2.4 非臨床試験の概括評価

目　次

目　次 2
表 一 覧 2
略号一覧 3
1 諸言 5
2 非臨床試験計画の概要及び GLP 適合性 5
3 薬理試験 5
3.1 効力を裏付ける試験 6
3.1.1 急性 GVHD に対する効果 6
3.1.2 慢性 GVHD に対する効果 7
4 薬物動態試験 7
5 毒性試験 7
5.1 単回投与毒性試験 7
5.2 反復投与毒性試験 7
5.3 遺伝毒性試験 7
5.4 がん原性試験 7
5.5 生殖発生毒性試験 8
5.5.1 幼若動物を用いた毒性試験 8
5.6 曝露量の比較 13
5.7 局所刺激性試験 13
5.8 その他の毒性試験 13
6 不純物及び分解物 13
7 安全性の総合評価 13
8 総括及び結論 16
9 参考文献 17

表 一 覧

Table 5-1 幼若ラットを用いた経口投与毒性試験 8
Table 5-2 幼若ラットを用いた経口投与毒性試験における TK パラメータ 12

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
Acp	tartrate-resistant acid phosphatase	酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ
Atf	activating transcription factor	-
AUC	area under the concentration time curve	薬物濃度-時間曲線下面積
AUC 0-t	area under the drug plasma concentration time curve from time zero to time 't'	0 時間から投与後時間 t までの血漿中薬物濃度-時間曲線下面積
AUCtau	area under the concentration time curve over a dosing interval	1 投与間隔における薬物濃度-時間曲線下面積
Chad	condroadherin	-
Cmax	maximal drug plasma concentration	最高血漿中薬物濃度
Col	collagen	コラーゲン
Csf	colony stimulating factor	コロニー刺激因子
CT	computed tomography	コンピュータ断層撮影
CTx	C-terminal telopeptides of type I collagen	I 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド
CXCR	CXC chemokine receptor	CXC ケモカイン受容体
Dlx	distalless homeobox	-
Fra	Fos-related antigen	-
GAP	growth associated protein	-
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
Gpr	G-protein-coupled receptor	G タンパク質共役型受容体
GVHD	graft versus host disease	移植片対宿主病
GVT	graft versus tumor	移植片対腫瘍
HSCT	hematopoietic stem cell transplantation	造血幹細胞移植
ICH	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for human use	医薬品規制調和国際会議
IFN	interferon	インターフェロン
IL	interleukin	インターロイキン
JAK	janus associated kinase	Janus キナーゼ
M-CSF	macrophage colony stimulating factor	マクロファージコロニー刺激因子
MEST	mesoderm-specific transcription	-
MF	myelofibrosis	骨髄線維症
MHC	major histocompatibility complex	主要組織適合抗原複合体
NR	not reported	報告せず
Opg	osteoprotegerin	オステオプロゲリン
PINP	procollagen type I N-terminal propeptide	I 型プロコラーゲン-N-プロペプチド
pQCT	peripheral quantitative computed tomography	末梢骨定量的コンピュータ断層撮影
PV	polycythemia vera	真性多血症
Rabep	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein	-
RANKL	receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand	-

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
scGVHD	sclerodermatous chronic GVHD	強皮症様の皮膚病変を有する慢性移植片対宿主病
STAT	signal transducer and activator of transcription	シグナル伝達兼転写活性化因子
T_{eff}	effector T cell	エフェクターT 細胞
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
Tnfrs	tumor necrosis factor (ligand) superfamily	腫瘍壊死因子（リガンド）スーパーファミリー
Tnmd	tenomodulin	テノモジュリン
T_{reg}	regulatory T cell	制御性 T 細胞
Tyk	tyrosine kinase	チロシンキナーゼ
Ucma	upper zone of growth plate and cartilage matrix associated	-

1 諸言

ルキソリチニブ（INC424）は Incyte Corporation で創製された Janus キナーゼ（JAK）1 及び JAK2 に選択性を示す JAK 阻害薬である。これまでに，骨髄線維症（MF）及び真性多血症（PV）の治療薬として国内外で承認されている。移植片対宿主病（GVHD）に対するルキソリチニブの有効性及び安全性の成績が得られたことから，ノバルティスファーマ株式会社はルキソリチニブの GVHD に対する製造販売承認事項一部変更承認申請を行うこととした。

2 非臨床試験計画の概要及び GLP 適合性

ルキソリチニブに関する非臨床試験として，薬理試験，薬物動態試験及び毒性試験の成績は，先の承認申請時（骨髄線維症）に提出済みである（1.13.1-1-MF-2.4）。今回の「造血幹細胞移植後の移植片対宿主病」に対する効能・効果追加の一部変更承認申請に際しては，新たに薬理試験として急性及び慢性 GVHD に対する作用に関する試験，毒性試験として幼若動物を用いた経口投与毒性試験を実施し，その結果を記載する。

