ベージニオ錠 50mg
ベージニオ錠 100mg
ベージニオ錠 150mg

2.6.1　緒言

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.1 緒言 3

略語一覧

ΔT/C (%)	溶媒対照群に対する被験薬投与群の腫瘍体積変化量の比
4-HT	4-ヒドロキシタモキシフェン
8-MOP	8-メトキシソラレン
ADP	アデノシン二リン酸
ATP	アデノシン三リン酸
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0-24,ss}$	定常状態における AUC_{0-24hr}
$AUC_{0-\infty}$	0 時間から無限時間まで外挿した血液（漿）中濃度－時間曲線下面積
AUC_{0-t}	0 時間から最終定量可能時点までの血液（漿）中濃度－時間曲線下面積
AUC_{0-xhr}	0 時間から x 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0-\tau}$	0 時間からτ時間（投与間隔）までの血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0-\tau,ss}$	定常状態における投与間隔の AUC
BLQ	定量下限未満
C_0	0 時間に外挿した血液（漿）中濃度
CAF	癌関連線維芽細胞
CDK	サイクリン依存性キナーゼ
CHO	チャイニーズハムスター卵巣
CL	クリアランス
C_{max}	最高血液（漿）中濃度/最高濃度
CNA	コピー数増幅
CR	完全奏効（腫瘍体積の変化に基づく）
CT	未処置対照
CTD	RNA ポリメラーゼ II C 末端反復ドメイン
CYP	チトクローム P450
DMSO	ジメチルスルホキシド
DT	倍化時間
dUTP	デオキシウリジン 3 リン酸
EC_{50}	50%効果濃度
EdU	5 エチニル 2’デオキシウリジン
ER	エストロゲン受容体
FDA	米国食品医薬品局
FDR	偽陽性率
FITC	フルオレセインイソチオシアネート
FOB	機能観察総合評価
FOXM1	forkhead box protein M1
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GREB1	growth regulation by estrogen in breast cancer 1
HEC	ヒドロキシエチルセルロース
HER2	ヒト上皮成長因子受容体 2 型
hERG	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
HisH3K9met3	9 位リジントリメチル化ヒストン H3
HUVEC	ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC_{50}	50%阻害濃度
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
ID	データ不十分
IP	腹腔内投与
Ki	阻害定数
Ki^{ATP}	ATP の結合阻害定数
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィーータンデム型質量分析
LOD	Log 10 尤度比
LOEL	最小影響量
LSC	液体シンチレーション計測法

（続く）

略語一覧（続き）

LWR	幅長比
MARG	ミクロオートラジオグラフィー
MCL1	myeloid cell leukemia-1
MinTD	軽微な毒性量
MTD	最大耐量
NA	該当せず
NC	算出せず
NOAEL	無毒性量
NOEL	無影響量
NSTD	重篤な毒性が発現しない投与量
pCTD	リン酸化 RNA ポリメラーゼ II C 末端反復ドメイン
PD	進行（腫瘍体積の変化に基づく）
PD	細胞集団倍加
PgR	プロゲステロン受容体
pHH3	リン酸化ヒストン H3
PI	ヨウ化プロピジウム
PI3Kα	phospho-inositide-3-kinase α
PK	薬物動態
PLK	polo-like kinase
PO	経口投与
PR	部分奏効（腫瘍体積の変化に基づく）
pRb	リン酸化 Rb
Q12H	12 時間ごと
QD	1 日 1 回
QWBA	定量的全身オートラジオグラフィー
Rb	retinoblastoma
RBBP8	RB 結合タンパク質 8
RE	相対誤差
RSD	相対標準偏差
SAHF	細胞老化特異的ヘテロクロマチン構造
SASP	senescence-associated secretory phenotype
SA-β-gal	老化関連β-ガラクトシダーゼ
SC	皮下投与
SD	安定（腫瘍体積の変化に基づく）
SERD	選択的エストロゲン受容体ダウンレギュレーター
SERM	選択的エストロゲン受容体モジュレーター
SSC	側方散乱光
TCA	トリカルボン酸
TED_x	x%阻害する有効用量の閾値
TK	トキシコキネティクス
T_{max}	最高血液（漿）中濃度到達時間/最高濃度到達時間
TopoIIα	トポイソメラーゼ IIα
TTF1	transcription termination factor 1
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
UVR	紫外線照射
$V_{d,ss}$	定常状態における分布容積
VEGF	血管内皮増殖因子

2.6.1 緒言

アベマシクリブ（LY2835219）は、イーライリリー・アンド・カンパニーにて創製及び開発した、サイクリン依存性キナーゼ（CDK）4 及び 6（以下、CDK4/6）に対して選択的かつ強力な阻害作用を有する低分子化合物である。

CDK4/6 はサイクリン D と複合体を形成し、細胞増殖抑制因子である retinoblastoma タンパク質をリン酸化することで不活性化し、G1 期から S 期へ細胞周期を進行させる。がん細胞ではこの CDK4/6－Rb 経路の異常が高い頻度で生じ、1）突然変異又はエピジェネティックな機序による CDK 阻害タンパク質の欠失、2）CDK4、CDK6 又はサイクリン D の突然変異又は過剰発現、又は 3）Rb タンパク質の不活性化が認められる。これらの異常が起こると細胞は分裂促進シグナルに依存せずに増殖する。したがって、CDK4/6 阻害剤は G1 期から S 期への細胞周期の進行を阻害し、腫瘍増殖を抑制すると考えられる。

手術不能又は再発乳癌を適応症とするアベマシクリブの臨床開発に関して、日米欧規制当局との協議を行ったうえで以下の内容を目的とした国際共同第 III 相試験を実施し、有効性及び安全性について評価を行った。

- 内分泌療法後に増悪したホルモン受容体陽性かつヒト上皮成長因子受容体 2 型陰性（HR+/HER2-）の切除不能な局所進行又は転移性乳癌患者を対象に、アベマシクリブ 150 mg 12 時間ごと投与とフルベストラントを併用投与したときの有効性及び安全性
- 全身治療歴のない HR+/HER2-の局所再発（根治的治療不能）又は転移性乳癌患者を対象に、アベマシクリブ 150 mg 12 時間ごと投与と非ステロイド性アロマターゼ阻害剤を併用投与したときの有効性及び安全性

いずれの試験もアベマシクリブの投与により主要評価項目である無増悪生存期間の延長が認められ、安全性は許容可能であった。

今般、品質に関する試験成績、非臨床試験成績及び臨床試験成績において、アベマシクリブの手術不能又は再発乳癌に対する良好なベネフィット／リスクが得られたことから医薬品製造販売承認申請することとした。

今回申請する効能又は効果、用法及び用量は以下のとおりである。

【効能又は効果】

手術不能又は再発乳癌

【用法及び用量】

内分泌療法剤との併用において、通常、成人にはアベマシクリブとして 1 回 150 mg を 1 日 2 回経口投与する。なお、患者の状態により適宜減量する。

ベージニオ錠 50mg
ベージニオ錠 100mg
ベージニオ錠 150mg

2.6.2　薬理試験の概要文

日本イーライリリー株式会社

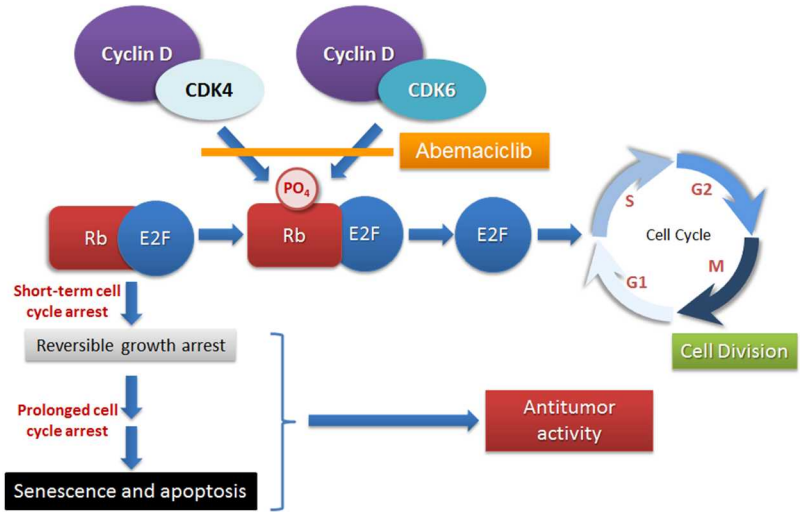
目次

2.6.2 薬理試験の概要文 1
2.6.2.1 まとめ 1
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 3
2.6.2.2.1 In vitro 試験 3
2.6.2.2.1.1 CDK－サイクリン複合体のキナーゼ活性の阻害 3
2.6.2.2.1.2 CDK 以外の細胞周期関連キナーゼの阻害 4
2.6.2.2.1.3 CDK4/6－サイクリン D 複合体に対する選択性 4
2.6.2.2.1.4 癌細胞株における CDK4/6 活性、細胞周期及び細胞増殖の阻害 5
2.6.2.2.1.5 癌細胞株における CDK9 活性の阻害 7
2.6.2.2.1.6 細胞周期関連遺伝子の E2F 依存的な転写の阻害 7
2.6.2.2.1.7 アベマシクリブに対する感受性に影響する因子の探索 8
2.6.2.2.1.8 乳癌に特徴的なアベマシクリブ感受性に影響する因子の探索 12
2.6.2.2.1.9 乳癌におけるエストロゲン受容体の発現阻害並びに細胞老化及びアポトーシスの誘導 14
2.6.2.2.1.10 ヒト代謝物の薬理活性 19
2.6.2.2.1.11 細胞代謝の阻害 22
2.6.2.2.1.12 腫瘍血管新生の阻害 24
2.6.2.2.1.13 内分泌療法との併用による細胞周期及び細胞増殖の阻害 25
2.6.2.2.2 In vivo 試験 30
2.6.2.2.2.1 アベマシクリブの in vivo 活性 31
2.6.2.2.2.1.1 異種移植腫瘍モデルにおける CDK4/6 活性及び細胞周期の阻害 31
2.6.2.2.2.1.2 異種移植腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果 32
2.6.2.2.2.1.3 ESR1 遺伝子変異により内分泌療法に対する耐性を獲得した乳癌モデルにおける抗腫瘍効果 36
2.6.2.2.2.1.4 サイクリン D を高発現する担癌モデルにおける抗腫瘍効果 37
2.6.2.2.2.1.5 脳腫瘍の同所性異種移植モデルにおける抗腫瘍効果 40
2.6.2.2.2.2 内分泌療法との併用の in vivo 活性 41
2.6.2.2.2.2.1 乳癌の異種移植腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果 41
2.6.2.2.2.2.2 ESR1 遺伝子変異により内分泌療法耐性を獲得した乳癌モデルにおける抗腫瘍効果 47
2.6.2.3 副次的薬理試験 47
2.6.2.4 安全性薬理試験 48
2.6.2.4.1 アベマシクリブの in vitro hERG 阻害作用 48
2.6.2.4.2 代謝物 M2、M18 及び M20 の in vitro hERG 阻害作用 48
2.6.2.4.3 イヌ心血管系安全性薬理試験 48
2.6.2.4.4 ラット中枢神経系安全性薬理試験 49
2.6.2.4.5 ラット呼吸器系安全性薬理試験 50
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 50
2.6.2.6 考察及び結論 50
2.6.2.7 図表 53
2.6.2.8 参考文献 53

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

サイクリン依存性キナーゼ（CDK）4 及び CDK6（以下、CDK4/6）は、サイクリン D（D1、D2 又は D3）と複合体を形成することで活性化し、細胞周期の進行を制御する（図 2.6.2-1）。アベマシクリブ（LY2835219）は、CDK ファミリータンパク質のうち CDK4/6 を選択的かつ可逆的に阻害するアデノシン三リン酸（ATP）競合型阻害剤である。アベマシクリブは CDK1、CDK2、CDK7 及び CDK9 と比較して CDK4/6 を選択的に阻害し、また CDK6－サイクリン D3 複合体と比較して CDK4－サイクリン D1 複合体に約 14 倍選択的であった。癌細胞株において、アベマシクリブは CDK4/6 による retinoblastoma（Rb）タンパク質のリン酸化を阻害し、G1 期から S 期及び G2/M 期への細胞周期の進行を阻害して細胞増殖を阻害した。また、乳癌細胞をアベマシクリブ存在下で長時間培養したときの細胞周期の阻害は持続的で、細胞老化による不可逆的な細胞増殖の停止やアポトーシスが誘導された。In vivo 試験では、エストロゲン受容体（ER）陽性乳癌を含む異種移植腫瘍モデルマウスにおいて、アベマシクリブによる用量依存的な Rb リン酸化の阻害、細胞周期の阻害及び腫瘍増殖抑制が認められた。また、担癌モデルマウスにアベマシクリブを 1 日 1 回反復投与した結果、顕著な腫瘍体積の減少や退縮が認められた。また、ER 陽性乳癌において、4-ヒドロキシタモキシフェン（4-HT）やフルベストラントなどの内分泌療法との併用により、in vitro 試験で細胞周期及び細胞増殖の阻害作用の増強が認められたほか、in vivo 試験で抗腫瘍効果の増強が認められた。さらに、脳腫瘍モデルラットにおいて、アベマシクリブは脳内に移行して生存期間を延長した。なお、薬効薬理試験ではアベマシクリブメシル酸塩又はアベマシクリブ遊離塩基を使用した。



CDK4 又は CDK6 はサイクリン D（D1、D2 又は D3）と複合体を形成することで活性化し、Rb をリン酸化して不活性化させる。その結果、Rb は転写因子 E2F から解離し、細胞周期の進行に必要な遺伝子群の E2F 依存的な転写が開始される。アベマシクリブは CDK4/6 による Rb のリン酸化を可逆的に阻害することで、細胞周期の進行を阻害して細胞増殖を抑制する。癌細胞がアベマシクリブに長時間曝露されると、細胞老化による不可逆的な増殖停止やアポトーシスが誘導される。

図 2.6.2-1 アベマシクリブは細胞周期を制御する CDK4/6－Rb 経路を阻害する

主要な薬効薬理試験成績を以下に示す。

- 無細胞系での評価において、アベマシクリブは CDK4/6 のキナーゼ活性を選択的かつ強力に阻害し、CDK4－サイクリン D1、CDK6－サイクリン D1 及び CDK6－サイクリン D3 のうち CDK4－サイクリン D1 を最も強く阻害した。CDK4－サイクリン D1 に対する阻害定数（Ki）は、CDK6－サイクリン D1 の 1/4 倍、CDK6－サイクリン D3 の 1/14 倍であった（CTD 第 2.6.2.2.1.1～2.6.2.2.1.3 項）。
- 癌細胞株を用いた in vitro 試験において、アベマシクリブは Rb のリン酸化を濃度依存的に阻害し、G1 期から S 期及び G2/M 期への細胞周期の進行及び細胞増殖を阻害した。また、CDK4/6 による Rb の不活性化を解除することで、E2F 依存的な細胞周期関連遺伝子の発現を阻害した（CTD 第 2.6.2.2.1.4、2.6.2.2.1.6 項）。
- サイクリン D を高発現する、又はサイクリン D 遺伝子増幅を有する癌細胞株は、アベマシクリブの増殖阻害作用に高い感受性を示した。一方、Rb 陰性（変異型 Rb 又は Rb 欠失）細胞株はアベマシクリブの増殖阻害作用に耐性を示した（CTD 第 2.6.2.2.1.7 項）。
- 検討した乳癌細胞株のうち、luminal 型の ER 陽性細胞株がアベマシクリブの増殖阻害作用に最も高い感受性を示した。これらの細胞株には、ヒト上皮成長因子受容体 2 型（HER2）陽性細胞株やサイクリン D1 遺伝子（CCND1）増幅を有する細胞株も含まれた（CTD 第 2.6.2.2.1.8 項）。
- ER 陽性乳癌細胞株において、アベマシクリブへの曝露により ERα発現量が減少したほか、長時間の細胞周期停止により細胞老化及びアポトーシスが誘導され、細胞の増殖及び生存に対する持続的かつ不可逆的な作用が認められた（CTD 第 2.6.2.2.1.9 項）。
- ヒト血漿中曝露量が総曝露量の 10%を超える主代謝物 M2 及び M20 は、アベマシクリブと同程度の効力で CDK4/6 キナーゼ活性、細胞周期及び細胞増殖を阻害し、細胞老化を誘導した。M22 の薬理活性はアベマシクリブよりも低かった（CTD 第 2.6.2.2.1.10 項）。
- 乳癌細胞株において、アベマシクリブはエネルギー産生に関わる細胞代謝を障害し、細胞死を誘導した（CTD 第 2.6.2.2.1.11 項）。
- In vitro 共培養系において、アベマシクリブは内皮細胞の発芽及び腫瘍誘導性の毛細血管様構造の形成を阻害した（CTD 第 2.6.2.2.1.12 項）。
- 担癌モデルマウスにおいて、アベマシクリブを単回投与後の Rb リン酸化及び細胞周期の阻害は可逆的であった（CTD 第 2.6.2.2.2.1.1 項）。一方、1 日 1 回の反復投与により用量依存的な腫瘍の増殖抑制又は退縮が認められ、抗腫瘍効果は Rb リン酸化及び細胞周期の阻害と相関した（CTD 第 2.6.2.2.2.1.2 項）。
- ER 陽性乳癌や、サイクリン D を高発現する乳癌の担癌モデルマウスにおいて、アベマシクリブは単独投与で顕著な抗腫瘍効果を示した（CTD 第 2.6.2.2.2.1.4 項）。また、ESR1 遺伝子変異により内分泌療法に耐性を獲得した乳癌モデルにおいて、アベマシクリブは抗腫瘍効果を示した（CTD 第 2.6.2.2.2.1.3 項）。
- 脳腫瘍の同所性異種移植モデルにおいて、アベマシクリブは脳内に移行して生存期間を延長した（CTD 第 2.6.2.2.2.1.5 項）。
- ER 陽性乳癌細胞株において、アベマシクリブとフルベストラントの併用により ERα発現、細胞周期及び細胞増殖の阻害作用の増強が認められた（CTD 第 2.6.2.2.1.13 項）。

- ER 陽性乳癌の担癌モデルマウスにおいて、4-HT 又はフルベストラントとの併用投与による抗腫瘍効果の顕著な増強が認められた（CTD 第 2.6.2.2.2.2.1 項）。ESR1 遺伝子変異により内分泌療法に耐性を獲得した乳癌モデルにおいて、アベマシクリブとの併用投与によりフルベストラントに対する感受性が回復した（CTD 第 2.6.2.2.2.2.2 項）。

安全性薬理試験では、心血管系、中枢神経系及び呼吸器系に対するアベマシクリブの作用を評価した。アベマシクリブ並びに代謝物 M2、M18 及び M20 のヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネル電流阻害作用を in vitro 試験で評価した結果、検討した最高用量（アベマシクリブ：1.65 μM、代謝物：10 μM）において 50%を上回る hERG チャネル電流の阻害は認められなかった。また、イヌを用いた心血管系安全性薬理試験並びにラットを用いた中枢神経系及び呼吸器系安全性薬理試験において、臨床上問題となる安全性の懸念は示されなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 In vitro 試験

アベマシクリブの薬理作用を明らかにするため、無細胞系で CDK4/6 阻害作用及びその選択性を評価し、癌細胞株を用いて CDK4/6 キナーゼ活性、細胞周期及び細胞増殖の阻害作用を評価した。また、ER 陽性乳癌を含む癌細胞株パネルを用いて、アベマシクリブの増殖阻害作用に対する感受性・耐性に影響を与える因子を探索した。さらに、アベマシクリブの ERαの発現に対する影響並びに細胞老化及びアポトーシスの誘導能を評価した。内分泌療法（フルベストラント）とアベマシクリブの併用効果は、ER 陽性乳癌における CDK4/6 キナーゼ活性、細胞周期、細胞増殖や ERα発現に対する影響を指標に評価した。ヒト血漿中に検出された代謝物[1]のうち M2（LSN2839567）、M18（LSN3106729）、M20（LSN3106726）及び M22（LSN3233168）についても主要な薬理作用を in vitro 試験で評価し（いずれもメシル酸塩を使用）、アベマシクリブと比較した。CDK4/6 のキナーゼ活性は Rb のリン酸化を指標に評価し、細胞周期は細胞周期マーカー［S 期：トポイソメラーゼ IIα（TopoIIα）、G2/M 期：リン酸化ヒストン H3（pHH3）］、DNA 量並びに Rb の作用標的である転写因子 E2F に依存的な細胞周期関連遺伝子群の発現を指標に評価した。

2.6.2.2.1.1 CDK－サイクリン複合体のキナーゼ活性の阻害

（添付資料 4.2.1.1.1、Gelbert et al. 2014）

各種 CDK－サイクリン複合体のキナーゼ活性に対するアベマシクリブの選択性を無細胞系で評価した。CDK4－サイクリン D1 及び CDK6－サイクリン D1 に対する 50%阻害濃度（IC_{50}）値はそれぞれ 2.0 及び 9.9 nM であった（表 2.6.2-1）。CDK1－サイクリン B1、CDK2－サイクリン E、CDK7－サイクリン H1－Mat1 及び CDK9－サイクリン T1 と比較して、アベマシクリブは CDK4－サイクリン D1 を約 29～2000 倍強く阻害した。アベマシクリブは CDK9－サイクリン T1 を比較的強く阻害したものの（IC_{50} = 57 nM）、培養細胞系を用いた評価では CDK9 の阻害は認められなかった（CTD 第 2.6.2.2.1.5 項）。

[1] 健康被験者に[^{14}C]アベマシクリブを 150 mg の用量で単回経口投与（CTD 第 2.7.2.2.2.1.1 項）

表 2.6.2-1 CDK－サイクリン複合体のキナーゼ活性の阻害

CDK－サイクリン複合体	例数	IC_{50}（nM）
CDK4－サイクリン D1	5	2.0 ± 0.4
CDK6－サイクリン D1	1	9.9
CDK1－サイクリン B1	5	1627 ± 666
CDK2－サイクリン E	3	504 ± 298
CDK7－サイクリン H1－Mat1	4	3910 ± 2410
CDK9－サイクリン T1	4	57 ± 42

略語：ADP = アデノシン二リン酸、ATP = アデノシン三リン酸、CTD = RNA ポリメラーゼ II C 末端反復ドメイン、IC_{50} = 50%阻害濃度。

CDK1、CDK2、CDK4 及び CDK6 の各基質［CDK1：ヒストン H1、CDK2、4 及び 6：Rb C 末端フラグメント（773～928 アミノ酸）］のリン酸化を ^{33}P 標識 ATP の filter binding 法で検出した。CDK9 のキナーゼ活性は、CTD のリン酸化で生成される ADP を特異的抗体で検出して評価した。CDK7 のキナーゼ活性は ADP を蛍光偏光法で検出して評価した。ATP 濃度は 20 μM（CDK1）、12 μM（CDK2）、40 μM（CDK4）、100 μM（CDK6）及び 50 μM（CDK7 及び CDK9）とした。アベマシクリブメシル酸塩の IC_{50} 値の平均値±標準偏差を示す。［添付資料 4.2.1.1.1、Gelbert et al. 2014］

2.6.2.2.1.2 CDK 以外の細胞周期関連キナーゼの阻害

（添付資料 4.2.1.1.1、Gelbert et al. 2014）

CDK 以外の細胞周期関連キナーゼ、特に G2/M 期に関与するキナーゼに対するアベマシクリブの阻害作用を無細胞系で評価した。Aurora A、Aurora B、polo-like kinase（PLK）1 及び PLK3 に対するアベマシクリブの阻害作用は示されなかった（表 2.6.2-2）。

表 2.6.2-2 G2/M 期関連キナーゼの阻害

キナーゼ	例数	IC_{50}（nM）
Aurora A	1	>20000
Aurora B	1	>20000
PLK1	1	>20000
PLK3	1	>20000

略語：IC_{50} = 50%阻害濃度、PLK = polo-like kinase。［添付資料 4.2.1.1.1、Gelbert et al. 2014］

2.6.2.2.1.3 CDK4/6－サイクリン D 複合体に対する選択性

（添付資料 4.2.1.1.2、QSB40 試験）

CDK4/6 に対するアベマシクリブの選択性を評価するため、CDK4－サイクリン D1、CDK6－サイクリン D1 及び CDK6－サイクリン D3 への ATP 結合に対する阻害作用を無細胞系で評価した。アベマシクリブはいずれの CDK－サイクリン D 複合体をも強力に阻害したが、CDK4－サイクリン D1 に対する阻害定数（Ki^{ATP}）が 0.6 nM と最も小さく選択性が高かった（表 2.6.2-3）。CDK6－サイクリン D1 及び CDK6－サイクリン D3 に対する Ki^{ATP} 値は、CDK4－サイクリン D1 のそれぞれ 4 倍及び 14 倍大きかった。

表 2.6.2-3 CDK4/6－サイクリン D 複合体に対する選択性

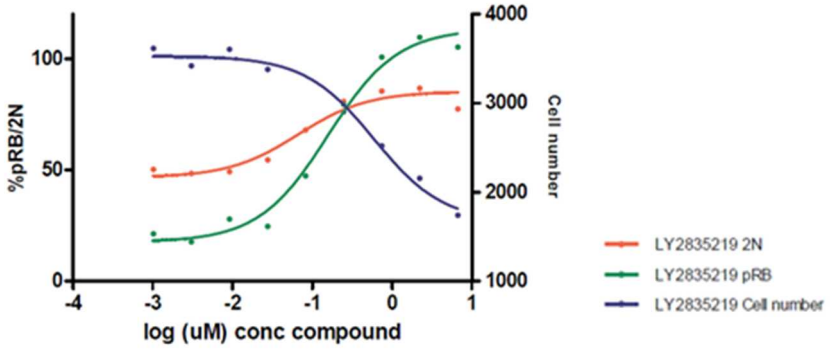
CDK－サイクリン D 複合体	例数	Ki^{ATP}（nM）
CDK4－サイクリン D1	2	0.6 ± 0.28
CDK6－サイクリン D1	2	2.4 ± 1.2
CDK6－サイクリン D3	2	8.2 ± 1.1

略語：ATP = アデノシン三リン酸、Ki^{ATP} = ATP の結合阻害定数。
CDK4/6 による Rb C 末端フラグメント（773～928 アミノ酸）のリン酸化を ^{33}P 標識 ATP の filter binding 法で検出した。アベマシクリブメシル酸塩の Ki^{ATP} 値の平均値±標準偏差を示す。［添付資料 4.2.1.1.2、QSB40 試験］

2.6.2.2.1.4 癌細胞株における CDK4/6 活性、細胞周期及び細胞増殖の阻害

（添付資料 4.2.1.1.1、Gelbert et al. 2014）
（添付資料 4.2.1.1.3、CCGS293 試験）

結腸直腸癌細胞株 Colo205 を用いて、アベマシクリブによる CDK4/6 及び細胞増殖の阻害を評価した（Gelbert et al. 2014）。アベマシクリブ存在下で 24 時間培養後、リン酸化 Rb（pRb）は濃度依存的に阻害され、G1 期での細胞周期停止の指標となる 2N DNA 量の細胞割合は濃度依存的に上昇した（図 2.6.2-2）。pRb の IC_{50} 値は 120 ± 36 nM、2N DNA 量の IC_{50} 値は 72 ± 31 nM であった（平均値±標準偏差、それぞれ n = 6 及び 7）。細胞周期の阻害に伴い、総細胞数は濃度依存的に減少した。以上、アベマシクリブは Rb リン酸化を阻害し、細胞周期及び細胞増殖を阻害した。これらの阻害作用は同程度の IC_{50} 値で認められた。



略語：pRb = リン酸化 Rb。
細胞周期を同期せずに、ヒト結腸直腸癌細胞株 Colo205 をアベマシクリブメシル酸塩存在下で 24 時間培養後、pRb（Ser^{780}）、2N DNA 量の細胞割合（ヨウ化プロピジウム染色）及び総細胞数を測定した。左縦軸はリン酸化 Rb の阻害率又は 2N DNA 量の細胞割合を、右縦軸は細胞数を示す。［添付資料 4.2.1.1.1、Gelbert et al. 2014］

