サノフィ株式会社

モゾビル皮下注 24 mg

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.1 緒言

Total number of pages: 7

目　　次

1　　化学情報 4

2　　薬理学的分類 5

3　　臨床使用 6

4　　非臨床試験 6

参 考 文 献 7

表　目　次

表 1 - Plerixafor の代替形態 5

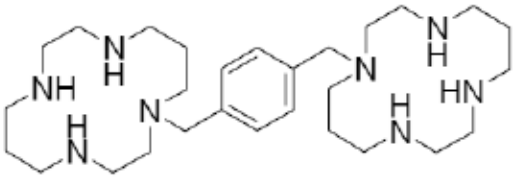
図　目　次

図 1 - Plerixafor の構造 4

1　化学情報

Plerixafor（プレリキサホル、AMD3100、GZ316455）は、図 1 に示すように、2 つの 1,4,8,11-テトラアザシクロテトラデカン（シクラム）環が 1,4-フェニレンビス（メチレン）部分に結合している。物理的性質として、plerixafor は白色～灰白色の固体である。Plerixafor は、水溶性で、pH を 1～10 の間に調整した場合には 80 mg/mL を超える濃度まで溶解する。

図 1 - Plerixafor の構造



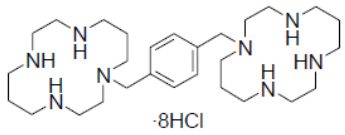
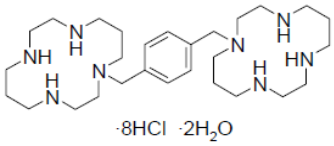
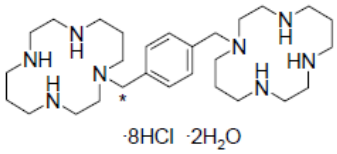
分子量 = 502.78 g/mol
分子式 = $C_{28}H_{54}N_8$

Plerixafor 注射液は無色澄明～淡黄色の保存剤を含まない皮下注射用の等張無菌溶液である。単回使用の 2 mL ガラス製バイアルに、plerixafor 24.0 mg 及び塩化ナトリウム 5.9 mg を含有する注射用水 1.2 mL（pH 6.0～7.5：必要に応じて塩酸及び水酸化ナトリウムによりに調整）が充填されている。

非臨床試験では plerixafor の代替形態も使用している。初期の毒性試験は、八塩酸塩又は plerixafor 八塩酸塩二水和物を用いて実施した。吸収、分布、代謝及び排泄試験の一部には、放射能標識 ^{14}C-plerixafor 八塩酸塩二水和物を使用した。これらの構造を表 1 に示す。水溶液の pH を中性に調整すると、plerixafor 遊離塩基及び plerixafor 八塩酸塩はいずれも部分的にプロトン化されて+4 状態になるため、得られる溶液の化学組成は同一である。2.6 項 非臨床試験の概要文及び概要表を通して、これらの代替形態のいずれかを用いた場合の用量は遊離塩基等量で表す。換算係数（遊離塩基 1 mg を含有する代替形態の質量）を表 1 に示す。

開発中に使用された plerixafor の別名は、AMD3100、[redacted] SID 791、SID-791 及び [redacted] 282-791 である。予定されている本製剤の商品名はモゾビル皮下注 24mg である。

表 1 - Plerixafor の代替形態

	Plerixafor 八塩酸塩	**Plerixafor 八塩酸塩二水和物**	**放射能標識 ^{14}C-plerixafor 八塩酸塩二水和物**
構造	 ·8HCl	 ·8HCl ·2H$_2$O	 ·8HCl ·2H$_2$O * = ^{14}C 標識位置
分子式	$C_{28}H_{54}N_8$ •8HCl	$C_{28}H_{54}N_8$ •8HCl•2H$_2$O	C_{27} ^{14}C $H_{54}N_8$ •8HCl •2H$_2$O
分子量 (g/mol)	794.48	830.51	832.51
換算係数 (1 mg 遊離塩基 = X mg)	1.58	1.65	1.65[a]

[a] 放射能標識体を非標識体で希釈して使用するため、有効換算係数は 1.65 である。

2 薬理学的分類

Plerixafor は、ファースト・イン・クラスのケモカイン受容体 CXCR4 の低分子アンタゴニストであり、その特異的ペプチドリガンドであるストローマ細胞由来因子-1α（SDF-1α、別名 CXCL12）の結合及びシグナル伝達を阻害する。SDF-1 及び 7 回膜貫通型 G タンパク質共役型細胞受容体である CXCR4 は、造血カスケードに大きく関与しており(1)、CD34 陽性造血幹細胞（HSC）の局在化及びホーミング(2)、並びに動員(3),(4)の重要なメディエーターであることが報告されている。SDF-1 は骨髄のストローマ細胞により産生される。HSC（CD34 陽性細胞であることが確認されている）などの CXCR4 を発現している細胞は高濃度の SDF-1 にホーミングするため、骨髄中に集められる。

多数の in vitro 薬理試験（[Module 2.6.2 の 2.1 項]）において、plerixafor が CXCR4 受容体の強力かつ選択的なアンタゴニストであることが示された。In vivo では、ヒト及び動物に plerixafor を単回皮下投与したとき、末梢循環血中の多能性 HSC 及び成熟白血球のレベルが一過性に増加した。本作用（「動員」）は、SDF-1/CXCR4 axis に対するアンタゴニスト作用に起因している。

3　臨床使用

リンパ腫及び骨髄腫といった悪性腫瘍の治療のため、大量化学療法後に HSC 移植を行う場合、HSC の採取が必要である。リンパ腫及び骨髄腫患者に plerixafor 注射液を 240 μg/kg の用量で皮下投与すると、投与 6～12 時間後に末梢血中 HSC が増加し、アフェレーシスによる HSC の採取が容易になる。これまでに実施された臨床試験によると、plerixafor を増殖因子の顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）と併用すると、骨髄中 HSC 数が増加し、末梢血中に放出される HSC 数が更に増加する。

4　非臨床試験

Plerixafor の非臨床試験により、主要な薬理作用である HSC 動員の基本的な機序が解明され、動員された細胞は長期自己複製能を有することが明らかとなった。ヒトでの安全な使用に問題となる有害な薬力学的作用が引き起こされる可能性は、一連の安全性薬理試験、並びにラット及びイヌを用いた最長 28 日間の反復投与毒性試験を含む毒性試験により評価した。Plerixafor の薬物動態は、マウス、ラット及びイヌで評価した。

Plerixafor を薬理学的用量及び使用条件で妊娠期に投与した場合、発生中の胎児に対し潜在的リスクが存在する。薬理学的用量で推奨される使用条件下において使用した場合には、CXCR4 細胞の動員及びそれらの細胞の意図しない組織部位への移動に伴うリスクは低いと考えられる。薬理学的用量がみられる用量で短期間投与した場合には、plerixafor による重度の神経筋関連の徴候、頻脈及び呼吸抑制のリスクは低いと考えられるが、薬理学的用量を上回る用量を投与した場合には、plerixafor の主要な毒性所見として重度の神経筋関連の徴候が出現する。Plerixafor は組織内に長期間滞留するが、これらの組織に病理組織学的障害を引き起こすリスクは低いと考えられる。

Plerixafor の非臨床安全性評価から得られた結果を総合すると、発生中の胎児が曝露される場合を除き、ヒトにおいて安全に使用できるものと考えられる。

参 考 文 献

1. Nagasawa T, Tachibana K, Kishimoto T. A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection. Semin Immunol. 1998;10:179-85.
2. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. Science. 1999;283:845-8.
3. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. Exp Hematol. 2002;30:973-81.
4. Sweeney EA, Lortat-Jacob H, Priestley GV, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells. Blood. 2002;99:44-51.

サノフィ株式会社

モゾビル皮下注 24 mg

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.2 薬理試験の概要文

Total number of pages: 88

目　　次

略号と用語の定義 7

1　まとめ 9

1.1　CXCR4 及び幹細胞動員の概要 9

1.2　薬理試験概要 11

1.2.1　効力を裏付ける試験 11

1.2.2　副次的薬理試験 12

1.2.3　安全性薬理試験 12

2　効力を裏付ける試験 15

2.1　In vitro 薬理 16

2.1.1　序文 16

2.1.2　G タンパク質共役型ケモカイン受容体 CXCR4 の特異的アンタゴニスト plerixafor の分子薬理学的特性 17

2.1.3　Plerixafor によるケモカイン受容体阻害作用の CXCR4 選択性 19

2.1.4　シクラム環を 1 つ又は 2 つ有する非ペプチド性アンタゴニストとケモカイン受容体 CXCR4 との分子間相互作用 21

2.1.5　ケモカイン受容体 CXCR4 の Asp171 及び Asp262 変異によるヒト免疫不全ウイルス-1 侵入のための CXCR4 の共受容体機能の低下及び plerixafor のアンタゴニスト作用の減弱 21

2.1.6　Plerixafor の CXCR4 受容体アンタゴニスト作用の分子メカニズム： CXCR3 受容体への結合部位の導入 22

2.2　In vivo 薬理 23

2.2.1　序文 23

2.2.2 Plerixafor の構造アナログの in vitro における SDF-1 の CXCR4 への結合阻害作用による in vivo における骨髄からの前駆細胞の動員 23

2.2.3 CXCR4 アンタゴニスト plerixafor によるマウス及びヒト造血幹細胞及び前駆細胞の速やかな動員 24

2.2.3.1 Plerixafor により誘発した C3H/HeJ マウス血中への骨髄 HPC の動員 24

2.2.3.2 種々のマウス系統における plerixafor、G-CSF、並びに plerixafor+G-CSF による骨髄 HPC 動員の比較試験 26

2.2.3.3 Plerixafor、G-CSF 及び plerixafor+G-CSF によるマウス HSC 動員の評価 28

2.2.3.4 NOD/SCID マウスにおける plerixafor 動員ヒト HSC の自己複製 29

2.2.3.5 Plerixafor、G-CSF 及び plerixafor+G-CSF で動員されたヒト CD34 陽性細胞の表現型の特性検討 30

2.2.4 イヌ自家移植モデルにおける plerixafor の造血幹細胞動員作用 32

2.2.5 イヌ同種移植モデルにおける plerixafor の造血幹細胞動員作用 34

2.2.6 非ヒト霊長類における plerixafor により動員された造血幹細胞の特性及び長期自己複製能 36

2.2.7 造血幹細胞移植の前処置レジメンとしての動員 37

3 副次的薬理試験 39

3.1 序文 39

3.2 Plerixafor の抗 HIV ウイルス活性 42

3.3 Plerixafor による心筋の血管新生部位への血管内皮前駆細胞の動員 43

3.4 ブタ心筋梗塞モデルにおける plerixafor の影響 44

3.5 サルにおける plerixafor の心筋梗塞後の幹細胞動員及びリモデリング、心機能改善への影響 45

3.6 糖尿病マウスにおける後肢虚血誘発後の plerixafor による後肢への血流の回復 46

3.7 急性後肢虚血マウスにおける plerixafor による血流改善 47

3.8 アレルギー性肺炎症マウスにおける plerixafor による炎症及び気道反応性亢進の軽減 47

3.9 IFN-γ 受容体ノックアウトマウスにおける plerixafor による自己免疫性関節炎症の軽減 48

3.10 コラーゲン誘発関節炎マウスにおける plerixafor による炎症の軽減 49

3.11 Plerixafor の腫瘍細胞に対する in vitro 活性 49

3.12 リンパ腫モデルにおける plerixafor の in vitro 及び in vivo 活性 50

3.13 マウスにおける plerixafor の急性リンパ性白血病細胞の動員及び生着への影響 51

3.14 マウスにおける plerixafor の急性前骨髄球細胞の動員及び化学療法感受性への影響 51

3.15 マウスにおける plerixafor の原発性脳腫瘍の頭蓋内増殖への影響 52

4 安全性薬理試験 53

4.1 中枢神経系 56

4.1.1 In vitro 試験 56

4.1.2 In vivo 試験：Irwin 試験（Primary Observation Test） 56

4.1.2.1 マウスを用いた中枢神経系安全性薬理試験（Irwin 試験） 56

4.1.2.2 ラットを用いた中枢神経系安全性薬理試験（Irwin 試験）（1） 57

4.1.2.3 ラットを用いた中枢神経系安全性薬理試験（Irwin 試験）（2） 57

4.2 呼吸系 58

4.2.1 無麻酔ラットの呼吸数及び 1 回換気量に対する plerixafor の影響 58

4.3 心血管系 59

4.3.1 In vitro 心血管系安全性薬理試験 59

4.3.1.1 hERG チャネル活性への影響 59

4.3.1.2 受容体相互作用試験 60

4.3.2 In vivo 心血管系安全性薬理試験 60

4.3.2.1 麻酔ラットにおける心血管系への影響 60

4.3.2.2 イヌを用いた心血管系安全性薬理予備試験 61

4.3.2.3 イヌを用いた心血管系安全性薬理主試験 62

4.4 追加の安全性薬理試験 64

4.4.1 大動脈平滑筋細胞への影響 64

4.4.2 内分泌機能への影響 64

4.4.3 In vitro における受容体スクリーニング及び相互作用試験 65
4.4.3.1 全般的及び特定の受容体スクリーニング（CXCR4 以外の受容体） 65

5 薬力学的薬物相互作用試験 72

6 考察及び結論 73

6.1 効力を裏付ける試験 73

6.2 副次的薬理試験 75

6.3 安全性薬理試験 76

6.4 結論 79

7 図表 80

参 考 文 献 81

表　目　次

表 1 - 効力を裏付ける試験の一覧 15

表 2 - Plerixafor による SDF-1/CXCR4 相互作用の阻害 19

表 3 - カルシウム流入実験における plerixafor の CXCR4 選択的アンタゴニスト作用 20

表 4 - Plerixafor により動員された細胞を同種移植したイヌの剖検時における骨髄評価 35

表 5 - 副次的薬理試験の一覧 40

表 6 - 安全性薬理試験の一覧 54

表 7 - SpectrumScreen でみられた plerixafor の有意な受容体結合（50%以上）の要約 71

表 8 - Plerixafor の結合によるアゴニスト又はアンタゴニスト活性を評価した機能アッセイの要約 71

図　目　次

図 1 - Plerixafor の構造式 9

図 2 - Plerixafor の作用機序 10

図 3 - Plerixafor による C3H/HeJ マウス血中への HPC（CFU-GM、BFU-E 及び CFU-GEMM）動員作用の経時変化及び用量反応性 26

図 4 - Plerixafor による G-CSF で誘発された動員の増強 28

図 5 - Plerixafor により動員された細胞をイヌに自家移植したときの好中球の生着 34

図 6 - Plerixafor により動員された細胞をイヌに自家移植したときの血小板の生着 34

略号と用語の定義

5-HT	5-Hydroxytryptamine（5-ヒドロキシトリプタミン）
ACE	Angiotensin converting enzyme（アンジオテンシン変換酵素）
ALL	Acute lymphoblastic leukaemia（急性リンパ性白血病）
AM	Acetoxymethyl（アセトキシメチル）
AML	Acute myeloid leukaemia（急性骨髄性白血病）
APC	Allophycocyanin（アロフィコシアニン）
APL	Acute promyelocytic leukaemia（急性前骨髄球性白血病）
BFU-E	Burst forming units-erythroid（赤芽球バースト形成細胞）
CFU-GEMM	Colony forming units-granulocyte, erythroid, megakaryocyte, macrophage（顆粒球・赤芽球・巨核球・マクロファージコロニー形成細胞）
CFU-GM	Colony forming units-granulocyte macrophage（顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞）
CLL	Chronic lymphocytic leukaemia（慢性リンパ性白血病）
DLA	Dog leukocyte antigen（イヌ白血球抗原）
DTH	Delayed type hypersensitivity（遅発性過敏症）
ECG	Electrocardiogram（心電図）
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay（酵素結合免疫吸着測定法）
EPC	Endothelial progenitor cells（血管内皮前駆細胞）
FACS	Fluorescence-activated cell sorting（蛍光活性化細胞選別法）
FITC	Fluorescein isothiocyanate（フルオレセインイソチオシアネート）
FLIPR	Fluorimetric imaging plate reader（蛍光イメージングプレートリーダー）
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor（顆粒球コロニー刺激因子）
GDP	Guanosine diphosphate（グアノシンニリン酸）
GH	Growth hormone（成長ホルモン）
GLP	Good Laboratory Practice（医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準）
GPCR	G-protein coupled receptor（G タンパク質共役型受容体）
GTP	Guanosine triphosphate（グアノシン三リン酸）
hERG	Human ether-a-go-go related gene（ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子）
HIV	Human immunodeficiency virus（ヒト免疫不全ウイルス）

HPC	Haematopoietic progenitor cells（造血前駆細胞）
HSC	Haematopoietic stem cells（造血幹細胞）
IC50	Half maximal (50%) inhibitory concentration（50%阻害濃度）
IFN-γ	Interferon gamma（インターフェロン γ）
LDMC	Low density mononuclear cells（低比重単核細胞）
LH	Luteinizing hormone（黄体形成ホルモン）
LTR	Long-term repopulating（長期自己複製）
mAChR	Muscarinic acetylcholine receptor（ムスカリン性アセチルコリン受容体）
MI	Myocardial infarction（心筋梗塞）
MMP-9	Matrix metallopeptidase 9
MRI	Mangetic resonance imaging（磁気共鳴画像法）
NHL	Non-Hodgkin's lymphoma（非ホジキンリンパ腫）
NOD/SCID	Non-obese diabetic severe combined immunodeficiency disease（非肥満糖尿病／重症複合免疫不全）
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell（末梢血単核球）
PCR	Polymerase chain reaction（ポリメラーゼ連鎖反応）
PE	Phycoerythrin（フィコエリトリン）
PLT	Platelet（血小板）
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1（ストローマ細胞由来因子-1）
SRC	SCID repopulating cells（SCID マウス再構築細胞）
TM	Transmembrane domain（膜貫通ドメイン）
TNC	Total nucleated cell count（総有核細胞数）
WBC	White blood cell（白血球）
WT	Wild type（野生型）

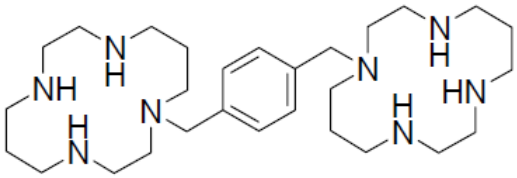
1　まとめ

1.1　CXCR4 及び幹細胞動員の概要

Plerixafor（プレリキサホル、AMD3100、GZ316455）はファースト・イン・クラスの CXCR4 ケモカイン受容体の低分子拮抗薬であり、その特異的ペプチドリガンドであるストローマ細胞由来因子-1α（SDF-1α）の結合及びシグナル伝達を阻害する。

Plerixafor の構造を図 1 に示す。

図 1 - Plerixafor の構造式



（分子式）$C_{28}H_{54}N_8$　　（分子量）502.78

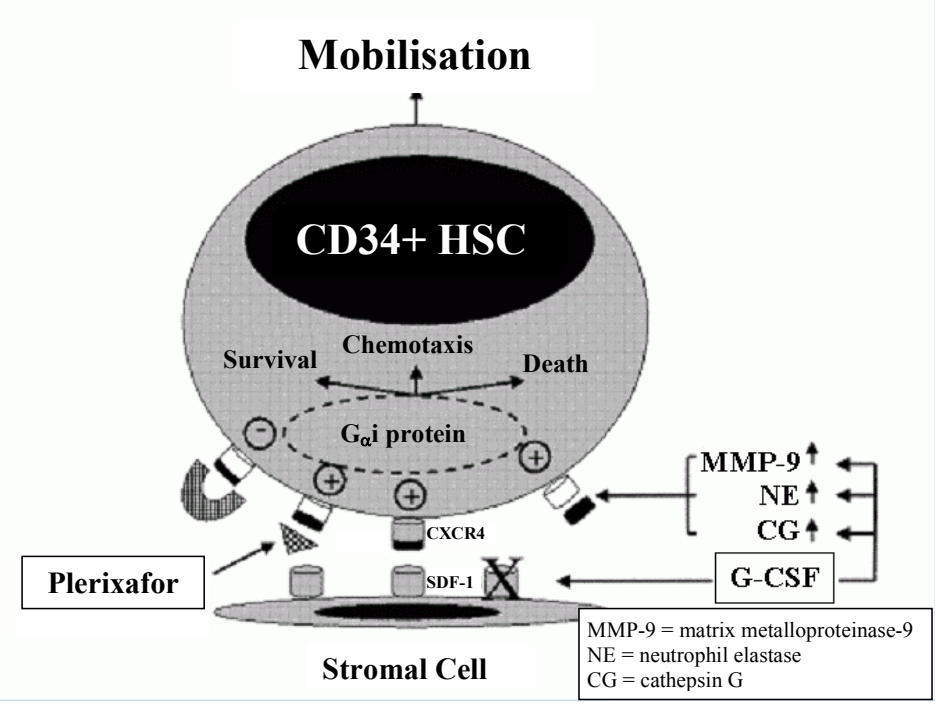
ケモカインは、リンパ球の動員、ホーミング及び発生に関与している。CXCR4 を発現している細胞は SDF-1（別名 CXCL12）の濃度勾配に応じて動員される。リガンドの SDF-1 及び受容体の CXCR4 は、いずれも広範囲の組織に発現している(1)。CXCR4 は、CD34 陽性前駆細胞、T リンパ球、B リンパ球、単球及びマクロファージ、好中球及び好酸球などの細胞上に広く発現している (2),(3),(4)。最近、SDF-1 のアイソフォームが数種類同定された。これらのアイソフォームは C 末端が異なっているが、類似した細胞遊走作用を示す(5)。重要なこととして、優勢なアイソフォームである SDF-1α は骨髄に発現しており、骨髄への造血幹細胞（HSC）のホーミング及び保持に必要である。Plerixafor の in vitro 試験に使用したアイソフォームはすべて SDF-1α である。

SDF-1/CXCR4 は、B 細胞及び T 細胞の活性化、造血、並びに体内の骨髄などの部位へのリンパ球の動員及びホーミングに関与している。さらに、SDF-1 又は CXCR4 のいずれかの遺伝子をノックアウトし、新生児の発達を検討した試験において、SDF-1/CXCR4 axis の重要な生理的役割が明らかになった(4),(6),(7),(8),(9),(10)。CXCR4 及び SDF-1 のノックアウトマウスでは、いずれも造血、血管新生及び小脳発達に障害がみられる。胎児の主要な造血器官である肝臓では、プロ B 細胞数及びプレ B 細胞数の重度の減少に伴い、B 細胞産生の抑制が認められる。骨髄造血の抑制も認められ、この主な原因と

して、胎児の肝臓から骨髄への前駆細胞の遊走の抑制が挙げられる。CXCR4 の発現は炎症性疾患などのいくつかの疾患に関連しており(11),(12)、CXCR4 は、ヒト免疫不全ウイルス-1（HIV-1）分離株の T 細胞への感染に適応させた際の感染における宿主細胞上の主要な共受容体である(3),(13)。

幹細胞動員及びその逆の現象であるホーミングのメカニズムには、接着分子、プロテアーゼ、ケモカイン、サイトカイン及び増殖因子といった多くの相互作用因子が関与している（図 2）(14),(15)。HSC は、CXCR4 を発現しており、骨髄ストローマ細胞による SDF-1 産生に応じて骨髄へのホーミング及び保持が引き起こされる。SDF-1 は接着分子の発現も媒介し、CXCR4 の発現は増殖因子及びプロテアーゼにより媒介される。顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF；骨髄中で幹細胞の産生を刺激する内因性タンパク質の増殖因子）による幹細胞の動員は、セリンプロテアーゼレベルの増加、タンパク質分解による接着分子の切断及び CXCR4 発現の低下と関連している。したがって、SDF-1 と CXCR4 との相互作用は、骨髄における HSC のホーミング及び保持を決定する重要な要素である(16),(17),(18),(19),(20),(21)。選択的 CXCR4 アンタゴニストである plerixafor により幹細胞が動員されることは、幹細胞のホーミングにおける SDF-1/CXCR4 の役割を更に裏付けている。Plerixafor により SDF-1/CXCR4 の相互作用が阻害されると、骨髄から末梢循環血中へ HSC が放出される。

図 2 - Plerixafor の作用機序



1.2　薬理試験概要

効力を裏付ける試験では、ケモカイン受容体 CXCR4 に対する plerixafor の活性を評価し、in vivo での HSC 動員における本薬の薬理作用の基本的な機序を明らかにした。マウス、イヌ及びサルを用いて、plerixafor の薬理作用及び本薬により動員された細胞の機能的な骨髄再構築能の評価を行った。副次的薬理試験では、他の疾患に対する薬物標的としての CXCR4 の有用性を検討した。

1.2.1　効力を裏付ける試験

一連の in vitro 試験により、ヒト CXCR4 受容体での plerixafor の活性が示された。内因性に CXCR4 を発現する CCRF-CEM 細胞を用いた試験では、plerixafor により SDF-1 リガンドの CXCR4 への結合、SDF-1 介在性カルシウム流入、G タンパク質の活性化及び走化性が強力（ナノモルレベル）に阻害された。一連のケモカイン受容体（CXCR1、CXCR2、CXCR3、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9）について、それらの受容体を天然に発現している細胞又は遺伝子組換え受容体を発現している遺伝子導入細胞株でリガンドに誘発されるカルシウム流入又はリガンド結合が plerixafor では阻害されなかったことから、受容体選択性が確認された。

受容体部位特異的突然変異誘発試験により、plerixafor とケモカイン受容体 CXCR4 との分子間相互作用を検討した。その結果、plerixafor が抗 CXCR4 抗体 ^{125}I-12G5 及び SDF-1 の結合を阻害するには、Asp171 及び Asp262 が必須であることが確認された。

Plerixafor が骨髄から血中に造血前駆細胞（HPC）及び HSC を動員することがマウスで証明された。Plerixafor を単回皮下投与したところ、HPC の骨髄からの速やかで用量依存的な動員が誘導され、投与 1 時間後には動員のピークに達した。Plerixafor を連日反復投与（3 日間）したところ、各投与後に一貫した HPC 動員が得られ、反復投与に伴う感受性の減弱は認められなかった。G-CSF による HPC 動員が弱い系統においても、plerixafor は強力な HPC 動員促進剤であることが示された。また、G-CSF に誘導される動員が plerixafor により増強することも示された。マウスの大腿骨の骨髄を in situ で直接 plerixafor により灌流し、灌流液中の HSC 及び HPC を測定した試験から、plerixafor の作用部位は骨髄であることが確認された。

骨髄を破壊した非肥満糖尿病／重症複合免疫不全（NOD/SCID）マウスの骨髄再構築アッセイにより、plerixafor、G-CSF 及び plerixafor+G-CSF により動員されたマウス低比重単核細胞（LDMC）及びヒト CD34 陽性細胞の自己複製能が確認された。これらの試験では、マウス LDMC 移植 6 ヵ月後及びヒト CD34 陽性細胞移植 8 週後にレシピエントマウス骨髄へのドナー細胞の生着（キメリズム）が認められた。

骨髄を破壊したイヌ及びサルのモデルにおいて、plerixafor は、自家及び同種移植後、早期かつ長期にわたって生着し骨髄を再構築する CD34 陽性幹細胞を動員することが示された。イヌでは、骨髄生

着（循環血中好中球数及び血小板数の回復により測定）が自家移植及び同種移植後 8～26 日の間に認められた。サルでは、早期の骨髄生着（循環血液細胞の遺伝子マーキングにより測定）が 7～14 日以内に確認され、遺伝子マーキングした骨髄性及びリンパ性細胞が、自家移植 32 ヵ月後まで長期間持続して認められた。

1.2.2 副次的薬理試験

CXCR4 阻害の影響を評価するため、多数の CXCR4 関連疾患モデルで副次的薬理試験を実施した。これらの試験には、1）CXCR4 を利用する T 細胞指向性 HIV 株に対する抗ウイルス活性、2）障害部位への多能性幹細胞の動員による組織修復の誘導、3）SDF-1 の走化性作用の阻害による抗炎症作用、4）抗腫瘍活性が含まれる。

心筋梗塞（MI）マウスモデルに plerixafor を単回皮下投与すると、血管内皮前駆細胞（EPC）の動員が増加することにより、MI 後の血管新生が促進され、心機能及び生存期間が改善した。ブタ及びサルの MI モデルでは改善がみられなかった。

2 種の後肢虚血マウスモデルに plerixafor を皮下投与するか、又は plerixafor で動員されたヒト CD34 陽性細胞を投与すると、レーザードップラー血流画像法で測定した血流の回復が加速した。

2 種のコラーゲン誘発関節リウマチマウスモデルに plerixafor をコラーゲン免疫前後の様々な時点から 14 日間にわたり持続皮下投与したところ、疾患重症度の低下が認められた。ゴキブリアレルゲン誘発喘息マウスモデルに plerixafor を 3 日間にわたり持続腹腔内投与したところ、気道反応性亢進及び気道抵抗が低減し、明らかな Th2 サイトカイン類（IL-4、IL-5）の減少及び Th1 サイトカイン類（IL-12、IFN-γ）の増加がみられた。Th1 サイトカイン類が増加したことから、免疫応答が Th2 から Th1 に移行したと考えられた。

様々な腫瘍モデルを用いて plerixafor の多数の試験を実施した。Plerixafor は、in vitro において、多くの腫瘍細胞株の SDF-1 に誘発された遊走を阻害し、抗増殖作用を有することが示された。また、plerixafor は、非ホジキンリンパ腫（NHL）、神経膠芽細胞腫、及び髄芽腫の in vivo モデルの腫瘍増殖を阻害することも示された。急性前骨髄球性白血病（APL）のトランスジェニックマウスモデルに plerixafor を投与すると、シタラビン（AraC）の抗腫瘍作用が増強した。

1.2.3 安全性薬理試験

Plerixafor と特定の器官系に悪影響を引き起こす可能性のある非ケモカイン受容体及び酵素との相互作用を in vitro 試験系で検討した。Plerixafor は、α アドレナリン受容体及びドパミン D_2 受容体において、低～中等度のリガンド結合阻害作用を示した（マイクロモルレベル）。Plerixafor は in vitro でア

ンジオテンシン変換酵素（ACE）を阻害し、その IC_{50} 値は 1.25 µg/mL（2.5 µmol/L）であった。ニューロペプチド Y Y_2 及び Y_3 受容体アッセイにおいて、明らかなアゴニスト活性（天然リガンドのニューロペプチド Y により誘発される最大反応の 50%を超える反応と定義する）が認められた。

さらに、in vitro での全般的な受容体活性スクリーニングを実施し、plerixafor の CXCR4 以外の受容体への結合及び酵素への作用を評価した。その結果、plerixafor は 5 µg/mL（10 µmol/L）の濃度で、N 型カルシウムチャネル、カリウム SK_{CA} チャネル、ヒスタミン H_3 受容体、ムスカリン性アセチルコリン受容体 M_1 及び M_2、アドレナリン受容体 α_{1B} 及び α_{2C}、ニューロペプチド Y Y_1 受容体、並びにグルタミン酸 NMDA ポリアミン受容体に中等度（リガンド結合阻害 50%超）又は強い（リガンド結合阻害 75%超）結合親和性を示した。本試験から得られた結果では、以前みられたドパミン D_2 受容体及びニューロペプチド Y Y_2 受容体（Y_3 受容体はスクリーニングに組み込まれていない）への plerixafor のリガンド結合は確認されず、アンジオテンシン AT_1 及び AT_2 受容体への結合親和性はごくわずかであった。スクリーニングで特定された受容体への plerixafor の結合の意義について更に検討するため、追加の機能アッセイを実施した。その結果、plerixafor はほとんどの受容体に対して結合によりアンタゴニスト作用を示し、アゴニスト作用はヒスタミン H_3 受容体（逆アゴニスト）及びニューロペプチド Y Y_1 受容体に対してのみ認められた。N 型カルシウムチャネルに対する作用を評価するパッチクランプアッセイにおいて、plerixafor は 15 µg/mL（30 µmol/L）の濃度で作用を示さなかった。

