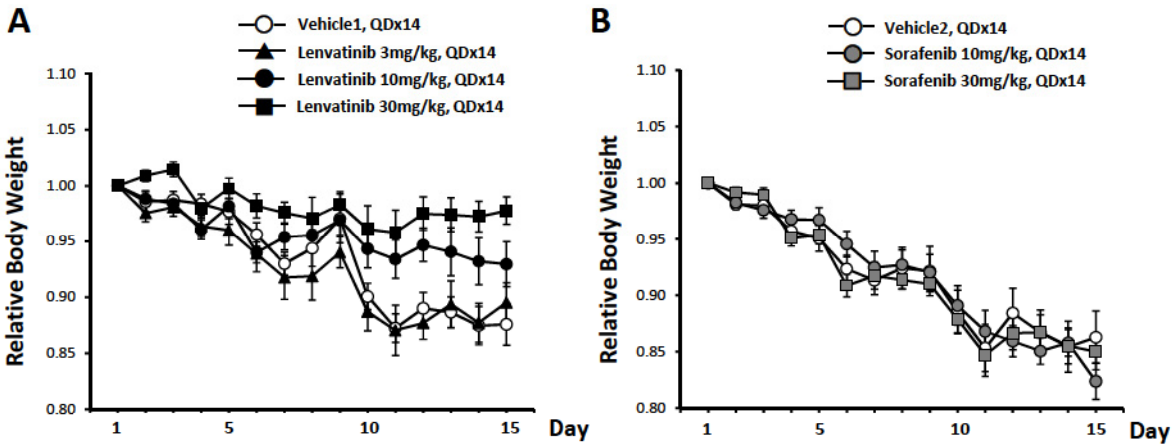


図 2.6.2-16　肝細胞癌 PDX 由来細胞株 LIXC-012 移植モデルにおける体重変化

A:　レンバチニブ　　B:　ソラフェニブ
各値は 5～8 匹の動物の平均値±標準誤差を示す（レンバチニブ［10 及び 30 mg/kg］では n=8，他は n=5～7）。Day 11 の測定後，レンバチニブ（10 及び 30 mg/kg）以外の各群では過剰の腫瘍負荷あるいは顕著な体重減少により 1～3 匹のマウスを除外した（ソラフェニブ 30 mg/kg で 1/8 匹，vehicle 1，レンバチニブ 3 mg/kg 及びソラフェニブ 10 mg/kg で 2/8 匹，vehicle 2 で 3/8 匹）。レンバチニブ（10 及び 30 mg/kg）ではすべてのマウスが測定終了まで生存した。PDX = 患者由来腫瘍組織片移植，QD×14 = 1 日 1 回 14 日間．　添付資料 4.2.1.1.16

2.6.2.2.2.6　肝細胞癌 PDX モデルにおける腫瘍増殖抑制作用（添付資料 4.2.1.1.17，[E0606-U[redacted]02.LI0050]）

本試験では，レンバチニブの肝細胞癌患者由来腫瘍 HuPrime® LI0050 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。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。LI0050 の腫瘍片を 5～6 週齢の雌無胸腺マウスに皮下移植し，移植後 19 日目（平均腫瘍体積 149 mm^3，Day 1）に各群を 15 匹とし，媒体対照の 3 mmol/L HCl（10 mL/kg），レンバチニブメシル酸塩（10 及び 30 mg/kg）あるいはソラフェニブトシル酸塩（30 mg/kg）の経口投与（QD×28）を開始した。腫瘍体積及び体重は週に 2 回測定を行った。個々のマウスについて RBW が 0.8 以下になった場合は休薬し RBW が 0.9 以上になった時点で投与を再開した（死亡例を除き腫瘍体積と体重測定は継続した）。Day 29 における腫瘍増殖抑制作用を dT/C で表示した。

図 2.6.2-17 に示すようにレンバチニブ（10 及び 30 mg/kg）は，LI0050 を用いた PDX モデルにおいて，有意な腫瘍増殖抑制作用を示し，Day 29 における dT/C はそれぞれ 46%，33%であった（ただしレンバチニブ 30 mg/kg 投与群の 1/15 匹のみ Day 15 に一過的な BWL [個体の RBW = 0.79] がみられたため，Day 15～27 に休薬している）。一方，ソラフェニブ（30 mg/kg）は忍容性が悪く，Day 19 までに 5/15 匹が死亡した。このためソラフェニブの腫瘍増殖抑制作用は統計学的に評価しなかった（図ではソラフェニブ投与群については Day 22 以降 10/15 匹の平均腫瘍体積を示す）。

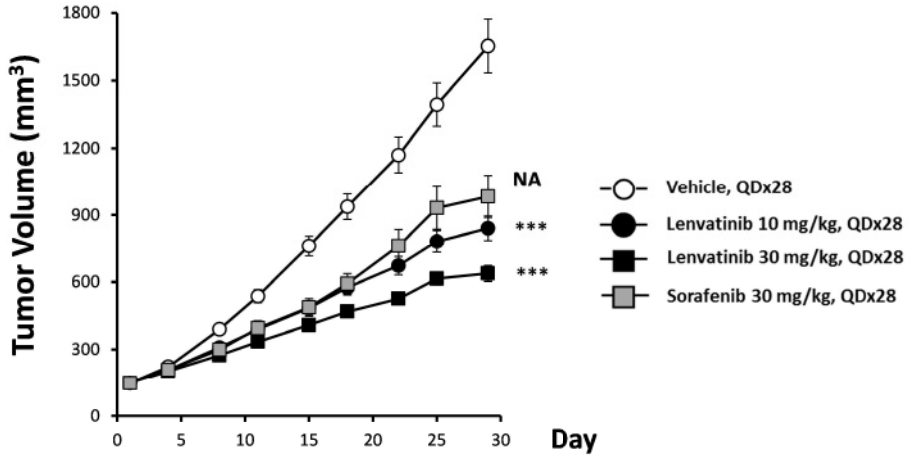


図 2.6.2-17　肝細胞癌患者由来腫瘍 HuPrime® LI0050 移植モデルにおける腫瘍増殖抑制作用

各値は 10～15 匹の動物の平均値±標準誤差を示す（媒体対照及びレンバチニブでは n=15，ソラフェニブでは n=10～15）。ソラフェニブ投与群では Day 10 に 1/15 匹，Day 19 に 4/15 匹死亡した。NA = 該当せず，QD×28 = 1 日 1 回 28 日間．　*** *P*<0.001 Day 29 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)．ソラフェニブ投与群では Day 19 までに 5/15 匹死亡したため，腫瘍増殖抑制作用の統計解析は行わなかった。
添付資料: 4.2.1.1.17

図 2.6.2-18 に示すように，レンバチニブ（10 及び 30 mg/kg）投与群では投与期間中に顕著な BWL はみられなかった（ただし上述のようにレンバチニブ 30 mg 投与群の 1/15 匹のみは Day 15 に一過的な BWL [個体の RBW = 0.79] を示した)。一方，ソラフェニブ投与群では Day 15 以降持続的な BWL がみられ，最大で Day 18 に 13%の平均体重減少（RBW = 0.87）がみられた。同群では Day 10 に 1/15 匹，また Day19 に 4/15 匹が死亡した。

以上，レンバチニブは LI0050 を用いた肝細胞癌 PDX モデルにおいて，10 及び 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た。ソラフェニブ（30 mg/kg）は本 PDX モデルでは忍容性を示さなかった。

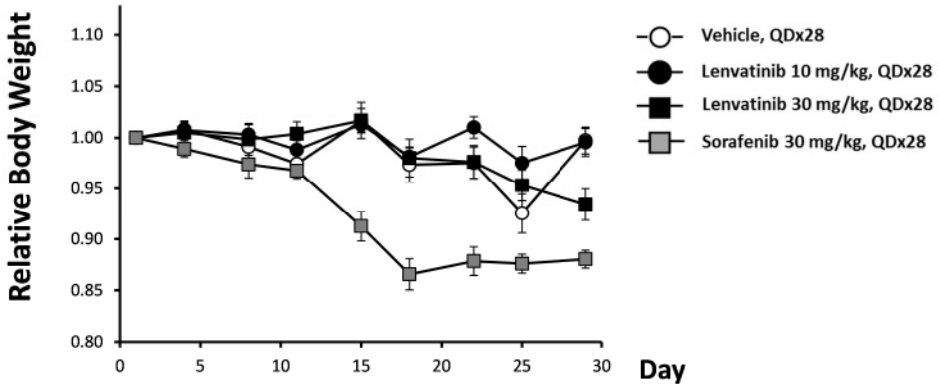


図 2.6.2-18　肝細胞癌患者由来腫瘍 HuPrime® LI0050 移植モデルにおける体重変化

各値は 10～15 匹の動物の平均値±標準誤差を示す（媒体対照及びレンバチニブでは n=15，ソラフェニブでは n=10～15）。ソラフェニブ投与群では Day 10 に 1/15 匹，Day 19 に 4/15 匹死亡した。QD×28＝1 日 1 回 28 日間.　添付資料 4.2.1.1.17