図 2.6.2-2 Colo205 における Rb リン酸化及び細胞周期の阻害

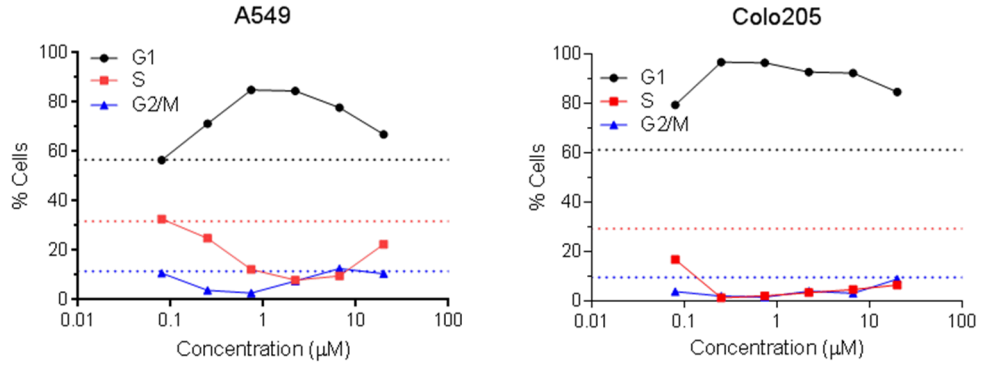
アベマシクリブによる細胞周期の阻害は、非小細胞肺癌細胞株 A549 及び結腸直腸癌細胞株 Colo205 を用いた別試験でも確認された（CCGS293 試験）。両細胞株をアベマシクリブ存在下で 24 時間培養した結果、pRb が濃度依存的に減少したほか、S 期マーカーの TopoIIα及び G2/M 期マーカーの pHH3 が濃度依存的に減少した（表 2.6.2-4）。3 つのパラメータの IC_{50} 値は、細胞株間で同程度であった。アベマシクリブによる細胞周期の阻害は、DNA 量に基づく評価でも確認された。すなわち、アベマシクリブにより G1 期細胞（2N DNA）の増加と、それに伴う S 期細胞（2N～4N DNA）及び G2/M 期細胞（4N DNA）の減少が認められた（図 2.6.2-3）。さらに、アベマシクリブ存在下で 4 日間培養後の細胞数は濃度依存的に減少し、その IC_{50} 値は A549 で

450 nM、Colo205 において 210 nM であった（図 2.6.2-4）。以上、A549 及び Colo205 において、アベマシクリブの濃度依存的な Rb リン酸化、細胞周期及び細胞増殖の阻害が認められた。

表 2.6.2-4　A549 及び Colo205 における Rb リン酸化及び細胞周期の阻害（細胞周期マーカー）

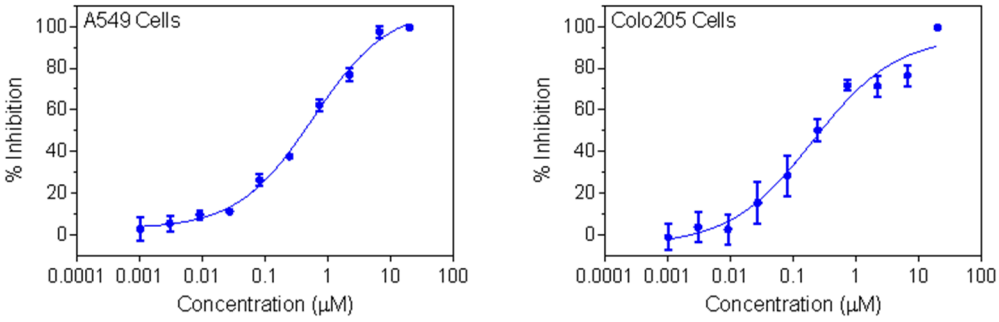
細胞株	pRb IC_{50}（μM）	TopoIIα IC_{50}（μM）	pHH3 IC_{50}（μM）
A549	0.151	0.047	0.043
Colo205	0.180	0.0297	<0.027

略語：IC_{50} = 50%阻害濃度、pHH3 = リン酸化ヒストン H3、pRb = リン酸化 Rb、TopoIIα = トポイソメラーゼ IIα。
ヒト非小細胞肺癌細胞株 A549 及びヒト結腸直腸癌細胞株 Colo205 をアベマシクリブメシル酸塩存在下で 24 時間培養後、免疫ブロット法で pRb（Ser^{780}）、TopoIIα及び pHH3（Ser^{10}）の発現を定量し、IC_{50} 値を算出した。［添付資料 4.2.1.1.3、CCGS293 試験］



ヒト非小細胞肺癌細胞株 A549 及びヒト結腸直腸癌細胞株 Colo205 をアベマシクリブメシル酸塩存在下で 24 時間培養後、ヨウ化プロピジウム染色し、フローサイトメトリーで DNA 量を測定した（2N DNA = G1 期、4N DNA = G2/M 期、2N～4N DNA = S 期）。総細胞数（G1 + S + G2/M）に対する各周期の細胞数の割合（%）を示す。点線は非処理細胞のベースラインを示す。［添付資料 4.2.1.1.3、CCGS293 試験］

図 2.6.2-3　A549 及び Colo205 における細胞周期の阻害（DNA 量）



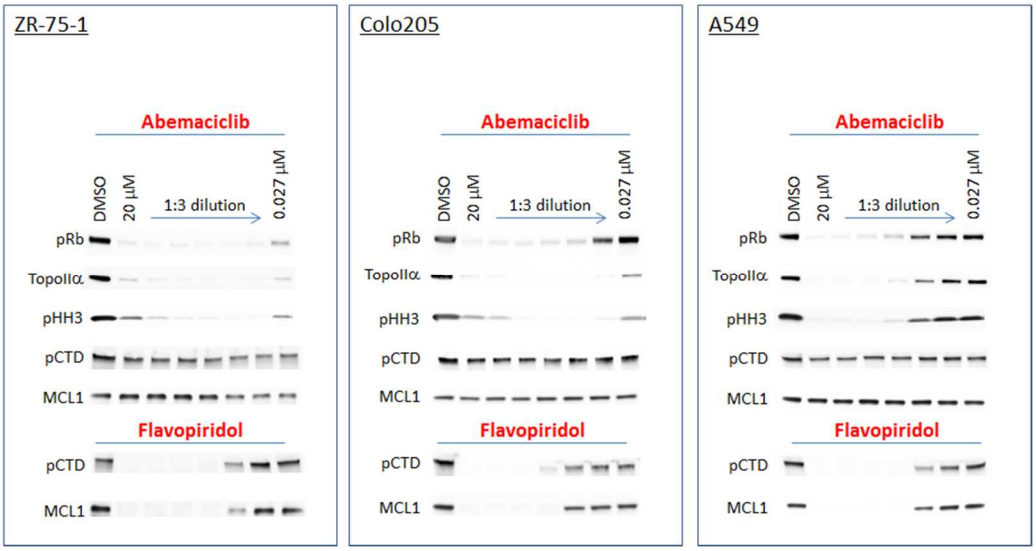
ヒト非小細胞肺癌細胞株 A549 及びヒト結腸直腸癌細胞株 Colo205 をアベマシクリブメシル酸塩存在下で 4 日間培養後、細胞数を測定した。独立した 2 回の試験で得られた平均値±標準偏差を示す（n = 2）。［添付資料 4.2.1.1.3、CCGS293 試験］

図 2.6.2-4　A549 及び Colo205 における細胞増殖の阻害

2.6.2.2.1.5　癌細胞株における CDK9 活性の阻害

（添付資料 4.2.1.1.4、CCGS311 試験）

無細胞系においてアベマシクリブは CDK9 のキナーゼ活性を阻害したため（CTD 第 2.6.2.2.1.1 項）、細胞周期及び細胞増殖の阻害作用に CDK9 が関与するか検討した。乳癌細胞株 ZR-75-1、結腸直腸癌細胞株 Colo205 及び非小細胞肺癌細胞株 A549 において、アベマシクリブ存在下で 24 時間培養後の pRb、TopoIIα及び pHH3 の発現は濃度依存的に減少した（図 2.6.2-5）。一方、CDK9 活性の指標となる myeloid cell leukemia-1（MCL1）及びリン酸化 RNA ポリメラーゼ II C 末端反復ドメイン（pCTD）は検討した最高濃度（20 μM）でも減少しなかった。陽性対照である flavopiridol（CDK1、CDK2、CDK4 及び CDK9 阻害剤）は、pCTD 及び MCL1 の発現を濃度依存的に阻害した。したがって、アベマシクリブによる細胞周期及び細胞増殖の阻害に CDK9 の阻害は関与しないことが示唆された。



略語：DMSO = ジメチルスルホキシド、MCL1 = myeloid cell leukemia-1、pCTD = リン酸化 RNA ポリメラーゼ II C 末端反復ドメイン、pHH3 = リン酸化ヒストン H3、pRb = リン酸化 Rb、TopoIIα = トポイソメラーゼ IIα。
ヒト乳癌細胞株 ZR-75-1、ヒト結腸直腸癌細胞株 Colo205 及びヒト非小細胞肺癌細胞株 A549 をアベマシクリブメシル酸塩又は flavopiridol 存在下で 24 時間培養後、免疫ブロット法で pRb（Ser^{780}）、TopoIIα、pHH3（Ser^{10}）、pCTD（Ser^{2}）及び MCL1 の発現を定量した。［添付資料 4.2.1.1.4、CCGS311 試験］

図 2.6.2-5　ZR-75-1、Colo205 及び A549 における CDK9 キナーゼ活性の阻害

2.6.2.2.1.6　細胞周期関連遺伝子の E2F 依存的な転写の阻害

（添付資料 4.2.1.1.5、CCGS302 試験）

乳癌細胞株をアベマシクリブ存在下で 24 時間培養し、E2F 依存的に転写制御される細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現プロファイルを評価した（図 2.6.2-6）。検討した 16 種の乳癌細胞株は、ER（陽性／陰性）や Rb［陽性（野生型 Rb）／陰性（変異型 Rb 又は Rb 欠失）］の発現が異なる。

アベマシクリブは、CCNA（サイクリン A）、CCNE1（サイクリン E1）、MCM7（ミニ染色体維持タンパク 7）、CDK2、CDK4 及び CDKN2C（p18）を含む複数の細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現を阻害した。アベマシクリブによるこれらの mRNA 発現の阻害は、ER 陽性乳癌及び

ER 陰性乳癌の両者で認められた。一方、Rb 陽性乳癌と比較して、Rb 陰性乳癌（BT-549、HCC-70 及び MDA-MB-468）における阻害はわずかであるか、又は認められなかった。したがって、アベマシクリブによる乳癌の細胞周期の阻害には機能を有する Rb の発現が必要であり、アベマシクリブは CDK4/6 による Rb のリン酸化を阻害することで、E2F 依存的な細胞周期関連遺伝子の発現を阻害すると考えられた。



16 種のヒト乳癌細胞株を 500 nM アベマシクリブメシル酸塩存在下で 24 時間培養後、細胞周期関連遺伝子［CCND1（サイクリン D1）、CCND3（サイクリン D3）、CDK2、CDK4、CDK6、CDKN2A（p16）、CDKN2C（p18）、CCNA（サイクリン A）、CCNE1（サイクリン E1）、MCM7（ミニ染色体維持タンパク 7）、RB1（エクソン 17～18）、RB1（エクソン 25～26）、RBL1 及び RBL2］の mRNA 発現を測定した。非処置対照群と比較した発現比の平均値を log2 スケールで示す（n = 2～3）。非処置対照群における発現量が検出限界未満であり発現比を算出できなかったデータは示していない。黒点線はベースラインを、赤点線は±4 倍の発現比を示す。BT-474、MDA-MB-453、MDA-MB-231、BT-20、BT-549、HCC-70、MDA-MB-468 及び Hs578T はエストロゲン受容体陰性で、その他はエストロゲン受容体陽性である（Finn et al. 2009）。BT-549、HCC-70 及び MDA-MB-468 は Rb 陰性（変異型 Rb 又は Rb 欠失）で、その他は Rb 陽性である。［添付資料 4.2.1.1.5、CCGS302 試験］

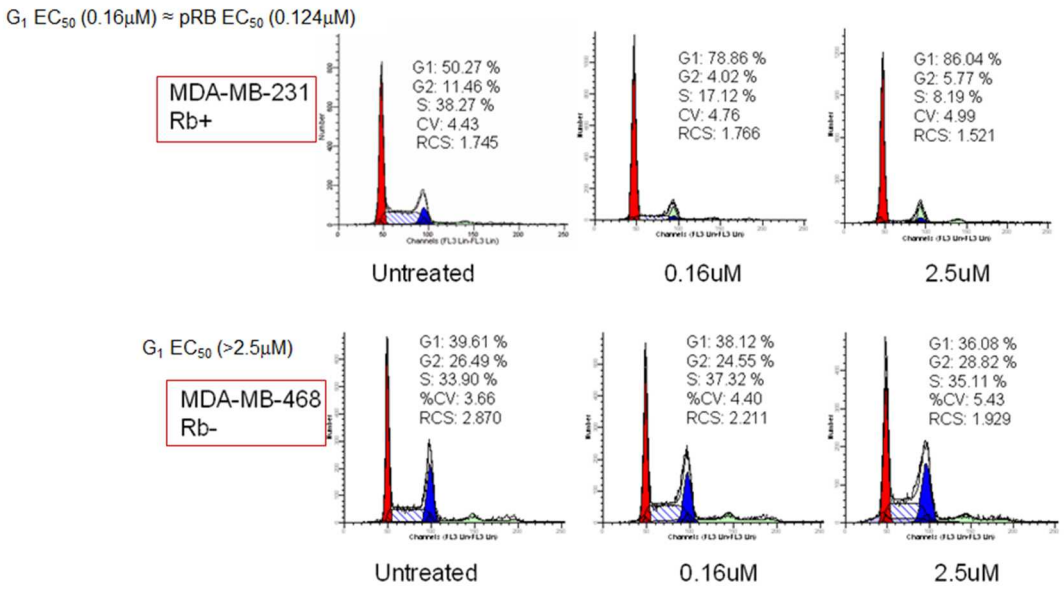
図 2.6.2-6　乳癌細胞株における E2F 依存的な細胞周期関連遺伝子の転写の阻害

2.6.2.2.1.7　アベマシクリブに対する感受性に影響する因子の探索

（添付資料 4.2.1.1.6、CCGS15 試験）
（添付資料 4.2.1.1.7、CCGS292 試験）
（添付資料 4.2.1.1.8、CCGS294 試験）

アベマシクリブによる細胞周期及び細胞増殖の阻害に影響する感受性・耐性因子を明らかにするため、一連の試験を実施した。

最初に、アベマシクリブの細胞周期阻害作用を Rb 陽性及び Rb 陰性乳癌細胞株で比較した（CCGS15 試験）。その結果、Rb 陽性の MDA-MB-231 では 2N DNA 量の細胞割合はアベマシクリブの濃度依存的に上昇し、G1 期での細胞周期停止が示された（図 2.6.2-7）。その 50%効果濃度（EC_{50}）は 160 nM であり、本細胞株における Rb リン酸化阻害作用の EC_{50} 値（124 nM）に近い値であった。一方、RB1 を欠失した MDA-MB-468 では、アベマシクリブによる 2N DNA 量の細胞割合の上昇は検討した最高濃度（2.5 μM）でも認められなかった。したがって、アベマシクリブによる細胞周期の阻害には、機能を有する Rb の発現が必要であることが示された。



略語：EC_{50} = 50%効果濃度、pRB = リン酸化 Rb。
Rb 陽性（MDA-MB-231）及び Rb 陰性（MDA-MB-468）のヒト乳癌細胞株をアベマシクリブメシル酸塩存在下で 24 時間培養後、ヨウ化プロピジウム染色し、フローサイトメトリーで DNA 量を測定した（2N DNA = G1 期、4N DNA = G2/M 期、2N～4N DNA = S 期）。総細胞数（G1 + S + G2/M）に対する各周期の細胞数の割合（%）を図中に示す。［添付資料 4.2.1.1.6、CCGS15 試験］

図 2.6.2-7 Rb 陽性及び Rb 陰性乳癌細胞株における細胞周期の阻害（DNA 量）

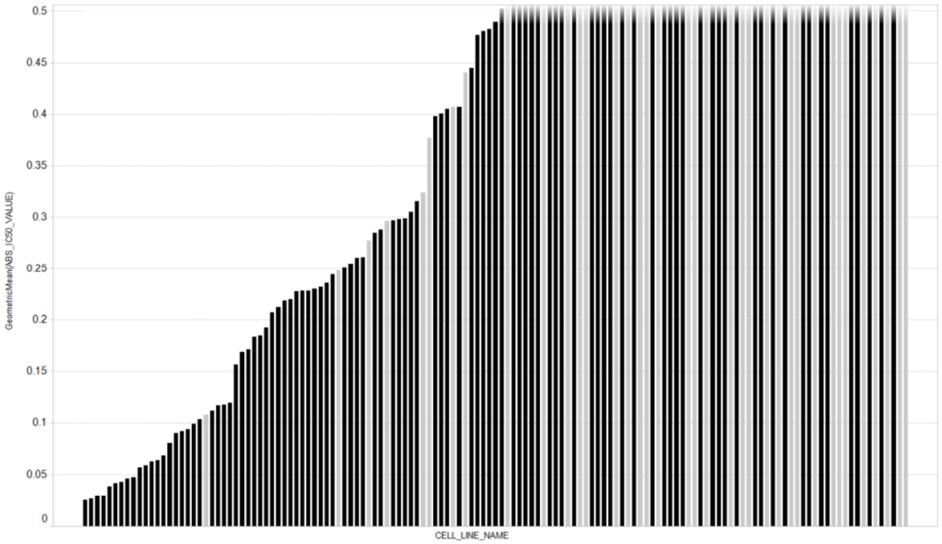
次に、遺伝的及び組織学的に多様なヒト癌細胞株のパネルを用いて、アベマシクリブの細胞増殖阻害作用に影響する遺伝子変異を探索した（CCGS292 試験）。アベマシクリブ存在下で各細胞株の倍化時間の 2 倍の時間培養した結果、13%の細胞株で細胞増殖の IC_{50} 値が 1 μM を下回った。これらの高感受性細胞株では、サイクリン D 遺伝子（CCND1、CCND2 又は CCND3）の発現を増加させる遺伝子変異が高頻度に認められた（表 2.6.2-5）。特に、CCND2 増幅、CCND3 増幅、t(11;14)染色体転座又は CCND1 増幅のいずれかを有する乳癌細胞株は、アベマシクリブに高感受性を示した［偽陽性率（FDR）が 0.05 未満］。乳癌以外の癌種では、CCND1 増幅と高感受性に明らかな関連性は認められなかった。一方、アベマシクリブに対する耐性に関連する遺伝子変異として、TP53（p53）及び PIK3CA［phospho-inositide-3-kinase α（PI3Kα）］が同定された（表 2.6.2-5）。すべての Rb 陰性細胞株の IC_{50} 値は 1 μM 以上であり、アベマシクリブに低感受性であった。

アベマシクリブ存在下で各細胞株を 10 日間培養した場合も、Rb 陰性細胞株における細胞増殖の IC_{50} 値は Rb 陽性細胞株よりも高い傾向にあった（図 2.6.2-8）。すべての Rb 陽性細胞株で強い細胞増殖阻害が認められた訳ではないことから、Rb 陽性は単独では高感受性の予測因子とはならないものの、Rb 陰性はアベマシクリブに対する低感受性の一要因となることが示唆された。

表 2.6.2-5 細胞増殖阻害に対する感受性に関連する遺伝子変異の探索

遺伝子変異との関連性	遺伝子変異	変異陽性細胞株数	p 値	FDR	LOD
高感受性	サイクリン D 高発現 [a]	11	2.61E-08	1.88E-06	6.73
高感受性	t(11;14) CCND1 転座	3	6.27E-08	2.26E-06	6.36
高感受性	CCND2 + CCND3 増幅 [b]	4	0.001	0.03	2.21
耐性	TP53 変異	258	0.002	0.04	2.06
耐性	PIK3CA 変異	41	0.004	0.04	1.82
耐性	PTEN + PIK3CA 変異	73	0.004	0.04	1.83

略語：FDR = 偽陽性率、IC_{50} = 50%阻害濃度、LOD = Log 10 尤度比。
遺伝子情報が得られた 505 種のヒト癌細胞株をアベマシクリブメシル酸塩存在下で各倍化時間の 2 倍の時間培養し、細胞増殖の IC_{50} 値を算出した。各遺伝子変異について、p 値及び LOD を算出して感受性の相関を解析した。また、Benjamini-Hochberg 法を用いて多重性を補正し、FDR を算出した（FDR<0.05 を有意と判断）。
[a] CCND2 増幅、CCND3 増幅、t(11;14)染色体転座、CCND1 増幅のいずれかを有する乳癌細胞株並びにカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス由来 v-cyclin を有する細胞株
[b] 局所的増幅によるコピー数増加
［添付資料 4.2.1.1.7、CCGS292 試験］



略語：IC_{50} = 50%阻害濃度。
主に乳癌及び肺癌から成る 137 種のヒト癌細胞株をアベマシクリブメシル酸塩存在下で 10 日間培養し、細胞増殖の IC_{50} 値を算出した（n = 1～2）。左から IC_{50} 値の小さい順に示す。黒色：野生型 RB1、灰色：変異型 RB1。
［添付資料 4.2.1.1.7、CCGS292 試験］

図 2.6.2-8 Rb 陽性及び Rb 陰性細胞株における細胞増殖の 50%阻害濃度

CDK4/6 阻害剤に対する感受性因子を検討するため、Rb 陽性の小細胞肺癌株 DMS-53 を親細胞株とし、CDK4/6 阻害剤（アベマシクリブ又はパルボシクリブ）による増殖阻害に耐性を獲得し

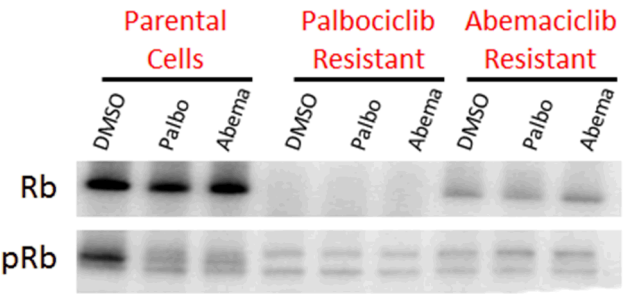
た細胞株を単離した（CCGS294 試験）。その結果、アベマシクリブについては、親細胞株の IC_{50} 値が 0.15 μM であるのに対し、アベマシクリブ耐性株では 1.33 μM と約 9 倍上昇した（表 2.6.2-6）。同様に、パルボシクリブについては、親細胞株の IC_{50} 値が 0.4 μM であるのに対し、パルボシクリブ耐性株では 3.5 μM と約 9 倍上昇した。CDK4/6 阻害剤の間で交差耐性が認められ、パルボシクリブ耐性細胞株ではアベマシクリブの IC_{50} 値が約 7 倍上昇し、アベマシクリブ耐性細胞株ではパルボシクリブの IC_{50} 値が約 13 倍上昇した。

アベマシクリブ又はパルボシクリブに対する耐性獲得機序は同じと考えられ、いずれも Rb 及び pRb 発現量が顕著に減少し、また CDK4/6 阻害薬添加による Rb リン酸化の阻害も認められなかった（図 2.6.2-9）。さらに、アベマシクリブ耐性細胞株では、アベマシクリブによる 2N DNA 量の細胞割合の増加は認められず、G1 期での細胞周期停止が示されなかった（図 2.6.2-10）。これらの結果から、アベマシクリブによる細胞周期及び細胞増殖の阻害には、機能を有する Rb の発現が必要であることが確認された。

表 2.6.2-6　アベマシクリブ又はパルボシクリブ耐性細胞株における細胞増殖の阻害

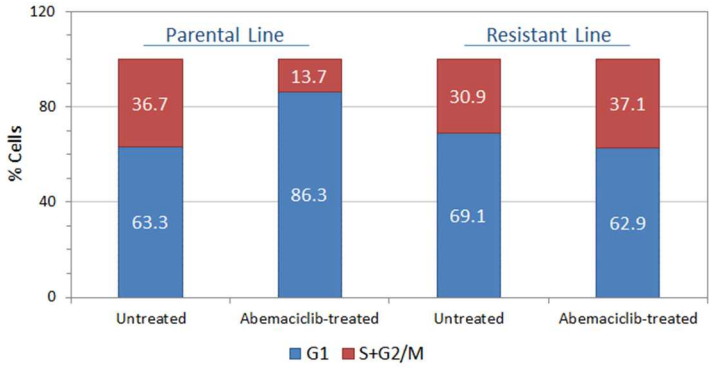
細胞株	アベマシクリブの IC_{50}（μM）	パルボシクリブの IC_{50}（μM）
親細胞株	0.2	0.4
パルボシクリブ耐性細胞株	1.0	3.5
アベマシクリブ耐性細胞株	1.3	5.0

略語：IC_{50} = 50%阻害濃度。
ヒト小細胞肺癌細胞株 DMS-53 をアベマシクリブメシル酸塩又はパルボシクリブメシル酸塩存在下で培養し、耐性細胞株を単離した。親細胞株及び耐性細胞株をアベマシクリブメシル酸塩又はパルボシクリブメシル酸塩存在下で各倍化時間の 2 倍の時間培養し、細胞増殖の IC_{50} 値を算出した（n = 1）。［添付資料 4.2.1.1.8、CCGS294 試験］



略語：DMSO = ジメチルスルホキシド、pRb = リン酸化 Rb。
ヒト小細胞肺癌細胞株 DMS-53 の親細胞株、アベマシクリブ耐性株及びパルボシクリブ耐性株を DMSO（陰性対照）、1 μM アベマシクリブメシル酸塩又は 1 μM パルボシクリブメシル酸塩存在下で 4 時間培養後、免疫ブロット法で Rb 及び pRb（Ser^{780}）の発現を定量した。［添付資料 4.2.1.1.8、CCGS294 試験］

図 2.6.2-9　アベマシクリブ又はパルボシクリブ耐性細胞株における Rb リン酸化の阻害



ヒト小細胞肺癌細胞株 DMS-53 の親細胞株及びアベマシクリブ耐性株を、1 μM アベマシクリブメシル酸塩存在下で 24 時間培養後、ヨウ化プロピジウム染色し、フローサイトメトリーで DNA 量を測定した（2N DNA = G1 期、4N DNA = G2/M 期、2N～4N DNA = S 期）。総細胞数（G1 + S + G2/M）に対する各周期の細胞数の割合（%）を示す。［添付資料 4.2.1.1.8、CCGS294 試験］

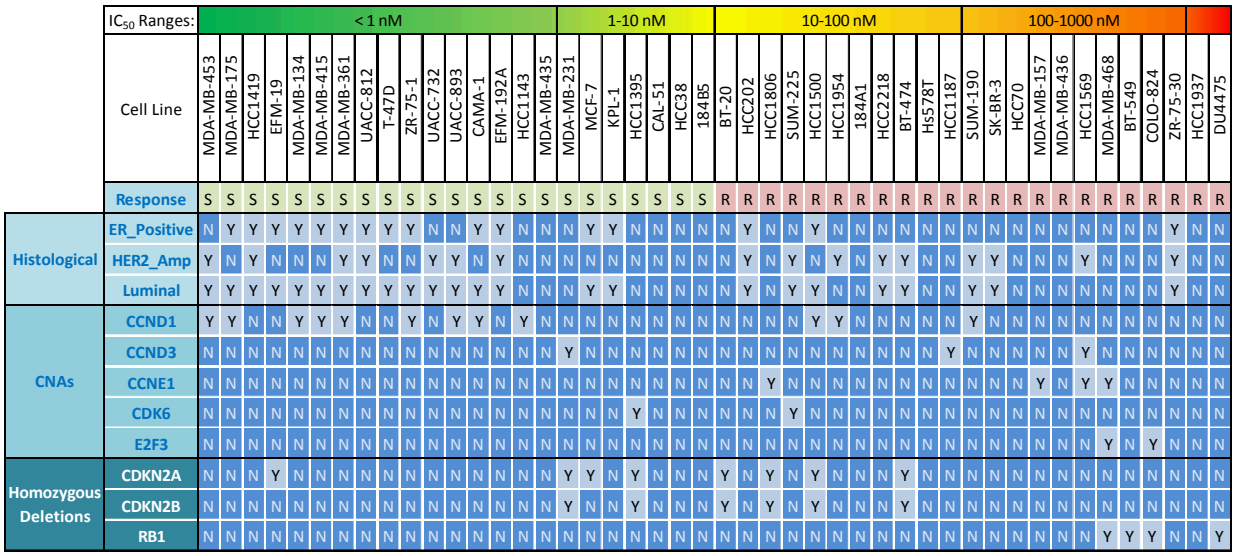
図 2.6.2-10 アベマシクリブ又はパルボシクリブ耐性細胞株における細胞周期の阻害

2.6.2.2.1.8 乳癌に特徴的なアベマシクリブ感受性に影響する因子の探索

（添付資料 4.2.1.1.9、CCGS291 試験）

46 種のヒト乳癌細胞株パネルを用いて、アベマシクリブの細胞増殖阻害作用に対する感受性に影響する因子を探索した。検討した因子には、組織型（luminal 型及び非 luminal 型）、乳癌特異的因子（ER 及び HER2）並びに CDK4/6 経路に関連する遺伝子（増幅：CCND1、CCND3、CCNE1 及び E2F3、ホモ接合性欠失：CDKN2A、CDKN2B 及び RB1）が含まれる。本試験では、luminal 型、ER 陽性、CCND1 増幅又は Rb 陽性のいずれかの特徴を有する乳癌で、細胞増殖の IC_{50} 値が低値を示した（図 2.6.2-11 及び表 2.6.2-7）。Luminal 型の ER 陽性乳癌は、特に高い感受性を示した。ER 陰性／HER2 陽性乳癌やトリプルネガティブ乳癌と比較して、ER 陽性／HER2 陽性乳癌及び ER 陽性／HER2 陰性乳癌では IC_{50} 値が低い傾向にあった。しかし、ER 陽性と異なり、HER2 陽性単独では統計学的に有意な相関性は認められず、HER2 陽性乳癌における高感受性はしばしば共発現する ER 陽性にも起因すると考えられた。同様に、CCND1 増幅も ER 陽性と共発現する場合に高感受性と相関する傾向にあった。