Plerixafor が中枢神経系の安全性に影響を及ぼす可能性について、マウス及びラットを用いた Primary Observation Test で評価した。ラット Irwin 試験において、plerixafor を 20 mg/kg の用量で投与したとき、刺激なしでは中枢神経系抑制物質様の影響（受動性、運動量の低下、無関心、警戒性低下、驚愕反応の低下、腹臥位など）、刺激ありでは中枢神経系刺激物質様の影響（呼吸数増加、恐怖心増加、攻撃性など）が誘発された。これらの影響は一過性で投与後 30 分～2 時間のみに認められた。マウス及び追加のラット試験においても同様の影響がみられた。

Plerixafor が呼吸系の安全性に影響を及ぼす可能性について、プレチスモグラフィーチャンバーに拘束した無麻酔雄 Sprague-Dawley ラットを用いて評価した。Plerixafor を 10 mg/kg の用量で皮下投与すると 1 回換気量の有意な減少が投与 30 分後に一過性にみられ、20 mg/kg では呼吸数の有意な減少が投与後 30 分及び 120 分に、1 回換気量の有意な減少が投与 30 分後のみに認められた。

Plerixafor がヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネル電流（I_{Kr}、心臓の急速活性型遅延整流カリウム電流）を阻害する可能性について、クローン化 hERG チャネルを発現しているヒト胎児腎由来細胞（HEK293）を用いて in vitro で検討した。Plerixafor は 50 µmol/L の濃度において、溶媒対照と比較して hERG チャネル電流の有意な阻害作用を示さなかった（$p > 0.05$）。

Plerixafor の心血管系への安全性について、麻酔ラットに plerixafor を 0、0.1、1.0 及び 10 mg/kg の漸増用量で各投与の間を 20 分間あけて持続静脈内投与（10 分間）、又は 0 及び 20 mg/kg の用量で皮下投与して検討した。動脈血圧、心筋収縮性、心拍数及び心拍出量の減少を特徴とする心抑制作用が 1 及び 10 mg/kg において用量依存的に認められた。10 mg/kg の静脈内投与により、5 匹のラットすべてが持続投与終了 2～5 分後の間に死亡した。心電図（ECG）において、血行動態悪化を引き起こすような所見はみられなかった。20 mg/kg の皮下投与により、血圧、心拍数、+dP/dt、-dP/dt 及び心拍出量の減少がみられ、ECG では P 波の平坦化又は陰性化がみられるか、又は P 波が検出不能であった。

また、2 群（n＝2/群）からなる無麻酔イヌに plerixafor を 8 時間持続静脈内投与して検討した。イヌに低投与速度（2.5 mg/kg/h で 1 時間投与後 1.67 mg/kg/h で 7 時間投与）で投与したとき、投与による一般状態の変化及びplerixaforに関連する心血管系への影響は認められなかった。高投与速度（5 mg/kg/h で 1 時間投与後 3.33 mg/kg/h で 7 時間投与）で投与したとき、重度の一般状態の変化がみられ、1 匹では持続静脈内投与を早期中止した。これらのイヌでみられた心血管系の変化は、2 匹両方における心拍数の増加、並びにより重篤な変化がみられた 1 匹における血圧の上昇及び持続投与を早期中止した 1 匹における肺動脈圧の一過性の上昇であった。2 匹ともに、plerixafor に関連した心拍出量、1 回拍出量及び末梢血管抵抗の変化は認められなかった。試験に用いたいずれのイヌにおいても、plerixafor による ECG 波形の変化はみられなかった。

2　効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験で plerixafor の薬理及び幹細胞動員メカニズムを検討した。In vitro 試験において、plerixafor が細胞受容体 CXCR4 の選択的アンタゴニストであることが確認され、plerixafor の CXCR4 受容体への結合機序が示された。In vivo 試験では、マウス、イヌ及びサルのモデルにおいて、plerixafor は、良好な忍容性がみられる用量で、これらの動物の免疫系の再構築能を有する細胞を動員することが示された。Plerixafor の効力を裏付ける試験を表 1 に示す。これらの試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を適用せずに実施した。特に記載のない限り、すべての試験で遊離塩基を用いた。

表 1 - 効力を裏付ける試験の一覧

項	試験表題／試験の種類	試験系及び投与方法	実施施設	報告書番号[Module 番号]又は参考文献
2.1.2	CXCR4 の選択的アンタゴニスト plerixafor の分子薬理学的特性検討	In vitro	AnorMED	AOM0051 [4.2.1.1-1] AOM0052 [4.2.1.1-2] AOM0053 [4.2.1.1-3] AOM0054 [4.2.1.1-4] AOM0055 [4.2.1.1-5] AOM0056 [4.2.1.1-6] AOM0057 [4.2.1.1-7] AOM0058 [4.2.1.1-8] AOM0059 [4.2.1.1-9] AOM0064 [4.2.1.1-10] AOM0075 [4.2.1.1-11] Fricker 2006 (22)
2.1.3	Plerixafor によるケモカイン受容体阻害作用の CXCR4 選択性	In vitro	Rega Institute for Medical Research	Hatse 2002 (23)
2.1.4	ケモカイン受容体 CXCR4 アンタゴニストの分子間相互作用	In vitro	Panum Institute	Gerlach 2001 (24)

項	試験表題／試験の種類	試験系及び投与方法	実施施設	報告書番号[Module番号]又は参考文献
2.1.5	ケモカイン受容体 CXCR4 の Asp171 及び Asp262 変異	In vitro	Rega Institute for Medical Research	Hatse 2001 (25)
2.1.6	PlerixaforのCXCR4受容体アンタゴニスト作用の分子メカニズム：結合部位の CXCR3 受容体への導入	In vitro	Panum Institute	Rosenkilde 2004 (26)
2.2.2	CXCR4 への結合親和性による骨髄からの造血前駆細胞の動員	BALB/c マウス 0.1 mmol/L plerixafor を大腿動脈に灌流	[redacted]	AOM0070 [4.2.1.1-12] Martin 2006 (27)
2.2.3	マウス造血幹細胞及び前駆細胞の動員及びマウス及びヒト幹細胞の自己複製	C3H/HeJ マウス 単回皮下投与 0.16, 0.24, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 mg/kg NOD/SCID マウス	[redacted]	AOM0033 [4.2.1.1-13] Broxmeyer 2005 (28)
2.2.4	イヌ自家移植モデルにおける造血幹細胞の動員	イヌ 単回皮下投与 4 mg/kg	[redacted]	AOM0045 [4.2.1.1-14] Burroughs 2005 (29)
			AnorMED	AOM0049 [4.2.1.1-15]
2.2.5	イヌ同種移植モデルにおける造血幹細胞の動員	イヌ 単回皮下投与 4 mg/kg	[redacted]	AOM0046 [4.2.1.1-16] Burroughs 2005 (29)
2.2.6	非ヒト霊長類における造血幹細胞の動員及び長期自己複製能	アカゲザル 単回皮下投与 1 mg/mL	National Heart, Lung, and Blood Institute	Larochelle 2006 (30)
2.2.7	移植の前処置レジメンとしての造血幹細胞の動員	ROSA26 及び PeP3^{b} マウス 単回皮下投与 5 mg/kg	National Heart, Lung, and Blood Institute	Chen 2006 (31)

2.1 In vitro 薬理

2.1.1 序文

In vitro 薬理試験は、ケモカイン受容体 CXCR4 の選択的阻害薬としての plerixafor の活性を評価するために計画した。ケモカイン受容体は 7 回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体（GPCR）であり、SDF-1/CXCR4 相互作用はリガンド結合による GPCR アッセイや、G タンパク質活性化、細胞内カルシウム流入のような下流のシグナル伝達過程を検討することで調べることが可能である。天然に CXCR4 を発現している細胞株を用い、SDF-1/CXCR4 を介する過程（^{125}I-SDF-1 リガンド結合、カルシウム流

入、グアノシン三リン酸[GTP]結合及び走化性）に対する plerixafor の阻害作用を標準的手法で検討した。受容体選択性は、CXCR4 との配列相同性が様々である一連の受容体に対して、plerixafor によるリガンド誘発カルシウム流入及び／又はリガンド結合の阻害の有無により確認した。また、plerixafor の CXCR4 との分子間相互作用を受容体部位特異的突然変異誘発試験により検討した。

2.1.2 G タンパク質共役型ケモカイン受容体 CXCR4 の特異的アンタゴニスト plerixafor の分子薬理学的特性

試験番号 AOM0051 [Module 4.2.1.1-1]
試験番号 AOM0052 [Module 4.2.1.1-2]
試験番号 AOM0053 [Module 4.2.1.1-3]
試験番号 AOM0054 [Module 4.2.1.1-4]
試験番号 AOM0055 [Module 4.2.1.1-5]
試験番号 AOM0056 [Module 4.2.1.1-6]
試験番号 AOM0057 [Module 4.2.1.1-7]
試験番号 AOM0058 [Module 4.2.1.1-8]
試験番号 AOM0059 [Module 4.2.1.1-9]
試験番号 AOM0064 [Module 4.2.1.1-10]
試験番号 AOM0075 [Module 4.2.1.1-11]
Fricker, 2006, *Biochem Pharmacol* (22) [Module 4.3-39]

目的：Plerixafor は CXCR4 の特異的アンタゴニストであることの確認。

方法：受容体結合アッセイ：放射能標識リガンド及び plerixafor を用いて競合的結合アッセイを実施した。SDF-1 リガンド結合については、CCRF-CEM 細胞を ^{125}I-SDF-1（100 pmol/L）及び plerixafor（4.1 nmol/L～10 µmol/L）と共にインキュベートした（AOM0053）。BLT1 リガンド結合については、CHO-S 細胞膜を plerixafor（100 nmol/L～100 µmol/L）及び 1 nmol/L の ^{3}H-LTB$_4$ と混合した 4 nmol/L の LTB$_4$ と共にインキュベートした（AOM0052）。CXCR7 リガンド結合については、Cf2Th 細胞を plerixafor（10 µmol/L）及び ^{125}I-SDF-1（100 pmol/L）と共にインキュベートした（AOM0075）。

Plerixafor の結合及び解離をフルオレセインイソチオシアネート（FITC）標識抗 CXCR4 抗体 12G5 を用いたフローサイトメトリーにより間接的に測定した。結合試験については、CCRF-CEM 細胞を 0.1、1 又は 10 µmol/L の plerixafor と共に 0、15、30、45 又は 60 分間プレインキュベートした後、FITC 標識 12G5 で標識し、フローサイトメトリーで結合を測定した。解離試験については、CCRF-CEM 細胞を 0.1、1 又は 10 µmol/L の plerixafor と共に 1 時間インキュベートし、その後 FITC 標識 12G5 で直接標識するか、又は更に 24 又は 48 時間インキュベートした後、FITC 標識 12G5 で標識し、フローサイトメトリーで結合を測定した。結合している抗体の比率は、plerixafor とインキュベーションしなか

ったとき（対照）の 12G5 の結合に対する plerixafor とインキュベーションした後の 12G5 の結合の比から算出した（Fricker, 2006）。

カルシウム流入アッセイ：CXCR4、CCR4、CCR7 を発現している CCRF-CEM 細胞及び CCR1、CCR2b、CXCR3、CCR4、CCR5、LTB4 を発現している細胞に、結合しているカルシウム上で蛍光を発するカルシウム指示薬 Fluo-4-AM（アセトキシメチル）を添加した。細胞を plerixafor（CXCR4 については 1.0 nmol/L～0.16 µmol/L、他の受容体についてはすべて 10 及び 100 µmol/L）と共に 15 分間プレインキュベートした。その後、細胞を適当な濃度のケモカインリガンドで刺激し、細胞内カルシウムの濃度変化を 525 nm での蛍光（励起 λ = 485 nm）により評価した。濃度－反応曲線から IC_{50} 値を算出した（AOM0051）（AOM0054）（AOM0057）（AOM0058）（AOM0059）（AOM0064）。アゴニストアッセイでは、ケモカインの代わりにアッセイプレートに plerixafor を添加することを除き、同様の方法を用いた（Fricker, 2006）。

GTP 結合アッセイ：本アッセイは、G タンパク質共役型受容体活性化のメカニズムに基づくものである。この受容体は、基底状態でグアノシン二リン酸ヌクレオチド（GDP）に結合するヘテロ三量体 G タンパク質と共役している。リガンドの結合により活性化されると、GDP が解離し GTP に置換される。その後 GTP は速やかに加水分解されて GDP となり、受容体と三量体の G タンパク質複合体の再結合が引き起こされる。この過程を加水分解されない GTP アナログを用いて GTP/G タンパク質複合体の形成を捕捉することにより測定した（AOM0056）。

CCRF-CEM 細胞膜を SDF-1（10 nmol/L）、plerixafor（0.92 pmol/L～1 µmol/L）及び ^{35}S-GTPγS（1 nmol/L）と共にインキュベートした。遊離 ^{35}S-GTPγS を除去し、結合 ^{35}S-GTPγS を液体シンチレーション計数法により測定した。濃度－反応曲線から IC_{50} 値を算出した。

走化性アッセイ：本アッセイでは、蛍光標識した CCRF-CEM 細胞の SDF-1 による遊走を測定した。カルセイン AM で前処置した細胞を plerixafor の存在下でトランスウェルプレートの上部チャンバーに、SDF-1（10 nmol/L）を下部チャンバーに添加した。2.5 時間後に、下部チャンバーに遊走した細胞数を蛍光プレートリーダーにより測定した。濃度－反応曲線から IC_{50} 値を算出した。アゴニストアッセイでは、下部チャンバーに SDF-1 を添加せず、plerixafor のみを添加することを除き、同様の方法を用いた。（AOM0055）

結果及び結論：Plerixafor は CCRF-CEM 細胞への SDF-1 の結合を阻害し、その IC_{50} は 651 ± 37 nmol/L（n = 3）であった。フローサイトメトリー試験では、plerixafor の結合阻害作用が 48 時間かけて緩徐に消失することが示された。Plerixafor は SDF-1/CXCR4 を介する以下の相互作用を阻害した：SDF-1 介在性 GTP 結合（IC_{50} = 15.4 ± 4.4 nmol/L）、SDF-1 介在性カルシウム流入（IC_{50} = 572 ± 190 nmol/L）、SDF-1 刺激走化性（IC_{50} = 51 ± 17 nmol/L）（表 2）。

表 2 - Plerixafor による SDF-1/CXCR4 相互作用の阻害

アッセイ	IC_{50} (nmol/L)	試験番号
^{125}I-SDF-1 リガンド結合	651 ± 37 (n = 3)	AOM0053
SDF-1 刺激カルシウム流入	572 ± 190 (n = 5)	AOM0054
SDF-1 刺激走化性	51 ± 17 (n = 4)	AOM0055
SDF-1 刺激 ^{35}S-GTPγS 結合	15.4 ± 4.4 (n = 4)[a]	AOM0056

[a] 試験 AOM0056 では IC_{50} の代わりに EC_{50} を使用した。それらは本試験の目的において同じ意味を示す。

Plerixafor は、100 µmol/L の濃度で、CXCR3、CCR1、CCR2b、CCR4、CCR5 又は CCR7 を発現している細胞におけるカルシウム流入をまったく又はほとんど阻害しなかった（すなわち、IC_{50} > 100 µmol/L）。BLT1 受容体への LTB4 リガンドの結合を阻害せず（IC_{50} > 100 µmol/L）、また CXCR7 受容体への SDF-1 リガンドの結合も阻害しなかった（IC_{50} > 10 µmol/L）。

Plerixafor 単独では、CXCR4、CCR4 及び CCR7 を発現する CCRF-CEM 細胞におけるカルシウム流入を誘発しなかったが、CXCR4 の認識リガンド SDF-1 はカルシウム流入を誘発し、その EC_{50} 値は 14.0 nmol/L であった。また、plerixafor は CCRF-CEM 細胞膜への GTP の結合及び CCRF-CEM 細胞の走化性を促進しなかったが、SDF-1 の GTP 結合アッセイにおける EC_{50} 値は 8.2 nmol/L であり、SDF-1 は 10 nmol/L で最大の CCRF-CEM 細胞走化性作用を示した。また、plerixafor の CXCR4 阻害作用は緩徐に消失することが示された（Fricker, 2006）。

以上、これらのデータから Plerixafor が CXCR4 に選択的なアンタゴニストであり、CXCR4 アゴニスト活性を示さないことが示された。

2.1.3 Plerixafor によるケモカイン受容体阻害作用の CXCR4 選択性

Hatse, 2002, *FEBS Lett* (23) [Module 4.3-45]

目的：Plerixafor が CXCR4 の選択的アンタゴニストであるか否かを検討する。

被験物質：Plerixafor 八塩酸塩

方法：カルシウム流入アッセイ：蛍光カルシウム指示薬 Fluo-3-AM を細胞に添加し、plerixafor と共に 15 分間プレインキュベートした後、適当なケモカイン又は plerixafor 単独で刺激した。蛍光イメージングプレートリーダー（FLIPR）を用いて蛍光の変化を継時的に測定することにより、細胞内カルシウム動員を評価した。

抗体染色及びフローサイトメトリー：CXCR4 特異抗体 12G5 の結合に対する経時的な plerixafor の作用を検討するため、SupT1 細胞を plerixafor（0 又は 5 µg/mL）と共に 30 分間プレインキュベートした。その後、細胞を洗浄し、薬物除去の 0、1、6、24 及び 48 時間後にフィコエリトリン（PE）標識 12G5 で染色し、抗体結合をフローサイトメトリーで測定した。

受容体インターナリゼーションアッセイ：緑色蛍光タンパク質を結合させた CXCR4 を遺伝子導入した U87.CD4 細胞を plerixafor（0 又は 5 µg/mL）と共に 15 分間プレインキュベートした後、ホルボールエステル又は SDF-1 と共に 37°C で 45 分間インキュベートした。その後、細胞を 1%パラホルムアルデヒドで固定し、細胞に関連した蛍光を蛍光顕微鏡で測定した。

結果及び結論：Plerixafor は新鮮単離末梢血単核球（PBMC）、SupT1 細胞、THP-1 細胞、HSB-2 細胞、MOLT-4 細胞、及びマウス L1210 細胞で SDF-1 介在性カルシウム流入を阻害した（表 3）。また、plerixafor は SDF-1 を介する PBMC の走化性も阻害した。Plerixafor は SDF-1 に誘発された CXCR4 のインターナリゼーションを阻害したが、ホルボールエステルにより誘発された受容体の非特異的エンドサイトーシスは阻害しなかった。Plerixafor は薬物除去後 48 時間にわたり抗体 12G5 の結合を阻害し、48 時間後における 12G5 の結合の阻害率は非処理対照と比較して 60%であった。

表 3 - カルシウム流入実験における plerixafor の CXCR4 選択的アンタゴニスト作用

リガンド	濃度 (ng/mL)	細胞の種類	Plerixafor の IC_{50} (µg/mL)	Plerixafor の IC_{50}[1] (nmol/L)
SDF-1	10	U87.CD4.CXCR4	0.13	164
	100	新鮮単離 PBMC	0.03	38
	20	SupT1	0.04	50
	10	THP-1	0.01	12.5
	20	HSB-2	0.10	126
	100	MOLT-4	0.02	25.2
	2.5	L1210	0.08	100.7

[1] 分子量 794.48（plerixafor 八塩酸塩）に基づいて算出した値。

Plerixafor は、それらの受容体を天然に発現している細胞及び遺伝子組換え受容体を発現している遺伝子導入細胞株のいずれにおいても、以下のケモカイン受容体を介するカルシウム流入を阻害しなかった（すなわち IC_{50} > 25 µg/mL［31.5 µmol/L］）；CXCR1、CXCR2、CXCR3、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8 及び CCR9。また、plerixafor は、ヒト T リンパ球においてカルシウム流入を誘発せず、緑色蛍光タンパク質を結合させた CXCR4 を遺伝子導入した U87.CD4 細胞において CXCR4 受容体インターナリゼーションも誘発しなかった。

以上、これらの結果から、plerixafor が新鮮単離ヒト PBMC、SupT1 細胞、THP-1 細胞、HSB-2 細胞、MOLT-4 細胞の SDF-1 介在性カルシウム流入に対する阻害作用を有することが示された。また、plerixafor はマウス L1210 細胞の SDF-1 介在性カルシウム流入も阻害したことから、plerixafor がマウス CXCR4 と交差反応することが確認された。Plerixafor の阻害作用は長時間持続する（48 時間まで）。さらに、これらのデータから、plerixafor が CXCR4 に選択的なアンタゴニストであり、CXCR4 のアゴニストではないことが示された。

2.1.4 シクラム環を1つ又は2つ有する非ペプチド性アンタゴニストとケモカイン受容体CXCR4との分子間相互作用

Gerlach, 2001, *J Biol Chem* (24) [Module 4.3-43]

目的：Plerixafor のケモカイン受容体 CXCR4 との分子間相互作用について検討する。

方法：ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）オーバーラップ伸長により CXCR4 受容体に膜貫通ドメイン及び細胞外ドメインのヒスチジン及びアスパラギン酸残基を標的とする点突然変異を導入し、その変異型 CXCR4 受容体遺伝子を COS-7 細胞に一過的にトランスフェクトした。^{125}I-Met SDF-1 又は抗 CXCR4 抗体 ^{125}I-12G5 を用いて変異型受容体に関する受容体結合アッセイを実施した。Plerixafor 及び様々な化学リンカーで 2 つのシクラム環が結合した構造を有するアナログ（ビシクラムアナログ）を用いて異種競合結合試験を実施した。結合阻害に関する IC_{50} 値は Prism 3.0（GraphPAD Software）を用いて非線形回帰により求めた。

結果及び結論：受容体部位突然変異誘発試験において、膜貫通ドメイン IV 及び VI（TM-IV 及び TM-VI）に位置する Asp171 及び Asp262 が SDF-1 及び抗 CXCR4 抗体 12G5 の結合に対する plerixafor の阻害作用に必須であることが確認された。関連する一連のビシクラムアナログの作用は、2 つのシクラム環部分のリンカーの長さ及び化学的性質により、Asp171 のみ又は Asp171 と Asp262 の両方に依存した。したがって、plerixafor はそのシクラム環部分のそれぞれが負に荷電したアミノ酸 Asp171 及び Asp262 に結合することにより CXCR4 受容体に作用すると結論された。

2.1.5 ケモカイン受容体 CXCR4 の Asp171 及び Asp262 変異によるヒト免疫不全ウイルス-1 侵入のための CXCR4 の共受容体機能の低下及び plerixafor のアンタゴニスト作用の減弱

Hatse, 2001, *Mol Pharmacol* (25) [Module 4.3-47]

目的：Plerixafor のケモカイン受容体 CXCR4 との分子間相互作用について検討する。

被験物質：Plerixafor 八塩酸塩

方法：CXCR4 の様々な変異型（CXCR4 [D171N]、CXCR4 [D262N]、CXCR4 [D171N, D262N] 及び CXCR4 [H281A]）を発現するように安定的に遺伝子導入した一連の U87.CD4 細胞株を構築した。蛍光カルシウム指示薬 Fluo-3-AM を細胞に添加し、カルシウム動員アッセイを実施した。Plerixafor 結合への影響を PE 標識抗 CXCR4 抗体 12G5 を用いてフローサイトメトリーで評価した。CXCR4 における変異の plerixafor の抗ウイルス活性に及ぼす影響を検討した。Plerixafor を遺伝子導入細胞及び HIV と共にインキュベートし、細胞培養上清中の HIV p24 抗原を測定することにより、抗ウイルス作用を評価した。

結果及び結論：Plerixafor の CXCR4 に対する阻害作用を SDF-1 誘発細胞内カルシウムシグナル伝達及び CXCR4 特異的抗体 12G5 置換により評価したところ、阻害作用は D171N 及び D262N 変異により大幅に減弱した。また、HIV の侵入も D171N 及び D262N 変異により減少した。これらのデータから、plerixafor の CXCR4 受容体への結合には、受容体の TM-IV 及び TM-VI に位置する 171 位及び 262 位の負に荷電したアスパラギン酸残基が関与していることが裏付けられた。

2.1.6 Plerixafor の CXCR4 受容体アンタゴニスト作用の分子メカニズム：CXCR3 受容体への結合部位の導入

Rosenkilde, 2004, *J Biol Chem* (26) [Module 4.3-100]

目的：Plerixafor とケモカイン受容体 CXCR4 の分子間相互作用について、plerixafor/CXCR4 結合部位の CXCR3 への導入により更に検討する。

方法：PCR オーバーラップ伸長を用いて CXCR4 又は CXCR3 受容体に点突然変異を導入し、その変異型 CXCR4 又は CXCR3 受容体を COS-7 細胞に一過的にトランフフェクトした。抗 CXCR4 抗体 ^{125}I-12G5 を用いて変異型 CXCR4 受容体に関する受容体結合アッセイを実施した。CXCR4 を SDF-1 で、CXCR3 を ITAC 又は IP10 で刺激した後、受容体活性化をホスファチジルイノシトール代謝回転アッセイにより測定した。結合阻害に関する IC_{50} 値は非線形回帰により求めた。

結果及び結論：CXCR4 受容体の主要なリガンド結合ポケットを形成する TM-III、IV、V、VI 及び VII に位置する 16 箇所の変異についてリガンド結合試験を実施したところ、plerixafor の主要な相互作用部位として、Asp171（D171）及び Asp262（D262）の重要性が確認されるとともに Glu288（E288）の関与が示された。CXCR3 では CXCR4 の 2 つのアスパラギン酸残基は保持されているが、288 位はセリン残基である。Plerixafor はホスファチジルイノシトール代謝回転アッセイにおいて CXCR3 活性に影響を及ぼさなかった。CXCR4 結合部位を Ser288 残基をグルタミン酸に置換（S288E）し、電位を中和するように Lys300 をアラニンに置換（K300A）することにより CXCR3 に導入した。これらの変

異により、CXCR3 のホスファチジルイノシトール代謝回転アッセイにおける plerixafor の阻害作用が 1000 倍増強し、plerixafor の CXCR4 への親和性との差が 10 倍以内となった。これらのデータから、plerixafor の CXCR4 への結合における 3 つの酸性アンカーポイント残基（D171、D262 及び E288）の重要性が裏付けられた。

2.2 In vivo 薬理

2.2.1 序文

In vivo の効力を裏付ける試験において、plerixafor が複数の動物種で HSC 及び HPC を動員し、動員されたこれらの細胞が骨髄に再び生着し、長期にわたり持続的に造血系が再構築されることが確認された。幹細胞は、分化方向の定まっていない細胞と定義され、自己複製能及び分化細胞への分化能を有している。HSC は、赤血球、血小板、リンパ性及び骨髄性細胞といった造血系のすべての細胞系統の産生能を有する。ヒト HSC 及び HPC に共通した特徴は、細胞表面タンパク質、特に CD34 陽性抗原の発現であるが、CD34 陽性発現細胞は性質の異なる細胞の集団であり、真の幹細胞画分はその一部分である (32)。HSC の大きな特徴は、移植したレシピエントの骨髄再構築能を有することである。骨髄再構築能は、in vivo において、末梢血中の好中球数及び血小板数の回復時間を測定することにより評価することが可能である。また、表現型及び遺伝型の異なる細胞を適切なレシピエントに移植し、長期骨髄再構築アッセイを行うことにより幹細胞を定量することも可能である。造血の初期段階は、HSC の HPC への分化であり、それが更に特定の造血系経路へと続く。HPC は、培養液中で単離し、コロニー形成アッセイ（顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞［CFU-GM］、赤芽球バースト形成細胞［BFU-E］及び顆粒球・赤芽球・巨核球・マクロファージコロニー形成細胞［CFU-GEMM］など）により測定及び定量を行うことが可能である。

2.2.2 Plerixafor の構造アナログの in vitro における SDF-1 の CXCR4 への結合阻害作用による in vivo における骨髄からの前駆細胞の動員

試験番号 AOM0070 [Module 4.2.1.1-12]
Martin, 2006, *Br J Haematology* (27) [Module 4.3-77]

目的：1）Plerixafor は CXCR4 の阻害により骨髄から HPC を直接動員すること、及び 2）Plerixafor の構造アナログを用いて、動員が SDF-1 の CXCR4 への結合阻害作用の強度に依存することを確認する。

方法：BALB/c マウスの大腿骨骨髄を大腿動脈及び静脈に挿入したカニューレを介して in situ で灌流した。灌流緩衝液は、動脈カニューレから持続注入し、静脈カニューレから排出した。後肢を緩衝

液で最初に 5 分間灌流することにより血管から血液を除去した後、更に 60 分間灌流した。その後、plerixafor 又は 3 つの構造アナログ（AMD3108、AMD3389 及びシクラム）を潅流緩衝液中に最終濃度 0.1 mmol/L で調製し、大腿動脈に直接 10 分間持続投与した（n=4～5/群）。また、G-CSF の前投与の相乗効果を調べるため、別の群のマウスに G-CSF を 2.5 µg/mouse で連日 4 日間皮下投与するか、又は溶媒を投与した後、0.1 mmol/L の plerixafor 又は緩衝液で灌流した（n=4～5/群）。灌流液を採取し、動員された細胞について、CD34 陽性細胞をフローサイトメトリー、前駆細胞をコロニー形成アッセイで測定した。

結果及び結論：Plerixafor は骨髄から CD34 陽性細胞及び CFU を動員し、動員された CD34 陽性細胞と CFU の総数は溶媒対照の 6.5 倍であった。Plerixafor の構造アナログの灌流において、これらの化合物の in vivo における HPC 動員作用は、in vitro における SDF-1 の CXCR4 への結合阻害作用(24)と直接相関しており、最も強力な CXCR4 アンタゴニスト（plerixafor 及び AMD3389）が最も強い HPC 動員作用を示した。

CFU の動員が G-CSF（2.5 µg/mouse で連日 4 日間皮下）単独投与したマウスで 11 倍増加し、plerixafor（0.1 mmol/L）単独投与では 7 倍増加したが、G-CSF 前投与＋plerixafor 投与では 22 倍増加したことから、マウス骨髄からの HPC 動員において G-CSF と相乗作用を示すことが確認された。

2.2.3 CXCR4 アンタゴニスト plerixafor によるマウス及びヒト造血幹細胞及び前駆細胞の速やかな動員

Broxmeyer, 2005, *J Exp Med* (28) [Module 4.3-15]
試験番号 AOM0033 [Module 4.2.1.1-13]

目的：plerixafor がマウス前駆細胞を速やかに動員し、これらの細胞及びヒト HSC が移植後のレシピエント骨髄の再構築能を有していることを確認する。

2.2.3.1 Plerixafor により誘発した C3H/HeJ マウス血中への骨髄 HPC の動員

A) Plerixafor 誘発 HPC 動員の経時変化：

方法：5 匹/群の C3H/HeJ マウスに 5 mg/kg の plerixafor を単回皮下投与し、HPC 数測定用の血液を投与 0.25、0.5、1、2 及び 24 時間後に採取した。HPC の特性分析は、マウスの細胞を標準培地及びサイトカイン濃度下で 7 日間インキュベートし、コロニーをスコア化することにより CFU-GM、BFU-E 及び CFU-GEMM の数を測定した。

結果：C3H/HeJ マウスに 5 mg/kg の用量の plerixafor を単回皮下投与したところ、投与 1 時間後に HPC 動員が最大となった。投与 1 時間後の CFU-GM、BFU-E 及び CFU-GEMM の数はそれぞれの対照

値の約 14、7 及び 10 倍であった（CFU-GM、BFU-E 及び CFU-GEMM の時間 0 における対照値は、それぞれ 78± 18、17 ± 2 及び 10 ± 2 であった）（図 3A）。

