2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

レンバチニブメシル酸塩（以下本薬）は，経口投与で有効性を示すマルチキナーゼ阻害剤であり，血管内皮増殖因子（VEGF）受容体（VEGFR1～3）をはじめ，線維芽細胞増殖因子（FGF）受容体（FGFR1～4），血小板由来増殖因子受容体の一つ PDGFRα，KIT，RET などの腫瘍血管新生あるいは腫瘍の悪性形質に関与する受容体型チロシンキナーゼ（RTK）に対する選択的な阻害活性を有する。VEGFR2 あるいは FGFR1 と本薬との複合体の X 線結晶構造解析から，本薬はソラフェニブを含む既存のマルチキナーゼ阻害剤とは異なる結合様式によりキナーゼ阻害作用を発揮することが示されている。本薬は，国内では 2015 年 3 月に根治切除不能な甲状腺癌の適応で承認されている。本申請は，本薬の医薬品製造販売承認事項に効能・効果として，「切除不能な肝細胞癌」を追加するための承認事項一部変更承認申請である。

肝細胞癌は腫瘍血管網が発達した典型的な多血性腫瘍である。腫瘍血管新生では VEGF 誘導性の血管新生に加え，FGF 誘導性の血管新生も重要な役割を果たしていると言われており，VEGFR と FGFR の両者を阻害することに基づく本薬の血管新生阻害は，肝細胞癌に対する有効な治療法となることが期待される。本申請パッケージの非臨床薬理試験では，初回申請において記載した VEGF 誘導性血管新生阻害に加え，FGF 誘導性血管新生阻害についての in vitro 及び in vivo 試験結果を報告する。肝細胞癌は各種 FGFR を発現しており，癌細胞自身あるいは周囲の腫瘍微小環境から供給される FGF の刺激により活性化した FGFR シグナルが肝細胞癌の悪性化に寄与している症例が多く報告されている。本申請パッケージの非臨床試験では，FGFR シグナルが活性化している肝細胞癌細胞株に対する FGFR 阻害作用及び細胞増殖阻害作用を報告する。また肝細胞癌患者由来の腫瘍片移植（PDX）を含む各種肝細胞癌移植マウスモデルに対する抗腫瘍効果を報告する。

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 3
2.6.2.1 まとめ 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 4
2.6.2.3 副次的薬理試験 27
2.6.2.4 安全性薬理試験 27
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 27
2.6.2.6 考察及び結論 27
2.6.2.7 図表 31
2.6.2.8 参考文献 31

薬理試験の概要文の略号一覧表

略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
bFGF	basic fibroblast growth factor	塩基性線維芽細胞増殖因子
BWL	body weight loss	体重減少
CI	confidence interval	信頼区間
DFG	Asp-Phe-Gly (aspartic acid-phenylalanine-glycine)	アスパラギン酸-フェニルアラニン-グリシン
dT/C	change in treatment / change in control	処理群での変化／対照群での変化
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
FGF	fibroblast growth factor	線維芽細胞増殖因子
FGFR	fibroblast growth factor receptor	線維芽細胞増殖因子受容体
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell	ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
IFNγ	interferon γ	インターフェロンγ
K_i	inhibition constant	阻害定数
KP-1/FGF	recombinant KP-1 cells expressing fibroblast growth factor	線維芽細胞増殖因子を発現している組換え KP-1 細胞
KP-1/VEGF	recombinant KP-1 cells expressing vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子を発現している組換え KP-1 細胞
MAPK	mitogen-activated protein kinase	分裂促進因子活性タンパク質キナーゼ
MVD	microvessel density	微小血管密度
NA	not applicable	該当せず
NS	not significant	有意差なし
NT	not tested	検討せず
PDX	patient-derived xenograft	患者由来腫瘍組織片移植
pFRS2	phosphorylated FRS2	リン酸化 FRS2
PO	oral	経口
QD	once a day	1 日 1 回
RBW	relative body weight	比体重
RTK	receptor tyrosine kinase	受容体型チロシンキナーゼ
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	ソディウムドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動
TAM	tumor-associated macrophages	腫瘍関連マクロファージ
T/C	treatment / control	処理群／対照群
TGI	tumor growth inhibition	腫瘍増殖抑制
TV	tumor volume	腫瘍体積
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor	血管内皮増殖因子受容体

2.6.2 薬理試験の概要文
2.6.2.1 まとめ
2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

レンバチニブメシル酸塩は，経口投与で有効性を示すマルチキナーゼ阻害剤であり，血管内皮増殖因子（VEGF）受容体（VEGFR1～3）をはじめ，線維芽細胞増殖因子（FGF）受容体（FGFR1～4），血小板由来増殖因子受容体の一つ PDGFRα，KIT，RET などの腫瘍血管新生あるいは腫瘍の悪性形質に関与する受容体型チロシンキナーゼ（RTK）に対する選択的な阻害活性を有する。VEGFR2-レンバチニブ複合体の X 線結晶構造解析から，本薬の VEGFR2 への結合様式は他の市販されているマルチキナーゼ阻害剤とは異なることが示されている。レンバチニブメシル酸塩は主として VEGFR シグナル及び FGFR シグナルの阻害による腫瘍血管新生阻害作用に基づき，様々ながん腫に対し抗腫瘍効果を発揮する。国内では 2015 年 3 月に根治切除不能な甲状腺癌の適応で承認されている。

レンバチニブメシル酸塩の肝細胞癌に対する効力を裏付ける薬力学的試験として以下の in vitro 及び in vivo 試験が実施された。非臨床試験では，特にことわらない限り，「レンバチニブ」あるいは「本薬」を用いるが，用量あるいは濃度については「レンバチニブメシル酸塩」としての値を表示する。

主薬効を裏付ける in vitro 薬力学的試験；
- FGFR1-レンバチニブ複合体のX線結晶構造解析
- 内皮細胞の FGF 誘導性血管様管腔構造形成に対する阻害作用
- 内皮細胞の VEGF 誘導性及び FGF 誘導性シグナル伝達に対する阻害作用
- ヒト肝細胞癌細胞株の FGFR シグナルに対する阻害作用
- ヒト肝細胞癌細胞株の細胞増殖に対する直接阻害作用

主薬効を裏付ける in vivo 薬力学的試験；
- In vivo 血管新生モデルに対する阻害作用
- マウス in vivo における FGFR シグナル阻害作用
- ヒト肝細胞癌移植マウスモデルにおける腫瘍増殖抑制作用
- マウス肝細胞癌同種移植モデルにおける腫瘍免疫促進作用

FGFR1-レンバチニブ複合体の X 線結晶構造解析の結果，レンバチニブは，FGFR1 キナーゼドメインのアデノシン三リン酸（ATP）結合サイト及び，隣接するアロステリック領域に結合すること，キナーゼドメインのアスパラギン酸-フェニルアラニン-グリシン（DFG）モチーフは，DFG-in 構造をとることが示され，レンバチニブの FGFR1 への結合様式は，VEGFR2 への結合様式と同様に type V（Okamoto, et al., 2015）であった。

ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いた in vitro 血管新生モデルにおいてレンバチニブは VEGF 誘導性血管様管腔構造の形成を阻害する（初回申請資料）のみならず，FGF 誘導性血管様管腔構造の形成も阻害し，50%阻害濃度（IC_{50}）値は 7.3 nmol/L（無血清培地での測定値＝タンパク質非結合型の濃度）であった。レンバチニブは HUVEC において VEGF あるいは FGF によって誘導される 2 つのシグナ伝達経路，分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）経路及び PI3K–AKT–mTOR–S6K–S6 経路（以下 mTOR–S6K–S6 経路）の両者を阻害した。レンバチニブは FGF19-FGFR4 オートクリンループにより FGFR シグナルが恒常的に活性化しているヒト肝細胞癌細胞株 Hep 3B2.1-7 及び HuH-7 の細胞増殖を，IC_{50} 値 86 及び 160 nmol/L（タンパク質非結合型）で阻害した。これはレンバチニブによる両細胞の細胞内 FGFR シグナルの阻害と対応していた。レンバチニブは FGFR シグナルの恒常的活性化が報告されていないヒト肝細胞

癌細胞株 PLC/PRF/5 の細胞増殖に対する阻害作用は比較的弱く，IC_{50} 値は 3750 nmol/L 以上（タンパク質非結合型）であった。

癌細胞を封入したチャンバーをマウスの背部皮下の dorsal air sac に包埋し，チャンバーに接する皮膚内の血管新生を評価するマウス in vivo 血管新生モデル（dorsal air sac model）において，レンバチニブの経口（PO）投与（1 日 1 回 [QD] ×4）は，VEGF 誘導性及び FGF 誘導性の血管新生を 10 及び 30 mg/kg の用量で有意に阻害した。マウスにおいてレンバチニブの単回投与（10 mg/kg）は，FGFR シグナル阻害の薬力学バイオマーカーとして知られる FGF23 の血漿濃度を有意に増加させた。

レンバチニブ（QD×7～28，PO）の肝細胞癌に対する腫瘍増殖抑制作用を患者由来腫瘍組織片移植（patient-derived xenograft：PDX）モデルを含む 5 種の無胸腺マウス皮下移植モデルで評価した。全ての移植モデルにおいて，レンバチニブは有意な腫瘍増殖抑制作用と高い忍容性を示した。レンバチニブは，ヒト肝細胞癌細胞株 PLC/PRF/5 移植モデルにおいて 3～100 mg/kg あるいは 1～100 mg/kg の用量で有意な腫瘍増殖抑制作用を示した。FGFR シグナルの亢進が知られているヒト肝細胞癌細胞株 Hep 3B2.1-7 及び LIXC-012 の移植モデルにおいて 3～30 mg/kg の用量で有意な腫瘍増殖抑制を示した。LIXC-012 移植モデルでは媒体対照群でみられた体重減少が，レンバチニブ投与により緩和された。これは腫瘍負荷軽減に伴う全身症状の改善のためと考えられた。レンバチニブは，2 種類の PDX モデルにおいて，10 及び 30 mg/kg の用量で，また，PDX 由来肝細胞癌細胞株の移植モデルにおいて，3～30 mg/kg の用量で有意な腫瘍増殖抑制作用を示した。