一方、RB1 のホモ接合性欠失又は CCNE1 増幅を有する乳癌では、アベマシクリブに対する感受性が低下する傾向が認められた。15 種の乳癌細胞株について、Rb リン酸化阻害と細胞増殖阻害［細胞核数又は 5 エチニル 2’デオキシウリジン（EdU）取込み］の相関性を解析した結果、3 つのパラメータは統計学的に有意に相関した（表 2.6.2-8）。したがって、アベマシクリブによる細胞増殖の阻害には、機能を有する Rb の発現が必要であることが確認された。



略語：CNA = コピー数増幅、ER = エストロゲン受容体、HER2 = ヒト上皮成長因子受容体 2 型、IC_{50} = 50%阻害濃度、R = 耐性、S = 高感受性。

46 種のヒト乳癌細胞株をアベマシクリブメシル酸塩存在下で 6 日間培養後、細胞増殖の IC_{50} 値を算出した。IC_{50} 値の幾何平均値の低い高感受性細胞株を左から順に列挙し、各細胞株の遺伝的及び組織学的特徴を Y（有り）又は N（無し）で示す［ER 陽性、HER2 陽性、luminal 型、遺伝子増幅（CCND1、CCND3、CCNE1、CDK6 及び E2F3）、ホモ接合性欠失（CDKN2A、CDKN2B 及び RB1）］。IC_{50} が 10 nM 未満を高感受性（S）、10 nM 以上を耐性（R）とした。［添付資料 4.2.1.1.9、CCGS291 試験］

図 2.6.2-11　乳癌細胞株における増殖阻害に相関する遺伝的及び組織学的特徴

表 2.6.2-7　乳癌細胞株の増殖阻害に相関する遺伝的及び組織学的特徴（統計学的解析）

遺伝的及び組織学的特徴	対応のある t 検定			Fisher 直接確率法		
	幾何平均 IC_{50}（μM）		p 値	高感受性細胞株の割合（%）		p 値
	Y 群	N 群		Y 群	N 群	
ER 陽性	0.0001	0.016	<0.0001	81	33	0.005
HER2 陽性	0.001	0.003	0.506	44	53	0.758
Luminal 型	0.0002	0.039	<0.0001	67	32	0.038
CCND1 コピー数増加	0.00004	0.009	0.0007	75	41	0.091
E2F3 コピー数増加	0.532	0.002	0.113	0	52	0.489
RB1 ホモ接合性欠失	0.863	0.001	0.011	0	55	0.109

略語：ER = エストロゲン受容体、IC_{50} = 50%阻害濃度、HER2 = ヒト上皮成長因子受容体 2 型。

46 種のヒト乳癌細胞株をアベマシクリブメシル酸塩存在下で 6 日間培養後、細胞増殖の IC_{50} 値を算出した。IC_{50} 値の幾何平均値と遺伝的及び組織学的特徴の相関性を、対応のある t 検定及び Fisher 直接確率法によるカテゴリカルデータ解析で検討した。t 検定：Y 群（当該特徴有り）及び N 群（当該特徴無し）における IC_{50} 値の幾何平均値を示す。Fisher 直接確率法：Y 群及び N 群における高感受性株の割合を示す（IC_{50} 値が 10 nM 未満を高感受性とした）。［添付資料 4.2.1.1.9、CCGS291 試験］

表 2.6.2-8　乳癌細胞株における Rb リン酸化と増殖阻害の相関性

評価項目	相関係数	p 値
細胞増殖（核数での評価）　対　pRb	0.839	<0.001
細胞増殖（EdU 取込みでの評価）　対　pRb	0.897	<0.001
細胞増殖（核）　対　細胞増殖（EdU）	0.938	<0.001

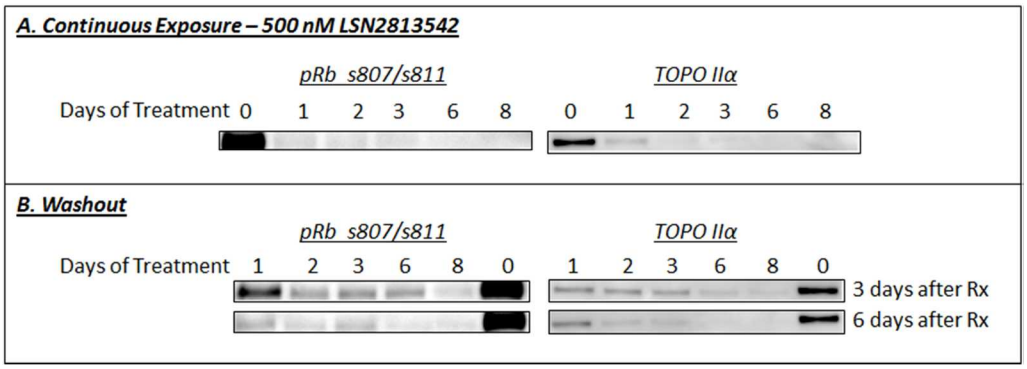
略語：EdU = 5 エチニル 2'デオキシウリジン、IC_{50} = 50%阻害濃度、pRb = リン酸化 Rb。

15 種のヒト乳癌細胞株をアベマシクリブメシル酸塩存在下で 24 時間培養後、pRb（$Ser^{807/811}$）の IC_{50} 値を算出した。また、8 日間培養後、細胞核数又は EdU 取込みに基づき細胞増殖の IC_{50} 値を算出した（n = 2～3）。3 種のパラメータの相関性を検定した。［添付資料 4.2.1.1.9、CCGS291 試験］

2.6.2.2.1.9 乳癌におけるエストロゲン受容体の発現阻害並びに細胞老化及びアポトーシスの誘導

（添付資料 4.2.1.1.10、CCGS304 試験）
（添付資料 4.2.1.1.11、QSB35 試験）

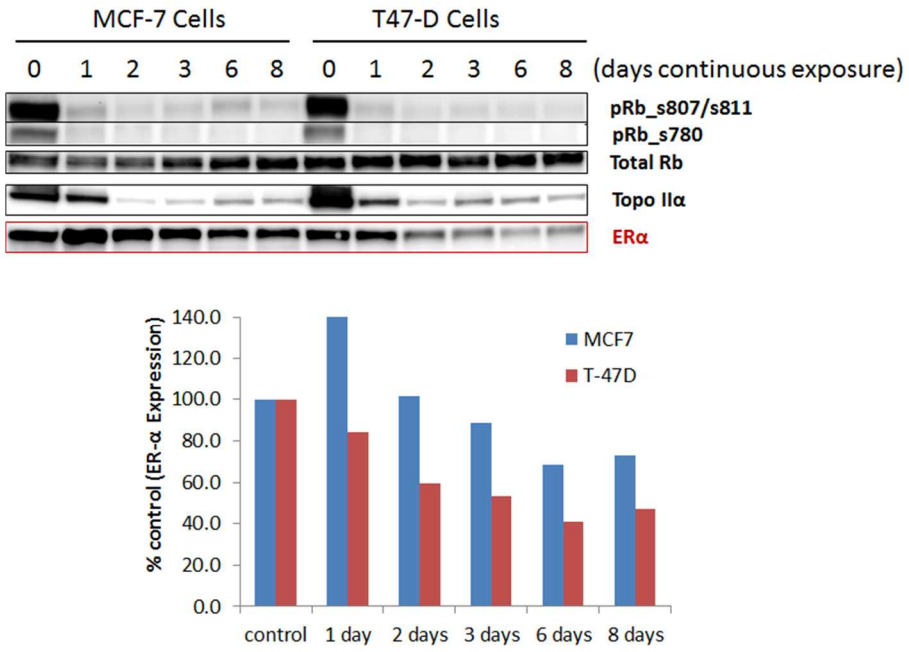
最初に、一定時間の培養後にアベマシクリブを培地から除去するウォッシュアウト試験を実施し、細胞周期及び細胞増殖の阻害の持続性を評価した（CCGS304 試験）。ER 陽性乳癌細胞株 T47-D をアベマシクリブ存在下で培養したとき、培養 1 日後から pRb 及び TopoIIαの発現はほぼ完全に阻害され、8 日間後も阻害作用は持続した（図 2.6.2-12）。pRb 及び TopoIIαの阻害は、アベマシクリブを培地から除去した 3 又は 6 日後においても認められた。阻害作用の持続は培養 1 日後にウォッシュアウトを開始した場合にも認められ、培養時間が長いほどウォッシュアウト後の阻害作用が持続する傾向にあった。以上、アベマシクリブによる Rb リン酸化及び細胞周期の阻害は持続的であることが示された。



略語：pRb = リン酸化 Rb、TopoIIα = トポイソメラーゼ IIα。
ヒト乳癌細胞株 T47-D を 500 nM アベマシクリブメシル酸塩（LSN2813542）存在下で 1～8 日間培養した（A）。その後、30%～40%コンフルエントとなるように再播種してアベマシクリブを含まない培地で更に 3 又は 6 日間培養した（B）。免疫ブロット法でリン酸化 Rb（Ser$^{807/811}$）及び TopoIIαの発現を測定した。［添付資料 4.2.1.1.10、CCGS304 試験］

図 2.6.2-12 T47-D における Rb リン酸化及び細胞周期阻害の持続

ER 陽性乳癌の増殖ドライバーである ERαの発現に対するアベマシクリブの作用を評価した（CCGS304 試験）。ER 陽性乳癌細胞株 MCF-7 及び T47-D において、アベマシクリブは培養 1～8 日後まで pRb 及び TopoIIαの発現を阻害するだけでなく、ERαタンパク質の発現量を経時的に減少させた（図 2.6.2-13）。ERα発現量の減少は MCF-7 よりも T47-D で顕著であった。すなわち、MCF-7 では ERα発現量は培養 1 日後には増加し、明らかな減少は 6 及び 8 日後にのみ認められた（最大で約 30%減少）。一方、T47-D における ERα発現量の減少は 1 日目から認められ、8 日後まで経時的に減少した（最大で約 60%減少）。以上、ER 陽性乳癌の増殖ドライバーである ERαの発現がアベマシクリブにより阻害されることが示された。T47-D においてウォッシュアウト後の細胞周期の再開が認められなかったことを踏まえると（図 2.6.2-12）、T47-D におけるアベマシクリブの細胞周期阻害作用には CDK4/6 の直接的阻害に加えて、ERαシグナルの抑制も関与する可能性が考えられる。



略語：ERα＝エストロゲン受容体α、pRb＝リン酸化 Rb、TopoIIα＝トポイソメラーゼ IIα。
ヒト乳癌細胞株 MCF-7 及び T47-D を 500 nM アベマシクリブメシル酸塩存在下で 1～8 日間培養後、免疫ブロット法で pRb（$Ser^{807/811}$ 又は Ser^{780}）、Rb、TopoIIα及び ERαの発現を測定した。未処置細胞を 100%とした ERαの相対発現量を棒グラフで示す。［添付資料 4.2.1.1.10、CCGS304 試験］

図 2.6.2-13　MCF-7 及び T47-D におけるエストロゲン受容体α発現の阻害

アベマシクリブによる細胞周期の持続的な阻害の機序を明らかにするため、細胞老化（代謝活性を維持するものの、細胞増殖が不可逆的に停止した状態）及びアポトーシスの誘導を検討した。

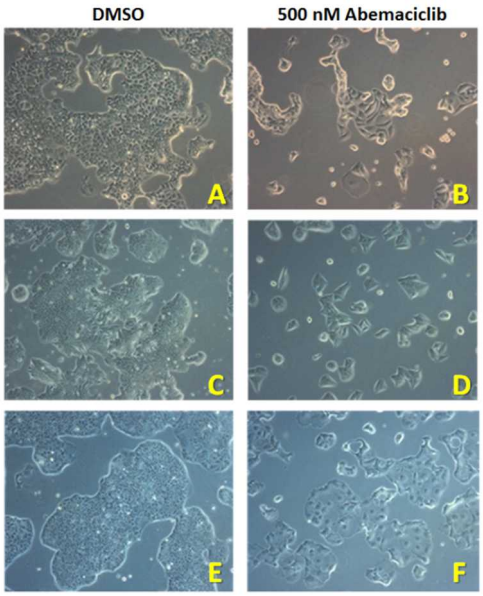
まず、乳癌細胞株を用いて細胞老化マーカーである老化関連β-ガラクトシダーゼ（SA-β-gal）活性を測定した（CCGS304 試験）。ER 陽性かつ Rb 陽性の MCF-7、T47-D 及び ZR-75-1 をアベマシクリブ存在下で 8 日間培養した結果、それぞれ 48%、58%及び 41%の細胞が SA-β-gal 陽性を示した（表 2.6.2-9）。一方、ER 陰性かつ Rb 陰性の MDA-MB-468 では、SA-β-gal 陽性細胞は検出されなかった。したがって、アベマシクリブは乳癌の細胞老化を誘導し、その作用の発現には機能を有する ER 又は Rb（もしくは両者）が必要であることが示唆された。

表 2.6.2-9　乳癌細胞株における SA-β-gal 陽性細胞の増加

細胞株	SA-β-gal 陽性細胞（%）	例数
MCF-7	47.6 ± 8.2	5
T47-D	58.2 ± 5.1	5
ZR-75-1	41.1 ± 10.9	3
MDA-MB-468	0.0	1

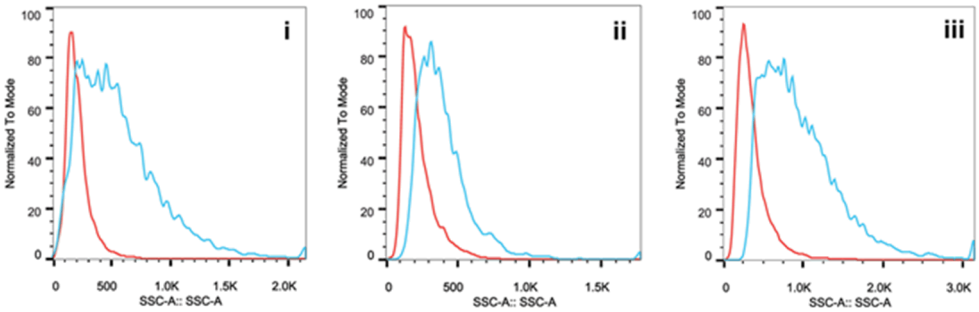
略語：ER＝エストロゲン受容体、SA-β-gal＝老化関連β-ガラクトシダーゼ。
ER 陽性かつ Rb 陽性のヒト乳癌細胞株（MCF-7、T47-D 及び ZR-75-1）及び ER 陰性かつ Rb 陰性のヒト乳癌細胞株（MDA-MB-468）を 500 nM アベマシクリブメシル酸塩存在下で 8 日間培養後、5-dodecanoylaminofluorescein di-β-D-galactopyranoside の SA-β-gal による加水分解で発生する蛍光をフローサイトメトリーで定量した。溶媒対照よりも蛍光強度の強い細胞を SA-β-gal 陽性と判断した。平均値±標準誤差を示す。［添付資料 4.2.1.1.10、CCGS304 試験］

細胞老化の誘導は形態学的にも確認された（QSB35 試験）。すなわち、ER 陽性の MCF-7、MDA-MB-361 及び EFM-19 をアベマシクリブ存在下で培養すると、老化細胞に特徴的な細胞の腫脹、平坦化及び顆粒増加が認められた（図 2.6.2-14）。細胞内顆粒の増加は、フローサイトメトリーにおける側方散乱光の増加によっても示された（図 2.6.2-15）。また、MCF-7 及び EFM-19 では、9 位リジントリメチル化ヒストン H3（HisH3K9met3）の局所的発現により細胞老化特異的ヘテロクロマチン構造（SAHF）が確認された（図 2.6.2-16）。両細胞株における HisH3K9met3 の増加はアベマシクリブの濃度依存的で、500 nM で最大に達した（図 2.6.2-17）。これらの結果から、ER 陽性乳癌においてアベマシクリブは G1 期から S 期への細胞周期の進行を阻害して細胞増殖を抑制するだけでなく、細胞老化を誘導することが示された。



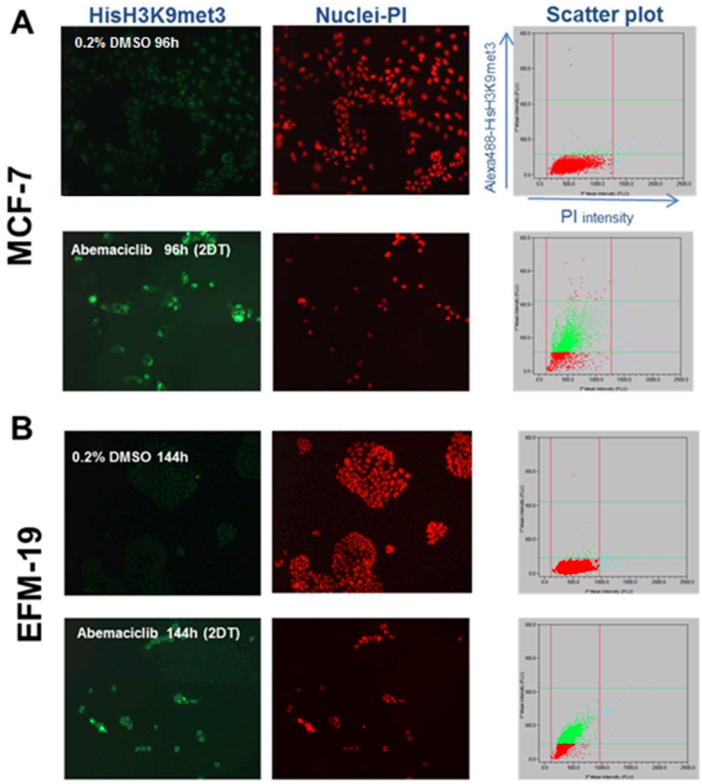
略語：DMSO＝ジメチルスルホキシド。
ER 陽性のヒト乳癌細胞株 MCF-7（A 及び B）、MDA-MB-361（C 及び D）及び EFM-19（E 及び F）を溶媒（0.2% DMSO、A、C 及び E）又は 500 nM アベマシクリブメシル酸塩（B、D 及び F）存在下で倍化時間の 3 倍の時間培養後、明視野顕微鏡で観察した（200 倍）。［添付資料 4.2.1.1.11、QSB35 試験］

図 2.6.2-14　乳癌細胞株における細胞老化に特徴的な形態変化の誘導



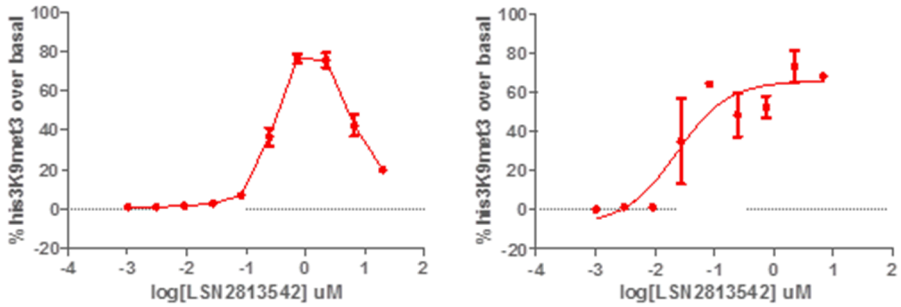
略語：DMSO＝ジメチルスルホキシド、SSC＝側方散乱光。
ER 陽性のヒト乳癌細胞株 MCF-7（i）、MDA-MB-361（ii）及び EFM-19（iii）を溶媒（0.2% DMSO、赤）又は 500 nM アベマシクリブメシル酸塩（青）存在下で倍化時間の 3 倍の時間培養後、フローサイトメトリーで SSC を検出した。［添付資料 4.2.1.1.11、QSB35 試験］

図 2.6.2-15　乳癌細胞株における細胞内顆粒の増加



略語：DMSO＝ジメチルスルホキシド、DT＝倍化時間、HisH3K9met3＝9 位リジントリメチル化ヒストン H3、PI＝ヨウ化プロピジウム。
ER 陽性のヒト乳癌細胞株 MCF-7（A）及び EFM-19（B）を溶媒（0.2% DMSO）又は 2 μM アベマシクリブメシル酸塩存在下で倍化時間の 2 倍の時間培養後、細胞核を PI で、細胞老化特異的ヘテロクロマチン構造を抗 HisH3K9met3 抗体で検出した。代表的な染色像を左に、散布図を右に示す。［添付資料 4.2.1.1.11、QSB35 試験］

図 2.6.2-16　乳癌細胞株における細胞老化特異的ヘテロクロマチン構造の増加

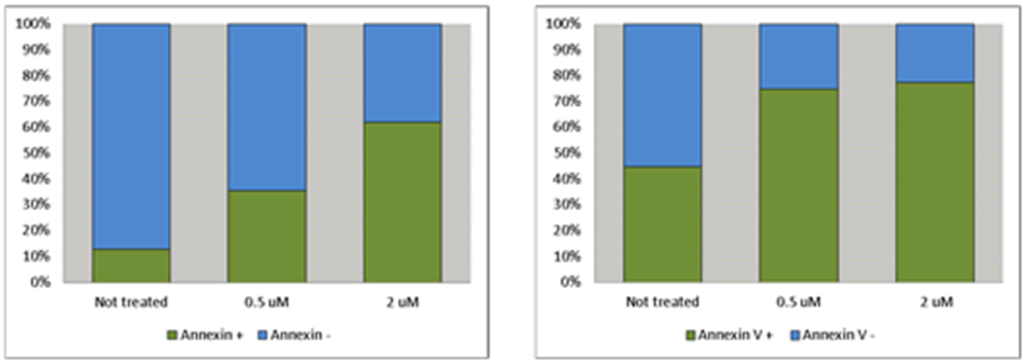


略語：DMSO＝ジメチルスルホキシド、HisH3K9met3＝9 位リジントリメチル化ヒストン H3。
ER 陽性のヒト乳癌細胞株 MCF-7（左）及び EFM-19（右）を溶媒（0.2% DMSO）又はアベマシクリブメシル酸塩（LSN2813542）存在下で倍化時間の 1 倍の時間培養後、細胞老化特異的ヘテロクロマチン構造を抗 HisH3K9met3 抗体で検出した。独立した 2 回の試験で得られた平均値±標準偏差を示す（n＝2）。［添付資料 4.2.1.1.11、QSB35 試験］

図 2.6.2-17　乳癌細胞株における細胞老化特異的ヘテロクロマチン構造の濃度依存的な増加

ER 陽性乳癌細胞株をアベマシクリブ存在下で長時間培養したとき、細胞老化に加えてアポトーシスの誘導も認められた（QSB35 試験）。MCF-7 及び MDA-MB-361 をアベマシクリブ存在下

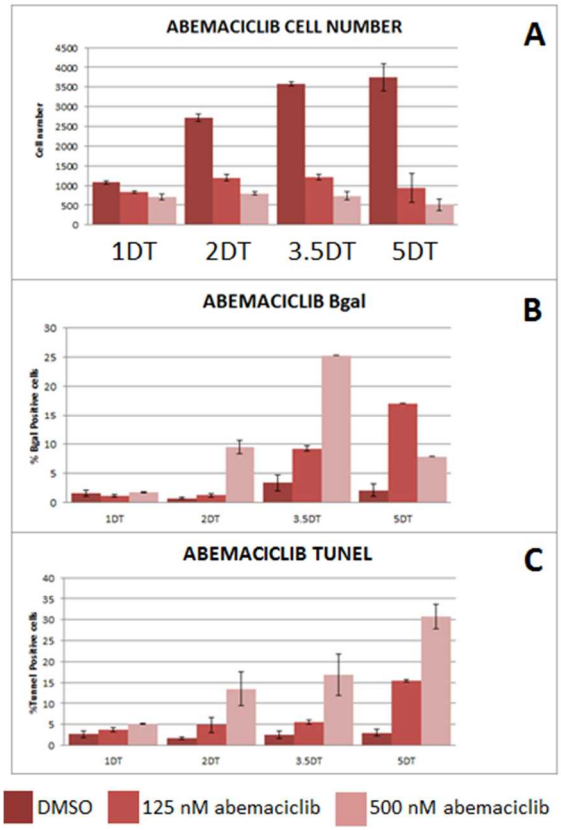
で倍化時間の 3 倍の時間培養した結果、アポトーシスマーカーであるアネキシン V 陽性細胞数が濃度依存的に増加した（図 2.6.2-18）。MCF-7 では、無処置細胞の約 13%がアネキシン V 陽性であったのに対し、0.5 及び 2 μM アベマシクリブによりそれぞれ約 36%及び 62%の細胞が陽性を示した。同様に、MDA-MB-361 では無処置細胞の約 45%に対し、0.5 及び 2 μM アベマシクリブによりそれぞれ約 75%及び 78%の細胞がアネキシン V 陽性を示した。



略語：FITC = フルオレセインイソチオシアネート。
ヒト乳癌細胞株 MCF-7（左図）及び MDA-MB-361（右図）を 0.5 及び 2 μM アベマシクリブメシル酸塩存在下で倍化時間の 3 倍の時間（それぞれ 6 及び 14 日間）培養後、FITC 標識アネキシン V 染色を行いフローサイトメトリーで検出した。アネキシン V 陽性細胞の割合を示す。独立した 3 回の試験の代表例を示す。［添付資料 4.2.1.1.11、QSB35 試験］

図 2.6.2-18 乳癌細胞株におけるアネキシン V 陽性細胞の増加

アベマシクリブによる細胞増殖の阻害と、細胞老化及びアポトーシスの誘導との関連性を明らかにするため、MCF-7 をアベマシクリブ存在下で培養し、3 つのパラメータを経時的に評価した（QSB35 試験）。溶媒対照群では総細胞数が経時的に増加したのに対し、125 及び 500 nM アベマシクリブ群では総細胞数の顕著な増加は認められず、培養を継続することで総細胞数は減少した（図 2.6.2-19）。倍化時間の 1 倍ではアベマシクリブによる顕著なアポトーシスの誘導は認められなかったことから、試験初期に総細胞数が溶媒対照群よりも低値を示したのは細胞増殖の停止が主な要因と考えられる。倍化時間の 2 倍以上では、アベマシクリブの濃度及び培養時間に依存的な細胞老化及びアポトーシスの誘導が認められた。培養の継続により認められた総細胞数の減少は、アポトーシスによる細胞死が原因と考えられる。500 nM アベマシクリブ群において、倍化時間の 5 倍で老化細胞数の割合は減少したが、これはアポトーシス細胞数の割合の増加による相対的な変化と考えられる。これらの結果を踏まえると、乳癌に対するアベマシクリブの作用は時間依存的と考えられる。すなわち、培養初期には細胞周期の阻害により細胞増殖が停止するのに対し、培養を継続することで細胞老化による不可逆的な細胞増殖の停止が誘導され、更に長時間の培養ではアポトーシスが誘導されると考えられる。



略語：DMSO＝ジメチルスルホキシド、DT＝倍化時間、dUTP＝デオキシウリジン 3 リン酸、PI＝ヨウ化プロピジウム、SA-β-gal＝老化関連β-ガラクトシダーゼ、TUNEL＝TdT-mediated dUTP nick end labeling。
ヒト乳癌細胞株 MCF-7 を溶媒（DMSO）又は 125 及び 500 nM アベマシクリブメシル酸塩存在下で倍化時間の 1、2、3.5 及び 5 倍の時間（それぞれ 2、4、7 及び 10 日間）培養後、総細胞数（A）、SA-β-gal 陽性細胞（B）及び TUNEL 陽性細胞（C）を測定した。総細胞数は PI で、SA-β-gal 陽性細胞は抗βガラクトシダーゼ抗体で、TUNEL 陽性細胞は標識 dUTP の取込みで評価した。独立した 2 回の試験で得られた平均値±標準偏差を示す。［添付資料 4.2.1.1.11、QSB35 試験）］

図 2.6.2-19 MCF-7 における経時的な細胞増殖の阻害並びに細胞老化及びアポトーシスの誘導

2.6.2.2.1.10 ヒト代謝物の薬理活性

（添付資料 4.2.1.1.3、CCGS293 試験）

健康被験者に[^{14}C]アベマシクリブを単回経口投与したとき、血漿中には未変化体のほかに代謝物 M2（LSN2839567）、M18（LSN3106729）及び M20（LSN3106726）が定量可能であり（血漿中総曝露量のそれぞれ 13%、5%及び 26%）、また微量代謝物として M1（LSN2878851）及び M22（LSN3233168）が検出された（CTD 第 2.7.2.2.2.1.1 項）。これらの代謝物はいずれも酸化体であり、また M2 及び M20 は総放射能曝露量の 10%を超える主代謝物である。M2、M18、M20 及び M22 について、in vitro 試験で各種薬理活性の有無を評価した。

