TABLE OF CONTENTS

1. 緒言 2
1.1. 医薬品の構造及び薬理学的特徴 2
1.2. 予定する効能又は効果と用法及び用量 3

LIST OF FIGURES

Figure 1: レナリドミド水和物の化学構造式 2

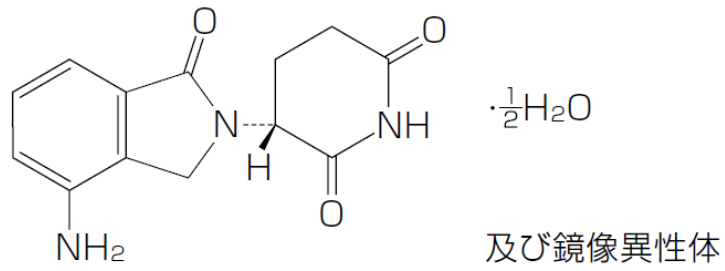
1. 緒言

1.1. 医薬品の構造及び薬理学的特徴

レナリドミド水和物（JAN、以下「レナリドミド」）は、サリドマイドの構造類似体であり、多発性骨髄腫等の血液腫瘍細胞に対する直接的細胞傷害作用の他、各種免疫細胞からのサイトカイン産生調整作用等を有する免疫調節薬である。「再発又は難治性の多発性骨髄腫」を効能・効果として2010 年 6 月に製造販売承認を取得した後、「5 番染色体長腕部欠失を伴う骨髄異形成症候群」の効能・効果で 2010 年 8 月に、また、未治療の多発性骨髄腫を含む「多発性骨髄腫」を効能・効果として 2015 年 12 月に承認事項一部変更承認（一変承認）を取得した。さらに、2017 年 3 月には「再発又は難治性の成人 T 細胞白血病リンパ腫」を効能・効果として一変承認を取得した。

レナリドミドの化学名は、（3*RS*）-3-（4-アミノ-1-オキソ-1,3-ジヒドロ-2*H*-イソインドール-2-イル）ピペリジン-2,6-ジオン 1/2 水和物で、分子式は $C_{13}H_{13}N_3O_3 \cdot 1/2\ H_2O$、分子量は 268.27 である。化学構造式を Figure 1 に示す。

Figure 1: レナリドミド水和物の化学構造式



今回の「再発又は難治性の低悪性度 B 細胞性非ホジキンリンパ腫」に対する効能・効果追加の承認事項一部変更申請では、非臨床薬理試験において、レナリドミド処置によってエフェクターT 細胞、ナチュラルキラー細胞及びナチュラルキラー T 細胞が増殖及び活性化され、*ex vivo* の試験系においては健康人及び濾胞性リンパ腫患者の末梢血単核細胞サンプルで、レナリドミドの処置によるサイトカイン産生・遊離が観察された。さらに濾胞性リンパ腫細胞株に対するリツキシマブとの併用処置では、単独処置と比較して、末梢血単核細胞媒介性及び直接的な細胞傷害作用の増強を示した。またリツキシマブとの併用処置では、ベンダムスチン抵抗性細胞株に対する抗腫瘍活性も示した。

レナリドミドの脾辺縁帯リンパ腫細胞株に対する細胞傷害作用は末梢血単核細胞媒介性作用だけでなく、直接的作用も存在することが示された。また、レナリドミド単独処置による直接的な抗増殖活性やアポトーシス誘導作用はリツキシマブとの併用処置でさらに増強されることが示された。さらに、レナリドミド単独処置は濃度依存的に脾辺縁帯リンパ腫細胞に対する末梢血単核細胞媒介性細胞傷害を増強した。これはグランザイム B 遊離と良好な相関性を示したことから、ナチュラルキラー細胞の活性化を示唆する結果であった。また、末梢血単核細胞共培養下での 脾辺縁帯リンパ腫細胞株に対する細胞傷害作用はレナリドミドで増強されるが、リツキシマブとの併用処置により更に増強された。

1.2. 予定する効能又は効果と用法及び用量

今般、以下の【効能又は効果】並びに【用法及び用量】にて、承認事項一部変更承認申請を行う。

【効能又は効果】

再発又は難治性の低悪性度 B 細胞性非ホジキンリンパ腫

【用法及び用量】

リツキシマブ（遺伝子組換え）との併用において、通常、成人にはレナリドミドとして 1 日 1 回 20mg を 21 日間連日経口投与した後、7 日間休薬する。これを 1 サイクルとして最大 12 サイクルまで投与を繰り返す。なお、患者の状態により適宜減量する。

TABLE OF CONTENTS

略号一覧 4
1. まとめ 5
2. 効力を裏付ける試験 6
2.1. リンパ腫モデルにおける *in vitro* 活性 6
2.1.1. 濾胞性リンパ腫 6
2.1.1.1. 免疫細胞及び濾胞性リンパ腫細胞間に形成される免疫シナプスに対する影響 6
2.1.1.2. 未治療及び再発／難治性の濾胞性リンパ腫患者末梢血単核細胞における T 細胞及びナチュラルキラー細胞に対するレナリドミドの増殖促進及び活性化能 13
2.1.2. 脾辺縁帯リンパ腫 23
2.1.2.1. 脾辺縁帯リンパ腫細胞株に対する直接的な増殖抑制作用及び細胞傷害作用、並びに健康人由来末梢血単核細胞媒介性の細胞傷害作用に対する影響 23
2.1.2.2. 脾辺縁帯リンパ腫細胞株に対する健康人及び辺縁帯リンパ腫患者由来の末梢血単核細胞媒介性の細胞傷害作用に対する影響、並びに直接的細胞傷害作用 27
3. 副次的薬理試験 29
4. 安全性薬理試験 29
5. 薬力学的薬物相互作用試験 29
6. 考察及び結論 30
7. 参考文献 31

LIST OF TABLES

Table 1: 略号一覧 4

Table 2: 健康人及び濾胞性リンパ腫患者の免疫刺激末梢血単核細胞サンプルにおける、DMSO 処置 3 日目のサイトカイン及びケモカインの産生（基礎分泌量） 16

LIST OF FIGURES

Figure 1: CD4 陽性 T 細胞及び自己濾胞性リンパ腫細胞間に形成される免疫シナプスにおける F アクチン発現に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の作用 7

Figure 2: CD8 陽性 T 細胞及び自己濾胞性リンパ腫細胞間に形成される免疫シナプスにおける F アクチン発現に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の作用 8

Figure 3: ナチュラルキラー細胞及び自己濾胞性リンパ腫細胞間に形成される免疫シナプスにおける F アクチン発現に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の作用 9

Figure 4: ナチュラルキラー細胞及び自己濾胞性リンパ腫細胞間に形成される免疫シナプスにおけるグランザイム B 発現に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の作用 10

Figure 5: 自己濾胞性リンパ腫細胞に対する CD8 陽性 T 細胞あるいはナチュラルキラー細胞による細胞傷害作用に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の作用 12

Figure 6: 健康人及び濾胞性リンパ腫患者の CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の増殖に対するレナリドミドの作用 14

Figure 7: 健康人及び濾胞性リンパ腫患者のナチュラルキラー細胞（$CD3^-$ $CD56^+$）及びナチュラルキラー T 細胞（$CD3^+$ $CD56^+$）の増殖に対するレナリドミドの作用 15

Figure 8: 健康人及び濾胞性リンパ腫患者の末梢血単核細胞サンプルにおけるサイトカイン及びケモカイン遊離に対するレナリドミドの作用 17

Figure 9: 健康人及び濾胞性リンパ腫患者の末梢血単核細胞サンプル中の CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の活性化マーカー発現に対するレナリドミドの作用 18

Figure 10: 健康人及び濾胞性リンパ腫患者の末梢血単核細胞サンプル中のナチュラルキラー細胞及びナチュラルキラーT 細胞に発現する活性化マーカー発現量に対するレナリドミドの作用 20

Figure 11: 濾胞性リンパ腫細胞株（DOHH2 細胞及び RL 細胞）に対する末梢血単核細胞媒介性の細胞傷害作用に及ぼすレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の影響 21

Figure 12: 濾胞性リンパ腫細胞株（RL 細胞）の親細胞及びベンダムスチン抵抗性細胞に対する末梢血単核細胞媒介性細胞傷害作用に及ぼすレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の影響 22

Figure 13: 濾胞性リンパ腫細胞株（DOHH2 細胞及び RL 細胞）に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の直接的細胞傷害作用 23

Figure 14: 脾辺縁帯リンパ腫細胞株（SLVL 細胞）における［^{3}H］-チミジン取込みに対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の作用 25

Figure 15: 脾辺縁帯リンパ腫細胞株（SLVL 細胞）に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の直接的細胞傷害作用 26

Figure 16: 脾辺縁帯リンパ腫細胞株（SLVL 細胞）と末梢血単核細胞の共培養時におけるグランザイム B 遊離に対するレナリドミドの影響 26

Figure 17: 脾辺縁帯リンパ腫細胞株（SLVL 細胞）における末梢血単核細胞媒介性細胞傷害作用に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の作用（1） 27

Figure 18: 脾辺縁帯リンパ腫細胞株（SLVL 細胞）における末梢血単核細胞媒介性細胞傷害作用に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の作用（2） 28

Figure 19: 脾辺縁帯リンパ腫細胞株（SLVL 細胞）に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の直接的細胞傷害作用 29

略号一覧

Table 1: 略号一覧

略号	定義
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity 抗体依存性細胞傷害
APC	Antigen presenting cell 抗原提示細胞
Benda	Bendamustine ベンダムスチン
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester カルボキシフルオレセインサクシニミジルエステル
CLL	Chronic lymphocytic leukemia 慢性リンパ性白血病
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
DMSO	Dimethyl sulfoxide ジメチルスルホキシド
DNAM-1	DNAX accessory molecule-1
EC_{50}	Effective concentration at 50% 50%有効濃度
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay 酵素結合免疫吸着測定法
FL	Follicular lymphoma 濾胞性リンパ腫
GC	Germinal center 胚中心
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
HD	Healthy donor 健康人
HLA-DR	Human leukocyte antigen-antigen D related ヒト白血球抗原－D 関連分子
ICOS	Inducible Co-Stimulatory 誘導性 T 細胞共刺激分子
IgG	Immunoglobulin G 免疫グロブリン G
IL	Interleukin インターロイキン
IL-2Rα	Interleukin-2 Receptor alpha インターロイキン 2 受容体 α
IFN-γ	Interferon-gamma インターフェロン-γ
iNHL	Indolent non-Hodgkin's lymphoma 低悪性度 B 細胞性非ホジキンリンパ腫
LEN	Lenalidomide レナリドミド
MCL	Mantle cell lymphoma マントル細胞リンパ腫
MDS	Myelodysplastic syndromes 骨髄異形成症候群
MFI	Mean fluorescence intensity 平均蛍光強度
MM	Multiple myeloma 多発性骨髄腫
MZL	Marginal zone lymphoma 辺縁帯リンパ腫
NHL	Non-Hodgkin’s lymphoma 非ホジキンリンパ腫
NK	Natural killer ナチュラルキラー
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell 末梢血単核細胞
P-Tyr	Phosphorylated tyrosine チロシンリン酸化（を受けたタンパク質）
R^2 併用	レナリドミド（商品名英語表記：REVLIMID）とリツキシマブ（商品名英語表記：RITUXAN）の併用
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
SLVL	Splenic lymphoma with villous lymphocytes 有毛リンパ球を伴う脾 B 細胞リンパ腫
SMZL	Splenic marginal zone lymphoma 脾辺縁帯リンパ腫
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha 腫瘍壊死因子 α

1. まとめ

レナリドミドには腫瘍細胞に対する増殖抑制、抗血管形成、抗赤血球形成、及び免疫調節の作用がある。すなわち、レナリドミドは① 特定の造血器腫瘍細胞（多発性骨髄腫［MM］、リンパ腫、及び第 5 染色体の欠失がある細胞など）の増殖を阻害、② T 細胞及びナチュラルキラー（NK）細胞媒介性免疫応答を増強、③ NK T 細胞数を増加、④ 単球による炎症性サイトカイン（腫瘍壊死因子 α［TNF-α］及びインターロイキン［IL］-6 など）の産生を阻害することができる。また、骨髄異形成症候群（MDS）の染色体欠失（del）（第 5 染色体長腕、5q）に対して、レナリドミドが del(5q) 細胞のアポトーシスを増加させることで異常クローンを選択的に阻害することも示されている（Heise, 2010; Kotla, 2009; Martiniani, 2012; Zeldis, 2011; Zhu, 2013）。さらに臨床的には、del(5q) MDS のほかに MM、マントル細胞リンパ腫（MCL）、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫（FL）等の B 細胞性悪性腫瘍に対する効果も報告されている（Davies, 2010; Dawar, 2012; Ferrajoli, 2008a; List, 2009）。

様々な非臨床試験においてレナリドミドの作用機序や薬理活性が検討されており、特にレナリドミドの分子標的を検討した試験では、本薬が E3 ユビキチンリガーゼ複合体の構成成分であるセレブロンと結合することが示されている。また、このセレブロンが MM 細胞及び T 細胞に対するレナリドミドの薬理活性発現に必須であることがわかっている（Bjorklund, 2015; Gandhi, 2014; Krönke, 2014; Lopez-Girona, 2012; Lu, 2014）。一方、複数の *in vitro* 試験系において、レナリドミドは MM、MCL、バーキットリンパ腫、DLBCL 等、様々な造血腫瘍細胞株に対して増殖抑制作用を示し、それに加えて MDS に付随して高頻度にみられる第 5 染色体の欠失がある腫瘍に対しても選択性を示す。さらに、ヒト MM 細胞をモデル動物へ異種移植した試験系において、レナリドミドは単独処置での活性を有していることが確認されている（Revlimid® 米国添付文書［US-PI］、2018；Hernandez-Ilizaliturri, 2005; Reddy, 2008）。レナリドミドは *in vitro* 及び *in vivo* のいずれの試験系においても、T 細胞増殖と T 細胞における IL-2 及びインターフェロン γ（IFN-γ）産生を増加させ、さらに T 細胞媒介性及び NK 細胞媒介性の細胞傷害作用を増強する。また、レナリドミドは単球による様々な炎症性サイトカイン（TNF-α 等）の産生を阻害する（Revlimid® 米国添付文書［US-PI］、2018；Revlimid™ 欧州製品概要［EU-SPC］、2018）。

本概要文では、低悪性度 B 細胞性非ホジキンリンパ腫（iNHL）の代表種である辺縁帯リンパ腫（脾辺縁帯リンパ腫 SMZL）及び濾胞性リンパ腫（FL）に対するレナリドミドの臨床的治療効果の作用機序を明らかにする目的で、本薬によるこれらの腫瘍細胞に対する直接的な細胞傷害作用及び宿主の免疫細胞に対する活性化を介する抗腫瘍作用を検討した結果をまとめた。

