ツシジノスタット
ハイヤスタ錠 10mg

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.1 緒言

Huya Japan 合同会社

略号一覧表

略語・用語	内容
17-AAG	17-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン
allo-HSCT	同種造血幹細胞移植
Akt	セリンスレオニンキナーゼ
ATL	成人 T 細胞白血病／リンパ腫
Bcl-2	B 細胞リンパ腫たんぱく質 2
Bcl-6	B 細胞リンパ腫たんぱく質 6
BCR-ABL	A fusion gene formed by the combination of the break point cluster region (bcr) and the c-Abelson (Abl) genes
CAS	ケミカル・アブストラクツ・サービス
CCR4	CC ケモカイン受容体 4
CFDA	中国国家食品薬品監督管理総局
CR	完全奏効
c-Raf	c-Jun N 末端キナーゼ
CTCL	皮膚 T 細胞リンパ腫
DLBCL	びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
Flt-3	FMS 様チロシンキナーゼ-3
HBZ	Hemoglobin Subunit Zeta
HDAC	ヒストン脱アセチル化酵素
Her-2	ヒト上皮増殖因子受容体-2
HSP	熱ショックたんぱく質
HTLV-1	ヒト T 細胞白血病ウイルス-1 型
HUYA	HUYA Japan 合同会社
HUYABIO	HUYA Bioscience, LLC
IND	Investigational New Drug
INN	医薬品国際一般名称
JAN	日本医薬品一般的名称
JCOG	日本臨床腫瘍研究グループ
JSH	日本血液学会
MHLW	厚生労働省
MST	平均生存期間
NF-κB	核内因子 κB
NHL	非ホジキンリンパ腫
NMPA	中国国家薬品監督管理局
NSCLC	非小細胞肺がん
OS	全生存率
PMDA	独立行政法人 医薬品医療機器総合機構
PTCL	末梢性 T 細胞リンパ種
SAHA	スベロイルアニリドヒドロキサム酸（ボリノスタット）
Sir2	Silent information regulator 2
US	米国
USAN	米国一般名
VEGF-R	血管内皮増殖因子受容体

目次

頁
略号一覧表 2
2.6.1 緒言 4
2.6.1.1 薬剤情報 5
2.6.1.2 薬理学クラス及び科学的背景 5
2.6.1.2.1 がんにおける治療標的としてのヒストン脱アセチル化酵素 5
2.6.1.2.2 血液悪性腫瘍における HBI-8000 使用の科学的根拠 6
2.6.1.2.2.1 T 細胞又は B 細胞非ホジキンリンパ腫における HBI-8000 使用の科学的根拠 6
2.6.1.2.2.2 成人 T 細胞白血病／リンパ腫における HBI-8000 使用の科学的根拠 7
2.6.1.3 参考文献 8

2.6.1 緒言

HBI-8000（ツシジノスタット、chidamide）は、低ナノモル濃度でクラスIのヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の触媒ポケットを阻害するよう設計された、ベンズアミドクラスのHDAC阻害剤の1つである。HBI-8000は、経口投与可能な、クラスIのHDACに対する選択的阻害剤である。

本申請資料内においては、HBI-8000、ツシジノスタット及びchidamideの用語が同一の意味で使用されている。Chidamideは中国国内での開発及び使用に関連する記載において特別に用いられている用語である。

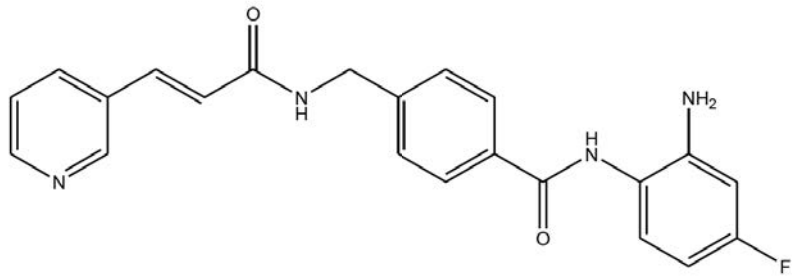
HBI-8000は、中国のShenzhen Chipscreen Biosciences Co, Ltd.（以下、Chipscreen）により最初に発見・開発された。米国サンディエゴ市に本社を置くHUYA Bioscience International, LLC（以下、HUYABIO）は、本化合物について中国以外の国・地域での開発販売権を取得している。2014年にHUYABIOは、日本法人としてHuya Japan合同会社（以下、HUYA）を設立した。

中国においてHBI-8000は、国家薬品監督管理局（NMPA、旧国家食品薬品監督管理総局 [CFDA]）により、再発又は難治性末梢性T細胞リンパ腫（PTCL）の治療剤、及び局所進行性又は転移性乳がんに対するアロマターゼ阻害剤エキセメスタンとの併用治療剤として、Epidaza®（chidamide）のブランド名で製造販売承認を受けている。

米国では、HUYABIOが、Investigational New Drug（IND）番号[redacted]の下で開発を進めている。これまでに固形がん又はリンパ腫の患者を対象とした第I相試験並びに悪性黒色腫患者を対象としたHBI-8000とニボルマブ（OPDIVO®）併用投与時の安全性及び有効性を評価する第Ib/II相試験の第Ib相部分を完了した。悪性黒色腫患者を対象とした第Ib/II相試験の第II相部分は、現在進行中である。

日本国内においてHUYAは、再発又は難治性の成人T細胞白血病/リンパ腫（ATL）の治療を目的としてHBI-8000を開発しており、再発又は難治性のPTCLを対象とした第IIb相試験を日本及び韓国において実施中である。

2.6.1.1 薬剤情報

USAN:	Tucidinostat
INN:	Tucidinostat
JAN:	ツシジノスタット
化合物名 JAN:	*N*-(2-Amino-4-fluorophenyl)-4-[N-[(E)-3-(3-pyridyl) acryloyl)aminomethyl]benzamide *N*-(2-Amino-4-fluorophenyl)-4-{[(2*E*)-3-(pyridin-3-yl)prop-2-enamido]methyl}benzamide
Company codes:	HBI-8000, CS055, chidamide
CAS 登録番号:	1616493-44-7
分子式:	$C_{22}H_{19}FN_4O_2$
分子量:	390.4 g/mol
構造式:	

CAS = ケミカル・アブストラクツ・サービス; INN = 医薬品国際一般名称; JAN = 日本医薬品一般的名称: USAN = 米国一般名

2.6.1.2 薬理学クラス及び科学的背景

2.6.1.2.1 がんにおける治療標的としてのヒストン脱アセチル化酵素

発がんは遺伝子変異のみで説明することは不可能であり、エピジェネティックなプロセスも関与している。アセチル化によるヒストン修飾は、遺伝子発現のエピジェネティックな制御において重要な役割を果たしており、HDAC 及びヒストンアセチルトランスフェラーゼの間のバランスによって制御されている（Roth 1996; Eckschlager 2017）。

HDAC は、酵母類縁体との相同性に基づき、4 つのクラスに分けられる。クラス I は核内に存在し、HDAC 1、2、3 及び 8 により構成される。HDAC 4、5、7 及び 9 はクラス IIa のメンバーであり、クラス IIb（HDAC 6 及び 10）と共に細胞質及び核内の両方に存在する。クラス IV（HDAC 11 のみ）はクラス I 及び II のいくつかの特徴を有している。酵母 silent information regulator 2（Sir2）たんぱく質である NDA-依存性ホモログ 1～7（サーチュイン）は HDAC クラス III として分類されている（Tang 2013）。

HDAC 阻害剤は、細胞増殖抑制剤として作用するエピジェネティック調節剤の 1 つであり、細胞周期の停止、アポトーシス誘導などを引き起こすことによって、*in vitro* や *in vivo* の系で腫瘍細胞増殖を抑制する。ヒストンのアセチル化／脱アセチル化はクロマチントポロジーの変調及び遺伝子転写の調節において重要な役割を果たす。3 つのクラスの HDAC（クラス I、IIa/IIb 及び IV）は、ヒストン及び非ヒストンたんぱく質の脱アセチル化において、亜鉛による触媒メカニズムを利用している（Bolden 2006; Minucci 2006; Glaser 2007; Rasheed 2007; Rasheed 2008; Witt 2009; Haberland 2009）。

急性骨髄性白血病、急性前骨髄球性白血病、非ホジキンリンパ腫（NHL）、前立腺がん、胃がん、

結腸直腸がん、乳がん及び子宮頸がんでは、クラスIのHDAC（HDAC1、HDAC2、HDAC3及びHDAC8）の発現又は活性の上昇がみられる（Bolden 2006; Nakagawa 2007; Fritzsche 2008; Weichert 2008）。

クラスIIbのHDAC（HDAC6及びHDAC10）は、α-チューブリンや熱ショックたんぱく質（HSP）90などの非ヒストンたんぱく質を選択的に標的とすることが知られている。HSP90は、BCR-ABL（a fusion gene formed by the combination of the break point cluster region (bcr) and the c-Abelson (Abl) genes）、突然変異FMS様チロシンキナーゼ-3（Flt-3）、プロテインキナーゼB（セリンスレオニンキナーゼAktしても知られている）、c-Jun N末端キナーゼ（c-Raf）、エストロゲン受容体、ヒト上皮増殖因子受容体-2（Her-2）及び血管内皮増殖因子受容体（VEGF-R）などのがんたんぱく質を安定化することにより、悪性形質転換に関係することが示されている。α-チューブリンは、ミスフォールドたんぱく質のリソソームによるクリアランスを促進することによって腫瘍細胞のアポトーシスを抑制する。HDAC6又はHDAC10によってHSP90とα-チューブリンが脱アセチル化されると、これらのたんぱく質が活性化し、悪性形質の一因となる。逆にHDAC6又はHDAC10の阻害により、腫瘍の増殖が抑制されることが知られている。HSP90阻害剤［17-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン（17-AAG）］と抗腫瘍プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブでみられた相乗作用は、提唱されているこれらのメカニズムをさらに裏付けている（Glaser 2004; Bali 2005; Rodriguez-Gonzalez 2008; Schemies 2009; Park 2008）。

予備的臨床試験の結果では、HDAC阻害剤を他の抗腫瘍剤と併用した場合に、非小細胞肺がん（NSCLC）及び乳がんの治療に有効であることが示されている。しかし、単剤療法では固形がんに対する有効性は示されていない（Blumenschein 2008; Crump 2008; Luu 2008; Modesitt 2008; Vansteenkiste 2008）。こうしたHDAC阻害剤の有効性上の限界を克服するため、現在は薬物動態プロファイル及び安全性プロファイルが改善したHDAC阻害剤の開発に焦点が置かれている。

2.6.1.2.2 血液悪性腫瘍におけるHBI-8000使用の科学的根拠

2.6.1.2.2.1 T細胞又はB細胞非ホジキンリンパ腫におけるHBI-8000使用の科学的根拠

T細胞リンパ腫は、臨床試験でHDAC阻害剤に対して一貫して反応を示す腫瘍型である（Duan 2005）。B細胞リンパ腫たんぱく質6（Bcl-6）は、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫（DLBCL）の約40%で過剰発現する転写因子であり、HDAC2を動員し増殖制御遺伝子を抑制する（Bolden 2006）。さらに、B細胞リンパ腫たんぱく質2（Bcl-2）の転座は濾胞性リンパ腫の85%及びDLBCLの20%で特徴的に生じ、またHDAC阻害剤が腫瘍細胞におけるBcl-2の発現を抑制することが知られている（Duan 2005）。

HDAC阻害剤には、いくつかのタイプのHDACに対してのみ特異的に作用する阻害剤（HDACアイソフォーム選択的阻害剤）と、全てのタイプのHDACに対して作用する阻害剤（汎HDAC阻害剤）がある。HDAC阻害剤の内、ボリノスタット（vorinostat／SAHA）及びbelinostatはヒドロキサム酸クラスの汎阻害剤の代表例である。ロミデプシン（romidepsin）は、環状テトラペプチドであり、同様に汎阻害剤である。Entinostat（MS-275）及びmocetinostatは、ベンズアミド誘導体であり、クラスIのHDACを選択的に阻害する。米国では、ボリノスタット及びロミデプシンが皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）の適応で既に承認されており、belinostatはPTCLで承認されている。Entinostat及びmocetinostatは、ホジキンリンパ腫を対象とした臨床試験中である（Ceccacci 2016）。日本では、ボリノスタット、ロミデプシン及びパノビノスタットが、それぞれCTCL、PTCL

及び多発性骨髄腫の適応で承認されている。

2.6.1.2.2.2 成人 T 細胞白血病／リンパ腫における HBI-8000 使用の科学的根拠

成人 T 細胞白血病／リンパ腫（ATL）は、ヒト T 細胞白血病ウイルス-1 型（HTLV-1）の潜伏感染によって発症する（Oshima 2017）。感染から ATL 発症までに最大 40 年の長い潜伏期間があり、HTLV-1 に感染した人の 5%が ATL を発症する。日本には推定で 108 万人の HTLV-1 キャリアが存在した（Yamaguchi 2011）。厚生労働省（MHLW）が 2019 年に報告した 2017 年の患者調査によると、日本には約 2000 人の ATL 患者が存在する（厚生労働省 2019）。ATL に起因する死亡者数は、過去 20 年に渡り年間約 1000 人で推移しており、ATL の年間死亡率は ATL の年間発症率にほぼ近似している（Iwanaga 2012）。一般的に ATL 患者の予後は悪く、3 年全生存率（OS）は従来の化学療法で約 24%である（Tsukasaki 2007; 日本血液学会（JSH）ガイドライン 2018）。

JSH ガイドラインでは、急速に進行するアグレッシブ ATL（急性型、リンパ腫型及び予後不良因子を有する慢性型）に対して多剤併用化学療法が推奨されており、VCAP-AMP-VECP 療法（mLSG15）が第一選択療法として推奨されている（JSH ガイドライン 2018）。しかしながら、mLSG15 による化学療法後のアグレッシブ ATL の予後は不良である。1 年無憎悪生存率は 28%であり、大多数の患者が治療開始後 12 ヵ月以内に再発又は進行している。同様に、3 年 OS は 24%であり、平均生存期間（MST）は 13 ヵ月であった（Tsukasaki 2007）。

化学療法感受性のアグレッシブ ATL 患者に対しては、患者が比較的若年で、身体的適合性があり、適切なドナーがいる場合には、同種造血幹細胞移植（allo-HSCT）が推奨される。

抗 CC ケモカイン受容体 4（CCR4）モノクローナル抗体であるモガムリズマブは、未治療のアグレッシブ ATL に対する化学療法との併用療法で、第一選択療法として 2014 年 12 月に国内承認を得ている。しかしながら、モガムリズマブの追加によって完全奏効（CR）率は高くなったものの、生存ベネフィットは向上しなかった（医薬品医療機器総合機構 2014）。またモガムリズマブは、再発又は難治性 ATL 患者に対する治療剤としても、2012 年 3 月に国内承認を得ている。

サリドマイド誘導体であるレナリドミド水和物（以下、レナリドミド）は、再発又は難治性 ATL の治療剤として、2017 年 3 月に国内承認を得ている。

モガムリズマブ及びレナリドミドによる治療は初期には反応が認められるものの、いずれの治療も最終的には再発又は難治性 ATL 患者の病勢をコントロールすることはできず、ほとんどの患者では短期間のうちに ATL が進行する。

再発又は難治性 ATL 患者の予後は依然として不良であり、進行したアグレッシブ ATL に対する有効で忍容性の高い新規治療剤、特に国内で現在承認されている薬剤と重複しない新たな作用機序の治療剤に対する強いアンメットメディカルニーズが存在する。

難治性の ATL 患者に対する治療剤が欠如していることより、HDAC 阻害剤の必要性がより高まっている。

現在の研究データに基づいて、HDAC 阻害剤には、ATL に対する効果が期待されている。HDAC 阻害剤は、*in vitro* 及び *ex vivo* において、感染ウイルス量を増加させることなく、ATL 細胞、HTLV-1 に感染した前がん性リンパ球又は HTLV-1 形質転換細胞株のアポトーシスを引き起こす（Hasegawa 2011）。さらに、HDAC 阻害剤は、ウイルス性がん遺伝子である Hemoglobin Subunit Zeta （HBZ）の発現を抑制し（Belrose 2011）、及び ATL で継続的に活性化されている核内因子-カッパ－B （NF-κB）の阻害を示す（Nishioka 2008）ことから、ATL に対して有用と考えられている。また、HDAC 阻害剤は、他の T 細胞及び B 細胞リンパ腫細胞及び細胞株においても同様に有

効な遺伝学的機序を介して HTLV-1 感染細胞のアポトーシスを引き起こすことができる（Murata 2000）。HDAC 阻害剤は、HTLV-1 感染細胞及び形質転換細胞のアポトーシスを引き起こすことに加え、これらの細胞に潜伏ウイルス抗原を再発現させ免疫機構の攻撃に感受性にすることによって、これらの細胞を死滅させることができる。さらに、HDAC 阻害剤は、2 つの異なる ATL マウスモデルで生存期間を延長した（Nishioka 2008; Chen 2009）。したがって、HDAC 阻害剤には *in vitro* 及び *in vivo* で ATL に対する治療効果があることを裏付ける多くのエビデンスが存在する。これらのデータは、難治性 ATL 患者に対する HBI-8000 による治療のさらなる裏付けとなっている。

HBI-8000 の再発又は難治性の ATL 患者に対する治療剤としての有用性は、薬理、薬物動態及び非臨床安全性試験を含む包括的な非臨床プログラムによって評価されている。薬理、薬物動態及び安全性プロファイルは *in vivo* 及び *in vitro* 試験によって適切に検討されている。また、非臨床安全性プログラムの結果は、臨床プログラム及び製造販売承認申請を支持するものである。HBI-8000 の非臨床試験の結果は、非臨床試験概要文及び概要表（2.6.2～2.6.7）に記載されている。

2.6.1.3 参考文献

Bali P, Pranpat M, Bradner J, et al. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90. J Biol Chem. 2005; 280(29): 26729-26734.

