

目次

2.6.1 緒言	2
2.6.1.1 製剤の組成	3
2.6.1.2 製剤の用量	3
2.6.1.3 薬理学的分類	3
2.6.1.4 対象疾患	3

表

表 2.6.1-1 イキサゾミブクエン酸エステルに関する一般情報	2
表 2.6.1-2 イキサゾミブに関する一般情報	3

図

図 2.6.1-1 イキサゾミブクエン酸エステルからイキサゾミブへの加水分解	2
--	---

2.6.1 緒言

イキサゾミブは、経口投与可能な 20S プロテアソーム阻害薬である。本剤の原薬であるイキサゾミブクエン酸エステルは、安定したクエン酸エステルである。イキサゾミブクエン酸エステルは、生理学的条件の下で速やかに加水分解され、生物学的活性体のボロン酸型であるイキサゾミブへと変換される（図 2.6.1-1）。イキサゾミブクエン酸エステルは、血漿中で速やかにイキサゾミブに加水分解されることが示されている。イキサゾミブは、20S プロテアソームの $\beta 5$ サブユニットに対して選択的な阻害作用を及ぼし、強力かつ可逆的な阻害をもたらす。

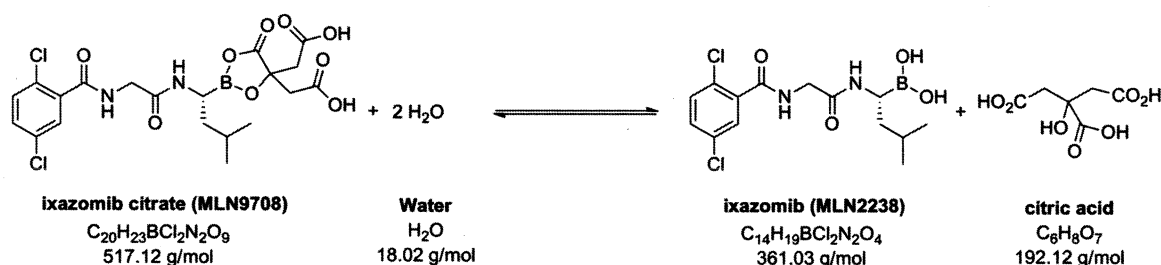


図 2.6.1-1 イキサゾミブクエン酸エステルからイキサゾミブへの加水分解

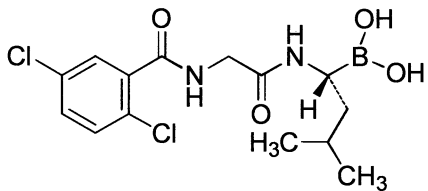
イキサゾミブクエン酸エステル及びイキサゾミブに関する命名法、Chemical Abstracts Service (CAS) 登録番号、分子式及び分子量、並びに構造式等の主要薬剤情報の概要をそれぞれ表 2.6.1-1 及び表 2.6.1-2 に示す。

表 2.6.1-1 イキサゾミブクエン酸エステルに関する一般情報

JAN	イキサゾミブクエン酸エステル
化学名：	2,2'-{2-[(1R)-1-({[(2,5-ジクロロベンゾイル)アミノ]アセチル}アミノ)-3-メチルブチル]-5-オキシ-1,3,2-ジオキサボロラン-4,4-ジイル}二酢酸
CAS 登録番号：	1239908-20-3
商標名	未定
社内コード：	MLN9708-001、MLN9708、ML00701203-001、ML00701203、MLN2238 citrate ester
分子式：	$C_{20}H_{23}BCl_2N_2O_9$
分子量：	517.12 g/mol
構造式：	

CAS = Chemical Abstracts Service; JAN = 医薬品一般的名称

表 2.6.1-2 イキサゾミブに関する一般情報

INN :	ixazomib
CAS 化学名 :	Boronic acid, B-[(1R)-1-[[2-[(2,5-dichlorobenzoyl)amino]acetyl]amino]-3-methylbutyl]-
CAS 登録番号 :	1072833-77-2
社内コード :	MLN2238-001、MLN2238、ML00604174-001、ML00604174
分子式 :	C ₁₄ H ₁₉ BCl ₂ N ₂ O ₄
分子量 :	361.03 g/mol
構造式 :	

CAS = Chemical Abstracts Service ; INN = 国際一般名称

2.6.1.1 製剤の組成

本剤は、経口投与製剤であり、イキサゾミブクエン酸エステル、並びに不活性成分である結晶セルロース、タルク及びステアリン酸マグネシウムを含有する硬~~質~~カプセル剤である。臨床試験ではこれまで7種類の有効成分含量（含量0.2 mg、0.5 mg、2.0 mg、2.3 mg、3.0 mg、4.0 mg及び5.5 mg）のカプセル剤が使用されており、各カプセルの色により含量の識別が可能となっている。すべてのカプセル剤は、1カプセルずつ~~の~~ブリスター包装されており、有効成分含量は、生物学的活性体のボロン酸型換算で表示されている。カプセル剤の組成に関しては、3.2.P.1-1、3.2.P.1-2、3.2.P.1-3に記載されている。

2.6.1.2 製剤の用量

本剤の投与に対して提案している市販用製剤の有効成分含量は、2.3 mg、3.0 mg及び4.0 mgである。推奨標準用量は、28日サイクル中の最初の3週間に対して週1回の4.0 mg経口投与である。必要に応じ、段階的に用量を減らすことを目的として有効成分含量が3.0 mg及び2.3 mgのカプセル剤も用意される予定である（Clinical Study Report 16010, Section 9.4.2.2）。

2.6.1.3 薬理学的分類

イキサゾミブは、経口投与可能な20Sプロテアソーム阻害薬である。

2.6.1.4 対象疾患

イキサゾミブは、再発又は難治性の多発性骨髄腫（MM）患者の治療に適応される。

目次

略号一覧表	3
2.6.2 薬理試験の概要文	5
2.6.2.1 まとめ	5
2.6.2.1.1 in vitro 非臨床薬理試験及び in vivo 非臨床薬理試験	5
2.6.2.1.2 安全性薬理試験	7
2.6.2.1.3 要約及び結論	7
2.6.2.2 効力を裏づける試験	7
2.6.2.2.1 in vitro 薬理試験	8
2.6.2.2.2 in vivo 薬理試験	26
2.6.2.3 副次的薬理試験	38
2.6.2.4 安全性薬理試験	38
2.6.2.4.1 in vitro 安全性薬理試験	38
2.6.2.4.2 in vivo 安全性薬理試験	39
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験	41
2.6.2.6 考察及び結論	41
2.6.2.7 図表	42
2.6.2.8 参考文献一覧	42

表

表 2.6.2.2-1 イキサゾミブ及びボルテゾミブの酵素学的検討結果の要約	9
表 2.6.2.2-2 イキサゾミブのプロテアーゼ選択性	10
表 2.6.2.2-3 20S β5 結合の反応速度論的解析	11
表 2.6.2.2-4 培養細胞でのイキサゾミブによるプロテアソーム阻害	12
表 2.6.2.2-5 in vitro でのイキサゾミブとの 72 時間培養がヒト骨髄腫細胞株の生存率に及ぼす影響	13
表 2.6.2.2-6 単独及び併用の評価と併用効果判定	25
表 2.6.2.4-1 イキサゾミブによる ³ H] dofetilide 結合の平均阻害率	39
表 2.6.2.4-2 イキサゾミブクエン酸エステルを単回経口投与したビーグル犬におけるイキサゾミブの平均血漿トキシコキネティクスの要約	40

図

図 2.6.2.2-1 イキサゾミブ処理が培養及び初代ヒト多発性骨髄腫細胞の生存率に及ぼす影響 (A)	14
図 2.6.2.2-2 イキサゾミブ処理が培養及び初代ヒト多発性骨髄腫細胞の生存率に及ぼす影響 (B)	15

図 2.6.2.2-3	イキサゾミブ処理が健康成人ドナー由来の PBMC の生存率に及ぼす影響 (C)	15
図 2.6.2.2-4	イキサゾミブ処理が培養及び初代ヒト多発性骨髄腫細胞の生存率に及ぼす 影響 (D)	16
図 2.6.2.2-5	多発性骨髄腫細胞株におけるイキサゾミブ活性の発現メカニズム (A)	17
図 2.6.2.2-6	多発性骨髄腫細胞株におけるイキサゾミブ活性の発現メカニズム (B)	18
図 2.6.2.2-7	多発性骨髄腫細胞株におけるイキサゾミブ活性の発現メカニズム (C)	19
図 2.6.2.2-8	多発性骨髄腫細胞株におけるイキサゾミブ活性の発現メカニズム (D)	20
図 2.6.2.2-9	in vitro での HUVEC による毛細管形成にイキサゾミブが及ぼす影響	22
図 2.6.2.2-10	破骨細胞の分化形成及び骨吸収にイキサゾミブが及ぼす影響 (A)	22
図 2.6.2.2-11	破骨細胞の分化形成及び骨吸収にイキサゾミブが及ぼす影響 (B)	23
図 2.6.2.2-12	骨芽細胞の活性にイキサゾミブが及ぼす影響 (A & B)	24
図 2.6.2.2-13	MM.1S 移植腫瘍組織における 20S プロテアソーム $\beta 5$ サブユニット平均 阻害率-時間曲線	27
図 2.6.2.2-14	腫瘍組織における平均 ATF-3 発現量-時間曲線	28
図 2.6.2.2-15	GADD34 及び活性化カスパーゼ-3 のウェスタンブロット法での解析結果	28
図 2.6.2.2-16	MM.1S ヒト多発性骨髄腫細胞株を移植した雌 CB-17 SCID マウスにおけ るイキサゾミブ経口投与後の経時的な平均腫瘍体積変化	29
図 2.6.2.2-17	MM.1S ヒト多発性骨髄腫細胞株を移植した雌 CB-17 SCID マウスにおけ るイキサゾミブ静脈内投与後の経時的な平均腫瘍体積変化	31
図 2.6.2.2-18	デノボ形質細胞腫瘍のモデルである iMyc ^{Cα} /Bcl-XL 遺伝子改変マウスモデ ルにおけるイキサゾミブ投与後の全生存期間	32
図 2.6.2.2-19	イキサゾミブを投与した iMyc ^{Cα} /Bcl-XL マウスの脾重量	33
図 2.6.2.2-20	イキサゾミブ投与あるいは未治療 iMyc ^{Cα} /Bcl-XL マウス及び非遺伝子組換 マウスにおける免疫グロブリン IgG2a レベルの比較	34
図 2.6.2.2-21	DP54-Luc iMyc ^{Cα} /Bcl-XL 形質細胞腫瘍を播種した雌 NOD-SCID マウスモ デルにおける腫瘍量	36
図 2.6.2.2-22	DP54-Luc iMyc ^{Cα} /Bcl-XL PCM 形質細胞腫瘍を播種した雌 NOD-SCID マウ スモデルにおけるイキサゾミブ投与後の個々の矢状縫合離開面積	37
図 2.6.2.2-23	DP54-Luc iMyc ^{Cα} /Bcl-XL 形質細胞を脛骨内移植した雌ヌードマウスモデ ルにおける平均光量子束密度	38

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明（英語）	略していない表現又は説明（日本語）
ΔAUC	change in the area under the tumor volume-time curve	腫瘍体積-時間曲線下面積の変化
ALP	alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
ATP	adenosine 5'-triphosphate	アデノシン 5'-三リン酸
AUC_{24}	area under the concentration-time curve from the time 0 to 24 hours	0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積
AUE_{24}	area under the effect-time curve from time 0 to 24 hours	0 時間から 24 時間の効果-時間曲線下面積
BIW	twice weekly	週 2 回
BMSC	bone marrow stromal cell	骨髄間質細胞
CI	confidence interval	信頼区間
C_{max}	maximum observed plasma concentration	最高血漿中濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
CT	computed tomography	コンピュータ断層撮影
CV	cardiovascular	心血管
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DRG	dorsal root ganglia	後根神経節
EC_{50}	concentration producing a half-maximal response	最大反応の 50%を示す濃度
ECG	electrocardiography	心電図
E_{max}	maximum effect	最大効果
ER	endoplasmic reticulum	小胞体
GEM	genetically engineered mouse	遺伝子改変マウス
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
HP- β -CD	hydroxypropyl-beta-cyclodextrin	ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン
HUVEC	human umbilical vascular endothelial cell	ヒト臍帯血管内皮細胞
I%	percentage of proteasome inhibition	プロテアソーム阻害率
IC_{50}	concentration producing 50% inhibition	50%阻害濃度
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
IHC	immunohistochemistry	免疫組織化学
I_{Kr}	delayed rectifier potassium current	遅延整流性カリウム電流
IV	intravenous(ly)	静脈内
KD	ligand concentration required to occupy 50% of receptor sites	受容体部位の 50%を占めるのに要するリガンド濃度
k_i	Inhibition dissociation constant	阻害定数
k_{off}	dissociation constant	解離定数
k_{on}	association constant	結合定数
LD_{50}	concentration causing lethality for 50% of cells	細胞の半数致死濃度
LSC	liquid scintillation counter	液体シンチレーションカウンター
MC	methylcellulose	メチルセルロース
MM	multiple myeloma	多発性骨髄腫
MSC	mesenchymal stem cell	間葉幹細胞
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MTV	mean tumor volume	平均腫瘍体積
NOD	non-obese diabetic	非肥満糖尿病
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核球
PCM	plasma cell malignancy	形質細胞腫瘍
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PO	oral(ly)	経口
QD	once daily	1 日 1 回
QW	once weekly	週 1 回

略号一覧表（続き）

略号	略していない表現又は説明（英語）	略していない表現又は説明（日本語）
RANKL	receptor activator of NF- κ B ligand	NF- κ B 活性化受容体リガンド
SC	subcutaneous(ly)	皮下
SCID	severe combined immunodeficient	重症複合免疫不全
SSSA	sagittal suture separation area	矢状縫合離開面積
Suc-LLV Y	succinyl-leucine-leucine-valine-tyrosine	スクシニル-ロイシン-ロイシン-バリン-チロシン
T/C	treatment over control	投与群/対照群
$t_{1/2}$	half-life	半減期
TGI	tumor growth inhibition	腫瘍増殖抑制
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
t_{max}	time to reach C_{max}	最高血漿中濃度到達時間 (C_{max} 到達時間)
TRAP ⁺	tartrate-resistant acid phosphatase positive	酒石酸耐性酸性ホスファターゼ陽性
UPR	unfolded protein response	小胞体ストレス応答
UPS	ubiquitin-proteasome system	ユビキチン-プロテアソーム系
w:v	weight-to-volume ratio	重量-体積比
Z-LRR	Z-leucine-arginine-arginine	Z-ロイシン-アルギニン-アルギニン

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

蛋白質のホメオスタシス、すなわち、蛋白質の産生及び分解の調節は、細胞生存にとって非常に重要な生物学的プロセスの一つである。ユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) は、全細胞蛋白質の 80%以上を処理し、細胞が蛋白質 (増殖制御、細胞周期調節及びアポトーシス) に関与する蛋白質を含む) を分解する主要な機構である ([1][2])。プロテアソーム阻害は、プロテアソーム基質の安定化及び蓄積をもたらす[1]。これは、細胞周期破壊、小胞体 (ER) ストレス、小胞体ストレス応答 (UPR) の活性化を引き起こし、最終的に、アポトーシス経路の活性化及び細胞死をもたらす[1]。

生化学および細胞アッセイにおいてイキサゾミブによる 20S プロテアソーム活性の阻害作用を評価すること、分子標的治療薬としてのイキサゾミブの選択性的特性を評価すること、並びに多発性骨髄腫 (MM) 細胞株及び MM 患者由来の腫瘍細胞の生存にイキサゾミブが及ぼす影響を評価することを目的とした多くの *in vitro* 試験で、イキサゾミブの薬理的プロファイルについて検討した。さらに、MM 細胞株において ER ストレス及びアポトーシス経路を含むイキサゾミブ活性を仲介するメカニズムについて評価した。MM の骨髄微小環境において血管新生及び骨再形成に寄与する MM 以外の細胞種 (血管内皮細胞、破骨細胞及び骨芽細胞等) にイキサゾミブが及ぼす影響についても *in vitro* 試験で検討した。イキサゾミブとレナリドミドの併用によるベネフィットについては、MM 細胞株の *in vitro* での細胞生存率アッセイを使用して評価した。

