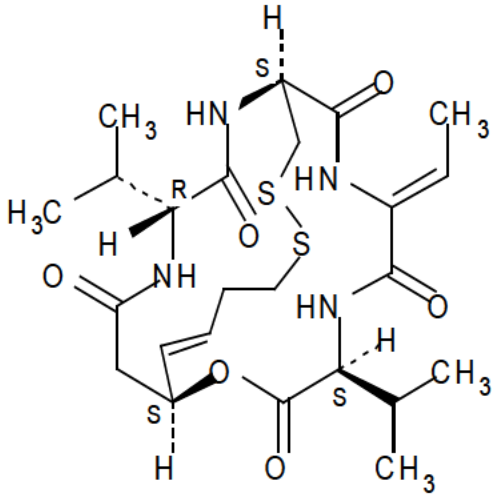
1. 緒言

ロミデプシンは、再発又は難治性の末梢性 T 細胞リンパ腫（PTCL）に対する治療薬として開発された抗悪性腫瘍剤である。通常、成人にはロミデプシンとして 14 mg/m^2（体表面積）を 1、8、15 日目に 4 時間かけて点滴静注した後、休薬（16～28 日目）する。この 28 日間を 1 サイクルとして投与を繰り返す。なお、患者の状態により適宜減量する。

ロミデプシン（Table 1 ）は、*Chromobacterium violaceum* から単離された分子量 540.71 の新規二環式ペプチドである。ロミデプシン原薬は、従来の発酵法により産生し、標準的クロマトグラフィー及び結晶化工程のプロセスにより精製する。本製剤は、1 バイアル中にロミデプシン 11 mg 及びポビドン 22 mg（米国薬局方、日本薬局方、欧州薬局方）を含有する無菌凍結乾燥注射剤である。本製剤は、専用添付溶解液［80%プロピレングリコール（米国薬局方、日本薬局方、欧州薬局方）及び 20%無水アルコール（米国薬局方、日本薬局方、欧州薬局方）；無菌］の構成となっている。

Table 1:　ロミデプシンの構造



原薬の一般的名称（JAN）は Romidepsin（英名）である。ロミデプシンの別称はデプシペプチド、FK228、FR901228 及び NSC 630176 である。

ロミデプシンは，新規ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤に分類される抗悪性腫瘍剤である。ロミデプシンは他の HDAC 阻害剤と同様に、*in vitro* 及び *in vivo* において、HDAC の阻害、遺伝子発現の誘導又は抑制、細胞周期の停止、細胞分化、細胞増殖の阻害、アポトーシスの誘導、形質転換細胞の形態復帰及び血管新生の抑制といった多様な活性が認められた。また、ロミデプシンにより HDAC 酵素クラス I 及びクラス II の複数の HDAC 酵素アイソフォームが阻害されることで、血液腫瘍から固形腫瘍に至る広範にわたり強力な抗腫瘍活性を示すことが確認された。さらに従来の抗がん剤治療で耐性となった腫瘍に対しても有効である可能性が示唆されており、新規抗がん剤として有用であることが期待される。

TABLE OF CONTENTS

略語一覧 5
1. まとめ 7
1.1. 効力を裏付ける試験 8
1.2. 安全性薬理試験 9
1.3. 薬力学的薬物相互作用試験 10
2. 効力を裏付ける試験 11
2.1. *In vitro* 試験 11
2.1.1. 遺伝子発現プロファイルを指標とした HDAC 阻害剤の抗腫瘍作用の予測 13
2.1.2. ヒトリンパ腫由来細胞及びヒト白血病由来細胞に対するロミデプシンの *in vitro* での作用の検討 13
2.1.2.1. U-937、K562 及び CCRF-CEM 細胞のロミデプシンに対する感受性 13
2.1.2.2. U-937 細胞のアポトーシスに対するロミデプシンの作用 13
2.1.2.3. U-937 細胞の細胞周期に対するロミデプシンの作用 14
2.1.2.4. U-937 細胞の分化に対するロミデプシンの作用 14
2.1.2.5. $p21^{WAF1/Cip1}$ 及びゲルゾリン mRNA 発現に対するロミデプシンの作用 15
2.1.2.6. U-937 細胞のヒストンアセチル化に対するロミデプシンの作用 15
2.1.3. ヒト培養細胞株に対するロミデプシンの細胞傷害活性 16
2.1.4. ロミデプシンの抗腫瘍作用及び作用機序 17
2.1.4.1. 培養細胞に対する細胞傷害活性 17
2.1.4.2. 細胞の高分子合成に対する作用 17
2.1.4.3. DNA 鎖間の架橋形成及び単鎖 DNA の切断 18
2.1.4.4. 単離核の DNA 合成に対する作用 18
2.1.4.5. 細胞周期に対する作用 18
2.1.4.6. c-myc 及び Ha-ras mRNA 発現量に対する作用 18
2.1.5. 遺伝子発現を指標としたロミデプシンの抗腫瘍作用の予測 18
2.1.5.1. PC-3 細胞の細胞周期及びアポトーシスに対するロミデプシンの作用 18
2.1.5.2. *In vitro* におけるロミデプシンによる $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA 発現量の変化 19
2.1.6. ヒト前立腺がん LNCaP 細胞における前立腺特異抗原の mRNA 発現量及び分泌量に対するロミデプシンの作用 19
2.1.7. 血管形成因子の発現に対する *in vitro* 作用 20
2.1.7.1. PC-3 細胞及び ACHN 細胞における VEGF 及び bFGF mRNA に対するロミデプシンの作用 20
2.1.7.2. 低酸素状態下 PC-3 細胞の VEGF mRNA 発現量に対するロミデプシンの作用 21

2.1.7.3. 低酸素状態下 PC-3 細胞の VEGF プロモーターに関連するヒストンアセチル化に対するロミデプシンの作用 21
2.2. *In vivo* 試験 22
2.2.1. 遺伝子発現プロファイルを指標としたロミデプシンの抗腫瘍作用の予測 22
2.2.2. ヒトリンパ腫由来 U-937 細胞移植モデルにおけるロミデプシンの効果 26
2.2.3. ロミデプシンの抗腫瘍作用及び作用機序 26
2.2.3.1. マウス腹水腫瘍に対するロミデプシンの効果 26
2.2.3.2. マウス固形がんに対するロミデプシンの効果 26
2.2.3.3. ヒト腫瘍細胞異種移植モデルにおけるロミデプシンの効果 27
2.2.3.4. 薬剤耐性 P388 白血病細胞移植モデルにおけるロミデプシンの効果 27
2.2.4. ヒト腫瘍細胞異種移植モデルでのロミデプシンの抗腫瘍活性 27
2.2.4.1. ヒトメラノーマ LOX（IMVI）細胞異種移植モデルにおけるロミデプシンの効果 28
2.2.4.2. ロミデプシンの静脈内投与と腹腔内投与との比較 29
2.2.4.3. 静脈内投与 31
2.2.4.4. 腹腔内投与 31
2.2.4.5. ヒト非小細胞肺がん NCI-H522 細胞異種移植モデルにおけるロミデプシンの効果 31
2.2.4.6. ヒト進行メラノーマ UACC-62 細胞異種移植モデルにおけるロミデプシンの効果 32
2.2.4.7. ヒト進行乳がん MX-1 細胞異種移植モデルにおけるロミデプシンの効果 33
2.2.5. 遺伝子発現を指標としたロミデプシンの抗腫瘍作用の予測 36
2.2.6. ロミデプシンの抗腫瘍作用と血管形成因子の発現との相関性 36
2.2.7. ヒト腫瘍細胞のヌードマウスへの異種移植モデルでのロミデプシンの抗腫瘍活性 37
3. 副次的薬理試験 38
4. 安全性薬理試験 39
4.1. 中枢神経系に対する作用 39
4.1.1. ラットを用いた試験 39
4.1.2. イヌを用いた試験 40
4.2. 心血管系に対する作用 41
4.2.1. *In vitro* 試験 41
4.2.1.1. hERG チャネルへの作用 41
4.2.1.2. モルモット摘出乳頭筋の活動電位に対する作用 41
4.2.2. *In vivo* 試験 42
4.3. 呼吸器系に対する作用 43
5. 造血系に対する作用 44

6. 受容体及びイオンチャネルに対する作用 45
6.1. 還元型ロミデプシンの各種カリウムチャネルに対する *in vitro* 結合試験 45
6.2. 各種受容体に対するロミデプシンの結合実験 45
7. 薬力学的薬物相互作用試験 47
7.1. 各種化学療法剤との併用下でのロミデプシンの細胞傷害活性 47
7.2. マウス白血病由来 L-1210 細胞移植モデルにおける各種化学療法剤とのロミデプシンの併用効果 48
7.3. ヒト腫瘍異種移植モデルにおけるロミデプシンとゲムシタビン塩酸塩との併用効果 49
8. 考察及び結論 51
8.1. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 51
8.2. ロミデプシンの作用機序 51
8.2.1. HDAC 阻害及びヒストンアセチル化 51
8.2.2. 遺伝子発現 52
8.2.3. ロミデプシンとアポトーシス 52
8.2.4. 細胞周期制御 53
8.2.5. 血管新生 53
8.2.6. 細胞分化 53
8.2.7. 非ヒストンタンパク質のアセチル化 54
8.2.8. 腫瘍細胞増殖抑制 54
8.2.9. 安全性薬理試験 55
8.2.10. 薬力学的薬物相互作用試験 55
9. 参考文献 56

LIST OF TABLES

Table 1:　ロミデプシンの薬理試験一覧 7
Table 2:　ロミデプシンの HDAC 阻害プロファイル 8
Table 3:　ロミデプシンで実施した *in vitro* における効力を裏付ける試験 12
Table 4:　ヒト細胞株におけるロミデプシンの細胞傷害活性 17
Table 5:　ロミデプシンで実施した *in vivo* における効力を裏付ける試験 22
Table 6:　ロミデプシン感受性腫瘍において発現量が高く、ロミデプシン非感受性腫瘍において発現量が低い遺伝子の一覧 24
Table 7:　ロミデプシン感受性腫瘍において発現量が低く、ロミデプシン耐性腫瘍において発現量が高い遺伝子の一覧 25
Table 8:　ヒトメラノーマ LOX（IMVI）細胞異種移植モデルにおけるロミデプシンの効果（静脈内投与、4 日ごとに 3 回） 29
Table 9:　進行メラノーマ LOX（IVMI）のロミデプシンに対する反応 30
Table 10:　ヒト非小細胞肺がん NCI-H522 異種移植モデルにおけるロミデプシンの効果 32
Table 11:　ヒト進行メラノーマ UACC-62 細胞異種移植モデルにおけるロミデプシンの効果 33
Table 12:　異種移植進行乳がん MX-1 のロミデプシンに対する反応 35
Table 13:　ロミデプシンで実施した安全性薬理試験 39
Table 14:　還元型ロミデプシンのカリウムチャネルとの相互作用を評価した試験の結果 45
Table 15:　ロミデプシンで検討した受容体及びイオンチャネルの一覧 46
Table 16:　ロミデプシンを他剤と併用して実施した試験 47
Table 17:　ロミデプシンと他の化学療法剤との併用効果 48
Table 18:　L-1210 細胞移植モデルでのロミデプシンと化学療法剤併用投与での抗腫瘍作用 49
Table 19:　PANC-1 細胞異種移植モデルでのロミデプシン及びゲムシタビン塩酸塩単独投与又は併用投与での抗腫瘍効果 50

略語一覧

略　語	定　義
5FU	5-fluorouracil　5-フルオロウラシル
ACHN	Romidepsin-insensitive renal cancer　ロミデプシン非感受性腎がん
ADR	Doxorubicin (Adriamycin)　ドキソルビシン（アドリアマイシン）
APA	Action potential amplitude　活動電位振幅
APD	Action potencial duration　活動電位持続時間
ATRA	All-trans retinoic acid　オールトランスレチノイン酸
bFGF	Basic fibroblast growth factor　塩基性線維芽細胞増殖因子
BSA	Bovine serum albumin　ウシ血清アルブミン
CBDCA	Carboplatin　カルボプラチン
CDDP	Cisplatin　シスプラチン
ChIP	Chromatin immunoprecipitation　クロマチン免疫沈降
CI	Combination index　併用療法インデックス
C_{max}	Maximum plasma concentration　最高血漿中濃度
CPM	Cyclophosphamide　シクロフホスファミド
CPT-11	Irinotecan hydrochloride　イリノテカン塩酸塩
DNA	Deoxyribonucleic acid　デオキシリボ核酸
eNOS	Endotherial nitoric oxide synthase　血管内皮型 NO 合成酵素
ELISA	Enzyme linkedimmunosorbent assay　酵素免疫測定法
FACS	Fluorescence-activated cell sorting　蛍光活性化セルソーター
FCS	Fetal calf serum　ウシ胎児血清
HDAC	Histone deacetylase　ヒストン脱アセチル化酵素
hERG	Human ether-a-go-go-related gene　ヒト ether-a -go-go 関連遺伝子
HIF-1α	Hypoxia Inducible Factor-1　低酸素誘導因子-1α
Hsp90	Heat shock protein 90　熱ショックタンパク質 90
IC_{50}	50% reduction in cell survival　50%阻害濃度
K_{ATP} (or KATP)	ATP-Sensitive Potassium （Channel）　ATP 感受性カリウム（チャンネル）
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration　平均赤血球ヘモグロビン濃度
MCV	Mean corpuscular volume　平均赤血球容積
MKP-1	Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1　マイトジェン活性化プロテインキナーゼホスファターゼ-1
MMC	Mitomycin C　マイトマイシン C
MST	Median survival time　生存期間中央値
MTD	Maximum tolerated dose　最大耐量
MTT	Methyl thiazolyl tetrazolium　メチルチアゾリルテトラゾリウム
NSCLC	Nonsmall cell lung cancer　非小細胞肺がん
PBS	Phosphate-buffered saline　リン酸緩衝生理食塩液
PCR	Polymerase chain reaction　ポリメラーゼ連鎖反応
PSA	Prostate-specific antigen　前立腺特異抗原
PTCL	Peripheral T-cell lymphoma　末梢 T 細胞リンパ腫
PTX	Pacritaxel　パクリタキセル
q-PCR	Quantitative polymerase chain reaction　定量的ポリメラーゼ連鎖反応
RBC	Red blood cell　赤血球
RMP	Resting membrane potential　静止膜電位
RNA	Ribonucleic acid　リボ核酸
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction　逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
SDS	Sodium dodecyl sulphate　ドデシル硫酸ナトリウム
SK_{CA} (or SKCa)	Small conductance calcium-activated potassium （channels）　小コンダクタンスカルシウム活性化カリウム（チャネル）
VCR	Vincristine　ビンクリスチン
VEGF	Vascularendothelial growth factor　血管内皮増殖因子

略　語	定　義
VP-16	Etoposide　　エトポシド

1. まとめ

実施したロミデプシンのすべての薬理試験を Table 1 に示した。

ロミデプシンは、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤として知られている抗悪性腫瘍剤に属する新規薬剤である。in vitro 及び in vivo での生物学的作用を検討した。薬効薬理試験に関する各種薬理試験の結果については 2 効力を裏付ける試験 の結果から、ロミデプシンは HDAC の阻害、遺伝子発現の誘導又は抑制、細胞周期の停止、細胞分化、細胞増殖の阻害、アポトーシスの誘導、形質転換細胞の形態復帰及び血管新生の抑制といった多様な活性を示すことが明らかとなった。

ロミデプシンが HDAC 以外の標的に対する作用を示すかについては解明されていない。したがって、副次的薬理試験は実施しなかった。

安全性薬理試験は、「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）」適用試験として実施した。安全性薬理コアバッテリー試験として、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する作用を in vitro 及び in vivo で検討した。これらの試験は、4 安全性薬理試験 の項に要約した。*In vitro* 試験では、ロミデプシンが心血管系に及ぼす影響について、生物学的に意義がある受容体及びイオンチャネルに対する結合試験で検討した。さらに、ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネル試験及びモルモット乳頭筋標本を含む電気生理学モデルを用いた試験で評価した。In vivo 試験では、心血管系への影響の他に、中枢神経系及び呼吸器系への影響を検討した。

ロミデプシンの一般的な薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。ロミデプシンは医療現場では他の抗悪性腫瘍剤と併用投与されることが考えられるため、ロミデプシンと他の抗悪性腫瘍剤との併用投与試験を in vitro 及び in vivo で検討した。

Table 1:　ロミデプシンの薬理試験一覧

試験番号	試験の表題	投与方法など	添付資料番号
効力を裏付ける試験			
CRE040010	遺伝子発現プロファイルを指標とした HDAC 阻害剤の抗腫瘍作用の予測	In vitro：細胞培養 In vivo：静脈内投与	4.2.1.1.1
CRE040013	ヒトリンパ腫由来 U-937 細胞に対する新規 HDAC 阻害剤 FK228 の *in vitro* 及び *in vivo* での作用	In vitro：細胞培養 In vivo：腹腔内投与	4.2.1.1.2
CRE010130	ヒト培養細胞株に対する FK228 の細胞傷害活性	In vitro：細胞培養	4.2.1.1.3
CRR910025	FR901228 の抗腫瘍作用及び各種動物における毒性：非臨床薬理試験	In vitro：細胞培養 In vivo：静脈内投与、腹腔内投与	4.2.1.1.4
CRE010158	遺伝子発現を指標とした FK228 の抗腫瘍作用の予測	In vitro：細胞培養 In vivo：静脈内投与	4.2.1.1.5
CRE020081	ヒト前立腺がん LNCaP 細胞における前立腺特異抗原の mRNA 発現量及び分泌量に対する FK228 の作用	In vitro：細胞培養	4.2.1.1.6
CRE040012	新規 HDAC 阻害剤 FK228 の血管形成因子の発現に依存する抗腫瘍作用	In vitro：細胞培養 In vivo：静脈内投与	4.2.1.1.7
CRE000198	ヒト腫瘍細胞異種移植モデルでの FK228 の抗腫瘍活性	In vivo：静脈内投与、腹腔内投与	4.2.1.1.8
CRE010131	ヒト腫瘍細胞異種移植ヌードマウスにおける FK228 の抗腫瘍活性	In vivo：静脈内投与	4.2.1.1.9

試験番号	試験の表題	投与方法など	添付資料番号
安全性薬理試験			
GLR030774	FR901228 の安全性薬理試験－ラットを用いた中枢神経系に対する作用	In vivo：静脈内持続投与	4.2.1.3.1
GLR030775	FR901228 の安全性薬理試験－イヌを用いた中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する作用	In vivo：静脈内持続投与	4.2.1.3.2
GLR030533	FR901228 の安全性薬理試験－hERG チャネル試験	In vitro：細胞培養	4.2.1.3.3
GLR030460	FR901228 の安全性薬理試験（2）：細胞内微小電極法を用いた活動電位測定	In vitro：オーガンバス灌流	4.2.1.3.4
DVRS-003	ジチオスレイトールにより還元されたロミデプシンの各種カリウムチャネルに対する *in vitro* 結合実験	In vitro：細胞培養	4.2.1.3.5
GLR030404	各種受容体に対する FR901228 の結合実験	In vitro：細胞培養	4.2.1.3.6
薬力学的薬物相互作用試験			
CRE040062	各種化学療法剤と併用した際の HDAC 活性阻害剤 FK228 の細胞傷害活性	In vitro：細胞培養	4.2.1.4.1
CRE040011	FK228 のマウス白血病 L-1210 細胞に対する各種抗悪性腫瘍剤との併用効果	In vivo：腹腔内投与	4.2.1.4.2
vvglou0501.v2	ヒト膵臓がん PANC-1 細胞又は BxPC-3 細胞異種移植 *nu/nu* マウスにおけるデプシペプチド（FK228）単独又はゲムシタビン塩酸塩との併用での *in vivo* 作用評価	In vivo：静脈内投与及び腹腔内投与	4.2.1.4.3

1.1. 効力を裏付ける試験

ロミデプシンは強力な HDAC 阻害剤である。HDAC 酵素クラス I に対する Ki 値は低い濃度範囲（nmol レベル）であり、HDAC 酵素クラス II に対しては中等度に阻害することが確認されている（Furumai, 2002；Miller, 2003）。

しかし、HDAC 酵素阻害作用プロファイルの検討のために適用される生化学的試験は標準化されていないため、多くの開発中の HDAC 阻害剤で異なったプロファイルが報告されている。これらの不一致は、HDAC 酵素種類が異なること、I～IV のすべてのクラスの HDAC 酵素に対して同一の基質が用いられていることに起因する。活性測定の条件を詳細に検討したことが最近公表されており（Bradner, 2010）、ロミデプシンの HDAC 酵素アイソフォーム選択性について、現時点で最も正確な結果として示されている。この公表論文では、ロミデプシンは、HDAC 酵素クラス I（HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC8）を極めて低い濃度（pmol レベル）で阻害することを報告している（Table 2 ）。

Table 2:　ロミデプシンの HDAC 阻害プロファイル

HDAC 酵素アイソフォーム	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ki 値 (nM)	0.002	0.038	0.150	21	550	9.5	1250	0.150	1100

引用元：Bradner, 2010

次に、マイクロアレイ解析により、各種細胞株にロミデプシンを処置したときの遺伝子発現量を評価した。この結果、検討した 7000 以上の遺伝子のうち、約 100 の遺伝子がロミデプシンの処置でアップレギュレートされ、100 の遺伝子がダウンレギュレートされた。培養ヒトリンパ腫細胞を用いた試験では、ロミデプシンは、細胞周期停止、アポトーシス及び細胞分化に関連する遺伝子である $p21^{WAF1/Cip1}$ 及びゲルゾリンの発現を変化させた。これらのヒトリンパ腫細胞では、アポトーシス、

細胞周期停止及び細胞分化に先立って遺伝子発現量の変化が認められた。また、細胞周期に対する作用を検討した試験では、ロミデプシンは細胞周期を G_1 及び G_2 期で停止させることが確認された。

ロミデプシンの細胞増殖抑制作用について、白血病、リンパ腫、腎臓がん、前立腺がん、結腸がん、胃がん、乳がん、肺がん、膵臓がん等の複数の腫瘍細胞株を用いて検討され、また、米国国立がん研究所（NCI）抗がんスクリーニング試験において評価された。細胞生存率が 50%低下する濃度及び細胞増殖が 50%抑制される濃度は ng/mL レベルであった。概して、ロミデプシンはヒト及びマウスの正常細胞よりも腫瘍細胞に対して強い増殖抑制作用を示した。また、ヒト B 細胞慢性リンパ球性細胞、B 細胞前リンパ球性白血病細胞、T 細胞リンパ腫細胞、食道がん細胞、膵臓がん細胞及び多発性骨髄腫細胞における増殖抑制作用及びそれに伴うアポトーシス活性が 1～500 nM の範囲で認められたことが報告されている。ロミデプシンは著明なアポトーシス促進活性を有すること、また、固形がんと同様に血液がんにおいても Fas 及び FasL 遺伝子転写のアップレギュレーションを誘導することが示された。また、ロミデプシンは、Ha-ras 形質転換細胞株の増殖を抑制し、その形態変異を正常表現型に回復させることも明らかとなった。さらに、血管新生促進因子の転写調節及び発現抑制を介した血管新生阻害作用も認められている。ロミデプシン処理により、転写制御因子産物（p53）、細胞周期タンパク質（Rb）及びシャペロンタンパク質（Hsp90）等のヒストンとは異なるタンパク質のアセチル化も認められた。これらの作用は、ロミデプシンの抗腫瘍効果に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。これらの結果から、ロミデプシンはヒストンのアセチル化に加えて他の脱アセチル化酵素も阻害する可能性が示唆された。

マウスを用いた複数のヒト腫瘍細胞異種移植モデル試験において、ロミデプシンの *in vivo* での有効性を検討した。ロミデプシンは、固形がん及び血液がんを含む複数のヒト腫瘍型に対して広範な抗腫瘍効果を示した。ヒト腫瘍細胞異種移植モデルにおける遺伝子発現プロファイルは、ロミデプシンに対する感受性と関連していた。*In vitro* と同様に、ロミデプシンは *in vivo* においてもアポトーシス誘導、細胞周期停止、細胞の分化誘導とこれらに関連した遺伝子発現量に影響を及ぼした。

1.2. 安全性薬理試験

臨床試験における QT 間隔延長のリスクを予測するために、電気生理学的アッセイにより hERG チャネル電流に対する作用並びにモルモット乳頭筋の活動電位持続時間について検討した。ロミデプシンによる hERG チャネル電流の最大阻害は、試験した最高濃度（10 µg/mL）でみられ、37%であった。臨床的に意義のある 1 µg/mL までの濃度では、hERG チャネル電流の阻害は軽度であった。本結果及びロミデプシンのタンパク結合率を考慮すると、ロミデプシンは、臨床用量における薬剤濃度では、hERG チャネルに対して生物学的に意義がある作用を示さないと考えられた。

モルモット乳頭筋標本を用いた試験では、10 µg/mL の濃度のロミデプシンで活動電位持続時間の短縮及び活動電位振幅の減少が認められたが、1 µg/mL までの濃度では活動電位に対する作用がみられなかったことから、ロミデプシンは臨床的に意味のある濃度［すなわち、14 mg/m^2 を 4 時間以上かけて持続注入したときの最高血漿中濃度（C_{max}）である 377 ng/mL］では、心筋活動電位に対して生理学的に意味のある作用を示さないと考えられた。ロミデプシンの安全性薬理試験において用いた最高用量は、最大耐量（MTD）又はそれに近い用量であった。ラット及びイヌにおける MTD は約 1 mg/kg であり、この用量はラットでは 6 mg/m^2、イヌでは 20 mg/m^2 に相当する。中枢神経系に対するロミデプシンの作用についてラットを用いて検討した。ロミデプシンを 0.1 mg/kg（2.0 mg/m^2）の用量で 4 時間静脈内に持続注入したときには、中枢神経系に対する作用は認められなかった。0.3 mg/kg（6.0 mg/m^2）では、自発運動の減少、四肢の緊張及び握力の低下等の軽度な作用が認められた。イヌでは、1 mg/kg（20 mg/m^2）の用量で中枢神経系に対する作用が認められた。本用量では、自発運動の減少、驚愕反応の低下、四肢の緊張及び握力の低下がみられた。ラットに 1 mg/kg（20 mg/m^2）を投与したとき、死亡、自発運動の減少、運動失調、歩行異常、攣縮、痙攣、

疼痛反応の低下、驚愕反応の低下、四肢の緊張及び握力の低下、半眼、心拍数及び呼吸数の増加が、遅延発性作用としてみられた。ロミデプシンの中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する作用を無麻酔イヌに 4 時間静脈内持続注入して評価した。ロミデプシンは 0.1 mg/kg の用量で自発運動量を増加させたことを除き、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する作用を示さなかった。0.3 mg/kg の用量では、自発運動量の増加及び体温上昇といった中枢神経系への作用がみられた。心血管系に対する唯一の作用として、心拍数の増加がみられた。1 mg/kg では、摂餌量減少がみられ、体温上昇、心拍数増加がみられた。

1.3. 薬力学的薬物相互作用試験

ロミデプシンの薬力学的薬物相互作用試験は実施していないが、本剤が他の抗悪性腫瘍剤と併用される可能性が考えられるため、*in vitro* 及び *in vivo* におけるロミデプシンと各種抗悪性腫瘍剤との併用試験を行い、薬力学的薬物相互作用の有無を確認した。

ドキソルビシン（ADR）、シスプラチン（CDDP）、フルオロウラシル（5FU）、パクリタキセル（PTX）及びエトポシド（VP-16）存在下でロミデプシンのヒト前立腺がん由来 DU-145 細胞に対する増殖阻害作用を *in vitro* で検討した。ADR、CDDP 又は VP-16 とロミデプシンの併用では、各化学療法剤の添加処置の順番にかかわらず、相乗的な細胞増殖阻害作用が発現した。5FU とロミデプシンとの併用では、同時処置又はロミデプシンで先に処置した場合に相乗的な細胞増殖阻害作用が発現したが、ロミデプシン後処置の場合には相加的であった。一方、PTX とロミデプシンでは、ロミデプシンで後処置した場合には相乗的な細胞増殖阻害作用が発現したが、前処置及び同時処置の場合は相加的であった。

マウス白血病由来 L-1210 細胞移植モデルでのロミデプシンとイリノテカン（CPT-11）、カルボプラチン（CBDCA）、PTX、マイトマイシン C（MMC）及び ADR との併用下でのマウスの生存期間に対する作用を検討した。その結果、ロミデプシン（0.14 mg/kg）と ADR（1 mg/kg）を併用投与した場合にのみ生存期間が有意に延長し、相乗的な抗腫瘍作用の増強が認められた。しかし、他の化学療法剤との併用では、ロミデプシンの抗腫瘍作用の増強はみられなかった。

また、ヒト膵臓がん由来 PANC-1 細胞及び BxPC-3 細胞異種移植モデルでのロミデプシン及びゲムシタビンとの併用による抗腫瘍活性を評価した。PANC-1 細胞異種移植モデルでは、各薬剤単独投与群では有意な抗腫瘍効果は認められなかったが、併用投与により、有意な抗腫瘍効果が認められた。一方、BxPC-3 細胞異種移植モデルでは、単独投与及び併用投与ともに有意な抗腫瘍効果はみられなかった。

以上のように、ロミデプシンは多様な抗腫瘍作用を有する強力な HDAC 阻害剤である。In vitro 及び in vivo 試験において、ロミデプシン処置により、複数の重要な調節遺伝子のアップレギュレーション及びダウンレギュレーションが認められた。ロミデプシンは転写調節作用を介して、細胞増殖抑制、アポトーシスの誘発、形質転換細胞の形態学的復帰、血管新生阻害を含む重要な多数の抗腫瘍作用を示す。また、転写因子、分子シャペロンタンパク質（Hsp90 等）を含む複数の非ヒストンタンパク質のアセチル化亢進も認められている。これらの多くは、末梢 T 細胞リンパ腫（PTCL）患者においてロミデプシン投与によりみられた臨床での効果に重要な役割を果たしているものと思われる。しかし、臨床での効果に関与する正確な作用機序は、完全には明らかになっていない。また、*in vivo* での安全性薬理試験においては、心血管系及び中枢神経系に対してわずかではあるが用量依存的な生理作用が認められた。このため、ロミデプシンの心血管系及び中枢神経系に対する潜在的な作用について、複数の臨床試験で検討がなされている。

