ENGGCSHLCLYRPQGLRCACPIGFELISDMKTC
```

LDLR ファミリータンパク質の EGFa ドメインの配列アラインメント（Gu, 2013）。太字は PCSK9 の結合に重要な役割を果たす主なアミノ酸を示す。

図 2.4-4　LDLR ファミリータンパク質の EGFa ドメインの配列アラインメント

VLDLR の Asp を Leu で置換し、LDLR の EGFa を模倣すると、変異型 VLDLR と PCSK9 は結合する。このことは、PCSK9 の LDLR ファミリータンパク質との相互作用において、Leu が重要であること及び LDLR の EGFa に高い選択性があることを強く示している（Zhang et al, 2007）。VLDLR 及び ApoER2 は、LDLR と同程度の大きさであり、構造ドメインは類似している（Blacklow, 2007）。LRP1 及び LRP2（メガリン）等の、より大きなファミリータンパク質は、複数の基本構造ドメインの繰り返しから成る。ApoE は主要なファミリータンパク質すべてに結合するリガンドであるが、LDLR ファミリータンパク質は、ApoE だけではなく多様な高分子と細胞表面で結合し、エンドサイトーシスと呼ばれる細胞膜陥入で細胞内に取り込むプロセスによって、それらを細胞内に輸送する（Brown et al, 1997）。

LDLR は、リガンドである ApoE 及び ApoB を含む脂質輸送リポ蛋白だけでなく、PCSK9 と結合する（Blacklow, 2007）。受容体ファミリー間の構造的特徴の類似性を考慮すると、理論的には、PCSK9 が LDLR 発現量を制御するのと同様の方法で他の受容体発現量を制御し、それらのリガンド量を調節している可能性がある。以下の項では、この PCSK9 相互作用の可能性を考察し、PCSK9 の VLDLR、ApoER2、ほかの LDLR ファミリータンパク質との相互作用が、evolocumab を患者に投与する際の安全性に影響する懸念はないとの結論を述べる。

2.4.2.2.2.1　PCSK9 と LDLR ファミリー受容体との *in vitro* における相互作用

PCSK9 と LDLR、LRP1、VLDLR、ApoER2（LRP8）、並びにソルチリン（LR11/SorLA）との *in vitro* 結合又は相互作用が検討されている。

PCSK9 及び LRP1

PCSK9 を過剰発現させた HepG2 細胞では、内因性 LDLR は減少したが、LRP1（LDLR と 40%の同一性を示す）は減少しなかったことから（Western ブロット解析により判定）、PCSK9 と LRP1 の間に相互作用はないと考えられた（Benjannet et al, 2004）。対照的に、Canuel らは、PCSK9 の過剰発現により多くの細胞株で LRP1 発現が減少することを見出したが（Canuel et al, 2013）、この試験では上述の試験よりも PCSK9 の発現量が多く、データの生理学的な意味は不明である。

PCSK9 及び VLDLR、ApoER2

PCSK9 と VLDLR 及び ApoER2 との相互作用が、無細胞系のタンパク質結合試験並びに発現細胞株で検討されている。結合試験には、精製組換えタンパク質が用いられている。

無細胞系の結合アッセイでは、精製 PCSK9 と VLDL 受容体及び ApoER2 との直接相互作用が検討された（Shan et al, 2008）。その結果、PCSK9 の VLDLR 及び ApoER2 に対する親和性は、LDLR に対する親和性よりおよそ 10 倍及び 100 倍弱いことが示された（Shan et al, 2008）。この結果とは異なり、表面プラズモン共鳴（SPR）を使用した結合実験では、組換え PCSK9 は、同程度の親和性で LDLR（K_D 386 nmol/L）、VLDLR（K_D 379 nmol/L）、並びに ApoER2（K_D 516 nmol/L）と結合することが明らかになった（Liu et al, 2010）。これらの違いには、組換えタンパク質及び異なる非生理条件での測定が関連していると考えられた。

精製タンパク質ではなく、細胞表面に LDLR 及び VLDLR を発現させたトランスフェクト細胞においては、PCSK9 は VLDLR と結合しなかった（Zhang et al, 2007、Gu et al, 2013）。Poirier らも細胞に VLDLR 及び ApoER2 をトランスフェクトして発現させた。外因性 PCSK9 と培養したとき、VLDLR 及び ApoER2 蛋白濃度が低下したことから、VLDLR 及び ApoER2 受容体の発現の制御に PCSK9 が関与していることが示唆された（Poirier et al, 2008）。ふたつの研究から得られた結果に差が生じた理由は明らかではない。

別の一連の試験では、PCSK9 を RNAi でノックダウンすることにより、Western ブロッティングで測定した培養神経細胞中の ApoER2 蛋白発現量が増加した（Kysenius et al, 2012）。

PCSK9 及びソルチリン

近年、SPR による精製タンパク質の親和性測定及び細胞溶解物の免疫沈降により、PCSK9 とソルチリンが相互作用することが報告されている（Gustafsen et al, 2014）。ソルチリン欠損マウスでは血漿中 PCSK9 濃度が低下し、ソルチリン過剰発現マウスでは上昇していた（Gustafsen et al, 2014）。ほかの細胞表面受容体とは対照的に、ソルチリンは細胞内でのみ PCSK9 と相互作用し、細胞からの PCSK9 分泌を促すと考えられる。evolocumab と分泌された PCSK9 は細胞外で相互作用するため、evolocumab がそのプロセスに影響する可能性は低い。

これらの点を総合的にみると、上記の試験から PCSK9 が LDLR 以外の LDLR ファミリータンパク質と *in vitro* においては相互作用する可能性が確認された。

2.4.2.2.2.2　PCSK9 と LDLR ファミリー受容体との *in vivo* における相互作用

PCSK9 KO マウスを用い、PCSK9 と LDLR ファミリータンパク質（LRP1、VLDLR、並びに ApoER2）との *in vivo* 結合又は相互作用が検討されている。

PCSK9 と VLDLR、及び LRP1

Rashid らが作製した PCSK9 KO マウスでは、全肝臓溶解物を Western ブロットにより測定したところ、VLDLR あるいは LRP1 蛋白濃度に変化はみられなかったが、LDLR 蛋白濃度には明らかに上昇が認められた（Rashid et al, 2005）。野生型マウスと PCSK9 KO マウスの間で体重に有意差はなかったが、脂肪蓄積の差は言及されていない。Roubtsova らが作製した別の系統の PCSK9 KO マウスでは、生後 6 カ月のマウスの生殖腺周囲脂肪ににおける細胞表面 VLDLR 蛋白量は、野生型の系統と比較して最大で 40 倍高かった。野生型マウスと比較して内臓脂肪蓄積は約 80%多かったが、体重には差がなかった（Roubtsova et al, 2011）。彼らは、この KO マウスでは PCSK9 が全く存在しないことにより、脂肪組織の VLDLR 発現量の増加を引き起こしトリグリセリド沈着を増加させ、その結果、組織量の増加が引き起こされたと考察している。

これら 2 つの報告は異なっているが、Rashid らにより報告された *in vivo* の成績は、evolocumab の非臨床データと一致している（Rashid et al, 2005）。カニクイザル及びハムスターを用いた毒性及び薬理試験において、evolocumab による PCSK9 阻害の影響が広範に検討されており、両動物種に薬理作用を示す用量を超える用量を投与したとき、PCSK9 の阻害と LDLR の増加、及び血清中 LDL-C の低下がみられたが、身体の脂肪蓄積あるいは体重に対する作用等、PCSK9 とほかの LDLR ファミリータンパク質との相互作用に関連すると考えられる作用は認められなかった。Roubtsova らにより報告されたデータが異なっている理由は不明である（Roubtsova et al, 2011）。

evolocumab はいずれの臨床試験でも PCSK9 阻害と体重の間に逆相関が報告されていないことから、ヒトでは VLDLR 発現に対する PCSK9 阻害の影響がないことが示唆される（2.7.4 項）。しかし、多くの臨床試験において、evolocumab 投与被験者ではプラセボ投与被験者と比較して血漿中 VLDL コレステロール及び血漿中トリグリセリド濃度が約 20%～30%低下している（2.7.3 項）。PCSK9 阻害により VLDL が低下するメカニズムは完全には解明されていないが、PCSK9 阻害によりアップレギュレートされる肝臓 LDLR が VLDL と結合できることを考慮すると、血漿中 VLDL の低下は肝臓 LDLR を介した VLDL の再取込みに起因する可能性が極めて高いと考えられる。

PCSK9 及び ApoER2

ApoER2 は、主に脳に発現する（Reddy et al, 2011）。PCSK9 KO 及び PCSK9 過剰発現トランスジェニックマウスを用い、*in vivo* で脳 ApoER2 蛋白発現制御における PCSK9 の役割が検討されている（Liu et al, 2010）。どちらのモデルでも、海馬及び皮質溶解物の Western ブロットにより測定した脳 ApoER2 蛋白濃度は、野生型と同一であった。また、evolocumab は、薬理学的に意味のある濃度で脳に分布する可能性は低い（2.4.2.2.1.1 項）。

以上より、結論として、*in vivo* で PCSK9 と LRP1、VLDLR、あるいは ApoER2 との間に機能的に意味のある相互作用があることを示す証拠は得られていない。

PCSK9 の阻害は、ほかの LDLR ファミリータンパク質に有害な作用をもたらすことはないと予想され、そのことは evolocumab について得られている広範な臨床及び非臨床データと一致している。

2.4.2.2.3 C 型肝炎感染性において予想される PCSK9 阻害の影響

C 型肝炎ウイルス（HCV）の感染は複雑な多段階のプロセスであり、ウイルス側と細胞側双方の複数の因子が関係し、それらによってウイルスの肝細胞への取り込みやその後の HCV 複製が誘発

される（Burlone and Budkowska, 2009）。CD81 やスカベンジャー受容体 SR-BI、密着結合分子のクラウディン 1 及びオクルジンは、HCV の肝細胞侵入を媒介する主要な受容体である（Pileri et al, 1998、Scarselli et al, 2002、Evans et al, 2007、Liu et al, 2010）。LDLR も HCV 感染性を修飾すると考えられているが、その正確な役割は明らかになっていない（Molina et al, 2007、Burlone and Budkowska, 2009）。一部の研究者は、LDLR が HCV の細胞侵入に必要であることを示唆しているが（Agnello et al, 1999）、より最近の研究ではこの説に異議が唱えられており、むしろ感染後に HCV が LDLR 表面発現をアップレギュレートして細胞内脂質環境を修飾することにより HCV の増殖が促進されていることが提起されている（Albecka et al, 2012、Syed et al, 2014）。LDLR の関与はさらに複雑であり、スタチンは LDLR を増加させる一方、HCV 複製を阻害する作用もあり、実際、HCV 治療薬としての可能性が研究されている。ただし、スタチンの抗ウイルス特性は、イソプレノイド枯渇に基づく可能性が高い（Vere et al, 2012）。LDLR の正確な役割は明らかになっていないが、理論的には、PCSK9 阻害を通じた LDLR 発現の増加により HCV の易感染性が高まる可能性がある。この可能性に関して、*in vitro* 及び *in vivo* での研究がある（Labonté et al, 2009、Mazumdar et al, 2011、Ramanathan et al, 2013）。

Labonté らは、*in vitro* で非分泌性過剰発現細胞膜結合型の PCSK9 を使用して、PCSK9 が LDLR とは無関係に、主要な HCV 細胞侵入因子である CD81 表面発現を減少させ、HCV 感染を抑えることを明らかにした（Labonté et al, 2009）。Mazumdar らは、別の *in vitro* 系では、PCSK9 プラスミド DNA あるいは PCSK9 機能獲得型突然変異（D374Y）のトランスフェクションが、CD81 発現レベルに影響しなかったことを示した（Mazumdar et al, 2011）。また、Labonté らは *in vivo* で、PCSK9 KO マウスで CD81 の肝臓発現が増加したことも明らかにしている（Labonté et al, 2009）。これらの結果に基づき、彼らは、ヒトでは血漿中 PCSK9 濃度及び活性の両方またはどちらかが低下すると HCV 感染リスクが上昇する可能性があると仮定した。しかしその後得られたデータでは、この仮定に異議が唱えられている（Ramanathan et al, 2013）。Ramanathan らは、十分に確立された *in vitro* HCV 侵入モデル（Bartosch and Cosset, 2009）において、生理的な可溶型 PCSK9 を加えても CD81 の発現に変化はみられず、HCV 感染に対する影響がなかったことを明らかにした。同じモデルに PCSK9 を阻害するモノクローナル抗体を投与しても、HCV 感染に対する影響はなかった（Ramanathan et al, 2013）。さらに、Labonté らと異なる系統の PCSK9 KO マウスや抗 PCSK9 モノクローナル抗体を投与したヒト PCSK9 発現高コレステロール血症マウスでも、*in vivo* の肝臓 CD81 発現に変化はみられなかった（Ramanathan et al, 2013）。

結論として、多くの報告が、evolocumab を介した PCSK9 の阻害により HCV 感染リスク（ウイルスの侵入や複製）は上昇しないことを支持しており、また、このことは臨床試験の結果と一致している（2.7.4 項）。

2.4.2.2.4 インスリン抵抗性及び糖尿病リスクに対して予想される PCSK9 阻害の影響

ヒトにおいて PCSK9 の循環血中濃度は、空腹時血清グルコース、インスリン、インスリン抵抗性指数（HOMA-IR、インスリン感受性の指標、Lakoski et al, 2009、Baass et al, 2009）といった複数のグルコース代謝の指数と正の相関関係を示すことが報告されている。こうした所見と一致して、ヒトでは絶食（低インスリン状態）に伴って血漿中 PCSK9 濃度の低下が認められる（Browning et al,

2010）。しかし、Cariouらによる最近の試験では、ヒトにおけるこうした関連性は、PCSK9濃度とグルコース恒常性との因果関係よりも、むしろ食事の影響が原因で生じている可能性が高いことが示されている（Cariou et al, 2013）。動物モデルでは、インスリンがPCSK9発現を調節できることが示されているが（Costet et al, 2006、Niesen et al, 2008、Persson et al, 2009）、これはヒトにはあてはまらないようである。Kappelleらは、健常被験者及び2型糖尿病患者を対象にした24時間インスリン持続投与試験において、血漿中PCSK9濃度に変化がないことを示した（Kappelle et al, 2011）。ただし、近年の報告では、特定の集団では急性作用が生じる可能性も示唆されている（Awan et al, 2014）。また、2型糖尿病患者あるいはグルコース代謝障害患者の平均血漿PCSK9濃度は、健常人と差がなかった（Brouwers et al, 2011）。これらの知見は、おおむねヒトではPCSK9とグルコース恒常性の間に因果関係がないことを示唆している。

PCSK9阻害と糖尿病リスクの関係については、2種類のPCSK9 KOマウス系統で矛盾するデータが得られている（Langhi et al, 2009、Mbikay et al, 2010）。組換え型PCSK9は、*in vitro*で培養マウス膵島におけるLDLRを減少させたが、*in vivo*のPCSK9 KOマウスでは、PCSK9の欠損により膵島機能は変化せず、グルコース恒常性の乱れを示す表現型は示されなかった（Langhi et al, 2009）。逆に、Mbikayらは異なる遺伝的背景のPCSK9 KOマウスにおいて、グルコース不耐性及びβ細胞アポトーシスを報告した（Mbikay et al, 2010）。また、機能喪失型PCSK9突然変異（Y142X及び／又はC679X）を持つ人々では、そうでない人々と比較して糖尿病の発生率が上昇していないことは重要な知見である（Cohen et al, 2006）。これらのデータを考え合わせると、evolocumabによるPCSK9阻害により糖尿病のリスクは上昇しないことが示唆される。