イキサゾミブの *in vivo* での薬力学的活性および抗腫瘍活性については、ヒト MM.1S 腫瘍移植 CB-17 SCID マウスモデルを用いて評価し、抗腫瘍効果については、形質細胞腫瘍 (PCM) のトランスジェニックマウスモデルでさらに証明した。イキサゾミブを用いて実施した個々の薬理試験は、概要表 2.6.3.1 に要約する。

hERG チャンネル並びにその他のイオンチャンネル及び受容体に対する各リガンドの親和性にイキサゾミブが及ぼす影響について判定するため、*in vitro* 安全性薬理試験を実施した。イキサゾミブクエン酸エステルを用いて *in vivo* 安全性薬理試験を実施したところ、イキサゾミブクエン酸エステルは血漿中で速やかに加水分解され、イキサゾミブに変換された。さらに、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験の一環として心電図、神経系及び呼吸系に及ぼす影響を評価し、また、ビーグル犬を用いたテレメトリー試験によりイキサゾミブが心血管 (CV) 系に及ぼす影響も評価した。

2.6.2.1.1 *in vitro* 非臨床薬理試験及び *in vivo* 非臨床薬理試験

in vitro 試験により、3.4 nmol/L の 50%阻害濃度 (IC_{50}) で、イキサゾミブが 20S プロテアソームの $\beta 5$ サブユニットを選択的に阻害することが示されたが、当該濃度は $\beta 1$ サブユニット ($IC_{50} = 31$ nmol/L) 及び $\beta 2$ サブユニット ($IC_{50} = 3500$ nmol/L) と比べ、それぞれ約 10 倍及び 1000 倍低い。引き続き実施した試験において、イキサゾミブは HCT-116 細胞の $\beta 5$ サブユニットに対して強力な阻害作用を示し (最大阻害: >98%)、 $\beta 5$ サブユニットに対しての選択性は $\beta 2$ サブユニットに対する選択性と比べて高いことが明らかとなった ($\beta 5$ サブユニットに対する $IC_{50} = 0.0075$ μ mol/L で、 $\beta 2$ サブユニットに対する $IC_{50} = 9.1$ μ mol/L)。イキサゾミブは、選抜した 7 種類のセリンプロテアーゼ及び 2 種類のシステインプロテアーゼ(そ

これらの IC₅₀ は 19 から > 100 μM に分布)、ならびに 103 種類のキナーゼ (IC₅₀ > 10 μM) 及び 18 種類の受容体 (IC₅₀ > 10 μM) と比較しプロテアソームに対しより選択的に阻害した。

精製プロテアソームを用いた生化学アッセイにおいて、イキサゾミブは、ボルテゾミブと同様の *in vitro* 阻害活性及びプロテアソームの活性サブユニットに対する選択性を示したが、20S プロテアソームの β5 サブユニットに対する解離半減期 (t_{1/2}) はボルテゾミブと比べて短かった (ボルテゾミブの 110 分に対して 18 分)。これは持続的に作用させた後に薬剤を含まない培地に交換するという条件で培養した細胞を用いたプロテアソーム阻害試験で、イキサゾミブ除去後のプロテアソーム活性の回復程度がボルテゾミブの場合よりも大きいことが示され、生化学アッセイに基づく反応速度論の結論が支持された。

20S プロテアソームの β5 サブユニットに対する活性の阻害結果と一致して、イキサゾミブは、培養細胞内でプロテアソームを阻害することを示した。これは、4 × Ub-Luc レポーターの安定化、NF-κB-ルシフェラーゼレポーターの阻害及びユビキチン化された蛋白質の蓄積から明らかである。MM 細胞株にイキサゾミブを添加すると、UPR を誘導し、複数のアポトーシス促進性蛋白質及び細胞周期阻害蛋白質の発現量を増大させ、アポトーシスカスケード反応を促進させた。

ヒト MM 細胞株 (MM.1S、ANBL-6、RPMI-8226 及び NCI-H929) を用いて *in vitro* で生存率に及ぼす影響を調べた成績から、イキサゾミブは 5.9~25.8 nmol/L の範囲の LD₅₀ (細胞の半数致死濃度) を持つ強力な殺細胞薬であることが示された。

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) テトラゾリウム還元試験で観察された生存率に及ぼす影響は、追加の培養ヒト MM 細胞でも観察され、ボルテゾミブ、レナリドミド及びデキサメタゾン等の複数の前治療後に再発した MM 細胞を含む患者由来の精製 MM 細胞 (CD138⁺) においても確かめられた。また、イキサゾミブは骨髄間質細胞の存在下で培養された MM.1S 細胞の増殖も阻害した。イキサゾミブは、MM 細胞に影響を及ぼすだけでなく、血管新生及び骨再形成に寄与する、骨髄微小環境で見出される他の細胞種の機能にも影響を及ぼした。イキサゾミブは、血管新生の *in vitro* モデルであるヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) から形成される毛細管様構造の形成を *in vitro* で阻害した。さらに、イキサゾミブは、骨を吸収する破骨細胞の *in vitro* の分化形成と機能を阻害し、骨を形成する骨芽細胞の *in vitro* での分化と機能を促進した。

イキサゾミブとレナリドミドを併用すると、細胞生存率に対して、ANBL-6 及び NCI-H929 細胞株では相乗作用が示され、RPMI-8226 及び MM.1S 細胞株では相加作用が示された。

in vivo 試験では、MM.1S ヒト多発性 MM 細胞株移植マウスモデルでイキサゾミブを経口投与及び静脈内投与すると、腫瘍細胞におけるプロテアソーム阻害、小胞体ストレス応答マーカーの発現量の増大、アポトーシス誘導及び抗腫瘍活性が示された。イキサゾミブは、ヒト MM の重要な特徴を示す 3 種類の形質細胞腫瘍 (PCM) マウスモデル、すなわち、デノボ PCM である iMyc^{Cα}/Bcl-XL 遺伝子改変マウス (GEM) モデル、DP54-Luc iMyc^{Cα}/Bcl-XL マウス細胞株の静脈内及び脛骨内接種によって作製された PCM 播種マウスモデル及び脛骨内接種 PCM マウスモデルにおいても抗腫瘍活性を示した ([3][4])。デノボ PCM マウスモデルにイキサゾミブを投与すると、脾腫の縮小及び IgG2a レベルの低下ばかりでなく、全生存期間の延長がもたらされた。PCM 播種マウスモデルにイキサゾミブを投与すると、腫瘍量が減少し、溶骨性病変も改善した (これは頭蓋縫合の離開が縮小することによって証明された)。

2.6.2.1.2 安全性薬理試験

in vitro (hERG チャネルを使用) と in vivo の両方で実施した非臨床安全性薬理試験及び評価により、心血管系、呼吸系及び神経系に及ぼす影響は、主にイヌの病理学的検査でみられた神経傷害のみであり、この神経傷害は一般症状と関係していた。動物におけるイキサゾミブに起因する病理組織学的な神経傷害は、プロテアソーム阻害薬であるボルテゾミブでも報告されており、ボルテゾミブ投与患者での末梢神経障害との関連が言われている。一方、プロテアソーム阻害薬であるカルフィルゾミブで報告されている心電図検査で認められる心血管系への影響はイキサゾミブではみられなかった[5]。イキサゾミブは末梢神経系に影響を及ぼす可能性があるものの、イキサゾミブに関する安全性薬理試験の全てのデータから、患者に心血管系、呼吸系、又は中枢神経関連の影響を及ぼす可能性は低いことが示された。

2.6.2.1.3 要約及び結論

要約すると、イキサゾミブは、20S プロテアソームの $\beta 5$ サブユニットに対する強力、可逆的かつ選択的な阻害薬である。培養細胞にイキサゾミブを添加するとユビキチン化された蛋白質の蓄積、UPR の誘導及びアポトーシスがもたらされたことから明らかなように、プロテアソーム活性が阻害され、その結果として蛋白質ホメオスタシスに影響を及ぼすことが示された。イキサゾミブは、各種の培養又は初代ヒト MM 細胞の生存率を低下させた。さらに、イキサゾミブは、血管新生抑制、骨芽細胞の機能促進及び破骨細胞の活性抑制を含む、骨髄微小環境を代表する細胞種の機能にも影響を及ぼすことが実証された。イキサゾミブとレナリドミドを併用し、in vitro での生存率を測定した結果、評価した 4 種類の MM 細胞株のうち 2 種類では相乗作用、残りの 2 種類では相加作用が認められた。

in vivo では、ヒト MM.1S MM 細胞株移植マウスモデルにおいて、イキサゾミブを経口投与及び静脈内投与したところ、その両方で薬力的作用及び抗腫瘍活性が認められた。3 種類の関連する PCM のマウスモデルにおいても、イキサゾミブによる有意な抗腫瘍活性が観察された。デノボ PCM である iMyc^{C α} /Bcl-XL GEM モデルにイキサゾミブを投与すると、全生存期間の延長、並びに脾腫の縮小及び IgG2a レベルの低下による当該疾患のその他の症状の改善が認められた。DP54-Luc iMyc^{C α} /Bcl-XL マウス細胞株の静脈内接種によって作製された DP54-Luc 播種モデルでは、イキサゾミブは腫瘍量を低下させ、溶骨性病変を有意に縮小させた。

イキサゾミブによる末梢神経系に対する影響が発生する可能性があるものの、全ての安全性薬理試験データから、患者に心血管系、呼吸系又は中枢神経関連の影響が発生する可能性は低いことが示された。

2.6.2.2 効力を裏づける試験

生化学アッセイおよび細胞アッセイでイキサゾミブによる 20S プロテアソーム活性に対する阻害活性の評価、分子標的治療薬としてのイキサゾミブの選択性の特性の評価、並びに MM 細胞株及び MM 患者由来の腫瘍細胞の生存率にイキサゾミブが及ぼす影響の評価を目的とした多くの in vitro 試験で、イキサゾミブの主要な薬理効果について検討した。ER ストレス及びアポトーシス経路を含む、MM 細胞株でのイキサゾミブの活性を仲介するメカニズムについても評価した。骨髄微小環境に存在する他の細胞種 (血管内皮細胞、破骨細胞及び骨

芽細胞等) にイキサゾミブが及ぼす影響については、*in vitro* 試験で評価した。MM 細胞株におけるイキサゾミブとレナリドミドの併用によるベネフィットは、*in vitro* での細胞生存率アッセイを使用して検討した。さらに、*in vivo* 試験を実施し、MM 腫瘍マウスモデルを用いて、イキサゾミブによるプロテアソーム活性及び腫瘍増殖の阻害活性を評価し、1 種類のマウスモデルを用いて、イキサゾミブが溶骨性病変に及ぼす影響についても評価した。

2.6.2.2.1 *in vitro* 薬理試験

イキサゾミブは、20S プロテアソームの $\beta 5$ サブユニットに対する強力、可逆的かつ選択的な阻害薬である。生化学アッセイから、イキサゾミブは、ボルテゾミブと同程度の IC_{50} で、20S プロテアソームの $\beta 5$ サブユニット活性を特異的かつ強力で阻害することが示された (イキサゾミブの IC_{50} は 3.4 nmol/L、ボルテゾミブの IC_{50} は 2.4 nmol/L)。しかし、イキサゾミブは、ボルテゾミブと比べて速やかにプロテアソームから解離した。この結果は、細胞を用いた試験において、プロテアソーム活性の回復がボルテゾミブと比べて速やかであったこととも一致した。イキサゾミブは、培養細胞におけるプロテアソーム阻害の結果として、ユビキチン化ルシフェラーゼレポーター蛋白質及び内因性ユビキチン化蛋白質の蓄積等、多くの作用を示した。MM 細胞株にイキサゾミブを添加すると、UPR の誘導、複数のアポトーシス促進性 BH3-only 蛋白質の増加、及びアポトーシスカスケード反応の促進を伴う、カスパーゼによって仲介されるアポトーシスが引き起こされた。ヒト MM 細胞株を用いて *in vitro* で生存率に及ぼす影響を調べた試験から、イキサゾミブは強力かつ用量依存的な殺細胞薬であることが示された ($LD_{50} = 5.9 \sim 25.8$ nmol/L)。 *in vitro* で、イキサゾミブは他の培養ヒト MM 細胞に対する抗腫瘍活性を示し、その活性は、ボルテゾミブ、レナリドミド及びデキサメタゾン等の複数の前治療後に再発した MM 細胞を含む患者由来の精製 MM 細胞 (CD138⁺) においても明らかであった。イキサゾミブは、骨髄間質細胞の存在下で培養した MM.1S 細胞の増殖も阻害した。MM 細胞に対する直接作用に加えて、イキサゾミブは、骨髄微小環境に存在する他の細胞種 (内皮細胞、破骨細胞及び骨芽細胞等) の機能にも影響を及ぼした。イキサゾミブは、血管新生の *in vitro* モデルである *in vitro* における HUVEC の毛細管様構造の形成を阻害した。イキサゾミブは、ヒト末梢血単核球 (PBMC) 由来の骨を吸収する破骨細胞の *in vitro* における分化形成と機能を阻害し、MM 患者の間葉幹細胞 (MSC) 由来の骨を形成する骨芽細胞の *in vitro* における分化と機能を促進した。

イキサゾミブとレナリドミドを併用すると、検討した 4 種類の MM 細胞株のうち 2 種類では相乗作用が示され、残りの 2 種類では相加作用が示された。

2.6.2.2.1.1 20S プロテアソームの活性サブユニットに対する選択性及び阻害活性

: 添付資料番号 4.2.1.1-1 (参考)、-2 (評価)

20S プロテアソームの $\beta 1$ (カスパーゼ様)、 $\beta 2$ (トリプシン様) 及び $\beta 5$ (キモトリプシン様) 蛋白質分解サブユニットに対するイキサゾミブの IC_{50} について、マイクロタイタープレートを用いた生化学アッセイで、特異的な蛍光基質を用いて測定した (表 2.6.2.2-1) (概要表 2.6.3.2; 添付資料番号 4.2.1.1-1)。イキサゾミブは、20S プロテアソームの $\beta 5$ サブユニットと選択的に結合して 3.4 nmol/L の IC_{50} で活性を阻害した [95%信頼区間 (CI) = 2.8~4.1 nmol/L; n = 3]。一方、 $\beta 1$ サブユニット及び $\beta 2$ サブユニットに対する阻害活性は、それ

ぞれ $\beta 5$ サブユニットの約 10 倍及び 1000 倍低かった（それぞれ $IC_{50} = 31$ nmol/L 及び 3500 nmol/L；どちらも $n = 1$ ）。さらに、イキサゾミブは、 $\beta 5i$ サブユニットに対する阻害解離定数 (K_i) が 0.4 nmol/L と、 $\beta 5$ サブユニットの K_i (0.93 nmol/L) と同程度であったことから明らかなように、20S 免疫プロテアソーム（脾臓等の免疫組織で認められる 20S プロテアソームのアイソフォーム）も強力に阻害した。イキサゾミブのプロテアソーム活性サブユニットに対する阻害活性及び選択性は、ボルテゾミブのものと非常に類似していた。

表 2.6.2.2-1 イキサゾミブ及びボルテゾミブの酵素学的検討結果の要約

生化学アッセイ	イキサゾミブ	ボルテゾミブ
K_i (nmol/L)		
$\beta 5$	0.93 (0.64~1.4, $n = 3$)	0.55 (0.34~0.89, $n = 3$)
$\beta 5i$	0.4	0.2
IC_{50} (nmol/L)		
$\beta 5$	3.4 (2.8~4.1, $n = 3$)	2.4 (2.0~2.9, $n = 45$)
$\beta 2$	3500	1200
$\beta 1$	31	24 (14.5~40, $n = 12$)