幼若動物を用いた経口投与毒性試験は，ルキソリチニブを小児に投与する際の安全性を担保する目的で，用量設定試験［医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）非適用］及び主試験（GLP 適用）を実施した。動物種として，成熟動物における毒性試験の供試動物であるラットを選択した。主試験については医薬品規制調和国際会議（ICH）M3 (R2)「医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドライン」及びその他の安全性に関するガイドラインに従い，GLP に準拠して実施した。いずれの試験もノバルティス社が委託した受託試験機関において実施した。

本概括評価では，試験で評価したルキソリチニブの用量は遊離塩基として表記した。ルキソリチニブリン酸塩としての用量への換算には，変換係数 1.32 を使用する。

3 薬理試験

ルキソリチニブは，強力かつ選択的な JAK1 及び JAK2 の阻害剤である。ルキソリチニブは，JAK1 / JAK2 下流のサイトカインシグナル伝達を阻害することで，GVHD における急性期の過剰な炎症性サイトカイン産生を抑制する（Spoerl et al. 2014）。また，ドナー由来エフェクターT 細胞（T_{eff}）の増殖を抑制し，$CD4^+$ T 細胞からインターフェロン（IFN）γ / インターロイキン（IL）17A 産生細胞への分化を抑制する（Spoerl et al. 2014，Heine et al. 2013）。さらに，IFN シグナル伝達の阻害により，GVHD 標的臓器への T 細胞遊走において重要な役割を担う CXC ケモカイン受容体（CXCR）3 の発現を減少させ，移植片対腫瘍（GVT）効果に影響を及ぼすことなく GVHD を抑制する（Choi et al. 2014）。なお，ルキソリチニブは制御性 T 細胞（T_{reg}）の生存及び増殖に必要な JAK3 経路には影響を与えないため相対的な T_{reg} の増加による免疫制御にも寄与していると考えられる（Spoerl et al. 2014）。これまでの非臨床試験からの知見により，急性及び

慢性 GVHD モデルを用いた非臨床試験では，GVHD の病態改善及び死亡率の低下が確認されている（Choi et al. 2014, Zeiser et al. 2015）。

急性 GVHD モデルであるマウス主要組織適合抗原複合体（MHC）不適合同種造血幹細胞移植（HSCT）モデルを用いて，ステロイド未治療条件下では予防期及び治療期に，ステロイド抵抗性の条件下では治療期に，ルキソリチニブを 1 日 2 回 60 mg/kg の用量でそれぞれ経口投与した結果，いずれのルキソリチニブ投与群においても溶媒投与群と比較して，GVHD スコア及び GVHD に伴う体重減少の改善が認められた。また，ステロイド未治療条件下での試験においては，炎症性サイトカイン発現の減少，JAK のシグナル下流であるシグナル伝達兼転写活性化因子（STAT）3 / STAT5 リン酸化の阻害及び病変結腸組織への免疫細胞浸潤の減少を確認した[2.6.2-2.1 項]。さらに，強皮症様の皮膚病変を有する慢性 GVHD（scGVHD）モデルとして，MHC 適合かつマイナー組織適合性抗原不適合のマウスモデルを用いて，治療期にルキソリチニブを 1 日 2 回 60 mg/kg の用量で経口投与した結果，ルキソリチニブ投与群では溶媒投与群と比較して，GVHD スコア及び GVHD に伴う体重減少の改善，皮膚病変の改善並びに死亡率の低下が認められた[2.6.1-2.2 項]。

以上，ルキソリチニブは，JAK1 及び JAK2 を選択的に阻害することで，急性及び慢性 GVHD において炎症性サイトカインを制御し，ドナー由来エフェクターT 細胞（T_{eff}）の活性化，増殖，分化及び遊走を抑制する。その結果，GVHD の病態形成の抑制に寄与し，GVT 効果に影響を与えることなく急性及び慢性 GVHD に対して効果を発揮すると期待できる。

3.1 効力を裏付ける試験

3.1.1 急性 GVHD に対する効果

ステロイド未治療の急性 GVHD マウスモデルに対するルキソリチニブの効果

急性 GVHD モデルである MHC 不適合同種 HSCT マウスモデルを用いて，同種 HSCT 移植前 3 日目の予防期又は移植後 14 日目の治療期より，ルキソリチニブを 1 日 2 回 60 mg/kg の用量でそれぞれ経口投与し，ステロイド未治療条件下におけるルキソリチニブの急性 GVHD に対する作用を検討した[2.6.3.1-PRECLIN-18.02.1]。その結果，いずれのルキソリチニブ投与群においても溶媒投与群と比較して，GVHD スコア及び GVHD に伴う体重減少の改善が認められた。また，炎症性サイトカイン発現の減少，JAK のシグナル下流である STAT3 / STAT5 リン酸化の阻害及び病変結腸組織への免疫細胞浸潤の減少を確認した。

ステロイド抵抗性の急性 GVHD モデルに対するルキソリチニブの効果

急性 GVHD モデルである MHC 不適合同種 HSCT マウスモデルを用いて，同種 HSCT 移植後 14 日目より，プレドニゾロン（1.0，0.3 及び 0.1 mg/kg）の投与を開始して，ステロイド抵抗性の急性 GVHD モデルを作製し，ステロイド抵抗性の条件下におけるルキソリチニブの作用を検討