各種 CDK－サイクリン複合体に対する代謝物の選択性を無細胞系で評価した（表 2.6.2-10）。その結果、M2、M18 及び M20 の CDK4－サイクリン D1 及び CDK6－サイクリン D1 に対する IC_{50} 値はアベマシクリブと同程度であったが、M22 の CDK4－サイクリン D1 及び CDK6－サイクリン D1 に対する IC_{50} 値はアベマシクリブの 200 倍以上であった。アベマシクリブと同様に、いずれの代謝物も CDK1－サイクリン B1 に対する阻害作用は弱く、CDK4－サイクリン D1 に対する IC_{50} 値との比はアベマシクリブで 589 倍、M2、M18 及び M20 で 484～658 倍であった。ま

た、アベマシクリブ及び代謝物は CDK9－サイクリン T1 を阻害し、CDK4－サイクリン D1 に対する IC_{50} 値との比はアベマシクリブで 22 倍、M2、M18 及び M20 で 8～14 倍であった。

表 2.6.2-10 CDK－サイクリン複合体のキナーゼ活性の阻害

CDK－サイクリン複合体 IC_{50}（nM）	アベマシクリブ	M2	M18	M20	M22
CDK4－サイクリン D1	1.6 ± 0.6 (n=10)	1.2 ± 0.4 (n=7)	1.5 ± 0.2 (n=3)	1.5 ± 0.2 (n=2)	425 ± 91 (n=3)
CDK6－サイクリン D1	2.0 ± 1.8 (n=5)	1.3 ± 0.3 (n=4)	2.7 ± 0.8 (n=4)	1.9 ± 0.5 (n=4)	557 ± 241 (n=3)
CDK1－サイクリン B1	925 ± 647 (n=13)	816 ± 447 (n=7)	706 ± 152 (n=4)	869 ± 340 (n=4)	>20000 (n=4)
CDK9－サイクリン T1	35 ± 29 (n=7)	10 ± 1.6 (n=3)	16 ± 1.7 (n=3)	22 ± 5.3 (n=3)	2012 ± 1112 (n=3)

略語：ADP = アデノシン二リン酸、ATP = アデノシン三リン酸、CTD = RNA ポリメラーゼ II C 末端反復ドメイン、IC_{50} = 50%阻害濃度。
CDK1、CDK4 及び CDK6 の各基質［CDK1：ヒストン H1、CDK4 及び CDK6：Rb C 末端フラグメント（773～928 アミノ酸）］のリン酸化を ^{33}P 標識 ATP の filter binding 法で検出した。CDK9 のキナーゼ活性は、CTD のリン酸化で生成される ADP を特異的抗体で検出して評価した。ATP 濃度は 20 μM（CDK1）、40 μM（CDK4）、100 μM（CDK6）及び 50 μM（CDK9）とした。被験物質はいずれもメシル酸塩。平均値±標準偏差を示す。［添付資料 4.2.1.1.3、CCGS293 試験］

非小細胞肺癌細胞株 A549 及び結腸直腸癌 Colo205 細胞株において、アベマシクリブ、M2、M18、M20 及び M22 は細胞増殖を濃度依存的に阻害した（表 2.6.2-11）。M20 はアベマシクリブと同程度の IC_{50} 値を示した一方、M2 及び M18 の IC_{50} 値はアベマシクリブの約 2～7 倍であり、M22 の IC_{50} 値はアベマシクリブの約 18～19 倍であった。CDK4/6 阻害作用（表 2.6.2-10）と細胞増殖阻害作用（表 2.6.2-11）の結果は一致し、M2、M18 及び M20 はアベマシクリブと同程度の効力を示すのに対し、M22 の効力は低いことが示された。

表 2.6.2-11 A549 及び Colo205 における代謝物による細胞増殖の阻害

IC_{50}（μM）	アベマシクリブ	M2	M18	M20	M22
A549	0.45 ± 0.09	1.18 ± 0.19	3.23 ± 0.09	0.49 ± 0.03	8.71 ± 0.23
Colo205	0.21 ± 0.03	0.42 ± 0.07	0.65 ± 0.14	0.21 ± 0.10	3.84 ± 0.47

略語：IC_{50} = 50%阻害濃度。
ヒト非小細胞肺癌細胞株 A549 及びヒト結腸直腸癌 Colo205 細胞株をアベマシクリブ、M2、M18、M20 及び M22（いずれもメシル酸塩）存在下で 4 日間培養後、細胞数を測定した。独立した 2 回の試験で得られた平均値±標準偏差を示す（n = 2）。［添付資料 4.2.1.1.3、CCGS293 試験］

さらに、M2 及び M20 の細胞増殖阻害作用を 8 種の乳癌細胞株（MDA-MB-175、MDA-MB-453、ZR-75-1、T47-D、UACC-812、UACC-893、MCF-7 及び BT-474）を用いて評価した（表 2.6.2-12）。その結果、いずれの細胞株においても M20 はアベマシクリブと同程度の IC_{50} 値を示した。一方、M2 は 8 種中 5 種の細胞株で同程度の IC_{50} 値を示したものの、UACC-812、UACC-893 及び MCF-7 における IC_{50} 値はアベマシクリブの 2～4 倍であった。

表 2.6.2-12 乳癌細胞株における代謝物による細胞増殖の阻害

IC_{50}（nM）	アベマシクリブ	M2	M20
MDA-MB-175	15.4	14.5	10.8
MDA-MB-453	17.2	16.7	13.0
ZR-75-1	29.9	44.6	30.5
T47-D	30.9	28.6	22.6
UACC-812	44.3	190.3	66.8
UACC-893	47.2	88.7	41.8
MCF-7	62.8	244.1	133.6
BT-474	143.9	155.6	135.2

略語：EdU = 5 エチニル 2'デオキシウリジン、IC_{50} = 50%阻害濃度。
ヒト乳癌細胞株をアベマシクリブ、M2 及び M20（いずれもメシル酸塩）存在下で 6 日間培養後、EdU 取込みから細胞増殖の IC_{50} 値を算出した（n = 1）。［添付資料 4.2.1.1.3、CCGS293 試験］

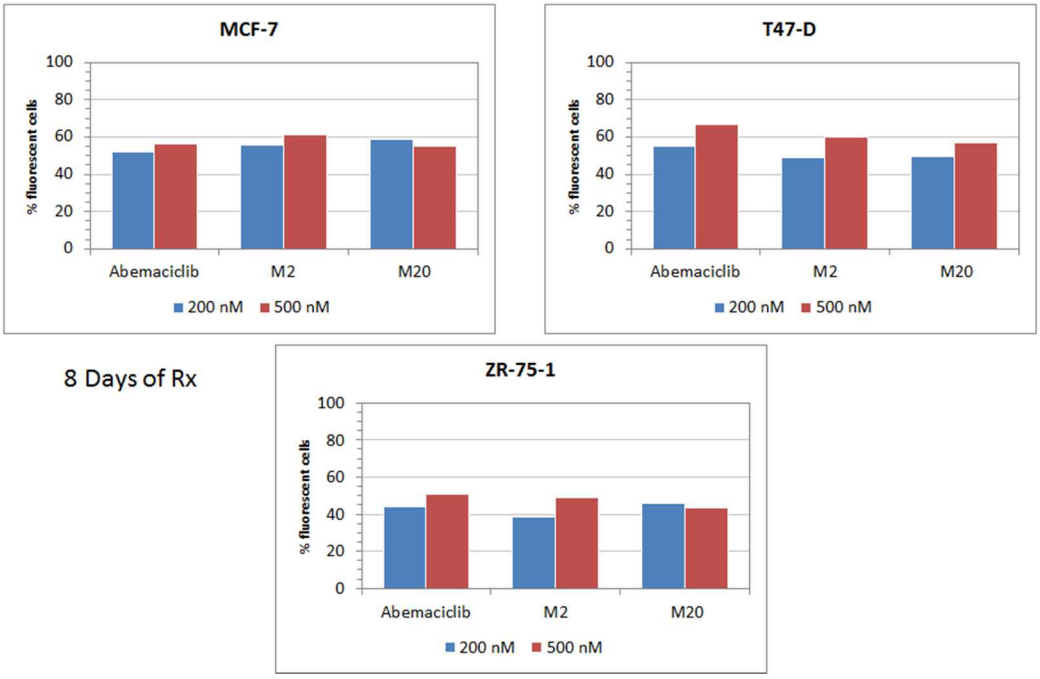
細胞周期の阻害能を評価するため、非小細胞肺癌細胞株 A549 及び結腸直腸癌細胞株 Colo205 をアベマシクリブ、M2、M18、M20 又は M22 存在下で 24 時間培養し、pRb 及び細胞周期マーカーの発現を評価した（表 2.6.2-13）。その結果、アベマシクリブと同様に M2、M18 及び M20 は濃度依存的に pRb、TopoIIα及び pHH3 の発現を阻害した。M20 はアベマシクリブと同程度の IC_{50} 値で pRb を阻害し、M2 及び M18 が次いで高い阻害作用を示した。TopoIIα及び pHH3 に関しても代謝物間の効力比は pRb と同様であり、また細胞株で阻害作用の傾向に違いは認められなかった（M20 > M2 > M18）。M22 は pRb 及び細胞周期マーカーを阻害しなかったため、M22 による細胞増殖阻害（表 2.6.2-11）は CDK4/6 阻害を介した作用ではないと考えられた。無細胞系において M2、M18 及び M20 は CDK9 のキナーゼ活性を阻害したが（表 2.6.2-10）、A549 及び Colo205 において pCTD 及び MCL1 の阻害は 20 μM でも認められなかった。したがって、アベマシクリブと同様に、M2、M18 及び M20 による細胞周期の阻害に CDK9 は関与しないことが示唆された。

表 2.6.2-13 A549 及び Colo205 における代謝物による Rb リン酸化及び細胞周期の阻害

IC_{50}（μM）	アベマシクリブ	M2	M18	M20	M22
A549					
pRb	0.151	0.235	2.003	0.091	>20
TopoIIα	0.047	0.223	0.934	0.082	>20
pHH3	0.043	0.228	0.873	0.043	>20
pCTD	>20	>20	>20	>20	>20
MCL1	>20	>20	>20	>20	>20
Colo205					
pRb	0.180	0.171	0.290	0.107	>20
TopoIIα	0.030	0.052	0.081	<0.027	1.708
pHH3	<0.027	0.082	0.032	<0.027	0.145
pCTD	>20	>20	>20	>20	>20
MCL1	>20	>20	>20	>20	>20

略語：IC_{50} = 50%阻害濃度、MCL1 = myeloid cell leukemia-1、pCTD = リン酸化 RNA ポリメラーゼ II C 末端反復ドメイン、pHH3 = リン酸化ヒストン H3、pRb = リン酸化 Rb、TopoIIα = トポイソメラーゼ IIα。
ヒト非小細胞肺癌細胞株 A549 及びヒト結腸直腸癌細胞株 Colo205 をアベマシクリブ、M2、M18、M20 又は M22（いずれもメシル酸塩）存在下で 24 時間培養後、免疫ブロット法で pRb（Ser^{780}）、TopoIIα、pHH3（Ser^{10}）、pCTD（Ser^{2}）及び MCL1 の発現を測定し、IC_{50} 値を算出した（n = 1）。［添付資料 4.2.1.1.3、CCGS293 試験］

ER 陽性かつ Rb 陽性の乳癌細胞株 MCF-7、T47-D 及び ZR-75-1 を M2 又は M20 存在下で 8 日間培養し、SA-β-gal 陽性細胞数を指標に細胞老化の誘導を評価した（図 2.6.2-20）。その結果、いずれの細胞株においても、M2 及び M20 はアベマシクリブと同程度の細胞老化誘導作用を示した。



略語：SA-β-gal = 老化関連β-ガラクトシダーゼ。
ER 陽性かつ Rb 陽性のヒト乳癌細胞株 MCF-7、T47-D 及び ZR-75-1 をアベマシクリブ、M2 又は M20（いずれもメシル酸塩）存在下で 8 日間培養後、5-dodecanoylaminofluorescein di-β-D-galactopyranoside の SA-β-gal による加水分解で生じる蛍光をフローサイトメトリーで定量した。溶媒対照よりも蛍光強度の強い細胞を SA-β-gal 陽性と判定した。［添付資料 4.2.1.1.3、CCGS293 試験］

図 2.6.2-20 乳癌細胞株における SA-β-gal 陽性細胞の増加

代謝物に関する一連の in vitro 試験成績を総合すると、ヒト主代謝物である M2 及び M20 はアベマシクリブと同程度の CDK4/6 阻害作用を有し、乳癌細胞株においてアベマシクリブと同程度の効力で細胞周期の阻害、細胞増殖の阻害及び細胞老化の誘導を示すと考えられた。

2.6.2.2.1.11 細胞代謝の阻害

（添付資料 4.2.1.1.11、QSB35 試験）

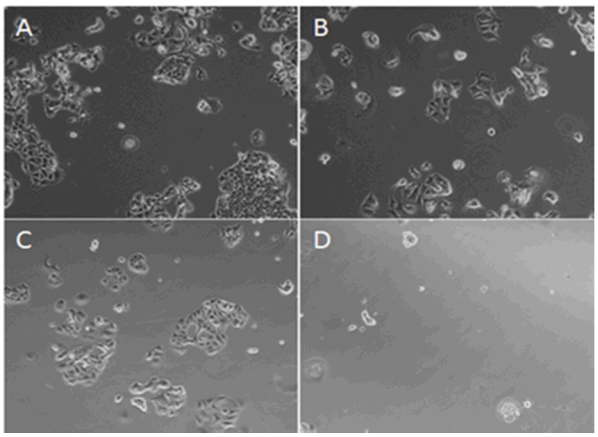
Rb は細胞周期のみならず、細胞増殖に必要なグルタミンなどのエネルギー代謝の制御にも関与する。Rb は Na 依存性中性アミノ酸トランスポーター（ASCT）2 を介したグルタミンの細胞内取込みを E2F 依存的に抑制するほか、γ–グルタミルシステイン合成酵素（GCLC）を介したグルタチオン合成や、ミトコンドリアでのグルタミナーゼ 1（GLS1）を介したグルタミン酸への変換を抑制することで、細胞内でのグルタミン利用を抑制することが報告されている（Reynolds et al 2014）。

乳癌細胞株 MCF-7 を用い、グルタミン依存的な細胞の増殖及び生存に対するアベマシクリブの影響を評価した（QSB35 試験）。アベマシクリブ含有完全培地又はアベマシクリブ非含有グル

タミン欠乏培地で培養した結果、MCF-7 の増殖は阻害された。さらに、アベマシクリブ含有グルタミン欠乏培地では細胞数が顕著に減少し、細胞死の誘導が示された（図 2.6.2-21）。

アベマシクリブが細胞代謝に影響を与える可能性が示されたため、トリカルボン酸（TCA）サイクル中間代謝物の変化を評価した（表 2.6.2-14）。MCF-7 を 500 nM アベマシクリブ存在下で 6 日間培養したとき、TCA サイクル中間代謝物のα-ケトグルタル酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸及びコハク酸の細胞内濃度は溶媒対照群と比較してそれぞれ 87%、88%、78%、70%及び 65%減少した。α-ケトグルタル酸について濃度依存性を検討した結果、2、4 及び 6 日間培養時の EC_{50} 値はそれぞれ 370、280 及び 730 nM であった。

これらの結果から、乳癌においてアベマシクリブはグルタミンなどのアミノ酸やグルコースをエネルギー源として利用するために必要な TCA サイクル中間代謝物を減少させ、栄養欠乏下での細胞の生存を阻害すると考えられた。



ヒト乳癌細胞株 MCF-7 を完全培地（A）、500 nM アベマシクリブメシル酸塩を含む完全培地（B）、グルタミン欠乏培地（C）、500 nM アベマシクリブメシル酸塩を含むグルタミン欠乏培地（D）で培養し、明視野顕微鏡で観察した（200 倍）。［添付資料 4.2.1.1.11、QSB35 試験］

図 2.6.2-21 グルタミン欠乏培地で培養した MCF-7 における細胞増殖の阻害

表 2.6.2-14 MCF-7 における TCA サイクル中間代謝物の細胞内濃度の減少

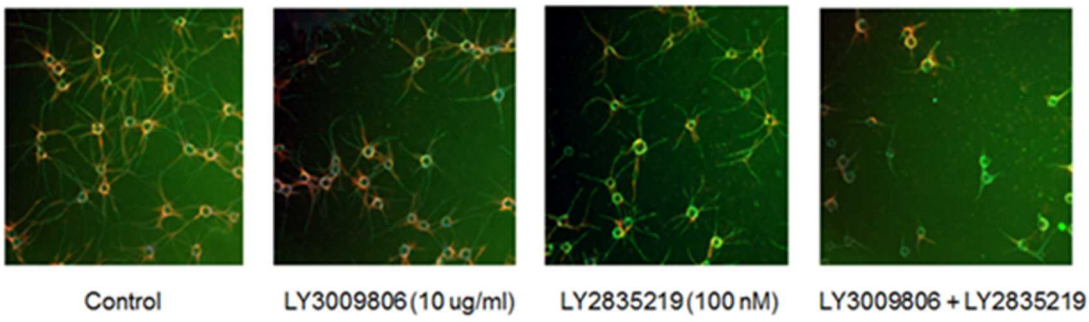
TCA 中間代謝物	溶媒対照	500 nM アベマシクリブ	2 μM アベマシクリブ
アスパラギン酸	1 ± 0.12	0.72 ± 0.10	0.47 ± 0.13
グルタミン酸	1 ± 0.07	0.71 ± 0.06	1.10 ± 0.38
クエン酸	1 ± 0.28	1.20 ± 0.27	1.07 ± 0.30
イソクエン酸	1 ± 0.33	1.90 ± 0.65	0.81 ± 0.52
α–ケトグルタル酸	1 ± 0.07	0.13 ± 0.03	0.08 ± 0.02
コハク酸	1 ± 0.12	0.35 ± 0.08	0.65 ± 0.23
フマル酸	1 ± 0.13	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.07
リンゴ酸	1 ± 0.12	0.22 ± 0.01	0.09 ± 0.03
乳酸	1 ± 0.15	0.30 ± 0.02	0.38 ± 0.15
ピルビン酸	1 ± 0.15	1.22 ± 0.64	3.59 ± 1.65

略語：DMSO = ジメチルスルホキシド、TCA = トリカルボン酸。
ヒト乳癌細胞株 MCF-7 を溶媒（DMSO）又はアベマシクリブメシル酸塩存在下で倍化時間の 3 倍の時間（6 日間）培養後、TCA 中間代謝物の細胞溶解液中濃度を定量した。溶媒対照群を 1 とした比を示す（平均値±標準偏差、n = 3）。［添付資料 4.2.1.1.11、QSB35 試験］

2.6.2.2.1.12 腫瘍血管新生の阻害

（添付資料 4.2.1.1.12、IMC38 試験）

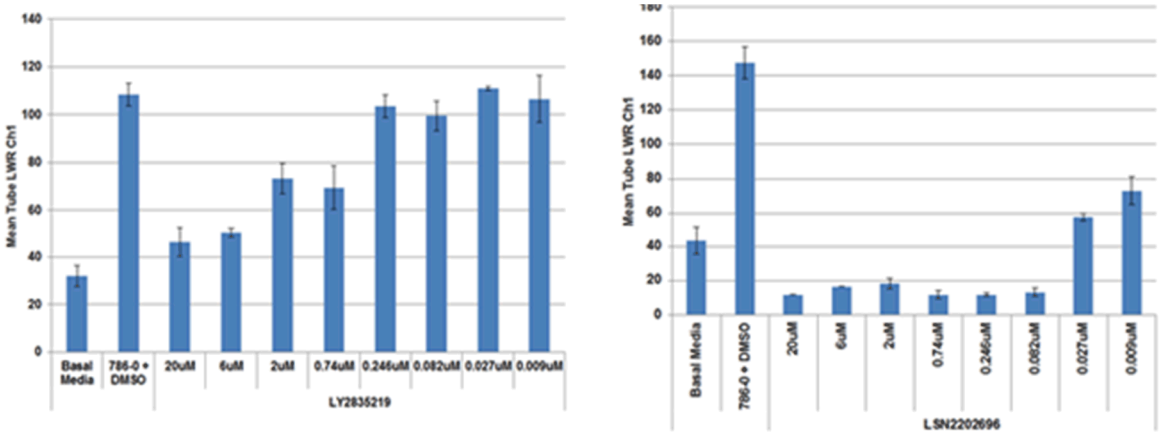
アベマシクリブの血管新生阻害作用を 2 種の in vitro 試験系で評価した。ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）及び癌関連線維芽細胞（CAF）を共培養する血管新生アッセイでは、平滑筋アクチン陽性細胞で覆われた内皮細胞の発芽が誘導され、培養 2 週間で内皮細胞の血管様ネットワークが形成される。CAF 由来の血管内皮増殖因子（VEGF）-A は、培養 7～10 日間で生じる内皮細胞の発芽に寄与するが、それ以降の発芽の伸長及び安定化にはほとんど寄与しないとされている。本アッセイにおいて、アベマシクリブ又は抗 VEGF 受容体 2 モノクローナル抗体（ラムシルマブ）は内皮細胞の発芽を顕著に阻害した（図 2.6.2-22）。単位ビーズあたりの発芽長は、アベマシクリブ及びラムシルマブにより溶媒対照群のそれぞれ 0.55 倍及び 0.56 倍に減少し、統計学的に有意であった（p = 0.0231 及び 0.0235、Dunnett 検定）。アベマシクリブとラムシルマブの併用による阻害作用は各単薬と比較して増強し、その発芽長は溶媒対照群の 0.34 倍と統計学的に有意に減少した（p = 0.0026）。以上、アベマシクリブは内皮細胞の発芽を阻害し、ラムシルマブとの併用により作用の増強が認められた。



略語：CAF = 癌関連線維芽細胞、HUVEC = ヒト臍帯静脈内皮細胞、VEGF = 血管内皮増殖因子。
HUVEC を固定化したビーズと CAF をフィブリンゲル中で共培養し、平滑筋アクチン陽性細胞で覆われた内皮細胞の発芽を誘導した。共培養開始から 14 日間、100 nM アベマシクリブメシル酸塩（LY2835219）又は 10 μg/mL 抗 VEGF 受容体 2 モノクローナル抗体（LY3009806、ラムシルマブ）存在下で培養後、内皮細胞を抗ヒト CD31 抗体で（緑）、平滑筋アクチン陽性細胞を抗平滑筋アクチンα抗体（黄色）で染色した。独立した 3 回の試験の代表例を示す。［添付資料 4.2.1.1.12、IMC38 試験］

図 2.6.2-22 In vitro 血管新生アッセイにおける内皮細胞の発芽の阻害

腎臓癌 786-0 を内皮コロニー形成細胞及び脂肪由来幹細胞と共培養する腫瘍誘導性血管新生アッセイでは、VEGF-A などの癌細胞由来の血管新生因子によって平滑筋アクチン陽性細胞で覆われた内皮細胞の毛細血管様構造が形成される。本アッセイにおいて、陽性対照である VEGF 受容体阻害剤（スニチニブ）は、0.009 μM 以上の濃度で毛細血管様構造の形成をほぼ完全に阻害した（図 2.6.2-23）。同様に、アベマシクリブは毛細血管様構造の形成を濃度依存的に阻害し、このときフィーダー細胞に対する毒性は示さなかった。以上、アベマシクリブは腫瘍誘導性の血管新生を阻害することが示された。



略語：DMSO＝ジメチルスルホキシド、LWR＝幅長比。
ヒト腎臓癌 786-0 を内皮コロニー形成細胞及び脂肪由来幹細胞と共培養し、平滑筋アクチン陽性細胞で覆われた内皮細胞の毛細血管様構造を形成させた。アベマシクリブメシル酸塩（左図）又はスニチニブ（右図）存在下で 3 日間培養後、内皮細胞を抗ヒト CD31 抗体で、平滑筋アクチン陽性細胞を抗平滑筋アクチンα抗体で、細胞核を Hoechst 33342 で染色した。毛細血管様構造の LWR を示す。独立した 3 回の試験で得られた平均値±標準偏差を示す。［添付資料 4.2.1.1.12、IMC38 試験］

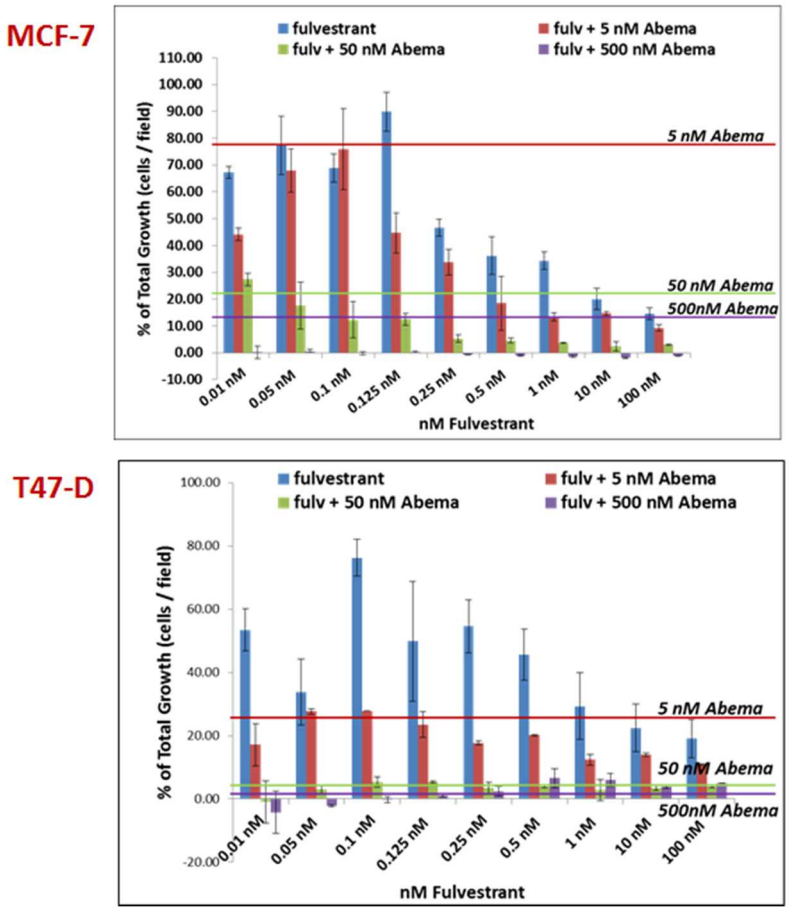
図 2.6.2-23　In vitro 腫瘍誘導性血管新生アッセイにおける毛細血管様構造形成の阻害

2.6.2.2.1.13　内分泌療法との併用による細胞周期及び細胞増殖の阻害

（添付資料 4.2.1.1.13、CCGS320 試験）

アベマシクリブとフルベストラントを併用したときの ER 陽性乳癌に対する作用を明らかにするため、細胞増殖阻害作用を評価したほか、ERαタンパク質の発現、ERα標的遺伝子の発現及び E2F 依存的な細胞周期関連遺伝子の発現に対する影響を評価した。

ER 陽性乳癌細胞株 MCF-7 及び T47-D をアベマシクリブ又はフルベストラント存在下で 6 日間培養したとき、両細胞株で濃度依存的な細胞増殖の阻害が認められた（図 2.6.2-24）。MCF-7 では、アベマシクリブ 50 nM 以上又はフルベストラント 10 nM 以上で顕著な細胞増殖の阻害作用が認められた（80%以上の阻害）。T47-D では、アベマシクリブ 5 nM 以上又はフルベストラント 100 nM 以上で顕著な細胞増殖の阻害が認められた。各単薬と比較して、アベマシクリブとフルベストラントの併用により増殖阻害作用は増強した。すなわち、MCF-7 ではアベマシクリブ 5、50 又は 500 nM に 0.125 nM 以上のフルベストラントを併用したとき阻害の増強が認められ、併用効果は両薬の濃度依存的であった。T47-D では、アベマシクリブの作用が低濃度から顕著であったため、アベマシクリブ 5 nM にフルベストラントを併用したときのみ阻害の増強が認められた。



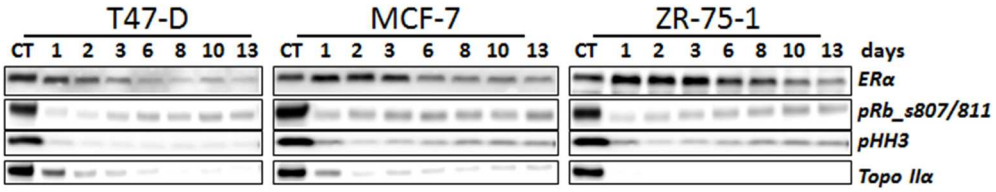
略語：DMSO＝ジメチルスルホキシド。
ヒト乳癌細胞株 MCF-7 及び T47-D を 5～500 nM アベマシクリブメシル酸塩、0.01～100 nM フルベストラント又は両薬の存在下で 6 日間培養後、細胞核を Hoechst 33342 で染色して細胞数を測定した。溶媒（DMSO）対照と比較した視野あたりの細胞増殖率の平均値±標準誤差を示す。アベマシクリブ単薬存在下における細胞増殖率を横線で示す。［添付資料 4.2.1.1.13、CCGS320 試験］