2.6.2.2.2.7　肝細胞癌 PDX モデルにおける腫瘍増殖抑制作用（添付資料 4.2.1.1.18，[E0606-U[redacted]02.LI0334]）

本試験では，レンバチニブの肝細胞癌患者由来腫瘍 HuPrime® LI0334 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。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。LI0334 の腫瘍片を 4～5 週齢の雌無胸腺マウスに皮下移植し，移植後 46 日目（平均腫瘍体積 131 mm^3，Day 1）に各群を 15 匹とし，媒体対照の 3 mmol/L HCl（10 mL/kg），レンバチニブメシル酸塩（10 及び 30 mg/kg）あるいはソラフェニブトシル酸塩（30 mg/kg）の経口投与（QD×28）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 29 における腫瘍増殖抑制作用を dT/C で表示した。

図 2.6.2-19 に示すようにレンバチニブ（10 及び 30 mg/kg）は，LI0334 を用いた PDX モデルにおいて，有意な腫瘍増殖抑制作用を示し，Day 29 における dT/C はそれぞれ 25%，14%であった。一方，ソラフェニブ（30 mg/kg）は有意な腫瘍増殖抑制作用を示さず，dT/C は 70%であった。図 2.6.2-20 に示すように全ての投与群で顕著な BWL はみられなかった。

以上，レンバチニブは LI0334 を用いた肝細胞癌 PDX モデルにおいて，10 及び 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た。ソラフェニブ（30 mg/kg）は本 PDX モデルでは有意な腫瘍増殖抑制作用を示さなかった。

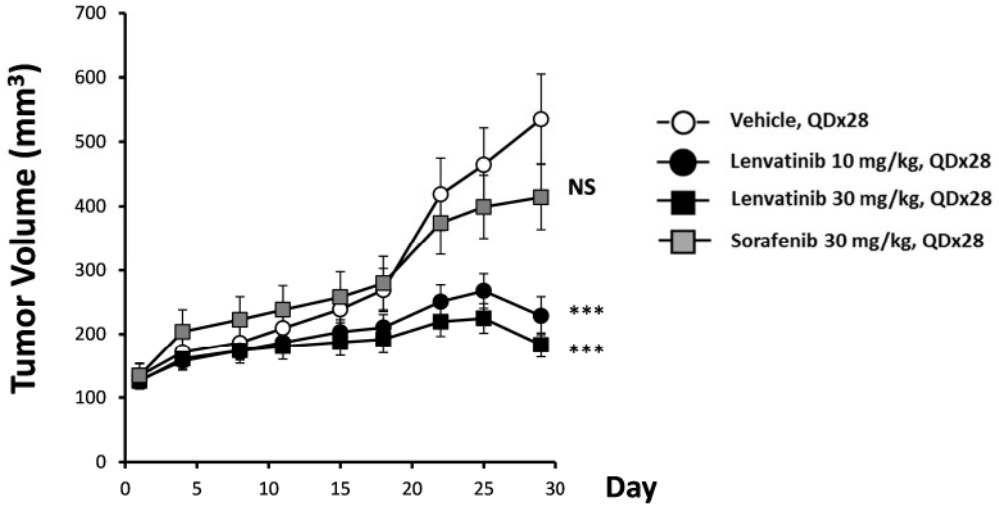


図 2.6.2-19　肝細胞癌患者由来腫瘍 HuPrime® LI0334 移植モデルにおける腫瘍増殖抑制作用

各値は 15 匹の動物の平均値±標準誤差を示す
NS = 有意差なし，QD×28 = 1 日 1 回 28 日間．　*** *P*<0.001 Day 29 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)．　Day 29 においてソラフェニブ投与群と媒体対照群では有意差なし (対応のない t 検定)．　添付資料 4.21.1.18

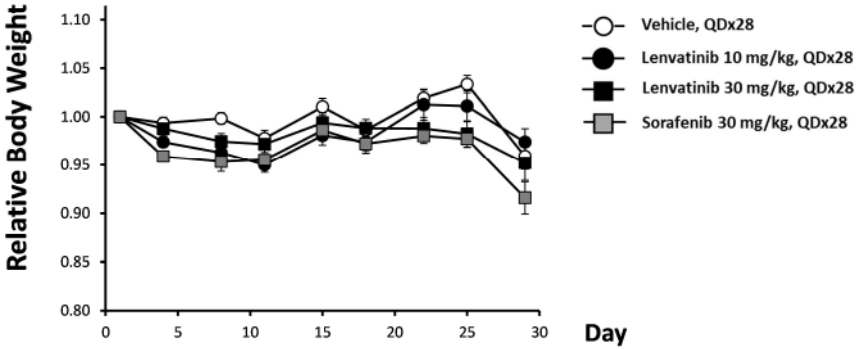


図 2.6.2-20　肝細胞癌患者由来腫瘍 HuPrime® LI0334 移植モデルにおける体重変化

各値は 15 匹の動物の平均値±標準誤差を示す。
QD×28 = 1 日 1 回 28 日間．　添付資料 4.2.1.1.18

2.6.2.2.2.8　免疫促進作用（添付資料 4.2.1.1.19［参考］，[W-20[redacted]0959]）

本試験では，マウス肝細胞癌細胞株 BNL 1ME A.7R.1 を免疫応答性マウスに同種移植したモデルにおけるレンバチニブの腫瘍免疫担当細胞のポピュレーションに対する作用について検討した。

（実験 1：腫瘍増殖抑制作用）

BNL 1ME A.7R.1 を，免疫応答性の BALB/c AnNCrlCrlj マウス（野生型：同種同系）及び同種異系の無胸腺マウスである CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マ

ウス（それぞれ 7 週齢雌）に移植し，50 日後（Day 1：免疫応答性マウスと無胸腺マウスにおける平均腫瘍体積はそれぞれ 158 及び 170 mm^3）に，媒体対照の蒸留水（10 mL/kg）あるいはレンバチニブメシル酸塩（3 及び 10 mg/kg）を経口投与（QD×7）した（各群 5 匹，この内，蒸留水あるいはレンバチニブ 10 mg/kg を投与した免疫応答性マウスは，実験 2 でも使用）。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。また，Day 8 の測定後，蒸留水あるいはレンバチニブ（10 mg/kg）を投与した免疫応答性マウスからは，腫瘍及び腫瘍所属リンパ節（流入領域のリンパ節）を採取した。

図 2.6.2-21 に示すようにレンバチニブ（3 及び 10 mg/kg）は，免疫応答性マウスを用いた移植モデルにおいて，媒体投与群に比べ有意な腫瘍増殖抑制作用を示し，dT/C はそれぞれ–31%及び–41%であった。マイナスの値が示すように，いずれも投与開始時（Day 1）に比べ腫瘍縮小が認められた。一方，無胸腺マウスを用いた移植モデルでは，レンバチニブ（3 及び 10 mg/kg）投与群の dT/C はそれぞれ 53%及び 20%であったが，腫瘍増殖抑制作用は有意ではなかった。それぞれの用量において，免疫応答性マウスモデルにおける腫瘍増殖抑制作用のほうが，無胸腺マウスモデルにおける腫瘍増殖抑制作用よりも有意に強かった。全ての処理群において顕著な BWL は認められなかった。

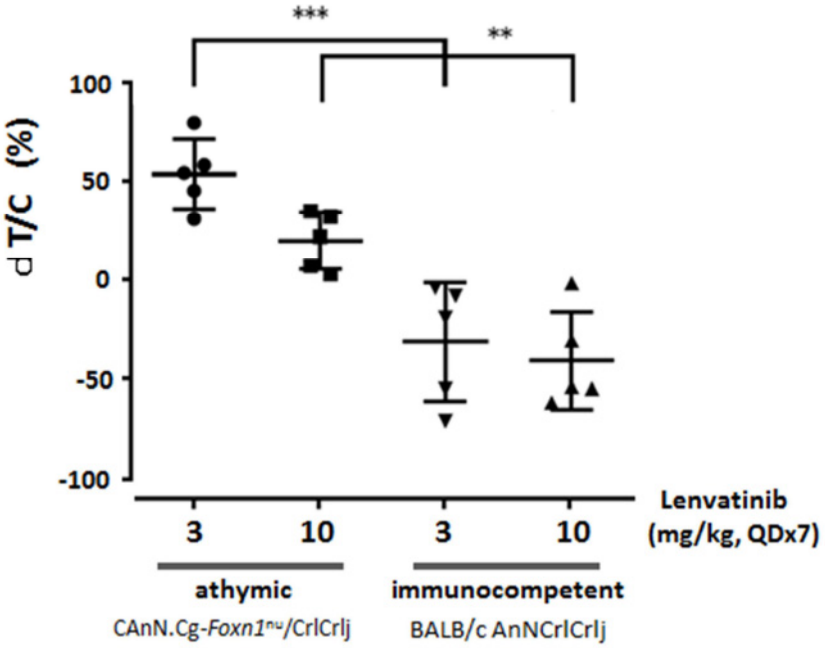


図 2.6.2-21　マウス肝細胞癌細胞株 BNL 1ME A.7R.1 同種移植モデルにおける腫瘍増殖抑制作用

各値は個々のマウスの値を，また各ラインは 5 匹の動物の平均値±標準偏差を示す。レンバチニブ(3 及び 10 mg/kg, PO, QD×7) 投与後，Day 8 に腫瘍増殖抑制作用を 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）。 マイナスの値は腫瘍縮小を示す。 QD×7 = 1 日 1 回 7 日間.
** P<0.01, *** P<0.001 Day 8 での両移植モデルにおける同じ投与量での比較 (対応のない t 検定). 添付資料 4.2.1.1.19 ［参考］(Figure 2 を改変)