B) Plerixafor 誘発 HPC 動員の用量反応性：

方法：7 匹/群の C3H/HeJ マウスに 0、0.625、1.25、2.5、5.0 又は 10 mg/kg の plerixafor を単回皮下投与し、HPC 数測定用の血液を投与 1 時間後に採取した。HPC の特性分析は、マウスの細胞を標準培地及びサイトカイン濃度下で 7 日間インキュベートし、コロニーをスコア化することにより CFU-GM、BFU-E 及び CFU-GEMM の数を測定した。

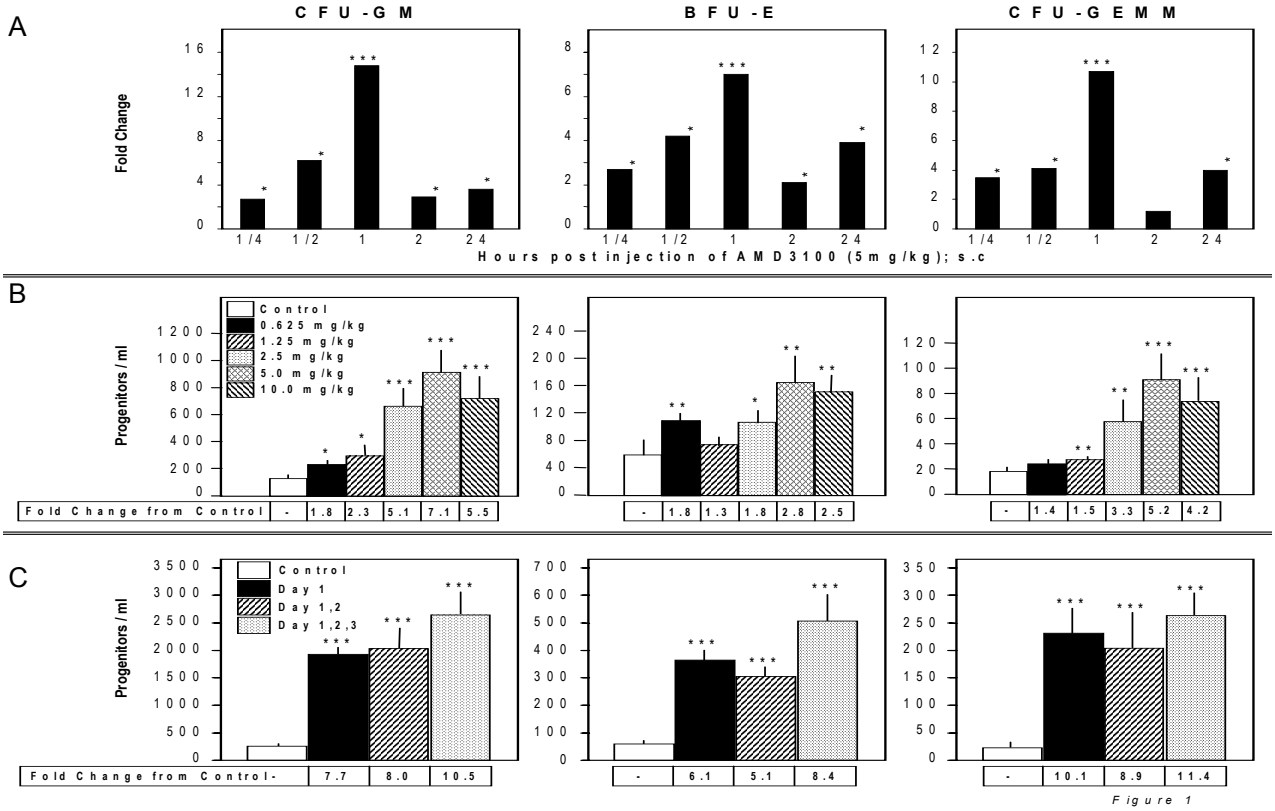
結果:C3H/HeJ マウスに plerixafor を 2.5～10 mg/kg で単回皮下投与したところ、投与 1 時間後に HPC 動員が最大となった。本試験において、plerixafor が 2.5～10 mg/kg で産生した CFU-GM、BFU-E 及び CFU-GEMM は、それぞれの対照値の 5.1～7.1、1.8～2.8 及び 3.3～5.2 倍であった（図 3B）。

C) Plerixafor の反復投与による HPC 動員の評価：

方法：C3H/HeJ マウスに 5 mg/kg の plerixafor または生理食塩液（対照群、0.1 mL/マウス、14 匹）を 1 日目、1 及び 2 日目又は 1、2 及び 3 日目に皮下投与（8 匹/群）した。複数の日数にわたる投与は 24 時間間隔で行った。HPC 数測定用の血液を最終投与の 1 時間後に採取した。HPC の特性分析は、マウスの細胞を標準培地及びサイトカイン濃度下で 7 日間インキュベートし、コロニーをスコア化することにより CFU-GM、BFU-E 及び CFU-GEMM の数を測定した。

結果：5 mg/kg の plerixafor を 3 日間連日投与したとき、いずれの投与日においても投与 1 時間後の HPC の動員は同様であった。3 日間投与したときの CFU-GM、BFU-E 及び CFU-GEMM の HPC 数の増加は、それぞれ 7.7～10.5、5.1～8.4 及び 8.9～11.4 倍であった（図 3C）。

図 3 - Plerixafor による C3H/HeJ マウス血中への HPC（CFU-GM、BFU-E 及び CFU-GEMM）動員作用の経時変化及び用量反応性



A) 5 mg/kg の plerixafor を C3H/HeJ マウスに単回皮下投与したときの動員の経時変化、B) Plerixafor を C3H/HeJ マウスに皮下投与した 1 時間後の用量反応解析、C) Plerixafor 5 mg/kg の反復投与による作用。
*p< 0.05、**p< 0.01、*** p< 0.001

2.2.3.2 種々のマウス系統における plerixafor、G-CSF、並びに plerixafor+G-CSF による骨髄 HPC 動員の比較試験

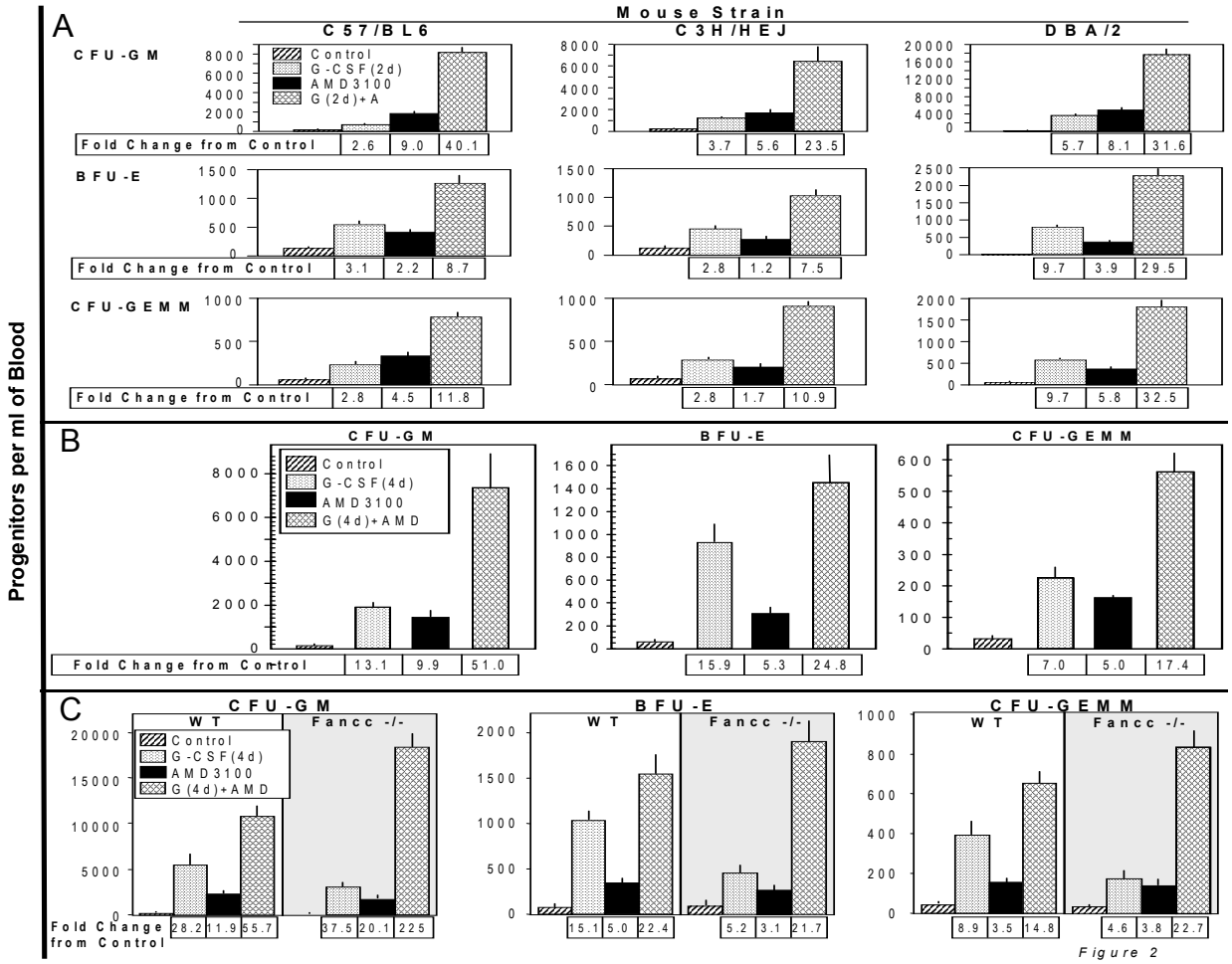
方法：15 匹/群の C57BL/6、15 匹/群の DBA/2 及び 11 匹/群の C3H/HeJ マウスに生理食塩液（対照）、plerixafor（5 mg/kg）を単回皮下投与、G-CSF（2.5 µg/mouse）を 2 又は 4 日間（1 日 2 回）連日皮下投与、並びに G-CSF（2.5 µg/mouse）の 2 又は 4 日間連日投与の 18 時間後に plerixafor（5 mg/kg）を単回皮下投与した。15 匹のファンコニ貧血相補群 C タンパク質遺伝子を有する野生型 $Fancc^{+/+}$マウス及び 8 匹/群の欠損する $Fancc^{-/-}$マウスに生理食塩液（対照）、plerixafor（5 mg/kg、単回投与）、G-CSF（2.5 µg/mouse、4 日間（1 日 2 回）連日投与）、並びに G-CSF（2.5 µg/mouse、4 日間連日投与）の後に plerixafor（5 mg/kg、単回投与）を皮下投与した。マウスは 1 時間後に採血してアッセイを行い、血液 1 mL あたりの HPC 数を算出した。HPC の分析では、マウスの細胞を標準培地及びサイトカイン濃

度下で7日間インキュベートし、コロニーをスコア化することによりCFU-GM、BFU-E及びCFU-GEMMの数を測定した。

結果及び結論：G-CSFによる最大のHPC動員は、DBA/2マウスの方がC57BL/6及びC3H/HeJマウスよりも有意に大きかった（$p< 0.001$）。いずれの系統のマウスにおいても、plerixaforは単独でCFU-GMを動員するとともに、plerixafor（単回投与）はG-CSF（2日間投与）との相乗作用によりCFU-GM動員を増強した（図4A）。CFU-GM動員に対する相乗作用はC57BL/6マウスにG-CSFを1日2回4日間投与した後plerixaforを投与したときにも認められた。G-CSFの4日間投与によるplerixafor+G-CSFのBFU-E及びCFU-GEMM動員作用は相加的又は相加的よりもわずかに強かった（図4B）。

G-CSFは$Fancc^{-/-}$マウスにおけるHPC動員作用が弱い。Plerixaforの単回皮下投与では、$Fancc^{-/-}$マウスと$Fancc^{+/+}$野生型マウスで同程度の数のHPCが動員された。G-CSFのみを1日2回4日間皮下投与したとき、$Fancc^{+/+}$マウスと比べて$Fancc^{-/-}$マウスにおけるHPC動員作用は弱かった。Plerixafor（単回皮下投与）+G-CSF（1日2回4日間皮下投与）では、$Fancc^{-/-}$及び$Fancc^{+/+}$マウスの両方でHPC動員の相乗作用が認められた。興味深いことに、$Fancc^{-/-}$マウスにおける相乗作用は$Fancc^{+/+}$マウスよりも大きかった（図4C）。

図 4 - Plerixafor による G-CSF で誘発された動員の増強



A) C57BL/6、DBA/2 及び C3H/HeJ マウスに G-CSF を 1 日 2 回 2 日間投与、B) C57BL/6 マウスに G-CSF を 1 日 2 回 4 日間投与、C) Fancc$^{-/-}$及び WT マウスに G-CSF を 1 日 2 回 4 日間投与。各群における測定結果はすべて各系統のマウスの特定の前駆細胞に関する対照と比較して少なくとも P< 0.001 である。

2.2.3.3 Plerixafor、G-CSF 及び plerixafor+G-CSF によるマウス HSC 動員の評価

A) Plerixafor による長期骨髄生着能及び自己複製能を有するマウス HSC の動員の評価

方法：

1）マウスを用いた競合的骨髄再構築アッセイにより、マウス HSC の動員を評価した。本アッセイでは、致死量放射線を照射したレシピエントにおいて、ドナーの長期自己複製（LTR）能を有する血液細胞の希釈液とレシピエントの骨髄細胞とで生着を競合させる。ドナー細胞は C57BL/6（CD45.2 陽性）マウスから採取し、移植レシピエントは B6.BoyJ（CD45.1 陽性）マウスとした。18 匹の C57BL/6（CD45.2 陽性）マウスに生理食塩液（0.1 mL）、又は 36 匹の C57BL/6（CD45.2 陽性）マウスに 5 mg/kg の plerixafor（0.1 mL）を皮下投与し、その 1 時間後に低比重単核細胞（LDMC）を採取した。競合細胞は非放射線照射 B6.BoyJ（CD45.1 陽性）マウスの骨髄から採取した。移植において、ドナー（CD45.2

陽性）血液細胞：競合（CD45.1 陽性）骨髄細胞の比を 3:1、2:1 及び 1:1 とし、競合骨髄細胞は一定数 0.5×10^6 個を用いた。致死量放射線（950 cGy）を照射した 6 匹の B6.BoyJ（CD45.1 陽性）レシピエントマウスに移植細胞を静脈内注入した。移植の 1、2、3 及び 4 ヵ月後に、レシピエントマウスの尾静脈から採血し、末梢血中白血球を FITC 標識抗 CD45.2 抗体及び抗 CD45.1 抗体を用いたフローサイトメトリーにより分析し、キメリズムでのドナー細胞の寄与率を求めた。

2）自己複製能を評価するため、二次移植を実施した。 一次移植用マウスにドナー細胞（plerixafor により動員された細胞又は生理食塩液対照細胞）：競合細胞混合物を 3:1 の比で注入し、その 4 カ月後に大腿から骨髄細胞を採取した。2.5×10^6 個の骨髄細胞を致死量放射線（950 cGy）を照射した二次移植用 B6.BoyJ マウスの静脈内に注入した。上記と同様にキメリズムを測定した。

結果及び結論：Plerixafor により動員されたドナー細胞：レシピエント競合細胞を 3:1 及び 2:1 の比で注入した B6.BoyJ レシピエントマウスでは、移植 2～4 ヵ月後において、対照ドナーマウスで動員された細胞を注入したときの 8 倍を超えるキメリズムが維持されていた。細胞比を 1:1 としたときにも、plerixafor により動員された細胞の生着能は明らかに強かった。非競合的自己複製アッセイにおいて、すべての二次移植 B6.BoyJ レシピエントマウスが生存し、これらのマウスの骨髄から採取された HPC の 50%以上がドナー細胞（C57BL/6 CD45.2 陽性細胞）由来のものであった。

B) Plerixafor、G-CSF 及び plerixafor+G-CSF による長期骨髄生着能及び自己複製能を有するマウス HSC の動員の評価

方法：5 匹/群の C57BL/6（CD45.2 陽性）ドナーマウスに生理食塩液（0.1 mL）、plerixafor（5 mg/kg）、G-CSF（2.5 µg/mouse）及び plerixafor（5 mg/kg）+G-CSF（2.5 µg/mouse）を皮下投与した。1 時間後に血液を採取して LDMC を単離した。ドナー細胞：競合細胞を 1:5 及び 1:1 の比とし、上記のように移植を実施した。移植 6 ヵ月後に上記のようにキメリズムを測定した。二次移植試験では、上記の各投与群につき 3 匹のマウスから採取した 2.5×10^6 個の細胞を、致死量放射線を照射した 3 匹の二次移植用 B6.BoyJ レシピエントマウスに再注入した。6 ヵ月後にキメリズムを評価した。

結果及び結論：Plerixafor 又は G-CSF（1 日 2 回 2 日間投与）により誘発された LTR 細胞動員は本質的に同様であった。Plerixafor+G-CSF の併用では相乗作用がみられ、この作用はドナー細胞：競合細胞が 1:1 であるときに最も明らかであった。一方、plerixafor 及び G-CSF をそれぞれ単剤として投与したときにはこの細胞比においてキメリズムの増加はみられなかった。HSC の自己複製能を評価した二次移植試験では、最初に plerixafor 単独又は plerixafor+G-CSF で動員した細胞を二次移植した 6 ヵ月後において、二次移植レシピエント（B6.BoyJ CD45.1 陽性）マウスへの C57BL/6 CD45.2 陽性ドナー細胞の 60%を超える生着がみられた。

2.2.3.4 NOD/SCID マウスにおける plerixafor 動員ヒト HSC の自己複製

方法：NOD/SCID マウス骨髄再構築モデルを用いて、動員されたヒト CD34 陽性細胞の長期生着能を評価した。正常ヒト被験者で plerixafor（240 μg/kg、単回投与；n=4）、G-CSF（10 μg/kg、1 日 1 回 5 日間投与）又は plerixafor（160 μg/kg、単回投与；n=3）+G-CSF により動員された HSC（CD34 陽性細胞）を含む試料をアフェレーシスにより採取し、亜致死量放射線照射 NOD/SCID マウスを用いて限界希釈法により測定した。4 種類の細胞濃度を用い、亜致死量放射線（300 cGy）を照射した 4 匹のマウスに各濃度の細胞を移植した。8 週後に、各細胞濃度について、ヒト CD45 陽性骨髄細胞に対する FITC 標識抗体を用いたフローサイトメトリーによりキメリズムを評価した。骨髄中総ヒト CD45 陽性細胞比が 0.2%を超えるキメリズムを示すマウスを陽性と判定した。限界希釈分析法による陰性マウスの比率を用いて SCID マウス再構築細胞（SRC、NOD/SCID マウスの免疫系再構築能を有する細胞）の割合を算出した。

結果及び結論：SRC 数/kg（アフェレーシス）の値が最も大きかったのは、plerixafor+G-CSF 併用動員群であった。Plerixafor+G-CSF で動員された細胞を移植した NOD/SCID マウスにおけるヒト細胞のキメリズムは、G-CSF で動員された細胞を移植したときよりも高かった。その作用は少ない細胞数を用いたときの方が明らかであった（75,000 個の細胞を用いたときのキメリズムは plerixafor+G-CSF での 2.0%に対して G-CSF 単独で 0.3%、150,000 個の細胞を用いたときのキメリズムは plerixafor+G-CSF での 3.0%に対して G-CSF 単独で 1.5%［n=11～16 匹］）。Plerixafor 単独では、ヒト細胞のキメリズムが認められなかった。

2.2.3.5 Plerixafor、G-CSF 及び plerixafor+G-CSF で動員されたヒト CD34 陽性細胞の表現型の特性検討

A) Plerixafor、G-CSF 及び plerixafor+G-CSF で動員されたヒト CD34 陽性細胞の接着分子表面発現及び走化性

方法：Plerixafor（240 μg/kg 単回投与）、G-CSF（10 μg/kg を 1 日 1 回 5 日間）又は plerixafor（160 μg/kg 単回投与）+G-CSF を投与したヒト被験者で動員されたヒト CD34 陽性細胞について、CD49d 最晩期抗原（VLA-4）、CD49e（VLA-5）、CD62L（L-セレクチン）及び CXCR4 の比率及び発現レベルを検討した。動員されたヒト CD34 陽性細胞の SDF-1 への走化性反応をトランスウェルプレートを用いて in vitro で測定した。

結果及び結論：CD62L を発現しているヒト CD34 陽性細胞の比率及び CD62L 発現レベルは、plerixafor+G-CSF で動員された細胞の方が G-CSF で動員された細胞より明らかに低かった。Plerixafor+G-CSF で動員された CD34 陽性細胞では、CD49e 発現細胞の比率が高い傾向がみられ、CD49e の発現レベルは明らかに高かった。各群で動員された CD34 陽性細胞の CD49d 又は CXCR4 の発現に有意差はみられなかったが、CXCR4 発現細胞の比率の方が高い傾向が認められた。G-CSF で動員された CD34 陽性細胞の陽性率は CD34 陽性骨髄細胞の陽性率と同程度であったが、CD49d 及び CXCR4

の発現レベルは骨髄細胞よりも低かった。In vitro での SDF-1 への走化性反応は、G-CSF で動員された CD34 陽性細胞よりも plerixafor+G-CSF で動員された細胞のほうが強かった。

B) NOD/SCID マウス骨髄へのヒト CD34 陽性細胞のホーミング

方法：動員されたヒト CD34 陽性細胞のホーミングを NOD/SCID マウスモデルを用いて測定した。ヒト被験者から plerixafor（240 µg/kg、単回投与；n=4）、G-CSF（10 µg/kg、1 日 1 回 5 日間投与）又は plerixafor（160 µg/kg、単回投与；n=3）+G-CSF により血中に動員された骨髄細胞を含む試料をアフェレーシスにより採取した。次に、一定数（2.5×10^6/mouse）の CD34 陽性細胞を含むアフェレーシス試料を亜致死量放射線（300 cGy）照射 NOD/SCID マウスの尾静脈に注入した。20 時間後に骨髄細胞を採取し、総ヒト CD45 陽性細胞を直接測定することによりヒト細胞の比率を求めた。

結果及び結論: ヒト CD34 陽性細胞の回収率に有意差はみられなかった（3 群でそれぞれ 1.5 ± 0.2%、1.2 ± 1.0%及び 1.8 ± 0.2%）。

C) 致死量放射線を照射した B6.BoyJ マウスの骨髄への C57BL/6 マウス由来骨髄細胞（CD45.2 陽性 Sca1 陽性 c-kit 陽性 Lin 陰性）のホーミング及び骨髄再構築

方法：ホーミング試験において、10 匹の C57BL/6 ドナーマウス（CD45.2 陽性 Sca1 陽性 c-kit 陽性 Lin 陰性骨髄細胞）から plerixafor（5 mg/kg、単回投与、n=3）、G-CSF（2.5 µg/mouse、1 日 2 回 4 日間、n=3）及び plerixafor（5 mg/kg）+G-CSF（10 µg/mouse、1 日 2 回）（n=4）で動員された末梢血を採取した。動員後の各群から採取した血液をプールし、致死量放射線（950 cGy）を照射した 1～4 匹/群の B6.BoyJ レシピエントマウスに 4×10^7 個の細胞を尾静脈から注入することにより移植した。11 時間後にマウスを安楽殺して骨髄を単離し、CD45.2-FTIC 及びアロフィコシアニン（APC）に結合させた細胞系統マーカーを用いてフローサイトメトリーにより細胞の表現型を評価した。各マウスについてドナー細胞（Sca1 陽性 c-kit 陽性 Lin 陰性細胞）の割合を求め、移植した細胞の回収率を算出した。

ホーミングした細胞が真の HSC であるかを検討するため、競合的骨髄再構築試験を実施した。本試験では、一次移植 CD45.1 陽性 B6.BoyJ レシピエントマウスの骨髄から単離した 3×10^5 個の CD45.2 陽性 C57BL/6 ドナー細胞を B6.BoyJ ドナーマウス由来の 10^5 個の骨髄細胞と共に、致死量放射線（950 cGy）を照射した二次移植用 B6.BoyJ マウスに静脈内投与した。1 ヵ月に 1 回マウスの尾静脈から採血し、CD45.2 陽性又は CD45.1 陽性の末梢血白血球の比率を測定することにより、ドナー細胞に由来する造血を分析した。

結果及び結論： CD45.2 陽性 Sca1 陽性 c-kit 陽性 Lin 陰性細胞の回収率は G-CSF により動員された細胞と plerixafor で動員された細胞で同程度であったが、plerixafor+G-CSF により動員された細胞ではそれらより低かった。しかし、競合的骨髄再構築アッセイにおけるキメリズムの比率は G-CSF により動員された細胞と plerixafor+G-CSF により動員された細胞で同程度であった。

要約：Plerixafor は、単独でマウス HPC を速やか、かつ用量依存的に動員した。Plerixafor を 24 時間間隔で反復投与したとき、一貫した HPC の動員が認められたことから、plerixafor の HPC 動員能に感受性の減弱はみられなかった。Plerixafor は C57BL/6、C3H/HeJ 及び Fancc$^{-/-}$といった G-CSF による HPC 動員作用が弱い系統を含むマウスの検討したすべての系統で G-CSF により誘発された動員を増強することが示された。

Plerixafor は、単独及び G-CSF との併用により、長期生着能を有するマウス HSC を動員し、G-CSF 単独投与時よりも多数の細胞を動員した。NOD/SCID マウスを用いた SRC アッセイにおいて、plerixafor は、ヒト HSC を動員し、G-CSF との相乗作用を示した。

Plerixafor+G-CSF により動員されたヒト CD34 陽性細胞は、生着能の高いマウス HSC と類似した表現型を有していた。表現型試験から、plerixafor により動員された細胞の高い生着能を表す表現型は、これらの細胞のホーミング能とは関連しないことが示された。

2.2.4　イヌ自家移植モデルにおける plerixafor の造血幹細胞動員作用

試験番号 AOM0045 [Module 4.2.1.1-14]
試験番号 AOM0049 [Module 4.2.1.1-15]
Burroughs, 2005, *Blood* (29) [Module 4.3-19]

目的：イヌの HSC 移植モデルを用いて、plerixafor の単回投与により CD34 陽性造血細胞が末梢血へ動員されることを確認するとともに、plerixafor により動員された細胞を自家移植すると、早期かつ長期にわたり生着することを確認する。

方法：最大動員時期を測定するため、4 匹のイヌに plerixafor（4 mg/kg、皮下）を投与し、血液試料を 1、2、4、6、8、10 及び 24 時間の時点で採取し、フローサイトメトリーで CD34 陽性細胞、コロニー形成アッセイで HPC を分析した（AOM0045）。Plerixafor 投与 6 時間後に PBMC を血液試料から単離して培養し、CXCR4 発現を FITC 標識抗 CXCR4 抗体を用いたフローサイトメトリー（n=2）、^{125}I-SDF-1 リガンド結合（n=1）及び SDF-1 介在性カルシウム流入（n=2）により分析した（AOM0049）。

移植試験では、4 匹のイヌに plerixafor（4 mg/kg、皮下）の投与 6～7 時間後から 3～4 時間にわたりアフェレーシスを実施した。自家移植レシピエントに移植前に骨髄破壊的な全身放射線照射（920 cGy）を行った後、自家移植のために plerixafor により動員した PBMC を輸注した。輸注した総有核細胞数（TNC）の中央値は 14.4×10^8 cells/kg（範囲 4～23×10^8 cells/kg）であった。輸注した CD34 陽性細胞数の平均値は 3.9×10^6 cells/kg（範囲 2.0～8.7×10^6 cells/kg）であった。生着は末梢血の血球数により評

価した。好中球の回復時点は、好中球数が 500 cell/μL を超える状態が 3 日間連続したときの初日と定義し、血小板（PLT）の回復時点は、PLT 数が 20,000 PLT/μL を超える状態が 5 日間連続したときの初日と定義した。21 日目又は 28 日目のいずれかに骨髄穿刺液及び生検試料を採取し、細胞充実性及び形態を評価した（AOM0045）。

結果及び結論：最大動員試験では、4 匹のイヌに 4 mg/kg の plerixafor を単回皮下投与したところ、総白血球及び好中球の増加を伴う全身性の白血球増加が引き起こされた。リンパ球（1.5 倍）及び単球（4 倍）の増加も認められた。循環血中 CD34 陽性細胞も 3～10 倍に増加し、4 匹中 3 匹で plerixafor 投与の 8～10 時間後に最大となった。血液試料の in vitro CFU アッセイにおいても、plerixafor により循環血中前駆細胞レベルがベースラインの 2～5 倍に増加し、plerixafor 投与の 8～10 時間後に最大となった。CD34 陽性細胞についても同様の結果がみられた。本データから、CD34 陽性細胞及び前駆細胞の採取量を最大にするのに最適なアフェレーシス開始時間は plerixafor 投与の 6～7 時間後であると判断された。Plerixafor により動員された細胞は、CXCR4 を発現していることがフローサイトメトリー及び ^{125}I-SDF-1 リガンド結合により示され、CXCR4 が機能していることが SDF-1 介在性カルシウム流入により示された。Plerixafor はカルシウム流入阻害作用を示した（2 種類の PBMC 標本における IC_{50} は 248.7 及び 649 nmol/L）。

移植試験では、更に 4 匹のイヌに plerixafor を単回皮下投与した後、アフェレーシスを実施した。細胞の収量は以下のとおりであった：TNC 範囲 = 4.0～23 × 10^8 cells/kg（n=4）；CD34 陽性 範囲=2.0～8.7 × 10^6 cells/kg（n=4）；CD3 範囲 = 0.6～2.7 × 10^8 cells/kg（n=3）；CD4 範囲 = 0.4～1.6 × 10^8 cells/kg（n=3）；CD8 範囲 = 0.1～0.8 × 10^8 cells/kg（n=3）；CD14 範囲 = 0.3～4.5 × 10^8 cells/kg（n=4）。次に、イヌに骨髄破壊的な全身放射線照射を行った後、自家移植のために plerixafor により動員した PBMC を輸注した。

図 5及び図 6に示すように、移植後の好中球及び PLT 生着時間の中央値は、それぞれ 9 日（範囲=7～10 日）及び 25 日（範囲=23～38 日）であった。

出血性の合併症のため輸血が必要となったイヌはいなかった。21 又は 28 日目に行った骨髄穿刺では、4 匹中 3 匹で骨髄の細胞充実性の軽度低下（正常値の 75～80%）がみられ、巨核球産生が正常値の 75～80%と推定された。追跡期間の中央値は 10 ヵ月（範囲=5～12 ヵ月）であったが、その期間全例生存し、造血機能も正常であった。