2. 効力を裏付ける試験

2.1. リンパ腫モデルにおける *in vitro* 活性

2.1.1. 濾胞性リンパ腫

2.1.1.1. 免疫細胞及び濾胞性リンパ腫細胞間に形成される免疫シナプスに対する影響

［報告書番号 CC-5013-10202017AR、添付資料 4.2.1.1.1、参考資料］

FL は胚中心（GC）B 細胞の腫瘍であり、正常な GC B 細胞の免疫表現型、並びに形態学的、遺伝的及び機能的特性の多くを保持している。FL の微小環境は腫瘍組織浸潤 CD4 陽性（$CD4^+$）及び CD8 陽性（$CD8^+$）T 細胞、制御性 T 細胞、腫瘍関連マクロファージ、濾胞性ヘルパーT 細胞、濾胞性樹状細胞から構成され、そのすべてが FL 患者の予後に関連することが報告されている（Sugimoto, 2016）。

非ホジキンリンパ腫（NHL）患者において、腫瘍組織に浸潤した $CD4^+$及び $CD8^+$ T 細胞と抗原提示細胞（APC）との間に形成される免疫シナプスが異常な状態となっており、これが免疫抑制状態の発現機序となることが報告されている（Ramsay, 2008; Ramsay, 2009）。過去のデータから、FL 細胞が免疫シナプスへの T 細胞の細胞骨格シグナル伝達タンパク質の動員を減少させることで、T 細胞内のアクチン細胞骨格形成異常を誘発することが示されている。この腫瘍細胞による免疫抑制が、FL で認められる T 細胞応答減弱に寄与している。同様に NK 細胞における免疫シナプス形成は、標的細胞を溶解させる細胞傷害性顆粒（lytic granules）の輸送等を含むエフェクター機能を制御している（Krzewski, 2012）。

本試験の目的は、未治療 FL 患者の末梢血及びリンパ節由来の T 細胞及び NK 細胞を用いて、T 細胞及び NK 細胞が標的腫瘍細胞に対して形成する細胞傷害性免疫シナプスに対する、レナリドミド、リツキシマブ、及びレナリドミドとリツキシマブの併用（R^2 併用）の効果を *ex vivo* で明らかにすること、並びに T 細胞及び NK 細胞の自己腫瘍に対する細胞傷害作用試験においてレナリドミド、リツキシマブ及び R^2 併用の影響を評価することであった。

腫瘍組織浸潤 $CD4^+$ T 細胞が自己 FL 細胞と免疫シナプスを形成する能力を、既存の免疫シナプスバイオアッセイ法（Ramsay, 2008）を使用して評価した。レナリドミド（1 μM）で FL 及び自己 $CD4^+$ T 細胞（n = 6）それぞれを *ex vivo* 処置したところ、免疫シナプスにおける重合化アクチン（F アクチン）量が有意に増加した。また、レナリドミド単独処置又は R^2 併用処置時の $CD4^+$ T 細胞の免疫シナプスにおける F アクチン量の増加には、$CD4^+$ T 細胞と FL 細胞の結合体（conjugate）におけるチロシンリン酸化タンパク質（P-Tyr）の動員増加が連動していた（Figure 1A）。対照群における免疫シナプスの F アクチン面積を求めたところ 1.9 ± 0.38 μm^2 であった。リツキシマブ処置群では対照群と比較して免疫シナプス形成の変化はなかった（同面積：2.0 ± 0.33 μm^2）。一方、レナリドミド処置群では同面積が 2.9 ± 0.44 μm^2 へと有意に増加した。R^2 併用処置群でも同面積は 2.96 ± 0.55 μm^2 へと対照群と比較して有意に増加したが、レナリドミド処置群との比較では有意差はなかった（Figure 1B）。

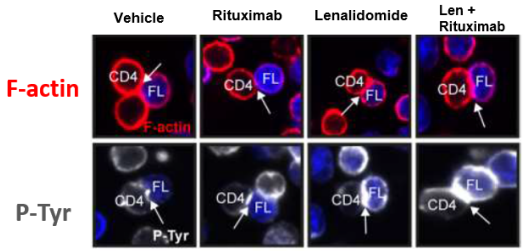
レナリドミド（1 μM）で前処置した腫瘍浸潤 $CD8^+$ T 細胞もまた、対照群と比較して、自己 FL 細胞と形成する免疫シナプスにおける F アクチン量の有意な増加を示し、R^2 併用処置でもこの増加は維持された（n = 6、Figure 2）。同時に、免疫シナプスにおけるグランザイム B の発現増加が認められたが、この増加はレナリドミド処置群（単独ならびに R^2 併用）にのみ認められた（Figure 2A）。対照群の F アクチン面積は 1.55 ± 0.29 μm^2 で、これはリツキシマブ処置群（同面積：1.59 ± 0.34 μm^2）と同レベルであった。レナリドミド処置群では同面積が 3.25 ± 0.44 μm^2 へと有意に増加した。R^2 併

用処置群でも同面積は 3.3 ± 0.31 μm² へと対照群との比較で有意に増加したが、レナリドミド処置群との比較では有意差はなかった（Figure 2B）。

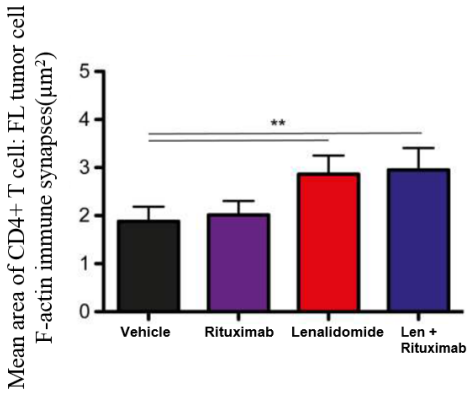
以上の結果から、R² 併用処置によって FL 細胞と CD4⁺ T 細胞あるいは CD8⁺ T 細胞間の免疫シナプス形成が増強され、それは主としてレナリドミドによって惹起される反応であることが示された。

Figure 1: CD4 陽性 T 細胞及び自己濾胞性リンパ腫細胞間に形成される免疫シナプスにおける F アクチン発現に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の作用

A)



B)



FL = 濾胞性リンパ腫；Len = レナリドミド；F-actin = F アクチン（重合化アクチン）；P-Tyr = チロシンリン酸化タンパク質

FL 患者リンパ節より採取した CD4⁺ T 細胞（1×10⁶ 個）を溶媒（dimethyl sulfoxide、DMSO）又はレナリドミド（1 μM）で 24 時間前処置した。同じく、同患者由来で事前に CellTracker blue CMAC 色素による標識済みの FL 細胞（1×10⁶ 個）を溶媒、リツキシマブ（1 μg/mL）、レナリドミド（1 μM）、又はリツキシマブとレナリドミドの併用で 1 時間前処置した。スーパー抗原カクテルで FL 細胞を 30 分間刺激した後、上記 CD4⁺ T 細胞と 20 分間混合し、免疫シナプスを形成させた。

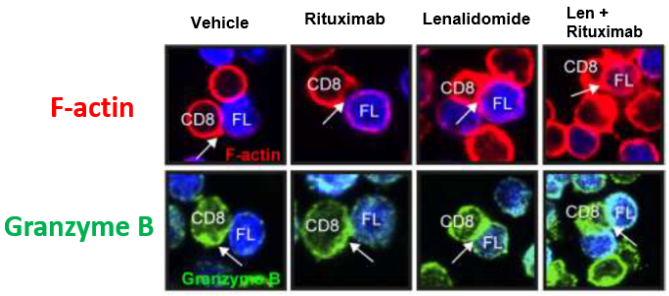
A. FL 細胞と CD4⁺ T 細胞間に形成される免疫シナプス（F アクチン：赤色、チロシンリン酸化タンパク質：白色）の共焦点像（代表例を提示）。CD4⁺ T 細胞は FL 細胞と結合体（conjugate）を形成した。免疫蛍光共焦点顕微鏡により結合体の分析を行った。A1R 共焦点顕微鏡を使用して顕微鏡像を得た後、NIS-Elements ソフトウェアにて分析した（倍率：60×）。

B. 定量的画像分析により、溶媒対照群及び各薬物処置群における FL 細胞と CD4⁺ T 細胞間に形成される免疫シナプスにおける F アクチン（A の共焦点像におけるローダミンファロイジン［赤色］染色されたアクチン）の総面積（μm²）を測定した。各カラムは 6 例の FL 患者からの検体を用いて算出した F アクチン面積（μm²）の平均 ± 標準偏差を示す（**：対照群との比較において $p < 0.01$ で有意差あり、一元配置分散分析）。

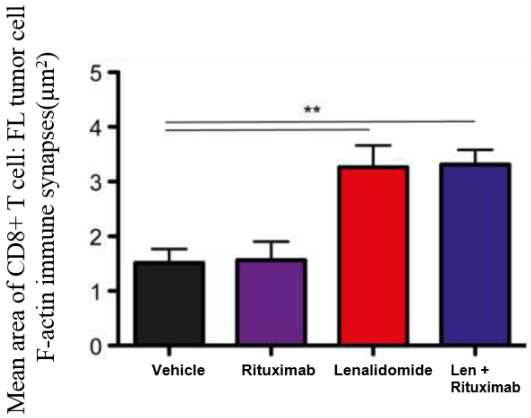
Source: Report CC-5013-10202017AR

Figure 2: CD8 陽性 T 細胞及び自己濾胞性リンパ腫細胞間に形成される免疫シナプスにおける F アクチン発現に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の作用

A)



B)



FL = 濾胞性リンパ腫；Len = レナリドミド

FL 患者リンパ節より採取した $CD8^+$ T 細胞（1×10^6 個）を溶媒（DMSO）又はレナリドミド（1 μM）で 24 時間前処置した。同じく、同患者由来で事前に CellTracker blue CMAC 色素による標識済みの FL 細胞（1×10^6 個）を溶媒、リツキシマブ（1 μg/mL）、レナリドミド（1 μM）、又はリツキシマブとレナリドミドの併用で 1 時間前処置した。スーパー抗原カクテルで FL 細胞を 30 分間刺激した後、上記 $CD8^+$ T 細胞と 10 分間混合し、免疫シナプスを形成させた。

A. FL 細胞と $CD8^+$ T 細胞間に形成される免疫シナプス（F アクチン：赤色、グランザイム B：緑色）の共焦点像（代表例を提示）。$CD8^+$ T 細胞は FL 細胞と結合体を形成した。免疫蛍光共焦点顕微鏡により結合体の分析を行った。A1R 共焦点顕微鏡を使用して顕微鏡像を得た後、NIS-Elements ソフトウェアにて分析した（倍率：60×）。

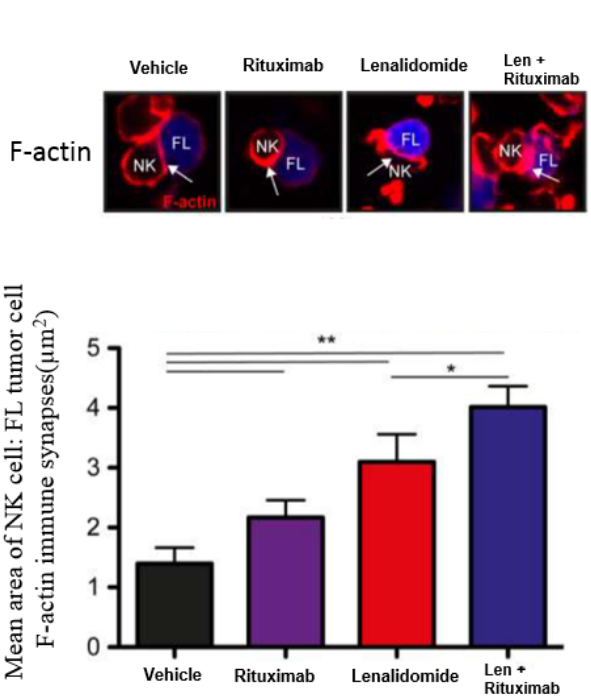
B. 定量的画像分析により、溶媒対照群及び各薬物処置群における FL 細胞と $CD8^+$ T 細胞間に形成される免疫シナプスにおける F アクチン（A の共焦点像におけるローダミンファロイジン［赤色］染色されたアクチン）の総面積（μm^2）を測定した。各カラムは 6 例の FL 患者からの検体を用いて算出した F アクチン面積（μm^2）の平均 ± 標準偏差を示す（**：対照群との比較において $p < 0.01$ で有意差あり、一元配置分散分析）。

Source: Report CC-5013-10202017AR

白血化 FL 患者の末梢血単核細胞（PBMC）サンプル由来の NK 細胞を用いた検討を行った（n = 6）。本検討では、レナリドミド、リツキシマブ又は R[2] 併用処置によって、NK 細胞と自己 FL 細胞間に形成される免疫シナプスにおける F アクチン発現量の増加が生じることが明らかとなった（Figure 3A）。対照群（溶媒処置）の F アクチン面積は 1.4 ± 0.33 μm^2 であった。一方、リツキシマブ処置群及びレナリドミド処置群では免疫シナプス形成が有意に増強され、その F アクチン面積はそれぞれ

2.15 ± 0.31 μm² 及び 3.05 ± 0.49 μm² であった。R² 併用処置群ではさらに相加的に増強され（F アクチン面積：4.0 ± 0.38 μm²）、対照群、レナリドミド処置群及びリツキシマブ処置群のいずれと比較してもその増強は有意であった（Figure 3B）。

Figure 3: ナチュラルキラー細胞及び自己濾胞性リンパ腫細胞間に形成される免疫シナプスにおける F アクチン発現に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の作用



FL = 濾胞性リンパ腫；Len = レナリドミド；NK = ナチュラルキラー

FL 患者末梢血より採取した NK 細胞（5×10⁵ 個）をレナリドミド（1 μM）存在下又は非存在下（溶媒［DMSO］を添加）で組み換えヒト IL-2（10 ng/mL）前処置した（24 時間）。同じく、同患者由来で事前に CellTracker blue CMAC 色素による標識済みの FL 細胞（1×10⁶ 個）を溶媒、リツキシマブ（1 μg/mL）、レナリドミド（1 μM）、又はリツキシマブとレナリドミドの併用で 1 時間前処置した。これらの NK 細胞と FL 細胞を 5 分間混合し、免疫シナプスを形成させた。