この結論は、高血清中コレステロール濃度と膵島機能不全及び糖尿病リスク上昇とが関連していることからも支持される（Brunham et al, 2008、Brunham et al, 2010）。糖尿病リスクの上昇は、膵臓β細胞に対する糖脂質毒性、すなわち高濃度の循環血中脂質及びグルコースによる悪影響によるものである（Unger et al, 2002）。そのため、血漿中コレステロール濃度を引き下げると糖尿病リスクが低下すると考えられたが、最も幅広く処方されている脂質低下薬であるスタチンは、むしろ糖尿病リスクを高めることが報告されている（Rajpathak et al, 2009、Sattar et al, 2010、Culver et al, 2012）。スタチンによる糖尿病リスク上昇の明確なメカニズム解明はなされていないが、こうした作用は、スタチンによる血清中コレステロール低下ではなく、スタチンを介したHMG CoA還元酵素阻害（イソプレノイド及びユビキノン枯渇）に基づく多元的影響によるものと考えられる（Sampson et al, 2011、Sattar et al, 2012）。これらのデータは、スタチンで報告されている糖尿病誘発作用が、メカニズム的にはPCSK9阻害にはあてはまらないことを示唆している。

この結論は、evolocumabの臨床及び非臨床の安全性試験において、evolocumabによるグルコース恒常性の変化がみられなかったことと一致している。臨床試験では、evolocumab 420 mg4週に1回投与（Q4W）を1年以上継続した被験者を対象として、血中グルコース及び糖化ヘモグロビン（HbA1c）が評価されている（2.7.4項）。非臨床試験では、ハムスター（114976試験）及びカニクイザル（110359試験）に最長で生涯を通じて薬効用量を超えるレベルのevolocumabを投与し、血漿中及び尿中のグルコース濃度、臨床症状、膵臓病理組織所見が検討されている（2.6.6項）。

2.4.2.2.5 スタチンによるミオパチーのメカニズムと PCSK9 阻害との関連

スタチンは一般に良好な忍容性を示すが、患者のおよそ 10%（本邦の報告ではおおむね 1%未満〔折井ら, 2010、Chang et al, 2013、Ooba et al, 2014〕）は筋肉痛、筋痙攣、虚弱、まれに生命を脅かす横紋筋融解症等の筋肉症状（ミオパチー）を訴え、それらの症状により患者の服薬が制限される恐れがある（Baker and Tarnopolsky, 2001、Thompson et al, 2003、Arora et al, 2006、Harper et al, 2007、Abd et al, 2011、Rosenson et al, 2014）。ミオパチーによるスタチン不耐性のために LDL-C が十分に管理されていない高リスクの患者がいることは、健康上の重大な問題である（Guyton et al, 2014）。

スタチン療法とミオパチーの関連性について、多くの仮説が提唱されてきた（Taha, 2014）。コレステロールは筋肉細胞の生存能力に重要であるため、当初、スタチンに関連するミオパチーは全身のコレステロール低下によるものと推定されたが（Baker and Tarnopolsky, 2001、Thompson et al, 2003）、この仮説は *in vitro* のスクアレン合成（コレステロール生合成経路におけるコレステロールの直前のステップ）を阻害しても筋毒性が誘発されなかったという所見と一致しなかった（Flint et al, 1997）。スタチン誘発性ミオパチーが全身のコレステロール低下とは無関係であり、むしろ、メバロン酸の下流にあってミトコンドリア機能など骨格筋の恒常性や生存に必要である 1 種類以上のイソプレノイド中間体が枯渇することによって起きていることを示す証拠が増加している（Dirks et al, 2006、Vaklavas et al; 2009、Mallinson et al, 2012、Thompson and Parker, 2013）。この仮説を実験的に研究した（118361 試験）。

2.4.2.2.5.1 ラットにおけるセリバスタチン誘発性ミオパチーと、コレステロール生合性経路におけるコレステロール低下又はイソプレノイド中間体枯渇の役割（118361 試験）

この試験の目的は、スタチン誘発性ミオパチーが、コレステロール生合成経路におけるイソプレノイド中間体によってもたらされるものであり、血清コレステロール濃度の低下によってもたらされるものではないという仮説を検証することであった。これまで汎用されているセリバスタチン誘発性ミオパチーのラットモデルを使用した（Westwood et al, 2005、Westwood et al, 2008、Schaefer et al, 2004）。このラットモデルでは、ヒラメ筋を I 型筋繊維（遅筋）型筋肉の代表例とし、長趾伸筋（EDL）、腓腹筋、並びに大腿二頭筋を II 型筋繊維（速筋）型筋肉の代表例とした。ラットにメバロン酸（HMG CoA 還元酵素のすぐ下流、イソプレノイド中間体の上流の中間体であり、この枯渇がスタチンミオパチーの原因と推定されている）又はコレステロール（イソプレノイド中間体の下流）を加えた標準食を摂餌させた。仮説に基づき、メバロン酸はセリバスタチン媒介性ミオパチーを抑制し、一方、コレステロールはそのような抑制効果を示さないと想定した。

これまでの報告と同様、ラットにセリバスタチンを 2 週間投与すると、II 型筋にはミオパチーが誘発されたが、I 型筋には誘発されなかった。上記の筋肉の種類の顕微鏡検査及び筋損傷の高感度バイオマーカー（血清アスパラギン酸トランスアミナーゼ、脂肪酸結合蛋白 3、骨格筋トロポニン 1、並びに尿中ミオグロビン）の評価において、セリバスタチン誘発性ミオパチーは、飼料にメバロン酸を添加することにより完全に抑制された。対照的に、セリバスタチン投与ラットの飼料にコレステロールを添加すると、循環血液中のコレステロール濃度は投与前の濃度を上回ったがミオパチーは抑制されず、スタチン媒介性ミオパチーが循環血液中のコレステロール濃度低下に基づくものではないことが確認された。

これらのデータは、スタチン誘発性ミオパチーは、コレステロールの上流及びメバロン酸の下流のコレステロール生合成中間体が関係することを示している。この結果は、ほかの研究者の報告（Dirks et al, 2006、Vaklavas et al, 2009、Mallinson et al, 2012、Thompson and Parker, 2013）と併せ、イソプレノイド中間体の枯渇が筋毒性につながる重要なステップであること（及びコレステロールの低下が原因ではないこと）を示している。こうしたことから、イソプレノイド中間体枯渇と関連していないPCSK9阻害によるコレステロールの低下は、ミオパチーを引き起こさないと予想される。

これらの結果と一致して、スタチンの有無にかかわらず、いずれの臨床試験（2.7.4項）及び非臨床安全性試験（2.6.6項）でも、evolocumabの投与に伴う筋毒性は認められていない。非臨床試験では、evolocumabを薬効用量レベルを超える用量でハムスターに最長2年間、カニクイザルに最長6カ月間投与している。筋肉と関連した評価では、臨床症状、臨床生化学検査（血清中AST、CK、並びにアルドラーゼ）、並びに病理組織検査（大腿二頭筋等のスタチン誘発性ミオパチーが生じやすいことが知られているIIB型筋肉を含む）を評価した。結論として、これらのメカニズムについて考慮すべき事項と臨床及び非臨床所見を総合的に検討した結果、evolocumabにはミオパチーの臨床的リスクはないと予想される。

2.4.2.2.6　PCSK9の阻害による血漿リポ蛋白脂質の最終代謝及び肝胆道系及び消化管に対する影響の可能性

evolocumabは、肝細胞表面のLDLR発現量を増加させることによって肝臓による循環血液中からのLDLの取り込みを増加させ、コレステロール等のLDLの脂質成分の肝臓への輸送を増加させる。この機序からは、肝細胞において脂質蓄積や代謝、コレステロール代謝産物の排泄が増加し、細胞内胆汁酸の蓄積や胆汁酸排泄が増加する可能性が考えられる。これらの理論上の可能性を毒性試験及び文献検索において検討した結果、臨床的に考慮すべき懸念は見いだされなかった。

2.4.2.2.6.1　肝臓LDL-C輸送の増加に対する肝臓の恒常性反応

PCSK9の阻害は、肝臓LDLRの発現量を増加させることにより、肝細胞のコレステロール及びトリグリセリド含有量を増加させる可能性がある。肝臓におけるコレステロール及びトリグリセリドの恒常性は、複数のフィードバック制御メカニズムにより厳密に調節されている。肝細胞へのコレステロール及びトリグリセリド輸送量が増加すると、以下のメカニズムにより調整される。

- 内因性コレステロール生合成の低下（Espenshade and Hughes, 2007）
- 遊離コレステロールの胆汁への直接的な排泄の増加（ABCG5/G8トランスポーターを媒介）（Wu et al, 2004）
- コレステロールの胆汁酸への変換（CYP7A1により調節）及び胆汁への排泄（Russell et al, 2003）

PCSK9 KOマウスでは、肝LDLR活性の増加に伴ってこれらのメカニズムが働いていることが示されており、肝臓のトリグリセリド、コレステロール及び胆汁酸含有量は、野生型マウスと同等であった（Rashid et al, 2005）。またこれらのことはスタチン投与後でも同様であった（Parker et al, 2013）。

同様に、evolocumabをカニクイザルで最長6カ月間、ハムスターで2年間投与したとき、あるいはロスバスタチンと併用してカニクイザルに3カ月間投与したとき、肝臓の異常は認められなかった（2.6.6項）。具体的には、肝胆道あるいは腸に毒性を示す病理組織学的所見、肝脂肪変性、胆石形成、あるいは血清中トランスアミナーゼの変化は認められなかった。これらのデータは、肝臓がPCSK9阻害によるリポ蛋白取り込み増加に対して順応することができ、有害な作用が引き起こされることもないことを示している。

ヘテロ接合性PCSK9 LOF突然変異を持つ被験者において、陽子核磁気共鳴分光法により肝臓トリグリセリド含量を測定したところ、突然変異を持たない被験者との有意差はみられなかった（Kotowski et al, 2006）。また、いずれの臨床試験でもevolocumabによる肝障害の証拠はなく（2.7.4項）、コレステロール及びトリグリセリドはevolocumab投与被験者の肝臓に蓄積しないものと考えられた。

2.4.2.2.6.2　胆汁酸の排泄増加の可能性

肝臓のコレステロールは、遊離コレステロールとして、あるいは胆汁酸への代謝後に、胆汁に排泄される可能性がある。理論的には、LDLRの発現量が増加すると胆汁酸の合成及び排泄が増加するか、遊離コレステロールとして胆管系へ、最終的には消化管への排泄が増加する可能性がある。肝細胞における胆汁酸合成は、毒性を示す可能性がある水準にまで胆汁酸が増加しないように、厳密に制御されている。コレステロールから胆汁酸への変換における律速段階は、コレステロールを7-α-ヒドロキシコレステロールに変換する酵素であるCYP7A1による触媒反応である。肝臓コレステロール濃度の調節と同様に、胆汁酸恒常性の調節には数多くのフィードバックメカニズムが関与している（Davis et al, 2002、Kerr et al, 2002、Staudinger et al, 2001）。

胆汁酸及び遊離コレステロールは、肝細胞から胆汁に排泄され、胆嚢に一旦貯蔵される。その後胆汁は腸管腔に放出されて、必須脂溶性ビタミンを含む食物脂肪の吸収を促進する。Parkerらは、マウスを用い、スタチン投与及び非投与条件下で胆汁酸及びステロール代謝に対するPCSK9 LOFの影響を検討した（Parker et al, 2013）。野生型マウス及びPCSK9 KOマウスにスタチンを12週間投与したとき、いずれの群でも血漿中LDL-C濃度が低下したが、肝脂肪濃度には変化がみられなかった（2.4.2.2.6.1項でも言及）。糞便ステロール濃度は野生型マウスとPCSK9 KOマウスで同等であったが、糞便胆汁酸濃度は野生型マウスよりPCSK9 KOマウスでおよそ1.5倍から2倍高かった（Parker et al, 2013）。スタチンを投与した野生型マウス及びPCSK9 KOマウスでは糞便中のステロール及び胆汁酸濃度はともに上昇し、群間で有意差はみられなかった（Parker et al, 2013）。

食物脂肪の摂取は大腸がん発現のリスク因子であるが、これは常在微生物叢により一次胆汁酸から代謝されてできた二次胆汁酸の濃度が上昇するためであると考えられている（Degirolamo et al, 2011）。Parkerの試験はPCSK9 LOFと併用したスタチン投与後に糞便中胆汁酸濃度が上昇したことを示しているが、回腸バイパス手術後等による糞便中胆汁酸負荷量の増加によって結腸癌リスクが上昇していないことから（Kuo et al, 1979、Buchwald et al, 1990）、糞便中の胆汁酸濃度の上昇は有害な影響を及ぼさないかもしれない。また、evolocumabをハムスターに最高100 mg/kg 2週に1回（Q2W）の用量レベルで2年間投与したとき、腫瘍発生率（消化管を含む）の上昇は認められなかった（114976試験、2.6.6項）。さらに、腸管の胆汁酸含有量の変動に伴い、食事からの脂溶性ビタ

ミンの吸収が変化する可能性が考えられるが、evolocumab の臨床試験では、脂溶性ビタミン吸収に対する影響は観察されていない（2.7.4 項）。

結論として、LDLR の増加により肝細胞に運ばれたコレステロールは少量の胆汁酸排泄の増加をもたらすが、有害な作用はないと考えられる。この結論は、生涯投与を実施したいずれの非臨床試験でも、evolocumab に関連した肝胆道又は胃腸に毒性が全く認められていないことによっても裏付けられている（2.6.6 項）。加えて臨床試験では、肝胆道障害の器官別大分類における有害事象の発現率は、evolocumab 群と対照群間でおおむね同様であった（2.7.4 項）。

2.4.2.2.7 PCSK9 阻害及び血清中 LDL-C 低下が免疫機能等の肝外系に影響を及ぼす可能性

コレステロールは、増殖及び成長のための細胞膜形成を含め、多くの細胞機能を支える必須分子であり、また、ステロイドホルモンの生合成の前駆体としても必要である（Maxfield and Tabas, 2005）。また、コレステロールの生合成経路の中間体は赤血球を除くすべての哺乳類細胞に存在するが、それらは細胞シグナル伝達経路における主要タンパク質の修飾に必要である。このようにコレステロールは全身で重要な役割を果たすために、evolocumab による LDL-C 低下作用が（局所 PCSK9 阻害又は低い循環血液中コレステロール濃度を介して）肝外プロセスに、特にリンパ球等の速やかに増殖する細胞に対して、理論上有害な影響を及ぼす可能性が考えられる。

2.4.2.2.7.1 肝外組織における低循環血液中 LDL-C を補うメカニズム

良好な健康状態を維持するための LDL-C の最小循環血液中濃度がどの程度であるか、まだ確立されていない。しかし、近年の総説では、西欧諸国及び西欧化した国々の成人集団における循環血液中 LDL-C 及び総コレステロール（TC）の平均濃度（それぞれおよそ 130 及び 200 mg/dL）は、出生から青年期に至る早期発育段階における濃度や、世界のほかの先進国の成人における濃度より大幅に高いことが示されている（Hochholzer and Giugliano, 2010、LaRosa et al, 2013）。これらの知見から、良好な健康状態と関連した循環血液中コレステロール濃度とは、西欧諸国の人口の平均よりはるかに低く、PCSK9 LOF 突然変異を持つ人々（Zhao, 2006）及び evolocumab を投与されている患者（2.7.3 項）における濃度の程度である可能性がある。

身体のほとんどの器官及び組織の細胞は全身循環からコレステロールを得ることができるが、一般にコレステロールの必要量は内因性生合成により満たされているため、循環血液中のコレステロールに依存することはない（Dietschy et al, 1993）。また、肝外組織におけるコレステロール生合成量は、LDL によって全身循環を通して臓器に運ばれるコレステロール量の 3～5 倍多いと推定されている（Dietschy et al, 1993）。evolocumab はほとんどの肝外組織で LDLR 発現量を増加させると予測されるため（Schmidt et al, 2008）、それらの組織では循環血液中からコレステロールを取り込む能力が高まることになる。しかし非臨床試験では evolocumab を動物に最大で生涯にわたり投与しても、どの肝外組織でも有害事象は認められず（2.6.6 項）、evolocumab で到達した低い血清中 LDL-C 濃度によって肝外組織の機能が低下することはないことが示唆される。さらに臨床試験で報告され

た有害事象の評価では、肝外組織における作用と関連した安全上のリスクは特定されていない（2.7.4 項）。

一方、腎臓及び副腎では、PCSK9 を阻害しても LDLR 発現は影響されないことが報告されており、そのメカニズムは十分に明らかになっていない（Grefhorst et al, 2008、Luo et al, 2009、Seidah et al, 2012）。副腎では、ステロイドホルモン生合成のためのコレステロール前駆体は HDL によってもたらされるため、evolocumab による PCSK9 阻害によって循環血液中 LDL-C 濃度が低下しても、このプロセスが影響される可能性は低い（Vergeer, 2011、Bochem, 2013）。この結論は、ハムスター及びカニクイザルの両方で受胎能及び生殖パラメータに対する影響が全くなかったことなど、ステロイドホルモン合成減少を示唆する影響がなかったことによっても裏付けられている（2.6.6 項）。また、臨床試験（20110109 試験）では、evolocumab 420 mg を Q4W にて 1 年間投与（単剤療法又はスタチン及びエゼチミブとの併用）することにより LDL-C 濃度が 25 mg/dL 未満に低下した患者でも、ステロイドホルモンの代謝（コルチゾル、ACTH、エストラジオール、FSH、LH、テストステロン）に悪影響は生じなかった（2.7.4 項）。

2.4.2.2.7.2　低血清中 LDL-C が免疫機能に影響する可能性