2. 効力を裏付ける試験

ロミデプシンは、ras 変異細胞の悪性表現型を ras 非変異細胞の表現型に回復させる新規製剤のスクリーニングにおいて最初に確認された（Ueda, 1994a；Ueda, 1994b）。1990 年代初期に NCI により NCI 55 細胞パネルを用いたロミデプシンの評価が行われ、広範囲の種類のがん細胞に対して強力な活性を示すことが見出された。その後、ロミデプシンは、1998 年に HDAC 阻害剤であることが特定された（Nakajima, 1998）。そしてこれ以降、多数の in vitro 及び in vivo 系においてロミデプシンは強力な抗腫瘍効果を示すことが明らかにされた。

ロミデプシンは、HDAC の阻害、遺伝子発現の誘導又は抑制、細胞周期の停止、細胞分化、細胞増殖の阻害、アポトーシスの誘導、形質転換細胞の形態復帰及び血管新生の抑制といった多様な生体反応を誘発する。ロミデプシン及び他の HDAC 阻害剤がこれらの生物学的作用を示す機序は未だ検討中であるが、現時点の見解では、HDAC 阻害剤は、程度の差はあるものの、HDAC 酵素クラス I（HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC8）、HDAC 酵素クラス II（HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC9、HDAC10）及び HDAC 酵素クラス IV（HDAC11）を阻害し、これによりクロマチンリモデリング及び遺伝子発現量の変化を引き起こし、腫瘍細胞の増殖・生存に有害となる抗腫瘍作用をもたらすと考えられている。また、HDAC 阻害剤はヒストン以外の基質も標的とし得ること、アセチル化による細胞タンパク質の翻訳後修飾が HDAC 阻害剤の生物学的作用に重要な役割を果たすことを示す報告（Rasheed, 2008）も増えている。

ロミデプシン投与による T 細胞リンパ腫に対する臨床での効果が認められているが、T 細胞リンパ腫に対する本剤の正確な作用機序は明らかにされていない。ロミデプシン投与により認められた有効性には、上述した生物学的作用が複数関与していると考えられる。ロミデプシンについての効力を裏付ける試験では、HDAC 阻害による遺伝子発現量に対する作用、細胞増殖抑制作用及びアポトーシス誘導作用を検討した。

本項の効力を裏付ける試験では、*in vitro* 試験（2.6.2.2.1 項）及び *in vivo* 試験（2.6.2.2.2 項）で実施した薬理試験結果の概要をまとめた。これらの試験で、検討した濃度はモル又は ng/mL として示した。ロミデプシンの分子量は 540.71 であることから、1 ng/mL は 1.85 nM に相当する。

2.1. In vitro 試験

ロミデプシン（FK228、FR901228）で実施した in vitro における効力を裏付ける試験を Table 3 に示す。

Table 3:　ロミデプシンで実施した in vitro における効力を裏付ける試験

試験番号	試験の表題	試験の種類	試験系	添付資料番号
CRE040010	遺伝子発現プロファイルを指標とした HDAC 阻害剤の抗腫瘍作用の予測	遺伝子発現	ヒトリンパ腫 U-937 細胞、ヒト前立腺がん PC-3 細胞、ヒト腎臓がん ACHN 細胞	4.2.1.1.1
CRE040013	ヒトリンパ腫由来 U-937 細胞に対する新規 HDAC 阻害剤 FK228 の *in vitro* 及び *in vivo* での作用検討	細胞傷害活性、アポトーシス、細胞周期、細胞分化、クロマチン免疫沈降	ヒトリンパ腫 U-937、慢性骨髄性白血病 K562、急性リンパ芽球性白血病 CCRF-CEM	4.2.1.1.2
CRE010130	ヒト培養細胞株に対する FK228 の細胞傷害活性	細胞傷害活性	ヒト腫瘍細胞株	4.2.1.1.3
CRR910025	FR901228 の抗腫瘍作用と毒性：非臨床薬理試験	細胞傷害活性、高分子合成、DNA 架橋及び切断、DNA 合成、細胞周期、遺伝子発現	マウス胚細胞、ヒト肺がん細胞、ヒト胃がん細胞、ヒト乳がん細胞、ヒト結腸がん細胞、ヒト線維芽細胞、ヒト内皮細胞	4.2.1.1.4
CRE010158	遺伝子発現を指標とした FK228 の抗腫瘍作用の予測	アポトーシス、細胞周期、遺伝子発現	ACHN 細胞、PC-3 細胞、DU-145 細胞	4.2.1.1.5
CRE020081	ヒト前立腺がん LNCaP 細胞における前立腺特異抗原の mRNA 発現量及び分泌量に対する FK228 の作用	細胞傷害活性、遺伝子発現	ヒト前立腺がん LNCaP 細胞	4.2.1.1.6
CRE040012	新規 HDAC 阻害剤 FK228 の抗腫瘍作用は、血管形成因子の発現に対する作用に依存する	遺伝子発現、クロマチン免疫沈降	PC-3 細胞、ACHN 細胞	4.2.1.1.7

2.1.1. 遺伝子発現プロファイルを指標とした HDAC 阻害剤の抗腫瘍作用の予測

［試験番号 CRE040010、添付資料 4.2.1.1.1、参考資料］

本試験では、ロミデプシンの標的遺伝子を特定すること、及びその抗腫瘍効果と標的遺伝子発現量の関係を評価するために、遺伝子発現量の時間依存性変化について検討した。3 種類のロミデプシン感受性細胞株、すなわち、ヒトリンパ腫（U-937）、前立腺がん（PC-3）及び腎臓がん（ACHN）細胞株を用いた。また、本試験では、ロミデプシン感受性に関与すると思われる遺伝子を特定するために、4 種類のヒト腫瘍異種移植モデル動物における *in vivo* での発現プロファイルも解析した。これらの結果は 2.6.2. 2.2.1 項（後述）に示した。

各種細胞にロミデプシン 5 ng/mL を添加し 0、1、3、12 及び 24 時間処置した。これらの細胞から全 RNA を分離して、プローブアレイハイブリダイゼーションの標的を調製した。標的ハイブリダイゼーションには Affymetrix 社の FL GeneChip を用い、データ解析には GeneSpring ソフトウェアを用いた。U-937、PC-3 及び ACHN 細胞株の RNA 発現プロファイルの時間依存性変化を解析し、ロミデプシン処置により 3 種類のすべての細胞株に共通して直線的に 2 倍以上アップレギュレート又はダウンレギュレートされた遺伝子を特定した。

ロミデプシンへの反応を検討した 7070 の遺伝子のうち、$p21^{WAF1/Cip1}$、IL-8 及びカスパーゼ 9 などの 105 の遺伝子がロミデプシンによりアップレギュレートされ、MAPK 及びサイクリン A2 などの 100 の遺伝子がダウンレギュレートされた。これらの遺伝子の多くは、シグナル伝達、細胞増殖抑制及びアポトーシスの誘導において重要な役割を果たすタンパク質をコードするものであった。

2.1.2. ヒトリンパ腫由来細胞及びヒト白血病由来細胞に対するロミデプシンの *in vitro* での作用の検討

［試験番号 CRE040013、添付資料 4.2.1.1.2、参考資料］

本試験は、ヒトリンパ腫 U-937 細胞並びにヒト白血病 K562 細胞及びヒト急性リンパ芽球性白血病 CCRF-CEM 細胞を用いてロミデプシンの抗腫瘍活性の作用機序を解明することを目的として in vitro における作用を検討した。

2.1.2.1. U-937、K562 及び CCRF-CEM 細胞のロミデプシンに対する感受性

増殖阻害試験は、96 ウェル平底マイクロプレートを用いてメチルチアゾリルテトラゾリウム（MTT）アッセイ法により行った。20,000 個の細胞をロミデプシン存在下又は非存在下で 72 時間インキュベートし、メチルチアゾリルテトラゾリウム（MTT）を添加して、さらに 4 時間インキュベートした。インキュベート後に SPECTRA MAX250 を用いて 580 nm の吸光度を測定し、対数変換濃度を用いて最小二乗法により IC_{50} 値を算出した。

ヒトリンパ腫 U-937 細胞、並びにヒト白血病 K562 及び CCRF-CEM 細胞のロミデプシンに対する *in vitro* 感受性を検討した結果、U-937 細胞の感受性は、K562 及び CCRF-CEM 細胞の感受性と同程度であり、これらの細胞に対するロミデプシンの増殖抑制作用の IC_{50} 値はそれぞれ 5.92、8.36 及び 6.95 nM であった。

2.1.2.2. U-937 細胞のアポトーシスに対するロミデプシンの作用

アポトーシスに対する作用試験では、25 cm^2 フラスコに U-937 細胞 1×10^6 個を播種し、ロミデプシン 5 ng/mL の存在下又は非存在下で 37ºC で各種時間インキュベートした。アポトーシス細胞は、MEBCYTO アポトーシスキットを用いて測定し、相対的蛍光量をフローサイトメトリーにより測定した。

ロミデプシン処置細胞と非処置細胞との間で、処置後 16 時間までは細胞のアネキシン V／ヨウ化プロピジウム（PI）による染色で差はみられなかった。ロミデプシン非処置細胞では、20～72 時間にわたり全細胞の 4.8%がアネキシン V 陽性／PI 陰性（初期アポトーシス細胞）であった。U-937 細胞をロミデプシン 5 ng/mL の存在下で 20 時間インキュベートしたときのアポトーシス率は 20.5%であり、48 時間まで継続して増加した。アネキシン V 陽性／PI 陽性細胞（後期アポトーシス細胞又は壊死細胞）の割合（%）は非処置細胞では 20～72 時間後まで約 6～8%で推移したが、ロミデプシン処置細胞では 72 時間後まで時間依存的に増加し、72 時間後のアネキシン V 陽性／PI 陽性細胞の割合は 53%であった。

U-937 細胞においてロミデプシンによるアポトーシス誘導が認められたことから、ロミデプシンのリンパ腫に対する増殖抑制作用の一部は、アポトーシス経路を介することが示唆された。

2.1.2.3. U-937 細胞の細胞周期に対するロミデプシンの作用

細胞周期に対する作用試験では、25 cm^2 フラスコに細胞周期非同調 U-937 細胞 2×10^6 個を播種し、ロミデプシン 5 ng/mL の存在下又は非存在下で 37ºC でインキュベートした。別の試験では、細胞をロミデプシン 0.5 ng/mL の存在下又は非存在下で 48 時間処置した後にロミデプシン非存在下の培地中でさらに 24 時間インキュベートした。所定時間のインキュベート後に、トリプシン処理により細胞を回収した。細胞周期はヨウ化プロピジウム染色により評価した。相対的 DNA 量はフローサイトメトリーを用いた免疫蛍光法により測定した。

U-937 細胞の細胞周期に対するロミデプシンの作用を評価するために、DNA ヒストグラム解析を行った。処置後 10 時間までは、ロミデプシン処置（5 ng/mL）細胞と非処置細胞との間に細胞周期に関する差は認められなかった。ロミデプシン処置細胞では処置 12 時間後に G_2/M 期での細胞周期停止が認められ、G_1 期の細胞の占める割合が低下した。処置 24 時間後には sub-G_1 期の細胞の占める割合が増加した。一方、ロミデプシン 0.5 ng/mL で 48 時間処置した後にロミデプシンを除きさらに 24 時間インキュベートした細胞では、G_1 期での細胞周期停止が認められた。大半の死細胞はロミデプシンを洗浄する過程で除去されるため、この結果は生存細胞の細胞周期を示すものである。

これらの結果から、ロミデプシンは U-937 細胞の細胞周期を G_1 及び G_2/M 期で停止させることが示され、この細胞周期停止作用がリンパ腫に対するロミデプシンの抗腫瘍活性に関与している可能性が考えられる。

2.1.2.4. U-937 細胞の分化に対するロミデプシンの作用

U-937 細胞の分化に対するロミデプシンの作用を検討するために、CD11b 及び CD14 の発現量を確認した。25 cm^2 フラスコに U-937 細胞 1×10^6 個を播種した後、ロミデプシン（0.5 及び 5 ng/mL）、オールトランスレチノイン酸（ATRA、1 μmol/L）又はビタミン D_3（0.1 μmol/L）の存在下又は非存在下で 37ºC でインキュベートした。ロミデプシン（0.5 ng/mL）、ATRA、カルシトリオール存在下又は非存在下で 24、48、72 及び 96 時間インキュベートした後、並びにロミデプシン（5 ng/mL）存在下で 24 及び 48 時間インキュベートした後に細胞を回収した。表面抗原の発現量はフローサイトメトリーを用いた免疫蛍光法により測定した。0.2%ウシ血清アルブミン（BSA）及び 0.1%NaN_3 を含有するリン酸緩衝生理食塩液（PBS）を染色培地として用いた。細胞を染色培地で 2 回洗浄し、抗ヒト CD11b フィコエリトリン（PE）標識抗体及び抗ヒト CD14 フルオレセイン（FITC）標識抗体と 4ºC で 30 分間、暗所でインキュベートした。細胞を 2 回洗浄後に 500 μL の染色培地に再懸濁し、フローサイトメトリーにより PE 及び FITC を測定した。陽性対照として ATRA 及びビタミン D_3（カルシトリオール）をそれぞれ 1 及び 0.1 μM の濃度で用いた。

陰性対照細胞では、24～96 時間後の CD11b 陽性／CD14 陽性細胞の割合に変化は認められなかった。ロミデプシン 5 ng/mL の存在下では、CD11b 陽性／CD14 陽性細胞の割合は 24 時間後に 72.8%まで増加したが、陽性染色を示した総細胞数はアポトーシスのために減少した。細胞分化に対する

ロミデプシンの作用をより明確に検討するために、U-937 細胞をロミデプシン 0.5 ng/mL で処置した結果、CD11b 陽性／CD14 陽性細胞の割合は、24 時間後で 86.8%まで増加した。陽性対照では、ATRA 1 μM 及びビタミン D_3 0.1 μM でも、24 時間後で U-937 細胞の CD11b 陽性／CD14 陽性細胞への分化が誘導され、CD11b 陽性／CD14 陽性細胞の割合はそれぞれ 84.6%及び 87.6%であった。ロミデプシン 0.5 ng/mL を 96 時間処置したときには、CD11b 陽性／CD14 陽性細胞の割合は低下し、CD11b 陽性／CD14 陰性細胞の割合が増加した。ATRA 及びビタミン D_3 では、CD11b 陽性／CD14 陽性細胞の割合のみが増加した。ロミデプシン 0.5 ng/mL、ATRA 1 μM 又はビタミン D_3 0.1μM を 24～96 時間処置した細胞の生存率は対照細胞と同程度であった。しかし、これらの薬剤はいずれも 72 時間後から増殖阻害を誘発し、96 時間後での阻害率はロミデプシン、ATRA 及びビタミン D_3 で、それぞれ 62.1%、85.1%及び 54.6%であった。

ロミデプシンによる U-937 細胞の分化に対する機序は十分には解明されていないが、ロミデプシンによりゲルゾリン mRNA の発現、誘導が生じており、これが U-937 の細胞分化に関与したことが考えられる。この腫瘍細胞の分化により、腫瘍細胞増殖抑制、腫瘍細胞表面マーカーの発現による T リンパ球活性のアップレギュレーション、初代芽球細胞の最終分化などの抗腫瘍効果を誘発することが示唆された。

2.1.2.5. $p21^{WAF1/Cip1}$ 及びゲルゾリン mRNA 発現に対するロミデプシンの作用

定量的ポリメラーゼ連鎖反応（q-PCR）により $p21^{WAF1/Cip1}$ 及びゲルゾリン遺伝子の発現を検出・評価した。25 cm^2 フラスコに U-937 細胞 2×10^6 個を播種し、ロミデプシン 5 ng/mL の存在下で 37ºC でインキュベートした。細胞を 0、1、3、12 及び 24 時間インキュベートした後に回収し、細胞から RNA を抽出して、使用時まで凍結した。次に RNA を逆転写し、$p21^{WAF1/Cip1}$、ゲルゾリン及び β-アクチンの発現量をサイバーグリーンポリメラーゼ連鎖反応（PCR）マスター混合物を用いたリアルタイム q-PCR により測定した。細胞の分化誘導を促進するタンパク質である $p21^{WAF1/Cip1}$ 及びゲルゾリンの発現量は、β-アクチンの発現量に対する比として示した。時間 T=0 における各値を 1 と設定した。

ロミデプシン 5 ng/mL で処置した U-937 細胞では発現した β-アクチンアクチン mRNA に対する $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA の相対値は 1 時間後で約 9 倍、24 時間後で 654 倍と時間依存的に増加した。また、ロミデプシンは、ゲルゾリン mRNA の発現を 1 時間後で 2 倍、24 時間後で 152 倍に増加させた。

これらの結果から、アポトーシスや細胞周期停止及び細胞分化の発現に先立って、遺伝子発現が生じたことが示唆され、これらの細胞に対する作用は、$p21^{WAF1/Cip1}$ 及びゲルゾリンの遺伝子発現促進による結果として生じる作用であると考えられた。

2.1.2.6. U-937 細胞のヒストンアセチル化に対するロミデプシンの作用

ロミデプシンによる遺伝子発現の変化は標的遺伝子プロモータードメインに関連するヒストンのアセチル化により誘導されたという仮説を確認するために、$p21^{WAF1/Cip1}$ プロモーターに関連するヒストン H3 及び H4 のアセチル化についてクロマチン免疫沈降（ChIP）分析を用いて検討した。75 cm^2 フラスコに U-937 細胞を 4×10^6 個で播種し、37ºC、5% CO_2 下で一晩インキュベートした後、細胞をロミデプシン 5 ng/mL の存在下で 2 時間インキュベートした。その後、細胞にホルムアルデヒドを添加して最終濃度を 1%とし、37ºC で 10 分間インキュベートした。培地を除去し、セリンプロテアーゼ阻害剤のフェニルメチルスルフォニルフルオリド（0.1 mM）を含有する氷冷 PBS 1 mL 中に細胞を懸濁した。細胞を 0.5 mL のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）溶解緩衝液（1% SDS/10 mM EDTA/50 mM Tris-HCl、pH 8.1）で再懸濁し、氷上で 10 分間インキュベートした。細胞溶解物を超音波破砕し、遠心分離により細胞片を除去した。クロマチン調製物の一定分量を採取し、インプットフラクションとした。次に上清を免疫沈降緩衝液で 5 倍希釈し、超音波破砕したサーモン精子

DNA 20 µg 及び BSA を含有する 50%プロテイン A セファロース懸濁液 80 µL を添加して 4ºC で 30 分間インキュベートした。セファロースビーズを遠心分離によりペレット化し、上清を抗アセチルヒストン H3 又は抗アセチルヒストン H4 抗体を含有する別の試験管に入れて、4ºC で一晩インキュベートした。プロテイン A セファロース懸濁液を添加して 1 時間インキュベートした後、プロテイン A 複合体を遠心分離して、5 回洗浄した。5 M NaCl 溶液の一定分量を複合体溶出液に添加して、検体を 65ºC で 4 時間インキュベートした。免疫沈降した DNA をフェノール／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿により回収した後、PCR により分析した。

ロミデプシン（5 ng/mL）で 2 時間処置後に、$p21^{WAF1/Cip1}$ プロモーターの P1 領域及び P2 領域に特異的なヒストン H3 のアセチル化の増加が認められ、ヒストン H4 のアセチル化は、$p21^{WAF1/Cip1}$ プロモーターのすべての領域とエクソン 2 において認められた。これらの結果から、ロミデプシンによる HDAC 阻害により $p21^{WAF1/Cip1}$ プロモーター領域のヒストンアセチル化が生じ、これにより遺伝子発現が変化することが示唆された。

以上の試験結果から、ロミデプシンは血液がん細胞株に対して強力な抗腫瘍作用を示すことが確認された。3 種類のすべての血液がん細胞株（U-937、K562、CCRF-CEM）がナノモルオーダーの低濃度のロミデプシンに感受性を示した。ヒトリンパ腫 U-937 細胞では、ロミデプシン処置によりヒストンタンパク質が急速にアセチル化され、この結果、$p21^{WAF1/Cip1}$ などの重要な制御遺伝子の発現が誘導された。この遺伝子発現の変化は、細胞周期停止、アポトーシス及び細胞分化に先立って認められた。以上、リンパ腫におけるロミデプシンの抗腫瘍効果は、細胞周期停止、アポトーシス誘発及び細胞分化をもたらす遺伝子発現の変化を介して誘発される可能性が示唆された。

2.1.3.　ヒト培養細胞株に対するロミデプシンの細胞傷害活性

［試験番号 CRE010130、添付資料 4.2.1.1.3、参考資料］

本試験は、ヒト腫瘍細胞に対するロミデプシンの細胞傷害活性の範囲を *in vitro* で評価することを目的とした。

ヒト白血病及びリンパ腫由来細胞（CCRF-CEM、U-937、THP-1、ML-3、HL-60、JOSK-1、K562、JOK-1）、腎臓がん由来細胞（OUR10、ACHN、A-498）、前立腺がん由来細胞（PC-3、DU-145）結腸腺がん由来細胞（SW-480、Colo201、HT-29）及び肺がん由来細胞（PC-10、NCI-H69）の 18 種類の細胞株を用いてロミデプシンの細胞傷害活性を検討した。ロミデプシンの細胞傷害活性は、72 時間のインキュベーション時間終了後の細胞生存率を算出することにより評価した。試験には 10,000～40,000 個の腫瘍細胞を含有する 96 ウェルマイクロプレートを用い、各種濃度のロミデプシンの存在下又は非存在下で 72 時間インキュベートした。プレートに 3-(4,5- ジメチルチアゾール-2 イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムを添加して 4 時間インキュベートし、580 nm における吸光度を測定した。各細胞株について、生存細胞が 50%減少する薬物モル濃度（IC_{50}）を算出した。結果を Table 4 に示す。

ロミデプシンは、検討したすべての細胞株に対して増殖抑制作用を示し、平均 IC_{50} 値は 3.16 ng/mL であった。Table 4 に示した結果から、ロミデプシンは種々の血液がん及び固形がんに対して活性を示すことが示唆された。

Table 4:　ヒト細胞株におけるロミデプシンの細胞傷害活性

細胞型	細胞株	IC_{50}（ng/mL）	IC_{50} 平均値（ng/mL）
白血病、リンパ腫	CCRF-CEM THP-1 ML-3 HL-60 JOSK-1 K562 JOK-1 U-937	3.76 4.09 3.31 0.60 3.75 4.52 2.97 3.20	3.23
腎臓がん	OUR10 ACHN A-498	4.68 4.25 5.98	4.97
前立腺がん	PC-3 DU-145	1.21 2.01	1.61
結腸腺がん	SW-480 Colo201 HT-29	1.50 1.11 2.23	1.61
肺がん	PC-10 NCI-H69	4.53 3.12	3.83
平均		3.16	-

2.1.4.　ロミデプシンの抗腫瘍作用及び作用機序

［試験番号 CRR910025、添付資料 4.2.1.1.4、参考資料］

ロミデプシンの多面的な抗腫瘍効果及び作用機序について *in vitro* で検討した結果を示す。*in vivo* でも検討を行い、結果を 2.6.2.2.2.3 項（後述）に記載した。

2.1.4.1.　培養細胞に対する細胞傷害活性

培養ヒト腫瘍細胞及び正常細胞に対するロミデプシンの作用を検討した。ロミデプシンは検討したヒト肺がん、胃がん、乳がん及び結腸がん細胞に対して強力な細胞傷害活性を示したが、正常ヒト線維芽細胞、正常ヒト内皮細胞及びマウス胚細胞に対する細胞傷害活性は弱かった。細胞傷害活性（IC_{50} 値）は、ヒト肺がん細胞株 A549、PC-9、PC-1、PC-10、ADH 及び LX-1 細胞に対してそれぞれ 0.7、0.3、1.2、2.4、1.0 及び 1.2 ng/mL、胃がん細胞株 MKN28 及び MKN74 細胞に対していずれも 0.9 ng/mL、乳がん細胞株 MCF-7 及び ZR-75-1 細胞に対してそれぞれ 0.6 及び 0.7 ng/mL、結腸がん細胞 Colo201 及び SW-480 細胞に対してそれぞれ 0.3 及び 1.0 ng/mL であった。ヒト正常線維芽細胞（HNFF）、ヒト正常内皮細胞（HE-9）、Balb/c3T3 マウス由来胚細胞及び NIH/3T3 マウス由来胚細胞に対する IC_{50} 値は、それぞれ>1000、7.0、9.2 及び 3.2 ng/mL であった。陽性対照ドキソルビシンでは、A549 及び MCF-7 細胞に対する IC_{50} 値はそれぞれ 13.8 及び 13.0 ng/mL であったのに対し、HNFF に対する IC_{50} 値は 129.9 ng/mL であった。

これらの結果から、ロミデプシンは広範囲の種類の固形がんに対して活性を示す可能性が示唆された。

2.1.4.2.　細胞の高分子合成に対する作用

マウス白血病 L1210 細胞を 10^{-8}～10^{-4} M のロミデプシンで 24 時間処置し、細胞内への放射活性前駆体の取り込みに対する作用を検討した。ロミデプシンは、DNA、RNA 及びタンパク質内へのそれぞれ ^{14}C-チミジン、^{14}C-ウリジン及び ^{14}C-ロイシンの取り込みを用量依存的に阻害した。ロミデプシンは RNA 合成を DNA 合成よりも強力に阻害した。

2.1.4.3. DNA 鎖間の架橋形成及び単鎖 DNA の切断

DNA 鎖間の架橋形成及び単鎖 DNA 切断に対するロミデプシン（15 及び 50 μM）の作用を、L1210 細胞を用いたアルカリ溶出試験により検討した。L1210 細胞をロミデプシンで 1 時間処置した後、アルカリ溶出を行った。L1210 細胞において、ロミデプシンによる DNA 鎖間の架橋形成及び単鎖 DNA の切断は認められなかった。

2.1.4.4. 単離核の DNA 合成に対する作用

Ras 1 細胞（Ha-ras がん遺伝子を導入した NIH3T3 由来細胞）の単離核をロミデプシン（10 nM～1 μM）で 37ºC で 40 分間処置した。ロミデプシンは、単離核の DNA 合成を阻害しなかった。

2.1.4.5. 細胞周期に対する作用

NIH3T3 細胞由来の培養 Ras 1 細胞の細胞周期に対するロミデプシン（4.6 nM）の作用を蛍光活性化セルソーター（FACS）により検討した。ロミデプシンは Ras 1 細胞の細胞周期を G_0/G_1 期で停止させたが、この作用はロミデプシン除去後に急速に回復した。

2.1.4.6. c-myc 及び Ha-ras mRNA 発現量に対する作用

培養 Ras 1 細胞の c-myc 及び Ha-ras mRNA 発現量に対するロミデプシンの作用をノーザンドットブロットハイブリダイゼーションを用いて検討した。ロミデプシンは、c-myc mRNA 発現量を強力に減少させたが、ロミデプシン除去後には処置前の値に復した。ロミデプシンは Ha-ras mRNA の発現を抑制しなかった。

結論として、ロミデプシンは各種のヒト肺がん、胃がん、乳がん及び結腸がん細胞株に対して *in vitro* で細胞傷害活性を示した。また、ロミデプシンは、G_0/G_1 期で細胞周期を停止させた。さらにロミデプシンは DNA 及びタンパク合成よりも強力に RNA 合成を阻害した。DNA 鎖間の架橋形成及び単鎖 DNA の切断は認められなかった。一方、c-myc mRNA 発現量の減少が認められた。

以上の試験結果から、ロミデプシンは腫瘍細胞の調節遺伝子の発現を選択的に抑制することにより抗腫瘍効果を発揮し、ADR や CDDP などの他の化学療法剤でみられる DNA との直接作用を示すことなく、腫瘍細胞の重要な生物学的機能を阻害させると考えられた。

2.1.5. 遺伝子発現を指標としたロミデプシンの抗腫瘍作用の予測

［試験番号 CRE010158、添付資料 4.2.1.1.5、参考資料］

本試験は、遺伝子発現を指標としてロミデプシンの抗腫瘍効果を予測できるか否かについて検討することを目的とした。

本項では、ヒト前立腺がん由来 PC-3 細胞における抗腫瘍効果の機序を検討した結果、及び PC-3、DU-145（ロミデプシン感受性ヒト前立腺がん）、ACHN（ロミデプシン非感受性ヒト腎がん）の 3 種の細胞株における $p21^{WAF1/Cip1}$ 遺伝子の基礎発現量及びロミデプシン処置による発現パターンの変化を検討した結果を示す。*in vivo* で検討した結果は 2.6.2. 2.2.5 項に示す。

2.1.5.1. PC-3 細胞の細胞周期及びアポトーシスに対するロミデプシンの作用

アポトーシス誘導に関する試験では、PC-3 細胞をロミデプシン（5 ng/mL）存在下又は非存在下で 24、36 及び 48 時間インキュベートした後、トリプシン処理により細胞を回収した。アポトーシス細胞は、MEBCYTO アポトーシスキット（医学生物学研究所）により測定した。相対的蛍光量は、フローサイトメトリーにより測定した。

細胞周期試験では、25 cm^2 フラスコに細胞周期非同調 PC-3 細胞を 2×10^6 個で播種し、ロミデプシン（5 ng/mL）の存在下又は非存在下で 37ºC で 8、12 及び 24 時間インキュベートした後、トリプシン処理により細胞を回収した。細胞周期はヨウ化プロピジウム染色により評価した。相対的 DNA 量はフローサイトメトリーを用いた免疫蛍光法により測定した。

