目次

略語・略号一覧 2
2.4 非臨床試験の概括評価 3
2.4.1 非臨床試験計画概略 3
2.4.2 薬理試験 4
2.4.3 薬物動態試験 5
2.4.4 毒性試験 5
2.4.5 総括及び結論 7
2.4.6 参考文献一覧 8

略語・略号一覧

略語・略号	内容
AKT	プロテインキナーゼ B
AUC_{0-24h}	血中薬物濃度―時間曲線下面積（0-24 時間）
B13LM	転移性膵臓腫瘍細胞
EOMA	血管内皮腫
GLP	Good Laboratory Practice
GSK3β	グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 ベータ
HDMECs	ヒト皮膚微小血管内皮細胞
LECs	リンパ管内皮細胞
mTOR	哺乳類ラパマイシン標的タンパク質
PI3K	ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ
VEGF	血管内皮細胞増殖因子

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

本剤は、国内において 2014 年 7 月にリンパ脈管筋腫症を効能・効果として「ラパリムス®錠 1 mg」の承認を世界に先駆けて取得しているシロリムス製剤である。本申請は難治性脈管腫瘍・脈管奇形のうち難治性リンパ管疾患（・リンパ管腫（リンパ管奇形）・リンパ管腫症・ゴーハム病・リンパ管拡張症）に対する本剤の効能追加である。

本剤の非臨床試験での薬理試験に関し、効力を裏付ける試験では公表論文（MEDLINE を用いて検索）の中からリンパ管腫や血管腫に関連した適切な in vitro 及び in vivo 試験を選択してまとめ、CTD 様式に編集した。安全性薬理試験、薬物動態試験は、ラパリムス錠の初回承認申請時に提出済みであることから新たな試験を実施しなかった。毒性試験については、今回の難治性リンパ管疾患を対象としたラパリムス錠の効能追加申請に際して、その対象が主に小児患者であることから、幼若ラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験を GLP 適用下で実施した試験を追加し、それ以外の毒性試験は、ラパリムス錠の初回承認申請時に提出済みであることから新たな試験は実施しなかった。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 in vitro 試験

添付資料番号＜4.2.1.1-1～3 参＞

in vitro 試験では、ヒト皮膚微小血管内皮細胞（HDMECs）の構成細胞であるリンパ管内皮細胞（LECs)、ヒトリンパ管奇形患者由来のリンパ管内皮細胞及びマウスの血管内皮腫細胞（EOMA 細胞）の増殖をシロリムスは濃度依存的に抑制した。また、シロリムスはヒト LECs の遊走を抑制した。

2.4.2.1.2 in vivo 試験

添付資料番号＜4.2.1.1-1 参、4.2.1.1-3 参、4.2.1.1-4 参＞

in vivo 試験では､エマルジョン化した不完全フロントアジュバンド誘発性リンパ管内皮腫瘍、マウス血管内皮腫細胞移植、マウス静脈奇形及びマウス転移性膵臓腫瘍細胞移植の各腫瘍モデルにおいて、シロリムスを経口もしくは腹腔内投与したとき、これらの動物モデルでみられた腫瘍細胞の増殖及びこれらの腫瘍細胞のリンパ管新生や血管新生を抑制した。

2.4.2.1.3 作用機序

添付資料番号＜4.2.1.1-1 参、4.2.1.1-3 参、4.2.1.1-5 参＞

ヒト LECs においてシロリムスは血管内皮細胞増殖因子（VEGF-C（VEGFR-2 及び VEGFR-3））に結合)、VEGF-A（VEGFR-2 に結合）又は VEGF-C*（VEGFR-3 選択的に結合：システイン 156 がセリンに置換されたもの）による p70S6 kinase のリン酸化促進作用を抑制した。マウス EOMA 細胞においては血清で活性化したプロテインキナーゼ B（AKT）(Ser473)、哺乳類ラパマイシン標的タンパク質（mTOR)、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 ベータ（GSK3β）及び S6 のリン酸化促進作用はシロリムスにより抑制された。シロリムスはヌードマウスの皮下に埋植した B13LM 細胞の LECs の増殖を抑制するとともに VEGF-A 及び VEGF-C の発現量も抑制した。