抗原又はマイトジェン刺激に反応するリンパ球は、クローン増殖時に著しく細胞分裂する。コレステロールは新しい細胞膜形成に必要であり、生合成あるいは外部からの供給によってまかなわれる（Cuthbert and Lipsky, 1984、Cuthbert and Lipsky, 1986、Cuthbert and Lipsky, 1987）。こうしたことから、evolocumab による PCSK9 阻害は免疫機能に影響する可能性が考えられる。T 細胞依存性抗体反応（TDAR）、末梢血免疫表現型検査、ナチュラルキラー細胞活性等の免疫毒性評価項目、並びにリンパ器官の病理組織学的検査及び血液検査などの免疫毒性学的検査について、詳細な検討が行われている。これらの検討では、evolocumab を 420 mg Q4W 投与した患者の 300 倍を超える曝露量でカニクイザルに投与した結果（単独で 6 カ月間、ロスバスタチンとの併用で 3 カ月間）、免疫機能に対する作用は認められなかった。また近年発表された報告では、別の抗 PCSK9 モノクローナル抗体をアトルバスタチンと併用してカニクイザルに投与したときにもほぼ同様の結果が得られている（Gelzleichter et al, 2014）。

メビノリンによって HMG CoA 還元酵素による内因性コレステロール合成を阻害し、さらに外因性 LDL 濃度を 0.5 mg/dL と低くしても、マイトジェン誘発性ヒトリンパ球増殖における膜コレステロール必要量は十分維持されていることが明らかにされている（Cuthbert and Lipsky, 1984、Cuthbert and Lipsky, 1986、Cuthbert and Lipsky, 1987）。このことは、上記の抗 PCSK9 抗体が免疫機能に作用しないとの知見と一致している。evolocumab を投与した被験者（2.7.3 項）における血清中 LDL-C 濃度は、0.5 mg/dL より 1 桁以上高い。さらに、リンパ球増殖にとって重要なほかのリポ蛋白（HDL を含む）分画（Cuthbert and Lipsky, 1987）は、evolocumab により減少しなかった（2.7.3 項）。そのため、evolocumab による PCSK9 阻害単独、あるいはスタチンを併用しても、LDL-C 濃度の低下は、リンパ球の増殖能力に悪影響を与えるレベルには達しないと考えられる。この結論は、いずれの非臨床試験（2.6.6 項）又は臨床試験（2.7.4 項）でも、evolocumab が免疫機能に対して影響していないことと一致している。

2.4.2.2.8 PCSK9 以外のサブチリシンプロテアーゼへの evolocumab の結合親和性評価

evolocumab の PCSK9 及び PCSK9 以外のサブチリシンプロテアーゼに対する結合親和性を、ELISA 法により検討した（3.2.S.3.1.4.2 項）。evolocumab は、ヒト野生型 PCSK9 及び変異型 D374Y PCSK9 に対して同程度の親和性で結合したが、PCSK1、PCSK2、PCSK4、PCSK7 及びフューリン等のサブチリシンプロテアーゼファミリーに属する他のタンパク質には結合しなかった。

2.4.2.3 安全性薬理試験

テレメトリーを装着した雄のカニクイザルにおいて、evolocumab（300 mg/kg）の単回静脈内投与が覚醒下の心血管系パラメータ、呼吸数及び神経行動学的機能に及ぼす影響を、24 時間以上にわたって評価した。

すべての心電図を定性的及び定量的に評価した結果、正常範囲内であった。心拍数、収縮期、拡張期及び平均血圧、動脈圧、並びに腹腔内体温に evolocumab 投与に関連した変化は観察されなかった。

PCSK9 と血圧との関連で、培養卵母細胞を用いた *in vitro* 試験において、ナトリウムイオンの恒常性及び血圧制御に重要な役割を果たす上皮性ナトリウムチャネル（ENaC）の分解を PCSK9 が促進することが、近年報告された（Sharotri, 2012）。しかし、この結果は、第 1 に上記作用はプロセッシング前の PCSK9 の細胞内での作用で（プロセッシング後細胞外に分泌された PCSK9 に evolocumab は作用する）、第 2 に上記 *in vitro* 作用は *in vivo* 作用には繋がらない（Seidah, 2014）ことから、evolocumab には関連しないと考えられる。また、PCSK9 KO マウスでは、基礎及びアンギオテンシン II 誘発時血圧上昇が野生型と異ならないことから、*in vivo* では PCSK9 が存在しなくても ENaC は増加しない（Seidah, 2014）。更に、機能喪失型 PCSK9 突然変異（Y142X 又は C679X）を持つ人には、高血圧患者が少ない（変異なしの 55%に対し 37%）（Cohen, 2006）。すなわち、本試験結果及び文献情報から、*in vitro* で観察される PCSK9 の ENaC に対する影響は、生理作用と関連しないと考えられた。

呼吸数あるいは神経学的行動に evolocumab と関連した変化はなかった。evolocumab はモノクローナル抗体であり、hERG イオンチャネルと相互作用しないと予測されるため（Vargas et al, 2008）、evolocumab が hERG イオンチャネル電流を阻害する作用の評価は行わなかった。

上述の結果は、非臨床反復投与毒性試験結果（2.6.6 項）、並びに臨床試験において心電図に影響が認められなかった結果（2.7.4 項）と矛盾しなかった。

2.4.3 薬物動態試験（2.6.4 項）

カニクイザルを用いて evolocumab の非臨床 PK/PD 試験を実施した。これらの試験のうち 2 試験において、クリアランスのメカニズムに関する知見を得て PK/PD の関連性を明らかにした。これにより、first-in-human 試験における用量を設定し、臨床試験に適用する曝露反応モデルを開発した。生物薬剤に関する 2 試験は、薬物動態に対する製剤変更の影響を評価するために実施された。毒性試験の結果から、反復投与時の PK を評価した。

ハムスター及びカニクイザルにおけるevolocumabのPK及びTKから、以下の点が明らかになった。

- 非線形の薬物動態を示し、非結合型evolocumabの見かけのクリアランス（CL/F）及び分布容積（V_z/F）は用量とともに変化した。これに伴い、血清中プロ蛋白転換酵素サブチリシン／ケキシン9型（PCSK9）濃度も変化した。
- SC投与後の絶対バイオアベイラビリティは82%であった。
- 分布容積は小さく、組織への移行は限られる。
- 抗evolocumab抗体の発現率は低かった。
- 血清中の非結合型evolocumabとLDL-C濃度の関連性は、メカニズムを考慮したPK/PDモデルにより、十分に説明された。
- evolocumabを反復投与後のTKにおいて、雌雄差、想定外の蓄積、あるいは時間依存的変化は認められなかった。

2.4.3.1 分析法

すべての測定方法は、2.6.4項に詳細に記載した。

カニクイザル及びハムスターの血清中非結合型evolocumab濃度は、バリデーション済の分析法に従って（それぞれ、MET-002332バージョン3.0及びMET-002532）測定された。分析法は、Amgen社（ワシントン州シアトル）が開発したものであった。精密で高感度で特異的な酵素免疫測定法を用いて、カニクイザル血清中の非結合型PCSK9を測定した。

2.4.3.2 吸収

カニクイザルにSC投与後、絶対バイオアベイラビリティは約82%であった。非結合型evolocumabの投与後0時間から無限大時間までの平均血清中濃度－時間曲線下面積（AUC_{inf}）から、曝露量の非線形性が示された。その値は、0.2～30 mg/kgにおいて約3000倍増加し、用量比以上に増加した。一方、10～30 mg/kgにおいて用量補正後のAUC_{inf}の変化は2倍未満であり、平均AUC_{inf}はおおよそ用量に比例していた。これらのPKに関する所見は、標的介在性消失と一致していた。

2.4.3.3 分布

分布試験は実施しなかった。IgG抗体は、その分子サイズのために血清から組織への分布が限られる。抗体薬は、中枢（Poduslo et al, 1994、Triguero et al, 1989、Frank et al, 2011）及び眼（Thiel et al, 2003、Gaudana et al, 2010）等への移行が限られ、循環血中の抗体濃度に対する脳内濃度の割合は、定常状態で0.1%～0.2%と推定されている（Yu and Watts, 2013）。モノクローナル抗体の生体分布の特徴を考慮すると、ほとんどの抗体は、血漿量の2～5倍の定常状態分布容積を持つと予想される（Tabrizi et al, 2010、Lobo et al, 2004）。

カニクイザルに3 mg/kgのevolocumabをIV投与したとき、血清中非結合型evolocumabの定常状態分布容積（V_{ss}）は25.3 mL/kgであり、血漿量（45 mL/kg）と同等であった。しかし、血清と間質腔間の平衡が遅く末梢コンパートメントからの消失が存在するために、ノンコンパートメント法を

用いて算出すると V_{ss} はやや過小評価されている可能性がある。SC 投与後、見かけの分布容積（V_z/F）は、0.2 mg/kg では 64.8 mL/kg、30 mg/kg では 19.9 mL/kg と用量の増加とともに減少し、飽和性の結合を示す抗体の特徴と一致していた。この結果は、evolocumab とその標的である PCSK9 間の親和性が高いことと合致する。

2.4.3.4　代謝

evolocumab について非臨床代謝試験は実施しなかった。しかし、evolocumab 投与後の PK 及び PCSK9 の用量依存的抑制は、標的介在性消失を示す薬物に典型的なものである（Lobo et al, 2004）。evolocumab のクリアランスには、標的リガンドである PCSK9 との特異的結合及び複合体形成に加え、ほかの免疫グロブリンと同様に、新生児 Fc 受容体（FcRn）を介した再利用と細網内皮系における除去が関与する可能性が高いと考えられる。（Waldmann and Strober, 1969、Junghans and Anderson, 1996）。また、evolocumab は、異化経路を介して小さいペプチド及びアミノ酸に分解されると推測される。

2.4.3.5　排泄

evolocumab はモノクローナル抗体であり、その分子量から腎排泄はないと推定される（Keizer et al, 2010）。そのため、evolocumab の排泄を評価することを目的とした試験は実施しなかった。

2.4.3.6　薬物動態学的薬物相互作用

薬物動態学的薬物相互作用に関する非臨床試験は実施しなかったが、カニクイザルにロスバスタチンを単剤又は evolocumab と併用投与した併用投与毒性試験において非結合型 evolocumab の血清中濃度及び総ロスバスタチン血漿中濃度を測定した（2.6.6 項）。その結果、ロスバスタチンの薬物動態に対する evolocumab の影響は認められなかった。薬物タンパク質と低分子間の薬物間相互作用（DDI）がまれに観察される。このような DDI は、主に炎症性サイトカイン（IL-1、IL-6、TNF、インターフェロン等）を調節するモノクローナル抗体において認められ（Huang et al, 2010、Zhou and Davis, 2009、Kenny et al., 2013、Evers et al, 2013）、薬物の効果により炎症状態が変化し、その結果、肝臓チトクローム P450（CYP450）の発現量に変化が生じることにより引き起こされる。例えば、関節リウマチ患者に対するトシリズマブの投与に伴って CYP3A の基質であるシンバスタチンのクリアランスが増加したことが報告されている（Schmitt et al, 2011）。evolocumab は免疫調節効果を誘発しないため（2.4.2.2.7.2 項及び 2.6.6 項）、evolocumab と CYP450 により代謝される薬物の併用により DDI が生じるリスクはほとんどない。

2.4.4　毒性試験（2.6.6 項）

該当する規制ガイダンス、特に ICH S6（R1）、ICH M3（R2）、並びに ICH S5（R2）に従い、evolocumab の単剤投与及びスタチンとの併用投与時の非臨床安全性プロファイルを明らかにするため、ハムスター及びカニクイザルにおいて包括的な毒性試験を実施した（2.6.6 項及び 2.6.7 項）。

いずれの試験においてもevolocumabと関連した毒性は観察されなかった。evolocumabに関連した影響は、予測された薬理作用（血清中LDL-C及び総コレステロールの低下）に限られた。毒性評価には、evolocumabの300 mg/kgまでをハムスター及びカニクイザルに投与した反復投与試験（それぞれ最長3及び6カ月間）、カニクイザルにロスバスタチン（5 mg/kg）をevolocumab（最大100 mg/kg）と併用投与した3カ月間反復投与試験、ハムスターにおけるがん原性試験（最大100 mg/kg）、ハムスターの受胎能及び初期胚発生試験（最大100 mg/kg）、並びにカニクイザルにおけるePPND試験（50 mg/kg）を行った。evolocumabはヒト、カニクイザル、及びハムスターのPCSK9と同等に高い親和性で結合し、ラット又はマウスのPCSK9とは結合しない。そのため、evolocumabの臨床開発プログラムの安全性を裏付ける毒性試験はハムスター及びカニクイザルにおいて実施した。すべての反復投与毒性試験の投与経路は、臨床投与経路に準じ皮下とした。投与頻度は、初期の試験ではQWとしたが、その後の試験では最も高頻度の臨床投与法に合わせてQ2Wとした。用量は、ICH S6（R1）に従い、（a）試験動物においてdynamic range（ほぼ最大に近い）の薬理作用（血清中LDL-Cの低下）、並びに（b）ヒトにおけるリスクの評価を可能にする薬物の曝露マージンを得ることができる用量を選択した。特にコレステロール恒常性及び血清中LDL-Cの調節におけるPCSK9の役割を考慮して、毒性試験には血清中LDL-C及び総コレステロールの評価を含めた。毒性試験及びトキシコキネティクス試験は、GLP基準を遵守し実施した。

2.4.4.1　単回投与毒性試験

単回投与毒性試験は実施しなかった。しかし、カニクイザルに単回静脈内投与（300 mg/kg）を行った安全性薬理試験（2.6.2項）、あるいはハムスター及びカニクイザルを用いた反復投与試験（最大300 mg/kg QW）の初回投与後に、急性毒性の兆候は観察されなかった。

2.4.4.2　反復投与毒性試験

evolocumabの300 mg/kgまでをQWで最長3カ月間投与したハムスター及び6カ月間投与したカニクイザルに、evolocumabと関連した毒性は認められなかった。これらの試験では、薬理作用である血清中LDL-C及び総コレステロールが各々およそ最大85%及び40%低下し、投与終了後に投与前の水準に戻った。カニクイザルにおいて、evolocumabは100 mg/kgまでのQ2W投与、ロスバスタチンは5 mg/kgの1日1回（QD）経口投与で3カ月間併用したが、有害な影響は認められなかった。本併用投与試験でみられた血清中LDL-C及び総コレステロールの低下は、evolocumab単独投与時に観察された低下よりやや大きかったが、投与終了後に投与前の水準に戻った。

2.4.4.2.1　ハムスターを用いた反復投与毒性試験

evolocumabのハムスターにおける反復投与による安全性プロファイルを明らかにするため、1カ月及び3カ月の反復投与毒性試験を実施した。

1カ月間投与試験（112699試験、表2.6.7-7.A.）では、すべてのevolocumab投与群（30、100、及び300 mg/kg QW）でevolocumabの薬理作用による変化が観察された（2.6.6.3.1項）。すなわち、すべてのevolocumab投与群で血清中のLDL-C、総コレステロール、高比重リポ蛋白コレステロール

（HDL-C）が低下した。LDL-C は雄で最大 59%及び雌で最大 69%低下し、HDL-C 及び総コレステロールの低下（雄で最大 41%及び雌で最大 53%）より顕著であった。観察された LDL-C 及び HDL-C の低下は、ハムスターにおける evolocumab の薬理活性と一致した。すなわち、通常すべての種で LDL 受容体は LDL コレステロールの ApoB 成分と結合するが、ApoE に対する親和性も有する（Mahley et al, 1977、Bersot et al, 1976）。ハムスターでは、霊長類と比較して HDL-C 中の ApoE 量が多いため（Goulinet and Chapman, 1993）、ハムスターにおいて HDL-C が低下すると考えられる。一方、カニクイザルにおける反復投与試験では、evolocumab による HDL-C の低下はまったく認められないか、若しくは極わずかで散発的なものであった（2.6.6.3.3 項、2.6.6.3.4 項）。試験を通して抗 evolocumab 抗体が陽性となった動物はいなかったことから、evolocumab はハムスターにおいて免疫原性を示さない可能性が考えられた。

3 カ月間試験（114375 試験、表 2.6.7-7.B.）でも、ハムスターにおける evolocumab 投与による影響は薬理作用に基づく変化に限られ、血清中 LDL-C、総コレステロール、及び HDL-C が低下した。これらの変化はいずれの用量（100 及び 300 mg/kg QW）も同等であったことから、最大の薬理作用は 100 mg/kg で達成されたと考えられた。1 カ月投与の試験と同様に（2.6.6.3.1 項）、LDL-C の低下（雄で最大 55%及び雌で最大 71%）は、総コレステロール及び HDL-C の低下（雄で最大 43%及び雌で最大 54%）より大きかった。抗 evolocumab 抗体の評価は実施しなかったが、試験を通して evolocumab の曝露及び薬理作用を示す証拠が得られたことから、免疫原性は evolocumab の毒性評価に影響しなかった。