マウス肝細胞癌細胞株 BNL 1ME A.7R.1 を免疫応答性マウス（同種同系）及び無胸腺マウス（同種異系）に移植したモデルにおいて，レンバチニブは免疫応答性マウスモデルに対し，無胸腺マウスモデルよりも有意に強い腫瘍増殖抑制作用を示した。レンバチニブ（QD×7，PO，10 mg/kg）により，腫瘍組織内の腫瘍関連マクロファージ（tumor-associated macrophage：TAM）の有意な減少と，腫瘍所属リンパ節内の活性化細胞傷害性 T 細胞の有意な増加がみられた。TAM は腫瘍免疫の抑制に，また活性化細胞傷害性 T 細胞等はがん細胞攻撃などの腫瘍免疫にかかわるとされていることから，免疫応答性マウスの移植モデルでは，レンバチニブの腫瘍増殖抑制作用に，腫瘍免疫の促進作用も貢献している可能性が示唆された。

以上，レンバチニブは VEGF 誘導性の血管新生のみならず FGF 誘導性の血管新生も抑制することによって腫瘍血管新生抑制作用を発揮すること，PDX を含む様々なヒト肝細胞癌移植マウスモデルにおいて腫瘍増殖抑制作用を発揮すること，FGFR シグナルが亢進している肝細胞癌細胞株に対しては FGFR シグナル抑制に基づく直接の細胞増殖抑制作用も期待できることを示した。またレンバチニブが腫瘍免疫担当細胞のポピュレーションを変化させることで腫瘍の微小環境において腫瘍免疫を促進する可能性も示唆された。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験の一覧表は 2.6.3.1 項に記載した。

2.6.2.2.1 in vitro 薬理試験

2.6.2.2.1.1 FGFR1-レンバチニブ複合体の結晶構造解析（添付資料 4.2.1.1.1，4.2.1.1.2［参考］，[W-20[redacted]0357，W-20[redacted]0522]）

レンバチニブ初回申請において VEGFR2-レンバチニブ複合体の X 線結晶構造解析結果を記載し，レンバチニブが，標的キナーゼ VEGFR2 の ATP 結合サイト及び隣接するアロステリック領域に結合すること，複合体の立体構造が DFG-in 型であることを示している。レンバチニブのこの結合様式（type V）は，多くの市販されているマルチキナーゼ阻害剤の結合様式（type I あるいは type II）とは異なる様式である（Okamoto, et al., 2015）。レンバチニブが，VEGFR2 以外の主要な標的キナーゼである FGFR1 に対しても同様の結合様式をとるかどうかを確認するために，新たに FGFR1-レンバチニブ複合体の X 線結晶構造解析を行い（試験番号 W-20160357），VEGFR2-レンバチニブ複合体の X 線結晶構造解析結果（試験番号 W-20140522）と比較した。ヒト FGFR1 のキナーゼドメイン（Ser461-Asp774）を含む組換えタンパク質を調製し，レンバチニブと反応させた。得られた FGFR1-レンバチニブ複合体を結晶化し 2.86 Å の解像度で X 線構造解析を行った。

表 2.6.2-1 に示すように，FGFR1-レンバチニブ複合体において，レンバチニブから 3.9 Å 以内の位置にある FGFR1 のアミノ酸残基は 20 個であり，内訳は ATP 結合サイト（キナーゼに共通するサイト），それに隣接するアロステリック領域（キナーゼごとに異なる調節領域），及び両者の境界に位置するゲートキーパー（キナーゼに共通するサイト）（Traxler and Furet, 1999）にそれぞれ 13 個，6 個，1 個であった。これは VEGFR2-レンバチニブ複合体における同様の解析の内訳，13 個，5 個，1 個とよく似ていた。レンバチニブは FGFR1 に対しても，VEGFR2 に対してと同様，ATP 結合サイト及び隣接するアロステリック領域に結合することが示された。

表 2.6.2-1　FGFR1-及び VEGFR2-レンバチニブ複合体内でレンバチニブから 3.9 Å 以内に位置するアミノ酸残基

Site/Region	Amino Acid Residues	
	FGFR1	VEGFR2
ATP 結合サイト	Gly485, Phe489, Val492, Ala512, Glu562, Tyr563, Ala564, Ser565, Gly567, Asn568, Leu630, Ala640, Asp641	Leu840, Gly841, Ala866, Glu885, Val899, Glu917, Phe918, Cys919, Lys920, Gly922, Leu1035, Cys1045, Asp1046
ゲートキーパー	Val561	Val916
アロステリック領域	Lys514, Glu531, Met534, Met535, Phe642, Leu644	Lys868, Ile888, Leu889, Phe1047, Leu1049

各アミノ酸残基の領域区分（Site/Region）は Traxler and Furet (1999) に従った。各アミノ酸残基の通し番号は Universal Protein Resource Knowledgebase の 11362 及び 35968 ページに記載の FGFR1 及び VEGFR2 の一次構造に従った。DFG モチーフに属する Asp 及び Phe は下線で示した。ATP＝ アデノシン三リン酸，DFG＝ アスパラギン酸-フェニルアラニン-グリシン.
添付資料 4.2.1.1.1，4.2.1.1.2［参考］

図 2.6.2-1 に示すように，FGFR1-レンバチニブ複合体（A），VEGFR2-レンバチニブ複合体（B）いずれにおいても，レンバチニブ（緑色の ball-and-stick モデルで示す）はそのウレア構造からキノリン環までの部分で ATP 結合サイト（アミノ酸残基を赤字で示す）と結合し，シクロプロパン環でアロステリック領域（アミノ酸残基を青字で示す）と結合していた。このシクロプロパン環と，Phe642（FGFR1）あるいは Phe1047（VEGFR2）のフェニル環との間には強い疎水性結合が示唆された。

レンバチニブの分子（添付資料 1.9.1 項）においてキノリン環の窒素原子あるいはシクロプロ

ピルカルバモイルアミノ基の酸素原子と ATP 結合サイトに含まれる Ala564 と Asp641 の主鎖原子，及びレンバチニブのシクロプロピルカルバモイルアミノ基に含まれる 2 つの窒素原子とアロステリック領域に含まれる Glu531 の側鎖原子とは，原子間の距離が 3.5 Å 以内であることから，これらの原子間に計 4 つの水素結合が示唆された（Liao, 2007; Zuccotto, et al., 2010; McTigue, et al., 2012）。

キナーゼは一般に activation loop N 末端に Asp-Phe-Gly という共通構造（DFG モチーフ）を持つ。不活性型キナーゼでは DFG モチーフは DFG-out 構造をとって酵素活性中心が基質に対し閉じられた状態に，また活性型キナーゼでは DFG モチーフは DFG-in 構造をとって酵素活性中心が基質に対し開かれた状態になる（Zuccotto, et al., 2010, 図 2.6.2-1C）。図 2.6.2-1 に示すように，FGFR1-レンバチニブ複合体（A），VEGFR2-レンバチニブ複合体（B）ともに DFG モチーフ（ピンク色の ball-and-stick モデルで示す）は，DFG-in 構造をとっていた。

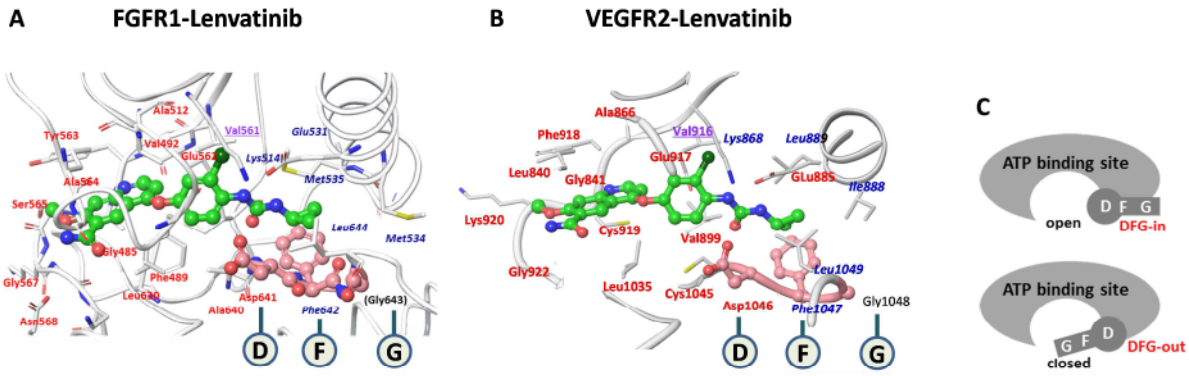


図 2.6.2-1　FGFR1-及び VEGFR2-レンバチニブ複合体の X 線結晶構造解析

A: FGFR1-レンバチニブ複合体，　B: VEGFR2-レンバチニブ複合体
C: DFG-in 及び DFG-out 構造の模式図
レンバチニブ及び DFG モチーフはそれぞれ，緑（●）及びピンク（●）の ball-and-stick モデルで示した。レンバチニブより 3.9 Å 以内に位置するアミノ酸残基は，それぞれが属する領域別に赤字（ATP 結合領域），紫（ゲートキーパー），青字（アロステリック領域）で示した。ATP = アデノシン三リン酸，DFG = アスパラギン酸-フェニルアラニン-グリシン.
添付資料 4.2.1.1.1，4.2.1.1.2［参考］