出典：添付資料番号 4.2.1.1-1

IC_{50} = 50%阻害濃度； K_i = 阻害定数

注記：結果は幾何平均 [95%信頼区間 (CI)、実験数]。CI を伴わないデータは 1 回のみの測定。

これらの結果は、[[] アッセイ [] ([] USA)] でヒト HCT-116 結腸直腸癌細胞株におけるイキサゾミブ及びボルテゾミブによるプロテアソームの $\beta 5$ 及び $\beta 2$ サブユニットに対する阻害作用を測定した試験でも支持された（概要表 2.6.3.2；添付資料番号 4.2.1.1-2）。細胞を用いた同社の [] アッセイは、化合物の 20S プロテアソームのキモトリプシン様 ($\beta 5$ サブユニット) 及びトリプシン様 ($\beta 2$ サブユニット) 活性に及ぼす作用を、それぞれスクシニル-ロイシン-ロイシン-バリン-チロシン (Suc-LLVY) アミノルシフェリン基質及び Z-ロイシン-アルギニン-アルギニン (Z-LRR) アミノルシフェリン基質を用いて *in situ* で測定するものである。アミノルシフェリン基質は、プロテアソームによって切断されると、アミノルシフェリンを放出し、プロテアソーム活性に比例した発光シグナルを発生させる。イキサゾミブ及びボルテゾミブは、当該アッセイにおいてプロテアソームのキモトリプシン様 ($\beta 5$ サブユニット) 活性を最大で 98%以上阻害した (IC_{50} の平均値はそれぞれ 0.0075 $\mu\text{mol/L}$ 及び 0.0036 $\mu\text{mol/L}$)。一方、イキサゾミブ及びボルテゾミブのトリプシン様 ($\beta 2$ サブユニット) 活性に対する阻害活性は低く、特にイキサゾミブの $\beta 2$ サブユニットに対する機能阻害は極わずかであった (IC_{50} の平均値はそれぞれ 9.1 $\mu\text{mol/L}$ 及び 0.41 $\mu\text{mol/L}$)。さらに、ペプチジルボロン酸は、他のプロテアーゼ、特にセリンプロテアーゼを配列依存性に阻害することが知られているため、7 種類のセリンプロテアーゼ及び 2 種類のシステインプロテアーゼから構成されたパネルに対するイキサゾミブの選択性を試験した（表 2.6.2.2-2；概要表 2.6.3.2；添付資料番号 4.2.1.1-1）[6]。これらのうち、エラスターゼのみイキサゾミブによる阻害が測定されたが ($IC_{50} = 19$ $\mu\text{mol/L}$)、その阻害濃度は、20S プロテアソームの $\beta 5$ サブユニットに対する IC_{50} (3.4 nmol/L；表 2.6.2.2-1) の 5000 倍以上であった。イキサゾミブのエラスターゼに対する選択性がわずかにあったのは、イキサゾミブの選択性試験で示されたように、当該酵素が P1 位のロイシン残基に対して選択性を示すということによって説明することができる。

表 2.6.2.2-2 イキサゾミブのプロテアーゼ選択性

プロテアーゼ	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)
キモトリプシン	> 100 (n = 2)
トリプシン	> 100
エラスターゼ	19 (7.8~47, n = 3)
トロンビン	> 100
プラスミン	> 100
tPA	> 100
CFbetaXIIa	> 100
カテプシン B	> 100 (n = 2)
カテプシン L	> 100

出典：添付資料番号 4.2.1.1-1

CFbetaXIIa = F12 凝固因子 XII (ハーゲマン因子) ; IC₅₀ = 50%阻害濃度 ; tPA = 組織プラスミノゲン活性化因子

注記：結果は幾何平均 (95% CI, 実験数)。CI を伴わないデータは、1 回のみ測定。

追加の選択性スクリーニングにおいて、イキサゾミブは 103 種類のキナーゼ及び 18 種類の受容体 (神経伝達物質、イオンチャネル、並びに脳及び腸の受容体) から構成されるパネルに対しては、IC₅₀ はそれぞれ > 10 $\mu\text{mol/L}$ で影響を及ぼさなかった (概要表 2.6.3.2 ; 添付資料番号 4.2.1.1-1 及び-3)。これらのデータから、イキサゾミブが off-target 効果をもたらす可能性は低いことが示された。

イキサゾミブの化学構造にはキラル中心が存在しており、原薬は光学異性体 (R 体) であることが確定されている (3.2.S.1.2)。光学異性体 (S 体) である ML00701207 をイキサゾミブとは別途合成し、精製ヒト 20S プロテアソームの $\beta 5$ サブユニットに対する阻害強度について評価した (概要表 2.6.3.2 ; 添付資料番号 4.2.1.1-4)。当該アッセイでの ML00701207 の IC₅₀ は、0.8245 $\mu\text{mol/L}$ (95% CI = 0.293) であり、これは、プロテアソームの $\beta 5$ サブユニットに対する阻害作用がイキサゾミブ [IC₅₀ = 3.4 nmol/L (添付資料番号 4.2.1.1-1)] と比べ 200 倍以上弱い。

2.6.2.2.1.2 20S プロテアソーム阻害の反応速度論的解析

: 添付資料番号 4.2.1.1-1 (参考)

イキサゾミブ及びボルテゾミブは、ボロン酸と N 末端トレオニン側鎖のヒドロキシル基との共有結合により 20S プロテアソームを時間依存的に阻害することが実証された (概要表 2.6.3.2 ; 添付資料番号 4.2.1.1-1)。当該結合は可逆的で、結合複合体と非結合複合体との平衡状態に徐々に到達した。

酵素活性部位の基質競合を考慮して平衡状態での真の K_i によって測定するとイキサゾミブの活性は、ボルテゾミブのものと類似していたが (表 2.6.2.2-1)、イキサゾミブの結合速度定数 (k_{on}) と解離速度定数 (k_{off}) はどちらも、ボルテゾミブのものと比べてはるかに大きかった (表 2.6.2.2-3)。イキサゾミブは、ボルテゾミブに比べて k_{off} が大きいいため、プロテアソームからの解離半減期が短かった [ボルテゾミブの 110 分に対して 18 分 (表 2.6.2.2-3)]。

表 2.6.2.2-3 20S β5 結合の反応速度論的解析

パラメータ	イキサゾミブ	ボルテゾミブ
$k_{on}(\text{sec}^{-1}\text{M}^{-1})$	700,000 (450,000~940,000, n = 3)	195,000 (140,000~250,000, n = 3)
$k_{off}(\text{sec}^{-1})$	0.00066 (0.00019~0.0011, n = 3)	0.00011 (0.000067~0.00015, n = 3)
$\beta 5 t_{1/2}(\text{分})$	18 (6.8~30, n = 3)	110 (71~150, n = 3)

出典：添付資料番号 4.2.1.1-1

k_{off} = 解離速度定数； k_{on} = 結合速度定数； $t_{1/2}$ = 解離半減期

注記：結果は平均値 (95% CI、実験数)。

2.6.2.2.1.3 培養ヒト癌細胞におけるプロテアソーム阻害のエビデンス

：添付資料番号 4.2.1.1-1 (参考)、-5 (参考)、-6 (参考)

(1) プロテアソーム活性及びプロテアソーム基質分解に及ぼす影響

イキサゾミブがプロテアソーム活性を阻害する可能性、及びその結果としてプロテアソームによって仲介される基質蛋白質分解を妨げる可能性について、細胞を用いた3種類のアッセイでさらに検討した(概要表 2.6.3.2；添付資料番号 4.2.1.1-1)。これらの細胞を用いたアッセイでは、生細胞におけるキモトリプシン様 ($\beta 5$) サブユニット活性の阻害及び回復の速度論についての検討、プロテアソームの直接の基質である $4 \times \text{Ub}$ -ルシフェラーゼレポーターに対してイキサゾミブが及ぼす影響の検討、さらにプロテアソーム活性によって調節されることが知られている NF- κ B シグナル伝達経路にイキサゾミブが及ぼす影響の検討によって、イキサゾミブによる阻害作用の特性を評価した。

●●●●●●●●●●を用いた細胞アッセイで、20S プロテアソームのキモトリプシン様 ($\beta 5$) サブユニット活性に化合物が及ぼす影響を *in situ* で測定した成績から、Calu-6 細胞にイキサゾミブ及びボルテゾミブを添加してから1時間後の IC_{50} は、それぞれ 9.7 nmol/L 及び 3.0 nmol/L であり(表 2.6.2.2-4)、これらの数値は、生化学アッセイでの精製 20S プロテアソームに対する IC_{50} の 2~3 倍の範囲内であったため、当該生化学アッセイでの IC_{50} に匹敵するとみなすことができた(表 2.6.2.2-1)。

イキサゾミブ及びボルテゾミブに短時間曝露させた後に薬剤を含まない新鮮培地に置き換えるという条件で培養した細胞でのプロテアソーム活性の回復について、同じアッセイシステムで検討した。濃度 1 $\mu\text{mol/L}$ の化合物の存在下で Calu-6 細胞を 30 分培養した後、薬剤を含まない新鮮培地に置き換え、4 時間後にプロテアソーム活性を評価した。薬剤を含まない新鮮培地に置き換える前のイキサゾミブ及びボルテゾミブに曝露させた細胞のプロテアソーム活性は、薬剤未添加の対照細胞の活性のそれぞれ 7.1% 及び 3.5% であった。薬剤を含まない新鮮培地に置き換えた後、イキサゾミブに曝露させた細胞のプロテアソーム活性は対照細胞の当該活性の 69% まで回復したが、ボルテゾミブに曝露させた細胞のプロテアソーム活性は対照細胞の当該活性の 20% までしか回復しなかった(表 2.6.2.2-4)。これらの成績から、イキサゾミブは、ボルテゾミブと比べて速やかにプロテアソームから解離するという生化学アッセイの知見が支持された。

細胞を用いた $4 \times \text{Ub}$ -Luc レポーターアッセイで、プロテアソームによるポリユビキチン化ルシフェラーゼの分解を直接モニタリングした。イキサゾミブは、MDA-MB-231- $4 \times \text{Ub}$ -Luc 細胞株において $4 \times \text{Ub}$ -Luc レポーターを安定化させ、刺激の最大効果 (E_{max}) は 265 倍、50% 効果濃度である EC_{50} の幾何平均値は 525 nmol/L であった(表 2.6.2.2-4)。本アッセイでは、

ボルテゾミブの方がやや高い活性効果を示し、 E_{max} は 370 倍、 EC_{50} の幾何平均値は 310 nmol/L であった。

TNF α による NF- κ B 経路の活性化には、機能するプロテアソーム活性によって NF- κ B の阻害因子 I κ B α を分解する必要がある。プロテアソームを阻害すると、I κ B α の分解が妨げられ、結果として NF- κ B 駆動性の遺伝子発現が減少する。NF- κ B-Luc アッセイは、NF- κ B 活性依存的にルシフェラーゼを発現させるレポーターシステムを利用する。イキサゾミブは、HEK-293 細胞を用いた NF- κ B-Luc アッセイにおいて TNF α 誘導による活性化をほぼ完全に阻害した（最大阻害：99.3%）。なお、そのときの IC_{50} はボルテゾミブが 33 nmol/L であったのに対し、イキサゾミブは 55 nmol/L であった（表 2.6.2.2-4）。

表 2.6.2.2-4 培養細胞でのイキサゾミブによるプロテアソーム阻害

細胞を用いたアッセイ	イキサゾミブ	ボルテゾミブ
IC ₅₀ (nmol/L) ^b (活性率) ^{b, c}	9.7	3.0
t = 4 時間、薬剤除去前	7.1 (3.6~10.6, n = 5) ^d	3.5 (2.0~4.9, n = 5) ^d
t = 4 時間、薬剤除去後	69 (66~71, n = 5) ^d	20 (18~23, n = 5) ^d
MDA-MB-231 4 × Ub-Luc EC ₅₀ (nmol/L)	525 (330~840, n = 4)	310 (230~400, n = 29)
E _{max} (刺激比)	265 (160~370, n = 4) ^d	370 (330~410, n = 29) ^d
HEK-293 NF- κ B-Luc IC ₅₀ (nmol/L)	55 (33~91, n = 7) ^d	33 (27~40, n = 23)
最大阻害率 (%)	99.3 (99.0~99.6, n = 7) ^d	99.6 (99.3~100, n = 23) ^d

出典：添付資料番号 4.2.1.1-1

EC₅₀ = 最大反応の 50%を示す濃度；E_{max} = 最大効果；IC₅₀ = 50%阻害濃度

注記：結果は、特に指定のない限り、幾何平均値（95% CI、実験数）。CI を伴わないデータは 1 回のみ測定。

a [redacted] (USA)。

b 本アッセイでは β 5 活性を評価した。

c 1 μ mol/L のイキサゾミブに 30 分間曝露させた後の値。

d 結果は平均値（95% CI、実験数）。

さらに、プロテアソーム活性サブユニットに対するイキサゾミブの活性阻害および選択性について、培養 MM.1S 細胞を用いて *in vitro* でそれぞれ個別に評価した（添付資料番号 4.2.1.1-5）。結果は、精製プロテアソームの生化学アッセイの知見（表 2.6.2.2-1）と一致しており、MM.1S 細胞において、イキサゾミブは β 5 サブユニットに対する阻害活性が最も大きく（ IC_{50} = 5 nmol/L）、 β 2 サブユニットに対する阻害活性が最も小さかった（ IC_{50} > 10 μ mol/L）。12 nmol/L のイキサゾミブで処理した MM.1S 細胞から抽出した蛋白質をウェスタンブロット法で分析したところ、ユビキチン化蛋白質の時間依存的かつ用量依存的な増加が示されたが、これはすでに知られているプロテアソーム阻害の効果と一致している（添付資料番号 4.2.1.1-5）。

(2) 培養又は初代ヒト多発性骨髄腫細胞の生存率に及ぼす影響

MM.1S、ANBL-6、RPMI-8226 及び NCI-H929 ヒト MM 細胞株を用いて、イキサゾミブが *in vitro* で生存率に及ぼす影響を評価した（概要表 2.6.3.2；添付資料番号 4.2.1.1-6）。各測定において、ジメチルスルホキシド（DMSO）を用いて 3 倍段階希釈を行って 10 の濃度のイキサゾミブを調製し、それらを各濃度当たり 2 回繰り返して試験した。様々な濃度のイキサゾミブとともに 72 時間培養したあと、[redacted] アッセイ [redacted] (USA)] を用いて、細胞内のアデノシン 5'-三リン酸（ATP）の濃

度を測定することによって生存率を評価した。すべての細胞株において、イキサゾミブは、用量依存的に生存率を強力に低下させた（表 2.6.2.2-5）。

表 2.6.2.2-5 in vitro でのイキサゾミブとの 72 時間培養がヒト骨髄腫細胞株の生存率に及ぼす影響

細胞株	疾患	n	LD ₅₀ 幾何平均値 ($\mu\text{mol/L}$)	SEM
ANBL-6	多発性骨髄腫	3	0.0243	0.0072
MM.1S	多発性骨髄腫	5	0.0258	0.0360
RPMI-8226	形質細胞腫; 骨髄腫	11	0.0059	0.0017
NCI-H929	形質細胞腫; 骨髄腫	5	0.0149	0.0007

出典：添付資料番号 4.2.1.1-6

LD₅₀ = 細胞の 50% が死に至る濃度；SEM = 標準誤差

注記：本表は 3 回以上 11 回以下の独立測定からのデータの幾何平均値及び関連する SEM を示す。

さらに、イキサゾミブの in vitro での抗腫瘍活性は、様々な培養ヒト MM 細胞株 (MM.1S、MM.1R、RPMI-8226、OPM1、OPM2、NCI H929 及び INA-6) を用いて、MTT アッセイでそれぞれ個別に評価した (添付資料番号 4.2.1.1-5)。

イキサゾミブ (6.25、12.5、25 又は 50 nmol/L) で 48 時間処理した後、培養ヒト MM 細胞株の生存率について評価した。比色分析の MTT アッセイを用いて細胞生存率を評価した結果、濃度依存的な生存率の有意な低下 ($p < 0.05$; $n = 3$) が引き起こされた (図 2.6.2.2-1)。MM.1S、MM.1R 及び NCI-H929 細胞では、12.5 nmol/L のイキサゾミブで処理すると対照細胞に比べて生存率が約 50% 低下し、25 nmol/L で処理すると当該細胞株並びに RPMI-8226 及び INA-6 細胞では生存率が > 90% 低下した。OPM1 及び OPM2 細胞株はイキサゾミブに対する感度が低く、25 nmol/L のイキサゾミブで処理しても 40~50% しか生存率は低下しなかった (図 2.6.2.2-1)。

用量依存性を示す生存率の有意な低下 ($p < 0.001$) は、ボルテゾミブ、レナリドミド及び / 又はデキサメタゾン等の複数の前治療後に再発した患者を含む、6 名の MM 患者から CD138⁺ 選択によって精製した初代 MM 細胞をイキサゾミブ (12.5、25 又は 50 nmol/L) で 24 時間又は 48 時間処理した後も観察された (図 2.6.2.2-2)。25 nmol/L のイキサゾミブによって 24 時間処理すると、生存率の低下は、患者 6 名の検体では約 40% で、50 nmol/L のイキサゾミブで処理すると、6 名中 4 名の検体では 70% 以上であった。48 時間処理すると、生存率に対する影響はさらに大きくなった。一方、上記濃度のイキサゾミブが健康成人ドナー由来の PBMC に及ぼす影響ははるかに小さかった。25 nmol/L のイキサゾミブで 48 時間処理すると、PBMC 検体 6 サンプル中 5 サンプルでの生存率の低下は 10% 未満で、残りの 1 サンプルでは約 20% であった。50 nmol/L のイキサゾミブで処理すると、PBMC 検体 6 サンプル中 5 サンプルでの生存率の低下は約 30% 以下で、残りの 1 サンプルでは約 40% であった。これらのデータから、MM 細胞株は、正常な PBMC に比べ、イキサゾミブ処理に対する感度が高いことが示された (図 2.6.2.2-3)。

