目次

2.6.1 緒言 2
2.6.2 参考文献 3

2.6.1 緒言

XL184（cabozantinib malate）は、主に血管内皮細胞増殖因子受容体 2（VEGFR2、KDR ともいう）、MET 及び AXL を標的とする新規の阻害剤である。VEGFR2 及び MET はそれぞれ腫瘍血管新生及び腫瘍細胞の増殖に関与しているばかりでなく、両者を同時に阻害することが腫瘍抑制に非常に効果的であることが知られており、また AXL は MET のシグナルを増強させることが知られている。XL184 はこのほかにも RET、ROS1、TYRO3、MER、VEGFR1、VEGFR3、KIT 及び FLT-3 を標的とする。

化学名： *N*-{4-[(6,7-Dimethoxyquinolin-4-yl)oxy]phenyl}-*N*'-(4-fluorophenyl) cyclopropane-1, 1-dicarboxamide mono-(2*S*)-malate

一般名： Cabozantinib Malate

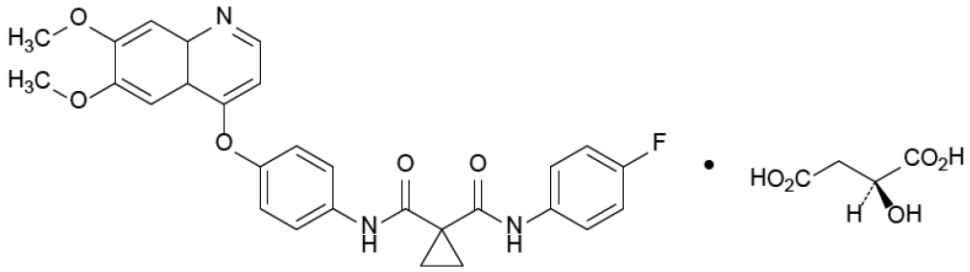
開発番号： XL184, EXEL-7184, EXEL-02977184

CAS 登録番号：1140909-48-3

分子式： $C_{28}H_{24}FN_3O_5 \cdot C_4H_6O_5$

分子量： 635.59

化学構造式:



MET 及び VEGFR2 は腎細胞癌（RCC）などの複数の腫瘍型において腫瘍細胞増殖、浸潤、転移及び血管新生の促進に重要な役割を果たす RTK である[1],[2]。AXL も、RCC などの癌における腫瘍細胞浸潤及び転移に関与し、AXL の発現量増加はこれらの患者における予後不良をもたらすことが示されている[3]。また、RET の変異活性化型は甲状腺髄様癌（MTC）及び非小細胞肺癌（NSCLC）におけるドライバー癌遺伝子として作用することが知られている[4],[5]。

新たに得られた前臨床及び臨床データから、VEGF 経路阻害に対する抵抗性の獲得は MET 経路などの新生血管促進や浸潤促進に関与するシグナル伝達経路の代償的な活性亢進に関連することが示唆されている[6]-[8]。RCC 患者由来の淡明細胞を用いた異種移植モデルにおいて、スニチニブに対する抵抗性の獲得が MET の過剰発現と関連していることが示され、VEGFR と MET の同時阻害により VEGFR 単独阻害よりも有効性が有意に改善した[9]。AXL も RCC 淡明細胞株において MET の活性化に関与しており[3]、VEGF シグナル伝達経路標的薬に対する MET を介した RCC 淡明細胞の抵抗性獲得に役割を果たしている可能性が示唆されている。このように、進行 RCC、MTC 及び NSCLC などの癌において MET、VEGFR、AXL 及び／又は RET などの複数のシグナル伝達経路を同時に標的とし阻害することは、VEGF シグナル伝達経路単独を標的とし阻害するよりも有益である可能性がある。

MET、VEGFR2、AXL 及び RET からのシグナル伝達を遮断する XL184 の作用を、in vivo 及び／又は in vitro 標的調節試験を用いて評価した。これらの試験で、XL184 は、MTC において多くみられる活性化型 RET（M918T）などのキナーゼに対する強い阻害を誘導した。組織学的解析により、胆癌マウスにおいて単一用量の XL184 の投与後 24 時間以内に腫瘍細胞及び腫瘍血管系の細胞死が発生することが示された。XL184 はヒト乳癌、ヒト NSCLC、ヒト MTC 及びラットグリオーマなどの固形腫瘍有効性モデルにおいて、60 mg の用量で 1 日 1 回（qd）投与したヒト被験者で測定された曝露量と同等の曝露量（Cave）で強い抗腫瘍活性を示し、大きな腫瘍の退縮を誘導した。

安全性薬理試験において、XL184 を投与したラットに神経行動又は呼吸器系機能に対する有害な影響はみられなかった。更に、テレメトリー試験で XL184 を投与したイヌの心血管又は心電図パラメータ（補正 QT 間隔など）に有意な変化はみられなかった。

XL184 の吸収、分布、代謝、及び排泄に関連する薬物動態パラメータを、in vitro 系並びに in vivo でマウス、ラット、イヌ及びサルを用いた非臨床試験において評価した。XL184 は水性懸濁剤又は固形経口剤として投与すると経口で生物学的に利用可能であった。XL184 について、in vitro 及び in vivo の両方における高い（99%超）血漿蛋白結合率、in vitro における総じて低い代謝変換率及びチトクロム P450（CYP）の特異的阻害又は誘導作用、並びに個々の薬物トランスポーターの基質又は阻害剤であることを示すエビデンスが明らかにされた。

XL184 の経口投与に関連する毒性を、ラット及びイヌにおける主要な GLP 適用の単回投与試験並びに 2 週間及び 26 週間反復投与試験、ラットにおける受胎能試験、ラット及びウサギにおける胚・胎児毒性試験、ラットにおける出生前及び出生後毒性試験並びに幼若ラット毒性試験、rasH2 トランスジェニックマウスにおける 26 週間がん原性試験、ラットにおける 2 年間がん原性試験、in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験、並びに in vitro 光毒性試験において評価した。これらの試験において特定された XL184 に関連する毒性の標的組織は、消化管、骨髄、リンパ系組織、生殖器組織、内分泌組織、腎臓及び皮膚であった。XL184 投与は、雌雄ラットの受胎能の低下、ラットにおける胚・胎児毒性、ウサギにおける胎児軟組織異常（脾臓サイズの縮小、肺中葉の欠損）、ラットにおける胚毒性用量における胚胎児骨格異常をもたらした。XL184 は、遺伝毒性及び光毒性試験において陰性であった。がん原性では、rasH2 トランスジェニックマウスにおける 26 週間試験では、XL184 に関連する腫瘍性の病理組織学的所見は認められなかったが、ラットにおける 2 年間がん原性試験では、副腎髄質に良性褐色細胞腫単独あるいは悪性褐色細胞腫と混在して出現する頻度の上昇が認められた。

RCC の分子病態生理に基づき、RCC の治療において、MET、VEGFR2 及び AXL を強く阻害する XL184 を評価することには作用機序に基づく根拠がある。

2.6.2 参考文献

[1] Carmeliet P and Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature. 2011;473: 298–307.

[2] Harshman LC and Choueiri TK. Targeting the hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway in renal cell carcinoma. Cancer J, 2013;(4): 316–23.

[3] Rankin EB, Fuha KC, Castellinia L, Viswanathana K, Fingera EC, Diepa AN, et al. Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIFpromotes renal metastasis through SRC and MET. PNAS, 2014;111(37): 13373–78.

[4] Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Leary R, Bettegowda C and Roberts NJ. Exomic Sequencing of Medullary Thyroid Cancer Reveals Dominant and Mutually Exclusive Oncogenic Mutations in RET and RAS. JCEM, 2013;98(2): E364–69.

[5] Drilon A , Wang L, Hasanovic A, Suehara Y, Lipson D, Stephens P, et al. Response to Cabozantinib in Patients with RET Fusion-Positive Lung Adenocarcinomas. Cancer Discov, 2013; 3(6); 630–5.

[6] Shojaei F, Lee JH, Simmons BH, Wong A, Esparza CO, Plumlee PA, et al. HGF/c-Met Acts as an Alternative Angiogenic Pathway in Sunitinib-Resistant Tumors. Cancer Res, 2010; 70(24); 10090–100.

[7] Ebos JML and Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. Nat. Rev. Clin. Oncol, 2011; 8, 210–21.

[8] Sennino B, Ishiguro-Oonuma T, Wei Y, Naylor RM, Williamson CW, Bhagwandin V, et al. Suppression of Tumor Invasion and Metastasis by Concurrent Inhibition of c-Met and VEGF Signaling in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. Cancer Discovery, 2012; 2(3); 270-87.

[9] Ciamporcero E, Miles KM, Adelaiye R, Ramakrishnan S, Shen L, Ku SY, et al. Combination Strategy Targeting VEGF and HGF/c-metinHumanRenal Cell Carcinoma Models. Mol Cancer Ther, 2014; 14(1); 101–10.

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 7
2.6.2.1 まとめ 7
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 9
2.6.2.2.1 XL184 活性の生化学的特性解析 9
2.6.2.2.2 細胞における XL184 活性の評価 13
2.6.2.2.3 In vivo 薬理試験 17
2.6.2.2.4 In vivo 有効性モデル 27
2.6.2.3 副次的薬理試験 42
2.6.2.4 安全性薬理試験 43
2.6.2.4.1 In vitro 安全性薬理試験 43
2.6.2.4.2 ラットにおける In vivo 安全性薬理試験 43
2.6.2.4.3 イヌにおける安全性薬理試験 44
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 45
2.6.2.6 考察及び結論 45
2.6.2.7 図表 48
2.6.2.8 参考文献一覧 49

表

表 2.6.2.2.1.1-1 XL184 によるプロテインキナーゼの阻害 10
表 2.6.2.2.1.1-2 XL184 による活性化 RET キナーゼバリアントの阻害 11
表 2.6.2.2.2.1-1 XL184 による細胞内受容体型チロシンキナーゼの活性阻害 13
表 2.6.2.2.2.2-1 XL184 による腫瘍細胞増殖阻害（IC_{50}<1,000 nmol/L） 14
表 2.6.2.2.3.1-1 マウスにおける XL184 単回投与 In vivo 標的調節試験の要約 18
表 2.6.2.2.3.2-1 H441 腫瘍異種移植モデルにおける XL184 による MET 阻害の薬力学（用量反応、投与 4 時間後時点） 19
表 2.6.2.2.3.2-2 H441 腫瘍異種移植モデルにおける XL184 による MET 阻害の薬力学（作用持続時間、用量 100 mg/kg） 19
表 2.6.2.2.3.3-1 肺組織における VEGFR2 阻害の薬力学（用量反応試験、投与 4 時間後時点）） 21
表 2.6.2.2.3.3-2 肺組織における VEGFR2 阻害の薬力学（作用持続時間試験、用量 100 mg/kg） 21
表 2.6.2.2.3.4-1 XL184 による RET 阻害の薬力学（用量反応試験、投与 4 時間後時点） 22
表 2.6.2.2.3.4-2 XL184 による RET 阻害の薬力学（作用持続時間試験、用量 100 mg/kg） 23
表 2.6.2.2.4.1-1 In vivo 固形腫瘍増殖阻害試験（連続投与法）の要約 28

表 2.6.2.2.4.2-1　ラット C6 神経膠腫腫瘍の XL184 による腫瘍増殖阻害の要約（投与期間 12 日）..... 29
表 2.6.2.2.4.2-2　C6 神経膠腫腫瘍の免疫組織化学解析の要約（投与期間 12 日）..... 29
表 2.6.2.2.4.2-3　ラット C6 神経膠腫腫瘍の XL184 による腫瘍増殖阻害の要約（低用量試験、投与期間 12 日）..... 30
表 2.6.2.2.4.2-4　C6 腫瘍の免疫組織化学解析の要約（低用量試験、投与期間 12 日）..... 30
表 2.6.2.2.4.3-1　MDA-MB-231 異種移植腫瘍の XL184 による腫瘍増殖阻害及び退縮..... 33
表 2.6.2.2.4.3-2　MDA-MB-231 腫瘍移植マウスにおける投与 14 日目の血漿中 XL184 濃度..... 34
表 2.6.2.2.4.3-3　MDA-MB-231 腫瘍の免疫組織化学解析（投与期間 14 日）..... 34
表 2.6.2.2.4.3-4　大きな MDA-MB-231 乳癌異種移植腫瘍の免疫組織化学解析の要約（14 日投与）..... 36
表 2.6.2.2.4.4-1　TT 異種移植腫瘍の XL184 による腫瘍増殖阻害及び退縮..... 37
表 2.6.2.2.4.4-2　TT 腫瘍における MET 及び RET リン酸化阻害の免疫組織化学解析（14 日投与）..... 37
表 2.6.2.2.4.5-1　H441 異種移植腫瘍の XL184 による腫瘍増殖阻害（投与期間 14 日）..... 38

図

図 2.6.2.2.1.2-1　XL184 による定量的阻害後の MET 及び VEGFR2 活性の時間依存性の回復..... 11
図 2.6.2.2.1.3-1　XL184 による MET の不活性型（Phe-Out 型）コンフォメーション誘導..... 12
図 2.6.2.2.2.2-1　培養下のヒト破骨細胞の分化（A）又は骨吸収活性（B）に対する XL184 の作用..... 16
図 2.6.2.2.2.2-2　培養下のマウス骨芽細胞株の分化（A）又は骨形成活性（B 及び C）に対する XL184 の作用..... 17
図 2.6.2.2.3.3-1　マウス肺における VEGF 刺激性 VEGFR2 リン酸化に対する阻害の用量反応関係（投与 4 時間後時点）..... 20
図 2.6.2.2.3.4-1　TT 異種移植腫瘍における XL184 による RET リン酸化阻害の用量反応関係（投与 4 時間後時点）..... 22
図 2.6.2.2.3.5-1　MDA-MB-231 異種移植腫瘍における XL184 投与に反応した平均血管密度の定量..... 24
図 2.6.2.2.3.5-2　XL184 の経口投与による血管内皮細胞死..... 25
図 2.6.2.2.3.5-3　MDA-MB-231 異種移植腫瘍における XL184 投与に反応した低酸素の定量..... 26
図 2.6.2.2.4.2-1　XL184 によるラットの皮下 C6 神経膠腫腫瘍増殖の抑制（投与期間 12 日）..... 29
図 2.6.2.2.4.2-2　XL184 単回経口投与によるラット皮下 C6 神経膠腫の腫瘍増殖の抑制..... 31
図 2.6.2.2.4.3-1　XL184 による MDA-MB-231 異種移植片増殖阻害（投与期間 14 日）..... 33

図 2.6.2.2.4.3-2 XL184 による大きな MDA-MB-231 乳癌異種移植腫瘍の腫瘍退縮（投与期間 14 日） 35
図 2.6.2.2.4.4-1 XL184 投与による TT 異種移植片増殖の抑制（14 日投与） 37
図 2.6.2.2.4.6-1 XL184 及び／又はエルロチニブ投与による HCC827GR6 異種移植片増殖の抑制 39
図 2.6.2.2.4.7-1 XL184 の肺転移へ及ぼす影響（投与期間 28 日） 40
図 2.6.2.2.4.8-1 トランスジェニック RIP-Tag2 マウスモデルにおける XL184 投与による死亡率の低下 41

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明
ALP	Alkaline phosphatase〔アルカリホスファターゼ〕
ALT	Alanine aminotransferase〔アラニンアミノトランスフェラーゼ〕
Ang1	Angiopoietin-1〔アンジオポエチン-1〕
AST	Aspartate aminotransferase〔アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ〕
AUC	Area under the plasma concentration versus time-curve〔血漿中濃度時間曲線下面積〕
$AUC_{0\text{-}inf}$	0 から無限大までの AUC〔－〕
$AUC_{0\text{-}t}$	0 から t 時間までの AUC〔－〕
BA	Bioavailability〔バイオアベイラビリティ〕
BCRP	Breast cancer resistance protein〔－〕
BDC	Bile duct cannulated〔胆管ろう形成〕
BDI	Bile duct intact〔胆管未処置〕
BSEP	Bile salt export pump〔－〕
Caco-2 細胞	ヒト結腸癌由来の細胞株〔－〕
C_{ave}	Concentration average〔平均曝露量〕
CHO	Chinese Hamster Ovary〔－〕
CK	Creatine kinase〔クレアチンキナーゼ〕
CLint	Intrinsic clearance〔固有クリアランス〕
Cmax	Maximum plasma concentration〔最高血漿中濃度〕
CPN	Chronic Progressive Nephropathy〔慢性進行性腎症〕
CV	変動係数
CYP	Cytochrome P450〔チトクローム P450〕
DAPI	4', 6-diamino-2-phenylindole, ジアミジノフェニルインドール〔DNA 結合性蛍光色素〕
DMSO	Dimethyl sulfoxide〔ジメチルスルホキシド〕
ECG	Electrocardiographic〔心電図〕
ED_{50} 値	50% effetive dose〔50%有効量〕
EtOH	Ethanol〔エタノール〕
FBE	Freebase Equivalent〔フリー体換算〕
GD	Gestation Day〔妊娠日数〕
GGT	γ-Glutamyltransferase〔γ-グルタミルトランスフェラーゼ〕
GI	Gastrointestinal〔消化管〕
GLP	Good Laboratory Practice〔医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準〕
HepG2	ヒト肝細胞癌細胞株
HepG2 hPXR-3A4 細胞	ヒト PXR 受容体及びルシフェラーゼレポーターを含む CYP3A4 応答 DNA 配列を安定的に発現する HepG2 細胞〔－〕
hERG	Human ether-a-go-go related gene〔ヒト遅延整流性カリウムイオンチャンネル遺伝子〕
HGF	Hepatocyte growth factor〔肝細胞増殖因子〕
HMVEC-L	Human Dermal Microvascular Endotherial Cells〔ヒト肺微小血管内皮細胞〕
HPLC	High performance liquid chromatography〔高速液体クロマトグラフィー〕
IC_{50}	Half maximal inhibitory concentration〔50%阻害濃度〕
IHC	immunohistochemical〔免疫組織化学〕
ITD	internal tandem duplication〔遺伝子内縦列重複〕
IV	intraveneously〔静脈内〕
Ki_{app}	みかけの阻害定数〔－〕