Belrose G, Gross A, Olindo S, et al. Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-1 and HAM/TSP T lymphocytes. Blood. 2011; 118(9); 2483-2491.

Blumenschein Jr GR, Kies MS, Papadimitrakopoulou VA, et al. Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (Zolinza™, suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with recurrent and/or metastatic head and neck cancer. Invest New Drugs. 2008;26(1):81-87.

Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. Nat Rev Drug Discov. 2006;5(9):769-784.

Ceccacci E, Minucci S. Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: Lessons from leukaemia. Br J Cancer. 2016; 114: 605-611.

Chen J, Zhang M, Ju W, Waldmann TA. Effective treatment of a murine model of adult T-cell leukemia using depsipeptide and tis combination with unmodified daclizumab directed toward CD25. Blood. 2009; 113(6): 1287-1293.

Crump M, Coiffier B, Jacobsen ED, et al. Phase II trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in relapsed diffuse large-B-cell lymphoma. Ann Oncol. 2008;19(5):964-969.

Duan H, Heckman CA, Boxer LM. Histone deacetylase inhibitors down-regulate bcl-2 expression and induce apoptosis in t(14;18) lymphomas. Mol Cell Biol. 2005; 25(5): 1608-1619.

Eckschlager T, Plch J, Stilborova M, Hrabeta J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. Int J. Mol Sci. 2017; 18: 1414

Fritzsche FR, Weichert W, Röske A, et al. Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in renal cell cancer. BMC Cancer. 2008; 8: 381.

Glaser KB. HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. Biochem Pharmacol. 2007;74(5):659-671.

Glaser KB, Li J, Pease LJ, et al. Differential protein acetylation induced by novel histone deacetylase inhibitors. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 325(3): 683-690.

Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. Nat Rev Genet. 2009;10(1):32-42.

Hasegawa H. Yamada Y. Tsukasaki K., et al. LBH589, a deacetylase inhibitor, induces apoptosis in adult T-cell leukemia/lymphoma cells via activation of a novel RAIDD-caspase-2 pathway. Leukemia. 2011; 25(4): 575-587.

Iwanaga M, Watanabe T, Yamaguchi K. Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. Front Microbiol 2012; 3: 322.

Luu TH, Morgan RJ, Leong L, et al. A phase II trial of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in metastatic breast cancer: a California Cancer Consortium study. Clin Cancer Res. 2008;14(21):7138-7142.

Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. Nat Rev Cancer. 2006;6(1):38-51.

Modesitt SC, Sill M, Hoffman JS, Bender DP. A phase II study of vorinostat in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. Gynecol Oncol. 2008;109(2):182-186.

Murata M, Towatari M, Kosugi H, et al. Apoptotic cytotoxic effects of a histone deacetylase inhibitor, FK228, on malignant lymphoid cells. Jpn J Cancer Res. 2000; 91(11): 1154-1160.

Nakagawa M, Oda Y, Eguchi T, et al. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. Oncol Rep. 2007;18(4):769-774.

Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, et al. Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest and apoptosis of HTLV-1 infected T-cells via blockage of signaling by nuclear factor κB. Leuk Res. 2008; 32(2): 287-296.

Oshima K, et al. Adult T-cell leukaemia/lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. WHO Classification of Tumours, revised 4th edition, Volume 2. Lyon, IARC; 2017, p363-7.

Park J-H, Kim S-H, Choi M-C, et al. Class II histone deacetylase play pivotal roles in heat shock protein 90-mediated proteasome degradation of vascular endothelial growth factor receptors. Biochem Biophys Res Commun. 2008; 368(2): 318-322.

Rasheed WK, Johnstone RW, Prince HM. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. Expert Opin Investig Drugs. 2007; 16(5): 659-678.

Rasheed W, Bishton M, Johnstone RW, Prince HM. Histone deacetylase inhibitors in lymphoma and solid malignancies. Expert Rev Anticancer Ther. 2008; 8(3): 413-432.

Rodriguez-Gonzalez A, Lin T, Ikeda AK, et al. Role of the aggresome pathway in cancer: targeting histone deacetylase 6-dependent protein degradation. Cancer Res. 2008; 68(8): 2557-2560.

Roth SY, Allis CD. Histone acetylation and chromatin assembly: A single escort, multiple dances? Cell. 1996; 87: 5-8.

Schemies J, Sippl W, Jung M. Histone deacetylase inhibitors that target tubulin. Cancer Lett. 2009; 280(2): 222-232.

Tang J, Yan H, Zhang S. Histone deacetylase as targets for treatment of multiple diseases. Clin. Sci. 2013; 124: 65-662.

Tsukasaki K, Utsunomiya A, Fukuda H, et al. VCAP-AMP-VECP compared with biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801. J. Clin Oncol. 2007; 25(34): 5458-64.

Vansteenkiste J, Van Cutsem E, Dumez H, et al. Early phase II trial of oral vorinostat in relapsed or refractory breast, colorectal, or non-small cell lung cancer. Invest New Drugs. 2008;26(5):483-488.

Weichert W, Röske A, Gekeler V, et al. Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. Br J Cancer. 2008;98(3):604-610.

Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? Cancer Lett. 2009;277(1):8-21.

Yamaguchi K (Principal researcher). Survey and comprehensive measures of HTLV-1 infection and related diseases in Japan [cited on 25 March 2020]. Summary research report 2011. Available from: https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/alphabet/htlv-1.html

医薬品医療機器総合機構 2014: ポテリジオ点滴静注 20 mg 申請資料 Available from https://www.pmda.go.jp/drugs/2014/P201400027/index.html

厚生労働省 2019: 厚生労働省平成 29 年（2017）患者調査の概要（2019 年公開）[2019 年 9 月 20 日引用]. Available from https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/17/index.html

JSH ガイドライン 2018: 日本血液学会. 造血器腫瘍診療ガイドライン 2018 年版 [cited on 20 September 2019]. Available from http://www.jshem.or.jp/gui-hemali/table.html

ツシジノスタット
ハイヤスタ錠 10mg

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.2 薬理試験の概要文

Huya Japan 合同会社

略号一覧表

略語・用語	内容
ADCC	抗体依存性細胞障害
ADP	アデノシン二リン酸
ATL	成人 T 細胞白血病／リンパ腫
Bax	Bcl-2 結合 X たんぱく質
Bcl-2	B 細胞リンパ腫たんぱく質 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
Bim	Bcl-2 様たんぱく質 11
BIW	週 2 回
CCC-HEK	ヒト胎児腎臓由来細胞
CCC-HEL	ヒト胎児肝臓由来細胞
C_{max}	最高血漿中濃度
CTL	細胞傷害性 T 細胞
DMSO	ジメチルスルホキシド
DNA	デオキシリボ核酸
ECG	心電図
FAS	TNF receptor superfamily, member 6
FOB	機能観察総合評価
GI_{50}	50%増殖阻害濃度
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験実施の基準
GZMA	グランザイム A
HDAC	ヒストン脱アセチル化酵素
hERG	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
HTLV-1	ヒト T 細胞白血病ウイルス-1 型
IC_{50}	50%阻害濃度
IKr	急速活性化遅延整流性カリウムチャネル
IkBα	Inhibitory kappa B alpha
IKKs	Inhibitory kappa B kinases
IL	インターロイキン
JAK	ヤヌスキナーゼ
LC_{50}	50%致死濃度
Lys	リジン
M	モル濃度
MMP	ミトコンドリア膜電位
mRNA	メッセンジャーリボ核酸
MTS assay	5-(3-カルボメトキシフェニル)-2-(4,5-ジメチル-チアゾイル)-3-(4-スルフォフェニル)テトラゾリウムアッセイ
NCI-60	米国立がん研究所による培養ヒト腫瘍細胞株 60 種
NF-κB	核内因子-カッパーB
NK-cell	ナチュラルキラー細胞
NKG2D	ナチュラルキラーグループ 2D
NHL	非ホジキンリンパ腫
NLRP3	ヌクレオチド結合オリゴマー化領域様受容体ピリンドメイン含有たんぱく質 3
NSCLC	非小細胞肺がん
p21	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21
p53	がん抑制たんぱく質 p53
PBMC	末梢血単核細胞
PCC	ピアソンの相関係数
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応

PD	薬力学
PK	薬物動態
QTc	補正 QT
RT-PCR	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
SAHA	スベロイルアニリドヒドロキサム酸（ボリノスタット）
SD	標準偏差
SE	標準誤差
siRNA	低分子干渉 RNA
TGI	完全増殖抑制

目次

頁
略号一覧表 2
2.6.2 薬理試験概要文 7
2.6.2.1 まとめ 7
2.6.2.1.1 *In Vitro* での HBI-8000 の阻害活性 7
2.6.2.1.2 HBI-8000 のナチュラルキラー細胞を介した細胞障害性 8
2.6.2.1.3 成人 T 細胞白血病／リンパ腫における *in vitro* 及び *ex-vivo* での HBI-8000 の抗腫瘍活性 8
2.6.2.1.4 *In Vivo* での HBI-8000 の抗腫瘍活性 8
2.6.2.1.5 HBI-8000 の安全性薬理試験 9
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 9
2.6.2.2.1 *In Vitro* での HBI-8000 の阻害活性 9
2.6.2.2.1.1 HBI-8000 による HDAC 酵素阻害 9
2.6.2.2.1.2 ヒストン H3 アセチル化に対する HBI-8000 の効力 10
2.6.2.2.1.3 HBI-8000 の NCI-60 スクリーニング及び HDAC 阻害剤の COMPARE 解析（試験番号 1008NS06） 11
2.6.2.2.1.4 HBI-8000 による細胞増殖抑制 12
2.6.2.2.2 NK 細胞を介した HBI-8000 の細胞毒性 13
2.6.2.2.3 *In Vitro* 及び *Ex Vivo* モデルにおける成人 T 細胞白血病／リンパ腫に対する HBI-8000 の抗腫瘍活性 15
2.6.2.2.3.1 HBI-8000 による成人 T 細胞白血病／リンパ腫由来細胞株における細胞生存能力の抑制 15
2.6.2.2.3.2 HBI-8000 による成人 T 細胞白血病／リンパ腫由来細胞株でのアポトーシス誘導 16
2.6.2.2.3.3 成人 T 細胞白血病／リンパ腫初代培養細胞における細胞生存能力の抑制 18
2.6.2.2.3.4 初代成人 T 細胞白血病／リンパ腫細胞における HBI-8000 によるアポトーシスの誘導 20
2.6.2.2.3.5 成人 T 細胞白血病／リンパ腫細胞におけるヒストンアセチル化の誘導及びがん抑制遺伝子の活性化 21
2.6.2.2.3.6 DNA マイクロアレイ解析及び抗体アレイ解析 22
2.6.2.2.3.7 Bim 活性化に焦点を当てた内因性アポトーシス経路の解析 25
2.6.2.2.3.8 NLRP3 インフラマソームシグナル活性化の解析 27
2.6.2.2.3.9 HBI-8000 により誘導される細胞死における Bim 及び NLRP3 インフラマソームの寄与 28
2.6.2.2.3.9.1 HBI-8000 誘導性アポトーシスの開始に Bim が果たす重要な役割 28
2.6.2.2.3.9.2 HBI-8000 により誘導される細胞死における NLRP3 インフラマソームの寄与の可能性 31
2.6.2.2.4 *In Vivo* での抗腫瘍活性 31
2.6.2.2.4.1 複数の *In Vivo* 腫瘍モデルでの HBI-8000 の有効性（試験番号 CXHL0502435） 31

2.6.2.2.4.2 ヒト結腸がん HCT-8 細胞ゼノグラフトモデルに HBI-8000 を異なる投与間隔で投与したときの有効性（試験番号 CXHB0801220） 33
2.6.2.3 副次的薬理試験 34
2.6.2.4 安全性薬理試験 34
2.6.2.4.1 *In Vitro* での安全性薬理試験 34
2.6.2.4.1.1 ヒト胎児腎細胞で発現したクローン化 hERG カリウムチャネルに対する HBI-8000 の影響（試験番号 080415.IVZ） 34
2.6.2.4.2 一般毒性試験における *In Vivo* 安全性薬理評価 35
2.6.2.4.2.1 ラットにおける HBI-8000 の 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 1515-002） 35
2.6.2.4.2.2 ラットにおける HBI-8000 の 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 20092736） 36
2.6.2.4.2.3 イヌにおける HBI-8000 の 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 1515-001） 37
2.6.2.4.2.4 イヌにおける HBI-8000 の 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 20092737） 38
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 39
2.6.2.6 考察及び結論 39
2.6.2.7 参考文献 43

表

頁

表 2.6.2-1 HBI-8000、entinostat 及びボリノスタットの構造とヒト組替え HDAC に対する IC_{50} 値 9
表 2.6.2-2 HDAC 阻害剤に対する HBI-8000 の GI_{50} 値の COMPARE 解析 12
表 2.6.2-3 形質転換細胞株及び正常細胞に対する HBI-8000（chidamide）及び entinostat（MS-275）の 50%細胞増殖阻害濃度（GI_{50}） 13
表 2.6.2-4 10 例の患者から得た 11 種の成人 T 細胞白血病／リンパ腫試料の特性 19
表 2.6.2-5 成人 T 細胞白血病／リンパ腫由来 KOB 及び LMY1 細胞株の DNA マイクロアレイ解析 23
表 2.6.2-6 HBI-8000 をラットに反復投与したときの初回投与（Day-1）又は反復投与（Day-27）における血漿中濃度の概要（試験番号 1515-002） 41

図

頁

図 2.6.2-1 HBI-8000 の作用機序 7
図 2.6.2-2 がん細胞及びヒト PBMC 中での HBI-8000 によるヒストンアセチル化の誘導 10
図 2.6.2-3 ヒト骨髄性白血病由来K562細胞の免疫細胞を介した細胞溶解作用に対する HBI-8000 による促進 14
図 2.6.2-4 HBI-8000 による NK 機能に関与するたんぱく質発現の促進 15
図 2.6.2-5 成人 T 細胞白血病／リンパ腫由来細胞株における HBI-8000 による細胞生存能力

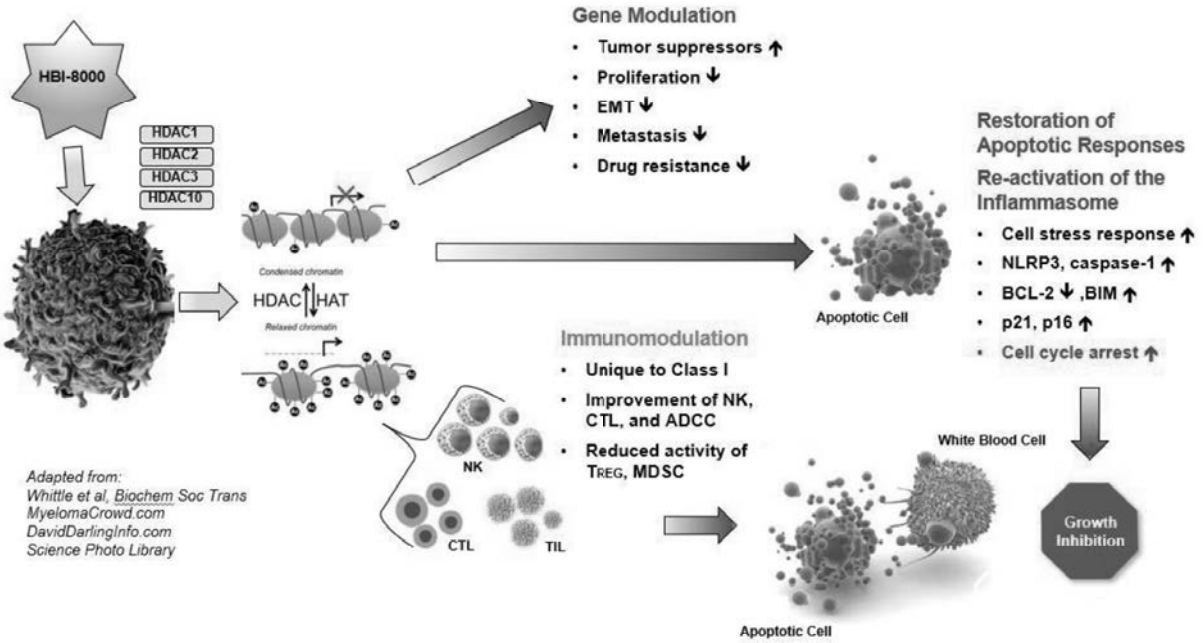
の抑制 16
図 2.6.2-6 アネキシン V との結合、ミトコンドリア膜電位低下及びカスパーゼ-3 活性化を伴う成人 T 細胞白血病／リンパ腫由来細胞株における HBI-8000 によるアポトーシス誘導 17
図 2.6.2-7 細胞周期対する HBI-8000 の影響 18
図 2.6.2-8 初代成人 T 細胞白血病／リンパ腫細胞における HBI-8000 による細胞生存率の抑制 19
図 2.6.2-9 初代成人 T 細胞白血病／リンパ腫細胞及び正常な CD4 陽性リンパ球の増殖に対する HBI-8000 の影響比較 20
図 2.6.2-10 初代成人 T 細胞白血病／リンパ腫細胞における HBI-8000 によるアポトーシス誘導 21
図 2.6.2-11 成人 T 細胞白血病／リンパ腫（ATL）由来細胞株及び初代 ATL 細胞におけるアセチル化ヒストン、がん抑制遺伝子及び抗体アレイの解析 22
図 2.6.2-12 成人 T 細胞白血病／リンパ腫（ATL）由来細胞株及び初代 ATL 細胞における HBI-8000 による IκBα 及び IKKs の発現 25
図 2.6.2-13 HBI-8000 誘導細胞死における内因性アポトーシスの解析（ポリメラーゼ連鎖反応アッセイ） 26
図 2.6.2-14 成人 T 細胞白血病／リンパ腫（ATL）由来細胞株及び初代 ATL 細胞における Bim のたんぱく質発現（ウェスタンブロット解析） 26
図 2.6.2-15 HBI-8000 誘導細胞死における NLRP3 経路の解析（PCR 解析） 27
図 2.6.2-16 成人 T 細胞白血病／リンパ腫（ATL）由来細胞株及び初代 ATL における NLRP3 経路のたんぱく質発現（ウェスタンブロット解析） 28
図 2.6.2-17 HBI-8000 誘導細胞死における siRNA（Bim 及び NLRP3）を用いたノックダウン実験（細胞生存率アッセイ） 29
図 2.6.2-18 アネキシン V／ヨウ化プロピジウムアッセイにおける si-Bim による阻害作用 30
図 2.6.2-19 ウエスタン・ブロット解析における si-Bim による抑制 30
図 2.6.2-20 ヒト結腸がん HCT-8 細胞ゼノグラフトモデルにおける HBI-8000 (CHI)の *In Vivo* での抗腫瘍効果 32
図 2.6.2-21 ヒト腫瘍細胞ゼノグラフトモデルにおける HBI-8000 の *In Vivo* での抗腫瘍効果 33
図 2.6.2-22 ヌードマウスに移植した HCT-8 の腫瘍体積に及ぼす HBI-8000 の投与間隔の影響の経時的曲線 34