（実験 2：腫瘍免疫担当細胞のポピュレーションに対する作用）

実験 1 と同じ BNL 1ME A.7R.1 移植免疫応答性マウスモデルを用い，腫瘍及び腫瘍所属リンパ節の腫瘍免疫担当細胞のポピュレーションに対するレンバチニブの作用を検討した。BNL 1ME

A.7R.1 を，免疫応答性の BALB/c AnNCrlCrlj マウス（7 週齢雌）に移植し，50 日後（Day 1：平均腫瘍体積 158 mm^3）に，媒体対照の蒸留水（10 mL/kg）あるいはレンバチニブメシル酸塩（10 mg/kg）を経口投与（QD×7）した（各群 10 匹，この内 5 匹は実験 1 で用いたマウスを使用）。Day 8 に腫瘍及びリンパ節を採取した。腫瘍は氷上で細切後コラゲナーゼと DNA 分解酵素 I で処理し，フローサイトメータによって，総白血球（$CD45^+$）画分中の $CD45^+CD11b^+Ly6G^-F4/80^+Ly6C^{low}$ 画分を TAM のポピュレーションとして求めた。腫瘍所属リンパ節については，すりつぶして洗浄し細胞浮遊液とした後に，細胞内タンパク質輸送阻害剤である BD GolgiStop™ とともに 37°C，5 時間培養して分泌タンパク質を細胞内に貯留させた。フローサイトメータによって $CD3^+CD8^+$画分の中の $IFN\gamma^+$画分の割合を，活性化細胞傷害性 T 細胞の割合として求めた。

図 2.6.2-22 に示すように，レンバチニブ（10 mg/kg）の投与により腫瘍組織内において TAM の有意な減少，また腫瘍所属リンパ節において活性化細胞傷害性 T 細胞の有意な増加がみられた。TAM は腫瘍免疫の抑制，また活性化細胞傷害性 T 細胞等は腫瘍免疫にかかわるとされていることから，これらの結果より，免疫応答性マウスの腫瘍内において腫瘍免疫が促進されていることが示唆された。前述の結果と合わせ，レンバチニブは免疫応答性マウスモデルにおいて無胸腺マウスモデルよりも強い腫瘍増殖抑制作用を示すこと，また免疫応答性マウスモデルにおいては，腫瘍免疫の促進作用があることが示唆された。

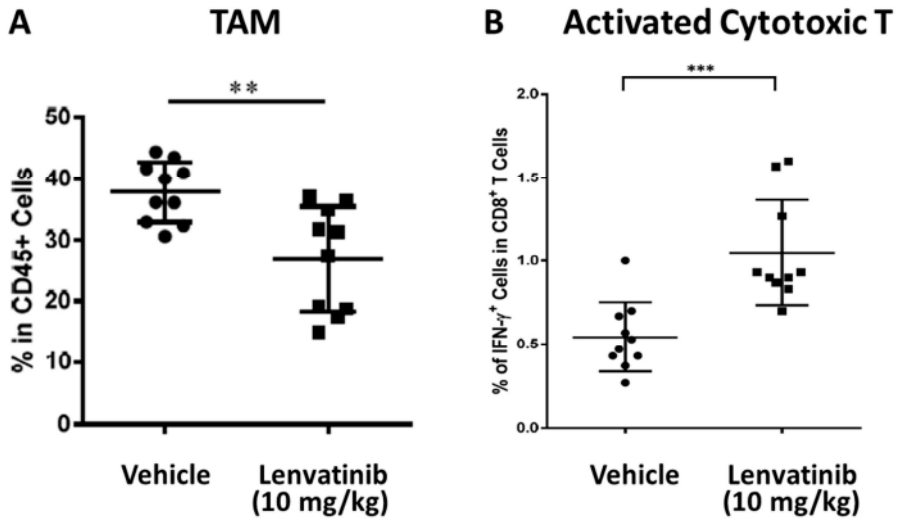


図 2.6.2-22　マウス肝細胞癌細胞株 BNL 1ME A.7R.1 同種移植モデルにおける腫瘍免疫担当細胞ポピュレーションに対する効果

A: 腫瘍組織内 TAM（$CD45^+CD11b^+Ly6G^-F4/80^+Ly6C^{low}$）
B: 所属リンパ節内活性化細胞傷害性T細胞 （$CD3^+CD8^+$ $INF\gamma^+$）
各値は個々のマウスの値を，また各ラインは10匹のマウスにおける平均値±標準偏差を示す。レンバチニブ（10 mg/kg，PO，QD×7） 投与後，Day 8 に (A) では $CD45^+$画分中の $CD45^+CD11b^+Ly6G^-F4/80^+Ly6C^{low}$画分の割合を，また(B)では$CD3^+CD8^+$画分の中の$IFN\gamma^+$画分の割合を，それぞれTAM及び活性化細胞傷害性T細胞のポピュレーションとして求めた。
IFNγ = インターフェロンγ，PO = 経口，QD×7 = 1日1回7日間, TAM = 腫瘍関連マクロファージ． ** P<0.01, *** P<0.001 媒体対照群との比較 (対応のないt検定).
添付資料 4.2.1.1.19［参考］

2.6.2.3 副次的薬理試験
新たな副次的薬理試験は実施していない

2.6.2.4 安全性薬理試験
新たな安全性薬理試験は実施していない

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験
新たな薬力学的薬物相互作用試験は実施していない

2.6.2.6 考察及び結論
肝臓癌は 5 年相対生存率約 30%と予後不良であり（国立がんセンター：がん情報サービス），未だ満足すべき治療法は確立されていない。肝臓癌の 90%を占め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（Finn and Zhu, 2009）であることから，VEGF 依存の血管新生を標的とした腫瘍血管新生阻害療法が注目され（Zhu, et al., 2011；Zhu, 2012），ソラフェニブが承認されている（Wilhelm, et al., 2004）。肝細胞癌は一方で，各種 FGFR（FGFR1～4）を発現しており，FGFR シグナルの亢進が癌の悪性形質あるいは予後不良に関連することが示唆されている（Gu, et al., 2015；Huang, et al., 2006；Lee, et al., 2015；Ho, et al., 2009；Sawey, et al., 2011；Miura, et al., 2012）。特に FGF19 を過剰産生する肝細胞癌においては FGF19 と対応する受容体 FGFR4 のオートクリンループによる FGFR シグナルの亢進が肝細胞癌患者全体の約 1/2～1/3 で報告されている（Desnoyers, et al., 2008；French, et al., 2012；Hyeon, et al., 2013；Repana and Ross, 2015）。したがって血管新生阻害に加えて，肝細胞癌の悪性形質にかかわる FGFR を阻害することは，肝細胞癌に対する有効な手段になると考えられる。

レンバチニブはエーザイ筑波研究所で創製されたマルチキナーゼ阻害剤であり，腫瘍血管新生を含む腫瘍の悪性化に関与する複数の RTK を標的とする。本薬の VEGFR2 に対する結合様式は，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ことが示されている。レンバチニブは VEGFR1～3 及び RET を阻害定数（K_i）約 1 nmol/L（それぞれ 1.3，0.74，0.71 及び 1.5 nmol/L）で極めて強力に阻害し，FGFR1～3 及び KIT もそれぞれ K_i 値 22，8.2，15 及び 11 nmol/L で強力に阻害する。66 種類のタンパク質キナーゼに対する IC_{50} 値のパネルでは，レンバチニブは VEGFR1～3 及び RET に対し 10 nmol/L 以下，また FGFR1～4，PDGFRα，及び KIT に対して 10～100 nmol/L の IC_{50} 値を示している（初回申請資料）。VEGFR1～3 に加え FGFR1～4 も阻害することは，市販されている既存のマルチキナーゼ阻害剤のなかでの本薬の大きな特徴である（Stjepanovic and Capdevila, 2014；Schlumberger, et al., 2015）。

初回申請では，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，レンバチニブの VEGFR2 に対する結合様式は，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とは異なるタイプであることを示している。今回レンバチニブが，VEGFR2 以外の主要な標的キナーゼであり，VEGFR1～3 とは分子構造上異なるクラスに分類されている FGFR1（Robinson, et al., 2000）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った。レンバチニブの FGFR1 に対する結合様式は，VEGFR2 に対する結合様式と同じく，type V であること，すなわちレンバチニブがキナーゼドメインの 1) ATP 結合サイト及び，隣接する 2)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 3) DFG モチーフは DFG-in 構造をとる，という type V の基準（Okamoto, et al., 2015）を満たしていることを示した。多くの市販されているマルチキナーゼ阻害剤は 1)と 3)を満たすが 2)を満たさない type I，あるいは 1)と 2)を満たすが 3)を満たさない（DFG-out 構造をとる ）type II（Liao, 2007；Zuccotto, et al., 2010；Blanc, et al., 2013）に分類される。Wu らはレンバチニ