市販の多くのマルチキナーゼ阻害剤の標的キナーゼへの結合様式は，type I（ATP 結合サイトに結合するがアロステリック領域に結合しない。阻害剤—キナーゼ複合体は DFG-in 構造をとる），あるいは type II（ATP 結合サイトとアロステリック領域に結合する。阻害剤—キナーゼ複合体は DFG-out 構造をとる）と言われている（Liao, 2007; Zuccotto, et al., 2010; Blanc, et al., 2013）。これに対し Okamoto らは，ATP 結合サイトとアロステリック領域に結合しかつ阻害剤—キナーゼ複合体が DFG-in 構造をとる場合を，従来にはない新しい結合様式として type V と称することを提唱している（Okamoto, et al., 2015）。Type V の阻害剤はアロステリック領域に結合することで高い標的特異性を発揮しつつ，活性型のキナーゼをその DGF-in 構造を変えることなく阻害することが特徴である。以上の X 線結晶構造解析の結果は，レンバチニブは分子構造上異なるキナーゼのクラスに属する FGFR1 と，VEGFR2（Robinson, et al., 2000）に対し，ともに type V の結合様式をとることを示している。

2.6.2.2.1.2　HUVEC の FGF 誘導性血管様管腔構造形成に対する作用（添付資料 4.2.1.1.3, [M[redacted]012]）

本試験では，レンバチニブの HUVEC における FGF 誘導性血管様管腔構造の形成に対する阻害作用を検討した。ソラフェニブの作用もあわせて検討した。HUVEC は 96 ウェルプレートの Geltrex®（Invitrogen）上に播種し，200PRF 培地（GIBCO: protein free and phenol red free）で培養した。Geltrex はマウス腫瘍由来の基底膜成分から増殖因子を最大限に低減したもので，FGF 誘導性の細胞の足場依存的形態変化，特に内皮細胞の血管様管腔構造形成の評価に用いられる。媒体（Medium 200PRF containing 0.1% dimethyl sulfoxide），レンバチニブメシル酸塩あるいはソラフェニブトシル酸塩の系列希釈液（それぞれ 0.152～1000 nmol/L）及び 20 ng/mL のヒト遺伝子組換え basic fibroblast growth factor（bFGF）を添加し，20 時間培養した。細胞を 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide（MTT）にて染色し，得られた血管様管腔構造の画像を GelCount™ (Oxford Optronix)で撮影した。イメージアナライザー（IN Cell Developer Toolbox，GE Healthcare）を用いて血管様管腔構造の長さを測定した。阻害(%)は以下の式で求めた。

$$\text{阻害（\%）} = \frac{\text{媒体対照ウェルの平均} - \text{化合物処理ウェルの平均}}{\text{媒体対照ウェルの平均}} \times 100$$

図 2.6.2-2 に示すように，レンバチニブは Geltrex モデルにおける HUVEC の FGF 誘導性血管様管腔構造の形成を濃度依存的に抑制し，IC_{50} 値は 7.3 nmol/L（95% 信頼区間 [CI]: 2.1～26 nmol/L）であった。またソラフェニブの IC_{50} 値は 380 nmol/L（95% CI: 200～710 nmol/L）であった。

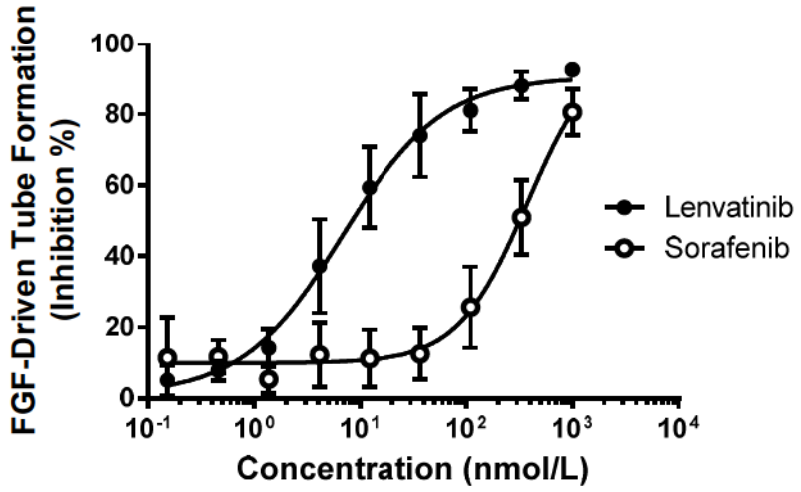


図 2.6.2-2　HUVEC の FGF 誘導性血管様管腔構造形成に対する作用

各値は 3 重測定した 3 回の実験の平均値±標準偏差を示す。FGF = 線維芽細胞増殖因子，HUVEC = ヒト臍帯静脈内皮細胞．　添付資料 4.2.1.1.3 （Figure 1 を改変）

2.6.2.2.1.3　HUVEC の VEGF あるいは FGF によって惹起されるシグナル伝達経路に対する作用（添付資料 4.2.1.1.4，4.2.1.1.5，[BIOMT-20[redacted]-009，BIOMT-20[redacted]-010]）

本試験では，VEGF あるいは FGF によって惹起される血管内皮細胞内の血管新生にかかわるシグナル伝達経路に対するレンバチニブの作用を検討した。RAS–RAF–MEK–Erk1/2 経路（MAPK 経路）として p44/42 MAPK（Erk1/2）のリン酸化，及び PI3K–AKT–mTOR–S6K–S6 経

路（mTOR–S6K–S6 経路）として p70 S6 キナーゼ（S6K）及び S6 リボソームタンパク（S6）のリン酸化（Iijima, et al., 2002; Salmond, et al., 2009）を測定した。また，これらのシグナル伝達経路に対する，mTOR 阻害剤であるエベロリムスの作用について検討した。

VEGF 誘導試験では HUVEC を低血清（0.5%ウシ胎児血清）培地中で約 16 時間飢餓させた後，レンバチニブ（100 nmol/L），エベロリムス（1 nmol/L），あるいは両者の混合物を添加し，さらに 1 時間培養した。VEGF（20 ng/mL）を添加し，さらに 30 分間培養後，細胞のライセートを調製した（試験番号 BIOMT-2015-009）。FGF 誘導試験では HUVEC を低血清（0.5%ウシ胎児血清）培地中で約 16 時間飢餓させた後，レンバチニブ（1000 nmol/L），エベロリムス（1 nmol/L），あるいは両者の混合物を添加し，さらに 1 時間培養した。FGF（20 ng/mL）を添加し，さらに 30 分間培養後，細胞のライセートを調製した（試験番号 BIOMT-2015-010）。レンバチニブ及びエベロリムスの濃度は，予備実験によりそれぞれの試験系で最大限のシグナル伝達系の阻害を起こす濃度とした。各ライセートにつきタンパク質量をそろえ，還元条件下でソディウムドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を行い，Erk1/2，リン酸化 Erk1/2 (T202/Y204)[a]，S6K，リン酸化 S6K(T389)[a]，リン酸化 S6K(T421/S424)[a]，S6，リン酸化 S6(S235/S236)[a] に対する抗体でイムノブロットを行い，化学発光によって可視化した。

図 2.6.2-3A 及び B それぞれの左端 2 レーンで示すように，HUVEC において Erk1/2（T202/Y204）のリン酸化レベル，S6K（T389）及び S6K（T421/S424）のリン酸化レベル，S6（S235/S236）のリン酸化レベルはそれぞれ，VEGF あるいは FGF により増加し，VEGF 及び FGF は MAPK 経路及び mTOR–S6K–S6 経路を活性化することが確認された。この試験系において，A 及び B それぞれの L レーンで示すように，レンバチニブは Erk1/2（T202/Y204），S6K（T389），S6K（T421/S424），S6（S235/S236）全てについて，VEGF あるいは FGF によるリン酸化の増加を阻害した。以上の結果より，血管内皮細胞において血管新生にかかわる 2 つのシグナル伝達経路，MAPK 経路及び mTOR–S6K–S6 経路は VEGF 及び FGF どちらの刺激によってもほぼ同様に活性化されること，レンバチニブは VEGF 及び FGF によって活性化される両経路をともに阻害することが示された。

a: Erk1/2(T202/Y204)は Erk1/2 の 202 番目のスレオニン残基と 204 番目のチロシン残基，S6K(T389)は S6K の 389 番目のスレオニン残基，S6K(T421/S424)は S6K の 421 番目のスレオニン残基と 424 番目のセリン残基，S6(S235/S236)は S6 の 235 番目と 236 番目のセリン残基を示す。

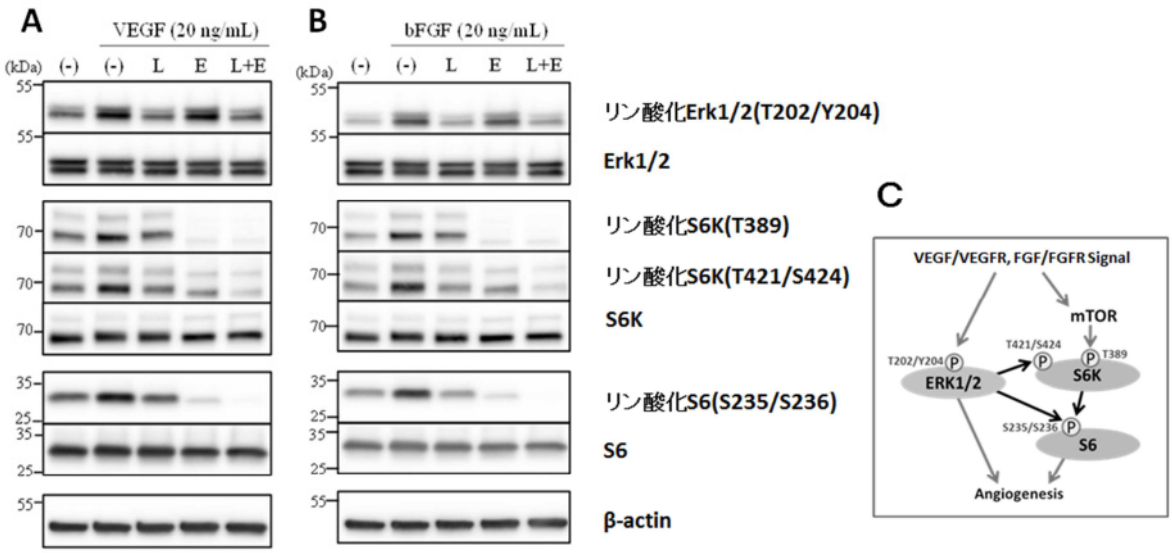


図 2.6.2-3　HUVEC の VEGF あるいは FGF によって惹起されるシグナル伝達経路に対する作用

A:　VEGF 誘導シグナル伝達のウェスタンブロット解析
B:　FGF 誘導シグナル伝達のウェスタンブロット解析
C:　MAPK 経路から mTOR–S6K–S6 経路への伝達経路の模式図
(Lehman, et al., 2003 ;　Roux, et al., 2007).
(–) = 媒体対照，bFGF = 塩基性線維芽細胞増殖因子，E = エベロリムス，HUVEC = ヒト臍帯静脈内皮細胞，L = レンバチニブ，VEGF = 血管内皮増殖因子.
添付資料 4.2.1.1.4，4.2.1.1.5