A. FL 細胞と NK 細胞間に形成される免疫シナプス（F アクチン：赤色）の共焦点像（代表例を提示）。NK 細胞は FL 細胞と結合体を形成した。免疫蛍光共焦点顕微鏡により結合体の分析を行った。A1R 共焦点顕微鏡を使用して顕微鏡像を得た後、NIS-Elements ソフトウェアにて分析した（倍率：60×）。
B. 定量的画像分析により、溶媒対照群及び各薬物処置群における FL 細胞と NK 細胞間に形成される免疫シナプスの F アクチン（A の共焦点像におけるローダミンファロイジン［赤色］染色されたアクチン）の総面積（μm²）を測定した。各カラムは 6 例の FL 患者からの検体を用いて算出した F アクチン面積（μm²）の平均 ± 標準偏差を示す（*, **：図に示した処置群間の比較においてそれぞれ $p < 0.05$ 及び $p < 0.01$ で有意差あり、Bonferroni の群間比較検定による一元配置分散分析）。

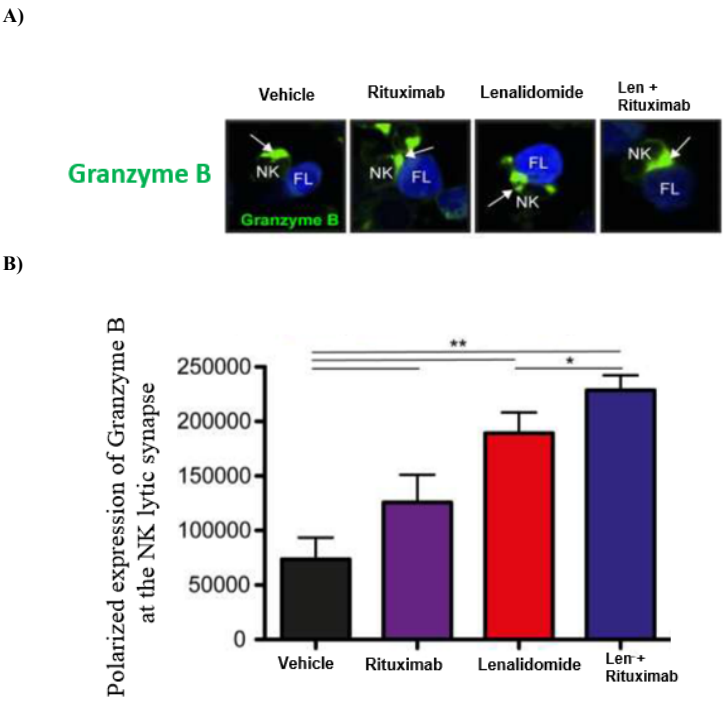
Source：Report CC-5013-10202017AR

F アクチン量増加は細胞傷害性免疫シナプス活性化の特徴であるが、本試験ではリツキシマブ処置、レナリドミド処置又は R² 併用処置による NK 細胞免疫シナプスにおけるグランザイム B 発現の増加も示された（Figure 4A）。対照群（溶媒処置）におけるグランザイム B 発現を示す発光強度は 75000 ± 19170 であった。一方、リツキシマブ処置群及びレナリドミド処置群ではグランザイム B 発

現が有意に増強され、その発光強度はそれぞれ 125000 ± 27386 及び 187500 ± 24647 であった。R^2 併用処置群ではさらに相加的かつ有意に増強された（発光強度：227500 ± 13693）（Figure 4B）。

これらの検討から、レナリドミド又はリツキシマブの単独処置と比較し、R^2 併用処置は NK 細胞と FL 細胞間に形成される免疫シナプスの増強に優れることが示された。

Figure 4: ナチュラルキラー細胞及び自己濾胞性リンパ腫細胞間に形成される免疫シナプスにおけるグランザイム B 発現に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の作用



FL = 濾胞性リンパ腫；Len = レナリドミド；NK = ナチュラルキラー

Figure 3 と同じ方法にて免疫シナプスサンプルを調製した。

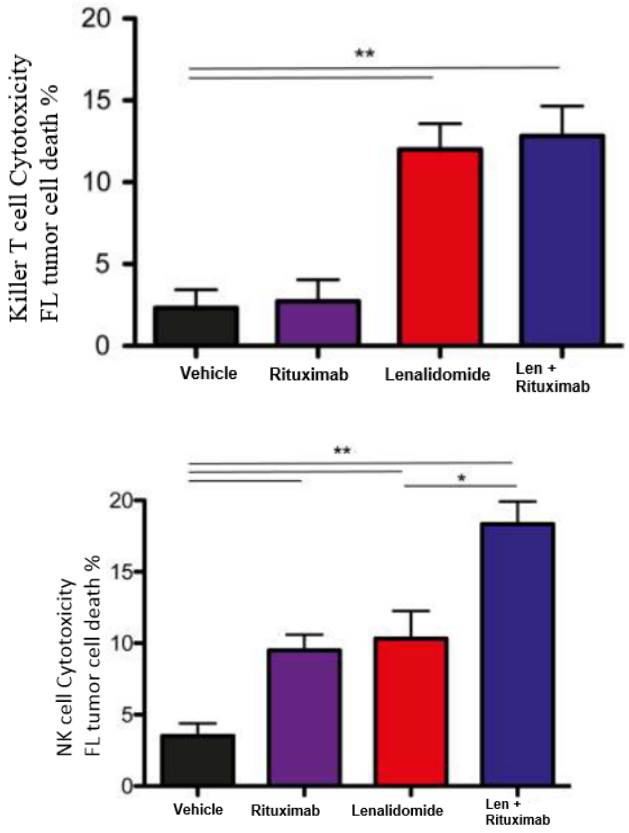
A. FL 細胞と NK 細胞間に形成される免疫シナプス（グランザイム B：緑色）の共焦点像（代表例を提示）。画像解析方法は Figure 3 と同じ。
B. Figure 3 と同じ方法により対照群及び各薬物処置群における FL 細胞と NK 細胞間に形成される免疫シナプスのグランザイム B 発現（緑色）の強度和を測定した。各カラムは 6 例の FL 患者からの検体を用いて算出したグランザイム B 発現強度和の平均 ± 標準偏差を示す（*, **：図に示した処置群間の比較においてそれぞれ $p < 0.05$ 及び $p < 0.01$ で有意差あり、Bonferroni の群間比較検定による一元配置分散分析）。

Source: Report CC-5013-10202017AR

FL 患者から採取した $CD8^+$ T 及び NK 細胞の自己 FL 細胞（スーパー抗原で刺激）に対する細胞傷害作用を *in vitro* で評価し、薬物処置による免疫シナプス形成の増強と T 細胞及び NK 細胞の細胞傷害作用の活性化との間に相関性があるかどうかを明らかにした。その結果、レナリドミド単独処置又は R^2 併用処置した細胞はリツキシマブ単独処置又は溶媒処置した細胞よりも T 細胞による細胞傷害作用（腫瘍細胞死）が増強されることが確認された（Figure 5 上）。すなわち、リツキシマブ処置群で誘発された細胞死の程度は 2.8%であり、対照群（2.5%）と同程度であったが、レナリドミド処置群及び R^2 併用処置群では細胞死はそれぞれ 12.18%及び 13.0%へと有意に増加した。

一方、NK 細胞媒介性の細胞傷害作用については、リツキシマブ処置群（FL 細胞のみ薬物処置）あるいはレナリドミド処置群（NK 細胞と FL 細胞の両方を薬物処置）では、FL 細胞に対する殺細胞作用が同程度活性化されることが示された（Figure 5 下）。すなわち、リツキシマブ処置群及びレナリドミド処置群で誘発された細胞死の程度はそれぞれ 9.69%及び 10.5%であり、溶媒処置対照群（3.63%）と比較して有意に FL 細胞死を増強した。さらに、R^2 併用処置群では細胞死が 18.44%へと相加的に増加し、単独処置よりも優れた細胞傷害作用の誘発が示された。

Figure 5: 自己濾胞性リンパ腫細胞に対する CD8 陽性 T 細胞あるいはナチュラルキラー細胞による細胞傷害作用に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の作用



FL = 濾胞性リンパ腫；Len = レナリドミド；NK = ナチュラルキラー

FL 患者（n = 6）リンパ節より採取した $CD8^+$ T 細胞を細胞密度 1×10^6 個/mL で抗 CD28 抗体と共に抗 CD3 抗体でプレコーティングした培養プレートに播種し、溶媒（DMSO）又はレナリドミド（1 μM）で 48 時間前処置した。また、FL 患者末梢血より採取した NK 細胞を細胞密度 1×10^6 個/mL で培養プレートに播種し、レナリドミド（1 μM）存在下又は非存在下（溶媒［DMSO］を添加）で組み換えヒト IL-2（10 ng/mL）前処置した（24 時間）。さらに、同じ FL 患者より採取した FL 細胞をカルボキシフルオレセインサクシニミジルエステル（CFSE）染色した後に、溶媒、リツキシマブ（1 μg/mL）、レナリドミド（1 μM）、又はリツキシマブとレナリドミドの併用で 1 時間前処置した。なお、$CD8^+$ T 細胞による細胞傷害作用を検討するアッセイでは、FL 細胞にスーパー抗原による刺激も加えた。これら前処置の後、FL 細胞（2×10^4 個）と $CD8^+$ T 細胞あるいは NK 細胞をそれぞれ 1:20 あるいは 1:5 の割合で混合し、4 時間インキュベートした。その後、アポトーシス死を誘発した FL 細胞をアネキシン V 及び TO-PRO-3 染色しフローサイトメトリーにて検出した。

上図：図に示す薬物で処置した時の FL 細胞に対する $CD8^+$ T 細胞（Killer T cell）による細胞傷害作用。縦軸はアポトーシス死誘導細胞の割合（%）で、各カラムは平均 ± 標準偏差で表す（**：溶媒対照群と比較して $p < 0.01$ で有意差あり、一元配置分散分析）。

下図：図に示す薬物で処置した時の FL 細胞に対する NK 細胞による細胞傷害作用。縦軸はアポトーシス死誘導細胞の割合（%）で、各カラムは平均 ± 標準偏差で表す（*,**：図に示した処置群間の比較においてそれぞれ $p < 0.05$ 及び $p < 0.01$ で有意差あり、一元配置分散分析）。

Source: Report CC-5013-10202017AR.

以上の結果から、リツキシマブとレナリドミドを併用処置すると、FL 細胞と $CD8^+$ T 細胞あるいは NK 細胞との間で形成される細胞傷害性免疫シナプスが活性化することが示された。

2.1.1.2. 未治療及び再発／難治性の濾胞性リンパ腫患者末梢血単核細胞における T 細胞及びナチュラルキラー細胞に対するレナリドミドの増殖促進及び活性化能

［報告書番号 8195-014、添付資料 4.2.1.1.2、評価資料］

未治療 FL 患者を R^2 併用処置すると、6 サイクルの投与完了時の末梢血 NK 細胞数にベースライン値と比較して有意な増加が認められ、当該併用処置によって NK 細胞の活性化が生じることは臨床的に既に示されている（Fowler, 2014）。しかし、R^2 併用により得られる臨床的ベネフィットに寄与する機序については、FL の病態において評価及び実証されていない。本試験では、未治療及び再発／難治性 FL 患者の PBMC における T 細胞及び NK 細胞に対するレナリドミドの増殖促進及び活性化能を評価した。FL 細胞株に対する免疫細胞媒介性細胞傷害作用及び直接的細胞傷害作用に対する R^2 併用の影響も評価した。

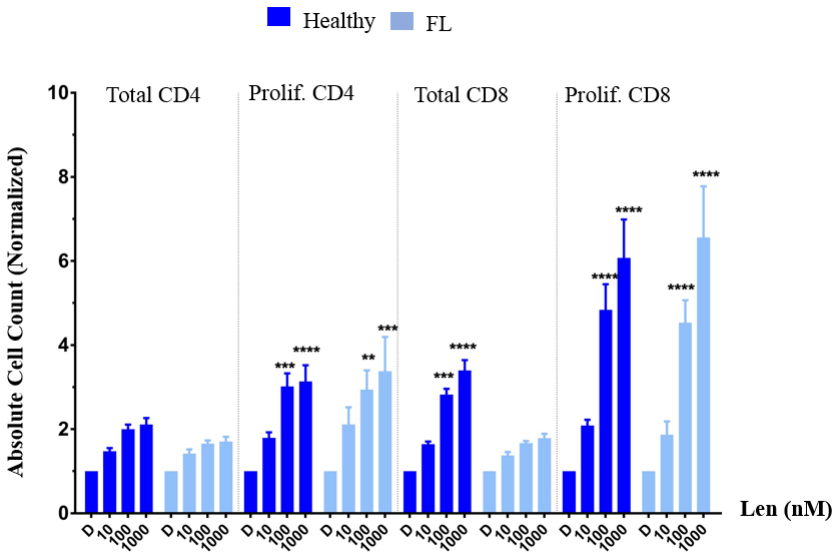
FL 患者（n = 3）及び健康人（n = 4）のレナリドミド（10 - 1000 nM）処置 CellTrace 標識 PBMC を、T 細胞アクチベーターで 5 日間刺激した。インキュベート終了時に、$CD4^+$ T 細胞（$CD3^+$ $CD4^+$）、$CD8^+$ T 細胞（$CD3^+$ $CD8^+$）、NK 細胞（$CD3^-$ $CD56^+$ $CD16^+$）及び NK T 細胞（$CD3^+$ $CD56^+$）として細胞をゲーティングした。CellTrace 弱染色（$CellTrace^{dim}$）細胞集団を対象としたゲーティングにより、各細胞型で増殖中にある細胞群を特定した。

レナリドミド処置による $CD4^+$ T 細胞及び $CD8^+$ T 細胞の増殖に対する影響を検討した結果、$CD4^+$ T 細胞については健康人及び FL 患者の PBMC サンプルでそれぞれ最大 3 倍及び 3.4 倍まで増殖中細胞数の有意な増加が、また、$CD8^+$ T 細胞では健康人及び FL 患者 PBMC サンプルでそれぞれ最大 6.1 倍及び 6.6 倍まで増殖中細胞数が有意に増加した（Figure 6）。このように、レナリドミド処置によって FL 患者 PBMC での T 細胞の増殖が誘発され、その程度は健康人の T 細胞の反応と同程度であった。

NK 細胞（$CD3^-$ $CD56^+$ $CD16^+$）及び NK T 細胞（$CD3^+$ $CD56^+$）の増殖に対するレナリドミドの作用も検討した。その結果、レナリドミドは健康人及び FL 患者 PBMC サンプルでそれぞれ最大 2.1 倍及び 2.3 倍まで増殖中の NK 細胞数を増加させることが示された（対照群との比較）。一方、NK T 細胞については、健康人及び FL 患者 PBMC サンプルで増殖中細胞数をそれぞれ最大 5 倍まで増加させた（Figure 7A）。