図 2.6.2-24　MCF-7 及び T47-D における細胞増殖の阻害（フルベストラントとの併用）

フルベストラントは ERαに結合して分解を促進することで、エストロゲン応答性遺伝子の発現を阻害し、乳癌細胞の増殖を阻害する。一方、アベマシクリブは CDK4/6 を介して E2F 依存的な細胞周期関連遺伝子の発現を阻害し、乳癌細胞の増殖を阻害する。アベマシクリブとフルベストラントとの併用による細胞増殖阻害作用の増強の機序を明らかにするため、ERαタンパク質の発現、エストロゲン応答性の ERα標的遺伝子並びに細胞周期関連遺伝子の発現に対する影響を評価した。

ER 陽性乳癌細胞株 T47-D、MCF-7 及び ZR-75-1 をアベマシクリブ存在下で培養したとき ERα発現量は経時的に減少し（図 2.6.2-25）、CTD 第 2.6.2.2.1.9 項で示した結果が再現された。ERα発現量の減少は T47-D で最も顕著であった。すべての細胞株において、pRb 及び細胞周期マーカー（TopoIIα及び pHH3）の発現量は培養初日から 13 日後までほぼ完全に阻害され、試験期間を通した細胞周期の G1 期停止が示された。一方、ERα発現量の減少は培養初日には認められず、細胞株によって 3～6 日後から認められた。したがって、アベマシクリブによる ERα発現量の減

少は細胞周期の阻害とは異なる機序を介しており、また長期間細胞周期が停止することで誘導されると考えられた。

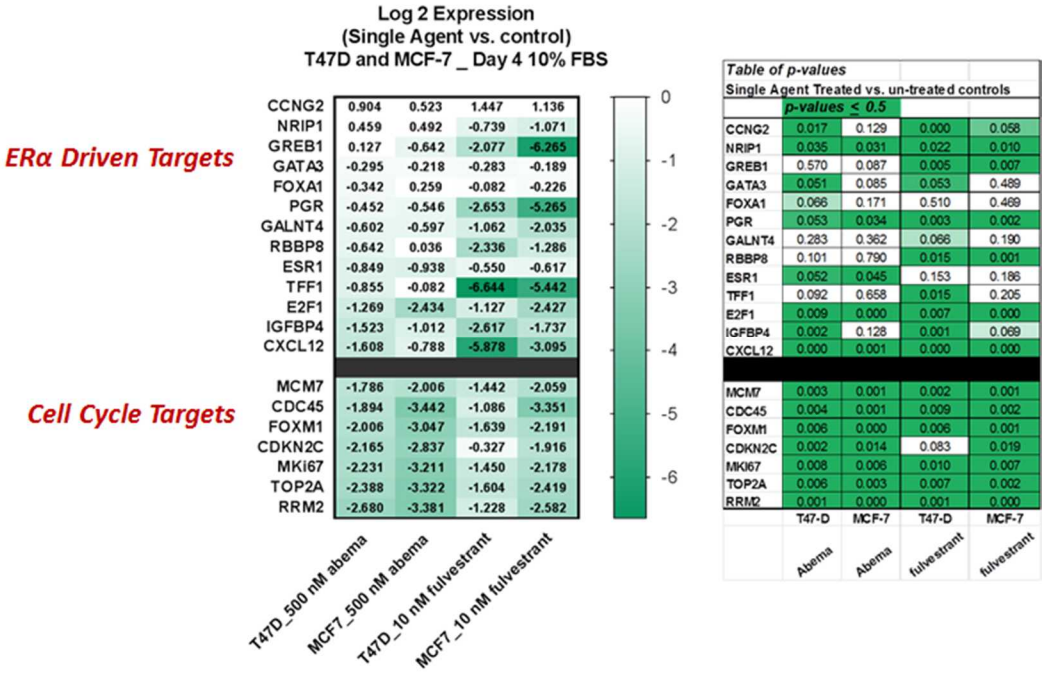


略語：CT＝未処置対照、ERα＝エストロゲン受容体α、pHH3＝リン酸化ヒストン H3、pRb＝リン酸化 Rb、TopoIIα＝トポイソメラーゼ IIα。
ER 陽性のヒト乳癌細胞株 T47-D、MCF-7 及び ZR-75-1 を 500 nM アベマシクリブメシル酸塩存在下で 1～13 日間培養後、免疫ブロット法で表記タンパク質の発現を測定した。［添付資料 4.2.1.1.13、CCGS320 試験］

図 2.6.2-25　T47-D、MCF-7 及び ZR-75-1 におけるエストロゲン受容体α発現の阻害

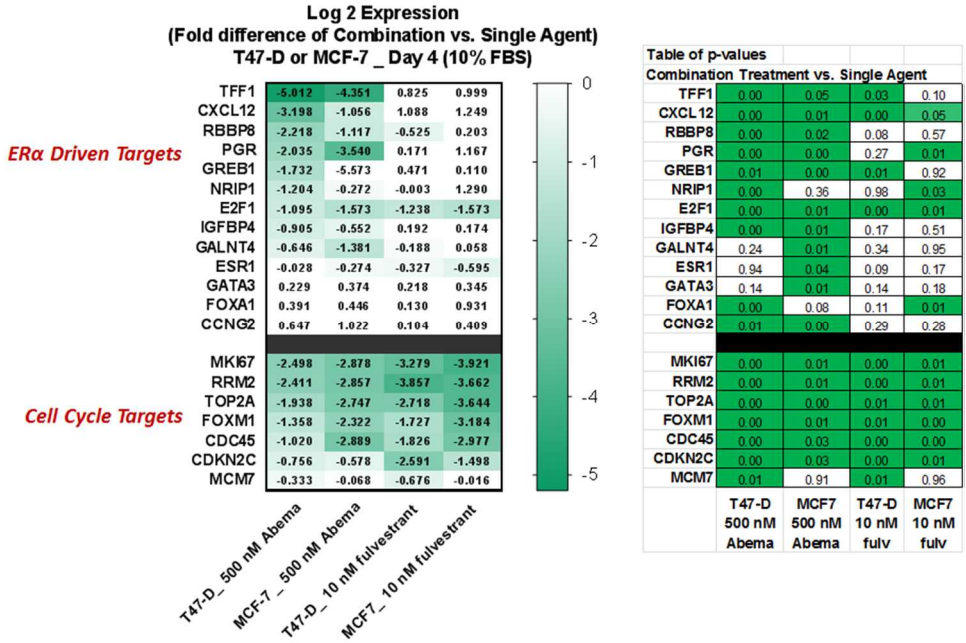
ERα発現量の減少が下流の遺伝子発現に与える影響を明らかにするため、ERα標的遺伝子の発現に対するアベマシクリブの作用を評価した。T47-D 及び MCF-7 において、フルベストラントは検討したほぼすべての ERα標的遺伝子の mRNA 発現を 1/2～1/100 倍の範囲で減少させ、細胞株間で mRNA 発現プロファイルの明らかな差は認められなかった（図 2.6.2-26）。両細胞株において、アベマシクリブは ERα標的遺伝子の mRNA 発現を阻害したが、阻害の程度はフルベストラントよりも低かった。アベマシクリブにより ERαをコードする ESR1 mRNA の発現が阻害されたことから、アベマシクリブによる ERα発現量の減少には ESR1 の発現抑制が関与することが示された。また、アベマシクリブは E2F 依存的な細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現を顕著に阻害し（図 2.6.2-26）、CTD 第 2.6.2.2.1.6 項で示した結果が再現された。細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現はフルベストラントによっても阻害されたことから、フルベストラントによる細胞周期停止に E2F 依存的な経路の抑制が関与することが示唆された。

各単薬と比較して、アベマシクリブとフルベストラントの併用により細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現の阻害作用が顕著に増強した（図 2.6.2-27）。ERα標的遺伝子の mRNA 発現の阻害作用は、アベマシクリブと比較して併用群で増強したが、フルベストラントと比較した場合は阻害作用の増強はわずかであった（図 2.6.2-27）。したがって、アベマシクリブとフルベストラントの併用による細胞増殖阻害作用の増強には、ERα標的遺伝子よりも細胞周期関連遺伝子の阻害作用の増強が強く関与していると考えられた。



略語：ERα＝エストロゲン受容体α。
ヒト乳癌細胞株 T47-D 及び MCF-7 を 500 nM アベマシクリブメシル酸塩又は 10 nM フルベストラント存在下で 4 日間培養後、ERα及び細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現量を測定した。左図に溶媒対照群と比較した発現比の平均値を log2 スケールで示し、右図に p 値を示す（独立した 2 回の試験、n＝4）。［添付資料 4.2.1.1.13、CCGS320 試験］

図 2.6.2-26　ER 陽性乳癌における遺伝子発現の阻害（溶媒対照群との比較）

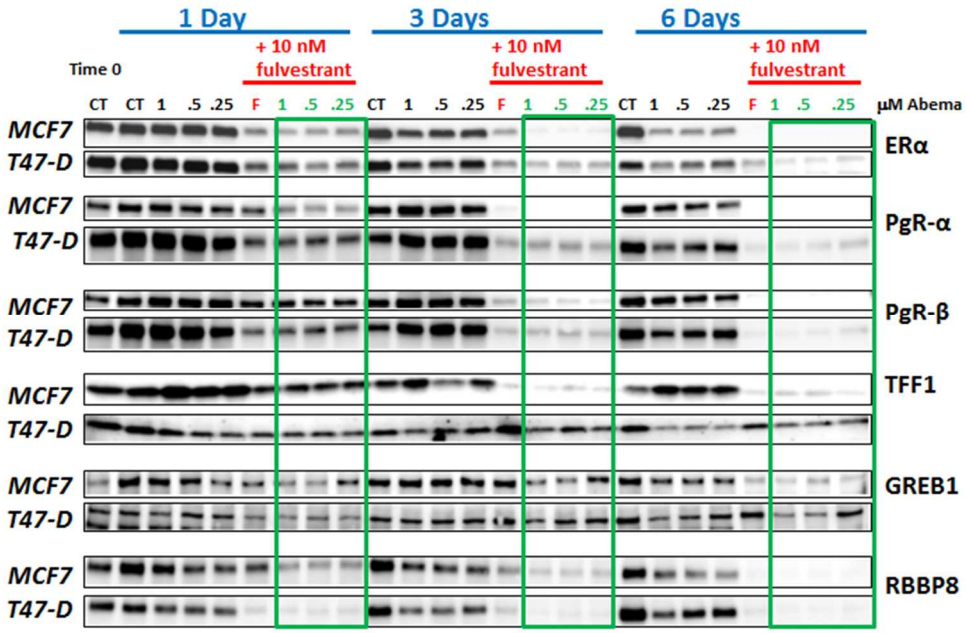


略語：ERα＝エストロゲン受容体α。
ヒト乳癌細胞株 T47-D 及び MCF-7 を 500 nM アベマシクリブメシル酸塩及び 10 nM フルベストラントの併用下で 4 日間培養後、ERα及び細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現を測定した。左図に各単薬群と比較した発現比の平均値を log2 スケールで示し、右図に p 値を示す（独立した 2 回の試験、n＝4）。［添付資料 4.2.1.1.13、CCGS320 試験］

図 2.6.2-27　ER 陽性乳癌における遺伝子発現の阻害（単薬群との比較）

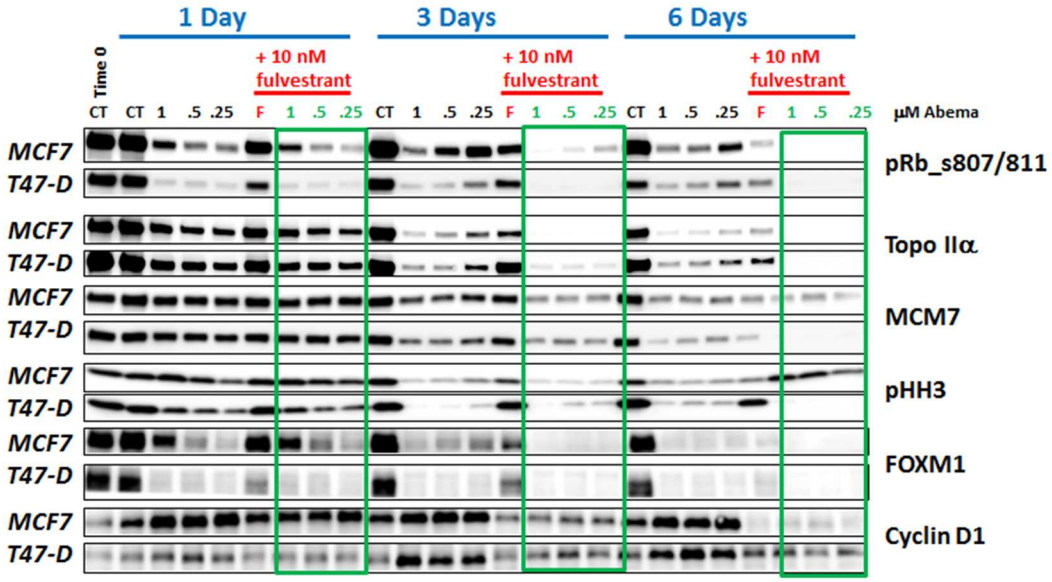
ERα標的遺伝子及び細胞周期関連遺伝子のタンパク質発現量の変化を免疫ブロット法で測定した結果、mRNA 発現量の変化と類似した結果が得られた。すなわち、アベマシクリブ又はフルベストラントによりプロゲステロン受容体（PgR）α、PgRβ、transcription termination factor 1（TTF1）、growth regulation by estrogen in breast cancer 1（GREB1）、RB 結合タンパク質 8（RBBP8）等の ERα標的分子の発現量が時間依存的に減少し、その作用はアベマシクリブよりもフルベストラントで顕著であった（図 2.6.2-28）。アベマシクリブ単薬と比較して、アベマシクリブとフルベストラント併用によりこれらの ERα標的分子に対する阻害作用の増強が認められた。pRb、TOPOIIα、pHH3、MCM7、FOXM1 等の細胞周期関連分子の発現は、アベマシクリブとフルベストラントの併用により各単薬と比較して顕著に阻害された（図 2.6.2-29）。

特筆すべき点として、アベマシクリブ単薬ではサイクリン D1 の発現量が増加したのに対し、アベマシクリブとフルベストラントの併用によりサイクリン D1 の増加は時間依存的に抑制され、6 日間培養ではベースラインと同程度もしくはそれ以下までサイクリン D1 の発現量が減少した（図 2.6.2-29）。アベマシクリブによるサイクリン D1 発現上昇の機序は明らかではないものの、サイクリン D1 の発現量が最大となる G1 期で細胞周期が停止するためである可能性がある。サイクリン D1 は G1 期から S 期への細胞周期進行因子の一つであるため、サイクリン D1 を高発現した細胞は容易に細胞周期を再開できる状態にあると考えられる。フルベストラントと併用することでアベマシクリブにより誘導されるサイクリン D1 の発現が抑制されるため、細胞周期関連遺伝子の発現がより強く阻害され、細胞増殖阻害作用が増強されたと考えられる。



略語：CT = 未処置対照、ERα = エストロゲン受容体α、GREB1 = growth regulation by estrogen in breast cancer 1、PgR = プロゲステロン受容体、RBBP8 = RB 結合タンパク質 8、TTF1 = transcription termination factor 1。
ヒト乳癌細胞株 MCF-7 及び T47-D をアベマシクリブメシル酸塩（0.25、0.5 又は 1.0 µM）及びフルベストラント（10 nM）を単薬又は併用で 1、3 及び 6 日間培養後、免疫ブロット法で表記タンパク質の発現を定量した。［添付資料 4.2.1.1.13、CCGS320 試験］

図 2.6.2-28　ER 陽性乳癌におけるエストロゲン受容体α標的タンパク質の発現阻害



略語：CT = 未処置対照、FOXM1 = forkhead box protein M1、MCM7 = ミニ染色体維持タンパク 7、pHH3 = リン酸化ヒストン H3、pRb = リン酸化 Rb、TopoIIα = トポイソメラーゼ IIα。
ヒト乳癌細胞株 MCF-7 及び T47-D をアベマシクリブメシル酸塩（0.25、0.5 又は 1.0 µM）及びフルベストラント（10 nM）を単薬又は併用で 1、3 及び 6 日間培養後、免疫ブロット法で表記タンパク質の発現を定量した。［添付資料 4.2.1.1.13、CCGS320 試験］

図 2.6.2-29 ER 陽性乳癌における細胞周期関連タンパク質の発現阻害

以上、ER 陽性乳癌細胞株において、アベマシクリブをフルベストラントと併用したとき、各単薬と比較して細胞増殖阻害作用の増強が認められた。併用による作用の増強には、ERα標的遺伝子よりも細胞周期関連遺伝子の阻害作用の増強がより寄与していると考えられた。アベマシクリブによる ESR1 遺伝子及び ERαタンパク質の発現量の減少は、持続的な細胞周期の停止や細胞老化に関連した二次的変化である可能性が考えられる。しかしながら、アベマシクリブによる細胞老化が ERα発現量の減少とどのように関連しているか、現時点では明らかではない。さらに、アベマシクリブにより誘導されるサイクリン D1 の発現がフルベストラントとの併用により抑制されることが示され、これが細胞増殖阻害作用の増強に寄与している可能性が示唆された。

2.6.2.2.2 In vivo 試験

In vivo 試験におけるアベマシクリブの作用を明らかにするため、ER 陽性乳癌を含むヒト腫瘍の担癌モデルマウスを用いて CDK4/6 キナーゼ活性及び細胞周期の阻害を評価し、また単薬投与並びに内分泌療法（4-HT 及びフルベストラント）との併用投与での抗腫瘍効果を評価した。また、同所性異種移植モデルラットを用いて、脳腫瘍に対する抗腫瘍効果を評価した。In vitro 試験と同様に、CDK4/6 キナーゼ活性は Rb のリン酸化を指標に、細胞周期は細胞周期マーカー（S 期：TopoIIα、G2/M 期：pHH3）及び E2F 依存的な細胞周期関連遺伝子の発現を指標に評価した。抗腫瘍効果は、溶媒対照群に対する被験薬投与群の腫瘍体積変化量の比（ΔT/C）を用いて評価した。

$\Delta T/C\ (\%) = \Delta T/\Delta C \times 100$ ［ΔT が負（腫瘍退縮）の場合、$\Delta T/T_{initial} \times 100$］

ΔC = 溶媒対照群の平均腫瘍体積のベースラインからの変化量

ΔT = 被験薬投与群の平均腫瘍体積のベースラインからの変化量

$T_{initial}$ = 被験薬投与群のベースラインの平均腫瘍体積

腫瘍体積の統計学的解析には二元配置反復測定分散分析を用いた。ベースラインから 20%以上の腫瘍体積の増加を PD（進行）、0%以上 20%未満の増加を SD（安定）、80%以下の減少を PR（部分奏効）、80%超の減少を CR（完全奏効）と定義し、病勢コントロール率（SD + PR + CR）又は全奏効率（PR + CR）で抗腫瘍効果を判定した。

2.6.2.2.2.1 アベマシクリブの in vivo 活性

2.6.2.2.2.1.1 異種移植腫瘍モデルにおける CDK4/6 活性及び細胞周期の阻害

（添付資料 4.2.1.1.14、CCGS14 試験）

結腸直腸癌細胞株 Colo205 の異種移植腫瘍モデルマウスにアベマシクリブメシル酸塩を 3.125～50 mg/kg の用量で単回経口投与し、24 時間後に異種移植片における pRb 及び細胞周期マーカーの発現を評価した（表 2.6.2-15）。pRb、TopoIIα及び pHH3 は用量依存的に阻害され、50%、70%及び 90%阻害する有効用量の閾値（TED_{50}、TED_{70} 及び TED_{90}）は測定指標間で同程度であった。

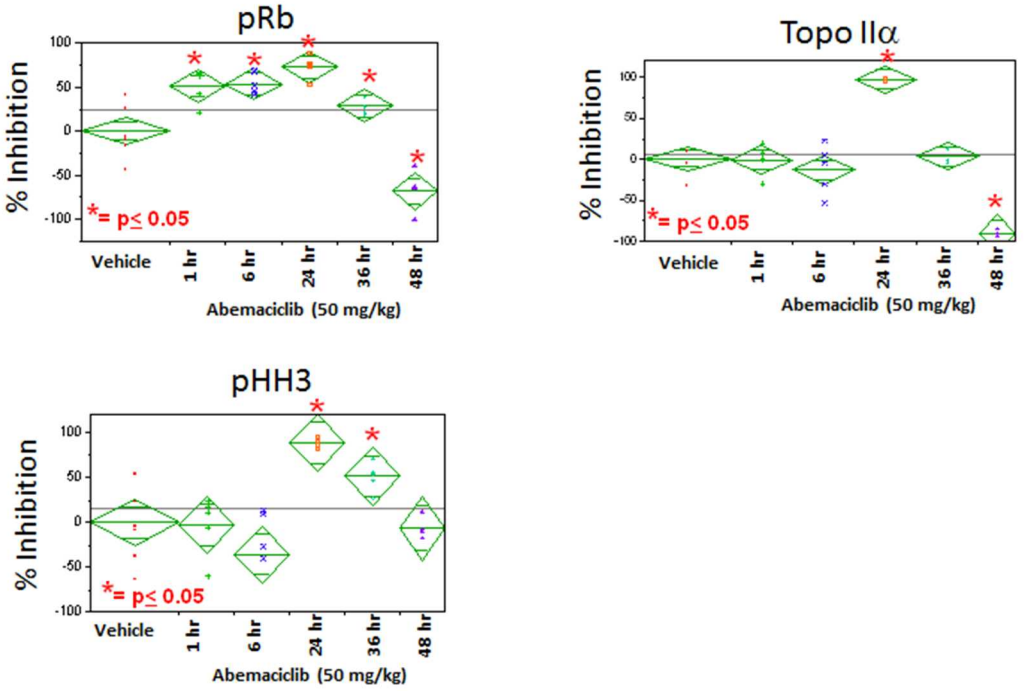
50 mg/kg 群における pRb 及び細胞周期マーカーの発現を経時的に評価した結果、pRb の阻害は投与 1 時間後にほぼ最大に達し、24 時間以上阻害作用が持続した（図 2.6.2-30）。TopoIIα及び pHH3 の阻害は pRb の阻害に遅れて認められ、投与 24 時間後に最大に達した。投与 24 時間後以降、pRb、TopoIIα及び pHH3 の阻害は一様に低下し、単回投与による CDK4/6 及び細胞周期の阻害は可逆的であることが示された。また、投与 48 時間後には pRb 及び TopoIIαの発現量は溶媒対照群よりも高値を示し（リバウンド）、細胞周期が同期して再開した可能性が考えられた。以上、Colo205 モデルにおいて、アベマシクリブは単回投与で CDK4/6 を可逆的に阻害し、CDK4/6 阻害作用と細胞周期阻害作用は相関することが示された。

表 2.6.2-15 Colo205 モデルにおける Rb リン酸化及び細胞周期の用量依存的な阻害

有効用量の閾値	pRb (mg/kg)	TopoIIα (mg/kg)	pHH3 (mg/kg)
TED_{50}	8.9	7.5	4.5
TED_{70}	14.1	14.3	10.8
TED_{90}	29.4	41.2	45.7

略語：pHH3 = リン酸化ヒストン H3、pRb = リン酸化 Rb、TEDx = x%阻害する有効用量の閾値、TopoIIα = トポイソメラーゼ IIα。

ヒト結腸直腸癌細胞株 Colo205 の異種移植腫瘍モデルマウス（溶媒対照群：8 例/群、被験薬群：5 例/群）に、溶媒又はアベマシクリブメシル酸塩を 3.125、6.25、12.5、25 及び 50 mg/kg の用量で単回経口投与した［溶媒：1%ヒドロキシエチルセルロースを含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。用量はアベマシクリブ遊離塩基の 2.625、5.25、10.5、21 及び 42 mg/kg に相当する。投与 24 時間後に異種移植片における pRb（Ser^{780}）、TopoIIα及び pHH3（Ser^{10}）の発現を免疫ブロット法で定量した。溶媒対照群を 100%とした TEDx を示す。［添付資料 4.2.1.1.14、CCGS14 試験］



略語：pHH3 = リン酸化ヒストン H3、pRb = リン酸化 Rb、TopoIIα = トポイソメラーゼ IIα。
ヒト結腸直腸癌細胞株 Colo205 の異種移植腫瘍モデルマウス（5 例/群）にアベマシクリブメシル酸塩 50 mg/kg を単回経口投与し、投与 1～48 時間後に異種移植片における pRb（Ser^{780}）、TopoIIα及び pHH3（Ser^{10}）の発現を免疫ブロット法で定量した。用量はアベマシクリブ遊離塩基の 42 mg/kg に相当する。溶媒対照群を 100%とした阻害率を示す。*p≤0.05（Dunnet）［添付資料 4.2.1.1.14、CCGS14 試験］

図 2.6.2-30　Colo205 モデルにおける Rb リン酸化及び細胞周期の経時的な阻害

2.6.2.2.2.1.2　異種移植腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果

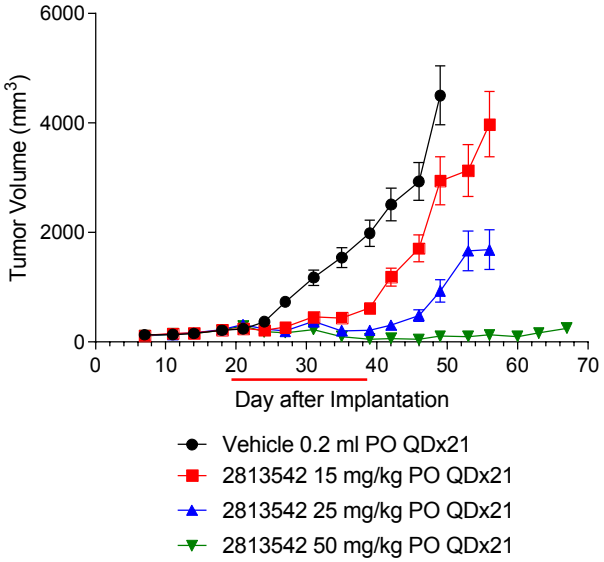
（添付資料 4.2.1.1.15、CCGS185 試験）
（添付資料 4.2.1.1.16、CCGS303 試験）
（添付資料 4.2.1.1.17、CCGS314 試験）

サイクリン D1 を高発現するマントル細胞リンパ腫細胞株 JeKo-1 及び ER 陽性の乳癌細胞株（ZR-75-1 及び MCF-7）の異種移植腫瘍モデルマウスにおけるアベマシクリブの抗腫瘍効果を評価した。

JeKo-1 の異種移植腫瘍モデルマウスにアベマシクリブメシル酸塩を 15、25 及び 50 mg/kg の用量で 1 日 1 回、21 日間経口投与し、抗腫瘍効果を評価した（CCGS185 試験）。アベマシクリブ投与により、腫瘍体積は用量依存的に減少した（図 2.6.2-31）。21 日間投与後、15、25 及び 50 mg/kg 群の ΔT/C はそれぞれ 22.8%、−2.7%及び −74.1%であり、25 及び 50 mg/kg 群で腫瘍退縮が認められた。いずれの群においても、腫瘍体積の減少は溶媒対照群と比較して統計学的に有意であった（p<0.001）。病勢コントロール率（SD + PR + CR）は 15 mg/kg 群で 25%（SD：2/8 例）、25 mg/kg 群で 100%（SD：3/8 例、PR：5/8 例）、50 mg/kg 群で 100%（PR：6/8 例、CR：2/8 例）であった。全奏効率（PR + CR）は、50 mg/kg 群で 100%であった。また、50 mg/kg 群では、最終投与の約 3 週間後まで腫瘍増殖抑制が持続した。

JeKo-1 モデルにアベマシクリブメシル酸塩を 15、25 及び 50 mg/kg の用量で 1 日 1 回、3 日間経口投与し、異種移植片における pRb 及び細胞周期マーカーの発現を評価した結果、pRb、

TopoIIα及び pHH3 の用量依存的な阻害が認められ、その阻害率は 3 つのパラメータ間でほぼ同程度であった（表 2.6.2-16）。したがって、Jeko-1 モデルにおけるアベマシクリブの抗腫瘍効果と、Rb リン酸化及び細胞周期の阻害作用が関連付けられた。



略語：PO＝経口投与、QD＝1 日 1 回。
ヒトマントル細胞リンパ腫細胞株 Jeko-1 の異種移植腫瘍モデルマウス（8 例/群）に、移植後 19 日目から溶媒又はアベマシクリブメシル酸塩を 15、25 及び 50 mg/kg の用量で 1 日 1 回、21 日間経口投与した［溶媒：1%ヒドロキシエチルセルロースを含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。用量はアベマシクリブ遊離塩基の 12.6、21 及び 42 mg/kg に相当する。腫瘍体積の平均値±標準誤差を示す。横線は投与期間。［添付資料 4.2.1.1.15、CCGS185 試験］