ブ及びレンバチニブより以前に FDA で承認された計 28 のキナーゼ阻害剤の中で唯一レンバチニブのみが type V の結合様式であると報告している（Wu, et al., 2016）。

血管内皮細胞は，VEGFR2 及び FGFR1 を発現しており，VEGF あるいは FGF のリガンド刺激によって，血管新生等を誘導する 2 つのシグナル伝達経路，MAPK 経路及び mTOR–S6K–S6 経路が活性化される（Matsuki, et al., 2017）。HUVEC を用いた in vitro 細胞系において，レンバチニブは VEGF あるいは FGF により促進された Erk1/2，S6K，S6 のリン酸化を阻害し，MAPK 経路及び mTOR–S6K–S6 経路の両者を阻害することが確認された。

HUVEC を用いた in vitro 血管新生モデルにおいて，レンバチニブが VEGF 誘導性血管様管腔構造の形成を IC_{50} 値 2.1 nmol/L で阻害することは，初回申請で記載している。今回，HUVEC の FGF 誘導性血管様管腔構造の形成に対するレンバチニブの作用を検討し，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。一方同時に測定したソラフェニブの IC_{50} 値は 380 nmol/L であり，レンバチニブの約 50 倍の濃度であった。マウスを用いた 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投与（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，かつそれぞれの用量でほぼ同程度に阻害した。この用量は，本薬がヒトがん移植マウスモデルで腫瘍増殖抑制作用を示す濃度と対応している。一方，ソラフェニブ（QD×4，100 及び 300 mg/kg）は VEGF 誘導性の血管新生は阻害したが，FGF 誘導性の血管新生は阻害しなかった。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（Wöhrle, et al., 2011；Kim, et al., 2011）の血漿中濃度を有意に増加させた。一方，ソラフェニブ単回投与（30 mg/kg）は有意な増加を示さなかった。以上の結果から，レンバチニブは in vitro 及び in vivo モデルにおいて，VEGF 誘導性血管新生及び FGF 誘導性血管新生の両者を強力に阻害することが示された。VEGF を標的とした血管新生阻害療法では，代償的に FGF 誘導性の血管新生が亢進することが報告されており（Stjepanovic and Capdevila, 2014；Dieci, et al., 2013），レンバチニブが VEGF 誘導性血管新生阻害に加え，ソラフェニブには見られない FGF 誘導性血管新生阻害作用を併せ持つことは，より効果的な血管新生阻害療法を可能にするものと考えられる。

レンバチニブが VEGF 誘導性血管新生及び FGF 誘導性血管新生を阻害することについての非臨床薬理試験成績は，臨床での探索的バイオマーカー解析結果によっても支持される。すなわち，臨床第 3 相 SELECT 試験（303 試験）においてレンバチニブを投与した甲状腺癌患者の血清では投与期間中に VEGFR2 シグナルの阻害を反映する VEGF の継続的な増加と，FGFR1 シグナルの阻害を反映する FGF23 の継続的な増加がともに認められた。303 試験において FGF23 の増加は progression-free survival の延長と関連しており，レンバチニブによる FGFR シグナル阻害が薬効に貢献していることが示唆された（Tahara, et al., 2017）。レンバチニブの肝細胞癌に対する臨床第 3 相 E7080-G000-304 試験（304 試験）のサブグループにおける探索的バイオマーカー解析結果でも本薬投与群の患者血清で同様の VEGF 及び FGF23 の変化，及び血管新生阻害剤に対する腫瘍の耐性化因子として報告されている angiopoietin-2 （Rigamonti, et al., 2014）の継続的な減少が示された。一方，本試験で対照としたソラフェニブ投与群の患者血清では，VEGF の増加はみられたものの，FGF23 の増加及び angiopoietin-2 の減少はみられなかった（添付資料 5.3.5.1.1　11.5.1.1.1 項）。

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 を用いた試験において，レンバチニブは両細胞の増殖を，IC_{50} 値 86 及び 160 nmol/L（タンパク質非結合型）で濃度依存的に阻害した。また，FGFR の下

流に位置するシグナル分子である FRS2 のリン酸化を指標にした試験で，レンバチニブは両細胞の FGFR シグナルを，細胞増殖阻害を示す濃度と同じ範囲の濃度で濃度依存的に阻害した。Hep 3B2.1-7 及び HuH-7 の増殖が FGFR シグナルに依存している（Sawey, et al., 2011；Guagnano, et al., 2012）ことと考え合わせると，レンバチニブの両細胞株に対する細胞増殖阻害作用は，主としてその FGFR 阻害に起因するものと考えられた。このことは，レンバチニブが FGFR シグナルの亢進が報告されていないヒト肝細胞癌細胞株，PLC/PRF/5 の細胞増殖に対しては弱い細胞増殖阻害作用しか示さないこと（IC_{50} 値 3750 nmol/L 以上 [タンパク質非結合型]）でも裏付けられた。レンバチニブは，ヒト肝細胞癌細胞株，SNU-449 において bFGF で活性化された FGFR シグナルも阻害した。 一方，ソラフェニブは Hep 3B2.1-7，HuH-7，PLC/PRF/5 の細胞増殖に対して明らかな選択性は示さず，いずれの細胞株に対する阻害も，μmol/L オーダーの IC_{50} 値であったことから，ソラフェニブの細胞増殖阻害作用に FGFR 阻害は大きくは寄与していないと考えられた。ソラフェニブは RAF 阻害が比較的強く，これが細胞増殖阻害作用に寄与していることが報告されている（Wilhelm, et al., 2004）。

以上の非臨床成績は，レンバチニブ 304 試験でのサブグループにおける探索的バイオマーカー解析結果を裏付けていると考えられる。末梢血の FGF19 濃度は、FGFR4 シグナルが阻害されると代償的に増加することから、FGFR4 阻害の薬力学バイオマーカーとして検討されている。マウスモデルでは肝臓の FGFR4 の発現を阻害すると FGF19 のマウス相同分子（オーソログ）である FGF15 の血中濃度が増加することが報告されている（Yu, et al, 2013）。304 試験ではレンバチニブを投与した肝細胞癌患者血清中の FGF19 は投与期間中継続して増加していた。一方，対照としたソラフェニブを投与した肝細胞癌患者血清中の FGF19 は変化しなかった（添付資料 5.3.5.1.1　11.5.1.1.1 項）。この結果は，肝細胞癌患者においてレンバチニブは FGFR4 シグナルを阻害したが、ソラフェニブは FGFR4 シグナルを阻害しなかった可能性を示唆している。

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，PDX を含む 5 種の無胸腺マウス皮下移植モデルで評価した結果，本薬は全てのモデルで有意な腫瘍増殖抑制作用と高い忍容性を示した。同時にソラフェニブ（QD×7～28，PO）の腫瘍増殖抑制作用を評価した結果を表 2.6.2-3 にまとめた。同じ用量での比較では，全てのモデルにおいてレンバチニブはソラフェニブより強い腫瘍増殖抑制作用を示した。なお PLC/PRF/5 移植モデルではレンバチニブ（1～100 mg/kg）とソラフェニブ（30～300 mg/kg）の腫瘍増殖抑制作用を比較したところ，レンバチニブは 1 mg/kg から，ソラフェニブは 30 mg/kg からそれぞれ有意な腫瘍増殖抑制作用を示した。またレンバチニブ 1～100 mg/kg の dT/C では 63%から最小 14%まで低下したが，ソラフェニブ 30～300 mg/kg の dT/C は 43%～30%の範囲であった。Hep 3B2.1-7 及び肝細胞癌 PDX 由来細胞株 LIXC-012 では FGF19-FGFR4 オートクリンループによる FGFR シグナルの恒常的活性化が報告されている（Sawey, et al., 2011；Guagnano, et al., 2012；Hagel, et al., 2015）。両モデルでみられたレンバチニブのソラフェニブより強い腫瘍増殖抑制作用には，本薬の FGFR 阻害に基づく細胞増殖抑制作用も寄与していると考えられる。Hep 3B2.1-7 移植モデルでは腫瘍内の MVD も評価したところ，レンバチニブは同じ用量のソラフェニブより強い血管新生阻害作用（腫瘍内 MVD 減少）を示した。LIXC-012 移植モデルでは，腫瘍増殖抑制作用に加え，腫瘍負荷の低減による全身症状の改善に伴うと考えられる体重減少の抑制でもレンバチニブはソラフェニブより強い効果を示した。すなわち媒体対照群で観察されたカケクシアによるとみられる強い体重減少が，レンバチニブ（10 及び 30 mg/kg）では大幅に緩和されたが，同用量のソラフェニブでは緩和されなかった。2 種類の PDX モデル（LI0050 及び LI0334）においてレンバチニブは 10 及び 30 mg/kg で有意な腫瘍増殖抑制作用を示したのに対し，30 mg/kg のソラフェニブは，忍容性を示さない（LI0050 モデル：薬効評価日までに 5/15 匹のマウスが死亡）か，あるいは有意な腫瘍増殖抑制作用を示さなかった（LI0334 モデル）。