2.4.4.2.2　カニクイザルを用いた反復投与毒性試験

evolocumab の反復投与時の安全性プロファイルを明らかにするために、カニクイザルを用いて 3 つの反復投与毒性試験を実施した。6 週間及び 6 カ月の反復投与試験は evolocumab のみを 300 mg/kg までの用量を QW で投与した。さらに、3 カ月の反復投与毒性試験は 100 mg/kg（Q2W）までの用量の evolocumab をスタチン（ロスバスタチン）と併用投与した。

6 週間の試験（110149 試験、表 2.6.7-7.C.）における evolocumab 投与による変化は、薬理作用に限られた。すなわち、すべての evolocumab 投与群で，血清中 LDL-C が投与前値に対して最大 82%減少した。血清中 HDL-C のごくわずかな低下が散見されたが、血清中総コレステロールの中等度の低下（最大 38%減少）は、LDL-C 低下によるものであった。これらのコレステロール分画の薬力学的変化は、休薬期間中の血清中 evolocumab の消失と一致していた。抗 evolocumab 抗体の陽性率は 10%と低かったことから、全試験期間にわたり evolocumab の毒性評価には影響しなかったと考えられた。

この試験では、対照群の雄 1 匹を回復期間中に、高用量（300 mg/kg）の雄 1 匹を投与 30 日に安楽死させた。いずれの動物にも、炎症性腸疾患の兆候及び感染症に伴う二次的な変化である全身性リンパ球枯渇がみられた。カニクイザルのコロニーでは、消化管感染症が未処置動物に発生することが知られている（Sestak et al, 2003）。対照群及び高用量群に類似した変化が認められたことから、evolocumab には関係しないと結論した。カニクイザルにおいて免疫機能の詳細な評価をより長期間のスタチン併用及び非併用下で実施したが影響はなかったことから、この結論に更なる裏付けが得られた。

300 mg/kg の雄 1 匹及び雌 1 匹では、対照群の動物より顕著なリンパ組織増生がみられた。これらの動物では、原因とされる寄生性感染の既往を示す証拠（病理組織学検査による肝臓の石灰化した肉芽腫や多巣性の被膜線維化）が得られた。その他のリンパ系組織病変の頻度及び程度は、施設の対照群の背景データ及び文献値（Spoor et al, 2008; Sellers et al, 2007; Drevon-Gaillot et al, 2006; Haley et al, 2005）の範囲内であった。試験を通して血液検査には変化がなく、リンパ増生すなわち免疫刺激と胸腺退縮や脾臓胚中心の大きさ及び数の減少といった免疫抑制を示す病理組織所見が混在したことは、介入疾患及び正常な成熟と一致しており、evolocumab 投与とは関係ないとみなされた。

6 カ月間の試験（110359 試験、表 2.6.7-7.D.）では、6 週間投与試験と同様に、evolocumab 投与に関連した影響は薬理作用に限られ、両性で投与量にかかわらず同様の変化が認められた。血清中 LDL-C が雄では最大 81%、雌では最大 85%低下し、同時に血清中コレステロールが雄では最大 42%、雌では最大 44%低下した。血清中のトリグリセリドも低下したが（雄では最大 29%、雌では最大 30%）、すべての時点で一貫してみられた訳ではなかった。血清中 HDL-C の低下は散発的かつ極めてわずかで、evolocumab 投与とは関係ないと考えられた。血清中 LDL-C、総コレステロール、並びにトリグリセリドに対する影響は、投与終了後に消失した。

投与期間中に 3 mg/kg の雄 1 匹及び休薬期間中に 30 mg/kg の雌 1 匹の合計 2 匹で、抗 evolocumab 抗体が陽性となった。いずれも中和抗体で、evolocumab のクリアランスの上昇及び薬理作用の低下あるいは早期の回復がみられた。抗 evolocumab 抗体の発現は 36 匹中 2 匹と少なかったことから、全試験期間において evolocumab の毒性評価には影響しなかった。

本試験では、受胎能及び免疫毒性を評価した。

組入れ動物（雄は 5～6 歳、雌は 4～6 歳）は性成熟した成獣で、ICH S6（R1）に沿って evolocumab の雄及び雌の受胎能に対する影響を評価することができた。評価項目は、生殖器の重量及び病理組織学的検査、月経周期（雌）及び精子の運動性、密度、形態（雄）で、どの検査項目にも影響は観察されなかった。

evolocumab の免疫機能に対する影響を評価するために、T 細胞依存性抗体産生（TDAR）及び末梢血リンパ球フェノタイプ検査を実施したが、evolocumab 投与に関連した影響は観察されなかった。TDAR では統計学的な有意差が散発的及び一過性にみられたが、対照群において抗キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）抗体が免疫前に高頻度で存在したためで、evolocumab 投与とは関連しないと考えられた。

3 カ月間併用毒性試験（112311 試験、表 2.6.7-7.E.）では、evolocumab とロスバスタチンを以下のように投与した。

- 対照群：媒体を Q2W で皮下投与し、空のゼラチンカプセルを QD で経口投与した。
- ロスバスタチン単独投与群：5 mg/kg をゼラチンカプセルに入れ、QD で経口投与した。Amgen 社にて、カニクイザルの単回薬動態理試験（115757 試験、2.6.4 項）を実施し、ロスバスタチンの臨床曝露量（Crestor の米国承認パッケージ NDA 21-366 を参照）と比較した。本試験では、ロスバスタチンが臨床で最も多く処方される用量（10 mg）に対して約 10 倍の曝露マージンが生じる用量である 5 mg/kg を選択し、スタチンとの併用毒性試験の用量として適切であると判断した。

- evolocumab（10 mg/kg を Q2W で皮下投与）とロスバスタチン（5 mg/kg を QD で経口投与）の併用投与群
- evolocumab（100 mg/kg を Q2W で皮下投与）とロスバスタチン（5 mg/kg を QD で経口投与）の併用投与群：evolocumab の曝露量は、420 mg を Q4W で投与したときの臨床曝露量に比較して、AUC として 21 倍であった。

evolocumab とロスバスタチン併用群の、投与期間中にみられた臨床病理検査値の変化は、血清中脂質への作用に限られ、すなわち用量反応のない LDL-C の低下（最大 89%）と総コレステロールの低下（最大 53%）がみられた。

evolocumab とロスバスタチンの併用投与あるいはロスバスタチン単剤投与によって、免疫毒性評価項目である末梢リンパ球サブセット、抗 KLH 抗体（IgM 及び IgG）産生あるいはナチュラルキラー細胞機能に、影響は認められなかった。血液検査及びリンパ系組織の病理組織学的検査に影響はなく、投与による免疫系への影響は認められなかった。この成績は、スタチンとの併用投与あるいは単独投与の evolocumab による PCSK9 阻害で LDL-C 及び総コレステロールが低下しても、リンパ球の増殖に悪影響を及ぼさないという 2.4.2.2.7 項の結論を裏付けている。

2.4.4.3　遺伝毒性試験

evolocumab は、天然のアミノ酸のみで構成される組換えタンパクであり、無機又は有機合成リンカーあるいはほかの非タンパク質部分を含まない。このことは、evolocumab が DNA あるいはほかの染色体物質と直接反応する可能性が極めて低いことを示す。そのため、ICH S6（R1）に沿い、遺伝毒性試験は実施及び計画はしていない。

2.4.4.4　がん原性試験

ICH S6（R1）に沿って関連するデータを詳細に評価し、evolocumab のがん原性を評価した（AMG 145 Preliminary Assessment of Carcinogenic Potential, Amgen Inc.2011）。評価には、evolocumab の非臨床安全性試験成績の評価、PCSK9 の生物学な知見、並びにヒトにおける低コレステロール血症とがん発生の関連性についての文献の包括的なレビューが含まれ、証拠の重要性に基づき、evolocumab を単剤あるいはスタチンと併用投与して長期間 LDL-C を引き下げても、発がんリスクは上昇しないと結論した。裏付ける主要なポイントを以下に述べる。

- 生涯にわたり LDL-C を低下させる PCSK9 LOF 遺伝子変異を持つ約 400 名を含む 13000 人以上について 9 年間追跡調査した前向き疫学研究では、突然変異を持たない集団と比較し PCSK9 の突然変異を持つ集団では、がんの発生率が低かった。
- 数十万人の疫学研究で、血清中コレステロールの低値（自然発生もしくはスタチン系薬剤の長期使用によるものを問わず）が、がんの発症リスクを上昇させないと結論している。一部の研究は、低コレステロールとがん発症率の低下の関連を示唆している。
- PCSK9 阻害とがん発生リスクを結びつける仮説の根拠は、生物学的な作用機序から見つからなかった。

- 最長 6 カ月間の evolocumab の非臨床試験において、発がんに関連する増殖性病変は認められなかった。
- evolocumab はモノクローナル抗体であり、DNA あるいはほかの染色体物質と直接反応することはない。

米国 FDA と協議した結果、ハムスターにおいて evolocumab の生涯投与試験を追加し、PCSK9 の慢性阻害による潜在的な発がんリスクについて、総合的に評価した（114976 試験、表 2.6.7-10）。試験計画（2.6.6.5.1 項）を米国 FDA の Executive Carcinogenicity Assessment Committee と議論し、合意を得て実施した。

試験において、雌雄のゴールデンシリアンハムスターに、媒体又は evolocumab の 10、30、及び 100 mg/kg を Q2W で、雄では 105 週間、雌では 86 週間皮下投与した。死亡、臨床症状、体重、摂餌量、剖検所見、並びに病理組織学的所見を評価した。サテライト動物（15 匹／性／群）は同様に投与し、検査は薬物動態及び薬力学的評価（非結合型 evolocumab 及び血清中 LDL-C 測定）に限定した。

evolocumab 投与に関連する変化は、予測された薬理作用（血清中 LDL-C の低下）に限られた。血清中 LDL-C の低下は、雄が雌よりわずかに大きかった。対照群と比較し、10、30、及び 100 mg/kg 群は雄でそれぞれ最大 77%、86%、及び 85%、雌でそれぞれ最大 47%、70%、及び 70%低下しており、全 evolocumab 投与群において薬理学的に有効な evolocumab が投与期間を通して曝露された。高用量（100 mg/kg Q2W）の曝露量は、420 mg を Q4W で投与した際の臨床曝露量の 15 倍で、用量設定時の予測とほぼ一致した。

死亡、腫瘍性又は非腫瘍性の変化を含め、ほかの検査項目に evolocumab と関連した影響は観察されなかった。

病理組織学的検査におけるすべての腫瘍は、ハムスターのがん原性試験において報告されたもので（Kamino et al, 2001; McInnes et al, 2013; Pour et al., 1976a; Pour et al., 1976b; Pour et al., 1976c; Pour et al., 1976d）、本試験における発現は、大半が両性においてで、対照群を含む全投与群を通じて同様の頻度で観察された。個別あるいは統合腫瘍発生において evolocumab 投与群が対照群より高かった少数の例は、副腎皮質腺癌、甲状腺濾胞細胞腺腫、ハーダー腺腺腫、並びに子宮上皮の腫瘍で、頻度が極めて低く、同種がん原性試験において報告されている対照群の発生頻度の範囲内であった（McInnes et al, 2013; Pour et al, 1976b）。また、腫瘍発生と evolocumab の曝露量及び薬力学的効果に関連性は認められなかった。

対照群を含むすべての投与群において、雄に比較して雌の生存率が低かったが、ハムスターにおける長期試験で報告された各性の死亡率と一致しており、evolocumab 投与との関係はなかった。雌対照群の生存数は投与 86 週までに 20 匹に達したため、がん原性試験の常法に則り、また Special Protocol Assessment の勧告に従い、雌の全群については早期に終了した。生存している雄への投与は、投与 105 週まで継続した。

がん原性を評価するために、雌雄のゴールデンシリアンハムスターに evolocumab の 0、10、30、及び 100 mg/kg を Q2W で最長 105 週間にわたり皮下投与した。すべての evolocumab 投与群で薬力

学的効果（血清中 LDL-C 低下）が観察された。死亡、腫瘍性又は非腫瘍性の変化を含め、ほかの検査項目に evolocumab に関連した影響は認められなかった。

2.4.4.5　生殖発生毒性試験

カニクイザルにおける ePPND 試験、ハムスターにおける受胎能及び初期胚発生試験、並びにカニクイザルにおける 6 カ月間反復投与毒性試験の雄及び雌の受胎能評価から、evolocumab の生殖及び発生毒性に関する情報を得た（2.4.4.2.2 項）。その結果、evolocumab と関連した生殖又は発生への影響は観察されなかった。

2.4.4.5.1　受胎能及び初期胚発生

ハムスターの受胎能及び初期胚発生試験（114975 試験、表 2.6.7-12）では、雌雄のゴールデンシリアンハムスター（25 匹／性／群）に、交配前（雄では 4 週間、雌では 2 週間）から交配さらに着床までの期間、媒体又は evolocumab の 10、30、及び 100 mg/kg を Q2W で皮下投与した。雄のいずれの用量でも、交尾及び受胎能、生殖器重量、精子に関して、投与による影響は認められなかった。トキシコキネティクスの成績から、本試験の evolocumab 曝露量は、ほかのハムスターの試験と一致した。また，高用量（100 mg/kg Q2W）の曝露量は、420 mg を Q4W で投与した臨床の曝露量と比較して 15 倍のマージンがあると推定された。

また、性成熟したカニクイザルに evolocumab の 300 mg/kg までを QW で 6 カ月間投与した際に、生殖器の重量及び病理組織学的検査、月経周期、あるいは精子パラメータに、影響は観察されなかった（110359 試験、2.6.6.3.4 項）。

2.4.4.5.2　胚・胎児及び出生後の発達

カニクイザルにおける ePPND 試験（110370 試験、表 2.6.7-14）では、evolocumab の単一用量（50 mg/kg）を Q2W で反復投与した。カニクイザルの evolocumab の非臨床薬理試験（111322 試験、2.6.4.1.1.1.1 項）において、3 mg/kg 以上の用量では PCSK9 阻害作用が飽和することが示された。さらに、カニクイザルにおける非臨床毒性試験（110149、110359、並びに 112311 試験）では、50 mg/kg の Q2W 投与による曝露量は、420 mg を Q4W で投与した際の臨床曝露量の 10 倍以上と推定された。そこで、ICH S6（R1）に沿い、本 ePPND 試験においては、Q2W での単一の用量（50 mg/kg）群及び対照群を設定し、胚・胎児の発生及び出生児の発達に対する潜在的な有害性を評価した。

妊娠したカニクイザル 36 匹に、媒体又は evolocumab の 50 mg/kg（18 匹／群）を、妊娠 20 から 22 日（妊娠判定により異なる）に 1 回、妊娠 35 日に 1 回、その後の出産までの妊娠期間を通じて Q2W で最大で合計 11 回皮下投与した。投与終了後、自然分娩し、出生児は生後全期間を通して母動物が飼育した。妊娠期間を通し妊娠状態を超音波検査によって確認し、臨床症状、摂餌量、体重を観察した。生後およそ 6 カ月間にわたり、臨床症状及び体重（母動物及び出生児）、摂餌量（母動物）、及び出生児の成長並びに発育（出生児、生後 2 週間の神経行動学的評価、生後約 1 カ月後の X 線検査による骨格評価を含む）について観察した。母動物及び出生児は、妊娠及び出生後の適

切な時点で採血を行い、薬力学的検査（LDL-C 及び総コレステロール）、トキシコキネティクスあるいは抗薬物抗体の分析を行った。生後 6 カ月ですべての出生児を安楽死させ、外表及び内臓検査並びに肉眼的組織検査を含む剖検を実施した。

妊娠期間又は妊娠及び生後の転帰（胎児死亡又は出生児死亡）に、evolocumab と関連した変化はなかった。evolocumab の 50 mg/kg を Q2W で投与した妊娠雌カニクイザルでは、投与期間を通して血清中 LDL-C 及び総コレステロール濃度が一貫して低下した（平均 LDL-C は対照群より 65%～70%低下）。分娩後の evolocumab 群の母体における血清中 LDL-C 及び総コレステロール濃度は、分娩 91 日までにベースラインの水準に戻り、evolocumab 血清中濃度の減少に関係していた。また、evolocumab 投与は、母体又は出生児の血清中 HDL-C あるいはトリグリセリド濃度には影響しなかった。