図 2.6.2-31 JeKo-1 モデルにおける腫瘍増殖抑制

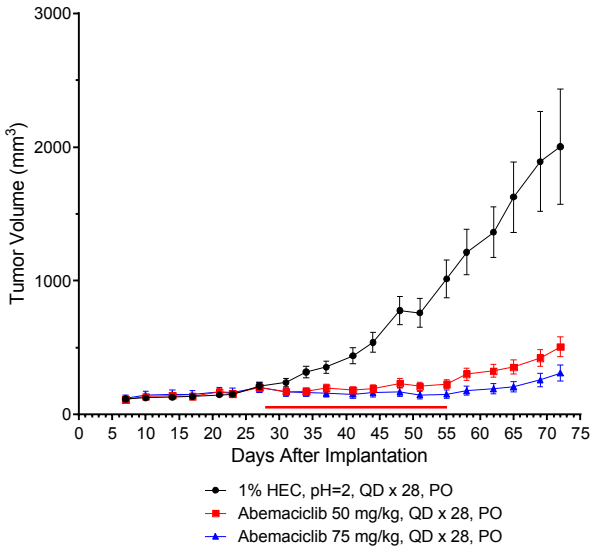
表 2.6.2-16 JeKo-1 モデルにおける Rb リン酸化及び細胞周期の阻害

用量	pRb（%）	TopoIIα（%）	pHH3（%）
15 mg/kg	1.8 ± 16	11.1 ± 24.2	20.8 ± 25.9
25 mg/kg	61.1 ± 10.6	82.3 ± 10.5	70.8 ± 11.3
50 mg/kg	91.4 ± 2.1	95.5 ± 2.2	99.2 ± 0.1

略語：pHH3＝リン酸化ヒストン H3、pRb＝リン酸化 Rb、TopoIIα＝トポイソメラーゼ IIα。
ヒトマントル細胞リンパ腫細胞株 Jeko-1 の異種移植腫瘍モデルマウス（溶媒対照群：8 例/群、被験薬群：5 例/群）に、溶媒又はアベマシクリブメシル酸塩を 15、25 及び 50 mg/kg の用量で 1 日 1 回、3 日間経口投与した［溶媒：1%ヒドロキシエチルセルロースを含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。用量はアベマシクリブ遊離塩基の 12.6、21 及び 42 mg/kg に相当する。最終投与の 24 時間後に異種移植片における pRb（Ser^{780}）、TopoIIα及び pHH3（Ser^{10}）の発現を免疫ブロット法で定量した。阻害率の平均値±標準誤差を示す。［添付資料 4.2.1.1.15、CCGS185 試験］

ZR-75-1 の異種移植腫瘍モデルマウスにアベマシクリブメシル酸塩を 50 及び 75 mg/kg の用量で 1 日 1 回、28 日間経口投与し、抗腫瘍効果を評価した（CCGS303 試験）。アベマシクリブ投与により、腫瘍体積は用量依存的に減少した（図 2.6.2-32）。28 日間投与後、50 及び 75 mg/kg 群の ΔT/C はそれぞれ 2.5%及び −26.3%であり、75 mg/kg 群で腫瘍退縮が認められた。両群において、腫瘍体積の減少は溶媒対照群と比較して統計学的に有意であった（$p<0.001$）。病勢コン

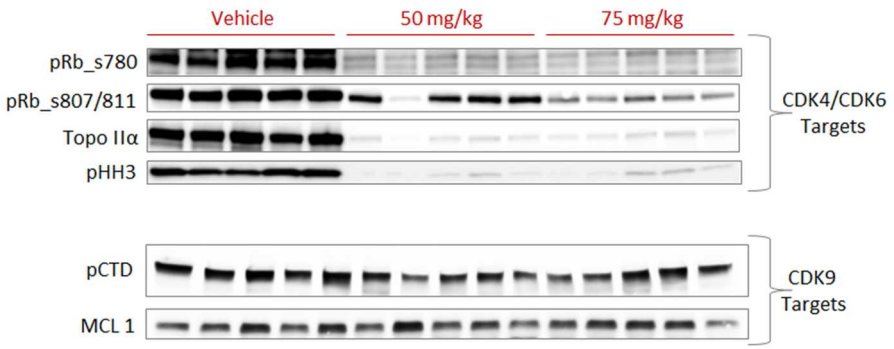
トロール率（SD + PR + CR）は 50 mg/kg 群で 63%（SD：1/8 例、PR：4/8 例）、75 mg/kg 群で 100%（SD：3/8 例、PR：5/8 例）であった。



略語：HEC = ヒドロキシエチルセルロース、PO = 経口投与、QD = 1 日 1 回。
ヒト乳癌細胞株 ZR-75-1 の異種移植腫瘍モデルマウス（8 例/群）に、移植後 28 日目から溶媒又はアベマシクリブメシル酸塩を 50 及び 75 mg/kg の用量で 1 日 1 回、28 日間経口投与した［溶媒：1% HEC を含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。用量はアベマシクリブ遊離塩基の 42 及び 63 mg/kg に相当する。腫瘍増殖誘導のため、移植前に 17β-エストラジオール徐放ペレットを埋め込んだ。腫瘍体積の平均値±標準誤差を示す。横線は投与期間。溶媒対照群の 1 例は腫瘍体積の著しい増加のため、投与期間中に安楽殺した。［添付資料 4.2.1.1.16、CCGS303 試験］

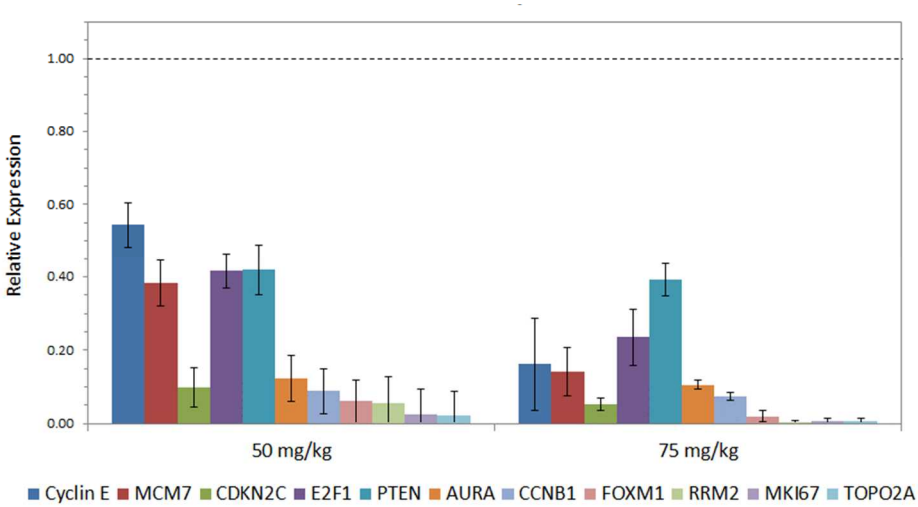
図 2.6.2-32 ZR-75-1 モデルにおける腫瘍増殖抑制

ZR-75-1 モデルにおける細胞周期マーカー及び細胞周期関連遺伝子群の発現を評価した（CCGS303 試験）。ZR-75-1 モデルにアベマシクリブメシル酸塩を 50 及び 75 mg/kg の用量で 1 日 1 回、5 日間経口投与した結果、両用量群で pRb、TopoIIα及び pHH3 の顕著な阻害が認められた（図 2.6.2-33）。一方、CDK9 の基質である pCTD 及び MCL1 は阻害されず、アベマシクリブの抗腫瘍効果は CDK4/6 阻害に基づき、CDK9 阻害は関与しないことが示された。さらに、S 期及び G2/M 期への細胞周期の進行に必要な遺伝子群［CCNE1（サイクリン E1）、MCM7、CDKN2C（p18）、PTEN、AURA（Aurora A）、CCNB1（サイクリン B1）、FOXM1、RRM2（リボヌクレオチドレダクターゼサブユニット M2）、MKI67（Ki67）及び TOPO2A（TopoIIα）］の mRNA 発現は、50 及び 75 mg/kg 群で顕著に減少した（図 2.6.2-34）。これらの遺伝子群のうち、PTEN 及び AURA 以外は E2F 依存的に転写が制御される遺伝子である。以上、乳癌細胞株を用いた in vitro 試験と同様に（CTD 第 2.6.2.2.1.6 項）、乳癌の異種移植腫瘍モデルにおいて、アベマシクリブは CDK4/6 による Rb のリン酸化を阻害することで、E2F 依存的な細胞周期関連遺伝子の転写を阻害し、細胞周期を阻害することが示された。



略語：MCL1 = myeloid cell leukemia-1、pCTD = リン酸化 RNA ポリメラーゼ II C 末端反復ドメイン、pHH3 = リン酸化ヒストン H3、pRb = リン酸化 Rb、TopoIIα = トポイソメラーゼ IIα。
ヒト乳癌細胞株 ZR-75-1 の異種移植腫瘍モデルマウス（5 例/群）に、移植後 27 日目から溶媒又はアベマシクリブメシル酸塩を 50 及び 75 mg/kg の用量で 1 日 1 回、5 日間経口投与した［溶媒：1%ヒドロキシエチルセルロースを含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。用量はアベマシクリブ遊離塩基の 42 及び 63 mg/kg に相当する。腫瘍増殖誘導のため、移植前に 17β-エストラジオール徐放ペレットを埋め込んだ。最終投与の 24 時間後に、異種移植片における pRb（Ser^{780} 又は $Ser^{807/811}$）、TopoIIα及び pHH3（Ser^{10}）並びに CDK9 基質の pCTD（Ser^{2}）及び MCL1 の発現を免疫ブロット法で定量した。［添付資料 4.2.1.1.16、CCGS303 試験］

図 2.6.2-33　ZR-75-1 モデルにおける Rb リン酸化及び細胞周期の阻害

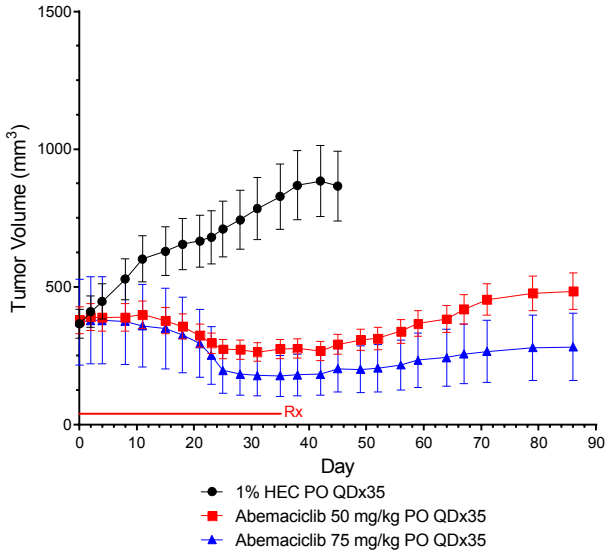


ZR-75-1 モデル（5 例/群）にアベマシクリブメシル酸塩を 50 及び 75 mg/kg の用量で 1 日 1 回、5 日間経口投与した 24 時間後に、異種移植片における mRNA 発現を RT-PCR 法で定量した。用量はアベマシクリブ遊離塩基の 42 及び 63 mg/kg に相当する。溶媒対照群に対する発現比を平均値±標準誤差で示す。［添付資料 4.2.1.1.16、CCGS303 試験］

図 2.6.2-34　ZR-75-1 モデルにおける細胞周期制御遺伝子の mRNA 発現の阻害

アベマシクリブの抗腫瘍効果は、MCF-7 の異種移植腫瘍モデルマウスにおいても示された（CCGS314 試験）。MCF-7 モデルにアベマシクリブメシル酸塩を 50 及び 75 mg/kg の用量で 1 日 1 回、35 日間経口投与した結果、腫瘍体積はアベマシクリブの用量依存的に減少した（図 2.6.2-35）。35 日間投与後、50 及び 75 mg/kg 群の ΔT/C はそれぞれ −25.9%及び −52.1%であり、両群で腫瘍退縮が認められた。両群において、腫瘍体積の減少は溶媒対照群と比較して統計学的に有意であった（p≤0.001）。病勢コントロール率（SD + PR + CR）は 50 mg/kg 群で 100%（SD：2/7 例、PR：5/7 例）、75 mg/kg 群で 100%（PR：6/7 例、CR：1/7 例）であり、特に

75 mg/kg 群の奏効率（PR + CR）は 100%であった。また、75 mg/kg 群では、最終投与の約 5 週間後まで腫瘍退縮が持続した。



略語：HEC = ヒドロキシエチルセルロース、PO = 経口投与、QD = 1 日 1 回。
ヒト乳癌細胞株 MCF-7 の異種移植腫瘍モデル（7 例/群）に、溶媒又はアベマシクリブメシル酸塩を 50 及び 75 mg/kg の用量で 1 日 1 回、35 日間経口投与した［溶媒：1% HEC を含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。用量はアベマシクリブ遊離塩基の 42 及び 63 mg/kg に相当する。腫瘍増殖誘導のため、移植前に 17β-エストラジオール徐放ペレットを埋め込んだ。腫瘍体積の平均値±標準誤差を示す。横線は投与期間。［添付資料 4.2.1.1.17、CCGS314 試験］

図 2.6.2-35 MCF-7 モデルにおける腫瘍増殖抑制

以上、2 種の ER 陽性乳癌モデル（ZR-75-1 及び MCF-7）において、アベマシクリブは顕著な抗腫瘍効果を示した。アベマシクリブの投与開始後、緩やかに腫瘍体積が減少して腫瘍退縮に至り、投与終了後も腫瘍退縮が長時間持続した。このことは、一連の in vitro 試験（CTD 第 2.6.2.2.1.9 項）において、ER 陽性乳癌でアベマシクリブにより細胞増殖が顕著に阻害されたこと、また長時間培養により細胞老化による不可逆的な増殖阻害及びアポトーシスが誘導されたことと一致すると考えられる。

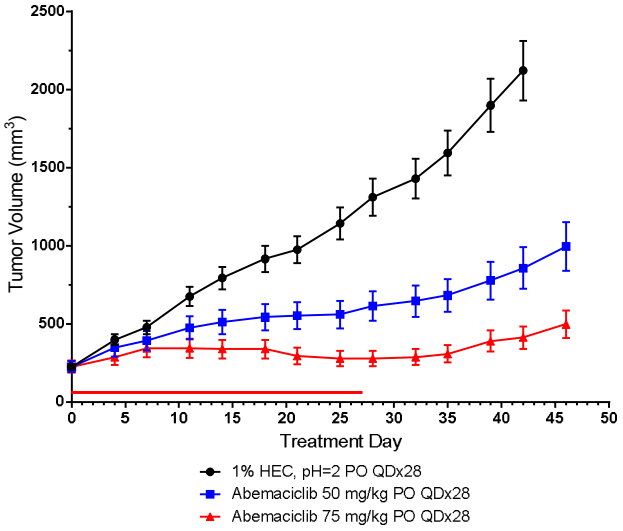
2.6.2.2.2.1.3 ESR1 遺伝子変異により内分泌療法に対する耐性を獲得した乳癌モデルにおける抗腫瘍効果

（添付資料 4.2.1.1.18、CCGS321 試験）

多くの ER 陽性乳癌はエストロゲン依存的に増殖し、内分泌療法に感受性を示す。一方、内分泌療法に耐性を獲得した ER 陽性乳癌は、選択的エストロゲン受容体モジュレーター（SERM）であるタモキシフェンや選択的エストロゲン受容体ダウンレギュレーター（SERD）であるフルベストラントに対する反応性が低下する。乳癌において、ERαをコードする ESR1 遺伝子の変異（Y537S などの 537/538 位のアミノ酸置換）は転移性症例と関連しており、ER リガンド非依存的な増殖や内分泌療法への耐性獲得に寄与している（Toy et al. 2013; Jeselsohn et al. 2014）。そこで、内分泌療法耐性乳癌におけるアベマシクリブの抗腫瘍効果を評価するため、ERαの Y537S 変異を有する乳癌患者由来 ST941/HI の異種移植腫瘍モデルマウスを用いた試験を実施した（CCGS321 試験）。

ST941/HI モデルにアベマシクリブメシル酸塩を 50 及び 75 mg/kg の用量で 1 日 1 回、28 日間経口投与した結果、腫瘍体積はアベマシクリブの用量依存的に減少した（図 2.6.2-36）。28 日間投与後、50 及び 75 mg/kg 群の ΔT/C はそれぞれ 35.8%及び 4.8%であり、75 mg/kg 群で腫瘍増殖はほぼ完全に抑制された。両群において、腫瘍体積の減少は溶媒対照群と比較して統計学的に有意であった（$p \leq 0.003$）。病勢コントロール率（SD + PR + CR）は 50 mg/kg 群で 20%（SD：1/5 例）、75 mg/kg 群で 100%（SD：4/5 例、PR：1/5 例）であった。

以上、ER リガンド非依存的に増殖し、内分泌療法に耐性を示す ER 陽性乳癌モデルにおいて、アベマシクリブは抗腫瘍効果を示すことが示された。



略語：HEC = ヒドロキシエチルセルロース、PO = 経口投与、QD = 1 日 1 回。
ヒト乳癌患者由来腫瘍 ST941/HI の異種移植腫瘍モデルマウス（5 例/群）に、溶媒又はアベマシクリブメシル酸塩を 50 及び 75 mg/kg の用量で 1 日 1 回、28 日間経口投与した［溶媒：1% HEC を含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。用量はアベマシクリブ遊離塩基の 42 及び 63 mg/kg に相当する。腫瘍体積の平均値±標準誤差を示す。横線は投与期間。［添付資料 4.2.1.1.18、CCGS321 試験］

図 2.6.2-36 ESR1 変異を有する ST941/HI モデルにおける腫瘍増殖抑制

2.6.2.2.2.1.4 サイクリン D を高発現する担癌モデルにおける抗腫瘍効果

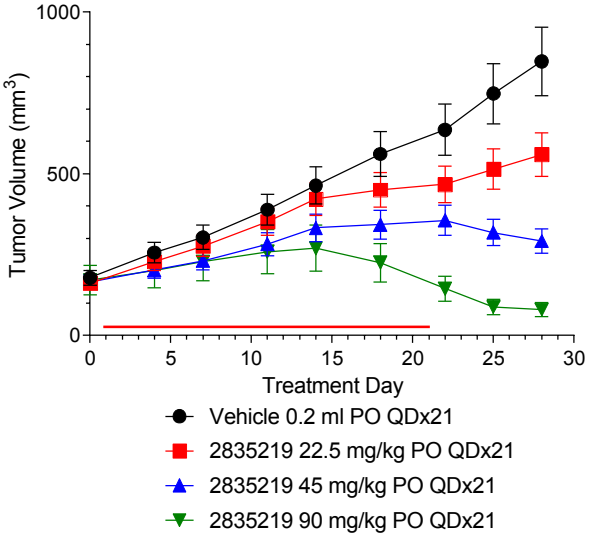
（添付資料 4.2.1.1.15、CCGS185 試験）
（添付資料 4.2.1.1.16、CCGS303 試験）
（添付資料 4.2.1.1.19、CCGS295 試験）
（添付資料 4.2.1.1.20、CCGS296 試験）
（添付資料 4.2.1.1.21、CCGS328 試験）

サイクリン D を高発現する癌細胞はアベマシクリブに高感受性であることが in vitro 試験で示されていることから（CTD 第 2.6.2.2.1.7 項）、サイクリン D1、D2 又は D3 を高発現する以下の異種移植腫瘍モデルマウスにおけるアベマシクリブの抗腫瘍効果を評価した。

- マントル細胞リンパ腫細胞株 JeKo-1：サイクリン D1 高発現［t(11;14)(q13;q32)］
- 胃癌患者由来腫瘍 GAF-152：CCND3 遺伝子増幅
- 小細胞肺癌細胞株 DMS-53：CCND2 遺伝子増幅
- ER 陽性乳癌細胞株 ZR-75-1：CCND1 遺伝子増幅
- ER 陰性乳癌細胞株 MDA-MB-453：サイクリン D1 高発現（3’非翻訳領域の変異）

JeKo-1 は染色体転座［t(11;14)(q13;q32)］によりサイクリン D1 を高発現するモデルである。JeKo-1 モデルにアベマシクリブメシル酸塩を 1 日 1 回、21 日間経口投与した結果（CCGS185 試験）、50 mg/kg 群で顕著な腫瘍退縮（ΔT/C = −74.1%）が認められ、腫瘍増殖抑制は最終投与の約 3 週間後まで持続した（CTD 第 2.6.2.2.2.1.2 項）。

GAF-152 は、CCND3 遺伝子の局所的増幅（11 コピー）を有するモデルである。GAF-152 の異種移植腫瘍モデルマウスにアベマシクリブ遊離塩基を 22.5、45 及び 90 mg/kg の用量で 1 日 1 回、21 日間経口投与した結果（CCGS295 試験）、腫瘍体積はアベマシクリブの用量依存的に減少した（図 2.6.2-37）。21 日間投与後、22.5、45 及び 90 mg/kg 群の ΔT/C はそれぞれ 57.5%、18.1%及び −52.6%であり、90 mg/kg 群で腫瘍退縮が認められた。45 及び 90 mg/kg 群において、腫瘍体積の減少は溶媒対照群と比較して統計学的に有意であった（p<0.001）。病勢コントロール率（SD＋PR＋CR）は 22.5 mg/kg 群で 10%（SD：1/10 例）、45 mg/kg 群で 50%（SD：4/10 例、PR：1/10 例）、90 mg/kg 群で 89%（PR：6/9 例、CR：2/9 例）であった。45 及び 90 mg/kg 群では、最終投与の 1 週間後（試験 21～28 日目）まで腫瘍体積の減少が持続した。

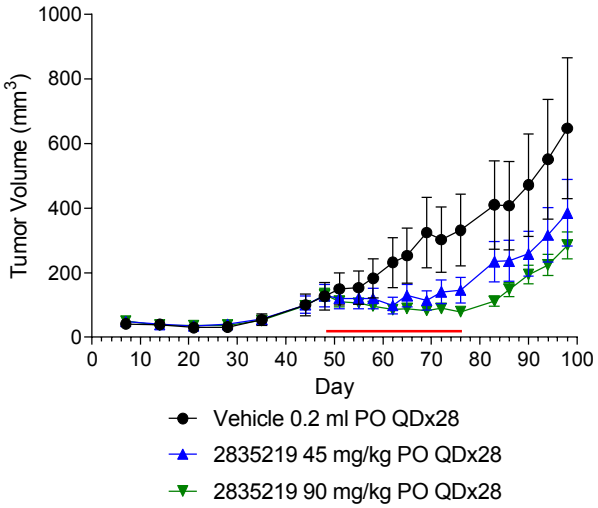


略語：PO＝経口投与、QD＝1 日 1 回。
ヒト胃癌患者由来腫瘍 GAF-152 の異種移植腫瘍モデルマウス（10 例/群）に、溶媒又はアベマシクリブ遊離塩基を 22.5、45 及び 90 mg/kg の用量で 1 日 1 回、21 日間経口投与した［溶媒：1%ヒドロキシエチルセルロースを含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。腫瘍体積の平均値±標準誤差を示す。横線は投与期間。［添付資料 4.2.1.1.19、CCGS295 試験］

図 2.6.2-37 CCND3 増幅を有する GAF-152 モデルにおける腫瘍増殖抑制

DMS-53 は CCND2 遺伝子の増幅（12 コピー）を有するモデルであり、他の小細胞肺癌モデルと異なり、機能を有する Rb を発現する。DMS-53 の異種移植腫瘍モデルマウスにアベマシクリブ遊離塩基を 45 及び 90 mg/kg の用量で 1 日 1 回、28 日間経口投与した結果（CCGS296 試験）、腫瘍体積はアベマシクリブの用量依存的に減少した（図 2.6.2-38）。28 日間投与後、45 及び 90 mg/kg 群の ΔT/C はそれぞれ 8.0%及び −38.6%であり、90 mg/kg 群で腫瘍退縮が認められた。両群において、腫瘍体積の減少は溶媒対照群と比較して統計学的に有意であった（p<0.02）。病

勢コントロール率（SD＋PR＋CR）は 45 mg/kg 群で 71%（SD：1/7 例、PR：4/7 例）、90 mg/kg 群で 100%（PR：7/7 例）であった。

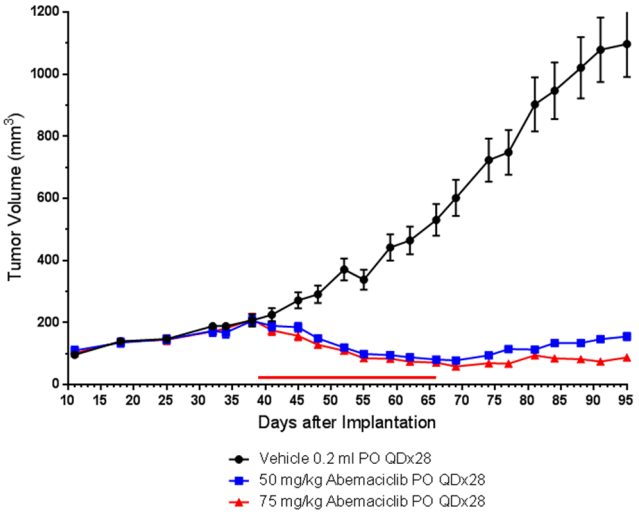


略語：PO＝経口投与、QD＝1 日 1 回。
ヒト小細胞肺癌細胞株 DMS-53 の異種移植腫瘍モデルマウス（7 例/群）に、移植後 48 日目から溶媒又はアベマシクリブ遊離塩基を 45 及び 90 mg/kg の用量で 1 日 1 回、28 日間経口投与した［溶媒：1%ヒドロキシエチルセルロースを含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。腫瘍体積の平均値±標準誤差を示す。横線は投与期間。［添付資料 4.2.1.1.20、CCGS296 試験］

図 2.6.2-38　CCND2 増幅を有する DMS-53 モデルにおける腫瘍増殖抑制

乳癌については、サイクリン D1 を高発現する 2 種のモデル（ZR-75-1 及び MDA-MB-453）を用いた。ZR-75-1 は、ER 陽性かつ CCND1 遺伝子の増幅を有するモデルである。ZR-75-1 モデルにアベマシクリブメシル酸塩を 1 日 1 回、28 日間経口投与した結果（CCGS303 試験）、75 mg/kg 群で顕著な腫瘍退縮（ΔT/C＝−26.3%）が認められた（CTD 第 2.6.2.2.2.1.2 項）。

MDA-MB-453 は ER 陰性乳癌で、3’非翻訳領域の変異により CCND1 mRNA が安定化するためサイクリン D1 を高発現するモデルである。ER 陽性乳癌と比較して、ER 陰性乳癌はアベマシクリブに対する感受性が低いが、例外的に MDA-MB-453 はサイクリン D1 を高発現するため、アベマシクリブに対して ER 陽性乳癌と同程度、もしくはより高い感受性を in vitro 試験で示す（CTD 第 2.6.2.2.1.8 項）。そこで、MDA-MB-453 の異種移植腫瘍モデルマウスにアベマシクリブメシル酸塩を 50 及び 75 mg/kg の用量で 1 日 1 回、28 日間経口投与した結果（CCGS328 試験）、両用量群で顕著な腫瘍退縮が認められた（図 2.6.2-39）。28 日間投与後、50 及び 75 mg/kg 群の ΔT/C はそれぞれ −60.9%及び −65.8%であり、両群ともに腫瘍体積の減少は溶媒対照群と比較して統計学的に有意であった（p<0.001）。病勢コントロール率（SD＋PR＋CR）は、50 及び 75 mg/kg 群でいずれも 100%（PR：7/7 例）であった。また、両群において腫瘍退縮は最終投与（試験 66 日）から 3 週間以上持続し、試験 95 日における 50 及び 75 mg/kg 群の ΔT/C はそれぞれ −25.0%及び −57.7%であった（p<0.001）。



略語：PO＝経口投与、QD＝1 日 1 回。
ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-453 の異種移植腫瘍モデルマウス（7 例/群）に、移植後 39 日目から溶媒又はアベマシクリブメシル酸塩を 50 及び 75 mg/kg の用量で 1 日 1 回、28 日間経口投与した［溶媒：1%ヒドロキシエチルセルロースを含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。用量はアベマシクリブ遊離塩基の 42 及び 63 mg/kg に相当する。腫瘍体積の平均値±標準誤差を示す。横線は投与期間。［添付資料 4.2.1.1.21、CCGS328 試験］