図 5 - Plerixafor により動員された細胞をイヌに自家移植したときの好中球の生着

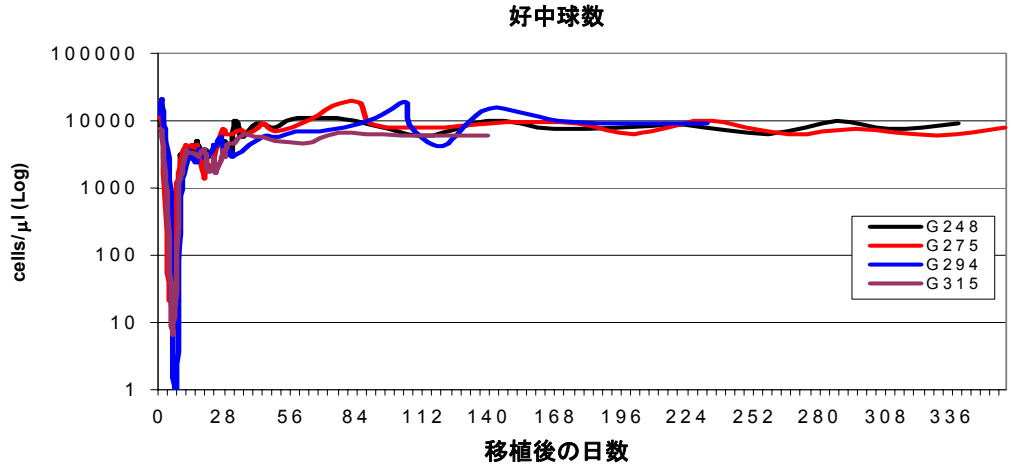
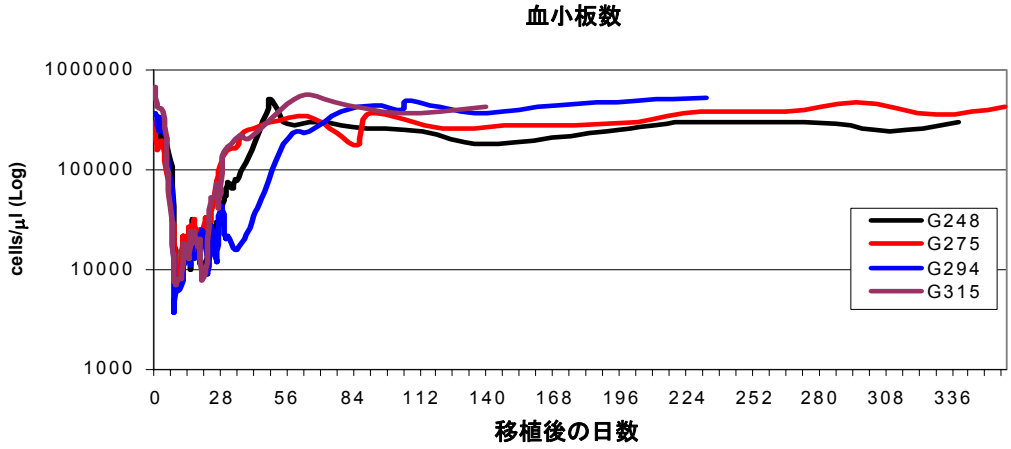


図 6 - Plerixafor により動員された細胞をイヌに自家移植したときの血小板の生着



以上のことから、plerixafor をイヌに単回投与すると末梢血中 CD34 陽性造血細胞数が増加することが示された。Plerixafor により動員された細胞を骨髄破壊的な全身放射線照射を行ったイヌに自家移植すると、早期かつ長期にわたり好中球及び PLT が生着した。

2.2.5 イヌ同種移植モデルにおける plerixafor の造血幹細胞動員作用

試験番号 AOM0046 [Module 4.2.1.1-16]

Burroughs, 2005, *Blood* (29) [Module 4.3-19]

目的: イヌ同種移植モデルを用いて plerixafor により動員された細胞の長期生着能を評価するとともに、plerixafor により動員された細胞を移植すると造血系が再構築することを確認する。

方法：同種移植試験にはイヌ白血球抗原（DLA）同型同腹子を用いた。ドナーイヌに plerixafor を 4 mg/kg で皮下投与し、投与 6～7 時間後にアフェレーシスを開始した。5 匹のレシピエントイヌに骨髄破壊的な全身放射線照射（920 cGy）による前処置を行った後、plerixafor により動員された PBMC を移植した（CD34 陽性細胞数の中央値 = 4.7×10^6 cells/kg）。生着は末梢血の血球数により評価した。好中球の回復時点は、好中球数が 500 cell/μL を超える状態が 3 日間連続したときの初日と定義した。PLT の回復時点は、PLT 数が 20,000 PLT/μL を超える状態が 5 日間連続したときの初日と定義した。レシピエントの造血へのドナー細胞の寄与をドナー細胞とレシピエント細胞を識別するイヌマイクロサテライト多型のプローブを用いた末梢血のキメリズム解析により評価した。

結果及び結論：Plerixafor により動員された PBMC を同種移植した 5 匹のイヌのうち 1 匹では、早期の生着がみられたものの、plerixafor 投与と関連のないイヌ単純ヘルペスウイルス感染及び膵炎により移植 18 日後に安楽殺した。残りの 4 匹において、好中球及び PLT が回復するまでの時間の中央値は、それぞれ移植後 8 日（範囲＝8～10 日）及び 26 日（範囲＝21～37 日）であった。フォローアップ期間（3.0～9.6 ヵ月）の中間時点である 7.6 ヵ月目において、4 匹のイヌは 100%ドナー末梢血単核球細胞キメリズムを示した。

4匹のイヌは70週まで生存した。4匹すべてにおいて末梢血球数は正常であり、剖検時のドナーPBMC のキメリズムは 98～100%であった。剖検時における骨髄の細胞充実性は正常（n=2）、軽度低下（n=1）又は中等度低下（n=1）であった（表 4）。

以上、イヌに骨髄破壊的な前処置を行った後、DLA 同型同腹子由来の同種造血細胞を移植すると、plerixafor により動員された PBMC による短期及び長期の骨髄再構築が認められた。

表 4 - Plerixafor により動員された細胞を同種移植したイヌの剖検時における骨髄評価

イヌ個体番号	好中球及び血小板数	剖検時における骨髄評価	ドナー末梢血顆粒球のキメリズム (%)	ドナー末梢血単核球のキメリズム (%)	剖検 (週)	死因
G383	正常	正常な細胞充実性及び三血球系の生着	100	99.1	70	試験終了
G378	正常	細胞充実性の軽度低下及び三血球系の正常な生着	100	100	68	試験終了
G422	好中球数正常	細胞充実性の顕著な低下、赤血球及び巨核球の減少	99	89	18 日目	膵炎により安楽殺
G375	正常	正常な細胞充実性	100	98.1	55	試験終了
G455	正常	細胞充実性の中等度低下	100	100	60	試験終了

2.2.6　非ヒト霊長類における plerixafor により動員された造血幹細胞の特性及び長期自己複製能

Larochelle, 2006, *Blood* (30) [Module 4.3-65]

目的：アカゲザル自家移植モデルを用いて plerixafor により動員された CD34 陽性細胞の長期自己複製能を確認するとともに、plerixafor により動員された細胞の特性を G-CSF により動員された細胞と比較する。

方法：若齢アカゲザル（n = 6）に plerixafor（1 mg/kg、アロメトリック・スケーリングに基づいて設定した用量）を 1 回又は 2 回皮下投与し、HSC を動員した。Plerixafor 投与 3 時間後にアフェレーシスを開始し、細胞を採取した。そのうち 4 匹のサルには plerixafor による動員の 1 ヵ月後に G-CSF（10 µg/kg）を 1 日 1 回 3 日間投与し、4 日目に 1 日 2 回投与した後、アフェレーシスにより再び細胞を採取した。採取したすべての細胞は、ネオマイシン耐性遺伝子（Neo）を含むレトロウイルスベクター（G1Na 又は LNL6）を導入することによりマーキングした。2 回の放射線（500 cGy）照射により骨髄を破壊した後、4 匹を自家移植に用いた（2 匹に plerixafor により動員された細胞、2 匹に plerixafor により動員された細胞と G-CSF により動員された細胞を合わせて移植した）。5 日目にアフェレーシスにより細胞を採取し、血液試料を移植後最初の 6 ヵ月間は月 1 回、その後は移植 32 ヵ月後まで 3 ヵ月ごとに採取した。PBMC 及び顆粒球の Neo 遺伝子をリアルタイム PCR により分析した。長期自己複製能を有する HSC により血液学的に再構築されたことを示す指標は、レトロウイルスによりマーキングした造血細胞が移植数ヵ月後にレシピエントの末梢血中に検出されることである。残りの 2 匹には表現型分析に用いた。動員された CD34 陽性細胞の細胞周期の状態、細胞表面表現型、in vitro での SDF-1 に対する遊走性を調べることにより表現型分析を行った。

結果及び結論：動員効率には個体間で変動がみられた（すなわち、移植に十分な細胞を採取するのに 1 匹のサルでは plerixafor を 2 回投与し、再びアフェレーシスを実施する必要があった）。

好中球数の 500 cell/µL への回復及び遺伝子マーキングにより測定した生着は、7～14 日以内に速やかに認められた。Neo 遺伝子でマーキングした PBMC 及び顆粒球は、いずれの時点においても認められた。Neo 遺伝子でマーキングした骨髄性及びリンパ性細胞は移植 32 ヵ月後まで長期間持続的に認められた。32 ヵ月後における PBMC、B 細胞、T 細胞及び顆粒球の Neo 遺伝子マーキングレベルは、1 匹のサルでそれぞれ 0.5%、0.2%、0.5%及び 0.05%、別の 1 匹では 5%、1%、4%及び 3%であった。レトロウイルスでマーキングされた plerixafor により動員された CD34 陽性細胞を用いたこれらの長期 in vivo マーキングの結果から、plerixafor は真の長期自己複製能を有する HSC を動員することが示された。

識別可能な Neo を含むレトロウイルスベクターで 2 つの細胞集団をマーキングした 2 匹の動物を用いた競合的骨髄再構築アッセイにおいて、plerixafor により動員された細胞を G-CSF により動員された

細胞と比較した。Plerixafor により動員された細胞に由来する PBMC 及び顆粒球は移植 24 ヵ月後までのすべての時点で検出された（24 ヵ月後の時点での PBMC、B 細胞、T 細胞及び顆粒球の Neo 遺伝子マーキングは、1 匹のサルでそれぞれ 3%、2%、3%及び 0.6%、別の 1 匹では 0.1%、0.3%、0.1%及び 0.01%であった）が、G-CSF により動員された細胞に由来する細胞は 24 ヵ月を通して少なく、24 ヵ月後には検出されなかった。

動員された CD34 陽性細胞の表現型解析では、plerixafor により動員された細胞は、G-CSF により動員された細胞と比べて、細胞周期の G_1 期にある比率が高く（それぞれ 64 ± 20%及び 17 ± 8%）、また CXCR4（それぞれ 53 ± 23%及び 11 ± 9%）及び VLA-4（それぞれ 71 ± 13%及び 41 ± 23%）を発現している比率も高かった。これを反映して、plerixafor により動員された細胞の方が SDF-1 への遊走能が高かった（plerixafor により動員された細胞及び G-CSF により動員された細胞でそれぞれ 45 ± 22%及び 8 ± 1%）。これらの結果から、plerixafor により動員された造血幹細胞集団の固有特性は、G-CSF により動員された造血幹細胞集団のそれとは異なることが示される。

以上、非ヒト霊長類自家移植モデルにおいて、plerixafor により動員された HSC は、G-CSF により動員された HSC に比べ、長期自己複製能を有し、特有の性質を有することが示された。

2.2.7 造血幹細胞移植の前処置レジメンとしての動員

Chen, 2006, *Blood* (31) [Module 4.3-23]

目的：同種造血幹細胞移植前に plerixafor による動員を行うことにより、骨髄内でドナー細胞が生着できる空のニッチ数が増加して前処置レジメンとしての有用性を示す可能性を検討する。

方法：並体結合マウスにおける動員：6～10 週齢の性別及び体重を一致させた 3 ペアの ROSA26（C57BL/6J-Gtrosa26. Ly5.2）と PeP3^b（B6 SJL/Ly5.1）マウスに並体結合手術（2 匹の動物の皮膚及び筋肉を縫合することにより両者を外科的に結合させる）を施した。これらのマウスの遺伝的背景は C57BL/6J で同一であったが、異なる造血細胞抗原（それぞれ CD45.2 及び CD45.1）を発現しており、これらはフローサイトメトリーで容易に識別できる。各マウスに plerixafor（5 mg/kg 皮下）を並体結合 21 日目に投与した。その後、42 日目（plerixafor 投与 3 週後、並体結合 6 週後）にマウスを分離し、血液、骨髄及び脾臓中の顆粒球、前駆細胞（CFU-GM）及び HSC を測定した。6 ペアの未処置並体結合マウスを対照として用いた：3 ペアを並体結合 3 週後、3 ペアを並体結合 6 週後に測定した。

HSC 数の測定は、並体結合マウス由来の骨髄細胞を放射線照射した C57BL/6J（B6.Ly5.2）又は PeP3^b レシピエントに二次移植することにより行った。移植 3 ヵ月後に、血液及び骨髄中顆粒球の PeP3^b 表現型に対する ROSA26 表現型の比率をフローサイトメトリーにより測定した。骨髄中 CFU-GM の PeP3^b 表現型に対する ROSA26 表現型の比率をコロニー形成アッセイにより測定した。

Plerixafor 動員後移植試験：PeP3^{b} 及び雌の Balb/cByJ マウスに plerixafor を投与し、放射線を事前に照射せず、2 時間後、6 時間後、又は 2 及び 6 時間後の両方に 4×10^{7} 個のドナー骨髄細胞（それぞれ ROSA26 及び雄の Balb/cByJ マウス由来）を移植した。対照動物には plerixafor を投与せずドナー細胞を移植した。3 ヵ月目にドナー細胞の生着をフローサイトメトリー（PeP3^{b} マウス）又は雄特異的性決定領域 Y 染色体遺伝子を用いた定量的リアルタイム PCR（Balb/cByJ マウス）により評価した。

結果及び結論：並体結合マウスにおいて plerixafor で動員すると、並体結合パートナーの骨髄におけるパートナーHSC の比率が対照のベースライン値の 1.4 ± 0.4%から 5.5 ± 2.3%に有意に上昇した（p = 0.05）ことから、HSC がパートナーの骨髄に移行したことが示された。

PeP3^{b} マウスに plerixafor を移植 2 時間前に投与した移植試験では、plerixafor 投与群におけるドナー細胞の生着率（4.6 ± 1.1%）が対照群（1.0 ± 0.24%）よりも高かった（p< 0.001）。動物に plerixafor を週 1 回連続 3 週間投与し、各動員の 2 時間後にドナー骨髄細胞を移植したところ、ドナー細胞の生着率が有意に上昇した（9.1 ± 1.7%、p=0.001）。Balb/cByJ マウスを用いて同様の実験をしたところ、PeP3^{b} マウスと比べて plerixafor による動員効率が悪く、plerixafor を投与したレシピエントへの生着率に対照との統計学的有意差は認められなかった。

以上、並体結合試験において、HSC は骨髄内のニッチから放出され、血中を移動し、最終的にはパートナーの骨髄内の空のニッチに生着することが示された。レシピエントマウスに plerixafor を移植前に投与した移植試験では、plerixafor を投与したレシピエントにおけるドナー細胞の生着率が対照と比べて高かったことから、plerixafor の前投与により骨髄内のニッチから細胞が放出され、移植に使用できるニッチが増加することが示された。これらのデータを総合すると、空のニッチ数が HSC の生着数を決定するとともに、同種移植の前処置レジメンとして plerixafor による動員を行うと HSC の生着が促進されることが示唆される。

3 副次的薬理試験

3.1 序文

Plerixafor は、HSC 以外の種々の幹細胞及び前駆細胞集団を動員することにより、MI 後の血管修復といった他の疾患過程に影響を及ぼす可能性がある。また、plerixafor の標的である CXCR4 は様々な組織に発現しており、そのリガンド SDF-1 とともに様々な疾患状態に関与している。これらの疾患には、HIV（CXCR4 が HIV ウイルスの侵入に使用される共受容体の 1 つである）(3),(13)などの免疫系に関連する疾患、喘息(33)及び関節リウマチ(11)などの炎症性疾患が含まれる。CXCR4 は、血液を起源とするがん(18),(34),(35),(36),(37),(38)及び固形腫瘍(39),(40),(41),(42),(43),(44),(45)のいずれにおいても発現していることが報告されており、腫瘍の増殖、進行及び転移に関連している。SDF-1/CXCR4 axis が発症に関与している疾患モデルにおいて、plerixafor を CXCR4 アンタゴニストとして使用し、CXCR4 阻害の影響を検討する探索試験を数試験実施した。これらの試験を表 5 に要約する。これらの試験では GLP 規制を適用せずに実施した。特に記載のない限り、すべての試験で遊離塩基を用いた。

1

表 5 - 副次的薬理試験の一覧

項	試験の種類	試験系及び投与方法	実施施設	試験番号 参考文献
3.2	Plerixafor の抗 HIV ウイルス活性	In vitro	Rega Institute for Medical Research	Hatse 2002 (23), De Clercq 1994 (46), Schols 1997a (47), Schols 1997b (48),
			Johnson Matthey Pharmaceutical Research	Bridger 1995 (49)
			The Aaron Diamond AIDS Research Center	Donzella 1998 (50)
3.3	Plerixafor による心筋の血管新生部位への血管内皮前駆細胞の動員	FVB マウス 単回皮下投与 125 µg/マウス	[redacted]	AOM0048 [4.2.1.2-1]
3.4	ブタ心筋梗塞モデルにおける plerixafor の影響	雄ヨークシャーブタ 240 µg/kg を単回皮下投与, 4 mg/kg を単回皮下投与, 4 mg/kg を 1 日 1 回 1 週間皮下投与	[redacted]	AOM0072 [4.2.1.2-2]
3.5	サルにおける plerixafor の心筋梗塞後の幹細胞動員及びリモデリング、心機能改善への影響	アカゲザル 梗塞 2 日後から 5 日後まで 1 mg/kg を静脈内投与	[redacted]	GT-249-EF-1 [4.2.1.2-3]
3.6	糖尿病マウスにおける後肢虚血誘発後の plerixafor による後肢への血流の回復	Hfh11 ヌードマウス 5 mg/kg を 2 回皮下投与	AnorMED	AOM0047 [4.2.1.2-4]
			University of Iowa	Jiao 2006 (51)
3.7	急性後肢虚血マウスにおける plerixafor による血流改善	C57BL/6 マウス 5 mg/kg を 3 日間皮下投与、又は G-CSF 250 µg/kg を 5 日間投与後 plerixafor 5 mg/kg を皮下投与	Washington University School of Medicine	Capoccia 2006 (52)
3.8	アレルギー性肺炎症マウスにおける plerixafor による炎症及び気道反応性亢進の軽減	CBA/J マウス 持続皮下投与 250 µg/kg/h	University of Michigan Medical School	Lukacs 2002 (53)

項	試験の種類	試験系及び投与方法	実施施設	試験番号 参考文献
3.9	IFN-γ 受容体ノックアウトマウスにおける plerixafor による自己免疫性関節炎症の軽減	IFN-γ 受容体ノックアウト DBA/1 マウス 持続皮下投与 180, 600 µg/body/日	Rega Institute for Medical Research	Matthys 2001 (54)
3.10	コラーゲン誘発関節炎マウスにおける plerixafor による炎症の軽減	DBA/1 マウス Alzet ポンプによる持続投与 600 µg/body/日	Rega Institute for Medical Research	De Klerck 2005 (55)
3.11	Plerixafor の腫瘍細胞に対する in vitro 活性	In vitro	Rega Institute for Medical Research	Hatse 2002 (56) Lagneaux 2002 (57),
			European Institute of Oncology	Paul 2002 (58)
			University of Rochester Medical Center	Liesveld 2004 (59)
			Queen Mary's School of Medicine and Dentistry	Scotton 2002 (60)
			Dana–Farber Cancer Institute	Rubin 2003 (61)
3.12	リンパ腫モデルにおける plerixafor の in vitro 及び in vivo 活性	NOD/SCID マウス Namalwa 細胞の異種移植 12 又は 2.5 mg/kg/日を 28 日間持続皮下投与、又は 10 mg/kg を週 1 回 3 週間皮下投与	European Institute of Oncology	Paul 2002 (58)
3.13	マウスにおける plerixafor の急性リンパ性白血病細胞の動員及び生着への影響	NOD/SCID マウス ヒト ALL 細胞の異種移植 10 mg/kg を皮下投与、又は 200 µg/body/日を持続皮下投与若しくは連日皮下投与（20 日間）	Westmead Institute for Cancer Research	Juarez 2007 (62)
3.14	マウスにおける plerixafor の急性前骨髄球細胞の動員及び化学療法感受性への影響	APL トランスジェニックマウス 5 mg/kg を皮下投与	Washington University School of Medicine	Nervi 2005 (63)
3.15	マウスにおける plerixafor の原発性脳腫瘍の頭蓋内増殖への影響	NCR ヌードマウス U87 又は Daoy 細胞の異種移植 0.24～0.36 mg/日を 21 日間持続皮下投与	Dana–Farber Cancer Institute	Rubin 2003 (61)

3.2 Plerixafor の抗 HIV ウイルス活性

Hatse, 2002, *FEBS Lett* (23) [Module 4.3-45]
De Clercq, 1994, *Antimicrob Agents Chemother* (46) [Module 4.3-28]
Bridger, 1995, *J Med Chem* (49) [Module 4.3-14]
Schols, 1997, *Antiviral Res* (47) [Module 4.3-104]
Schols, 1997, *J Exp Med* (48) [Module 4.3-105]
Donzella, 1998, *Nat Med* (50) [Module 4.3-33]

目的：T 細胞指向性 HIV-1 ウイルスはウイルス侵入の際に共受容体として CXCR4 を CD4 とともに使用し、マクロファージ指向性ウイルスはウイルス侵入の際に共受容体としてケモカイン受容体 CCR5 を使用する。Plerixafor の抗 HIV ウイルス活性を確認するとともに、抗 HIV ウイルス活性のメカニズムを検討する。

被験物質：Plerixafor 八塩酸塩

方法：抗ウイルス活性アッセイ：Plerixafor を T 細胞指向性 HIV-1 株（III_B、RF、NL4.3）、マクロファージ指向性 HIV-1 株（BaKm SF0162、ADA、JR-FL）及び HIV-2 株（ROD）が導入されたホスト細胞（フィトヘマグルチニンで刺激した初代ヒトリンパ球、初代ヒト PBMC、MT-4、MOLT-4、SUP-T1 リンパ芽球様細胞株）と共にインキュベートした。細胞にウイルスを感染させ、感染後 6 日目及び 10 日目に上清を回収した。リンパ芽球様細胞株については、インキュベーション期間終了時に MTT テトラゾリウムベースの比色アッセイを用いて生細胞を定量した。初代リンパ球の抗ウイルス活性は、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）でウイルス抗原 p24 の産生を測定することにより評価した。マクロファージ指向性株の抗ウイルス活性は、顕微鏡検査又は p24 抗原により測定した細胞変性作用により評価した。

作用メカニズム試験：添加時期について HIV-1（III_B）感染 MT-43 細胞を用いて plerixafor 添加時期について検討した。Plerixafor をウイルス感染前後の様々な時点で添加し、感染 29 時間後に p24 を測定した。SUP-T1 細胞における CXCR4 発現は、特異的抗 CXCR4 抗体 12G5 を用いてフローサイトメトリーで確認した。MT-4 細胞及び NL4.3 ウイルス、並びに NL4.3 耐性ウイルスを SDF-1 と共にインキュベートし、抗ウイルス活性を上記のように測定した。

結果及び結論：Plerixafor は T 細胞指向性 HIV-1 株及び HIV-2 株に対して強力な阻害作用を示し、その EC_{50} 値は 2～7 ng/mL であった。しかし、plerixafor はマクロファージ指向性 HIV-1 株に対して活性を示さなかった。添加時期についての検討では、plerixafor はウイルス感染の時点で添加した場合に

のみウイルスの複製を阻害した。ウイルス感染後に添加した場合には阻害は認められなかった。Plerixafor の抗ウイルス活性のメカニズムに関する試験では、plerixafor は CXCR4 と相互作用することにより抗 HIV ウイルス活性を発揮することが示された。

3.3 Plerixafor による心筋の血管新生部位への血管内皮前駆細胞の動員

試験番号 AOM0048 [Module 4.2.1.2-1]

目的：Plerixafor が MI 後の心筋血管新生部位へ骨髄由来 EPC を動員し、その結果、機能回復が促進される可能性を検討する。

方法：EPC 動員：雄 FVB マウスに plerixafor（125 μg/マウス）を投与し、定期的に血液試料を採取した。血管内皮細胞系の指示薬であるアセチル化 LDL（acLDL）-DiI 及び *Bandeiraea simplicifolia*（BS-1）レクチン I で共染色することにより EPC を測定した。EPC は蛍光顕微鏡下で紡錘形の二重陽性細胞として同定した。また、蛍光活性化細胞選別法（FACS）においても、Sca-1 及び Flk-1 の発現により EPC を同定した。同様の試験を MMP-9$^{-/-}$マウスを用いて実施した。

MI の動物モデル：雄 FVB マウスの左冠動脈左前下行枝を結紮し、MI を誘発した。胸壁を閉じた後、マウスを無作為に群分けし、125 μg/マウスの plerixafor 又は同量の生理食塩液（対照群）を MI 誘発 1 時間後に単回皮下投与した。

FVB/N マウスにドナーの Tie-2（Tie-2 は血管内皮細胞マーカー）トランスジェニックマウスから骨髄細胞を移植した。Tie-2 トランスジェニックマウスでは、β-ガラクトシダーゼ遺伝子（LacZ）の発現が Tie-2 プロモーターにより制御されている。4 週後に骨髄が再構築された後、Tie-2 キメラマウスを無作為に群分けし、MI の 1 時間後に plerixafor 又は生理食塩液を投与した。両群のマウスを MI の 1 及び 2 週後に安楽殺した。

心血管系及び血行動態のパラメータを MI 前及び MI の 1、2 及び 4 週後に測定した。野生型マウスの心臓の組織学的検査をトリクローム染色、ヘマトキシリン／エオジン染色又は免疫組織化学染色により実施した。細胞を β-ガラクトシダーゼ X-gal 染色液と共にインキュベートし、LacZ 発現細胞を同定した。

結果及び結論：正常及び MI 誘発 FVB/N マウスに plerixafor を単回皮下投与すると、いずれにおいても EPC の動員が認められた。梗塞周囲領域の組織学的検査において、plerixafor 投与動物の毛細血管密度が高かったことから、心筋の血管分布が増加したことが示された。MMP-9$^{-/-}$マウスでは EPC の動員が認められなかった。

MI の 1 及び 2 週後に FVB/N-Tie-2 キメラマウスの梗塞領域及び梗塞周囲領域に β-ガラクトシダーゼの発現が認められた。光学顕微鏡により X-gal 陽性細胞数を定量すると、plerixafor 投与群における陽性細胞数は対照群よりも明らかに多かった。また、二重蛍光免疫組織化学染色において、plerixafor 投与群では、より多くの細胞がイソレクチン B4 及び β-ガラクトシダーゼについて二重陽性を示した。

心臓弾性組織の組織学的検査では、MI の 4 週後に対照群の左心室内腔の明らかな拡大が認められた。一方、plerixafor 群では明らかに左心室リモデリングが抑制されていた。さらに、左心室領域に対する線維化領域の比率が plerixafor 投与群で有意に低かった（38.0 ± 4.4%対 57.5 ± 5.4%、$p < 0.05$）。

心エコー検査では、MI の 2 週後に plerixafor 投与マウスで心室リモデリングの抑制が認められた。MI の 4 週後に左室収縮期圧（投与群で高値）及び左室拡張末期圧（投与群で低値）の改善がみられた。2 及び 4 週間後の LV+dP/dt 及び短縮率も対照群に比べて plerixafor 群で明らかに維持されていた。カプラン・マイヤー生存分析では、未処置群に比べて plerixafor 群で生存期間の延長が認められた。

以上、plerixafor は、正常マウス及び MI 後のマウスのいずれにおいても EPC を動員する。Plerixafor による EPC の動員は一部 MMP-9 を介していた。Plerixafor の投与により MI 後の心筋の血管新生が促進され、左心室の機能及び構造が維持された。その結果、plerixafor 投与により生存期間が延長した。

3.4　ブタ心筋梗塞モデルにおける plerixafor の影響

試験番号 AOM0072 [Module 4.2.1.2-2]

目的：ブタの MI 後に plerixafor が骨髄からの EPC の動員を促進し、その結果、機能回復が促進される可能性を検討する。

方法：冠動脈左前下行枝中間部又は近位部のいずれかをバルーンカテーテルで 90 分間閉塞することにより MI を誘発した。動物を 4 群に分け、MI の直後に plerixafor の 240 µg/kg、4 mg/kg 若しくは 4 mg/kg/日（連日 7 日間投与）、又は生理食塩液（単回投与）を皮下投与した。心血管系及び血行動態のパラメータを MI 前並びに MI 後 1 及び 35 日目に測定した。血液試料を MI 前及び MI 後に定期的に採取し、PBMC 及び EPC（培養アッセイ）を測定した。35 日目に動物を安楽殺し、心臓を単離して組織学的検査を実施した。

結果及び結論：MI 後 1 週目において PBMC 及び EPC に変化は認められなかった。その後も平均 PBMC についてはいずれの時点においても有意差がみられず、EPC 数については 35 日目においてのみ対照群（$2.8 \pm 2.9 \times 10^5$ cell/mL）と plerixafor の 4 mg/kg 単回投与群（$5.6 \pm 1.5 \times 10^5$ cell/mL）又は連日 7 日間

投与群（$5.6 \pm 1.8 \times 10^5$ cell/mL）との間に有意差が認められた。投与動物において対照と比較したときの左心室機能（駆出率又は左心室拡張末期容積）及び血行動態パラメータの改善は 35 日間を通してみられなかった。非梗塞領域には投与群と対照群との間で統計学的有意差は認められなかったが、左心室容積に対する瘢痕領域の比は対照群（5 ± 2%）と比べて plerixafor の 4 mg/kg 単回投与群（10 ± 3%）及び連日 7 日間投与群（9 ± 3%）で有意に大きかった（$p < 0.05$）。

これらの検討結果において、ブタの MI 後に plerixafor による骨髄から末梢循環血中への EPC の動員、左心室機能の維持及び瘢痕の減少はいずれもみられなかった。しかし、データには試験内でいくつか矛盾した特徴がみられることから、明確な結論を得ることは困難である。顕著な矛盾点の 1 つとして、血管造影検査で重度の左心室機能障害がみられるにもかかわらず、組織学的検査で梗塞サイズが比較的小さいことが挙げられる。

3.5 サルにおける plerixafor の心筋梗塞後の幹細胞動員及びリモデリング、心機能改善への影響

試験番号 GT-249-EF-1 [Module 4.2.1.2-3]

目的：MI 後に plerixafor が幹細胞を動員し、左心室機能、左心室リモデリング、梗塞サイズ及び組織学的パラメータに影響を及ぼす可能性を検討する。

方法：成獣アカゲザルの冠動脈左前下行枝を 120 分間結紮し、可逆的に冠動脈を閉塞することにより MI を誘発した。投与群の動物（n=11）には梗塞後 2～5 日目まで plerixafor を 1 mg/kg の用量で静脈内投与した。対照動物（n=9）には何も投与しなかった。

血液試料を plerixafor 投与の 1 週前（ベースライン値）、手術（0 日目）の 3～6 時間後、2 及び 5 日目の plerixafor 投与 2～3 時間後、及び梗塞の 6 及び 12 週後に採取した。標準的血液分析装置で総血球数、フローサイトメトリーで CD34 陽性幹細胞を測定することにより、動員を評価した。

MI の 1 週又はそれ以上前、並びに MI の 1、6 及び 12 週後に心機能を磁気共鳴画像法（MRI）により評価した。動物を MI の 12 週後に安楽殺した。心臓の組織学的検査として、ヘマトキシリン／エオジン染色、マッソン・トリクローム染色、デスミン及び転写因子 MEF-2 を抗体で染色する筋細胞中間径フィラメントの免疫組織化学的染色及び共焦点顕微鏡観察を実施した。

結果及び結論：Plerixafor 投与群で 1 匹、対照群で 2 匹の動物が死亡し、死亡は手術後の心不整脈に起因すると考えられた。いずれの動物においても plerixafor 投与による毒性はみられなかった。

CD34 陽性細胞は、対照群では 2 日目に 2.6 倍、5 日目に 5.6 倍に増加したが、plerixafor 投与群（n＝10）では、2 日目に 5.3 倍（p=0.005）、5 日目に 13 倍に増加した（p=0.001）。総 WBC は 5 日目に対照群で 1.3 倍、plerixafor 投与群で 4 倍に増加し、6 週目までには両群ともに正常レベルに戻った。

MI の 1 週後に MRI で測定した平均梗塞サイズは、plerixafor 投与群で左心室の 17%、対照群で 21%であった。いずれの群においても、梗塞サイズには 12 週間にわたり有意な変化はみられなかった。左心室のリモデリング及び機能の指標についても同様に、plerixafor 投与群及び対照群のいずれにおいても、12 週間にわたり改善は認められなかった。