2.6.2 薬理試験概要文

2.6.2.1 まとめ

HBI-8000 は、低ナノモル濃度でクラス I のヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の触媒ポケットを阻害するよう設計された、ベンズアミドクラスの HDAC 阻害剤の 1 つである。HBI-8000 の作用機序を図 2.6.2-1 に示す。

図 2.6.2-1 HBI-8000 の作用機序



ADCC = 抗体依存性細胞障害; BCL 2 = B 細胞リンパ腫たんぱく質 2; BIM = Bcl-2-様たんぱく質 11; CTL = 細胞傷害性 T 細胞; EMT = 上皮間葉転換; HDAC = ヒストン脱アセチル化酵素; MDSC = 骨髄由来免疫抑制細胞; NK = ナチュラルキラー; NLRP3 = ヌクレオチド結合オリゴマー化領域様受容体－ピリンドメイン含有たんぱく質 3; p16 = サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p16; p21 = サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21; T_{REG} = 制御性 T 細胞

2.6.2.1.1 *In Vitro* での HBI-8000 の阻害活性

HBI-8000 の HDAC アイソタイプの阻害における選択性と効力を一連のヒト組替え HDAC たんぱく質を用いて解析した。HBI-8000 は、HDAC のクラス I に属する HDAC1、HDAC2 及び HDAC3、並びにクラス IIb の HDAC10 をナノモルレベルで阻害することが認められた。これらの酵素の 50%阻害濃度（IC_{50}）は 67～160 nM の範囲であった（Ning 2012）。

HBI-8000 は、ヒト子宮頸部腺がん HeLa 細胞及び末梢血単核細胞（PBMC）中のヒストン H3 のアセチル化を顕著に誘導し、薬剤濃度 0.1～10 μM の範囲で、HBI-8000 によるアセチル化誘導のレベルは、entinostat（MS-275）及びボリノスタット（SAHA）に認められたレベルと同様であった（Ning 2012）。

ヒト腫瘍由来細胞株パネル NCI-60 を用いて、HBI-8000 の細胞増殖抑制効果を 5 用量（10^{-4} M～10^{-8} M）で検討した（試験番号 1008NS06）結果、HBI-8000 は、6 種の白血病由来細胞株を含む広範囲のヒト腫瘍由来細胞株の増殖を抑制し、IC_{50} は 1～10 μM 未満の範囲であった。HBI-8000 は非形質転換細胞に対し毒性を示さなかった（IC_{50} は 100 μM 以上）。

ヒト腫瘍由来細胞 18 株で細胞増殖抑制を検討した試験において、HBI-8000 は entinostat（MS-275）と同様に、低 μM 濃度範囲で大多数の腫瘍細胞株の増殖を抑制した。一方、HBI-8000、及び

HBI-8000 に比して程度は低いものの MS-275 も同様に、正常なヒト胎児腎臓由来細胞（CCC-HEK）株及びヒト胎児肝臓由来細胞（CCC-HEL）株に対する毒性が顕著に低く、HBI-8000 の細胞傷害反応が正常細胞とがん細胞とで異なっていることが示された（Ning 2012）。

2.6.2.1.2 HBI-8000 のナチュラルキラー細胞を介した細胞障害性

健常ドナー由来の PBMC に HBI-8000 を添加することにより、ナチュラルキラー（NK）細胞を介した細胞傷害性を評価する標的細胞として用いられている K562 細胞に対する溶解性が著しく高まった。標的細胞溶解活性は HBI-8000 を 100 nM で添加した際に最大となり、この濃度では 48 時間が最適なインキュベーション時間であった。健常ドナー2 例からの PBMC に 100 nM の HBI-8000 を添加して 48 時間後に、NK 細胞の活性化に関与する受容体たんぱく質である CD16（低親和性免疫グロブリン G 受容体）及びナチュラルキラーグループ 2D（NKG2D）、並びに細胞傷害性酵素であるグランザイム A（GZMA）の大幅な発現増加が認められた（Ning 2012）。

2.6.2.1.3 成人 T 細胞白血病／リンパ腫における *in vitro* 及び *ex-vivo* での HBI-8000 の抗腫瘍活性

ヒト T 細胞白血病ウイルス-1 型（HTLV-1）により発症した成人 T 細胞白血病／リンパ腫（ATL）の *in vitro* 及び *ex vivo* モデルを用いて、HBI-8000 の抗腫瘍活性を評価した（Hasegawa 2016）。ヒト ATL の *in vitro* 及び *ex vivo* モデルの双方に対し、HBI-8000 は活性を示した。HBI-8000 は、ATL 由来細胞株（平均 IC_{50} = 1.16 μM）及び ATL 患者より採取した新鮮初代培養細胞（平均 IC_{50} = 4.35 μM）で細胞の増殖及び生存を抑制した。HBI-8000 はカスパーゼ 3 活性化及びアネキシン V 結合性を増大させ、ミトコンドリア膜電位を低下させ、細胞周期を停止させアポトーシスを誘導した。細胞増殖抑制活性は曝露時間に依存して上昇し、細胞のインターロイキン 2（IL2）依存性には影響されなかった。DNA マイクロアレイ及びアポトーシス関連抗体アレイの結果から、HBI-8000 は核内因子-カッパーB（NF-κB）を抑制し、Bcl-2 様たんぱく質 11（Bim）及びヌクレオチド結合オリゴマー化領域（NOD）様受容体ピリンドメイン含有たんぱく質 3（NLRP3）インフラマソーム経路を活性化させて、ATL 細胞死を誘導することが示された。低分子干渉 RNA（siRNA）を用いた試験で、Bim 発現誘導が、HBI-8000 により誘導される ATL 細胞死に寄与していることが確認された。

2.6.2.1.4 *In Vivo* での HBI-8000 の抗腫瘍活性

HBI-8000 は、ヒト結腸がん HCT-8 細胞、ヒト肺がん A549 細胞、ヒト肝がん BEL-7402 細胞及びヒト乳がん MCF-7 細胞のマウスゼノグラフトなどのいくつかの *in vivo* 腫瘍モデルにおいて、単剤で活性を示した（試験番号 CXHL0502435）。本試験において、HBI-8000 は 12.5～50 mg/kg の用量範囲で、20～28 日間、各腫瘍モデルに経口投与された。検討した全腫瘍モデルで、25%～84%の腫瘍増殖抑制効果が認められ、体重減少は認められなかった（試験番号 CXHL0502435）。HBI-8000 は上記用量範囲で、HCT-8、A549、BEL-7402 及び MCF-7 を用いたヒトがんゼノグラフトモデルにおいて用量依存的に腫瘍サイズと腫瘍重量を抑制した（Ning 2012）。ヒト結腸がん HCT-8 細胞ゼノグラフトマウスモデルを用いて、HBI-8000 の異なる投与間隔の影響を評価した（試験番号 CXHB0801220）。HBI-8000 は、1 日 1 回、2 日に 1 回及び 3 日に 1 回の投与頻度で腫瘍細胞増殖を抑制した。

2.6.2.1.5 HBI-8000 の安全性薬理試験

中枢神経系及び呼吸器系に対する影響を、ラットにおける反復投与毒性試験（4 週間及び 13 週間）で実施した詳細な一般状態観察及び機能観察総合評価法（FOB）により、並びにイヌにおける反復投与毒性試験（4 週間及び 13 週間）で実施したケージ外からの観察及び詳細な一般状態観察により評価した。心血管系に対する *in vitro* の影響は hEGR（ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子）チャネル電流に対する影響に基づき評価した。心血管系に対する *in vivo* の影響は、イヌにおける反復投与毒性試験（4 週間及び 13 週間）でのケージ外からの観察、詳細な一般状態観察及び心電図検査（ECG）に基づき評価した。安全性薬理評価は ICH S7A ガイダンスに準じて実施し、試験は全て GLP 適合下で実施された。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In Vitro* での HBI-8000 の阻害活性

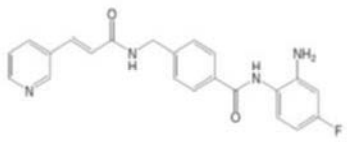
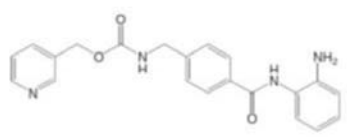
2.6.2.2.1.1 HBI-8000 による HDAC 酵素阻害

参考資料[4.3-46] Ning 2012

HDAC アイソタイプ酵素の阻害に対する HBI-8000 の選択性及び効力を一連のヒト組替え HDAC たんぱく質を用いて *in vitro* で評価し、entinostat（MS-275）及びボリノスタット（SAHA）と比較した。Entinostat 及びボリノスタットは、それぞれベンスアミド及びヒドロキサム酸クラスの HDAC 阻害剤を代表している（Eckschlager 2017）。

表 2.6.2-1 に示すように、HBI-8000 は、クラス I に属する HDAC1、HDAC2 及び HDAC3、並びに、クラス IIb に属する HDAC10 をナノモル濃度で阻害することが認められた。HBI-8000 のこれらの酵素に対する IC_{50} は 67～160 nM の範囲にあった。HBI-8000 の酵素阻害プロファイルは、MS-275 と同様であったが、その阻害活性は MS-275 より高かった。SAHA と異なり、HBI-8000 及び MS-275 はいずれも HDAC6 を阻害せず、また両者はいずれも HDAC8 及び HDAC11 に対して SAHA と比較して低い阻害活性を示した（表 2.6.2-1）。IC_{50} 値より、HBI-8000 は、もう一つのベンズアミドクラスの HDAC 阻害剤である mocetinostat（MGCD0103）（Fournel 2008）の文献値と比してより高い阻害効果を示した。

表 2.6.2-1 HBI-8000、entinostat 及びボリノスタットの構造とヒト組替え HDAC に対する IC_{50} 値

Compound	Structure	IC_{50} (μM)[a]										
		Class I				Class IIa				Class IIb		Class IV
		1	2	3	8	4	5	7	9	6	10	11
Chidamide[b] (HBI-8000)		0.095	0.160	0.067	0.733	>30	>30	>30	>30	>30	0.078	0.432
Entinostat (MS-275)		0.262	0.306	0.499	2.700	>30	>30	>30	>30	>30	0.254	0.649
Vorinostat (SAHA)		0.038	0.144	0.006	0.038	>30	>30	>30	>30	0.010	0.021	0.028

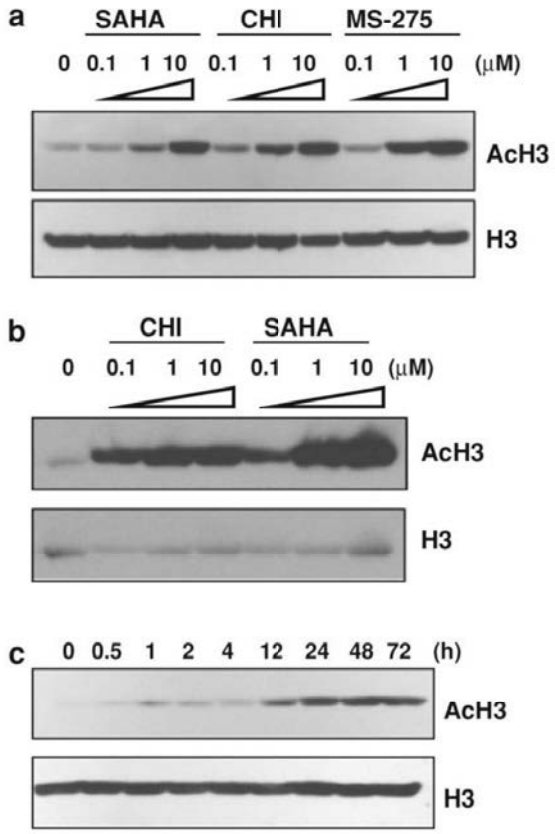
HDAC = ヒストン脱アセチル化酵素; IC_{50} = 50%阻害濃度
[a] Chidamide（HBI-8000）又は entinostat（MS-275）の HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC6、HDAC8、HDAC10 及び HDAC11 に対する IC_{50} 値は、9 種の濃度（0.001～30 μM の範囲）で 2 回実施した実験結果に基づく。HDAC4、HDAC5、HDAC7 及び HDAC9 に対する IC_{50} 値は、3、10 及び 30 μM の化合物濃度での 2 回の実験結果に基づく。30 μM 超の IC_{50} 値は、検討した最高濃度まで顕著な阻害が認められなかったことを意味する。
[b] 結果は、3 回の独立した実験結果からの平均値として示した。
原典: Ning 2012 – Table 1

2.6.2.2.1.2 ヒストン H3 アセチル化に対する HBI-8000 の効力

参考資料[4.3-46] Ning 2012

HeLa 細胞及び PBMC から単離した核抽出物中のヒストン H3 のアセチル化を測定することにより、ヒトがん細胞及び PBMC 中の HDAC 活性に対する HBI-8000 の作用を評価した。図 2.6.2-2a,b に示すように、HBI-8000 は、ヒト子宮頸部腺がん HeLa 細胞及び PBMC 中のヒストン H3 のアセチル化を顕著に誘導し、薬剤濃度 0.1～10 μM の範囲で、HBI-8000 によるアセチル化誘導のレベルは、entinostat（MS-275）及びボリノスタット（SAHA）に認められたレベルと同様であった。HeLa 細胞を 1 μM 濃度の HBI-8000 と共にインキュベートしたとき、ヒストン H3 のアセチル化の増加は処理後 30 分～60 分の時点で認められ、24 時間～72 時間の時点で最大に達した（図 2.6.2-2c）。

図 2.6.2-2 がん細胞及びヒト PBMC 中での HBI-8000 によるヒストンアセチル化の誘導



AcH3 = アセチル化ヒストン H3；CHI = chidamide = HBI-8000；H3 = ヒストン H3；MS-275 = entinostat；SAHA = ボリノスタット
[a] HeLa 細胞を、図示した濃度の HBI-8000（CHI）、SAHA、又は MS-275 と共に 24 時間インキュベートした。
[b] 健常人からのヒト PBMC を図示した濃度の HBI-8000 又は SAHA と供に ex-vivo で 24 時間インキュベートした。
[c] HeLa 細胞を、1 μM 濃度の HBI-8000 と共に図示した時間インキュベートした。
ヒストンを全細胞溶解物より単離し、ヒストン H3 アセチル化の状態を抗アセチル化ヒストン H3 抗体及び再プロ

ーブした抗ヒストン H3 抗体を用いたウェスタン免疫ブロット法により解析した。
原典：Ning 2012 – Figure 1.