MM 細胞の増殖は、増殖を支持するサイトカインを供給する骨髄間質細胞との共培養によって刺激される (添付資料番号 4.2.1.1-5)。イキサゾミブは、MM 患者の骨髄から精製した CD138⁺ 細胞由来の骨髄間質細胞 (BMSC) の存在下で培養した MM.1S 細胞の増殖を阻害し

た。骨髓間質細胞の存在下で、MM.1S 細胞を 25 nmol/L のイキサゾミブで処理したところ、未処理の対照細胞と比べ、 ^3H チミジンの取込み量は約 1/15 に低下し、12.5 nmol/L のイキサゾミブで処理した場合でも ^3H チミジンの取込み量は約 1/2.5 に有意に低下した(図 2.6.2.2-4)。これらの成績から、イキサゾミブは、MM の骨髓微小環境によく見られる MM 細胞を支持する BMSC の存在下でも MM 細胞株の増殖を阻害できることが示された。

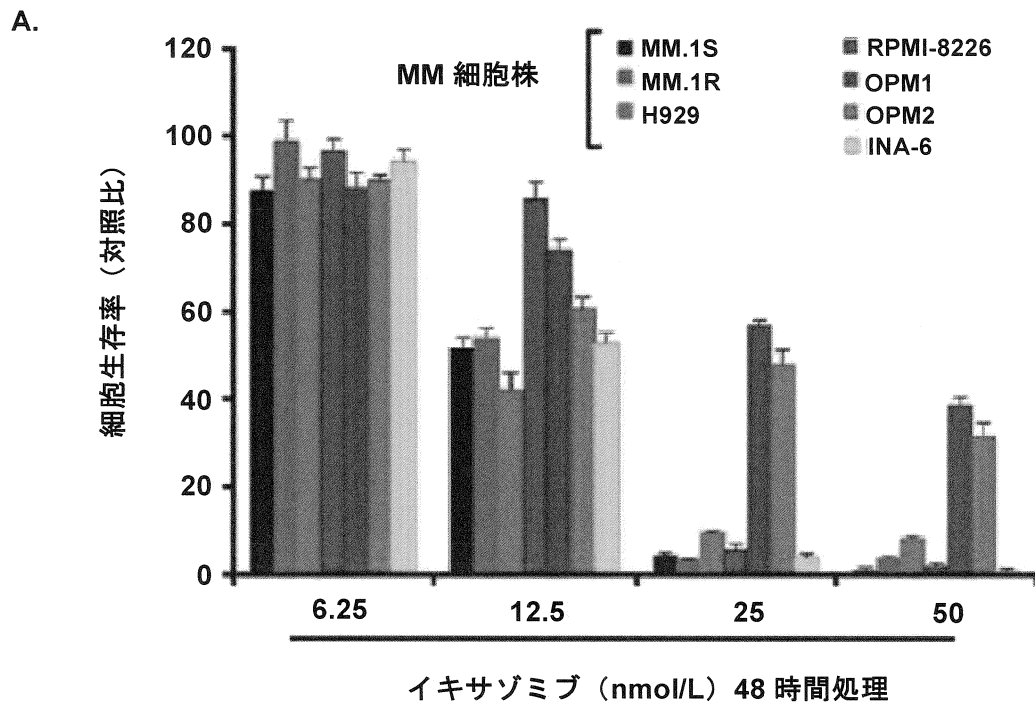


図 2.6.2.2-1 イキサゾミブ処理が培養及び初代ヒト多発性骨髄腫細胞の生存率に及ぼす影響 (A)

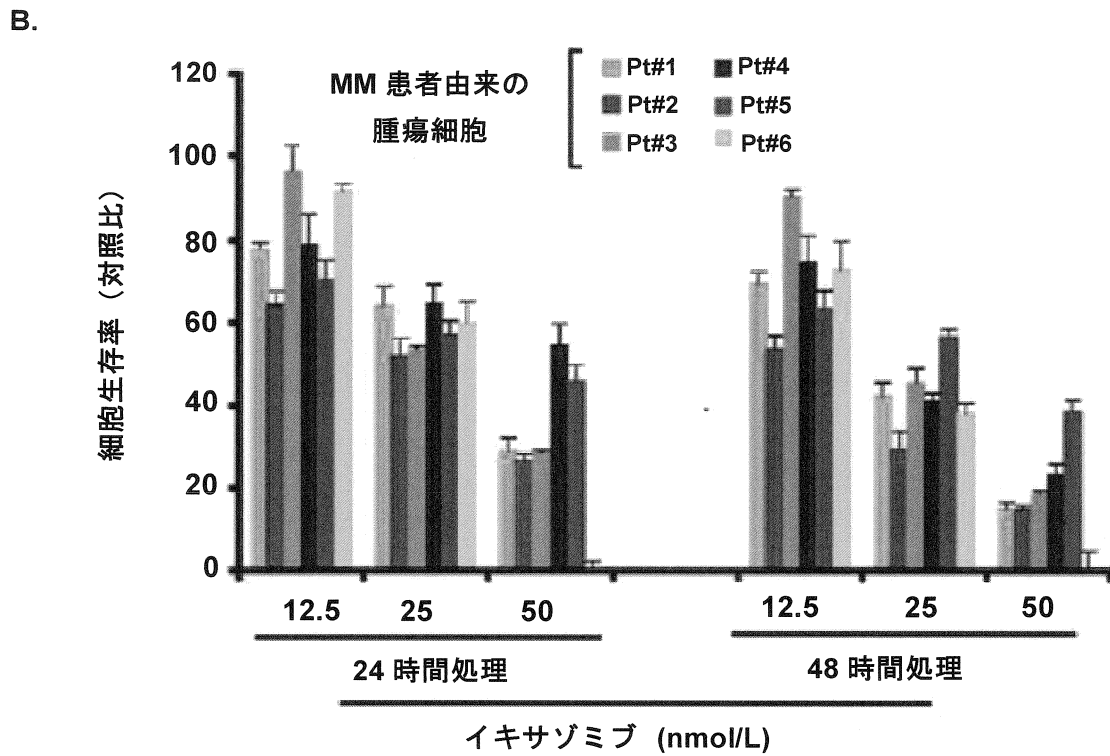


図 2.6.2.2-2 イキサゾミブ処理が培養及び初代ヒト多発性骨髄腫細胞の生存率に及ぼす影響 (B)

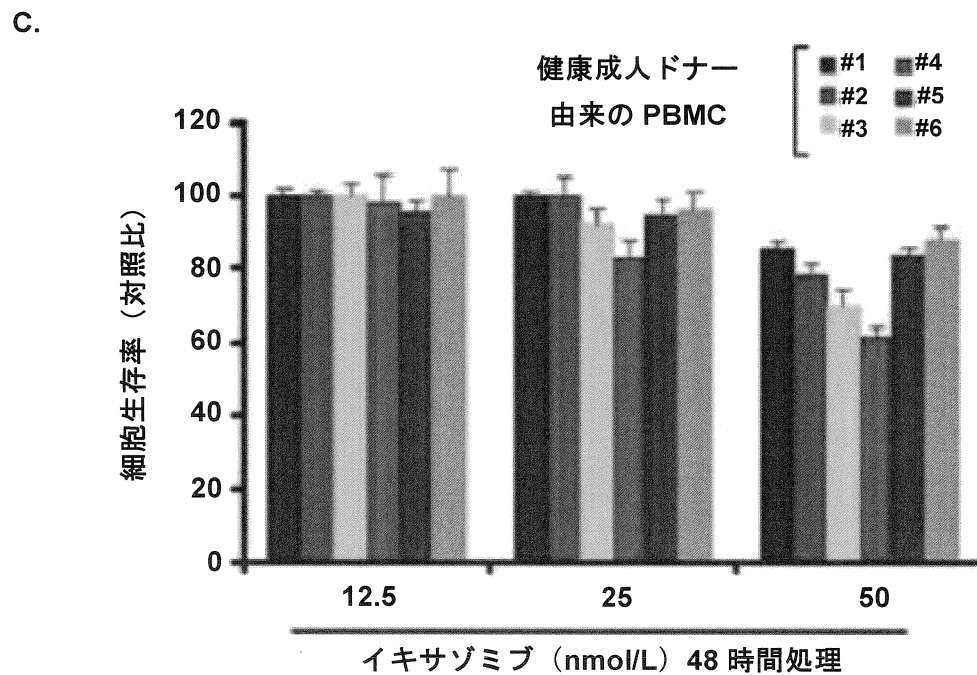


図 2.6.2.2-3 イキサゾミブ処理が健康成人ドナー由来の PBMC の生存率に及ぼす影響 (C)

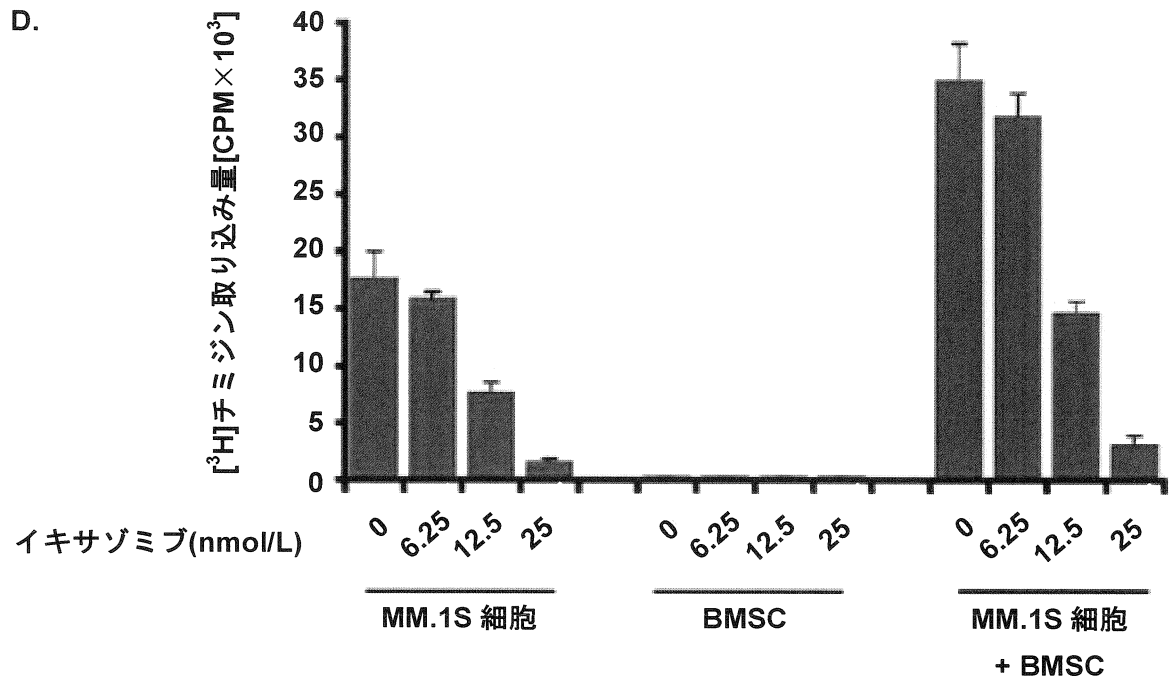


図 2.6.2.2-4 イキサゾミブ処理が培養及び初代ヒト多発性骨髄腫細胞の生存率に及ぼす影響 (D)

出典：添付資料番号 4.2.1.1-5

BMSCs = 骨髄間質細胞；H929 = NCI-H929；MM = 多発性骨髄腫；PBMC = 末梢血単核球

パネル A：培養ヒト MM 細胞株をイキサゾミブで 48 時間処理した；細胞生存率は

(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT) テトラゾリウムアッセイを用いて評価した (結果は平均値±標準偏差 (SD)；n = 3；すべての細胞株の p 値は < 0.05)。

パネル B：精製初代 MM 細胞 (CD138⁺) をイキサゾミブで 24 時間及び 48 時間処理した；細胞生存率は、
アッセイを用いて評価した (結果は 3 検体の平均値±SD；すべての検体の p 値は < 0.001)。

パネル C：健康成人ドナー由来の PBMC をイキサゾミブで 48 時間処理した；細胞生存率は、アッセイを用いて評価した。結果は 4 検体の平均値±SD (すべての検体の p 値は < 0.001)。

パネル D：MM 患者から採取し、20%ウシ胎仔血清 (FBS) 含有のダルベッコ修正イーグル培地 (DMEM) 中で培養した CD138⁺細胞由来の骨髄間質細胞 (BMSC) 存在下又は非存在下で、MM.1S 細胞をイキサゾミブで 48 時間処理した。細胞増殖量は [³H]チミジンの取込みアッセイで測定した。結果は平均値±SD (n = 3)。

2.6.2.2.1.4 多発性骨髄腫細胞株内シグナル伝達経路に対するイキサゾミブの作用メカニズム

：添付資料番号 4.2.1.1-5 (参考)

イキサゾミブのアポトーシスシグナル伝達経路に対する作用メカニズムについて、ヒト MM 細胞を対象として、ウェスタンブロット法を用いて in vitro で評価した (添付資料番号 4.2.1.1-5)。NCI-H929 及び MM.1S 細胞をイキサゾミブで処理したところ、カスパーゼ 3、カスパーゼ 8、カスパーゼ 9、及び PARP の蛋白質分解的切断の増加が認められ、イキサゾミブは、ミトコンドリア依存的な内因性シグナル伝達経路 (カスパーゼ 9) 及びミトコンドリア非依存的な外因性シグナル伝達経路 (カスパーゼ 8) の両方を活性化することが示された (図 2.6.2.2-5 及び図 2.6.2.2-6)。プロテアソーム阻害薬処理した MM 細胞がアポトーシスに至る一連の事象について完全に明らかにしたわけではないが、ER ストレス/UPR、アポトーシス促進性 BH3-only 蛋白質の発現上昇及び p53 の活性化等の複数の経路が、ボルテゾミブ等の

その他のプロテアソーム阻害薬に反応して活性化されることが高頻度で認められた[1]。MM.1S 細胞をイキサゾミブで処理すると、p53 の蛋白質レベル及び p53 調節遺伝子群すなわち細胞周期停止に関与する p21、並びにアポトーシス促進性 BH3-only 蛋白質である NOXA 及び PUMA の蛋白質発現レベルが上昇した (図 2.6.2.2-7)。イキサゾミブによって引き起こされるプロテアソーム阻害によりシャペロン蛋白質 BiP のレベル上昇、eIF2 α リン酸化の亢進、及び転写因子 CHOP のレベル上昇が引き起こされた (図 2.6.2.2-8)。これらはいずれも UPR 活性化の証拠である[7]。

A

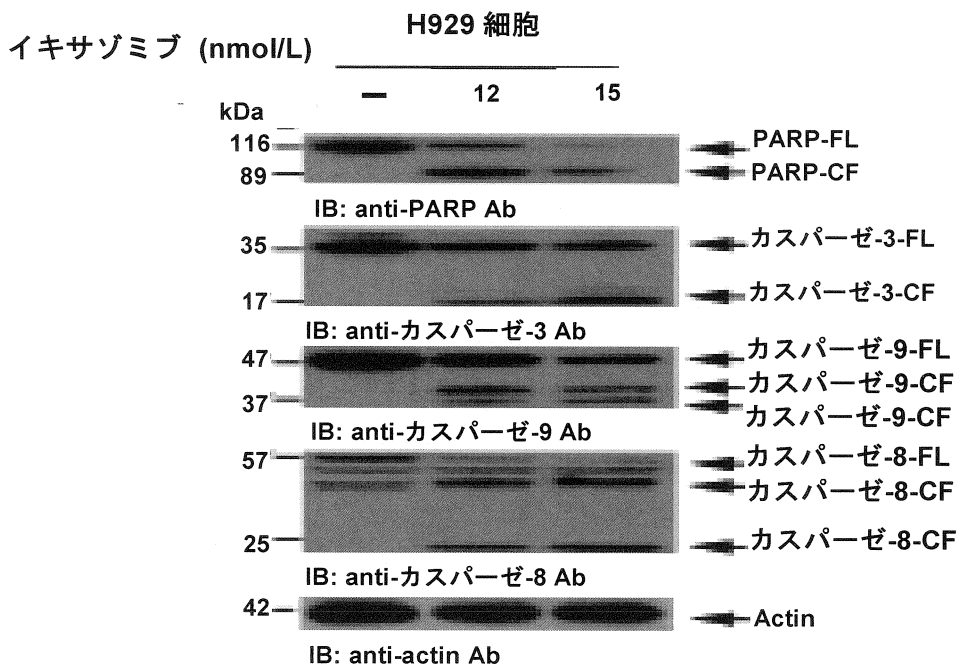


図 2.6.2.2-5 多発性骨髄腫細胞株におけるイキサゾミブ活性の発現メカニズム (A)