PC-3 細胞の細胞周期に対するロミデプシンの作用を評価するために、DNA ヒストグラムを検討した。ロミデプシン（5 ng/mL）で 12 時間処置した細胞の細胞周期は G_1 期ではなく G_2/M 期で停止した。抗腫瘍効果の機序をさらに解明するために、PC-3 細胞のアポトーシスに対するロミデプシン（5 ng/mL）の作用を検討した。アネキシン V 結合ホスファチジルセリンの細胞膜外層への再分布は初期アポトーシス細胞の特徴であり、PI 透過性の増加は後期アポトーシス細胞又は壊死細胞において認められる特徴である。48 時間インキュベート後のロミデプシン非処置細胞におけるアネキシン V 陽性／PI 陰性細胞（初期アポトーシス細胞）の割合は全細胞の 3.8%であったが、アネキシン V 陽性／PI 陽性細胞の割合は 0.6%であった。PC-3 細胞をロミデプシン（5 ng/mL）存在下で 48 時間インキュベートするとアネキシン V 陽性／PI 陰性細胞の割合は 14.8%に増加したことから、ロミデプシンは PC-3 細胞のアポトーシスを誘発することが示された。

2.1.5.2. *In vitro* におけるロミデプシンによる $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA 発現量の変化

PC-3、DU-145 及び ACHN 細胞における $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA 発現量に対するロミデプシン（5 ng/mL）の作用を検討した。遺伝子発現量はリアルタイム q-PCR 法を用いて測定した。PC-3 細胞においてロミデプシン存在下で発現した β-アクチン mRNA に対する $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA の相対値は、1 時間後で約 8 倍、24 時間後で約 36 倍増加した。DU-145 細胞では、β-アクチン mRNA に対する $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA の相対値は 1 時間後で約 4 倍増加し、24 時間後では 9 倍に達した。一方、ACHN 細胞においては β-アクチン mRNA に対する $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA の相対値の増加はみられなかった。これらの細胞における β-アクチン mRNA に対する $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA の基礎相対値は、PC-3 < DU-145 << ACHN の順で増加した。この結果は、PC-3 細胞及び DU-145 細胞はロミデプシン感受性であり、ACHN 細胞はロミデプシン非感受性であることと相関する。PC-3 細胞及び DU-145 細胞では、アポトーシスの誘発、細胞周期停止及び細胞分化に先立ち $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA 発現量の増加が生じた。

以上の試験結果から、ロミデプシンは PC-3 細胞において細胞周期を停止させ、アポトーシスを誘発することにより抗腫瘍効果を示すことが示唆された。PC-3 細胞及び DU-145 細胞では $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA 発現量の時間依存的な増加がみられたが、ACHN 細胞では増加が認められず、これらの細胞株の増殖は、ロミデプシン感受性と逆の相関を示した。これらの結果から、$p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA 発現量はロミデプシンの抗腫瘍効果を予測するマーカーとなり得ることが示された。

2.1.6. ヒト前立腺がん LNCaP 細胞における前立腺特異抗原の mRNA 発現量及び分泌量に対するロミデプシンの作用

［試験番号 CRE020081、添付資料 4.2.1.1.6、参考資料］

本試験では、ヒト前立腺がん LNCaP 細胞の細胞増殖、並びに前立腺特異抗原（PSA）の mRNA 発現量及び分泌量に対するロミデプシンの作用を検討した。

ロミデプシンをエタノール中に 1 mg/mL の濃度で溶解させた後、培養液で各種濃度に希釈した。細胞増殖の測定では、ロミデプシン（0.0488～50 ng/mL の範囲の 11 濃度）又は培地のみを含む 96 ウェルプレートに各ウェル 20,000 細胞/250 µL の密度で細胞を播種した。48 時間インキュベート後に PSA 分泌量を測定した。また、メチルチアゾリルテトラゾリウム（MTT）を各ウェルに添加し、さらに 4 時間インキュベートした後に 580 nm における吸光度を測定した。細胞の増殖阻害は、各濃度に 3 ウェルを用いて算出した。

PSA 分泌量は、定量的サンドイッチ酵素免疫測定法を適用した市販 ELISA 系（E プレート‘栄研’PSA、栄研化学株式会社、日本、東京）を用いて測定した。吸光度は 490 nm で測定した。

定量的リアルタイム PCR 解析は次のように実施した。細胞を 6 ウェルプレートに各ウェル 1×10^6 細胞/3 mL の密度で播種して 24 時間インキュベートした後、培地を各種濃度のロミデプシン（0.01～3.2 ng/mL 又は溶媒対照）で交換した。さらに 24 時間インキュベートした後に細胞を回収して全 RNA を単離し、残渣ゲノム DNA を DNase 処置により除去した。逆転写して得られた産物を PCR で増幅させた。PSA mRNA 発現量は 18S rRNA（内部標準物質）量の比として示した。β-アクチン（HDAC 阻害剤に影響を受けないハウスキーピング遺伝子）の発現量も定量した。

これらの試験において、ロミデプシンは LNCaP 細胞の増殖を 48 時間後まで濃度依存的に阻害し、ロミデプシンの IC_{50} 値は 3.36 ng/mL であった。PSA mRNA の発現量は 0.1～0.32 ng/mL の範囲で濃度依存的に軽度増加したが、1.0 及び 3.2 ng/mL の濃度ではそれぞれ 63.1%及び 98.1%まで顕著に減少し、ロミデプシンは LNCaP 細胞の PSA mRNA 発現量を 2 相性に変化させた。PSA 分泌量は 0.195 及び 0.391 ng/mL の濃度のロミデプシン処置により濃度依存的にわずかに増加し、0.391 ng/mL では対照と比較して最大約 60%増加した。0.781 ng/mL 以上の濃度では、PSA 分泌量が濃度依存的に低下し、3.13 ng/mL（ロミデプシンによる細胞増殖遅延の IC_{50} 値にほぼ相当する濃度）で最低値に達した。このように、48 時間以内の PSA 分泌量の変化は、ロミデプシンによる PSA mRNA 発現量の変化のパターンと同様であったが、PSA 分泌抑制は細胞増殖抑制に先立って認められ、また、細胞傷害活性と相関しなかった。

以上、ロミデプシンは LNCaP 細胞の増殖を濃度依存的に阻害した。また、PSA の mRNA 発現量及び分泌量は、ロミデプシンにより変化したが、PSA 分泌量についてはロミデプシンの細胞傷害活性と相関しなかった。これらの結果から、ロミデプシンを前立腺がん患者に投与した場合の血清 PSA 値の変化は腫瘍重量の変化を十分には反映しない可能性が示唆された。

2.1.7.　血管形成因子の発現に対する in vitro 作用

［試験番号 CRE040012、添付資料 4.2.1.1.7、参考資料］

本試験は、ロミデプシン感受性前立腺がん細胞（PC-3）及びロミデプシン非感受性腎臓がん細胞（ACHN）における血管新生因子の発現量に対するロミデプシンの *in vitro* 及び *in vivo* での作用を検討した。*In vivo* の結果は、2.6.2.2.2.6 項（後述）に記載した。

2.1.7.1.　PC-3 細胞及び ACHN 細胞における VEGF 及び bFGF mRNA に対するロミデプシンの作用

リアルタイム q-PCR で評価した試験では、25 cm^2 フラスコに細胞を 2×10^6 個で播種し、ロミデプシン（5 ng/mL）存在下で 37ºC でインキュベートした。0、1、3、12 及び 24 時間インキュベートした後に細胞を回収し、細胞から RNA を抽出して逆転写した。サイバーグリーン PCR マスター混合物を用いたリアルタイム q-PCR により血管内皮増殖因子（VEGF）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）及びβ-アクチンの発現量を測定した。VEGF 及び bFGF の発現量は、β-アクチンの発現量に対する比として示した。PC-3 細胞の時間 0 における値を 1 に設定し、2 倍以上の増加又は 50%以上の減少をそれぞれ有意と判定した。

PC-3 細胞では、ロミデプシンは処置後 12 時間で VEGF mRNA の発現量を 51%減少させた。ACHN 細胞では、VEGF mRNA の発現量には影響を及ぼさなかった。処置後 12 時間の bFGF mRNA の発現量は、PC-3 細胞及び ACHN 細胞で顕著に減少（それぞれ 94%及び 81%）した。ロミデプシン処置前の VEGF mRNA の発現量は PC-3 細胞と ACHN 細胞で同程度であり、同じく bFGF mRNA の発現量は PC-3 細胞よりも ACHN 細胞の方が高かった。ロミデプシン処置により、ロミデプシン感受性細胞である PC-3 細胞では VEGF 及び bFGF mRNA のいずれの発現も抑制したが、非感受性の ACHN 細胞では bFGF mRNA の発現を抑制したものの、VEGF mRNA の発現は抑制しなかった。こ

れらの結果から、ロミデプシンが血管新生因子の発現に影響を与えることができることと、ロミデプシンの感受性に関連がある可能性が示唆された。

2.1.7.2. 低酸素状態下 PC-3 細胞の VEGF mRNA 発現量に対するロミデプシンの作用

生体内における血管新生状態を再現した低酸素状態下において、PC-3 細胞の VEGF 及び HIF-1α の mRNA 発現量に対するロミデプシンの作用を q-PCR により評価した。75 cm^2 フラスコに PC-3 細胞を 4×10^6 個で播種して、10%ウシ胎仔血清（FCS）、ペニシリン 50 単位/mL 及びストレプトマイシン 50 µg/mL を添加した高グルコースダルベッコ改変イーグル培地（D-MEM）中、37ºC5% CO_2 下で一晩インキュベートした。その後、細胞をロミデプシン（5 ng/mL）存在下又は非存在下で 10% FCS、ペニシリン 50 単位/mL 及びストレプトマイシン 50 µg/mL を添加した低グルコース D-MEM 中、37ºC2% O_2 下で 2、4、8 及び 16 時間インキュベートした。一部の試験では、低酸素状態開始後 4 時間から 8 又は 16 時間まで、細胞をロミデプシン（5 ng/mL）存在下又は非存在下でインキュベートした。RNeasy ミニキットを用いて細胞から RNA を抽出し、M-MLV RT を用いて逆転写して PCR を実施した。

HIF-1 は低酸素状態における VEGF 遺伝子の転写活性化因子であり、その活性は HIF-1 を構成するサブユニット HIF-1α が低酸素誘導により安定化されることにより主に決定される。PC-3 細胞に低酸素状態開始と同時にロミデプシンで処置した場合、コントロール細胞でみられた処置後 4～16 時間の時間依存的な VEGF mRNA 発現量の増加が完全に阻害された。低酸素状態開始 4 時間後にロミデプシンで処置した場合、処置後 8 及び 16 時間の VEGF mRNA 発現量も減少した。HIF-1α mRNA の発現量には、いずれの処置スケジュールでも影響を及ぼさなかった。これらの結果から、ロミデプシンは PC-3 細胞において HIF-1α 遺伝子の発現量を変化させることなく VEGF 遺伝子の発現を抑制することが示唆された。

2.1.7.3. 低酸素状態下 PC-3 細胞の VEGF プロモーターに関連するヒストンアセチル化に対するロミデプシンの作用

PC-3 細胞の VEGF プロモーターに関連するヒストン H4 又は H3 のアセチル化に対するロミデプシンの作用について、ChIP 分析を用いて検討した。75 cm^2 フラスコに PC-3 細胞を 4×10^6 個で播種し、10% FCS、ペニシリン 50 単位/mL 及びストレプトマイシン 50 µg/mL を添加した高グルコース D-MEM 中、37ºC5% CO_2 下で一晩インキュベートした後、細胞をロミデプシン（5 ng/mL）存在下で 10% FCS、ペニシリン 50 単位/mL 及びストレプトマイシン 50 µg/mL を添加した低グルコース D-MEM 中、37ºC2% O_2 下で 2 時間インキュベートした。その後、細胞に最終濃度 1%となるようにホルムアルデヒドを添加し、37ºC で 10 分間インキュベートした。培地を除去して、セリンプロテアーゼ阻害剤のフェニルメチルスルフォニルフルオリド（0.1 mM）を含有する氷冷 PBS 1 mL 中に細胞を懸濁した。次に 0.5 mL の SDS 溶解緩衝液（1% SDS/10 mM EDTA/50 mM Tris-HCl、pH 8.1）で再懸濁して、氷上で 10 分間インキュベートした。細胞溶解物を超音波破砕し、遠心分離により検体から細胞片を除去した。クロマチン調製物の一定分量を採取し、インプットフラクションとした。次に上清を免疫沈降緩衝液で 5 倍希釈し、超音波破砕したサーモン精子 DNA 20 µg 及び BSA を含有する 50%プロテイン A セファロース懸濁液 80 µL を添加し、4ºC で 30 分間インキュベートした。セファロースビーズを遠心分離によりペレット化し、上清を抗アセチルヒストン H3 抗体又は抗アセチルヒストン H4 抗体を含有する別の試験管に入れて、4ºC で一晩インキュベートした。プロテイン A セファロース懸濁液を添加して 1 時間インキュベートした後にプロテイン A 複合体を遠心分離して、5 回洗浄した。免疫複合体は 2 回溶出した。5 M NaCl 溶液を複合体溶出液に添加して、検体を 65ºC で 4 時間インキュベートした。免疫沈降した DNA をフェノール／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿により回収した後、PCR により分析した。

ロミデプシンは、VEGF 遺伝子プロモーターに関連するアセチル化ヒストンのクロマチンへの蓄積を誘発した。ヒストン H3 及び H4 のアセチル化量は、VEGF プロモーターの P2 領域（VEGF mRNA

発現の制御に重要な役割を有する HIF-1 結合部位を含む領域）で最も高値であった。イントロン (I) 1 領域ではヒストン H3 のアセチル化は増加したが、H4 のアセチル化の増加はみられなかった。E3 領域ではヒストン H3 及び H4 ともにアセチル化の増加はみられなかった。これらの結果から、ロミデプシンは VEGF プロモーター領域、特に P2 領域においてヒストンアセチル化を誘発することが示唆された。

以上のように、ロミデプシンはロミデプシン感受性 PC-3 細胞株において、2 つの重要な血管新生因子である VEGF 及び bFGF の mRNA 発現を抑制した。一方、ロミデプシン非感受性 ACHN 細胞株においては、ロミデプシンは bFGF mRNA 発現のみを抑制した。低酸素状態下の PC-3 細胞株では、ロミデプシンは、重要な転写因子 HIF-1α の発現量を変化させることなく VEGF mRNA の発現を抑制した。ロミデプシンによるヒストン H3 及び H4 のアセチル化は VEGF プロモーターの P2 領域（HIF-1α 結合部位を含む領域）で最も高かった。これらの結果から、ロミデプシンが VEGF プロモーターの重要な調節領域においてヒストンアセチル化を誘発することにより、VEGF プロモーターへの HIF-1α の結合が阻害されて VEGF 遺伝子発現が抑制されること、また、この抑制が PC-3 細胞のロミデプシン感受性に寄与している可能性が示唆された。

2.2. In vivo 試験

ロミデプシンの *in vitro* 試験で認められた抗腫瘍効果の機序を特定することを目的として *in vivo* 試験を実施した。これらの *in vivo* 試験では、ロミデプシンに高感受性な腫瘍の特定に重点を置くとともに、これらの腫瘍のロミデプシン療法への感受性に関与する鍵となる遺伝子を特定するために、ロミデプシン投与後の遺伝子発現量の変化を検討した。また、生体内で抗腫瘍効果が得られる最適な投与レジメン（投与スケジュール及び投与経路）について検討する試験を実施した。

実施した *in vivo* における効力を裏付ける試験の一覧を Table 5 に示す。

Table 5:　ロミデプシンで実施した in vivo における効力を裏付ける試験

試験番号	試験の表題	試験の種類	試験系	添付資料番号
CRE040010	遺伝子発現プロファイルを指標とした HDAC 阻害剤の抗腫瘍作用の予測	細胞傷害活性、遺伝子発現	ヌードマウス	4.2.1.1.1
CRE040013	ヒトリンパ腫由来細胞株 U-937 細胞に対する新規 HDAC 阻害剤 FK228 の *in vitro* 及び *in vivo* での作用検討	細胞傷害活性	SCID マウス	4.2.1.1.2
CRR910025	FR901228 の抗腫瘍作用と毒性：非臨床薬理試験	細胞傷害活性	マウス	4.2.1.1.4
CRE000198	ヒト腫瘍細胞異種移植モデルでの FK228 の抗腫瘍活性	細胞傷害活性	ヌードマウス	4.2.1.1.8
CRE010158	遺伝子発現を指標とした FK228 の抗腫瘍作用の予測	遺伝子発現	ヌードマウス	4.2.1.1.5
CRE040012	新規 HDAC 阻害剤 FK228 の血管形成因子の発現に対する作用に依存した抗腫瘍作用	遺伝子発現	ヌードマウス	4.2.1.1.7
CRE010131	ヒト腫瘍細胞異種移植ヌードマウスにおける FK228 の抗腫瘍活性	細胞傷害活性	ヌードマウス	4.2.1.1.9

2.2.1. 遺伝子発現プロファイルを指標としたロミデプシンの抗腫瘍作用の予測

［試験番号 CRE040010、添付資料 4.2.1.1.1、参考資料］

本試験では *in vivo* における 4 種類のヒト異種移植腫瘍（ヒト前立腺がん由来 PC-3 細胞、ヒト腎がん由来 ACHN 細胞及び A498 細胞、ヒト胃がん由来 SC-6 細胞）に対する増殖抑制作用に関与する遺伝子を特定するために、遺伝子発現量の時間依存性変化について検討した。

ヒト由来各種固形腫瘍（PC-3、ACHN、A498 及び SC-6 細胞）片（3 × 3 × 3 mm）をヌードマウスの右側腹部に移植した。推定腫瘍重量が 100～300 mg に到達した時点で、動物を 1 群 6 例に分けて、ロミデプシン（1.8 及び 3.2 mg/kg）を 4 日ごとに計 3 回静脈内投与した。腫瘍重量の計算式は、腫瘍重量（mg）$= L \times W^2/2$（L 及び W はそれぞれ腫瘍の長軸径及び短軸径のミリメートル値を示す）とした。抗腫瘍効果は最終投与後約 10 日の時点で評価した。

生体内でロミデプシンにより制御される遺伝子を特定するために、これらの異種移植がんから全 RNA を単離して、Affymetrix 社の FL GeneChip を用いて、標的 RNA のハイブリダイゼーションを行った。データ解析には GeneSpring ソフトウェアを用いた。異種移植した PC-3、SC-6、A498 及び ACHN 細胞の RNA 発現プロファイルにおける時間依存的な変化を解析し、発現量が 100 以上かつ、ロミデプシン感受性腫瘍と非感受性腫瘍の間で発現量が 2 倍以上異なる遺伝子を特定した。

また、セリン/スレオニンとチロシンの両方のアミノ酸をリン酸化する能力を持つ酵素である二重特異性フォスファターゼ 1（DUSP1）及びカスパーゼ 9 の mRNA 発現量を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）により確認するために、上述と同様の異種移植モデル動物から RNA を抽出して逆転写させた。PCR は組換え Taq DNA ポリメラーゼを用いて実施した。また、DUSP1、カスパーゼ 9 及び β-アクチンのプライマーを調製した。

ロミデプシンは PC-3 及び SC-6 異種移植モデルにおいて抗腫瘍効果を示したが、 ACHN 及び A498 移植モデルでは抗腫瘍効果を示さなかった。ロミデプシンは 3.2 mg/kg の用量で PC-3 移植腫瘍の増殖を 98%抑制し、 SC-6 移植腫瘍を中等度退縮させた。

ロミデプシン感受性腫瘍（PC-3 及び SC-6）とロミデプシン非感受性腫瘍（ACHN 及び A498）の遺伝子発現プロファイルを比較し、いずれかの腫瘍に一般に高発現又は低発現する遺伝子を特定した。その結果、ロミデプシン感受性腫瘍細胞では発現量が高く、非感受性腫瘍細胞では発現量が低い 27 の遺伝子及びロミデプシン感受性腫瘍細胞では発現量が低く、非感受性腫瘍細胞では発現量が高い 49 の遺伝子が見出された。これらの遺伝子の一覧を Table 6 及び Table 7 に示す。ロミデプシン非感受性腫瘍（A498 及び ACHN）と比較して、ロミデプシン感受性腫瘍（PC-3 及び SC-6）ではカスパーゼ 9（アポトーシス促進分子）の発現量は 3 倍以上高く、DUSP1（細胞増殖、アポトーシスの鍵となる調節因子）の発現は 1/2 未満であった。

GeneChip 解析により認められた発現パターンを定量的 RT-PCR により確認した結果、ロミデプシン感受性腫瘍でカスパーゼ 9 の mRNA 量が有意に高く、ロミデプシン非感受性腫瘍では DUSP1 の mRNA 量が同様に低いことが示され、これら遺伝子の GeneChip 解析の結果と定量的 RT-PCR の結果は一致することが示された。　以上これらの試験から、ロミデプシン感受性腫瘍とロミデプシン非感受性腫瘍との間で遺伝子発現プロファイルが異なることが確認された。特に、細胞増殖及びアポトーシスにおいて重要な機能的役割を有する 2 つの遺伝子（DUSP1 及びカスパーゼ 9）がロミデプシン感受性と相関することが明らかとなった。これらの試験から、ロミデプシンは遺伝子発現量を変化させて細胞増殖を阻害し、アポトーシスを誘導することにより抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。

Table 6:　ロミデプシン感受性腫瘍において発現量が高く、ロミデプシン非感受性腫瘍において発現量が低い遺伝子の一覧

アクセッション番号	遺伝子
L11005	Aldehyde oxidase 1
X12517	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C
U43944	Malic enzyme 1, soluble
U52100	Epithelial membrane protein 2
U65579	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8 (23kD) (NADH-coenzyme Q reductase)
X06272	Signal recognition particle receptor (「docking protein」)
D42047	The ha3662 gene product is related to mouse glycerophosphate dehydrogenase
D90086	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta
U61734*	Protein trafficking protein (S31iii125)
J03798	Small nuclear riboprotein Sm-D
X05299	Centromere protein B (80kD)
L34155	Laminin, alpha 3 (nicein (150 kD), kalinin (165kD), BM600 (150kD), epilegrin)
U60521	Caspase 9, apoptosis-related cysteine protease
Y10807	HMT1 (hnRNP methyltransferase, S. cerevisiae)-like 2
U44754	Small nuclear RNA activating complex, polypeptide 1, 43 kD
U78107	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, gamma
U60644	Similar to Vaccinia virus HindIII K4L ORFand to vaccisia virus P37 (HindIII F13L ORF)
U32986	Damage-specific DNA binding protein 1 (127kD)
D59253	RNA-binding protein that has two RNP consensus motifs
U41767	A disintegrin and metalloproteinase domain 15 (metargidin)
U10550	Source：Human Gem GTPase (gem) mRNA, complete cds.
D38521	The ha0919 gene product is novel
J04823	Cytochrome c oxidase subunit VIII
M21154	S-adenosylmethionine decarboxylase 1
X78565	Hexabrachion (tenascin C, cytotactin)
D50405	Histone deacetylase 1
X04366	Calpain, large polypeptide L1

* 試験報告書作成後にパブリックドメインデータベース（BLAST、GBD、TIGR 及び NCBI Entrez Genome Project を含む）により特定された遺伝子

Table 7:　ロミデプシン感受性腫瘍において発現量が低く、ロミデプシン非感受性腫瘍において発現量が高い遺伝子の一覧

アクセッション番号	遺伝子
U84487	Small inducible cytokine subfamily D (Cys-X3-Cys), member 1 (fractalkine, neurotactin)
M33600	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 5
J03474	Amyloid A precursor
L24564	Ras-related associated with diabetes
J05428	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B7
L03840	Fibroblast growth factor receptor 4
M35878	Insulin-like growth factor binding protein 3
HG4318-HT4588*	Lim-Domain Transcription Factor Lim-1
X87241	FAT tumor suppressor (Drosophila) homolog
M59807	Natural killer cell transcript 4
HG2379-HT3996*	Serine hydoxymethyltransferase
D16532	Very low density lipoprotein receptor
U37546	Apoptosis inhibitor 1
X72889	Source：H. sapiens hbrm mRNA
U66838	Cyclin A1
Z23090	Heat shock 27kD protein 1
U16031	Signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced alternative splicing（see also D84107-D84111）
D84110	RNA binding protein-multiple splicing (type 4)
M55998*	Neuroblastoma candidate region, suppression of tumorigenicity 1
D28124	Neuroblastoma,candidate region suppression of tumorigenicity 1
HG3548-HT3749*	CCAAT displacement protein
X86809	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15
M79462	Promyelocytic leukemia
M59465	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)
HG2379-HT3997*	Gene identity not available
Z36715	ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)Note：symbol and name provisional
U41654	Putative GTP-binding protein, homolog of small GTPase family members
U72882	Source：human interferon-induced leucine zipper protein (IFP35) mRNA, partial cds.
U72649	Rat PC3 and murine TIS21 genes homolog
U47621*	Nucleolar autoantigen No55
L22214	Adenosine A1 receptor
U68494	Source：Human hbc647 mRNA sequence
X69699	Paired box gene 8
X63717	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6
U04285*	Lysosomal acid lipase
L38969	Source：homo sapiens thrombospondin 3 (THBS3) mRNA, complete cds.
Y10032	Sours: H. sapiens mRNA for putative serine/threonine protein kinase
L48513	Paraoxonase2
U89942	Lysyl oxidase-like 2
Z12173	Glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase (Sanfilippo disease IIID)
U59423	Sma and Mad homolog
X68277	Dual specificity phosphatase1
U45878	HIAP-1
L08187*	Cytokine receptor (EBV latent induced)
X71874	Proteasome (prosome, macropain) subunit
D50863	Beta type, 10
X91911	Testis-specific kinase 1
U65011	Encodes tumor antigen recognized by cytolytic T lymphocytes
U90313	Glutathione-S-transferase like

* 試験報告書作成後にパブリックドメインデータベース（BLAST、GBD、TIGR 及び NCBI Entrez Genome Project を含む）により特定された遺伝子

2.2.2.　ヒトリンパ腫由来 U-937 細胞移植モデルにおけるロミデプシンの効果

［試験番号 CRE040013、添付資料 4.2.1.1.2、参考資料］

ヒトリンパ腫 U-937 細胞を SCID マウスの腹腔内に移植し、生存率を指標にロミデプシンの効果を検討した。

8 週齢以上の雄 SCID マウスに 150 mg/kg のシクロホスファミド（CPM）を腹腔内投与し、翌日（試験 0 日）に U-937 細胞（1×10^7 個）を腹腔内に移植した。試験 1 日からマウスに溶媒又はロミデプシンを 0.1、0.18、0.32、0.56 及び 1.0 mg/kg の用量で週 1 回又は 2 回腹腔内投与した。各ロミデプシン投与群には 6 例、溶媒対照群（10% HCO60/生理食塩液、週 2 回投与）には 12 例のマウスを用いた。投与容量は 10 mL/kg とした。観察期間は試験 60 日までとし、生存期間中央値（MST）を指標として抗腫瘍効果を評価した。

溶媒対照群の MST は 20 日であり、試験 18 日に 1 例目が死亡した。ロミデプシン投与群の MST は検討したすべての用量で溶媒対照群に比較して有意に延長した。ロミデプシン投与群の MST は週 1 回投与で 22.5～30.5 日（0.56 mg/kg）、週 2 回投与で 25～33 日（0.32 mg/kg）であった。60 日間の評価期間終了時では 0.56 mg/kg の週 1 回及び週 2 回投与群の各 6 例中 1 例が生存した。試験 24 日では 0.18 及び 0.56 mg/kg の週 1 回投与群及び 0.32 及び 0.56 mg/kg の週 2 回投与群の全例が生存したが、溶媒対照群では 12 例中 11 例が死亡した。1 mg/kg の週 1 回投与群の 1 例及び 1 mg/kg の週 2 回投与群の 1 例は、溶媒対照群の 1 例目が死亡する前に死亡した。

以上、マウスリンパ腫モデルにおいて、ロミデプシンの投与により MST が有意に延長した。この *in vivo* での結果と *in vitro* での結果（2.6.2.2.1.2 項参照）から、リンパ腫においてロミデプシンが抗腫瘍効果を発揮する機序は、遺伝子発現量を変化させることによる細胞周期阻害、アポトーシス及び腫瘍細胞の分化誘導を介するものであると考えられた。

2.2.3.　ロミデプシンの抗腫瘍作用及び作用機序

［試験番号 CRR910025、添付資料 4.2.1.1.4、参考資料］

マウス腹水腫瘍及び固形がん並びにヒト腫瘍細胞異種移植モデルに対するロミデプシンの抗腫瘍効果を検討した。また、他の化学療法剤に交差耐性を示す P338 腫瘍細胞を用いたロミデプシンの抗腫瘍効果の評価も行った。以下の試験は、各投与群 10 匹のマウスを用いた。

2.2.3.1.　マウス腹水腫瘍に対するロミデプシンの効果

マウス腹水腫瘍（マウス白血病 P388 及び L1210、マウスメラノーマ B16 細胞を腹腔内に移植して作成）に対するロミデプシンの抗腫瘍効果を検討した。試験 0 日にマウスに腫瘍を腹腔内に移植した。P388 細胞を移植したマウスにはロミデプシンを試験 1 日から連続 5 日間、 L1210 細胞又は B16 細胞を移植したマウスには試験 1 日から連続 9 日間、腹腔内投与した。ロミデプシンの用量は 0.032、0.056、0.1、0.18、0.32、0.56、1.0 及び 1.8 mg/kg とした。ロミデプシンは、これら 3 種（P388、L1210 及び B16 細胞）の腫瘍細胞移植腹水腫瘍マウスの生存期間を延長した。P388 細胞移植マウスでは、ロミデプシン投与群で最長 138%の生存期間延長が認められた。L1210 細胞移植マウスでは、ロミデプシン投与群で最長 129%の生存期間延長が認められた。また、 B16 細胞移植マウスでは、ロミデプシン投与群で最長 174%の生存期間の延長が認められた。

2.2.3.2.　マウス固形がんに対するロミデプシンの効果

6 種類のマウス固形がん（結腸がん Colon 38 及び Colon 26、細網肉腫 M5076、B16 メラノーマ、ルイス肺がん、肉腫 Meth A）に対するロミデプシンの抗腫瘍効果を検討した。試験 0 日に腫瘍を皮下

又は皮内移植した。ロミデプシンは 0.32、0.56、1.0、1.8、3.2、5.6 及び 10 mg/kg の用量を 3 日ごとに計 3 回又は 4 回静脈内投与した。