2.6.2.2.1.3 HBI-8000 の NCI-60 スクリーニング及び HDAC 阻害剤の COMPARE 解析（試験番号 1008NS06）

参考資料[4.2.1.1-1] 1008NS06

米国国立がん研究所のヒト腫瘍由来細胞株パネル（NCI-60）での 59 種の細胞株を用いて 5 用量（10^{-4} M～10^{-8} M）の HBI-8000 の細胞増殖抑制活性を検討した。50%増殖阻害濃度（GI_{50}）、細胞分裂阻害活性の尺度である完全増殖阻害濃度（TGI）、及び細胞傷害性の尺度である 50%致死濃度（LC_{50}）を求めた。59 の細胞株を用いて試験が行われた。

6 種類の白血病由来細胞株［CCRF-CEM、HL-60 (TB)、K-562、MOLT-4、RPMI-8226、及び SR］に対する増殖抑制活性を評価した。HBI-8000 は、用いた全ての白血病由来細胞株に対し、マイクロモルレベルの低濃度で増殖抑制活性を示し、GI_{50} は 1.04～10.4 μM であった。TGI は、PRMI-8226（39.8 μM）を除く白血病細胞株で 10^{-4} M 超の濃度で得られると考えられた。HBI-8000 は、細胞毒性を有さず、LC_{50} は 10^{-4} M を超えると考えられた。白血病由来細胞株に対する HBI-8000 の *in vitro* での増殖抑制活性は、他の腫瘍細胞株、特に *in vivo* 試験でも評価されている（2.6.2.2.4.1 項参照）ヒト非小細胞肺がん（NSCLC）由来 A549 細胞（GI_{50}＝8.74 μM）及びヒト乳がん由来 MCF-7 細胞（GI_{50}= 2.11 μM）に対する増殖抑制活性と同等であった。

HDAC 阻害剤である depsipeptide、ボリノスタット、belinostat、entinostat（SNDX275）及び HBI-8000 について GI_{50} による COMPARE 解析を行った。平均 $\log_{10} GI_{50}$ でみると、HBI-8000 は他の HDAC 阻害剤より効力が低かった（depsipeptide＞belinostat＞ボリノスタット＞entinostat＞HBI-8000）。HBI-8000 は腫瘍サブパネル解析で選択性が全く示されなかったが、検討した他の HDAC 阻害剤とは異なる GI_{50} プロファイル／パターンが示された。

entinostat（SNDX275）、belinostat、ボリノスタット及び depsipeptide と HBI-8000 との相関性について、GI_{50} 値に基づく COMPARE マトリックス解析を行った（表 2.6.2-2）。HBI-8000 を含む全ての HDAC 阻害剤はそれぞれの自身との完全な相関関係（1.0）にあり、この解析の妥当性が認められた。検討した 5 つの化合物間での相関関係は弱かった。ベンズアミドクラスに属するもう一つの化合物である entinostat（SNDX275）と HBI-8000 とのピアソン相関係数（PCC）は 0.422 で被検化合物の中では最良の相関関係にあったが、他の HDAC 阻害剤と HBI-8000 との間の相関性はごく低かった。

表 2.6.2-2 HDAC 阻害剤に対する HBI-8000 の GI_{50} 値の COMPARE 解析

Compound	Compound	PCC*
HBI-8000	HBI-8000	1.0
HBI-8000	Entinostat (NSC706995)	0.422
HBI-8000	Belinostat (NSC726630)	0.306
HBI-8000	Vorinostat (NSC701852)	0.238
HBI-8000	Depsipeptide (NSC630176)	0.255

HDAC = ヒストン脱アセチル化酵素
*PCC = ピアソン相関係数
原典：1008NS06 – Table I

GI_{50} 値に基づく HBI-8000 に感受性の高い腫瘍細胞株／腫瘍タイプとして、黒色腫（7 株）、非小細胞肺がん（3 株）、乳がん（2 株）、腎がん（2 株）及び卵巣がん（シスプラチン抵抗性である OVCAR-3 及び OVCAR-5 の 2 株）が同定された。多くの細胞株は、最小濃度（約 1 μM）で HBI-8000 に感受性を示した。HBI-8000 の効力のデータは、他の HDAC 阻害剤のデータと異なっていた。

これらの結果から、白血病を含む数多くの腫瘍タイプ由来の細胞株に対する HBI-8000 の IC_{50} は低マイクロモルで得られ、一方細胞毒性は低い（大半の細胞株で LC_{50} が 100 μM 超）ことが示された。ある種の腫瘍タイプ又は細胞株は、バックグラウンドの変異又はエピジェネティック変化が HBI-8000 の作用によって無効化されるために、HBI-8000 に対してより高い感受性を示す可能性がある。

2.6.2.2.1.4 HBI-8000 による細胞増殖抑制

参考資料[4.3-46] Ning 2012

3 種の白血病由来細胞株（骨髄性白血病由来 HL-60 細胞株、ヒト単球／マクロファージ由来 28SC 細胞株及び急性 T 細胞白血病由来 Jurkat 細胞株）及び 1 種のリンパ種由来細胞株（B 細胞リンパ腫由来 Raji 細胞株）を含む 18 種のヒト腫瘍由来細胞株を用いて実施した細胞増殖抑制試験において、HBI-8000 及び entinostat（MS-275）は同様に低マイクロモル濃度範囲でほとんどの腫瘍細胞の増殖を抑制したものの、一部の腫瘍細胞に対しては抑制しなかった（表 2.6.2-3）。特に、B 細胞リンパ腫由来 Raji 細胞株及び急性 T 細胞白血病由来 Jurkat 細胞株の GI_{50} 濃度は、肺がん由来 A549 細胞株、乳がん由来 MCF-7 細胞株及び結腸がん由来 HCT-8 細胞株などの他の固形がん由来細胞株における濃度と同等であった。一方で HBI-8000 は、MS-275 に比べ、ヒト胎児腎臓（CCC-HEK）及び肝臓（CCC-HEL）由来の正常細胞に対して毒性が顕著に低く、HBI-8000 に対する細胞毒性反応性が正常細胞とがん細胞で異なることが示された。

表 2.6.2-3 形質転換細胞株及び正常細胞に対する HBI-8000（chidamide）及び entinostat（MS-275）の 50%細胞増殖阻害濃度（GI_{50}）

Cell line	Cell type	GI_{50} (μM)	
		HBI-8000	MS-275
Transformed cell lines			
A549	Lung	8.2 ± 2.9	10.8 ± 3.4
DU-145	Prostate	25 ± 6.7	13 ± 4.3
LNCaP	Prostate	4.0 ± 1.2	2.5 ± 0.8
MCF-7	Breast	5.0 ± 1.3	6.3 ± 1.7
MB-231	Breast	7.9 ± 2.1	5.0 ± 2.0
SK-OV-3	Ovarian	>50	>50
HeLa	Cervical	40 ± 8.3	25 ± 4.2
SK-N-SH	Neuroblastoma	>50	>50
HCT-8	Colon	7.2 ± 1.7	1.2 ± 0.3
SMMC	Liver	16 ± 3.2	20 ± 2.8
HepG2	Liver	4.0 ± 1.5	3.2 ± 1.1
PANC-1	Pancreas	6.3 ± 2.1	5.0 ± 1.7
SGC-7901	Gastric	>50	>50
U2OS	Osteosarcoma	2.0 ± 0.6	1.0 ± 0.3
Raji	B-cell lymphoma	4.0 ± 0.9	6.3 ± 1.4
HL-60	Myelogenous leukemia	0.4 ± 0.1	0.32 ± 0.1
28SC	Human monocyte/macrophage	5.8 ± 1.2	4.0 ± 0.8
Jurkat	Acute T-cell leukemia	6.3 ± 0.9	6.3 ± 1.1
Normal cells			
CCC-HEK	Human fetal kidney cells	>100	30 ± 6.9
CCC-HEL	Human liver cells	>100	40 ± 5.7

結果は少なくとも 3 回独立して実施した実験から求めた平均値 ± SE として示されている。
DMSO = ジメチルスルホキシド; GI_{50} = 50% 増殖抑制濃度.
注：chidamide = HBI-8000, MS-275 = entinostat
各細胞株は 5～10 × 10^3 cells/well（個々の細胞株の増殖速度に準じて）となるよう 96-well plate に播種した。24 時間後に、被験物質を異なる濃度で添加し、引き続き細胞を 72 時間培養し、その後 CellTiter 96 Aquous One Solution Reagent (Promega, Madison, WI, USA)を 20 μL/well 添加した。プレートを 37 ℃ で 2 時間インキュベートした後、96-well 用のマイクロプレートリーダーを用いて 490 nm の波長での吸光度を測定した。細胞の生存率は、$A_{treatment}/A_{control}$ × 100%（A は 490 nm の波長での吸光度を現す）として求めた。対照物質に対して 50%の割合で細胞増殖を抑制した被験物質の濃度を GI_{50} とした。全ての化合物は DMSO に溶解し、培養液中の最終 DMSO が 0.1%以下となるよう 1000 倍に希釈して培養液に添加した。全ての試料について 2 回評価し、個々の実験は少なくとも 3 回繰り返した。
原典：Ning 2012 – Table 2

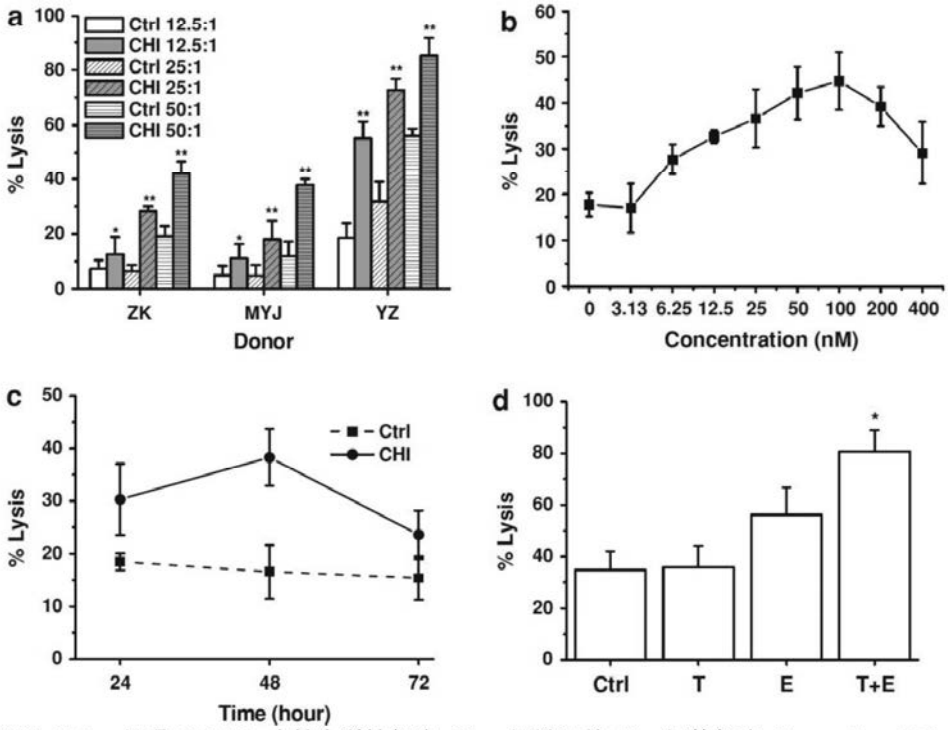
2.6.2.2.2 NK 細胞を介した HBI-8000 の細胞毒性

参考資料[4.3-46] Ning 2012

NK 細胞のソースとして、健常ドナーからの PBMC を用いて免疫系を介した HBI-8000 の抗腫瘍効果の潜在能力を検討した。健常ドナーの PBMC は HBI-8000 とインキュベートした後、免疫系を介した腫瘍細胞溶解性を評価するために、ヒト慢性骨髄性白血病由来 K562 細胞株と共にインキュベートした。図 2.6.2-3a に示す様に、健常ドナーからの PBMC を HBI-8000 で処理することにより、NK 細胞を介した細胞毒性評価での標的細胞である K562 細胞の溶解作用は有意に高まった。最大の標的細胞溶解活性は 100 nM の HBI-8000 添加時に認められ（図 2.6.2-3b）、この濃度では 48 時間が最適培養時間であった（図 2.6.2-3c）。HBI-8000 は、200 nM 濃度で添加後 72 時間時点までは、溶媒を添加した場合と比較して、PBMC に対して細胞毒性作用を発揮しなかった。標的の K562 細胞のみに HBI-8000 を添加して培養したとき、HBI-8000 を添加しなかった PBMC の共存下で細胞溶解性は促進されなかったが、標的細胞及びエフェクター細胞の双方に HBI-8000

を添加したときには、エフェクター細胞のみに添加した場合と比較して細胞溶解性は顕著に高まった（図 2.6.2-3d）。

図 2.6.2-3 ヒト骨髄性白血病由来 K562 細胞の免疫細胞を介した細胞溶解作用に対する HBI-8000 による促進



CHI = HBI-8000; Ctrl = 対照; PBMC =末梢血単核細胞; SE = 標準誤差; T = 標的細胞; E = エフェクター細胞; T + E = 標的細胞とエフェクター細胞; *E/T* = 標的細胞に対するエフェクター細胞の割合

a: 健常ドナーから単離した PBMC を 100 nM の HBI-8000 で 48 時間処理し、次に異なる割合の K562 細胞と共に培養し、その後細胞毒性アッセイにより評価した。$^{*}P < 0.05$ 及び$^{**}P < 0.01$ は HBI-8000 での処理を行わなかったエフェクター細胞の値と比較したものである。統計解析はスチューデントの *t* 検定により実施した。

b: PBMC を図示した異なる濃度の HBI-8000 で 48 時間処理した後、*E/T* = 25:1 で細胞毒性アッセイを行った。

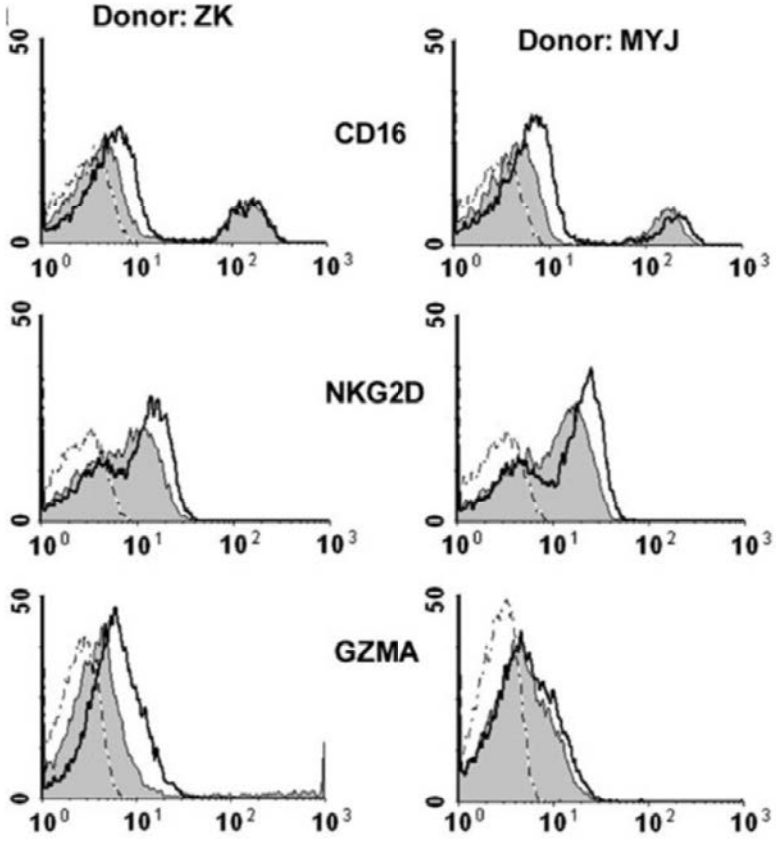
c: PBMC を HBI-8000 100 nM で図示した時間処理した後、*E/T* = 25:1 で細胞毒性アッセイを行った。

d: HBI-8000 100 nM の存在下、又は非存在下で 48 時間処理したときの *E/T* = 25:1 での細胞毒性アッセイの結果を示す；Ctrl は PBMC 及び K562 細胞の両者について HBI-8000 非存在下で処理した結果を; T は K562 細胞のみを HBI-8000 で処理した結果を；E は PBMC のみを HBI-8000 で処理した結果を；T + E は PBMC と K562 細胞の両者を HBI-8000 で処理した結果をそれぞれ示している。$^{*}P < 0.05$ はエフェクター細胞のみを HBI-8000 で処理したときの値と比較したものである。結果は、独立して実施した 3 回の試験結果より得た平均値 ± SE として示した。

原典：Ning 2012 – Fig. 3

免疫細胞を介した細胞溶解作用に関与することが知られているたんぱく質パネルの発現レベルをフローサイトメトリーを用いて解析した。図 2.6.2-4 に示すように、ドナー2 例から採取して *ex vivo* で 100 nM の HBI-8000 を添加して 48 時間培養した PBMC において、NK 活性化受容体として機能するたんぱく質である CD16 及び NKG2D、並びに細胞傷害性酵素であるグランザイム A（GZMA）の顕著なアップレギュレーションが認められた。

図 2.6.2-4 HBI-8000 による NK 機能に関与するたんぱく質発現の促進



CHI = chidamine; PBMC = 末梢血単核細胞
2 名の異なる健常ドナーから単離した PBMC を 100 nM の HBI-8000 で 48 時間処理し、処理前と処理後の図示した各タンパクの発現をフローサイトメトリーにより分析した。網掛けしたヒストグラムは未処理細胞の染色を、実線で示したオープンヒストグラムは処理細胞の染色を、及び点線で示したオープンヒストグラムは対照アイソタイプで処理した細胞の染色をそれぞれ示している。
原典：Ning 2012 – Fig. 4a