した[2.6.3.1-PRECLIN-18.02.1]。ステロイド抵抗性を確認後，移植後 31 日目に 1 日 2 回 60 mg/kg の用量でルキソリチニブの経口投与を開始し，移植後 56 日目まで投与した。その結果，ステロイドからルキソリチニブ投与への切替え後，溶媒投与群と比較して，GVHD スコア及び GVHD に伴う体重減少の改善及び死亡率の低下が認められた。

3.1.2 慢性 GVHD に対する効果

scGVHD モデルとして，MHC 適合かつマイナー組織適合性抗原不適合のマウスモデルを用いて，同種 HSCT 移植後 21 日目から 56 日目の試験終了時まで，ルキソリチニブを 1 日 2 回 60 mg/kg の用量で経口投与し，ルキソリチニブの慢性 GVHD に対する作用を検討した[2.6.3.1-PRECLIN-20]。その結果，ルキソリチニブ投与群では溶媒投与群と比較して，scGVHD スコア及び GVHD に伴う体重減少の改善，無増悪生存期間の延長及び死亡率の低下が認められた。また，皮膚病変の改善，並びに皮膚及び肺の炎症の減少がみられた。

4 薬物動態試験

該当事項なし

5 毒性試験

ルキソリチニブに関する毒性試験として，単回及び反復毒性試験，遺伝毒性試験，がん原性試験，生殖発生毒性試験，並びに皮膚感作性／光毒性／光感作性試験は先の承認申請時（骨髄線維症）に提出済みである。ルキソリチニブを小児に投与する際の安全性を担保する目的で幼若ラットを用いた経口投与毒性試験として用量設定試験（1570143 試験）及び主試験（1570144 試験）を実施した。

5.1 単回投与毒性試験

記載事項なし

5.2 反復投与毒性試験

記載事項なし

5.3 遺伝毒性試験

記載事項なし

5.4 がん原性試験

記載事項なし

5.5 生殖発生毒性試験

ルキソリチニブの生殖発生毒性試験として，ラット及びウサギを用いた催奇形性，ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に対する影響，出生児の出生前後の発達及び母動物の機能に対する影響が検討され評価済みである。以下に新たに実施した幼若動物を用いた毒性試験結果について示した。

5.5.1 幼若動物を用いた毒性試験

幼若ラットを用いた経口投与毒性試験（用量設定試験及び主試験）を実施した（Table 5-1）。

Table 5-1 幼若ラットを用いた経口投与毒性試験

動物種	試験の種類	投与経路	動物数／群	用量（mg/kg/日）	投与期間	試験番号
ラット	幼若動物を用いた毒性試験（用量設定試験）	経口	雌雄各 12	0，5，15，30，50，75	生後 7～41 日	1570143
ラット	幼若動物を用いた毒性試験	経口	主試験群 雌雄各 12	0，1.5，5，15，60	生後 7～63 日，14～63 日，21～63 日	1570144
			受胎能検査群 雌雄各 20	0，5，15，60	生後 21～63 日	
			機序検討群 雌雄各 8	0，30	生後 7～10 日	

Source: Table2.6.7.11-1570143, Table2.6.7.15-1570144

5.5.1.1 幼若動物を用いた毒性試験（用量設定試験，1570143 試験）

幼若ラット（Sprague-Dawley）を用いた毒性試験の用量設定試験（試験番号：1570143）をGLP 非適用で実施し，ルキソリチニブを 0（対照），5，15，30，50 又は 75 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回経口投与した。投与期間は生後 7～41 日までとし，剖検を生後 42 日に実施した。

その結果，15 mg/kg/日以上の群で骨への影響が認められ，30 mg/kg/日以上の群では死亡又は切迫殺に至り早期に試験を終了させた。30 mg/kg/日群の病理検査において，投薬に関連した骨の変化として海綿骨の増加，骨端軟骨の変性及び壊死，骨端骨折，及び骨幹部での仮骨形成が認められた。X 線検査において尺骨，脛骨及び腓骨に骨透亮線像がみられ，投薬に関連した骨折と判断された。また，上腕骨，尺骨及び脛骨に X 線不透過像が認められた。これらの X 線検査所見は骨の変化と概ね一致しており，骨透亮線像は骨端軟骨の変性及び壊死，骨折並びに骨幹部の仮骨と，X 線不透過線像は海綿骨の増加と一致していた。15 mg/kg/日群の病理検査において海綿骨増加が認められ，X 線検査でみられた X 線不透過線像と一致していた。また，24 例中 2 例（いずれも雌）において肩甲骨骨端での軽微な骨折が認められた。15 mg/kg/日群のマイクロコンピュータ断層撮影（CT）による骨検査で，雄において骨伸長の軽微な遅延及び骨髄腔拡大の減少，並びに雌雄で皮質厚の増加が認められた。雄の脛骨骨幹中央での皮質骨密度は対照群と比べて 1.2%