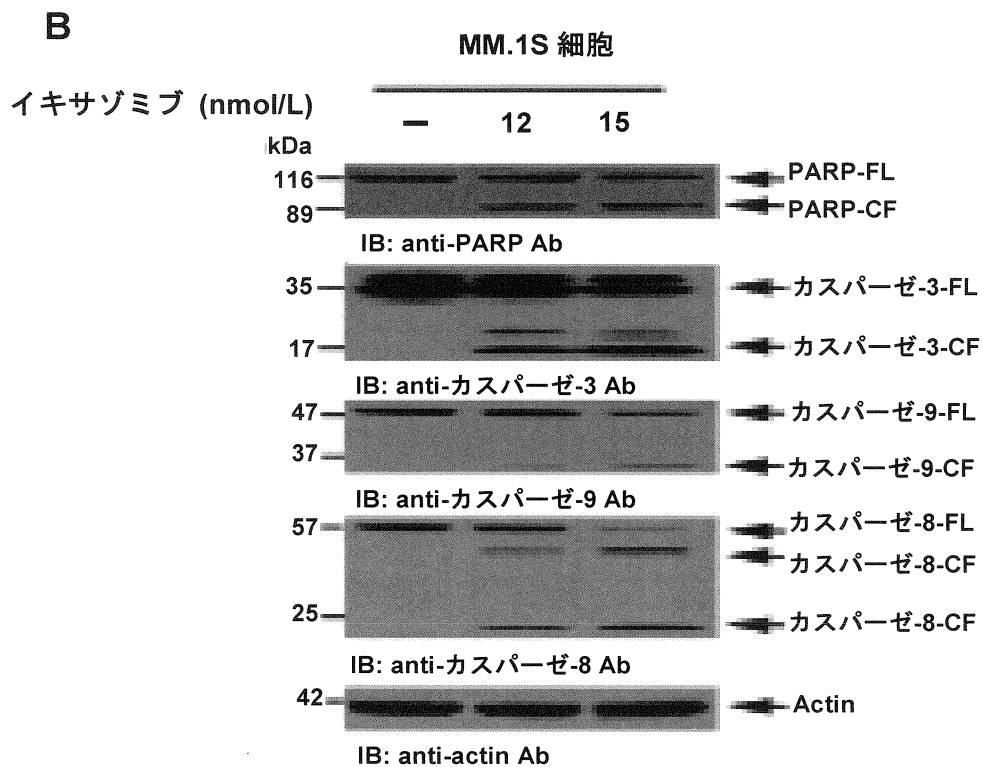


図 2.6.2.2-6 多発性骨髄腫細胞株におけるイキサゾミブ活性の発現メカニズム (B)

C

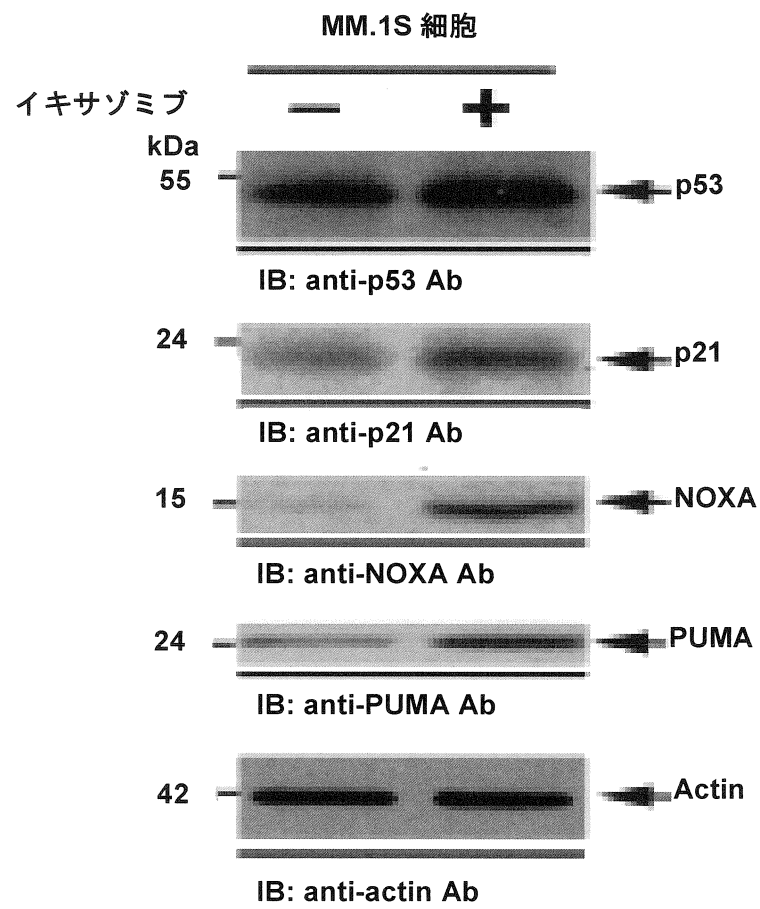


図 2.6.2.2-7 多発性骨髄腫細胞株におけるイクサゾミブ活性の発現メカニズム (C)

D

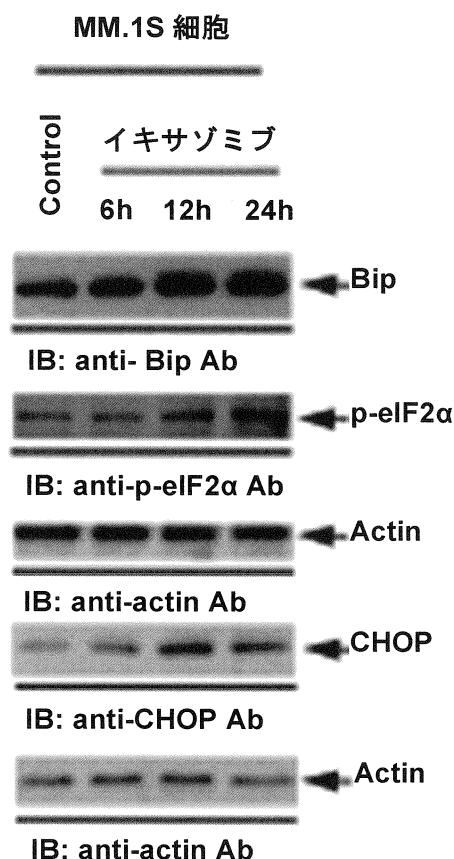


図 2.6.2.2-8 多発性骨髄腫細胞株におけるイクサゾミブ活性の発現メカニズム (D)

出典：添付資料番号 4.2.1.1-5

CF = 切断(活性化)フラグメント； FL = 完全長； H929 = NCI-H929；

パネル A 及び B： H929 及び MM.1S 細胞を 24 時間イクサゾミブで処理し細胞を回収した。全細胞溶解液のイムノブロット分析の結果を示す。

パネル C 及び D： MM.1S 細胞を 12 nmol/L のイクサゾミブで 24 時間処理した；その後、蛋白質溶解液を指定の抗体でイムノブロット分析した。パネル D において示されたプロットは、3 回の実験を代表するものである。

2.6.2.2.1.5 骨髄微小環境に存在するその他の細胞種にイクサゾミブが及ぼす影響

：添付資料番号 4.2.1.1-5 (参考)、-7 (参考)

イクサゾミブは、MM 細胞ばかりでなく、骨髄微小環境におけるその他の細胞種、すなわち、血管新生、骨吸収及び骨形成にそれぞれ関与する血管内皮細胞、破骨細胞及び骨芽細胞にも影響を及ぼす。

血管新生の *in vitro* モデルである HUVEC 由来の毛細管様構造の *in vitro* での形成に対するイクサゾミブの阻害作用について評価した(添付資料番号 4.2.1.1-5)。HUVEC を溶媒(DMSO)又はイクサゾミブ(10 nmol/L)で 8 時間前処理し、薬剤を含まない培地に移した後、Matrigel™ [BD Biosciences (Piscataway, NJ, USA)] でコーティングした 96 ウェルプレートに播種し、4 時間培養した後に、光学顕微鏡で管形成について評価した。イクサゾミブは管形成を有意に阻害し、一視野あたりの枝分かれ部位の数によって定量したところ、イクサゾミブの存在下で当該部位は約 35%減少した(図 2.6.2.2-9)。

破骨細胞分化形成に関する *in vitro* 試験から、イキサゾミブは健康成人ドナー及びMM患者から採取したPBMC中に存在する前駆細胞からの破骨細胞分化形成を阻害することが示された(添付資料番号4.2.1.1-7)。末梢血単核球を、イキサゾミブ又はボルテゾミブの存在下又は非存在下で、マクロファージ・コロニー刺激因子(M-CSF) 25 ng/mL及びNF- κ B活性化受容体リガンド(RANKL) 50 ng/mLを含有する破骨細胞分化形成培地において21日間培養し、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ陽性(TRAP⁺)細胞が3個以上の核を有する場合を破骨細胞と定義して、破骨細胞の存在について評価した。これらの実験から、総細胞数を減少させることなく破骨細胞の分化形成を有意に阻害するイキサゾミブ濃度(2.5~10 nmol/L)が特定されたが、これは破骨細胞の生存というよりも分化に影響を及ぼす濃度である(図2.6.2.2-10)。しかし、さらに高濃度のイキサゾミブ(25 nmol/L)で処理すると、破骨細胞の分化形成阻害と共に、総細胞数の減少が引き起こされた。破骨細胞の骨吸収能を、イキサゾミブ及びボルテゾミブの存在下及び非存在下で、*in vitro* で評価した。これらの試験では、末梢血単核球を、カルシウム被塗スライド上の破骨細胞分化形成培地中で17日間培養し、カルシウムの再吸収領域(吸収窩)を定量した。イキサゾミブ濃度が2.5 nmol/L以上のとき、カルシウムの再吸収を有意に低下させた(図2.6.2.2-11)。これらのアッセイにおいて、ボルテゾミブは、イキサゾミブと比べて低い濃度で破骨細胞分化形成に対して同程度の影響を示した。

骨芽細胞の分化及び機能について検討した *in vitro* 試験から、イキサゾミブは、前駆細胞からの骨芽細胞分化を促進し、基質石灰化を刺激することが示された。MM患者の骨髄由来の初代MSCを、イキサゾミブ又はボルテゾミブの存在下又は非存在下で、 β -グリセロリン酸5 mM、アスコルビン酸50 μ g/mL、デキサメタゾン80 nmol/Lを含有する骨形成培地において分化させ、アルカリホスファターゼ(ALP)活性(早期骨芽細胞のサロゲートマーカー)及び基質石灰化(細胞外環境にカルシウムを沈着させる能力)等の骨芽細胞の特徴の観点で細胞を評価した。骨形成培地において11日間培養した後、ALPはイキサゾミブ又はボルテゾミブの存在下で用量依存的に上昇し、特に2.5 nmol/L以上のイキサゾミブ濃度ではALPの有意な上昇が認められた(図2.6.2.2-12)。骨形成培地において21日間培養したところ、カルシウム検出色素のアリザリン赤による染色部位の増加によって示されるように、カルシウム沈着はイキサゾミブ又はボルテゾミブの存在下で増加した。

以上の結果を総合すると、イキサゾミブは、ボルテゾミブ同様、骨形成細胞(骨芽細胞)の分化及び機能を促進し、骨吸収細胞(破骨細胞)の分化及び機能を阻害するといえる。

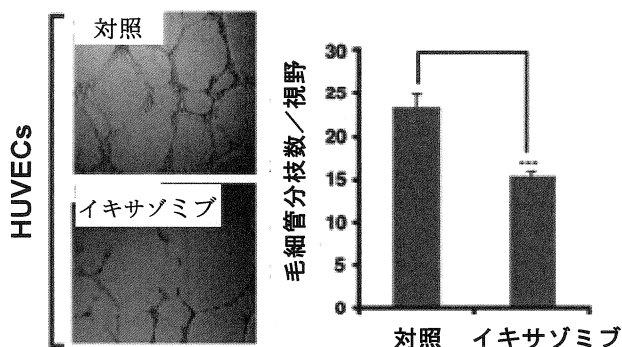


図 2.6.2.2-9 in vitro での HUVEC による毛細管形成にイクサゾミブが及ぼす影響

出典：添付資料番号 4.2.1.1-5

HUVEC = ヒト臍帯血管内皮細胞

HUVEC を 10 nmol/L のイクサゾミブの存在下又は非存在下で、8 時間、内皮基本培地 (EBM-2) で培養した後、薬物を含まない培地で洗浄し、Matrigel™ [BD Biosciences (Piscataway, NJ, USA)] に播種して 4 時間培養して管形成させた後、倒立顕微鏡 (倍率 4×/0.10 NA oil) で撮影した。in vitro での血管新生は、毛細管の分枝形成によって示される。結果は平均値±SD ; n = 3 ; p < 0.001。

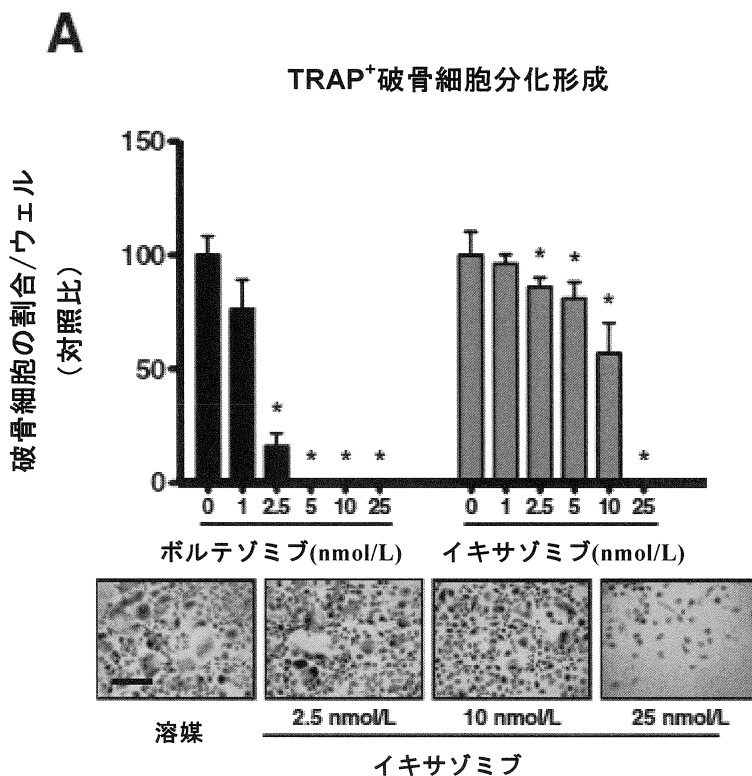


図 2.6.2.2-10 破骨細胞の分化形成及び骨吸収にイクサゾミブが及ぼす影響 (A)

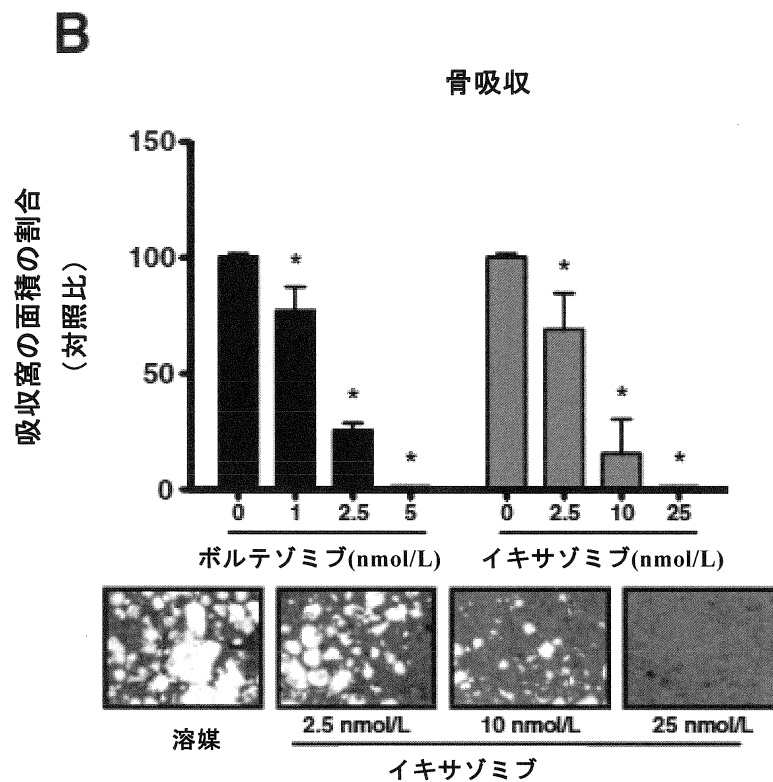


図 2.6.2.2-11 破骨細胞の分化形成及び骨吸収にイクサゾミブが及ぼす影響 (B)