2.4.2.2 副次的薬理試験

該当する試験を実施しなかった。

2.4.2.3 安全性薬理試験

該当する試験を実施しなかった。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験を実施しなかった。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 吸収

該当する試験を実施しなかった。

2.4.3.2 代謝

該当する試験を実施しなかった。

2.4.3.3 排泄

該当する試験を実施しなかった。

2.4.3.4 薬物相互作用

該当する試験を実施しなかった。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験

該当する試験を実施しなかった。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

該当する試験を実施しなかった。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

該当する試験を実施しなかった。

2.4.4.4 がん原性試験

該当する試験を実施しなかった。

2.4.4.5 生殖発生毒性

新生児を用いた試験を除き、該当する試験を実施しなかった。

2.4.4.5.1 新生児を用いた試験

(1) 幼若ラットの 4 週間反復経口投与毒性試験

添付資料番号＜4.2.3.5.4-1＞

幼若ラット（10 日齢）に、シロリムスの 0、0.1、0.3、1.0 mg/kg/day を 4 週間反復経口投与し、その毒性を検討した。その結果、0.1 mg/kg/day の雄及び 0.3 mg/kg/day 以上で体重の増加抑制及び摂餌量の低値がみられた。0.3 mg/kg/day の雌及び 1.0 mg/kg/day でリンパ球比の減少、好中球比の高値、1.0 mg/kg/day で非染色白血球比の低値がみられ、0.3 mg/kg/day 以上で、胸腺マクロファージの増加、1.0 mg/kg/day で胸腺重量の低値がみられた。生殖器では 0.3 mg/kg/day 以上の雄で精巣の重量低下、精細管の空胞化がみられ、雌では 0.3 mg/kg/day 以上で卵巣の重量低下、1.0 mg/kg/day で子宮の重量低下がみられた。0.3 mg/kg/day 以上の雄及び 1.0 mg/kg/day の雌で、生殖器の発育分化（包皮分離及び膣開口）の時期が遅延した。また、肺では 0.1 mg/kg/day 以上で肺胞マクロファージの集簇がみられた。これらのリンパ系組織・器官、生殖器及び肺に対する影響は成獣ラットでも同様に認められる変化であった。幼若ラットのみの変化としては、0.1 あるいは 0.3 mg/kg/day 以上で眼の水晶体で核を有する水晶体線維の増加、大腿骨の成長板の肥厚、関節軟骨の肥厚（雄）及び乳腺芽がみられた。いずれの所見も若齢動物で認められる発達途上の所見に類似しており、成長・発達の遅れによるものと推察された。

TK 測定では、用量増加に伴う全身曝露の上昇がみられ、反復投与後（投与 4 週間）の曝露量は投与 1 日の約 50%程度となった。性差はみられなかった。曝露量を成獣ラットと比較すると幼若ラットで高い傾向にあった。

以上の結果から、幼若ラットの 4 週間反復経口投与における無毒性量は、雌雄とも 0.1 mg/kg/day 未満と判断された。

2.4.4.6 局所刺激性試験

該当する試験を実施しなかった。

2.4.4.7 その他の毒性試験

該当する試験を実施しなかった。

2.4.5 総括及び結論

本申請の本剤の適応症として考えている難治性リンパ管疾患としては、リンパ管腫（リンパ管奇形)、リンパ管腫症、ゴーハム病、リンパ管拡張症が挙げられる。また本申請の適応症には含まれないが、難治性血管疾患としては、カサバッハ・メリット現象を伴うカポジ型血管内皮腫、房状血管腫、血管奇形などの血管異常症が挙げられる。これらの疾患ではリンパ管あるいは血管を構成する細胞などに腫瘍性の増殖が共通に認められる[1, 2, 3)]。

難治性脈管腫瘍・脈管奇形（難治性リンパ管疾患及び血管疾患）の治療においては、外科的処置、放射線照射及び薬剤治療が実施されているが、薬剤に関しては、国内外を問わずこれらの疾患に対する適応症を有する治療薬はない。種々の疾患に対応してプロプラノロール、抗癌剤、インターフェロン、ステロイドなどを使用した報告例はあるが効果は限定的である[4,5,6,7,8,9,10)]。