2.6.2.2.1.4　ヒト肝細胞癌細胞株の FGFR シグナルに対する抑制作用（添付資料 4.2.1.1.6，4.2.1.1.7，4.2.1.1.8，[M[redacted]014，M[redacted]019，M[redacted]015]）

本試験では，3 種類のヒト肝細胞癌細胞株，Hep 3B2.1-7，HuH-7，及び SNU-449 の細胞内 FGFR シグナルに対するレンバチニブの阻害作用を検討した。FGFR シグナルは FGFR1～4 の下流に共通するシグナル分子である FRS2 のリン酸化の程度で評価した。肝細胞癌の治療に用いられているマルチキナーゼ阻害剤であるソラフェニブの作用もあわせて検討した。

Hep 3B2.1-7 及び HuH-7 は FGF19 遺伝子増幅により FGF19 を過剰発現し，また，その受容体である FGFR4 を発現している。その結果，両細胞では FGF19-FGFR4 のオートクリンループが形成されて，FGFR シグナルが恒常的に活性化されている（Sawey, et al., 2011 ; Guagnano, et al., 2012）。予備試験により，両細胞では FRS2 が恒常的にリン酸化されていることが確認された。また Hep 3B2.1-7 では FGF19 を加えることでさらにリン酸化が亢進することがわかっている。SNU-449 は FGFR1～4 のなかでは主に FGFR1 を発現しており，bFGF を加えることにより，FRS2 がリン酸化される。

Hep 3B2.1-7 は，約 13 時間 0.5%ウシ血清アルブミンを含む培地で飢餓させた後，レンバチニブ（0.03，0.1，0.3，1，及び 3 μmol/L）あるいはソラフェニブ（0.1，0.3，1，及び 3 μmol/L）を加え，さらに 1 時間インキュベーションした。FGF19（100 ng/mL）を加えた 5 分後に細胞のラ

イセートを調製した（試験番号 M16014）。HuH-7 は，レンバチニブ（0.03，0.1，0.3，1，及び 3 μmol/L）あるいはソラフェニブ（0.1，0.3，1，及び 3 μmol/L)を加え，1 時間インキュベーション後に細胞のライセートを調製した（試験番号 M16019）。SNU-449 は，約 14 時間 0.5%ウシ血清アルブミンを含む培地で飢餓させた後，レンバチニブ（0.1，0.3，1，及び 3 μmol/L）あるいはソラフェニブ（0.1，0.3，1，及び 3 μmol/L）を加え，さらに 1 時間インキュベーションした。bFGF（20 ng/mL）を加えた 5 分後に細胞のライセートを調製した（試験番号 M16015）。得られた Hep 3B2.1-7，HuH-7，SNU-449 の各ライセートを SDS-PAGE で展開後，FRS2 のリン酸化を抗 FRS2 抗体，及び抗リン酸化 FRS2（チロシン 436 残基がリン酸化した FRS2）抗体を用いた免疫染色で検出した。

図 2.6.2-4 に示すように，Hep 3B2.1-7 の FRS2 リン酸化は，FGF19 添加により促進された。レンバチニブ（0.03～3 μmol/L）は，この FRS2 リン酸化を濃度依存的に阻害し，1 μmol/L 以上の濃度では完全に阻害した。一方，ソラフェニブ（0.1～3 μmol/L）は明確な阻害を示さなかった。すなわちソラフェニブそれぞれの濃度で，トータル FRS2 （リン酸化 FRS2＋非リン酸化 FRS）に対するリン酸化 FRS2 のバンドの濃さの程度は特に変わらず，レンバチニブのようなリン酸化 FRS2 のバンド消失もみられなかった。

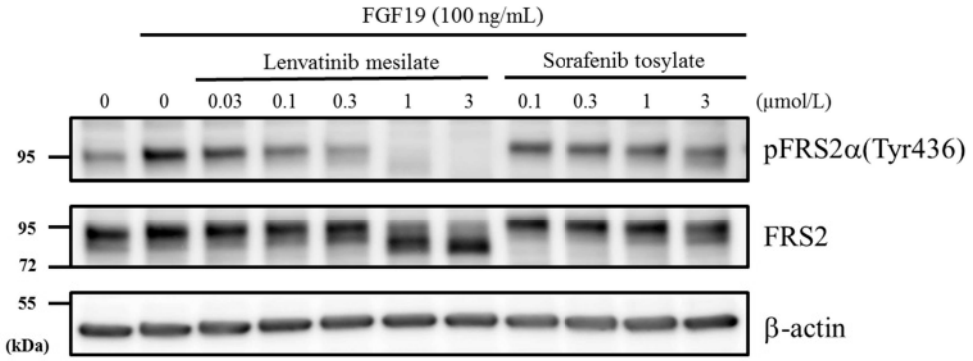


図 2.6.2-4　ヒト肝細胞癌細胞株 Hep 3B2.1-7 の細胞内 FGFR シグナルに対する作用

FGFR1～4 共通の情報伝達分子である FRS2 のリン酸化に対する作用を評価した。
FGFR＝ 線維芽細胞増殖因子受容体，pFRS2 =リン酸化 FRS2.　添付資料 4.2.1.1.6

図 2.6.2-5 に示すように，レンバチニブ（0.03～3 μmol/L）は，HuH-7 の FRS2 リン酸化を濃度依存的に阻害し，1 μmol/L 以上の濃度では完全に阻害した。一方，ソラフェニブ（0.1～3 μmol/L）は，明確な阻害を示さなかった。

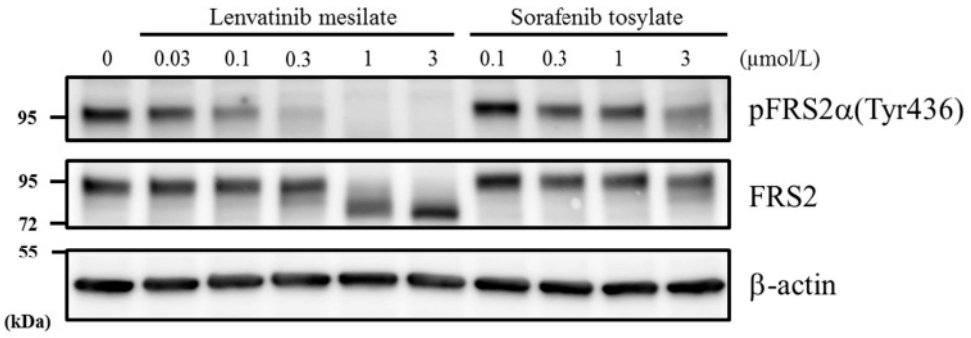


図 2.6.2-5　ヒト肝細胞癌細胞株 HuH-7 の細胞内 FGFR シグナルに対する作用

FGFR1～4 共通の情報伝達分子である FRS2 のリン酸化に対する作用を評価した。
FGFR＝線維芽細胞増殖因子受容体，pFRS2＝リン酸化 FRS2.　添付資料 4.2.1.1.7

図 2.6.2-6 に示すように，レンバチニブ（0.3～3 μmol/L）は，bFGF によって誘導された SNU-449 の FRS2 リン酸化を濃度依存的に阻害し，3 μmol/L の濃度では完全に阻害した。一方，ソラフェニブ（0.1～3 μmol/L）は明確な阻害を示さなかった。

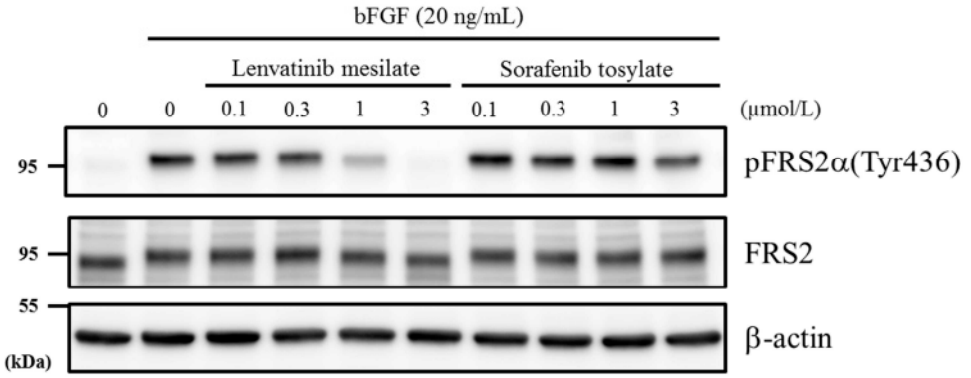


図 2.6.2-6　ヒト肝細胞癌細胞株 SNU-449 の細胞内 FGFR シグナルに対する作用

FGFR1～4 共通の情報伝達分子である FRS2 のリン酸化に対する作用を評価した。
FGFR＝線維芽細胞増殖因子受容体，pFRS2＝リン酸化 FRS2.　添付資料 4.2.1.1.8