細胞表面の CD56 発現に基づく NK 細胞サブセットについても、レナリドミドの作用を個別に評価した（Figure 7B）。本アッセイでは NK 細胞を $CD16^+$ $CD56^{dim}$ 及び $CD16^+$ $CD56^{bright}$ のサブセットへとゲーティングした。$CD56^{bright}$ NK 細胞は、活性化によって大量のサイトカインを産生する循環血中 NK 細胞の小サブセット（約 10%）であり、以下、サイトカイン産生 NK 細胞とした。一方、細胞傷害性 NK 細胞は主に抗腫瘍効果を発揮する $CD56^{dim}$ 細胞の主要なサブセットである。レナリドミドは、健康人及び FL 患者の PBMC サンプルでそれぞれ最大 1.3 倍及び 1.2 倍まで細胞傷害性 NK 細胞の増殖を、また、健康人のみでサイトカイン産生 NK 細胞を最大 1.5 倍まで有意に増加させた。

Figure 6: 健康人及び濾胞性リンパ腫患者の CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の増殖に対するレナリドミドの作用

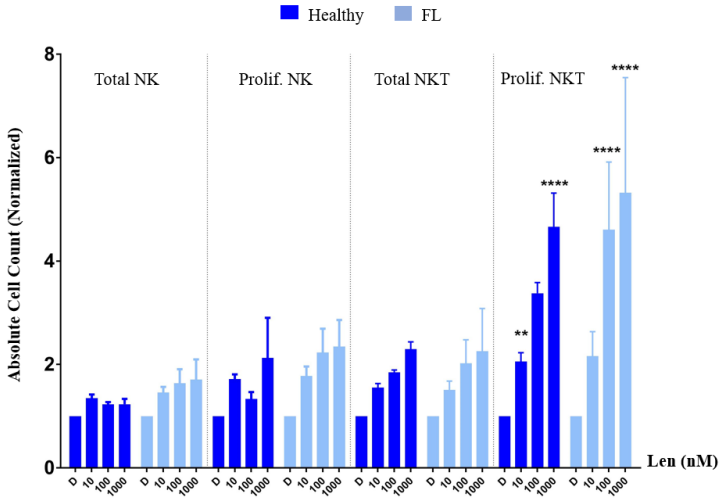


D = 溶媒（DMSO）のみ；FL = 濾胞性リンパ腫；Len = レナリドミド

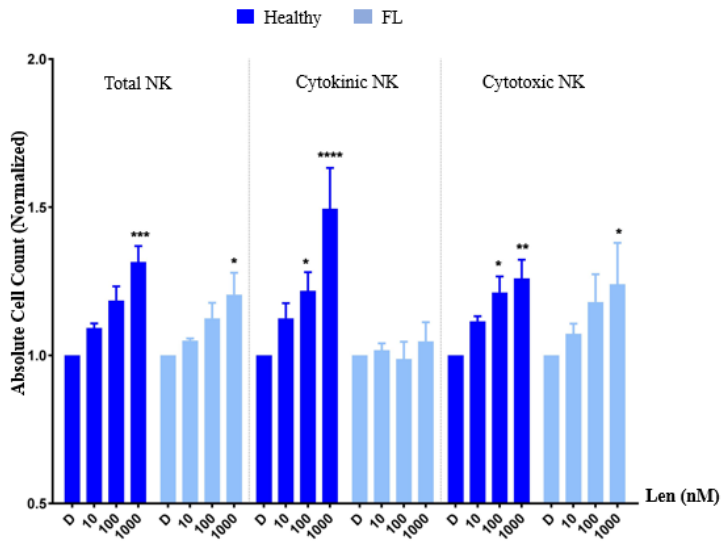
健康人及び FL 患者の PBMC サンプルを溶媒又はレナリドミド（10 - 1000 nM）で 5 日間処置し、当該 PBMC サンプル中に含まれる $CD4^+$ T 細胞及び $CD8^+$ T 細胞の絶対細胞数を溶媒対照群（D）に対する増加倍数として算出した。増殖中 T 細胞（図中「Prolif. CD4」及び「Prolif. CD8」）はフローサイトメトリーによる Cell Trace 法を用いて測定した。各データは n = 3 - 4 での平均 ± 標準誤差で表した。**, ***, ****：それぞれ $p \leqq 0.01$、$p \leqq 0.001$、$p \leqq 0.0001$ で有意差あり（溶媒対照群との比較、二元配置分散分析）
Source: Report 8195-014.

Figure 7: 健康人及び濾胞性リンパ腫患者のナチュラルキラー細胞（$CD3^{-}$ $CD56^{+}$）及びナチュラルキラー T 細胞（$CD3^{+}$ $CD56^{+}$）の増殖に対するレナリドミドの作用

A: Fold Increase NK and NK T cells



B: Fold Increase Natural Killer cell subsets



D = 溶媒（DMSO）のみ；FL = 濾胞性リンパ腫；Len = レナリドミド；NK = ナチュラルキラー

健康人及び FL 患者の PBMC サンプルを溶媒又はレナリドミド（10 - 1000 nM）で 5 日間処置した。A）当該 PBMC サンプルに含まれる NK 細胞及び NK T 細胞の絶対細胞数に対する作用を溶媒対照群（D）と比べた時の増加倍数として算出した。また、B）NK 細胞サブセット（サイトカイン産生 NK 細胞及び細胞傷害性 NK 細胞）別の絶対細胞数に対する作用を溶媒対照群（D）に対する増加倍数として算出した。増殖中の NK 細胞及び NK T 細胞（図中「Prolif. NK」及び「Prolif. NKT」）はフローサイトメトリーによる Cell Trace 法を用いて測定した。各データは n = 4 での平均 ± 標準誤差で表した。*, **, ***, ****：それぞれ $p \leqq 0.05$、$p \leqq 0.01$、$p \leqq 0.001$、$p \leqq 0.0001$ で有意差あり（溶媒対照群との比較、二元配置分散分析）
Source: Report 8195-014.

レナリドミドはサイトカインの分泌を変化させることで免疫調節機能を発揮する。レナリドミドのT細胞刺激作用によって1型ヘルパーT細胞タイプサイトカインの応答、すなわちIFN-γ及びIL-2の分泌が増加し、これによってクローン性T細胞増殖及びNK細胞活性が刺激される（Gandhi, 2014; Schafer, 2003）。Figure 6及びFigure 7で検討したPBMCサンプルの上清を薬物処置3日目に一定量ずつ採取し、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を用いてサイトカイン／ケモカインの遊離量を測定した（n = 4）。まず、処置3日目に溶媒対照群PBMCサンプルから遊離されたサイトカイン及びケモカインの濃度をTable 2に示す。結果として、RANTES（regulated on activation, normal T cell expressed and secreted）及びTNF-αの遊離量に、健康人及びFL患者間で有意差が認められた。PBMCサンプルにおけるRANTES濃度は、健康人PBMCサンプルで208.33 ± 28.21 pg/mLであったのに対してFL患者PBMCサンプルでは85.03 ± 15.93 pg/mLであった。また、TNF-α濃度については、健康人PBMCサンプルで480.31 ± 28.73 pg/mLであったのに対し、FL患者PBMCサンプルでは96.99 ± 51.84 pg/mLであった。

一方、レナリドミド（10 - 1000 nM）処置によって、健康人及びFL患者のPBMCサンプル共に顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、IL-13、TNF-α及びIL-5の遊離が有意に増加した（Figure 8）。レナリドミドの作用は健康人PBMCサンプルからのIFN-γ遊離に対する作用が最も大きく、1 μMのレナリドミドによってIFN-γ遊離が13倍に増加した。一方、FL患者PBMCサンプルでの同増加は6倍であった。また、レナリドミドによって、健康人PBMCサンプルにおけるIL-2の遊離量が最大6倍まで有意に増加したが、FL患者サンプルにおけるそれは最大3倍の増加であった。TNF-α及びIL-5については、レナリドミドによる遊離増加が健康人及びFL患者PBMCサンプル共に同レベルで、最大4倍まで有意に増加した。レナリドミドの作用はFL患者PBMCサンプルからのGM-CSF遊離に対する作用が最も大きく、レナリドミド（1 μM）によってFL患者及び健康人のPBMCサンプルにおけるGM-CSF遊離が、それぞれ10倍及び8倍に有意に増加した（Figure 8）。

Table 2: 健康人及び濾胞性リンパ腫患者の免疫刺激末梢血単核細胞サンプルにおける、DMSO処置3日目のサイトカイン及びケモカインの産生（基礎分泌量）

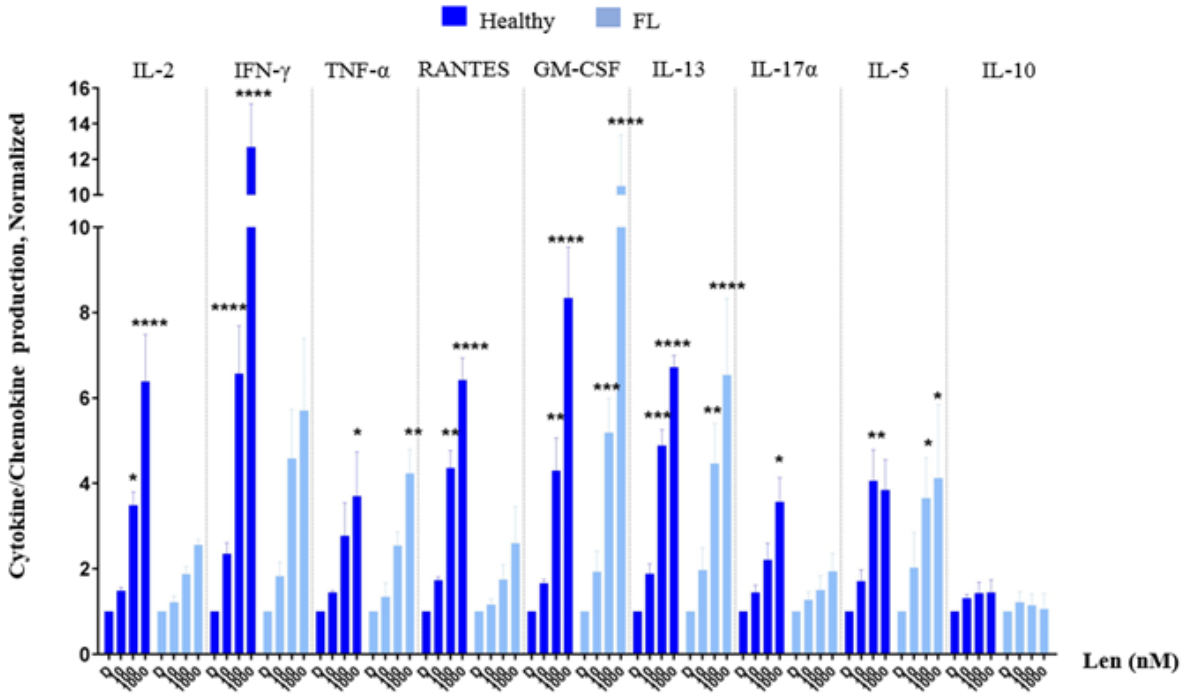
Cytokine/Chemokine	HD (pg/mL)	FL patient (pg/mL)
IL-2	4.06 ± 0.69	5.74 ± 2.57
IL-5	20.16 ± 7.96	16.77 ± 15.12
IL-10	391.17 ± 140.0	236.01 ± 109.64
IL-13	74.13 ± 25.47	50.64 ± 39.42
IL-17α	45.00 ± 9.11	32.68 ± 16.44
IFN-γ	98.48 ± 35.01	32.76 ± 18.22
GM-CSF	75.40 ± 19.32	25.10 ± 16.56
RANTES	208.33 ± 28.21	85.03 ± 15.93**
TNF-α	480.31 ± 28.73	96.99 ± 51.84*

FL = 濾胞性リンパ腫；GM-CSF = 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子；HD = 健康人；IFN-γ = インターフェロンγ；IL = インターロイキン；RANTES = regulated on activation, normal T cell expressed and secreted；TNF-α = 腫瘍壊死因子α

溶媒（DMSO）処置後にImmuocult T cell Activator（抗CD3抗体）で3日間刺激した健康人及びFL患者のPBMCサンプルの上清に含まれるサイトカイン含有量（= 基礎分泌量）をLuminex Multiplex Assayにより測定した。各値はn = 3 - 4での平均 ± 標準誤差で示す。*,**：p ≦ 0.05、p ≦ 0.01で有意差あり（健康人との比較、両側T検定）。

Source: Report 8195-014

Figure 8: 健康人及び濾胞性リンパ腫患者の末梢血単核細胞サンプルにおけるサイトカイン及びケモカイン遊離に対するレナリドミドの作用



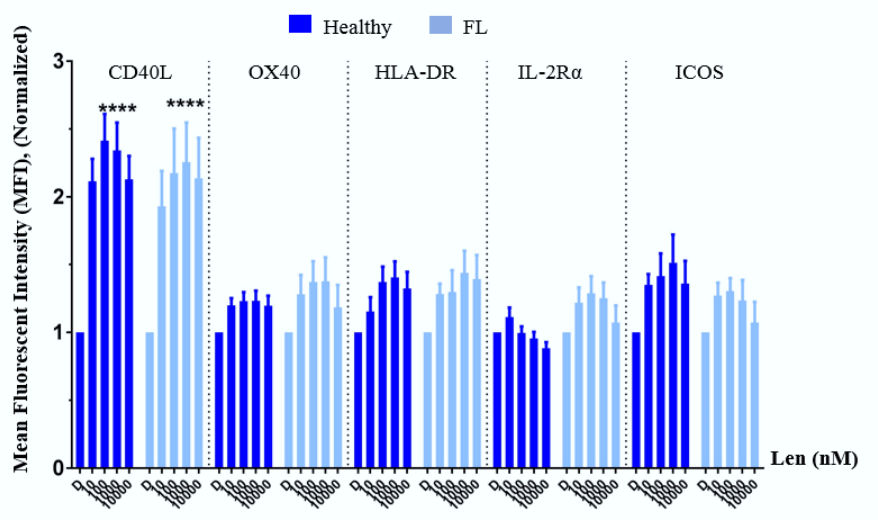
D = 溶媒（DMSO）のみ；Healthy = 健康人；FL = 濾胞性リンパ腫；GM-CSF = 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子；IFN-γ = インターフェロン γ；IL = インターロイキン；Len = レナリドミド；RANTES = regulated on activation, normal T cell expressed and secreted；TNF-α = 腫瘍壊死因子 α