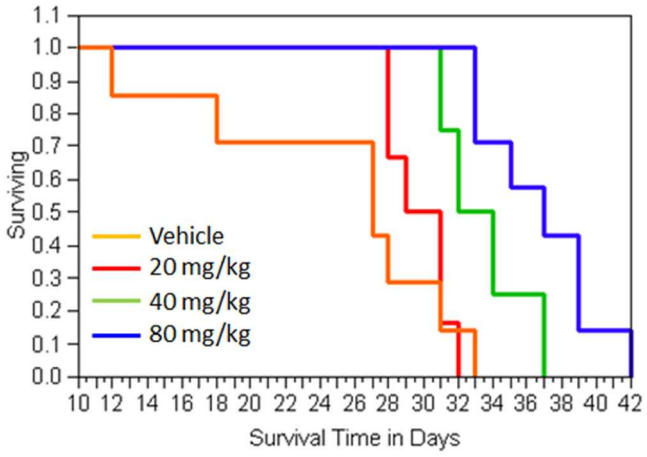
図 2.6.2-39　エストロゲン受容体陰性かつサイクリン D1 高発現の MDA-MB-453 モデルにおける腫瘍増殖抑制

以上、サイクリン D1、D2 又は D3 を高発現する異種移植腫瘍モデルマウスにおいて、癌種及び高発現の機序に関わらずアベマシクリブは顕著な抗腫瘍効果を示した。

2.6.2.2.2.1.5　脳腫瘍の同所性異種移植モデルにおける抗腫瘍効果

（添付資料 4.2.1.1.22、CCGS19 試験）

ラットにおいて、アベマシクリブは経口投与後に脳内に移行することから（CTD 第 2.6.4.4.2 項）、神経膠芽細胞腫細胞株 U87 MG の同所性異種移植モデルラットにおけるアベマシクリブの抗腫瘍効果を評価した（CCGS19 試験）。本モデルにアベマシクリブ遊離塩基を 20、40 及び 80 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与した結果、用量依存的な生存期間の延長が認められた（図 2.6.2-40）。溶媒対照群と比較して、20、40 及び 80 mg/kg 群の生存期間の中央値はそれぞれ 4.69、8.36 及び 11.72 日延長し、40 及び 80 mg/kg 群で統計学的に有意な延長が認められた。



群	生存期間 （中央値±標準誤差）	Log-rank test P 値	Wilcoxon test P 値
溶媒対照	25.14 ± 2.82	—	—
20 mg/kg	29.83 ± 0.70	0.5000	0.1460
40 mg/kg	33.50 ± 1.32	0.0316	0.0333
80 mg/kg	36.86 ± 1.28	0.0006	0.0010

ヒト神経膠芽細胞腫細胞株 U87 MG を脳内に移植した異種移植腫瘍モデルラット（6～7 例/群）に、移植 4 日後から溶媒又はアベマシクリブ遊離塩基を 20、40 及び 80 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与した［溶媒：1%ヒドロキシエチルセルロース、0.1% antifoam を含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。Kaplan-Meier 解析結果を示す。［添付資料 4.2.1.1.22、CCGS19 試験］

図 2.6.2-40　U87 MG 同所性異種移植モデルの生存期間の延長

2.6.2.2.2.2　内分泌療法との併用の in vivo 活性

2.6.2.2.2.2.1　乳癌の異種移植腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果

（添付資料 4.2.1.1.17、CCGS314 試験）
（添付資料 4.2.1.1.23、CCGS319 試験）

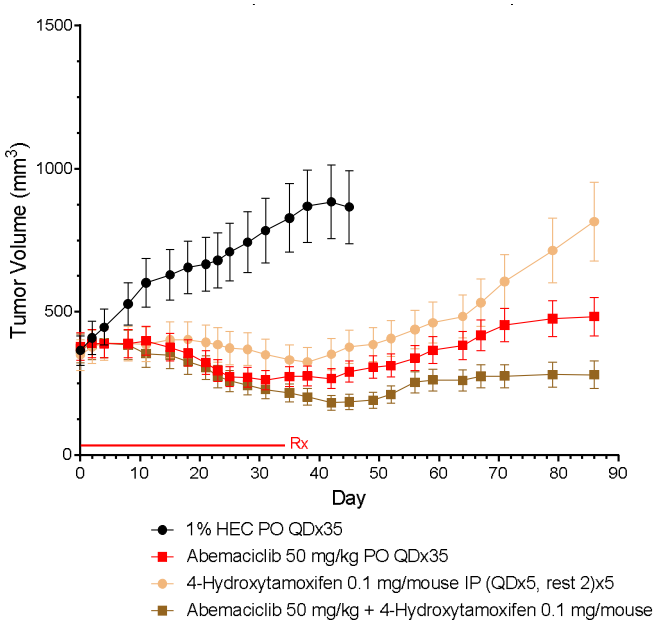
Luminal 型の ER 陽性／HER2 陰性乳癌である MCF-7 及び T47-D の異種移植腫瘍モデルマウスを用い、アベマシクリブと内分泌療法（4-HT 又はフルベストラント）との併用投与による抗腫瘍効果の増強を評価した。

MCF-7 の異種移植腫瘍モデルマウスに 50 mg/kg アベマシクリブメシル酸塩及び 0.1 mg 4-HT を 35 日間、単独投与又は併用投与した（CCGS314 試験）。その結果、最終投与時点での ΔT/C はアベマシクリブ単独群、4-HT 単独群及びアベマシクリブ／4-HT 併用群でそれぞれ −25.9%、−10.1%及び −41.3%であり、いずれの群でも腫瘍退縮が認められた（図 2.6.2-41）。併用群における腫瘍体積の減少は溶媒対照群と比較して統計学的に有意であったが（$p<0.001$）、アベマシクリブ又は 4-HT 単独群との比較では統計学的に有意な差は認められなかった（それぞれ $p = 0.419$、$p = 0.160$）。病勢コントロール率（SD + PR + CR）はアベマシクリブ単独群で 100%（SD：2/7 例、PR：5/7 例）、4-HT 単独群で 71%（SD：1/7 例、PR：4/7 例）、併用群で 100%（PR：6/6 例）であった。投与終了後の観察期間において、各単独群では試験 42～45 日以降に腫瘍の再増殖が認められたが、併用群では腫瘍退縮が長期間持続した。最終投与の 50 日後の腫瘍体積はアベマシ

クリブ単独群で 484.4 ± 67.1 mm³、4-HT 単独群で 815.3 ± 137.2 mm³、併用群で 281.0 ± 48.1 mm³ であった（平均値±標準誤差）。

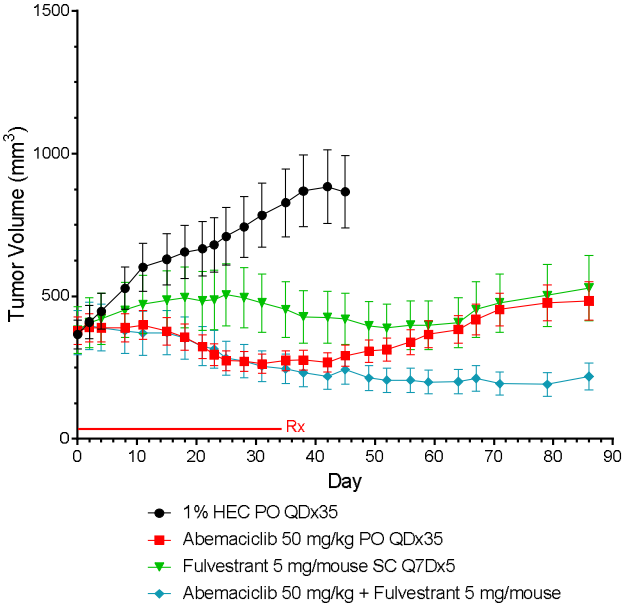
MCF-7 モデルに 50 mg/kg アベマシクリブメシル酸塩及び 5 mg/kg フルベストラントを 35 日間、各単独投与又は併用投与した（CCGS314 試験）。その結果、最終投与時点での ΔT/C はアベマシクリブ単独群、フルベストラント単独群及びアベマシクリブ／フルベストラント併用群でそれぞれ −25.9%、18.3%及び −33.6%であり、アベマシクリブ単独群及び併用群で腫瘍退縮が認められた（図 2.6.2-42）。併用群における腫瘍体積の減少は溶媒対照群と比較して統計学的に有意であったが（p<0.001）、アベマシクリブ又はフルベストラント単独群との比較では統計学的に有意な差は認められなかった（それぞれ p = 0.728、p = 0.056）。病勢コントロール率（SD + PR + CR）はアベマシクリブ単独群で 100%（SD：2/7 例、PR：5/7 例）、フルベストラント単独群で 43%（SD：1/7 例、PR：2/7 例）、併用群で 100%（SD：1/7 例、PR：6/7 例）であった。投与終了後の観察期間において、アベマシクリブ単独群及びフルベストラント単独群ではそれぞれ試験 45 及び 64 日以降に腫瘍の再増殖が認められたが、併用群では腫瘍退縮が試験 86 日まで持続した。最終投与の 50 日後の腫瘍体積はアベマシクリブ単独群で 484.4 ± 67.1 mm³、フルベストラント単独群で 529.2 ± 115.5 mm³、併用群で 218.7 ± 47.2 mm³ であった（平均値±標準誤差）。

以上、MCF-7 モデルにおいて、アベマシクリブを 4-HT 又はフルベストラントと併用投与したとき、35 日の投与期間中には各単独群と比較して統計学的に有意な抗腫瘍効果の増強は認められなかった。しかしながら、併用群では投与期間終了後も腫瘍増殖抑制が持続し、最終投与の 50 日後の腫瘍体積は単独群と比較して併用群で顕著に減少した。



略語：HEC = ヒドロキシエチルセルロース、IP= 腹腔内投与、PO = 経口投与、QD = 1 日 1 回。
ヒト乳癌細胞株 MCF-7 の異種移植腫瘍モデルマウス（7 例/群）に、溶媒、アベマシクリブメシル酸塩（50 mg/kg、1 日 1 回経口投与）又は 4-ヒドロキシタモキシフェン（0.1 mg、5 日間腹腔内投与−2 日間休薬を 1 サイクルとする）を 35 日間、各単独投与又は併用投与した［溶媒：1% HEC を含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。50 mg/kg アベマシクリブメシル酸塩はアベマシクリブ遊離塩基の 42 mg/kg に相当する。腫瘍増殖誘導のため、移植前に 17β-エストラジオール徐放ペレットを埋め込んだ。腫瘍体積の平均値±標準誤差を示す。横線は投与期間。投与期間中、併用群の 1 例が死因不明で死亡発見された。［添付資料 4.2.1.1.17、CCGS314 試験］

図 2.6.2-41　MCF-7 モデルにおける腫瘍増殖抑制（4-ヒドロキシタモキシフェンとの併用投与）



略語：HEC＝ヒドロキシエチルセルロース、PO＝経口投与、Q7D＝週 1 回、QD＝1 日 1 回、SC=皮下投与。
ヒト乳癌細胞株 MCF-7 の異種移植腫瘍モデル（7 例/群）に、溶媒、アベマシクリブメシル酸塩（50 mg/kg、1 日 1 回経口投与）又はフルベストラント（5 mg、週 1 回皮下投与）を 35 日間、各単独投与又は併用投与した［溶媒：1% HEC を含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。50 mg/kg アベマシクリブメシル酸塩はアベマシクリブ遊離塩基の 42 mg/kg に相当する。腫瘍増殖誘導のため、移植前に 17β-エストラジオール徐放ペレットを埋め込んだ。腫瘍体積の平均値±標準誤差を示す。横線は投与期間。［添付資料 4.2.1.1.17、CCGS314 試験］

図 2.6.2-42　MCF-7 モデルにおける腫瘍増殖抑制（フルベストラントとの併用投与）

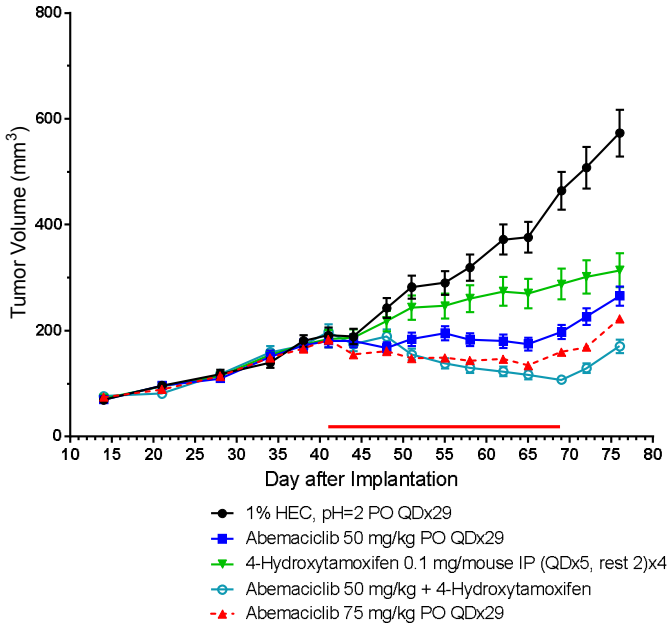
T47-D は MCF-7 と同様に luminal 型の ER 陽性／HER2 陰性乳癌であるが、PI3Kαをコードする PIK3CA 遺伝子の活性化変異 A3140G（H1047R）を有する。T47-D の異種移植腫瘍モデルマウスにアベマシクリブメシル酸塩を 50 及び 75 mg/kg の用量で 1 日 1 回、29 日間経口投与した（CCGS319 試験）。その結果、腫瘍体積はアベマシクリブの用量依存的に減少した（図 2.6.2-43）。29 日間投与後、50 及び 75 mg/kg 群の ΔT/C はそれぞれ 3.5%及び −14.9%であり、75 mg/kg 群で腫瘍退縮が認められた。両群において、腫瘍体積の減少は溶媒対照群と比較して統計学的に有意であった（$p<0.001$）。病勢コントロール率（SD＋PR＋CR）は 50 mg/kg 群で 100%（SD：4/7 例、PR：3/7 例）、75 mg/kg 群で 100%（SD：2/6 例、PR：4/6 例）であった。

同モデルに 50 mg/kg アベマシクリブ及び 0.1 mg 4-HT を 29 日間、各単独投与又は併用投与した結果、最終投与時点での ΔT/C は 4-HT 単独群及びアベマシクリブ／4-HT 併用群でそれぞれ 36.3%及び −42.9%であり、併用群で腫瘍退縮が認められた（図 2.6.2-43）。併用群における腫瘍体積の減少は、溶媒対照群並びに各単独群と比較して統計学的に有意であった（いずれも $p<0.001$）。病勢コントロール率（SD＋PR＋CR）は 4-HT 単独群で 20%（PR：1/5 例）、併用群で 100%（PR：7/7 例）であった。アベマシクリブ単独群と比較して、併用群では PR 例の増加が認められ、抗腫瘍効果の増強が示された。

同モデルに 50 mg/kg アベマシクリブメシル酸塩及び 5 mg フルベストラントを 29 日間、各単独投与又は併用投与した結果、最終投与時点での ΔT/C はフルベストラント単独群及びアベマシクリブ／フルベストラント併用群でそれぞれ 2.2%及び −37.8%であり、併用群で腫瘍退縮が認められた（図 2.6.2-44）。併用群における腫瘍体積の減少は、溶媒対照群並びに各単独群と比較して

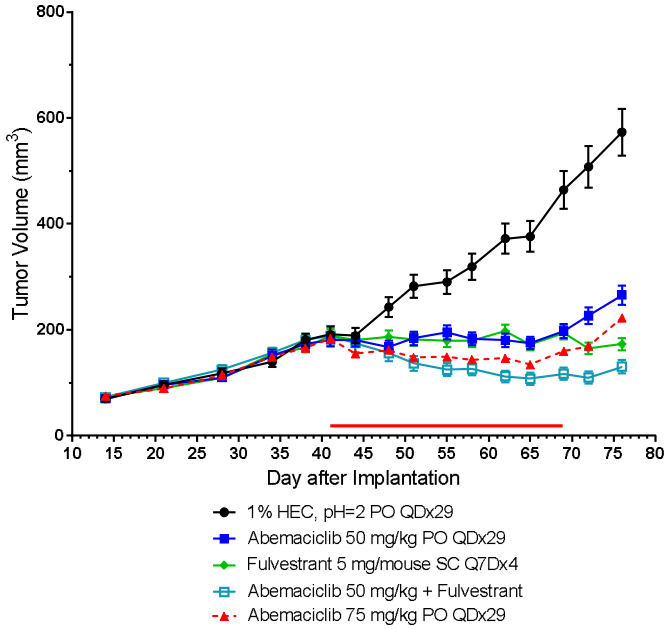
統計学的に有意であった（いずれも p<0.001）。病勢コントロール率（SD＋PR＋CR）はフルベストラント単独群で 86%（SD：2/7 例、PR：4/7 例）、併用群で 100%（PR：7/7 例）であった。アベマシクリブ単独群と比較して、併用群では PR 例の増加が認められ、抗腫瘍効果の増強が示された。

以上、T47-D モデルにおいて、アベマシクリブは単独投与で用量依存的な抗腫瘍効果を示し、4-HT 又はフルベストラントとの併用投与により抗腫瘍効果は顕著に増強し、腫瘍退縮が認められた。



略語：HEC＝ヒドロキシエチルセルロース、IP= 腹腔内投与、PO＝経口投与、QD＝1 日 1 回。
ヒト乳癌細胞株 T47-D の異種移植腫瘍モデルマウス（7 例/群）に、移植後 41 日目から溶媒、アベマシクリブメシル酸塩（50 又は 75 mg/kg、1 日 1 回経口投与）又は 4-ヒドロキシタモキシフェン（0.1 mg、5 日間腹腔内投与－2 日間休薬を 1 サイクルとする）を 29 日間、各単独投与又は併用投与した［溶媒：1% HEC を含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。アベマシクリブメシル酸塩 50 及び 75 mg/kg は、アベマシクリブ遊離塩基の 42 及び 63 mg/kg に相当する。腫瘍増殖誘導のため、移植前に 17β-エストラジオール徐放ペレットを埋め込んだ。腫瘍体積の平均値±標準誤差を示す。横線は投与期間。アベマシクリブ 75 mg/kg 群の 1 例は著しい体重減少のため、投与期間中に安楽殺した。4-ヒドロキシタモキシフェン群の 2 例は試験 48 及び 51 日目に死亡発見された。［添付資料 4.2.1.1.23、CCGS319 試験］

図 2.6.2-43　T47-D モデルにおける腫瘍増殖抑制（4-ヒドロキシタモキシフェンとの併用投与）



略語：HEC＝ヒドロキシエチルセルロース、PO＝経口投与、Q7D＝週 1 回、QD＝1 日 1 回、SC= 皮下投与。
ヒト乳癌細胞株 T47-D の異種移植腫瘍モデルマウス（7 例/群）に、移植後 41 日目から溶媒、アベマシクリブメシル酸塩（50 又は 75 mg/kg、1 日 1 回経口投与）又はフルベストラント（5 mg、週 1 回皮下投与）を 29 日間、各単独投与又は併用投与した［溶媒：1% HEC を含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。アベマシクリブメシル酸塩 50 及び 75 mg/kg は、アベマシクリブ遊離塩基の 42 及び 63 mg/kg に相当する。腫瘍増殖誘導のため、移植前に 17β-エストラジオール徐放ペレットを埋め込んだ。腫瘍体積の平均値±標準誤差を示す。横線は投与期間。アベマシクリブ 75 mg/kg 群の 1 例は著しい体重減少のため、投与期間中に安楽殺した。［添付資料 4.2.1.1.23、CCGS319 試験］

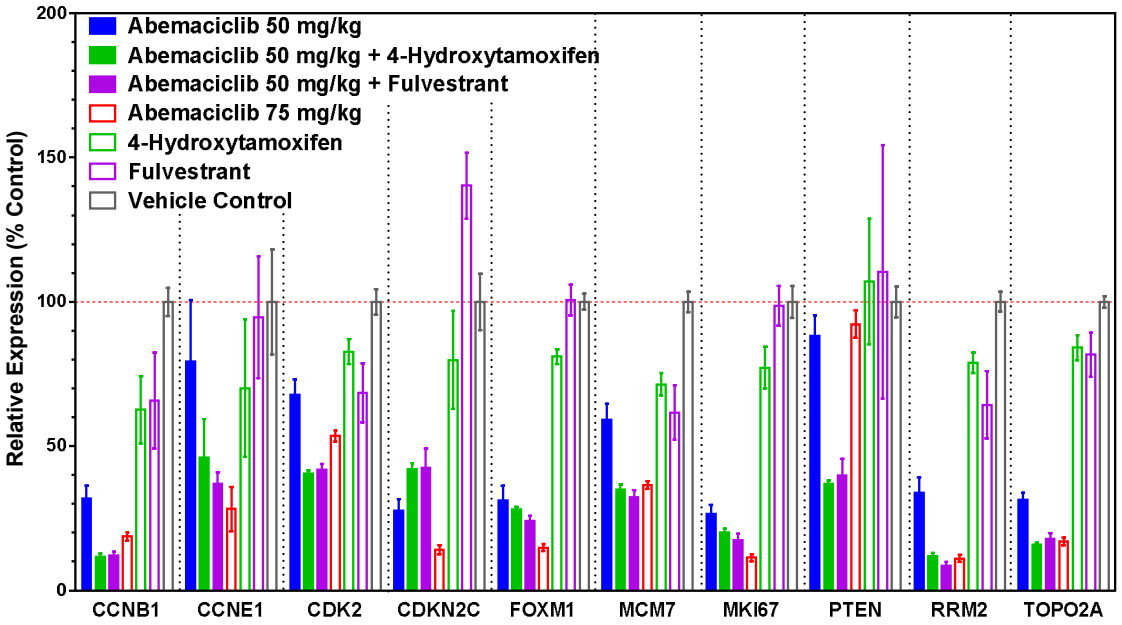
図 2.6.2-44　T47-D モデルにおける腫瘍増殖抑制（フルベストラントとの併用投与）

T47-D モデルに 50 mg/kg アベマシクリブメシル酸塩と 0.1 mg 4-HT 又は 5 mg フルベストラントを 5 日間、単独投与又は併用投与し、細胞周期マーカー及び細胞周期関連遺伝子の発現を評価した（CCGS319 試験）。その結果、アベマシクリブ単独群と同様に、4-HT 又はフルベストラント単独群においても pRb、TopoIIα及び pHH3 の阻害作用は認められたが、併用投与により阻害作用の増強が認められた（表 2.6.2-17）。4-HT 又はフルベストラントとの併用群における pRb、TopoIIα及び pHH3 の阻害は、溶媒対照群と比較して統計学的に有意であったが、アベマシクリブ単独群との比較では統計学的に有意な差は認められなかった。さらに、E2F 依存的に転写が制御される細胞周期関連遺伝子（CCNB1、CCNE1、CDK2、CDKN2C、FOXM1、MCM7、MKI67、PTEN、RRM2 及び TOPO2A）の mRNA 発現は、アベマシクリブと 4-HT 又はフルベストラントとの併用投与により顕著に阻害された（図 2.6.2-45）。以上、T47-D モデルにおいて、アベマシクリブと 4-HT 又はフルベストラントとの併用による抗腫瘍効果の増強は、CDK4/6 による Rb リン酸化や細胞周期の阻害作用の増強と関連しており、併用投与により細胞周期がほぼ完全に阻害されることが示された。

表 2.6.2-17　T47-D モデルにおける Rb リン酸化及び細胞周期の阻害
（4-ヒドロキシタモキシフェン又はフルベストラントとの併用投与）

投与群	pRb (%)	TopoIIα (%)	pHH3 (%)
溶媒対照	0.0 ± 5.9	0.0 ± 8.6	0.0 ± 3.1
50 mg/kg アベマシクリブ	52.9 ± 3.1*	74.9 ± 1.6*	69.2 ± 1.8*
75 mg/kg アベマシクリブ	76.6 ± 1.8*	87.3 ± 0.9*	79.3 ± 0.2*
0.1 mg 4-ヒドロキシタモキシフェン	23.0 ± 3.7	42.7 ± 2.6*	48.8 ± 1.9*
50 mg/kg アベマシクリブ ＋ 0.1 mg 4-ヒドロキシタモキシフェン	46.6 ± 8.2*	83.3 ± 2.7*	78.3 ± 1.1*
5 mg フルベストラント	28.9 ± 4.2	28.9 ± 4.7	33.1 ± 4.6*
50 mg/kg アベマシクリブ ＋ 5 mg フルベストラント	69.8 ± 3.4*	85.4 ± 1.3*	76.7 ± 0.8*

略語：pHH3 = リン酸化ヒストン H3、pRb = リン酸化 Rb、TopoIIα = トポイソメラーゼ IIα。
ヒト乳癌細胞株 T47-D の異種移植腫瘍モデルマウス（5 例/群）に、移植後 41 日目から溶媒、アベマシクリブメシル酸塩（50 又は 75 mg/kg、1 日 1 回経口投与）、4-ヒドロキシタモキシフェン（0.1 mg、5 日間腹腔内投与－2 日間休薬を 1 サイクル）又はフルベストラント（5 mg、週 1 回皮下投与）を 5 日間、各単独投与又は併用投与した［溶媒：1% HEC を含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。アベマシクリブメシル酸塩 50 及び 75 mg/kg は、アベマシクリブ遊離塩基の 42 及び 63 mg/kg に相当する。腫瘍増殖誘導のため、移植前に 17β-エストラジオール徐放ペレットを埋め込んだ。最終投与の 24 時間後に、異種移植片における pRb（$Ser^{807/811}$）、TopoIIα及び pHH3（Ser^{10}）の発現を免疫ブロット法で定量した。溶媒対照群を 0%とした阻害率を平均値±標準誤差で示す。
*p<0.0001（Tukey-Kramer、溶媒対照との比較）
［添付資料 4.2.1.1.23、CCGS319 試験］



ヒト乳癌細胞株 T47-D の異種移植腫瘍モデルマウス（5 例/群）に、移植後 41 日目から溶媒、アベマシクリブメシル酸塩（50 又は 75 mg/kg、1 日 1 回経口投与）、4-ヒドロキシタモキシフェン（0.1 mg、5 日間腹腔内投与）又はフルベストラント（5 mg、1 回皮下投与）を 5 日間、各単独投与又は併用投与した［溶媒：1% HEC を含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。アベマシクリブメシル酸塩 50 及び 75 mg/kg は、アベマシクリブ遊離塩基の 42 及び 63 mg/kg に相当する。腫瘍増殖誘導のため、移植前に 17β-エストラジオール徐放ペレットを埋め込んだ。最終投与の 24 時間後に、異種移植片における mRNA 発現を定量した。溶媒対照群に対する発現比を平均値±標準誤差で示す。［添付資料 4.2.1.1.23、CCGS319 試験］

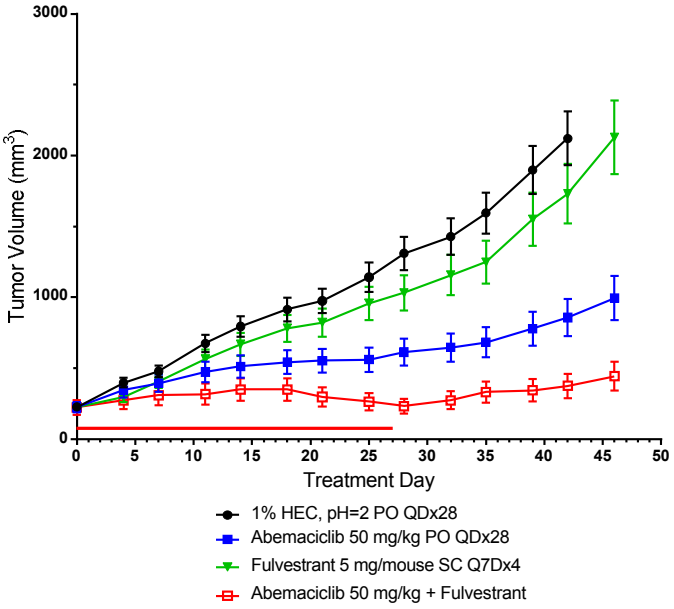
図 2.6.2-45　T47-D モデルにおける細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現の阻害
（4-ヒドロキシタモキシフェン又はフルベストラントとの併用投与）

2.6.2.2.2.2　ESR1 遺伝子変異により内分泌療法耐性を獲得した乳癌モデルにおける抗腫瘍効果

（添付資料 4.2.1.1.18、CCGS321 試験）

ERαの Y537S 変異を有する乳癌患者由来 ST941/HI の異種移植腫瘍モデルマウスに 50 mg/kg アベマシクリブメシル酸塩及び 5 mg フルベストラントを 28 日間、各単独投与又は併用投与した。その結果、最終投与時点での ΔT/C はアベマシクリブ単独群、フルベストラント単独群及びアベマシクリブ／フルベストラント併用群でそれぞれ 35.8%、74.5%及び 0.6%であった（図 2.6.2-46）。フルベストラント単独群における腫瘍体積の減少は限定的で、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な差は認められなかった（p = 0.339）。一方、併用群では腫瘍増殖がほぼ完全に抑制され、溶媒対照群並びに各単独群と比較して統計学的に有意であった（p<0.001）。病勢コントロール率（SD + PR + CR）はアベマシクリブ単独群で 20%（SD：1/5 例）、フルベストラント単独群で 0%（全例が PD）、併用群で 80%（SD：2/5 例、PR：2/5 例）であった。また、投与終了後の観察期間において、併用群では最終投与の約 2 週間後まで腫瘍増殖抑制が持続した。