2.6.2.2.1.5　肝細胞癌細胞株に対する細胞増殖阻害作用（添付資料 4.2.1.1.9，[M[redacted]007]）

本試験では，ヒト肝細胞癌細胞株，Hep 3B2.1-7，HuH-7，及び PLC/PRF/5 の細胞増殖に対するレンバチニブの阻害作用を検討した。Hep 3B2.1-7 及び HuH-7 の細胞増殖は FGF19-FGFR4 のオートクリンループによって恒常的に活性化されている FGFR シグナルに依存していることが知られている（Sawey, et al., 2011；Guagnano, et al., 2012；Futami, et al., 2017）。

Hep 3B2.1-7，HuH-7，あるいは PLC/PRF/5 を 96 ウェルプレートに播種し，一晩培養後，媒体対照，レンバチニブあるいはソラフェニブの希釈系列（39.1～10,000 nmol/L）を各ウェルに添加した。6 日間培養後，2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt（WST-8）試薬を加え，マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を

測定することで生細胞数を測定した。阻害（%）は以下の式で求めた（細胞も化合物も添加していないウェルをブランクウェルとした）。

$$\text{阻害 (\%)} = \frac{\text{媒体対照ウェルの平均} - \text{化合物処理ウェルの平均}}{\text{媒体対照ウェルの平均} - \text{ブランクウェルの平均}} \times 100$$

図 2.6.2-7A 及び表 2.6.2-2 に示すようにレンバチニブは，Hep 3B2.1-7 及び HuH-7 に対し PLC/PRF/5 に対するよりも強い細胞増殖阻害作用を示し，IC_{50} 値は 230 nmol/L（95% CI: 160～320 nmol/L）及び，420 nmol/L（95% CI: 320～550 nmol/L）であった。レンバチニブの培地に含まれる 10%ウシ胎児血清中のタンパク質への結合を考慮すると，タンパク質非結合型としてのレンバチニブの IC_{50} 値はそれぞれの細胞株に対し 86 及び 160 nmol/L であった。レンバチニブの PLC/PRF/5 に対する細胞増殖阻害作用は比較的弱く，IC_{50} 値は 10,000 nmol/L 以上（タンパク質非結合型として 3750 nmol/L 以上）であった。一方，図 2.6.2-7B 及び表 2.6.2-2 に示すようにソラフェニブは Hep 3B2.1-7，HuH-7，及び PLC/PRF/5 に対する細胞増殖阻害作用において明確な選択性は示さず，IC_{50} 値はそれぞれ 2300，2200，及び 5300 nmol/L であった。

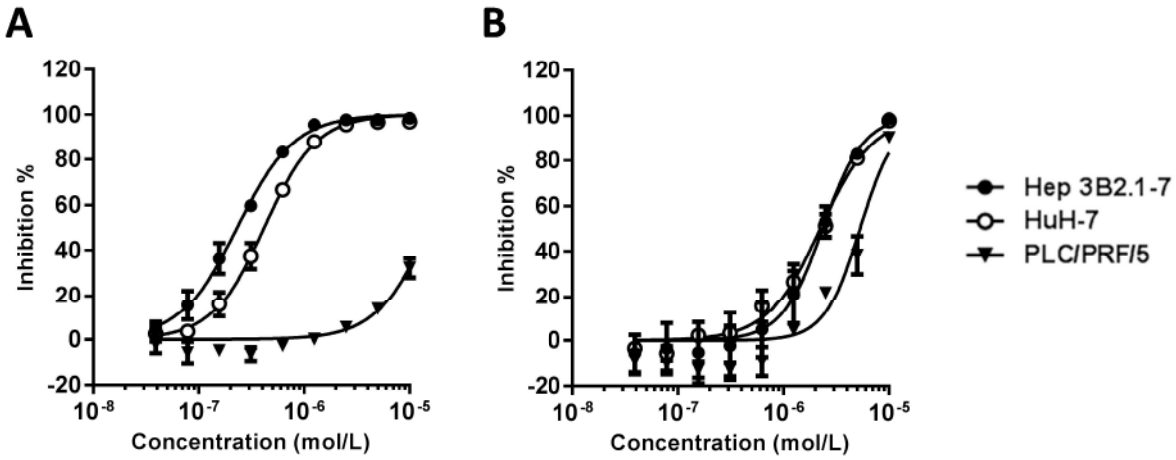


図 2.6.2-7　ヒト肝細胞癌細胞株の細胞増殖に対する阻害作用

A:　レンバチニブ，　B:　ソラフェニブ
各値は 3 重測定した 3 回の実験の平均値±標準偏差を示す。添付資料 4.2.1.1.9

表 2.6.2-2　ヒト肝細胞癌細胞株の細胞増殖に対する阻害作用（IC_{50}）

Cell	IC_{50} (95% CI) (nmol/L)	
	Lenvatinib	Sorafenib
Hep 3B2.1-7	230 (160～320) [86][a]	2300 (1400～3600) [620][a]
HuH-7	420 (320～550) [160][a]	2200 (1600～3000) [590][a]
PLC/PRF/5	>10000	5300 (4100～6900) [1400][a]

CI＝信頼区間，IC_{50}＝50%阻害濃度.
a: [　] 内はタンパク質非結合型としての IC_{50} 値を示す。上段に示す IC_{50} 値× (1–X/100) で算出した （X は 10%ウシ胎児血清を含む培地におけるタンパク質結合率：レンバチニブでは 62.5%，ソラフェニブでは 73.2%）。　添付資料 4.2.1.1.9.

2.6.2.2.2 主薬効薬理試験 in vivo 試験

2.6.2.2.2.1 In vivo 血管新生モデルにおける阻害作用（添付資料 4.2.1.1.10［参考］, [Yamamoto, et al., 2014]）

本試験では，マウス dorsal air sac モデル（Funahashi, et al., 1999）において VEGF 誘導性及び FGF 誘導性の血管新生に対するレンバチニブの阻害作用を検討した。またソラフェニブの作用もあわせて検討した。ヒト VEGF を過剰発現させた組換え KP-1 ヒト膵臓癌細胞株，KP-1/VEGF 及びマウス FGF を過剰発現させた組換え KP-1 細胞株，KP-1/FGF を，コラーゲン・ゲルとともにミリポアチャンバーに入れ，これを C57BL/6 マウスの背部皮下に作製した dorsal air sac に包埋した（Day 1）。同日より，媒体対照の蒸留水（20 mL/kg），レンバチニブメシル酸塩（3，10，及び 30 mg/kg）あるいはソラフェニブトシル酸塩（100 及び 300 mg/kg）の投与（QD×4，PO）を開始した。このチャンバーに接する皮膚において，細胞株から産生される VEGF あるいは FGF によって誘導される血管新生に対するレンバチニブあるいはソラフェニブの作用を検討した。Day 5 にチャンバーに接する皮膚において，細胞株から産生される VEGF あるいは FGF によって誘導される血管新生を評価した。マウス血液細胞をあらかじめ放射標識しておき，当該皮膚内の血液量を，放射能量として測定した。処理群と対照群の比（T/C）は以下の式によって算出した。

$$\text{T/C (\%)} = \frac{\text{化合物処理群の値 - コラーゲン対照群 a の平均値}}{\text{媒体対照群の平均値- コラーゲン対照群の平均値}} \times 100$$

a:　コラーゲン・ゲルのみ（細胞なし）を入れたミリポアチャンバーを包埋したマウスにおいて媒体対照を投与した群

図 2.6.2-8A に示すように，KP-1/VEGF あるいは KP-1/FGF を入れたチャンバーを包埋したマウスの皮膚において，KP-1 mock（mock-transfected cells）あるいはコラーゲンのみを入れたチャンバーを包埋したマウスの皮膚と比較して顕著な血管網の発達が認められ，チャンバー内の癌細胞から分泌された VEGF あるいは FGF によって in vivo 血管新生が誘導されたと考えられた。本モデルにおいて，レンバチニブ（10 及び 30 mg/kg）は VEGF 誘導性及び FGF 誘導性の in vivo 血管新生を有意に，かつそれぞれの用量でほぼ同程度に抑制した。一方，ソラフェニブ（100 及び 300 mg/kg）は VEGF 誘導性の in vivo 血管新生を有意に抑制したが，FGF 誘導性の in vivo 血管新生は有意には抑制しなかった（図 2.6.2-8B）。