略号	略していない表現又は説明
LC/MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry〔液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法〕
LD	Lactation Day〔授乳〕
LDH	Lactate Dehydrogenase〔乳酸デヒドロゲナーゼ〕
LLOQ	limit of quiantitation〔定量下限〕
LSC	Liquid scintillation counter〔液体シンチレーションカウンター〕
MATE	Multidrug and toxin extrusion〔－〕
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin〔平均赤血球ヘモグロビン量〕
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration〔平均赤血球ヘモグロビン濃度〕
MCV	Mean Corpuscular Volume〔平均赤血球容積〕
MDCK	イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来細胞〔－〕
MET	Hepatocyte growth factor receptor〔肝細胞増殖因子の受容体チロシンキナーゼ〕
MM	multiple myeloma〔多発性骨髄腫〕
MPNST	malignat peripheral nerve sheath tumor〔悪性末梢神経鞘腫瘍〕
mRNA	Messenger ribonucleic acid〔メッセンジャーリボ核酸〕
MRP	Multidrug resistance-associated protein〔－〕
MTC	Medullary thyroid carcinoma〔甲状腺髄様癌〕
MTD	Maximum tolerated dose〔最大耐量〕
MVD	mean vascular density〔平均血管密度〕
NA	Not appricable〔該当せず〕
NADPH	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate〔還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸〕
ND	Not Determined〔未測定〕
NHDF	Normal Human Dermal Fibroblasts〔正常ヒト皮膚線維芽細胞〕
NOAEL	No Observable Adverse Effect Level〔無毒性量〕
NOEL	No observed effect level〔無影響量〕
NSCLC	Non-small-cell lung cancer〔非小細胞肺癌〕
OAT	Organic anion transporter〔－〕
OATP	Organic anion transporting polypeptide〔－〕
OB	Osteoblast〔骨芽細胞〕
OC	Osteoclast〔破骨細胞〕
OCT	Organic cation transporter〔－〕
Papp	Apparent permeability coefficient〔見かけの透過係数〕
PBS	Phosphate Buffered Saline〔リン酸緩衝液〕
PCE	Polychromatic erythrocyte〔多染性赤血球〕
PEG	Polyethylene glycol〔ポリエチレングリコール〕
p-FA	Para-Fluoroaniline〔パラ-フルオロアニリン〕
P-gp	P-glycoprotein〔P-糖蛋白質〕
PINP	type I procollagen N-terminal propeptide〔I 型プロコラーゲン N 末端プロペプチド〕
pMET	リン酸化 MET
pRET	リン酸化 RET
q3d	3 日に 1 回
qd	1 日 1 回
QWBA	Quantitative whole body autoradiography〔定量的全身オートラジオグラフィ〕
RCC	Renal Cell Carcinoma〔腎細胞癌〕

略号	略していない表現又は説明
RO	reverse osmosis〔逆浸透〕
RTK	Receptor tyrosine kinase〔受容体型チロシンキナーゼ〕
SD	Sprague-Dawley〔－〕
SPA	Special Protocol Assessment〔特定計画書の評価〕
SULT	Sulfotransferase〔ヒト硫酸転移酵素〕
$t_{1/2}$	Half-life〔半減期〕
t1/2, Z	Terminal half-life〔終末相の半減期〕
TGI	Tumor growth inhibition〔腫瘍増殖阻害〕
Tmax	Time to maximum plasma concentration〔最高血漿中濃度到達時間〕
TRACP 5b	Tartrate-resistant Acid phosphatase 5b〔酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ 5b〕
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling〔タネル染色〕
UV-A	Ultraviolet A〔紫外線 A 波〕
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2〔血管内皮細胞増殖因子受容体 2〕
β-NF	β-naphthoflavone〔β-ナフトフラボン〕

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

XL184（cabozantinib malate、EXEL 7184、EXEL-02977184）は、主に血管内皮細胞増殖因子受容体 2（VEGFR2、KDR ともいう）、MET 及び AXL を標的とする新規作用機序を有する阻害剤である。その他、RET、ROS1、TYRO3、MER、VEGFR1、VEGFR3、KIT 及び FLT-3 に対する阻害作用も有している。VEGFR2 及び MET はそれぞれ腫瘍血管新生及び腫瘍細胞の増殖に関与しているだけでなく、両者を同時に阻害することが腫瘍抑制に非常に効果的であることが知られており、また AXL は MET のシグナルを増強させることが知られている。XL184 はキナーゼドメイン領域（ATP 結合部位を含む）に対して完全に可逆的に結合し、キナーゼ活性化ループを擬似非活性構造に変化させることにより触媒活性を阻害する。

XL184 の細胞薬力学を明らかにするために、様々な細胞ベースアッセイで評価を行った。複数の細胞モデルにおいて、XL184 は標的である受容型チロシンキナーゼ（RTK）の活性を強力に阻害し、細胞における VEGFR2、MET 及び AXL のリン酸化に対する阻害の IC_{50} 値（活性を 50%阻害する濃度）は、<3～372 nmol/L であった。XL184 曝露によって生じる標的分子阻害は、様々な細胞において表現型の変化を引き起こした。細胞アッセイにおいて、増殖阻害の IC_{50} 値は、1.2 nmol/L から>30,000 nmol/L までであったが、XL184 の標的分子のシグナル伝達に依存して生存・増殖することが知られる腫瘍細胞株では、1～200 nmol/L の範囲内であった。MET 増幅を有する 5 種類の細胞株における阻害の IC_{50} 値は 10～149 nmol/L であった。RET C634W 変異を有する甲状腺髄様癌（MTC）患者に由来する TT 細胞株における阻害の IC_{50} 値は 94 nmol/L、SLC-ROS1 遺伝子再構成を有する非小細胞肺癌（NSCLC）患者に由来する HCC-78 細胞株における阻害の IC_{50} 値は 24 nmol/L であった。

細胞挙動アッセイにおいて、HGF 誘導性の遊走及び浸潤に対する阻害作用や、ヒト微小血管内皮細胞による VEGF 誘導性管形成に対する阻害作用などについて評価を行った。また、in vitro で骨芽細胞（OB）と破骨細胞（OC）両方の分化及び機能活性を評価した細胞アッセイでは、XL184 に、破骨細胞の分化に対する阻害や、骨芽細胞の分化又は骨形成能に対する二相性の作用（XL184 低濃度で促進され高濃度では阻害された）などの様々な作用が認められた。

生化学的標的分子プロファイル及び細胞薬力学データに基づき、in vivo 試験では最初に、標的への薬力学的作用と腫瘍細胞の反応に注目した。異種移植腫瘍組織又はマウス肺組織において、XL184 投与により、標的 RTK のリン酸化が長時間にわたり強力に阻害された。血漿中薬物濃度の上昇と、受容体リン酸化阻害の増強との間に、良好な相関が認められた。マウスにおける用量反応試験の結果から、これらの標的分子阻害の ED_{50} 値（リン酸化を 50%阻害する用量）は、十分に忍容可能な用量の XL184 で達成されている。受容体リン酸化阻害の持続時間も比較的長く、MET 及び VEGFR2 阻害は XL184 の単回投与 10 時間後も持続していた。この長時間の阻害作用は概して血漿中曝露量から予測可能であり、血漿中濃度が MET に対しては約 5,000 ng/mL（10 µmol/L）、VEGFR2 に対しては 2,500 ng/mL（5 µmol/L）、RET に対しては 7,500 ng/mL（15 µmol/L）を下回ると、阻害作用が減弱した。

組織学的解析のデータから、MDA-MB-231 ヒト乳癌異種移植片において、in vivo で XL184 は腫瘍の新生血管構造を速やかに崩壊させ、初回投与後 8～24 時間で血管密度を低下させるとともに、腫瘍低酸素領域を増加させることが示された。さらに、同モデルにおいて、XL184

の 5 回投与後（初回投与 96 時間後）に、腫瘍血管内皮細胞の 91%の減少が認められた。腫瘍血管内皮に対する作用と一致して、XL184 の 1 日 1 回経口投与開始から 72～96 時間後に、腫瘍低酸素領域が約 65～70 倍に増加した。MDA-MB-231 異種移植腫瘍における腫瘍及び血管内皮細胞死の増加は、XL184 投与後 2～24 時間以内に認められる。腫瘍内のこの血管破壊作用は肉眼形態レベルで明らかであり、摘出された腫瘍の表面に広範囲の出血が認められた。2 回目投与 4 時間後から、腫瘍と血管内皮の両コンパートメントにおいて、アポトーシスが組織学的に明らかに生じており、その後増加したように見えた。投与 96 時間後には血管構造が完全に消失し、複数のアポトーシス核を含有する小さな内皮細胞塊を呈した。単回投与後わずか 2 時間で TUNEL 陽性腫瘍細胞数が顕著に増加し、5 回目投与後には 138 倍まで増加した。これらのデータから、XL184 は本モデルにおいて、急速かつ顕著に腫瘍細胞死を誘導することが示されており、これは、腫瘍細胞及び腫瘍血管構造に対する XL184 の直接的な作用と一致する。

複数のマウス腫瘍モデルを用いて、in vivo での腫瘍増殖阻害（TGI）及び腫瘍退縮という点から、XL184 の有効性を検討した。用いた細胞株の大半は固形腫瘍を代表するものであり、C6（ラット神経膠腫）、MDA-MB-231（ヒト乳癌）、H441（ヒト肺癌）及び TT（ヒト MTC）などであった。SV40 Large-T Antigen 誘導性の膵神経内分泌癌のトランスジェニック RIP Tag2 マウスモデル系と、マウス多発性骨髄腫の 5TGM1 同系モデルでも評価を行った。H441 モデルはリン酸化 MET を高度に発現することから、in vivo では MET シグナル伝達経路に依存して、腫瘍形成表現型を維持している可能性が示唆される。一方、TT 細胞株は、MEN-2A 関連甲状腺癌の発生につながる発がん性 Cys634Trp RET 変異を有する。

腫瘍増殖阻害試験のための標準実験においては、移植・増殖させた固形腫瘍が指定の重量に達した時点で、XL184 の 1 日 1 回経口投与を開始した。投与期間を通して、腫瘍サイズを週 2 回、体重を 1 日 1 回測定した。これらの試験において、XL184 は強力な抗腫瘍活性を示し、固形腫瘍の顕著な退縮をもたらした。腫瘍増殖阻害には、総じて、腫瘍壊死の増加、腫瘍血管新生の減少、腫瘍細胞増殖指数の低下との良好な相関が認められ、XL184 の血管新生阻害活性が、強力な抗腫瘍効果に寄与することが示唆された。XL184 は概してマウスにおいて忍容性が高いと考えられ、著しい体重減少は認められなかった。マウスの体重減少データ及び臨床的観察から、最大耐量（MTD）は 60 mg/kg/day より高いことが示唆されたが、ラットの MTD は 10 mg/kg/day であった。マウスとラットのこのような忍容性の差は、XL184 の血漿中曝露量の用量補正値がラットにおいてマウスよりも高かったために生じたと考えられる。

マウス有効性データの検討により、90%を超える腫瘍増殖阻害のためには、XL184 曝露量（Cave）として約 1,500～2,400 ng/mL（3～4.8 µmol/L）が必要であった。ラット C6 モデルにおいては、血漿中曝露量として約 1,200 ng/mL（2.4 µmol/L）で完全に腫瘍増殖を抑制した。見かけ上、完全に腫瘍増殖を抑制するためには高い曝露量が必要であるが、トラフ濃度はかなり低値である場合がある。マウスでは高い有効性を示す用量で 50 ng/mL（0.1 µmol/L）という低いトラフ濃度が認められている。

In vitro 電気生理学的試験において、マニュアルあるいはオートメーテッドパッチクランプ法による評価では、XL184 は 30 µmol/L（15,000 ng/mL）まで hERG チャネル活性に対する阻害は示さなかった。別の in vitro 評価系では、形質転換された哺乳類細胞において、XL184

は、hERG チャネル蛋白輸送に対して軽度であるが有意な阻害作用を 10～30 μmol/L で、また、hERG チャネル活性に対する直接阻害作用を 30 μmol/L で示した。In vivo 安全性薬理試験では、XL184 を投与したラットにおいて、300 mg/kg まで神経行動機能に有害な作用は認められず、900 mg/kg まで呼吸機能に有害な作用は認められなかった。また、XL184 を投与したイヌのテレメトリー試験において、心血管系パラメータ又は心電図パラメータ（補正 QT［QTc］間隔を含む）に重大な変化は認められなかった。同試験において NOAEL は 150 mg/kg であり、1,000 mg/kg で拡張期血圧の軽い一過性の上昇が認められた。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 XL184 活性の生化学的特性解析

2.6.2.2.1.1 XL184 によるプロテインキナーゼ活性阻害

：添付資料番号 4.2.1.1-1（評価）、-2（評価）、-3（評価）、-4（参考）、-5（参考）

XL184 は、VEGFR2、MET 及び AXL を主な標的とする、新規作用機序を有する阻害剤である。これらの RTK を同時に阻害することが腫瘍の生存、増殖、浸潤、転移、及び腫瘍周囲の血管新生に強く影響を及ぼすことが期待されている。XL184 は、他にも腫瘍進展に関与する複数の RTK を阻害する。VEGFR2、MET 及び AXL の生化学的 IC_{50} 値はそれぞれ 0.035、1.8 及び 7 nM であり、他の癌原蛋白である RET の生化学的 IC_{50} 値は 9.8 nM である（表 2.6.2.2.1.1-1）。XL184 は、VEGF 受容体ファミリーキナーゼの他の 2 種類 VEGFR1 及び VEGFR3 も阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 12.2 及び 6.0 nmol/L である。XL184 の標的としてはさらに、RTK の MER、KIT、TRKB、TYRO3、FLT-3、TIE-2、ROS1 及び RON が挙げられ、IC_{50} 値はそれぞれ 0.3、4.6、7、12、14.4、14.3、24、46 nmol/L である。XL184 のセリン／スレオニンプロテインキナーゼに対する阻害活性は小さく、IC_{50} 値が 500 nmol/L 未満であるのは、評価を行った 60 種類を超えるキナーゼのうち 3 種類のみである（表 2.6.2.2.1.1-1）。

臨床的に重要な MET の 9 種類のバリアントに対する XL184 の効力を評価したところ、IC_{50} 値は 3.8～61.2 nmol/L であった。XL184 は、野生型 RET に加えて、MTC で最も高頻度に認められる RET の活性化変異体 M918T を阻害し、IC_{50} 値は 27 nmol/L である）。XL184 は Y791F 変異型 RET も IC_{50} 値 1.17 μmol/L で阻害する。しかし、in vitro で V804L 変異型 RET に対しては強い阻害作用を示さない（表 2.6.2.2.1.1-2）。XL184 は、臨床的に重要な T670I 変異型 KIT にも強い阻害作用を示すが（IC_{50}=4.8 nmol/L）、D835Y 変異型 FLT-3 に対する活性は弱い。

XL184 の主要代謝物 4 種類（N-酸化体［EXEL-5162］、一水酸化硫酸体［EXEL-1646］、アミド結合開裂体［EXEL-5366］、脱メチルアミド結合開裂硫酸体［EXEL-1644］）について、生化学アッセイによって、キナーゼパネルに対する特性を明らかにした。主要な標的である MET、RET 及び VEGFR2（KDR）に対する XL184 の IC_{50} 値は、それぞれ 1.8、9.8 及び 0.035 nmol/L であった（表 2.6.2.2.1.1-1）。一方、代謝物 EXEL-5162 及び EXEL-5366 のキナーゼ阻害作用 IC_{50} 値は、先の試験の親化合物 XL184 の阻害作用 IC_{50} 値（表 2.6.2.2.1.1-1）の 100 分の 1 未満であった。MET、RET 及び VEGFR2/KDR に対する IC_{50} 値は、EXEL-5162 がそれぞれ 190 nmol/L、>1 μmol/L 及び 140 nmol/L、EXEL-5366 がそれぞれ 5、>1 及び>10 μmol/L であった。一水酸化及び硫酸抱合体である EXEL-1646 の MET、RET 及び VEGFR2（KDR）に対する IC_{50} 値は、XL184 と比較してはるかに高かった（それぞれ 199、234 及び 308 nmol/L）。

代謝物 EXEL-1644 については、代謝物濃度 1 μmol/L でのみ、キナーゼパネルに対する阻害作用を測定した。EXEL-1646 の測定値（MET、RET、AXL、FLT4 を>90%阻害）と比較して、EXEL-1644 の阻害作用は弱かった（MET 及び RON をそれぞれ 68%及び 75%阻害、RET 又は AXL に対する顕著な阻害作用なし）。EXEL-1644 は、濃度 1 μmol/L で VEGFR2 活性に対する明らかな阻害作用を示さなかった。別の試験で測定した、EXEL-1644 による MET 阻害の IC_{50} 値は 3,044 nmol/L であった。XL184 代謝物の曝露量については、「薬物動態試験の概要文」（2.6.4）で詳細に記載する。