シロリムスのリンパ管及び血管異常に対する効力を裏付ける試験に関し、in vitro 試験では正常ヒトの LECs、リンパ管奇形患者由来の LECs 及びマウス EOMA 細胞を用いた試験、in vivo 試験ではマウスのリンパ管内皮腫、血管内皮腫及び静脈奇形動物モデルを用いて薬理作用を検討した。その結果、in vitro 及び in vivo 試験において、シロリムスはマウス及びヒトのリンパ管及び血管内皮腫の増殖を抑制した。ヒト LECs の遊走もシロリムスにより抑制された。臨床研究においてもリンパ管腫、静脈奇形、カサバッハ・メリット減少を伴うカポジ型血管内皮腫などに対し、シロリムスの有効性を示唆する複数の報告がなされているが[11,12,13,14,15)]、上記薬理試験の結果は臨床試験で認められたシロリムスの有効性を裏付けている結果と考えられる。

脈管腫瘍及び脈管奇形は、病因は明確になっていないものの、PI3K/AKT/mTOR 経路の異常活性により、血管内皮細胞、LECs などの異常増殖を起こすことが原因の一つであると考えられている[16,17)]。そこで PI3K/AKT/mTOR シグナル系に対するシロリムスの作用を検討した。その結果、リンパ管内皮細胞及び EOMA 細胞において PI3K/AKT/mTOR シグナル系のリン酸化亢進作用はシロリムスにより抑制されることが認められた。

また、mTOR シグナルの促進は血管形成やリンパ管形成を制御している VEGF の発現量を増加させるが、VEGF の発現量の増加は腫瘍の増殖や遊走に重要である。今回の B13LM 細胞を用いた試験において、シロリムスは細胞増殖抑制作用を示すとともに、リンパ管における VEGF-A 及び VEGF-C の発現量を抑制した。VEGFR-3 はリンパ管内皮細胞に発現しており、リンパ管形成を促進する働きを有するとの報告[18)]及び血管腫における血管内皮細胞増殖に VEGFR-2 が関与するとの報告[3)]とを考え併せると、シロリムスによる VEGF 発現量抑制作用はシロリムスのリンパ管及び血管内皮細胞の増殖や転移抑制作用に関与していると推察される。

以上の薬理作用の結果をまとめると、シロリムスは、細胞の分裂や増殖、生存等を調節する mTOR に結合し、その活性化を抑制することにより、細胞増殖抑制とともに抗血管新生作用、抗リンパ管新生作用を示すと推察される。従って、本剤は難治性脈管腫瘍・脈管奇形に対する治療薬としての有効性が期待される。

毒性試験の結果から幼若ラットと成獣ラット（3 ヶ月経口投与毒性試験[19)]）に共通する毒性所見には、リンパ系組織・器官、生殖器及び肺に対する影響がみられた。リンパ系組織・器官では、リンパ球比の減少、好中球比の高値がみられた。これらはシロリムスの過剰な免疫抑制作用により発現したものと考えられた。生殖器では雄で精巣の重量低下、精細管の萎縮あるいは空胞化（幼

若ラット投与試験)、雌で子宮あるいは卵巣の重量低下がみられた。また、肺では肺胞マクロファージの集簇がともにみられた。成獣動物においては心筋変性及び膵島細胞の空胞化がみられたが、幼若動物ではみられなかった。

幼若ラットのみの変化としては、眼の水晶体において核を有する水晶体線維の増加、大腿骨の成長板の肥厚、関節軟骨の肥厚及び乳腺において乳腺芽がみられた。ラットではこれらの器官は生後に掛けて形成されることが知られており、水晶体は胎生期に一次線維から水晶体核が形成され、その周囲に 2 次線維が形成される。線維細胞はその後脱核して高濃度のタンパク質を含むレンズとしての特性を有し[20]、生後 21 日に組織学的成熟に達する[21]。大腿骨の伸長は骨幹と骨端の境界に位置する成長板又は骨端軟骨板で起こり、性成熟とともに軟骨の分化が促進され、骨端軟骨組織が増殖・肥大化すると考えられる[22]。また、乳腺は胎児期に表皮の一部が皮下に侵入して乳腺芽となり、性成熟まで未発達の乳管を形成する[23]。このようにこれらの器官は動物の成長及び性成熟の発現とともに分化が促進される。0.3 mg/kg/day 以上では体重の増加抑制及び生殖器の発達遅延がみられることから、これらの変化は成長抑制に伴う発達の抑制（又は遅延）であり、シロリムスの特異な毒性ではないと考えられた。その他、成獣ラットと比較し幼若ラットで増悪した変化はみられなかった。