組織学的検査では、心室中隔及び左室前部の心筋に瘢痕が認められた。対照群及び plerixafor 投与群で梗塞障害は同程度であり、両群ともに瘢痕領域内に筋細胞又は新規の増殖は認められなかった。免疫組織化学分析では、plerixafor 投与群及び対照群のいずれにおいても、梗塞領域に筋細胞はみられず、同様の心筋構造を有していることが示された。

以上、plerixafor の投与により CD34 陽性幹細胞は動員されたが、左心室機能、左心室リモデリング及び梗塞サイズは改善されず、心筋再生も誘発されなかった。Plerixafor の投与に起因すると考えられる毒性は認められなかった。

3.6　糖尿病マウスにおける後肢虚血誘発後の plerixafor による後肢への血流の回復

試験番号 AOM0047 [Module 4.2.1.2-4]

Jiao, 2006, *Diabetologia* (51) [Module 4.3-51]

目的：糖尿病マウスの後肢に虚血を誘発させた後、plerixafor 又は plerixafor により動員された CD34 陽性細胞を直接注入すると後肢への血流が改善するか否かを検討する。

方法：雄 Hfh11 ヌードマウスにストレプトゾトシン（140 mg/kg）を単回皮下投与することにより糖尿病を誘発した。ストレプトゾトシン投与 3～4 週間後、腸骨動脈を結紮し、一部を切除することにより左後肢を虚血にした(64)。虚血の直後に plerixafor（5 mg/kg）を皮下投与し、46～52 時間後に再投与した。対照には投与を行わないか、又は生理食塩液を投与した。第 2 の実験では、虚血 2～4 時間後に、末梢血から採取した非動員 CD34 陽性 PBMC 又は健康被験者に plerixafor（240 µg/kg）を投与後動員された CD34 陽性ヒト PBMC をマウス虚血後肢の筋肉内に 1×10^6 個注入した。非投与マウスを対照に用いた。

虚血前（0 日目）、虚血直後（0 日目）及び虚血 24 日後までの肢の血流を走査型レーザードップラー装置で測定した。虚血（左）肢の血流を非虚血対側（右）肢の血流で正規化し、両肢の虚血前の血流の差で補正した。

結果及び結論：Plerixafor の直接投与により、対照と比べて血流の回復が促進され、24 日目まで血流の相対的な改善が持続した。

CD34 陽性細胞を直接注入すると、注入 6 日後に非投与対照と比較して血流の回復が明らかに促進された。非動員 CD34 陽性 PBMC を注入した肢の血流は、虚血 8 日後までに虚血前の血流の 70.7 ± 3.9% でプラトーになった。対照マウスの肢における血流は、同程度（64.7 ± 4.6%）でプラトーになったが、このレベルに達したのは 15 日後以降であった。一方、plerixafor により動員された CD34 陽性 PBMC を注入した肢の血流は、12 日目まで改善し続け、その後血流は虚血前の血流の 89.5 ± 6.6%でプラトーになった。この血流は対照及び非動員 CD34 陽性 PBMC を注入した肢のいずれの血流よりも有意に多かった（$p < 0.05$）。

3.7　急性後肢虚血マウスにおける plerixafor による血流改善

Capoccia, 2006, *Blood* (52) [Module 4.3-20]

目的：後肢虚血マウスモデルに plerixafor を投与すると血流が改善するか否かを検討する。

方法：C57BL/6 マウスの大腿動脈を結紮及び切除することにより、後肢に虚血を誘発した。血流をレーザードップラー血流画像法で測定した。Plerixafor は 5 mg/kg を 1 日 1 回 3 日間皮下投与し、G-CSF は 250 µg/kg の用量で 7 日間持続投与した。G-CSF（250 µg/kg を 5 日間持続投与）投与後に plerixafor（5 mg/kg）を単回皮下投与することにより、CD11b 陽性細胞を動員した。CD11b 陽性細胞を採取し、後肢虚血マウスに静脈内注入した。

結果及び結論：C57BL/6 マウスを用いた後肢虚血マウスモデルに plerixafor を 1 日 1 回 3 日間皮下投与すると、血流が改善し、術後 5〜7 日目に最大効果が認められた。G-CSF を 7 日間持続投与したときにも虚血後の血流が改善したが、最大効果がみられたのは術後 10〜14 日目であった。G-CSF と plerixafor とを併用投与した場合には血流の顕著な改善が術後 4 日目からみられた。同様に、G-CSF と plerixafor との併用により動員した PBMC を輸注したときにも、血流の改善が認められた。

3.8　アレルギー性肺炎症マウスにおける plerixafor による炎症及び気道反応性亢進の軽減

Lukacs, 2002, *Am J Pathol* (53) [Module 4.3-73]

目的：アレルギー性気道疾患モデルにおける CXCR4 阻害の影響を検討する。

方法：雌 CBA/J マウスをゴキブリアレルゲンで感作した後、ゴキブリアレルゲンによる鼻腔内抗原惹起を行ったところ、Th2 により誘発される好酸球依存的な反応がみられた。気道反応性亢進をプレチスモグラフで評価した。好酸球集簇を細気管支洗浄液又は肺の組織学的検査により評価した。サイトカインを ELISA で測定した。Plerixafor を 0.1、1.0 及び 10.0 mg/kg でボーラス腹腔内投与（抗原惹起直前 [15 分以内] に投与）又は浸透圧ポンプを用いて 250 µg/kg/h の一定の注入速度（6 mg/kg/日）で 3 日間持続腹腔内投与（投与開始は抗原惹起の 1 時間前）した。

結果及び結論：Plerixafor 投与により、気道反応性亢進及び気道抵抗が低減した。Plerixafor 投与マウスでは、白血球及び好酸球の浸潤が明らかに減少した。また、それに関連して Th2 サイトカイン類（IL-4、IL-5）の減少及び Th1 サイトカイン類（IL-12、IFN-γ）の増加がみられたことから、免疫応答が Th2 から Th1 に移行したと考えられた。

3.9　IFN-γ 受容体ノックアウトマウスにおける plerixafor による自己免疫性関節炎症の軽減

Matthys, 2001, *J Immunol* (54) [Module 4.3-78]

目的：インターフェロン γ（IFN-γ）受容体ノックアウトマウスを用いたコラーゲン誘発関節リウマチモデルにおける CXCR4 阻害の影響を検討する。

方法：マウス（DBA/1 IFN-γR KO）に完全フロイントアジュバント中で乳状にしたニワトリコラーゲン II を単回皮内投与することにより免疫し、関節炎を惹起させた。Plerixafor を 180 又は 600 µg/body/日の用量でコラーゲン II 投与の 1 日前、7 日後及び 22 日後から 14 日間、Alzet 浸透圧ポンプ持続皮下投与した。コラーゲン II の右足蹠投与後の遅発性過敏症（DTH）反応を多数のパラメータ（各肢の疾患重症度スコア、肢の組織学的検査、炎症を起こした関節から採取した白血球のフローサイトメトリー）により測定し、SDF-1 が介在する採取した白血球の走化性及びカルシウム動員を評価した。

結果及び結論：コラーゲン免疫の 1 日前から plerixafor を投与すると、疾患の臨床発現が遅延し、疾患重症度が明らかに軽減した。Plerixafor の投与をコラーゲン免疫の 7 又は 22 日後から開始したときにも同様の結果がみられた。肢の組織学的検査において plerixafor 投与マウスで白血球浸潤及び滑膜過形成が抑制されたことから示されるように、plerixafor の投与によりコラーゲン II への DTH 反応も軽減された。関節腔から採取した浸潤細胞の大半は Mac-1 及び CXCR4 がいずれも陽性であった。これらの細胞はカルシウム流入アッセイ及び走化性アッセイで SDF-1 に反応した。いずれの反応も plerixafor により阻害された。以上、plerixafor の投与により IFN-γ 受容体ノックアウトマウスにおけるコラーゲン誘発関節炎の重症度が低減し、それは一部、炎症細胞浸潤阻害によるものであった。

3.10　コラーゲン誘発関節炎マウスにおける plerixafor による炎症の軽減

De Klerck, 2005, *Arthritis Res Ther* (55) [Module 4.3-29]

目的:野生型マウスのコラーゲン誘発関節リウマチモデルにおけるCXCR4阻害の影響を検討する。

方法：マウス（DBA/1）に完全フロイントアジュバント中で乳状にしたニワトリコラーゲン II を単回皮内投与することにより感作した。Plerixafor を 600 µg/body/日の用量で 14 日間持続皮下投与した。各肢について疾患重症度をスコア化した。また、肢の組織学的検査も実施した。炎症を起こした関節から白血球を採取し、フローサイトメトリーで評価した。SDF-1 が介在する脾細胞の走化性及びカルシウム動員を評価した。コラーゲン II の右足蹠への注入による惹起後の DTH 反応を以下により測定した：ELISA によるサイトカインの測定、M-CSF（マクロファージコロニー刺激因子）及び RANKL（NF-κB 活性化受容体リガンド）により誘発される破骨細胞分化の TRAP（酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ）染色による評価、リン酸カルシウム再吸収の分析による破骨細胞活性の評価。

結果及び結論：Plerixafor の投与により、コラーゲン誘発関節炎の発症が阻害された。これは IL-6 の血清中濃度の減少と関連していた。Plerixafor はコラーゲン II に対する抗体の産生には影響を及ぼさず、また DTH 反応を阻害しなかった。肢の組織学的検査では、白血球浸潤の減少が認められた。また、plerixafor は in vitro で SDF-1 が介在する脾細胞の走化性、並びに SDF-1 が介在する破骨細胞の分化及び活性を阻害した。

以上、plerixaforにより野生型マウスにおけるコラーゲン誘発関節炎の重症度が低減し、それは一部、炎症細胞浸潤及び破骨細胞活性の阻害によるものであった。

3.11　Plerixafor の腫瘍細胞に対する in vitro 活性

Hatse, 2002, *Int J Cancer* (56) [Module 4.3-46]
Lagneaux, 2002, *Intl Soc Exp Hematol* (57) [Module 4.3-61]
Paul, 2002, *Blood* (58) [Module 4.3-93]
Liesveld, 2004, *Bloodl* (59) [Module 4.3-72]
Scotton, 2002, *Cancer Res* (60) [Module 4.3-107]
Rubin, 2003, *Proc Natl Acad Sci USA* (61) [Module 4.3-101]

目的：In vitro での腫瘍細胞に対する CXCR4 阻害の影響を検討する。

方法：In vitro での腫瘍細胞に対する plerixafor の影響を細胞の遊走、増殖及び生存、並びにカルシウム流入アッセイを用いて検討する。

結果及び結論：腫瘍の進行に対する plerixafor の影響を検討するため、in vitro 試験を数試験実施した。Plerixafor は、多くの腫瘍細胞株（MDA-MB-231［乳がん］、SK-N-SH［神経芽細胞腫］、IGROV［卵巣がん］及び髄芽腫など）において SDF-1 に誘発された遊走を阻害し、MDA-MB-231 及び SK-N-SH 細胞において SDF-1 に誘発されたカルシウム流入を抑制した。Plerixafor は、SDF-1 に誘発された IGROV 細胞の増殖を阻害し、MDA-MB-231 及び SK-N-SH 細胞に対して増殖抑制作用を示した。

Plerixafor は、Namalwa 細胞（B リンパ芽球様）において、細胞増殖を阻害し、アポトーシスを促進し、SDF-1 に誘発される遊走を阻害した。Plerixafor はストローマ細胞下の慢性リンパ性白血病（CLL）B 細胞の遊走を阻害した。CLL B 細胞をストローマ細胞と共に刺激すると、SDF-1 の産生が増加した。SDF-1 は CLL 細胞を自然発生的なアポトーシスから保護し、plerixafor の添加により SDF-1 の抗アポトーシス作用が阻害された。Plerixafor は in vitro において急性骨髄性白血病（AML）細胞の遊走活性も阻害した。

3.12　リンパ腫モデルにおける plerixafor の in vitro 及び in vivo 活性

Paul, 2002, *Blood* (58) [Module 4.3-93]

目的：NHL モデルにおける腫瘍増殖に対する CXCR4 阻害の影響を検討する。

方法：B リンパ芽球様 Namalwa 細胞を NHL モデルとして用いた。In vitro 測定では、細胞生存率を MTT 又は WST-1 のいずれかを用いたフローサイトメトリーにより評価し、アポトーシスをアネキシン V 及びヨウ化プロピジウムを用いたフローサイトメトリーにより評価し、経内皮／ストローマ遊走を微小血管内皮細胞又は骨髄由来ストローマ細胞株 L87/4 及び L88/5 のいずれかをコートしたトランスウェルプレートを用いて測定した。In vivo 腫瘍増殖試験では、NOD/SCID マウスの腹腔内に Namalwa 細胞を注入し、注入部位に測定可能な固形腫瘍を発生させた。Plerixafor を 2.5 又は 12 mg/kg/日の用量で Alzet 浸透圧ポンプで 28 日間持続皮下投与するか、10 mg/kg の用量で週 1 回 3 週間ボーラス皮下投与した。対照には生理食塩液を投与した。試験終了時にすべての動物を安楽殺した。

結果及び結論：In vitro 試験において、plerixafor は、Namalwa 細胞の増殖を阻害し、アポトーシスを促進し、SDF-1 に誘発される遊走を阻害した。Plerixafor を 2.5 又は 12 mg/kg/日の用量で 28 日間持続皮下投与したマウスにおいて、NHL Namalwa 腫瘍のサイズが増加した。肉眼観察及び顕微鏡観察の両方でみられた腫瘍サイズの増加は血管新生の増加と関連すると考えられた。Plerixafor を 10 mg/kg の用量で 3、7 及び 10 日目にボーラス皮下投与したとき、腫瘍サイズの統計学的に有意な減少が 30 日間の観察期間にわたり認められた。

3.13　マウスにおける plerixafor の急性リンパ性白血病細胞の動員及び生着への影響

Juarez, 2007, *Leukemia* (62) [Module 4.3-52]

目的：白血病細胞の動員及び骨髄への生着に対する CXCR4 阻害の影響を検討する。

方法：急性リンパ性白血病（ALL）患者 5 名から採取し NOD/SCID マウスで継代した白血病芽球及びマウスプレ B ALL 細胞株 MALL1 をそれぞれヒト及びマウスの ALL モデルとして用いた。移植前にマウスに放射線を照射し、ALL 細胞を尾静脈から注入した。

動員試験では、白血病細胞が末梢血中に検出されるまで白血病を進行させた。その後マウスに 10 mg/kg の plerixafor を皮下投与し、動員された白血病細胞をヒト白血病細胞については CD19 に対する抗体、マウス白血病については CD45 に対する抗体を用いてフローサイトメトリーにより検出した。

生着試験では、白血病細胞注入の 24 時間後にマウスに plerixafor を投与した。Plerixafor を 200 µg/body/日の用量で 20 日間持続皮下投与又は連日皮下投与した。マウスを 21 日目に安楽殺し、骨髄、末梢血及び脾臓をフローサイトメトリーで分析した。その他の器官について組織学的検査を実施した。

結果及び結論：ALL モデルにおいて、plerixafor はヒト及びマウスプレ B ALL 細胞の末梢血中への動員を誘発した。Plerixafor を長期投与すると、NOD/SCID マウス骨髄へのヒト ALL 細胞の生着が阻害された。肝臓への白血病細胞の浸潤も減少した。

3.14　マウスにおける plerixafor の急性前骨髄球細胞の動員及び化学療法感受性への影響

Nervi, 2005, *Blood* (63) [Module 4.3-90]

目的：Plerixafor が Acute Promyelocytic Leukemia （APL）細胞を骨髄から動員し、APL 細胞の化学療法への感受性を増加させる可能性を検討する。

方法：マウスカテプシン G の遺伝子座の単一対立遺伝子に PML-RARα 遺伝子を導入した APL のトランスジェニックマウスモデルを使用した。同一遺伝子型のマウスに APL 細胞を静脈内注入した。Plerixafor を 5 mg/kg の用量で皮下投与した。APL 細胞の動員をフローサイトメトリーで評価した。有効性試験では、マウスに plerixafor（5 mg/kg 皮下）又はシタラビン（AraC）（200 mg/kg 皮下）の単独投与又はそれらの併用投与を行った。

結果及び結論：Plerixafor を APL 注入の 11 日後に投与したとき、白血病細胞の速やかな動員が認められ、末梢血中に動員された総白血球（WBC）数は 3 倍、白血病芽球数は 10 倍に増加した。11 日目

に plerixafor を AraC（200 mg/kg）と併用投与したところ、マウスの全生存期間がシタラビン単独投与マウスと比較して延長した。

3.15　マウスにおける plerixafor の原発性脳腫瘍の頭蓋内増殖への影響

Rubin, 2003, *Proc Natl Acad Sci USA* (61) [Module 4.3-101]

目的：脳腫瘍モデルにおける腫瘍増殖に対する CXCR4 阻害の影響を検討する。

方法：脳腫瘍モデルとして 2 種の細胞株、U87（神経膠芽細胞腫）細胞及び Daoy（髄芽腫）細胞をそれぞれ用いた。CXCR4 及び SDF-1 の発現を免疫蛍光染色により測定した。細胞増殖（BrdUrd 取込み）、アポトーシス（TUNEL アッセイ）及び走化性を in vitro で評価した。画像化のため、ルシフェラーゼ遺伝子を導入した U87 及び Daoy 細胞をホモ接合型 NCR ヌードマウスの頭蓋内に移植した。Plerixafor を 0.24～0.36 mg /body/日の用量で 21 日間持続皮下投与した。腫瘍増殖を生物発光画像法又は MRI により評価した。

結果及び結論：神経膠芽細胞腫及び髄芽腫の病理学的標本、並びに U87 及び Daoy 細胞で CXCR4 の発現が認められた。Plerixafor は両細胞株において、SDF-1 を介する走化性を阻害し、SDF-1 を介する生存を抑制した。In vivo で頭蓋内に腫瘍を異種移植した試験では、plerixafor の持続投与により U87 神経膠芽細胞腫及び Daoy 髄芽腫の腫瘍増殖が明らかに阻害された。

4　安全性薬理試験

Plerixafor がヒトの安全性に悪影響を及ぼす可能性のある薬理作用を引き起こすか検討した（表 6）。特記すべき所見を[Module 2.6.3 の表 2.6.3.4.1]に要約する。In vitro 及び in vivo 試験は plerixafor 八塩酸塩及び plerixafor（遊離塩基）を用いて実施した。水溶液の pH を中性に調整すると、plerixafor（遊離塩基）及び plerixafor 八塩酸塩はいずれも部分的にプロトン化されるため（[Module 2.3.S の 3.1.2.4 項]を参照のこと）、得られた溶液の化学組成は等しい。Plerixafor（遊離塩基）及び plerixafor 八塩酸塩の分子量はそれぞれ 502.78 g/mol 並びに 794.48（無水）及び 829.60（二水和物）g/mol である。本概要文では、特に記載のない限り、すべての用量及び濃度を遊離塩基等量で示している。八塩酸塩を用いて実施した 3 試験については、用量及び濃度の表記法（遊離塩基又は八塩酸塩）が試験報告書中に記載されていないことから、正確な投与用量が不明である。この不備については各々の試験概要中で示している。実施した一連の試験は、概して ICH S7A ガイドライン「安全性薬理試験ガイドライン」（2001 年 6 月）に記載されている要件を満たすと考えられる。

表 6 - 安全性薬理試験の一覧

項	試験の種類	試験系及び投与方法	実施施設	試験番号 [Module 番号]	GLP 適用
4.1.1	受容体親和性	In vitro	[redacted]	107-031 [4.2.1.3-1]	非適
4.1.1	5-HT 結合部位への受容体親和性	In vitro	[redacted]	AOM0071 [4.2.1.3-2]	非適
4.1.1	受容体結合（アドレナリン受容体、GABA）	In vitro	[redacted]	1009304 -02NOV20[redacted] [4.2.1.3-3]	非適
4.1.2.1	マウスを用いた中枢神経系安全性薬理試験（Irwin 試験）	マウス, 皮下投与	[redacted]	POT-M-92-10 [4.2.1.3-4]	非適
4.1.2.2	ラットを用いた中枢神経系安全性薬理試験（Irwin 試験）(1)	ラット, 皮下投与	[redacted]	POT-R-94-5 [4.2.1.3-5]	非適
4.1.2.3	ラットを用いた中枢神経系安全性薬理試験（Irwin 試験）(2)	ラット, 皮下投与	[redacted]	GT-249-TX-1 [4.2.1.3-6]	適
4.2.1	無麻酔ラットを用いた呼吸系安全性薬理試験	ラット, 皮下投与	[redacted]	GT-249-TX-2 [4.2.1.3-7]	適
4.3.1.1	クローン化 hERG カリウムチャネルアッセイ	In vitro	[redacted]	051128-BOP [4.2.1.3-8]	適
4.3.1.2	ACE 及び中性エンドペプチダーゼアッセイ	In vitro	[redacted]	1009304 -14DEC20[redacted] [4.2.1.3-9]	非適
4.3.1.2	ニューロペプチド Y Y_1 及び Y_2 受容体機能アッセイ	In vitro	[redacted]	1009304 -15DEC20[redacted] [4.2.1.3-10]	非適
4.3.2.1	麻酔ラットを用いた心血管系安全性薬理試験	ラット, 短時間持続静脈内投与; 皮下投与	[redacted]	107-028 [4.2.1.3-11]	非適
4.3.2.2	無麻酔拘束ビーグル犬を用いた予備心血管系安全性薬理試験	イヌ, 持続静脈内投与	[redacted]	[redacted]-93226 [4.2.1.3-12]	非適

2.6.2 薬理試験の概要文
plerixafor

項	試験の種類	試験系及び投与方法	実施施設	試験番号 [Module 番号]	GLP 適用
4.3.2.3	無麻酔ビーグル犬を用いた心血管系安全性薬理試験	イヌ, 持続静脈内投与	[redacted]	[redacted]-93227 [4.2.1.3-13]	適
4.4.1	ラット大動脈平滑筋細胞の弛緩	In vitro	[redacted]	9608-0228-01 [4.2.1.3-14]	非適
4.4.2	雄ラットの内分泌パラメータに対する作用	ラット, 皮下投与	[redacted]	107-029 [4.2.1.3-15]	非適
4.4.3.1	全般的な受容体スクリーニング（CXCR4 以外の受容体）－放射性リガンド結合アッセイ	In vitro	[redacted]	AA80066 -30DEC20[redacted] [4.2.1.3-17]	非適
4.4.3.1	受容体スクリーニング（CXCR4 以外の受容体）－細胞及び組織アッセイ、追加放射性リガンド結合アッセイ	In vitro	[redacted]	AA81111 -01DEC20[redacted] [4.2.1.3-16]	非適
4.4.3.1	哺乳類細胞に発現させたカルシウムチャネルに対する plerixafor の影響－パッチクランプアッセイ	In vitro	[redacted]	GT-249-TX-6 [4.2.1.3-18]	非適

4.1 中枢神経系

4.1.1 In vitro 試験

試験番号 107-031 [Module 4.2.1.3-1]
試験番号 AOM0071 [Module 4.2.1.3-2]
試験番号 1009304-02NOV20[redacted] [Module 4.2.1.3-3]

結果の一覧を[Module 2.6.3 の表 2.6.3.4.1]に示す。

目的：中枢神経系機能への影響を媒介する可能性のある特定の神経伝達物質受容体及びトランスポーターと plerixafor との相互作用を放射性リガンド結合試験で検討した。

方法：被験物質：Plerixafor。ウシアドレナリン α_1 及び α_2 受容体、ウシドパミン D_1 及び D_2 受容体、ラット μ オピオイド受容体、並びに 5-ヒドロキシトリプタミン（5-HT）受容体へのリガンド結合の阻害を検討した。試験は複数のリガンド濃度で実施した。以下の受容体への放射性リガンドの結合に対する plerixafor の阻害作用は、単一濃度（6 μmol/L）の plerixafor で検討した：GABA トランスポーター（ラット）、$GABA_A$ アゴニスト部位（ラット）、$GABA_A$ ベンゾジアゼピン結合部位（中枢、ラット）、$GABA_A$ ベンゾジアゼピン結合部位（末梢、ラット）、$GABA_A$ クロライドチャネル（TBOB、ラット）、$GABA_B$（ラット）、アドレナリン α_1 及び α_2 受容体（ラット）。

結果及び結論：Plerixafor は、ウシアドレナリン α_1 及び α_2 受容体、並びにウシドパミン D_2 受容体に対して中等度の親和性を示し、pKi 値はそれぞれ 6.2、5.9 及び 5.5 であった（107-031）。検討した 5-HT 受容体に対する親和性はいずれも低かった（AOM0071）。Plerixafor を単一濃度（6 μmol/L）で検討したときにも、ラットアドレナリン受容体との相互作用がみられ、α_1 及び α_2 受容体に対してそれぞれ 40 及び 41%の結合阻害を示した（1009304-02NOV20[redacted]）。

4.1.2 In vivo 試験：Irwin 試験（Primary Observation Test）

4.1.2.1 マウスを用いた中枢神経系安全性薬理試験（Irwin 試験）

試験番号 POT-M-92-10 [Module 4.2.1.3-4]

結果の一覧を[Module 2.6.3 の表 2.6.3.4.1]に示す。

目的：マウスに plerixafor を単回皮下投与したときの行動、神経及び自律神経系への影響を定量的及び定性的に評価する。

方法：被験物質：Plerixafor 八塩酸塩を生理食塩液に溶解し、水酸化ナトリウムを用いて pH を 5～6 に調整した。1 群 3 匹からなる 4 群の雄 OF-1 マウスに、plerixafor を 0、0.1、1 又は 10 mg/kg の用量（用量は遊離塩基等量で表示）で単回皮下投与した。

観察：投与後最初の 1 時間、並びに投与 1、7 及び 23 時間後に行動、神経及び自律神経系所見について観察した。投与 23 時間後に高用量群の動物には電気ショック試験も実施した。

結果及び結論：0.1 及び 1 mg/kg を皮下投与したとき、軽度の変化が認められた。10 mg/kg において、plerixafor 投与 5～10 分後及び 1 時間後に、運動量の低下、自発運動の低下、立ち上がり及び腹臥位がみられた。その他の用量依存的な所見は認められなかった。

4.1.2.2　ラットを用いた中枢神経系安全性薬理試験（Irwin 試験）（1）

試験番号 POT-R-94-5 [Module 4.2.1.3-5]

結果の一覧を[Module 2.6.3 の表 2.6.3.4.1]に示す。

目的：ラットに plerixafor を単回皮下投与したときの行動、神経及び自律神経系への影響を定量的及び定性的に評価する。

方法：被験物質：Plerixafor 八塩酸塩をリン酸緩衝水溶液に溶解した。所定の投与用量となるよう、10 mg/mL ストック溶液を各容量で投与した。

動物及び投与：1 群 6 匹からなる 4 群の雄 Sprague-Dawley ラットに、plerixafor を 0（溶媒対照）、5、10 又は 20 mg/kg の用量（用量は遊離塩基等量で表示）で単回皮下投与した。

観察：投与後最初の 1 時間、並びに投与 1、5 及び 23 時間後に行動、神経学的及び自律神経系所見について観察した。

結果及び結論：ラットに plerixafor を 5、10 及び 20 mg/kg の用量で単回皮下投与したところ、運動量及び自発運動の用量依存的な低下が認められた。投与 1 時間後に筋及び呼吸の異常な変化を示すいくつかの徴候（腹部の筋緊張低下、努力呼吸など）が認められた。また、軽度な変化として、眼瞼下垂、瞳孔径および体温の変化が認められた。変化は一過性であり、高用量群のみにおいて投与 23 時間後に筋の軽度の変化が認められた。

4.1.2.3　ラットを用いた中枢神経系安全性薬理試験（Irwin 試験）（2）

試験番号 GT-249-TX-1 [Module 4.2.1.3-6]

結果の一覧を[Module 2.6.3 の表 2.6.3.4.1]に示す。

目的：ラットに plerixafor を単回皮下投与したときの行動及び生理状態への影響を検討する。

方法：被験物質：Plerixafor 注射液（20 mg/mL）を生理食塩液で所定の投与液濃度に希釈した。対照物質のクロルプロマジン塩酸塩は、生理食塩液で溶解し、5 mg/mL 投与液を調製した。

動物及び投与：1 群 6 匹からなる 4 群の雄 Sprague-Dawley ラットに、plerixafor を 0（溶媒対照）、2、10 又は 20 mg/kg の用量で単回皮下投与した。第 5 群の 6 匹の雄 Sprague-Dawley ラットには陽性対照のクロルプロマジン塩酸塩を 5 mg/kg の用量で単回皮下投与した。すべての投与群において投与容量は 1 mL/kg とした。

観察：すべてのラットについて肉眼的な行動及び生理状態の変化を投与前、投与 30、120 及び 240 分後に観察した。Irwin 試験に挙げられているすべてのパラメータを体系的に評価し、各ラットの重症度を独自のスケール（0～8）でスコア化した。試験期間終了時に、すべての動物を一般的な方法で安楽殺した。

結果及び結論：Plerixafor を 2 及び 10 mg/kg で皮下投与したラットでは、投与後 4 時間にわたり、溶媒投与ラットと比べて明らかな肉眼的行動変化及び生理的変化は認められなかった。Plerixafor を 20 mg/kg で投与したラットでは、投与 30 分後において、刺激しない場合に中枢神経系抑制物質様作用（自発運動の低下、無関心、筋痙縮、警戒性低下、驚愕反応の低下、異常姿勢［腹臥位］、不活発、眼球突出）、ハンドリング時には中枢神経系刺激物質様作用（呼吸数増加、接触反応の増加、恐怖心増加、攻撃性）がみられたが、これらの変化は一過性であり、投与 2 時間後までに消失した。20 mg/kg 群の約半数のラットにおいて、投与 2 時間後に色素涙が認められた。対照を含むすべての投与群において、1 時点以上で受動性上昇、眼球突出及び接触反応の増加が認められた。クロルプロマジン投与後にみられた変化は、その既知の薬理作用と一致するものであったことから、本試験系は中枢神経系への影響を検出するのに十分な感度を有していると考えられた。

4.2　呼吸系

4.2.1　無麻酔ラットの呼吸数及び 1 回換気量に対する plerixafor の影響

試験番号 GT-249-TX-2 [Module 4.2.1.3-7]

結果の一覧を[Module 2.6.3 の表 2.6.3.4.1]に示す。

目的：無麻酔ラットの呼吸数及び 1 回換気量に対する plerixafor の影響を検討する。

方法：被験物質：Plerixafor 注射液（20 mg/mL）を生理食塩液で所定の投与液濃度に希釈した。対照物質のモルヒネ塩酸塩は生理食塩液に溶解して 5 mg/mL 投与液を調製した。

動物及び投与：1 群 8 匹からなる 4 群の雄 Sprague-Dawley ラットに、plerixafor を 0（溶媒対照）、2、10 又は 20 mg/kg の用量で単回皮下投与した。第 5 群の 8 匹の雄 Sprague-Dawley ラットには陽性対照のモルヒネ塩酸塩を 10 mg/kg の用量で単回静脈内投与した。投与容量は溶媒及び plerixafor 投与群で 1 mL/kg、モルヒネ投与群で 2 mL/kg とした。

測定：試験日の前にすべてのラットをプレチスモグラフィーチャンバーに馴化させた。プレチスモグラフィーチャンバーはラットの頭部を体部の呼吸運動から隔離するよう設計されており、各測定ごと、ラットの体部をチャンバー内に拘束した。チャンバーには高利得増幅ユニットに接続したトランスデューサーが取り付けられており、それによりラットの胸部容量の変化を測定した。すべての測定は照明を暗くして実施した。呼吸数及び 1 回換気量を測定した。ラットを各測定時間（投与前、並びに投与 30 及び 120 分後）の前にチャンバーに入れ、その約 15 分後から各々のラットのデータを測定した。