以上，様々なヒト肝細胞癌移植モデルにおいて，レンバチニブはソラフェニブと比較し，より強い腫瘍増殖抑制作用とより高い忍容性を示した。肝細胞癌 PDX モデルでの両化合物の比較は Gu ら（2015）も報告しており，FGFR1 過剰発現が認められた複数の肝細胞癌 PDX モデルにおいて，レンバチニブ（30 mg/kg）はソラフェニブ（60 mg/kg）より優れた腫瘍増殖抑制作用と弱い体重減少を示している（Gu, et al., 2015）。

表 2.6.2-3　ヒト肝細胞癌移植マウスモデルにおけるレンバチニブとソラフェニブの薬効比較

移植モデル 投与法 用量	レンバチニブ dT/C					ソラフェニブ dT/C		
	1 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg	100, 200, 300 mg/kg
PLC/PRF/5 QD×14	63%	54%	29%	14%	16%	NS	35%	30～43%
Hep.3B2.1-7 QD×7	—	56%	51%	31%	—	73%	47%	—
LIXC-012 QD×14[a]	—	61%	43%	25%	—	NS	55%	—
PDX (LI0050) QD×28	—	—	46%	33%	—	—	NA[b]	—
PDX (LI0334) QD×28	—	—	25%	14%	—	—	NS	—

有意な腫瘍増殖抑制作用がみられた場合に dT/C の値を示す。
a 媒体対照群（vehicle 1，vehicle 2）で Day11 の測定以降過剰の腫瘍負荷あるいは顕著な体重減少のため，それぞれ 2/8 及び 3/8 匹のマウスを除いた。このため dT/C は Day 11 に評価した。
b Day 10～19 にかけて 5/15 匹のマウスが死亡したため腫瘍増殖抑制作用の統計解析（Day 29）を実施せず。
dT/C = 処理群の変化/対照群の変化の比，NA = 該当せず，NS = 有意差なし（媒体対照群との比較），— = 実験なし.

悪性度の高いがんは，がん周囲の腫瘍微小環境を免疫抑制的な環境に変化させて宿主からの免疫攻撃を回避していると言われており，近年，その免疫抑制機構を標的とした様々な抗がん剤の開発が進んでいる（Hanahan and Weinberg, 2011）。TAM は，免疫抑制性フェノタイプをもつタイプ 2 マクロファージの一種で，肝細胞癌を含む多くの腫瘍組織に集積し，予後不良に関係している（Joyce and Pollard, 2009；Ding, et al., 2009；Heusinkveld and van der Burg, 2011）。TAM は TGFβ，IL-10，VEGF，FGF 等のサイトカイン・ケモカインの産生を介して，細胞傷害性 T 細胞（エフェクターT 細胞）のがん細胞攻撃を抑止する。また腫瘍血管新生を促進することによって、がんを増悪化させる（Pollard, 2004；Riabov, et al, 2014；Noy and Pollard, 2014）。このことから TAM の機能を抑制することは、腫瘍免疫を賦活するための新しいアプローチとして注目されている。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。レンバチニブの経口投与（QD×7，10 mg/kg）により，腫瘍組織内での TAM のポピュレーションの有意な減少と，腫瘍所属リンパ節内での活性化細胞傷害性 T 細胞のポピュレーションの有意な増加がみられた。この結果より，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，FGFR シグナルが亢進している肝細胞癌細胞に対しては 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，PDX を含む様々なヒト肝細胞癌移植マウスモデルにお

いてソラフェニブよりも優れた腫瘍増殖抑制作用を発揮すること等を示した。また腫瘍微小環境において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免疫を促進する可能性も示唆された。これらの非臨床成績は本薬が肝細胞癌に対し，有効な治療法を提供し得ることを裏付けている。

2.6.2.7 図表

薬理試験の概要文中の図表は，本文中の適切な箇所に記載した。

2.6.2.8 参考文献

Blanc J, Geney R, Menet C. Type II kinase inhibitors: an opportunity in cancer for rational design. Anticancer Agents Med Chem. 2013;13(5):731–47.

Desnoyers LR, Pai R, Ferrando RE, Hötzel K, Le T, Ross J, et al. Targeting FGF19 inhibits tumor growth in colon cancer xenograft and FGF19 transgenic hepatocellular carcinoma models. Oncogene. 2008;27(1):85–97.

Dieci MV, Arnedos M, Andre F, Soria JC. Fibroblast growth factor receptor inhibitors as a cancer treatment: from a biologic rationale to medical perspectives. Cancer Discov. 2013;3(3):264–79.

Ding T, Xu J, Wang F, Shi M, Zhang Y, Li SP, et al. High tumor-infiltrating macrophage density predicts poor prognosis in patients with primary hepatocellular carcinoma after resection. Hum Pathol. 2009;40(3):381–9.

Finn RS, Zhu AX. Targeting angiogenesis in hepatocellular carcinoma: focus on VEGF and bevacizumab. Expert Rev Anticancer Ther. 2009;9(4):503–9.

French DM, Lin BC, Wang M, Adams C, Shek T, Hötzel K, et al. Targeting FGFR4 inhibits hepatocellular carcinoma in preclinical mouse models. PLoS One. 2012;7(5):e36713.

Funahashi Y, Wakabayashi T, Semba T, Sonoda J, Kitoh K, Yoshimatsu K. Establishment of a quantitative mouse dorsal air sac model and its application to evaluate a new angiogenesis inhibitor. Oncol Res. 1999;11(7):319–29.

Futami T, Okada H, Kihara R, Kawase T, Nakayama A, Suzuki T, et al. ASP5878, a novel inhibitor of FGFR 1, 2, 3, and 4, inhibits the growth of FGF19-expressing hepatocellular carcinoma. Mol Cancer Ther. 2017;16(1):68–75.

Gu Q, Zhang B, Sun H, Xu Q, Tan Y, Wang G, et al. Genomic characterization of a large panel of patient-derived hepatocellular carcinoma xenograft tumor models for preclinical development. Oncotarget. 2015;6(24):20160–76.

Guagnano V, Kauffmann A, Wöhrle S, Stamm C, Ito M, Barys L, et al. FGFR genetic alterations predict for sensitivity to NVP-BGJ398, a selective pan-FGFR inhibitor. Cancer Discov. 2012;2(12):1118–33.

Hagel M, Miduturu C, Sheets M, Rubin N, Weng W, Stransky N, et al. First Selective Small Molecule Inhibitor of FGFR4 for the Treatment of Hepatocellular Carcinomas with an Activated FGFR4 Signaling Pathway. Cancer Discov. 2015;5(4):424–37.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646–74.

Heusinkveld M, van der Burg SH. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. J Transl Med. 2011;9:216.

Ho HK, Pok S, Streit S, Ruhe JE, Hart S, Lim SK, et al. Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation, anti-apoptosis and alpha-fetoprotein secretion during hepatocellular carcinoma progression and represents a potential target for therapeutic intervention. J Hepatol. 2009;50(1):118–27.

Huang X, Yu C, Jin C, Kobayashi M, Bowles CA, Wang F, et al. Ectopic activity of fibroblast growth factor receptor 1 in hepatocytes accelerates hepatocarcinogenesis by driving proliferation and vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. Cancer Res. 2006;66(3):1481–90.

Hyeon J, Ahn S, Lee JJ, Song DH, Park CK. Expression of fibroblast growth factor 19 is associated with recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. Dig Dis Sci. 2013;58(7):1916–22.

Iijima Y, Laser M, Shiraishi H, Willey D, Sundaravadivel B, Xu L, et al. c-Raf/MEK/ERK pathway controls protein kinase C-mediated p70S6K activation in adult cardiac muscle cells. J Biol Chem. 2002;277:23065–75.

Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. Nat Rev Cancer. 2009;9(4):239–52.

Kim KB, Chesney J, Robinson D, Gardner H, Shi MM, Kirkwood JM. Phase I/II and pharmacodynamic study of dovitinib (TKI258), an inhibitor of fibroblast growth factor receptors and VEGF receptors, in patients with advanced melanoma. Clin Cancer Res. 2011;17(23):7451–61.

Lee HJ, Kang HJ, Kim KM, Yu ES, Kim KH, Kim SM, et al. Fibroblast growth factor receptor isotype expression and its association with overall survival in patients with hepatocellular carcinoma. Clin Mol Hepatol. 2015;21(1):60–70.

Lehman JA, Calvo V, Gomez-Cambronero J. Mechanism of ribosomal p70S6 kinase activation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in neutrophils: cooperation of a MEK-related, THR421/SER424 kinase and a rapamycin-sensitive, m-TOR-related THR389 kinase. J Biol Chem. 2003;278(30):28130–8.