増加し有意差が認められた。これらの 15 mg/kg/日以下の群で得られた検査所見では，30 mg/kg/ 日以上の群で認められた骨折の原因となる変化は観察されなかった。5 mg/kg/日群では X 線検査及び病理検査で変化は認められなかった。

5.5.1.2 幼若動物を用いた毒性試験（1570144 試験）

本試験（試験番号：1570144）はルキソリチニブを幼若ラットに生後 7 日，14 日又は 21 日から 63 日（9 週齢）まで反復経口投与したときの毒性及びその後 12 週間の休薬による回復性を評価することを目的として GLP 適用で実施した。

ルキソリチニブ含有 0.5%メチルセルロース溶液を幼若ラット（Sprague-Dawley，1 群雌雄各 12 例）に 0（対照），1.5，5 又は 15 mg/kg/日の用量で生後 7～63 日まで，0（対照）又は 15 mg/kg/ 日の用量で生後 14～63 日まで，0（対照），5，15 又は 60 mg/kg/日の用量で生後 21～63 日までそれぞれ 1 日 1 回経口投与した。また，回復性試験群として 1 群雌雄各 12 例に同様に投与し，生後 64～147 日の期間休薬して 12 週間の休薬による回復性を評価した。さらに投薬による骨への影響を詳細に評価する機序検討群として 1 群雌雄各 8 例に 0（対照）又は 30 mg/kg/日の用量で生後 7～10 日まで投与し，生後 11 日に剖検した。

対照群の 2 例を含む 9 例が死亡又は切迫殺に至った。死因は敗血症 3 例，悪性リンパ腫 1 例，不明 5 例であった。特定の群における発生頻度の増加はみられず，これらの死因は偶発的なものと判断されたことから，いずれの個体の死亡も投薬に起因した死亡ではないと判断された。

投薬に関連した一般状態の変化は認められず，身体発達評価（開眼，膣開口及び包皮分離），視覚機能及び生殖能検査［性周期，交配所要日数，交尾率，受胎率，妊娠率，黄体数及び子宮パラメータ（着床数，吸収胚数及び死亡胎児数，生存胎児数，着床前及び着床後死亡率）］，血液生化学的検査，血液凝固検査及び尿検査において投薬による影響は認められなかった。

体重の変化として，生後 7～63 日投与の 5 mg/kg/日以上の群の雄及び 15 mg/kg/日群の雌，生後 14～63 日投与の 15 mg/kg/日群の雌雄，生後 21～63 日投与の 5 mg/kg/日以上の群の雄において軽度の体重増加抑制がみられた。より幼若な日齢から投与を開始した動物では早期から体重増加抑制が認められた。体重増加抑制は概ね回復期間終了まで持続的に認められ，摂餌量の減少を伴っていたが，生後 21～63 日投与の群では 15 mg/kg/日以下の用量で摂餌量への影響は認められず，また 60 mg/kg/日の雌では回復期間中に体重増加抑制及び摂餌量減少が認められた。

血液学的検査において，生後 7～63 日投与の 1.5 mg/kg/日以上の群の雄及び 5 mg/kg/日以上の群の雌，生後 14～63 日投与の 15 mg/kg/日群の雌雄，生後 21～63 日投与の 15 mg/kg/日以上の群の雄，並びに 5 及び 60 mg/kg/日の雌において，軽微から軽度のリンパ球数の減少がみられた。また，生後 14～63 日の 15 mg/kg/日群の雄及び生後 21～63 日投与の 15 mg/kg/日以上の群の雌雄で軽微な網状赤血球数の減少が認められた。いずれの変化も休薬により回復した。リンパ球数減少に関連する変化として，白血球数の減少，胸腺及び脾臓重量の減少，並びに骨髄及び脾臓における造血細胞密度の減少が，また，網状赤血球数の減少に関連する変化として病理検査において

骨髄における造血細胞密度の減少及び脾臓における造血の減少が認められた。血液塗抹検査では投薬に関連した変化は認められなかった。

投与期間終了時（9 週齢）の X 線検査では，5 mg/kg/日以上の群の雄及び 15 mg/kg/日群の雌で大腿骨及び腰椎のサイズ（直径及び長さ）の減少がみられ，回復期間終了時点においても観察された。生後 7～63 日投与動物での変化は他の群と比較してより重度かつ広範囲にわたっており，変化の重篤度及び範囲は投与開始日齢がより幼若であるほど顕著になる傾向がみられた。また，用量依存性も認められた。骨のサイズ減少に関連して，pQCT（6 週齢及び 9 週齢）では骨量の減少及び骨構造の変化が認められ，一部の動物において骨密度の変化（概ね増加）を伴っていた。これらの動物では体重増加抑制がみられたことから，成長速度及び骨成長の抑制が示唆された。投与期間終了時において，15 mg/kg/日以上の群の雌雄の脛骨骨幹中央部に X 線不透過像として検出される横断線が認められ，投薬に関連する可能性が示唆されたが，病理組織学的所見を伴わない軽微な変化であったことから毒性学的意義は不明であった。投薬に関連した骨の変化は一部を除き，概ね 12 週間の回復期間後に部分的，又は完全に回復した。回復性が認められなかった変化は，生後 14～63 日の 15 mg/kg/日群又は 21～63 日投与の 60 mg/kg/日群の雌の腰椎長，生後 21～63 日投与の 60 mg/kg/日群の雄での大腿骨及び腰椎長，並びに生後 7～63 日投与の 5 mg/kg/日以上の群の雄及び 15 mg/kg/日群の雌の脛骨近位骨端の pQCT パラメータであった。このうち，生後 14～63 日又は 21～63 日投与の 15 mg/kg/日の雌又は 60 mg/kg/日の雌雄では，回復性試験終了時の平均体重の減少を伴っていた。