出典：添付資料番号 4.2.1.1-7

TRAP⁺ = 酒石酸耐性酸性ホスファターゼ陽性

パネル A：健康成人ドナーから採取した末梢血単核球 (PBMC) にボルテゾミブ又はイクサゾミブで 21 日間プロテアソームを持続的に阻害しつつ、M-CSF 25 ng/mL 及び RANKL 50 ng/mL を含有した破骨細胞分化形成培地で培養した。破骨細胞を、多核 (核数>3) の TRAP⁺細胞と定義した。結果は、平均値±SD ; n = 3 ; *p < 0.05。代表的な TRAP⁺破骨細胞の顕微鏡写真を示す。

パネル B：PBMC にボルテゾミブ又はイクサゾミブを 17 日間処理し、プロテアソームを持続的に阻害しつつ、破骨細胞分化形成培地の存在下で、カルシウム被塗スライド上で培養した。破骨細胞を除去し、吸収窩の面積を分析した。平均値±SD ; *p < 0.05。代表的な吸収窩の顕微鏡写真を示す。

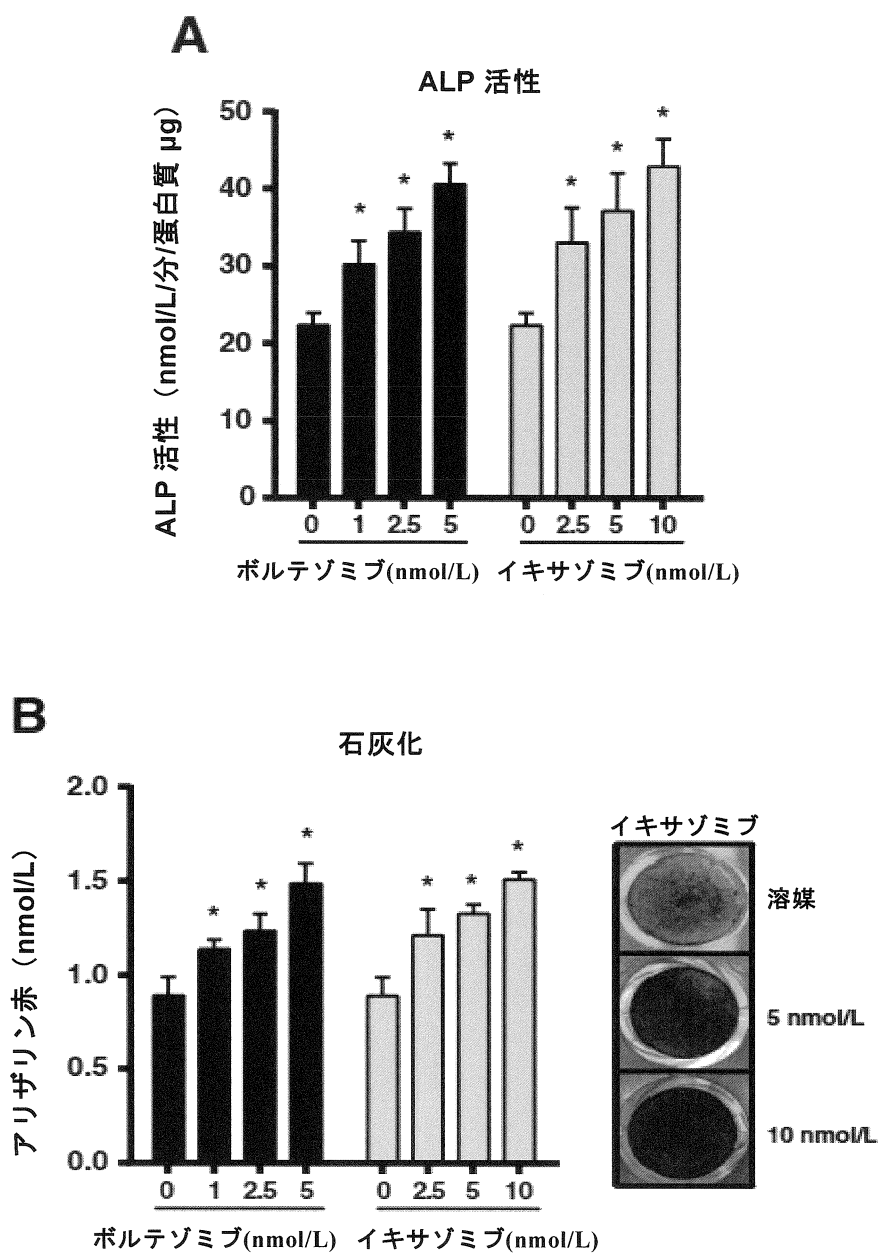


図 2.6.2.2-12 骨芽細胞の活性にイキサゾミブが及ぼす影響 (A & B)

出典：添付資料番号 4.2.1.1-7

ALP=アルカリホスファターゼ

パネル A：多発性骨髄腫 (MM) 患者由来の初代 MSC にボルテゾミブ又はイキサゾミブを 11 日間処理し、プロテアソームを持続的に阻害しつつ、骨形成培地で培養した。ALP 活性は p-ニトロフェニルリン酸の p-ニトロフェノールへの加水分解 (Sigma-Aldrich) によって測定した。平均値±SEM；*p<0.05。

パネル B：MM 患者由来の初代 MSC にボルテゾミブ又はイキサゾミブを 21 日間処理し、プロテアソームを持続的に阻害しつつ、骨形成培地で培養した。マトリックスの石灰化は、アリザリン赤の染色及び色素量測定で評価した。平均値±SD；*p<0.05。溶骨性病変を有する MM 患者から採取した MSC の代表的な画像を示す。

2.6.2.2.1.6 in vitro で培養した多発性骨髄腫細胞株の生存率にイキサゾミブとレナリドミドの併用が及ぼす影響

: 添付資料番号 4.2.1.1-8 (参考)

イキサゾミブとレナリドミドの併用が及ぼす影響について、4種類のMM細胞株(MM.1S、ANBL-6、RPMI-8226及びNCI-H929)を用いて検討した(表2.6.2.2-6)(概要表2.6.3.2;添付資料番号4.2.1.1-8)。様々な濃度のイキサゾミブ、レナリドミドの単独又はその併用で120時間培養した後、XXXXXXXXXXアッセイXXXXXXXXXXを用いて細胞内のATP濃度を測定し、細胞生存率を評価した。イキサゾミブはすべての細胞株において生存率を強力に低下させたが(表2.6.2.2-6)、レナリドミドの場合、4種類の細胞株間で阻害活性の差が認められた。レナリドミドは、ANBL-6、NCI-H929及びRPMI-8226の細胞死を誘導したが、約25µmol/Lまでの濃度ではMM.1S細胞の生存率に影響を及ぼさなかった。

イキサゾミブとレナリドミドの併用は、ANBL-6及びNCI-H929細胞では相乗作用を示し、MM.1S及びRPMI-8226細胞では相加作用を示した。相乗作用及び相加作用の分類は、併用についての2種類の評価尺度、すなわち、併用指数及び非線形混合効果モデル推定値によって判定した([8][9][10])。

表 2.6.2.2-6 単独及び併用の評価と併用効果判定

細胞株	化合物	所見	解釈
MM1.S	イキサゾミブ	EC ₅₀ :23.9 nmol/L	相加作用
	レナリドミド	EC ₅₀ : > 24900 nmol/L	
	イキサゾミブ/レナリドミド併用	併用指数: N/A 非線形混合効果モデル推定値: 0	
ANBL-6	イキサゾミブ	EC ₅₀ :17.7 nmol/L	相乗作用
	レナリドミド	EC ₅₀ :578 nmol/L	
	イキサゾミブ/レナリドミド併用	併用指数:0.45, p < 0.001 非線形混合効果モデル推定値: 21.3, p < 0.001	
NCI-H929	イキサゾミブ	EC ₅₀ :18.3 nmol/L	相乗作用
	レナリドミド	EC ₅₀ :776 nmol/L	
	イキサゾミブ/レナリドミド併用	併用指数:0.48, p < 0.001 非線形混合効果モデル推定値: 23.6, p < 0.001	
RPMI-8226	イキサゾミブ	EC ₅₀ :7.85 nmol/L	相加作用
	レナリドミド	EC ₅₀ :447 nmol/L	
	イキサゾミブ/レナリドミド併用	併用指数: N/A 非線形混合効果モデル推定値: 18.9, p < 0.001	

出典: 添付資料番号 4.2.1.1-8

EC₅₀ = 最大反応の50%を示す濃度; N/A = 該当せず。

併用指数 (CI) の解釈: p 値が < 0.05 の場合で、CI が 0~0.7 のとき「相乗作用」、CI が 0.7~1.3 のとき「相加作用」、CI が 1.3~2 のとき「準相加作用」、CI > 2 のとき「拮抗作用」があると解釈した。CI によって判定を下せない場合は、非線形混合効果モデル (NLB) を用いた推定値を使用した。p 値が < 0.05 の場合で、NLB > 20 のとき「相乗作用」、NLB が -20~20 の間のとき「相加作用」、NLB < -20 のとき「拮抗作用」があると解釈した。CI 又は NLB に対しての p 値が > 0.05 のとき、結果には有意差があるとはいえないと判定した。

2.6.2.2.2 in vivo 薬理試験

イクサゾミブを用いて実施した in vivo 試験の結果から、イクサゾミブは in vivo でもプロテアソームを阻害し、忍容性を示す投与量で腫瘍の増殖を阻害することが確認された。CB17-SCID マウスにイクサゾミブを単回経口投与又は単回静脈内投与すると、MM.1S 細胞移植腫瘍における 20S プロテアソーム阻害が示された。これらの MM.1S 移植細胞では、UPR マーカー (GADD34 及び ATF-3) 並びにアポトーシス指標である活性化カスパーゼ-3 の増加も示された。MM.1S 腫瘍移植マウスモデルにイクサゾミブを反復経口投与及び反復静脈内投与すると、強力な抗腫瘍活性が示された。イクサゾミブ 1.64、4.1 及び 11.47 mg/kg を週 1 回静脈内投与、2.5 及び 7 mg/kg を週 2 回静脈内投与、並びに 6、8 及び 10 mg/kg を週 2 回経口投与を継続した 19 日目の各腫瘍体積は、投与開始時 (0 日目) の各腫瘍体積より小さかった。イクサゾミブは、3 種類の関連する PCM マウスモデル、すなわち、デノボ PCM である iMyc^{Ca}/Bcl-XL GEM モデル、DP54-Luc iMyc^{Ca}/Bcl-XL マウス細胞株の静脈内接種によって作製された PCM 播種マウスモデル、及び DP54-Luc iMyc^{Ca}/Bcl-XL マウス細胞株の脛骨内接種によって作製されたマウスモデルにおいても抗腫瘍活性を示した。デノボ PCM マウスモデルにイクサゾミブを投与すると、脾腫の縮小及び IgG2a レベルの低下ばかりでなく、全生存期間の延長がもたらされ、PCM 播種マウスモデルにイクサゾミブを投与すると、腫瘍量が減少し、溶骨性病変も改善した (これは頭蓋縫合の離開が縮小することによって証明された)。MM に関連したマウスモデルを用いて実施した試験については、2.6.2.2.2.2 で詳述する。これらの試験結果は、MM.1S モデル (添付資料番号 4.2.1.1-5)、RPMI-8226-ルシフェラーゼ標識 MM 播種モデル (添付資料番号 4.2.1.1-7)、及びデノボ PCM である C.IL6Myc GEM モデル [11]でも認められた in vivo での抗腫瘍効果によっても支持された。

2.6.2.2.2.1 多発性骨髄腫マウスモデルにおける in vivo での抗腫瘍試験及び薬力学試験

: 添付資料番号 4.2.1.1-9 (参考)、-10 (評価)、-11 (評価)

皮下に MM.1S 腫瘍細胞を移植した雌 CB-17 SCID マウスにイクサゾミブを経口投与後又は静脈内投与後、イクサゾミブの抗腫瘍活性を評価した。これらの試験から、イクサゾミブは、MM.1S 移植腫瘍に対して、統計的に有意かつ用量依存的な抗腫瘍活性を示すことが明らかになった。さらに、これとは別に、イクサゾミブの投与に対する薬力学的反応を、移植腫瘍における 20S プロテアソーム阻害のレベル、UPR マーカーである ATF-3 及び GADD34 のレベル、並びにアポトーシスの指標である活性化カスパーゼ-3 のレベルに基づいて評価した。これらの薬力学試験は薬物動態試験と併せて実施した。

(1) 経口投与又は静脈内投与後の多発性骨髄腫マウスモデルにおける薬物動態試験及び薬力学試験

イクサゾミブの薬物動態及び薬力学的特性について、MM.1S 腫瘍移植雌 CB-17 SCID マウスへの経口投与後又は静脈内投与後に評価した (概要表 2.6.3.2 ; 添付資料番号 4.2.1.1-9)。マウスに、溶媒 (ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン [HP-β-CD] 5%) の単回経口投与若しくは単回静脈内投与、イクサゾミブ 2.0 mg/kg の単回静脈内投与、又はイクサゾミブ 6.0 mg/kg の単回経口投与のいずれかを行った。各群 3 匹のマウスを、溶媒投与群は 4 時間後に、イクサゾミブ投与群は 0.25、0.5、1、4、8 又は 24 時間後に安楽死させた。安楽死処置時

に、薬物動態分析を目的として血漿試料及び腫瘍組織を採取し、20S プロテアソームの $\beta 5$ サブユニット活性アッセイ、ウェスタンブロット法及び免疫組織化学 (IHC) による薬力学分析を目的として腫瘍組織を採取した。

イキサゾミブ 2 mg/kg の静脈内投与群及び 6 mg/kg の経口投与群では、同程度の AUC_{24} 値 (0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積、それぞれ 1100 及び 1680 ng·hr/mL) 並びに同程度の腫瘍内 AUC_{24} 値 (それぞれ 15,800 及び 16,100 ng·hr/mL) が観察された。

イキサゾミブの投与経路が経口又は静脈脈内であるかを問わず、MM.1S 移植腫瘍組織において薬力学効果が認められた。20S プロテアソームの $\beta 5$ サブユニットに対する阻害率 (I%) で測定した薬力学効果は投与後 1 時間までに観察され、ベースラインと比較した場合のプロテアソーム阻害は 24 時間にわたり持続した (図 2.6.2.2-13)。静脈内投与後及び経口投与後の腫瘍組織において観察された 20S プロテアソーム阻害の E_{max} 平均値は、それぞれ 71.7 I% (4 時間後) 及び 60.6 I% (8 時間後) であった。静脈内投与後及び経口投与後の腫瘍組織における AUE_{24} 値 (0 時間から 24 時間の効果-時間曲線下面積) の平均値は、それぞれ 1530 hr·I% 及び 1210 hr·I% であった。