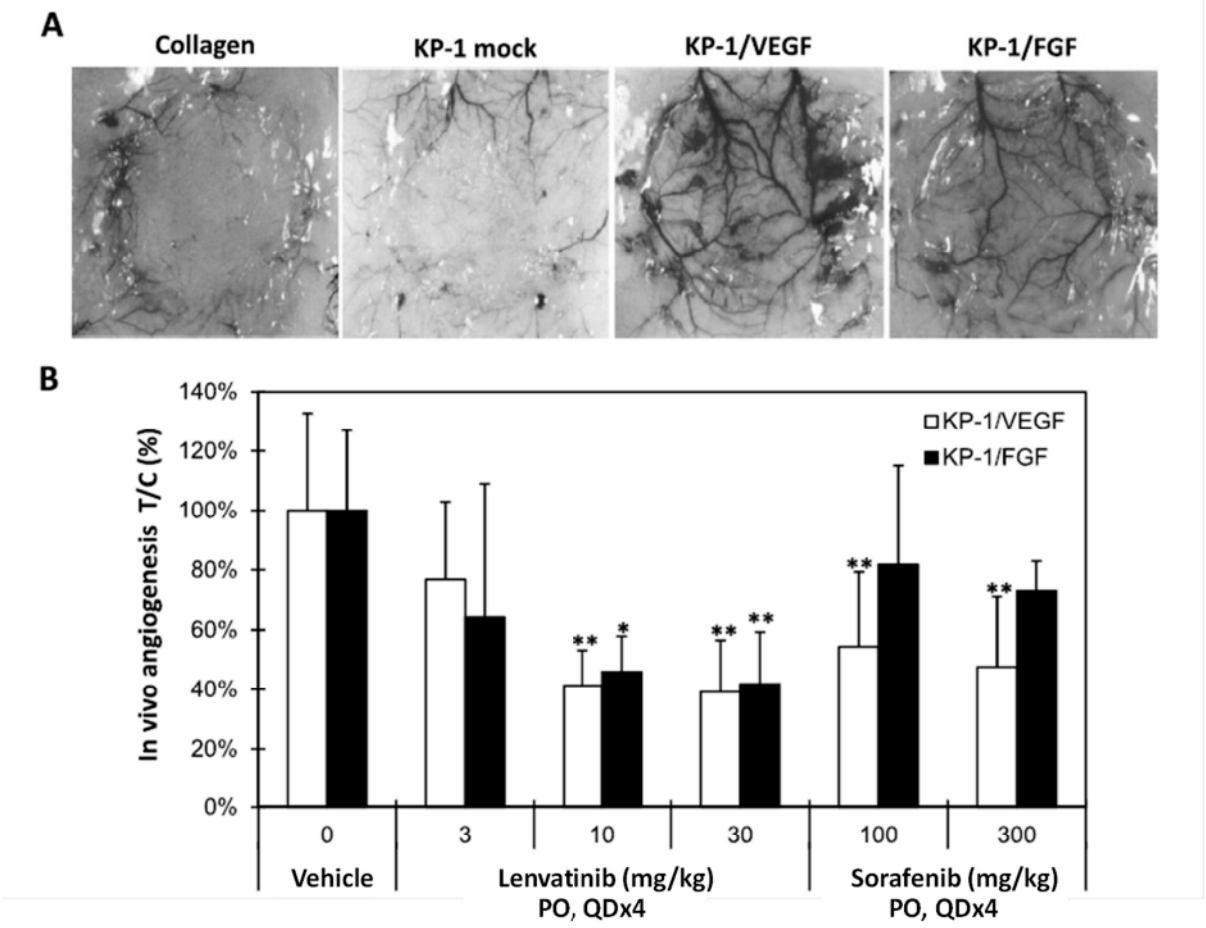


図 2.6.2-8　VEGF あるいは FGF 誘導 in vivo 血管新生モデルに対する作用

A: ミリポアチャンバーに包埋したマウスの皮膚に形成された血管新生像
B:　in vivo 血管新生モデルにおける血管新生抑制
マウス in vivo 血管新生モデル（dorsal air sac モデル）においてレンバチニブ（PO, QD×4）投与後，5 日目の血管新生を T/C (%)で示した。各カラムは平均値±標準偏差（3～5 匹の各 3 重測定）を示す。KP-1/FGF = 線維芽細胞増殖因子発現組換え KP-1 細胞，KP-1/VEGF = 血管内皮増殖因子発現組換え KP-1 細胞，PO = 経口，QD×4 = 1 日 1 回 4 日間，T/C = 処理群／対照群.　* P<0.05, ** P<0.01 (媒体対照群に対して一元配置分散分析後 Dunnett の多重比較検定).
添付資料 4.2.1.1.10［参考］

2.6.2.2.2.2　In vivo FGFR シグナル阻害作用（添付資料 4.2.1.1.11［参考］, [W-20[redacted]0842]）

FGF23 は主に腎臓においてミネラル代謝にかかわるホルモンであるが，FGFR からの細胞内シグナル伝達が抑制された環境においては，代償的に FGF23 の血漿中濃度が高くなることから，FGF シグナル伝達阻害を示す薬力学バイオマーカーとして知られている（Wöhrle, et al., 2011；Kim, et al., 2011）。本試験では，レンバチニブ経口投与後のマウス血漿中の FGF23 濃度の変化を検討した。非担癌マウス（7 週齢雌）に媒体対照の蒸留水（10 mL/kg），レンバチニブメシル酸塩（3 及び 10 mg/kg）あるいはソラフェニブトシル酸塩（9 及び 30 mg/kg）を経口で単回投与し，24 時間後の血漿中の FGF23 を酵素免疫測定法（ELISA）で測定した。

図 2.6.2-9 に示すように，レンバチニブ投与により血漿中 FGF23 濃度が上昇し，10 mg/kg 投与

では有意な上昇（媒体対照に比して，2.6 倍の上昇）が確認された。一方ソラフェニブでは 9 及び 30 mg/kg 投与ともに血漿中 FGF23 濃度の有意な上昇は認められなかった。この結果より，レンバチニブの 10 mg/kg 経口単回投与によってマウス体内の FGFR のシグナルが阻害されることが薬力学バイオマーカーの変化から示唆された。

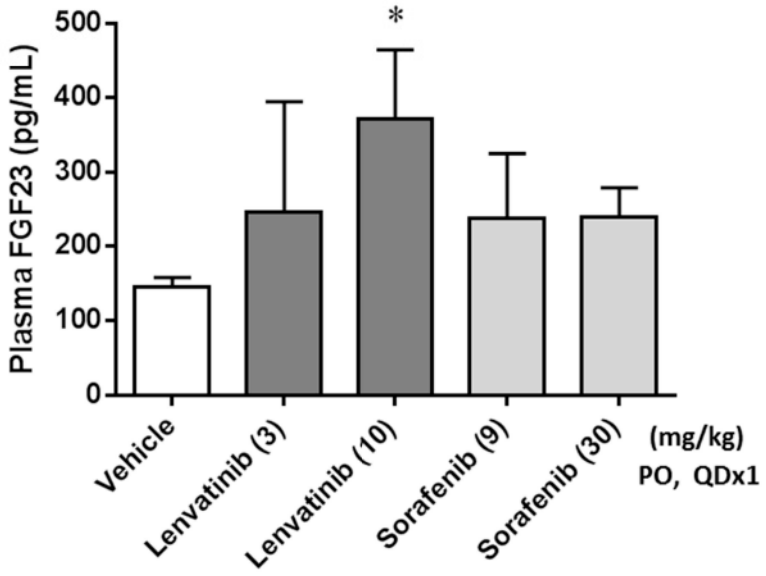


図 2.6.2-9　マウス in vivo における FGFR シグナル阻害作用

投与 24 時間後の血漿中 FGF23 濃度を示した。各カラムは 7～8 匹の動物の平均値±標準偏差を示す（ソラフェニブ 30 mg/kg 投与群は n=8，他は n=7）。
FGF＝ 線維芽細胞増殖因子，PO＝ 経口，QD×1＝ 単回投与.
* *P*<0.05 媒体対照群との比較 (一元配置分散分析後 Dunnett の多重比較検定).
添付資料 4.2.1.1.11［参考］

2.6.2.2.2.3　ヒト肝細胞癌細胞株 PLC/PRF/5 移植モデルにおける腫瘍増殖抑制作用（添付資料 4.2.1.1.12，4.2.1.1.13［参考］，[K[redacted]004，W-20[redacted]0793]）

本試験では，レンバチニブのヒト肝細胞癌細胞株 PLC/PRF/5 に対する腫瘍増殖抑制作用を，無胸腺マウス移植モデルを用いて検討した（試験番号 K08004）。PLC/PRF/5 を 6～7 週齢の雌無胸腺マウスに皮下移植し，平均腫瘍体積が 377 mm^3（移植後 10 日目，Day 1）になった時点で，各群を 6 匹とし，媒体対照の蒸留水（20 mL/kg）あるいはレンバチニブメシル酸塩（1，3，10，30 及び 100 mg/kg）の経口投与（QD×14）を開始した。腫瘍体積及び体重は週に 2 回測定を行った。腫瘍体積は「腫瘍体積（mm^3）＝ 長さ(mm) × (幅 [mm])^2 × 1/2」によって算出した。比体重（RBW）は，個々のマウスにおいて「個体の RBW ＝ 測定日の体重 / 投与開始時の体重」を求め，群におけるその平均値を RBW とした。以下，腫瘍体積と RBW はこの方法で算出した。投与群において RBW あるいは個体の RBW が 0.8 を下回る場合，あるいは媒体対照群の RBW に比べて 8 割を下回る場合に顕著な体重減少（BWL）であるとした。投与群に顕著な BWL が認めない場合を認容性があるとした。

図 2.6.2-10 に示すように，レンバチニブは PLC/PRF/5 移植モデルにおいて，3～100 mg/kg の用量で有意な腫瘍増殖抑制作用を示した。本モデルでは若干の BWL が媒体対照群に認められた（Day 15 において RBW=0.91）。レンバチニブ投与群 の BWL は Day 15 において 0.81～0.88 で

あり，レンバチニブに起因する顕著な BWL は認められなかった。

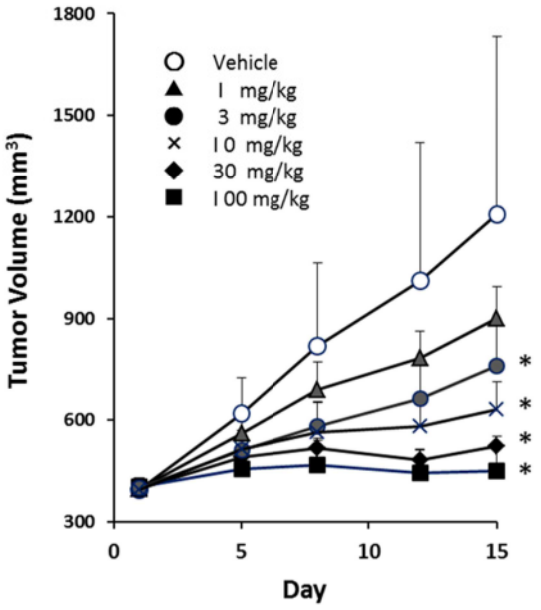


図 2.6.2-10　ヒト肝細胞癌細胞株 PLC/PRF/5 移植モデルにおける腫瘍増殖抑制作用

各値は 6 匹の動物の平均値±標準偏差を示す。
* P<0.05 Day 15 における媒体対照群との比較（一元配置分散分析後 Dunnett の多重比較検定).
添付資料 4.2.1.1.12