移植 1 日後からロミデプシンを投与した場合には、Colon 38、B16 及び M5076 の増殖が 58%以上抑制されたが、ルイス肺がん、Colon 26 及び Meth A に対する増殖抑制作用はみられなかった。しかし、ロミデプシンを腫瘍移植 4～7 日後から投与した場合には、Colon 38、M5076 及び Meth A の増殖が 76～95%抑制された。

2.2.3.3. ヒト腫瘍細胞異種移植モデルにおけるロミデプシンの効果

9 種類のヒト腫瘍（肺がん LX-1、LU-65、A549、LC-6 及び PC-9、胃がん SC-6、結腸がん Colo201、並びに乳がん MX-1 及び MCF-7）をヌードマウスの皮下に移植した異種移植モデルに対するロミデプシンの抗腫瘍効果を検討した。ロミデプシンは 1.8、3.2、5.6 及び 10 mg/kg の用量を、4 日ごとに計 3 回静脈内投与した。

ロミデプシンは、 LU-65、LC-6、SC-6 及び MX-1 の増殖を 80%以上抑制した。

2.2.3.4. 薬剤耐性 P388 白血病細胞移植モデルにおけるロミデプシンの効果

薬剤耐性腫瘍に対するロミデプシンの有効性を検討するために、ADR、マイトマイシン C（MMC）、フルオロウラシル（5FU）、シクロホスファミド（CPM）又はビンクリスチン（VCR）のいずれかに耐性を示す白血病 P388 細胞を試験 0 日にマウスに腹腔内移植した。移植 1 日後からロミデプシンを 0.18、0.32、0.56 及び 1.0 mg/kg の用量で 1 日 1 回、4 日間腹腔内投与した。有効性は MST により評価した。

ロミデプシンは検討したすべての用量で MMC、5FU、VCR 及び CPM 耐性白血病 P388 細胞に対して有効性を示した。ロミデプシンは ADR 耐性白血病 P388 細胞に対しては検討したいずれの用量でも有効性を示さなかった。

以上の試験結果から、ロミデプシンは有意な抗腫瘍効果を有することが明らかとなり、腹水担がんマウスの生存期間の明らかな延長及びマウス及びヒト固形がんの著明な増殖抑制を示した。特筆すべきは、ロミデプシンは、ADR を除いて、検討した他の標準的化学療法剤（MMC、5FU、VCR、CPM）と交差耐性を示さなかった。本結果は、従来の薬剤耐性腫瘍の治療においてロミデプシン療法の適用が奏効する可能性を示すものであり、臨床的意義は高いと考えられる。

2.2.4. ヒト腫瘍細胞異種移植モデルでのロミデプシンの抗腫瘍活性

［報告書番号 CRE000198、添付資料 4.2.1.1.8、参考資料］

ヒトメラノーマ LOX（IMVI）細胞及び UACC-62 細胞、ヒト非小細胞肺がん NCI-H522 細胞、並びにヒト乳がん MX-1 細胞の皮下移植モデルを用いてロミデプシンの抗腫瘍効果を評価した。本試験では各種の投与経路及び投与スケジュールを含む複数の投与レジメンについても検討した。腫瘍退縮に関する評価項目は、部分／完全退縮、特定日の相対増殖率［投与群／対照群（T/C）］、腫瘍移植 6 日後の腫瘍重量中央値、腫瘍移植 75 日後の腫瘍の有無、倍加時間中央値（日）、腫瘍増殖抑制［（T-C）／C］及び殺腫瘍細胞数の対数変換値（Net log cell kill 値）とした。

ヒトメラノーマ LOX（IMVI）細胞及び他の細胞株はともにヌードマウスに皮下移植した。約 30 mg の腫瘍を皮下に移植後、腫瘍重量中央値が 220 mg に到達した時点（移植 6 日後）に薬剤の投与を開始した。腫瘍増殖抑制は、移植後に腫瘍が評価サイズに到達するまでの時間の中央値についての投与群と溶媒対照群の差で判断した。各投与群ともに 10 匹のヌードマウスを用いて試験した。

T-C 値（日）は、非特異的死亡例、腫瘍が消失した生存例及び腫瘍が評価サイズに達しなかった例は評価から除外した。

腫瘍重量が 2 倍になるまでに要した時間は、投与開始時の腫瘍重量に基づいて算出した。腫瘍重量は、算出値が 2 倍となるまで記録した。倍加時間は、腫瘍退縮前ではなく、最終腫瘍増殖段階に算出していることを確認するために、最終記録以降も検査した。測定間の値は指数関数により外挿して算出したが、外挿値が動物の死亡前であった場合は、最終測定重量以降の値を算出していた可能性がある。

腫瘍退縮は、非特異的死亡例を除いて、投与後の腫瘍重量の最小値（投与開始時の腫瘍重量との比較）が投与開始時の 50%未満となった場合を部分退縮とし、腫瘍が触知不能となった場合を完全退縮とした。一部の試験では、退縮期間（部分／完全退縮と分類された腫瘍が投与開始時の 50%未満の腫瘍重量となるまでの期間）を示した。

2.2.4.1. ヒトメラノーマ LOX（IMVI）細胞異種移植モデルにおけるロミデプシンの効果

ロミデプシンの各用量を 2 通りの投与スケジュールで投与したときの皮下移植メラノーマ LOX（IMVI）に対する作用を評価した。結果の概要を Table 8 に示す。1 コースレジメンでは、腫瘍移植 6 日後からロミデプシンを 8.0、5.3 又は 3.6 mg/kg の用量で 4 日ごとに計 3 回静脈内投与した。また、一部の動物には、2 コースレジメンを行い、第 1 回目に引き続き 2 回目のレジメンとして、移植 23 日後から 2.4 及び 1.6 mg/kg を投与した。対照群には溶媒（25% PEG 400／蒸留水）のみを投与した。ロミデプシンの投与により、1 コースレジメン動物では 8.0、5.3 及び 3.6 mg/kg の用量群でそれぞれ 35.7、24.1 及び 21.9 日の腫瘍増殖抑制がみられ、2 コースレジメン動物では 2.4 及び 1.6 mg/kg 用量群でそれぞれ 33.3 及び 19.9 日の腫瘍増殖抑制がみられた。投与期間終了時の Net log cell kill 値（倍加時間 1.5 日を使用）は、1 コースレジメン動物では 8.0、5.3 及び 3.6 mg/kg の用量群でそれぞれ 5.6、3.2 及び 2.8（log10 unit）であり、2 コースレジメン動物の 2.4 及び 1.6 mg/kg の用量群でそれぞれ 2.7 及び 0.0 であった。1 コースレジメン動物の高用量群では、より高い殺腫瘍細胞数が得られたことを反映して、より多数の動物において腫瘍の完全退縮が認められ、8.0 mg/kg 群では 10 例全例が投与期間中に腫瘍の完全退縮が認められた。

本試験で検討したすべてのロミデプシン用量及びレジメンにおける忍容性は良好であり、明らかな毒性はみられなかったが、すべての投与群において有意な体重減少が認められた。本モデルにおけるロミデプシンの MTD は 8.0 mg/kg と考えられたが、この時の平均体重減少率は 20%であった。

本試験で検討したロミデプシンの用量及びレジメンはいずれも良好な忍容性を示すとともに、メラノーマ LOX（IMVI）に対して有効であることが、完全／部分退縮の例数、腫瘍移植 75 日後の無腫瘍マウス、倍加時間中央値（日）の遅延、腫瘍増殖遅延及び Net log cell kill 値により示された。生存、腫瘍退縮及び腫瘍細胞死から、高用量の 1 コースレジメンがより優れたレジメンであると考えられた。

Table 8:　ヒトメラノーマ LOX（IMVI）細胞異種移植モデルにおけるロミデプシンの効果（静脈内投与、4 日ごとに 3 回）

評価項目	投与量（mg/kg）					
	0	**8.0**	**5.3**	**3.6**	**2.4[a]**	**1.6[a]**
生存期間中央値（日）[b]	19.0	61.0	47.0	49.0	51.0	46.0
生存期間延長率の中央値（%）	--	221	147	157	168	142
死亡例	0	0	0	0	1	1
体重減少率の最大値（%）	9.3	19.9	15.1	11.2	12.9	11.9
部分退縮	0	0	0	3	4	1
完全退縮	0	10	9	6	4	1
退縮期間の中央値／範囲（日）	--	25.0 15–47	18.6 15–42	12.9 10–23	24.8 7–31	18.6 10–27
移植 75 日後の腫瘍消失例数	0/20	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10
最適%T/C	UE[c]	UE[c]	UE[c]	UE[c]	UE[c]	UE[c]
移植 6 日後の腫瘍重量の中央値（mg）	221.0	236.0	250.5	263.0	245.0	256.0
倍加時間中央値（日）	2.6	38.3	26.7	24.5	35.9	22.5
倍加時間中央値の対照群との差（T-C、日）	--	35.7	24.1	21.9	33.3	19.9
腫瘍増殖抑制率［(T-C)/C、%］	--	870	524	493	720	502
殺腫瘍細胞数の対数変換値（Net log cell kill）	--	8.00	4.00	3.70	2.00	–0.50

[a] 第 1 コースレジメンに続き、第 2 コースレジメンとして、移植後 23 日目から初回投与スケジュールを繰り返す。
[b] 無腫瘍生存動物（「治癒」及び腫瘍重量 < 63 mg）を除く。
[c] UE：評価不可能、T/C の算出が可能な対照例数が投与終了前に 67%未満に低下したために、いずれの投与群においても最適%T/C 値を算出しなかった。

2.2.4.2.　ロミデプシンの静脈内投与と腹腔内投与との比較

ヒトメラノーマ LOX（IMVI）を皮下に異種移植した雌のヌードマウスを用いて、ロミデプシンを各種投与スケジュールで静脈内投与及び腹腔内投与したときの作用を比較した。投与は腫瘍移植 4 日後から開始した。本試験の結果を Table 9 に要約した。

Table 9:　ヒトメラノーマ LOX（IVMI）のロミデプシンに対する反応

用量（mg/kg）	投与経路	投与スケジュール	死亡（例）	最大体重減少率（%）	部分退縮（例）	完全退縮（例）	移植 37 日後の腫瘍消失例	最適 T/C（%）	移植 4 日後の腫瘍重量中央値	倍加時間中央値（日）	腫瘍増殖遅延 [(T-C)/C,%]	殺腫瘍細胞数の対数変換値 (Net log cell kill)
対照	腹腔内	1 日 1 回、連続 5 日間	0	4.9	0	0/20	0/20	--	100.0	3.2	--	--
8.00	静脈内	腫瘍移植 4 日後から 4 日ごとに計 3 回投与	0	19.6	0	10/10	0/10	–50	125.5	28.4	788	3.70
5.30			0	14.8	0	10/10	0/10	–50	126.0	24.4	661	2.80
3.60	静脈内	腫瘍移植 4 及び 22 日後から 4 日ごとに計 3 回投与	0	13.1	0	9/10	1/10	–100	104.0	33.0	931	0.80
2.40			0	0.0	0	8/10	0/10	–100	100.0	25.4	692	–0.80
2.16	静脈内	腫瘍移植 4 日後から 1 日 1 回 5 日間 投与	4	17.9	0	3/10	0/10	ND	94.0	20.0	525	2.80
1.44			0	14.7	0	3/10	0/10	–25	100.0	15.4	381	1.80
0.96	静脈内	腫瘍移植 4 日後から 1 日 1 回 4 日間+腫瘍移植 18 日目から 1 日 1 回 3 日間 5,6,7,8,18,19,20）投与	0	16.9	0	0/10	0/10	–19	108.0	15.9	395	–0.70
0.64			6	16.3	0	0/10	0/10	ND	117.0	6.9	114	–2.70
1.44	腹腔内	腫瘍移植 4 日後から 1 日 1 回、連続 5 日間 投与	0	10.8	0	0/10	0/10	56	100.0	4.2	30	–0.70
0.96			1	13.7	0	0/10	0/10	81	108.0	4.1	28	–0.70
0.64			0	12.8	0	0/10	0/10	85	104.0	3.6	13	–0.80
0.43			3	11.0	0	0/10	0/10	58	100.0	4.1	28	–0.70
5.30	腹腔内	腫瘍移植 4 日後から 1 日 1 回、4 日ごとに計 3 回投与	3	10.8	0	2/10	0/10	2	108.0	16.1	403	1.10
3.60			3	8.1	0	0/10	0/10	16	100.0	5.4	69	–1.20
2.40			2	7.8	0	0/10	0/10	39	104.0	4.8	48	–1.40
1.60			0	13.8	0	0/10	0/10	67	94.0	4.0	23	–1.60
0.66	腹腔内	腫瘍移植 4 日及び 8 日後に 3 時間ごとに計 8 回投与	10	18.1	0	0/10	0/10	ND	--	--	--	--
0.45	腹腔内	腫瘍移植 4 日、8 日及び 12 日後に 3 時間ごとに計 8 回投与	10	18.4	0	0/10	0/10	ND	--	--	--	--
0.30			10	9.2	0	0/10	0/10	ND	--	--	--	--
0.20			5	12.9	0	0/10	0/10	ND	108.0	4.8	50	–1.70
0.0			0	2.6	0	0/10	0/10	--	104.0	4.5	--	--

注：3.60 及び 2.40 mg/kg の用量群では、第 1 コースレジメンに続き、第 2 コースレジメンとして試験 22 日から 4 日ごとに計 3 回の投与を反復した。
雌マウス（各投与群 n=10）
ND：解析生存動物例が少数であったために本値は算出しなかった。
T/C：抗腫瘍効果の指標として算出した相対的増殖率（投与群／対照群）

2.2.4.3. 静脈内投与

静脈内投与（4 日ごとに計 3 回投与）により、ヒトメラノーマ LOX （IVMI）細胞異種移植モデルにおいて強力な抗腫瘍効果が認められた。8 及び 5.3 mg/kg の用量で、10 例全例のマウスが腫瘍完全退縮を示し、腫瘍増殖の遅延は平均でそれぞれ 788%及び 661%であった。また、これら 2 用量での Net log cell kill 値はそれぞれ 3.70 及び 2.80 であった。前項の試験と同様に、いずれの用量でも明らかな毒性は認められなかったが、投与後に有意な体重減少が認められ、特に 8 mg/kg の用量では 19.6%の体重減少が認められた。

試験 22 日に 3.60 又は 2.40 mg/kg の用量で 2 コース目の投与を開始したところ、腫瘍完全退縮を示した動物数はそれぞれ 9 例及び 8 例となった。対照群（25% PEG／蒸留水を投与したマウス）と比較して、3.60 及び 2.40 mg/kg の用量での腫瘍増殖の遅延はそれぞれ 931%及び 692%であり、また、投与終了時の Net log cell kill 値はそれぞれ 0.80 及び 0.0（-0.80）であった。3.60 mg/kg の用量での 2 コースの静脈内投与による体重減少は 13.1%であり、他に明らかな毒性は認められなかった。2.40 mg/kg の用量では、体重減少及び明らかな毒性は認められなかった。

ロミデプシンを 2.16 又は 1.44 mg/kg の用量で 1 日 1 回、5 日間静脈内投与したときの腫瘍完全退縮を示した動物は各用量で 3 例であった。2.16 又は 1.44 mg/kg の用量での腫瘍増殖遅延は平均でそれぞれ 525%及び 381%、Net log cell kill 値はそれぞれ 2.80 及び 1.80 であった。本スケジュールの 2.16 mg/kg の用量では平均体重減少率は 17.9%であり、試験完了前の死亡動物は 10 例中 4 例であった。1.44 mg/kg の用量での忍容性はより良好であり、死亡例はなく、平均体重減少率は 14.7%であった。

ロミデプシンを 0.96 及び 0.64 mg/kg の用量で試験 4、5、6、7、8、18、19 及び 20 日に静脈内投与したときには、いずれの動物にも腫瘍退縮はみられなかった。また、0.96 及び 0.64 mg/kg の用量での腫瘍増殖遅延はそれぞれ 395%及び 114%、Net log cell kill 値は 0.0（それぞれ-0.70 及び-2.70）であった。また、平均体重減少率は両用量で 16%であった。いずれの用量でも部分退縮及び完全退縮はみられなかった。0.64 mg/kg 投与群では試験中に 6 例が死亡した。0.96 mg/kg 投与群では死亡例はなかった。低用量では死亡率が高く、高用量では死亡例はなかったことから、低用量投与群の動物は腫瘍の進行により死亡したと考えられた。

2.2.4.4. 腹腔内投与

ロミデプシンを連日、間歇的（4 日ごと）又は時間（3 時間）ごとのいずれかで腹腔内投与したときには有意な抗腫瘍効果は認められなかった。ただし、5.3 mg/kg の用量を 4 日ごとに投与した場合には 10 例中 2 例の動物が腫瘍退縮を示し、腫瘍増殖遅延は平均で 403%であった。この平均腫瘍増殖遅延率は、同用量を静脈内投与したときと比較して、やや低かった。ロミデプシンの腹腔内投与では、3 つの全スケジュールにおいて死亡例がみられ（特に 3 時間ごとのスケジュールでは試験完了前に 10 例全例が死亡）、静脈内投与よりも忍容性が低いと考えられた。

以上、ヒトメラノーマ LOX（IVMI）細胞異種移植マウスモデルにおいて、静脈内投与経路は腹腔内投与経路よりも有効性が高くかつ忍容性が良好であった。また、静脈内投与では、高用量の間歇投与レジメンの方が低用量での連日投与レジメンよりも優れていた。静脈内投与では腫瘍退縮を示した動物数の増加、腫瘍増殖遅延の延長及び Net log cell kill 値の増加が認められた。

2.2.4.5. ヒト非小細胞肺がん NCI-H522 細胞異種移植モデルにおけるロミデプシンの効果

本試験では、皮下異種移植したヒト非小細胞肺がん（NSCLC）NCI-H522 に対するロミデプシンの作用を評価した。雌のヌードマウスに腫瘍移植 13 日後からロミデプシンを 1.60～8 mg/kg の用量で 4 日ごとに計 3 回静脈内投与した。各投与群とも 10 匹のヌードマウスを用いて試験した。

本試験条件下でのロミデプシンの投与により、腫瘍増殖遅延及び Net log cell kill 値を指標とした場合に軽度な抗腫瘍効果が認められた（Table 10 ）。また、ロミデプシンの投与に関連して用量依存的な体重減少及び死亡例の増加がみられた。

以上、これらの試験で用いた用量及びスケジュールでは、ロミデプシンのヒト非小細胞肺がん由来 NCI-H522 異種移植モデルに対する作用は限定的であり、前項の試験と比較して忍容性も劣っていた。忍容性に差が認められた理由については不明であった。

Table 10: ヒト非小細胞肺がん NCI-H522 異種移植モデルにおけるロミデプシンの効果

評価項目	用量（mg/kg）					
	0	**8.0**	**5.3**	**3.6**	**2.4**	**1.6**
死亡（例）	0	7	2	3	1	1
最大体重減少率（%）	0	25.7	22.7	20.4	11.8	10.5
部分退縮（例）	0	0	0	0	0	0
完全退縮（例）	0	0	0	0	0	0
移植 46 日後の腫瘍消失例	0	0	0	0	0	0
%T/C（日）	65 (22)	毒性	25 (29)	23 (26)	40 (26)	54 (29)
移植 13 日後の腫瘍重量中央値（mg）	233	270	309	270	270	306
3 倍加時間中央値（日）	11.2	19.4	19.9	21.0	17.2	14.3
腫瘍増殖遅延［(T-C)/C、%］	10	90	95	106	69	40
殺腫瘍細胞数の対数変換値（Net log cell kill 値）		0.10	0.20	0.30	–0.10	–0.40

2.2.4.6.　ヒト進行メラノーマ UACC-62 細胞異種移植モデルにおけるロミデプシンの効果

ヒトメラノーマ UACC-62 細胞を皮下移植した雌のヌードマウスに移植 19 日後からロミデプシンを 1.60～8 mg/kg の用量で 4 日ごとに計 3 回静脈内投与した。各投与群ともに 10 匹のヌードマウスを用いて試験した。

ロミデプシンの投与に関連して用量依存的な体重減少がみられた。倍加時間中央値（日）、腫瘍増殖遅延及び Net log cell kill 値には有意な増加はみられなかった。

以上、これらの試験で用いた用量及びスケジュールでは、ロミデプシンのヒトメラノーマ UACC-62 細胞異種移植モデルに対する効果は限定的であった（Table 11 ）

Table 11: ヒト進行メラノーマ UACC-62 細胞異種移植モデルにおけるロミデプシンの効果

評価項目	用量（mg/kg）					
	0	**8.0**	**5.3**	**3.6**	**2.4**	**1.6**
死亡（例）	0	4	0	3	0	0
最大体重減少率（%）	9.8	20.6	19.1	15.5	16.3	9.9
部分退縮（例）	0	0	1	0	0	0
完全退縮（例）	0	0	0	0	0	0
移植 48 日後の腫瘍消失例	0	0	1	0	0	0
最適% T/C	44 (36)	毒性	15 (29)	13 (36)	28 (33)	32 (33)
移植 19 日後の腫瘍重量中央値（mg）	300	342	282	270	343	316
倍加時間中央値（日）	13.5	18.5	18.7	23.3	19.7	17.6
腫瘍増殖遅延［(T-C)/C、%］	42	95	97	145	107	85
殺腫瘍細胞数の対数変換値（Net log cell kill 値）		0.10	0.10	0.60	0.20	0.00

2.2.4.7.　ヒト進行乳がん MX-1 細胞異種移植モデルにおけるロミデプシンの効果

ヒト進行乳がん MX-1 細胞異種移植モデルにおけるロミデプシンの各種静脈内投与スケジュールでの効果を比較した。雌のヌードマウスに移植 11 日後から投与を開始した。対照群には溶媒（25% PEG 400／蒸留水）のみを投与した。投与スケジュール及び得られた結果を Table 12 に示す。各投与群とも 10 匹のヌードマウスを用いて試験した。

ロミデプシンの連続 5 日間静脈内投与により、検討した 2 つの高用量で毒性がみられた。3 倍加時間中央値（日）及び腫瘍増殖遅延の増加は軽度であった。0.64 mg/kg の用量では死亡例はなく、体重減少は 5.0%、腫瘍増殖遅延は 111%、Net log cell kill 値は 0.40 であった。0.96 mg/kg の用量では 2 例が死亡し、体重減少は 9.2%、腫瘍増殖遅延は 144%、Net log cell kill 値は 0.80 であった。1.44 mg/kg の用量では 9 例が死亡し、体重減少は 18.4%、腫瘍増殖遅延は 111%、Net log cell kill 値は 0.40 であった。最高用量の 2.16 mg/kg では 10 例全例が死亡し、更なる測定は実施しなかった。

ロミデプシンを試験 11 日から 4 日ごとに計 3 回静脈内投与したときには、最高用量で毒性がみられ、より低用量では抗腫瘍効果は軽度であった。2.40 mg/kg 群では死亡例はなく、体重減少は 5.6%、腫瘍増殖遅延は 155%、Net log cell kill 値は 0.10 であった。3.60 mg/kg 群では死亡例はなく、体重減少は 5.7%、腫瘍増殖遅延は 191%、Net log cell kill 値は 0.50 であった。5.30 mg/kg 群では死亡例はなく、体重減少は 14.0%、腫瘍増殖遅延は 182%、Net log cell kill 値は 0.40 であった。最高用量の 8.00 mg/kg では 9 例が死亡し、体重減少は 21.5%であり、腫瘍増殖遅延及び Net log cell kill 値は算出しなかった。

ロミデプシンを 4 日ごとに計 6 回投与したときには、最高用量の 3.6 mg/kg で毒性がみられた。抗腫瘍効果は、検討したすべての用量でみられたが、評価時点で対照動物の生存例は 2/3 未満であったため、特定のパラメータの評価が不可能であった。検討した最低用量の 1.07 mg/kg では 1 例のみが死亡し、体重減少は 4.5%、腫瘍増殖遅延は 167%、Net log cell kill 値は–2.20 であった。1.60 mg/kg 群では 1 例が死亡し、体重減少は 11.0%、腫瘍増殖遅延は 171%、Net log cell kill 値は–2.10 であった。2.40 mg/kg 群では 2 例が死亡し、体重減少は 12.3%、腫瘍増殖遅延は 220%、Net log cell kill 値は–1.60 であった。本スケジュールにおける試験最高用量の 3.60 mg/kg では 7 例が死亡し、体重減少は 6.8%、腫瘍増殖遅延は 318%、Net log cell kill 値は–0.50 であった。

ロミデプシンを週 1 回、計 4 回投与したときには、最高用量での忍容性は低く、3 倍加時間中央値（日）及び腫瘍増殖遅延の増加は軽度であった。2.40 mg/kg の用量では 3 例が死亡し、体重減少は

7.5%、腫瘍増殖遅延は 131%、Net log cell kill 値は–2.80 であった。3.60 mg/kg の用量では 6 例が死亡し、体重減少は 9.5%、腫瘍増殖遅延は 73%、Net log cell kill 値は–3.40 であった。5.30 mg/kg の用量では 7 例が死亡、体重減少は 18.5%、腫瘍増殖遅延は 296%、Net log cell kill 値は–0.90 であった。試験最高用量の 8.00 mg/kg では全例（10 例）が死亡したため、体重減少、腫瘍増殖遅延及び Net log cell kill 値は算出しなかった。

以上、異種移植進行乳がん MX-1 に対するロミデプシンの抗腫瘍効果は中等度であることが明らかとなった。本試験において検討した用量及びレジメンで、最も高い抗腫瘍効果が認められ、かつ忍容性が良好であった高用量は 2 つの間歇（4 日ごと）投与レジメンであった。

結論として、ロミデプシン感受性腫瘍の種類、並びに最適な抗腫瘍効果を得るための投与レジメン及び投与経路に関して腫瘍細胞移植動物モデルを用い、検討を行った。これらの試験において、ロミデプシンはメラノーマ LOX（IVMI）に対して強力な抗腫瘍効果を示したが、メラノーマ UACC-62 に対しては抗腫瘍効果を示さなかった。これら 2 種類のメラノーマ細胞株の感受性が異なる理由については解明されていない。検討した他種の固形がんのうち、ヒト進行乳がん MX-1 はヒト非小細胞肺がん NSCLC よりもロミデプシンに対する感受性が高かった。検討した多くの投与レジメンのうち、高用量での間歇投与は低用量での頻回投与よりも有効性が高くかつ忍容性が良好であった。これらの試験で検討した 2 つの投与経路のうち、静脈内投与経路は腹腔内投与経路よりも有効性が高くかつ忍容性に優れていた。

Table 12: 異種移植進行乳がん MX-1 のロミデプシンに対する反応

用量（mg/kg）	投与スケジュール	死亡	相対的平均総体重減少率の最大値（%）	部分退縮	完全退縮	移植 45 日後の無腫瘍例	% T/C [b]	移植 11 日後の腫瘍重量中央値（mg）	3 倍加時間中央値（日）	腫瘍増殖遅延 [(T-C)/C, %]	殺腫瘍細胞数の対数変換値 (Net log cell kill)
対照	--	0	体重減少なし	0	0/20	0/20	--	322.0	5.5	--	--
2.16	腫瘍移植 11 日後から連続 5 日間投与	10	体重減少なし	0	0/10	0/10	ND	--	--	--	--
1.44		9	18.4	0	0/10	0/10	ND	352.0	11.6	111	0.40
0.96		2	9.2	0	0/10	2/10	17 (17)	307.0	13.4	144	0.80
0.64		0	5.0	0	0/10	0/10	35 (17)	321.5	11.6	111	0.40
0.00		1	体重減少なし	0	0/10	0/10	43 (17)	288.0	8.4	53	--
8.00	腫瘍移植 11 日後から 4 日ごとに 3 回投与	9	21.5	0	0/10	0/10	ND	352.0	UE[a]	--	--
5.30		0	14.0	0	0/10	1/10	18 (20)	257.5	15.5	182	0.40
3.60		0	5.7	0	0/10	0/10	10 (20)	279.0	16.0	191	0.50
2.40		0	5.6	1	0/10	0/10	13 (20)	216.0	14.0	155	0.10
3.60	腫瘍移植 11 日後から 4 日ごとに 6 回投与	7	6.8	1	0/10	0/10	ND	198.0	23.0	318	–0.50
2.40		2	12.3	0	0/10	0/10	UE[a]	218.5	17.6	220	–1.60
1.60		1	11.0	0	0/10	1/10	UE[a]	252.0	14.9	171	–2.10
1.07		1	4.5	0	0/10	1/10	UE[a]	225.0	14.7	167	–2.20
8.00	腫瘍移植 11 日後から 7 日ごとに 4 回投与	10	体重減少なし	0	0/10	0/10	ND	--	--	--	--
5.30		7	18.5	0	0/10	0/10	ND	252.0	21.8	296	–0.90
3.60		6	9.5	0	0/10	0/10	ND	234.0	9.5	73	–3.40
2.40		3	7.5	0	0/10	0/10	UE[a]	234.0	12.7	131	–2.80

a UE：投与終了時に算出可能な対照群が 67%未満であったために、これらの群の評価不可能。
b T/C：抗腫瘍効果の指標として算出した相対的増殖率（投与群／対照群）。
ND：不明な毒性のために算出せず。

2.2.5. 遺伝子発現を指標としたロミデプシンの抗腫瘍作用の予測

［試験番号 CRE010158、添付資料 4.2.1.1.5、参考資料］

本試験は、遺伝子発現を指標としてロミデプシンの抗腫瘍効果を予測できるか否かについて検討することを目的とした。本 in vitro 試験（2.6.2.2.1.2.5 項に要約）では、$p21^{WAF1/Cip1}$ 及び c-myc の発現量とロミデプシンに対する相対的感受性は相関することを確認した。in vivo 試験では、ロミデプシン感受性ヒト前立腺がん PC-3 細胞又はロミデプシン非感受性ヒト腎臓がん ACHN 細胞を異種移植したマウスを用いて、ロミデプシンを投与したときの β-アクチン mRNA 発現量に対する $p21^{WAF1/Cip1}$ 及び c-myc mRNA の相対的発現量を検討した。