evolocumab を 50 mg/kg Q2W でカニクイザルの妊娠雌に投与したとき、出生児の血清中 evolocumab 濃度は生後 14 日でおよそ 100 µg/mL であり、成獣において LDL-C 及び総コレステロールについて最大の効果を発現する血清中濃度で曝露された。しかし、evolocumab 群の出生児の血清中 LDL-C 及び総コレステロール濃度の平均値は、対照群よりわずかに低いだけで、対照と evolocumab 両群の個別値のかなりの重なり合いが期間を通して認められた。これらの結果は、出生児における evolocumab の薬理効果は成獣と比較して小さいことを示唆している。カニクイザルにおける IgG2 モノクローナル抗体の胎盤通過性についての知見（Moffat, 2014）及び出生後の母体由来 IgG の全身曝露量は無視できる程度であること（Van de Perre, 2003; Hurley, 2011）から、観察された出生児の曝露は、子宮内で胎盤通過を介した可能性が高いと考えられる。

evolocumab の 50 mg/kg を Q2W で投与したとき、妊娠 133 日の投与後における母動物の evolocumab の平均曝露値は、420 mg を Q4W で投与した際の臨床曝露量と比較して 12 倍のマージンがあった。分娩後の evolocumab の濃度は、すべての母動物では分娩後 91 日までに、すべての出生児では生後 180 日までに検出限界以下に減少したことから、evolocumab のクリアランスは出生児において遅い可能性が示唆された。この試験では PCSK9 濃度は測定しなかったが、ヒトでは新生児の PCSK9 濃度が母親の約 1/2 であることが近年報告された（Peticca et al, 2013）。すなわち、出生後の evolocumab の血中濃度推移は、出生児における抗原によるクリアランスの低下にも関連すると考えられる。evolocumab 群の母動物 3 匹に抗 evolocumab 抗体が検出された（そのうちの 2 匹は分娩後に検出され、1 匹は中和抗体が検出された）が、抗体産生に伴ったトキシコキネティクスあるいは薬理効果の変化はみられなかった。出生児には、抗 evolocumab 抗体は検出されなかった。

結論として、妊娠カニクイザルに evolocumab の 50 mg/kg を Q2W で妊娠 20～22 日と出生時までの期間に皮下投与した結果、忍容性は良好で、母体に対する毒性は観察されず、生後 6 カ月間の出生児の成長あるいは発達に影響はなかった。発生に関する NOEL は 50 mg/kg で、母体における evolocumab 投与の影響は、予測された薬理効果（血清中 LDL-C 及び総コレステロールの低下）に限られた。生後 14 日の出生児における evolocumab の全身曝露量は、成獣における最大の薬理効果を誘発する水準にあったが、evolocumab 群の新生児における血清中 LDL-C 及び総コレステロールの平均値は対照群の新生児と比較してわずかに低いだけで、個別値がかなり重複していたことから、新生児の evolocumab の薬理効果は成獣に比較して弱いことが示唆された。

胚・胎児発生及び出生児の発育にevolocumabが影響しなかったことは、報告された知見と一致する。すなわち妊娠中の胚・胎児へのコレステロール供給は母体のステロールの状態と無関係で、胚・胎児はコレステロール必要量の少なくとも80%を、母体からの循環血液ではなく、内因性の生合成から得ている（Woollett, 2005, Bartels and O'Donoghue, 2011）。ヒトを含む複数の動物種において、胎児のコレステロール生合成は成人のそれを大きく上回る（Dietschy et al, 1993）。さらに、食事若しくは遺伝子突然変異（例えばApoBの変異）により妊娠期間を通して低コレステロール状態であった母親から産まれた児の発達に、有害な影響は認められていなかったことから、母体の低コレステロール状態と出産転帰への悪影響に因果関係はなかった（Connor et al, 1978、McMurry et al, 1981、Homanics, 1993）。これらの知見は、妊娠期間を通して母体の血清中LDL-Cが約70%低下したが、胚・胎児発生又は出生後の発育への影響がなかった本試験結果と一致しており、全体として、ヒト胎児へのリスクがほとんどないことを示唆している。

2.4.4.5.3 新生児を対象とした試験

2.5項で述べたように、evolocumabは、12歳以上の家族性高コレステロール血症ホモ接合体（HoFH）治療を目的として治験が実施された。幼若動物を対象とした非臨床試験は実施及び計画はしていない。しかし、終了した非臨床安全性試験から、小児での臨床試験での安全性についての若干の成績が得られた。

反復投与毒性試験には発達中の年齢の動物が含まれており、ヒトでの少なくとも後期小児期及び早期思春期から性成熟期に対応していた。カニクイザルにおける6週間反復投与毒性試験では2.5歳の動物が使用され、これらの動物はヒトのおよそ10歳に相当する。免疫系の発達など出生後に起こるいくつかの事象に関しては、より低年齢層への外挿が適当かもしれない（Morford et al, 2011; Martin and Weinbauer, 2010; Beck et al, 2006）。

カニクイザルにおけるePPND試験では母動物の曝露によって、ヒトの0歳から2歳に相当する生後発育期（Weinbauer et al, 2012）のevolocumabが及ぼす潜在的な影響が評価され、小児（乳幼児）の安全性についての非臨床成績が得られた（2.6.6.6.2項）。発育に対するNOELは50 mg/kg（Q2W）で、血清中LDL-C及び総コレステロールの低下がみられ、投与に関連する影響はevolocumabの薬理作用に限られた。

いずれの試験においても毒性は観察されず、evolocumabの非臨床安全性プロファイルは、幼若動物と成獣では同様と推定された。12歳以上の小児を対象にしたHoFHの臨床試験に際し、これらの試験成績は安全性を支持できるものと考えられた。

2.4.4.6 局所刺激性試験

局所刺激性試験（110151試験及び115815試験、表2.6.7-16）を実施し、臨床試験で使用する2種類のevolocumab製剤（3.2.P.2.3項参照）、すなわちプロセス1（70 mg/mL）及びプロセス2（140 mg/mL）の局所刺激性を評価した。これらの試験を通じて、evolocumabに関連する投与部位の変化は認められなかった。

プロセス1のevolocumab製剤（1 mL／部位）を、雄ウサギ（ニュージーランドホワイト種）3匹に単回静脈内投与した（110151試験）。対照物質は左耳辺縁静脈、被験物質は右耳辺縁静脈から急速注入した。投与部位の肉眼及び病理組織学的評価に、evolocumabの影響は観察されなかった。したがって、evolocumabの静脈内投与による局所刺激性はないものと考えられた。

一方の試験（115815試験）では、ゴールデンシリアンハムスターの雄5匹の左腰部にプロセス2のevolocumab製剤（140 mg/mL）1 mLを単回皮下投与し、局所刺激性を評価した。すべての動物が、試験4日の剖検時まで生存した。臨床症状、体重、摂餌量に対する影響は観察されなかった。局所の変化は、投与後48時間までに完全に消失した軽度あるいは極軽度の浮腫に限られ、一過性で皮下投与の手技によって生じたものと考えられた。投与部位に肉眼的に観察される変化はなく、低頻度で極わずかな投与部位と投与部位以外の皮膚の病理組織学的変化は、投与あるいは剃毛による皮膚処理によって生じたもので、evolocumabとの関連はなかった。

最後に、すべての反復投与毒性試験において投与部位について評価したが、evolocumabと関連した変化は観察されなかった。

2.4.4.7　そのほかの毒性試験

2.4.4.7.1　組織交差反応性試験

組織交差反応性試験は、免疫組織化学的方法を用いた*in vitro*における組織結合性のアッセイで、モノクローナル抗体及び関連する抗体様産物の組織における抗原決定基への結合性を特徴付けることを目的に実施されている（ICH S6［R1］、2011）。ハムスター（112876試験、表2.6.7-17）又はヒト及びカニクイザル（110148試験、表2.6.7-17）の正常組織を用いて試験を実施した。

以下の正常組織において、*in vitro*でのevolocumabの細胞表面成分への結合が観察された。

- ヒト：横紋骨格筋、心筋細胞、皮膚の平滑筋細胞
- カニクイザル：横紋骨格筋、心筋細胞、眼（虹彩）及び皮膚の平滑筋細胞
- ハムスター：横紋骨格筋、心筋細胞、皮膚の平滑筋細胞

*in vivo*心機能評価、並びに心筋及び骨格筋、皮膚、眼の病理組織学的検査成績より、反応性がみられた組織に対するevolocumabの機能的な影響あるいは形態学的な変化はなかった。間接検眼鏡やスリットランプ検眼鏡を用いた前眼部及び後眼部の詳細な評価を含む*in vivo*の検査を、カニクイザル及びハムスターにおいて実施したが，影響は認められなかった。カニクイザルのePPND試験での生後7日及び14日の出生児の神経行動学的検査において、瞳孔光反射、眼振の有無、更に眉間タップ反射（三叉神経、顔面神経並びに輪筋によるまばたき反射を評価）に、影響は認められなかった。

また、いくつかの組織の細胞内成分に対して、検査したすべての動物種で交差反応性が観察された。しかしevolocumabは、その大きさのために細胞質コンパートメントに到達しないため、細胞内成分への結合はevolocumabの安全性評価に関係しないと考えられた。

組織交差反応性アッセイには多くの技術的な限界があり、治療用のモノクローナル抗体についてこのアッセイを使用するための十分な最適化がなされていないため、データの解釈には困難を伴うことがある（Leach et al, 2010）。113種類のモノクローナル抗体の組織交差反応性試験成績を検討したBussiereらの広範な調査では、これらの限界について言及された（Bussiere et al ,2011）。治療標的を発現することが既知の組織を95%以上染色したのは、ヒト以外の霊長類及びヒト組織におい

て、試験した分子の各々22%及び10%のみであった。標的の発現が不明で、*in vivo* の毒性又は薬効の証拠がない組織への反応、すなわち偽陽性の結果もよくみられた。ICH S6（R1）では、アッセイの能力不足、*in vivo* 試験結果との低い相関性、種間での不一致、及び組織交差反応性のみで特定された臨床安全性課題が少ないことから、ヒト組織を使用した組織交差反応性の検討のみが推奨される。また、同ガイドラインには「組織結合自体は *in vivo* の生物活性を示すものではない。（中略）知見は、全体の薬理及び安全性評価パッケージに照らして評価及び解釈すべきである」との記載がある。種を問わず様々な組織が evolocumab によって多少染色されたが、PCSK9 の主要な発現部位である肝臓（Seidah et al, 2003）ではどの種においても染色が観察されなかった結果は、本アッセイが特異性を欠く一例かもしれない。

2.4.4.7.2 免疫原性

免疫原性を評価することを目的とした試験は実施しなかった。一般毒性試験において免疫原性を評価した結果、evolocumab はハムスター及びカニクイザルのいずれにおいても、高い免疫原性は示さなかった。evolocumab を投与したハムスターの試験では、抗 evolocumab 抗体は検出されなかった。カニクイザルの 4 試験（110149、110359、112311、110370 試験）において、抗 evolocumab 抗体について検査した。その結果、evolocumab を投与したサルの 100 例中 10 例（10%）に抗 evolocumab 抗体が検出され、半数は中和抗体陽性であった。しかし、抗 evolocumab 抗体が検出された動物でも薬理効果が示され、非臨床試験全般では抗 evolocumab 抗体産生の頻度が低かったことから、免疫原性は evolocumab の安全性評価に影響しなかったと考えられる。

2.4.4.7.3 免疫毒性試験

反復投与毒性試験の一部として、スタチン併用（112311 試験）及び evolocumab 単独投与（110359 試験）下での、evolocumab の免疫毒性を評価した。免疫毒性の評価項目は、TDAR、末梢リンパ球サブセット、並びにナチュラルキラー細胞機能で、どの評価項目についても evolocumab による影響は観察されず、免疫系の統合性あるいは機能に evolocumab は影響しないと考えられた。免疫毒性に関する更なる考察は、副次的薬理試験の項（2.4.2.2.7.2 項）で行った。

2.4.4.7.4 メカニズム試験

いずれの非臨床試験でも毒性は観察されず、作用機序に関する試験は実施しなかった。

2.4.4.7.5 依存性試験

evolocumab に、薬物の乱用又は誤用の可能性を示唆する証拠はなく、また実際にいずれも観察されていない。ほかの抗体と同様に、血液脳関門を通過する可能性は低い（Poduslo et al, 1994; Triguero et al, 1989; Jones and Shusta, 2009; Frank et al, 2011; Yu and Watts, 2013）。非臨床試験では、420 mg を Q4W で投与した際の臨床曝露量に対して最高で 300 倍の曝露量でも、幼若動物（110370 試験）あるいは成獣（110150 試験）に神経行動学的な影響は認められていない。さらに、

evolocumabの単一リガンドであるPCSK9に対する特異性、作用機序（PCSK9の阻害）、あるいはスタチンを含む脂質低下薬の当該情報から、薬物依存に関する理論上の警告はないと判断した。

2.4.4.7.6 代謝物の毒性試験

evolocumabの代謝においては活性代謝物は特定されていない（2.6.4項）ため、代謝物に関する試験は不要と判断された。

2.4.4.7.7 不純物の毒性試験

evolocumabはバイオテクノロジー由来医薬品であるため、不純物に関する試験は該当しない。

2.4.4.7.8 そのほかの試験

そのほかに実施した試験はない。

2.4.5 総括及び結論

evolocumabの非臨床プログラムにおける主な結論は次の通りであった。

- *in vitro*で、evolocumabはPCSK9とLDLRとの相互作用を阻害してPCSK9を介したLDLRの分解を抑制する。その結果、PCSK9による細胞へのLDL取り込み減少を抑制する。またスタチン存在下及び非存在下でHepG2細胞中のLDLR蛋白濃度を上昇させる。
- evolocumabは、ヒトPCSK9と高い親和性で結合する（K_D= 16 pmol/L）。
- evolocumabは、ハムスター及びカニクイザルのPCSK9とも高い親和性で結合して（それぞれK_D = 14及び8 pmol/L）、PCSK9とLDLRの相互作用を抑制することにより、肝臓LDLR蛋白濃度を上昇させ、血清中LDL-Cを低下させる。
- ハムスター及びカニクイザルを用いた単回投与及び反復投与試験でevolocumabのPK及びTKの特徴を明らかにした。
  - evolocumabは、標的媒介性消失と一致した非線形のPKを示し、また分布容積が小さいことから組織分布は限られる。
  - evolocumabの反復投与では、単回投与時と比較して、時間に依存したPKの変化を示す兆候はなかった。
  - 血清中の非結合型evolocumabとLDL-Cの間に濃度－反応の関連性が認められた。
- ハムスター及びカニクイザルにおいて、最高300 mg/kgをQWで投与した反復投与毒性試験（ハムスターで最長3カ月間、カニクイザルで最長6カ月間）、並びにカニクイザルを用いたロスバスタチンとの3カ月間併用毒性試験（最高100 mg/kg Q2W）では、evolocumabによる毒性は認められなかった。これらの試験のNOELにおける曝露マージンは、evolocumabの420 mgをQ4Wで投与したときの臨床曝露量と比較して、ハムスターでは最大46倍、カニクイザルでは最大300倍であった。

- evolocumabによる影響は、薬理作用（血清中LDL-C及び総コレステロールの低下）に限られた。
- カニクイザルでは、免疫機能、眼及び心血管系について詳細に検査した。
- どちらの種でも筋毒性の証拠はなかった。
- ハムスター及びカニクイザルでは抗evolocumab抗体の発現がわずかであったことから（≤10%）、全試験期間においてevolocumabの毒性評価に影響はなかった。

- ハムスターにおける受胎能及び初期胚発生試験では、生殖及び発生に関するNOAELは試験した最高用量（100 mg/kg Q2W）で、420 mg Q4Wの臨床曝露量と比較して推定15倍のマージンがあった。性成熟したカニクイザルに420 mg Q4Wの臨床曝露量の300倍を6カ月継続したとき、生殖器の重量又は病理組織検査所見、月経周期、あるいは精子パラメータに影響はなかった。
- カニクイザルにおけるePPND試験では、妊娠、胚・胎児あるいは生後の成長及び発達に影響はなかった。発生へのNOELは試験した最高用量（50 mg/kg Q2W）で、420 mg Q4Wの臨床曝露量に対して12倍のマージンがあった。母体におけるevolocumabに関連した影響は、薬理作用に限られていた。出生児では、成獣での最大の薬理作用を誘発する曝露量であったことから、evolocumabの胎盤通過を介した可能性が高いと考えられる。しかし、平均LDL-C濃度は、対照の出生児と比較してわずかに低いだけであった。
- ハムスターにおける2年間の生涯投与試験では、死亡、腫瘍性又は非腫瘍性変化にevolocumabに関連した影響は認められなかった。evolocumab投与による影響は、薬理作用に限られた。NOAELは試験した最高用量（100 mg/kg Q2W）で、420 mg Q4Wの臨床曝露量の15倍のマージンがあった。

該当するガイダンス、主にICH S6（R1）、ICH M3（R2）及びICH S5（R2）に準拠して、evolocumabの非臨床安全性プロファイルを明らかにする包括的な毒性試験を実施した。いずれの非臨床試験でも毒性は観察されなかった。evolocumabに関連した影響は、薬理作用（血清中LDL-C及び総コレステロールの低下）に限られていた。