独立して実施した PLC/PRF/5 移植モデルにおいて，レンバチニブの腫瘍増殖抑制作用をソラフェニブの腫瘍増殖抑制作用と比較した（試験番号 W-20130793）。PLC/PRF/5 を 9 週齢の雌無胸腺マウスに皮下移植し，平均腫瘍体積が 539 mm^3（移植後 15 日目，Day 1）になった時点で，各群を 5 匹とし，レンバチニブの媒体対照として蒸留水（20 mL/kg），ソラフェニブの媒体対照としてエタノール：クレモフォア：蒸留水 = 1 : 1 : 6，レンバチニブメシル酸塩（1，3，10，30 及び 100 mg/kg）あるいはソラフェニブトシル酸塩（10，30，100，200 及び 300 mg/kg）の投与（QD×14，PO）を開始した。腫瘍体積及び体重は週に 2 回測定を行った。Day 15 における腫瘍増殖抑制作用を dT/C = dT/dC × 100 (%)で表示した（dT と dC はそれぞれ処理群，対照群の Day 1 からの腫瘍体積の増加，以下 dT/C の算出にはこの式を用いた)。

図 2.6.2-11 に示すように，レンバチニブは 1～100 mg/kg の用量において前述の結果（試験番号 K08004）と同様，有意な腫瘍増殖抑制作用を示し，それぞれの dT/C は 63%，54%，29%，14%，及び 16%であった（最小の dT/C は 14%）であった。一方，ソラフェニブは 10 mg/kg の用量での腫瘍増殖抑制作用は有意でなく（dT/C = 67%），30～300 mg/kg の用量において有意な腫瘍増殖抑制作用を示した。それぞれの dT/C は 35%，43%，30%，及び 33%と，30%を下まわることはなかった。以上，最小有効用量及び最大効果において，レンバチニブはソラフェニブより優れた腫瘍増殖抑制作用を示すことが示唆された。

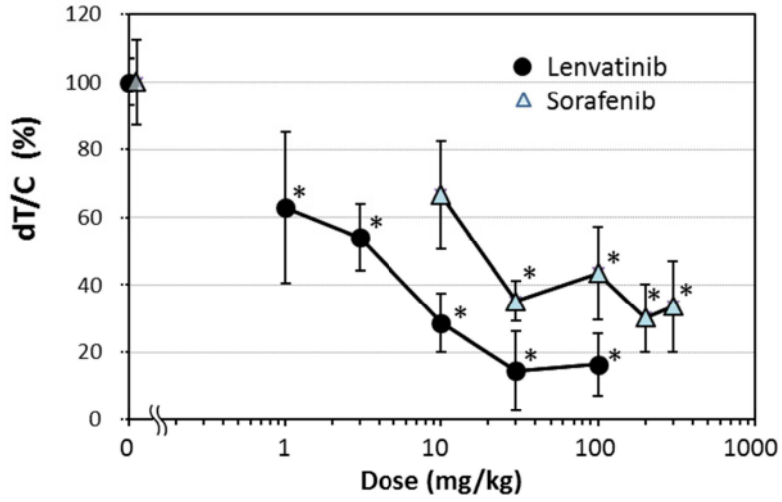


図 2.6.2-11　ヒト肝細胞癌細胞株 PLC/PRF/5 移植モデルにおける腫瘍増殖抑制作用（ソラフェニブとの比較）

各値は 3～5 匹の動物の平均値±標準偏差を示す。
腫瘍増殖抑制作用は dT/C = dT/dC×100 (%) により求めた（dT と dC はそれぞれ処理群と対照群の投与開始日［Day 1］からの腫瘍体積の変化）。 * P<0.05 Day 15 における各々の媒体対照群との比較 (一元配置分散分析後 Dunnett の多重比較検定). 添付資料 4.2.1.1.13［参考］

2.6.2.2.2.4　ヒト肝細胞癌細胞株 Hep 3B2.1-7 移植モデルにおける腫瘍増殖抑制作用（添付資料 4.2.1.1.14，4.2.1.1.15，[M[redacted]008，M[redacted]011]）

レンバチニブのヒト肝細胞癌細胞株 Hep 3B2.1-7 に対する腫瘍増殖抑制作用を，無胸腺マウス皮下移植モデルを用いて検討した。前述のように本細胞株では FGFR シグナルの亢進が知られている（2.6.2.2.1.5 ）。同モデルにおいてソラフェニブの腫瘍増殖抑制作用も評価した（試験番号 M16008）。Hep 3B2.1-7 をマトリゲル®とともに 6 週齢の雌無胸腺マウスに皮下移植し，移植後 12 日目（平均腫瘍体積 183 mm^3，Day 1）に各群を 8 匹とし，レンバチニブの媒体対照（vehicle 1）として 3 mmol/L HCl（10 mL/kg），ソラフェニブの媒体対照（vehicle 2）としてエタノール：クレモフォア：蒸留水 = 1：1：6（10 mL/kg），レンバチニブメシル酸塩（3，10，及び 30 mg/kg）あるいはソラフェニブトシル酸塩（10 及び 30 mg/kg）の経口投与（QD×7）を開始した。腫瘍体積及び体重は週に 3 回測定を行った。Day 8 における腫瘍増殖抑制作用を dT/C で表示した。

図 2.6.2-12 に示すように，レンバチニブ（3，10，及び 30 mg/kg）は Hep 3B2.1-7 移植モデルにおいて，用量依存的で有意な腫瘍増殖抑制作用を示した。それぞれの dT/C は 56%，51%及び 31%であった。ソラフェニブ（10 及び 30 mg/kg）も用量依存的で有意な腫瘍増殖抑制作用を示し，それぞれの dT/C は 73%及び 47%であった。若干の BWL が媒体対照群（vehicle 1，2）に認められ（RBW としていずれも 0.93），レンバチニブとソラフェニブ投与群（10 及び 30 mg/kg）の BWL もこれと同様（RBW として 0.87～0.89）であることから，レンバチニブ，ソラフェニブともに認容性が認められた（図 2.6.2-13）。

以上，レンバチニブは FGFR シグナルが亢進している Hep 3B2.1-7 ヒト肝細胞癌移植モデルにおいて 3～30 mg/kg で顕著な BWL を伴わずに有意な腫瘍増殖抑制作用を示し，忍容性は良好

であった。またレンバチニブの 3 及び 10 mg/kg は，ソラフェニブの 10 mg/kg より，またレンバチニブの 30 mg/kg はソラフェニブの 30 mg/kg より優れた腫瘍増殖抑制作用を示した。

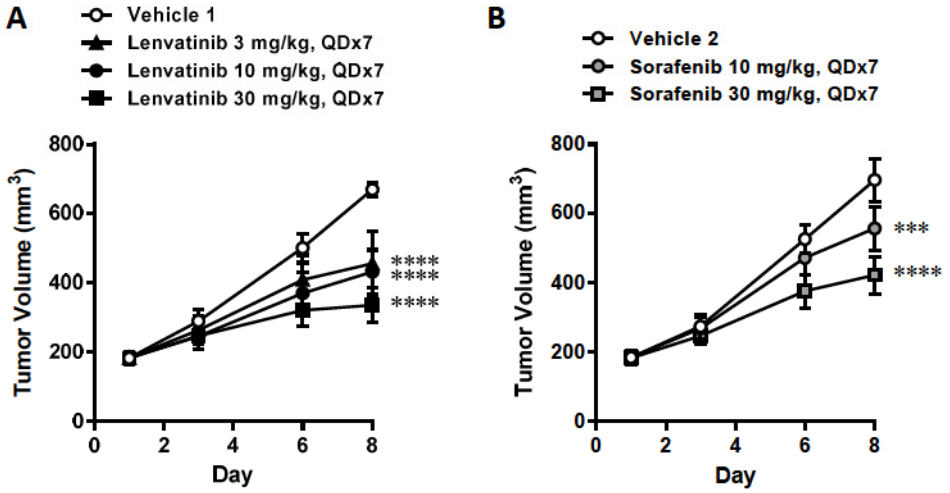


図 2.6.2-12　ヒト肝細胞癌細胞株 Hep 3B2.1-7 移植モデルにおける腫瘍増殖抑制作用

A:　レンバチニブ　　B:　ソラフェニブ
各値は 8 匹の動物の平均値±標準偏差を示す。
QD×7 = 1 日 1 回 7 日間.　*** P<0.001, **** P<0.0001　Day 8 における各々の媒体対照群との比較 (Dunnett の多重比較検定).　添付資料 4.2.1.1.14

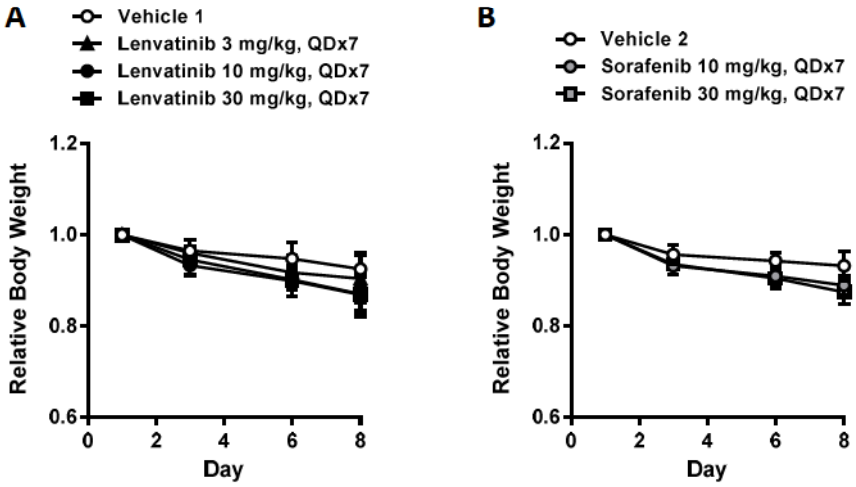


図 2.6.2-13　ヒト肝細胞癌細胞株 Hep 3B2.1-7 移植モデルにおける体重変化

A:　レンバチニブ,　　B:　ソラフェニブ
各値は 8 匹の動物の平均値±標準偏差を示す。
QD×7 = 1 日 1 回 7 日間.　添付資料 4.2.1.1.14