PC-3 及び ACHN 細胞はヌードマウス皮下に継代移植して維持した。腫瘍片（約 3 mm^3）を 7 週齢の雄ヌードマウスの右側腹部の皮下に移植（各腫瘍を 20 匹に移植）した。3 週後に、腫瘍重量がほぼ同程度になった担癌マウス 5 匹にロミデプシン 3.2 mg/kg を静脈内投与した。ロミデプシン投与前並びにロミデプシン投与 1、3、6 及び 24 時間後に腫瘍を摘出し、RNA を抽出して逆転写させた。サイバーグリーン PCR マスターミックス（PE Bio System 社、現 Thermo Fisher Scientific 社製）を用いたリアルタイム q-PCR により $p21^{WAF1/Cip1}$、c-myc 及び β-アクチンの発現量を測定した。$p21^{WAF1/Cip1}$ 及び c-myc の発現量は、β-アクチンの発現量に対する比として示した。時間 T= 0 における各値を 1 に設定し、2 倍以上の増加又は 50%以上の減少をそれぞれ有意と判定した。

PC-3 細胞では、ロミデプシン投与 1 及び 3 時間後に β-アクチン mRNA に対する $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA の相対的発現量が増加し、その後低下したが、24 時間でも基準発現量（時間 T 0）値より増加していた。PC-3 細胞における c-myc mRNA 発現量は顕著かつ速やかに減少し、β-アクチン mRNA に対する c-myc mRNA の比は、ロミデプシン投与 24 時間後に最小値に達した。対照的にロミデプシン非感受性の ACHN 細胞では、ロミデプシンによる $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA 発現量の変化は認められなかったが、c-myc mRNA の相対的発現量は基準発現量（時間 T=0）と比較して有意に増加した。

PC-3 細胞における β-アクチン mRNA に対する $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA の基準発現量の比は ACHN 細胞におけるよりも低かった。PC-3 細胞における β-アクチン mRNA に対する c-myc mRNA の基準発現量の比は ACHN 細胞よりも高かった。したがって、腫瘍細胞における β-アクチン mRNA に対する $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA の基準発現量の比及び β-アクチン mRNA に対する c-myc mRNA の基準発現量の比は、ロミデプシンの *in vivo* における抗腫瘍効果とそれぞれ負の相関及び正の相関を示すと考えられた。

結論として、ロミデプシンは遺伝子発現量と相関した抗腫瘍効果を示した。これらの結果から、$p21^{WAF1/Cip1}$ 遺伝子発現のアップレギュレーション及び c-myc 遺伝子発現のダウンレギュレーションは in vitro 及び in vivo で認められたロミデプシンの強力な抗腫瘍効果と関連することが示唆された。また、in vivo での抗腫瘍効果は $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA の基準発現量と負の相関を示し、c-myc mRNA の基準発現量（時間 T=0）と正の相関を示した。

2.2.6. ロミデプシンの抗腫瘍作用と血管形成因子の発現との相関性

［試験番号 CRE040012、添付資料 4.2.1.1.7、参考資料］

本試験は、血管新生因子の発現量に対するロミデプシンの in vivo 及び in vitro での作用をロミデプシン感受性ヒト前立腺がん PC-3 細胞及びロミデプシン非感受性ヒト腎臓がん ACHN 細胞を用いて検討することを目的とした。*in vitro* 試験の結果については 2.6.2.2.1.7 項で要約した。

固形腫瘍片をヌードマウスの右側腹部に皮下移植した。推定腫瘍重量が 100～300 mg に到達した時点で、ロミデプシン（3.2 mg/kg）を静脈内投与した。腫瘍重量は、計算式｛腫瘍重量（mg）= $L \times W^2/2$（L 及び W はそれぞれ腫瘍の長軸径及び短軸径のミリメートル値を示す）｝から求めた。ロミデプシン投与 1、3、6 及び 24 時間後に腫瘍から RNA を抽出し、RNA を逆転写させて、サイバーグ

リーン PCR マスターミックスを用いたリアルタイム q-PCR により VEGF、bFGF 及び β-アクチン mRNA の発現量を測定した。最終的発現量は、β-アクチン mRNA の発現量に対する VEGF 又は bFGF mRNA の発現量の比とした。時間 T=0 における各値を 1 に設定した。ACHN 腫瘍を PC-3 腫瘍と比較するときには、PC-3 腫瘍における基準発現量（時間 T = 0）を 1 に設定した。200%以上の増加又は 50%以上の減少を有意と判定した。

PC-3 細胞では、ロミデプシン投与 24 時間後の VEGF 及び bFGF mRNA の発現量がそれぞれ 68%及び 88%減少した。対照的に ACHN 細胞での VEGF 及び bFGF mRNA の発現量はロミデプシン投与により有意に変化しなかった。ACHN 細胞の bFGF mRNA 基準発現量は異種移植 PC-3 よりも高かった。

結論として、ロミデプシン投与により、ロミデプシン感受性ヒト前立腺がん PC-3 細胞において VEGF 及び bFGF mRNA レベルが低下したが、ロミデプシン非感受性ヒト腎臓がん ACHN 細胞においては低下がみられなかった。これらの結果から、血管新生因子 mRNA の発現量に対する作用がロミデプシンの抗腫瘍効果に重要であると考えられた。本抑制作用の機序は不明であるが、先に示した *in vitro* 試験の結果から（2.6.2.2.1.7 参照）、これら遺伝子のプロモーター領域の脱アセチル化が遺伝子発現の抑制に寄与していると考えられた。

2.2.7.　ヒト腫瘍細胞のヌードマウスへの異種移植モデルでのロミデプシンの抗腫瘍活性

［試験番号 CRE010131、添付資料 4.2.1.1.9、参考資料］

本試験は、ヌードマウスに異種移植したヒト腎臓がん由来 ACHN 及び RXF-631L 細胞、ヒト前立腺がん由来 PC-3 及び DU-145 細胞並びにヒト結腸がん由来 HT-29、HCC2998 及び HCT-15 細胞に対するロミデプシンの抗腫瘍効果をパクリタキセル（PTX）と比較することを目的とした。

ロミデプシンは HCO60／生理食塩液で溶解、希釈した。PTX はエタノール／クレモフォール®（1:1）溶液で溶解し、生理食塩液で希釈した（最終濃度は 5%クレモフォール®／5%エタノール／90%生理食塩液）。この溶液を、10 mL/kg 体重の容量で静脈内投与した。対照動物には HCO60／生理食塩液を投与した。

腫瘍細胞は、ヌードマウスにおける皮下継代移植により維持した。腫瘍片（3 mm^3）をマウスの左側腹部に移植し、推定腫瘍重量が約 100～300 mg に到達した時点で、動物を 1 群 6 匹に分けて、ロミデプシンを 4 日ごとに計 3 回静脈内投与した。PTX は、24 mg/kg の用量で連続 5 日間静脈内投与した。腫瘍重量は初回投与日の投与直前及び最終評価日に算出した。腫瘍重量は前出の計算式から求めた。腫瘍重量の変化は、最終的な腫瘍重量を開始時の腫瘍重量で除した値とした。有効性は、対照群と比較した投与群の平均腫瘍重量の比（%）として示した。抗腫瘍効果は、投与開始時の腫瘍重量と比較して腫瘍重量が減少した場合には、その薬物は有効であると判断した。抗腫瘍効果は、最終投与約 10 日後（腫瘍移植 28 日後）に評価した。

ロミデプシン（1.8 及び 3.2 mg/kg）は RXF-631L 及び PC-3 に対して顕著な抗腫瘍効果を示した。PC-3 移植ヌードマウスでは、ロミデプシン投与期間中に腫瘍退縮の徴候がみられた。PTX（24 mg/kg）は RXF-631L、PC-3、DU-145、HT-29 及び HCC2998 に対して抗腫瘍効果を示した。PC-3 及び RXF-631L では、ロミデプシンの抗腫瘍効果は、PTX と同程度であることが示された。いずれの投与でも死亡例は認められなかった。最大体重変化率はロミデプシンの 3.2 mg/kg の用量と PTX の 24 mg/kg の用量で同程度であり、11～19%の範囲であった。最大体重減少は第 1 週前後に認められた。体重はすべての投与群で移植 28 日後（最終投与の 10 日後）までには回復した。

以上、ロミデプシンは異種移植したヒト腎がん RXF-631L 細胞及びヒト前立腺がん PC-3 細胞移植ヌードマウスに対して顕著な抗腫瘍効果を示し、その作用及び忍容性は PTX と同程度であった。

3. 副次的薬理試験

該当なし。

4. 安全性薬理試験

ヒトでの安全性に関連するロミデプシンの薬理学的特性を評価するために、安全性薬理試験を in vitro 及び in vivo のモデルにより、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系の重要な機能に対する影響を評価した。In vitro 試験として、ロミデプシンの hERG チャネル電流に対する作用並びにモルモット乳頭筋の活動電位持続時間を検討する電気生理学的試験を実施し、ヒトにおける QT 間隔延長のリスクについて評価した。これらの試験には、生物学的に重要な多数のイオンチャネル（hERG チャネルを含む）へのロミデプシン及び還元型ロミデプシンのカリウムチャネルに対する結合の評価も含め、また、ロミデプシンの各種受容体との相互作用についても評価した。In vivo 試験では、ロミデプシンを 4 時間静脈内持続注入したときのラットの中枢神経系並びにイヌの中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する作用を検討した。ロミデプシンで実施した安全性薬理試験を Table 13 に示す。

Table 13: ロミデプシンで実施した安全性薬理試験

試験番号	試験の表題	試験の種類	器官系	GLP 適用	添付資料番号
GLR030774	FR901228 の安全性薬理試験—ラットの中枢神経系に対する作用	中枢神経系	中枢神経系	適	4.2.1.3.1
GLR030775	FR901228 の安全性薬理試験—イヌの中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する作用	中枢神経系、心血管系、呼吸器系、造血系	中枢神経系（脳）、心臓、呼吸器系（肺）、血液	適	4.2.1.3.2
GLR030533	FR901228 の安全性薬理試験—hERG 試験	心血管系	心臓、HEK-293 細胞	適	4.2.1.3.3
GLR030460	FR901228 の安全性薬理試験（2）：微小電極法による活動電位測定	心血管系	心臓、モルモット乳頭筋	適	4.2.1.3.4
DVRS-003	ジチオスレイトールにより還元されたロミデプシンの各種カリウムチャネルに対する *in vitro* 結合実験	心血管系	ハムスター膵臓 β 細胞、ラット脳、HEK-293 細胞	不適	4.2.1.3.5
GLR030404	各種受容体に対する FR901228 の結合実験	心血管系、中枢神経系	複数	不適	4.2.1.3.6

4.1. 中枢神経系に対する作用

4.1.1. ラットを用いた試験

［試験番号 GLR030774、添付資料 4.2.1.3.1、評価資料］

安全性薬理コアバッテリー試験の 1 つとしてラットの中枢神経系に対するロミデプシンの作用を評価した。本試験は、GLP 基準に従って実施した。

5 週齢の雄 Crj:CD (SD) IGS ラット（6 匹/群）を 18 時間絶食した後、麻酔下で外頸静脈にカニューレを挿入した。ロミデプシンは 0.1、0.3 及び 1.0 mg/kg（0.6、1.8 及び 6.0 mg/m^2）の 3 用量を 4 時間静脈内持続注入した。Irwin 法（Irwin, 1968）に従って、静脈内持続注入前（麻酔から覚醒して約 1 時間後）並びに静脈内持続注入開始後 0.5、1、2、4、4.5、5、6、8 及び 24 時間に動物を観察した。観察期間の最初の 8 時間は、絶食及び絶水とした。

ロミデプシンは 0.1 mg/kg の用量で一般症状及び行動に対する作用を示さなかった。0.3 mg/kg では、6 例中 1 例に投与開始後 1～4 時間に四肢の緊張及び握力の低下が、また、投与開始後 2 時間には自発運動の減少も認められた。これらの変化は一過性であり、静脈内持続注入中に認められたこ

と、また 6 例中 1 例のみで認められたことから、当該用量での中枢神経系に対する作用はわずかであると考えられた。

1.0 mg/kg では、投与開始後 1～8 時間に驚愕反応の低下が 6 例中 1 例に認められた。別の 1 例では、投与開始後 2～4 時間に四肢の緊張及び握力の低下及び投与開始後 2 時間に自発運動の減少が認められた。また、 投与開始後 24 時間で 6 例中 3 例が死亡した。生存例の 3 例中 2 例では、投与開始後 24 時間で自発運動の減少、運動失調、歩行異常が認められ、このうち 1 例では攣縮、四肢の緊張及び握力の低下並びに半眼が認められ、他の 1 例でも攣縮が認められた。さらに、別の 1 例では、痙攣、疼痛反応の低下、驚愕反応の低下、心拍数増加、呼吸数増加が認められた。

結論として、ロミデプシンは、0.1 mg/kg の用量で 4 時間静脈内持続注入したときにラットの中枢神経系に影響せず、0.3 mg/kg では、自発運動の減少、わずかではあるが明らかな四肢の緊張及び握力の低下が認められ、1 mg/kg の用量では自発運動の減少、驚愕反応の低下、四肢の緊張及び握力の低下などの中枢神経系に対する作用が認められた。また、遅発作用として、死亡、自発運動の減少、運動失調、歩行異常、攣縮、けいれん、疼痛反応の低下、驚愕反応の低下、四肢の緊張及び握力の低下、半眼、心拍数増加並びに呼吸数増加が認められた。

4.1.2. イヌを用いた試験

［試験番号 GLR030775、添付資料 4.2.1.3.2、評価資料］

本試験は、無麻酔イヌの中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対するロミデプシンの作用を検討することを目的とした。本試験は GLP 基準に従って実施した。

ロミデプシンを 0.1、0.3 及び 1.0 mg/kg（2.0、6.0 及び 20 mg/m^2）の 3 用量で 4 時間静脈内持続注入して評価した。陽性対照のアステミゾールは経口投与した。4 匹の雄性ビーグル犬を麻酔し、テレメトリーシステム送信機を腹腔内に固定した。血圧センサーは大腿動脈に挿入・固定した。心電図（ECG）電極は左右側腹部の皮下に固定した。ヘモグロビン酸素飽和度を測定するアクセスポートは背部に埋め込み、センサーを大腿動脈に挿入した。投与及び血液試料採取のためのアクセスポートは背部に固定し、留置カテーテルを大腿静脈に挿入した。動物の容態が完全に回復し、安定した測定値が得られた時点でロミデプシン及びアステミゾールの投与を開始した。各動物とも、最初に溶媒を投与した。その後にロミデプシンを漸増用量で投与した。最後に陽性対照であるアステミゾールを投与した。投与はすべて 6 日以上の間隔をおいて行われた。

一般症状は、投与 2 時間前、並びに静脈内持続注入開始 0.5、1、2、4、4.5、5、6、8、10、12、14、16、18、20、22 及び 24 時間後に観察した。自発運動量、体温、呼吸数、ヘモグロビン酸素飽和度、血圧、心拍数及び ECG を一般症状と同時期に測定し、血液学的検査は投与開始後 24 時間の時点で実施した。給餌は、投与日では静脈内持続注入開始後 8 時間の測定が終了した時点で、投与翌日は採血が終了した時点で行った。

ロミデプシンは、0.1 及び 0.3 mg/kg の用量で一般症状に対する作用を示さなかった。1 mg/kg では 4 例中 3 例で投与後 10 時間以降に摂餌量が減少した。対照薬のアステミゾールは 20 mg/kg で一般症状に対する作用を示さなかった。

ロミデプシン 0.1 mg/kg の用量では投与開始後 4.5、5 及び 24 時間に、0.3 mg/kg の用量では投与開始後 10 及び 22 時間に、自発運動量の有意な増加が認められた。1 mg/kg の用量では自発運動量に対する作用はみられなかった。

ロミデプシンは 0.1 mg/kg の用量で体温に対する作用を示さなかった。0.3 mg/kg では、投与開始後 4～5 時間及び 14～16 時間に最高 1.3℃ の上昇が認められ、1 mg/kg では、投与開始後 2～5 時間及び 14～24 時間に体温が 1.6℃ まで上昇した。アステミゾール投与群ではベースライン値と比較して体

温の軽度上昇（–0.3～+0.5ºC）が認められたが、アステミゾール投与による作用ではないと考えられた。

4.2. 心血管系に対する作用

4.2.1. *In vitro* 試験

4.2.1.1. hERG チャネルへの作用

［試験番号 GLR030533、添付資料 4.2.1.3.3、評価資料］

hERG は、細胞の内向きカリウム電流を担うヒト整流カリウムチャネルのタンパク質サブユニットをコードしている。ヒトでは、医薬品による QT 間隔延長の原因となる最も一般的な機序は、遅延整流性カリウムチャネルの阻害であると考えられている。このため、hERG 試験は、新規物質がイオンチャネルを阻害して QT 間隔を延長する可能性を評価するための重要な電気生理学的スクリーニング試験である。

本試験は、hERG チャネルをトランスフェクトしたヒト胎児腎（HEK293）細胞における電位依存性 hERG チャネル電流に対するロミデプシンの作用を、ホールセルパッチクランプ法を用いて評価することを目的とした。本試験は、GLP に準拠して実施した。

ロミデプシンは、0.3、1 及び 10 µg/mL の濃度を使用した。細胞の膜電位を－70 mV で保持し、hERG 電流を観察するために脱分極パルスを定期的に与えた。テール電流の最大振幅が安定値に達した時点で、被験物質を適用チャンバー内に 5 mL/分の流速で 10 分間灌流した。被験物質（ロミデプシン及び陽性対照 E-4031 0.10 µmol/L）の hERG 電流阻害作用は、各試験群で 5 個の異なる細胞標本を用いて、被験物質適用 10 分後におけるテール電流の最大振幅の低下率（%）として算出した。

hERG チャネル電流に対する溶媒対照（細胞外灌流液）の適用 10 分後の阻害率は 8.3%であった。0.3 µg/mL の濃度でのロミデプシンの阻害率は 7.9%であり、溶媒対照と有意差はなかった。1 及び 10 µg/mL の濃度のロミデプシンでは適用 10 分後の hERG 電流阻害率はそれぞれ 18%及び 37.3%となり、溶媒対照と比較して統計学的有意差がみられた（$P < 0.001$）。陽性対照の E-4031 0.10 µmol/L では、適用 10 分後の hERG 電流阻害率は 82.5%であった。

ロミデプシンは、高濃度（1 及び 10 µg/mL）で hERG チャネル電流を軽度阻害し、hERG チャネル電流に対する最大阻害率は 37%であった。ロミデプシンの臨床用量での血中濃度（14 mg/m^2 を 4 時間持続注入したときの C_{max} である 377 ng/mL）は、本試験で使用した最高濃度（10 µg/mL）の約 1/20 であり、本結果及びロミデプシンの高いタンパク結合率を考慮すると、ロミデプシンは臨床用量において hERG チャネルに対して影響を及ぼさないと考えられた。

4.2.1.2. モルモット摘出乳頭筋の活動電位に対する作用

［試験番号 GLR030460、添付資料 4.2.1.3.4、評価資料］

本試験は、ガラス微小電極法を用いてモルモット摘出乳頭筋標本の活動電位に対するロミデプシンの作用を評価することを目的とした。本試験は、GLP 基準に従って実施した。

モルモットの各心臓から乳頭筋標本を作成し、通気したタイロード液を 36ºC で灌流したオーガンバス内に摘出乳頭筋標本をピンで固定した。ガラス微小電極を乳頭筋細胞内に刺入した。活動電位はフィールド電気刺激（頻度：0.5 Hz、持続時間：1 msec、電圧：閾値電圧の 150～200%）により誘発し、オシロスコープでモニタリングして活動電位解析ソフトウェアを用いて記録した。ロミデプシン群では、1 標本あたり 3 濃度（0.3、1 及び 10 µg/mL）のロミデプシンを漸増灌流した後に陽性対照のソタロール塩酸塩（0.1 mmol/L）を灌流する計 4 回の灌流セッション（濃度）について電位測

定を行った。溶媒対照群では、タイロード液を 4 セッション（各 30 分間持続）灌流して測定した。90%再分極時の活動電位持続時間（APD_{90}）、静止膜電位（RP）、活動電位振幅（APA）及び最大立ち上がり速度（dV/dt max）は、各灌流セッション前と灌流セッション中に測定した。陽性対照の評価には、ロミデプシン灌流 30 分後に得られた値をベースラインとして用いた。各測定時点で 10 回トレースを行って解析し、平均値を算出した。

ロミデプシンは 0.3 及び 1 μg/mL の濃度では、APD_{90}、RP、APA 及び dV/dt max に対して作用を示さなかった。10 μg/mL の濃度では、APD_{90} を有意に短縮させ、APA を有意に減少させたが、RP 及び dV/dt max に対しては有意な作用を示さなかった。陽性対照の（±）ソタロール塩酸塩では APD_{90} が延長し、溶媒群と比較して dV/dt max に有意差がみられたが、RP 及び APA に対する有意な作用はみられなかった。

結論として、ロミデプシンは 1 μg/mL の濃度までモルモット摘出乳頭筋の活動電位に対して作用を示さなかった。10 μg/mL では、活動電位持続時間を短縮したが、RP 及び dV/dt max に対する作用はみられなかった。ロミデプシンの臨床用量での血中濃度（14 mg/m^2 を 4 時間持続注入したときの C_{max} である 377 ng/mL に相当）はモルモット摘出乳頭筋試験で使用した 10 μg/mL の濃度の約 1/20 であり、ロミデプシンは臨床用量において心筋活動電位に対して有意な生理学的作用を示さないと考える。

4.2.2.　In vivo 試験

［試験番号 GLR030775、添付資料 4.2.1.3.2、評価資料］

4.1.2 に示したイヌを用いた in vivo 安全性薬理試験で実施した心血管系に対する作用の結果を以下に記載した。

収縮期、拡張期及び平均血圧は、溶媒対照と比較してロミデプシンのすべての用量で有意に変化した。しかし、ベースライン値からの差は非常にわずかであり、また用量反応相関はみられなかったことから、これらの変化はロミデプシン投与に関連しないと考えられた。また、溶媒対照と比較して陽性対照のアステミゾールでも血行動態パラメータに有意な変化が認められたが、溶媒対照投与前と比較してその変化は非常にわずかであり、アステミゾール投与に起因しないと考えられた。

ロミデプシンを 0.1 mg/kg の用量で投与開始後 22 時間に、20%の心拍数増加が認められた。投与前値からの差（+10%）は非常にわずかであったため、この心拍数増加はロミデプシン投与に関連しないと考えられた。しかし、0.3 mg/kg では、投与開始後 4.5 時間及び 10～18 時間に、統計学的に有意ではないものの、52%の増加がみられた。最高用量では、投与開始後 4.5～10 時間に 34%の有意な増加が認められたが、この増加は可逆的であった。陽性対照のアステミゾールでは、投与開始後 0.5～24 時間に、最大 40%の心拍数増加が認められた。

PR 間隔及び QRS 間隔に対する作用は、ロミデプシンのいずれの用量でも認められなかった。0.1 mg/kg の用量で投与開始後 22 時間に RR 間隔の有意な短縮が認められたが、投与前値からの差は非常にわずか（–8%）であったため、この変化はロミデプシン投与に起因するものではないと考えられた。0.3 mg/kg では、投与開始後 10～18 時間に RR 間隔の有意な短縮（最大 34%）が認められ、1.0 mg/kg では、投与開始後 5～10 時間に最大 26%の有意な短縮が認められた。

ロミデプシンの 1 mg/kg の用量では、QT 間隔に対する作用は認められなかった。低用量（0.1 及び 0.3 mg/kg）では、投与開始後 22 時間に QT 間隔が有意に短縮したが、投与前値からの差は非常にわずか（–3～–7%）であり、また、用量反応相関は認められなかったことから、これらの変化はロミデプシンにより誘発されたものではないと考えられた。低用量（0.1 及び 0.3 mg/kg）では、Bazett 式、Fridericia 式及び Matsunaga 式（Bazett, 1920；Fridericia, 1920；Matsunaga, 1997）で算出した QTc への作用はみられなかった。1 mg/kg の用量では、Bazett 式及び Fridericia 式で算出した QTc が散発的にそれぞれ最大 8%及び 5%延長したが、投与前値からの差はわずかであり、また、Matsunaga 式

（Matsunaga, 1997）により算出した QTc に延長はみられなかったため、これらの変化の毒性学的意義は低いと考えられた。2 週間の回復期間後の QT 間隔は、対照群での値と同程度にまで回復した。心拍数及び QT におけるこれらの変化に伴う心臓の病理組織学的所見はみられなかった。

陽性対照のアステミゾールは、QRS 間隔に対する作用を示さなかったが、投与開始後 0.5～8 時間に、RR 間隔を有意に短縮（最大 26%）した。また、投与開始後 5 及び 20 時間に、QT 間隔がそれぞれ 9%及び 10%有意に延長した。アステミゾールによる QTc 間隔の持続的な延長が試験期間を通して認められ、Bazett 式、Fridericia 式及び Matsunaga 式でそれぞれ最大 26%、22%及び 15%の延長を示した（Bazett, 1920；Fridericia, 1920；Matsunaga, 1997）。

4.3. 呼吸器系に対する作用

［試験番号 GLR030775、添付資料 4.2.1.3.2、評価資料］

4.1.2 項に示したイヌを用いた in vivo 安全性薬理試験で実施した呼吸器系に対する作用の結果を以下に記載した。

呼吸数は、溶媒と比較して、ロミデプシンのすべての用量で著明に増加した。特に、0.1 mg/kg 投与群ではロミデプシン投与開始 20 時間後（$p<0.05$、Dunnett's multiple test）に、また 1 mg 投与群では 24 時間後（$p<0.01$、Dunnett's multiple test）に溶媒投与群に比較して有意な呼吸数の増加がみられた。また、0.3 mg/kg 投与群では有意差はみられなかったものの、20、22、24 時間の平均値は溶媒投与群に比べて著明に増加していた。しかし、各投与群とも本薬投与前値からの差は非常にわずかであり、また用量反応相関はみられなかったため、これらの変化はロミデプシン投与に関連しないと考えられた。同様に、アステミゾール投与開始後 5、12 及び 18～20 時間にも有意な増加が認められたが、投与前値と比較して非常にわずかであり、アステミゾール投与に関連した変化ではないと結論した。

5. 造血系に対する作用

［試験番号 GLR030775、添付資料 4.2.1.3.2、評価資料］

4.1.2 項に示したイヌを用いた in vivo 安全性薬理試験で実施した血液学的検査に対する作用の結果を以下に記載した。

ヘモグロビン酸素飽和度（sO_2）に対する作用は、ロミデプシンのいずれの用量でも認められなかった。アステミゾール投与後に sO_2 の有意な変化が認められたが、その変化の程度はわずかであった。

ロミデプシンは、0.1 mg/kg の用量で血小板数を溶媒対照と比較して有意に増加した。しかし、その変化はわずかであり、また用量依存性はみられなかったため、ロミデプシン投与に関連したものではないと考えられた。0.3 mg/kg では、投与開始後 24 時間に平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）の有意な増加、並びにリンパ球数及び平均赤血球容積（MCV）の有意な減少が認められた。最高用量の 1 mg/kg では、投与開始後 24 時間に赤血球数（RBC）、ヘモグロビン及び MCHC が有意に増加し、リンパ球数及び MCV が有意に減少した。アステミゾールの投与では、白血球（WBC）、リンパ球、RBC、ヘモグロビン及びヘマトクリットが有意に増加し、MCV 及び MCHC が減少した。

6. 受容体及びイオンチャネルに対する作用

6.1. 還元型ロミデプシンの各種カリウムチャネルに対する *in vitro* 結合試験

［試験番号 DVRS-003、添付資料 4.2.1.3.5、評価資料］

本試験は、カリウムチャネル（hERG、K_{ATP} 及び SK_{CA}）に対する還元型ロミデプシンの活性を、放射性リガンド結合試験で評価することを目的とした。

K_{ATP} の評価にはハムスター膵臓 HIT-T15-β 細胞を用いた。この時の放射性標識リガンドとしては[^{3}H]-グリブリド 5 nM を、非特異的リガンドとして 1 μM の非標識グリブリドを用いた。SK_{CA} の評価には Wistar ラット脳組織を用い、放射性標識リガンドは[^{125}I]-アパミン 5 pM を、非特異的リガンドとして 0.1 μM の非標識アパミンを用いた。hERG カリウムチャネル結合実験には、ヒト組換え HEK-293 細胞を用いた。放射性標識リガンドとして[^{3}H]-アステミゾール 1.5 nM を、非特異的リガンドとして 10 μM の非標識アステミゾールを用いた。還元型ロミデプシンは 10 μM の濃度で検討した。結果を Table 14 に要約した。いずれのカリウムチャネルに対しても 50%を超える阻害活性は認められず、IC_{50} 値は算出できなかったことから、還元型ロミデプシンは臨床上問題となる活性をほとんど又は全く示さないと結論した。

Table 14: 還元型ロミデプシンのカリウムチャネルとの相互作用を評価した試験の結果

カリウムチャネル	還元型ロミデプシン（μM）	阻害率（%）
K_{ATP}	10	-15
SK_{CA}	10	0
hERG	10	-7

6.2. 各種受容体に対するロミデプシンの結合実験

［試験番号 GLR030404、添付資料 4.2.1.3.6、評価資料］

本試験は、生物学的に重要な 62 種類の受容体及びイオンチャネルへのロミデプシンの結合能を評価することを目的とした。結合率は、（薬剤存在下で特異的に結合した放射能）／（薬剤非存在下で特異的に結合した放射能）×100 として算出し、100 から結合率を減ずることにより阻害率を算出した。

本試験において検討した大半の受容体及びイオンチャネルに対してロミデプシンの結合親和性は認められなかった。ロミデプシンは 10 μg/mL の濃度まで、心臓系（又は心臓に関連する）アドレナリン受容体、ムスカリン受容体、カルシウムイオンチャネル、ナトリウムイオンチャネル及びカリウムイオンチャネルに結合親和性を示さなかった。ロミデプシンのエストロゲン受容体阻害率は 10 μg/mL で 97.8%、1 μg/mL で 26.6%であったことから、エストロゲン受容体を阻害することが示されたが、0.3 μg/mL での阻害率は 20%未満であった。ロミデプシンのニューロキニン NK_2 受容体阻害率は 10 μg/mL で 71.4%であったことから、ニューロキニン NK_2 受容体を阻害することが示されたが、1 μg/mL での阻害率は 20%未満であった。カルシウムイオンチャネル及びカリウムイオンチャネルに対する結合阻害は認められなかった。