表 2.6.2.2.1.1-1　XL184 によるプロテインキナーゼの阻害

受容体型チロシンキナーゼ	**IC_{50}±SEM (nmol/L)**
MET	1.8±0.2
VEGFR2/KDR	0.035±0.007
VEGFR1	12.2±0.7
VEGFR3	6.0±0.6
RET	9.8±2.3
KIT	4.6±0.5
FLT-3	14.4±0.8
AXL	7
MER	0.3
TYRO3/RSE/SKY	12
ROS1	24
TRKA	64
TRKB	7
FMS/CSF1R	9
TIE-2	14.3±2.8
RON	46
ABL	>500
ALK	139±23
EPHA4	319±14
EPHB4	248±30
ERBB2	>500
INSR	1140±21
IGF1R	1240±140
PDGFRβ	234±1.1
EGFR, FGFR1	>2000
非受容体型チロシンキナーゼ	**IC_{50}±SEM (nmol/L)**
FYN	365±55
BLK	101
LYN	45
YES	83
FES	1000
FAK	460±31
BTK	114±11
JAK2, JAK3, SRC, ZAP70	>500
LCK	>5000
ITK	>10000

IC_{50}：活性を 50%阻害する濃度。61 種類のセリン／スレオニンキナーゼに対する XL184 の阻害作用も評価した；IC_{50} が 500 nmol/L 未満であったのは、SAP4K（141 nmol/L）、MAP2K1(MEK)（390 nmol/L）及び c-Raf（260 nmol/L）の 3 種類のみであった。
出典：4.2.1.1-2（MER、TYRO3、ROS1、TRKA、FMS 及び RON）；4.2.1.1-1（その他すべてのキナーゼ）。

表 2.6.2.2.1.1-2　XL184 による活性化 RET キナーゼバリアントの阻害

RET 野生型及び変異型	IC_{50}±SEM (nmol/L)
RET	9.8±2.3
RET_M918T	27±5
RET_V804L	>5000
RET_Y791F	1170±80

IC_{50}：活性を 50%阻害する濃度。出典：4.2.1.1-1。

2.6.2.2.1.2 阻害機構

：添付資料番号 4.2.1.1-1（評価）

（1）ATP との競合

MET、VEGFR2、FLT 3 及び TIE 2 を標的として、XL184 によるキナーゼ阻害機構を検討した。様々な ATP 濃度で IC_{50} を測定したところ、XL184 は、検討した各標的に対し、ATP と競合する活性部位阻害剤となることが明らかになった。これらのデータは、XL184 が MET の ATP 結合部位を占有することを示した構造試験と一致している（2.6.2.2.1.3）。

（2）阻害作用の可逆性と解離速度論

XL184 の MET、VEGFR2 及び TIE 2 との結合は、完全に可逆的であることが示された。図 2.6.2.2.1.2-1 に、XL184 と MET の複合体及び XL184 と VEGFR2 の複合体の速度論的解離の結果を示す。半減期はそれぞれ 34 及び 120 分であった。XL184 と MET の複合体については、非共有結合性の可逆的な結合様式が、構造データによって強く裏付けられている（2.6.2.2.1.3）。機構的データの要約は 4.2.1.1-1 に示した。

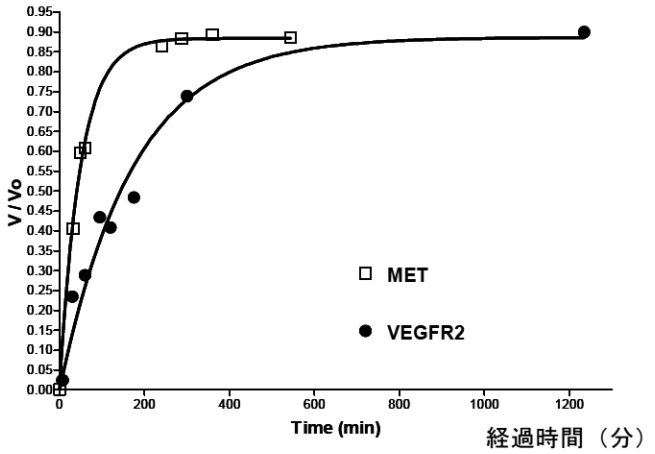


図 2.6.2.2.1.2-1　XL184 による定量的阻害後の MET 及び VEGFR2 活性の時間依存性の回復

酵素活性は非阻害酵素対照 Vo に対する割合としてプロットしている。
出典：4.2.1.1-1。

2.6.2.2.1.3 MET/XL184 複合体の構造解析

：添付資料番号 4.2.1.1-6（参考）

XL184 が結合した MET タンパクのキナーゼドメインの構造を、X 線結晶構造解析により解像度 1.6 Å で解析した。XL184 は、ATP 結合部位とその他複数のキナーゼ触媒領域を占有する。MET のキナーゼドメインは、典型的な 2 つのローブによる折り畳み構造をとる。すなわち主にβシートから構成されるより小さい N 末端ローブと、主にαヘリックスから構成されるより大きい C 末端ローブが、ATP 結合ポケットを構成するリンカーによって結合している。XL184 は 2 つのローブ間に結合し、複数の水素結合と、広範囲に及ぶ疎水性相互作用を MET と形成する。そこでは XL184 のキノリン部位窒素原子 N1 と MET の 1160 番目アミノ酸残基の主鎖アミド NH との間に、水素結合が 1 つ形成されている。これと同様の主鎖アミド NH との水素結合は、ADP/MET 複合体にも認められる。

XL184 が MET に結合すると、活性化ループが構造変化する（図 2.6.2.2.1.3-1）。すなわち XL184 のフェニルマロンアミド部分が、活性型コンフォメーション状態の MET の C ヘリックス近傍の阻害剤結合ポケットから、“DFG”モチーフのフェニルアラニン残基を追い出す。続いてフェニルアラニン側鎖が約 13 Å 位置を変え、XL184 の中央のフェニル環と安定したπ-π 相互作用を形成する。これによって MET は、キナーゼ触媒活性が妨げられた不活性型コンフォメーションとなる。

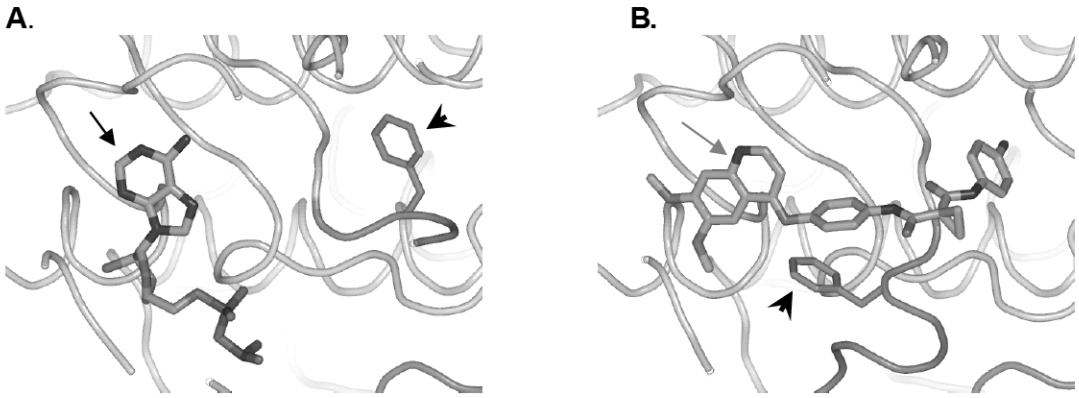


図 2.6.2.2.1.3-1　XL184 による MET の不活性型（Phe-Out 型）コンフォメーション誘導

(A) ADP（黒色矢印）が結合した MET の構造と（B）XL184（灰色矢印）が結合した MET の構造との比較。両図において、活性化ループが橙色、活性化ループ内“DFG”モチーフの Phe 1223（黒色矢尻）の側鎖がスティック構造で示されている。XL184 が結合すると、activation loop 活性化ループは、Phe 1223 の側鎖がタンパク表面側に反転した不活性型コンフォメーションをとる。出典：4.2.1.1-6

2.6.2.2.1.4 薬理学的特異性

：添付資料番号 4.2.1.1-7（参考）

XL184 の濃度 1 µmol/L で、74 種類の薬理学的標的（受容体、トランスポーター及び酵素を含む）のパネルに対する特異性を評価した。アデノシン A3 受容体アッセイでのみ、1 µmol/L で 50%を超える阻害作用が認められた。その後の解析により、アデノシン A3 受容体に対する IC_{50} 値は 1.1 µmol/L であることがわかった。詳細な結果を 4.2.1.1-7 に記載する。

2.6.2.2.2 細胞における XL184 活性の評価

2.6.2.2.2.1 細胞内キナーゼ活性の阻害

：添付資料番号 4.2.1.1-3（評価）、-8（評価）、-9（評価）

XL184 は、細胞内で、VEGFR2、MET 及び AXL に対して強力な阻害活性を示す。さらに RET などの複数の RTK に対しても阻害活性を示す。腫瘍細胞株を用いて、無刺激時又は増殖因子誘導性の RTK 自己リン酸化に対する XL184 の作用を評価し、初代培養又は不死化ヒト血管内皮細胞を用いて VEGF 刺激による VEGFR2 又は ERK リン酸化を評価した。蛋白リン酸化レベルは免疫ブロット又は ELISA により定量した。細胞株は、内因性に RTK（MET、VEGFR2、RET、AXL、ROS1、RON）を発現するもの、又は対象の RTK（MER、FLT-3、KIT、TIE-2）を形質転換して発現させたものを用いた。

XL184 は、無血清増殖条件下の細胞において、VEGFR2、MET 及び RET の自己リン酸化と、VEGF 刺激による ERK リン酸化を強力に阻害した。VEGFR2、MET 及び RET リン酸化阻害の IC_{50} 値はそれぞれ<3、8 及び 85 nmol/L であった（表 2.6.2.2.2.1-1）。血管内皮細胞における VEGF 刺激による ERK リン酸化に対する IC_{50} 値は 2 nmol/L であった。形質転換細胞株における AXL、MER、FLT-3、KIT 及び TIE-2 阻害の IC_{50} 値は、それぞれ<3、4、11、5 及び 101 nmol/L であった。腫瘍細胞株における AXL、ROS1 及び RON 阻害の IC_{50} 値はそれぞれ 77～372、26 及び 70 nmol/L であった。総じて XL184 は、生化学的阻害特性から予測されるキナーゼに対し、強い細胞内阻害活性を示した（表 2.6.2.2.2.1-1）。

XL184 の代謝物 2 種類について、MET リン酸化アッセイにより、細胞内の MET 活性に対する阻害作用を検討した。EXEL-5162（N-酸化体代謝物；M1）の IC_{50} 値は 2.0 µmol/L であった一方、EXEL-5366（酸性代謝物；M8）は活性を示さなかった（IC_{50}>30 µmol/L）。

表 2.6.2.2.2.1-1　XL184 による細胞内受容体型チロシンキナーゼの活性阻害

リン酸化アッセイ（細胞株）	リガンド刺激	細胞内 IC_{50} (nmol/L)	N[a]
MET (PC3)	HGF	8	21
ERK (HUVEC)	VEGF165	2	13
VEGFR2 (HUE)	VEGFA	<3	1
RET (TT)	none	85[b]	2
AXL (A172)	GAS6	77[b]	1
AXL (Hs 683)	GAS6	372[b]	1
AXL (M059J)	GAS6	128[b]	1
AXL (MEF-AXL)	none	<3	1
MER (QBI-HEK 293A)	none	4	2
FLT-3 ITD (BaF3/FLT-3 ITD)	none	11[b]	2
KIT (MDA-MB-231T/KIT)	SCF	5	2
ROS1 (HCC-78)	none	26	1
RON (T47D)	MSP	70	1
TIE-2 (COS1)	none	101	3

HGF：肝細胞増殖因子、VEGF165：血管内皮細胞増殖因子 165 kD アイソフォーム、GAS6：growth arrest-specific 6、IC_{50}：活性を 50%阻害する濃度、SCF：幹細胞因子。用いた細胞株を括弧内に示す。明記されている場合を除き、IC_{50} は ELISA 法により測定。アッセイは無血清条件下で実施。[a] 実験の繰り返し回数。[b] 免疫ブロット法により測定した IC_{50}。
出典：4.2.1.1-8；4.2.1.1-9。

2.6.2.2.2.2 抗腫瘍活性及び血管新生阻害活性の細胞アッセイ
：添付資料番号 4.2.1.1-10（評価）、-11（参考）、-12（参考）、-13（参考）、-14（参考）、4.2.1.1-15（参考）

ヒト及びマウス腫瘍細胞株を用いて、XL184 の細胞増殖阻害能を評価した。XL184 は、複数のがん種を代表する腫瘍細胞株の増殖を抑制し、IC_{50} 値は 3 nmol/L から>30,000 nmol/L であった（表 2.6.2.2.2.2-1 に 1,000 nmol/L 未満の IC_{50} 値を示す）。MET 遺伝子のコピー数増加（遺伝子コピー数 8～25）があり、MET を介するシグナル伝達に依存し生存する細胞であるいくつかの細胞株において XL184 は細胞増殖を抑制し、IC_{50} 値は 10～149 nmol/L であった（表 2.6.2.2.2.2-1）。XL184 による増殖阻害作用に高い感受性を示したその他の細胞株は、XL184 の標的分子に活性化突然変異を有する FLT-3（MV-4-11；FLT-3-ITD）、RET（TT；RET C634W）、ROS1（HCC-78；SLC-ROS1 遺伝子再構成）であった。XL184 は、クリゾチニブ耐性 ROS1 変異 G2032R 及び L1982F を発現する BaF3 細胞に対しても、増殖阻害活性を示した（表 2.6.2.2.2.2-1）。

表 2.6.2.2.2.2-1　XL184 による腫瘍細胞増殖阻害（IC_{50}<1,000 nmol/L）

細胞株	由来組織	既知の分子変化	IC_{50} (nmol/L)	N[a]
EBC-1	肺	MET コピー数増加（9.8 コピー）[b]	13	4
Hs 746T	胃	MET コピー数増加（約 8 倍）[c]	10	5
KATO III	胃		602	2
KU812	造血（好塩基球）		570	2
MKN-45	胃	MET コピー数増加（8.5 コピー）[b]	149	5
MV-4-11	造血（単球）	FLT-3 遺伝子内縦列重複[d]	3	3
NCI-H1993	肺	MET コピー数増加（15 コピー）[e]	134	2
NCI-H345	肺		787	1
NCI-N87	胃		68	2
SNU-5	胃	MET コピー数増加（25 コピー）[b]	19	4
TT	甲状腺	Ret C634W[f]	94	4
HCC-78	肺	SLC-ROS1 遺伝子再構成	24～49	2
BaF3/CD74-ROS1	造血（マウスプロ B 細胞株）	ROS1 遺伝子再構成	1.2	1
BaF3/CD74-ROS1 G2032R	造血（マウスプロ B 細胞株）	ROS1 遺伝子再構成（クリゾチニブ耐性）	11	1
BaF3/FIG-ROS1	造血（マウスプロ B 細胞株）	ROS1 遺伝子再構成	5.9	1
BaF3/FIG-ROS1 L1982F	造血（マウスプロ B 細胞株）	ROS1 遺伝子再構成（クリゾチニブ耐性）	63	1

IC_{50}<1,000 nM であった細胞株の結果を要約（薬物作用時間 72 時間）。出典：4.2.1.1-10, 4.2.1.1-11。増殖に対する IC_{50} 値の詳細な一覧については、4.2.1.1-10 並びに 4.2.1.1-11 を参照。[a] 実験の繰り返し回数。[b] Exelixis 社内データ。[c] Smolen et al. 2006[1]。[d] Yee et al. 2002[2]。[e] Kubo et al. 2009[3]。[f] Carlomagno et al. 1995[4]。IC_{50}：増殖を 50%抑制する濃度。

細胞ベース試験において、XL184 の標的分子によって活性化されることが知られる細胞機能に対する XL184 の阻害作用も検討した。肝細胞増殖因子（HGF）は、その受容体である MET の活性化を介して、細胞運動と浸潤能を刺激することが知られている。HGF 刺激によるトランスウェル遊走アッセイと、HGF 刺激によるトランスウェルマトリゲル浸潤アッセイの 2 種類の細胞ベースアッセイを用いて、腫瘍細胞遊走及び浸潤に対する XL184 の阻害作用を検討した。増殖因子の非存在下では、トランスウェルプレートの上チャンバーに播種した B16F10 黒色腫細胞が膜を通過して下チャンバーへ遊走する細胞は限られているが、下チャン

バーに HGF を添加すると、24 時間で膜を通過する遊走細胞が大幅に増加する。XL184 は、HGF 誘導性のトランスウェル遊走を阻害し、IC_{50} 値は 53 nmol/L であった。細胞毒性の IC_{50} 値は、HGF 刺激によるトランスウェル遊走に対する IC_{50} 値よりも 73 倍高かったことから、トランスウェル遊走阻害作用は XL184 による細胞毒性によってもたらされたものではなかった。黒色腫細胞が HGF 依存的に、細胞外マトリックスを通って浸潤する能力を評価するために、1 層のマトリゲルを細胞とトランスウェル膜の間に置いた。XL184 は、HGF 刺激によるマトリゲル浸潤を阻害し、IC_{50} 値は 12 nmol/L であった。

In vivo の血管新生に寄与すると考えられる血管内皮細胞機能の面を反映した in vitro モデルにおいて、XL184 の作用を検討するために、内皮管形成及び細胞遊走アッセイを行った。ヒト肺微小血管内皮細胞（HMVEC-L）は、正常ヒト二倍体線維芽細胞（NHDF）上に播種すると、7 日間にわたり、VEGF に反応して広範な毛細血管様の管網を形成する。XL184 は、NHDF と共培養した HMVEC-L 細胞における VEGF 誘導性の管形成を阻害し、IC_{50} 値は 7 nmol/L であった。細胞を培養上清の存在下又は平滑筋細胞の上で増殖させた場合にも、管形成の阻害が認められた。この系における XL184 の細胞毒性の IC_{50} は 10,000 nmol/L を超え、管形成阻害の IC_{50} 値と比べて約 1,430 倍高かったことから、管形成阻害作用が毒性によってもたらされたものではないと判断した。