2.6.2.2.3 *In Vitro* 及び *Ex Vivo* モデルにおける成人 T 細胞白血病／リンパ腫に対する HBI-8000 の抗腫瘍活性

参考資料[4.3-33] Hasegawa 2016

ATL 由来細胞株及び日本人 ATL 患者から採取した初代培養細胞に対する HBI-8000 の効果について評価した。この試験では、下山分類（Shimoyama 1991）に基づきアグレッシブタイプの ATL と診断された 10 例の患者から 11 の試料を採取した。末梢血単核細胞（PBMC）は ATL 患者及び健康成人ドナーから採取した。

2.6.2.2.3.1 HBI-8000 による成人 T 細胞白血病／リンパ腫由来細胞株における細胞生存能力の抑制

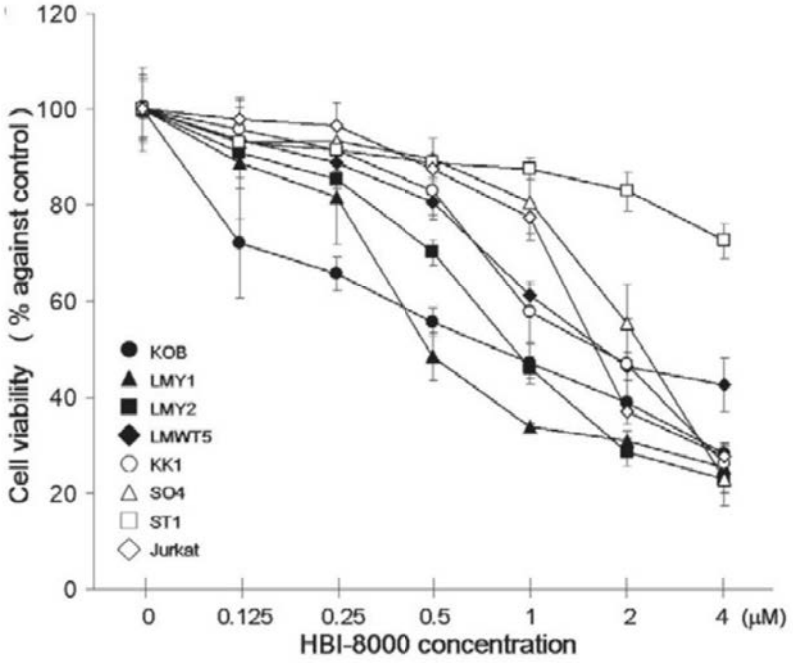
ATL 細胞における HBI-8000 の活性を評価するため、ATL 患者由来細胞株における *in vitro* 及び *ex-vivo* の 2 つのモデルシステムを使用した。第一のシステムでは、7 種の ATL 由来細胞株（KOB、LMY1、LMY2、LMWT5、KK1、SO4 及び ST1）、及び HDAC 阻害剤が良好に奏効することが知られている非 ATL であるヒト急性 T 細胞白血病由来 Jurkat 株を用いて HBI-8000 活性を評価した（Rosato 2003）。

ATL 由来細胞株である KOB、KK1、ST1、SO4、LMY1 及び LMY2 はアグレッシブ ATL 患者か

ら樹立されたものである（Maeda 1999; Hasegawa 2005）。LMWT5 は、急性型 ATL 患者の PBMC から新規に樹立された細胞株である。サザンブロッティングデータとの一致により、細胞株が初代 ATL 由来細胞であることを確認した。Jurkat 細胞、ST1 細胞及び THP-1 細胞は IL-2 を添加していない培地で維持され、他の細胞株は 10 ng/mL の IL-2 を添加した培地で維持された。KOB、LMY1、LMY2 及び ST1 細胞は、野生型がん抑制たんぱく質 p53 を保持していることが明らかとなっている（Hasegawa 2009）。

HTLV-1 感染、IL2 依存性、又は p53 遺伝子の発現の有無に関わらず、HBI-8000 添加 72 時間後に、検討した全ての細胞株で細胞の生存能力の低下が示された（図 2.6.2-5）。ATL 由来細胞株に対する IC_{50} は 0.7～1.7 μM（平均 1.16 μM）であった。これらの結果から、HBI-8000 に対する ATL 由来細胞株の感受性は Jurkat 細胞と比較して劣っていないことが示された。細胞の HTLV-1 感染、IL2 依存性及び p53 遺伝子発現の有無は HBI-8000 への反応に影響を及ぼさなかった。

図 2.6.2-5 成人 T 細胞白血病／リンパ腫由来細胞株における HBI-8000 による細胞生存能力の抑制



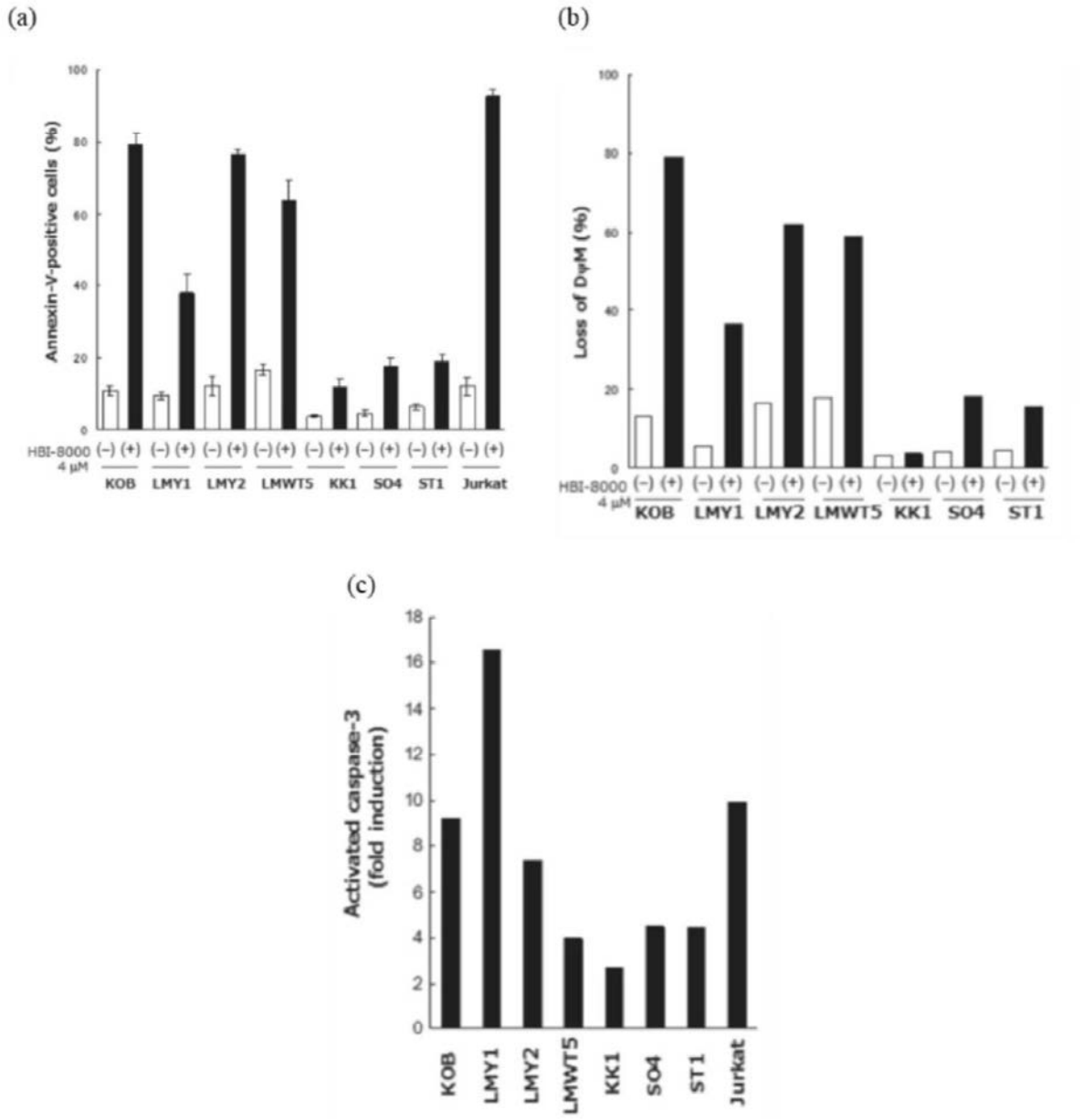
ATL = 成人 T 細胞白血病／リンパ腫; MTS アッセイ = 5-(3-カルボメトキシフェニル)-2-(4,5-ジメチル-チアゾイル)-3-(4-スルフォフェニル)テトラゾリウムアッセイ; SD = 標準偏差
ATL 由来細胞株及び Jurkat 細胞（2～5 × 10^5 cells/mL）を溶媒、又は図示した濃度の HBI-8000 で 72 時間処理し、次いで細胞生存率を MTS アッセイにより評価した。全ての実験は 3 回繰り返し、結果は平均 ± SD として求めた。
原典：Hasegawa 2016 – Fig. 1a

2.6.2.2.3.2 HBI-8000 による成人 T 細胞白血病／リンパ腫由来細胞株でのアポトーシス誘導

アポトーシス誘導の測定に通常使用される 4 つのアッセイである、アネキシン V 結合（図 2.6.2-6a）、ミトコンドリア膜電位（MMP）低下（図 2.6.2-6b）、カスパーゼ-3 活性化（図 2.6.2-6c）及び細胞周期のサブ G_1 期ピークにおける細胞蓄積（図 2.6.2-7）を用いてアポトーシス誘導を測定した。細胞死を検出する 4 つのアッセイから得たデータは一貫しており、KOB、LMY1、LMY2、LMWT5 及び Jurkat 細胞ではアポトーシスが顕著なレベルで誘導されたが、KK1、SO4 及び ST1

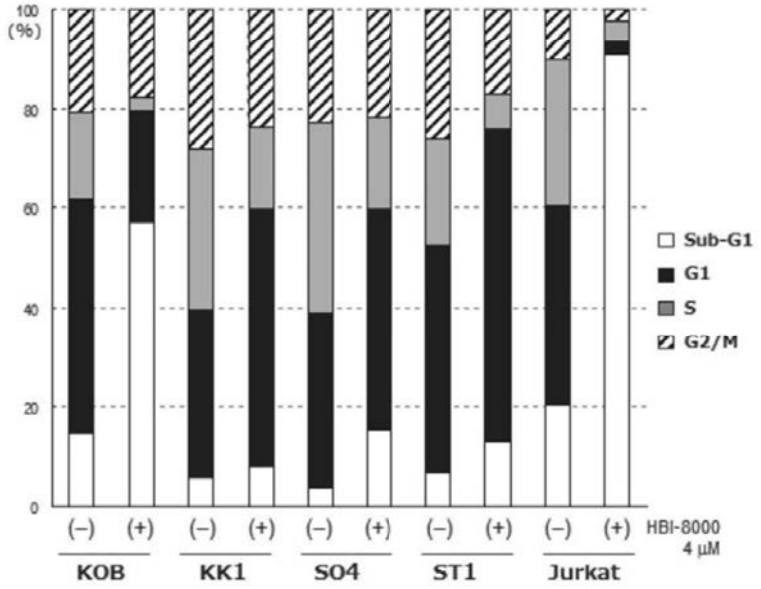
株ではアポトーシスの誘導は顕著ではなかった（図 2.6.2-6）。HBI-8000 は KK1、SO4 及び ST1 株で G_1 期での細胞周期停止も誘導した（図 2.6.2-7）。

図 2.6.2-6 アネキシン V との結合、ミトコンドリア膜電位低下及びカスパーゼ-3 活性化を伴う成人 T 細胞白血病／リンパ腫由来細胞株における HBI-8000 によるアポトーシス誘導



ATL＝ 成人 T 細胞白血病／リンパ腫; SD＝ 標準偏差
ATL 由来細胞株及び Jurkat 細胞（2～5 × 10^5 cells/mL）を溶媒、又は 4 μM HBI-8000 で 48 時間処理した後、細胞を回収した。(a) アネキシン V／ヨウ化プロピジウム（PI）により染色し、アネキシン V 陽性細胞の割合（%）を評価した。実験は 3 回繰り返し、結果は平均値 ± SD として表した。(b) ミトコンドリア膜電位の低下を評価した。細胞を JC-1 色素と共にインキュベートし、フローサイトメトリーで分析することにより、JC-1 赤色蛍光強度の低い細胞の割合を求めた。KK1 細胞を除き、ほとんどの細胞株でミトコンドリア膜電位（ΔΨM）の低下を認めた。 (c) 活性化された（切断された）カスパーゼ 3 を APOPCYTE^{TM} caspase-3 colorimetric assay kit により評価した。シグナル伝達の Fold Induction（HBI-8000 処置細胞/HBI-8000 未処置細胞）が示された。
原典：Hasegawa 2016 – Fig. 1b、Fig. 1e 及び Fig. 1d

図 2.6.2-7 細胞周期対する HBI-8000 の影響



ATL 由来細胞株及び Jurkat 細胞（2～5 × 10^5 cells/mL）を溶媒、又は 4 μM HBI-8000 で 48 時間処理した後、細胞を回収した。Cell Cycle Test kit (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)を用いて細胞周期を評価した。サブ-G_1、G_1、S 及び G_2/M 相の各相にある細胞の割合（%）を算出した。G_1 相及び G_1 arrest 相における細胞数の増加が HBI-8000 で処理した KK1 及び SO4 細胞について認められた。
原典：Hasegawa 2016 – Fig. 1c

2.6.2.2.3.3 成人Ｔ細胞白血病／リンパ腫初代培養細胞における細胞生存能力の抑制

ATL 患者から得られた新鮮細胞を用いて HBI-8000 の影響を評価した。10 例のアグレッシブタイプの ATL 患者から採取した 11 種の初代 ATL 試料の特性を表 2.6.2-4 に示す。細胞を複数濃度の HBI-8000 で 72 時間処理し、5-(3-カルボメトキシフェニル)-2-(4,5-ジメチル-チアゾイル)-3-(4-スルフォフェニル)テトラゾリウムアッセイ（MTS アッセイ）で細胞生存率を評価した。6 種の ATL サンプル、ATL1、ATL7、ATL8、ATL9、ATL10 及び ATL11 を最高濃度 20 μM までの HBI-8000 で処理した。

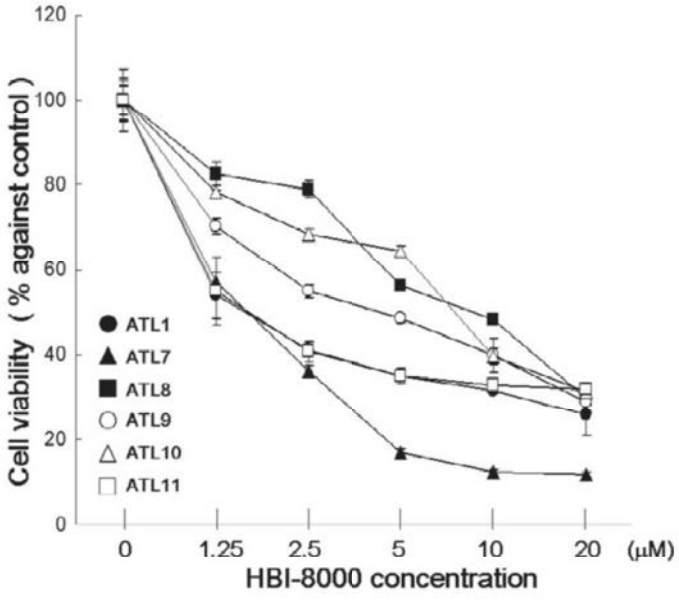
表 2.6.2-4　10 例の患者から得た 11 種の成人 T 細胞白血病／リンパ腫試料の特性

Case	G/A	Type	Clinical Course	IC_{50} (μM)	p53 Status	p21 mRNA Upregulation	Previous Treatment
ATL1	F/81	Acute	Relapse	9.1	Mutant (Y126C)	2.1	Chemotherapy Mogamulizumab
ATL2	M/62	Acute	Relapse	17.8	N/A	N/A	Chemotherapy
ATL3	F/74	Unfavorable Chronic	de novo	8.2	N/A	N/A	Untreated
ATL4	F/79	Unfavorable Chronic	de novo	18.2	Wild	N/A	Untreated
ATL5	M/74	Acute	de novo	4.8	Mutant (P72R)	2.1	Untreated
ATL6	M/59	Acute	de novo	7.9	Wild	N/A	Untreated
ATL7	F/46	Unfavorable Chronic	de novo	11.0	N/A	N/A	Untreated
ATL8	F/30	Unfavorable Chronic	de novo	-	Mutant (D281N)	2.2	Untreated
ATL9	F/80	Acute	de novo	-	Wild	N/A	Untreated
ATL10	M/65	Acute	Relapse	-	Wild	N/A	Chemotherapy Mogamulizumab
ATL11	M/45	Chronic	de novo	-	Wild	N/A	Untreated

A＝ 年齢; ATL＝ 成人 T 細胞白血病／リンパ腫; F＝ 女性; G＝ 性別; IC_{50}＝50%阻害濃度; M＝ 男性; mRNA＝ メッセンジャーリボ核酸; N/A＝ 該当データなし; p21＝ サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21; p53＝ がん抑制たんぱく質 p53
ATL4 及び ATL9 は同一の患者より得た。
原典: Hasegawa 2016 - Table S1.