結論として、ロミデプシンは臨床用量における血中濃度（14 mg/m^2 を 4 時間持続投与したときの C_{max} である 377 ng/mL に相当）で、検討したいずれの受容体及びイオンチャネルに対しても有意な相互作用を示さないと考えられた。

Table 15: ロミデプシンで検討した受容体及びイオンチャネルの一覧

受容体	イオンチャネル
アデノシン A1、A2、A3	Ca チャネル（L）（ラット大脳皮質、モルモット心臓）
α_1、α_2、β_1、β_2、β_3アドレナリン	Ca チャネル（N）（ラット大脳皮質、モルモット心臓）
βアドレナリン（非選択的）	K チャネル KA、K_{ATP}、KV SK_{CA}
アンジオテンシン II、1 型及び 2 型	Na チャネル $_2$（ラット脳、モルモット心臓）
ブラジキニン B2	
コレシストキニン $_A$	
ドパミン $_{1、2}$	
ドパミントランスポーター	
エストロゲン	
エンドセリン $_{A、B}$	
$GABA_{A、B}$	
ガラニン	
グルタミン酸、AMPA、カイニン酸など	
グリシン	
ヒスタミン $_{1、2、3}$	
ロイコトリエン、B_4 D_4	
ムスカリン（非選択的）$_{1、2、3}$	
ニューロキニン $_{1、2、3}$	
NE トランスポーター	
ニコチン	
オピオイド（非選択的）	
オキシトシン	
PAF	
セロトニン（非選択的）	
セロトニントランスポーター	
シグマ（非選択的）	
テストステロン	
TXA_2	
バソプレッシン V_1	
VIP	

結論として、ロミデプシンは 0.1 mg/kg（2.0 mg/m^2）の用量でイヌに 4 時間静脈内持続注入したときに、自発運動量を増加させたことを除き、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する作用を示さなかった。0.3 mg/kg（6.0 mg/m^2）の用量では、自発運動量の増加及び体温上昇が認められたことから、中枢神経系への作用がみられた。本用量では心血管系に対する唯一の作用として、軽度かつ可逆的な心拍数の増加もみられた。また、0.3 mg/kg のロミデプシンでは血液学的プロファイルの有意な変化もみられた。本試験の最高用量かつ MTD である 1 mg/kg（20 mg/m^2）では、摂餌量減少がみられ、自発運動量に対する作用はみられず、体温上昇（中枢神経系作用）、心拍数（心血管系作用）及び血液学的毒性の増加がみられた。

7. 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかったが、多くの抗悪性腫瘍剤と同様に、ロミデプシンは、他の化学療法剤と併用使用される可能性がある。このため、ロミデプシンと他の抗悪性腫瘍剤との併用投与試験を *in vitro* 及び *in vivo* で実施した。ロミデプシンと他の抗悪性腫瘍剤を併用して実施した試験の一覧を Table 16 に示す。

Table 16:　ロミデプシンを他剤と併用して実施した試験

試験番号	試験の表題	試験の種類	試験系
CRE040062	各種化学療法剤との併用下でのロミデプシンの細胞傷害活性	細胞傷害活性、遺伝子発現	ヒト前立腺がん DU-145 細胞
CRE040011	マウス白血病由来 L-1210 細胞移植モデルにおける各種化学療法剤とのロミデプシンの併用効果	In vivo 有効性	CDF1 及び DBA/2 マウス
vvglou0501.v2	ヒト腫瘍細胞異種移植モデルにおけるロミデプシンとゲムシタビン塩酸塩との併用効果	抗腫瘍効果	ヒト膵臓がん PANC-1 又は BxPC-3 細胞異種移植モデル

7.1. 各種化学療法剤との併用下でのロミデプシンの細胞傷害活性

［試験番号 CRE040062、添付資料 4.2.1.4.1、参考資料］

各種化学療法剤としてドキソルビシン（ADR）、シスプラチン（CDDP）、フルオロウラシル（5FU）、パクリタキセル（PTX）、エトポシド（VP-16）を用い、これら化学療法剤併用下でのヒト前立腺がん由来 DU-145 細胞におけるロミデプシンの *in vitro* 細胞増殖阻害作用を検討した。

96 穴培養プレートに DU-145 細胞（6.0×10^3 個/mL）を 100 µL ずつ分注した。ロミデプシン及び他の化学療法剤との同時併用処置実験では、37°C で終夜インキュベートした後、ロミデプシン及び他の化学療法剤を同時に添加し、24 時間インキュベートした。インキュベート終了後、培養液で洗浄し、さらに 4 日間インキュベートして実験に供した。また、ロミデプシン及び他の化学療法剤との連続処置実験では 37°C で終夜インキュベートした後、ロミデプシンを添加し、24 時間インキュベートした。インキュベート終了後、培養液で洗浄し、他の化学療法剤を添加し、24 時間インキュベートした。インキュベート終了後に培養液で洗浄し、さらに 3 日間インキュベートして実験に供した。また、同様の操作で、ロミデプシンと化学療法剤の順番を入れ替えた試験も実施した。

生存細胞の測定には MTT（3-(4,5-ジメチル チアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニールテトラゾリウム ブロミド）法を用いた。併用効果の評価は、80%細胞増殖阻害活性をアイソボログラム法で解析した。

併用効果に関する結果を Table 17 に示す。ADR、CDDP 又は VP-16 とロミデプシンとの併用では、処置の順番にかかわらず、細胞増殖阻害作用が相乗的に発現した。5FU とロミデプシンの併用では、併用存在下又はロミデプシンを先に処置した場合に細胞増殖阻害作用が相乗的に、また、PTX とロミデプシンでは、PTX を先に処置した場合にのみ細胞増殖阻害作用が相乗的に発現した。

Table 17: ロミデプシンと他の化学療法剤との併用効果

併用した化学療法剤	同時併用処置（ロミデプシン+化学療法剤）	連続処置	
		（ロミデプシン→化学療法剤）	（化学療法剤→ロミデプシン）
ADR	相乗的	相乗的	相乗的
CDPP	相乗的	相乗的	相乗的
5FU	相乗的	相乗的	相加的
PTX	相加的	相加的	相乗的
VP-16	相乗的	相乗的	相乗的

［試験番号 CRE040062　Table 1 より引用］

7.2. マウス白血病由来 L-1210 細胞移植モデルにおける各種化学療法剤とのロミデプシンの併用効果

［試験番号 CRE040011、添付資料 4.2.1.4.2、参考資料］

各種化学療法剤としてイリノテカン塩酸塩（CPT-11）、カルボプラチン（CBDCA）、パクリタキセル（PTX）、マイトマイシン C（MMC）及びドキソルビシン（ADR）を用い、これら化学療法剤併用下でのマウス白血病由来 L-1210 細胞移植モデルにおけるロミデプシンの作用を検討した。

雌性 CDF1 マウス腹腔内に L-1210 細胞 1×10^5 個を移植した。ロミデプシンの投与量は 0.14 及び 0.28 mg/kg、MMC は 0.625 及び 1.25 mg/kg、ADR は 1 及び 2 mg/kg とし、腫瘍移植日の翌日から 1 日 1 回 4 日間連続して腹腔内に投与した。また、溶媒対照群として 10%ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60（HCO60）含有生理食塩液投与群を設定した。薬剤投与から 30 日間毎日観察し、生存期間中央値（MST）を算出した。薬剤投与群の MST を溶媒対照群の MST で除した値（%）（T/C：［薬剤投与群の MST／溶媒対照群の MST］×100）を算出し、T/C を指標として抗腫瘍効果を検討した。併用効果の評価には併用係数（Combination Index：CI）を用いた。CI はロミデプシンと化学療法剤を併用した際の T/C から 100 を減じた値をロミデプシン単独投与時の T/C から 100 を減じた値とそれぞれの化学療法剤の単独投与時の T/C から 100 を減じた値の和で除して算出した［（併用投与群の T/C-100）／｛（ロミデプシン単独投与群の T/C-100）＋（化学療法剤単独投与群の T/C-100）｝］。CI が 1 を超える場合は相乗作用、1 の場合は相加作用、1 未満の場合は拮抗作用として評価した。

結果を Table 18 に示す。ロミデプシン 0.14 又は 0.28 mg/kg 投与群での MST は 9～10 日、T/C は 100%～111%であり、溶媒対照群（MST：9 日、T/C：100%）と比較して有意な作用はみられなかった。ロミデプシン（0.14 mg/kg）と ADR（1 mg/kg）を併用した場合、CI が 2.33 となり、相乗効果が認められ、生存期間が有意に延長した。他の化学療法剤との併用では、ロミデプシンの抗腫瘍効果が増強されなかった。

Table 18: L-1210 細胞移植モデルでのロミデプシンと化学療法剤併用投与での抗腫瘍作用

投与群	30 日間生存した動物数（匹）	MST（日）	T/C（%）	CI
溶媒対照群	0	9.0	100	-
ロミデプシン（0.14 mg/kg）	0	9.0	100	
ロミデプシン（0.28 mg/kg）	0	10.0	111	
PTX（12.5 mg/kg）	0	11.0	122	
PTX（25 mg/kg）	0	12.5	139	
ロミデプシン（0.14 mg/kg）＋PTX（12.5 mg/kg）	0	11.0	122	1.00
ロミデプシン（0.28 mg/kg）＋PTX（25 mg/kg）	0	11.0	122	0.44
CTP-11（25 mg/kg）	3	29.5	328	
CTP-11（50 mg/kg）	3	27.5	306	
ロミデプシン（0.14 mg/kg）＋CTP-11（25 mg/kg）	0	15.5	172	0.32
ロミデプシン（0.28 mg/kg）＋CTP-11（50 mg/kg）	0	17.0	189	0.41
MMC（0.625 mg/kg）	0	10.0	111	
MMC（1.25 mg/kg）	0	11.0	122	
ロミデプシン（0.14 mg/kg）+MMC（0.625 mg/kg）	0	9.0	100	0.00
ロミデプシン（0.28 mg/kg）+MMC（1.25 mg/kg）	0	10.0	111	0.33
CBDCA（0.5 mg/kg）	0	10.0	111	
CBDCA（1 mg/kg）	0	11.0	122	
ロミデプシン（0.14 mg/kg）+CBDCA（0.5 mg/kg）	0	10.0	111	1.00
ロミデプシン（0.28 mg/kg）+CBDCA（1 mg/kg）	0	11.0	122	0.67
ADR（1 mg/kg）	0	12.0	133	
ADR（2 mg/kg）	1	13.0	144	
ロミデプシン（0.14 mg/kg）+ADR（1 mg/kg）	2	16.0	178	2.33
ロミデプシン（0.28 mg/kg）+ADR（2 mg/kg）	1	13.0	144	0.80

7.3. ヒト腫瘍異種移植モデルにおけるロミデプシンとゲムシタビン塩酸塩との併用効果

［試験番号 vvglou0501.v2、添付資料 4.2.1.4.3、参考資料］

ヒト膵臓がん由来 PANC-1 細胞及び BxPC-3 細胞を雌性ヌードマウスに移植した異種移植モデルにおけるロミデプシン単独又はゲムシタビン塩酸塩併用投与の効果を検討した。腫瘍増殖阻害、体重減少及び薬剤の毒性を指標として評価した。

ヌードマウス皮下に継代した PANC-1 細胞及び BxPC-3 細胞の腫瘍組織片をヌードマウス皮下に移植した。PANC-1 細胞異種移植モデルでは腫瘍体積が約 135 mm^3（移植 17 日後）に達した時点で、また、BxPC-3 細胞異種移植モデルでは腫瘍体積が約 85 mm^3（移植 19 日後）に達した時点で各群 9 例に群分けして試験に供した。なお、腫瘍体積（mm^3）は長径（mm）×短径（mm）^{2}×0.52 として算出した。

群分けの翌日から薬剤投与を開始した。ロミデプシン（2.5 及び 5 mg/kg）は 1 日 1 回、4 日ごとに 3 回静脈内投与した。また、ゲムシタビン塩酸塩（40 及び 80 mg/kg）は 1 日 1 回、3 日ごとに 4 回腹腔内投与した。溶媒対照として、2%エタノール及び 8%ポリエチレングリコール含有生理食塩液を 1 日 1 回、4 日ごとに 3 回静脈内投与した。体重測定を週 2 回実施するとともに、症状観察（週 2 回）及び死亡判定（連日）を行った。また、週 2 回の腫瘍体積測定、観察期間終了時（PANC-1 細胞異種移植モデルは Day 25、BxPC-3 細胞異種移植モデルでは Day 29）での溶媒対照群の腫瘍増殖の程度に対する薬剤投与群の比で表す腫瘍増殖阻害作用（TGI%）、腫瘍増殖率（%）及び 5 段階評

価の腫瘍壊死割合により、ロミデプシン単独又はゲムシタビン塩酸塩併用投与での抗腫瘍効果を評価した。

PANC-1 細胞異種移植モデルでの結果を Table 19 に示す。PANC-1 細胞異種移植モデルでは、ゲムシタビン塩酸塩単独投与群及びロミデプシン単独投与群ともに、用量依存的に体重減少がみられたが、試験完了時（腫瘍移植 25 日後）までには回復した。また、高用量のゲムシタビン塩酸塩（80 mg/kg）との併用により、試験期間中に死亡例が認められた。抗腫瘍効果判定については、米国 NCI の判定基準では TGI 値 58%以上を有効としているが、両薬剤の単独投与ではいずれも 58%未満にとどまっており、統計学的な有意差もないことから、単独の抗腫瘍効果は認められなかった。一方、ロミデプシンとゲムシタビン併用により TGI 値 58%を超える著明な抗腫瘍効果が確認された。

BxPC-3 細胞異種移植モデルにおいても、PANC-1 細胞異種移植モデルと同様の体重減少が認められたが、試験終了時（腫瘍移植 29 日後）までに回復した。また、本モデルでは、いずれの薬剤の単独投与又は併用投与においても TGI 値は 58%未満にとどまり、抗腫瘍効果は認められなかった。

Table 19: PANC-1 細胞異種移植モデルでのロミデプシン及びゲムシタビン塩酸塩単独投与又は併用投与での抗腫瘍効果

投与群	体重		腫瘍体積（mm^3）[a]（Day 25）*	%TGI[b]
	投与開始時からの増減率（%）（Day 25）*	最大減少率（%）		
溶媒対照群	+8	-	2234 ± 402	-
ロミデプシン 2.5 mg/kg	+8	-9（Day 11）*	1688 ± 290	26
ロミデプシン 5 mg/kg	+9	-12（Day 11）*	1690 ± 331	26
ゲムシタビン 40 mg/kg	+7	-2 (Day 11）*	1566 ± 255	31
ゲムシタビン 80 mg/kg	+12	-3（Day 11）*	1172 ± 234	51
ロミデプシン 2.5 mg/kg + ゲムシタビン 40 mg/kg	+10	-16（Day 11）*	600 ± 129	78
ロミデプシン 5 mg/kg + ゲムシタビン 40 mg/kg	+12	-23（Day 11）*	326 ± 70	90
ロミデプシン 2.5 mg/kg + ゲムシタビン 80 mg/kg	+15	-24（Day 11）*	383 ± 98	88
ロミデプシン 5 mg/kg + ゲムシタビン 80 mg/kg	+10	-27（Day 11）*	147 ± 63	97

[a]：平均値 ± 標準誤差

[b]：%TGI＝ 1－｛（薬剤投与群の最終評価日の平均腫瘍体積－投与前の平均腫瘍体積）÷（溶媒対照群の最終評価日の平均腫瘍体積－投与前の平均腫瘍体積）｝×100%（NCI の判定基準）

*：Day 11 は腫瘍移植 11 日後を、Day 25 は腫瘍移植 25 日後を示す。

8. 考察及び結論

8.1. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤

HDAC 阻害剤は、環状テトラペプチド（ロミデプシン、アピシジン）、短鎖脂肪酸（酪酸、バルプロ酸）、ヒドロキサム酸（ベリノスタット、パノビノスタット、ボリノスタット）及びベンズアミド（MS275）の主に 4 つのグループに分類される。

それぞれの HDAC 阻害剤は異なる官能基を有するが、これらの HDAC 阻害剤はいずれも程度は異なるものの 1 種類以上の HDAC 酵素を阻害してヒストンアセチル化を亢進させることによりクロマチン構造を弛緩し、腫瘍細胞で眠っていた、いわゆる沈黙遺伝子の発現を誘導する。さらに、HDAC 阻害剤は重要な細胞シグナル伝達経路に関与するヒストンとは異なるタンパク質のアセチル化も亢進させることが明らかにされている。例えば、HDAC 阻害剤は、Akt 及び c-Raf のような腫瘍性タンパク質のシャペロンである Hsp90 のアセチル化を誘導することにより、これら生存促進性タンパク質のプロテアソーム分解を誘発する（Bali, 2005）。さらに、HDAC 阻害は、腫瘍抑制因子タンパク質 p53 のアセチル化を亢進することにより、p53 の転写活性化を増強する（Bode, 2004）。

HDAC 阻害剤の生物学的作用は多面的であることを考慮すると、すべての HDAC 阻害剤があらゆる種類の腫瘍細胞において共通して細胞死をもたらすような単一の分子経路はないと考えられる。むしろ、HDAC 阻害剤の作用は細胞の種類に影響されると考えられ、構造的に異なる HDAC 阻害剤は、同種の細胞であっても作用が異なることを示す知見が増えつつある。これらの作用の差異は、個々の HDAC 阻害剤が有している HDAC 特異性プロファイルに起因している可能性があるが、未だ最終的な結論には達していない。ヒストン以外のタンパク質に対する作用の可能性も残されている。正確な機序は未だ十分には解明されていないが、HDAC 阻害のダウンストリームとしての抗腫瘍効果には、ほとんどすべての種類の培養変異細胞及び各種腫瘍由来細胞における細胞周期の停止、細胞分化誘導及びアポトーシスの誘導、並びに血管新生阻害作用が含まれる（Minucci, 2006）。

8.2. ロミデプシンの作用機序

8.2.1. HDAC 阻害及びヒストンアセチル化

細胞のヒストンアセチル化の程度は、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（HAT）と HDAC との競合による動的平衡により決定される。HDAC 阻害剤により細胞内でアセチル化ヌクレオゾームコアヒストンの蓄積が生じることが明らかにされており、このアセチル化亢進が抗腫瘍効果と関連している。また、ロミデプシンが HDAC1 及び HDAC2 を強力に阻害すると同時に、程度は低いものの HDAC4 及び HDAC6 も阻害することが報告されている（Furumai, 2002）。

腫瘍細胞株において、P 糖タンパク質（P-gp）や多剤耐性関連タンパク質（MRP）1 のような輸送タンパク質の過剰発現がロミデプシンの細胞傷害活性に耐性をもたらすことが複数の試験で示唆されている（Robey, 2008；Peart, 2003）。これらの試験結果は、ロミデプシンが薬剤排出ポンプの基質であることを示すものであるが、ロミデプシンの細胞傷害活性の評価のみであり、ロミデプシンの双方向輸送についての明らかな検討はされていない。別の試験結果では、薬物相互作用の検討の一環として、Caco2 細胞の単層膜を用いてロミデプシンの双方向輸送を評価することにより相互作用が明らかにされた（Xiao, 2005）。この試験では、P-gp 阻害剤及び MRP 阻害剤の存在下及び非存在下での Caco2 細胞単層膜におけるロミデプシンの頂側膜側から基底膜側方向（A→B）及び基底膜側から頂側膜側方向（B→A）の輸送について明らかにされた。Xiao は、ロミデプシンが Caco-2 細胞単層膜をほぼ一方向性に輸送され、B→A の見かけの透過係数（P_{app}）は A→B の 32 倍であり、明らかな飽和はみられないことを示した（Xiao, 2005）。シクロスポリン A 及びベラパミルによる P-gp の阻害により、B→A P_{app} の低下及び A→B P_{app} の上昇がみられた。さらに、Xiao はヒト赤血球を用

いてロミデプシンの取り込みは濃度依存的であり、排出には飽和がみられることを示した。また、耐性の機序についての更なる研究により、MRP や HAT/HDAC 酵素活性の変化ではなく、P-gp のアップレギュレーションがロミデプシンの細胞傷害活性の低下につながることを示した。

8.2.2. 遺伝子発現

DNA 塩基配列の 変化を伴わない後天的な、いわゆるエピジェネティックな変化により支配される遺伝子発現が、がんの発症及び進行に重要であることを示す知見が増えている。クロマチン構造の「開」「閉」間のリモデリング（変化）は、エピジェネティックな遺伝子発現制御に重要な役割を果たしている。このようなリモデリングはクロマチンの基本単位であるヌクレオソーム（ヒストン 8 量体の周囲を約 2 回 DNA が巻き付いた構造）の構造変化により生じる。ヒストンのアミノ末端、すなわちヒストンの「テール」の種々の変化としては、アセチル化、メチル化、リン酸化、ポリ ADP リボシル化、ユビキチン化、SUMO 化、カルボニル化及びグリコシル化などが含まれる。また、HAT と HDAC は相反する活性を示すが、これらの活性がクロマチンのリモデリングを介して遺伝子発現量を厳密に制御している。HAT はヒストンのアミノ末端リジン残基をアセチル化することにより、クロマチンのローカル構造の拡張により制御タンパク質の DNA へのアクセスを容易にするのに対して、HDAC はアセチル基除去を触媒してクロマチン凝縮及び転写抑制をもたらす。したがって、HDAC を阻害するとヒストンのアセチル化が亢進し、転写が促進されることになる。

これまでに、新しい遺伝子転写や翻訳の阻害が HDAC 阻害剤による細胞周期停止やアポトーシスを抑制することが明らかにされている（Glick, 1999；Ruefli, 2001；Peart, 2003）。これらの知見から、HDAC 阻害剤による遺伝子発現の調節が抗腫瘍活性に不可欠であることが確認された。遺伝子発現プロファイルの試験において、ロミデプシンは、検討した全遺伝子のうち約 25%を特異的に 1.5 倍以上誘導又は抑制することが確認された（Peart, 2005）。

本資料中に示した試験において、ロミデプシンは in vitro 及び in vivo で多数の遺伝子の発現を誘導又は抑制することが確認された。これらの遺伝子のいくつかは、細胞周期やアポトーシスなどの細胞機能の制御において重要な役割を有することが示されている。注目すべきこととして、ロミデプシンによる $p21^{WAF1/Cip1}$ のアップレギュレーションは、複数種の細胞及び腫瘍において一貫してみられたことがあげられる。$p21^{WAF1/Cip1}$ 発現量は、HDAC 阻害剤による G_1 期での細胞周期停止に重要であることが既に明らかにされており（Richon, 2000）、このことから、$p21^{WAF1/Cip1}$ はロミデプシンの細胞増殖抑制作用の重要な標的となる。これらの試験で確認された、ロミデプシンの抗腫瘍効果に関与する可能性のある他の遺伝子には、アポトーシスに関与する遺伝子（DUSP1、カスパーゼ 9）、腫瘍血管新生に関与する遺伝子（VEGF、bFGF）及びがん遺伝子（c-myc）が含まれる。公表されているロミデプシンの他の試験では、共通して誘導される遺伝子は $p21^{WAF1/Cip1}$、Prdx1、IL-8、ヒストンファミリー、JunB、カスパーゼ 9、マイトジェン活性化プロテインキナーゼホスファターゼ-1（MKP-1）、共通して抑制される遺伝子としては、サイクリン A 及び MAPK 遺伝子ファミリーなどであることが報告されており（Sasakawa, 2005；Hoshino, 2007）、前述の結果と一致している。

本資料に示した結果から、がん細胞の遺伝子発現プロファイルに基づいてその細胞のロミデプシン感受性を明らかに予測できる知見が得られた。In vitro 及び in vivo 試験において、ロミデプシン処置による $p21^{WAF1/Cip1}$ 発現誘導及び c-myc 発現抑制という相対的な作用が、ロミデプシンの抗腫瘍効果を引き起こすことが示された。また、in vivo における抗腫瘍効果は $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA の基準発現量と負に相関し、c-myc mRNA の基準発現量と正の相関を示した。

8.2.3. ロミデプシンとアポトーシス

多数の抗悪性腫瘍剤と同様に、HDAC 阻害剤の腫瘍細胞死誘発能は、アポトーシス誘発能に起因する。アポトーシスは、主にカスパーゼファミリーにより調節されており、カスパーゼの活性化をも

たらす経路には、細胞死受容体経路（外因性）及びミトコンドリア経路（内因性）の 2 つがある。HDAC 阻害剤の処置によるアポトーシスには外因性及び内因性アポトーシスのいずれに対する機序も推定されている（Johnstone, 2002；Minucci, 2006；Insinga, 2005）。ロミデプシンのみで確認されたユニークな特性は、Eμ-myc リンパ腫細胞において確認されたが、アポトーシスを妨害する Bcl-2 タンパクを抑制できることである（Newbold, 2008）。

ロミデプシンの直接的なアポトーシス誘発能を、ヒトリンパ腫 U-937 及びヒト前立腺がん PC-3 の 2 つの細胞株を用いて検討した。両細胞株において、ロミデプシンはナノモルという低濃度で時間依存的にアポトーシスを誘発させた。これまでに述べたように、ロミデプシン処置後の遺伝子発現量の変化により、他の HDAC 阻害剤で認められているように、アポトーシス促進性及びアポトーシス抑制性の遺伝子及びタンパク質のバランスがアポトーシス側に傾くことが示唆された。リンパ腫細胞株 U-937 を用いた試験をさらに要約すると、ロミデプシンは SCID マウスモデルの生存期間を延長させるが、このロミデプシンの抗腫瘍効果は、ヒストンアセチル化によりアポトーシスの誘導に関連する遺伝子の発現量が変化することによって発揮されると考えられる。実際に、いくつかの公表論文において、ロミデプシンのアポトーシス誘導能について報告されている（Zhang, 2006；Watanabe, 2005；Klisovic, 2003；Rajgolikar, 1998；Lundqvist, 2006；Yu, 2007）。

8.2.4.　細胞周期制御

HDAC 阻害剤は、細胞分化誘導作用を示す薬物として発見された。本作用は、網膜芽細胞腫タンパク質（pRb）及び関連タンパク質を介した G_1/S 移行期での細胞周期停止と密接に関連している。実際、現在までに検討されている HDAC 阻害剤はいずれも主に G_1/S 期で細胞周期停止を誘発する（Johnstone, 2002；Marks, 2003；Richon, 2000；Sandor, 2000；Kim, 1999；Chen, 2002；Jaboin, 2002；Glaser, 2003；Qiu, 2000）。

本資料中に示した試験において、ロミデプシンは、ナノモルオーダーの低濃度で複数のヒト腫瘍細胞株の細胞周期を G_1 期や G_2/M 期で停止させた。ロミデプシン処置により、$p21^{WAF1/Cip1}$、サイクリン A、c-myc、チミジン合成酵素などの細胞周期に関与する複数の鍵となる遺伝子の発現量が変化した（Sasakawa, 2005）。これらの試験から、ロミデプシンの抗腫瘍効果は細胞周期に対する作用に一部は起因すると考えられた。

8.2.5.　血管新生

HDAC 阻害剤の血管新生阻害作用は、VEGF、bFGF、hypoxia-inducible factor-1α（HIF-1α）及び血管内皮型 NO 合成酵素（eNOS）などの血管新生促進性遺伝子の発現量減少と関連していた（Qian, 2006；Michaelis, 2004；Rossig, 2002）。

本資料中に示した試験結果から、血管新生因子（VEGF、bFGF など）の発現量に対するロミデプシンの作用が抗腫瘍効果に関与している可能性が考えられた。

8.2.6.　細胞分化

ロミデプシンは、Ha-ras 形質転換体の形態変異を正常に回復させる化合物の探索スクリーニングにおいて *Chromobacterium violaceum* の発酵ブロスから同定された（Ueda, 1994c）。Ueda らは、その後の試験で、Ha-ras 変異 Ras-1 細胞株の細胞周期、高分子合成及びがん遺伝子発現量に対するロミデプシンの作用を検討した（Ueda, 1994a）。公表論文となった研究では、ロミデプシンは c-myc 発現を抑制したが、その抑制は Ras-1 細胞の増殖抑制と相関したことが報告されている（Munster, 2001）。

本資料中に示した試験において、ロミデプシンによりヒトリンパ腫 U-937 細胞が分化することが単球（CD11b 陽性／CD14 陽性）及び顆粒球（CD11b 陽性／CD14 陰性）に特異的なマーカーのアップ

レギュレーションにより示された（Carlos, 1990；Perussia, 1981；Dimitriu-Bona, 1983）。本細胞分化の臨床における意義は不明であるが、他で報告されているように、腫瘍細胞の分化が、一次芽細胞の最終分化、増殖抑制及び細胞傷害性 T リンパ球活性のアップレギュレーションなどの抗腫瘍効果と関連することが、腫瘍細胞表面マーカーの発現量により確認されている（Ferrara, 2001；Witt, 2000；Passmore, 2001）。

8.2.7. 非ヒストンタンパク質のアセチル化

既に詳述したように、HDAC 阻害剤の抗腫瘍効果は、HDAC 阻害剤がヒストンのアセチル化亢進を介して直接的に遺伝子発現量を調節することとある程度関連しているが、それ以外に、ヒストンのアセチル化とは異なる経路で腫瘍細胞に影響を与えている可能性がある。

ロミデプシンの非ヒストンタンパク質への作用についての検討は、本資料中に示した試験の一環としては実施していないが、他の研究者によりロミデプシンが転写因子（p53、E2F）、細胞周期タンパク質（Rb）、シャペロンタンパク質（Hsp90 など）、増殖抑制タンパク質 p53 を含むヒストンとは異なるタンパク質のアセチル化を誘発することが報告されている（Yu, 2002）。