スクラッチアッセイを用いて、HGF、VEGF 又はアンジオポエチン-1（Ang1）刺激による内皮細胞遊走に対する XL184 の活性を検討した。このアッセイでは、単層のヒト内皮 HMVEC-L 細胞をスクラッチして無細胞領域を作り、HGF、VEGF 又は Ang1 刺激によって細胞の無細胞領域への遊走を誘導し、これに対する XL184 の阻害作用を測定する。血管新生因子非存在下では、スクラッチ部分に接する細胞の無細胞領域への遊走はわずかであるが、HGF、VEGF 又は Ang1 を添加すると遊走が強く刺激され、24 時間でスクラッチ部分がほぼ完全に被覆される。XL184 は、VEGF、HGF 及び Ang1 に反応した無細胞領域への細胞遊走を遅延させ、IC_{50} 値はそれぞれ 12、19 及び 23 nmol/L であった。

軟寒天アッセイにおける細胞の足場非依存性増殖は、3 次元の in vivo 増殖環境を再現しており、形質転換細胞の悪性度の評価に用いられる。正常酸素及び低酸素条件下の軟寒天アッセイ系を用いて、足場非依存性の腫瘍細胞増殖に対する XL184 の抑制能を評価した。XL184 は、14 日間にわたり、B16F10 及び A549 細胞コロニーの増殖を抑制し、IC_{50} 値はそれぞれ 9,854 及び 3,457 nmol/L（正常酸素条件下）、並びに 4,123 及び 1,086 nmol/L（低酸素条件下）であった。

このように、増殖、遊走、浸潤及び 3 次元系における増殖の細胞モデルにおいて、XL184 は、in vivo での腫瘍増殖及び転移の抑制を予測させる活性を示した。さらに XL184 は、微小血管内皮細胞遊走及び VEGF 誘導性管形成を阻害したことから、強い血管新生阻害活性を有することも予測される。

さらに試験を行い、in vitro で培養した骨芽細胞（OB）及び破骨細胞（OC）の分化及び機能活性に対する XL184 の影響を評価した。ヒト骨髄由来 CD34 陽性破骨細胞前駆細胞を XL184 存在下で、ウシ骨スライス上で 7 日間培養すると、0.11 μmol/L 以上の用量で、破骨細胞分化に対する用量依存性の阻害が認められた（図 2.6.2.2.2.2-1A）。顕微鏡解析により、0.11 及び 0.33 μmol/L の用量では、Hoechst 及び TRACP 陽性単核細胞数に影響は認められなかったことから、これらの濃度では破骨細胞分化が特異的に阻害されることが示唆された。XL184

を成熟破骨細胞に添加しても、骨スライス上の破骨細胞の機能的骨吸収活性に変化は認められなかった（図 2.6.2.2.2.2-1B）。

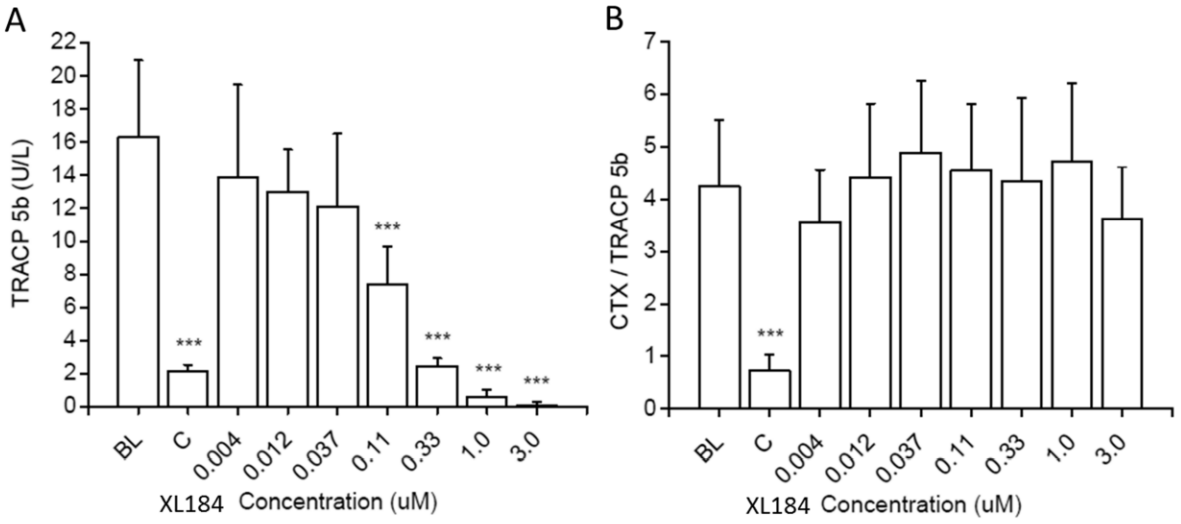


図 2.6.2.2.2.2-1　培養下のヒト破骨細胞の分化（A）又は骨吸収活性（B）に対する XL184 の作用

BL：ベースライン（阻害剤なし）、C：対照阻害剤（A ではオステオプロテゲリン、B ではシステインプロテアーゼ阻害剤 E64）、CTX：I 型コラーゲン C 末端架橋テロペプチド、TRACP 5b：酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ 5b。アスタリスク 3 個(***)は p 値<0.001 の統計学的有意な阻害作用を示す。アスタリスクはベースライン値との比較における有意差を示す。
出典：4.2.1.1-15。

骨芽細胞に対する XL184 の影響を評価するために、KS483 マウス骨前駆細胞を XL184 と 8 日間培養した後、形成された成熟骨芽細胞を、細胞内アルカリホスファターゼ（ALP）活性量の測定によって定量した。また、KS483 細胞を XL184 と 13 日間培養し、11 日目に培地に分泌された I 型プロコラーゲン N 末端プロペプチド（PINP）を測定することにより有機骨基質形成に対する作用を検討するとともに、13 日目には形成された骨基質へのカルシウム沈着量を測定することにより無機骨基質形成への作用を検討した。XL184 は骨芽細胞の分化及び活性に対して二相性の作用を示し、低濃度（0.012、0.037、0.11、0.33 及び 1.0 µmol/L）では分化（ALP 発現）を用量依存的に誘導した一方、3.0 µmol/L の高濃度では阻害した（図 2.6.2.2.2.2-2A）。骨芽細胞活性測定では、XL184 は 0.012 及び 0.037 µmol/L で PINP 値を上昇させ（図 2.6.2.2.2.2-2B）、0.004、0.012、0.037 及び 0.11 µmol/L でカルシウム値を上昇させた（図 2.6.2.2.2.2-2C）。また XL184 は、0.33、1.0 及び 3.0 µmol/L では、PINP 値とカルシウム値ともに低下させた（図 2.6.2.2.2.2-2B, -C）。

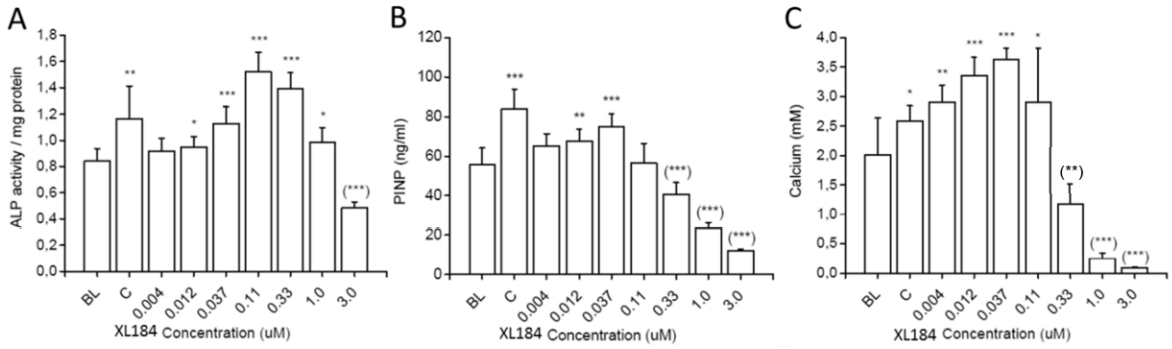


図 2.6.2.2.2.2-2　培養下のマウス骨芽細胞株の分化（A）又は骨形成活性（B 及び C）に対する XL184 の作用

ALP：アルカリホスファターゼ、BL：ベースライン（刺激因子なし）、C：対照刺激因子（17β-エストラジオール）、PINP：I 型プロコラーゲン N 末端プロペプチド。(*)は p 値<0.05、(**)は p 値<0.01、(***)は p 値<0.001 の統計学的有意な作用を示す。アスタリスクはベースライン値との比較における有意差を示す。
出典：4.2.1.1-15。

2.6.2.2.3 In vivo 薬理試験

2.6.2.2.3.1 In vivo 薬理試験の概要

：添付資料番号 4.2.1.1-16（参考）、-17（評価）、-18（評価）、-19（参考）、-20（参考）、4.2.1.1-21（参考）、-22（参考）

生化学試験及び細胞ベース試験のデータから、XL184 は、腫瘍細胞増殖や血管新生を促進する MET 及び VEGFR2 などの主要 RTK、を阻害することが示されている。以下に述べる in vivo 試験では、血漿中薬物濃度の上昇と、XL184 標的受容体活性に対する阻害の増強との間に、良好な相関が認められた。マウスにおける用量反応試験の結果から、これらの標的に対する阻害の ED_{50} 値は、十分に忍容可能な用量の XL184 で達成されることがわかった。XL184 投与によって受容体リン酸化は長時間阻害されており、例えば、MET、VEGFR2 及び RET の阻害は、XL184 単回投与後 4～24 時間持続した。この長時間の阻害作用は概して血漿中曝露量から予測可能であり、血漿中濃度が MET に対しては約 5,000 ng/mL（10 µmol/L）、VEGFR2 に対しては 2,500 ng/mL（5 µmol/L）、RET に対しては 7,500 ng/mL（15 µmol/L）を下回ると、阻害作用が減弱した。

RTK に対する XL184 の薬力学的作用を検討するための実験は、その検討に適した受容体発現量と無刺激時のリン酸化／活性を示す試験系を用いた。MET 及び RET については、これらの受容体を高度に発現する固形腫瘍溶解物において受容体リン酸化を測定し、VEGFR2 及び TIE-2 のリン酸化は、マウス肺溶解物を用いて測定した。内因性 MET リン酸化に対する XL184 の作用は、マウス肝でも測定した。異種移植腫瘍では恒常的に MET がリン酸化しているため HGF の静脈内（IV）投与は必要ではなかったが、マウス肝では、内因性 MET のリン酸化を測定可能にするために HGF 投与が必要であった。マウス肺では、無刺激時の VEGFR2 受容体リン酸化レベルが低かったため、VEGF 投与による刺激後の肺において、VEGFR2 に対する XL184 の阻害作用を評価した。マウス肺における無刺激時の TIE-2 の内因性受容体リン酸化レベルは、リガンド刺激非存在下でも十分測定可能であった。別の 2 種類の二次標的（KIT 及び FLT-3）については、ヒト肺細胞株 Calu6 及び BaF3 細胞株それぞれに

KIT C10D 変異体及び FLT-3 ITD 変異体を強制発現した恒常的活性化モデルを用いて評価した。

用量反応試験において、XL184 の経口投与後 4 時間で組織検体を採取した。XL184 の作用持続時間を測定するために、担がん動物に最大有効量を単回経口投与し、投与 48 又は 96 時間後まで経時的に組織を採取した。

XL184 を用いた試験の薬力学データを、表 2.6.2.2.3.1-1 に要約する。その他の詳細については、2.6.2.2.3.2、2.6.2.2.3.3 及び 2.6.2.2.3.4 において、MET、VEGFR2 及び RET の薬力学に対する XL184 の作用を示した。

表 2.6.2.2.3.1-1　マウスにおける XL184 単回投与 In vivo 標的調節試験の要約

		用量反応				作用持続時間			
標的	組織又は細胞株	最大阻害 (%)	ED_{50} 推定値 (mg/kg)	IC_{50} 推定値 µmol/L	ng/mL	用量 (mg/kg)	最大阻害 (%)	阻害作用の持続[a]（時間）	試験報告書
MET	肝 (+HGF)	97	5	2	1000	100	99	10	4.2.1.1-16
	H441	96	9	7	3500	100	92	8	4.2.1.1-17
VEGFR2	肺 (+VEGF)	98	26	2	1000	100	99	10	4.2.1.1-18
RET	TT	89	11	7	4000	100	79	<24	4.2.1.1-19
TIE-2	肺	84	86	24	12000	100	89	10	4.2.1.1-20
FLT-3	BaF3/ FLT-3 ITD	89	≤1	≤0.48	≤240	30	82	24	4.2.1.1-21
KIT	Calu6/ KIT D10C	47	≥100	≥19	≥95000	ND	ND	ND	4.2.1.1-22

ED_{50}：受容体リン酸化を 50%阻害する用量、ITD：遺伝子内縦列重複、HGF：肝細胞増殖因子、IC_{50}：受容体リン酸化を 50%阻害する濃度、VEGF：血管内皮細胞増殖因子、ND：実施せず。[a] >50%の持続的阻害。

2.6.2.2.3.2 H441 腫瘍異種移植片における MET 阻害の薬力学

：添付資料番号 4.2.1.1-17（評価）

H441 ヒト肺異種移植腫瘍の溶解物には、恒常的にリン酸化された MET が高濃度で含まれていることから、これを用いて腫瘍における MET の内因性リン酸化に対する XL184 の阻害作用を、3、10、30 及び 100 mg/kg の単回経口投与 4 時間後に検討した。XL184 投与により、in vivo の H441 腫瘍において、MET リン酸化が用量依存的に低下し、用量 100 mg/kg で最大 96%の阻害が認められた。用量反応関係に基づくと、XL184 による MET リン酸化阻害の ED_{50} 予測値は 9 mg/kg である（表 2.6.2.2.3.2-1）。

同試験において、血漿中及び腫瘍溶解物中の XL184 濃度も測定した。血漿中 XL184 濃度は概して、用量 3～30 mg/kg では用量に比例して増加したが、用量 30～100 mg/kg では用量比例性から予測されるよりも増加が小さかった。H441 腫瘍溶解物では、XL184 濃度は、全用量で用量比例性から予測されるよりも増加が小さかった。さらに、腫瘍溶解物中の XL184 濃度は、血漿中濃度と比較して約 50%低かった。XL184 の血漿中濃度が 24～31 µmol/L では、MET リン酸化が 87%～96%阻害された。血漿中濃度と阻害反応の関係に基づくと、XL184 による MET リン酸化阻害の IC_{50} 予測値は 7 µmol/L である（表 2.6.2.2.3.2-1）。

MET リン酸化に対する XL184 の阻害作用の持続時間を検討するために、H441 腫瘍移植動物に 100 mg/kg を単回投与し、投与 2、4、8、24 及び 48 時間後に腫瘍を採取した。投与 2 時間後に MET リン酸化の最大阻害（92%）が認められ、投与 8 時間後まで持続した（≥50%）。血漿中 XL184 濃度は投与 8 時間後で約 20 µmol/L であり、投与 24 時間後には約 9 µmol/L に低下し、MET リン酸化の 45%阻害が認められた。投与 48 時間後には、血漿中 XL184 濃度は約 0.14 µmol/L まで低下しており、MET リン酸化の阻害は認められなかった（表 2.6.2.2.3.2-2）。これらの結果から、H441 腫瘍における MET リン酸化に対する XL184 の阻害作用の持続時間は、阻害剤の血漿中曝露量に関連すること、また、マウスにおいて単回投与後に標的を約 90%阻害するためには、血漿中濃度約 25 µmol/L が必要であることが示された。

表 2.6.2.2.3.2-1　H441 腫瘍異種移植モデルにおける XL184 による MET 阻害の薬力学（用量反応、投与 4 時間後時点）

	XL184 濃度 (µmol/L)			
XL184 (mg/kg)	血漿 平均±SD	腫瘍溶解物 平均±SD	pMET (%対照)	pMET (%阻害)[a]
溶媒	NA	NA	100	0
3	2.52±0.30	1.84±1.25	68	32
10	8.12±2.47	3.78±1.52	57	43
30	23.6±4.94	11.5±4.45	13	87
100	31.5±3.83	17.4±5.78	4	96
ED_{50} (mg/kg)[b]	9	—	—	—
IC_{50} (µmol/L)[c]	7	—	—	—

NA：該当せず、SD：標準偏差。血漿中 XL184 の定量下限（LLOQ）は 0.004 µmol/L。[a] 阻害率（%）は対応する時点の溶媒投与対照検体の値で標準化。[b] リン酸化を 50%阻害する用量。[c] リン酸化を 50%阻害する血漿中濃度。
出典：4.2.1.1-17。

表 2.6.2.2.3.2-2　H441 腫瘍異種移植モデルにおける XL184 による MET 阻害の薬力学（作用持続時間、用量 100 mg/kg）

	XL184 濃度 (µmol/L)			
経過時間（時間）	血漿 平均±SD	腫瘍溶解物 平均±SD	pMET (%対照)	pMET (%阻害)[a]
2	24.4±2.60	40.0±8.90	8	92
4	25.0±5.60	43.2±9.70	13	87
8	20.4±5.00	43.4±19.0	40	60
24	9.42±6.60	14.5±2.30	55	45
48	0.14±0.19	1.10±1.40	133	0