溶媒（DMSO）又はレナリドミド（10 - 1000 nM）で 1 時間処置した後に Immuocult T cell Activator（抗 CD3 抗体）で 3 日間刺激した健康人及び FL 患者の PBMC サンプル中の各サイトカイン含有量を Luminex Multiplex Assay を用いて測定し、溶媒対照群に対する増加倍数として示した。各データは n = 3 - 4 での平均 ± 標準誤差で表した。
*, **, ***, ****：それぞれ p ≦ 0.05、p ≦ 0.01、 p ≦ 0.001、 p ≦ 0.0001 で有意差あり（溶媒対照群との比較、二元配置分散分析）
Source: Report 8195-014

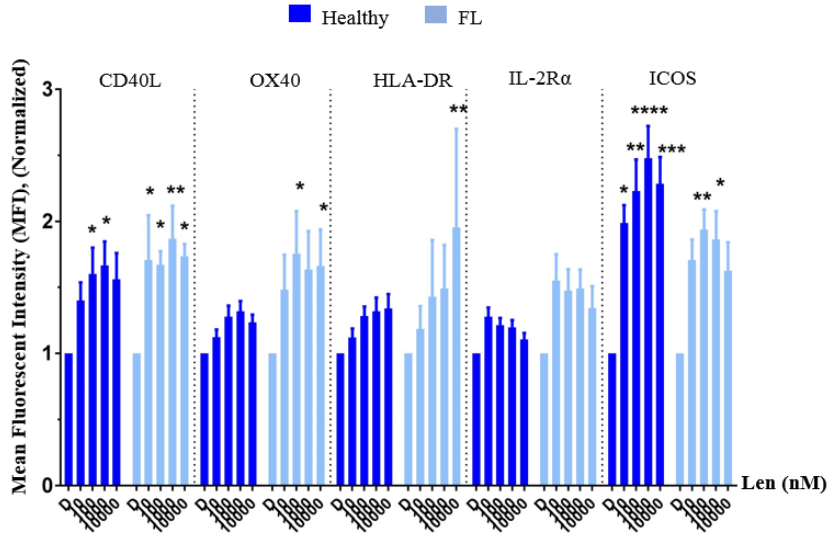
サイトカイン分泌の他に、ヒト白血球抗原－D 関連（HLA-DR）分子及びその他の共刺激分子の発現を調べることで、T リンパ球活性化の程度を評価することができる。本試験では共刺激マーカーである誘導性 T 細胞共刺激分子（ICOS）、OX40、CD40L 及びインターロイキン 2 受容体 α（IL-2Rα）の T 細胞上での発現量を検討した（Figure 9）。その結果、$CD4^+$ T 細胞活性化については、レナリドミドは健康人及び FL 患者細胞で CD40L の発現量を最大 2 倍超まで有意に増強させた（Figure 9A）。一方、$CD8^+$ T 細胞活性化については、レナリドミドは FL 患者細胞で ICOS、OX40 及び CD40L の発現を最大 2 倍程度まで有意に、また、健康人細胞で CD40L 及び ICOS を最大 2 倍超まで有意に増加させた（Figure 9B）。

Figure 9: 健康人及び濾胞性リンパ腫患者の末梢血単核細胞サンプル中の CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の活性化マーカー発現に対するレナリドミドの作用

A: CD4 T Cells



B: CD8 T Cells



D = 溶媒（DMSO）のみ；FL = 濾胞性リンパ腫；HLA-DR = ヒト白血球抗原－D 関連分子；ICOS = 誘導性 T 細胞共刺激分子；IL-2Rα = インターロイキン 2 受容体 α；Len = レナリドミド；MFI = 平均蛍光強度

溶媒又はレナリドミド（10 - 10000 nM）1 時間処置した後に抗 CD3 抗体で 3 日間刺激した健康人及び FL 患者の PBMC サンプル中の $CD4^+$ T 細胞（A）及び $CD8^+$ T 細胞（B）上の各活性化マーカー発現量を溶媒対照群に対する増加倍数として示した。PBMC サンプルを各種抗体で蛍光染色した後、フローサイトメトリーで検出した。各データは、n = 4 - 8 での平均 ± 標準誤差で表した。
*, **, ***, ****：それぞれ $p \leqq 0.05$、$p \leqq 0.01$、$p \leqq 0.001$、$p \leqq 0.0001$ で有意差あり（溶媒対照群との比較、二元配置分散分析）。
Source: Report 8195-014

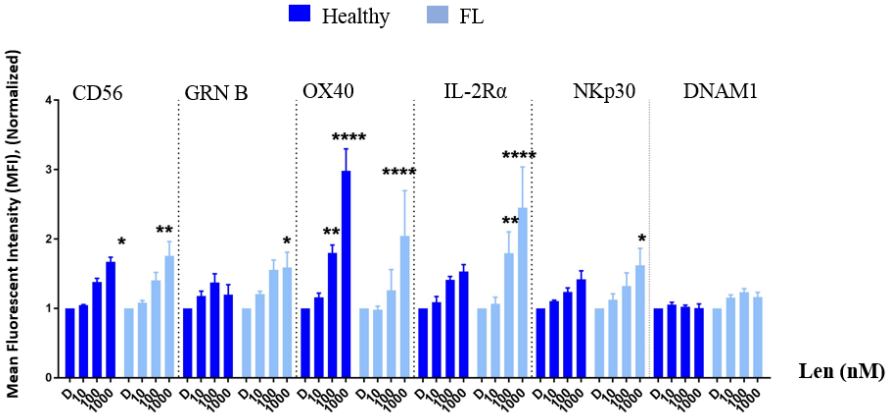
レナリドミドは抗腫瘍効果を発揮するが、その機序の一部は患者自身の NK 細胞活性を調節することであることが知られている。また、NK 細胞による抗腫瘍免疫と NKp30、NKp46 及び DNAM-1 を含む複数の NK 細胞活性化受容体との関連が報告されており、これらによって CD16 への抗体結合で惹起される抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性が補完されると考えられる。一方、*in vitro* の系においてレナリドミド処置によって腫瘍細胞のアポトーシスが増加する際、レナリドミドによる NK 細胞の CD56 接着マーカー発現の増加と相関性があることが知られている（Zhu, 2008）。さらに、レナリドミドはリツキシマブによる ADCC 活性を増強するが、この増強には NK 細胞の活性化や細胞傷害作用に関連する細胞内タンパク質グランザイム B の発現増加が伴っていることが報告されている（Wu, 2008）。そこで、健康人及び FL 患者 PBMC サンプル中の NK 細胞上に発現する細胞表面活性化マーカー及び細胞内活性化マーカーの発現量に対するレナリドミドの作用を検討し、レナリドミドによる NK 細胞活性化を評価した。

レナリドミドは、健康人及び FL 患者の両方の PBMC サンプルにおける活性化マーカーの発現を濃度依存的に増加させた（Figure 10）。すなわち、レナリドミド（1 μM）は FL 患者 PBMC サンプル中の NK 細胞に対して、CD56、グランザイム B、 IL-2Rα、OX40、及び NKp30 の発現を有意に増加させて NK 細胞を活性化した。また、健康人 PBMC サンプル中の NK 細胞に対しては、CD56 及び OX40 の発現を有意に増加させた（Figure 10A）。一方、FL 患者 PBMC サンプル中の NK T 細胞に対しても、CD56、グランザイム B 、OX40、IL-2Rα 及び NKp30 の発現を有意に増加させて、NK T 細胞を活性化した。また、健康人 PBMC サンプル中の NK T 細胞に対しては、CD56、OX40、及び NKp30 の発現を有意に増加させた（Figure 10B）。しかしながら、レナリドミドは健康人又は FL 患者の NK 又は NK T 細胞のいずれにおいても DNAM-1 の発現量に対する作用は示さなかった。

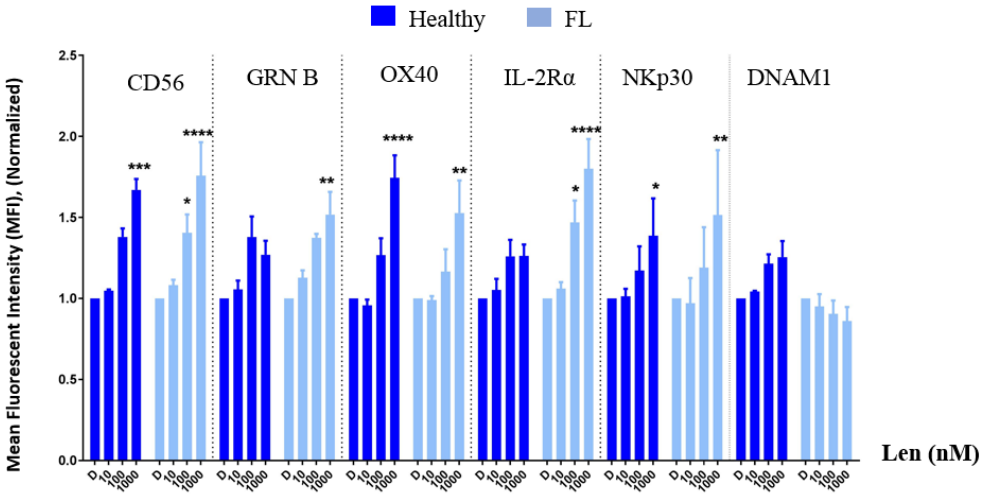
これらのデータから、レナリドミドによって NK 細胞及び NK T 細胞が活性化することが示された。

Figure 10:健康人及び濾胞性リンパ腫患者の末梢血単核細胞サンプル中のナチュラルキラー細胞及びナチュラルキラーT 細胞に発現する活性化マーカー発現量に対するレナリドミドの作用

A: Natural Killer Cells



B: Natural Killer T Cells



D = 溶媒（DMSO）のみ；FL = 濾胞性リンパ腫；GRN B = グランザイム B；IL-2Rα = インターロイキン 2 受容体 α；Len = レナリドミド；MFI = 平均蛍光強度

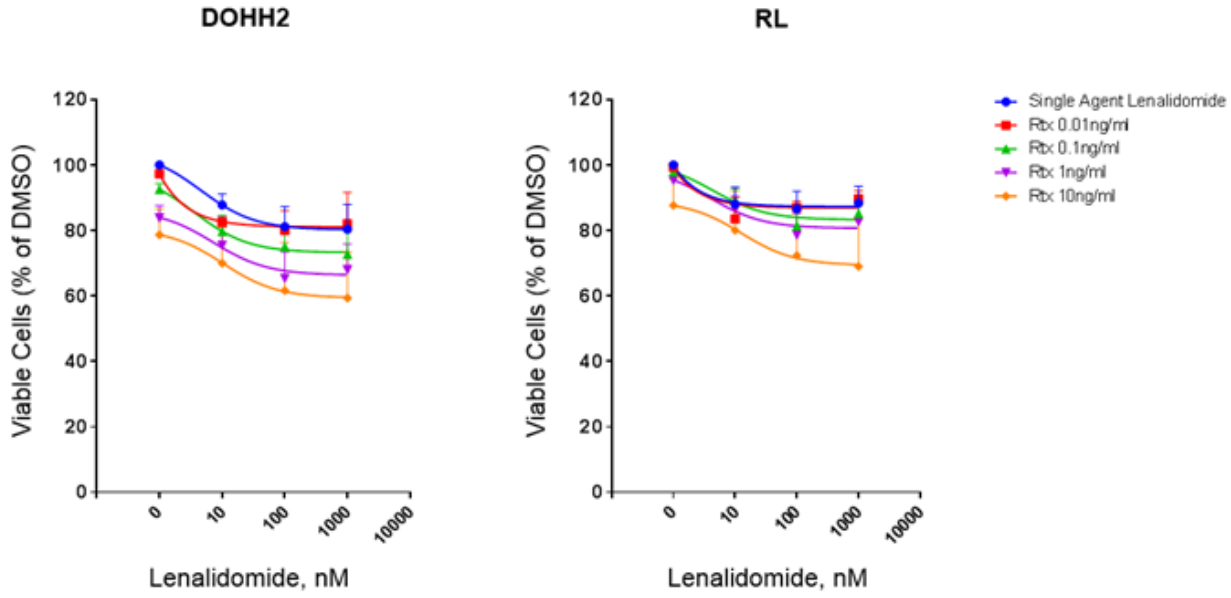
溶媒又はレナリドミド（10 - 1000 nM）で 1 時間処置した後に抗 CD3 抗体で 3 日間刺激した健康人及び FL 患者の PBMC サンプル中の NK 細胞（A）及び NK T 細胞（B）上の活性化マーカー発現量を溶媒対照群に対する増加倍数として示した。PBMC サンプルを各種抗体で蛍光染色した後、フローサイトメトリーで検出した。各データは、平均 ± 標準誤差（n = 4）で表した。
*, **, ***, ****：それぞれ p ≦ 0.05、p ≦ 0.01、 p ≦ 0.001、 p ≦ 0.0001 で有意差あり（溶媒対照群との比較、二元配置分散分析）。
Source: Report 8195-014

これまでの試験から、レナリドミドには NK 細胞の活性化を導き、DLBCL 及び MCL 細胞株に対する NK 細胞媒介性 ADCC を増強するといった、免疫細胞に対する作用が存在することが示されている（Hagner 2017; Wu, 2008）。本試験では、FL 患者の PBMC サンプル中の NK 細胞がレナリドミドによって活性化され、これが FL 細胞株に対する ADCC 活性の増強に繋がるか否かを明らかにした。

FL 患者 PBMC サンプルをレナリドミド（1 μM）単独処置すると、当該 PBMC によって FL 細胞株である DOHH2 細胞及び RL 細胞のアポトーシスがそれぞれ 20%及び 12%が誘発された。FL 細胞株をリツキシマブ（10 ng/mL）単独処置すると、DOHH2 細胞及び RL 細胞にそれぞれ 21%及び 12%のアポトーシスが誘導された。R^2 併用処置では、DOHH2 細胞で 41%、及び RL 細胞で 31%のアポトーシスが誘導された（Figure 11）。なお、健康人 PBMC サンプルでも R^2 併用処置によって FL 細胞株のアポトーシスが誘発され、その程度は FL 患者 PBMC サンプルの場合と同程度であった。

Figure 11:濾胞性リンパ腫細胞株（DOHH2 細胞及び RL 細胞）に対する末梢血単核細胞媒介性の細胞傷害作用に及ぼすレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の影響

FL patient cells



FL = 濾胞性リンパ腫；Rtx = リツキシマブ

FL 患者 PBMC サンプル（1×10^6 個/mL）を溶媒（DMSO）又はレナリドミド（10 - 1000 nM）で 1 時間処置した後に抗 CD3 抗体で 3 日間刺激した。一方、FL 細胞株（DOHH2 細胞及び RL 細胞）は、CFSE で染色した後に、リツキシマブ（0.01 - 10 ng/mL）で 1 時間処置した。その後、上記の PBMC サンプルと細胞数 1：3 の割合で混合し、さらに 4 時間にわたって共培養した。アネキシン V 及び TO-PRO-3 染色を用いたフローサイトメトリー分析によりアポトーシス誘導 FL 細胞数を測定し、算出した生細胞数を溶媒対照群の生細胞数に対する割合（%）で示した。データは平均 ± 標準誤差で表す（n = 3 - 6）。
Source: Report 8195-014