evolocumabはヒト、カニクイザル、ハムスターのPCSK9と同等に高い親和性で結合したため、evolocumabの臨床開発プログラムの安全性を担保する毒性試験はハムスター及びカニクイザルにおいて実施した。臨床投与経路に準じ、すべての反復投与毒性試験の投与経路は皮下とした。evolocumabの投与頻度は、初期の試験ではQWとしたが、その後の試験では最も高頻度の臨床投与法に合わせQ2Wとした。ICH S6（R1）に従い、（a）試験動物においてdynamic range（ほぼ最大に近い）の薬理効果（血清中LDL-Cの低下）、及び（b）ヒトにおけるリスクの評価を可能にする薬物の曝露マージンを得ることができる用量を選択した。毒性試験及びトキシコキネティクス試験はGood Laboratory Practice（GLP）基準を遵守し実施した。

evolocumabの300 mg/kgまでをQWで最長3カ月間投与したハムスター及び6カ月間投与したカニクイザルに、evolocumabと関連した毒性は認められなかった。これらの試験では薬理作用である血清中LDL-C及び総コレステロールが各々およそ最大85%及び40%低下し、投与終了後には投与前の水準に戻った。カニクイザルにおいて、evolocumabは100 mg/kgまでをQ2W投与で、ロスバスタチンは5 mg/kgのQD経口投与で3カ月間併用したが、有害な影響は認められなかった。

evolocumabのがん原性を評価するため、ハムスターの生涯投与試験を実施した。ハムスターにevolocumabの100 mg/kgまでをQ2Wで最長2年間投与したが、腫瘍発生率は上昇しなかった。

妊娠した雌カニクイザルにevolocumabを50 mg/kgの用量で、妊娠20ないし22日から出産までQ2Wで投与したが、妊娠、胚・胎児発生又は出生後の発育に影響は認められなかった。ハムスターにevolocumabを100 mg/kgまでQ2Wで投与したとき、雄又は雌の受胎能に影響はなく、性成熟たカニクイザルにevolocumabを300 mg/kgまでQWで6カ月間投与したとき、生殖器官の重量又は病理組織学的検査、月経周期、あるいは精子パラメータに影響は認められなかった。

これらの非臨床毒性試験成績は、ヒトのリスクに関連する安全上の懸念の兆候はないことを示しており、NOAELの曝露量と臨床曝露量には十分なマージンがあった（表2.4-1）。この結論は、evolocumabの臨床試験における安全性データと一致していた。

添付文書案は、evolocumabの薬理学的及び毒性学的特性を十分に反映し、受胎能、妊娠、授乳、並びに小児患者への投与に関して医療従事者及び患者への注意が含まれる。

結論として、本申請においては、2.6項及び第4部に示すように、適切で十分な薬理、薬物動態、並びに毒性の試験が実施された。得られた成績は、evolocumabの適応症において推奨される用量、投与経路及びスケジュールでの製造販売承認を裏付ける上で適切と考えられる。

2.4.6 参考文献

Abd TT, Jacobson TA. Statin-induced myopathy: a review and update. Expert Opin Drug Saf. 2011;10:373-387.

Abifadel M, Varret M, Rabès J-P, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. Nat Genet. 2003;34:154-156.

Albecka A, Belouzard S, Op de Beeck A, et al. Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. Hepatology. 2012;55:998-1007.

Agnello V, Gyorgy A, Mutasim E, Knight GB, Zhang Q-X Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. Proc Natl Acad Sci. 1999; 96:12766-12771.

Amgen Inc., AMG 145 Preliminary Assessment of Carcinogenic Potential. FDA Submission:SN0038,February, 2011.

Arora R, Liebo M, Maldonado F. Statin-induced myopathy: the two faces of Janus. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2006;11:105-112.

Awan Z, Dubuc G, Faraj M, Dufour R, Seidah NG, Davignonb J, Rabasa-Lhoret R, Baass A. The effect of insulin on circulating PCSK9 in postmenopausal obese women. Clin Biochem 2014; http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.03.022.

Baass A, Dubuc G, Tremblay M, et al. Plasma PCSK9 is associated with age, sex, and multiple metabolic markers in a population based sample of children and adolescents. Clin Chem. 2009;55:1637-1645.

Baker SK, Tarnopolsky MA. Statin myopathies: pathophysiologic and clinical perspectives. Clin Invest Med. 2001;24:258-272.

Bartels A, O'Donoghue K. Cholesterol in pregnancy: a review of knowns and unknowns. Obstetric Medicine 2011; 4:147-151.

Bartosch B, Cosset FL. Studying HCV cell entry with HCV pseudoparticles (HCVpp). Methods Mol Biol. 2009;510:279-293.

Beck MJ, Padgett EL, Bowman CJ, et al. Nonclinical juvenile toxicity testing. In: Hood RD, ed. Developmental and Reproductive Toxicology: A Practical Approach. 2nd ed. Boca Raton, FL: Taylor & Francis; 2006;263-327.

Benito-León J, Louis ED, Vega S, Bermejo-Pareja F. Statins and cognitive functioning in the elderly: a population-based study. J Alzheimers Dis. 2010;21:95-102.

Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, et al. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL-cholesterol. J Biol Chem. 2004;279:48865-48875.

Bersot TP, Mahley RW, Brown MS, Goldstein JL Interaction of swine lipoproteins with the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. J Biol Chem. 1976;251:2395-2398.

Bettermann K, Arnold AM, Williamson J, et al. Statins, risk of dementia, and cognitive function: secondary analysis of the Ginkgo Evaluation of Memory Study. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2012;21:436-44.

Beydoun MA, Beason-Held LL, Kitner-Triolo MH, et al. Statins and serum cholesterol's associations with incident dementia and mild cognitive impairment. J Epidemiol Community Health. 2011;65:949-957.

Bingham B, Shen R, Kotnis S, et al. Proapoptotic effects of NARC 1 (=PCSK9), the gene encoding a novel serine proteinase. Cytometry A. 2006;69:1123-1131.

Blacklow SC. Versatility in ligand recognition by LDL receptor family proteins: advances and frontiers. Curr Opin Struct Biol 2007;17:419–426.

Blom DJ, Hala T, Bolognese M, et al. A 52-week placebo-controlled trial of evolocumab in hyperlipidemia. N Engl J Med. 2014;370:1809-1819.

Bochem AE, Holleboom AG, Romijn JA, et al. High density lipoprotein cholesterol as a source of cholesterol for adrenal steroidogenesis: a study in individuals with low plasma HDL-C. J Lipid Res. 2013;54:1698-1704.

Brouwers MCGJ, Troutt JS, vanGreevenbroeka MMJ, et al. Plasma proprotein convertase subtilisin kexin type9 is not altered in subjects with impaired glucose metabolism and type2 diabetes mellitus, but its relationship with non-HDL cholesterol and apolipoprotein B may be modified by type 2 diabetes mellitus: The CODAM study. Atherosclerosis 2011;217:263–267.

Brown MS and Goldstein JL. Lowering LDL – not only how low, but how long? Science. 2006;311:1721-1723.

Brown MS, Herz J, Goldstein JL. LDL-receptor structure: Calcium cages, acid baths and recycling receptors. Nature. 1997;388:629-630.

Browning JD, Horton JD. Fasting reduces plasma proprotein convertase, subtilisin/kexin type 9 and cholesterol biosynthesis in humans. J Lipid Res. 2010;51:3359-3363.

Brunham LR, Kruit JK, Hayden MP, Verchere B. Cholesterol in β-cell dysfunction: the emerging connection between HDL cholesterol and type 2 diabetes Curr Diab Rep 2010;10:55–60.

Brunham LR, Kruit JK, Verchere B, Hayden MP. Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes J Clin Invest. 2008;118:403–408.

Buchwald H, Varco RL, Matts JP et al Effect of partial ileal bypass surgery on mortality and morbidity from coronary heart disease in patients with hypercholesterolemia. New Engl J Med 1990; 323:946-955.

Burlone ME, Budkowska A. Hepatitis C virus entry: role of lipoproteins and cellular receptors. J Gen Virol. 2009;90:1055-1070.

Bussiere JL, Leach MW, Price KD, Mounho BJ, Lightfoot-Dunn R Survey results on the use of the tissue cross-reactivity immuno-histochemistry assay Regul Toxicol Pharmacol 2011;59:493-502.

Canuel M, Sun X, Asselin MC, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) can mediate degradation of the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1). Plos One. 2013;8:e64145.

Cariou B, Langhi C, Le Bras M, et al. Plasma PCSK9 concentrations during an oral fat load and after short term high-fat, high-fat high-protein and high-fructose diets. Nutrition & Metabolism 2013;10:4.

Cariou B, Ouguerram K, Zaïr Y, et al. PCSK9 dominant negative mutant results in increased LDL catabolic rate and familial hypobetalipoproteinemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29:2191-2197.

Chang CH, Kusama M, Ono S, et al. Assessment of statin-associated muscle toxicity in Japan: a cohort study conducted using claims database and laboratory information. BMJ Open. 2013 Apr 11;3(4). pii: e002040. doi: 10.1136/bmjopen-2012-002040. Print 2013.

Chen J, Ho S, Hayward M, et al. Comprehensive phenotype of mice carrying PCSK9-Y119X null mutation. PCSK9 conference, Nantes, France. 2010.

Chen YQ, Troutt JS, Konrad RJ. PCSK9 is present in human cerebrospinal fluid and is maintained at remarkably constant concentrations throughout the course of the day. Lipids 2014;49:445–455.

Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. Lancet. 2010;376:1670-1681.

Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, et al. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. Nat Genet. 2005;37:161-165.

Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Jr, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. N Engl J Med. 2006;354:1264-1272.