以上、内分泌療法に耐性を示す ER 陽性乳癌モデルにおいて、アベマシクリブとの併用投与によりフルベストラントに対する感受性が回復することが示された。



略語：HEC = ヒドロキシエチルセルロース、PO = 経口投与、Q7D = 週 1 回、QD = 1 日 1 回、SC= 皮下投与。
ヒト乳癌患者由来腫瘍 ST941/HI の異種移植腫瘍モデルマウス（5 例/群）に、溶媒、アベマシクリブメシル酸塩（50 mg/kg、1 日 1 回経口投与）又はフルベストラント（5 mg、週 1 回皮下投与）を 28 日間、各単独投与又は併用投与した［溶媒：1% HEC を含む 25 mM リン酸緩衝液（pH 2）］。50 mg/kg アベマシクリブメシル酸塩はアベマシクリブ遊離塩基の 42 mg/kg に相当する。腫瘍体積の平均値±標準誤差を示す。横線は投与期間。［添付資料 4.2.1.1.18、CCGS321 試験］

図 2.6.2-46　ESR1 変異を有する乳癌 ST941/HI モデルにおける腫瘍増殖抑制（フルベストラントとの併用投与）

2.6.2.3　副次的薬理試験

該当なし

2.6.2.4 安全性薬理試験

日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S7A 及び B ガイドラインに準拠し、アベマシクリブの in vitro hERG 試験、イヌを用いた心血管系安全性薬理試験並びにラットを用いた中枢神経系及び呼吸器系安全性薬理試験を実施した。また、ヒト血漿中で検出された代謝物 M2、M18 及び M20 について、in vitro hERG 試験を実施した。代謝物の hERG 試験を除き、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）に従って実施した。本項に記載したアベマシクリブの安全性薬理試験は、アベマシクリブ遊離塩基を用いて実施した。代謝物の安全性薬理試験は、M2 メシル酸塩（LSN2839543）、M18 メシル酸塩（LSN3151114）及び M20 メシル酸塩（LSN3151113）を用いて実施した。

2.6.2.4.1 アベマシクリブの in vitro hERG 阻害作用

（添付資料 4.2.1.3.1、090210.FMD 試験）

アベマシクリブの hERG チャネル電流阻害作用を in vitro で評価した。試験溶媒（0.3% DMSO‐HEPES 緩衝生理食塩液、pH 7.4）における溶解度の限界から、試験最高濃度は 1.65 μM とし、低用量に 0.18 μM を設定した。陽性対照にはテルフェナジン（60 nM）を用いた。アベマシクリブの hERG チャネル電流阻害率は、0.18 及び 1.65 μM でそれぞれ 4.4 ± 1.4%及び 33.7 ± 4.9%であり（平均値±標準偏差、n = 3）、1.65 μM で溶媒対照と比較して統計学的に有意な阻害作用を示した（$p<0.05$）。IC_{50} 値は 1.65 μM 以上と推定された。

2.6.2.4.2 代謝物 M2、M18 及び M20 の in vitro hERG 阻害作用

（添付資料 4.2.1.3.2、140516.FMD 試験）

代謝物 M2 メシル酸塩（LSN2839543）、M18 メシル酸塩（LSN3151114）及び M20 メシル酸塩（LSN3151113）の hERG チャネル電流阻害作用を in vitro で評価した。試験濃度は臨床曝露量及びそれを超える濃度として 0.3、1、3 及び 10 μM を設定した（試験溶媒：0.3% DMSO‐HEPES 緩衝生理食塩液）。陽性対照にはシサプリド（0.05 μM）を用いた。M2、M18 及び M20 の 10 μM における hERG チャネル電流阻害率（平均値±標準偏差）はそれぞれ 24.9 ± 8.0%（n = 3）、10.9 ± 4.3%（n = 4）及び 22.1 ± 5.2%（n = 4）であり、いずれの代謝物も IC_{50} 値は 10 μM 以上と推定された。

2.6.2.4.3 イヌ心血管系安全性薬理試験

（添付資料 4.2.1.3.3、692944 試験）

12 ヵ月齢の雄ビーグル犬にアベマシクリブを単回経口投与し、投与後 48 時間までの血行動態及び心電図パラメータに対する作用をテレメトリーで評価した。用量はイヌ 28 日間反復投与毒性試験（CTD 第 2.6.6.3.3 項）と同じ 10 及び 1 mg/kg を設定し、さらに低用量に 0.3 mg/kg を設定した。試験デザインを表 2.6.2-18 に示す。

表 2.6.2-18 イヌ心血管系安全性薬理試験の試験デザイン

用量 (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	例数	評価パラメータ
0[a]	0	1	雄 8[b]	死亡、一般状態、心電図（投与後 48 時間まで）、心拍数、左心室圧、全身血圧
0.3	0.3	1		
1.0	1.0	1		
10	10	1		

a 溶媒対照群：1%ヒドロキシエチルセルロース、0.25%ポリソルベート 80、0.05% Dow Corning Antifoam 1510-US 水溶液

b 投与間隔を 7 日間以上とする 4 群 4 期のラテン方格クロスオーバー法により実施。

10 mg/kg 群において、収縮期血圧の軽度の低下（平均 3.9%）が投与後 12～21 時間に認められたが、軽度で短期間の低下であったため生理的に意味のある変化ではないと考えられた。また、10 mg/kg 群の 1 例で、投与後 22～48 時間に心室性期外収縮、発作性心室性頻拍及び頻脈性固有心室調律が認められた。心室性不整脈は高用量で発現したことから投与に関連した変化である可能性は完全に否定できないものの、投与後 22 時間以降に発現していること、他の個体で不整脈は発現していないことから、左心室圧トランスデューサや心電図陽電極の挿入部位から生じる心室刺激に起因する可能性が高い。したがって、本所見の毒性学的意義は低いと判断した。イヌ心血管系に対する無影響量（NOEL）は 1 mg/kg とした。

2.6.2.4.4 ラット中枢神経系安全性薬理試験

（添付資料 4.2.1.3.4、692942 試験）

約 8 週齢の雄 Sprague Dawley 系ラットにアベマシクリブを単回経口投与し、投与後 48 時間まで中枢神経系に対する作用を評価した。用量は、ラット 28 日間反復投与毒性試験（CTD 第 2.6.6.3.1 項）と同じ 10、30 及び 50 mg/kg に設定した。試験デザインを表 2.6.2-19 に示す。

表 2.6.2-19 ラット中枢神経系安全性薬理試験の試験デザイン

用量 (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	例数	評価パラメータ
0[a]	0	10	雄 8	死亡、一般状態、FOB（投与後 48 時間まで）
10	1.0	10	雄 8	
30	3.0	10	雄 8	
50	5.0	10	雄 8	
クロルプロマジン 20 mg/kg（陽性対照）	2	10	雄 8	

略語：FOB = 機能観察総合評価。

a 溶媒対照群：1%ヒドロキシエチルセルロース、0.25%ポリソルベート 80、0.05% Dow Corning Antifoam 1510-US 水溶液

アベマシクリブ投与群では、溶媒対照群と比較して特記すべき変化は認められず、ラット中枢神経系に対する NOEL は 50 mg/kg（試験最高用量）とした。

2.6.2.4.5 ラット呼吸器系安全性薬理試験

（添付資料 4.2.1.3.5、692943 試験）

約 8 週齢の雄 Sprague Dawley 系ラットにアベマシクリブを単回経口投与し、投与後 48 時間まで呼吸器系に対する作用を評価した。用量は、ラット 28 日間反復投与毒性試験の用量（CTD 第 2.6.6.3.1 項）と同じ 10、30 及び 50 mg/kg に設定した。試験デザインを表 2.6.2-20 に示す。

表 2.6.2-20 ラット呼吸器系安全性薬理試験の試験デザイン

用量 (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	例数	評価パラメータ
0[a]	0	10	雄 8	死亡、一般状態、呼吸機能（呼吸数、一回換気量及び分時換気量：投与後 48 時間まで）
10	1.0	10	雄 8	
30	3.0	10	雄 8	
50	5.0	10	雄 8	

[a] 溶媒対照群：1%ヒドロキシエチルセルロース、0.25%ポリソルベート 80、0.05% Dow Corning Antifoam 1510-US 水溶液。

アベマシクリブ投与群では、溶媒対照群と比較して特記すべき変化は認められず、ラット呼吸器系に対する NOEL は 50 mg/kg（試験最高用量）とした。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

該当なし。

2.6.2.6 考察及び結論

細胞周期の G1 期から S 期への進行を制御するチェックポイントである制限点は、CDK4/6 などの細胞周期制御因子によって調節されている。CDK4/6 はサイクリン D（D1、D2 又は D3）と複合体を形成することにより活性化し、細胞周期の負の制御因子である Rb をリン酸化してその増殖抑制作用を不活性化する。アベマシクリブは CDK4/6 の選択的阻害剤であり、CDK4/6－サイクリン D 複合体による Rb のリン酸化を阻害することで癌細胞の細胞周期の進行及び増殖を阻害する。

無細胞系での評価において、アベマシクリブの CDK4 及び CDK6 に対する IC_{50} 値はいずれも 10 nM 未満であった。CDK4－サイクリン D1 及び CDK6－サイクリン D3 に対する Ki^{ATP} 値はそれぞれ 0.6 及び 8.2 nM であり、アベマシクリブは CDK4－サイクリン D1 に約 14 倍選択的であった。細胞増殖がどの CDK4/6－サイクリン D 複合体により依存しているかは組織間で異なるため、アベマシクリブに対する反応は組織間で異なる可能性がある。乳癌では CDK4 及びサイクリン D1 がドライバー遺伝子と考えられているため、乳癌の増殖における CDK4－サイクリン D1 の重要性は特に高いと考えられる。

種々の in vitro 及び in vivo 試験において、アベマシクリブは CDK4/6 を介した Rb リン酸化を濃度依存的に阻害した。細胞周期マーカー（S 期：TopoIIα、G2/M 期：pHH3）、DNA 量及び E2F 依存的な細胞周期関連遺伝子（例えば CCNA、CCNE1、MCM7 や CDK2）の発現を指標にした多角的評価から、Rb リン酸化の阻害に相関した細胞周期及び細胞増殖の阻害が示された。また、ヒト血漿中の主代謝物である M2 及び M20 は、アベマシクリブと同程度の効力で CDK4/6 キナーゼ活性、細胞周期及び細胞増殖を阻害し、細胞老化を誘導した。

癌細胞パネルを用いた解析では、アベマシクリブに対する感受性に影響を与える因子が明らかになり、乳癌では luminal 型の ER 陽性細胞株が最も高い感受性を示した。また、高感受性細胞株の集団では CCND1 増幅が高頻度に認められ、これはサイクリン D1 が CDK4/6 に必須の活性化因子であるという知見と一致した。乳癌以外の癌種においても、サイクリン D を高発現させる遺伝子変異がアベマシクリブに対する感受性因子として同定された。一方、低感受性細胞株の集団では Rb 陰性（変異型 Rb 又は Rb 欠失）が高頻度に認められた。Rb 陰性細胞株では CDK4/6 非依存的な機序による増殖が優位になるため、アベマシクリブの効果が減弱すると考えられる。アベマシクリブを含む CDK4/6 阻害剤に耐性を獲得した細胞株で Rb 発現量の顕著な減少が認められたことや、細胞株や担癌モデルにおいてアベマシクリブによる Rb リン酸化の阻害と細胞増殖阻害作用が相関したことからも、アベマシクリブの作用発現における Rb の重要性が示された。

In vivo 試験では、ヒト腫瘍の担癌モデルを用いて CDK4/6 キナーゼ活性及び細胞周期の阻害を評価し、また抗腫瘍効果を評価した。ER 陽性乳癌を含む種々の異種移植腫瘍モデルマウスにおいて、アベマシクリブは用量依存的に腫瘍増殖を抑制し、その抑制作用には Rb リン酸化／細胞周期マーカーの阻害や E2F 依存的な細胞周期関連遺伝子の発現抑制との関連性が認められた。また、アベマシクリブはサイクリン D1、D2 又は D3 を高発現する乳癌の異種移植腫瘍モデルマウスにおいて顕著な抗腫瘍効果を示した。さらに、神経膠芽細胞腫細胞株 U87 MG の同所性異種移植モデルラットの生存期間を用量依存的に延長し、中枢神経系の腫瘍に対する抗腫瘍効果が示された。

結腸直腸癌細胞株 Colo205 の異種移植腫瘍モデルマウスにおいて、アベマシクリブの単回経口投与により異種移植片における pRb 及び細胞周期マーカーの発現は投与 24 時間後まで阻害されたが、それ以降は阻害作用が減弱し、48 時間後にはリバウンドによる pRb 及び細胞周期マーカーの発現量の高値が認められた。一方、MCF-7 を含む ER 陽性乳癌細胞株の異種移植腫瘍モデルマウスにアベマシクリブを反復投与した場合には、最終投与の数週間後まで腫瘍増殖抑制作用が持続した。したがって、長期間の有効性を得るためには、アベマシクリブの反復投与により CDK4/6 を持続的に阻害することが重要であると考えられた。

持続的な CDK4/6 の阻害が有効性の発現に重要であることは、ER 陽性乳癌においてアベマシクリブによる細胞老化及びアポトーシスの誘導が時間依存的であり、より長期間の曝露で強い誘導が認められたことからも示された。アポトーシスの誘導は癌細胞数の減少につながるため有効性に寄与することは明らかであるが、細胞老化の誘導も同様に有効性の発現に寄与すると考えられる。すなわち、細胞老化は腫瘍による組織侵襲に抵抗し、前癌細胞集団の更なる増殖を防ぐために惹起される正常かつ生理的な抗腫瘍反応である。老化細胞は増殖能を失い、細胞の大型化及び平坦化、空胞化、β-ガラクトシダーゼ染色陽性などの形態学的特徴を示す。また、老化細胞は senescence-associated secretory phenotype（SASP）と呼ばれる炎症反応を誘導することでヘルパー T 細胞やマクロファージなどの免疫細胞を動員し、老化細胞を除去する炎症性微小環境を形成する。ER 陽性乳癌において、アベマシクリブ処置により老化細胞の特徴に一致する増殖能の消失、β-ガラクトシダーゼ染色陽性及び SAHF が認められたことから、同時に誘導されるアポトーシスと併せて細胞老化はアベマシクリブの抗腫瘍効果に寄与すると考えられる。さらに、ER 陽性乳癌ではアベマシクリブ処置により ERα発現量が減少したことから、アベマシクリブによる細胞老

化及びアポトーシスの誘導には細胞周期に対する作用と ER 依存的細胞増殖シグナルに対する作用の両方が寄与している可能性が考えられる。

細胞老化及びアポトーシスの誘導に加えて、アベマシクリブは乳癌の細胞代謝にも影響を与えた。アベマシクリブは ATP 産生に必要な種々の TCA サイクル中間代謝物の細胞内濃度を減少させ、グルタミン欠乏条件下で細胞の生存を阻害した。また、in vitro 試験でアベマシクリブは血管新生を阻害したことから、アベマシクリブは癌細胞に対する直接的な作用に加えて、癌細胞を栄養する局所腫瘍血管系を変化させてその生存を阻害する可能性も示唆された。

以上、一連の作用機序に関する検討から、アベマシクリブは濃度依存的に細胞老化及びアポトーシスを誘導するほか、細胞代謝を障害することで癌細胞の増殖を阻害し、また生存を阻害することが明らかとなった。また、アベマシクリブによる細胞老化及びアポトーシスの誘導は時間依存的であり、CDK4/6 を持続的かつ強力に阻害することが有効性の発現に重要であることが示された。

種々の担癌モデルマウスにおいて、アベマシクリブは単独投与で顕著な抗腫瘍効果を示したが、ER 陽性乳癌においては内分泌療法（4-HT 及びフルベストラント）との併用により抗腫瘍効果の増強が認められた。ER 陽性乳癌を用いた in vitro 試験において、アベマシクリブにより誘導される ERα発現量及び細胞周期関連遺伝子発現量の減少がフルベストラントとの併用により増強された。アベマシクリブをフルベストラントと併用することで、ERα依存的な細胞増殖シグナルが抑制されるほか、E2F 依存的な細胞周期関連遺伝子の発現も強力に抑制されるため、細胞周期の G1 期での停止や細胞増殖阻害作用がより顕著に誘導されると考えられる。フルベストラントとの併用による効力の増強は in vivo 試験でも認められた。ER 陽性乳癌の異種移植腫瘍モデルマウスにおいて、アベマシクリブを 4-HT 又はフルベストラントと併用投与することで抗腫瘍効果の増強が認められ、このとき Rb リン酸化や細胞周期マーカーに対する阻害作用の増強が認められた。さらに、ESR1 遺伝子変異により内分泌療法への耐性を獲得した乳癌患者由来 ST941/HI の異種移植腫瘍モデルマウスにおいて、アベマシクリブは単独投与で抗腫瘍効果を示すほか、フルベストラントに対する感受性を回復させることが示された。

安全性薬理試験では、心血管系、中枢神経系及び呼吸器系に対するアベマシクリブの作用を評価した。In vitro hERG 試験において、アベマシクリブは最高濃度の 1.65 μM で hERG チャネル電流を 33.7%阻害した。臨床推奨用量（150 mg、1 日 2 回投与）におけるアベマシクリブの最高血漿中濃度（C_{max}）は 247 ng/mL（0.49 μM）である（I3Y-MC-JPBL 試験、CTD 第 2.7.2.3.3.5.1 項）。また、アベマシクリブの活性代謝物 M2、M18 及び M20 の hERG チャネル電流の IC_{50} 値はいずれも 10 μM 以上と推定された。10 μM は乳癌患者にアベマシクリブ 200 mg を 1 日 2 回投与したときの各代謝物の C_{max}（I3Y-MC-JPBA 試験、CTD 第 2.7.2.2.2.2.1.2 項）と比較してそれぞれ約 37 倍、126 倍及び 27 倍に相当する。In vitro hERG 試験の結果から、臨床推奨用量（150 mg、1 日 2 回投与）において hERG チャネル電流が阻害される可能性は低いと考えられる。

イヌ心血管系安全性薬理試験では、10 mg/kg 群で収縮期血圧の軽度の低下が認められたほか、1 例に心室性不整脈が認められた。このときの C_{max} は 158～162 ng/mL と推定され（イヌ 28 日間反復投与毒性試験の投与 1 日目のデータに基づく）、JPBL 試験における C_{max}（247 ng/mL）の約 0.64 倍である。しかしながら、収縮期血圧の低下は軽度かつ一時的な変化であったこと、また心室性不整脈は実験操作に起因する可能性が高いと判断されたことから、いずれも毒性学的な重要

性は低いと考えられた。また、同試験において補正 QT 間隔の延長は認められず、イヌ反復投与毒性試験（最高用量：10 mg/kg）においても心電図異常は認められなかったことから、臨床推奨用量においてアベマシクリブがヒトの心血管系に重大な影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。なお、臨床試験においてもアベマシクリブ投与に伴う臨床的に問題となる心血管系の重篤な有害事象（QT/QTc 間隔の延長など）は認められていない（CTD 第 2.7.4.4.2.1 項）。

ラットを用いた呼吸器系及び中枢神経系安全性薬理試験の NOEL はいずれも 50 mg/kg であった。このときの C_{max} は 1152～1330 ng/mL と推定され（ラット 28 日間反復投与毒性試験の投与 1 日のデータに基づく）、JPBL 試験における C_{max}（247 ng/mL）との曝露量比は 4.7～5.4 倍である。したがって、アベマシクリブは臨床推奨用量においてヒトの中枢神経系及び呼吸器系機能に重大な影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

以上、in vitro 及び in vivo 薬効薬理試験から乳癌におけるアベマシクリブの抗腫瘍効果及びその作用機序が明らかになった。また、安全性薬理試験において、臨床上問題となる安全性の懸念は示されなかった。

2.6.2.7 図表

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

Finn RS, Dering J, Conklin D, Kalous O, Cohen DJ, Desai AJ, et al. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. Breast Cancer Res. 2009;11:R77.

Jeselsohn R, Yelensky R, Buchwalter G, Frampton G, Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM, et al. Emergence of constitutively active estrogen receptor-α mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer. Clin Cancer Res. 2014 Apr 1;20(7):1757-67.

Reynolds MR, Lane AN, Robertson B, Kemp S, Liu Y, Hill BG, et al. Control of glutamine metabolism by the tumor suppressor Rb. Oncogene. 2014 Jan 30;33(5):556-66.

Toy W, Shen Y, Won H, Green B, Sakr RA, Will M, et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. Nat Genet. 2013 Dec;45(12):1439-45.

ベージニオ錠 50mg
ベージニオ錠 100mg
ベージニオ錠 150mg

2.6.3　薬理試験概要表

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.3 Pharmacology Tabulated Summary 1
2.6.3.1 Pharmacology: Overview 1
2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics 4
2.6.3.3 Secondary Pharmacodynamics 4
2.6.3.4 Safety Pharmacology 5
2.6.3.5 Pharmacodynamic Drug Interactions 6

2.6.3 Pharmacology Tabulated Summary

2.6.3.1 Pharmacology: Overview

Type of Study	Test System	Route of Administration	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics – In vitro					
Biochemical activity and mechanism of action	Cell free kinase assay, immunoblotting and flow cytometry	In vitro	Eli Lilly and Company	Gelbert et al. 2014	4.2.1.1.1
Kinetic assessment	Cell free kinase assay	In vitro	Eli Lilly and Company	QSB40	4.2.1.1.2
Mechanism of action (abemaciclib and metabolites M2, M18, M20 and M22)	Cell free kinase assay, growth inhibition assay, immunoblotting, and flow cytometry	In vitro	Eli Lilly and Company	CCGS293	4.2.1.1.3
Mechanism of action	Immunoblotting	In vitro	Eli Lilly and Company	CCGS311	4.2.1.1.4
Characterization of transcriptional changes	RT-PCR in breast cancer cell lines	In vitro	Eli Lilly and Company	CCGS302	4.2.1.1.5
Cell cycle analysis	Flow cytometry in breast cancer cell lines	In vitro	Eli Lilly and Company	CCGS15	4.2.1.1.6
Cell-based predictors of response	Growth inhibition assay	In vitro	Eli Lilly and Company	CCGS292	4.2.1.1.7
Characterization of CDK4/6 inhibitor resistance	Immunoblotting and flow cytometry in CDK4/6-resistant cell lines	In vitro	Eli Lilly and Company	CCGS294	4.2.1.1.8
Cell-based predictors of response	Growth inhibition assay, immunofluorescence and fluorescent imaging in breast cancer cell lines	In vitro	Eli Lilly and Company	CCGS291	4.2.1.1.9
Mechanism of action	Immunoblotting and flow cytometry in breast cancer cell lines	In vitro	Eli Lilly and Company	CCGS304	4.2.1.1.10
Mechanism of action	High content imaging assay, flow cytometry and LC/MS in breast cancer cell lines	In vitro	Eli Lilly and Company	QSB35	4.2.1.1.11

(Continued)

2.6.3.1 Pharmacology: Overview (Continued)

Type of Study	Test System	Route of Administration	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics – In vitro (continued)					
Characterization of angiogenicity	HUVEC and CAF co-culture; ECFC/ADSC and 786-0 cancer cells co-culture	In vitro	Eli Lilly and Company	IMC38	4.2.1.1.12
Combination with endocrine therapy	Growth inhibition assay, immunoblotting, and RT-PCR	In vitro	Eli Lilly and Company	CCGS320	4.2.1.1.13
Primary Pharmacodynamics – In vivo					
In vivo target inhibition – Colorectal cancer	Mouse, CD1 nu/nu Colo205 xenograft model	Oral gavage	Eli Lilly and Company	CCGS14	4.2.1.1.14
In vivo efficacy – Mantle cell lymphoma	Mouse, Fox Chase CB17 SCID Jeko-1 xenograft model	Oral gavage	Eli Lilly and Company	CCGS185	4.2.1.1.15
In vivo efficacy – Breast cancer	Mouse, NOD SCID ZR-75-1 xenograft model	Oral gavage	Eli Lilly and Company	CCGS303	4.2.1.1.16
In vivo efficacy – Breast cancer	Mouse CD-1 nude MCF-7 xenograft model	Oral gavage	Eli Lilly and Company	CCGS314	4.2.1.1.17
In vivo efficacy – Breast cancer	Mouse, athymic nude (Crl:NU(NCr)-Foxn1^{nu}) ST941/HI PDX model	Oral gavage	Eli Lilly and Company	CCGS321	4.2.1.1.18
In vivo efficacy – Gastric cancer	Mouse, Balb/c nude GAF-152 PDX model	Oral gavage	Eli Lilly and Company	CCGS295	4.2.1.1.19
In vivo efficacy – SCLC	Mouse, Harlan athymic nude DMS-35 xenograft model	Oral gavage	Eli Lilly and Company	CCGS296	4.2.1.1.20
In vivo efficacy – Breast cancer	Mouse, NOD SCID Gamma MDA-MB-453 xenograft model	Oral gavage	Eli Lilly and Company	CCGS328	4.2.1.1.21
In vivo efficacy – Orthotopic brain tumor	Rat, NIH-RNU U87 MG brain implantation model	Oral gavage	Eli Lilly and Company	CCGS19	4.2.1.1.22
In vivo efficacy – Breast cancer	Mouse, NOD SCID Gamma T47-D xenograft model	Oral gavage	Eli Lilly and Company	CCGS319	4.2.1.1.23

(Continued)

2.6.3.1 Pharmacology: Overview (Concluded)

Type of Study	Test System	Route of Administration	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Secondary Pharmacodynamics					
Not applicable					
Safety Pharmacology					
Effects on hERG channel[a]	HEK293 cells	In vitro	[redacted]	090210.FMD	4.2.1.3.1
Metabolite effects on hERG channel	HEK293 cells	In vitro	[redacted]	140516.FMD	4.2.1.3.2
Effects on cardiovascular system[a]	Dog, Beagle	Oral gavage	[redacted]	692944	4.2.1.3.3
Effects on CNS and behavior[a]	Rat, Sprague Dawley	Oral gavage	[redacted]	692942	4.2.1.3.4
Effects on respiratory system[a]	Rat, Sprague Dawley	Oral gavage	[redacted]	692943	4.2.1.3.5
Pharmacodynamic Drug Interactions					
Not applicable					

Abbreviations: ADSC = adipose derived stem cells, CAF = cultured lung cancer associated fibroblast cells, CDK = cyclin-dependent kinase, CNS = central nervous system, ECFC = endothelial colony forming cells, HEK = human embryonic kidney, hERG = human ether-à-go-go-related gene, HUVEC = human umbilical vein endothelial cells, LC/MS = liquid chromatography and mass spectrometry, NOD = non-obese diabetic, PDX = patient-derived xenograft, RT-PCR = reverse transcription-polymerase chain reaction, SCID = severe combined immune deficiency, SCLC = small cell lung cancer.

[a] Contains a GLP compliance statement.

2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics

See the Pharmacology Written Summary, Section 2.6.2.

2.6.3.3 Secondary Pharmacodynamics

Not applicable

2.6.3.4 Safety Pharmacology

Organ Systems Evaluated	Species, Strain	Route of Administration	Test article Doses[a]	Sex #/Group	Noteworthy Findings	GLP	Document ID	Location in CTD
Cardiovascular Ion channel	HEK293 cells transfected with hERG clone	In vitro	Abemaciclib: 0.18, 1.65 μM	NA	Inhibition rate for hERG potassium current at 0.18 and 1.65 μM were 4.4 ± 1.4% and 33.7 ± 4.9%. IC_{50} > 1.65 μM	Yes	090210.FMD	4.2.1.3.1
Cardiovascular Ion channel	HEK293 cells transfected with hERG clone	In vitro	Metabolites M2, M18, M20: 0.3, 1, 3, 10 μM	NA	IC_{50} > 10 μM for M2, M18 and M20	No	140516.FMD	4.2.1.3.2
Cardiovascular Effects	Dog, Beagle	Oral gavage	0.3, 1, 10 mg/kg	Males 8	1 mg/kg: NOEL 10 mg/kg: ↓ systolic blood pressure 12-21 hours postdose (3.9%); VPCs and paroxysmal ventricular tachycardia or accelerated idioventricular rhythm 22-48 hours postdose (1 animal)	Yes	692944	4.2.1.3.3
Central Nervous System and Behavioral Effects	Rat, Sprague Dawley	Oral gavage	10, 30, 50 mg/kg	Males 8/group	50 mg/kg: NOEL	Yes	692942	4.2.1.3.4
Respiratory Effects	Rat, Sprague Dawley	Oral gavage	10, 30, 50 mg/kg	Males 8/group	50 mg/kg: NOEL	Yes	692943	4.2.1.3.5

Abbreviations: # = number, ↓ = decreased, NOEL = no-observed-effect level, VPCs = ventricular premature complexes, NA = not applicable, HEK = human embryonic kidney, hERG = human ether-à-go-go-related gene.

[a] Single doses of abemaciclib unless specified otherwise.

2.6.3.5 Pharmacodynamic Drug Interactions

Not applicable