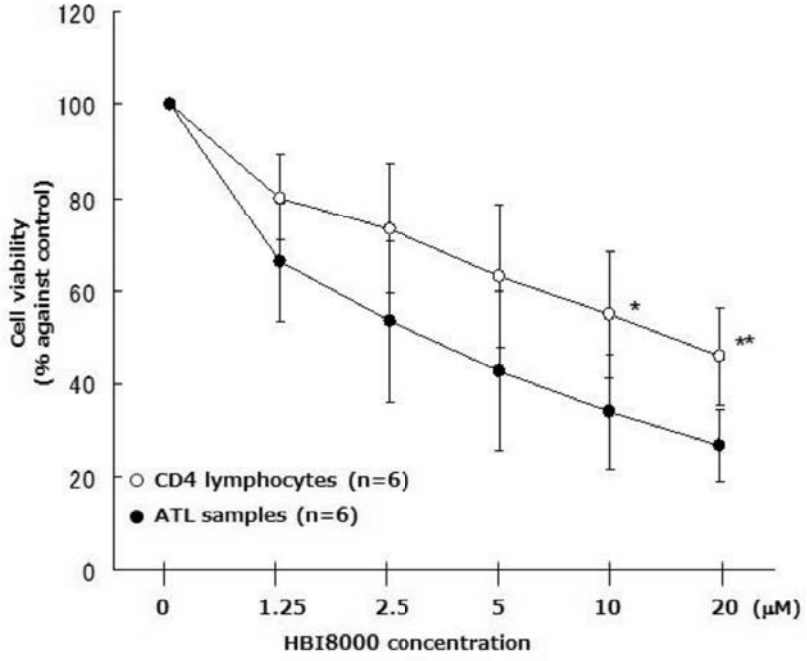
図 2.6.2-8 に示すように、再発 2 例（ATL1 及び ATL10）、及び予後不良因子を有する慢性型 2 例（ATL7 及び ATL8）を含む 6 種の初代 ATL 細胞に対して HBI-8000 は用量依存的な反応を示した（平均 IC_{50} は 4.35 μM）。HBI-8000 は正常な CD4 陽性リンパ球に対してもある程度の細胞傷害性を示したが（図 2.6.2-9）、ATL 細胞では顕著に低い濃度で細胞の生存率を抑制した。併用化学療法にモガムリズマブを加えた療法後に再発した患者由来の ATL1 及び ATL10 細胞では、他の初代 ATL 細胞と同様の感受性が HBI-8000 に対して示された。この結果から、HBI-8000 は標準療法に不応となった患者に対しても効果を発揮する可能性が示唆された。

図 2.6.2-8　初代成人 T 細胞白血病／リンパ腫細胞における HBI-8000 による細胞生存率の抑制



ATL＝ 成人 T 細胞白血病／リンパ腫; MTS アッセイ＝5-(3-カルボメトキシフェニル)-2-(4,5-ジメチル-チアゾイル)-3-(4-スルフォフェニル)テトラゾリウムアッセイ; SD＝ 標準偏差
初代 ATL 細胞株（1×10^6 cells/mL）を溶媒、又は図示した濃度の HBI-8000 で 72 時間処理した後、細胞生存率を MTS アッセイにより評価した。全ての実験は 3 回繰り返し、結果は平均値± SD として求めた。
原典：Hasegawa 2016 – Fig. 2a

図 2.6.2-9 初代成人 T 細胞白血病／リンパ腫細胞及び正常な CD4 陽性リンパ球の増殖に対する HBI-8000 の影響比較

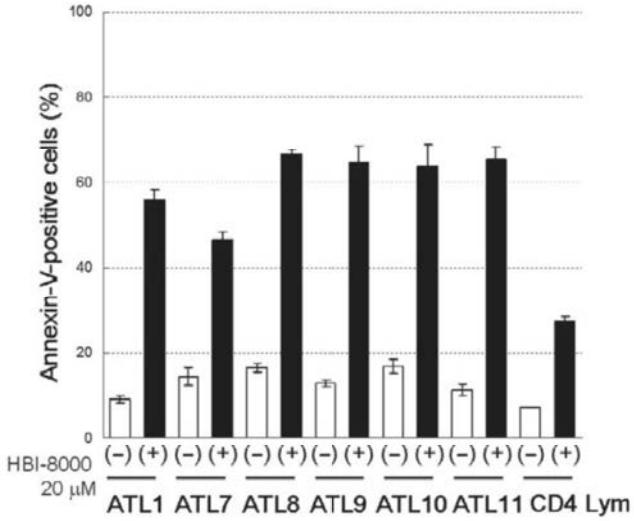


ATL ＝ 成人 T 細胞白血病／リンパ腫; MTS assay ＝ 5-(3-カルボメトキシフェニル)-2-(4,5-ジメチル-チアゾイル)-3-(4-スルフォフェニル)テトラゾリウムアッセイ
1×10^6 cells/mL の初代 ATL 細胞（n= 6）及び健常ドナー（n= 6）から単離した正常な CD4 リンパ球を溶媒又は図示した濃度の HBI-8000 で 72 時間処理後、MTS アッセイで細胞生存率を評価し、溶媒処理細胞に対する割合 (%) を算出した。結果は、3 回繰り返し実験の平均値 ± SD で表示した。また、ウェルチの *t* 検定を実施した（$*P < 0.05$、$**P<0.01$）。
原典: Hasegawa 2016 – Fig. S1.

2.6.2.2.3.4 初代成人 T 細胞白血病／リンパ腫細胞における HBI-8000 によるアポトーシスの誘導

6 種の初代 ATL 細胞（ATL1、ATL7、ATL8、ATL9、ATL10 及び ATL11）を用いて、ATL 細胞の細胞死パターンをアネキシン V／ヨウ化プロピジウム（PI）アッセイを用いて評価した（図 2.6.2-10）。試験した ATL 細胞の 50%超がアネキシン V 陽性細胞で構成されていたことから、HBI-8000 はアポトーシスによる細胞死を初代 ATL 細胞に誘導したことが示された。対照的に、正常な CD4 陽性リンパ球ではアネキシン V 陽性細胞が 30%未満であった。

図 2.6.2-10 初代成人 T 細胞白血病／リンパ腫細胞における HBI-8000 によるアポトーシス誘導



ATL = 成人 T 細胞白血病／リンパ腫; SD = 標準偏差
初代 ATL 細胞及び正常 CD4 陽性細胞（1×10^6 cells/mL）を溶媒、又は 20 μM の HBI-8000 で 48 時間処理した後、アネキシン V／ヨウ化プロピジウム染色を行い、アネキシン V 陽性細胞の割合（%）を評価した。実験は 3 回繰り返し、結果は平均値 ± SD で表示した。
原典: Hasegawa 2016 – Fig. 2.b

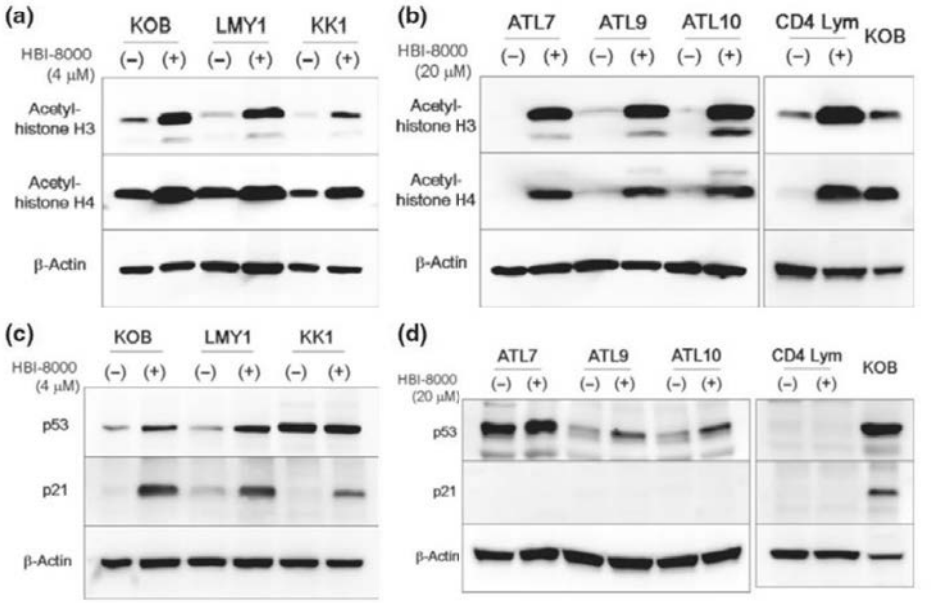
2.6.2.2.3.5 成人 T 細胞白血病／リンパ腫細胞におけるヒストンアセチル化の誘導及びがん抑制遺伝子の活性化

HDAC 阻害に続くヒストンの過剰アセチル化により p53 及び p21 などの様々ながん抑制遺伝子の発現が促進することがよく知られていることより（Gius 2004; Zhao 2006）、HBI-8000 が、ATL 由来細胞株及び初代 ATL 細胞のヒストン H3／H4 のアセチル化促進に有効であることを確認した（図 2.6.2-11a,b）。

次に、p53 及び p21 たんぱく質の発現に対する HBI-8000 の効果をウェスタンブロット解析により検討した。p53 の発現は HBI-8000 への反応に影響しないことが先の結果から示唆されているものの、本試験では、野生型 p53 を有する ATL 由来細胞株（KOB 及び LMY1）では p53 及び p21 の発現増加が示された。変異型 p53 を有する KKI 細胞株では p53 たんぱく質の蓄積が示され、HBI-8000 添加により蓄積レベルの変化はみられなかったが、それにもかかわらず p21 の発現増加が認められた（図 2.6.2-11c）。検討した初代 ATL 細胞中 ATL9 及び ATL10 の 2 株は野生型 p53 を有しており（表 2.6.2-4）、p53 の活性化が示された。また、別の ATL 細胞である ATL7 は、変異型 p53 を有する可能性があり、p53 たんぱく質の蓄積を同様に示した。しかし、いずれの初代 ATL 細胞でも HBI-8000 添加後に p21 の発現増加が認められず（図 2.6.2-11d）、これらの細胞は HBI-8000 の誘導するアポトーシスに関して p21 活性化を必要としなかった（Wong 2011）。3 種の細胞（ATL1、5 及び 8）のみで、HBI-8000 添加後の p21 mRNA 発現についてさらに評価した。これら 3 種の細胞は変異型 p53 を有していたものの、ATL1 では p21 mRNA のアップレギュレーションが認められた。このことから、ある種の ATL 細胞では HBI-8000 で処理することにより p21 mRNA 又はたんぱく質の発現が促進されるが、HBI-8000 への感受性とは相関していないことが示唆された。また、この結果からは、野生型 p53 を有する ATL 細胞では HBI-8000 添加によって p53 が再活性化され得る可能性が示唆された。正常な CD4 陽性リンパ球は、HBI-8000 添加によってある程度細

胞生存性が障害され（図 2.6.2-9）、ヒストンがアセチル化されたが（図 2.6.2-11b）、がん抑制遺伝子は活性化されなかった（図 2.6.2-11d）。

図 2.6.2-11 成人 T 細胞白血病／リンパ腫（ATL）由来細胞株及び初代 ATL 細胞におけるアセチル化ヒストン、がん抑制遺伝子及び抗体アレイの解析



ATL = 成人 T 細胞白血病／リンパ腫; p21 = サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21; p53 = がん抑制たんぱく質 p53
ATL 由来細胞株（2〜5 × 10^5 cells/mL）、初代 ATL 細胞及び正常な CD4 リンパ球（1 × 10^6 cells/mL）を、溶媒又は図示した濃度の HBI-8000 で 48 時間処理後回収した。全細胞溶解物を調製し、ウエスタンブロッティングを実施した。HBI-8000 で処理した KOB 細胞を CD4 リンパ球の陽性対照として使用した。
原典: Hasegawa 2016 – Fig. 3

2.6.2.2.3.6 DNA マイクロアレイ解析及び抗体アレイ解析

HBI-8000 により誘導される ATL 細胞死に関する根幹の作用機序を DNA マイクロアレイ解析及びたんぱく質発現アレイ解析を用いて検討した。DNA マイクロアレイ解析は、HBI-8000 の処理によりアポトーシス性変化を示した ATL 由来細胞株（KOB 及び LMY1）を用いて実施し、HBI-8000 処理及び未処理の細胞株間で遺伝子発現プロファイルを比較した。アポトーシス、細胞周期、細胞死、又は細胞増殖に関連する既知の機能を有する遺伝子をアップレギュレーション、又はダウンレギュレーションのいずれかの方向における遺伝子発現の変化量（$\log_2$ 比）の大きい順に配列した。表 2.6.2-5 に示すように、共通に認められる変化の中で、ケモカイン（C-C モチーフ）リガンドである CCL2 及び CCL4、IL9 及び IL13、ヤヌスキナーゼ（JAK）／シグナル伝達兼転写活性化因子（IL9、IL13 及びシグナル伝達兼転写活性化因子 4）などの細胞増殖シグナル伝達に関連する分子、並びにインフラマソーム関連分子（IL1β、腫瘍壊死因子、γ-インターフェロン及び NLRP3）のアップレギュレーションが顕著であった。対照的に、FAS（CD95）及び BRCA1 などのアポトーシス促進分子はダウンレギュレートされていた。これらの結果は、認められている HBI-8000 誘導性 ATL 細胞死と矛盾するように思われた。可能性のある説明として、少数のアポトーシス促進因子が HBI-8000 によって活性化され、抗アポトーシス及び細胞増殖シグナルを抑制し得ると考えられた。KOB 及び LMY1 は内因性経路によってアポトーシスに至ることを考慮すると、Bcl-2 様たんぱく質 11（BCL2L11；アポトーシス促進分子）（Bim）のアップレギュレーションは所見と

一致している。

表 2.6.2-5 成人 T 細胞白血病／リンパ腫由来 KOB 及び LMY1 細胞株の DNA マイクロアレイ解析

Symbol	Gene	KOB	LMY1
Upregulated Genes			
IL1B	Homo sapience interleukin 1, β (IL1B), mRNA (NM_000576)	11.0	2.5
CCL4	Homo sapience chemokine (C-C motif) ligand 4 (CCL4), transcript variant 1, mRNA (NM_002984)	7.8	3.7
IL9	Homo sapience interleukin 9 (IL9)	7.5	6.0
SERPINB2	Homo sapience serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 (SERPINB2)	7.3	4.6
CCL2	Homo sapience chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)	6.3	5.3
BCL2L11	Homo sapience BCL2-like 11 (apoptosis facilitator) (BCL2L11)	5.3	3.2
CTLA4	Homo sapience cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4)	5.2	1.6
IL13	Homo sapience interleukin 13 (IL13)	5.1	4.6
IL3RA	Homo sapience interleukin 3 receptor, α (low affinity) (IL3RA)	4.8	2.5
GZMA	Homo sapience granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3 (GZMA)	4.7	3.4
ID1	Homo sapience inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein (ID1)	4.6	1.7
NLRP3	Homo sapience NLR family, pyrin domain containing 3 (NLRP3)	4.4	2.4
IER3	Homo sapience immediate early response 3 (IER3)	4.4	7.2
BCL2A1	Homo sapience BCL2-related protein A1 (BCL2A1)	4.0	1.8
IFNG	Homo sapience interferon, gamma (IFNG)	3.9	2.8
TNF	Homo sapience tumor necrosis factor (TNF)	3.8	1.6
SNAI1	Homo sapience snail homolog 1 (Drosophila) (SNAI1)	3.6	2.5
STAT4	Homo sapience signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4)	3.5	2.2
DHRS2	Homo sapience dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2 (DHRS2)	3.0	2.6
LGMN	Homo sapience legumain (LGMN)	2.7	4.6
IL24	Homo sapience interleukin 24 (IL24)	2.5	6.1

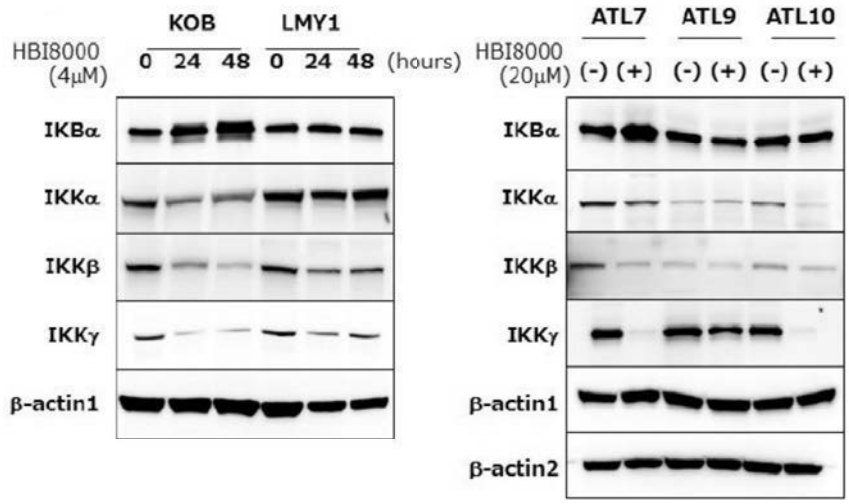
表 2.6.2-5 成人 T 細胞白血病／リンパ腫由来 KOB 及び LMY1 細胞株の DNA マイクロアレイ解析（続き）