生後 7～63 日投与の，5 mg/kg/日以上の群の雌雄の脾臓，15 mg/kg/日群の雌雄の胸腺及び 15 mg/kg/日群の雄の副腎で重量減少がみられた。病理組織学的変化として，15 mg/kg/日群の雌で骨髄に軽微な造血細胞密度の低下が認められ，投薬に関連した変化と判断された。これらの変化は休薬により回復性が認められた。

生後 14～63 日投与の 15 mg/kg/日群の雌では，脾臓重量の減少が認められ，病理組織学的変化として脾臓の赤脾髄に軽微な細胞密度の低下が認められた。これらの変化は回復性が認められた。

生後 21～63 日投与のすべての群の雌雄で脾臓重量の減少，15 mg/kg/日以上の群の雄及び 60 mg/kg/日群の雌で副腎重量の減少，並びに 60 mg/kg/日群の雄及び 15 mg/kg/日以上の群の雌で胸腺重量の減少がみられた。脾臓及び副腎重量の減少に関連して，病理組織学的変化として 60 mg/kg/日群の雌雄で赤脾髄に軽微から軽度の細胞密度の低下，15 mg/kg/日以上の群の雄で副腎皮質に軽微な萎縮が認められた。また，60 mg/kg/日群の雌の骨髄に軽微から軽度の造血細胞密度の低下が認められた。これらの変化は回復性が認められた。

機序検討群（30 mg/kg/日を生後 7～10 日に投与）における骨の評価では，生後 11 日に実施した骨代謝マーカー測定において雌雄ともに骨形成マーカーである血清中 I 型プロコラーゲン-N-プロペプチド（PINP）が顕著に減少したが，骨吸収マーカーである血清中 I 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド（CTx）への影響は認められなかった。右前肢及び右後肢の病理検査では，主として大腿骨及び上腕骨の近位側並びに脛骨の遠位側骨端において，骨端軟骨及び一次海綿骨に軽微な

限局性の変性及び壊死が認められ，骨成長抑制に起因した変化と考えられた。上腕骨及び大腿骨を用いた遺伝子発現解析では，上腕骨の骨及び軟骨において，破骨細胞関連遺伝子のアップレギュレーション及び間葉系幹細胞関連遺伝子のダウンレギュレーションが認められた。アップレギュレーションした破骨細胞関連遺伝子には，代表的なマーカーである酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ 5（*Acp 5*）及び *cathepsin K* のほか，リソソームマーカーである *lysosomal H+ transporting ATPase* 及び *cathepsin Z*，並びに破骨細胞分化に関わる *Gpr68* であり，ダウンレギュレーションした間葉系幹細胞関連遺伝子は，mesoderm-specific transcription（*MEST*），growth associated protein 43（*GAP43*），テノモジュリン（*Tnmd*）及びコラーゲン類（*Col6α6* 及び *Col14α1*）であった。また，上腕骨の骨及び軟骨で，成熟軟骨芽細胞／軟骨細胞関連遺伝子マーカーで発現プロファイルが類似し共発現がみられる遺伝子［condroadherin（*Chad*），upper zone of growth plate and cartilage matrix associated（*Ucma*）及びコラーゲン類（*Col10α1*，*Col2α1* 及び *Col9α3*）］について解析した結果，これらの遺伝子発現には個体間差がみられ，対照群と投与群との比較では投薬に関連した明らかな影響は認められなかった。なお，投与群の 1 例においてこれらの遺伝子発現が最も低下したが，対照群での最も低下した動物と比べるとその低下した程度はわずかであった。大腿骨骨髄において，骨吸収関連遺伝子として RANKL / *Tnfsf11* の軽微な発現上昇（対照群と比較して 1.3 倍の上昇）がみられたが，オステオプロゲリン（Opg）/ *Tnfrsf11b*，マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）/ *Csf1*，及び RANKL / *Tnfsf11*：Opg / *Tnfrsf11b* 比では投薬に関連した明らかな影響は認められなかった。また，大腿骨骨髄での骨芽細胞関連遺伝子［アルカリフォスファターゼ *Alpl*，I 型コラーゲン（*Col1a1*，*Col1a2*）］，骨形成関連遺伝子（activating transcription factor-4 *Atf4*，distalless homeobox *Dlx*，Fos-related antigen Fra / *Rabep2*）及び JAK-STAT 経路の主な骨恒常性関連遺伝子（*Tyk2*，*Stat3*，*Stat5b*）に投薬の影響はみられなかった。上腕骨又は大腿骨の骨髄において分化段階早期の T 細胞及び B 細胞並びに細胞分裂を示す遺伝子のダウンレギュレーションが認められた。これは JAK 阻害剤の薬理作用に基づいた変化であった。また，大腿骨骨髄で単球及びマクロファージを示す遺伝子のアップレギュレーションが認められた。