上述の試験で用いた移植モデルの Day 8 において腫瘍を摘出し，免疫組織染色法にて腫瘍組織内微小血管密度（MVD）を測定した（試験番号 M16011）。すなわち，それぞれの腫瘍よりパラフィン包埋ブロックを作製し，薄切標本（3 μm）を内皮細胞マーカーであるマウス CD31 に対

するモノクローナル抗体で染色後，Aperio® AT2 system で画像を取り込み，面積あたりの CD31 陽性血管の数を Aperio ImageScope で計測し MVD とした。Day 8 における MVD についての T/C は T/C = T/C ×100 (%)で求めた（T は処理群の MVD，C は対照群における平均の MVD）。

図 2.6.2-14 に示すように，レンバチニブ（3，10，及び 30 mg/kg）は用量依存的で有意な MVD の減少を起こし，T/C はそれぞれ 77%，62%，及び 51%であった。ソラフェニブの 10 mg/kg は有意な効果を示さず，30 mg/kg において有意な MVD の減少（T/C = 72%）を示した。レンバチニブの腫瘍増殖抑制作用と MVD 減少はよく相関しており，このことよりレンバチニブの腫瘍増殖抑制作用には，その血管新生抑制作用が寄与している可能性が示唆された。

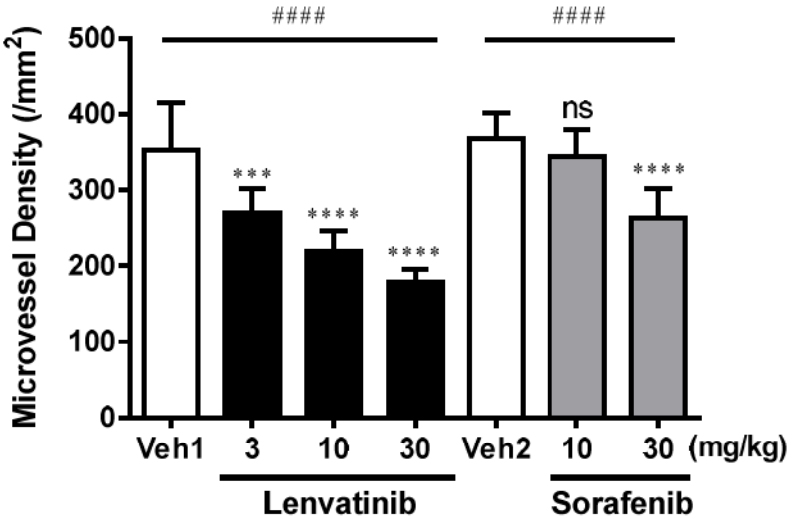


図 2.6.2-14　ヒト肝細胞癌細胞株 Hep 3B2.1-7 移植モデルにおける腫瘍組織内 MVD に対する効果

各カラムは 8 匹の動物の平均値±標準偏差を示す。
MVD = 微小血管密度， ns = 有意差なし，Veh1 = レンバチニブの媒体対照，Veh2 = ソラフェニブの媒体対照． *** P<0.001, **** P<0.0001　Day 8 における各々の媒体対照との比較 (Dunnett の多重比較検定)． #### P<0.0001 (用量依存性)． 添付資料 4.2.1.1.15

2.6.2.2.2.5　肝細胞癌 PDX 由来細胞株移植モデルにおける腫瘍増殖抑制作用（添付資料 4.2.1.1.16，[CPB-P[redacted]-5670]）

本試験では，レンバチニブの肝細胞癌 PDX 由来細胞株 LIXC-012 に対する腫瘍増殖抑制作用を，無胸腺マウス皮下移植モデルを用いて検討した。LIXC-012 は肝細胞癌患者から得た PDX 腫瘍 LIX-012 より樹立された細胞株である（Xin, et al., 2014）。FGF19 と FGFR4 が過剰発現しており，FGF19-FGFR4 オートクリンループにより FGFR シグナルが恒常的に活性化されている（Hagel, et al., 2015）。同モデルにおいてソラフェニブの腫瘍増殖抑制作用も評価した。LIXC-012 を 8～10 週齢の雌無胸腺マウスに皮下移植し，移植後 11 日目（平均腫瘍体積約 80～300 mm^3，Day 1）に各群を 8 匹とし，レンバチニブの媒体対照（vehicle 1）として 3 mmol/L HCl（10 mL/kg），ソラフェニブの媒体対照（vehicle 2）としてエタノール：クレモフォア：蒸留水 = 1 : 1 : 6（10 mL/kg），レンバチニブメシル酸塩（3，10，及び 30 mg/kg）あるいはソラフェニブトシル酸塩（10 及び 30 mg/kg）の経口投与（QD×14）を開始した。腫瘍体積は週に 3 回，体重は毎日測定した。過剰の腫瘍負荷（TV >2000 mm^3）あるいは顕著な BWL（RBW <0.8）が測定

されたマウスは除外し安楽死させた。媒体対照群（vehicle 1，vehicle 2）において Day 11 の測定以降，8 匹中 2 匹（2/8 匹）及び 3/8 匹のマウスが同基準により除かれたため，腫瘍増殖抑制作用は Day 11 に評価し，dT/C で表示した。

図 2.6.2-15 に示すように，レンバチニブ（3，10 及び 30 mg/kg）は有意な腫瘍増殖抑制作用を示し，Day 11 における dT/C はそれぞれ 61%，43%及び 25%であった。ソラフェニブの 10 mg/kg は有意な作用を示さず，30 mg/kg において有意な腫瘍増殖抑制作用（dT/C = 55%）を示した。

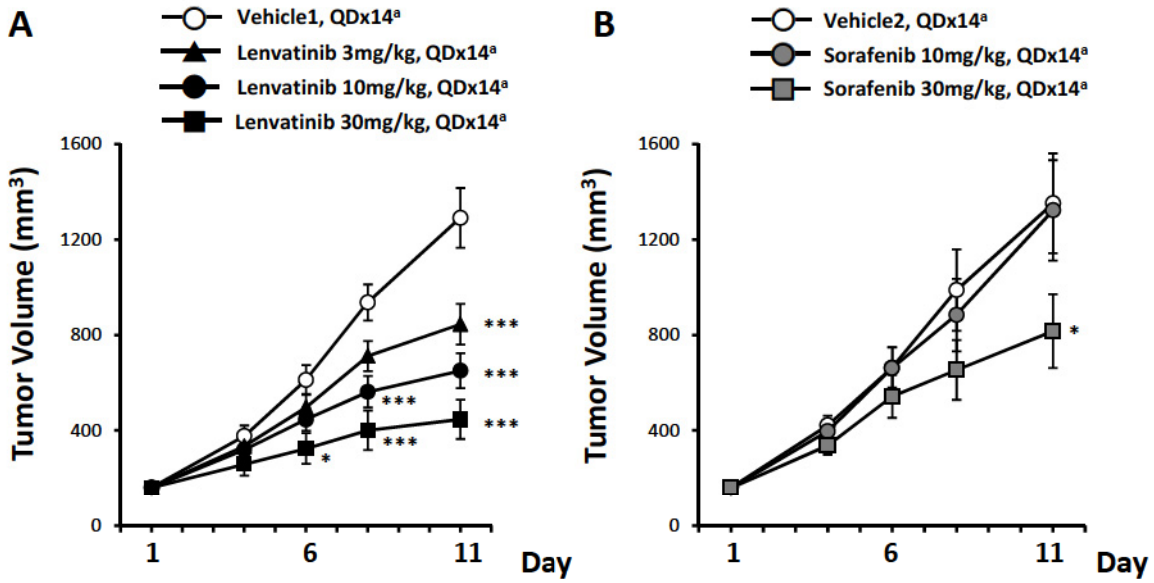


図 2.6.2-15　肝細胞癌 PDX 由来細胞株 LIXC-012 移植モデルにおける腫瘍増殖抑制作用

A:　レンバチニブ　　B:　ソラフェニブ
各値は 8 匹の動物の平均値±標準誤差を示す。
PDX = 患者由来腫瘍組織片移植，QD×14 = 1 日 1 回 14 日間.
a:　腫瘍増殖抑制作用は Day 11 に評価した（Day 11 の測定後 vehicle 1 の 2/8 匹，vehicle 2 の 3/8 匹を過剰の腫瘍負荷あるいは顕著な体重減少により除外したため）。
* P<0.05, *** P<0.001 各測定日における各々の媒体対照群との比較 (二元配置分散分析後ボンフェローニの多重比較検定).　添付資料 4.2.1.1.16

図 2.6.2-16 に示すように，媒体対照群（vehicle 1，vehicle 2）においてカケクシアによる BWL がみられ，Day 11 での RBW は，それぞれ 0.87 と 0.85 であった。 レンバチニブ 10 及び 30 mg/kg の Day 11 での RBW はそれぞれ 0.93，0.96 と，vehicle 1 より軽度の BWL であった。一方，ソラフェニブ 10 及び 30 mg/kg の Day 11 での RBW はそれぞれ 0.87，0.85 であり，vehicle 2 と同様であった。

以上，レンバチニブは FGFR シグナルが亢進している肝細胞癌 PDX 由来細胞株 LIXC-012 移植モデルにおいて，3～30 mg/kg で有意な腫瘍増殖抑制作用を示し，レンバチニブ 10 及び 30 mg/kg での dT/C（それぞれ 43%及び 25%）は，ソラフェニブ 30 mg/kg の dT/C = 55%より優れていた。レンバチニブ 10 及び 30 mg/kg 投与群での BWL は媒体対照群より軽度であり，これはレンバチニブによる腫瘍負荷低減によって全身症状が改善したためと考えられた。一方ソラフェニブ 10 及び 30 mg/kg 投与群での BWL は媒体対照群と同程度であった。