SD：標準偏差。血漿中 XL184 の定量下限（LLOQ）は 0.004 µmol/L。[a] 阻害率（%）は対応する時点の溶媒投与対照検体の値で標準化。出典：4.2.1.1-17。

2.6.2.2.3.3 マウス肺組織における VEGFR2 阻害の薬力学

：添付資料番号 4.2.1.1-18（評価）

マウス肺などの高度に血管の存在する組織の溶解物には、多量の VEGFR2（マウスでは Flk-1 として知られる）が含まれ、VEGFR2 の自己リン酸化は VEGF の静脈内投与によって誘導される。そこで、XL184 を 3、10、30、100 又は 300 mg/kg 単回投与した未治療無胸腺ヌードマウスの肺組織において、投与 4 時間後に VEGF 刺激性の VEGFR2 リン酸化に対する XL184 の阻害作用を検討した。別の試験において、XL184 を 100 mg/kg 単回経口投与後に、

VEGF 刺激性 VEGFR2 リン酸化に対する XL184 の阻害作用の持続時間を測定した。VEGF は、各時点の組織採取 30 分前に静脈内投与した。

XL184 投与により、in vivo のマウス肺において、VEGF 刺激性 VEGFR2 リン酸化が用量依存的に低下し、用量 300 mg/kg で最大 98%の阻害が認められた（表 2.6.2.2.3.3-1）。VEGFR2 リン酸化阻害は用量≥30 mg/kg でのみ認められた。用量反応関係に基づくと、マウス肺における VEGF 刺激性 VEGFR2 リン酸化に対する ED_{50} の予測値は 26 mg/kg である（図 2.6.2.2.3.3-1）。

同試験において、血漿中及び肺溶解物中 XL184 濃度も測定した。血漿中濃度 14～19 µmol/L で、VEGF 刺激性 VEGFR2 リン酸化が 90%～98%阻害された。肺溶解物において、同程度の濃度の XL184 が認められた（5～20 µmol/L）。濃度反応関係に基づくと、マウス肺における VEGF 刺激性 VEGFR2 リン酸化に対する IC_{50} の予測値は 2 µmol/L である。

VEGF 刺激性 VEGFR2 リン酸化に対する XL184 の阻害作用の持続時間を測定するために、未治療無胸腺ヌードマウスに XL184 を 100 mg/kg 単回投与し（+VEGF、上述の通り）、投与 48 時間後まで経時的に肺を採取した。VEGF 刺激性 VEGFR2 リン酸化に対する XL184 のほぼ最大の阻害作用が、最初の測定時点である投与 2 時間後で認められ、投与 10 時間後まで持続した（表 2.6.2.2.3.3-2）。血漿中 XL184 濃度は投与 10 時間後まで 23～35 µmol/L であり、投与 24 時間後には約 5 µmol/L に低下した。肺溶解物中の XL184 濃度は、血漿中濃度と同程度であった。したがって、マウス肺における VEGF 誘導性 VEGFR2 リン酸化に対する阻害作用の持続時間は、XL184 の血漿中濃度と時間のプロファイルと一致し、マウス肺において XL184 単回投与後に受容体のほぼ 100%の阻害を達成するには、血漿中濃度約 23 µmol/L が必要である。

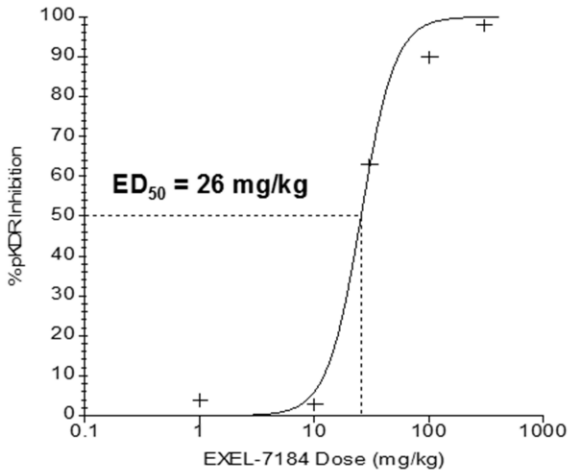


図 2.6.2.2.3.3-1　マウス肺における VEGF 刺激性 VEGFR2 リン酸化に対する阻害の用量反応関係（投与 4 時間後時点）

ED_{50}：受容体リン酸化を 50%阻害する用量。
出典：4.2.1.1-18。

表 2.6.2.2.3.3-1　肺組織における VEGFR2 阻害の薬力学（用量反応試験、投与 4 時間後時点））

	XL184 濃度 (µmol/L)			
XL184 (mg/kg)	血漿 平均±SD	肺溶解物 平均±SD	pVEGFR2 (%対照)	pVEGFR2 (%阻害)[a]
溶媒	NA	NA	100	0
3	0.12±0.05	0.10±0.05	96	4
10	0.75±0.18	0.50±0.18	97	3
30	2.30±0.35	0.88±0.37	37	63
100	13.6±4.30	5.23±2.10	10	90
300	19.0±13.0	20.0±17.0	2	98
ED_{50} (mg/kg)[b]	26	—	—	—
IC_{50} (µmol/L)[c]	2	—	—	—

NA：該当せず、SD：標準偏差。XL184 の定量下限（LLOQ）は 0.004 µmol/L。[a] 阻害率（%）は各時点の溶媒投与対照群の値で標準化。[b] リン酸化を 50%阻害する用量。[c] リン酸化を 50%阻害する血漿中濃度。出典：4.2.1.1-18。

表 2.6.2.2.3.3-2　肺組織における VEGFR2 阻害の薬力学（作用持続時間試験、用量 100 mg/kg）

	XL184 濃度 (µmol/L)			
経過時間（時間）	血漿 平均±SD	肺溶解物 平均±SD	pVEGFR2 (%対照)	pVEGFR2 (%阻害)[a]
溶媒	NA	NA	100	0
2	29.6±8.52	42.8±22.5	2	98
4	34.5±10.6	39.5±20.2	2	98
10	22.8±2.40	21.6±7.30	1	99
24	5.30±4.30	6.68±7.20	89	11
48	0.11±0.08	0.18±0.11	100	0

NA：該当せず、SD：標準偏差。XL184 の定量下限（LLOQ）は 0.004 µmol/L。[a] 阻害率（%）は各時点の溶媒投与対照群の値で標準化。出典：4.2.1.1-18。

2.6.2.2.3.4 TT 腫瘍異種移植片における RET 阻害の薬力学

：添付資料番号 4.2.1.1-19（参考）

TT 甲状腺髄様癌細胞においては、RET 癌原遺伝子のコドン 634 に優性機能獲得型ヘテロ接合突然変異が存在し、そのために RET の恒常的自己リン酸化が生じる[5]。これらの腫瘍における RET の内因性リン酸化に対する XL184 の阻害作用を単回投与試験（3、10、30、100 及び 300 mg/kg）によって、投与 4 時間後の腫瘍を採取して検討した。XL184 投与によって、RET リン酸化が用量依存的に低下し、用量 100 及び 300 mg/kg でそれぞれ最大 84 及び 89%の阻害が認められた（表 2.6.2.2.3.4-1）。用量反応関係に基づくと、RET リン酸化を 50%阻害する用量の予測値は 11 mg/kg である（図 2.6.2.2.3.4-1、表 2.6.2.2.3.4-1）。同試験において血漿中及び腫瘍溶解物中の XL184 濃度も測定した。血漿中では、XL184 の濃度 49～66 µmol/L で RET リン酸化に対する最大 84～89%の阻害が認められた。XL184 濃度は血漿中で腫瘍溶解物よりも約 2 倍高かった。濃度反応関係に基づくと、RET リン酸化を 50%阻害する血漿中濃度の予測値は 7 µmol/L である。

RET リン酸化に対する XL184 の阻害作用の持続時間を測定するために、TT 腫瘍移植動物に XL184 を用量 30、100 及び 300 mg/kg で投与し、24 時間後に腫瘍を採取した。投与 24 時間後の血漿中濃度 1 µmol/L 未満に相当する用量 30 mg/kg 投与では、RET リン酸化に対する阻害作用は認められなかった。しかし同時点の血漿中濃度 7～9 µmol/L に相当する用量 100 及び 300 mg/kg 投与では、RET リン酸化の中等度の阻害（それぞれ 44 及び 37%）が認められた。これらの結果から、TT 腫瘍における RET リン酸化に対する XL184 の阻害作用持続時間

は、XL184 の血漿中薬物動態プロファイルと直接相関しており、マウスにおいて RET リン酸化の最大阻害を維持するためには、定常状態の血漿中濃度が 10 µmol/L を超えている必要がある。

別の試験において、RET リン酸化に対する XL184 の阻害作用持続時間をさらに詳細に検討した。TT 腫瘍移植動物に XL184 を 100 mg/kg 単回投与し、4、24、48 及び 72 時間後に腫瘍を採取した（表 2.6.2.2.3.4-2）。上述の結果と一致して、投与 24 時間後の RET リン酸化阻害率は 42%であった。しかし、RET リン酸化の最大 79%の阻害は投与 4 時間後に認められ、相当する血漿中濃度は 42 µmol/L であった。投与後 48～72 時間では、血漿中 XL184 濃度は 1 µmol/L を下回っており、RET リン酸化に対する阻害作用は認められなかった。AKT 及び ERK のリン酸化に対しては、中等度の阻害（<50%）が投与 4 時間後に認められたが、投与 24 時間後まで持続しなかった。

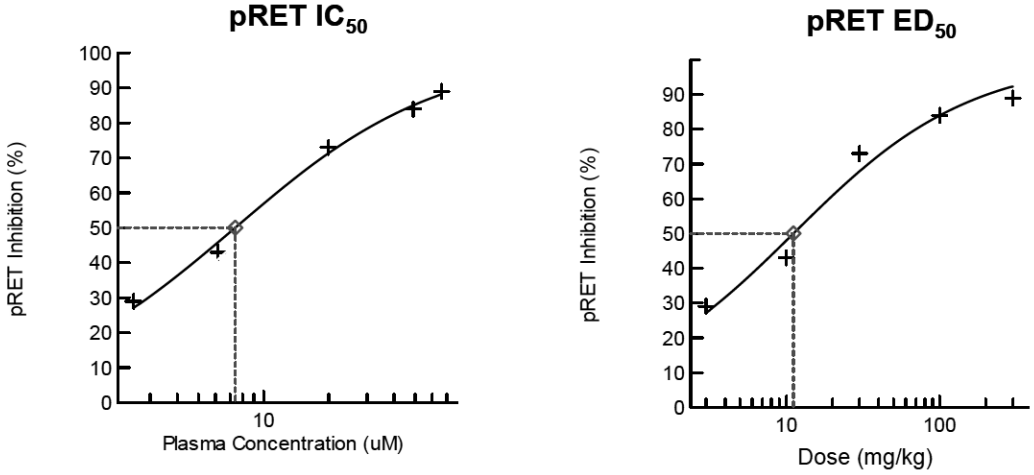


図 2.6.2.2.3.4-1　TT 異種移植腫瘍における XL184 による RET リン酸化阻害の用量反応関係（投与 4 時間後時点）

IC_{50}：リン酸化を 50%阻害する濃度。ED_{50}：リン酸化を 50%阻害する用量。出典：4.2.1.1-19。

表 2.6.2.2.3.4-1　XL184 による RET 阻害の薬力学（用量反応試験、投与 4 時間後時点）

	XL184 濃度 (µmol/L)		pRET	pRET
	血漿	腫瘍	(%対照)	(%阻害)[a]
XL184 (mg/kg)	平均±SD	平均±SD		
溶媒	NA	NA	100	0
3	2.51±0.50	1.13±0.21	71	29
10	6.15±1.70	2.57±0.88	57	43
30	19.8±6.51	9.33±3.48	27	73
100	49.0±5.86	23.3±5.22	16	84
300	66.4±15.2	38.6±20.7	11	89
ED_{50} (mg/kg)[b]	11.1	—	—	—
IC_{50} (µM)[c]	7.4	—	—	—

NA：該当せず、SD：標準偏差。注：血漿中 XL184 の定量下限（LLOQ）は 0.004 µmol/L。[a] 阻害率（%）は対応する時点の溶媒投与対照検体の値で標準化。[b] リン酸化を 50%阻害する用量。[c] リン酸化を 50%阻害する血漿中濃度。出典：4.2.1.1-19。

表 2.6.2.2.3.4-2　XL184 による RET 阻害の薬力学（作用持続時間試験、用量 100 mg/kg）

	XL184 濃度（µmol/L）		pRET	pRET
	血漿	腫瘍	(%対照)	(%阻害)[a]
経過時間（時間）	平均±SD	平均±SD		
4	42.1±17.7	17.4±8.56	21	79
24	15.1±11.8	6.04±5.76	58	42
48	0.04±0.03	<LLOQ	100	0
72	0.01±0.01	<LLOQ	97	3

SD：標準偏差。注：XL184 の定量下限（LLOQ）は 0.004 µmol/L。[a] 阻害率（%）は対応する時点の溶媒投与対照検体の値で標準化。出典：4.2.1.1-19。

2.6.2.2.3.5 腫瘍血管新生、低酸素、腫瘍細胞増殖、細胞死に対する XL184 の急性作用

：添付資料番号 4.2.1.1-23（参考）

In vivo の腫瘍細胞とそれらを支持する血管構造に対する XL184 の急性作用を検討するために、MDA-MB-231 ヒト乳癌細胞を移植した無胸腺ヌードマウスに、XL184 を 100 mg/kg 1 日 1 回経口投与した。腫瘍が約 100 mg に達した時点で投与を開始し、図 2.6.2.2.3.5-1 に示した各時点で腫瘍を摘出した。

肉眼的形態観察では、溶媒投与対照マウスの腫瘍とは異なり、XL184 投与マウスの腫瘍には全体の外観に明らかな変化が認められた。投与開始後 24 時間以内に著しい表面出血を伴う表面血管の明らかな崩壊が認められ、48 時間時点まで次第に増強した。96 時間の時点では、腫瘍の色が正常化したように見え、表面血管は見えなくなっていた。この顕著な血管新生阻害の所見と一致して、XL184 投与マウスの腫瘍は、溶媒投与対照マウスの腫瘍と比較して、試験期間中に次第に縮小した。肉眼観察でみられた腫瘍サイズの明らかな縮小は、ノギスによる測定では溶媒投与対照腫瘍と比較し、腫瘍は増殖せず、10%の退縮を示した。XL184 は投与期間中の忍容性が高く、体重減少は認められなかった。

平均血管密度（MVD）を免疫組織化学解析（IHC）で評価するために腫瘍を処理し（MECA32 染色）、全体的細胞充実性を評価するために 4', 6-diamino-2-phenylindole（DAPI）染色を行った。解析により、溶媒投与対照群腫瘍においては、実験経過全体を通して均一な血管新生が認められた。溶媒投与対照における MECA32 染色の定量では、腫瘍領域の約 20%が MECA32 陽性内皮細胞で占められており、高度の腫瘍血管新生が明らかになった。XL184 単回投与 24 時間後に腫瘍血管分布の有意な縮小が認められ、この縮小は時間依存的に次第に大きくなり、4 及び 5 回目投与後にはそれぞれ 87 及び 91%の最大縮小率に達した（図 2.6.2.2.3.5-1）。

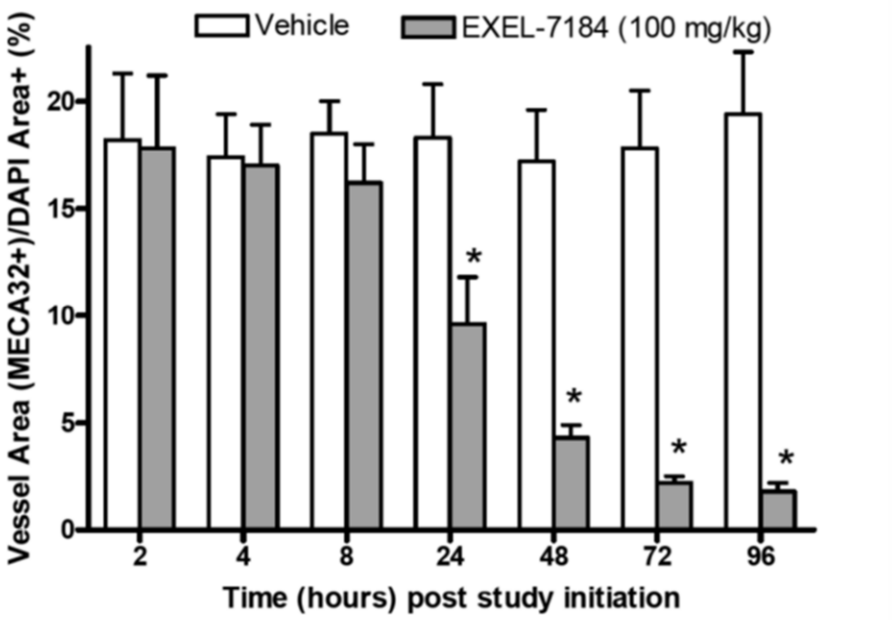


図 2.6.2.2.3.5-1　MDA-MB-231 異種移植腫瘍における XL184 投与に反応した平均血管密度の定量

出典：4.2.1.1-23。(*)は p 値<0.05 の統計学的有意な作用を示す。

前述の XL184 投与に反応した腫瘍血管分布の大幅な縮小から、XL184 は腫瘍血管内皮細胞に著しい作用を及ぼすことが示唆される。そこで、内皮細胞死の解析を行った。腫瘍切片において、血管分布を評価するための処理（MECA32、赤色蛍光）、細胞死／アポトーシスを評価するための処理（TUNEL、緑色蛍光）、全体の細胞充実性を検出するために DAPI 染色（青色蛍光）を行った。代表的画像の定性的・視覚的解析により、内皮細胞死（MECA32 及び TUNEL シグナルの重ね合わせによる黄色蛍光）は 2 回目投与 4 時間後に初めて認められ、3 回目投与までに増加したように見えた（図 2.6.2.2.3.5-2）。2 回目投与 4 時間後に、腫瘍細胞死が認められた。4 回目投与後、画像において血管構造は完全に消失し、複数のアポトーシス核をもつ小さな内皮細胞塊が認められた。これらの結果から、XL184 投与は、腫瘍内血管構造の必須の構成要素である内皮細胞の生存に、重大な影響を及ぼすことが示唆される。