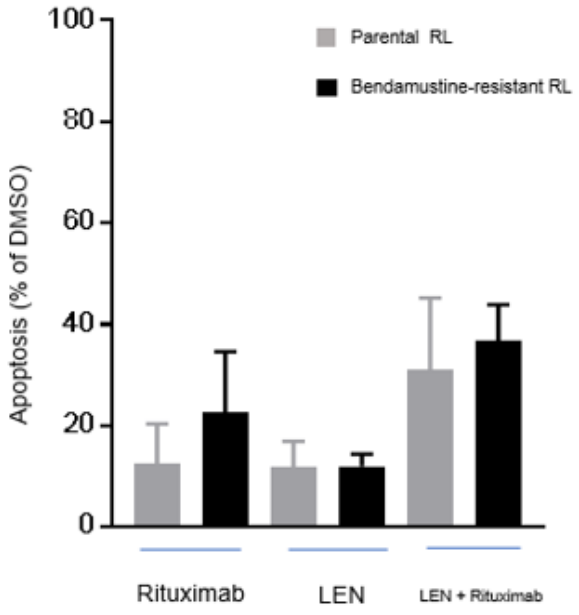
化学療法抵抗性の FL 細胞株を用いた R^2 併用処置の薬理試験も行った。RL 細胞を 4 ヵ月間にわたって最大 85 μM のベンダムスチン（Benda）に漸増的に曝露させることで Benda に対する抵抗性を獲得させた。この Benda 抵抗性 RL 細胞とその親 RL 細胞に対する FL 患者 PBMC 媒介性細胞傷害作用に対するレナリドミド、リツキシマブ、及び R^2 併用処置による影響を検討した。その結果、R^2 併用処置によって親 RL 細胞及び Benda 抵抗性 RL 細胞に対する PBMC 媒介性細胞傷害作用が増強されることが確認された。すなわち、親 RL 細胞及び Benda 抵抗性 RL 細胞に対して、レナリドミド単独処置によっていずれの細胞でも 12%の細胞死が誘導された。リツキシマブ単独処置ではそれぞれ

12%及び23%の細胞死が、R²併用処置ではそれぞれ31%及び37%の細胞死が誘導された（Figure 12）。

以上のように、親RL細胞及びBenda抵抗性RL細胞のいずれに対してもR²併用処置が同程度の効力を発揮することが示されたことから、化学療法抵抗性FLに対してもR²併用処置の治療効果が期待できる。

Figure 12:濾胞性リンパ腫細胞株（RL細胞）の親細胞及びベンダムスチン抵抗性細胞に対する末梢血単核細胞媒介性細胞傷害作用に及ぼすレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の影響

PBMCs from FL Patients



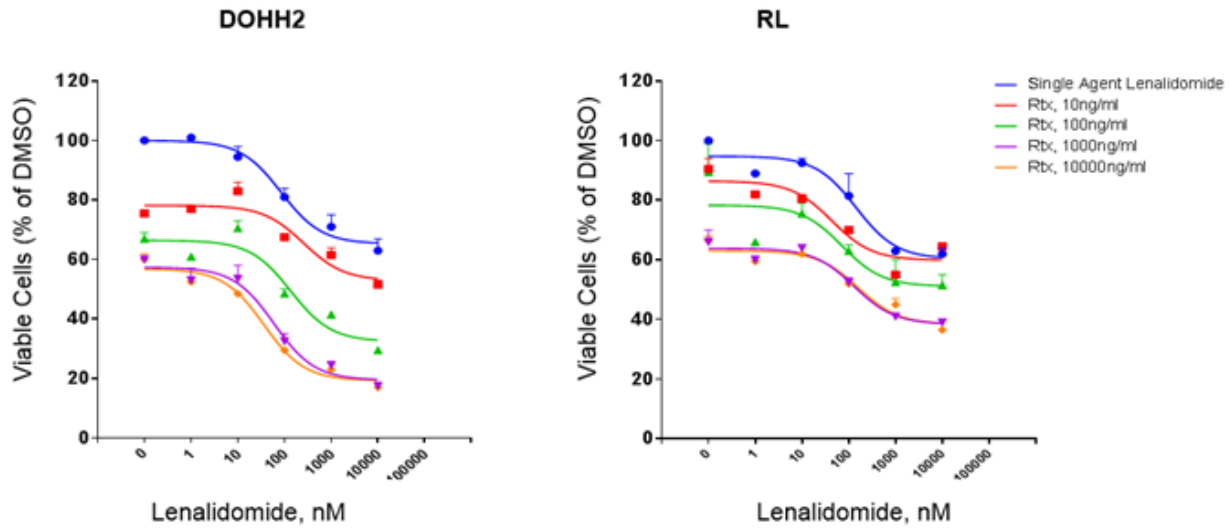
FL＝濾胞性リンパ腫；Len＝レナリドミド；PBMC＝末梢血単核細胞

FL患者のPBMCサンプルを溶媒（DMSO）もしくはレナリドミド（1 μM）で1時間処置した後に、抗CD3抗体で72時間刺激した。一方、FL細胞株であるRL細胞の親細胞（Parental RL）及びBenda抵抗性RL細胞をCFSEで標識した後に、リツキシマブ（10 ng/mL）と共に1時間インキュベートした。このPBMCサンプルと親RL細胞あるいはBenda抵抗性RL細胞を4時間にわたって共培養した。アネキシンV及びTO-PRO-3を用いたフローサイトメトリー分析により、CFSE陽性細胞のアポトーシスを測定した。データは、n＝3の平均±標準誤差で表す。
Source: Report 8195-014.

レナリドミドのNHL細胞株に対する直接的な細胞傷害作用も評価した。悪性腫瘍B細胞では、レナリドミド処置によって生じるセレブロン基質Aiolos及びIkarosの分解によってアポトーシスが誘導される（Hagner, 2015）。本試験では、FL細胞株におけるR²併用処置のアポトーシス誘導作用を検討した。2種類のFL細胞株（DOHH2細胞及びRL細胞）をR²併用処置（DMSO又はレナリドミド［1 - 10000 nM］で7日間処置の後にリツキシマブ［10 - 10000 ng/mL］で24時間処置）すると、いずれかの薬物を単独で処置した場合と比較してアポトーシスが増加した。すなわち、レナリドミド単独処置の場合、DOHH2細胞及びRL細胞の両FL細胞株ともに生細胞数がレナリドミド濃度依存的に減少し、リツキシマブを漸増させながらレナリドミドと併用すると、FL細胞株の生細胞数が更に減少した。DOHH2細胞では溶媒対照群との比較においてレナリドミド（1 μM）単独処置で生細胞

数が 29%減少し、リツキシマブ（10 µg/mL）単独処置では生細胞数が 40%減少した。これらの薬物濃度の R^2 併用処置では生細胞数の減少が 77%と有意に（$p \leqq 0.0001$、溶媒対照群との比較、一元配置分散分析）増加した（Figure 13）。同じく RL 細胞では、レナリドミド（1 µM）単独処置及びリツキシマブ（10 µg/mL）単独処置で生細胞数がそれぞれ 37%及び 34%減少したが、同 R^2 併用処置では生細胞数の減少が 55%と有意に増強した（Figure 13）。なお、R^2 併用処置によるアポトーシス増強は、RL 細胞では相加的であり、DOHH2 細胞では相乗的であった（フラクショナルプロダクト法による判定）。

Figure 13:濾胞性リンパ腫細胞株（DOHH2 細胞及び RL 細胞）に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の直接的細胞傷害作用



Rtx = リツキシマブ

濾胞性リンパ腫細胞株（DOHH2 細胞及び RL 細胞）を溶媒（DMSO）又はレナリドミド（1 - 10000 nM）で 7 日間処置した後に、リツキシマブ（10 - 10000 ng/mL）を加えてさらに 24 時間インキュベートした。アネキシン V 及び TO-PRO-3 染色を用いたフローサイトメトリー分析によりアポトーシス誘発細胞数を測定し、生細胞数（Viable cells）を算出した。データは平均 ± 標準誤差で表す。n = 2
Source: Report 8195-014

2.1.2. 脾辺縁帯リンパ腫

2.1.2.1. 脾辺縁帯リンパ腫細胞株に対する直接的な増殖抑制作用及び細胞傷害作用、並びに健康人由来末梢血単核細胞媒介性の細胞傷害作用に対する影響

［報告書番号 8195-008、添付資料 4.2.1.1.3、評価資料］

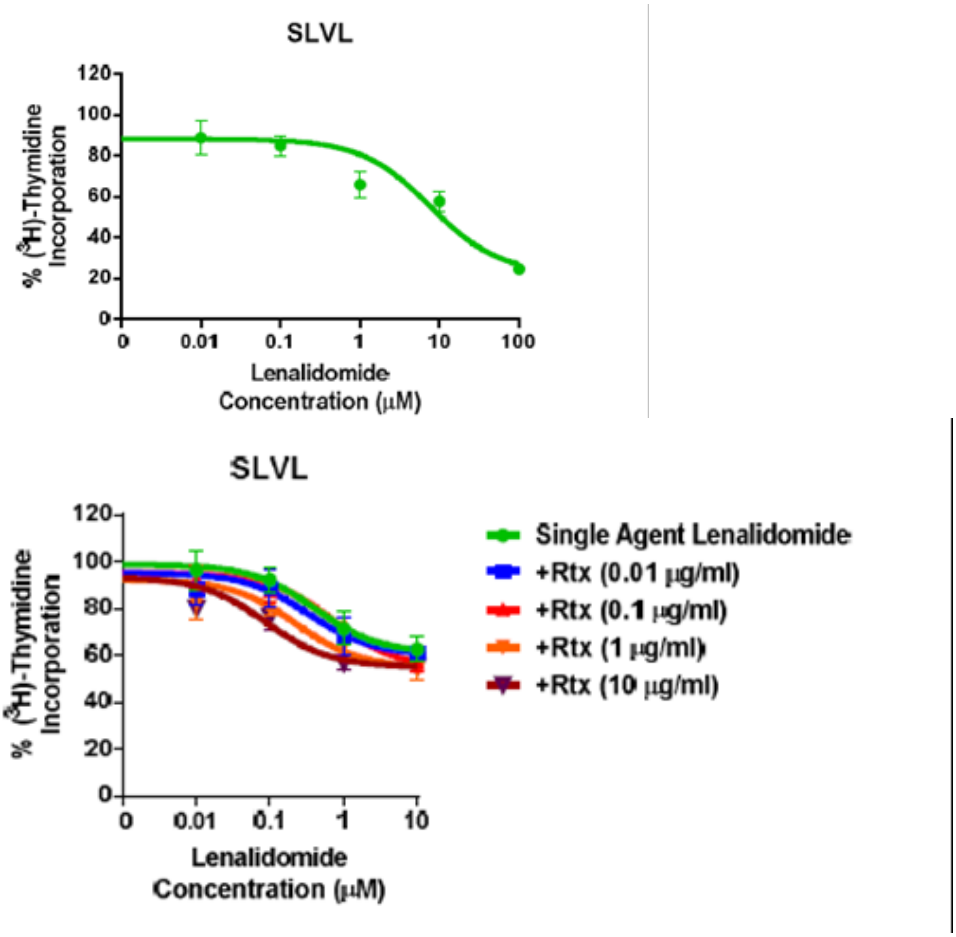
SMZL は胚中心後 B 細胞に由来し辺縁帯に浸潤する低悪性度 B 細胞性非ホジキンリンパ腫であり、合併症として脾腫及び自己免疫性疾患が比較的多く認められる。本試験では、レナリドミド単独処置及び R^2 併用処置の増殖抑制作用及びアポトーシス惹起作用を SMZL モデル（*in vitro*）を用いて評価した。さらに、免疫細胞の活性化及び PBMC 媒介性細胞傷害作用に対する影響を、レナリドミド単独処置及び R^2 併用処置により評価した。

SMZL 細胞株である SLVL（有毛リンパ球を伴う脾 B 細胞リンパ腫）細胞の細胞増殖に対するレナリドミドの作用を同細胞の［^{3}H］-チミジン取込みアッセイで検討したところ、［^{3}H］-チミジンの取り込み量がレナリドミド濃度依存的に阻害され、その時の EC_{50} 値は約 0.9 µM であった（Figure 14 上）。次に、単独処置又はリツキシマブ併用（リツキシマブは 0.01 - 10 µg/mL）下で、レナリドミド濃度を漸増（0.01 - 10 µM）して 3 日間にわたり SLVL 細胞を処置する、追加試験を実施した。その結果、レナリドミド単独処置で［^{3}H］-チミジン取込みのレナリドミド濃度依存的阻害作用が再現され（阻害曲線下面積［AUC］= 540）、そこにリツキシマブを併用するとリツキシマブ濃度依存的に阻害曲線が左へシフトした（リツキシマブ濃度 0.01、0.1、1 及び 10 µg/mL について、それぞれ AUC = 520、525、492 及び 482）（Figure 14 下）。

単独処置又は R^2 併用処置でのレナリドミドの細胞傷害作用を評価する目的で、SLVL 細胞（5×10^5 細胞/mL）を、溶媒（DMSO）、レナリドミド（0.01 - 10 µM）、リツキシマブ（0.01 - 10 µg/mL）、又は R^2 併用で 3 日間処置した。薬物処置後にアネキシン V 及び TO-PRO-3 染色を用いたフローサイトメトリー分析によってアポトーシス誘導細胞を検出した。その結果、レナリドミド単独処置では、レナリドミド濃度依存的にアポトーシスが誘導されることが示された（Figure 15）。またリツキシマブをレナリドミド処置細胞に追加したところ、相加的なアポトーシス増強が認められた。

PBMC との共培養時に惹起される SLVL 細胞に対する PBMC 媒介性細胞傷害作用に対するレナリドミドの作用を検討した。健康人の PBMC サンプルを溶媒（DMSO）又はレナリドミド（0.001 - 10 µM）で処置した後、抗 CD3 抗体で 72 時間刺激した。SLVL 細胞は CFSE で標識した後、上記 PBMC と 1：3 の割合で混合した。4 時間後に上清を回収し、上清中に含まれるグランザイム B を ELISA 法により測定した。その結果、グランザイム B 遊離量のレナリドミド濃度依存的な増加が認められ、レナリドミドにより NK 細胞の活性化が惹起されることが示唆された（Figure 16）。

Figure 14:脾辺縁帯リンパ腫細胞株（SLVL 細胞）における［^{3}H］-チミジン取込みに対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の作用