Connor WE, Cerquera MT, Connor RW, et al. The plasma lipids, lipoproteins, and diet of the Tarahumara Indians of Mexico. Amer J Clin Nutr. 1978:31:1131-1142.

Costet P, Cariou B, Lambert G, et al. Hepatic PCSK9 expression Is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. J. Biol. Chem. 2006;281:6211-6218.

Culver AL, Ockene IS, Balasubramanian R, et al. Statin use and risk of diabetes mellitus in postmenopausal women in the Women's Health Initiative. Arch Intern Med. 2012;172:144-152.

Cuthbert JA, Lipsky PE. Provision of cholesterol to lymphocytes by high density and low density lipoproteins: requirements for low density lipoprotein receptors. J Biol Chem. 1987;262;7808-7818.

Cuthbert JA, Lipsky PE. Promotion of human T lymphocyte activation and proliferation by fatty acids in low density and high density lipoproteins. J Biol Chem. 1986;261:3620-3627.

Cuthbert JA, Lipsky PE. Modulation of human lymphocyte responses by low density lipoproteins (LDL): enhancement but not immunosuppression is mediated by LDL receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81:4539-4543.

Davis RA, Miyake JH, Hui TY, Spann NJ. Regulation of cholesterol-7-hydroxylase: BAREly missing a SHP. J Lipid Res. 2002;43:533-543.

Degirolamo C, Modica S, Palasciano G, Moschetta A. Bile acids and colon cancer: Solving the puzzle with nuclear receptors. Trends Mol Med. 2011;17:564-572.

Dias CS, Shaywitz AJ, Wasserman SM, et al. Effects of AMG 145 on low-density lipoprotein cholesterol levels: results from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose phase 1 studies in healthy volunteers and hypercholesterolemic subjects on statins. J Am Coll Cardiol. 2012;60:1888-1898.

Dieckmann M, Dietrich MF, Herz J. Lipoprotein receptors – an evolutionarily ancient multifunctional receptor family. Biol Chem. 2010;319:1341-1363.

Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. J Lipids Res. 2004;45:1375-1397.

Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain. Curr Opin Lipidol. 2001;12:105-112.

Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. J Lipid Res. 1993;34:1637-1659.

Dirks AJ, Jones KM. Statin-induced apoptosis and skeletal myopathy. Am J Physiol Cell Physiol. 2006;291:C1208-1212.

Drevon-Gaillot, E, Perron-Lepage MF, Clement C, Burnett R A review of background findings in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis) from three different geographical origins. Exp Toxicol Pathol. 2006;58:77–88.

Espenshade PJ, Hughes AL. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. Annu Rev Genet. 2007;41:401-427.

Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. Nature 2007;446:801–805.

Evans MA, Golomb BA. Statin-associated adverse cognitive effects: survey results from 171 patients. Pharmacotherapy. 2009;29:800-811.

Evers R, Dallas S, Dickmann LJ, Fahmi, Kenny JR, Kraynov E, et al. Critical review of preclinical approaches to investigate cytochrome P450-mediated therapeutic protein drug-drug interactions and recommendations for best practices: a white paper. Drug Metabolism and Disposition 2013;41:1598-1609.

Ezzati M, Vander Hoorn S, Lopez AD, et al. Chapter 4: Comparative Quantification of Mortality and Burden of Disease Attributable to Selected Risk Factors. In: Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, et al, eds. Global Burden of Disease and Risk Factors. Washington (DC):World Bank; 2006.

FDA Drug Safety Communication: Important safety label changes to cholesterol-lowering statin drugs 2012 http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm293101.htm.

Feldman HH, Doody RS, Kivipelto M, et al. Randomized controlled trial of atorvastatin in mild to moderate Alzheimer disease: LEADe. Neurology. 2010;74:956-964.

Flint OP, Masters BA, Gregg RE, Durham SK. Inhibition of cholesterol synthesis by squalene synthase inhibitors does not induce myotoxicity in vitro. Toxicol Appl Pharmacol. 1997;145:91-98.

Frank RT, Abody KS, Najbauer J. Strategies for enhancing antibody delivery to the brain. Biochim Biophys Acta. 2011; 1816:191-198.

Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, Mitra AK. Ocular Drug Delivery. AAPS Journal 2010;12:348-360.

Gelzleichter TR, Halpern W, Erwin R, et al. Combined administration of RG7652, a recombinant human monoclonal antibody against PCSK9, and atorvastatin does not result in reduction of immune function. Tox Sci. 2014; doi: 10.1093/toxsci/kfu093.

Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics – 2013 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation. 2013;127:e6-e245.

Goedeke L, Fernandez-Hernando C. MicroRNAs: a connection between cholesterol metabolism and neurodegeneration. Neurobiol Dis 2014: doi:10.1016/j.nbd.2014.05.034.

Golomb BA, Criqui MH, White H, Dimsdale JE. Conceptual foundations of the UCSD statin study. Arch Intern Med 2004;164:153–62.

Goulinet S, Chapman MJ. Plasma lipoproteins in the Golden Syrian hamster (Mesocricetus auratus): heterogeneity of apoB- and apoA-1-containing particles. J Lipid Res. 1993;34:943-959.

Graham MJ, Lemonidis KM, Whipple CP, et al. Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. J Lipid Res. 2007;48:763-767.

Grefhorst A, McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice. J Lipid Res. 2008;49:1303-1311.

Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. Circulation. 2004;110:227-239.

Gu H-M, Adijiang A, Mah M, Zhang D. Characterization of the role of EGF-A of low density lipoprotein receptor in PCSK9 binding. J Lipid Res 2013;54:3345-3357.

Gustafsen C, Kjolby M, Nyegaard M, et al., The hypercholesterolemia-risk gene SORT1 facilitates PCSK9 secretion. Cell Metabolism 2014;19:310–318.

Guyton JR, Bays HE, Grundy SM, Jacobsen TA. An assessment by the statin intolerance panel: 2014 update J Clin Lipidol 2014; 8:S72–S81.

Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β-peptide. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007; 8:101-112.

Haley P, Perry R, Ennulat D Society of Toxicologic Pathology position paper: best practice guideline for the routine pathology evaluation of the immune system. Toxicol Pathol 2005;33:404–407.

Harper CR, Jacobson TA. The broad spectrum of stain myopathy: from myalgia to rhabdomyolysis. Curr Opin Lipidol. 2007;18:401-408.

Herz J, Bock HH. Lipoprotein receptors in the nervous system. Ann Rev Biochem 2002;71;405-434.

Herz J. Apolipoprotein E receptors in the nervous system. Curr Opin Lipidol. 2009;20:190-196.

Hochholzer W, Giugliano RP. Lipid lowering goals: back to nature? Ther Adv Cardiovasc Dis. 2010;4:185-191.

Homanics GE, Smith TJ, Zhang SH, et al. Targeted modification of the apolipoprotein B gene results in hypobetalipoproteinemia and developmental abnormalities in mice. Proc Natl Acad Sci 1993;90:2389-2393.

Hooper AJ, Marais AD, Tanyanyiwa DM, Burnett JR. The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. Atherosclerosis. 2007:193:445-448.

Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. Trends Biochem Sci. 2007:32:71-77.

Huang SM, Zhao H, Lee JI, Reynolds K, Zhang L, Temple R, and Lesko LJ Therapeutic protein-drug interactions and implications for drug development. Clin Pharmacol Ther 2010;87:497-503.

Hurley WL, Theil PK. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. Nutrients 2011:3:442-474.

International Conference on Harmonisation (ICH) 2011 Tripartite Guideline S6 (R1) Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals.

International Conference on Harmonisation (ICH). 2009. Tripartite Guideline M3 (R2) Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals.

International Conference on Harmonisation (ICH) 2005. Harmonised Tripartite Guideline S5 (R2). Guideline for Industry: detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility.

Jonas MC, Costantini C, Puglielli L. PCSK9 is required for the disposal of non-acetylated intermediates of the nascent membrane protein BACE1. EMBO Rep. 2008;9:916-922.

Jones AR, Shusta EV.Antibodies and the blood-brain barrier In: An Z, ed. Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic John Wiley & Sons, Inc. 2009; Ch21:483-502.

Jukema JW, Cannon CP, de Craen AJ, Westendorp RG, Trompet S. The controversies of statin therapy: weighing the evidence. J Am Coll Cardiol. 2012;60:875–881.

Junghans RP, Anderson CL. The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:5512-5516.

Kamino K, Tillmann T, Boschmann E, Mohr U Age-related incidence of spontaneous non-neoplastic lesions in a colony of Han:AURA hamsters. Exp Toxicol Pathol. 2001:53:157-164.

Kappelle PJWH, Lambert Gb, Dullaarta RPF. Plasma proprotein convertase subtilisin–kexin type 9 does not change during 24 h insulin infusion in healthy subjects and type 2 diabetic patients. Atherosclerosis 2011;214: 432–435.

Keizer RJ, Huitema ADR, Schellens JHM, Beijnen JH. Clinical phramacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. Clin Pharmacokinet 2010;49:493-507.

Kenny JR, Liu MM, Chow AT, Earp JC, Evers R, et al. Therapeutic Protein-Drug-Drug Interactions: navigating the knowledge gaps. Highlights from the 2012 AAPS NBC Roundtable and IQ Consortium/FDA Workshop. The AAPS Journal. 2013;15(4):933-40.

Kerr TA, Saeki S, Schneider M, et al. Loss of nuclear receptor SHP impairs but does not eliminate negative feedback regulation of bile acid synthesis. Dev Cell. 2002;2:713-720.

Kim J, Castellano JM, Jiang H, et al. Overexpression of low –density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A beta clearance. Neuron. 2009;64:632-644.

Klopfleisch S, Merkler D, Schmitz M, et al. Negative impact of statins on oligodendrocytes and myelin formation in vitro and in vivo. J Neurosci. 2008;28:13609–13614.

Koren MJ, Lundqvist P, Bolognese M, et al. Anti-PCSK9 monotherapy for hypercholesterolemia – the MENDEL-2 randomized, controlled phase 3 clinical trial of evolocumab. J Am Coll Cardiol. doi: 10.1016/j.jacc.2014.03.018.

Koren MJ, Scott R, Kim JB, et al. Efficacy, safety, and tolerability of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 as monotherapy in patients with hypercholesterolaemia (MENDEL): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. Lancet. 2012;380:1995-2006.

Kotowski IK, Pertsemlidis A, Luke A, et al. A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. Am J Hum Genet. 2006;78:410-422.

Kuo PT, Hayase K, Kostis JB, Moreyra AE. Use of combined diet and colestipol in long term (7-7.5 years) treatment of patients with type II hyperlipoproteinemia. Circulation. 1979;59:199-211.

Kwon HJ, Lagace TA, McNutt MC, et al. Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105:1820-1825.

Kysenius K, Muggalla P, Mätlik K, et al.PCSK9 regulates neuronal apoptosis by adjusting ApoER2 levels and signaling. Cell Mol Life Sci. 2012;69:1903-1916.

Labonté P, Begley S, Guévin C, et al. PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. Hepatology. 2009;50:17-24.

Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, et al. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94:2537-2543.

Langhi C, Le May C, Gmyr V, et al. PCSK9 is expressed in pancreatic delta-cells and does not alter insulin secretion. Biochem Biophys Res Commun. 2009;390:1288-1293.

LaRosa JC, Pedersen TR, Somaratne R, Wasserman SM. Safety and effect of very low levels low-density lipoprotein cholesterol on cardiovascular events. Am J Cardiol. 2013;111:1221-1229.

Leach MW, Halpern WG, Johnson CW, et al Use of tissue cross-reactivity studies in the development of antibody-based biopharmaceuticals: history, experience, methodology, and future directions. Toxicol Pathol. 2010; 38:1138-1366.

Liu M, Wu G, Baysarowich J, et al. PCSK9 is not involved in the degradation of LDL receptors and BACE1 in the adult mouse brain. J. Lipid Res. 2010;51:2611-2618.

Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP. Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. J Pharm Sci 2004;93:2645-2668.

Luo Y, Warren L, Xia D, et al. Function and distribution of circulating human PCSK9 expressed extrahepatically in transgenic mice. J Lipid Res. 2009;50:1581-1588.

Mahley RW, Innerarity TL, Pitas RE, Weisgraber KH, Brown JH, Gross E. Inhibition of lipoprotein binding to cell surface receptors of fibroblasts following selective modification of arginyl residues in arginine-rich and B apoproteins. J Biol Chem 1977;252:7279-7287.

Mallinson JE, Constantin-Teodosiu D, Glaves PD, et al. Pharmacological activation of the pyruvate dehydrogenase complex reduces statin-mediated upregulation of FOXO gene targets and protects against statin myopathy in rodents. J. Physiol. 2012;590:6389-6402.

Martin PL, Weinbauer GF. Developmental toxicity testing of biopharmaceuticals in nonhuman primates: previous experience and future directions. Int J Toxicol. 201;29:552-568.

Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. Nature. 2005;438:612-621.

Mazumdar B, Banerjee A, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus E1 envelope glycoprotein interacts with apolipoproteins in facilitating entry into hepatocytes. Hepatology. 2011;54:1149-1156.

Mbikay M, Sirois F, Mayne J, et al. PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities. FEBS Lett. 2010;584:701-706.

McGuinness B, O'Hare J, Craig D, et al. Cochrane review on "Statins for the treatment of dementia". Int J Geriatr Psychiatry. 2013;28:119-126.

McInnes EF, Ernst H, Germann PG. Spontaneous neoplastic lesions in control Syrian hamsters in 6-, 12-, 24-month short-term and carcinogenicity studies. Toxicol Pathol. 2013;41:86-97.

McMurry MP, Connor WE, Goplerud CP. The effects of dietary cholesterol upon the hypercholesterolemia of pregnancy. Metabolism. 1981;30:869-879.

Miron VE, Zehntner SP, Kuhlmann T, et al. Statin therapy inhibits remyelination in the central nervous system. Am. J. Pathol. 2009;174:1880-1890.

Moffat GJ, Retter MW, Kwon G et al. Placental transfer of a fully human IgG2 monoclonal antibody in the cynomolgus monkey, rat and rabbit: a comparative assessment from during organogenesis to late gestation. Birth Defects Res Part B 2014; 101:178-188.

Molina S, Castet V, Fournier-Wirth C, et al. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. J. Hepatol. 2007;46:411-419.

Morford LL, Bowman CJ, Blanset DL, et al. Preclinical safety evaluations supporting pediatric drug development with biopharmaceuticals: strategy, challenges, current practices. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2011;92:359-380.

Muldoon MF, Ryan CM, Sereika SM, et al. Randomized trial of the effects of simvastatin on cognitive functioning in hypercholesterolemic adults. Am J Med. 2004;117:823-829.

Muldoon MF, Barger SD, Ryan CM, et al. Effects of lovastatin on cognitive function and psychological well-being. Am J Med. 2000;108:538-546.

NDA 21-366: CDER Approval Package for Crestor (rosuvastatin calcium) tablets. 2003.

Niesen M, Bedi M, Lopez D. Diabetes alters LDL receptor and PCSK9 expression in rat liver. Arch Biochem Biophys. 2008;470:111-115.

Nguyen MA, Kosenko T, Lagace TA. Internalized PCSK9 dissociates from recycling LDL receptors in PCSK9-resistant SV-589 fibroblasts. J Lipid Res. 2014;55:266-275.

Ooba N, Sato T, Wakana A, et al. A prospective stratified case-cohort study on statins and multiple adverse events in Japan. PLoS One. 2014 e96919. doi: 10.1371/journal.pone. 0096919. eCollection 2014.