Liao JJ. Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors. J Med Chem. 2007;50(3):409–24.

Matsuki M, Adachi Y, Ozawa Y, Kimura T, Hoshi T, Okamoto K, et al. Targeting of tumor growth and angiogenesis underlies the enhanced antitumor activity of lenvatinib in combination with everolimus. Cancer Sci. 2017;108(4):763–71.

McTigue M, Murray BW, Chen JH, Deng YL, Solowiej J, Kania RS. Molecular conformations, interactions, and properties associated with drug efficiency and clinical performance among VEGFR TK inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(45):18281–9.

Miura S, Mitsuhashi N, Shimizu H, Kimura F, Yoshidome H, Otsuka M, et al. Fibroblast growth factor 19 expression correlates with tumor progression and poorer prognosis of hepatocellular carcinoma. BMC Cancer. 2012;12:56.

Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. Immunity. 2014;41(1):49–61.

Okamoto K, Ikemori-Kawada M, Jestel A, von König K, Funahashi Y, Matsushima T, et al. Distinct binding mode of multikinase inhibitor lenvatinib revealed by biochemical characterization. ACS Med Chem Lett. 2015;6(1):89–94.

Pollard JW. Tumor-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. Nat Rev Cancer 2004;4(1):71–8.

Repana D, Ross P. Targeting FGF19/FGFR4 pathway: A novel therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma. Diseases. 2015;3:294–305.

Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A, Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. Front Physiol. 2014;5:75.

Rigamonti N, Kadioglu E, Keklikoglou I, Wyser Rmili C, Leow CC, De Palma M. Role of angiopoietin-2 in adaptive tumor resistance to VEGF signaling blockade. Cell Rep. 2014;8(3):696–706.

Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. Oncogene. 2000;19(49):5548–57.

Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS, Taunton J, et al. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. J Biol Chem. 2007;282(19):14056–64.

Salmond RJ, Emery J, Okkenhaug K, Zamoyska R. MAPK, phosphatidylinositol 3-kinase, and mammalian target of rapamycin pathways converge at the level of ribosomal protein S6 phosphorylation to control metabolic signaling in CD8 T Cells. J Immunol. 2009;183:7388–97.

Sawey ET, Chanrion M, Cai C, Wu G, Zhang J, Zender L, et al. Identification of a therapeutic strategy targeting amplified FGF19 in liver cancer by Oncogenomic screening. Cancer Cell. 2011;19(3):347–58.

Schlumberger M, Tahara M, Wirth LJ, Robinson B, Brose MS, Elisei R, et al. Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer. N Engl J Med. 2015;372(7):621–30.

Stjepanovic N, Capdevila J. Multikinase inhibitors in the treatment of thyroid cancer: specific role of lenvatinib. Biologics:Targets and Therapy. 2014;8:129–39.

Tahara M, Schlumberger M, Elisei R, Habra MA, Kiyota N, Paschke R, et al. Exploratory analysis of biomarkers associated with clinical outcomes from the study of lenvatinib in differentiated cancer of the thyroid. Eur J Cancer. 2017;75:213–21.

Traxler P, Furet P. Strategies toward the design of novel and selective protein tyrosine kinase inhibitors. Pharmacol Ther. 1999;82(2-3):195–206.

Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. Cancer Res. 2004;64(19):7099–109.

Wöhrle S, Bonny O, Beluch N, Gaulis S, Stamm C, Scheibler M, et al. FGF receptors control vitamin D and phosphate homeostasis by mediating renal FGF-23 signaling and regulating FGF-23 expression in bone. J Bone Miner Res. 2011;26(10):2486–97.

Wu P, Nielsen TE, Clausen MH. Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs. Drug Discov Today. 2016;21(1):5–10.

Xin H, Wang K, Hu G, Xie F, Ouyang K, Tang X, et al. Establishment and characterization of 7 novel hepatocellular carcinoma cell lines from patient-derived tumor xenografts. PLoS One. 2014;9(1):e85308.

Yu XX, Watts LM, Manchem VP, Chakravarty K, Monia BP, McCaleb ML, et al. Peripheral reduction of FGFR4 with antisense oligonucleotides increases metabolic rate and lowers adiposity in diet-induced obese mice. PLoS One. 2013;8(7):e66923.

Zhu AX, Duda DG, Sahani DV, Jain RK. HCC and angiogenesis: possible targets and future directions. Nat Rev Clin Oncol. 2011;8(5):292–301.

Zhu AX. Molecularly targeted therapy for advanced hepatocellular carcinoma in 2012. Current status and future perspectives. Semin Oncol. 2012;39:493–502.

Zuccotto F, Ardini E, Casale E, Angiolini M. Through the "gatekeeper door": Exploiting the active kinase conformation. J Med Chem. 2010;53(7):2681–94.

目次

2.6.3 薬理試験概要表 2
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 5

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Test Article:Lenvatinib mesilate

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Location
In Vitro Pharmacodynamics					
Crystal structure analysis	Human (recombinant)/ FGFR1 X-ray crystal structural analysis	in vitro	[redacted] Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.	W-20[redacted]0357	4.2.1.1.1
Crystal structure analysis	Human (recombinant)/ VEGFR2 X-ray crystal structural analysis	in vitro	[redacted] Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.	W-20[redacted]0522	4.2.1.1.2
Effect on FGF-driven endothelial cell tube formation	Human/ HUVEC Tube formation assay in Geltrex	in vitro	Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.	M[redacted]012	4.2.1.1.3
Effect on VEGF-driven signal transduction in endothelial cells	Human/ HUVEC Western blot analysis	in vitro	Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.	BIOMT-20[redacted]-009	4.2.1.1.4
Effect on FGF-driven signal transduction in endothelial cells	Human/ HUVEC Western blot analysis	in vitro	Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.	BIOMT-20[redacted]-010	4.2.1.1.5
Effect on FGFR signaling	Human/ Hep 3B2.1-7 (HCC)	in vitro	Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.	M[redacted]014	4.2.1.1.6

Test Article:Lenvatinib mesilate

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Location
Effect on FGFR signaling	Human/ HuH-7 (HCC)	in vitro	Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.	M[redacted]019	4.2.1.1.7
Effect on FGFR signaling	Human/ SNU-449 (HCC)	in vitro	Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.	M[redacted]015	4.2.1.1.8
Effect on tumor cell proliferation	Human/ Hep 3B2.1-7 (HCC) HuH-7 (HCC) PLC/PRF/5 (HCC)	in vitro	Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.	M[redacted]007	4.2.1.1.9
In Vivo Pharmacodynamics					
Effect on VEGF- and FGF-induced angiogenesis in mice	Mouse/ C57BL/6 Human/ KP-1/VEGF (recombinant) Human/ KP-1/FGF (recombinant) Dorsal air sac assay	PO	Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.	Yamamoto, et al., 2014	4.2.1.1.10
FGFR inhibition in mice	Mouse/ BALB/cAnNCrlCrlj Plasma FGF23	PO	Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.	W-20[redacted]0842	4.2.1.1.11
Antitumor effect in human cancer xenograft model in mice	Mouse/ CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj Human/ PLC/PRF/5 (HCC) Xenograft model	PO	Sunplanet Co., Ltd.	K[redacted]004	4.2.1.1.12
Antitumor effect in human cancer xenograft model in mice (Comparison with sorafenib)	Mouse/ CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj Human/ PLC/PRF/5 (HCC) Xenograft model	PO	Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.	W-20[redacted]0793	4.2.1.1.13

Test Article:Lenvatinib mesilate

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Location
Antitumor effect in human cancer xenograft model in mice	Mouse/ CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj Human/ Hep 3B2.1-7 (HCC) Xenograft model	PO	Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.	M[redacted]008	4.2.1.1.14
Antiangiogenic activity in human cancer xenograft model in mice	Mouse/ CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj Human/ Hep 3B2.1-7 (HCC) Xenograft model	PO	Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.	M[redacted]011	4.2.1.1.15
Antitumor effect in human cancer xenograft model in mice	Mouse/ Crl:NU-*Foxn1*^{nu} Human/ LIXC-012 (HCC, obtained from a patient-derived xenograft) Xenograft model	PO	[redacted]	CPB-P[redacted]-5670	4.2.1.1.16
Antitumor effect in human cancer xenograft model in mice	Mouse/ CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlChfk Human/ HuPrime®LI0050 (HCC, patient derived) Xenograft model	PO	[redacted]	E0606-U[redacted]02. LI0050	4.2.1.1.17
Antitumor effect in human cancer xenograft model in mice	Mouse/ STOCK-*Foxn1*^{nu}/JNju Human/ HuPrime®LI0334 (HCC, patient derived) Xenograft model	PO	[redacted]	E0606-U[redacted]02. LI0334	4.2.1.1.18
Immunostimulatory effect in murine cancer isograft model in mice	Mouse/ CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj (athymic) BALB/cAnNCrlCrlj, (wild type, immunocompetent) Mouse/BNL 1ME A.7R.1 (HCC) Isograft model	PO	Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.	W-20[redacted]0959	4.2.1.1.19