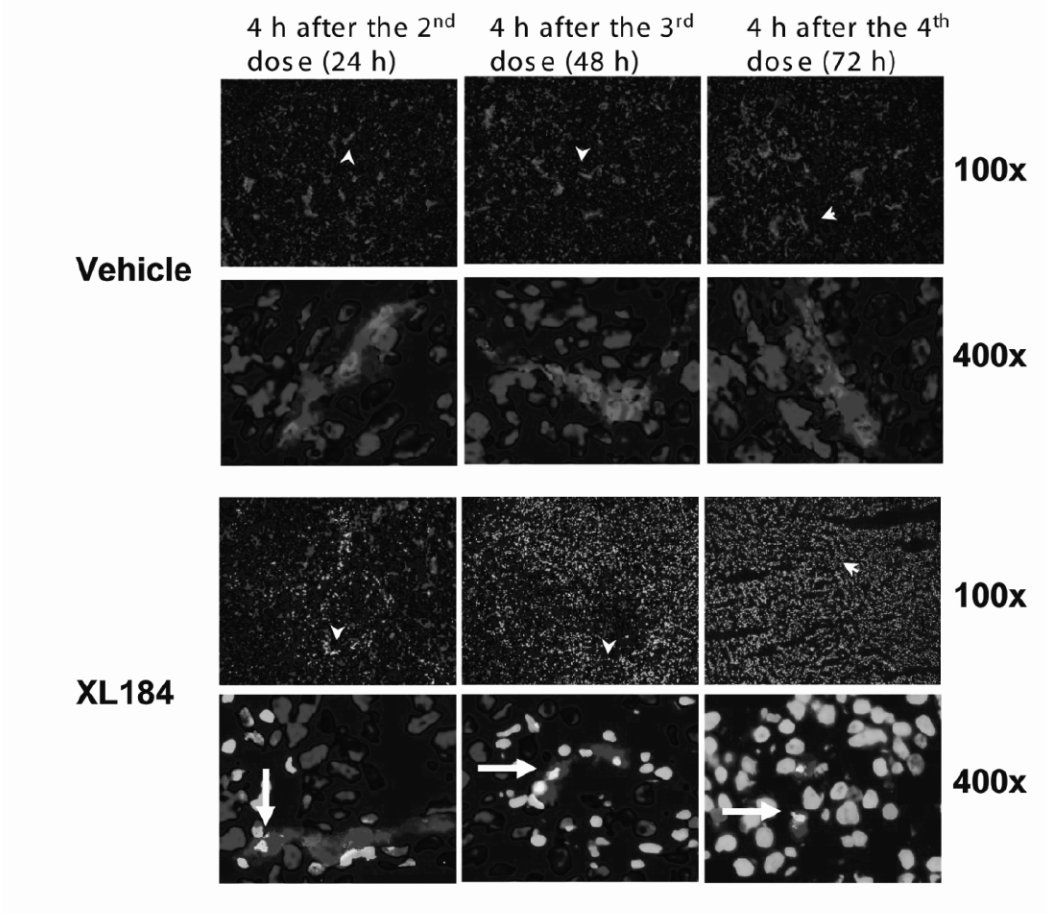


図 2.6.2.2.3.5-2　XL184 の経口投与による血管内皮細胞死

青：DAPI 染色された核、赤：MECA32 染色された微小血管、緑：TUNEL 陽性の核。100X 画像の矢尻（白）は、400X 拡大画像に表示された領域を示す。400X 画像の矢印（白）は、TUNEL 陽性内皮細胞核（黄）を示す。上図（括弧内）に示した時点は、初回投与後の経過時間である。出典：4.2.1.1-23。

腫瘍血管内皮細胞に対する作用と一致して、XL184 の 100 mg/kg 1 日 1 回経口投与により、投与 8 時間後時点で、低酸素領域（IHC 低酸素マーカーにより測定）が有意に増加した（全腫瘍組織の約 10%まで、$p<0.001$；図 2.6.2.2.3.5-3）。このような腫瘍内低酸素化は時間とともに徐々に進行し、XL184 投与 48～96 時間後には溶媒投与群と比較し、低酸素領域が約 85～105 倍に増加した。

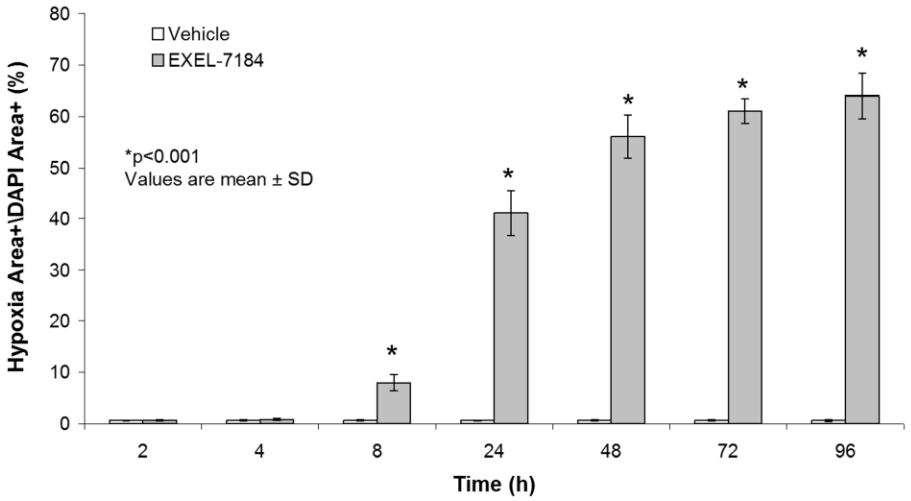


図 2.6.2.2.3.5-3　MDA-MB-231 異種移植腫瘍における XL184 投与に反応した低酸素の定量
出典：4.2.1.1-23

図 2.6.2.2.3.5-2 に認められる、肉眼的腫瘍サイズの縮小と TUNEL 染色によって確認した腫瘍細胞死（TUNEL 陽性）の増加から、XL184 投与が高度の腫瘍細胞死を誘導していることが明らかになった。腫瘍細胞アポトーシス及び増殖のレベルを、腫瘍切片において定量した。溶媒投与対照動物の腫瘍では、TUNEL 陽性腫瘍細胞数が、測定を行った各時点で極めて少なかった。XL184 投与により、TUNEL 陽性腫瘍細胞数が次第に増加した。この作用の定量解析により、TUNEL 陽性細胞数の有意な増加は、初回投与のわずか 2 時間後に認められ、5 回目投与後には 138 倍にも上ることがわかった。これらのデータから、XL184 投与は腫瘍細胞死を急速かつ顕著に誘導することが示されており、これは、腫瘍細胞及び腫瘍血管構造に対する XL184 の直接的な作用と一致する。

MDA-MB-231 腫瘍において、Ki67 免疫染色による細胞増殖の定量も行った。溶媒投与対照動物の腫瘍には、生存腫瘍組織の存在を示す Ki67 が各時点で同程度に多量に含まれていた。XL184 の単回投与後 8 時間以内に、Ki67 免疫染色領域のわずかではあるが 19%の有意な減少が認められた。XL184 の追加投与により、Ki67 免疫染色領域は腫瘍中心部内から次第に消失し、時間とともに腫瘍辺縁部に広がった。5 回目投与後には、腫瘍辺縁部に生存腫瘍組織の小さな輪のみが認められた。腫瘍低酸素及び TUNEL（上述）の誘導と比較すると、XL184 に反応した低酸素及び TUNEL 発現と増殖との間には逆相関が存在する。

これらの結果から、XL184 は、MDA-MB-231 異種移植片において、投与後 8 時間以内に腫瘍新生血管の速やかな崩壊を誘導し、血管密度を低下させるとともに腫瘍低酸素領域を増加させる。XL184 投与後 2～24 時間という早期に腫瘍あるいは内皮細胞死が増加し、強力な抗腫瘍活性が生じる。

2.6.2.2.4 In vivo 有効性モデル

2.6.2.2.4.1 In vivo 有効性モデルの概要

：添付資料番号 4.2.1.1-24（評価）、-25（評価）、-26（評価）、-27（評価）、-28（評価）、4.2.1.1-29（参考）、-30（評価）、-31（参考）、-32（参考）、-33（参考）、-34（参考）、4.2.1.1-35（参考）、-36（参考）、-37（参考）、-38（参考）

複数のマウス腫瘍モデルを用いて、腫瘍増殖阻害、腫瘍細胞転移、生存という点から、XL184の有効性と効力を検討した。細胞株として、C6（ラット神経膠腫）、MDA-MB-231（ヒト乳癌）、H441（ヒト肺癌）、TT（ヒト MTC）、B16F10（マウス黒色腫）、SV40 Large-T-Antigen誘導性膵癌のトランスジェニック RIP-Tag2 モデル系などを用いた。H441 モデルは多量のリン酸化 MET を発現していることから、in vivo で、MET シグナル伝達経路に依存して腫瘍形成の表現型を維持している可能性が示唆される[6]。一方、TT 細胞株には、MEN-2A 関連甲状腺癌の発生につながる発がん性 Cys634Trp RET が存在する。

これらの試験の標準実験計画においては、移植・増殖させた固形腫瘍が指定の重量（大半の腫瘍モデルでは約 100 mg、ラットの C6 ラット神経膠腫腫瘍では約 200～250 mg、腫瘍退縮試験においては最大 1,000 mg）に達した時点で、又は腫瘍細胞の経静脈移植の 3 日後に、XL184 の 1 日 1 回経口投与を開始した。投与期間を通して、腫瘍サイズを週 2 回測定し（適切な場合）、体重を 1 日 1 回測定した。これらの試験において、XL184 は強力な抗腫瘍活性を示し、固形腫瘍の顕著な退縮をもたらした。

一部の試験の終了時に腫瘍を摘出し、平均血管密度（CD31 染色）、増殖細胞（Ki67 染色）、壊死（ヘマトキシリン／エオシン染色）を組織学的に調べた。腫瘍増殖阻害には、総じて、腫瘍壊死の増加、腫瘍血管新生の減少、腫瘍細胞増殖指数の低下との良好な相関が認められ、XL184 の血管新生阻害活性が強力な抗腫瘍効果に寄与することが示唆された。

これらの試験において、1 日 1 回の体重測定により忍容性を観察した。XL184 は概してマウスにおいて忍容性が高いと考えられ、最大 100 mg/kg/day を 14 日間投与した場合に著しい体重減少は認められなかった。それより高い用量での検討は行わなかった。ラットにおいては、体重減少データ及び臨床的観察から、最大耐量は 10 mg/kg/day であることがわかっている。マウスとラットの忍容性の差は、ラットにおいてマウスよりも XL184 のクリアランスが低く、血漿中曝露量の用量補正値が高かったために生じたと考えられる。

マウス試験の比較から、90%を超える腫瘍増殖阻害のためには、XL184 の定常状態の曝露量（C_{ave}）として約 1,500～2,400 µg/mL（3～4.8 µmol/L）が必要であった（表 2.6.2.2.4.1-1）。ラット C6 モデルにおいては、血漿中曝露量約 1,200 ng/mL（2.4 µmol/L）が、完全な腫瘍増殖阻害を伴う。有効量での最高血漿中濃度は比較的高いが、トラフ濃度はかなり低い場合があり、マウスでは高い有効性を示す用量で 50 ng/mL（0.1 µmol/L）という低いトラフ濃度が認められている。XL184 のトラフ値低値は、主にマウス試験で認められる特徴である。XL184 の $t_{1/2}$（終末相消失半減期）は、マウスにおいて（8 時間）、ラット（21.5 時間）又はヒト（111 時間）よりもかなり短い。しかし、有効性の結果は、マウスでの in vivo 標的調節試験において、XL184 の主要標的に対する長い作用持続時間（8～24 時間）が示されたことと一致しており、有効性を維持するために持続的な高曝露量は必要ないといえる。

いくつかの固形腫瘍増殖阻害試験のデータを、表 2.6.2.2.4.1-1 に要約する。XL184 の腫瘍増殖に対する作用及び生存試験における作用を評価した各試験のさらに詳しいデータを、2.6.2.2.4.2～2.6.2.2.4.9 で示す。

表 2.6.2.2.4.1-1　In vivo 固形腫瘍増殖阻害試験（連続投与法）の要約

腫瘍モデル	用量及び投与期間	TGI (%)	腫瘍退縮 (%)	XL184 血漿中曝露量 (C_{ave})[a] (ng/mL)
C6 神経膠腫（ラット）	1 mg/kg/d x 12d	92	—	1234
C6 神経膠腫（ラット）	3 mg/kg/d x 12d	>100	62	1979
C6 神経膠腫（ラット）	10 mg/kg/d x 12d	>100	85	7827
MDA-MB-231（マウス）	1 mg/kg/d x 14d	39	—	28
MDA-MB-231（マウス）	3 mg/kg/d x 14d	55	—	179
MDA-MB-231（マウス）	10 mg/kg/d x 14d	86	—	514
MDA-MB-231（マウス）	30 mg/kg/d x 14d	99	—	1544
MDA-MB-231（マウス）	60 mg/kg/d x 14d	>100	18	3017
TT（マウス）	1 mg/kg/d x 14d	5	—	56
TT（マウス）	3 mg/kg/d x 14d	12	—	355
TT（マウス）	10 mg/kg/d x 14d	50	—	802
TT（マウス）	30 mg/kg/d x 14d	100	—	2382
TT（マウス）	60 mg/kg/d x 14d	>100	20[b]	7847
H441（マウス）	1 mg/kg/d x 14d	31	—	43
H441（マウス）	3 mg/kg/d x 14d	56	—	134
H441（マウス）	10 mg/kg/d x 14d	58	—	505
H441（マウス）	30 mg/kg/d x 14d	97	—	1944
H441（マウス）	60 mg/kg/d x 14d	>100	33	3256

各実験において良好に忍容された用量でのデータを示す。[a] XL184 曝露量、C_{ave} は AUC(0-24)/24 として算出；AUC(0-24)は最終投与の約 1、4（又は 4.5）及び 24 時間後に採取した血漿中の測定値から推定。[b] 統計学的に有意でない腫瘍退縮。出典：4.2.1.1-24、4.2.1.1-25、4.2.1.1-26、4.2.1.1-27。

2.6.2.2.4.2 C6 ラット神経膠腫腫瘍モデル

：添付資料番号 4.2.1.1-24（評価）、-28（評価）、-29（参考）

（1）12 日投与法：用量反応

C6 ラット神経膠腫腫瘍を雌 Wistar ラットの後側腹部皮下に移植して増殖させ、腫瘍が約 250 mg に達した時点で投与を開始した。XL184 の 10、30 及び 100 mg/kg/day 1 日 1 回 12 日間投与により、腫瘍増殖がほぼ完全に停止した（図 2.6.2.2.4.2-1）。XL184 の 10、30 及び 100 mg/kg/day で認められた抗腫瘍効果は均一であり、全 3 群のすべての腫瘍が退縮して開始時のサイズを下回った。試験終了時点での摘出後、10 及び 30 mg/kg/day 投与群では、腫瘍移植部位に残存腫瘤が認められたのみであった。投与後 12 日目の腫瘍の免疫組織化学解析において、XL184 投与により、溶媒投与対照の場合と比較して、平均血管密度と増殖腫瘍細胞の割合が用量依存的に低下したことが示された（表 2.6.2.2.4.2-2）。

忍容性を検討するために、投与期間中は体重を連日記録した。XL184 の 1 日 1 回投与は、用量 10 mg/kg/day 投与群で忍容性が高く、著しい体重減少は認められず、ラット全例で予定された投与計画が終了した。30 mg/kg/day 投与群では、投与 10 日目から体重減少が始まり、溶媒投与対照群と比較して平均 13%の体重減少が認められた。30 mg/kg/day 投与群において死亡例はなかったが、試験終了までに、この群のラットにはストレス症状（体重減少、被毛の乱れなど）が認められた。100 mg/kg/day 投与群では、投与 7 日目から急激な体重減少がみ

られ、被毛の乱れや体温維持不能などの症状を伴った。投与 8 日目には死亡率 100%となった。これらのデータに基づき、ラットにおける XL184 の最大耐量は 10 mg/kg/day と決定した。