折井孝男、下堂薗権洋、石本敬三、他.平成 21 年度学術委員会学術第 2 小委員会報告 薬剤疫学的手法を利用した医薬品適正使用に関する研究（最終報告）. 日本病院薬剤師会雑誌,2010; 46, 993-997.

Orsi A, Sherman O, Woldeselassie Z. Simvastatin-associated memory loss. Pharmacotherapy. 2001;21:767-769.

Parker BA, Polk DM, Rabdiya V, et al. Changes in memory function and neuronal activation associated with atorvastatin therapy. Pharmacotherapy. 2010;30(6):236e-240e.

Parker RA, Garcia R, Ryan CS, et al. Bile acid and sterol metabolism with combined HMG CoA reductase and PCSK9 suppression. J Lipid Res. 2013;54:2400-2409.

Persson L, Cao G, Ståhle L,et al. Circulating proprotein convertase subtilisin kexin type 9 has a diurnal rhythm synchronous with cholesterol synthesis and is reduced by fasting in humans. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30:2666-2672.

Persson L, Gälman C, Angelin B, Rudling M. Importance of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in the hormonal and dietary regulation of rat liver low-density lipoprotein receptors. Endocrinology. 2009;150:1140-1146.

Peticca P, Raymond A, Gruslin A, et al. Human serum PCSK9 Is elevated at parturition in comparison to nonpregnant subjects while serum PCSK9 from umbilical cord blood is lower compared to maternal blood. ISRN Endocrinol. 2013, 341632.

Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. Science. 1998;282:938-941.

Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, et al. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E (LDL) receptors in the brain. J Biol Chem. 1987;262:14352-14360.

Poduslo JF, Curran GL, Berg CT. Macromolecular permeability across the blood-brain barriers. Proc Natl Acad Sci USA. 1994 ;91:5705-5709.

Poirier S, Mayer G, Benjannet S, et al. The proprotein convertase PCSK9 induces degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. J Biol Chem. 2008;283:2363-2372.

Poirier S, Prat A, Marcinkiewicz E, et al. Implication of the convertase NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system. J. Neurochem. 2006;98:838-850.

Postmus I, Trompet S, de Craen AJ, et al. PCSK9 SNP rs11591147 is associated with low cholesterol levels but not with cognitive performance or noncardiovascular clinical events in an elderly population. J Lipid Res. 2013;54:561-566.

Pour P, Kmoch N, Greiser E, Mohr U, Althoff J, Cardesa A. Spontaneous tumors and common diseases in two colonies of Syrian hamsters. I. Incidence and sites. J Natl Cancer Inst 1976a;56:931-935.

Pour P, Mohr U, Althoff J, Cardesa A, Kmoch N. Spontaneous tumors and common diseases in two colonies of Syrian hamsters. III. Urogenital system and endocrine glands J Natl Cancer Inst 1976b;56:949-961.

Pour P, Mohr U, Althoff J, Cardesa A, Kmoch N. Spontaneous tumors and common diseases in two colonies of Syrian hamsters. IV. Vascular and lymphatic systems and lesions of other sites J Natl Cancer Inst, 1976c;56:963-973.

Pour P, Mohr U, Cardesa A, Althoff J, Kmoch N (1976d) Spontaneous tumors and common diseases in two colonies of Syrian hamsters.. II. Respiratory tract and digestive system J Natl Cancer Inst 1976d;56:937-948.

Raal F, Scott R, Somaratne R, et al. Low-density lipoprotein cholesterol-lowering effects of AMG 145, a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia: the Reduction of LDL-C with PCSK9 Inhibition in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia Disorder (RUTHERFORD) randomized trial. Circulation. 2012;126:2408-2417.

Rajpathak SN, Kumbhani DJ, Crandall J, et al. Statin therapy and risk of developing type 2 diabetes: a meta-analysis. Diabetes Care. 2009;32:1924-1929.

Ramanathan A, Gusarova V, Kyratsous C. Role of alirocumab (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 antibody) on CD81 levels and hepatitis C virus entry into hepatocytes. [abstract] American Heart Association 2013; Abstract 12052.

Rashid S, Curtis DE, Garuti R, et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:5374-5379.

Reddy SS, Connor TE, Weeber EJ, Rebeck W. Similarities and differences in structure, expression, and functions of VLDLR and ApoER2. Mol Neurodegener. 2011;6:30.

Reynolds CA, Hong MG, Eriksson UK, et al. Analysis of lipid pathway genes indicates association of sequence variation near SREBF1/TOM1L2/ATPAF2 with dementia risk. Hum Mol Genet. 2010;19:2068-2078.

Rhinn H, Fujita R, Qiang L, et al. Integrative genomics identifies APOE e4 effectors in alzheimer's disease. Nature. 2013;500:45-50.

Richardson K, Schoen M, French B, et al. Statins and cognitive function: a systematic review. Ann Intern Med. 2013;159:688-697.

Robinson JG, Smith B, Maheshwari N, Schrott H. Pleiotropic effects of statins: benefit beyond cholesterol reduction? A meta-regression analysis. J Am Coll Cardiol. 2005;46:1855-1862.

Rojas-Fernandez CH, Goldstein LB, Levey AI, et al. An assessment by the Statin Cognitive Safety Task Force: 2014 update. J Clin Lipidol. 2014;8:S5-S16.

Rosenson RS, Baker SK, Jacobson TA, et al. An assessment by the Statin Muscle Safety Task Force: 2014 update. J Clin Lipidol. 2014;8:S58-S71.

Roubtsova A, Munkonda MN, Awan Z, et al. Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDLR protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31:785-791.

Rousselet E, Marcinkiewicz J, Kriz J, et al. PCSK9 reduces the protein levels of the LDL receptor in mouse brain during development and after ischemic stroke. J Lipid Res. 2011;52:1383-1391.

Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. Annu Rev Biochem. 2003;72:137-174.

Saher G, Simons M. Cholesterol and myelin biogenesis. In: J.R. Harris (ed.), Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins Subcellular Biochemistry. Springer Science+Business Media B.V. 2010;51:489-508. DOI 10.1007/978-90-481-8622-8_18.

Sampson UK, Linton MF, Fazio S. Are statins diabetogenic? Curr Opin Cardiol. 2011;26:342-347.

Sattar N, Preiss D, Murray HM, et al. Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomized statin trials. Lancet. 2010;375:735-742.

Sattar N, Taskinen MR. Statins are diabetogenic – myth or reality? Atheroscler Suppl. 2012;13:1-10.

Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. EMBO J. 2002;21:5017-5025.

Schaefer WH, Lawrence JW, Loughlin AF, et al. Evaluation of ubiquinone concentration and mitochondrial function relative to cerivastatin-induced skeletal myopathy in rats. Toxicol Appl Pharmacol. 2004;194:10-23.

Schmidt RJ, Beyer TP, Bensch WR, et al. Secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces both hepatic and extrahepatic low-density lipoprotein receptors in vivo. Biochem Biophys Res Commun. 2008;370:634-640.

Schmitt C, Kuhn B, Zhang X, Kivitz AJ, Grange S.Disease-drug-drug interaction involving tocilizumab and simvastatin in patients with rheumatoid arthritis. Clin Pharmacol Therap 2011;89:735-740.

Seidah NG, Awan Z, Chrétien M, Mbikay M. PCSK9: A key modulator of cardiovascular health. Circ Res. 2014;114:1022-1036.

Seidah NG, Poirier S, Denis M, et al. Annexin A2 is a natural extrahepatic inhibitor of the PCSK9-induced LDL receptor degradation. PLoS One. 2012;7:e41865.

Seidah NG, Prat A. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. Nat Rev Drug Discov. 2012;11:367-383.

Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:928-933.

Sellers R, Morton D, Michael B, et al. Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. Toxicol Pathol. 2007;35:751-755.

Sestak K, Merritt CK, Borda J, et al. Infectious agent and immune response characteristics of chronic enterocolitis in captive rhesus macaques. Infect Immun. 2003;71:4079-4086.

Shan L, Pang L, Zhang R, et al. PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. Biochem Biophys Res Commun. 2008;375:69-73.

Sharotri V, Collier DM, Olson DR, et al. Regulation of epithelial sodium channel trafficking by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). J Biol Chem. 2012;287:19266-19274.

Smith ME. The turnover of myelin in the adult rat. Biochim Biophys Acta. 1968;164:285-293.

Spoor MS, Radi ZA, Dunstan RW. Characterization of age- and gender-related changes in the spleen and thymus from control cynomolgus macaques used in toxicity studies. Toxicol Pathol. 2008;36:695-704.

Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). JAMA. 1986;256:2823-2828.

Statistics Canada. Canadian Health Measures Survey, 2009 to 2011. 13 February 2013 version. Available at: http://www.statcan.gc.ca/pub/82-625-x/2012001/article/11732- eng.htm.

Statistics Canada. Ten leading causes of death by selected age groups, by sex, Canada — All ages – 2009. 25 July 2012 version. Available at: http://www.statcan.gc.ca/pub/84- 215-x/2012001/tbl/t001-eng.htm.

Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, et al. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:3369-3374.

Stein EA, Honarpour N, Wasserman SM, et al. Effect of the proprotein convertase subtilisin/kexin 9 monoclonal antibody, AMG 145, in homozygous familial hypercholesterolemia. Circulation. 2013;128:2113-2120.

Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, et al. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:8098-8102.

Swiger KJ, Manalac RJ, Blumenthal RS, et al. Statins and cognition: a systematic review and meta-analysis of short- and long-term cognitive effects. Mayo Clin Proc. 2013;88:1213-1221.

Syed GH, Tang H, Khan M, et al. Hepatitis C virus stimulates low-density lipoprotein receptor expression to facilitate viral propagation. J Virol. 2014;88:2519-2529.

Tabrizi M, Bornstein GG, Suria H. Biodistribution mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies in health and disease. AAPS J. 2010;12:33-43.

Taha DA, De Moor CH, Barrett DA, Gershkovich P. Translational insight in to statin-induced muscle toxicity: from cell culture to clinical studies. Transl Res. 2014; S1931-5244(14)00034-6. doi: 10.1016/j.trsl.2014.01.013.

Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease hypothesis: a genetic perspective. Cell. 2005;120:545-555.

Thiel MA, Coster DJ, Williams KA. The potential of antibody-based immunosuppressive agents for corneal transplantation. Immunol Cell Biol. 2003; 81:93-105.

Thompson PD, Parker B. Statins, exercise, and exercise training. J Am Coll Cardiol. 2013;62:715-716.

Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. JAMA. 2003;289:1681-1690.

Tolonen H, Keil U, Ferrario M, et al. Prevalence, awareness and treatment of hypercholesterolaemia in 32 populations: results from the WHO MONICA Project. Int J Epidemiol. 2005;34:181-192.

Tomkin GH, Owens D. The chylomicron: relationship to atherosclerosis. Int J Vasc Med. 2012;2012:784536.

Triguero D, Buciak JB, Yang J, Pardridge WM. Blood-brain barrier transport of cationized immunoglobulin G: enhanced delivery compared to native protein. Proc Natl Acad Sci USA. 1989; 86:4761-4765.

Trompet S, van Vliet P, de Craen AJ, et al. Pravastatin and cognitive function in the elderly. Results of the PROSPER study. J Neurol. 2010;257:85-90.

Unger RH. Lipotoxic diseases. Annu Rev Med. 2002;53:319-336.

Vaklavas C, Chatzizisis YS, Ziakas A, et al. Molecular basis of statin-associated myopathy. Atherosclerosis. 2009;202:18-28.

Van de Perre P. Transfer of antibody via mother's milk. Vaccine. 2003;21:3374-3376.

Vargas HM, Bass AS, Breidenbach A, et al. Scientific review and recommendations on preclinical cardiovascular safety evaluation of biologics. J Pharmacol Toxicol Methods. 2008;58:72-76.

Vassar R. BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. J Mol Neurosci. 2004;23:105-114.

Vere CC, Streba CT, Streba L, Rogoveanu I. Lipid serum profile in patients with viral liver cirrhosis. Med Princ Pract. 2012;21:566-568.

Vergeer M, Korporaal SJ, Franssen R, et al. Genetic variant of the scavenger receptor B1 in humans. N Engl J Med. 2011;364:136-145.

Wagstaff LR, Mitton MW, Arvik BM, Doraiswamy PM. Statin-associated memory loss: analysis of 60 case reports and review of the literature. Pharmacotherapy. 2003;23:871-880.

Waldmann TA, Strober W. Metabolism of immunoglobulins. Prog Allergy. 1969;13:1-110.

Weinbauer GF, Luft J, Fuchs A. The enhanced pre- and postnatal development study for monoclonal antibodies. Methods Mol Biol. 2013;947:185-200.

Weinbauer GF, Chellman GJ, Rasmussen AD, Vogelwedde E. Use of primate pediatric model. In Hoberman AM and Lewis EM, ed. Pediatric Non-Clinical Drug Testing. Principles, Requirements and Practices. John Wiley & Sons, Inc. 2012; Ch13:255-279.

Westwood FR, Scott RC, Marsden AM, et al. Rosuvastatin: characterization of induced myopathy in the rat. Toxicol Pathol. 2008;36:345-352.

Westwood FR, Bigley A, Randall K, et al. Statin-induced muscle necrosis in the rat: distribution, development, and fiber selectivity. Toxicol Pathol. 2005;33:246-257.

WHO. Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2010. Chapter 1. Burden: mortality, morbidity, and risk factors. Geneva, Switzerland: WHO; 2011a.

WHO. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Cardiovascular Diseases (CVD). Fact Sheet Number 317. Geneva, World Health Organization, 2011b.

Woollett LA. Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation. Am J Clin Nutr. 2005;82:1155-1161.

Wu JE, Basso F, Shamburek RD, et al. Hepatic ABCG5 and ABCG8 overexpression increases hepatobiliary sterol transport but does not alter aortic atherosclerosis in transgenic mice. J Biol Chem. 2004;279:22913-22925.

Yu JT, Tan L, Hardy J. Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease: An update. Annu Rev Neurosci. 2014; DOI: 10.1146/annurev-neuro-071013-014300

Yu YJ, Watts RJ. Developing therapeutic antibodies for neurodegenerative disease. Neurotherapeutics. 2013;10:459-472.

Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): Hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. Hepatology. 2008;48:646-654.

Zamrini E, McGwin G, Roseman JM. Association between statin use and Alzheimer's disease. Neuroepidemiology. 2004;23:94-98.

Zandi PP, Sparks DL, Khachaturian AS, et al. Do statins reduce risk of incident dementia and Alzheimer disease? The Cache County Study. Arch Gen Psychiatry. 2005;62:217-224.

Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, et al. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. J Biol Chem. 2007;282:18602-18612.

Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, et al. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. Am J Hum Genet. 2006;79:514-523.

Zhong Z, Ewers M, Teipel S, et al. Levels of beta-secretase (BACE1) in cerebrospinal fluid as a predictor of risk in mild cognitive impairment. Arch Gen Psychiatry. 2007;64:718-726.

Zhou B, Teramukai S, Fukushima M. Prevention and treatment of dementia or Alzheimer's disease by statins: a meta-analysis. Dement Geriatr Cogn Disord. 2007;23:194-201.

Zhou H, Davis HM. Risk-based strategy for the assessment of pharmacokinetic drug–drug interactions for therapeutic monoclonal antibodies. Drug Disc Today 2009;14:891-898.

Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. Neuron. 2008;57:178-201.