Hsp90 は、豊富に存在する分子シャペロンであり、腫瘍細胞におけるその過剰発現が予後不良や化学療法耐性に相関する。また、Hsp90 は HDAC により脱アセチル化されることが既に明らかにされている。HDAC 阻害剤は、Hsp90 のアセチル化亢進を誘導することが知られており、これにより HER2/neu、ErbB1、ErbB2、Akt、c-Raf、Bcr-Abl 及び FLT3 などの Hsp90 クライアントタンパク質のプロテアソーム分解をもたらすことが報告されている（Whitesell, 2005；Nimmanapalli, 2003；Yu, 2002；Bali, 2004）。

8.2.8. 腫瘍細胞増殖抑制

ロミデプシンは、上記のような多面的な作用により種類の異なる腫瘍に対して奏効する可能性を秘めた強力な抗悪性腫瘍剤である。

NCI ヒト腫瘍細胞株スクリーニング試験において、ロミデプシンの活性は広範囲に及ぶことが最初に確認され、その GI_{50}（50%増殖抑制を示す濃度）は、検討した 76 種類の細胞株の大半に対して 2～10 nM であった。本パネルには、血液がん及び固形がん由来の細胞株が含まれる。この最初のヒト腫瘍細胞株スクリーニング試験後に、様々なヒト腫瘍細胞に対するロミデプシンの活性を *in vitro* 及び *in vivo* 試験で評価した。その結果、ロミデプシンの増殖抑制作用及びそれに伴うアポトーシス作用が確認され、U-937 細胞、ヒト B 細胞慢性リンパ球白血病性細胞（Byrd, 1999；Byrd, 1997）、B 細胞前リンパ球性白血病細胞（Waselenko, 1997）、T 細胞リンパ腫細胞（Piekarz, 2004）、食道がん細胞（Nguyen, 2003）、膵臓がん細胞（Sato, 2004）及び多発性骨髄腫細胞（Khan, 2004）における腫瘍増殖抑制作用の IC_{50} 値は 0.2～500 nM の範囲であった。

本概要中に示した試験では、ロミデプシンはナノモルという低濃度で血液がん及び固形がん細胞株（ヒトリンパ腫、前立腺がん、腎臓がん、白血病、結腸がん、肺がん、胃がん、乳がん、膵臓がん及びメラノーマ細胞由来）に対して強力な抗腫瘍効果を示した。重要なこととして、ロミデプシンの活性は、変異細胞に選択的であるとみられ、同様の条件下で検討したヒト正常内皮細胞及び線維芽細胞に対する IC_{50} は変異細胞株よりも高かった。さらに、ロミデプシンは、複数の化学療法剤耐性細胞株に対して in vitro 及び in vivo 試験で活性を示すことも確認され、ロミデプシンは難治性患者においても臨床的有用性を示す可能性がある。ロミデプシンは、ヒトリンパ腫細胞株に対して in vitro のみではなく、in vivo においても異種移植腫瘍に抗腫瘍効果を示した。ロミデプシンを間歇静脈内投与した場合に、異種移植モデルにおいて顕著な腫瘍縮小及び生存期間中央値の延長が認められた。本投与スケジュールは、低用量での高頻度投与レジメンよりも有効性が高くかつ忍容性が良好であることが示された。また、異種移植モデルにおいて静脈内投与経路の方が腹腔内投与経路よりも有効性が高かった。これらの結果と予備的な毒性試験で得られた結果を踏まえて、ロミデプシ

ンの初期臨床開発計画を行い、最初の第 1 相試験では間歇静脈内投与を適用し、その後、現在の臨床レジメンである 28 日間サイクルの 1、8 及び 15 日目に 14 mg/m^2 の 4 時間静脈内持続投与とした。

8.2.9. 安全性薬理試験

ロミデプシンの生理機能に対する望ましくない薬理作用を明らかにするために、*in vitro* 及び *in vivo* での安全性薬理試験を実施した。安全性薬理試験はラット及びイヌを用いて実施し、ロミデプシンの中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する作用を評価した。ロミデプシンの薬剤分類及び抗悪性腫瘍剤としての適用を考慮して、薬物乱用試験は実施しなかった。全体的に、ロミデプシンは用量依存的な安全性プロファイルを示し、その生理作用は臨床における結果と一致していた。

In vivo 試験において検討したロミデプシンの最高用量は、体表面換算に基づくとラット及びイヌでそれぞれ 6 mg/m^2 及び 20 mg/m^2 であり、ヒトにおける推定臨床用量は 14 mg/m^2 である。ラット及びイヌのいずれにおいても、毒性による制限のために、より高用量での検討は不可能であった。これらの試験では、ロミデプシン投与により中枢神経系及び心血管系に対して用量依存的な生理作用が認められたが、これらの作用は概して 24 時間以上持続せず、投与終了直後又は 2 週間以内に消失した。中枢神経系に対する作用は体温上昇及び自発運動量の増加などであり、概して軽度であった。

8.2.10. 薬力学的薬物相互作用試験

ロミデプシンの治療濃度では、hERG チャネル及びモルモットモデルの活動電位に対する作用はみられなかった。生物学的に重要な受容体及びイオンチャネルのパネルに対するロミデプシンの作用の検討では、ロミデプシンは薬理学的濃度で有意な結合を示さなかった。イヌを用いた試験において、1 mg/kg の用量で最大 8%の QTc 間隔延長が散発的に認められたが、投与前値からの差はわずかであったため、これらの変化は毒性学的にはほとんど意義はないと考えられた。

一般的な薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかったが、ロミデプシンは医療現場では他の抗悪性腫瘍剤と併用投与されることが考えられるため、ロミデプシンと他の抗悪性腫瘍剤との併用投与試験を実施した。*In vitro* 試験では、ヒト前立腺がん由来 DU-145 細胞株において、ADR、CDDP、VP-16、5FU 又は PTX との共存により、少なくとも相加的な、多くの場合に相乗的な細胞増殖阻害作用が認められた。また、*in vivo* 試験では、マウス白血病由来 L-1210 細胞移植モデル、並びにヒト膵臓がん由来の PANC-1 細胞及び同 BxPC-3 細胞異種移植モデルを用いてロミデプシンとの併用作用試験を実施した。その結果、ヒト膵臓がん由来 PANC-1 細胞異種移植モデル及びマウス白血病由来 L-1210 細胞移植モデルにおいて ADR 又はゲムシタビン塩酸塩との併用投与により、抗腫瘍作用の増強が認められた。

以上、ロミデプシンは多面的な抗腫瘍作用を有する強力な HDAC 阻害剤である。*In vitro* 及び *in vivo* 試験において、ロミデプシン処置により、多数の鍵となる調節遺伝子の誘導及び抑制が確認された。ロミデプシンは転写調節作用を介して、細胞増殖抑制、アポトーシスの誘導、形質転換細胞の形態学的復帰、血管新生阻害、血管新生因子の発現抑制などの重要で多彩な抗腫瘍作用を示す。また、転写因子、増殖抑制タンパク質、分子シャペロンタンパク質（Hsp90 など）を含む複数のヒストンとは異なるタンパク質のアセチル化亢進が認められている。これらの作用は、PTCL 患者においてロミデプシン投与によりみられる臨床活性に重要な役割を果たしていると思われる。しかし、臨床活性を示す機序は、完全には明らかになってはいない。

安全性薬理試験では、ロミデプシンにより軽度かつ散発的な自発運動量増加及び体温上昇がみられたが、呼吸器系に対する作用はみられなかった。また、in vivo 安全性薬理試験において心血管系に対してわずかではあるが用量依存的な作用も認められた。臨床試験では、ロミデプシン投与により QTc、T 波（陰性 T 波、2 相性 T 波等）及び ST-T 部分（ST 下降）などの一過性の心電図上の変化が報告されている。

9. 参考文献

Bali P, George P, Cohen P, et al. Superior activity of the combination of histone deacetylase inhibitor LAQ824 and the FLT-3 kinase inhibitor PKC412 against human acute myelogenous leukemia cells with mutant FLT-3. Clin Cancer Res. 2004;10:4991-4997.

Bali P, Pranpat M, Bradner J, et al. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. J Biol Chem. 2005;280(29):26729-26734.

Bradner J, West N, Grachan M, et al. Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010; 6(3) 238-243.

Bazett HC. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. Heart. 1920;7:353-370.

Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. Nat Rev Cancer. 2004;4:793-805.

Byrd JC, Shinn C, Ravi R, et al. Depsipeptide (FR901228): a novel therapeutic agent with selective, in vitro activity against human B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. Blood. 1999;94(4):1401-1408.

Byrd JC, Waselenko JK, Shinn CA, et al. FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide, has significant in vitro activity against human B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). Blood. 1997;90(10)(suppl 1):532a.

Carlos TM, Harlan JM. Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. Immunol Rev. 1990;114:5-28.

Chen Z, Clark S, Birkeland M, et al. Induction and superinduction of growth arrest and DNA damage gene 45 (GADD45) α and β messenger RNAs by histone deacetylase inhibitors trichostatin A (TSA) and butyrate in SW620 human colon carcinoma cells. Cancer Lett. 2002;188:127-140.

Dimitriu-Bona A, Burmester GR, Waters SJ, et al. Human mononuclear phagocyte differentiation antigens. I. Patterns of antigenic expression on the surface of human monocytes and macrophages defined by monoclonal antibodies. J Immunol. 1983;130(1):145-152.

Ferrara FF, Fazi F, Bianchini A, et al. Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia. Cancer Res. 2001;61:2-7.

Fridericia LS. The duration of systole in an electrocardiogram in normal humans and in patients with heart disease. Acta Med Scand. 1920;53:469-486.

Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, et al. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. Cancer Res. 2002;62:4916-4921.

Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, et al. Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. Mol Cancer Ther. 2003;2(2):151-163.

Glick RD, Swendeman SL, Coffey DC, et al. Hybrid polar histone deacetylase inhibitor induces apoptosis and CD95/CD95 ligand expression in human neuroblastoma. Cancer Res. 1999;59:4392-4399.

Hoshino I, Matsubara H, Akutsu Y, et al. Gene expression profiling induced by histone deacetylase inhibitor, FK228, in human esophageal squamous cancer cells. Oncol Rep. 2007;18(3):585-592.

Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, et al. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. Nat Med. 2005;11:71-76.

Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. Psychopharmacologia. 1968;13:222-257.

Jaboin J, Wild J, Hamidi H, et al. MS-27-275, an inhibitor of histone deacetylase, has marked in vitro and in vivo antitumor activity against pediatric solid tumors. *Cancer Res.* 2002;62(21):6108-6115.

Johnstone RW. Histone -deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. Nature Rev Drug Discov. 2002;1:287-299.

Khan SB, Maududi T, Barton K, et al. Analysis of histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228), effect on multiple myeloma. Br J Haematol. 2004;125:156-161.

Kim YB, Lee KH, Sugita K, et al. Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits mammalian histone deacetylase. Oncogene. 1999;18:2461-2470.

Klisovic DD, Katz SE, Effron D, et al. Depsipeptide (FR901228) inhibits proliferation and induces apoptosis in primary and metastatic human uveal melanoma cell lines. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44(6):2390-2398.

Lundqvist A, Abrams SI, Schrump DS, et al. Bortezomib and depsipeptide sensitize tumors to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a novel method to potentiate natural killer cell tumor cytotoxicity. Cancer Res. 2006;66(4):7317-7325.

Marks PA, Miller T, Richon VM. Histone deacetylases. Curr Opin Pharmacol. 2003;3:344-351.

Matsunaga T, Mitsui T, Harada T, et al. QT corrected for heart rate and relation between QT and RR intervals in beagle dogs. J Pharmacol Toxicol Meth. 1997;38(4):201-209.

Michaelis M, Michaelis UR, Fleming I, et al. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. Mol Pharmacol. 2004;65:520-527.

Miller TA, Witter DJ, Belvedere S. Histone deacetylase inhibitors. 2003;46(24):5097-5116.

Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. Nat Rev Cancer. 2006;6:38-51.

Munster PN, Troso-Sandoval T, Rosen N, et al. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells. Cancer Res. 2001;61:8492-8497.

Nakajima H, Kim YB, Terano H, et al. FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. Exp Cell Res. 1998;241(1):126–133.

Newbold A, Lindemann RK, Cluse LA, et al. Characterisation of the novel apoptotic and therapeutic activities of the histone deacetylase inhibitor romidepsin. Mol Cancer Ther. 2008;7(5):1066-1079.

Nguyen DM, Schrump WD, Tsai WS, et al. Enhancement of depsipeptide-mediated apoptosis of lung or esophageal cancer cells by flavopiridol: activation of the mitochondria-dependent death-signaling pathway. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003;125(5):1132-1142.

Nimmanapalli R, Fuino L, Bali P, et al. Histone deacetylase inhibitor LAQ824 both lowers expression and promotes proteasomal degradation of Bcr-Abl and induces apoptosis of imatinib mesylate-sensitive or -refractory chronic myelogenous leukemia-blast crisis cells. Cancer Res. 2003;63:5126-5135.

Passmore JS, Lukey PT, Ress SR. The human macrophage cell line U937 as an in vitro model for selective evaluation of mycobacterial antigen-specific cytotoxic T-cell function. Immunology. 2001;102:146-156.

Peart MJ, Smyth GK, van Laar RK, et al. Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(10):3697-3702.

Peart MJ, Tainton KM, Ruefli AA, et al. Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. Cancer Res. 2003;63:4460-4471.

Perussia B, Lebman D, Ip SH, et al. Terminal differentiation surface antigens of myelomonocytic cells are expressed in human promyelocytic leukemia cells (HL60) treated with chemical inducers. Blood. 1981;58:836-843.

Piekarz RL, Robey RW, Zhan Z, et al. T-cell lymphoma as a model for the use of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: impact of depsipeptide on molecular markers, therapeutic targets, and mechanisms of resistance. Blood. 2004;103(12):4636-4643.

Qian DZ, Kato Y, Shabbeer S, et al. Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589. Clin Cancer Res. 2006;12(2):634-642.

Qiu L, Burgess A, Fairlie DP, et al. Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells. Mol Biol Cell. 2000;11(6):2069-2083.

Rajgolikar G, Chan KK, Wang HCR. Effects of a novel antitumor depsipeptide FR901228 on human breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 1998;51(1):29-38.

Rasheed W, Bishton M, Johnstone RW, et al. Histone deacetylase inhibitors in lymphoma and solid malignancies. Expert Review of Anticancer Therapy. 2008;8(3):413-432.

Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, et al. Histone deacetylase inhibitor selectively induces $p21^{WAF1}$ expression and gene-associated histone acetylation. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(18):10014-10019.

Robey RW, Shukla S, Finley EM, et al. Inhibition of P-glycoprotein (ABCB1)- and multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1)-mediated transport by the orally administered inhibitor, CBT-1(®). Biochem Pharmacol. 2008;75(6):1302-1312.

Rossig L, Li H, Fisslthaler B, et al. Inhibitors of histone deacetylation downregulate the expression of endothelial nitric oxide synthase and compromise endothelial cell function in vasorelaxation and angiogenesis. Circ Res. 2002;91:837-844.

Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, et al. The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by Bid cleavage and production of reactive oxygen species. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98(19):10833-10838.

Sandor V, Senderowicz A, Mertins S, et al. P21-dependent g_1 arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228. Br J Cancer. 2000;83(6):817-825.

Sasakawa Y, Naoe Y, Sogo N. Marker genes to predict sensitivity to FK228, a histone deacetylase inhibitor. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(4):603-616.

Sato N, Ohta T, Kitagawa H, et al. FR901228, a novel histone deacetylase inhibitor, induces cell cycle arrest and subsequent apoptosis in refractory human pancreatic cancer cells. Int J Oncol. 2004;24:679-685.

Ueda H, Nakajima H, Hori Y, et al. Action of FR901228, A novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum*, No. 968, on ha-ras transformed NIH3T3 cells. Biosci Biotech Biochem. 1994a;58(19):1579-1583.

Ueda H, Manda T, Matsumoto S, et al. FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum*, No. 968, III. Antitumor activities on experimental tumors in mice. J Antibiot. 1994b;47(3):315-323.

Ueda H, Nakajima H, Hori Y. et al. FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum,* No. 968. I. taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties and antitumor activity. J Antibiotic. 1994c;47(3):301-310.

Waselenko JK, Przygodzki R, Grever MR, et al. Flavopiridol, UCN-01, FR901228 and gemcitabine have significant in vitro activity in de novo B-cell prolymphocytic leukemia with aberrant p53 function. Blood. 1997;90:532a [ASH abstract 2369].

Watanabe K, Okamoto K, Yonehara S. Sensitization of osteosarcoma cells to death receptor-mediated apoptosis by HDAC inhibitors through downregulation of cellular FLIP. Cell Death Differ. 2005;12:10-18.

Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. Nat Rev Cancer. 2005;5:761-772.

Witt O, Sand K, Pekrun A. Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. Blood. 2000;95:2391-2396.

Xiao JJ, Foraker AB, Swaan PW, et al. Efflux of depsipeptide FK228 (FR901228, NSC-630176) is mediated by P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1. J Pharmacol Exp Ther. 2005;313:268-276.

Yu X, Guo ZS, Marcu MG, et al. Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by depsipeptide FR901228. J Natl Cancer Inst. 2002;94:504-513.

Yu XD, Wang SY, Chen GA. Apoptosis induced by depsipeptide FK228 coincides with inhibition of survival signaling in lung cancer cells. Cancer J. 2007;13:105-113.

Zhang Y, Adachi M, Kawamura R, et al. Bmf is a possible mediator in histone deacetylase inhibitors FK228 and CBHA-induced apoptosis. Cell Death Differ. 2006;13:129-140.

TABLE OF CONTENTS

1. 薬理試験：一覧表 2
1.1. 効力を裏付ける試験 2
1.2. 副次的薬理試験 3
1.3. 安全性薬理試験 4
1.4. 薬力学的薬物相互作用試験 5
2. 効力を裏付ける試験 6
2.1. *In vitro* 試験 6
2.2. *In vivo* 試験 13
3. 副次的薬理試験 22
4. 安全性薬理試験 23
5. 薬力学的薬物相互作用試験 26

1. 薬理試験：一覧表

1.1. 効力を裏付ける試験

被験物質：ロミデプシン

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	資料番号
遺伝子発現プロファイルを指標とした HDAC 阻害剤の抗腫瘍作用の予測	遺伝子発現 （ヒトリンパ腫細胞、ヒト前立腺がん細胞、ヒト腎臓がん細胞） 細胞傷害活性、遺伝子発現 （ヌードマウス）	In vitro 静脈内投与	藤沢薬品工業株式会社（現アステラス製薬株式会社）	CRE040010	4.2.1.1.1
ヒトリンパ腫由来 U-937 細胞に対する新規 HDAC 阻害剤 FK228 の *in vitro* 及び *in vivo* での作用検討	細胞傷害活性、アポトーシス、細胞周期、細胞分化、クロマチン免疫沈降 （ヒトリンパ腫細胞、慢性骨髄性白血病細胞、急性リンパ芽球性白血病細胞） 細胞傷害活性 （SCID マウス）	In vitro、細胞培養 腹腔内投与	藤沢薬品工業株式会社（現アステラス製薬株式会社）	CRE040013	4.2.1.1.2
ヒト培養細胞株に対する FK228 の細胞傷害活性	細胞傷害活性 （ヒト腫瘍細胞株）	In vitro、細胞培養	藤沢薬品工業株式会社（現アステラス製薬株式会社）	CRE010130	4.2.1.1.3
FR901228 の抗腫瘍作用と毒性：非臨床薬理試験	細胞傷害活性、高分子合成、DNA 架橋及び切断、DNA 合成、細胞周期、遺伝子発現 （マウス胚細胞、ヒトがん細胞、ヒト線維芽細胞、ヒト内皮細胞） 細胞傷害活性（マウス）	In vitro、細胞培養 静脈内投与又は腹腔内投与	藤沢薬品工業株式会社（現アステラス製薬株式会社）	CRR910025	4.2.1.1.4
遺伝子発現を指標とした FK228 の抗腫瘍作用の予測	アポトーシス、 細胞周期、遺伝子発現（がん細胞） 遺伝子発現 （ヌードマウス）	In vitro 静脈内投与	藤沢薬品工業株式会社（現アステラス製薬株式会社）	CRE010158	4.2.1.1.5
ヒト前立腺がん LNCaP 細胞における前立腺特異抗原の mRNA 発現量及び分泌量に対する FK228 の作用	細胞傷害活性、遺伝子発現 （ヒト前立腺がん細胞）	In vitro、細胞培養	藤沢薬品工業株式会社（現アステラス製薬株式会社）	CRE020081	4.2.1.1.6

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	資料番号
新規 HDAC 阻害剤 FK228 の血管形成因子の発現に対する作用に依存した抗腫瘍作用	遺伝子発現、クロマチン免疫沈降（がん細胞） 遺伝子発現（ヌードマウス）	In vitro、細胞培養 静脈内投与	藤沢薬品工業株式会社（現アステラス製薬株式会社）	CRE040012	4.2.1.1.7
ヒト腫瘍細胞異種移植モデルでの FK228 の抗腫瘍活性	細胞傷害活性（ヌードマウス）	静脈内投与又は腹腔内投与	米国国立がん研究所/ Southern Research Institute	CRE000198	4.2.1.1.8
ヒト腫瘍細胞異種移植ヌードマウスにおける FK228 の抗腫瘍活性	細胞傷害活性（ヌードマウス）	In vivo：静脈内投与	藤沢薬品工業株式会社（現アステラス製薬株式会社）	CRE010131	4.2.1.1.9

1.2. 副次的薬理試験

該当なし。

1.3. 安全性薬理試験

被験物質：ロミデプシン

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	資料番号
中枢神経系 FR901228 の安全性薬理試験－ラットを用いた中枢神経系に対する作用	Irwin 法（ラット）	In vivo：静脈内持続投与	薬物安全性試験センター	GLR030774	4.2.1.3.1
FR901228 の安全性薬理試験－イヌを用いた中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対する作用	観察及びテレメトリーシステム（イヌ）	In vivo：静脈内持続投与	薬物安全性試験センター	GLR030775	4.2.1.3.2
心血管系 FR901228 の安全性薬理試験－hERG チャネル試験	HEK-293 細胞	In vitro：細胞培養	薬物安全性試験センター	GLR030533	4.2.1.3.3
FR901228 の安全性薬理試験（2）：細胞内微小電極法を用いた活動電位測定	モルモット乳頭筋標本	In vitro：オーガンバス潅流	株式会社環境バイリス研究所（現日精バイリス株式会社 滋賀研究所）	GLR030460	4.2.1.3.4
FR901228 の安全性薬理試験－イヌを用いた中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対する作用	テレメトリーシステム（イヌ）	In vivo：静脈内持続投与	薬物安全性試験センター	GLR030775	4.2.1.3.2
呼吸系 FR901228 の安全性薬理試験－イヌを用いた中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対する作用	テレメトリーシステム（イヌ）	In vivo：静脈内持続投与	薬物安全性試験センター	GLR030775	4.2.1.3.2
ジチオスレイトールにより還元されたロミデプシンの各種カリウムチャネルに対する in vitro 結合実験	*In vitro* 結合試験	In vitro：細胞培養	MDS Pharma Service	DVRS-003	4.2.1.3.5
各種受容体に対する FR901228 の結合実験	各種受容体及びチャネル	In vitro：細胞培養	第一化学薬品株式会社薬物動態研究所（現積水メディカル株式会社）	GLR030404	4.2.1.3.6

1.4. 薬力学的薬物相互作用試験

被験物質：ロミデプシン

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	資料番号
各種化学療法剤と併用した際の HDAC 活性阻害剤 FK228 の細胞傷害活性	ヒト前立腺がん由来 DU-145 細胞	In vitro：細胞培養	藤沢薬品工業株式会社（現アステラス製薬株式会社）	CRE040062	4.2.1.4.1
FK228 のマウス白血病 L-1210 細胞に対する各種抗がん剤との併用効果	マウス白血病由来 L-1210 細胞移植モデル	In vivo：腹腔内投与	藤沢薬品工業株式会社（現アステラス製薬株式会社）	CRE040011	4.2.1.4.2
ヒト膵臓がん PANC-1 細胞又は BxPC-3 細胞異種移植 nu/nu マウスにおけるデプシペプチド（FK228）単独又はゲムシタビン塩酸塩との併用での in vivo 作用評価	ヒト膵臓がん細胞異種移植モデル	In vivo：静脈内投与及び腹腔内投与	Cancer Therapy & Research Center/ The Institute for Drug Development	vvglou0501.v2	4.2.1.4.3

2. 効力を裏付ける試験

2.1. In vitro 試験

被験物質：ロミデプシン

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	試験番号
In vitro 遺伝子発現	ヒトリンパ腫 U-937、ヒト前立腺がん細胞株 PC-3、ヒト腎臓がん細胞株 ACHN	In vitro	5 ng/mL（0、1、3、12、24 時間）	－	試験で検討した 7070 の遺伝子のうち、205 の遺伝子がロミデプシンにより変化。$p21^{WAF1/Cip1}$、IL-8 及び caspase 9 を含む 105 の遺伝子がロミデプシンによりアップレギュレートされ、100 の遺伝子（最も共通した遺伝子は MAPK 及び cyclin A2 など）がロミデプシンによりダウンレギュレートされた。	CRE040010
In vitro 細胞傷害活性、アポトーシス、細胞周期、細胞分化、クロマチン免疫沈降	ヒトリンパ腫 U-937、ヒト白血病 K562、急性リンパ芽球性白血病 CCRF-CEM	In vitro、細胞培養	5 ng/mL 溶媒：エタノール	－	増殖抑制： ロミデプシンの U-937 細胞、K562 細胞及び CCRF-CEM 細胞に対する増殖抑制作用の IC_{50} 値はそれぞれ、5.92、8.36 及び 6.95 nM であった。 アポトーシス： ロミデプシン処置 16 時間にわたり U-937 細胞に対する作用はなかった。非処置 U-937 細胞では、20～72 時間後で細胞の 4.8%がアネキシン V 陽性／PI 陰性であった。ロミデプシン 5 ng/mL で 20 時間インキュベートした後にアポトーシスを生じた細胞の割合は 20.5%であり、48 時間後まで時間依存的に増加した。アネキシン V 陽性／PI 陽性細胞の割合（%）は、対照細胞では 20～72 時間後まで約 6～8%で推移したが、ロミデプシン処置細胞では 72 時間後の 53%まで時間依存的に増加した。	CRE040013

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	試験番号
In vitro 細胞傷害活性、アポトーシス、細胞周期、細胞分化、クロマチン免疫沈降（続き）					細胞周期解析： ロミデプシン処置 10 時間で U-937 細胞に対する作用はなかった。ロミデプシン 5 ng/mL で、処置 12 時間後に G_2/M 期での細胞周期の停止が認められた。また、ロミデプシン存在下では、12 時間後に G_1 期の細胞の占める割合が低下し、24 時間後では sub-G_1 期の細胞の占める割合が増加した。ロミデプシン 0.5 ng/mL で 48 時間処置した後に薬物非存在下の培地で 24 時間インキュベートした細胞では、G_1 期での細胞周期停止が認められた。 細胞分化解析： ロミデプシン 24～96 時間処置後の CD11b 陽性／CD14 陽性細胞の割合に変化なし。ロミデプシン 5 ng/mL 存在下では、CD11b 陽性／CD14 陽性細胞の割合は 24 時間後に 72.8%まで増加したが、陽性染色を示した総細胞数はアポトーシスのために減少した。また、ロミデプシン 0.5 ng/mL では CD11b 陽性／CD14 陽性細胞の割合は 24 時間後では 86.8%に増加した。96 時間後では CD11b 陽性／CD14 陽性細胞の割合は低下し、CD11b 陽性／CD14 陰性細胞の割合が増加した。	CRE040013

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	試験番号
In vitro 細胞傷害活性、アポトーシス、細胞周期、細胞分化、クロマチン免疫沈降（続き）					P21$^{WAF1/Cip1}$ 及びゲルゾリン mRNA 発現： ロミデプシン 5 ng/mL 存在下の U-937 細胞における β-actin mRNA に対する p21$^{WAF1/Cip1}$ mRNA の相対的発現量は、インキュベート 1 時間後に約 9 倍、24 時間後には 654 倍と時間依存的に増加した。ロミデプシンは、ゲルゾリンの mRNA 発現量をインキュベート 1 時間後に 2 倍、24 時間後には 152 倍に増加させた。 ヒストンアセチル化に対する作用： ロミデプシン 5 ng/mL2 時間処置後、ヒストン H3 の p21$^{WAF1/Cip1}$ プロモーターの P1 及び P2 領域でアセチル化の増加が認められた。ヒストン H4 ではロミデプシンにより、p21$^{WAF1/Cip1}$ プロモーターのすべての領域とエクソン 2 でアセチル化が増加した。	CRE040013
In vitro 細胞傷害活性	ヒト腫瘍細胞株 CCRF-CEM、U-937、THP-1、ML-3、HL-60、JOSK-1、K562、JOK-1、OUR10、ACHN、A-498、PC-3、DU-145、SW-480、Colo201、HT-29、PC-10、NCI-H69	In vitro	記載なし	―	ロミデプシンは、検討した 18 種類のすべての腫瘍細胞株に対して細胞傷害活性を示した。 白血病（リンパ腫）、腎がん、前立腺がん、結腸がん及び肺がん培養細胞に対する平均 IC_{50}（細胞生存率が 50%低下する濃度）値はそれぞれ 3.23、4.97、1.61、1.61 及び 3.83 ng/mL であった。	CRE010130