幼若ラットと成獣ラットの全身曝露量を比較したとき、幼若ラットの 0.1 mg/kg/day、4 週間投与後の $AUC_{0\text{-}24h}$ は 9.129(雄)、6.005(雌)ng･h/mL であったのに対し、成獣ラットの 0.2 mg/kg/day、3 週間投与後の $AUC_{0\text{-}24h}$ は 17.9（雄）、7.9（雌）ng･h/mL で、両者の曝露量に大差はなかった。しかし、0.3 及び 1.0 mg/kg/day 投与での曝露量は成獣ラットのそれぞれ 2～3 倍及び 3～4 倍となった。シロリムスは、ラット肝ミクロソームにおいて主にチトクロム P-450（CYP3A）によって代謝されると推察され、幼若動物では薬物代謝酵素の発現が成獣に比べて低いことが知られている。ラットの CYP3A は、出生後から 42 日齢の間に活性が上昇する[24] ほか、3 週齢に比較して 12 週齢まで活性が上昇しその後低下する[25] との報告がある。中・高用量群で曝露量が増加したのは、生後の発達過程において薬物代謝酵素活性の発現が低いために生じたものと推察された。幼若ラットにおける反復投与後（投与 4 週間）の曝露量が投与 1 日の約 50%程度であったのも、薬物代謝酵素の発現変動に起因していると考えられる。

なお、ヒト臨床推奨用量（0.04 mg/kg）での曝露量 120 ng･h/mL（ラパリムス®錠 1 mg 初回申請資料）に対しては、幼若ラットの無毒性量（0.1 mg/kg/day 未満）での曝露量比は 1 倍未満であることから、本剤投与の副作用を最小限に抑えるために臨床症状、臨床検査などをモニタリングすることが望ましい。

2.4.6 参考文献一覧

1 Wassef M, Blei F, Adams D, Alomari A, Baselga E, Berenstein A, Burrows P, Frieden LJ, Garzon MC, Lopez-Gutierrez J-C, Lord DJE, Mitchel S, Powell J, Prendiville J, Vikkula M, on behalf of the ISSVA Board and Scientific Committee. Vascular anomalies classification: recommendations from the International Society for the study of vascular anomalies. Pediatrics 2015;136:e203-e214.＜4.3.2-1＞

2 Brouillard P, Boon L, Vikkula M, Genetics of lymphatic anomalies. J Clin Invest 2014;124:898-904. ＜4.3.2-2＞

3 Medici D and Olsen BR, Rapamycin inhibits proliferation of hemangioma endothelial cells by reducing HIF-1-dependent expression of VEGF. PLOS One 2012;7:e42913＜4.3.2-3＞

4 血管腫・血管奇形・リンパ管奇形診療ガイドライン 2017（第 2 版 2017 年 3 月 31 日）＜4.3.2-4＞

5 Ozeki, M., A. Fujino, K. Matsuoka, S. Nosaka, T. Kuroda, and T. Fukao, Clinical Features and Prognosis of Generalized Lymphatic Anomaly, Kaposiform Lymphangiomatosis, and Gorham-Stout Disease. Pediatr. Blood Cancer. 2016; 63:832-838. ＜4.3.2-5＞

6 Ozeki M and Fukao T, Generalized lymphatic anomaly and Gorham-Stout disease:overview and recent insights. Adv Wound Care (New Rochelle) 2019;8:230-245. ＜4.3.2-6＞

7 Ozeki, M., M. Funato, K. Kanda, M. Ito, T. Teramoto, H. Kaneko, T. Fukao, and N. Kondo, Clinical improvement of diffuse lymphangiomatosis with pegylated interferon alfa-2b therapy: case report and review of the literature. Pediatr. Hematol. Oncol. 2007;24:513-524. ＜4.3.2-7＞