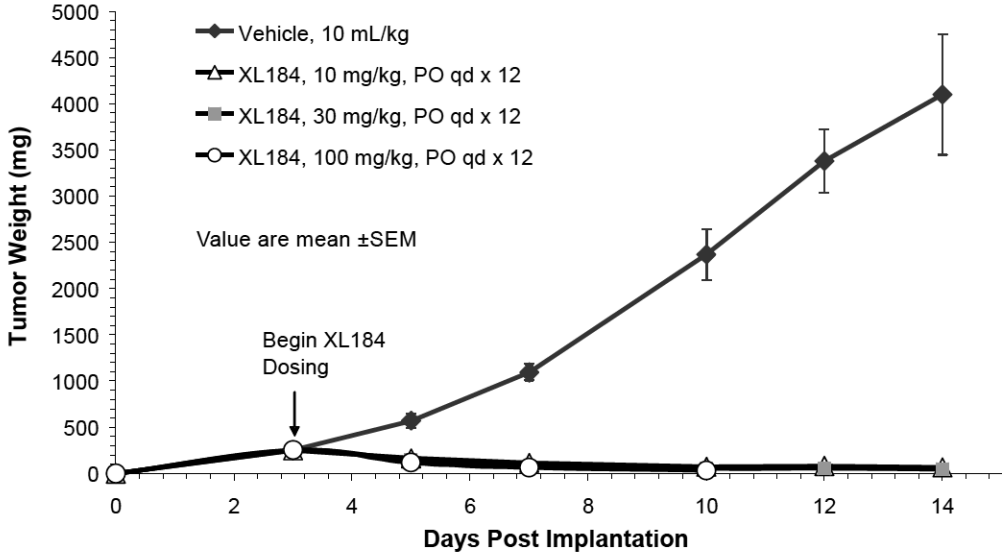


図 2.6.2.2.4.2-1　XL184 によるラットの皮下 C6 神経膠腫腫瘍増殖の抑制（投与期間 12 日）

出典：4.2.1.1-28

表 2.6.2.2.4.2-1　ラット C6 神経膠腫腫瘍の XL184 による腫瘍増殖阻害の要約（投与期間 12 日）

XL184 用量 (mg/kg/day)	TGI (%)	退縮 (%)[a]	P 値 [a]
10	>100	73	<0.00005
30	>100	81	<0.00005
100	>100	74[b]	<0.0005

NA：該当せず、TGI：腫瘍増殖阻害。[a] 投与前の腫瘍重量との比較。[b] 投与 5 日目に評価した腫瘍退縮。出典：4.2.1.1-28

表 2.6.2.2.4.2-2　C6 神経膠腫腫瘍の免疫組織化学解析の要約（投与期間 12 日）

XL184 用量	CD31 解析		Ki67 発現	
(mg/kg/day)	% MVD[a]	% 低下 [b]	% 陽性細胞	%低下 [b]
溶媒対照	28.6±11.4	NA	39.2±8.8	NA
10	3.4±0.7	88	15.8±2.3	60
30	1.1±1.2	96	9.7±3.6	75
100[c]	—	—	—	—

MVD：平均血管密度、NA：該当せず。[a] 値は平均±標準偏差。[b] 溶媒対照と比較した値。[c] 腫瘍は組織学的評価において極めて小さく、血管がなかった。出典：4.2.1.1-28

（2）12 日投与法：低用量試験

本試験では、Wistar ラットに XL184 を 1、3、10 及び 30 mg/kg/day の低用量で 1 日 1 回投与し、ラット C6 神経膠腫腫瘍に対する XL184 の増殖阻害能を検討した。XL184 の 1 mg/kg/day 投与により、92%の有意な腫瘍増殖阻害が得られた。3、10 及び 30 mg/kg/day 投与群では、溶媒投与対照群と比較してそれぞれ 62%、85%及び 94%の腫瘍退縮が認められた（表 2.6.2.2.4.2-3）。12 日目に腫瘍を摘出し、腫瘍血管分布及び腫瘍細胞増殖度を検討するための処理を行った。XL184 投与により、溶媒を投与した対照腫瘍と比較して、腫瘍血管分布が用

量依存的に低下し、低下率は 62%（1 mg/kg/day）から 95%（30 mg/kg/day）であった（表 2.6.2.2.4.2-4）。さらに、XL184 投与によって、溶媒投与対照と比較して腫瘍細胞増殖が低下し、低下率は 41%（1 mg/kg/day）から 82%（30 mg/kg/day）であった（表 2.6.2.2.4.2-4）。全体として、これらの結果は、先に述べた XL184 の強力な抗腫瘍効果に一致した。

1、3 及び 10 mg/kg/day 群において、投与 12 日目の投与前（24 時間トラフ値）と最終投与 1 及び 4 時間後に順次、尾静脈から全血を採取した。1、3 及び 10 mg/kg/day 群において、XL184 曝露量は用量にほぼ比例する形で増加した。腫瘍退縮は、曝露量（C_{ave}）約 2,000～約 8,000 ng/mL に伴って認められた。1 mg/kg/day 投与群において、曝露量約 1,200 ng/mL で 90%を超える腫瘍増殖阻害が得られた（表 2.6.2.2.4.1-1）。

表 2.6.2.2.4.2-3　ラット C6 神経膠腫腫瘍の XL184 による腫瘍増殖阻害の要約（低用量試験、投与期間 12 日）

XL184 用量 (mg/kg/day)	TGI (%)	退縮 (%)[a]	P 値
溶媒	0	NA	NA
1	92	NA	0.02 [b]
3	>100	62	4×10^{-6} [c]
10	>100	85	3×10^{-8} [c]
30	>100	94	6×10^{-9} [c]

NA：該当せず、TGI：腫瘍増殖阻害。[a] 投与前の腫瘍重量との比較。[b] 試験最終日に溶媒投与対照腫瘍との比較により判定した有意性。[c] 投与前の腫瘍重量との比較により判定した有意性。
出典：4.2.1.1-24

表 2.6.2.2.4.2-4　C6 腫瘍の免疫組織化学解析の要約（低用量試験、投与期間 12 日）

XL184 用量	CD31 解析		Ki67 発現	
(mg/kg/day)	MVD [a]	% 低下 [b, c]	% 陽性細胞 [a]	%低下 [b, c]
溶媒	37.8±7.15	NA	31.9±5.06	NA
1	14.5±2.66	62	18.8±3.41	41
3	7.06±2.42	81 [d]	15.3±4.03	52
10	3.00±1.10	92 [e]	7.61±2.99	76 [e]
30	1.86±0.56	95 [f]	5.87±4.07	82

MVD：平均血管密度、NA：該当せず。[a] 値は平均±標準偏差。[b] 溶媒投与対照群と比較した値。[c] 特に指定のない限り、有意性は溶媒投与対照腫瘍との比較による値。[d] 1 mg/kg/day 投与群と有意差あり。[e] 3 mg/kg/day 投与群と有意差あり。
[f] 10 mg/kg/day 投与群と有意差あり。出典：4.2.1.1-24

（3）単回投与による作用持続時間

C6 ラット神経膠腫モデルを用いてさらに、XL184 単回投与後の有効性を検討した。雌 Wistar ラットの後側腹部皮下に腫瘍を移植して増殖させ、腫瘍が約 200 mg に達した時点で投与を開始した。XL184 の 10、30 又は 100 mg 単回投与によって、ほぼ完全な腫瘍増殖阻害が得られ、投与後 14 日の試験終了時点で 90%を超える腫瘍増殖阻害が認められた（図 2.6.2.2.4.2-2）。

投与後 14 日目に、LC/MS/MS によって XL184 濃度を測定した。XL184 は 100 mg/kg 投与群の血漿中に低濃度で検出されたのみであり（約 5 nmol/L）、XL184 の抗腫瘍作用は、血漿中曝露量に比較して長時間持続することが示された。

試験期間中に 1 日 1 回体重を記録した。XL184 の単回経口投与後に、体重への影響は認められなかった。これらのデータに基づき、単回投与の最大耐量は決定できなかったが、100 mg/kg 以上であることは明らかになった。

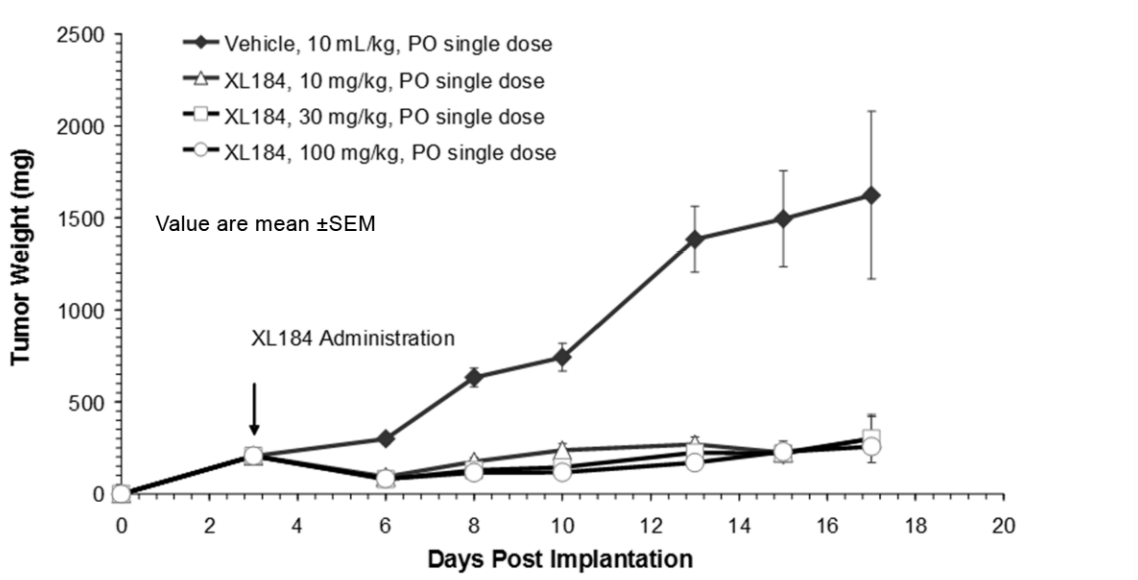


図 2.6.2.2.4.2-2　XL184 単回経口投与によるラット皮下 C6 神経膠腫の腫瘍増殖の抑制

出典：4.2.1.1-29

2.6.2.2.4.3 MDA-MB-231 ヒト乳癌マウス異種移植モデル

：添付資料番号 4.2.1.1-23（参考）、-25（評価）、-30（評価）

（1）14 日投与法

MDA-MB-231 は、無胸腺ヌードマウスにおいて腫瘍形成能を示すヒト乳癌細胞株である。薬力学的急性曝露腫瘍異種移植試験では、本細胞株に由来する腫瘍において、IHC 法により、XL184 の経口投与後に、腫瘍血管構造の速やかな崩壊、低酸素領域の増加、細胞死が認められた（2.6.2.2.3.5）。MDA-MB-231 腫瘍を雌性無胸腺ヌードマウスに移植して増殖させ、腫瘍が約 100 mg に達した時点で投与を開始した。XL184 を 1、3、10 及び 30 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回、14 日間経口投与することにより、用量依存性の腫瘍増殖阻害（それぞれ 39%、55%、86%及び 99%）が得られた（図 2.6.2.2.4.3-1 及び表 2.6.2.2.4.3-1）。60 mg/kg/day 1 日 1 回投与により、有意な腫瘍退縮が得られた（18%、P<0.005）。用量反応関係に基づくと、本試験における XL184 の ED_{50} 予測値は 2 mg/kg/day、90%抑制に必要な用量予測値は 17 mg/kg/day である。

同試験において、XL184 が示す抗腫瘍効果が、より低頻度の投与でも維持されるかどうかを検討するために、別の投与スケジュールも実施した。XL184 を 100 mg/kg の用量で 3 日に 1 回（q3d）投与することにより、有意な腫瘍増殖阻害（96%）が得られ、30 mg/kg 1 日 1 回投与群で認められた腫瘍増殖阻害が再現された（図 2.6.2.2.4.3-1 及び表 2.6.2.2.4.3-1）。100 mg/kg 単回投与では、最長 7 日間の持続的な腫瘍増殖阻害が得られ、投与後 7 日目に最大抑制率 89%に達した（表 2.6.2.2.4.3-1）。その後は腫瘍増殖が再開し、その速度は溶媒投与対照腫瘍と同程度であった。

14 日目の投与 1、4 及び 24 時間後に、XL184 の血漿中濃度を測定した。定常状態の血漿中 XL184 濃度は、用量増加にほぼ比例する形で上昇し、1、3、10、30 及び 60 mg/kg の投与 4 時間後にそれぞれ 0.36、1.2、3.3、9.3 及び 16 µmol/L であった（表 2.6.2.2.4.3-2）。30 及び 60 mg/kg 投与群で顕著な抗腫瘍効果（それぞれ腫瘍増殖阻害 99%、腫瘍退縮 18%）が認めら

れ、血漿中曝露量（C_{ave}）として約 1,500～約 3,000 ng/mL（3～6 μmol/L）がこれらの効果をもたらすと計算される。

試験終了時点で腫瘍を摘出して処理を行い、腫瘍壊死（ヘマトキシリン／エオシン染色）、平均血管密度（MVD）（CD31 染色）、腫瘍細胞増殖（Ki67 染色）を解析した（表 2.6.2.2.4.3-3）。XL184 投与により、溶媒投与対照マウスの腫瘍と比較して、MVD は用量依存的に顕著に低下した（1、3、10、30 及び 60 mg/kg/day 投与でそれぞれ 49%、65%、83%、91%及び 95%の低下）。XL184 の 100 mg/kg を 3 日に 1 回投与群における MVD 低下率は、60 mg/kg 1 日 1 回投与群で認められる低下率と同程度である（それぞれ 89% vs 95%）。XL184 の単回経口投与（100 mg/kg）により、溶媒投与対照マウスの腫瘍と比較して、MVD は 26%低下した。Ki67 染色により、溶媒投与対照マウスの腫瘍と比較して、増殖細胞の用量依存的な減少が明らかになった（1、3、10、30 及び 60 mg/kg/day 投与でそれぞれ 15%、40%、56%、71%及び 66%の減少）。XL184 の 100 mg/kg を 3 日に 1 回投与群における Ki67 陽性増殖細胞の減少率は、60 mg/kg 1 日 1 回投与群で認められる減少率と同程度である（それぞれ 58% vs 66%）。XL184 100 mg/kg 単回投与群では、試験終了時点で Ki67 染色に有意な影響は認められなかった。このことは、同群の腫瘍が、増殖阻害を持続的に受けた期間を経て、腫瘍採取の時点では溶媒投与対照群と同程度の速度で増殖していたという観察結果と一致する。XL184 の 10、30 及び 60 mg/kg/day 群、さらには 100 mg/kg を 3 日に 1 回投与群において、腫瘍壊死が 3 倍に増加した。XL184 の 100 mg/kg 単回投与群では、試験終了時点で腫瘍壊死の誘導は認められず、Ki67 染色の観察結果と一致した。XL184 の 100 mg/kg 経口投与により、投与 24 時間後では腫瘍細胞死（DAPI 陽性面積に対する TUNEL 陽性面積の割合により評価）の有意な増加（約 20%、P<0.001）が認められた（4.2.1.1-23）。この効果は時間とともに徐々に高まり、投与 2 時間後と比較して、投与 96 時間後では細胞死が約 90 倍増加した。全体として、腫瘍の MVD、Ki67 染色、腫瘍壊死に対する XL184 の阻害作用は、腫瘍サイズに対する阻害作用と密接に対応しており、このモデルにおいては、XL184 の血管新生阻害活性及び増殖阻害活性が抗腫瘍効果に大きく寄与することが示唆される。

投与期間中の XL184 投与の忍容性を検討するために、体重を 1 日 1 回記録した。XL184 はすべての用量で忍容性が高く、体重減少の所見はなく、すべてのマウスにおいて予定された投与計画が完了した。

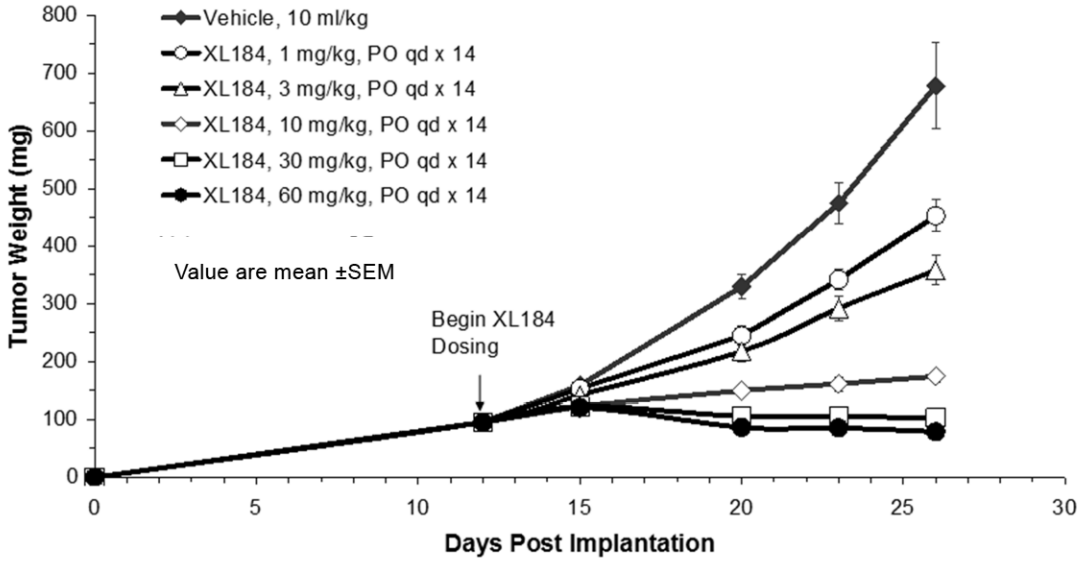


図 2.6.2.2.4.3-1　XL184 による MDA-MB-231 異種移植片増殖阻害（投与期間 14 日）

出典：4.2.1.1-25。

表 2.6.2.2.4.3-1　MDA-MB-231 異種移植腫瘍の XL184 による腫瘍増殖阻害及び退縮

XL184 用量 (mg/kg/day)	TGI (%)	腫瘍退縮 (%)	P 値
1 (qd)	39	NA	0.01[b]
3 (qd)	55	NA	<0.005[b]
10 (qd)	86	NA	<0.005[b]
30 (qd)	99	NA	<0.005[b]
60 (qd)	>100	18	<0.005[c]
100 (q3d)	96	NA	<0.005[b]
100 (単回投与)	89[a]	NA	<0.005[d]