トキシコキネティクス（TK）測定の結果，血漿中曝露量は初回投与及び投与終了時のいずれにおいても概ね用量依存的に増加した（Table 5-2）。生後 7～63 日及び 14～63 日投与の各群で，投与終了時の曝露量は，初回投与後と比べ概ね減少した。生後 21～63 日投与群での投与終了時の曝露量は，雌では初回投与と同程度であり，雄では初回投与と比べて低く，1 / 10～1 / 42 倍であった。

Table 5-2 幼若ラットを用いた経口投与毒性試験における TK パラメータ

投与開始	投与量（mg/kg/日）		1.5		5		15		60	
			雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
生後 7 日	生後 7 日	Cmax	41.5	42.7	292	189	623	714	-	-
		AUC 0-24h	171	158	811	785	2520	3010	-	-
	生後 63 日	Cmax	4.64	39.3	17.2	138	103	336	-	-
		AUC 0-24h	NR	44.7	NR	136	187	483	-	-
生後 14 日	生後 14 日	Cmax	-	-	-	-	351	494	-	-
		AUC 0-24h	-	-	-	-	1920	2370	-	-
	生後 63 日	Cmax	-	-	-	-	112	457	-	-
		AUC 0-24h	-	-	-	-	88.3	560	-	-
生後 21 日	生後 21 日	Cmax	-	-	129	117	787	423	1150	2520
		AUC 0-24h	-	-	373	276	1340	1140	10000	7960
	生後 63 日	Cmax	-	-	24.8	103	84.7	368	166	1320
		AUC 0-24h	-	-	36.4	151	133	697	237	8630

Source：Table 2.6.7.15-1570144

単位：Cmax（ng/mL），AUC 0-24h（ng*h/mL）

-：投与群を設定していないため測定せず

NR（not reported）：濃度を定量できた血漿サンプルが 3 未満であったため，データは得られていない

以上，幼若ラットを用いた経口投与毒性試験において，ルキソリチニブを 1.5，5 及び 15 mg/kg/ 日の用量で生後 7～63 日，15 mg/kg/日で生後 14～63 日，並びに 5，15 及び 60 mg/kg/ 日で生後 21～63 日に経口投与したとき，5 mg/kg/日以上の群で摂餌量の減少，体重増加抑制，骨のサイズ（直径及び長さ）の減少が認められた。骨のサイズ減少に関連した変化として，骨量の減少及び骨の構造変化が認められ，一部の動物において骨密度の変化（概ね増加）を伴っていた。骨の変化は投与開始齢がより幼若であるほど著しく，低日齢動物においてより重症で広範にわたる変化が認められた。高日齢動物では高用量が投与されたものの，その毒性変化は軽度で低日齢動物と類似しており，回復傾向が認められた。

5.5.1.3 生殖発生毒性試験の総合評価

幼若動物を用いた経口投与毒性試験において，1.5～75 mg/kg/日の用量で生後 7 日，14 日，又は 21 日齢の幼若ラットに連日経口投与した結果，生後 7 日から投与を開始した 30 mg/kg/日以上の群で骨折が認められ早期に試験を中止した。5 mg/kg/日以上の群で投与開始齢にかかわらず骨のサイズ（直径及び長さ）減少が認められ，骨成長の抑制が示唆された。骨への影響以外は幼若ラットにおいても成熟ラットと同様の毒性プロファイルが認められた。

生後 7 日から投与を開始した動物では，骨への影響はより重度かつ広範囲にわたっており，体重増加抑制を伴っていた。これらの変化の回復性は投与開始齢及び用量／曝露量に依存しており，