Symbol	Gene	KOB	LMY1
Downregulated genes			
IL4	Homo sapience interleukin 4 (IL4)	-3.7	-1.2
FAS	Homo sapience Fas (TNF receptor superfamily, member 6) (FAS)	-3.0	-1.3
TSC22D3	Homo sapience TS22 domain family, member 3 (TSC22D3)	-2.4	-2.1
CHAC1	Homo sapience ChaC, cation transport regulator homolog 1 (*E. coli*) (CHAC1)	-2.3	-2.1
JMY	Homo sapience junction mediating and regulatory protein, p53 cofactor (JMY)	-2.3	-1.4
SERPINH1	Homo sapience serpin peptidase inhibitor, clade H (HSP47), member 1, (SERPINH1)	-2.2	-1.2
HDAC9	Homo sapience histone deacetylase 9 (HDAC9)	-2.1	-1.1
PPP1R15A	Homo sapience protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A (PPP1R15A)	-2.1	-1.1
RNF7	Homo sapience ring finger protein 7 (RNF7)	-2.0	-1.9
HDAC7	Homo sapience histone deacetylase 7 (HDAC7)	-1.9	-1.1
IRAK4	Homo sapience interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4)	-1.9	-1.1
INPP5D	Homo sapience inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145 kDa (INPP5D)	-1.7	-1.9
IL9R	Homo sapience interleukin 9 receptor (IL9R)	-1.6	-1.7
ADA	Homo sapience adenosine deaminase (ADA)	-1.6	-1.5
BNIP3	Homo sapience BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3 (BNIP3)	-1.5	-1.5
FHL2	Homo sapience four and a half LIM domains 2 (FHL2)	-1.3	-2.0
CENPH	Homo sapience centromere protein H (CENPH)	-1.2	-1.5
RAD51	Homo sapience RAD51 homolog (*S. cerevisiae*) (RAD51)	-1.2	-1.7
BRCA1	Homo sapience breast cancer 1, early onset (BRCA1)	-1.1	-1.9
MUC1	Homo sapience mucin 1, cell surface associated (MUC1)	-1.1	-1.9
CCNG2	Homo sapience cyclin G2 (CCNG2)	-1.0	-2.1

DNA = デオキシリボ核酸
細胞（2～5×10^5 cells/mL）を溶媒又は 4 μM の HBI-8000 のいずれかで 16 時間処理した後、DNA マイクロアレイを実施した。KOB 細胞のアップレギュレートされた遺伝子とダウンレギュレートされた遺伝子を、倍率変化（log2 比）の降順と昇順でそれぞれ配置した。その中で、アポトーシス、細胞死、細胞増殖に関連する機能が知られている遺伝子を選択した。
原典: Hasegawa 2016 – Table 1

たんぱく質発現アレイ解析の所見では、カスパーゼ-3 及び-7、並びにポリ（アデノシン二リン酸[ADP]-リボ―ス）ポリメラ―ゼの切断（Ashkenazi 2014）は、ATL 由来細胞株及び初代 ATL 細胞で共通する現象であった。この結果に基づき、HBI-8000 により誘導された ATL 細胞のアポトーシスを示す上述の所見が裏付けられた。他の分子の中では、明らかな inhibitory kappa B alpha（IκBα）のアップレギュレーションが、KK1 以外の ATL 細胞で共通してみられた（Karin 2000）。ウェスタンブロットたんぱく質発現アレイ解析の所見では、ATL 由来細胞株（KOB 及び LMY1）及び初代 ATL 細胞（ATL7、ATL9 及び ATL10）で IκBα の発現レベルの増加及び IκB キナーゼ（IKKs）発現レベルの減少傾向が認められた（図 2.6.2-12）。これらの結果から、HBI-8000 は核内因子-κB（NF-κB）の阻害を介し、部分的に ATL 細胞死に寄与していることが示された。

図 2.6.2-12 成人 T 細胞白血病／リンパ腫（ATL）由来細胞株及び初代 ATL 細胞における HBI-8000 による IκBα 及び IKKs の発現



ATL＝ 成人 T 細胞白血病／リンパ腫; NF-κB＝ 核内因子-κB.
ATL 由来細胞株（2～5 × 10^5 cells/mL）及び初代 ATL 細胞（1 × 10^6 cells/mL）を 4 μM 又は 20 μM の HBI-8000 で 48 時間処理した後、回収し、全細胞溶解物を調製した。ウエスタンブロッティングは、NF-κB 関連分子に対する抗体を用いて実施した。20～50 mg の細胞溶解物を各測定試料として使用した。
原典: Hasegawa 2016 – Fig. S2

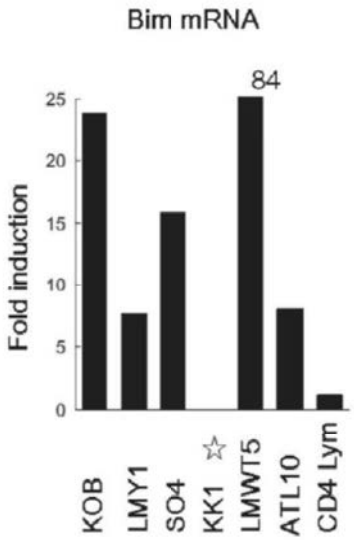
2.6.2.2.3.7 Bim 活性化に焦点を当てた内因性アポトーシス経路の解析

Bim は、抗アポトーシス性たんぱく質である Bcl-2 ファミリーの結合ポケットにはまり込んで拮抗することでアポトーシスを誘導するアポトーシス促進たんぱく質である（Bouillet 2002）。Bim の挙動を評価するため、Bim に対する定量的ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）解析を ATL 由来細胞株（KOB、LMY1、SO4、KK1、LMWT5）及び初代 ATL 細胞（ATL10）を用いて実施した。また、Bim と相互作用する主要な分子に対するウェスタンブロット解析を ATL 由来細胞株（KOB、LMY1）及び初代 ATL 細胞（ATL7、ATL9、ATL10）を用いて実施した。正常 CD4 陽性リンパ球を対照として用いた（図 2.6.2-13 及び図 2.6.2-14）。

定量的 PCR により、HBI-8000 が mRNA レベルで Bim をアップレギュレートすることが確認された。このアップレギュレーションは KOB、LMY1 及び他の細胞株で共通して認められたが、正常な CD4 陽性リンパ球では認められなかった（図 2.6.2-13）。

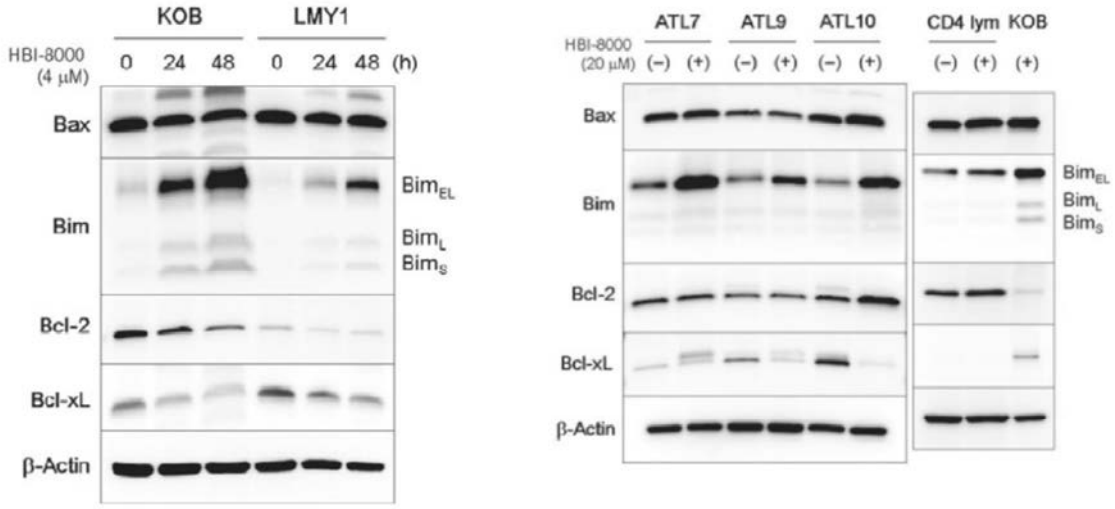
PCR 結果と一致して、Bim のたんぱく質発現は KOB、LMY1 及び検討した 3 種の初代 ATL 細胞全てで著しくアップレギュレートされていた。KOB 及び LMY1 細胞株では Bcl-2 及び Bcl-xL のダウンレギュレーションが明らかであったが、Bax の変化は認められなかった。Bcl-xL は、初代 ATL 細胞の中、ATL9 及び ATL10 ではダウンレギュレートされ、Bax は、ATL7 及び ATL10 においてわずかにアップレギュレートされた（図 2.6.2-14）。これらの結果は、少数のアポトーシス促進因子が HBI-8000 によって活性化され、抗アポトーシス又は細胞増殖シグナルを抑制し得るとの、上述の推測を裏付けている。正常な CD4 陽性リンパ球についてウェスタンブロット解析を実施して ATL 細胞での解析結果と比較したところ、HBI-8000 によって Bax、Bim、Bcl-2 及び Bcl-xL の発現は変化していなかった。

図 2.6.2-13 HBI-8000 誘導細胞死における内因性アポトーシスの解析（ポリメラーゼ連鎖反応アッセイ）



ATL = 成人 T 細胞白血病／リンパ腫; Bim = Bcl-2 様たんぱく質 11; mRNA = メッセンジャーリボ核酸; RT-PCR = 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
ATL 由来細胞株（2～5 × 10^5 cells/mL）、初代 ATL 細胞及び正常 CD4 リンパ球（1 × 10^6 cells/mL）を 4 又は 20 μM HBI-8000 で 24 時間処理した後、細胞を回収した。Bim 及びポルフォビリノーゲン脱アミノ酵素について定量的 RT-PCR アッセイを行った。ポルフォビリノーゲン脱アミノ酵素の値と比較した相対比を算出した後、Fold induction（HBI-8000 処置細胞/HBI-8000 未処置細胞）を求めた。HBI-8000 で処理した KK1 細胞中の Bim の定量的データは増加したものの、HBI-8000 未処理細胞中のレベルは検出限界以下であったため、Fold induction は算出できなかった（星印）。
原典: Hasegawa 2016 – Fig 4a

図 2.6.2-14 成人 T 細胞白血病／リンパ腫（ATL）由来細胞株及び初代 ATL 細胞における Bim のたんぱく質発現（ウェスタンブロット解析）



ATL = 成人 T 細胞白血病／リンパ腫; Bax = Bcl-2 結合 X たんぱく質; Bcl-2 = B 細胞リンパ腫たんぱく質 2; Bim = Bcl-2 様たんぱく質 11.
2 種の ATL 由来細胞株（2～5 × 10^5 cells/mL）、3 種の初代 ATL 細胞、及び正常 CD4 リンパ球（1 × 10^6 cells/mL）を溶媒、又は図示した濃度の HBI-8000 で 24～48 時間及び 48 時間、それぞれ処理した。細胞を回収した後、ウェスタンブロット解析を実施した。CD4 リンパ球の解析時には、HBI-8000 で処理した KOB 細胞を陽性対照として用いた。
原典：Hasegawa 2016 – Fig. 4c 及び 4d

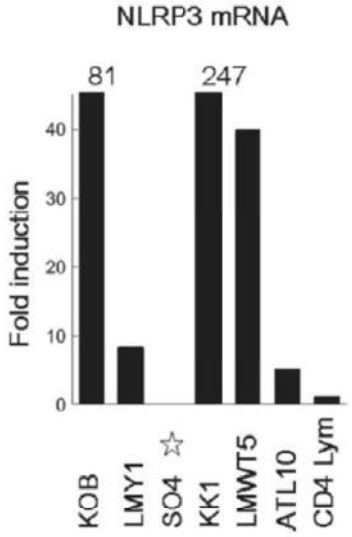
2.6.2.2.3.8 NLRP3 インフラマソームシグナル活性化の解析

インフラマソーム経路は炎症過程活性化を引き起こし、アポトーシスとは異なったプログラム細胞死過程であるパイロトーシスを誘導する（Latz 2013）。NLRP3 は、インフラマソームを形成するヌクレオチド結合オリゴマー化領域様受容体であり、プロカスパーゼ 1 を活性化し結果として IL1β の成熟化をもたらす。他のカスパーゼ同様、プロカスパーゼ 1 はたんぱく質分解によって活性化（切断されたカスパーゼ 1）される（Martinon 2002）。NLRP3 のインフラマソーム関連分子の活性化がマイクロアレイ解析結果から強く示唆されたことから、さらに定量的 PCR を NLRP3 について実施し、ウェスタンブロット解析を NLRP3 及びカスパーゼ 1 について実施した（図 2.6.2-15 及び図 2.6.2-16）。

マイクロアレイ解析の結果と一致して、検討した ATL 由来細胞株（KOB、LMY1、SO4、KK1、LMWT5）及び初代 ATL 細胞（ALT10）の mRNA レベルで HBI-8000 が NLRP3 をアップレギュレートさせたことが、定量的 PCR により確認された。一方、正常な CD4 陽性リンパ球の mRNA レベルでは、HBI-8000 添加に応じた NLRP3 のアップレギュレーションが生じなかった（図 2.6.2-15）。

一方、ウェスタンブロット解析により、KOB 細胞では NLRP3 及びプロカスパーゼ 1α が発現せず、むしろプロカスパーゼ 1 のアイソフォームの発現が低下することが認められた。対照的に、LMY1 では NLRP3 及びプロカスパーゼ 1α が明らかにアップレギュレートされたが、カスパーゼ 1 のアイソフォーム発現は低下した。初代 ATL 細胞中、ATL7 及び ATL10 ではプロカスパーゼ 1α の発現低下、及び切断されたカスパーゼ 1 の発現上昇が認められ、ATL9 ではプロカスパーゼ 1 アイソフォームの発現低下、及び切断されたカスパーゼ 1 の発現上昇が認められた。このため、HBI-8000 が NLRP3 及びカスパーゼ 1 を活性化させる傾向は、細胞タイプによって異なることが示された。正常な CD4 陽性リンパ球のたんぱく質レベルでは、HBI-8000 添加に応じたカスパーゼ 1 のアップレギュレーションは認められなかった（図 2.6.2-16）。

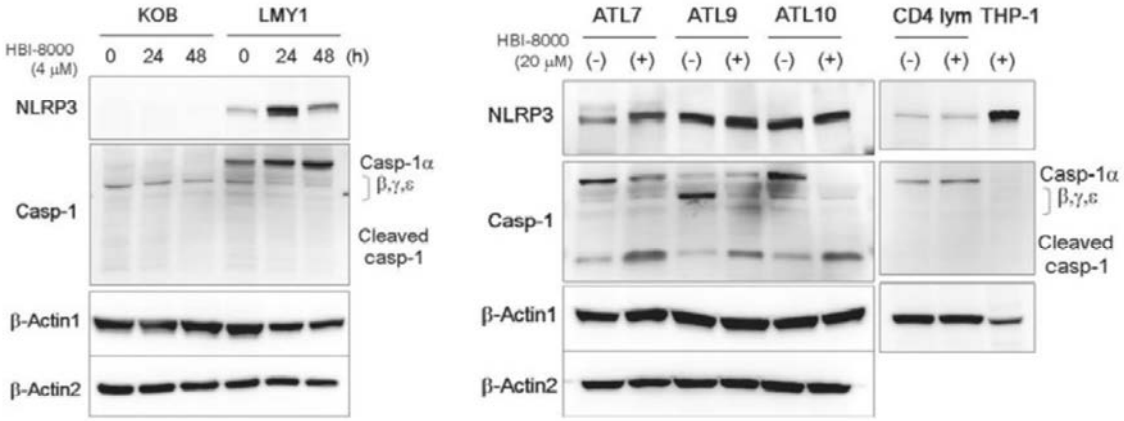
図 2.6.2-15 HBI-8000 誘導細胞死における NLRP3 経路の解析（PCR 解析）



ATL = 成人 T 細胞白血病／リンパ腫; mRNA = メッセンジャーリボ核酸; NLRP3 = ヌクレオチド結合オリゴマー化領域（NOD）様受容体ピリンドメイン含有たんぱく質 3; RT PCR = 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
ATL 由来細胞株（2～5 × 10^5 cells/mL）、初代 ATL 細胞及び正常な CD4 リンパ球（1 × 10^6 cells/mL）を 4 μM 又は 20 μM の HBI-8000 で 24 時間処理した後回収し、NLRP3 及びポルフォビリノーゲン脱アミノ酵素に対する定量的

RT-PCR アッセイを行った。ポルフォビリノーゲン脱アミノ酵素と比較した相対比を算出した後、Fold induction（HBI-8000 処理細胞/未処理細胞）を算出した。HBI-8000 処理 SO4 細胞における NLRP3 の定量的データは増加を示したものの、未処理細胞のレベルが検出限界より低値であったため、Fold induction は算出できなかった（星印）。
原典: Hasegawa 2016 – Fig 4b