CTD = Common Technical Document, FGF = fibroblast growth factor, FGFR = fibroblast growth factor receptor, HCC = hepatocellular carcinoma, HUVEC = human umbilical vein endothelial cell, KP-1/FGF = recombinant KP-1 cells expressing murrain FGF, KP-1/VEGF = recombinant KP-1 cells expressing human VEGF, PO = oral, VEGF = vascular endothelial growth factor, VEGFR = vascular endothelial growth factor receptor.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Test Article: Lenvatinib mesilate

Type of Study	Methods	Species/ Strain	Number/ Gender	Route	Dose or Concentration	Observations	Study/ Report No.
Crystal structure analysis	Recombinantly expressed human FGFR1 including kinase domain (Ser461-Asp774) was crystalized with lenvatinib. The resulting crystals of kinase-inhibitor complexes were subjected to x-ray structural analysis	Human/ FGFR1 (recombinant)	NA	in vitro (cell free)	NA	Lenvatinib binds to the ATP-binding site and the neighboring allosteric region. The DFG motif adopts the DFG-in conformation in the FGFR1-lenvatinib complex.	4.2.1.1.1
Crystal structure analysis	Recombinantly expressed human VEGFR2 including kinase domain (Leu834-Asn1162) was crystalized with lenvatinib or sorafenib, respectively. The resulting crystals of kinase-inhibitor complexes were subjected to x-ray structural analysis	Human/ VEGFR2 (recombinant)	NA	in vitro (cell free)	NA	Both lenvatinib and sorafenib bind to the ATP-binding site and the neighboring allosteric region. The DFG motif adopts the DFG-in conformation in the VEGFR2-lenvatinib complex, and the DFG-out conformation in the VEGFR2-sorafenib complex.	4.2.1.1.2
Effect on FGF-driven endothelial cell tube formation	Inhibition of the FGF-driven HUVEC tube formation was evaluated in the Geltrex tube formation model.	Human/ HUVEC	NA	in vitro	lenvatinib and sorafenib: 0.152 – 1000 nmol/L	lenvatinib: IC_{50} = 7.3 nmol/L (95% CI: 2.1 – 26) sorafenib: IC_{50} = 380 nmol/L (95% CI: 200 – 710)	4.2.1.1.3

Test Article: Lenvatinib mesilate

Type of Study	Methods	Species/ Strain	Number/ Gender	Route	Dose or Concentration	Observations	Study/ Report No.
Effect on VEGF-driven signal transduction in endothelial cell (Combination with everolimus)	Effect of the VEGF-driven signal transduction in HUVECs was evaluated by a western blot analysis using antibodies against Erk1/2, S6K, S6, and their phosphorylated forms: Erk1/2(Thr202/Tyr204), S6K(Thr389), S6K(Thr421/Ser424), and S6(Ser235/Ser236).	Human/ HUVEC	NA	in vitro	lenvatinib: 100 nmol/L everolimus: 1 nmol/L	Lenvatinib inhibited the phosphorylation of Erk1/2(Thr202/Tyr204), S6K(Thr389), S6K(Thr421/Ser424), and S6(Ser235/Ser236). Everolimus did not inhibit the phosphorylation of Erk1/2(Thr202/Tyr204), but inhibited the phosphorylation of S6K(Thr389), S6K(Thr421/Ser424), and S6(Ser235/Ser236). The combination showed greater inhibition of the phosphorylation of S6K(Thr421/Ser424) and S6(Ser235/Ser236) than each agent alone.	4.2.1.1.4

Test Article: Lenvatinib mesilate

Type of Study	Methods	Species/ Strain	Number/ Gender	Route	Dose or Concentration	Observations	Study/ Report No.
Effect on FGF-driven signal transduction in endothelial cell (Combination with everolimus)	Effect of the FGF-driven signal transduction in HUVECs was evaluated by a western blot analysis using antibodies against Erk1/2, S6K, S6, and their phosphorylated forms: Erk1/2(Thr202/Tyr204), S6K(Thr389), S6K(Thr421/Ser424), and S6(Ser235/Ser236).	Human/ HUVEC	NA	in vitro	lenvatinib: 1000 nmol/L everolimus: 1 nmol/L	Lenvatinib inhibited the phosphorylation of Erk1/2(Thr202/Tyr204), S6K(Thr389), S6K(Thr421/Ser424), and S6(Ser235/Ser236). Everolimus did not inhibit the phosphorylation of Erk1/2(Thr202/Tyr204), but inhibited the phosphorylation of S6K(Thr389), S6K(Thr421/Ser424), and S6(Ser235/Ser236). The combination showed greater inhibition of the phosphorylation of S6K(Thr421/Ser424) and S6(Ser235/Ser236) than each agent alone.	4.2.1.1.5
Effect on FGFR signaling	Effect of the FGFR signal transduction in HCC cells was evaluated by a western blot analysis using antibodies against FRS2 and phosphorylated FRS2.	Human/ Hep 3B2.1-7 (HCC)	NA	in vitro	lenvatinib: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 μmol/L sorafenib: 0.1, 0.3, 1, 3 μmol/L	Lenvatinib inhibited FGF19-driven phosphorylation of FRS2 at concentrations from 0.03 to 3 μmol/L in a concentration-dependent manner and completely inhibited the phosphorylation of FRS2 at ≥1 μmol/L. Sorafenib showed incomplete inhibition at concentrations from 0.1 to 3 μmol/L.	4.2.1.1.6

Test Article: Lenvatinib mesilate

Type of Study	Methods	Species/ Strain	Number/ Gender	Route	Dose or Concentration	Observations	Study/ Report No.
Effect on FGFR signaling	Effect of the FGFR signal transduction in HCC cells was evaluated by a western blot analysis using antibodies against FRS2 and phosphorylated FRS2.	Human/ HuH-7 (HCC)	NA	in vitro	lenvatinib: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 μmol/L sorafenib: 0.1, 0.3, 1, 3 μmol/L	Lenvatinib inhibited the phosphorylation of FRS2 at concentrations from 0.03 to 3 μmol/L in a concentration-dependent manner and completely inhibited the phosphorylation of FRS2 at ≥1 μmol/L. Sorafenib showed incomplete inhibition of the phosphorylation of FRS2 at concentrations from 0.1 to 3 μmol/L.	4.2.1.1.7
Effect on FGFR signaling	Effect of the FGFR signal transduction in HCC cells was evaluated by a western blot analysis using antibodies against FRS2 and phosphorylated FRS2.	Human/ SNU-449 (HCC)	NA	in vitro	lenvatinib: 0.1, 0.3, 1, 3 μmol/L sorafenib: 0.1, 0.3, 1, 3 μmol/L	Lenvatinib inhibited the bFGF-driven phosphorylation of FRS2 at concentrations from 0.3 to 3 μmol/L in a concentration-dependent manner and completely inhibited the phosphorylation of FRS2 at 3 μmol/L. Sorafenib showed incomplete inhibition of the phosphorylation of FRS2 at concentrations from 0.1 to 3 μmol/L.	4.2.1.1.8

Test Article: Lenvatinib mesilate

Type of Study	Methods	Species/ Strain	Number/ Gender	Route	Dose or Concentration	Observations	Study/ Report No.
Effect on tumor cell proliferation	Inhibition of the cell proliferation was measured by a colorimetric assay using WST-8.	Human/ Hep 3B2.1-7 (HCC) HuH-7 (HCC) PLC/PRF/5 (HCC)	NA	in vitro	lenvatinib and sorafenib: 39.1 – 10,000 nmol/L	Lenvatinib: IC_{50} = 230, 420, >10,000 nmol/L against Hep 3B2.1-7, HuH-7, PLC/PRF/5 cells, respectively. Sorafenib: IC_{50} = 2300, 2200, 5300 nmol/L against Hep 3B2.1-7, HuH-7, PLC/PRF/5 cells, respectively.	4.2.1.1.9
Effect on VEGF- and FGF-induced angiogenesis in mice	An in vivo VEGF- and FGF-induced angiogenesis model was generated by embedding Millipore chambers packed with VEGF- and FGF-expressing KP-1 cells, respectively, in dorsal air sacs of C57BL/6 mice. After dosing, angiogenesis was evaluated by measuring pre-radiolabelled red blood cell content in the skin attached to the membrane chamber.	Mouse/ C57BL/6 Human/ KP-1/VEGF, KP-1/FGF (recombinant)	3 – 5 female / group	lenvatinib, sorafenib: PO, QD×4	lenvatinib: 3, 10, 30 mg/kg sorafenib: 100, 300 mg/kg	Lenvatinib (10, 30 mg/kg) inhibited both VEGF- and FGF-induced angiogenesis in vivo. Sorafenib (100, 300 mg/kg) inhibited VEGF-induced angiogenesis, but did not inhibit FGF-induced angiogenesis.	4.2.1.1.10
FGFR inhibition in mice	The amount of plasma FGF23 as a biomarker for the inhibition of FGFR signaling was evaluated by ELISA 24 hours after oral administration.	Mouse/ BALB/cAnNCrlCrlj	7 – 8 female / group	lenvatinib, sorafenib: PO, single dose	lenvatinib: 3, 10 mg/kg sorafenib: 9, 30 mg/kg	Lenvatinib (10 mg/kg) significantly increased the amount of FGF23 in plasma to a level 2.6-fold higher than that in vehicle-control group. Sorafenib at all doses did not cause a significant increase in plasma FGF23.	4.2.1.1.11