8 de Souza RJSP and Tone LG, Treatment of lymphangioma with alpha-2a-interferon. J Pediatr (Rio J) 2001;77:139-42＜4.3.2-8＞

9 Hagendoorn J, Yock TI, Rinkes IHMB, Padera TP, Ebb DH, Novel molecular pathways in Gorham disease: Implications for treatment. Pediatr Blood Cancer.2014;61:401-406. ＜4.3.2-9＞

10 Ellati, R., A. Attili, H. Haddad, M. Al-Hussaini, and A. Shehadeh, Novel approach of treating Gorham-Stout disease in the humerus--Case report and review of literature. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2016;20:426-432. ＜4.3.2-10＞

11 Raphael MF, Breur JMPJ, Vlasveld FAE, Elbert NJ, Liem YTB, Kon M, Breugem CC and Pasmans SGMA, Treatment of infantile hemangiomas: therapeutic options in regard to side effects and adverse events - a review of the literature. EXPERT OPINION ON DRUG SAFETY, 2016;15:199-214. ＜4.3.2-11＞

12 Triana, P., M. Dore, V.N. Cerezo, M. Cervantes, A.V. Sanchez, M.M. Ferrero, M.D. Gonzalez, and J.C. Lopez-Gutierrez, Sirolimus in the Treatment of Vascular Anomalies. Eur. J. Pediatr. Surg. 2017:27:86-90. ＜4.3.2-12＞

13 Hammill AM, Wentzel M, Gupta A, Nelson S, Lucky A, Elluru R, Dasgupta R, Azizkhan RG and Adams DM, Sirolimus for the Treatment of Complicated Vascular Anomalies in Children. Pediatr Blood Cancer 2011;57:1018-1024. ＜4.3.2-13＞

14 Adams DM, Trenor III CC, Hammill AM, Vinks AA, Patel MN, Chaudry G, Wentzel MS, Mobberly-Schuman PS, Campbell LM, Brookbank C, Efficacy and safety of sirolimus in the treatment of complicated vascular anomalies. Pediatrics 2016;137:e20153257. ＜4.3.2-14＞

15 Freixo C, Ferreira V, Martins J, Almeida R, Caldeira D, Rosa M, Costa J, and Ferreira, J, Efficacy and safety of sirolimus in the treatment of vascular anomalies: A systematic review. J Vasc Surg 2020;71:318-27. ＜4.3.2-15＞

16 Luks VL, Kamitaki N, Vivero MP, et al. Lymphatic and other vascular malformative/overgrowth disorders are caused by somatic mutations in PIK3CA. J Pediatr. 2015 Apr;166(4):1048-54.e1-5. ＜4.3.2-16＞
17 Limaye N, Kangas J, Mendola A, et al. Somatic Activating PIK3CA Mutations Cause Venous Malformation. Am J Hum Genet. 2015 Dec 3;97(6):914-21. ＜4.3.2-17＞
18 Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C and Alitalo K.(2004)"Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins."Nat.Immunol. 5,74-80. PMID 14634646＜4.3.2-18＞
19 Rapamycin-three month oral(gavage) toxicity study with recovery-rat.90069(GTR-19371),19[redacted];[redacted]社内資料＜4.3.3-1＞
20 宇賀 茂三,形態学的にみた白内障発症機序. 日本白内障学会誌 21:5-15, 2009. ＜4.3.3-2＞
21 Vrolyk V.et al. Neonatal and Juvenile Ocular Development in Sprague-Dawley Rats: A Histomorphological and Immunohistochemical Study. Vet Pathol.55:310-330.2018＜4.3.3-3＞
22 上田　晃三,他.骨の成長・発達.バイオメカニズム学会誌 32:57-60,2008＜4.3.3-4＞
23 今岡達彦,他.乳腺の幹細胞系：細胞表面マーカーと細胞系譜追跡の研究から,乳癌基礎研究 25:15-25,2016＜4.3.3-5＞
24 Zwart LD.et al. The ontogeny of drug metabolizing enzymes and transporters in the rat. Reprod Toxicol.26:220-230.2008＜4.3.3-6＞
25 Yun KU.et al. Age-related changes in hepatic expression and activity of cytochrome P450 in male rats. Arch Toxicol.84:939-946.2010＜4.3.3-7＞