Rtx = リツキシマブ；SLVL = 有毛リンパ球を伴う脾 B 細胞リンパ腫

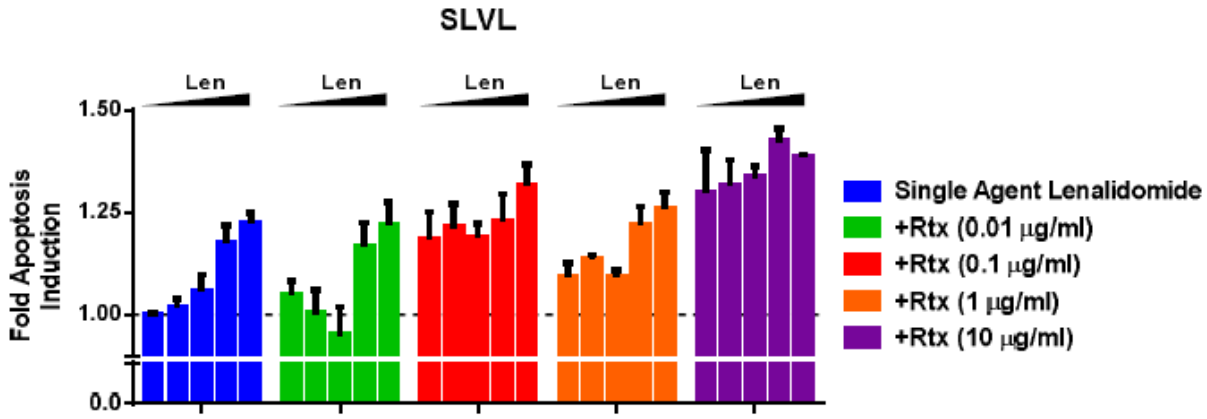
対数増殖期にある SLVL 細胞を溶媒（DMSO）又は薬物（単独又は R^2 併用）で 72 時間処置した後、[^{3}H]-チミジンを培地に加えさらに 6 時間インキュベートした。回収した細胞中の放射能をシンチレーションカウンターにて測定した。平均 ± 標準偏差。n = 4

上図：レナリドミド単独（0.01 - 100 µM）で処置した SLVL 細胞の［^{3}H］-チミジン取込み量を、溶媒対照群に対する割合（%）で示した。

下図：レナリドミド単独（0.01 - 10 µM）又はリツキシマブ（0.01 - 10 µg/mL）との併用で 72 時間処置した SLVL 細胞の［^{3}H］-チミジン取込み量を、溶媒対照群に対する割合（%）で示した。

Source: Report 8195-008

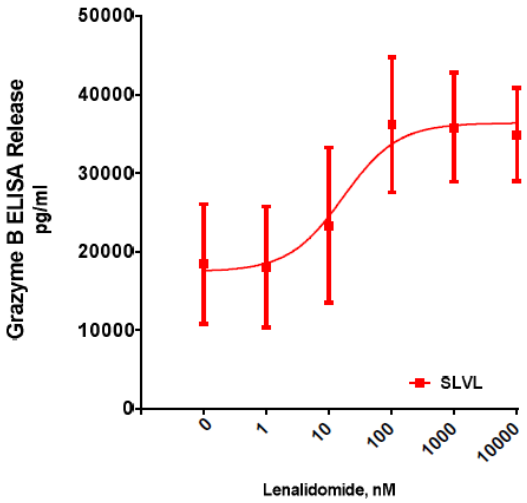
Figure 15:脾辺縁帯リンパ腫細胞株（SLVL 細胞）に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の直接的細胞傷害作用



Len = レナリドミド；Rtx = リツキシマブ；SLVL = 有毛リンパ球を伴う脾 B 細胞リンパ腫

対数増殖期にある SLVL 細胞を溶媒（DMSO）、レナリドミド（0.01 - 10 µM）、リツキシマブ（0.01 - 10 µg/mL）で 72 時間処置（単独又は R^2 併用）した後、アネキシン V 及び TO-PRO-3 染色を用いたフローサイトメトリー分析によりアポトーシス誘発細胞数を測定した。各データは溶媒対照群に対する倍数として示した。平均 ± 標準偏差。n = 4
Source: Report 8195-008

Figure 16:脾辺縁帯リンパ腫細胞株（SLVL 細胞）と末梢血単核細胞の共培養時におけるグランザイム B 遊離に対するレナリドミドの影響



ELISA = 酵素結合免疫吸着測定法；SLVL = 有毛リンパ球を伴う脾 B 細胞リンパ腫

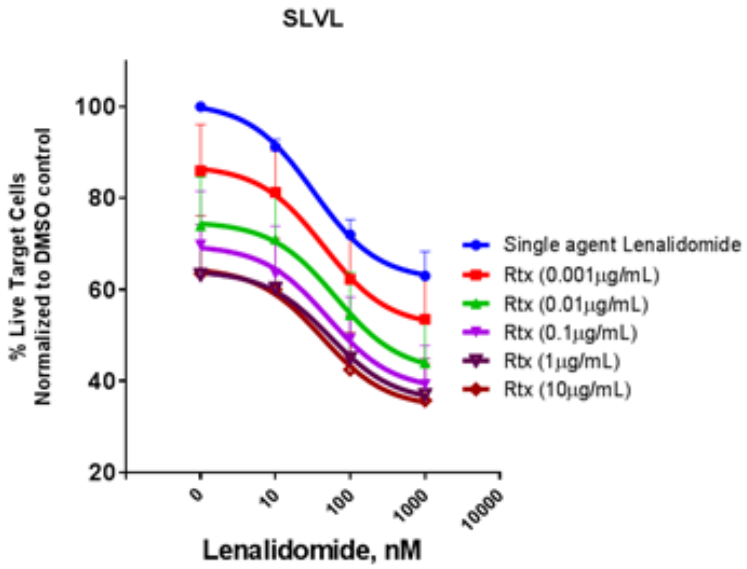
健康人の PBMC サンプルを溶媒（DMSO）又はレナリドミド（1 - 10000 nM）で 1 時間処置した後、抗 CD3 抗体で 3 日間刺激した。SLVL 細胞は CFSE で標識した後に、上記 PBMC サンプルと 1：3 の割合で混合した。4 時間後、上清を回収し、ELISA 法を用いてグランザイム B の遊離量を測定した。平均 ± 標準偏差。n = 4
Source: Report 8195-008

さらに、レナリドミドは PBMC 媒介性細胞傷害作用を刺激することが示され、レナリドミド単独処置（1 µM）で SLVL 生細胞数の約 40%減少を引き起こした。なお、リツキシマブ単独処置

（10 µg/mL）も SLVL 生細胞数の約 40%減少を引き起こした。さらに、R² 併用処置した場合（レナリドミド、リツキシマブ共に最高被験濃度）は 60%を上回る SLVL 生細胞数減少を引き起こした（Figure 17）。

以上の結果から、*in vitro* においてレナリドミド単独あるいは R² 併用で SMZL 細胞に対する直接的な増殖抑制作用、細胞傷害作用及び免疫刺激による細胞傷害活性化作用を発揮することが示され、レナリドミド単独での抗腫瘍活性が明らかになると共に、R² 併用時にはさらなる増強効果を得られることも示された。

Figure 17:脾辺縁帯リンパ腫細胞株（SLVL 細胞）における末梢血単核細胞媒介性細胞傷害作用に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の作用（1）



Rtx = リツキシマブ；SLVL = 有毛リンパ球を伴う脾 B 細胞リンパ腫

健康人の PBMC サンプル（n = 4）を溶媒（DMSO）あるいはレナリドミド（10 - 1000 nM）で 1 時間処置した後、抗 CD3 抗体で 3 日間刺激した。SLVL 細胞は CFSE で標識した後にリツキシマブ（0.001 - 10 µg/mL）で 1 時間処置し、上記 PBMC サンプルと 1：3 の割合で混合した。4 時間後、アネキシン V 及び TO-PRO-3 染色を用いたフローサイトメトリー分析によりアポトーシス誘発細胞数を測定し、溶媒処置群との比較から SLVL 生細胞の割合（%）を算出した。各データは平均 ± 標準誤差で表す。
Source: Report 8195-008

2.1.2.2. 脾辺縁帯リンパ腫細胞株に対する健康人及び辺縁帯リンパ腫患者由来の末梢血単核細胞媒介性の細胞傷害作用に対する影響、並びに直接的細胞傷害作用

［報告書番号 8195-014、添付資料番号 4.2.1.1.2、評価資料］

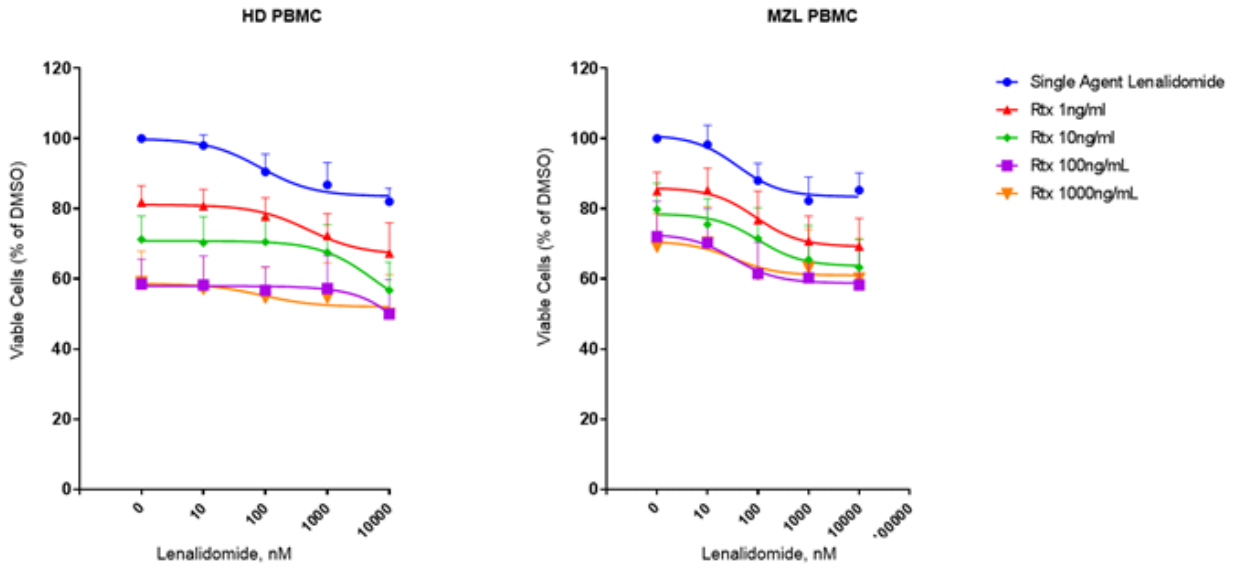
SLVL 細胞に対するレナリドミド、リツキシマブ及び R² 併用処置の PBMC 媒介性細胞傷害作用及び直接的な細胞傷害作用を評価した。

PBMC 媒介性細胞傷害作用を検討した試験では、健康人 PBMC サンプルを用いた場合、SLVL 細胞のリツキシマブ単独処置（1000 ng/mL）によって、SLVL 生細胞数が約 40%減少した。PBMC サンプルのレナリドミド単独処置（1000 nM）によっても SLVL 生細胞数が 13%減少し、これらの併用処置（R² 併用）の場合には、最大で 45%の SLVL 生細胞数減少が認められた。なお、リツキシマブ高濃

度を用いた際のレナリドミドの濃度依存性が同様の試験内容である前項 Figure 17 よりも弱かったが、両試験で用いた PBMC サンプルは異なるヒト由来のものであり、各 PBMC サンプルの不均一性による差が表れたものと思われる。 一方、MZL 患者 PBMC サンプルを用いた場合は、SLVL 細胞のリツキシマブ単独処置（1000 ng/mL）によって、SLVL 生細胞数が 31%減少した。PBMC サンプルのレナリドミド単独処置（1000 nM）によっても SLVL 生細胞数が 18%減少した。さらに、これらの併用処置（R^2 併用）の場合には、最大で 37%の SLVL 生細胞数減少が認められた（Figure 18）。以上のように、レナリドミド処置によって健康人及び MZL 患者の PBMC が刺激され、リツキシマブが惹起する細胞傷害作用を増強することが前項同様に示された。

次に、SLVL 細胞に対するレナリドミド（1 - 10000 nM）、リツキシマブ（10 - 10000 ng/mL）及び R^2 併用処置の直接的な細胞傷害作用を評価した。レナリドミド単独処置では、本薬の濃度が増すにつれて生細胞数の減少が認められ、直接的な細胞傷害作用が生じることが示された（Figure 19）。一方、今回の実験条件下では、リツキシマブを漸増させて処置しても生細胞数の更なる低下が生じることはなかった。

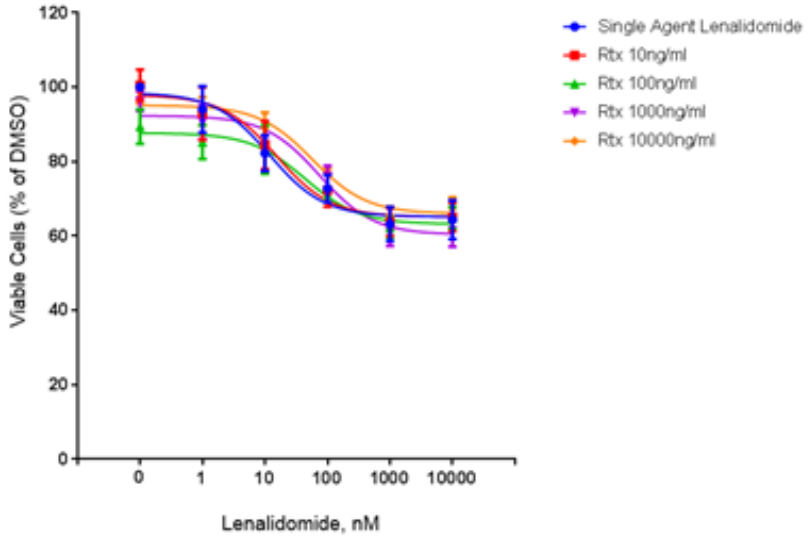
Figure 18:脾辺縁帯リンパ腫細胞株（SLVL 細胞）における末梢血単核細胞媒介性細胞傷害作用に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の作用（2）