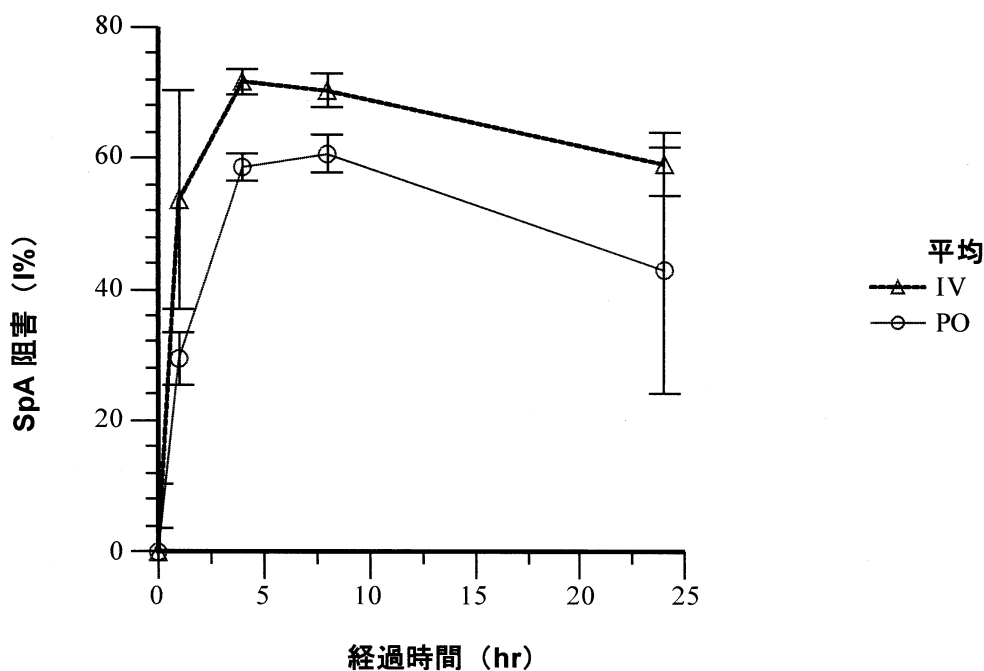


図 2.6.2.2-13 MM.1S 移植腫瘍組織における 20S プロテアソーム $\beta 5$ サブユニット平均阻害率-時間曲線

出典：添付資料番号 4.2.1.1-9

I% = プロテアソーム阻害率；IV = 静脈内；PO = 経口；SpA = 特異的活性

縦棒は SD；n = 3。

さらに、プロテアソーム阻害後に発現する UPR マーカー (ATF-3 及び GADD34、それぞれ IHC 及びウェスタンブロット法で検出) は、投与後 4 時間までに上昇し、24 時間にわたり継続してベースラインを上回った (図 2.6.2.2-14 及び図 2.6.2.2-15)。投与後 8 時間まで、静脈内投与及び経口投与の両方で、アポトーシスのマーカーである活性化カスパーゼ-3 (ウェス

タンブロット法で検出) のレベルが上昇し、24 時間にわたりそのレベルが維持された (図 2.6.2.2-15)。

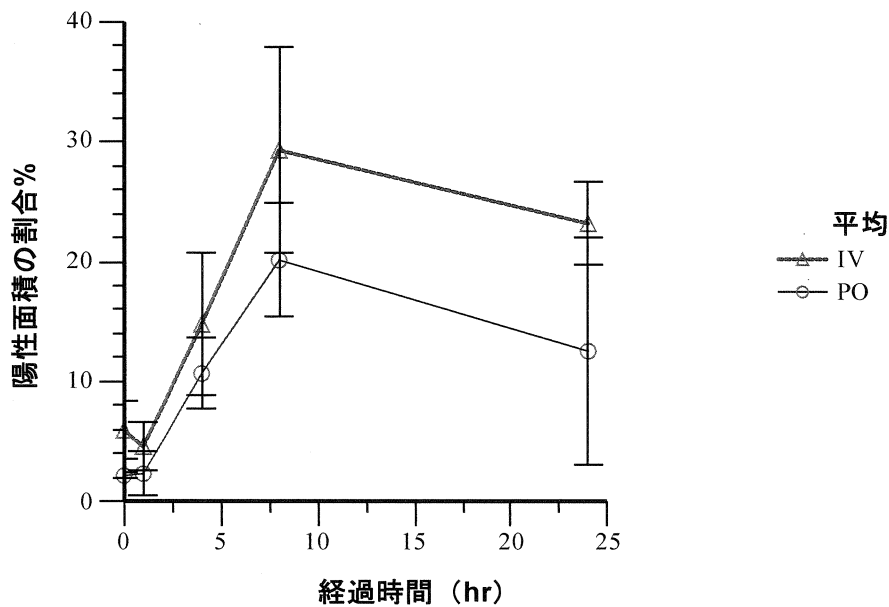


図 2.6.2.2-14 腫瘍組織における平均 ATF-3 発現量-時間曲線

出典：添付資料番号 4.2.1.1-9

IV = 静脈内；PO = 経口

縦棒は SD；n = 3。

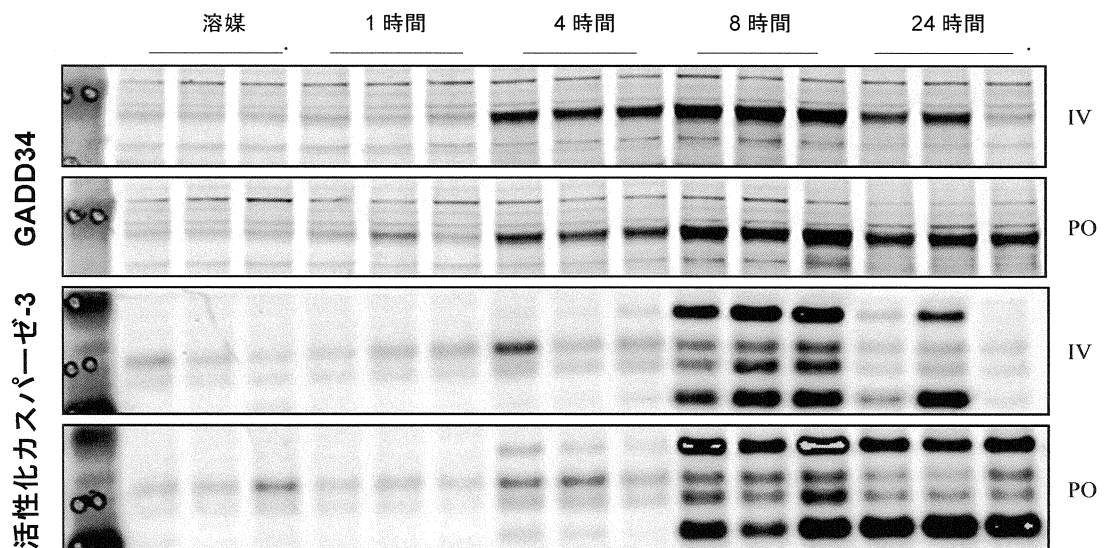


図 2.6.2.2-15 GADD34 及び活性化カスパーゼ-3 のウェスタンブロット法での解析結果

出典：添付資料番号 4.2.1.1-9

IV = 静脈内；PO = 経口。

(2) 経口投与後の多発性骨髄腫マウスモデルにおける抗腫瘍活性

MM.1S 腫瘍移植雌 CB-17 SCID マウスモデルに、溶媒 (HP-β-CD 5%)、又はイキサゾミブ 1、2、4、6、8 若しくは 10 mg/kg を週 2 回 18 日間、合計 5 回経口投与した (イキサゾミブ投与群 n = 5 及び溶媒投与群 n = 8) (概要表 2.6.3.2 ; 添付資料番号 4.2.1.1-10)。試験開始 1 日目に投与を開始し、その時の平均腫瘍体積 (MTV) は約 100~350 mm³ に達していた。19 日目に、腫瘍増殖阻害率 [TGI、(対照群 MTV - 投与群 MTV) *100/ (対照群の MTV)] を算出した。

イキサゾミブ 6、8 及び 10 mg/kg を週 2 回経口投与すると、溶媒投与に比べて、統計的に有意な抗腫瘍活性をもたらした (それぞれの TGI = 99.3%、99.7%及び 100% ; 腫瘍体積-時間曲線下面積の変化 (ΔAUC)、すべての投与量に対して p 値は <0.001) (図 2.6.2.2-16)。6 mg/kg 投与群及び 8 mg/kg 投与群では、19 日目の腫瘍体積は 0 日目の腫瘍体積よりも小さく、10 mg/kg 投与群では、19 日目に測定可能な腫瘍は存在しなかった。1 mg/kg 投与群及び 4 mg/kg 投与群では、他の投与群と比べて低い (とはいえ統計的に有意な) 腫瘍増殖阻害率が観察された (それぞれの TGI = 26.3%及び 30.8% ; ΔAUC、両投与量に対して p 値は <0.005)。しかし、イキサゾミブ 2 mg/kg 投与群では統計的に有意な抗腫瘍活性を示さなかった

(TGI = 9.1% ; ΔAUC、p > 0.05)。8 mg/kg 投与群のマウスは、11 日目に平均 11.2%の最大体重減少を示し、10 mg/kg 投与群のマウス 1 匹は、15%を超える体重減少により 7 日目に試験から脱落した。

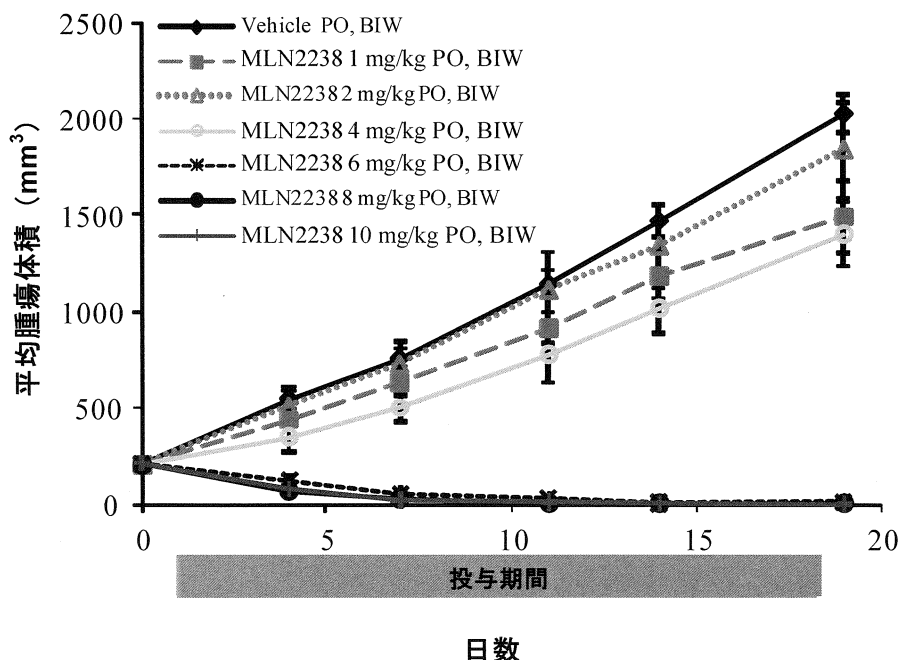


図 2.6.2.2-16 MM.1S ヒト多発性骨髄腫細胞株を移植した雌 CB-17 SCID マウスにおけるイキサゾミブ経口投与後の経時的な平均腫瘍体積変化

出典：添付資料番号 4.2.1.1-10

BIW = 週 2 回 ; MLN2238 = イキサゾミブ ; PO = 経口 ; SCID = 重症複合免疫不全

試験開始 1 日目に投与を開始した。縦棒は SEM を示す ; 溶媒投与群は n = 8 及び各投与群は n = 5。

(3) 静脈内投与後の多発性骨髄腫マウスモデルにおける抗腫瘍活性

MM.1S 腫瘍移植雌 CB-17 SCID マウスに、18 日間にわたって、溶媒 (HP- β -CD 5%) を週 1 回静脈内投与 (合計 3 回)、イキサゾミブ 0.5、1.0、2.5 若しくは 7.0 mg/kg を週 2 回静脈内投与 (合計 6 回)、又はイキサゾミブ 0.82、1.64、4.1 若しくは 11.47 mg/kg を週 1 回静脈内投与 (合計 3 回) した (概要表 2.6.3.2; 添付資料番号 4.2.1.1-11)。試験開始 0 日目に投与を開始したが、その時の MTV は約 100~350 mm³ に達していた。19 日目に、TGI を算出した。

イキサゾミブ 0.5、1.0、2.5 及び 7.0 mg/kg を週 2 回静脈内投与した各群は、溶媒投与群に比べて、統計的に有意な抗腫瘍活性をもたらした [それぞれの TGI = 34.2%、46.8%、94.2% 及び 99.3%; Δ AUC、0.5 mg/kg ($p < 0.05$) を除くすべての投与群に対して p 値は < 0.001]

(図 2.6.2.2-17)。2.5 mg/kg 投与群と 7.0 mg/kg 投与群では、強力な抗腫瘍活性が認められ、試験終了時の腫瘍体積は投与開始時に比べて小さく、7.0 mg/kg 投与群の一部の腫瘍は、もはや目視で確認できないか、測定不能であった。

イキサゾミブ 0.82、1.64、4.1 及び 11.47 mg/kg を週 1 回静脈内投与した群も、溶媒投与群に比べて、統計的に有意な抗腫瘍活性をもたらした (TGI はそれぞれ 24.7%、93.2%、97.1% 及び 99.5%; Δ AUC、 $p < 0.001$) (図 2.6.2.2-17)。1.64、4.1 及び 11.47 mg/kg を投与した各群では強力な抗腫瘍活性が認められ、試験終了時の腫瘍体積は投与開始時に比べて小さく、4.1 mg/kg 投与群及び 11.47 mg/kg 投与群の一部の腫瘍は、もはや目視で確認できないか、又は測定不能であった。

イキサゾミブ 11.47 mg/kg 週 1 回静脈内投与群では、16 日目に、平均 11.3% の最大体重減少が認められたが、体重減少により、試験から脱落したマウスはいなかった。

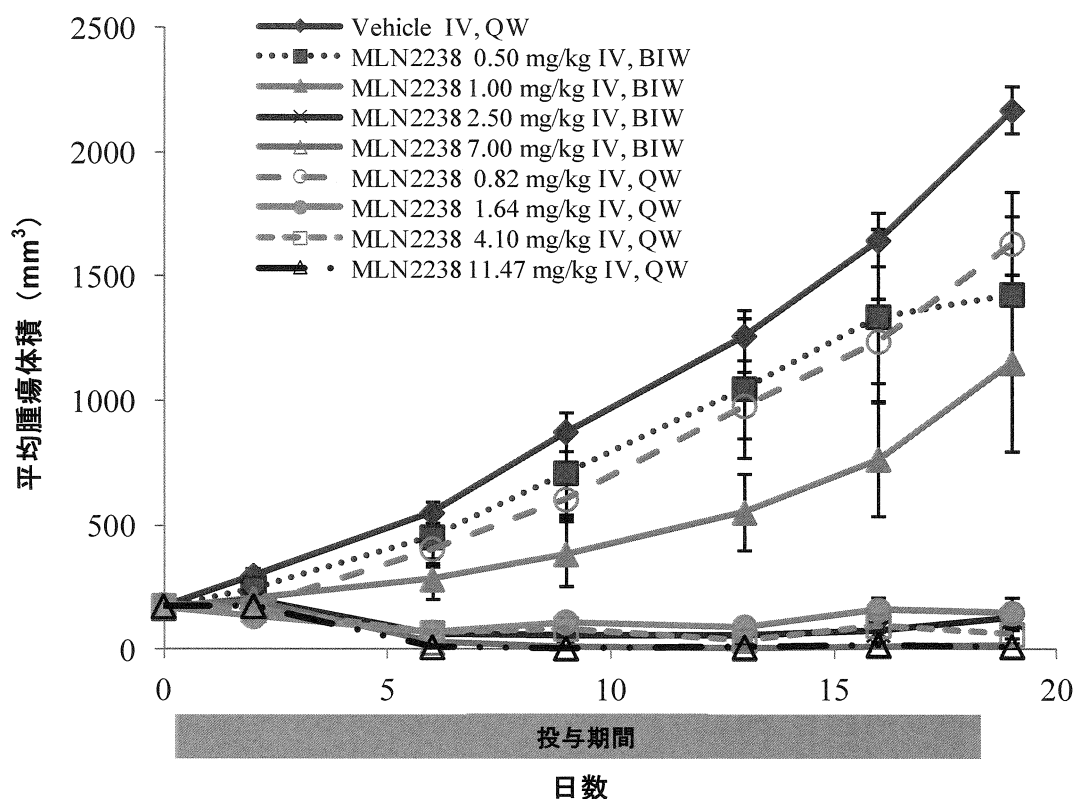


図 2.6.2.2-17 MM.1S ヒト多発性骨髄腫細胞株を移植した雌 CB-17 SCID マウスにおけるイキサゾミブ静脈内投与後の経時的な平均腫瘍体積変化

出典：添付資料番号 4.2.1.1-11

BIW = 週 2 回；IV = 静脈内；MLN2238 = イキサゾミブ；QW = 週 1 回；SCID = 重症複合免疫不全
試験開始 0 日目に投与を開始した。縦棒は SEM；溶媒投与群 n = 8 及び各投与群 n = 5。