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	試験番号
In vitro 細胞傷害活性、mRNA 発現、細胞周期、DNA 架橋及び合成	ヒト肺がん細胞、ヒト胃がん細胞、ヒト乳がん細胞、ヒト結腸がん細胞、ヒト線維芽細胞（Ras 1 細胞）、ヒト内皮細胞（L1210 細胞）、マウス胚細胞（NIH/3T3、Balb/3T3）	In vitro、細胞培養	記載なし	－	IC_{50} 値により測定した細胞傷害活性は、ヒト肺がん細胞 A549、PC-9、PC-1、PC-10、ADH 及び LX-1 に対してそれぞれ 0.7、0.3、1.2、2.4、1.0 及び 1.2 ng/mL であった。胃がん細胞 MKN28 及び MKN74 に対する IC_{50} 値はいずれも 0.9 ng/mL であった。乳がん細胞 MCF-7 及び ZR-75-1 に対する IC_{50} 値はそれぞれ 0.6 及び 0.7 ng/mL であった。結腸がん細胞 Colo-201 及び SW 480 に対する IC_{50} 値はそれぞれ 0.3 及び 1.0 ng/mL であった。ドキソルビシン単独での IC_{50} 値は、A549 及び MCF-7 細胞に対してそれぞれ 13.8 及び 13.0 ng/mL であったが、正常線維芽細胞に対しては 129.9 ng/mL であった。ロミデプシンは培養 L1210 細胞における RNA 合成を DNA 合成及びタンパク合成よりも強力に阻害した。L1210 細胞において、ロミデプシンによる DNA 鎖間の架橋形成及び単鎖 DNA の切断は認められなかった。 ロミデプシンは、Ras 1 細胞から単離した核の DNA 合成を阻害しなかった。 ロミデプシンは Ras 1 細胞の細胞周期を G_0/G_1 期で停止させた。この作用はロミデプシン除去後に回復した。 ロミデプシンは、Ras 1 細胞の c-myc mRNA 発現量を顕著に減少させたが Ha-ras mRNA 発現量の減少はみられなかった。	CRR910025

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	試験番号
In vitro アポトーシス、細胞周期、遺伝子発現	ACHN、PC-3、DU-145	In vitro	5 ng/mL 溶媒：エタノール	－	アポトーシス： ロミデプシン非処置 PC-3 細胞を 48 時間インキュベートしたときのアネキシン V 陽性／PI 陰性細胞は 3.8%、アネキシン V 陽性／PI 陽性細胞は 0.6%であった。5 ng/mL のロミデプシン存在下で 48 時間インキュベートした PC-3 細胞では、アネキシン V 陽性／PI 陰性細胞の割合が 14.8%まで増加し、アポトーシス誘導が示された。 細胞周期： ロミデプシンを処置した PC-3 細胞では、12 時間後に G_2/M 期での細胞周期の停止が認められた。 $P21^{WAF1/Cip1}$ mRNA 発現： ロミデプシン 5 ng/mL 存在下でインキュベートした PC-3 細胞及び DU-145 細胞における β-アクチン mRNA に対する $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA の相対的発現量は時間依存的に増加した。PC-3 細胞では 1 時間後に約 8 倍増加し、24 時間後に 36 倍増加した。DU-145 細胞では 1 時間後に約 4 倍増加し、24 時間後に 9 倍増加した。ACHN 細胞では、β-アクチン mRNA に対する $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA の相対的発現量の増加は認められなかった。β-アクチン mRNA に対する $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA の基準量の比における増加の順序は PC-3<DU-145<<ACHN であった。	CRE010158

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	試験番号
In vitro mRNA 発現、細胞増殖、前立腺特異抗原分泌	ヒト前立腺がん LNCaP 細胞	In vitro、細胞培養	mRNA 発現：0.01～3.2 ng/mL（24 時間） 細胞傷害活性及び前立腺特異抗原分泌：0.0488～50 ng/mL	－	前立腺特異抗原 mRNA の発現量は、0.01～0.32 ng/mL で濃度依存的にわずかに増加し、1.0 及び 3.2 ng/mL で顕著に減少した。 ロミデプシンは LNCaP 細胞の増殖を 48 時間後まで濃度依存的に抑制した。IC_{50} = 3.36 ng/mL。 前立腺特異抗原分泌は 0.391 ng/mL までの濃度で濃度依存的にわずかに増加（最大 60%）した。0.781 ng/mL 以上の濃度では前立腺特異抗原分泌が低下した。前立腺特異抗原分泌抑制は細胞増殖抑制に先立って認められた。	CRE020081
血管新生因子発現に関するロミデプシンの in vitro 作用	前立腺がん PC-3 細胞、腎がん ACHN 細胞	In vitro、細胞培養	5 ng/mL 溶媒：エタノール	－	ロミデプシンは、PC-3 細胞では、添加後 12 時間で VEGF mRNA の発現量を 51%減少させた。ACHN 細胞では、VEGF mRNA の発現量には影響を及ぼさなかった。添加後 12 時間の bFGF mRNA の発現量は、PC-3 細胞及び ACHN 細胞でそれぞれ 94%及び 81%減少した。 VEGF mRNA の基準発現量は PC-3 細胞と ACHN 細胞で同程度であり、bFGF mRNA の基準発現量は PC-3 細胞よりも ACHN 細胞の方が高かった。	CRE040012

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	試験番号
血管新生因子発現に関するロミデプシンの in vitro 作用（続き）					PC-3 細胞に低酸素状態開始と同時にロミデプシンを添加で処置した場合、処置 4～16 時間後の VEGF mRNA 発現量の増加が完全に阻害され、低酸素状態開始 4 時間後にロミデプシンで処置した場合、処置 8 及び 16 時間後の mRNA 発現量は減少した。HIF-1α mRNA の発現量には影響を及ぼさなかった。 ロミデプシンは、VEGF 遺伝子プロモーターと関連するアセチル化ヒストンのクロマチンへの蓄積を誘発した。H3 及び H4 のアセチル化量は、VEGF プロモーターの P2 領域で最も高値であった。イントロン 1 領域では、ヒストン H3 のアセチル化は増加したが、H4 のアセチル化は増加しなかった。エクソン 3 領域ではヒストン H3 及び H4 のアセチル化の増加はみられなかった。	CRE040012

2.2. *In vivo* 試験

被験物質：ロミデプシン

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	試験番号
In vivo 抗腫瘍効果ヒト前立腺がん（PC-3）、胃がん（SC-6）、腎臓がん（A498、ACHN）異種移植モデル	ヌードマウス／BALB/c *nu/nu*	静脈内投与	1.8、3.2 mg/kg を 4 日ごとに 3 回	雄 6	前立腺がん及び胃がん異種移植モデルに対するロミデプシンの抗腫瘍効果：3.2 mg/kg の用量で PC-3 増殖を 98%抑制し、SC-6 を中等度退縮。腎がん細胞に対する効果はみられなかった。 単離した異種移植がん細胞の遺伝子発現解析により、ロミデプシン感受性腫瘍細胞では発現量が高く、非感受性腫瘍細胞では発現量が低い 27 遺伝子が見出された。また、ロミデプシン感受性腫瘍細胞では発現量が低く、非感受性腫瘍細胞では発現量が高い 49 遺伝子が見出された。ロミデプシン非感受性腫瘍細胞（A498 及び ACHN）と比較して、ロミデプシン感受性腫瘍細胞（PC-3 及び SC-6）では、カスパーゼ 9 の発現は 3 倍以上高く、二重特異性ホスファターゼの発現は 1/2 未満であった。 これら 2 つの遺伝子発現と RT-PCR による RNA 解析結果は相関した。	CRE040010
ヒトリンパ腫 U-937 細胞に対するロミデプシンの in vivo 作用	SCID マウス（Fox Chase SCID C.B-17/Icr-scidJcl）	腹腔内投与	腫瘍細胞移植 24 時間後に 0.1、0.18、0.32、0.56、1 mg/kg を週 1 回又は週 2 回。 溶媒対照として 10%HCO60/生理食塩液を週 2 回投与。	雄 投与群 6、 対照群 12	溶媒対照群の生存期間中央値（MST）は 20 日であり、1 例目は試験 18 日に死亡した。 ロミデプシン投与群の MST はすべての用量で溶媒対照群に比して有意に延長した。MST は週 1 回投与で 22.5～30.5 日（0.56 mg/kg）、週 2 回投与で 25～33 日（0.32 mg/kg）であった。60 日間の評価期間終了時では 0.56 mg/kg の週 1 回及び週 2 回投与群の各 6 例中 1 例が生存した。試験 24 日では 0.18 及び 0.56 mg/kg の週 1 回投与群並びに 0.32 及び 0.56 mg/kg の週 2 回投与群の全例が生存していたが、溶媒対照群の 12 例中 11 例が死亡した。1 mg/kg の週 1 回投与群の 1 例及び 1 mg/kg の週 2 回投与群の 1 例は溶媒対照群の 1 例目の死亡前に死亡した。	CRE040013

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	試験番号
マウス固形がんを皮下又は皮内に移植したマウスにおける *in vivo* 作用。結腸がん Colon 38、メラノーマ B16、細網肉腫 M5076、ルイス肺がん、大腸がん Colon 26、肉腫 Meth A	マウス	静脈内投与	0.32、0.56、1.0、1.8、3.2、5.6、10 mg/kg を 3 日ごとに 4 回。移植後 1、4 又は 7 日目に投与を開始	N=10	マウス固形がん：ロミデプシンをがん移植翌日（試験 1 日）から投与したときには、結腸がん Colon 38、メラノーマ B16 及び肉腫 M5076 の増殖抑制がみられたが、ルイス肺がん、大腸腺がん Colon 26 及び肉腫 Meth A に対する作用はみられなかった。ロミデプシンを移植 4 又は 7 日後から投与したときには、Colon 38、M5076 及び Meth A がんに対する活性がみられた。	CRR910025

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	試験番号
ヌードマウスに皮下異種移植したヒト固形がんに対する *in vivo* での抗腫瘍作用（LX-1、LU-65、A549、LC-6、PC-9、SC-6、Colo 201、MX-1、MCF-7）	ヌードマウス BALB/c *nu/nu*	静脈内投与	1.8、3.2、5.6 及び 10 mg/kg を 4 日ごとに 3 回	N=6	9 種類の異種移植ヒト固形がん： ロミデプシンは、LU-65、LC-6、SC-6 及び MX-1 に対して抗腫瘍効果を示した（1-T/C% ≥ 0%）。10 mg/kg の用量では毒性（生存率 <65%）が認められた。	CRR910025
マウス腹水腫瘍（白血病 P388、白血病 L1210、メラノーマ B16）を腹腔内移植したマウスにおける in vivo での効果	マウス	腹腔内投与	0.032、0.056、0.1、0.18、0.32、0.56、1.0、1.8 mg/kg を P388 細胞移植マウスは連続 5 日間、L1210 及び B16 移植マウスは連続 9 日間	記載なし	マウス腹水腫瘍：ロミデプシンは、担がん（P388、L1210、B16）動物の生存期間を延長した。白血病 P388 及び L1210 担がんマウスの生存期間はそれぞれ最長 138%及び 129%延長した。メラノーマ B16 担がんマウスの生存期間は最長 174%延長した。ロミデプシンの 1 及び 1.8 mg/kg の用量では、これら 3 種のすべての生存率は 86%以下となった。	
薬剤耐性 P388 細胞を腹腔内移植したマウスにおける in vivo 抗腫瘍作用	マウス	腹腔内投与	0.18、0.32、0.56、1.0 mg/kg を連続 4 日間	N=6	ロミデプシンは検討したすべての用量でマイトマイシン C（MMC）、フルオロウラシル（5FU）、ビンクリスチン（VCR）及びシクロホスファミド（CPM）耐性腫瘍に対して有効性を示した。ロミデプシンは、ドキソルビシン耐性マウス白血病 P388 細胞に対しては検討したいずれの用量でも有効性を示さなかった。	

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	試験番号
非小細胞肺がん NCI-H522（由来／株 02/B/05）に対するロミデプシンの in vivo 細胞傷害活性	ヌードマウス	静脈内投与	0、1.6、2.4、3.6、5.3、8.0 mg/kg を 4 日ごとに 3 回	雌 10	1.6 mg/kg：1 例死亡、平均体重減少は 10.5%、増殖遅延は 40%、殺腫瘍細胞数の対数変換値（Net log cell kill）は–0.40。 2.4 mg/kg：1 例死亡、平均体重減少は 11.8%、増殖遅延は 69%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は–0.10。 3.6 mg/kg：3 例死亡、平均体重減少は 20.4%、増殖遅延は 106%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は 0.30。 5.3 mg/kg：2 例死亡、平均体重減少は 22.7%、増殖遅延は 95%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は 0.20。 8.0 mg/kg：7 例死亡、平均体重減少は 25.7%、増殖遅延は 90%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は 0.10。	CRE000198
メラノーマ UACC-62（由来／株 01/A/07F5）に対するロミデプシンの in vivo 細胞傷害活性	ヌードマウス	静脈内投与	0、1.6、2.4、3.6、5.3、8.0 mg/kg を 4 日ごとに 3 回	雌 10	1.6 mg/kg：0 例死亡、平均体重減少は 9.9%、増殖遅延は 85%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は 0.0。 2.4 mg/kg：0 例死亡、平均体重減少は 16.3%、増殖遅延は 107%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は 0.20。 3.6 mg/kg：3 例死亡、平均体重減少は 15.5%、増殖遅延は 145%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は 0.60。 5.3 mg/kg：0 例死亡、平均体重減少は 19.1%、増殖遅延は 97%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は 0.10。 8.0 mg/kg：4 例死亡、平均体重減少は 20.6%、増殖遅延は 95%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は 0.10。	

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	試験番号
進行乳がん MX-1（由来／株 22/R/20F2）に対するロミデプシンの in vivo 細胞傷害活性	ヌードマウス	静脈内投与	0.64、0.96、1.44、2.16 mg/kg を連続 5 日間	雌 10	0.64 mg/kg：0 例死亡、平均体重減少は 5.0%、増殖遅延は 111%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は 0.40。 0.96 mg/kg：2 例死亡、平均体重減少は 9.2%、増殖遅延は 144%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は 0.80。 1.44 mg/kg：9 例死亡、平均体重減少は 18.4%、増殖遅延は 111%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は 0.40。 2.16 mg/kg：10 例死亡、更なる測定はせず。	CRE000198
		静脈内投与	2.40、3.60、5.30、8.00 mg/kg を 4 日ごとに 3 回	雌 10	2.40 mg/kg：0 例死亡、平均体重減少は 5.6%、増殖遅延は 155%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は 0.10。 3.60 mg/kg：0 例死亡、平均体重減少は 5.7%、増殖遅延は 191%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は 0.50。 5.30 mg/kg：0 例死亡、平均体重減少は 14.0%、増殖遅延は 182%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は 0.40。 8.00 mg/kg：9 例死亡、平均体重減少は 21.5%、増殖遅延及び殺腫瘍細胞数の対数変換値は算出せず。	

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	試験番号
進行乳がん MX-1（由来／株 22/R/20F2）に対するロミデプシンの in vivo 細胞傷害活性	ヌードマウス	静脈内投与	1.07、1.60、2.40、3.60 mg/kg を 4 日ごとに 6 回	雌 10	1.07 mg/kg：1 例死亡、平均体重減少は 4.5%、増殖遅延は 167%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は–2.20。 1.60 mg/kg：1 例死亡、平均体重減少は 11.0%、増殖遅延は 171%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は–2.10。 2.40 mg/kg：2 例死亡、平均体重減少は 12.3%、増殖遅延は 220%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は–1.60。 3.60 mg/kg：7 例死亡、平均体重減少は 6.8%、増殖遅延は 318%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は–0.50。	CRE000198
		静脈内投与	2.40、3.60、5.30、8.00 mg/kg を 7 日ごとに 4 回	雌 10	2.40 mg/kg：3 例死亡、平均体重減少は 7.5%、増殖遅延は 131%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は–2.80。 3.60 mg/kg：6 例死亡、平均体重減少は 9.5%、増殖遅延は 73%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は–3.40。 5.30 mg/kg：7 例死亡、平均体重減少は 18.5%、増殖遅延は 296%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は–0.90。 8.00 mg/kg：10 例死亡、平均体重減少、増殖遅延及び殺腫瘍細胞数の対数変換値は算出せず。	
LOXI（MVI）（由来／株 32/R/05）に対するロミデプシンの in vivo 細胞傷害活性	ヌードマウス	静脈内投与	2.16、1.44 mg/kg を連続 5 日間	雌 10	2.16 mg/kg：4 例死亡、平均体重減少は 18%、3 例は完全退縮、増殖遅延は 525%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は 2.8。 1.44 mg/kg：0 例死亡、平均体重減少は 15%、3 例は完全退縮、増殖遅延は 381%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は 1.8。	

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	試験番号
LOX（IMVI）（由来／株32/R/05）に対するロミデプシンの in vivo 細胞傷害活性	ヌードマウス	腹腔内投与	1.60、2.40、3.60、5.30 mg/kg を 4 日ごとに 3 回	雌 10	1.60 mg/kg：0 例死亡、 平均体重減少は 13.8%、測定可能な腫瘍退縮なし、増殖遅延は 23%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は–1.60。 2.40 mg/kg：2 例死亡、平均体重減少は 7.8%、測定可能な腫瘍退縮なし、増殖遅延は 48%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は –1.40。 3.60 mg/kg：3 例死亡、平均体重減少は 8.1%、増殖遅延は 69%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は–1.20。 5.30 mg/kg：3 例死亡、平均体重減少は 10.8%、2 例は完全退縮、増殖遅延は 403%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は 1.10。	CRE000198
LOX（IMVI）（由来／株32/R/05）に対するロミデプシンの in vivo 細胞傷害活性	ヌードマウス	腹腔内投与	0、0.20、0.30、0.45、0.66 mg/kg を 3 時間ごとに 8 回	雌 10	0.20 mg/kg：5 例死亡、平均体重減少は 12.9%、測定可能な腫瘍退縮なし、増殖遅延は 50%、殺腫瘍細胞数の対数変換値は –1.70。 0.30 mg/kg 以上：全例死亡、更なる測定不能。	

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	試験番号
In vivo におけるロミデプシンによる $p21^{WAF1/Cip1}$ 及び c- myc mRNA の変化	ヌードマウス／BALB/c *nu/nu*	静脈内投与	3.2 mg/kg 溶媒：HCO60［10%ポリオキシエチル化（60 mol）硬化ヒマシ油］/生理食塩液	雄 5	PC-3 細胞では、ロミデプシン投与 1 及び 3 時間後に β-アクチン mRNA に対する $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA の相対的発現量が増加し、その後減少したが、ベースライン値よりも増加していた。PC-3 細胞における c-myc mRNA 発現量は顕著かつ速やかに減少し、β-アクチン mRNA に対する c-myc mRNA の比は、ロミデプシン投与 24 時間後に最小値に達した。ACHN 細胞では、ロミデプシンによる $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA 発現量の変化は認められなかった。投与 24 時間後の c-myc mRNA の相対的発現量はベースラインと比較して増加した。 PC-3 細胞における β-actin mRNA に対する $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA の基準量の比は ACHN 細胞よりも低かった。PC-3 細胞における β-アクチン mRNA に対する c-myc mRNA の基準量の比は ACHN 腫瘍細胞よりも高かった。	CRE010158
異種移植モデルにおける血管新生因子の発現に対するロミデプシンの in vivo 作用	ヌードマウス／BALB/c *nu/nu*	静脈内投与	3.2 mg/kg 溶媒：HCO60［10%ポリオキシエチル化（60 mol）硬化ヒマシ油］/生理食塩液	雄、記載なし	異種移植 PC-3 細胞では、ロミデプシン投与 24 時間後の VEGF 及び bFGF mRNA の発現量がそれぞれ 68%及び 88%減少した。投与 6 時間後では VEGF 及び bFGF mRNA の軽度減少が認められたに過ぎず、投与 24 時間後には対照値まで回復した。異種移植 ACHN 細胞の bFGF mRNA の基準発現量は異種移植 PC-3 細胞よりも高かった。	CRE040012

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	試験番号
ヒト腫瘍細胞のヌードマウスへの異種移植モデルでのロミデプシンの抗腫瘍活性及びロミデプシンの in vivo 細胞傷害活性 腎臓がん（ACHN、RXF-631L）、前立腺がん（PC-3、DU-145）、結腸がん（HT-29、HCC2998、HCT-15）	ヌードマウス／BALB/c ANnNCrj-*nu/nu*	静脈内投与	ロミデプシン 1.8、3.2 mg/kg を 4 日ごとに 3 回 溶媒（対照）：HCO60/生理食塩液 パクリタキセル 24 mg/kg を連続 5 日間 溶媒：エタノール：クレモフォール（1:1）（5%クレモフォール、5%エタノール、90%生理食塩液）	雌雄 6	最終投与後約 10 日目の抗腫瘍効果（腫瘍移植後 28 日目）。 ロミデプシンは異種移植 RXF-631L（腎がん）及び PC-3（前立腺がん）に対して抗腫瘍効果を示した。パクリタキセルは異種移植 RXF-631L、PC-3、DU-145、HT-29 及び HCC2998 に対して抗腫瘍効果を示した。 死亡例はなかった。 最大体重変化率はロミデプシンの 3.2 mg/kg の用量とパクリタキセルで同程度であり、11～19%の範囲であった。平均体重の最大減少は第 1 週前後に認められ、腫瘍移植後 28 日目までには回復した。	CRE010131

3. 副次的薬理試験

該当なし。

4. 安全性薬理試験

被験物質：ロミデプシン

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	投与量 (mg/kg)	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
中枢神経系	ラット／Crj:CD (SD) IGS	4 時間の静脈内持続注入	0、0.1、0.3、1.0 mg/kg	雄 6	0.1 mg/kg：一般症状及び行動に対する作用なし 0.3 mg/kg：1 例で静脈内持続投与開始 1～4 時間後の四肢の緊張及び握力の低下、静脈内持続投与開始 2 時間後の活動性の低下 1.0 mg/kg：静脈内持続投与開始 8～24 時間後に 3 例死亡、これら 3 例中 1 例は静脈内持続投与開始 1～8 時間後の驚愕反応低下。生存例（3 例）では、静脈内持続投与開始 2～4 時間後に四肢の緊張及び握力の低下（1 例）、静脈内持続投与開始 2 及び 24 時間後に活動性の低下（それぞれ 1 例及び 2 例）、静脈内持続投与開始 24 時間後に運動失調・歩行異常・攣縮（2 例）、静脈内持続投与開始 24 時間後に半眼／閉鎖（眼瞼下垂）・けいれん・疼痛反応の低下・驚愕反応の低下・心拍数増加・呼吸数増加（1 例）。	適	GLR030774
中枢神経系	イヌ／ビーグル	4 時間の静脈内持続注入 陽性対照は経口投与	0（溶媒）、0.1、0.3、1.0 mg/kg 陽性対照アステミゾール 20 mg/kg	雄 4	0.1 mg/kg：自発運動量増加。体温及び摂餌量に作用なし。 0.3 mg/kg：自発運動量増加、 体温上昇。摂餌量に作用なし。 1.0 mg/kg：摂餌量減少、体温上昇。自発運動量に作用なし。 アステミゾール 20 mg/kg：作用なし。	適	GLR030775
心臓	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）をトランスフェクションした HEK293 細胞	In vitro：インキュベーション	0（溶媒）、0.3、1、10 μg/mL 陽性対照 E-4031 0.1 μmol/L	－	被験物質適用 10 分後のテール電流の最大振幅低下により作用を評価 溶媒：阻害率 8.3% 0.3 μg/mL：阻害率 7.9% 1 μg/mL：阻害率 18%（$P<0.001$） 10 μg/mL：阻害率 37.3%（$P<0.001$） E-4031：阻害率 82.5%	適	GLR030533

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	投与量 (mg/kg)	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
心臓（右心室乳頭筋）	モルモット	In vitro：オルガンバス潅流	0（溶媒）、0.3、1、10 µg/mL 陽性対照 (±) ソタロール塩酸塩 0.1 mmol/L	雄 5	90%再分極時の活動電位持続時間（ADP_{90}）： 0.3 及び 1 µg/mL は ADP_{90} に対して作用を示さなかった。 10 µg/mL は ADP_{90} を短縮した。 ソタロールは ADP_{90} を延長した。 活動電位振幅（APA）： 10 µg/mL で APA 減少 静止膜電位（RP）及び最大立ち上がり速度（dV/dt max）に対する作用なし。	適	GLR030460
心血管系	イヌ／ビーグル	4 時間の静脈内持続注入 陽性対照は経口投与	0（溶媒）、0.1、0.3、1.0 mg/kg 陽性対照アステミゾール 20 mg/kg	雄 4	0.1 mg/kg： 血圧、心拍数及び心電図に作用なし。 0.3 mg/kg： 血圧に作用なし。心拍数は 52%増加、RR 間隔は 34%短縮（静脈内持続注入 10～18 時間後で最大）。 1.0 mg/kg： 血圧に作用なし。心拍数は 34%増加（静脈内持続注入開始 4.5～10 時間後で最大）、RR 間隔は 26% 短縮（静脈内持続注入開始 5～10 時間後で最大）。 アステミゾール 20 mg/kg： 血圧に作用なし。心拍数は 40%増加（静脈内持続注入開始 0.5～24 時間後で最大）、RR 間隔は 26%短縮（静脈内持続注入開始 0.5～8 時間後で最大）、静脈内持続注入開始 0.5～24 時間後で QTc 延長。	適	GLR030775
呼吸系	イヌ／ビーグル	4 時間の静脈内持続注入 陽性対照は経口投与	0（溶媒）、0.1、0.3、1.0 mg/kg 陽性対照アステミゾール 20 mg/kg	雄 4	0.1 mg/kg： 呼吸数及びヘモグロビン酸素飽和度に作用なし。 0.3 mg/kg： 呼吸数及びヘモグロビン酸素飽和度に作用なし。 1.0 mg/kg： 呼吸数及びヘモグロビン酸素飽和度に作用なし。	適	GLR030775

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	投与量 (mg/kg)	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
					アステミゾール 20 mg/kg： 呼吸数及びヘモグロビン酸素飽和度に作用なし。		
血液学的検査	イヌ／ビーグル	4 時間の静脈内持続注入 陽性対照は経口投与	0（溶媒）、0.1、0.3、1.0 mg/kg 陽性対照アステミゾール 20 mg/kg	雄 4	0.1 mg/kg： 作用なし。 0.3 mg/kg： 静脈内持続注入開始 24 時間後の平均赤血球ヘモグロビン濃度増加、リンパ球数減少、平均赤血球容積減少。 1.0 mg/kg： 静脈内持続注入開始 24 時間後の赤血球数増加、ヘモグロビン量増加、平均赤血球ヘモグロビン濃度増加、リンパ球数減少、平均赤血球容積減少。 アステミゾール 20 mg/kg： 白血球、リンパ球、RBC、ヘモグロビン及びヘマトクリット値が有意に減少し、MCV 及び MCHC が減少した。		
心血管系 K チャネル	ハムスター、ラット、ヒト	In vitro：インキュベーション	10 µM 還元型	－	K_{ATP}（ハムスター）を 10 µM で 15%阻害 SK_{CA}（ラット）には 10 µM で作用せず hERG（ヒト）を 10 µM で 7%阻害 IC_{50} 評価基準を満たさなかった。	否	DVRS-003
各種受容体及びチャネル	ラット、ヒト（組換え）、モルモット、ウサギ	In vitro	0（50% DMSO）、0（溶媒）、0.3、1、10 µg/mL 陽性対照	－	エストロゲン受容体阻害率は 1 及び 10 µg/mL でそれぞれ 26.61%及び 97.76%。 ニューロキニン 2 受容体阻害率は 10 µg/mL で 71.36%。 他のすべての受容体及びチャネルに対する阻害率はいずれの濃度でも 20%未満であり、結合親和性がないことが確認された。参照物質（陽性対照）の阻害率は 50%を上回り、これら測定系の反応性は適切であることが示された。	否	GLR030404

5. 薬力学的薬物相互作用試験

被験物質：ロミデプシン

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	投与量 (mg/kg)	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
In vitro 試験 各種化学療法剤との併用下でのロミデプシンの細胞傷害活性	ヒト前立腺がん由来細胞株 DU-145 細胞：*In vitro* 細胞増殖阻害作用	in vitro	—	—	ドキソルビシン、シスプラチン又はエトポシドとロミデプシンの併用では、処置の順番にかかわらず、細胞増殖抑制作用が相乗的に発現した。 フルオロウラシルとロミデプシンの併用では、併用存在下又はロミデプシンを先に処置した場合に細胞増殖阻害が相乗的に、また、パクリタキセルとロミデプシンでは、パクリタキセルを先に処置した場合のみ細胞増殖阻害作用が相乗的に発現した。	否	CRE040062
In vivo 試験 移植モデルにおける各種化学療法剤とのロミデプシンの併用効果	マウス白血病細胞株由来 L-1210 細胞移植モデル：イリノテカン塩酸塩、カルボプラチン、パクリタキセル、マイトマイシン C 及びドキソルビシンとの併用投与での抗腫瘍活性の検討 雌性 CDF1（DBA/2）系マウス	移植日の翌日から 1 日 1 回 4 日間連続腹腔内投与	ロミデプシン：0.14, 0.28 イリノテカン塩酸塩：25, 50 カルボプラチン：0.5, 1 パクリタキセル：12.5, 25 マイトマイシン C：0.625, 1.25 ドキソルビシン：1, 2	不明	ロミデプシン 0.14 又は 0.28 mg/kg 単独投与群： ・生存期間の中央値：9～10 日 ・抗腫瘍作用（T/C）：100%～111% ロミデプシン（0.14 mg/kg）とドキソルビシン（1 mg/kg）を併用投与した場合のみに相乗的効果が認められ、生存期間が有意に延長した。その他の組み合わせでは、明確な相乗効果は得られなかった。	否	CRE040011

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	投与量 (mg/kg)	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
ヒト腫瘍細胞異種移植モデルにおけるロミデプシンとゲムシタビン塩酸塩との併用効果	ヒト膵臓がん由来細胞株 PANC-1 細胞及び BxPC-3 細胞異種移植モデル：ロミデプシン単独又はゲムシタビン塩酸塩併用投与での抗腫瘍活性の検討 雌性ヌードマウス	ロミデプシン： 1 日 1 回 4 日ごとに 3 回静脈内投与 ゲムシタビン塩酸塩： 1 日 1 回、3 日ごとに 4 回腹腔内投与	ロミデプシン：2.5, 5 ゲムシタビン塩酸塩：40, 80	雌：8～9	PANC-1 細胞異種移植モデル： ゲムシタビン塩酸塩、単独投与群及びロミデプシン単独投与群ともに、用量依存的に体重減少がみられたが、試験完了時までに回復した。 ゲムシタビン塩酸塩とロミデプシンの併用投与群では、抗腫瘍効果の評価で有意な効果が認められた。 BxPC-3 細胞異種移植モデル： いずれの薬剤の単独投与又は併用投与においても、抗腫瘍効果は認められなかった。	否	vvglou0501.v2