12 週間の回復期間後の回復性は低日齢若しくは高用量／高曝露量の動物で乏しく，高日齢若しくは低用量／低曝露量で回復又は回復傾向を示した。

5.6 曝露量の比較

生後 7 日（ヒトで新生児に相当），14 日（ヒトで 1 歳に相当）及び 21 日（ヒトで 2～3 歳に相当）の幼若ラットに 1.5～75 mg/kg/日の用量で反復経口投与した結果，生後 7 日から投与を開始した群では 30 mg/kg/日以上で骨折が認められ，曝露量（非結合型 AUC0-24h，ラット血漿タンパク非結合率 18%を用いて算出）は 1200 ng*h/mL 以上であった。また，生後 7 日投与開始の 5 mg/kg/日群，生後 14 日投与開始の 15 mg/kg/日群で骨成長抑制が認められ，曝露量（非結合型 AUC0-24h）は 140 ng*h/mL 以上であった。幼若ラットでこれらの骨折及び骨成長抑制が認められた曝露量は，成人及び 12 歳以上の小児 GVHD 患者にルキソリチニブ 10 mg を 1 日 2 回投与したときの推定臨床曝露量を上回っており，骨折が認められた曝露量では約 18 倍，骨成長抑制が認められた曝露量では約 2 倍であった［C2301 試験；AUCtau（算術平均値） 961.9 ng*h/mL，ヒト血漿タンパク非結合率 3.3%を用いて算出，推定 AUC は 0~24 時間の値とするため AUCtau を倍加している］（5.3.5.1-1-Table 14.2-3.3.1）。GVHD 患者を対象とした臨床試験（C2301 及び D2301 試験）の薬物動態評価では，12 歳以上の小児と成人，及び，日本人と外国人との間に明らかな違いは認められなかった[2.7.2-3.1 項]。なお，本邦で承認されている最高臨床用量はルキソリチニブ 25 mg を 1 日 2 回投与であり，適応症である成人 MF 患者にこの用法用量を投与したときの推定臨床曝露量との比較では，幼若ラットで骨折が認められた曝露量では約 13 倍，骨成長抑制が認められた曝露量では約 1.5 倍であった（INCB18424-251 試験，非結合型推定 AUC0-24h 288 ng*h/mL から算出）（1.13.1-1-MF-2.4-Table 5.5）。

5.7 局所刺激性試験

記載事項なし

5.8 その他の毒性試験

記載事項なし

6 不純物及び分解物

記載事項なし

7 安全性の総合評価

JAK-STAT 経路が，骨成長，恒常性及び機械的負荷に対する反応に関与していること示す報告があるが，この経路の筋骨格系における意義についての詳細は明らかにされていない（Li 2013）。また，これまでの公表文献に JAK 阻害剤と幼若動物の骨成長との関連性を示す結果の報告はな

く，ルキソリチニブが JAK-STAT 経路を介して破骨細胞，骨芽細胞及び骨細胞に直接作用する可能性を示す報告はない。

幼若ラットを用いた経口投与毒性試験（GLP 適用）では機序検討群を設定した。当該試験群の用量は，用量設定試験で骨への影響（骨折，仮骨，骨端の変性又は壊死）が認められた 30 mg/kg/ 日を選択し，生後 7～10 日の 4 日間投与した。大腿骨及び上腕骨を用いた遺伝子発現解析では，上腕骨の骨及び軟骨において，破骨細胞関連遺伝子のアップレギュレーション及び間葉系幹細胞関連遺伝子のダウンレギュレーションが認められた。大腿骨骨髄では，骨芽細胞関連，骨吸収関連及び骨形成関連遺伝子，並びに骨恒常性に関連する JAK-STAT 経路遺伝子の発現に投薬と関連した変化は認められなかった。また，上腕骨又は大腿骨骨髄において，分化段階早期の T 細胞及び B 細胞並びに細胞分裂を示す遺伝子のダウンレギュレーションが認められ，これは JAK 阻害剤の薬理作用に基づいた既知の変化であった。また，大腿骨骨髄で単球及びマクロファージを示す遺伝子のアップレギュレーションが認められた。

以上，本試験において，機序検討群の遺伝子発現解析では骨吸収マーカー，骨芽細胞／骨形成関連遺伝子の変化が認められなかったこと，生後 63 日まで反復経口投与した群では本薬の影響による骨成長抑制が示唆されたが，動物の成長及び骨格発達の経過に伴い程度及び範囲が低下していたことから，本薬の骨代謝に対する直接作用はないものと考えられる。

本薬が破骨細胞（骨吸収増加）に対する直接作用を有する場合，成熟動物において骨リモデリングの活性化及び急速な骨量減少（ほとんどが海綿骨），並びに骨吸収の増加による骨髄腔の拡張と皮質骨の菲薄化を示すものと考えられる。これまでに実施した本薬の成熟ラットを用いた毒性試験では，7 週齢のラット（ヒトでの 12 歳に相当）に反復投与したとき，このような変化は認められなかった。さらに，マウスでは 26 週間（投与開始 8 週齢），ラットでは 104 週間（投与開始 7 週齢），イヌでは 52 週間（投与開始 4～5 ヵ月齢）までの反復投与により，骨折及び骨の病理組織学的変化は認められなかった（1.13.1-1-MF-2.6.6-3 項，1.13.1-1-MF-2.6.6-5 項）。

生後 7 日，14 日及び 21 日目の幼若ラットに本薬を反復経口投与したとき成長抑制が認められ，曝露量（非結合型 AUC0-24h）は 0.45 µM*h（140 ng*h/mL）以上であった。用量設定試験において，生後 7 日から高用量を投与した動物で骨折が認められ，曝露量（非結合型 AUC0-24h）は約 3.9 µM*h（1211 ng*h/mL）であった。これらの変化は体重増加抑制を伴っており，12 週間の休薬後でも回復が認められない，又は部分的な回復が認められた。