2.6.2.2.2.2 形質細胞腫瘍の遺伝子改変マウスモデルを用いた in vivo での抗腫瘍活性

：添付資料番号 4.2.1.1-12（参考）、-13（参考）、-14（参考）

一代雑種 (B6 × FVB/N) の $iMyc^{C\alpha}/Bcl-XL$ ダブルトランスジェニックマウス ($iMyc^{C\alpha}$ に対してホモ接合性の C57BL/6J [B6] マウスを Bcl-XL に対してヘテロ接合性の FVB/N マウスと交雑させて作製) では、骨髄等を含む複数の組織において、デノボ形質細胞腫瘍 (PCM) が遺伝的に発現しやすい。先行する試験において、当該マウスは 6~8 週齢までに、脾腫、高 γ -グロブリン血症及び組織形質細胞増多症等の前癌状態になり、28 週齢に達する以前に PCM を急激に発症し死亡した[3]。これらのマウスは、血清パラプロテインの上昇、PCM の骨髄浸潤、溶骨性病変の発現、及び全般的な MM 様の遺伝子発現プロファイル等、ヒト MM の重要な特徴を示した ([3][4])。本モデルを用いて、全生存期間、並びに投与後の脾重量及び血清 Ig レベル等の疾患マーカーを評価することにより、イキサゾミブの in vivo 活性について評価した。イキサゾミブの抗腫瘍活性については、免疫不全マウスを用いた PCM 播種マウスモデル及び脛骨内接種 PCM マウスモデルでも評価した。PCM 播種マウスモデル及び脛骨内接種 PCM マウスモデルで用いた、ルシフェラーゼ標識細胞株である DP54-Luc 細胞株は $iMyc^{C\alpha}/Bcl-XL$ トランスジェニックマウスの腫瘍由来である。

(1) デノボ形質細胞腫瘍の iMyc^{Cα}/Bcl-XL 遺伝子改変マウスモデルにおける生存期間、脾腫及び IgG2a レベルに及ぼす影響

雌雄 iMyc^{Cα}/Bcl-XL マウスに薬剤を投与しないか、又は連続6週間（投与期間）にわたりイキサゾミブ 18 mg/kg 週2回静脈内投与若しくはボルテゾミブ 1.2 mg/kg 週2回静脈内投与した（n=30）（概要表 2.6.3.2；添付資料番号 4.2.1.1-12）。これらの投与量は、非トランスジェニック（B6×FVB/N）一代雑種マウスにおける各薬剤の最大耐量（MTD）である。投与期間終了後もさらに25週間、マウスを継続して観察した。全生存曲線は、カプラン・マイヤー法を用いて作成した。ハザード比、95% CI、及び p 値は、治療及び性別を共変量としてコックス比例ハザードモデルに基づいて算出した。ハザード比は1を下回り、薬剤未投与の対照群に対する投与群の優位性が示された。

薬剤未投与群の iMyc^{Cα}/Bcl-XL マウスはすべて、脾腫（脾重量平均値 = 0.87 g）を伴うデノボ PCM を短期間で発症した（全生存期間の中央値 = 112 日）。イキサゾミブ 18 mg/kg の週2回静脈内投与群は、未投与対照群に比べて、生存期間が延長し（全生存期間 = 148 日；ハザード比 = 0.116；95% CI = 0.057~0.236；p < 0.0001）、脾腫が有意に縮小した（脾重量平均値 = 0.63 g；p < 0.05）（それぞれ図 2.6.2.2-18 及び図 2.6.2.2-19）。同様に、ボルテゾミブの 1.2 mg/kg 週2回静脈内投与群も全生存期間の中央値が延長し（139 日；ハザード比 = 0.163；95% CI = 0.085~0.312；p < 0.0001）、脾腫が縮小した（脾重量平均値 = 0.59；p < 0.05）。

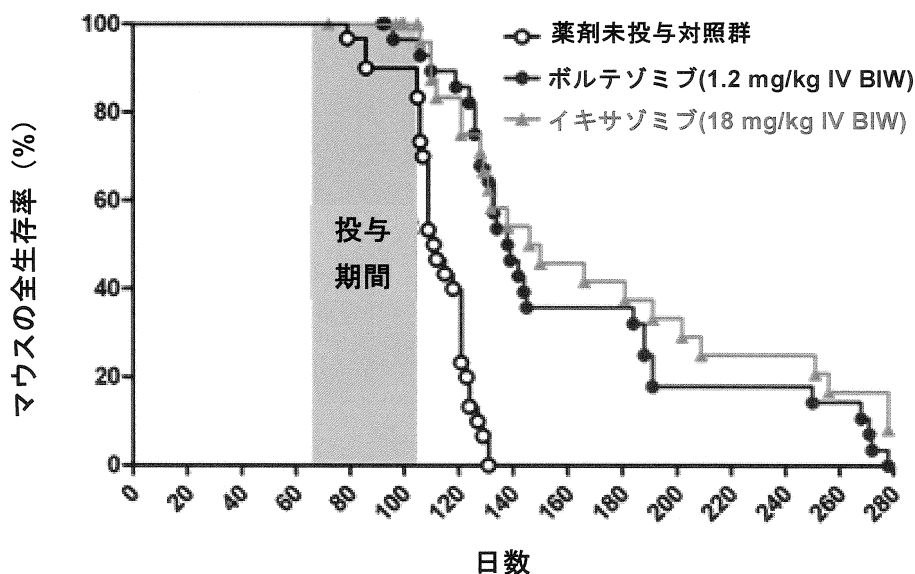


図 2.6.2.2-18 デノボ形質細胞腫瘍のモデルである iMyc^{Cα}/Bcl-XL 遺伝子改変マウスモデルにおけるイキサゾミブ投与後の全生存期間

出典：添付資料番号 4.2.1.1-12

BIW = 週2回；IV = 静脈内；MLN2238 = イキサゾミブ

iMyc^{Cα}/Bcl-XL マウスは、薬剤を投与しない（○）か、ボルテゾミブ（1.2 mg/kg, IV, BIW）（●）又はイキサゾミブ（18 mg/kg, IV, BIW）（▲）を12回（6週連続）投与した。各投与群は、マウス30匹（合計90匹）で構成した。投与期間後、さらに25週間、マウスを経過観察した。全生存期間データはカプラン・マイヤー法を用いて作成した。

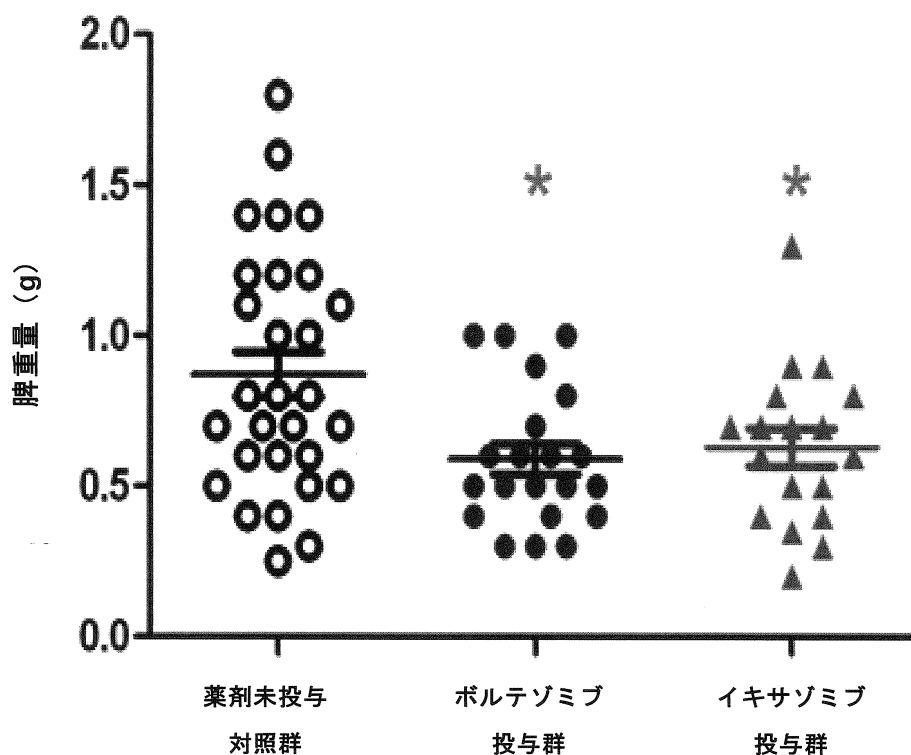


図 2.6.2.2-19 イキサゾミブを投与した $iMyc^{Ca}/Bcl-XL$ マウスの脾重量

出典：添付資料番号 4.2.1.1-12

ボルテゾミブ ($n=21$) 又はイキサゾミブ ($n=18$) を投与し、人道的エンドポイントに達した時点の $iMyc^{Ca}/Bcl-XL$ マウスの脾臓の湿重量を、未投与群の $iMyc^{Ca}/Bcl-XL$ マウス ($n=29$) のそれと比較した。* = $p < 0.05$; 未投与の $iMyc^{Ca}/Bcl-XL$ 群 (○) と比較したボルテゾミブ投与群 (●) 又はイキサゾミブ投与群 (▲)。

対照群である $iMyc^{Ca}/Bcl-XL$ マウスの PCM では、薬剤をしないでおくと週齢が一致する一代雑種 (B6 × FVB/N) の非トランスジェニックマウス ($n=10$) に比べて、血漿 IgG2a 濃度平均値の上昇をもたらした ($iMyc^{Ca}/Bcl-XL$ マウスにおいて $IgG2a = 3.79 \times 10^6$ ng/mL、非トランスジェニックマウスにおいて $IgG2a = 1.19 \times 10^5$ ng/mL ; $p < 0.05$)。イキサゾミブ又はボルテゾミブを投与すると、この上昇は減弱した (イキサゾミブでは $IgG2a = 6.80 \times 10^5$ ng/mL、ボルテゾミブでは $IgG2a = 3.52 \times 10^5$ ng/mL ; $p < 0.05$) (図 2.6.2.2-20)。

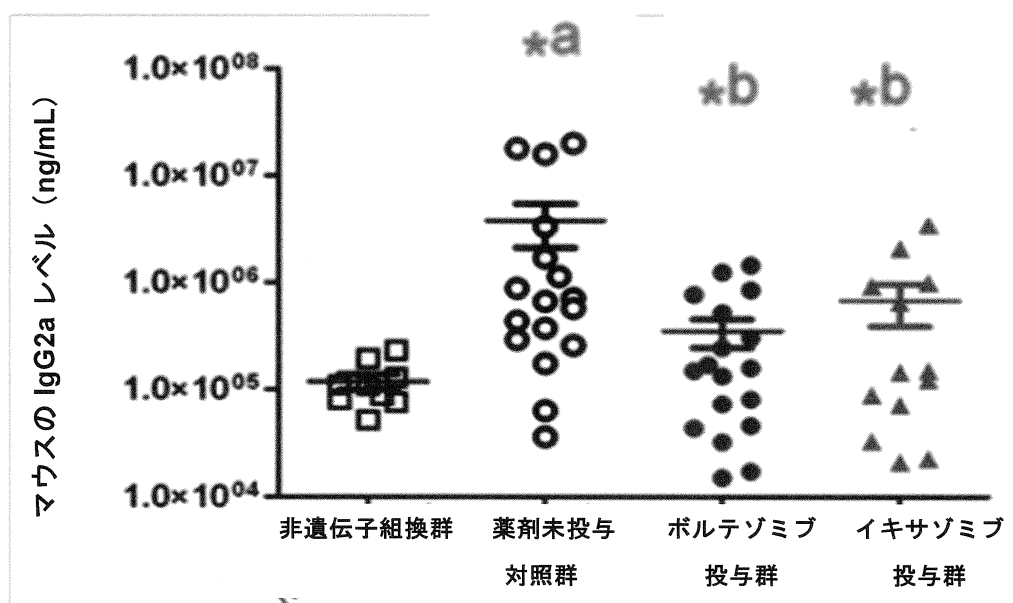


図 2.6.2.2-20 イキサゾミブ投与あるいは未治療 iMyc^{Ca}/Bcl-XL マウス及び非遺伝子組換マウスにおける免疫グロブリン IgG2a レベルの比較

出典：添付資料番号 4.2.1.1-12

Ig = 免疫グロブリン

ボルテゾミブ (n = 18) 又はイクサゾミブ (n = 13) を投与した iMyc^{Ca}/Bcl-XL マウスの血漿中 IgG2a 濃度を分析し、薬剤未投与の iMyc^{Ca}/Bcl-XL マウス (n = 17) 及び 126 日齢の一代雑種 (BL6 × FVB/N) の非トランスジェニックマウス (n = 9) の血漿中 IgG2a 濃度と比較した。* a = p < 0.05; 126 日齢の一代雑種 (BL6 × FVB/N) の非トランスジェニックマウス (□) と比較した薬剤未投与群の iMyc^{Ca}/Bcl-XL (○) マウス。*b = p < 0.05; 薬剤未投与群の iMyc^{Ca}/Bcl-XL マウス (○) と比較したボルテゾミブ投与群のマウス (●) 又はイクサゾミブ投与群のマウス (▲)。

iMyc^{Ca}/Bcl-XL マウスでは、週齢が一致する一代雑種 (B6 × FVB/N) の非トランスジェニックマウスに比べて、血漿中 IgM 濃度平均値も上昇した (iMyc^{Ca}/Bcl-XL マウスにおいて IgM = 1.59×10^6 ng/mL、非トランスジェニックマウスにおいて IgM = 3.8×10^4 ng/mL; p < 0.05)。しかし、本 PCM モデルにおいて、イクサゾミブ又はボルテゾミブを投与しても、IgM 濃度は有意に低下しなかった (イクサゾミブでは IgM = 3.97×10^5 ng/mL、ボルテゾミブでは IgM = 3.03×10^5 ng/mL; p > 0.05)。本遺伝子導入モデルにおいて、IgA、IgG 1 及び IgG2b レベルは有意に上昇せず、イクサゾミブ又はボルテゾミブ投与による影響を受けなかった (p > 0.05)。

すべての試験群における最大体重減少は、平均 10%未満であった。

(2) iMyc^{Ca}/Bcl-XL 形質細胞腫瘍細胞株 DP54- Luc を用いた播種マウスモデルにおける腫瘍量及び溶骨性病変に及ぼす影響

DP54 は、iMyc^{Ca}/Bcl-XL 腫瘍を以前接種された同系の一代雑種 (B6 × FVB/N) マウスの骨髓由来の形質細胞腫瘍細胞株である[4]。in vivo では、DP54 細胞は iMyc^{Ca} 及び Bcl-XL 導入遺伝子、並びに様々な後期 B 細胞及び早期形質細胞マーカー (CD38、CD138、B220 等) を発現し、ヒト MM 細胞に極めて類似した遺伝子発現プロファイルを有する[4]。生体で生物発

光イメージングによって可視化できるように、DP54 細胞にホタルルシフェラーゼを安定的に遺伝子導入した[12]。

結果として得られた DP54-Luc iMyc^{Ca}/Bcl-XL PCM 細胞を、雌の非肥満糖尿病 (NOD) -SCID マウスの尾静脈に静脈内接種し、PCM 播種マウスモデルを作製した。腫瘍量は、XXXXXXXXXX 定量解析が可能な生物発光イメージングで、週 1 回、全光量子束密度を測定してモニタリングした。6 日目に全光量子束密度がベースライン値に達した時点で、マウスを各投与群にランダムに割り付けた。マウスには、溶媒 (HP-β-CD 5%) を週 2 回静脈内投与、イキサゾミブ 11 mg/kg を週 2 回静脈内投与、イキサゾミブ 3 mg/kg を 1 日 1 回皮下投与、又はボルテゾミブ 0.7 mg/kg を週 2 回静脈内投与のいずれかを行った [各群 n=10 (20 日目にイキサゾミブ皮下投与群では n=9 となり、23 日目に溶媒投与群、ボルテゾミブ静脈内投与群及びイキサゾミブ皮下投与群では n=9、イキサゾミブ静脈内投与群では n=5 となった)] (概要表 2.6.3.2 ; 添付資料番号 4.2.1.1-13)。静脈内投与群には合計 5 回、皮下投与群には合計 15 回、投与を行った。各群に対する投与は試験開始 6 日目に開始した。腫瘍量は 6、13、20 及び 23 日目に測定した。抗腫瘍活性は 20 日目に測定した平均光量子束密度値 (腫瘍量) の投与群/対照群比 (T/C 値) を算出して判定した。さらに、23 日目にマウスを安楽死処置した後、コンピュータ断層撮影 (CT) 画像を用いて矢状縫合離開面積 (SSSA) を測定し、溶骨性病変の徴候の一つである頭蓋縫合の離開を評価した。

上記の薬剤を投与した 3 群すべてにおいて、溶媒投与群に比べて、統計的に有意な抗腫瘍活性が示された (イキサゾミブ 11 mg/kg 週 2 回静脈内投与群 : T/C = 0.36、 $p < 0.05$ 、イキサゾミブ 3 mg/kg 1 日 1 回皮下投与群 : T/C = 0.24、 $p < 0.05$ 、及びボルテゾミブ 0.7 mg/kg 週 2 回静脈内投与群 : T/C = 0.52、 $p < 0.05$) (図 2.6.2.2-21)。