結果及び結論：Plerixafor を 2 mg/kg で雄ラットに皮下投与したとき、呼吸数及び 1 回換気量の有意な変化は認められなかった。10 mg/kg 投与では呼吸数には有意な変化がみられなかったが、1 回換気量の有意な減少が投与 30 分後に一過性にみられた。20 mg/kg 投与では呼吸数の有意な減少が投与 30 及び 120 分後に、1 回換気量の有意な減少が投与 30 分後のみに認められた。モルヒネ投与後にみられた変化は、その既知の薬理作用と一致するものであったことから、本試験系は呼吸系への影響を検出するのに十分な感度を有していると考えられた。

4.3 心血管系

4.3.1 In vitro 心血管系安全性薬理試験

4.3.1.1 hERG チャネル活性への影響

試験番号 051128-BOP [Module 4.2.1.3-8]

結果の一覧を[Module 2.6.3 の表 2.6.3.4.1]に示す。

目的：Plerixafor が in vitro で hERG チャネル電流（I_{Kr}、心臓の急速活性型遅延整流カリウム電流）を阻害する可能性を検討する。

方法：被験物質：Plerixafor。クローン化 hERG チャネルを発現しているヒト胎児腎由来細胞（HEK293）を用いてパッチクランプアッセイを実施した。Plerixafor は 5 及び 50 µg/mL の最終濃度で、振幅が一

定のパルスパターンを用いて検討し、バリデートされた高速液体クロマトグラフィー－紫外検出（HPLC-UV）法により plerixafor 濃度を測定した。

結果及び結論：Plerixafor は、5 及び 50 µg/mL の濃度において、溶媒対照と比較して hERG 電流を有意に（$p > 0.05$）阻害しなかった。陽性対照のテルフェナジン（60 nmol/L）は hERG 電流を 75.7±4.5%（$n = 2$）阻害した。

4.3.1.2 受容体相互作用試験

試験番号 1009304-14DEC20[redacted] [Module 4.2.1.3-9]
試験番号 1009304-15DEC20[redacted] [Module 4.2.1.3-10]

結果の一覧を[Module 2.6.3 の表 2.6.3.4.1]に示す。

目的：心血管系パラメータへの影響を媒介する可能性のある特定の酵素又は受容体と plerixafor との相互作用を in vitro で検討する。

方法：以下のアッセイを実施した：ACE 及び中性エンドペプチダーゼ（酵素アッセイ）；ニューロペプチド Y Y_1、Y_2 及び Y_3 受容体（全組織アッセイ）。ニューロペプチド Y 受容体アッセイでは、plerixafor のアゴニスト作用及びアンタゴニスト作用の両方について、既知のリガンドに対する機能的反応を評価することにより検討した。ACE 及び中性エンドペプチダーゼ酵素アッセイでは、plerixafor の最初の検討をそれぞれ 18 及び 6 µmol/L の単一濃度で実施した。

結果及び結論：ACE アッセイでは 70%を超える阻害がみられ、その後の試験で測定された IC_{50} 値は 2.5 µmol/L であった。Plerixafor は中性エンドペプチダーゼに対して明らかな阻害作用を示さず（7%）、IC_{50} 値の測定は実施しなかった（1009304-14DEC20[redacted]）。Plerixafor（18 µmol/L）はニューロペプチド Y Y_2 及び Y_3 受容体アッセイにおいて、明らかなアゴニスト活性（天然リガンドの NPY により誘発される最大反応の 50%を超える反応と定義する）を示し（それぞれ 70%及び 97%）、ニューロペプチド Y Y_1 受容体アッセイにおいて中等度のアゴニスト活性（37%）を示した。Plerixafor は 6 µmol/L の濃度では、Y_2 及び Y_3 受容体アッセイにおいて 24%及び 42%のアゴニスト反応を示した（1009304-15DEC20[redacted]）。

4.3.2 In vivo 心血管系安全性薬理試験

4.3.2.1 麻酔ラットにおける心血管系への影響

試験番号 107-028 [Module 4.2.1.3-11]

結果の一覧を[Module 2.6.3 の表 2.6.3.4.1]に示す。

目的：麻酔ラットに plerixafor を静脈内又は皮下投与したときの心血管系への影響を評価する。

方法：被験物質：Plerixafor 八塩酸塩をリン酸緩衝水溶液に溶解し、生理食塩液で所定の投与液濃度に希釈した。

動物及び投与：1 群 5 匹からなる 4 群のペントバルビタール麻酔下の雄 Wistar ラットに、plerixafor を 0（静脈内投与の溶媒対照群）若しくは連続して 0.1、1 及び 10 mg/kg の用量で短時間持続静脈内投与、又は 0（皮下投与の溶媒対照群）若しくは 20 mg/kg の用量で皮下投与した（用量は遊離塩基等量で表示）。静脈内持続投与では、1 群（n＝5）に漸増用量（0.1、1 及び 10 mg/kg）を 20 分の投与間隔で連続して持続投与（10 分間かけて 1 mL/kg を投与）した。対照群にはリン酸緩衝液（生理食塩液で希釈）を同様に投与した。また、皮下投与では 1 群に 20 mg/kg を 2 mL/kg の容量で皮下投与し、別の群にリン酸緩衝液を同様に投与した。

観察：以下のパラメータを測定又は算出した：平均動脈血圧、心拍数、+dP/dt 及び-dP/dt、心拍出量、末梢血管抵抗、並びに体表面 ECG。パラメータは、一連の持続静脈内投与開始 30、20、10 分前及び直前、並びに各静脈内投与直後及び 10、20 分後に測定した。皮下投与では、パラメータを投与の 3、10、30、60、90、120、180 及び 240 分後に測定した。

結果及び結論：Plerixafor を 0.1 mg/kg の用量で静脈内投与したとき、心血管系パラメータの変化は認められなかった。1 mg/kg では、中等度の血圧低下及び心筋収縮性（+dP/dt）の低下、並びに有意ではないものの末梢血管抵抗の減少傾向が認められた。10 mg/kg の持続投与後 2～5 分に 5 匹のラットすべてが死亡した。死亡前に、平均動脈血圧、心拍数、+dP/dt、-dP/dt 及び心拍出量の大幅な減少がみられた。有意ではなく軽度の末梢血管抵抗の上昇が認められた。ECG において、血行動態悪化を引き起こすような所見はみられなかった。

麻酔ラットに 20 mg/kg の用量で皮下投与したとき、中等度の平均動脈血圧、心拍数、+dP/dt、-dP/dt 及び心拍出量の減少がみられた。ECG では、5 匹中 4 匹のラットにおいて、P 波の平坦化又は陰性化がみられるか、又は P 波が検出不能であった。

4.3.2.2 イヌを用いた心血管系安全性薬理予備試験

試験番号 [redacted]-93226 [Module 4.2.1.3-12]

結果の一覧を[Module 2.6.3 の表 2.6.3.4.1]に示す。

目的：無麻酔拘束ビーグル犬に plerixafor を静脈内投与したときの血行動態への影響を評価するとともに、GLP 適用の主試験に用いる持続投与速度を設定する。

方法：被験物質：Plerixafor を塩酸に溶解し、pH を塩酸又は水酸化ナトリウムで 6.0～7.5 に調整した後、注射用水で希釈して保存溶液を調製し、更に保存溶液を生理食塩液で所定の投与液濃度に希釈した。

動物及び投与：拘束下の 1 匹のイヌに plerixafor 溶液を段階的漸増投与法により 3 つの持続投与速度（5.064、7.530 及び 10 mg/kg/h）で 1 時間持続静脈内投与した。Plerixafor の持続投与は 1 回目及び 2 回目の持続投与後にそれぞれ 1 時間中断した。持続投与速度は、一般状態の毒性変化を引き起こす血漿中 plerixafor 濃度が得られると予想される投与速度を設定した。

観察：大腿動脈から外科的に挿入した留置カテーテルにより血行動態を測定した。測定は、初回持続投与約 30 分前から最終持続投与終了約 30 分後まで継続して行った。ECG の測定は、投与前及び持続投与期間中に定期的に行った。PK 解析用の血液試料を採取し、血漿中 plerixafor 濃度を高速液体クロマトグラフィーで測定した。

結果及び結論： Plerixafor の 1 回目及び 2 回目（5.064 及び 7.530 mg/kg/h）の持続投与期間中に、被験物質に直接関連した血行動態及び ECG の変化、並びに投与に関連した一般状態の変化はみられなかった。3 回目（10 mg/kg/h）の持続投与期間中には、一般状態の変化として流涎、散瞳及び非持続性痙攣、心血管系の変化として心拍数及び血圧の上昇、並びに心拍数及び血圧の変化による二次的変化と考えられる T 波の波形変化が認められた。1 時間の持続投与期間終了後 10～30 分以内に、これらの変化は回復した。3 回目の持続投与期間終了直前の血漿中 plerixafor 濃度は 25～30 µg/mL であった。

4.3.2.3 イヌを用いた心血管系安全性薬理主試験

試験番号 [redacted]-93227 [Module 4.2.1.3-13]

結果の一覧を[Module 2.6.3 の表 2.6.3.4.1]に示す。

目的：無麻酔非拘束ビーグル犬に plerixafor を持続静脈内投与したときの血行動態への影響を評価する。

方法：被験物質：Plerixafor 注射液（10 mg/mL）を生理食塩液で 5 mg/mL に希釈した。

動物及び投与：2 つの持続投与速度レジメンを設定し、それぞれの速度について 2 匹のイヌで検討した。Plerixafor を最初 5 mg/kg/h の速度で 1 時間投与した後、3.33 mg/kg/h の速度で 7 時間投与した。この持続投与速度では、定常状態における血漿中 plerixafor 濃度が約 15 µg/mL になると算出された。次に、2 匹のイヌからなる別の群に、plerixafor を 2.5 mg/kg/h の速度で 1 時間投与した後、1.67 mg/kg/h の速度で 7 時間投与した（最初の速度の 50%；定常状態における血漿中 plerixafor 濃度の予測値は

7.5 μg/mL）。先の群の速度（高投与速度）で投与したイヌでみられた所見に基づき、後の速度（低投与速度）を選択した。

観察：各動物に腹部大動脈カテーテル、左室カテーテル、肺動脈カテーテル、被験物質持続投与用の静脈カテーテル、及び ECG 測定用の皮膚導線を留置した。心血管系パラメータを投与開始 1 時間以上前から投与開始後 8 時間以上継続的に測定した。全身血圧、左室圧、左室の弛緩／収縮率、肺動脈圧及び心拍数を観察期間中、継続的に測定した。ECG 及び平均心拍出量を投与前及び投与期間中に定期的に測定した。ECG 波形の定性的評価は、独自の試験プロトコールを用いて行った。さらに、独立した循環器認定獣医師により、波形の更なる定性的及び定量的評価を実施した。心拍出量の各測定値から 1 回拍出量及び全末梢血管抵抗を算出した。PK 測定用の血液試料を投与前及び持続投与開始後 1 時間ごとに採取した。安楽殺時に肉眼的病理検査を実施した。

結果及び結論：Plerixafor を低投与速度（2.5 mg/kg/h で 1 時間投与後 1.67 mg/kg/h で 7 時間投与）で持続投与したとき、ECG 及び心血管系パラメータのいずれにおいても本薬に関連する変化はみられず、有害な一般状態の変化も認められなかった。低速で持続投与した 2 匹のイヌにおいて、投与期間中の定常状態における血漿中 plerixafor 濃度は 6.0～7.4 μg/mL であった。

高投与速度（5.0 mg/kg/h で 1 時間投与後 3.33 mg/kg/h で 7 時間投与）では、1 匹のイヌで plerixafor の持続投与を投与開始約 3.25 時間後に早期中止した。このイヌでは、一般状態の変化として、活動性低下、振戦、流涎、運動協調性の欠如、散瞳、横臥位及び努力性呼吸がみられた。持続投与中止時（投与開始 3.27 時間後）及びその少し前（投与開始 3 時間後）に測定された血漿中 plerixafor 濃度は、それぞれ約 11.2 及び 11.7 μg/mL であった。もう一方のイヌにおける一般状態の変化（断続的な活動性低下、興奮性亢進、振戦及び運動協調性の欠如）は、重症度が低く、わずかに異なるものであった。このイヌで計画どおり投与開始後 3～8 時間の間に 1 時間ごとに測定された血漿中 plerixafor 濃度は、10.9～14.3 μg/mL であった。一般状態の変化は、2 匹ともに、持続投与中止後速やかに軽減した。

高投与速度で投与したイヌでは、2 匹とも持続投与開始直後から心拍数の増加が認められ、持続投与を早期中止した 1 匹では異常（頻脈）と考えられた。より重度の影響がみられたイヌでは、投与開始約 3 時間後に、一般状態の変化とともに全身血圧の上昇が認められ、観察期間を通して持続した。また、このイヌでは、投与終了後約 1.75 時間にわたり、肺動脈圧の一過性の上昇が認められた。影響がより軽度であったイヌでみられた全身血圧の上昇は、plerixafor の直接作用ではなく、活動性の上昇に起因すると考えられた。いずれのイヌにおいても、本薬に関連した心拍出量、1 回拍出量及び全末梢血管抵抗の変化はみられず、plerixafor 投与に起因すると考えられる肉眼的病理検査所見は認められなかった。Plerixafor の持続静脈内投与に起因する ECG の定性的な異常は認められなかった。ECG 波形の定量的評価において、心拍数の軽度の増加及び心拍数増加に対する正常な生理的反応として PR 間隔の短縮が認められた。Plerixafor による QRS 時間及び QTc 間隔の変化はみられなかった。

以上、plerixafor を高投与速度で持続静脈内投与したとき、心拍数の増加及び重度の有害な一般状態の変化が認められた。しかし、ECG で心毒性の所見は認められなかったことから、これらの変化は心臓自体への影響に直接関連するものではないと考えられた。高投与速度の半分の速度（低投与速度）で投与した動物では、一般状態の変化及び本薬に関連する心血管系の変化はみられなかった。

4.4　追加の安全性薬理試験

4.4.1　大動脈平滑筋細胞への影響

試験番号 9608-0228-01 [Module 4.2.1.3-14]

結果の一覧を[Module 2.6.3 の表 2.6.3.4.1]に示す。

目的：麻酔ラットを用いた安全性薬理試験でみられた血圧低下作用を明らかにするため、plerixafor が in vitro で大動脈平滑筋細胞に直接作用するか検討する。

方法：被験物質：Plerixafor。ラット大動脈平滑筋細胞の初代培養におけるアンジオテンシン II 誘発性収縮に対する plerixafor の拮抗作用を検討した。Plerixafor は 0.2～20 µg/mL の濃度を用いた（注：試験報告書には、これらの用量が遊離塩基等量、又は八塩酸塩の実際の濃度のどちらであるかは記載されていない）。

結果及び結論：Plerixafor は大動脈平滑筋細胞のアンジオテンシン II 誘発性収縮を濃度依存的に阻害した。2 µg/mL の濃度で有意な弛緩がみられ、20 µg/mL で最大弛緩が得られた（アンジオテンシン II 単独に対してそれぞれ $p< 0.025$ 及び $p< 0.005$）。この作用は培養液中に遊離 Ca^{2+}又は Mg^{2+}を添加すると減弱し、Ca^{2+}の最終濃度 4 mmol/L で完全に消失した。

4.4.2　内分泌機能への影響

試験番号 107-029 [Module 4.2.1.3-15]

結果の一覧を[Module 2.6.3 の表 2.6.3.4.1]に示す。

目的：ラットに plerixafor を単回投与したとき、特定の内分泌パラメータに及ぼす影響を検討する。

方法：被験物質：Plerixafor 八塩酸塩を水に溶解した。

動物及び投与：1 群 8 匹（対照群のみ 16 匹）からなる 5 群の雄 Sprague-Dawley ラットに、plerixafor を 0、0.01、0.1、1 又は 10 mg/kg の用量で単回皮下投与した（注：試験報告書には、これらの用量が遊離塩基等量、又は八塩酸塩の実際の濃度のどちらであるかは記載されていない）。投与 1 時間後に

ラットを安楽殺し、採血した。以下のホルモン及び基質を測定した：成長ホルモン（GH）、プロラクチン、黄体形成ホルモン（LH）、テストステロン、コルチコステロン、グルコース及びカルシウム。

結果及び結論：LH、テストステロン、グルコース及びカルシウムレベルに投与による変化はみられなかった。GH レベルは低下したが、変化に用量依存性はみられず、有意な変化ではなかった（Dunnett の検定）。10 mg/kg ではプロラクチンが有意（$p < 0.05$、Dunnett の検定）に増加した。コルチコステロンには用量依存的な増加がみられたが、有意な変化ではなかった（Dunnett の検定）。

4.4.3 In vitro における受容体スクリーニング及び相互作用試験

4.4.3.1 全般的及び特定の受容体スクリーニング（CXCR4 以外の受容体）

試験番号 AA81111-01DEC20[redacted] [Module 4.2.1.3-16]
試験番号 AA80066-30DEC20[redacted] [Module 4.2.1.3-17]
試験番号 GT-249-TX-6 [Module 4.2.1.3-18]

結果の一覧を[Module 2.6.3 の表 2.6.3.4.1] に示す。

目的：動物における急性毒性に CXCR4 以外の受容体（ノルアドレナリン受容体、ドパミン受容体、5-HT 受容体及びその他の受容体、並びに酵素及び組織に対する plerixafor の作用）が関与している可能性を検討する。

方法：被験物質：Plerixafor。以下のアッセイを実施した：

In vitro における全般的な受容体スクリーニング（MDS Pharma SectrumScreen）：MDS Pharma SpectrumScreen に含まれる広範な受容体への plerixafor の親和性を放射性リガンド結合アッセイにより評価した。各受容体について、信頼性及び再現性が最大となるように科学論文から引用した方法を用いた。各アッセイでは必ず標準試料を測定し、結果の妥当性を確認した。Plerixafor の検討濃度は 5 µg/mL（10 µmol/L）とした（AA80066-30DEC20[redacted] 。

細胞、組織及び追加の放射性リガンド結合アッセイ：全般的な受容体スクリーニングで plerixafor の結合親和性が中等度又は強かった特定の受容体について、追加の放射性リガンド結合アッセイで IC_{50} 値を測定し、細胞及び組織アッセイで機能的アゴニスト又はアンタゴニスト活性を評価した。信頼性及び再現性が最大となるように科学論文から引用した方法を用いた。各アッセイでは必ず標準試料を測定し、結果の妥当性を確認した。Plerixafor の検討濃度は、放射性リガンド結合アッセイで 0.003～30 µmol/L、機能的細胞及び組織アッセイでそれぞれ 10 及び 30 µmol/L とした（AA81111-01DEC20[redacted]。

自動並行パッチクランプアッセイ：本アッセイでは、哺乳類細胞（n≥3）に発現させたN型カルシウムチャネルに対するplerixaforの作用を評価した。Plerixaforの検討濃度は0.1、1、3、10及び30 µmol/Lとした。各被験物質への曝露時間は5分とした（GT-249-TX-6）。

結果及び結論：Plerixaforは、N型カルシウムチャネル、カリウムSK_{CA}チャネル、ヒスタミンH3受容体、ムスカリン性アセチルコリン受容体M_1及びM_2、アドレナリン受容体α_{1B}及びα_{2C}、ニューロペプチドY Y_1受容体、並びにグルタミン酸NMDAポリアミン受容体に中等度又は強い結合親和性を示した（表7及び表8）。これらのチャネル及び受容体へのplerixaforの結合についての結果及び結論を以下に示す。

カルシウムチャネル（N型；L型、ベンゾチアゼピン；L型、ジヒドロピリジン；L型、フェニルアルキルアミン）：

Plerixaforは N型カルシウムチャネルに選択的かつ強力な結合親和性を示した（5 µg/mLで100%阻害；IC_{50} = 0.55 µg/mL、1.09 µmol/L）。L型カルシウムチャネルに対しては、いずれも明らかな結合親和性が認められず、P/Q型カルシウムチャネルは全般的な受容体スクリーニングに含まれていなかった。N型カルシウムチャネルに対する機能活性を検討した組織アッセイにおいて、plerixaforはモルモット回腸の刺激誘発性収縮を阻害した（30 µmol/Lで30%阻害）ことから、plerixaforがN型カルシウムチャネルに対するアンタゴニスト作用を有することが示唆されたが、その阻害作用は弱く、IC_{50}の30倍の濃度で30%しか阻害しなかった。一方、標準薬のω-コノトキシンで100%の阻害作用がみられたのは、そのIC_{50}の1000倍の濃度であったことから、plerixaforの阻害作用が弱かったのは、組織アッセイの感度が結合アッセイに比べて低かった可能性が考えられた。したがって、plerixaforのN型カルシウムチャネルに対するアンタゴニスト作用の有無を更に検討するため、hCav2.2チャネルを発現しているCHO細胞を用いてパッチクランプアッセイを実施した。パッチクランプアッセイの実験条件下において、plerixaforは15 µg/mL以下の濃度でN型カルシウムチャネルに対するアンタゴニスト作用を示さなかった。

N型及びP/Q型カルシウムチャネルは、主に中枢神経系（海馬、小脳及び脊髄など）及び末梢神経系（交感神経終末など）のシナプス前神経終末に局在する高電位活性化カルシウムチャネルであり、神経伝達物質放出の誘導に直接関与している(65),(66),(67)。N型カルシウムチャネルは、シナプス前神経終末においてそのすぐ近くに共局在化している神経伝達物質Gタンパク質共役型受容体（GPCR［アセチルコリン、ノルアドレナリン、グルタミン酸、ヒスタミンなど］）の活性化により阻害される(68),(69)。

また、N型カルシウムチャネルは、魚食性のイモガイから単離された毒素であるω-コノトキシンのGVIA、MVIIA及びCVIDによっても選択的に阻害される。これらの毒素は、N型カルシウムチャネルの開口を物理的に妨害することによってカルシウムのニューロン内への流入を阻害し、細胞内カルシウムの増加を抑制し、神経伝達物質の放出を抑制することで作用を発揮する(70)。ω-コノトキシンMVIIAの合成等価体であるジコノチドは、髄腔内投与で用いる重度慢性疼痛治療薬としてFDAによ

り承認されている(70)。ジコノチドの非臨床試験における有害な所見については、文献で公表されている(71)。公表された急性／亜慢性毒性試験において、ジコノチドの用量制限毒性は、一般状態及び行動の一過性の変化であり、これらは過剰な薬理作用に起因すると考察されている(71)。ラット及びサルを用いた急性／亜慢性静脈内投与毒性試験において、ジコノチドにより誘発された一般状態の変化は、振戦、筋力低下、協調運動障害、運動失調、自発運動の低下、眼瞼下垂、立毛及び下痢であった(71)。ジコノチドを動物に投与したときにみられた急性徴候は、plerixafor を投与したときにみられたものと同様であった。

インタクトな組織を用いた機能アッセイ及びパッチクランプアッセイでは、plerixafor は 15 µg/mL の濃度で N 型カルシウムチャネルへの結合活性に起因する機能的な影響を及ぼさなかった。これらの試験結果から、動物でみられた有害な変化が N 型カルシウムチャネルとの相互作用に起因するものである可能性は低いことが示唆された。

カリウムチャネル（SK_{CA}、K_A、K_{ATP}及び hERG）：

特定の受容体スクリーニングにおいて、plerixafor は小コンダクタンスカルシウム活性化カリウム SK_{CA} チャネルに対して選択的かつ強力な結合親和性を示した（5 µg/mL で 81%阻害）が、K_A、K_{ATP} 及び hERG カリウムチャネルに対しては明らかな結合が認められなかった。SK_{CA} チャネルは、中枢神経系及び末梢神経系のニューロンに広く発現している小コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャネルである。SK_{CA} チャネルは、活動電位発生中に開口する電位依存性カルシウムチャネルを介したカルシウム流入に主に起因する細胞内カルシウムの増加により活性化される(72),(73)。SK_{CA} チャネルは活動電位発生頻度、樹状突起の興奮性、シナプス伝達及びシナプス可塑性を調節することにより、ニューロンの興奮性の制御に関与している(73),(74),(75)。SK_{CA} チャネルは興奮性、睡眠・覚醒周期、学習・記憶、消化器系及び血管緊張といったいくつかの生理的過程に関与している(76),(77)。

SK_{CA} チャネルへの plerixafor の結合親和性は強かったことから、plerixafor により誘発される急性毒性に SK_{CA} チャネル阻害作用が関与している可能性がある。また、SK_{CA} チャネルへの作用が N 型カルシウムチャネルへの影響を調節している可能性もある。SK_{CA} チャネルに関して、組織を用いた電気生理学的アッセイ及び機能アッセイは実施していない。Plerixafor を動物に投与したときにみられた急性毒性が SK_{CA} チャネルへの作用に起因するかを結論づけるには、SK_{CA} チャネルがニューロン内に局在していること、細胞内カルシウム濃度により活性化されること、及び N 型カルシウムチャネルと関連していることが交絡因子となっている。

ヒスタミン受容体（H_1、H_2、H_3及び H_4）：

Plerixafor はヒトヒスタミン H_3 受容体に対して選択的かつ強力な結合親和性を示し（5 µg/mL で 99%阻害；IC_{50} = 0.06 µg/mL）、ヒスタミン H_1、H_2 及び H_4 受容体に対する結合親和性はごくわずかであるか低かった。ヒスタミン H_3 受容体は $G_{i/o}$ タンパク質共役型受容体であり、主にヒスタミンの合成及び

放出を阻害するシナプス前自己受容体である。また、ヒスタミン H_3 受容体は、ノルアドレナリン、アセチルコリン、セロトニン、ドパミン及び GABA といった多くの神経伝達物質の放出を阻害するヘテロ受容体としても働く(78),(79)。ヒスタミン H_3 受容体を刺激すると、おそらく電位依存性カルシウムチャネル（N 型カルシウムチャネルなど）を介したカルシウム輸送の抑制により、軸索のカルシウム濃度が減少する。ヒスタミン H_3 受容体は、認知、肥満、睡眠及び恒常性調節に関連する中枢神経系の領域に最も高密度に存在しているが、消化管及び気管支の末梢ニューロン並びに血管及び心臓を支配する交感神経の節後線維にも広く分布している(80),(81),(82),(83)。

Plerixafor により誘発される急性毒性がヒスタミン H_3 受容体との相互作用を介するものであるかを結論づけるには、動物種間での薬理活性の変動及び 20 種類のヒスタミン H_3 受容体アイソフォームを含むいくつかの因子が交絡因子となっている。また、ヒスタミン H_3 受容体は高い恒常的活性を有しており、アゴニスト非存在下でシグナルを伝達できる。したがって、ヒスタミン H_3 受容体に結合する化合物は逆アゴニスト、アンタゴニスト及びアゴニストに分類される(84)。上記の機能アッセイにおいて、plerixafor は逆アゴニスト活性を示した。

Plerixafor はヒスタミン H_3 受容体に高い結合親和性を示したことから、in vivo でヒスタミン H_3 受容体と相互作用する可能性が示唆される。したがって、plerixafor により誘発される急性毒性の徴候の一部は、ヒスタミン H_3 受容体への直接作用又は N 型カルシウムチャネル反応の調節を介して、ヒスタミン H_3 受容体との相互作用に関連している可能性がある。しかし、plerixafor でみられた急性毒性の種類に基づくと、急性毒性の発現には、おそらくヒスタミン H_3 受容体以外の受容体との相互作用がより大きく関与していると考えられる。

アセチルコリン受容体（ムスカリン M_1、M_2、M_3、M_4 及び M_5；ニコチン性アセチルコリン、ニコチン性アセチルコリン α1-ブンガロトキシン及びニコチン性アセチルコリン α7-ブンガロトキシン）：

全般的な受容体スクリーニングにおいて、plerixafor は M_1 及び M_2 ムスカリン性アセチルコリン受容体（mAChR）に対して選択的な中等度の結合親和性（それぞれ 5 µg/mL で 73%、65%阻害）を示したが、M_3、M_4 及び M_5 mAChR 及び 3 種類のニコチン性アセチルコリン受容体に対してはほとんど結合しなかった。G タンパク質共役型 mAChR は、GPCR の G_q/G_{11} ファミリー（M_1 受容体）及び $G_{i/o}$ ファミリー（M_2 及び M_4 受容体）に属する。M_1 受容体は主に中枢神経系に存在しており、M_2 受容体は中枢神経系及び末梢組織に広く分布している。M_1 及び M_2 受容体はいずれも接合部前後の組織に認められる。接合部前の M_2 受容体が活性化されると、N 型カルシウムチャネルへの作用を介して神経伝達物質放出が抑制される。大部分の組織が 2 種類以上の mAChR を発現している。中枢神経系に存在している mAChR は、認知、行動、感覚、運動及び自律神経の過程を含む多くの中枢機能を調節している。末梢神経系に存在している mAChR は、副交感神経によって支配されるエフェクター組織へのアセチルコリンの活性を調節している(85)。

Plerixafor の mAChR への結合親和性は中等度であったこと、及び上記の機能アッセイの結果に基づくと、動物において plerixafor により誘発される急性毒性が、mAChR との相互作用を介するものである可能性は否定できない。この相互作用は、受容体との直接的な相互作用又はカルシウムチャネルへの調節作用を介して生じると考えられる。

アドレナリン受容体（α_{1A}、α_{1B}、α_{1D}；α_{2A}、α_{2C}、β_1、β_2、β_3）：

特定の受容体スクリーニングにおいて、plerixafor はアドレナリン α_{1B} 及び α_{2C} 受容体に対して中等度の結合親和性を示した（それぞれ 5 µg/mL で 66%、58%阻害）が、アドレナリン α_{1A}、α_{1D} 及び α_{2A} 受容体に対する結合親和性は低かった（それぞれ 31%、37%及び 40%阻害）。種々の β アドレナリン受容体に対しては明らかな結合親和性を示さなかった。アドレナリン受容体は GPCR であり、α_{1B} 受容体は G_q ファミリー、α_{2C} 受容体は $G_{i/o}$ ファミリーに属している。α_{1B} 及び α_{2C} 受容体は、中枢神経系及び末梢神経系のシナプス前及びシナプス後の組織に存在している。$\alpha_{2A/D}$ 受容体は、交感神経系のシナプス前 α アドレナリン自己受容体の大部分を占める(66)。脳における α_{2C} 受容体の刺激は、ドパミン神経伝達及び行動反応の調節、並びに末梢での副腎髄質からのカテコールアミンの放出阻害に大きく関与している。脳における α_{1B} 受容体の刺激は、新奇なものに対する反応及び探索などの行動、並びに行動感作及び薬物依存脆弱性に関与している。末梢神経系では、α_{1B} 受容体が心臓において最も豊富にみられるサブタイプであり、心臓の成長及び構造に関与している。機能アッセイにおいて、plerixafor は α_{1B} 及び α_{2C} 受容体に対するアンタゴニスト作用を示した。

Plerixafor のアドレナリン α_1 及び α_2 受容体への結合親和性が低～中等度であったこと、並びに上記の機能アッセイの結果に基づくと、動物において plerixafor により誘発される急性毒性が、これらの受容体との相互作用を介するものである可能性は否定できない。

ニューロペプチド Y 受容体（Y_1 及び Y_2）：

全般的な受容体スクリーニングにおいて、plerixafor はニューロペプチド Y Y_1 受容体に対して選択的な中等度の結合親和性（5 µg/mL で 54%阻害）を示したが、Y_2 受容体に対しては明らかな結合親和性を示さなかった。ニューロペプチド Y は、ほとんどの交感神経終末にアデノシン三リン酸及びノルアドレナリンとともに貯蔵されており、末梢の交感神経系が活性化されている間、ノルアドレナリンとともに放出される。ニューロペプチド Y Y_1 受容体は、シナプス後の特に動脈の血管平滑筋細胞上に存在しており、非アドレナリン非プリン作動性の神経性収縮を媒介することが知られている(66)。Plerixafor のニューロペプチド Y Y_1 受容体への結合親和性が中等度であったこと、並びにラット及びイヌを用いた試験において血圧変化が観察されたことに基づくと、血圧変化に plerixafor のシナプス後 Y_1 受容体との相互作用が関連している可能性は否定できないが、その可能性は低いと考えられる。