Test Article: Lenvatinib mesilate

Type of Study	Methods	Species/ Strain	Number/ Gender	Route	Dose or Concentration	Observations	Study/ Report No.
Antitumor effect in human cancer xenograft model in mice	Xenografts were generated by SC inoculation of the cancer cells. Dosing was initiated after 10 days. The TV and the body weight of mice were measured twice a week.	Mouse/ CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj Human/ PLC/PRF/5 (HCC)	6 female / group	PO, QD×14	lenvatinib: 1, 3, 10, 30, 100 mg/kg	Significant antitumor effect at doses of 3 – 100 mg/kg. Mean RBW at 100 mg/kg was 0.81, compared to 0.91 in controls on Day 15.	4.2.1.1.12
Antitumor effect in human cancer xenograft model in mice	Xenografts were generated by SC inoculation of the cancer cells. Dosing was initiated after 15 days. The TV and the body weight of mice were measured twice a week.	Mouse/ CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj Human/ PLC/PRF/5 (HCC)	3 – 5 female / group	lenvatinib, sorafenib: PO, QD×14	lenvatinib: 1, 3, 10, 30, 100 mg/kg sorafenib: 10, 30, 100, 200, 300 mg/kg	Lenvatinib: Significant antitumor effect at all doses tested. Sorafenib: Significant antitumor effects at doses of 30 – 300 mg/kg.	4.2.1.1.13
Antitumor effect in human cancer xenograft model in mice	Xenografts were generated by SC inoculation of the cancer cells. Dosing was initiated after 12 days (Day 1). The TV and the body weight of mice were measured on Days 1, 3, 6, and 8.	Mouse/ CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj Human/ Hep 3B2.1-7 (HCC)	8 female / group	lenvatinib, sorafenib: PO, QD×7	lenvatinib: 3, 10, 30 mg/kg sorafenib: 10, 30 mg/kg	Lenvatinib (3, 10, 30 mg/kg) showed significant TGI with dT/C values of 56%, 51%, and 31%, respectively at Day 8. Sorafenib (10, 30 mg/kg) showed significant TGI with dT/C values of 73% and 47%, respectively at Day 8. No remarkable BWL was observed in all treated groups.	4.2.1.1.14
Antiangiogenic activity in human cancer xenograft model in mice	Xenografts generated in Study No. M16008 were used. One day after the last dose, tumor was isolated and the MVD was evaluated by IHC staining for CD31.	Mouse/ CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj Human/ Hep 3B2.1-7 (HCC)	8 female / group	lenvatinib, sorafenib: PO, QD×7	lenvatinib: 3, 10, 30 mg/kg sorafenib: 10, 30 mg/kg	Lenvatinib (3, 10, 30 mg/kg) significantly reduced MVD in the tumor with T/C values of 77%, 62%, and 51%, respectively at Day 8. Sorafenib at 30 mg/kg but not 10 mg/kg significantly reduced MVD with a T/C value of 72% at Day 8.	4.2.1.1.15

Test Article: Lenvatinib mesilate

Type of Study	Methods	Species/ Strain	Number/ Gender	Route	Dose or Concentration	Observations	Study/ Report No.
Antitumor effect in human cancer xenograft model in mice	Xenografts were generated by SC inoculation of the cancer cells. Dosing was initiated after 11 days (Day 1). The TV (3 times a week) and the body weight of mice (daily) were measured.	Mouse/ Crl:NU-*Foxn1*^{nu} Human/ LIXC-012 (HCC obtained from a patient-derived xenograft)	8 female / group	lenvatinib, sorafenib: PO, QD×14	lenvatinib: 3, 10, 30 mg/kg sorafenib: 10, 30 mg/kg	Lenvatinib (3, 10, 30 mg/kg) showed significant TGI with dT/C values of 61%, 43%, and 25%, respectively at Day 11. Sorafenib at 30 mg/kg but not 10 mg/kg showed significant TGI with a dT/C value of 55% at Day 11. BWL was observed in the vehicle controls accompanied by cachexia, resulting in RBW values of 0.85 to 0.87 at Day 11. This BWL was less in the lenvatinib (10, 30 mg/kg) groups with RBW values of 0.93 and 0.96, respectively. The BWL in sorafenib (10, 30 mg/kg) groups was similar to that in the vehicle control with RBW values of 0.87 and 0.85, respectively.	4.2.1.1.16
Antitumor effect in human cancer xenograft model in mice	Xenografts were generated by SC inoculation of the tumor fragment. Dosing was initiated after 19 days (Day 1). The TV and the body weight of mice were measured twice a week.	Mouse/ CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlChfk Human/ HuPrime®LI0050 (HCC, patient derived)	15 female / group	lenvatinib, sorafenib: PO, QD×28	lenvatinib: 10, 30 mg/kg sorafenib: 30 mg/kg	Lenvatinib (10, 30 mg/kg) showed significant TGI with dT/C values of 46% and 33%, respectively, without severe BWL at Day 29. Sorafenib was not tolerated; multiple dosing suspensions were necessary during the treatment and 5 of 15 mice died by Day 19. A maximum mean BWL of 13% (RBW = 0.87) was noted at Day 18.	4.2.1.1.17

Test Article: Lenvatinib mesilate

Type of Study	Methods	Species/ Strain	Number/ Gender	Route	Dose or Concentration	Observations	Study/ Report No.
Antitumor effect in human cancer xenograft model in mice	Xenografts were generated by SC inoculation of the tumor fragment. Dosing was initiated after 46 days (Day 1). The TV and the body weight of mice were measured twice a week.	Mouse/ STOCK-*Foxn1*^{nu}/JNju Human/ HuPrime®LI0334 (HCC, patient derived)	15 female / group	lenvatinib, sorafenib: PO, QD×28	lenvatinib: 10, 30 mg/kg sorafenib: 30 mg/kg	Lenvatinib (10, 30 mg/kg) showed significant TGI with dT/C values of 25% and 14%, respectively, without severe BWL at Day 29. Sorafenib did not show significant TGI.	4.2.1.1.18
Immunostimulatory Effect in murine cancer isograft model in mice	Isografts were generated by SC inoculation of the murine cancer cells to BALB/c immunocompetent mice or corresponding athymic mice. Dosing with lenvatinib was initiated after 50 days (Day 1). The TV and body weight of mice were measured on Days 1, 3, 6, and 8 (Exp. 1). Tumors and draining lymph nodes were isolated from the immunocompetent mice 1 day after the end of dosing (Day 8), and macrophages and cytotoxic T-cells were analyzed, respectively by flow cytometry (Exp. 2).	Mouse/ CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj (athymic) BALB/cAnNCrlCrlj, (wild type, immunocompetent) Mouse/ BNL 1ME A.7R.1 (HCC)	5 female / group (Exp.1) 10 female / group (Exp.2)	lenvatinib PO, QD×7	lenvatinib: 3, 10 mg/kg (Exp.1) 10 mg/kg (Exp. 2)	(Exp. 1) Lenvatinib (3, 10 mg/kg) showed significant TGI with tumor regression in the immunocompetent mice with dT/C values of–31% and –41%, respectively at Day 8, but not in the athymic mice. No remarkable BWL was observed. (Exp. 2) Lenvatinib significantly decreased TAM population ($CD45^+CD11b^+Ly6G^-$ $F4/80^+Ly6C^{low}$) in the tumors and increased the activated $CD8^+$ T cell population (IFN-γ^+ $CD3^+CD8^+$) in the draining lymph node of immunocompetent mice at Day 8.	4.2.1.1.19

Doses or concentrations described for lenvatinib and sorafenib are expressed as those of the salt form.
Antitumor effect is shown as dT/C = dT/dC (%), where dT and dC are the change of tumor volume from Day 1 of dosing in the treatment and control groups, respectively. Minus number means tumor regression.
ATP = adenosine triphosphate, bFGF = basic fibroblast growth factor, BWL = body weight loss, CI = confidence interval, DFG = aspartic acid-phenylalanine-glycine, ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay, Exp. = experiment, FGF = fibroblast growth factor, FGFR = fibroblast growth factor receptor, HCC = hepatocellular carcinoma, HUVEC =

human umbilical vein endothelial cell, IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration, IHC = immunohistochemistry, IV = intravenous, KP-1/FGF = recombinant KP-1 cells expressing murrain FGF, KP-1/VEGF = recombinant KP-1 cells expressing human VEGF, MVD = microvessel density, NA = not applicable, PO = oral, RBW = relative body weight, QD×X = once daily for X days, SC = subcutaneous, TAM = tumor associated macrophage, T/C = treatment/control, TGI = tumor growth inhibition, TV = tumor volume, VEGF = vascular endothelial growth factor, VEGFR = vascular endothelial growth factor receptor.