NA：該当せず、qd：1 日 1 回、q3d：3 日に 1 回、TGI：腫瘍増殖阻害。[a] 投与後 7 日目。[b] 試験最終日の溶媒投与対照マウスと比較した P 値。[c] 投与前の腫瘍重量と比較した P 値。[d] 7 日目の最大 TGI を溶媒投与対照腫瘍と比較した P 値。

出典：4.2.1.1-25。

表 2.6.2.2.4.3-2　MDA-MB-231 腫瘍移植マウスにおける投与 14 日目の血漿中 XL184 濃度

XL184 用量 (mg/kg/day)	時点（時間）[a]	XL184 平均±SD (µmol/L)[b]	%CV
1	1	0.41±0.16	39
	4	0.36±0.31	87
	24	<LLOQ	NA
3	1	0.90±0.58	65
	4	1.2±1.1	94
	24	0.01±0.01	45
10	1	3.4±1.8	55
	4	3.3±2.8	85
	24	0.02±0.01	66
30	1	8.9±4.0	45
	4	9.3±9.3	101
	24	0.12±0.05	45
60	1	11±3	26
	4	16±14	88
	24	0.72±0.08	12
100 (q3d)	28	2.2±1.2	55

CV：変動係数、NA：該当せず、SD：標準偏差。[a] 投与後の検体採取時点（時間）。[b] XL184 の定量下限（LLOQ）は 0.004 µmol/L。
出典：4.2.1.1-25

表 2.6.2.2.4.3-3　MDA-MB-231 腫瘍の免疫組織化学解析（投与期間 14 日）

XL184 用量 (mg/kg/day)	壊死		CD31 解析		Ki67 発現	
	% 壊死 [a]	増加（倍）[b]	% MVD[a]	% 低下 [b]	% 陽性細胞 [a]	% 低下 [b]
溶媒対照	21.4±17.7	NA	37±6.4	NA	43±7.1	NA
1 qd	18.7±16.9	NS	19±3.9	49[c]	36±4.8	15
3 qd	29.9±17.1	NS	13±5.5	65[c]	26±1.9	40[c]
10 qd	63.3±19.6	3[c]	6.4±1.9	83[c]	19±2.2	56[c]
30 qd	64.5±21.9	3[c]	3.2±0.9	91[c]	13±4.1	71[c]
60 qd	70.5±8.8	3[c]	1.8±0.9	95[c]	15±3.7	66[c]
100 q3d	70.9±9.2	3[c]	4.2±2.2	89[c]	18±1.8	58[c]
100 単回投与	13.7±19.7	NS	27±8.4	26[c]	36±8.2	17

MVD：平均血管密度、NA：該当せず、NS：有意差なし、qd：1 日 1 回、q3d：3 日に 1 回。[a] 値は平均±標準偏差。[b] 溶媒対照との比較による値。[c] $P<0.05$。出典：4.2.1.1-25。

（2）退縮試験（500 又は 1,000 mg の大きさの腫瘍）

より大きな MDA-MB-231 ヒト乳癌異種移植片において、腫瘍増殖阻害及び退縮をさらに検討した（4.2.1.1-30）。腫瘍が開始重量である 500 又は 1,000 mg に到達した後に、XL184 を 10 又は 60 mg/kg の用量で 1 日 1 回投与、あるいは 100 mg/kg の用量で単回投与した。

MDA-MB-231 異種移植を受け、腫瘍重量 500 又は 1,000 mg に達したマウスにおいて、XL184 の 10 mg/kg/day 投与により、強力な腫瘍増殖阻害が認められた（100%）。XL184 の 60 mg/kg/day 投与により、500 及び 1,000 mg の腫瘍がそれぞれ 37%及び 45%退縮した（図 2.6.2.2.4.3-2）。同じ退縮試験において XL184 を 100 mg/kg で単回経口投与し、大きな MDA-MB-231 異種移植腫瘍に対する作用持続時間を検討した。100 mg/kg 単回投与により、500 及び 1,000 mg の腫瘍の増殖が顕著に抑制された。この効果は、それぞれ 7 及び 6 日間持続した。その後、増殖が再開し、その速度は溶媒投与対照群で認められた増殖速度と同程度であった。

これらの結果からは、XL184 の 10 mg/kg/day 1 日 1 回経口投与によって、開始腫瘍サイズを問わず、腫瘍増殖が強力に抑制されることが示されている。しかし、用量を 60 mg/kg/day に増量すると、極めて大きな腫瘍でも、投与後 14 日の過程において、37～45%の退縮が確実かつ均一に得られた。

14 日目の投与 1、4 及び 24 時間後に、XL184 の血漿中濃度を測定した。血漿中 XL184 濃度は、用量の増加にほぼ比例する形で上昇し、最高濃度は 10 mg/kg 投与後に 1,000～3,500 ng/mL（2～7 μmol/L）、60 mg/kg 投与後に 8,500～13,500 ng/mL（17～27 μmol/L）であった。投与 24 時間後のトラフ濃度は、10 mg/kg 投与で 30～1,500 ng/mL（0.06～3 μmol/L）、60 mg/kg 投与で 140～500 ng/mL（0.28～1 μmol/L）であった。これらのデータから、腫瘍退縮を得るには最高血漿中濃度 8,500～13,500 ng/mL が必要であるが、トラフ濃度が 50 ng/mL を下回っても抗腫瘍活性は消失しないことがわかった。

試験終了時点で腫瘍を摘出して処理し、ヘマトキシリン／エオシン染色による腫瘍壊死の解析、平均血管密度の免疫染色による腫瘍血管分布の検討、Ki67 染色による腫瘍細胞増殖の評価を行った。開始腫瘍重量 500 mg での XL184 投与により、用量 10 及び 60 mg/kg/day 群では、腫瘍壊死がそれぞれ 10 倍及び 12 倍増加した（表 2.6.2.2.4.3-4）。開始腫瘍重量 1,000 mg でマウスに XL184 を 60 mg/kg/day で投与すると、溶媒投与対照腫瘍と比較して腫瘍壊死がわずかであるが有意に 1.7 倍増加したが、10 mg/kg/day では有意な腫瘍壊死は誘導されなかった（表 2.6.2.2.4.3-4）。なお、溶媒投与対照腫瘍（特に開始腫瘍重量 1,000 mg 群）ではベースライン時の腫瘍壊死率が高かったため、有効性ウィンドウになりうる範囲が小さくなったことに注意が必要である。開始腫瘍重量 500 mg において、10 及び 60 mg/kg/day 投与により、腫瘍血管分布が用量依存的にそれぞれ 82%及び 94%低下した。開始腫瘍重量 1,000 mg においては、XL184 の 10 及び 60 mg/kg/day 投与により、腫瘍血管分布が 73%及び 95%低下した。同時に腫瘍細胞増殖の低下も認められた（Ki67 染色データ、表 2.6.2.2.4.3-4）。

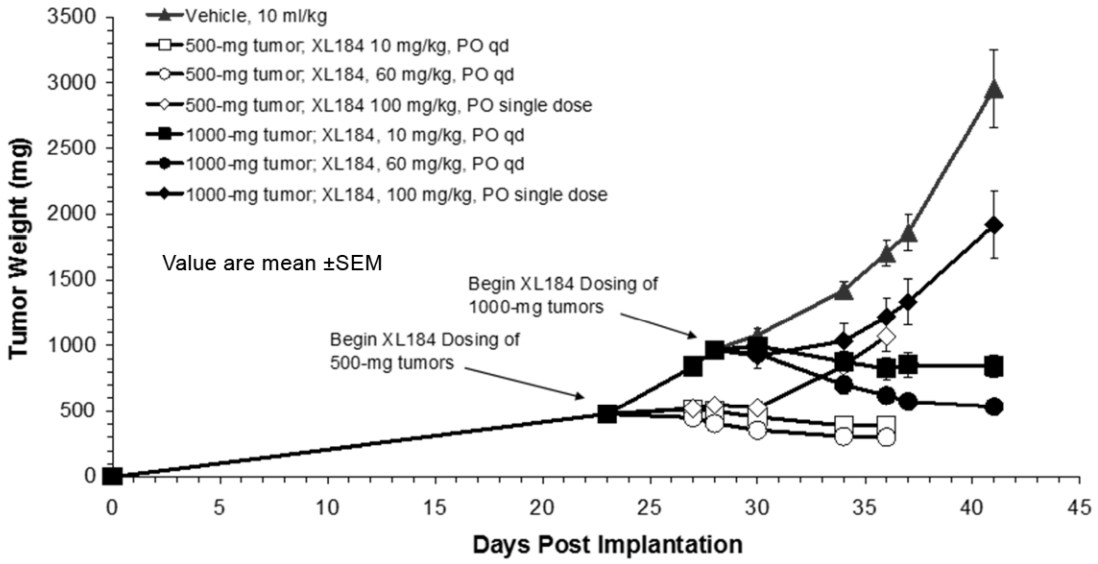


図 2.6.2.2.4.3-2　XL184 による大きな MDA-MB-231 乳癌異種移植腫瘍の腫瘍退縮（投与期間 14 日）

出典：4.2.1.1-30。

表 2.6.2.2.4.3-4　大きな MDA-MB-231 乳癌異種移植腫瘍の免疫組織化学解析の要約（14 日投与）

腫瘍重量 (mg)	XL184 用量 (mg/kg/day)	壊死 % 壊死 [a]	壊死 増加（倍） [b]	CD31 解析 MVD[a]	CD31 解析 % 低下 [b]	Ki67 % 陽性 [a]	Ki67 % 低下 [b]
500	溶媒	7.1±5.8	NA	55.5±15.4	NA	34.2±7.24	NA
	10	74.6±13.6	10	10.0±4.46	82	13.3±2.42	61
	60	83±4.2	12	3.34±2.53	94	7.85±2.26	77
	100[c]	18.1±17.2	2.5 (NS)	41.2±11.6	26	20.4±3.34	40
1000	溶媒	42±7.9	NA	45.6±6.88	NA	26.5±5.97	NA
	10	52.1±14.9	1.2 (NS)	12.1±3.54	73	16.6±4.36	37
	60	72.8±14.6	1.7	2.32±2.01	95	9.44±3.08	64
	100[c]	24.5±12.5	NA	33.9±10.6	26	21.6±3.87	18 (NS)

MVD：平均血管密度、NA：該当せず、NS：有意差なし。[a] 値は平均±標準偏差。[b] 溶媒投与対照との比較による値であり、特記がない限り有意。[c] 単回投与。
出典：4.2.1.1-30。

2.6.2.2.4.4 TT ヒト甲状腺髄様癌マウス異種移植モデル

：添付資料番号 4.2.1.1-26（評価）

ヒト TT（MTC）細胞株は発がん性の MEN-2A-type RET Cys634Trp 突然変異を有し、この突然変異は MTC 発生の原因になりうる。薬力学的標的調節試験では、XL184 の経口投与によって、これらの細胞を移植・増殖させた固形皮下腫瘍において、RET リン酸化が用量依存的に低下した（2.6.2.2.3.4）。そこで、この異種移植モデルにおいて、TT 腫瘍増殖に対する XL184 の抑制能を評価した。XL184 の 10、30 及び 60 mg/kg/day 1 日 1 回経口投与を 14 日間行ったところ、それぞれ 50%、100%及び>100%の腫瘍増殖阻害が得られた（表 2.6.2.2.4.4-1 及び図 2.6.2.2.4.4-1）。XL184 の 1 及び 3 mg/kg/day 投与では、TT 腫瘍に対する増殖阻害は認められなかった。用量反応関係に基づくと、TT 異種移植腫瘍増殖に対する ED_{50} の予測値は 11 mg/kg である。

14 日目の投与 1、4 及び 24 時間後に、XL184 の血漿中濃度を測定した。最大の抗腫瘍効果は 30 及び 60 mg/kg 群において認められたが（腫瘍増殖阻害それぞれ 100%及び>100%）、これらの効果を伴う血漿中曝露量（C_{ave}）計算値は約 2,400～約 7,800 ng/mL（4.8～15.6 µmol/L）である（表 2.6.2.2.4.1-1）。

活性化 RET を発現する甲状腺細胞においては、MET のアップレギュレーションが認められる[7]。そこで、試験終了時点で腫瘍を摘出して処理し、MET 及び RET リン酸化阻害の検討（表 2.6.2.2.4.4-2）、増殖細胞の解析（Ki67）、CD31 免疫染色による平均血管密度測定を行った。XL184 の 1 日 1 回投与により、MET リン酸化が有意に阻害され、60 mg/kg 投与で溶媒投与対照マウスの腫瘍と比較して最大 70%の阻害が認められた。3、10 及び 30 mg/kg/day 投与群において、用量依存性の阻害が認められた。RET リン酸化阻害は MET リン酸化阻害と似ており、60 mg/kg/day 投与で最大 70%の阻害が認められた。RET リン酸化の用量依存性の阻害も、3、10 及び 30 mg/kg/day 投与群で認められた。

CD31 免疫染色解析により、すべての用量群で、溶媒投与対照群の腫瘍と比較して平均血管密度の有意な低下が認められ、10 及び 30 mg/kg/day 投与群におけるその低下は用量比例性であった。XL184 の 10、30 及び 60 mg/kg/day 投与により、溶媒投与対照マウスと比較して、腫瘍増殖が用量依存的に有意に低下した。

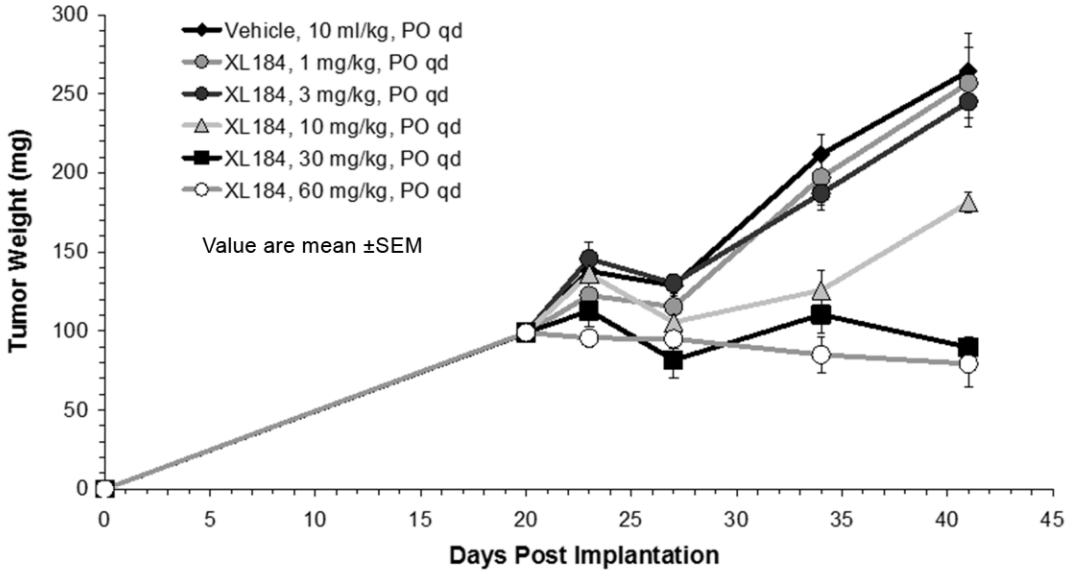


図 2.6.2.2.4.4-1 XL184 投与による TT 異種移植片増殖の抑制（14 日投与）

出典：4.2.1.1-26。

表 2.6.2.2.4.4-1 TT 異種移植腫瘍の XL184 による腫瘍増殖阻害及び退縮

XL184 用量 (mg/kg/day)	TGI (%)	腫瘍退縮 (%)	P 値
1	5	NA	NS [a]
3	12	NA	NS [a]
10	50	NA	<0.05[a]
30	100	NA	<0.0005[a]
60	>100	20	NS[b]

NA：該当せず、NS：有意差なし、TGI：腫瘍増殖阻害。[a] 試験最終日の溶媒投与対照マウスと比較した P 値。[b] 投与前の腫瘍重量と比較した P 値。

出典：4.2.1.1-26。

表 2.6.2.2.4.4-2 TT 腫瘍における MET 及び RET リン酸化阻害の免疫組織化学解析（14 日投与）

XL184 用量 (mg/kg/day)	pMET		pRET	
	% 発現 [a]	% 阻害 [b]	% 発現 [a]	% 阻害 [b]
溶媒対照	27.4±2.6	NA	32.7±2.6	NA
1	23.8±3.1	13 (NS)	28.5±2.5	13 (NS)
3	21.6±2.7	21[c]	25.2±2.9	23[c]
10	17.2±2.3	37[c]	17.4±1.9	47[c]
30	10.7±1.5	61[c]	12.5±2.0	62[c]
60	8.3±2.2	70[c]	9.7±2.1	70[c]

NA：該当せず、NS：有意差なし、pMET：MET リン酸化、pRET：RET リン酸化。[a] 値は平均±標準偏差。[b] 溶媒対照と比較した値。[c] $P<0.05$。

出典：4.2.1.1-26

2.6.2.2.4.5 H441 ヒト肺癌マウス異種移植モデル

：添付資料番号 4.2.1.1-27（評価）

H441 細胞株は、リン酸化 MET を高度に発現するヒト肺腺癌細胞株であり、無胸腺ヌードマウスにおいて腫瘍形成能を示す。薬力学試験では、XL184 投与により、H441 腫瘍における MET リン酸化が阻害された(2.6.2.2.3.2)。そこで本試験では、H441 異種移植腫瘍の増殖に