グルタミン酸受容体（NMDA、ポリアミン；AMPA、カイニン酸、NMDA、アゴニスト作用；NMDA、グリシン；NMDA、フェンシクリジン）：

全般的な受容体スクリーニングにおいて、plerixafor はグルタミン酸 NMDA ポリアミン受容体に対して選択的な中等度の結合親和性（5 µg/mL で 53%阻害）を示したが、他のグルタミン酸受容体に対しては明らかな結合親和性を示さなかった。グルタミン酸 NMDA ポリアミン受容体は、変力性のリガンド依存性カチオンチャネル型のシナプス後イオンチャネル型受容体であり、主に中枢神経系に存在する(86),(87)。グルタミン酸は興奮性神経伝達物質であり、N 型及び P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルが関与するカルシウム依存性メカニズムによりシナプス前終末の小胞から放出される(88)。病態生理学的条件下において、グルタミン酸は急性（脳虚血、脳・脊髄損傷など）又は慢性（運動ニューロン疾患、筋委縮性側索硬化症、ハンチントン病、パーキンソン病、アルツハイマー病など）の神経変性過程に関与している(87),(88)。Plerixafor のグルタミン酸 NMDA ポリアミン受容体への結合親和性が中等度であったこと、本受容体が主に中枢神経系に存在していること、及び本受容体との相互作用に関連する生物学的影響に基づくと、plerixafor でみられた有害な毒性作用が本受容体との相互作用を介するものである可能性は低いと考えられる。

表 7 - SpectrumScreen でみられた plerixafor の有意な受容体結合（50%以上）の要約

受容体[a]	動物種	濃度 μg/mL (μmol/L)	阻害率	IC_{50}[b] μg/mL
N 型カルシウムチャネル	ラット	5.0 (10.0)	100	0.55
カリウムチャネル [SK_{CA}]	ラット	5.0 (10.0)	81	---
ヒスタミン H_3	ヒト	5.0 (10.0)	99	0.06
ムスカリン M_1	ヒト	5.0 (10.0)	73	---
ムスカリン M_2	ヒト	5.0 (10.0)	65	---
アドレナリン α_{1B}	ラット	5.0 (10.0)	66	---
アドレナリン α_{2C}	ヒト	5.0 (10.0)	58	---
ニューロペプチド Y Y_1	ヒト	5.0 (10.0)	54	---
グルタミン酸 NMDA、ポリアミン	ラット	5.0 (10.0)	53	---

[a] 注：コルヒチン受容体で測定された-71%の結合は、plerixafor でみられる毒性所見との関連性がないと考えられるため、記載していない。
[b] 別の試験（AA8111-01DEC20[redacted]）において、一部の受容体について測定した IC_{50}

表 8 - Plerixafor の結合によるアゴニスト又はアンタゴニスト活性を評価した機能アッセイの要約

アッセイ名	組織、細胞、動物種など	濃度 μg/mL	反応率 %	
			アゴニスト	アンタゴニスト
N 型カルシウムチャネル、収縮性	回腸、モルモット	15	0	30
N 型カルシウムチャネル、パッチクランプ	哺乳類細胞、ヒト	15	---	2
ヒスタミン H_3 GTPγS 結合	CHO-K1 細胞、ヒト	5	-46[a]	145[a]
ムスカリン M_1 GTPγS 結合	CHO 細胞、ヒト	5	2	71
ムスカリン M_2 収縮性	心房、モルモット	15	0	33
アドレナリン α_{1B} 収縮性	脾臓、ラット	15	0	28
アドレナリン α_{2C} GTPγS 結合	昆虫 Sf9 細胞、ヒト	5	-1	28

[a] 逆アゴニスト活性を示した。

5　薬力学的薬物相互作用試験

効力を裏付ける試験のマウス幹細胞動員試験（2.2.3項）において、plerixafor の G-CSF との併用を検討した。その他の薬物相互作用試験は実施していない。

6　考察及び結論

6.1　効力を裏付ける試験

ケモカイン／ケモカイン受容体ペアの SDF-1/CXCR4 は、幹細胞の骨髄中での保持及びその後の動員に際しての放出のメカニズムに大きく関与している(16),(17)。Plerixafor による幹細胞動員のメカニズムは、幹細胞のホーミング及び保持に関与する SDF-1/CXCR4 相互作用の阻害と推定される。効力を裏付ける試験では、in vitro 及び in vivo のいずれにおいても、plerixafor が SDF-1/CXCR4 相互作用の阻害剤であることが示され、このメカニズムが裏付けられている(22),(23)。

内因性に CXCR4 を発現するヒト細胞株 CCRF-CEM を用いた試験では、plerixafor により SDF-1 リガンドの CXCR4 への結合の阻害（IC_{50} = 651 ± 37 nmol/L [AOM0053]）、下流の G タンパク質の活性化の阻害（IC_{50} = 15.4 ± 4.4 nmol/L [AOM0056]）、カルシウム動員の阻害（IC_{50} = 572 ± 190 nmol/L [AOM0054]）及び細胞走化性の阻害（IC_{50} = 51 ± 17 nmol/L [AOM0055]）がみられた。また、plerixafor は、種々のヒト T リンパ芽球様細胞株において SDF-1 介在性カルシウム流入を阻害し（IC_{50} = 12.5～252 nmol/L）、緑色蛍光タンパクカップリング CXCR4 を遺伝子導入した U87.CD4 細胞において SDF-1 介在性 CXCR4 受容体インターナリゼーションを阻害した(23)。SDF-1 は CXCR4 の唯一のリガンドであり、CXCR7（SDF-1 の別の受容体と考えられている(89),(90)）への SDF-1 リガンドの結合は plerixafor により阻害されない（(91), [AOM0075]）ことから、これらの SDF-1 を介する過程の阻害は CXCR4 の阻害のみによると結論される。

他の試験において、plerixafor が G タンパク質の活性化、カルシウム流入、受容体インターナリゼーション及び走化性といった CXCR4 を介する過程に対してアゴニスト作用を示されていないことから、上記の plerixafor の作用が CXCR4 アンタゴニスト作用によるものであると考えられた(22),(23)。また、plerixafor が高濃度（1 nmol/L～10 µmol/L）では野生型 CXCR4 に対して弱いアゴニスト作用を示し、恒常的活性化変異型 CXCR4（N119S）も刺激することが示唆された(92)。しかし、数種類の細胞株を用い、種々の試験系において広範な試験を実施しても、これらの所見は再現されなかった(22),(23)ことから、報告された上記所見は細胞株に依存的な現象であるか、又は恒常的活性化変異型 CXCR4 の機能である可能性が示唆される。

カルシウム流入及びリガンド結合試験において、plerixafor は、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR7、CCR1、CCR2b、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9 及び BLT1 といった種々の他のケモカイン受容体と交差反応しないことが示されている（[AOM0051], [AOM0052], [AOM0057],

[AOM0058], [AOM0059], [AOM0064], [AOM0075], (22),(23)）ことから、plerixafor の阻害作用は CXCR4 選択的であることが示唆される。

部位突然変異により作製した変異型 CXCR4 を用い、plerixafor の CXCR4 受容体との相互作用を分子レベルで検討した。これらの試験に基づくと、plerixafor の CXCR4 への結合に 3 つの酸性アミノ酸残基（Asp171、Asp262 及び Glu288）が関与していると考えられる。別の結合様式として、Asp262 及び Glu288、並びに Phe189 又は Tyr190 のいずれかが関与し、Asp171 は関与しないというものが提唱されている(93)。しかし、いくつかの試験で得られたエビデンス(24),(25),(26),(94)から、plerixafor は 3 つの酸性アンカーポイント残基（Asp171、Asp262 及び Glu288）で相互作用することが裏付けられている。

CXCR4 は哺乳類動物種を通して高度に保存されており、plerixafor はマウス及びイヌの CXCR4 に対して SDF-1 介在性カルシウム流入を阻害し、その効力はヒト受容体に対する阻害と同程度であることが示されている(95),(96)。Plerixafor は、マウス白血病細胞株 L1210 を用いた試験でマウス CXCR4 を阻害し（IC_{50} = 100.7 nmol/L）(23)、plerixafor により動員されたイヌ PBMC を用いた試験でイヌ CXCR4 を阻害した（IC_{50} = 248.7～649 nmol/L）（(29); 試験[AOM0049]）。サルにおいて、plerixafor は、他の動物種で使用された用量のアロメトリック・スケーリングに基づく等価用量で HSC を動員したことから、動物種を通して効力及び反応性が同程度であることが示唆される。これらの動物種を用いたモデルは plerixafor の作用を検討するのに妥当と考えられる。

Plerixafor は複数の動物種で HSC 及び HPC を動員することが示されている；マウス（(28); [試験 AOM0033]）、イヌ（(29); 試験[AOM0045], [AOM0046]）及びサル(30)。マウス大腿骨骨髄を plerixafor で灌流した in situ 灌流試験において、plerixafor が骨髄由来の HPC を動員することが確認された（(27); 試験[AOM0070]）。さらに、本モデルで G-CSF を前投与したマウスに plerixafor を持続投与すると、plerixafor の単独投与時と比べて HPC 動員が明らかに増強された。Plerixafor はマウスで用量及び時間依存的に HPC を動員し、その至適用量は 5 mg/kg 皮下投与、最大の動員は投与 1 時間後であった。Plerixafor は、G-CSF による動員作用が弱いマウスの系統を含め、マウスで HPC 動員を相乗的に増強した(28)。

Plerixafor により動員された HSC は、骨髄を破壊したレシピエントの骨髄を再構築することがマウス(28)、イヌ（(29); 試験[AOM0045]）及びサル(30)を用いた自家移植、並びにイヌを用いた同種移植（(29); 試験[AOM0046]）で示されている。Plerixafor 及び plerixafor+G-CSF は長期生着能を有するマウス HSC を動員し、plerixafor の作用は G-CSF と相乗的であった。NOD/SCID マウスを用いた SRC アッセイにおいて、plerixafor はヒト HSC を動員し、G-CSF との相乗作用を示した。Plerixafor+G-CSF により動員されたヒト CD34 陽性細胞は、生着能の高いマウス HSC と類似した表現型を有していた。

同様に、イヌ及びサルに plerixafor をそれぞれ 4 mg/kg 及び 1 mg/kg で皮下投与すると、HSC が動員された。イヌに HSC を自家移植すると、長期にわたる持続的な生着（好中球数及び血小板数の回復により測定）がみられた。Plerixafor により動員された細胞を同種移植すると、ドナー細胞の骨髄キメリズムが 100%となった。アカゲザルに自家移植したときにも長期にわたる生着がみられた。また、アカゲザルの試験で動員された細胞の表現型解析では、plerixafor により動員された細胞が G-CSF により動員された細胞と異なる表現型を有することが示された。複数の動物種で得られたこれらのデータを総合すると、plerixafor により HSC が動員され、これらの HSC を移植すると造血系が再構築され、長期にわたり持続的に骨髄が生着することが示される。同種移植プロトコールには必ず前処置レジメンが含まれている。前処置レジメンの目的は、ドナーのキメリズムを増加させることによりドナーHSC の生着率を改善することである。現在の前処置レジメンには化学療法薬による骨髄破壊があり、合わせて放射線を照射する場合もある。Plerixafor は、骨髄からレシピエント HSC を動員することにより、ドナー細胞の生着に使用できる空のニッチ数を増加させることから、代替的な前処置レジメンとして使用できる可能性がある。

6.2 副次的薬理試験

CXCR4 及びそのリガンド SDF-1 の発現は、多くの病態、特に細胞遊走が関与する病態と関連している。副次的薬理試験では、plerixafor を CXCR4 アンタゴニストとして用い、疾患モデルにおける CXCR4 阻害の影響を検討した。第一に検討すべき plerixafor の薬理作用は、T 細胞指向性 HIV に対する作用であった。T 細胞指向性ウイルスは細胞への侵入の際に CXCR4 を共受容体として使用するが、この試験により plerixafor が CXCR4 を強力に阻害することが示された。幹細胞は組織修復に関与しており、plerixafor は 3 つの虚血性疾患モデルにおける転帰を改善した。SDF-1 は炎症部位への T リンパ球の動員に関与しており(11),(12)、また循環血中好中球数の恒常性にも関与している(97),(98)。Plerixafor は 3 つの炎症性疾患モデルにおいて疾患の進行を抑制した。CXCR4 は血液がん及び固形腫瘍の両方に影響を及ぼす。Plerixafor は、in vitro において、数種類のがん細胞の SDF-1/CXCR4 を介する走化性を阻害した。In vivo では、plerixafor は NHL 及び原発性脳腫瘍のモデルにおいて腫瘍増殖を抑制し、また ALL 及び APL のモデルにおいて白血病細胞を動員し、APL モデルではさらに化学療法への感受性を増加させ、生存率を改善した。検討した疾患モデルで plerixafor の投与により転帰が改善したことから、これらのモデルに CXCR4 介在性細胞遊走が関与していることが示される。

副次的薬理試験での投与法は、疾患モデルに基づいて設定した。例えば、組織修復モデルで幹細胞を動員するには単回ボーラス投与、炎症性疾患モデルには持続投与とした。これらのすべての試験例において、plerixafor 投与による明らかな毒性作用は、2 つの例外を除いて、認められなかった。

NHL モデルに plerixafor を持続投与すると、腫瘍サイズが増加した。同様の所見が G-CSF で報告されている。Daudi 細胞を NOD/SCID マウスに移植した B 細胞性 NHL モデルにおいて、G-CSF により

動員されたヒト造血 CD34 陽性幹細胞が腫瘍増殖を促進した(99)。これらの幹細胞は血管新生に関与していることから、観察された腫瘍増殖の促進は、血管新生の増加によるものと考えられる。このことは、NHL モデルに plerixafor を持続投与したとき、明らかな血管新生の増加がみられることと一致している。Plerixafor をボーラス皮下投与（幹細胞動員に用いる投与法）したときには腫瘍増殖の促進はみられず、逆に腫瘍増殖の抑制がみられた。この結果から、NHL 患者への plerixafor の使用において、腫瘍増殖促進の懸念はないことが示唆された。

マウス MI モデルにおいて、plerixafor は心血管系パラメータを改善し、組織学的評価における組織損傷を減少させ、生存率を上昇させることにより、転帰を改善した。アカゲザル MI モデルでは、MI に関連する機能障害及び組織損傷のいずれのパラメータの改善もみられなかった。事実、両パラメータについて非投与対照動物と plerixafor 投与動物を識別することは不可能であった。ブタ MI モデルでは、心血管系パラメータの改善はみられず、plerixafor を 4 mg/kg で単回投与するか、又は 7 日間連日皮下投与したブタの心臓の組織学的評価で組織損傷の増加がみられており、この所見について更なる考察が必要である（注：本所見は低用量の 240 µg/kg ではみられなかった）。梗塞サイズには統計学的有意な増加がみられたが、対照群及び plerixafor 投与群のいずれにおいても左心室損傷面積が小さく（5 ～10%）、心血管系の機能的パラメータには、対照群と投与群の間に有意差がみられなかった。特記すべきこととして、対照群及び投与群のいずれにおいても機能的パラメータの障害の重症度が予想よりはるかに大きく、心臓の組織学的評価における組織障害の程度と一致しないと考えられた。心血管系の所見における矛盾点に加えて、PBMC 及び EPC の動員が検出されなかった。したがって、追加試験で確認しない限り、生物学的関連性の評価結果はいずれも疑わしいと考えられる。また、ブタに投与した用量 108 mg/m^2（4 mg/kg）は患者に使用するときの推奨用量 8.9 mg/m^2（240 µg/kg）より約 12 倍高かった（体表面積での計算に基づく）。3 つの試験で得られたデータを総合すると、plerixafor を申請用法・用量でヒトに投与しても、特に MI の発症時又はその前後に投与される可能性は極めて低いことから、問題はないと考えられる。

6.3　安全性薬理試験

Plerixaforのヒトにおける安全性に悪影響を及ぼす可能性のある薬理作用について一連の非臨床安全性薬理試験で検討した。

In vivo 中枢神経系安全性薬理試験において、plerixafor は一過性の刺激変化及び抑制変化（マウス及びラットに単回皮下投与したときの運動量及び筋緊張度の低下など）を引き起こした。変化は、投与 1 時間後までに発現し、その後速やかに減弱した。Plerixafor が特定の神経伝達物質受容体又は酵素と相互作用する可能性を検討した in vitro 試験から得られた結果では、plerixafor でみられた変化の基本的な機序は明らかにはならなかった。Plerixafor と中枢神経系受容体との相互作用の可能性は否定できないが、ラットでの plerixafor の中枢神経系への移行は少なかったことから、毒性徴候の誘発には中枢

神経系よりも末梢神経系の受容体との相互作用がより大きな影響があると推察するのが妥当と考えられた。

Plerixafor の催不整脈作用及び全体的な心臓における安全性について、in vitro 試験並びにラット及びイヌの in vivo 試験で評価した。Plerixafor は in vitro で hERG カリウムチャネル電流に対して有意な阻害作用を示さなかった（$p > 0.05$）ことから、ヒトでこのメカニズムを介した QT/QTc 延長を誘発する可能性は低いことが示された。イヌに plerixafor を最長 8 時間持続静脈内投与した GLP 適用試験で得られた ECG 波形の定量的評価では、plerixafor による QRS 時間及び QTc 間隔の変化はみられなかった。本試験において、検討した 2 つの持続投与速度のうち、高投与速度で plerixafor を投与したとき（定常状態における血漿中濃度は 10.9～14.3 µg/mL）、心拍数及び血圧の上昇が認められた。これらの変化がみられた後、急性毒性を示す一般状態の変化が持続投与の数時間後から認められた。変化が非常に重篤であったため、本投与速度で検討した 2 匹のうち 1 匹の持続投与を早期中止する必要があった。高投与速度で検討したいずれのイヌにおいても、plerixafor の心臓への直接作用を示唆する組織学的所見は認められなかった。低投与速度で検討した別の 2 匹のイヌでは（定常状態における血漿中濃度は 6.0～7.4 µg/mL）、心拍数の増加、ECG の変化及び毒性を示唆する一般状態の変化は認められなかった。本試験を総合すると、plerixafor は、ECG の質的及び量的変化を伴わず、心拍数及び血圧を軽度に上昇させる可能性があると結論された。

麻酔ラットを用いた試験において、plerixafor の短時間持続静脈内投与により、用量依存的な血圧、心筋収縮性及び心拍出量の減少が認められた。最高用量を静脈内投与したすべてのラットが持続注入終了後 2～5 分以内に死亡した。静脈内投与したラットの ECG 変化は軽度であった。20 mg/kg の皮下投与後にも同様の血行動態の変化が認められた。皮下投与した 5 匹中 4 匹のラットにおいて、P 波の平坦化又は陰性化がみられるか、又は P 波が検出不能であった。

無麻酔イヌを用いた in vivo 心血管系安全性薬理試験を総合すると、plerixafor は、ECG パラメータの変化を伴わず、心拍数及び血圧を軽度に上昇させる可能性があると結論された。この推察は、イヌを用いた GLP 適用の主試験及び予備試験において、持続投与中止後に、毒性を示す一般状態の変化及び心血管系パラメータの変化が速やかに回復したこととも一致している。Plerixafor がコンダクタンス及び ECG を変化させる可能性は低いと考えられる。

Plerixafor は Ca^{2+}及び Mg^{2+}といった二価の陽イオンに結合する。ラット大動脈平滑筋細胞を用いた in vitro 試験において、Ca^{2+}の添加により、アンジオテンシン II 誘発性収縮に対する plerixafor の阻害作用が減弱した。しかし、in vivo 試験でみられた plerixafor による血行動態変化にこの推定メカニズムが関与しているかは不明である。

ラット及びイヌを用いた in vivo 心血管系安全性薬理試験において毒性を示す一般状態の変化は、plerixaforの毒性試験で観察されたものと質的に類似しており、非常にC_{max}依存的であると考えられる。[Module 2.6.6 の 9 項] 非臨床毒性試験概要の考察及び結論を参照のこと。しかし、イヌを用いた持続投与試験では、これらの変化に曝露量との関連がみられた。In vitro 試験の結果から、plerixafor は ACE との相互作用を介した血圧低下作用及びニューロペプチド Y 受容体アゴニスト作用を介した血圧上昇作用を示す可能性が示唆された。in vivo でみられた plerixafor による変化にこれらの結果が関与しているかは不明である。

Plerixafor は破骨細胞の活性を阻害する可能性があるが、plerixafor で予定されている臨床使用期間が短いことを考慮すると、この作用の懸念は少ないと考えられる。ラットに plerixafor を単回皮下投与したとき、特定の内分泌評価項目に変化はみられなかった。

以上、in vivo 安全性薬理試験において、plerixafor の投与によりいくつかの有害な薬理作用が認められた。これらの作用の発現は、ラット及びマウスに皮下又は静脈内投与したときには速やかであったが、イヌに長時間にわたり持続静脈内投与したときには遅かった。これらの作用に伴って、急性毒性を示す一般状態の変化がみられる場合もあった。具体的には、ラットにおける呼吸数及び 1 回換気量の増加、並びに無麻酔イヌにおける心拍数及び血圧の上昇などの変化が認められた。Plerixafor の急性毒性に CXCR4 が関与している可能性は否定できないが、その既知の薬理作用に基づくと、その可能性は低いと考えられる。Plerixafor の急性毒性は、静脈内又は皮下投与後速やかに発現するが、イヌを用いた心血管系安全性試験の所見からは曝露量との関連が示唆される。Plerixafor の安全性薬理試験の結果は毒性試験の結果と一致するものであり、ヒトにおける plerixafor の使用に対する特段の危険性を示唆するものではなかった。

In vitro 全般的受容体スクリーニングの結果により、plerixafor（10 µmol/L [5 µg/mL]）は様々な多数の受容体に対して中等度又は強度の結合親和性を有することが示された。毒性試験及び安全性薬理試験で得られた plerixafor の最高血漿中濃度は 5 µg/mL 以上であることから、plerixafor とこれらの受容体の 1 つ以上との相互作用が、動物試験でみられた plerixafor 誘発性の急性毒性徴候に関与している可能性がある。スクリーニング及び上記の詳細な検討で確認された受容体の大部分（N 型カルシウムチャネル、カリウム SK_{CA} チャネル、ヒスタミン H_3、ムスカリン性アセチルコリン M_2、アドレナリン α_{2C}）は、主として中枢神経系及び末梢神経系のシナプス前神経末端に存在する。また、確認された受容体の大部分は、カルシウム流入、細胞内カルシウム濃度及び誘発された神経伝達物質放出の調節に関連している。Plerixafor と中枢神経系受容体との相互作用の可能性は否定できないが、ラットでの plerixafor の中枢神経系への移行は少なかったことから、毒性徴候の誘発には中枢神経系よりも末梢神経系の受容体との相互作用がより大きな影響があると推察するのが妥当と考えられた。しかし、これらの所見の臨床的意義は不明である。推奨用量でのヒトにおける plerixafor の最高血漿中濃度（約 1 µg/mL）は、全般的受容体スクリーニングで使用した濃度の約 5 分の 1 である。したがって、plerixafor と中等度の

結合親和性を有する受容体（mAChR、アドレナリン性 α_{1B} 及び α_{2C}、ニューロペプチド Y Y_1、グルタミン酸 NMDA ポリアミン）と plerixafor との相互作用が、ヒトでみられる重大な plerixafor 誘発性の毒性に関与する可能性は低いと考えられる。

6.4 結論

Plerixafor はケモカイン受容体 CXCR4 の選択的アンタゴニストであることが確認された。CXCR4 及びそのリガンドの SDF-1 は、骨髄への HSC のホーミング及び保持に大きく関与している。Plerixafor は、CXCR4 アンタゴニストとして、マウス、イヌ及びサルで HSC を動員した。さらに、動員された HSC は骨髄に生着することが可能であり、移植後にレシピエント動物の免疫系を長期間にわたり持続的に再構築した。副次的薬理試験では、HIV 感染、組織修復に関連した血管新生、炎症及びがんといった種々の疾患モデルにおいて、CXCR4 阻害による有益な作用が確認された。これらの種々のモデルで用いた投与法の忍容性は概して良好であった。In vivo 安全性薬理試験において、plerixafor の投与後に急性毒性を示唆する有害な薬理学的作用がいくつか認められた。受容体を特定した in vitro 試験から、安全性薬理試験における有害な所見及び急性毒性所見の基本的な機序を結論づけることはできなかった。これらの安全性薬理試験の結果は毒性試験の結果と一致するものであった。追加で実施した in vitro の全般的な受容体活性スクリーニングでは、plerixafor は、ヒトにおける最高血漿中濃度よりも数倍高い濃度（5 µg/mL）で、主に中枢神経系及び末梢神経系のシナプス前神経終末に存在している多くの種類の受容体（N 型カルシウムチャネル、カリウム SK_{CA} チャネル、ヒスタミン H_3 受容体、ムスカリン性アセチルコリン受容体 M_1 及び M_2、アドレナリン受容体 α_{1B} 及び α_{2C}、ニューロペプチド Y Y_1 受容体、並びにグルタミン酸 NMDA ポリアミン受容体）に対して、中等度又は強い結合親和性を示した。これらの結果の臨床における意義は不明である。

効力を裏付ける試験、副次的薬理試験及び安全性薬理試験の結果を総合すると、幹細胞動員を目的として plerixafor を効果的かつ安全に使用できるものと考えられた。

7　図表

本文中に記載した。

参 考 文 献

1. Murdoch C. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. Immunol Rev. 2000;177:175-84.
2. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. Science. 1999;283:845-8.
3. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. Nature. 1996;382:829-33.
4. Nagasawa T, Tachibana K, Kishimoto T. A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection. Semin Immunol. 1998;10:179-85.
5. Yu L, Cecil J, Peng SB, Schrementi J, Kovacevic S, Paul D, Su EW, Wang J. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. Gene. 2006;374:174-9.
6. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:9448-53.
7. McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK, Palis J. Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. Dev Biol. 1999;213:442-56.
8. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. Nature.1996;382:635-8.
9. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. Nature. 1998;393:591-4.
10. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. Nature. 1998;393:595-9.
11. Buckley CD, Amft N, Bradfield PF, Pilling D, Ross E, Arenzana-Seisdedos F, Amara A, Curnow SJ, Lord JM, Scheel-Toellner D, Salmon M. Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium. J Immunol. 2000;165:3423-9.
12. Nanki T, Lipsky PE. Cutting edge: stromal cell-derived factor-1 is a costimulator for CD4+ T cell activation. J Immunol. 2000;164:5010-4.
13. Oberlin E, Amara A, Bachelerie F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. Nature. 1996;382:833-5.

14. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. Exp Hematol. 2002;30:973-81.
15. Thomas J, Liu F, Link DC. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. Curr Opin Hematol. 2002;9:183-9.
16. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. J Exp Med. 1997;185:111-20.
17. Lapidot T. Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. Ann N Y Acad Sci. 2001;938:83-95.
18. Gazitt Y, Liu Q. Plasma levels of SDF-1 and expression of SDF-1 receptor on CD34+ cells in mobilized peripheral blood of non-Hodgkin's lymphoma patients. Stem Cells. 2001;19:37-45.
19. Lévesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. J Clin Invest. 2003;111:187-96.
20. Sanz-Rodríguez F, Hidalgo A, Teixidó J. Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. Blood. 2001;97:346-51.
21. Shen W, Bendall LJ, Gottlieb DJ, Bradstock KF. The chemokine receptor CXCR4 enhances integrin-mediated in vitro adhesion and facilitates engraftment of leukemic precursor-B cells in the bone marrow. Exp Hematol. 2001;29:1439-47.
22. Fricker SP, Anastassov V, Cox J, Darkes MC, Grujic O, Idzan SR, Labrecque J, Lau G, Mosi RM, Nelson KL, Qin L, Santucci Z, Wong RS. Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4. Biochem Pharmacol. 2006;72:588-96.
23. Hatse S, Princen K, Bridger G, De Clercq E, Schols D. Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. FEBS Lett. 2002;527:255-62.
24. Gerlach LO, Skerlj RT, Bridger GJ, Schwartz TW. Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor. J Biol Chem. 2001;276:14153-60.
25. Hatse S, Princen K, Gerlach LO, Bridger G, Henson G, De Clercq E, Schwartz TW, Schols D. Mutation of Asp(171) and Asp(262) of the chemokine receptor CXCR4 impairs its coreceptor function for human immunodeficiency virus-1 entry and abrogates the antagonistic activity of AMD3100. Mol Pharmacol. 2001;60:164-73.
26. Rosenkilde MM, Gerlach LO, Jakobsen JS, Skerlj RT, Bridger GJ, Schwartz TW. Molecular mechanism of AMD3100 antagonism in the CXCR4 receptor: transfer of binding site to the CXCR3 receptor. J Biol Chem. 2004;279:3033-41.

27. Martin C, Bridger GJ, Rankin SM. Structural analogues of AMD3100 mobilise haematopoietic progenitor cells from bone marrow in vivo according to their ability to inhibit CXCL12 binding to CXCR4 in vitro. Br J Haematol. 2006;134:326-9.
28. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, Liles WC, Li X, Graham-Evans B, Campbell TB, Calandra G, Bridger G, Dale DC, Srour EF. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. J Exp Med. 2005;201:1307-18.
29. Burroughs L, Mielcarek M, Little MT, Bridger G, Macfarland R, Fricker S, Labrecque J, Sandmaier BM, Storb R. Durable engraftment of AMD3100-mobilized autologous and allogeneic peripheral-blood mononuclear cells in a canine transplantation model. Blood. 2005;106:4002-8.
30. Larochelle A, Krouse A, Metzger M, Orlic D, Donahue RE, Fricker S, Bridger G, Dunbar CE, Hematti P. AMD3100 mobilizes hematopoietic stem cells with long-term repopulating capacity in nonhuman primates. Blood. 2006;107:3772-8.
31. Chen J, Larochelle A, Fricker S, Bridger G, Dunbar CE, Abkowitz JL. Mobilization as a preparative regimen for hematopoietic stem cell transplantation. Blood. 2006;107:3764-71.
32. Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D, Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:5320-5.
33. Gonzalo JA, Lloyd CM, Peled A, Delaney T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease. J Immunol. 2000;165:499-508.
34. Möhle R, Bautz F, Rafii S, Moore MA, Brugger W, Kanz L. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. Blood. 1998;91:4523-30.
35. Dürig J, Schmücker U, Dührsen U. Differential expression of chemokine receptors in B cell malignancies. Leukemia. 2001;15:752-6.
36. Bertolini F, Dell'Agnola C, Mancuso P, Rabascio C, Burlini A, Monestiroli S, Gobbi A, Pruneri G, Martinelli G. CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma. Cancer Res. 2002;62:3106-12.
37. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. Blood. 1999;94:3658-67.
38. Bradstock KF, Makrynikola V, Bianchi A, Shen W, Hewson J, Gottlieb DJ. Effects of the chemokine stromal cell-derived factor-1 on the migration and localization of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells within bone marrow stromal layers. Leukemia. 2000;14:882-8.

39. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature. 2001;410:50-6.
40. Scotton CJ, Wilson JL, Milliken D, Stamp G, Balkwill FR. Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? Cancer Res. 2001;61:4961-5.
41. Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Doi R, Hori T, Fujii N, Imamura M. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. Clin Cancer Res. 2000;6:3530-5.
42. Robledo MM, Bartolome RA, Longo N, Rodríguez-Frade JM, Mellado M, Longo I, van Muijen GN, Sánchez-Mateos P, Teixidó J. Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. J Biol Chem. 2001;276:45098-105.
43. Geminder H, Sagi-Assif O, Goldberg L, Meshel T, Rechavi G, Witz IP, Ben-Baruch A. A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. J Immunol. 2001;167:4747-57.
44. Rempel SA, Dudas S, Ge S, Gutiérrez JA. Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. Clin Cancer Res. 2000;6:102-11.
45. Libura J, Drukala J, Majka M, Tomescu O, Navenot JM, Kucia M, Marquez L, Peiper SC, Barr FG, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. Blood. 2002;100:2597-606.
46. De Clercq E, Yamamoto N, Pauwels R, Balzarini J, Witvrouw M, De Vreese K, Debyser Z, Rosenwirth B, Peichl P, Datema R, et al. Highly potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus by the bicyclam derivative JM3100. Antimicrob Agents Chemother. 1994;38:668-74.
47. Schols D, Esté JA, Henson G, De Clercq E. Bicyclams, a class of potent anti-HIV agents, are targeted at the HIV coreceptor fusin/CXCR-4. Antiviral Res. 1997;35:147-56.
48. Schols D, Struyf S, Van Damme J, Esté JA, Henson G, De Clercq E. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. J Exp Med. 1997;186:1383-8.
49. Bridger GJ, Skerlj RT, Thornton D, Padmanabhan S, Martellucci SA, Henson GW, Abrams MJ, Yamamoto N, De Vreese K, Pauwels R, et al. Synthesis and structure-activity relationships of phenylenebis(methylene)-linked bis-tetraazamacrocycles that inhibit HIV replication. Effects of macrocyclic ring size and substituents on the aromatic linker. J Med Chem. 1995;38:366-78.
50. Donzella GA, Schols D, Lin SW, Esté JA, Nagashima KA, Maddon PJ, Allaway GP, Sakmar TP, Henson G, De Clercq E, Moore JP. AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. Nat Med. 1998;4:72-7.
51. Jiao C, Fricker S, Schatteman GC. The chemokine (C-X-C motif) receptor 4 inhibitor AMD3100 accelerates blood flow restoration in diabetic mice. Diabetologia. 2006;49:2786-9.

52. Capoccia BJ, Shepherd RM, Link DC. G-CSF and AMD3100 mobilize monocytes into the blood that stimulate angiogenesis in vivo through a paracrine mechanism. Blood. 2006;108:2438-45.
53. Lukacs NW, Berlin A, Schols D, Skerlj RT, Bridger GJ. AMD3100, a CxCR4 antagonist, attenuates allergic lung inflammation and airway hyperreactivity. Am J Pathol. 2002;160:1353-60.
54. Matthys P, Hatse S, Vermeire K, Wuyts A, Bridger G, Henson GW, De Clercq E, Billiau A, Schols D. AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN-gamma receptor-deficient mice. J Immunol. 2001;167:4686-92.
55. De Klerck B, Geboes L, Hatse S, Kelchtermans H, Meyvis Y, Vermeire K, Bridger G, Billiau A, Schols D, Matthys P. Pro-inflammatory properties of stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) in collagen-induced arthritis. Arthritis Res Ther. 2005;7:R1208-20.
56. Hatse S, Fonteyn E, Bridger G, De Clercq E, Schols D. CXC-chemokine receptor 4 as a potential new therapeutic target for neuroblastoma and breast cancer. Int J Cancer. 2002;Supplement(13):349.
57. Lagneaux L, Delforge A, Dejeneffe M, Schols D, Bron D. The SDF-1/CXCR4 pathway is involved in the homing of chronic lymphocytic leukemia B cells and in their survival after migration into bone marrow stromal layers: Inhibition by the CXCR4 antagonist (AMD3100). Exp Hematol. 2002;30(Suppl. 1):Abst 72.
58. Paul S, Mancuso P, Rabascio C, Gobbi A, Cappillo M, Pruneri G, Martinelli G, Fricker S, Bridger G, Bertolini F. In vitro and preclinical activity of the novel AMD3100 CXCR4 antagonist in lymphoma models. In: American Society of Hematology Annual Meeting; 2002; Philadelphia, PA, USA. Blood. 2002.
59. Liesveld JL, Lancet JE, Rosell KE, Bechelli J, Abboud CN, Phillips GL. The CXCR4 antagonist, AMD3100, inhibits AML transmigratory activity but does not alter blast proliferation or survival. Blood. 2004;104(Part 1):Abst 2881.
60. Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, Bridger G, Balkwill FR. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. Cancer Res. 2002;62:5930-8.
61. Rubin JB, Kung AL, Klein RS, Chan JA, Sun Y, Schmidt K, Kieran MW, Luster AD, Segal RA. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:13513-8.
62. Juarez J, Dela Pena A, Baraz R, Hewson J, Khoo M, Cisterne A, Fricker S, Fujii N, Bradstock KF, Bendall LJ. CXCR4 antagonists mobilize childhood acute lymphoblastic leukemia cells into the peripheral blood and inhibit engraftment. Leukemia. 2007;21:1249-57.
63. Nervi B, Holt M, Rettig MP, Bridger G, Ley TJ, DiPersio JF. AMD3100 Mobilizes Acute Promyelocytic Leukemia Cells from the Bone Marrow into the Peripheral Blood and Sensitizes Leukemia Cells to Chemotherapy. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2005;106:Abstract 246.
64. Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. J Clin Invest. 2000;106:571-8.

65. Kisilevsky AE, Zamponi GW. Presynaptic calcium channels: structure, regulators, and blockers. Handb Exp Pharmacol. 2008;184:45-75.
66. Boehm S, Kubista H. Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. Pharmacol Rev. 2002;54:43-99.
67. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. Pharmacol Rev. 2005;57:411-42.
68. Tedford HW, Zamponi GW. Direct G protein modulation of CaV2 calcium channels. Pharmacol Reviews. 2006;58:837-62.
69. Elmslie KS. Neurotransmitter modulation of neuronal calcium channels. J Bioenerg and Biomembr. 2003;35:477-89.
70. Prommer E. Ziconotide: a new option of refractory pain. Drugs of Today. 2006;42:369-78.
71. Skov MJ, Beck JC, de Kater AW, Shopp GM. Nonclinical safety of ziconotide: an intrathecal analgesic of a new pharmaceutical class. Intl J Toxicol. 2007;26:411-21.
72. Stocker M, Hirzel K, D'hoedt D, Pedarzani P. Matching molecules to function: neuronal Ca2+-activated K+ channels and afterhyperpolarization. Toxicon. 2004;43:933-49.
73. Faber ES, Sah P. Calcium-activated potassium channels: multiple contributions to neuronal function. Neuroscientist. 2003;9:181-94.
74. Faber ES, Sah P. Functions of SK channels in central neurons. Clin Exper Pharmacol Physiol. 2007;34:1077-83.
75. Maylie J, Bond CT, Herson PS, Lee W-S, Adelman JP. Small conductance Ca2+-activated K+ channels and calmodulin. J Physiol. 2004;554:255-61.
76. Bond CT, Maylie J, Adelman JP. Small-conductance calcium-activated potassium channels. Ann NY Acad Sci. 1999;868:370-8.
77. Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. Physiol. 2006;21:69-78.
78. Morrey C, Estephan R, Abbott GW, Levi R. Cardioprotective effect of histamine H3-receptor activation: pivotal role of Gβγ-dependent inhibition of voltage operated Ca+2 channels. J Pharmacol Exper Therap. 2008;326:871-8.
79. Seyedi N, Mackins CJ, Machida T, Reid AC, Silver RB, Levi R. Histamine H3-receptor-induced attenuation of norepinephrine exocytosis: a decreased protein kinase A activity mediates a reduction in intracellular calcium. J Pharmacol Exper Therap. 2005;312: 272-80.
80. Malinowska B, Godlewski G, Schlicker E. Histamine H3 receptors-general characterization and their function in the cardiovascular system. J Physiol Pharmacol. 1998;49:191-211.
81. Leurs R, Bakker RA, Timmerman H and de Esch IJP. The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs. Nature Rev Drug Discovery. 2005;4:107-20.

82. Esbenshade TA, Fox GB, Cowart MD. Histamine H3 receptor antagonists: preclinical promise for treating obesity and cognitive disorders. Molec Intervent. 2006;6:77-88.
83. Celanire S, Wijtmans M, Talaga P, Leurs R, de Esch IJP. Histamine H3 receptor antagonists reach out for the clinic. Drug Discovery Today. 2005;10:1613-27.
84. Wijtmans M, Leurs R, de Esch I. Histamine H3 receptor lignads break ground in a remarkable plethora of therapeutic areas. Exper Opin Investigational Drugs. 2007;16:967-85.
85. Wess J, Eglen RM, Gautam D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. Nature Reviews Drug Discovery. 2007;6:721-33.
86. Kew JNC, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. Psychopharmacology. 2005;179:4-29.
87. Kalia LV, Kalia SK, Salter MW. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. Lancet Neurol. 2008;7:742-55.
88. Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. J Nutr. 2000;130:1007S-15S.
89. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelerie F. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. J Biol Chem. 2005;280:35760-6.
90. Shimizu N, Soda Y, Kanbe K, Liu HY, Mukai R, Kitamura T, Hoshino H. A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. J Virol. 2000;74:619-26.
91. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. J Exp Med. 2006;203:2201-13.
92. Zhang WB, Navenot JM, Haribabu B, Tamamura H, Hiramatu K, Omagari A, Pei G, Manfredi JP, Fujii N, Broach JR, Peiper SC. A point mutation that confers constitutive activity to CXCR4 reveals that T140 is an inverse agonist and that AMD3100 and ALX40-4C are weak partial agonists. J Biol Chem. 2002;277:24515-21.
93. Trent JO, Wang ZX, Murray JL, Shao W, Tamamura H, Fujii N, Peiper SC. Lipid bilayer simulations of CXCR4 with inverse agonists and weak partial agonists. J Biol Chem. 2003;278:47136-44.
94. Gerlach LO, Jakobsen JS, Jensen KP, Rosenkilde MR, Skerlj RT, Ryde U, Bridger GJ, Schwartz TW. Metal ion enhanced binding of AMD3100 to Asp262 in the CXCR4 receptor. Biochemistry. 2003;42:710-7.
95. Moepps B, Braun M, Knöpfle K, Dillinger K, Knöchel W, Gierschik P. Characterization of a Xenopus laevis CXC chemokine receptor 4: implications for hematopoietic cell development in the vertebrate embryo. Eur J Immunol. 2000;30:2924-34.

96. Liang TS, Hartt JK, Lu S, Martins-Green M, Gao JL, Murphy PM. Cloning, mRNA distribution, and functional expression of an avian counterpart of the chemokine receptor/HIV coreceptor CXCR4. J Leukoc Biol. 2001;69:297-305.
97. Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. Immunity. 2003;19:583-93.
98. Suratt BT, Petty JM, Young SK, Malcolm KC, Lieber JG, Nick JA, Gonzalo JA, Henson PM, Worthen GS. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. Blood. 2004;104:565-71.
99. de Bont ES, Guikema JE, Scherpen F, Meeuwsen T, Kamps WA, Vellenga E, Bos NA. Mobilized human CD34+ hematopoietic stem cells enhance tumor growth in a nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mouse model of human non-Hodgkin's lymphoma. Cancer Res. 2001;61:7654-9.

サノフィ株式会社

モゾビル皮下注 24 mg

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.3 薬理試験概要表

Total number of pages: 16

目　　次

表　目　次 3

1　　薬理試験一覧表 4

2　　効力を裏付ける試験 8

3　　副次的薬理試験 9

4　　安全性薬理試験 10

5　　薬力学的薬物相互作用試験 16

表　目　次

表 2.6.3.1 - 薬理試験一覧表 4
表 2.6.3.4.1 - 安全性薬理試験 10

1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1 - 薬理試験一覧表

Type of Study / Study Title	Test System	Route	Testing Facility	GLP Compliance	Study No. [Module No.]
Primary Pharmacodynamics					
Cross Screening AMD3100 for CCR4 and CCR7	CCRF-CEM cells	In vitro	AnorMED	No	AOM0051 [4.2.1.1-1]
Inhibition of LTB_4 Ligand Binding to the Receptor by AMD3100	CHO-S/LTB_4 cells	In vitro	AnorMED	No	AOM0052 [4.2.1.1-2]
Inhibition of SDF-1 Ligand Binding to CXCR4 by AMD3100	CCRF-CEM lymphoblastoid cells	In vitro	AnorMED	No	AOM0053 [4.2.1.1-3]
Inhibition of SDF-1 Stimulated Calcium Flux by AMD3100	CCRF-CEM lymphoblastoid cells	In vitro	AnorMED	No	AOM0054 [4.2.1.1-4]
Inhibition of SDF-1 Stimulated Chemotaxis by AMD3100	CCRF-CEM lymphoblastoid cells	In vitro	AnorMED	No	AOM0055 [4.2.1.1-5]
Inhibition of SDF-1 Stimulated GTPγS Binding by AMD3100	CCRF-CEM lymphoblastoid cells	In vitro	AnorMED	No	AOM0056 [4.2.1.1-6]
The Effects of AMD3100 on IP10 Stimulated Calcium Flux	HEK293F.CXCR3 cells	In vitro	AnorMED	No	AOM0057 [4.2.1.1-7]
The Effects of AMD3100 on MCP-1 Stimulated Calcium Flux	HEK293F.CCR2b cells	In vitro	AnorMED	No	AOM0058 [4.2.1.1-8]
AMD3100 Has No Significant Effect on CCR5 Mediated Calcium Flux	HEK293F.CCR5 cells	In vitro	AnorMED	No	AOM0059 [4.2.1.1-9]
The Effects of AMD3100 on MIP-1α Stimulated Calcium Flux	HEK293F.CCR1 cells	In vitro	AnorMED	No	AOM0064 [4.2.1.1-10]

2.6.3 薬理試験概要表
plerixafor

Type of Study / Study Title	Test System	Route	Testing Facility	GLP Compliance	Study No. [Module No.]
Investigation of the Cross-reactivity of AMD3100 with CXCR7	Cf2Th-CXCR7 cells	In vitro	AnorMED	No	AOM0075 [4.2.1.1-11]
Structural Analogues of AMD3100 Mobilize Progenitor Cells from Bone Marrow In vivo According to Their Ability to Inhibit CXCL12 Binding to CXCR4 In vitro	Mouse (Female BALB/c)	Hind Limb Perfusion	[redacted]	No	AOM0070 [4.2.1.1-12]
Hematological Effects of AMD11070 in Mice	Mouse (C3H/He J)	SC	[redacted]	No	AOM0033 [4.2.1.1-13]
AMD3100 for Hematopoietic Stem Cell Mobilization in a Canine Autologous Transplantation Model	Dog	SC	[redacted]	No	AOM0045 [4.2.1.1-14]
AMD3100 Antagonism of CXCR4 Expressed on Cultured Canine PBMCs	Canine Peripheral Blood Mononuclear Cells	In vitro	AnorMED	No	AOM0049 [4.2.1.1-15]
AMD3100 for Hematopoietic Stem Cell Mobilization in a Canine Allogeneic Transplantation Model: Follow-up Report	Dog	SC	[redacted]	No	AOM0046 [4.2.1.1-16]
Secondary Pharmacodynamics					
AMD3100, a CXCR4 Antagonist, Augments Mobilization and Incorporation of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells into Sites of Myocardial Neovascularization	Mouse (FVB/N) FVB/N-TgN[TIE2LacZ]18Sato MMP9null	SC	[redacted]	No	AOM0048 [4.2.1.2-1]
AMD3100 Administration in a Porcine Model of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury	Pig (Male Yorkshire)	SC	[redacted]	No	AOM0072 [4.2.1.2-2]
AMD3100 Rapidly Mobilized Stem Cells after Myocardial Infarction in Nonhuman Primates but Does Not Improve Left Ventricular Remodeling of Function	Monkey (Rhesus Macaque)	IV	[redacted]	No	GT-249-EF-1 [4.2.1.2-3]
Direct Injection of AMD3100 Improves Blood Flow to the Diabetic Mouse Hind Limb after Induction of Hindlimb Ischemia	Mouse (Nude Hfh11)	SC	[redacted]	No	AOM0047 [4.2.1.2-4]

Type of Study / Study Title	Test System	Route	Testing Facility	GLP Compliance	Study No. [Module No.]
Safety Pharmacology					
Receptor Affinities (Binding) of [redacted] SID 791	Membranes from calf cortex (adrenergic), calf striatum (dopaminergic), rat forebrain without cerebellum (opiate)	In vitro	[redacted]	No	107-031 [4.2.1.3-1]
Affinity of [redacted] 282 791 ([redacted] SID 791) for 5-HT Receptor Binding Sites	Membranes from pig cortex ($5HT_{1A}$), calf caudate ($5HT_{1D}$), pig choroid plexus ($5HT_{2C}$), rat cortex ($5HT_{2A}$)	In vitro	[redacted]	No	AOM0071 [4.2.1.3-2]
Receptor Binding (Adrenergic, GABA)	Membranes from Rat (Wistar) brain and heart	In vitro	[redacted]	No	1009304 -02NOV20[redacted] [4.2.1.3-3]
The Effects of [redacted] 282-791 in the Primary Observation Test in Mice	Mouse (OF-1)	SC	[redacted]	No	POT-M-92-10 [4.2.1.3-4]
The Investigation of Potential CNS Effects of Subcutaneously Administered SID 791 Using the Rat Primary Observation Test	Rat (Sprague-Dawley)	SC	[redacted]	No	POT-R-94-5 [4.2.1.3-5]
Effects of Plerixafor in the Irwin Test in Rats	Rat (Sprague-Dawley)	SC	[redacted]	Yes	GT-249-TX-1 [4.2.1.3-6]
Effects of Plerixafor on Respiration Rate and Tidal Volume in Conscious Rats	Rat (Sprague-Dawley)	SC	[redacted]	Yes	GT-249-TX-2 [4.2.1.3-7]
Effects of AMD3100 on Cloned hERG Potassium Channels Expressed in Mammalian Cells	Human (HEK293 cells)	In vitro	[redacted]	Yes	051128-BOP [4.2.1.3-8]
Angiotensin Converting Enzyme (ACE) and Neutral Endopeptidase Enzyme Assays	Rabbit lung (ACE), human Raji cells (endopeptidase)	In vitro	[redacted]	No	1009304 -14DEC20[redacted] [4.2.1.3-9]
Neuropeptide Y Receptor Functional Assays (agonist and antagonist activity)	Rabbit (New Zealand) vas deferens (Y_1), rat (Wistar) vas deferens (Y_2) and distal colon (Y_3)	In vitro	[redacted]	No	1009304 -15DEC20[redacted] [4.2.1.3-10]
Cardiovascular Effects of [redacted] SID 791 (282-791) in Anaesthetized Rats after Intravenous and Subcutaneous Administration	Rat (Wistar)	IV and SC	[redacted]	No	107-028 [4.2.1.3-11]

2.6.3 薬理試験概要表
plerixafor

Type of Study / Study Title	Test System	Route	Testing Facility	GLP Compliance	Study No. [Module No.]
A Pilot Cardiovascular Profile Study Following a Single Intravenous Infusion of AMD3100 Free Base in the Conscious Restrained Beagle Dog	Dog (Beagle)	IV (infusion)	[redacted]	No	[redacted]-93226 [4.2.1.3-12]
A Cardiovascular Profile Study Following an Intravenous Infusion of AMD3100 Free Base in the Conscious Unrestrained Beagle Dog	Dog (Beagle)	IV (infusion)	[redacted]	Yes	[redacted]-93227 [4.2.1.3-13]
Dilatation of Rat Aortic Smooth Muscle Cells, Possible Implication of Free Calcium	Rat aortic smooth muscle cells	In vitro	[redacted]	No	9608-0228-01 [4.2.1.3-14]
Effect of [redacted] 282-791 on Different Endocrine Parameters in Male Rats	Rat (Sprague-Dawley)	SC	[redacted]	No	107-029 [4.2.1.3-15]
General Receptor Radioligand Binding and Enzyme Assays	Human or human recombinant cells from various sources; mouse, rat, guinea pig, hamster and rabbit cells from various sources	In Vitro	[redacted]	No	AA80066 -30DEC20[redacted] [4.2.1.3-17]
Selected Receptor Radioligand Binding, Cellular and Tissue Assays	Radioligand and cellular assays- Human recombinant CHO-K1, CHO and Sf9 (insect) cells, and rat brain; Tissue assay - Guinea Pig Atria and Ileum; Rat spleen	In Vitro	[redacted]	No	AA81111 -01DEC20[redacted] [4.2.1.3-16]
Patch Clamp Assay on Calicum Channel N-Type	Calcium channel expressed in mammalian cells	In Vitro	[redacted]	No	GT-249-TX-6 [4.2.1.3-18]

SC = subcutaneous, IV = intravenous, hERG = human ether-a-go-go related gene, GABA = gamma-aminobutyric acid, plerixafor = AMD3100 = [redacted] SID 791 = [redacted] 282 791, CHO = Chinese hamster ovary

2　効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験の情報は[Module 2.6.2 の 2 項]に記載した。

3　副次的薬理試験

副次的薬理試験の情報は[Module 2.6.2 の 3 項]に記載した。

4 安全性薬理試験

表 2.6.3.4.1 - 安全性薬理試験

Organ Systems Evaluated	Species (Strain)	Route	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study No. [Module No.]
CNS	Membranes from calf cortex (adrenergic), calf striatum (dopaminergic), rat forebrain without cerebellum (opiate)	In vitro	NA	NA	Moderate affinity for α_1 and α_2 adrenergic receptors, and dopamine D_2 receptor (pKi = 6.2, 5.9 and 5.5, respectively). Low affinity for dopamine D_1 and opiate receptors	No	107-031 [4.2.1.3-1]
CNS	Membranes from pig cortex ($5HT_{1A}$), calf caudate ($5HT_{1D}$), pig choroid plexus ($5HT_{2C}$), rat cortex ($5HT_{2A}$)	In vitro	NA	NA	Low affinities for all tested receptors, with pKD values ranging from 4.0 to 5.1 –log mol/L.	No	AOM0071 [4.2.1.3-2]
CNS and Cardiovascular	Membranes from Rat (Wistar) brain and heart	In vitro	6 µmol/L[a]	NA	No significant inhibition of ligand binding (< 50 %) at α_1, α_2, or β-adrenergic receptors; GABA, central and peripheral benzodiazepine receptor binding site (40 and 41% inhibition at α_1 and α_2 adrenergic receptors)	No	1009304 -02NOV20[redacted] [4.2.1.3-3]
CNS	Mouse (OF-1)	SC	0, 0.1, 1, 10 mg/kg[b]	3M	Reductions in activity and flattening of body posture (decreased motor activity, locomotion, rearing) observed beginning 5 min. after injection at 10 mg/kg, largely resolved at 1 hour. Minor effects at lower doses.	No	POT-M-92-10 [4.2.1.3-4]
CNS	Rat (Sprague-Dawley)	SC	0, 5, 10, 20 mg/kg	6M	Dose-dependent inhibition of motor activities and locomotion with some signs of irregular muscular and respiratory effects at 1 hour post-administration. Most effects resolved at 23 hours post-administration.	No	POT-R-94-5 [4.2.1.3-5]
CNS	Rat (Sprague-Dawley)	SC	0, 2, 10, 20 mg/kg	6M	CNS depressant-like signs when not stimulated and CNS stimulant-like signs when stimulated at 30 minutes post-dose at 20 mg/kg. Effects absent at 2 hours post-dose. Minor effects at lower doses.	Yes	GT-249-TX-1 [4.2.1.3-6]

2.6.3 薬理試験概要表
plerixafor

Organ Systems Evaluated	Species (Strain)	Route	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study No. [Module No.]
Respiratory	Rat (Sprague-Dawley)	SC	0, 2, 10, 20 mg/kg	8M	Decreased tidal volume at 30 min post-dose (10 and 20 mg/kg). Decreased respiration rate at 30 and 120 min post-dose (20 mg/kg).	Yes	GT-249-TX-2 [4.2.1.3-7]
Cardiovascular	Human embryonic kidney cells (HEK293) expressing cloned hERG channel	In vitro	5, 50 µg/mL	NA	No significant inhibition of hERG current (1.8 % and 0.9 % inhibition at 5 µg/ml and 50 µg/ml, respectively).	Yes	051128-BOP [4.2.1.3-8]
Cardiovascular	Rabbit lung (ACE), human Raji cells (endopeptidase)	In vitro	0.06-60 µmol/L[a] (ACE) 6 µmol/L[a] (endopeptidase)	NA	Significant (≥ 50 %) inhibition of ACE activity at 18 µmol/L (73-75 %) and 6 µmol/L (66-75 %); IC_{50} = 2.5 µmol/L. No significant inhibition of endopeptidase activity.	No	1009304 -14DEC20[redacted] [4.2.1.3-9]
Cardiovascular	Rabbit (New Zealand) vas deferens (Y_1), rat (Wistar) vas deferens (Y_2) and distal colon (Y_3)	In vitro	6 and 18 µmol/L[a]	NA	Significant (≥ 50 %) agonist activity at Neuropeptide Y Y_2 and Y_3 receptors (70 and 97 %, respectively at 6 and 18 µmol/L, respectively) and moderate activity at Neuropeptide Y Y_1 receptor (37 % at 18 µmol/L). No significant antagonist activity at any sub-types observed.	No	1009304 -15DEC20[redacted] [4.2.1.3-10]
Cardiovascular	Rat (Wistar)	SC and IV	IV: 0, 0.1, 1, 10 mg/kg SC: 0, 20 mg/kg	5M	Dose-dependent cardiodepressant effects observed at IV doses ≥ 1 mg/kg with mortality (5/5) at 10 mg/kg preceded by marked decreases in blood pressure, heart rate, myocardial contractility, and cardiac output. ECG changes not considered of sufficient magnitude to cause haemodynamic changes. SC administration (20 mg/kg) produced decrease in blood pressure, heart rate, myocardial contractility, cardiac output and altered ECG (P wave changes) without mortality.	No	107-028 [4.2.1.3-11]

2.6.3 薬理試験概要表
plerixafor

Organ Systems Evaluated	Species (Strain)	Route	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study No. [Module No.]
Cardiovascular	Dog (Beagle)	IV infusion	Step-wise dose escalation: 1 hour infusions at 5.064 + 7.530 + 10 mg/kg/h with 1 h washout periods between 1st and 2nd infusions	1M	No direct test-article-related haemodynamic, ECG or clinical effects during first 2 infusion periods. Heart rate increased shortly after initiation of the third infusion, and declined approximately 50 min into infusion. Blood pressure increased beginning approximately 30 min thereafter and continued to rise with continued exposure. Clinical signs appeared approx. 50 min into the third infusion, including: salivation, dilated pupils and non-sustained convulsions. Changes in T-wave were considered secondary to blood pressure and heart rate changes. Effects resolved approximately 10-30 min after end of third infusion.	No	[redacted]-93226 [4.2.1.3-12]

Organ Systems Evaluated	Species (Strain)	Route	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study No. [Module No.]
Cardiovascular	Dog (Beagle)	IV infusion	Infusion rates: 5 (1h) + 3.33 (7h), and 2.5 (1h) + 1.67 (7h) mg/kg/h	2M	Heart rate increased in both dogs tested at the higher dose rate beginning shortly (≤ 30 min) after initiation of infusion, and was considered abnormal (tachycardia) in 1 of the 2 dogs (dog 101). Blood pressure increases concurrent with clinical signs of toxicity were noted in both dogs beginning approximately 3 hours after initiation of infusion. The clinical signs of toxicity were sufficiently severe in one dog (101) to warrant premature discontinuation of infusion at 3.25 h (decreased activity, tremors, salivation, vomiting, uncoordinated movement, dilated pupils, lateral recumbency and laboured breathing; with plasma plerixafor concentrations of 11.2-11.7 µg/ml just prior to discontinuation of infusion). Clinical signs in the second dog (102) were less severe (intermittent periods of decreased activity, increased excitability, tremors and uncoordinated movement) and this dog completed infusion period. Dog 101 also exhibited a transient elevation in pulmonary artery pressure for 1.75 h following premature termination of dosing. The increases in blood pressure were considered a combined effect of plerixafor with increased activity associated with toxicity in dog 101 but were attributed solely to increased activity in the case of dog 102. No test article related effects on cardiac output, stroke volume or total peripheral resistance were observed. No test article related effects were noted in the 2 dogs tested at the lower infusion rate (steady-state plasma plerixafor concentrations of 6.0-7.4 µg/ml.) No ECG evidence of cardiotoxicity was observed for any of the dogs.	Yes	[redacted]-93227 [4.2.1.3-13]
Cardiovascular	Rat aortic smooth muscle cells	In vitro	0.2, 2, 10, 20 µg/ml[b]	NA	Dose dependent inhibition of Angiotensin II-induced contractions, significant inhibition at ≥ 2 µg/ml. Supplementation with Ca^{2+} (4 m mol/L) completely reversed the inhibitory effects. Supplementation with Mg^{2+} (4 m mol/L) partially reversed the inhibitory effects.	No	9608-0228-01 [4.2.1.3-14]

2.6.3 薬理試験概要表
plerixafor

Organ Systems Evaluated	Species (Strain)	Route	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study No. [Module No.]
Endocrine	Rat (Sprague-Dawley)	SC	0, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/kg[a]	8M (control – 16M)	No effects on levels of lutenizing hormone, testosterone, glucose, and calcium. Growth hormone levels were lower in treated rats, but the effect was not significant or dose-related. Prolactin was significantly increased at the 10 mg/kg dose ($p < 0.05$). Corticosterone showed a dose-dependent increase, but the change was not significant.	No	107-029 [4.2.1.3-15]
General Receptor (Radioligand Binding Assay) and Enzyme Assay	Human or human recombinant cells from various sources; mouse, rat, guinea pig, hamster and rabbit cells from various sources	In vitro	5 µg/mL (10 µmol/L)	NA	Strong affinity (>75% binding inhibition) for Calcium N-Type (100%); Histamine H_3 (99%); Potassium channel [SK_{CA}](81%). Moderate affinity (50-74% binding inhibition) for Muscarinic M_1 (73%); Muscarinic M_2 (65%); Adrenergic α_{1B} (66%); Neuropeptide Y Y_1 (54%); Glutamate NMDA polyamine (53%).	No	AA80066 -30DEC20[redacted] [4.2.1.3-17]

Organ Systems Evaluated	Species (Strain)	Route	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study No. [Module No.]
Selected Receptor Radioligand Binding, Cellular and Tissue assays	Radioligand and cellular assays - Human recombinant CHO-K1, CHO and insect Sf9 cells, and rat brain cells; Tissue assays - Guinea Pig Atria and Ileum; Rat spleen	In vitro	0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, & 30 µmol/L	NA	Receptor binding assay showed significant activity in Calcium Channel N-Type (IC_{50} = 1.09 µmol/L) and Histamine H_3 (IC_{50} = 0.123 µmol/L).	No	AA81111-01DEC20[redacted] [4.2.1.3-16]
			10 µmol/L	NA	Cellular GTPγS binding assays showed Histamine H_3 inverse agonist profile (-46% agonist, 145% antagonist activity), Muscarinic M_1 antagonist activity (71%), and no significant Adrenergic α_{2C} activity.		
			30 µmol/L	NA	Tissue assays showed no significant response for Adrenergic α_{1B}, Calcium N-Type, or Muscarinic M_2 receptors.		
Patch Clamp Assay on Calicum Channel N-Type	Mammalian cells	In vitro	0.1, 1, 3, 10, 30 µmol/L	NA	Calcium Channel N-Type (hCav2.2) showed negligible antagonist response (IC_{50} >30 µmol/L).	No	GT-249-TX-6 [4.2.1.3-18]

M = male, NA = not applicable, ECG = electrocardiogram, SDF-1 = stromal cell-derived factor 1

[a] An assumed molecular weight of 300 g/moL was used by the contract research laboratory while performing this study. The values reported in this table have been recalculated with the correct molecular weight for the molecule of 502.78 g/moL.

[b] These studies were conducted with plerixafor octahydrochloride. However, the study reports do not make it clear whether the reported doses represent free base equivalents or absolute dose of plerixafor octahydrochloride. The doses reported for these studies in this table and in Module 2.6.2 Pharmacology Written Summary are as reported in the original study reports.

5　薬力学的薬物相互作用試験

実施していない。