以上，極めて幼若な動物（ヒト新生児に相当）では骨への影響が認められたが，ヒト 12 歳以上に相当する動物では骨への影響は認められなかった。骨成長に対する影響は骨格発達段階に基づいて予想することができ，成熟動物でのリスクは想定されないが，発達段階にある幼若期で特により低年齢であるほどリスクが高いと考えられた。また，幼若ラットで影響が認められたときの曝露量は GVHD 患者（12 歳以上の小児及び成人を対象，10 mg を 1 日 2 回投与）での推定曝露量及び本邦で承認されている最高臨床用量（骨髄線維症の成人患者を対象，25 mg を 1 日 2 回投

与）での推定曝露量を上回っていた。この幼若期に生じた本薬の影響は投薬中止に伴いみられなくなるものの，骨格発達の損失を完全に補うことはできない可能性がある。

8 総括及び結論

ルキソリチニブは JAK1 及び JAK2 を選択的かつ強力に阻害しそのシグナル伝達を抑制する。その結果，GVHD の病態において，炎症性サイトカイン産生を抑制，並びにドナー由来 T_{eff} の活性化，増殖，分化及び遊走を制御することで，GVHD による臨床症状の改善及び死亡率の低下に寄与することが期待される。

ルキソリチニブを小児に投与する際の安全性を担保する目的で幼若ラットを用いた経口投与毒性試験［用量設定試験（GLP 非適用）及び主試験（GLP 適用）］を実施した。その結果，骨への影響が認められ，骨成長抑制及び成長抑制が示唆された。生後 7 日（ヒトで新生児に相当），14 日（ヒトで 1 歳に相当）及び 21 日（ヒトで 2～3 歳に相当）の幼若ラットに 1.5～75 mg/kg/日の用量で反復経口投与した結果，生後 7 日から投与を開始した群では 30 mg/kg/日以上で骨折が認められ，曝露量（非結合型 AUC0-24h）は 1200 ng*h/mL 以上であった。また，生後 7 日投与開始の 5 mg/kg/日群，生後 14 日投与開始の 15 mg/kg/日群で骨成長抑制が認められ，曝露量（非結合型 AUC0-24h）は 140 ng*h/mL 以上であった。幼若ラットでこれらの骨折及び骨成長抑制が認められたときの曝露量は推定臨床曝露量を上回っており，GVHD 患者（12 歳以上の小児及び成人）に本剤 10 mg を 1 日 2 回投与したときの曝露量のそれぞれ約 18 倍及び約 2 倍，成人 MF 患者に最高臨床用量（本剤 25 mg を 1 日 2 回投与）を投与したときの曝露量のそれぞれ約 13 倍及び約 1.5 倍であった。本薬の骨への影響は低日齢動物であるほど重症であった。これらの変化の回復性は低日齢若しくは高用量／高曝露量の動物で乏しく，高日齢若しくは低用量／低曝露量で回復又は部分的な回復を示した。これまでに実施したラット（ヒトで 12 歳以上に相当）での毒性試験では骨の変化は認められておらず，また，骨への影響以外は幼若ラットにおいても成熟ラットと同様の毒性プロファイルが認められた。

以上から，本薬の骨成長に対する潜在的影響は，小児における曝露量及び骨格発達段階に関連するものと推察された。本剤の予定投与対象患者である 12 歳以上の小児及び成人では骨成長に対する影響は想定されないが，2 歳未満，特に 1 歳未満の小児では影響を及ぼす可能性が考えられる。骨変化の閾値における曝露量は推定臨床曝露量を上回っており，骨成長に及ぼす影響は可逆的と考えられるが，骨形成完了前及び成長途中に生じた発育遅延は，投与終了後の骨成長により十分に補填されない可能性がある。したがって，特に 1 歳未満の小児への投与に際しては，成長に及ぼす潜在的影響と期待される効果を考慮して判断する必要がある。

以上，一連の非臨床試験成績から，造血幹細胞移植後の GVHD の治療薬として添付文書に規定した用法及び用量でルキソリチニブを使用することは支持されると考えた。

9 参考文献

[Choi J, Cooper ML, Alahmari B, et al. (2014)] Pharmacologic blockade of JAK1/JAK2 reduces GvHD and preserves the graft-versus-leukemia effect. PLoS One; 9(10):e109799.

[Heine A, Held SAE, Daecke SN, et al. (2013)] The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. Blood; 122(7):1192-202.

[Li J (2013)] JAK-STAT and bone metabolism. JAKSTAT; 2(3):e23930.

[Spoerl S, Mathew NR, Bscheider M, et al. (2014)] Activity of therapeutic JAK 1/2 blockade in graft-versus-host disease. Blood; 123(24):3832-42.

[Zeiser R, Burchert A, Lengerke C, et al. (2015)] Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: a multi-center survey. Leukemia; 29(10):2062-8.