図 2.6.2-16 成人 T 細胞白血病／リンパ腫（ATL）由来細胞株及び初代 ATL における NLRP3 経路のたんぱく質発現（ウェスタンブロット解析）



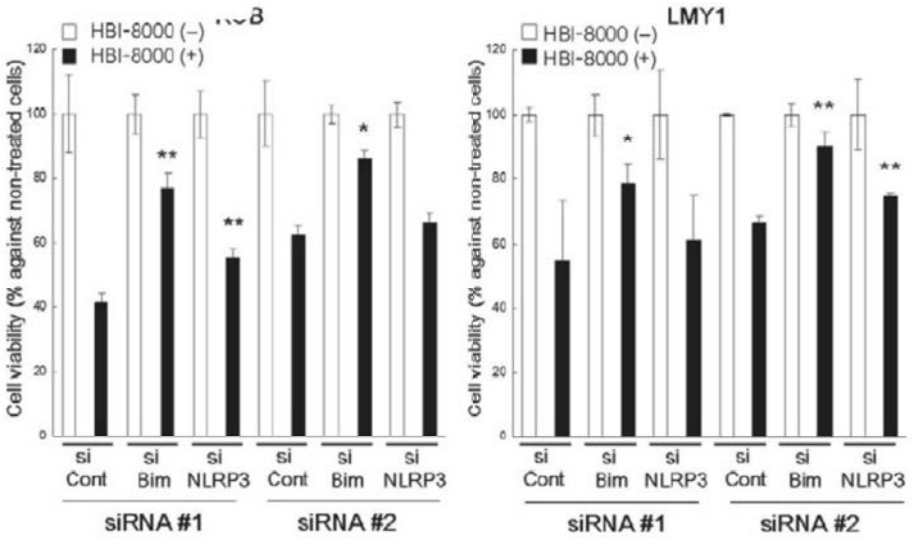
ATL = 成人 T 細胞白血病／リンパ腫; NLRP3 = NOD 様受容体ピリンドメイン含有たんぱく質 3
2 種の ATL 由来細胞株（2～5 × 10^5 cells/mL）、3 種の初代 ATL 細胞及び正常な CD4 リンパ球（1 × 10^6 cells/mL）を、溶媒又は図示した濃度の HBI-8000 のいずれかで 24～48 時間及び 48 時間 処理した。細胞を回収した後、ウエスタンブロッティングを実施した。HBI-8000 で処理した KOB 細胞又は THP-1 細胞を CD4 リンパ球の陽性対照として使用した。本試験で使用したプロカスパーゼ 1 の抗体は、カスパーゼ 1 アイソフォーム（β、γ、δ）及びカスパーゼ 1α を検出することが知られている。Casp：カスパーゼ。
原典: Hasegawa 2016 – Fig. 4e 及び Fig.4f

2.6.2.2.3.9 HBI-8000 により誘導される細胞死における Bim 及び NLRP3 インフラマソームの寄与

2.6.2.2.3.9.1 HBI-8000 誘導性アポトーシスの開始に Bim が果たす重要な役割

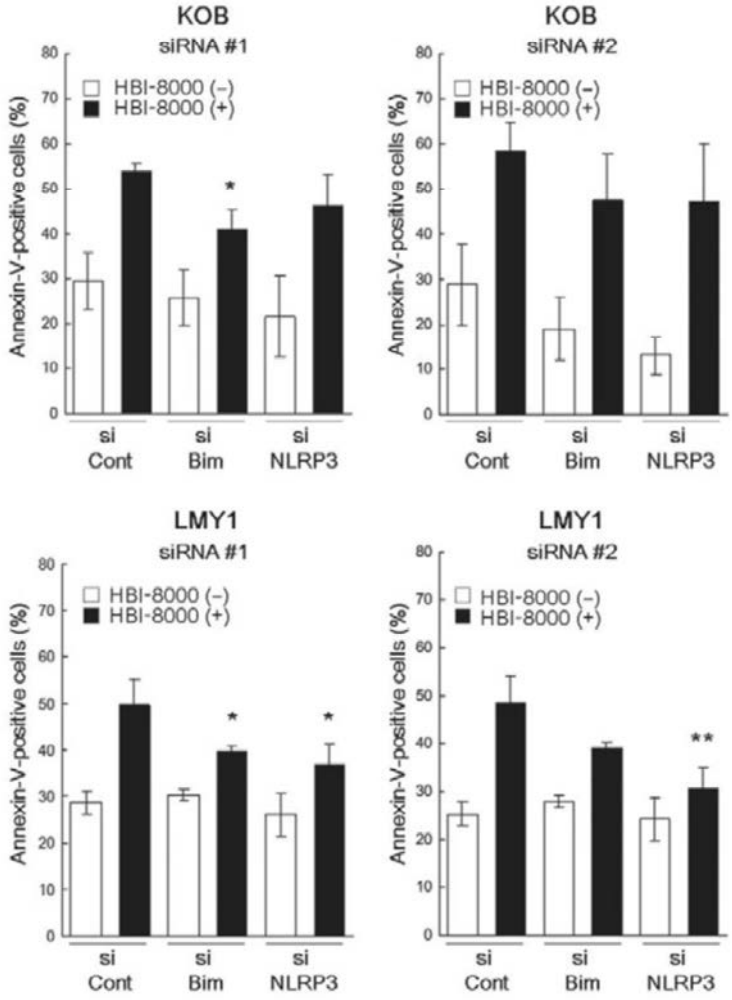
細胞の生存率アッセイにより、KOB 及び LMY1 細胞株では、HBI-8000 に誘導される細胞死が Bim を siRNA（siRNA#1 及び#2）でノックダウンすることにより著しく抑制されることが判明した（図 2.6.2-17）。HBI-8000 添加後の生存細胞の比率は siRNA 対照群では 40%～60%であったが、HBI-8000 で処理した si-Bim 群では約 80%に上昇していた。si-Bim による同様のアポトーシス抑制効果はアネキシン V／PI 解析の結果からも認められた（図 2.6.2-18）。HBI-8000 による NLRP3 誘導が認められる細胞株 LMY1 では、si-Bim が Bim 活性化を抑制するものの NLRP3 活性化は抑制しないことが、ウェスタンブロット解析により判明した（図 2.6.2-19）。これらの結果から、KOB 及び LMY1 では、HBI-8000 で誘導されるアポトーシスの開始に Bim が重要な役割を果たしていることが示された。

図 2.6.2-17 HBI-8000 誘導細胞死における siRNA（Bim 及び NLRP3）を用いたノックダウン実験（細胞生存率アッセイ）



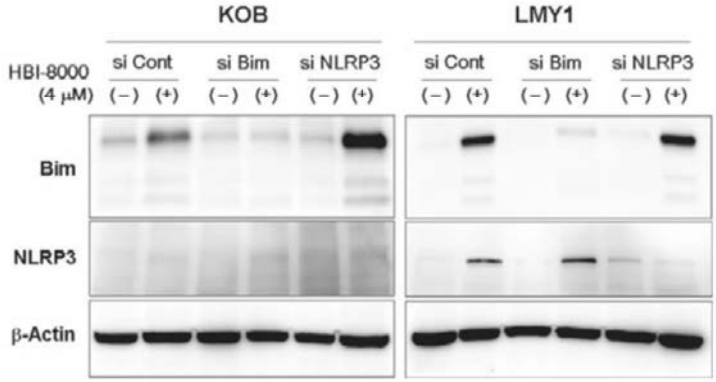
Bim = Bcl-2 様たんぱく質 11; Cont = 対照; MTS assay = 5-(3-カルボメトキシフェニル)-2-(4,5-ジメチル-チアゾイル)-3-(4-スルフォフェニル)テトラゾリウムアッセイ; NLRP3 = NOD 様受容体ピリンドメイン含有たんぱく質 3; SD =標準偏差; siRNA = 低分子干渉リボ核酸
トランスフェクションの 12 時間後に、細胞（1～2 × 10^5 cells/mL）を溶媒又は 1～2 μM の HBI-8000 で 24 時間インキュベートした。未処理の細胞と比較した細胞生存率を MTS アッセイで評価した。結果は、3 回の独立した実験の平均値 ± SD で表示した。また、HBI-8000 処理 si-対照細胞と比較するためにウェルチの *t* 検定を実施した（**P* < 0.05、***P* < 0.01）。
原典: Hasegawa 2016 – Fig. 5a

図 2.6.2-18 アネキシン V／ヨウ化プロピジウムアッセイにおける si-Bim による阻害作用



Bim = Bcl-2 様たんぱく質 11; Cont = 対照; NLRP3 = NOD 様受容体ピリンドメイン含有たんぱく質 3; SD =標準偏差; siRNA = 低分子干渉リボ核酸
トランスフェクションの 12 時間後に、細胞（1～2 × 10^5 cells/mL）を溶媒又は 1～2 μM の HBI-8000 で 24 時間インキュベートした。アネキシン V 陽性細胞の割合（%）をフローサイトメトリーで評価した。結果は、3 回の独立した実験の平均値 ±SD で表示した。また、HBI-8000 処理 si-Control 細胞と比較するためにウェルチの *t* 検定を実施した（$^*P < 0.05$、$^{**}P<0.01$）。
原典: Hasegawa 2016 – Fig. 5b

図 2.6.2-19 ウエスタン・ブロット解析における si-Bim による抑制



Bim = Bcl-2 様たんぱく質 11; si-Cont = 低分子干渉対照; NLRP3 = NOD 様受容体ピリンドメイン含有たんぱく質 3; siRNA = 低分子干渉リボ核酸
si-Cont、siRNA#1 又は#2 を用いたトランスフェクション後に、細胞（1～2 × 10^5 cells/mL）を溶媒又は 1～2 μM の HBI-8000 で 24 時間インキュベートした。細胞を回収し、ウェスタンブロット解析を実施した。siRNA#1 を用いたときの代表的な結果を示す。
原典: Hasegawa 2016 – Fig. 5c.

2.6.2.2.3.9.2 HBI-8000 により誘導される細胞死における NLRP3 インフラマソームの寄与の可能性

siRNA を用いて NLRP3 の役割を解析した。細胞の生存率アッセイで、KOB 及び LMY1 細胞株において、HBI-8000 により誘導される細胞死が NLRP3 に対する siRNA によって著しく阻害されることが判明した（図 2.6.2-17）。si-NLRP3 による同様の阻害効果はアネキシン V／PI アッセイの結果からも認められた。NLRP3 に対して siRNA を使用したとき、LMY1 のアポトーシスが著しく阻害されることが認められ、同様の傾向は KOB でも認められたものの統計的に有意ではなかった（図 2.6.2-18）。ウェスタンブロット解析により、LMY1 で si-NLRP3 は NLRP3 活性化を阻害するが Bim 活性化は阻害しないことが判明した（図 2.6.2-19）。まとめると、これらの結果から、LMY1 細胞株において NLRP3 活性化が HBI-8000 が誘導する細胞死に重要であることが示唆された。

2.6.2.2.4 *In Vivo* での抗腫瘍活性

2.6.2.2.4.1 複数の *In Vivo* 腫瘍モデルでの HBI-8000 の有効性（試験番号 CXHL0502435）

参考資料[4.2.1.1-2] CXHL0502435
参考資料[4.3-46] Ning 2012

白血病／リンパ腫モデルは検討されなかったが、HBI-8000 の *in vivo* 抗腫瘍活性を、ヒト結腸がん HCT-8 細胞、ヒト非小細胞肺がん（NSCLC）A549 細胞、ヒト肝がん BEL-7402 細胞及びヒト乳がん MCF-7 細胞を用いたマウスゼノグラフトモデルにおいて評価した（試験番号 CXHL0502435）。これら 4 種のヒト由来の腫瘍に対する HBI-8000 の *in vivo* での抗腫瘍活性は、Ning 2012 によっても報告されている。

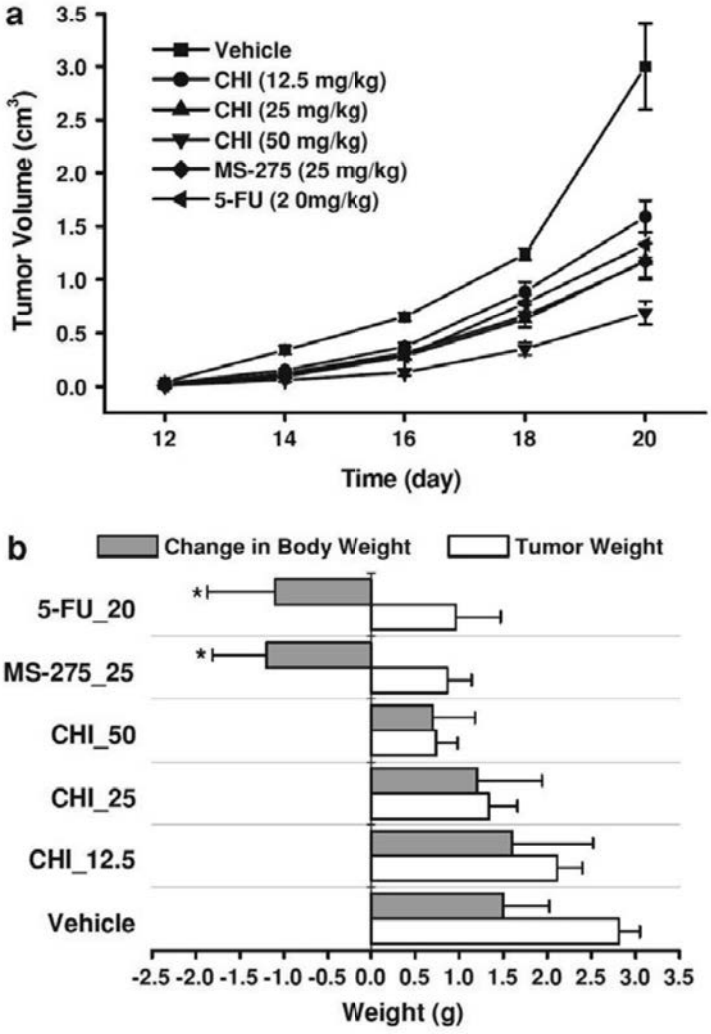
ヒト腫瘍細胞ゼノグラフトモデルを用いた試験においては、溶媒対照群と共に、entinostat（MS-275）及び 5-fluorouracil（5-FU）を陽性対照として評価した。雄のヌードマウスに HCT-8、A549 及び BEL-7402 細胞を移植し、雌のヌードマウスに MCF-7 細胞を移植した。薬剤投与（各群 8～10 匹）は細胞移植後 3 日目に開始した。0.2%カルボキシメチルセルロース及び 0.1% Tween 80 で溶解した HBI-8000 及び entinostat を、腫瘍の種類に応じて、1 日 1 回 20～28 日間経口投与した。5-FU は 2 日に 1 回腹腔内投与した。腫瘍の長径及び短径を 3 日に 1 回測定し、腫瘍体積を算出した。試験終了時にはマウスを安楽死させ腫瘍を分離し、腫瘍重量を測定した。体重は最終投与翌日に測定した。腫瘍増殖抑制率は、[（対照群の平均腫瘍重量－投与群の平均腫瘍重量）／対照群の平均腫瘍重量]×100%から算出し、*t* 検定は腫瘍重量で行った。

HBI-8000 は全てのヒト腫瘍細胞ゼノグラフトモデルにおいて 25%～84%の腫瘍増殖抑制を示した。HBI-8000 の用量 12.5 mg/kg～50 mg/kg の範囲において、腫瘍増殖抑制率は、ヒト結腸がん HCT-8 細胞ゼノグラフトモデルでは 24.9%～73.7%及び 38.4%～67.7%（2 回の独立した試験）、ヒト NSCLC A549 細胞ゼノグラフトモデルでは 45.1%～79.3%及び 47.9%～84.1%（2 回の独立した試験）、ヒト肝がん BEL-7402 細胞ゼノグラフトモデルでは 29.2%～71.4%（単一試験）、及びヒト

乳がん MCF-7 細胞ゼノグラフトモデルでは 49.3%～70.0%（単一試験）であった（試験番号 CXHL0502435）。

ヒト由来腫瘍ゼノグラフトモデルにおける HBI-8000 の用量－抗腫瘍活性相関は、Ning 2012 によっても報告されている。図 2.6.2-20a 及び図 2.6.2-20b に示すように HBI-8000 は、ヒト結腸がん HCT-8 細胞ゼノグラフトモデルにおいて 12.5～50 mg/kg の用量範囲で、用量依存的に腫瘍体積及び腫瘍重量を低下させた。50 mg/kg 用量では、陽性対照薬剤である 5-FU（20 mg/kg）及び entinostat（MS-275）（25 mg/kg）と比較して同等以上の有効性を示した。また、HBI-8000 は、上記の用量範囲で忍容性を示したものの、陽性対照薬剤では有意な体重減少が認められた（図 2.6.2-20b）。

図 2.6.2-20 ヒト結腸がん HCT-8 細胞ゼノグラフトモデルにおける HBI-8000 (CHI)の *In Vivo* での抗腫瘍効果



5 FU = 5-fluorouracil; CHI = chidamide
CHI = HBI-8000、MS-275 = entinostat
体重変化量は day0 と day21 の体重より算出した。
*：MS-275 又は 5-FU を投与した群と 50 mg/kg の HBI-8000 を投与した群の間で $P < 0.05$（スチューデントの t 検定）であった。
原典; Ning 2012 – Figure 2a and 2b

同様の有意で用量依存性を示す HBI-8000 の増殖抑制効果は、ヒト NSCLC A549 細胞、ヒト肝