HD = 健康人；MZL = 辺縁帯リンパ腫；PBMC = 末梢血単核細胞；Rtx = リツキシマブ

A）健康人及び B）MZL 患者の PBMC サンプル（どちらも n = 4）を溶媒（DMSO）又はレナリドミド（10 - 10000 nM）で 1 時間処置した後に抗 CD3 抗体で 3 日間刺激した。一方、SLVL 細胞は CFSE で標識した後、リツキシマブ（1 - 1000 ng/mL）で 1 時間処置した。その後、当該 SLVL 細胞を上記の PBMC と 1:3 の比で混合し、4 時間にわたって共培養した。アネキシン V 及び TO-PRO-3 染色を用いたフローサイトメトリー分析によりアポトーシス誘発細胞数を測定し、溶媒処置群との比較から SLVL 生細胞の割合（%）を算出した。各データは平均 ± 標準誤差で表す。
Source: Report 8195-014

Figure 19:脾辺縁帯リンパ腫細胞株（SLVL 細胞）に対するレナリドミド、リツキシマブ及びその併用処置の直接的細胞傷害作用



Rtx = リツキシマブ

SLVL 細胞を溶媒（DMSO）又はレナリドミド（1 - 10000 nM）で 7 日間処置した後に、リツキシマブ（10 - 10000 ng/mL）で 24 時間処置した。アネキシン V 及び TO-PRO-3 染色を用いたフローサイトメトリー分析によりアポトーシス誘発細胞数を測定し、溶媒処置群との比較から SLVL 生細胞の割合（%）を算出した。各データは平均 ± 標準誤差で表す。n = 6
Source: Report 8195-014

3. 副次的薬理試験

該当なし

4. 安全性薬理試験

該当なし

5. 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし

6. 考察及び結論

これまでに実施された臨床試験結果から、レナリドミドは MM、del(5q) MDS 及び ATL に加えて、FL 及び MZL の患者においても治療効果を示すことが明らかとなっている。さらに、今回の非臨床試験では、複数の NHL モデルに対してリツキシマブとの併用による抗腫瘍効果の増強を示した。

腫瘍によって誘発される免疫シナプス形成障害が、FL における免疫抑制の機序の一つとして特定されている。今回の薬理試験では、レナリドミド処置によって免疫シナプスにおける F アクチン重合が増強され、また、免疫シナプスにおけるチロシンリン酸化タンパク質及びグランザイム B の発現も増強されることが示された。さらに、R^2 併用処置により NK 細胞の作用が増強されて、細胞傷害能がさらに増加する結果となった。これらのデータから、FL に対する併用免疫療法としての R^2 併用処置について詳細に理解できることとなった。すなわち、腫瘍によって障害されている免疫シナプスが R^2 併用処置により復活すること、並びに T 細胞及び NK 細胞の自家腫瘍細胞に対する傷害作用が R^2 併用処置により増強することが判明し、R^2 併用処置は免疫学的な作用に基づいて臨床効果を発揮するものであることが示唆された。

レナリドミドの処置によって、エフェクターT 細胞、NK 細胞及び NK T 細胞が増殖及び活性化され、*ex vivo* の試験系においては健康人及び FL 患者の両 PBMC サンプルでレナリドミドの処置によるサイトカイン産生・遊離が観察された。さらに R^2 併用処置は、FL 細胞株に対する単独処置と比較して、PBMC 媒介性及び直接的な細胞傷害作用の増強を示した。また R^2 併用処置は Benda 抵抗性細胞株に対する抗腫瘍活性も示した。

レナリドミドの SMZL 細胞株に対する細胞傷害作用は PBMC 媒介性のものだけでなく、直接的なものも存在することが示された。また、レナリドミド単独処置による直接的な抗増殖活性やアポトーシス誘導作用は R^2 併用処置でさらに増強されることが示された。さらに、レナリドミド単独処置は濃度依存的に SMZL 細胞に対する PBMC 媒介性細胞傷害を増強した。これはグランザイム B 遊離と良好な相関性を示したことから、NK 細胞の活性化を示唆する結果であった。また、PBMC 共培養下での SMZL 細胞株に対する細胞傷害作用はレナリドミドで増強されるが、リツキシマブとの併用処置により更に増強された。

以上のように、FL 及び SMZL 細胞株を用いた非臨床試験において、レナリドミド単独での薬理活性並びにその作用機序が明らかとなった。さらにこれらの試験において、R^2 併用処置によりレナリドミド又はリツキシマブ単独処置を超える有効性が示されることも確認された。

7. 参考文献

Bjorklund CC, Lu L, Kang J, Hagner PR, Havens CG, Amatangelo M, et al. Rate of $CRL4^{crbn}$ substrate Ikaros and Aiolos degradation underlies differential activity of lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma cells by regulation of c-MYC and IRF4. Blood Cancer J. 2015;5:e354.

Davies F, Baz R. Lenalidomide mode of action: linking bench and clinical findings. Blood Rev. 2010;24(suppl 1):S13-S19.

Dawar R, Hernandez-Ilizaliturri F. The emerging role of lenalidomide in the management of mantle cell lymphoma (MCL). Best Pract Res Clin Haematol. 2012;25(2):185-190.

Ferrajoli A, Lee BN, Schlette EJ, et al. Lenalidomide induces complete and partial remissions in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2008;111(11):5291-5297.

Fowler NH, Davis RE, Rawal S, Nastoupil L, Hagemeister FB, Mclaughlin P, et al. Safety and activity of lenalidomide and rituximab in untreated indolent lymphoma: an open-label, phase 2 trial. Lancet Oncol. 2014;15(12):1311-1318.

Gandhi AK, Kang J, Havens CG, Conklin T, Ning Y, Wu L, et al. Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex $CRL4^{CRBN}$. Br J Haematol. 2014;164(6):811-821.

Hagner PR, Chiu H, Ortiz M, Apollonio B, Wang M, Couto S, et al. Activity of lenalidomide in mantle cell lymphoma can be explained by NK cell-mediated cytotoxicity. Br J Haematol. 2017;179(3):399-409.

Hagner PR, Man HW, Fontanillo C, Wang M, Couto S, Breider M, et al. CC-122, a pleiotropic pathway modifier, mimics an interferon response and has antitumor activity in DLBCL. Blood. 2015;126(6):779-789.

Heise C, Carter T, Schafer P, Chopra R. Pleiotropic mechanisms of action of lenalidomide efficacy in del(5q) myelodysplastic syndromes. Expert Rev Anticancer Ther. 2010;10(10):1663-1672.

Hernandez-Ilizaliturri FJ, Reddy N, Holkova B, Ottman E, Czuczman MS. Immunomodulatory drug CC-5013 or CC-4047 and rituximab enhance antitumor activity in a severe combined immunodeficient mouse lymphoma model. Clin Cancer Res. 2005;11(16):5984-5992.

Kotla V, Goel S, Nischal S, Heuck C, Vivek K, Das B, et al. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. J Hematol Oncol 2009;2:36-45.

Krönke J, Udeshi ND, Narla A, Grauman P, Hurst SN, McConkey M, et al. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. Science. 2014;343(6168):301-305.

Krzewski K, Coligan JE. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. Front Immunol. 2012;3:335.

List A. Lenalidomide--a transforming therapeutic agent in myelodysplastic syndromes. Clin Lymphoma Myeloma. 2009;9(suppl 3):S302-S304.

Lopez-Girona A, Mendy D, Ito T, Miller K, Gandhi AK, Kang J, et al. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. Leukemia. 2012;26(11):2326-2335.

Lu G, Middleton RE, Sun H, Naniong M, Ott CJ, Mitsiades CS, et al. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of ikaros proteins. Science. 2014;343(6168):305-309.

Martiniani R, Di Loreto V, Di Sano C, Lombardo A, Liberati AM. Biological activity of lenalidomide and its underlying therapeutic effects in multiple myeloma. Adv Hematol. 2012;2012:1-11

Ramsay AG, Clear AJ, Kelly G, Fatah R, Matthews J, MacDougall F, et al. Follicular lymphoma cells induce T-cell immunological synapse dysfunction that can be repaired with lenalidomide: implications for the tumor microenvironment and immunotherapy. Blood 2009;114(21):4713-20.

Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, Gorgün G, Le Dieu R, Blum W, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. J Clin Invest. 2008;118(7):2427-2437.

Reddy N, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Deeb G, Roth M, Vaughn M, Knight J, et al. Immunomodulatory drugs stimulate natural killer-cell function, alter cytokine production by dendritic cells, and inhibit angiogenesis enhancing the anti-tumour activity of rituximab in vivo. Br J Haematol. 2008;140(1):36-45.

Schafer PH, Gandhi AK, Loveland MA, Chen RS, Man HW, Schnetkamp PP, et al. Enhancement of cytokine production and AP-1 transcriptional activity in T cells by thalidomide-related immunomodulatory drugs. J Pharmacol Exp Ther. 2003;305(3):1222-1232.

Sugimoto T, Watanabe T. Follicular lymphoma: The role of the tumor microenvironment in prognosis. J Clin Exp Hematop. 2016;56(1):1-19.

Wu L, Adams M, Carter T, Chen R, Muller G, Stirling D, et al. Lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated $CD20^{+}$ tumor cells. Clin Cancer Res. 2008;14(14):4650-4657.

Zeldis JB, Knight R, Hussein M, Chopra R, Muller G. A review of the history, properties, and use of the immunomodulatory compound lenalidomide. Ann N Y Acad Sci. 2011;1222:76-82.

Zhu D, Corral LG, Fleming YW, Stein B. Immunomodulatory drugs Revlimid®(lenalidomide) and CC-4047 induce apoptosis of both hematological and solid tumor cells through NK cell activation. Cancer Immunol Immunother. 2008;57(12):1849-1859.

Zhu YX, Kortuem KM, Stewart AK. Molecular mechanism of action of the immune-modulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma. Leuk Lymphoma. 2013;54(4):683-687.

TABLE OF CONTENTS

1. 薬理試験：一覧表 2
2. 効力を裏付ける試験 3
3. 副次的薬理試験 5
4. 安全性薬理試験 5
5. 薬力学的薬物相互作用試験 5

1. 薬理試験：一覧表

Overview			**Test Article: Lenalidomide (CC-5013)**			
試験の種類	**試験系**	**投与方法**	**実施施設**	**報告書番号**	**区分・添付資料番号**	
効力を裏付ける試験						
Effect as Single Agent and in Combination with Rituximab (Rtx) on T and NK Cell Lytic Immune Synapses in Follicular Lymphoma (FL) *Ex Vivo*	Lymph node (LN) single-cell suspension and peripheral blood (PB) from patients with FL; NK cells from patient peripheral blood mononuclear cells (PBMC).	*In vitro*/*Ex vivo*: incubation	[redacted], UK	CC-5013-10202017AR	参考資料	4.2.1.1.1
Effect as Single Agent and in Combination with Rtx in FL and of Splenic Marginal Zone Lymphoma (SMZL)	FL cell lines: DOHH2 and RL; SMZL cell line: splenic B-cell lymphoma with villous lymphocytes (SLVL).	*In vitro*: incubation	Celgene Corp Summit, New Jersey, USA	8195-014	評価資料	4.2.1.1.2
Effect as Single Agent or in Combination with Rtx in a Preclinical Model of SMZL	SMZL cell line: SLVL.	*In vitro*: incubation	Celgene Corp Summit, New Jersey, USA	8195-008	評価資料	4.2.1.1.3

FL = follicular lymphoma; LN = lymph node; NK = natural killer; PB = peripheral blood; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; Rtx = rituximab; SLVL = splenic B-cell lymphoma with villous lymphocytes; SMZL = splenic marginal zone lymphoma.

2. 効力を裏付ける試験

					Test Article: Lenalidomide (CC-5013)	
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Doses (µg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Effect as Single Agent and in Combination with Rituximab (Rtx) on T and NK Cell Lytic Immune Synapses in Follicular Lymphoma (FL) *Ex Vivo*	Lymph node (LN) single-cell suspension and peripheral blood (PB) from patients with FL; NK cells from patient peripheral blood mononuclear cells (PBMC).	*In vitro*/*Ex vivo*: incubation	Lenalidomide (LEN): 1 µM	NA	Lenalidomide alone enhanced immune synapse formation between $CD4^+$T or $CD8^+$T with FL B cells with an increase in F-actin polymerization. There was an associated increase P-Tyr expression at the $CD4^+$T and Granzyme B at $CD8^+$T immune synapse. Lenalidomide alone enhanced the immune synapse formation between NK cells from PB and B cells with an increase in F-actin polymerization and increased Granzyme B expression at the immune synapse. Treatment of tumor-infiltrating $CD8^+$ T and NK cells from PB of FL patients with lenalidomide enhanced the autologous FL tumor cell death. Combination of lenalidomide and rituximab enhanced immune synapse formation driven by lenalidomide and the drug combination additively enhanced NK cell mediated cytotoxicity.	CC-5013-10202017AR

					Test Article: Lenalidomide (CC-5013)	
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Doses (µg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Effect as Single Agent and in Combination with Rtx in FL and of Splenic Marginal Zone Lymphoma (SMZL)	FL cell lines: DOHH2 and RL; SMZL cell line: SLVL.	*In vitro* incubation	LEN: 0.001 to 10 µM	NA	Lenalidomide enhanced proliferation and activation of T, NK, and NK T subsets in FL PBMCs in a concentration-dependent manner. Lenalidomide did not negatively affect PBMC viability. The R^2 combination enhanced FL patient PBMC mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against parental and chemoresistant FL cell lines. The R^2 combination was more potent at inducing PBMC-mediated ADCC than Rtx combined with chemotherapeutic/novel agents tested. Also, the R^2 combination additively or synergistically enhanced the autonomous cytotoxicity in FL cell lines as compared to the combination of Rtx with other chemotherapeutic/novel agents. The R^2 combination enhances MZL patient PBMC mediated ADCC against MZL cell line. Lenalidomide enhanced autonomous cytotoxicity in the MZL cell line.	8195-014
Effect as Single Agent or in Combination with Rtx in a Preclinical Model of SMZL	SMZL cell line: SLVL.	*In vitro* incubation	LEN: 0.001 to 100 µM	NA	Lenalidomide displayed dose-dependent antiproliferative and pro-apoptotic activity in the human SMZL model. Lenalidomide also induced anti-CD3 stimulated PBMCs to kill SMZL cells in a dose-dependent manner that correlated with Granzyme B release. In combination with Rtx, lenalidomide displays an additive, effect on proliferation, apoptosis, and PBMC-mediated killing of SMZL cells when compared to single agent activity alone.	8195-008

ADCC = antibody-dependent cellular cytotoxicity; FL = follicular lymphoma; LEN = lenalidomide; LN = lymph node; NK = natural killer; PB = peripheral blood; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; R^2 = revlimid (lenalidomide) and rituxan (rituximab) combination; Rtx = rituximab; SLVL = splenic B-cell lymphoma with villous lymphocytes; SMZL = splenic marginal zone lymphoma.

3. 副次的薬理試験

該当なし

4. 安全性薬理試験

該当なし

5. 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし