2.6.1 緒言

タグラキソフスプ（本薬）は、ジフテリア毒素（DT）とヒトインターロイキン（IL）-3 からなる遺伝子組換え融合タンパク質であり、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍（BPDCN）の治療を目的として開発された。

本薬は IL-3 受容体 α サブユニット（IL-3Rα）を標的とした初の薬剤であり、本薬の配列中に含まれる DT に起因する作用に基づき、IL-3Rα を発現する腫瘍細胞のタンパク合成を阻害し、アポトーシスを誘導することによって抗腫瘍効果を発揮する。IL-3Rα は正常細胞に比較して様々な造血器腫瘍細胞で過剰に発現していることから、本薬により正常細胞への有害作用を抑えながら腫瘍細胞を標的とした治療が期待できる。

以下に、IL-3 受容体や IL-3Rα、DT の機能について学術文献をもとに概説したのち、本薬の作用機序を説明する。

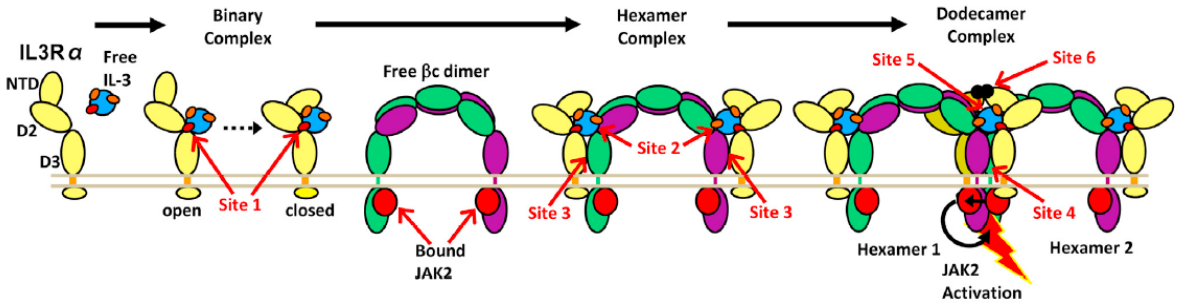
2.6.1.1 IL-3 受容体（IL-3R）

IL-3R は IL-5 受容体（IL-5R）や顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体（GM-CSFR）と同じ受容体サブファミリーに属し、造血幹細胞の増殖、分化、及び生存に関わる。

IL-3R は α と β の 2 つのサブユニットから構成される。α サブユニット（すなわち IL-3Rα）はサイトカイン特異的であり、リガンドである IL-3 と低親和性に結合する。IL-3Rα は別名「CD123 抗原」とも呼ばれている。β サブユニットは β common（βc）と呼ばれ、IL-5R 及び GM-CSFR と共通のサブユニットである。βc は単独ではリガンドと結合しないが、α サブユニットと会合することで高親和性の受容体として機能する[1, 2]。α サブユニットはそのサイトカイン特異性によってリガンドの認識と結合に寄与し、βc は高親和性のリガンド結合とシグナル伝達に寄与する。

IL-3 が IL-3Rα に結合すると、βc がリクルートされて受容体の会合が起こり、IL-3/IL-3R 複合体が形成される[3]（図 2.6.1.1-1）。この IL-3/IL-3R 複合体は下流のシグナル経路［Janus kinase/signal transducers and activators of transcription（JAK/STAT）、Ras-mitogen-activated protein kinase（Ras/MAPK）、phosphoinositide 3 kinase-PKB（PI3K-PKB）、p38 経路など］を活性化し、様々な遺伝子の転写に影響を与える、もしくは直接的にその機能を修飾することによって、細胞の増殖、分化、及び生存に関わる機能を調節している[2, 4, 5]。

後述（2.6.1.2 項）するように、IL-3Rα は様々な造血器腫瘍において過剰に発現している。活性化された IL-3/IL-3R シグナル経路によって腫瘍細胞の増殖や生存が亢進し、疾患が進行すると考えられる。



D：ドメイン、NTD：N 末端ドメイン

図 2.6.1.1-1 IL-3R の活性化

IL-3 が IL-3Rα に結合すると、複数の相互作用部位（Site 1～6）を介して βc と会合し、安定化した IL-3/IL-3R 複合体が形成される。この IL-3/IL-3R 複合体により下流のシグナル伝達が可能となる。

［4.3-9 Fig.5A を引用］

2.6.1.2 IL-3Rα の発現

正常造血における IL-3Rα の発現は細胞の分化状態や系統に特異的である。$CD34^{+}CD38^{-}$造血幹細胞における IL-3Rα の発現は陰性又は低く、$CD34^{+}$骨髄系前駆細胞における IL-3Rα の発現は比較的高い。細胞の分化が進むにつれて、IL-3Rα の発現は単球系や顆粒球系では維持されるが、赤血球系や巨核球系ではほぼ消失する。成熟細胞での IL-3Rα の発現は形質細胞様樹状細胞（pDC）、好塩基球、単球、好酸球など一部の免疫細胞に限られ、特に pDC や好塩基球での発現が高い [6, 7, 8]。

一方で、様々な造血器腫瘍において IL-3Rα が過剰に発現していることが報告されている。一部の造血器腫瘍では白血病幹細胞にも IL-3Rα が過剰に発現しており、疾患進行・再発に関連し、治療標的としてだけではなく、診断時、治療中及び再発時のバイオマーカーとしても注目される。IL-3Rα の発現レベルが高いと化学療法への反応性が低く、患者予後に影響する可能性なども示唆されている。

BPDCN は pDC 由来の血液腫瘍であり [9, 10]、成人・小児によらず、ほぼすべての患者において IL-3Rα の過剰な発現が認められる。

BPDCN を含む様々な造血器腫瘍における IL-3Rα の発現や病態への関与について、学術文献に基づく情報を表 2.6.1.2-1 に示す。

表 2.6.1.2-1　主な造血器腫瘍における IL-3Rα（CD123）に関する情報（学術文献）

造血器腫瘍	検出方法	報告者	IL-3Rα に関する記載内容
BPDCN	FCM/IHC	Tsagarakis ら [11]	BPDCN 患者全例（20 例）の骨髄/末梢血/皮膚/リンパ節で CD123 陽性であった。
	IHC	Hashikawa ら [12]	BPDCN 患者 18/24 例（75%）の骨髄/皮膚/リンパ節で CD123 陽性であった。
	IHC	An ら [13]	BPDCN 患者全例（7 例）の骨髄/皮膚/リンパ節で CD123 陽性であった。
	FCM	Garnache-Ottou ら [14]	BPDCN 患者全例（16 例、pDCL と表記）の骨髄で CD123 陽性であり、AML や ALL に比べて CD123 発現レベルが高かった。
	IHC	Julia ら [15]	BPDCN 患者 85/87 例（98%）の皮膚で CD123 陽性であった。
	IHC	Jegalian ら [16]	小児 BPDCN 患者全例（9 例）の組織で CD123 陽性であった。 小児 BPDCN 患者の症例報告。12 例で CD123 陽性であった。
	IHC	Nguyen ら [17]	小児 BPDCN 患者の症例報告。2 例の皮膚で CD123 陽性であった。
	情報なし	Sun ら [18]	小児 BPDCN 患者の症例報告。3 例の骨髄/皮膚/皮下/リンパ節で CD123 陽性であった。
	FCM	Angelot-Delettre ら [19]	BPDCN 患者全例（21 例、pDCL と表記）の骨髄で CD123 陽性であった。
AML	FCM	Bras ら [6]	大多数の AML 患者 444/455 例（98%）の骨髄/末梢血/リンパ節/胸水で、正常対照に比べて CD123 発現レベルが高かった。小児と成人で CD123 発現に差はなかった。
	FCM	Florian ら [20]	AML 患者全例（10 例）の白血病幹細胞で CD123 発現が認められ、CD123 陽性細胞の割合は 96～100%であった。
	FCM	Kandeel ら [21]	小児 AML 患者 62/89 例（70%）の骨髄及び 60/89 例（67%）の白血病幹細胞で CD123 陽性であった。CD123 は CR 未達、MRD 陽性など予後不良因子と関連していた。
	IHC	Arai ら [22]	*de novo* AML 患者 14/48 例（29%）の骨髄で CD123 陽性であった。CD123 陽性は AML サブタイプ、OS 不良、初回寛解導入療法後の CR 未達と有意に関連していた。
	IHC	Safaei ら [23]	初回診断 AML 患者 42/76 例（55%）の骨髄で CD123 陽性であった。CD123 発現と FLT3 変異（FLT3-ITD）は有意に関連していた。CD123 発現は骨髄芽球率高値、骨髄芽球 CD34 陰性と有意に関連していた。
	FCM	Testa ら [24]	健常人の正常 $CD34^+$細胞に比べ、45%の AML 患者の骨髄/末梢血の $CD34^+$細胞で IL-3Rα が過剰に発現していた。IL-3R 発現と診断時白血病細胞（芽球）数には有意な関連があり、IL-3Rα 発現レベルが高い患者は低い患者に比べて完全寛解率が低く、生存期間が短かった。AML において IL-3Rα 発現は白血病細胞増殖に優位に働き、予後不良に寄与することが示唆された。
	FCM	Jordan ら [25]	AML 患者 18 例の白血病幹細胞における CD123 陽性細胞の割合は 51～100%であり、16/18 例（89%）で発現レベルが高かった（98±2%）。一方で、正常幹細胞ではほとんど発現が認められなかった。

表 2.6.1.2-1　主な造血器腫瘍における IL-3Rα（CD123）に関する情報（学術文献）（続き）

造血器腫瘍	検出方法	報告者	IL-3Rα に関する記載内容
（AML の続き）	FCM	Zeijlemaker ら [26]	AML 患者 107/130 例（82%）の白血病幹細胞での CD123 発現レベルは高く、健常人の正常造血幹細胞での CD123 発現レベルは低かった。CD123 発現は白血病幹細胞と正常造血幹細胞とを判別でき、AML 診断時及び治療フォローアップマーカーとなりうる。
	FCM	Ehninger ら [27]	新規診断された AML 患者 232/298 例（78%）の芽球（骨髄/末梢血）で CD123 陽性であり、健常人の正常造血前駆細胞と比較して有意に発現レベルが高かった。また、FLT3-ITD 変異や NPM1 変異を持つ AML 患者で特に CD123 の発現レベルが高かった。
CML	FCM	Florian ら [20]	CML 患者 6/7 例（86%）の白血病幹細胞で CD123 発現が認められ、CD123 陽性細胞の割合は 36～100%であった。
	FCM	Nievergall ら [28]	CML 患者の白血病幹細胞では正常対象（健常人）に比べて CD123 陽性細胞の割合及びその発現レベルが高く、また疾患進行に伴って CD123 発現レベルが上昇した（Choronic phase:53%、Blastic phase:73%、Normal:20%）。
	FCM	Frolova ら [29]	CML 患者 8 例の白血病幹細胞における CD123 陽性細胞の割合は 49～98%であった。
CMML	IHC	Bénet ら [30]	CMML 患者 5/17 例（29%）の皮膚で CD123 陽性であった。
MDS	FCM	Li ら [31]	MDS 患者 76 例［低グレード（very low／low／intermediate）：35 例、高グレード（high／very high）：41 例］の骨髄（$CD34^{+}CD38^{-}$細胞）における CD123 陽性細胞の特徴を AML と比較した。CD123 陽性細胞の割合と MFI（平均蛍光強度）は、低グレード MDS では AML に比べて低く（44% vs 60%）、高グレード MDS では AML と同程度（53% vs 60%）であった。また、CD123 陽性細胞数の増加は、異常な分化や増殖、アポトーシスの減少を示し、MDS の疾患進行と悪性化に関連していると考えられた。
	FCM	Florian ら [20]	MDS 患者 6 例全例の白血病幹細胞で CD123 発現が認められ、CD123 陽性細胞の割合は 23～100%であった。
MPN	FCM	Babcook ら [32]	MPN 患者の芽球（骨髄/末梢血）で CD123 発現が認められ、急性期（芽球>10%）又は ASXL1 変異ありで発現レベルが高かった。
SM	FCM	Florian ら [20]	SM 患者 8/9 例（89%）の白血病幹細胞で CD123 発現が認められ、CD123 陽性細胞の割合は 68～100%であった。
	IHC	Pardanani ら [33]	SM 患者 37/58 例（64%）の骨髄で CD123 発現が認められ、aggressive SM で 100%、indolent SM で 61%、血液腫瘍関連 SM で 57%、肥満細胞白血病で 0%であった。
ALL	FCM	Angelova ら [34]	ALL 患者 177/213 例（83%）の白血病芽球で CD123 発現が認められ、B-ALL 164/183 例（90%）、T-ALL 13/30 例（43%）であり、B-ALL で高かった。B-ALL ではフィラデルフィア染色体陽性患者（57/59 例、97%）が陰性患者（107/124 例、86%）に比べて発現が高かった。
	FCM	Testa ら [24]	健常人の正常 $CD34^{+}$陽性細胞に比べ、40%の B-ALL 患者の骨髄/末梢血 $CD34^{+}$細胞で IL-3Rα が過剰に発現していたが、T-ALL 患者での発現は微かであった。

表 2.6.1.2-1　主な造血器腫瘍における IL-3Rα（CD123）に関する情報（学術文献）（続き）

造血器腫瘍	検出方法	報告者	IL-3Rα に関する記載内容
（ALL の続き）	FCM	Djokic ら [35]	ALL 患者（小児 95 例、成人 24 例）の骨髄/末梢血等について、B-ALL では小児 B-ALL 79/85 例［intermediate：50 例（59%）、strong：29 例（34%）］、成人 B-ALL 19/21 例［intermediate：15 例（71%）、strong：4 例（19%）］で CD123 陽性であり、T-ALL では 1/10 例（10%）のみ CD123 陽性であった。特に、hyperdiploid（過二倍体、B-ALL の予後良好マーカー）型の小児 B-ALL の 82%で顕著な CD123 発現が認められ、過剰な CD123 発現が小児 B-ALL の予後良好マーカーであることが示唆された。
HCL	FCM	Venkataraman ら [36]	HCL 患者全例（114 例）の末梢血で著明で均一な CD123 発現が確認された。HCLv（HCL variant）患者 8/20 例（40%）で部分的又は弱い CD123 発現が確認された。
	FCM	Fromm[37]	HCL 患者全例（3 例）の骨髄/末梢血で CD123 陽性であった。
	FCM	Muñoz ら [38]	HCL 患者 6/7 例（86%）の骨髄/末梢血/リンパ節で CD123 陽性であった。
HL	FCM	Fromm[37]	CHL 患者 35/59 例（59%）のリンパ節で CD123 陽性であった。
	FCM、IHC	Aldinucci ら [39]	HL 患者全例（21 例）の組織で CD123 陽性であった。
NHL	FCM	Venkataraman ら [36]	MCL 患者 7/21 例（33%）、FL 患者 1/3 例（33%）、SMZL 患者 1/4 例（25%）で CD123 陽性であった。
	FCM	Fromm[37]	LBCL 患者 1/55 例（2%）で CD123 陽性であった。
MM	—	Uckun[40]	CD123 は MM 幹細胞、MDSC、pDC、破骨細胞前駆細胞に発現している。タグラキソフスプは MM の骨髄微小環境を標的とし、pDC の生存を阻害することにより pDC による MM 細胞の増殖を阻害する。また、MM 幹細胞の生存阻害及び破骨細胞前駆細胞への作用を介して破骨細胞形成を抑制する。MDSC に対するタグラキソフスプの作用に関する直接的な記載はないが、MDSC は T 細胞や NK 細胞などの免疫担当細胞の機能を抑制することで MM 細胞の増殖に寄与するとされているため、CD123 を標的とした薬剤は MDSC の抑制を介して MM 細胞の増殖を阻害することが期待できる。
	FCM	Ray ら [41]	MM 患者（6 例）由来の pDC 及び MM 細胞において CD123 発現が認められた。 MM の骨髄環境での *in vitro* 及び *in vivo* 検討において、タグラキソフスプは pDC の生存率を低下させ、pDC による MM 細胞の増殖を阻害した。また、ボルテゾミブ及びポマリドミドの抗 MM 活性を相乗的に増強した。さらに、破骨細胞形成・骨吸収の抑制作用や、がん幹細胞様細胞の生存率低下作用も示した。

IL-3Rα（CD123）の検出には一般的に FCM 及び IHC が用いられ、感度・特異性・再現性の程度は様々である。

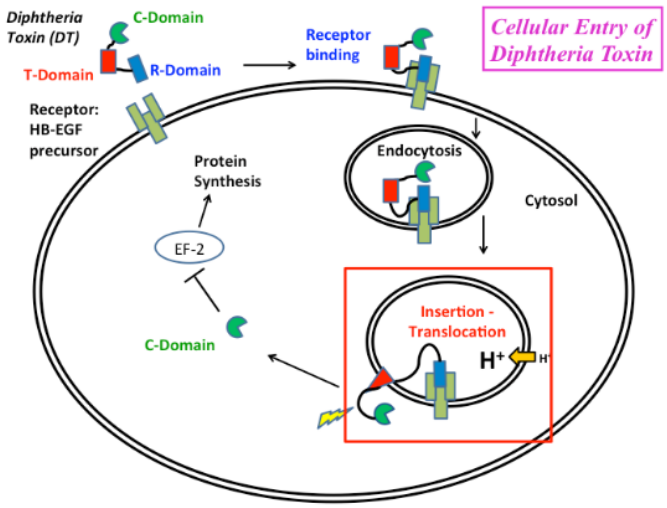
AML：急性骨髄性白血病、ALL：急性リンパ芽球性白血病、BPDCN：芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍、CHL：古典的ホジキンリンパ腫、CML：慢性骨髄性白血病、CMML：慢性骨髄単球性白血病、CR：完全寛解、FCM：フローサイトメトリー、FL：濾胞性リンパ腫、FLT3-ITD 変異：FMS 様チロシンキナーゼ-3 の遺伝子内縦列重複変異、HCL：ヘアリー細胞白血病、HL：ホジキンリンパ腫、IHC：免疫組織化学、LBCL：大細胞型 B 細胞リンパ腫、MCL：マントル細胞リンパ腫、MDSC：骨髄由来抑制細胞、MM：多発性骨髄腫、MPN：骨髄増殖性腫瘍、MRD：微小残存病変、NHL：非ホジキンリンパ腫、pDC：形質細胞様樹状細胞、OS：生存期間、SM：全身性肥満細胞症、SMZL：脾辺縁帯リンパ腫

2.6.1.3 ジフテリア毒素（DT）

DT はジフテリア菌 *Corynebacterium diphtheriae* によって合成される、535 アミノ酸からなる一本鎖タンパク質（分子量 58 kDa）である [42, 43]。DT は 3 つのドメインから構成され、N 末端の触媒ドメイン（1～200 番目のアミノ酸残基）に続いて、トランスロケーションドメイン（膜貫通ドメイン、201～389 番目のアミノ酸残基）が存在し、C 末端に受容体結合ドメイン（390～535 番目のアミノ酸残基）が位置している。触媒ドメインの配列に含まれている Cys186 と Cys201 はジスルフィド結合によって架橋されており、14 アミノ酸からなるループが形成されている。

触媒ドメインはアデノシン二リン酸（ADP）リボシルトランスフェラーゼ活性を有する酵素活性部位であり、トランスロケーションドメインは触媒ドメインの細胞質内への移行を促進する性質を、受容体結合ドメインは細胞膜表面上の受容体に結合する役割を有する。

DT は図 2.6.1.3-1 に示す取り込み機構及び細胞内での一連のイベントを経て作用を示すと考えられる。



C-Domain：触媒ドメイン、R-Domain：受容体結合ドメイン、T-Domain：トランスロケーションドメイン

図 2.6.1.3-1 DT の細胞内への取り込み及びその後の挙動

［4.3-50 Fig.1 を引用］

まず、DT は受容体結合ドメインを介して受容体（膜結合型ヘパリン結合性上皮成長因子様前駆体： HB-EGF precursor）に結合し、エンドサイトーシスによってエンドソームに取り込まれ、触媒ドメインのループ（Cys186-Cys201）内の Arg193 と Ser194 の位置でプロテアーゼ（furin）によるタンパク分解（nicking）を受けて切断されることで、N 末端の触媒ドメインと、C 末端のトランスロケーションドメイン及び受容体結合ドメインに分離する [44, 45]。エンドソーム内は、エンドソーム膜にあるプロトンポンプ（vATPase）の働きによって酸性環境下にあり、この酸性環境においてトランスロケーションドメインの折り畳み構造がほどけて疎水性のヘアピン構造が形成され、エンドソームの膜に挿入され、触媒ドメインが細胞質へ移行する pore が形成される。触媒ドメインはこの pore を通過して細胞質へと移行し、細胞質の還元環境下においてジスルフィド結合

（Cys186-Cys201）が切断され、トランスロケーションドメイン及び受容体結合ドメインから触媒ドメインが遊離する。遊離した触媒ドメインは ADP リボシルトランスフェラーゼ活性によって伸長因子-2（EF-2）を不活性化し、タンパク合成を阻害してアポトーシスを誘導することで細胞傷害作用を示す[42, 46-49]。

なお、DT の触媒ドメイン 1 分子によって細胞のコロニー形成能が顕著に低下し、十分な殺細胞作用が得られたとの報告[50]から、DT は非常に強力な毒素であり、1 つの触媒ドメインで十分な細胞傷害作用を示すと考えられている。

2.6.1.4 本薬の構造及び機能

本薬は、DT の部分配列（DT ドメイン）にヒト IL-3 の全配列（IL-3 ドメイン）が繋がった、524 個のアミノ酸残基から構成される遺伝子組換え融合タンパク質である（表 2.6.1.4-1）。

表 2.6.1.4-1 本薬の詳細

一般名	タグラキソフスプ（遺伝子組換え）
分子式	$C_{2553}H_{4022}N_{692}O_{798}S_{16}$
分子量	57690.45
アミノ酸配列及びジスルフィド結合	MGADDVVDSS KSFVMENFSS YHGTKPGYVD SIQKGIQKPK SGTQGNYDDD 50 WKGFYSTDNK YDAAGYSVDN ENPLSGKAGG VVKVTYPGLT KVLALKVDNA 100 ETIKKELGLS LTEPLMEQVG TEEFIKRFGD GASRVVLSLP FAEGSSSVEY 150 INNWEQAKAL SVELEINFET RGKRGQDAMY EYMAQACAGN RVRRSVGSSL 200 SCINLDWDVI RDKTKTKIES LKEHGPIKNK MSESPNKTVS EEKAKQYLEE 250 FHQTALEHPE LSELKTVTGT NPVFAGANYA AWAVNVAQVI DSETADNLEK 300 TTAALSILPG IGSVMGIADG AVHHNTEEIV AQSIALSSLM VAQAIPLVGE 350 LVDIGFAAYN FVESIINLFQ VVHNSYNRPA YSPGHKTRPH MAPMTQTTSL 400 KTSWVNCSNM IDEIITHLKQ PPLPLLDFNN LNGEDQDIIM ENNLRRPNLE 450 AFNRAVKSLQ NASAIESILK NLLPCLPLAT AAPTRHPIHI KDGDWNEFRR 500 KLTFYLKTLE NAQAQQTTLS LAIF 524

N 末端のメチオニン（1 番目のアミノ酸残基）の後ろに位置する DT ドメイン（388 アミノ酸：2～389 番目のアミノ酸残基）は、DT 本来の配列の 419 番目の Q（グルタミン）が R（アルギニン）に置換された Q388R 変異体であり、DT 本来の触媒ドメイン及びトランスロケーションドメインを含む。この DT ドメインはヒスチジン-メチオニンジペプチドリンカー（390～391 番目のアミノ酸残基）を介して IL-3 ドメイン（133 アミノ酸：392～524 番目のアミノ酸残基）と融合して

いる、すなわち DT 本来の受容体結合ドメインが IL-3 ドメインに置換されている。この IL-3 ドメインによって本薬は IL-3Rα を発現する細胞を標的とすることができる（図 2.6.1.4-1 参照）。

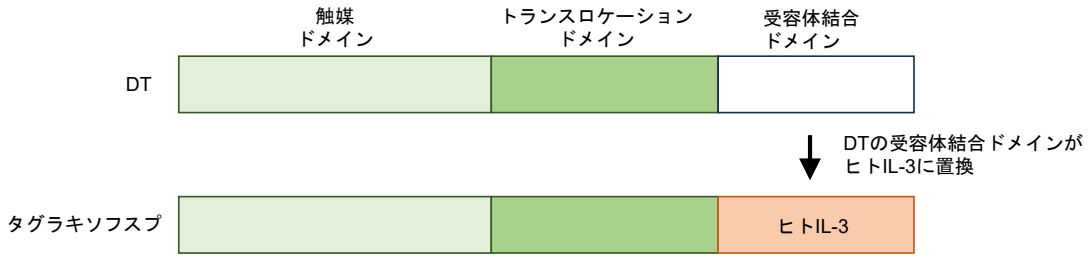


図 2.6.1.4-1 本薬の構造

本薬は、細胞膜上に発現する IL-3Rα に結合し、受容体を介したエンドサイトーシスによって細胞内のエンドソームに取り込まれる。この後の挙動は DT の毒性発現機序と同様であり（2.6.1.3 項参照）、エンドソーム内の酸性環境下でプロテアーゼ（furin）によって DT ドメインは分解を受け、トランスロケーションドメインの構造変化によって形成された pore を介して DT の触媒ドメイン（酵素活性部位）が細胞質へと移動する。細胞質内の還元環境下で遊離した DT の触媒ドメインは、ADP リボシルトランスフェラーゼ活性によって EF-2 を不活性化し、タンパク合成を阻害してアポトーシスを誘導することで細胞傷害作用を示すと考えられる [51]（図 2.6.1.4-2）。

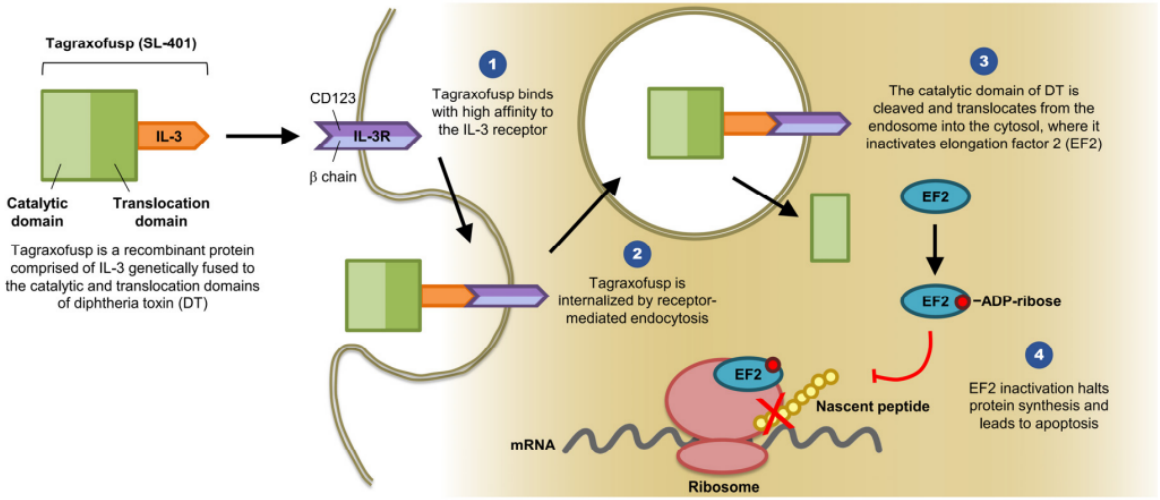


図 2.6.1.4-2 本薬の作用機序

本薬は IL-3 ドメインを介して IL-3R に結合（①）した後に、受容体を介したエンドサイトーシスによりエンドソームに取り込まれる（②）。DT の触媒ドメインは細胞質内で切り離され、ADP リボシル化を介して EF-2 を不活化し（③）、タンパク合成を阻害してアポトーシスを誘導する（④）。

［4.3-55 Fig.1 を引用］

2.6.1.5 非臨床試験の収集

本薬の医薬品製造販売承認申請書添付資料の作成にあたり、Stemline Therapeutics 社（現 Menarini 社）が実施又は委託した薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験の試験成績及び公表文献の情報を活用した。さらに、本薬を用いた *in vitro* 薬効薬理試験を日本新薬で新たに実施し、評価資料として追加した。

なお、本薬の効能又は効果（案）並びに用法及び用量（案）を以下に示す。

効能又は効果（案）	芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍
用法及び用量（案）	通常、成人及び 2 歳以上の小児には、タグラキソフスプ（遺伝子組換え）として 12 μg/kg を 1 日 1 回 5 日間 15 分かけて点滴静注し、16 日間休薬する。この 21 日間を 1 サイクルとし、投与を繰り返す。

2.6.1.6 参考文献一覧

1. Kitamura T, Sato N, Arai K, Miyajima A. Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared β subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors. Cell. 1991; 66: 1165-74. ＜資料番号 4.3-7＞

2. Hercus TR, Dhagat U, Kan WL, Broughton SE, Nero TL, Perugini M, et al. Signalling by the βc family of cytokines. Cytokine Growth Factor Rev. 2013; 24: 189-201. ＜資料番号 4.3-8＞

3. Broughton SE, Hercus TR, Hardy MP, McClure BJ, Nero TL, Dottore M, et al. Dual mechanism of interleukin-3 receptor blockade by an anti-cancer antibody. Cell Rep. 2014; 8: 410-9. ＜資料番号 4.3-9＞

4. de Groot RP, Coffer PJ, Koenderman L. Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. Cell Signal. 1998; 10: 619-28. ＜資料番号 4.3-10＞

5. Guthridge MA, Stomski FC, Thomas D, Woodcock JM, Bagley CJ, Berndt MC, et al. Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. Stem Cells. 1998; 16: 301-13. ＜資料番号 4.3-11＞

6. Bras AE, de Haas V, van Stigt A, Jongen-Lavrencic M, Beverloo HB, Te Marvelde JG, et al. CD123 expression levels in 846 acute leukemia patients based on standardized immunophenotyping. Cytometry B Clin Cytom. 2019; 96B: 134-42. ＜資料番号 4.3-12＞

7. Huang S, Chen Z, Yu JF, Young D, Bashey A, Ho AD, et al. Correlation between IL-3 receptor expression and growth potential of human $CD34^+$ hematopoietic cells from different tissues. Stem Cells. 1999; 17: 265-72. ＜資料番号 4.3-13＞

8. Testa U, Fossati C, Samoggia P, Masciulli R, Mariani G, Hassan HJ, et al. Expression of growth factor receptors in unilineage differentiation culture of purified hematopoietic progenitors. Blood. 1996; 88: 3391-406. ＜資料番号 4.3-14＞

9. Chaperot L, Bendriss N, Manches O, Gressin R, Maynadie M, Trimoreau F, et al. Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. Blood. 2001; 97: 3210-7. ＜資料番号 4.3-15＞

10. Sapienza MR, Fuligni F, Agostinelli C, Tripodo C, Righi S, Laginestra MA, et al. Molecular profiling of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm reveals a unique pattern and suggests selective sensitivity to NF-kB pathway inhibition. Leukemia. 2014; 28: 1606-16. ＜資料番号 4.3-16＞

11. Tsagarakis NJ, Kentrou NA, Papadimitriou KA, Pagoni M, Kokkini G, Papadaki H, et al. Acute lymphoplasmacytoid dendritic cell (DC2) leukemia: results from the Hellenic Dendritic Cell Leukemia Study Group. Leuk Res. 2010; 34: 438-46. ＜資料番号 4.3-17＞

12. Hashikawa K, Niino D, Yasumoto S, Nakama T, Kiyasu J, Sato K, et al. Clinicopathological features and prognostic significance of CXCL12 in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. J Am Acad Dermatol. 2012; 66: 278-91. ＜資料番号 4.3-18＞

13. An HJ, Yoon DH, Kim S, Shin SJ, Huh J, Lee KH, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: a single-center experience. Ann Hematol. 2013; 92: 351-6. ＜資料番号 4.3-19＞

14. Garnache-Ottou F, Feuillard J, Ferrand C, Biichle S, Trimoreau F, Seilles E, et al. Extended diagnostic criteria for plasmacytoid dendritic cell leukaemia. Br J Haematol. 2009; 145: 624-36. ＜資料番号 4.3-20＞

15. Julia F, Dalle S, Duru G, Balme B, Vergier B, Ortonne N, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms: clinico-immunohistochemical correlations in a series of 91 patients. Am J Surg Pathol. 2014; 38: 673-80. ＜資料番号 4.3-21＞

16. Jegalian AG, Buxbaum NP, Facchetti F, Raffeld M, Pittaluga S, Wayne AS, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm in children: diagnostic features and clinical implications. Haematologica. 2010; 95: 1873-9. ＜資料番号 5.4-21＞

17. Nguyen CM, Stuart L, Skupsky H, Lee YS, Tsuchiya A, Cassarino DS. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm in the pediatric population: a case series and review of the literature. Am J Dermatopathol. 2015; 37: 924-8. ＜資料番号 4.3-22＞

18. Sun W, Liu H, Kim Y, Karras N, Pawlowska A, Toomey D, et al. First pediatric experience of SL-401, a CD123-targeted therapy, in patients with blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: report of three cases. J Hematol Oncol. 2018; 11: 61. ＜資料番号 5.3.5.4-4＞

19. Angelot-Delettre F, Biichle S, Ferrand C, Seilles E, Gaugler B, Harrivel V, et al. Intracytoplasmic detection of TCL1-but not ILT7-by flow cytometry is useful for blastic plasmacytoid dendritic cell leukemia diagnosis. Cytometry A. 2012; 81: 718-24. ＜資料番号 4.3-23＞

20. Florian S, Sonneck K, Hauswirth AW, Krauth MT, Schernthaner GH, Sperr WR, et al. Detection of molecular targets on the surface of CD34+/CD38- stem cells in various myeloid malignancies. Leuk Lymphoma. 2006; 47: 207-22. ＜資料番号 4.3-24＞

21. Kandeel EZ, Madney Y, Eldin DN, Shafik NF. Overexpression of CD200 and CD123 is a major influential factor in the clinical course of pediatric acute myeloid leukemia. Exp Mol Pathol. 2021; 118: 104597. ＜資料番号 4.3-25＞

22. Arai N, Homma M, Abe M, Baba Y, Murai S, Watanuki M, et al. Impact of CD123 expression, analyzed by immunohistochemistry, on clinical outcomes in patients with acute myeloid leukemia. Int J Hematol. 2019; 109: 539-44. ＜資料番号 4.3-26＞

23. Safaei A, Monabati A, Mokhtari M, Safavi M, Solhjoo F. Evaluation of the CD123 expression and FLT3 gene mutations in patients with acute myeloid leukemia. Iran J Pathol. 2018; 13: 438-46. ＜資料番号 4.3-27＞

24. Testa U, Riccioni R, Militi S, Coccia E, Stellacci E, Samoggia P, et al. Elevated expression of IL-3Rα in acute myelogenous leukemia is associated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognosis. Blood. 2002; 100: 2980-8. ＜資料番号 4.3-28＞

25. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, Guzman ML, Howard DS, Pettigrew AL, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. Leukemia. 2000; 14: 1777-84. ＜資料番号 4.3-29＞

26. Zeijlemaker W, Kelder A, Oussoren-Brockhoff YJ, Scholten WJ, Snel AN, Veldhuizen D, et al. A simple one-tube assay for immunophenotypical quantification of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. Leukemia. 2016; 30: 439-46. ＜資料番号 4.3-30＞

27. Ehninger A, Kramer M, Röllig C, Thiede C, Bornhäuser M, von Bonin M, et al. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. Blood Cancer Journal. 2014; 4: e218. ＜資料番号 4.3-31＞

28. Nievergall E, Ramshaw HS, Yong AS, Biondo M, Busfield SJ, Vairo G, et al. Monoclonal antibody targeting of IL-3 receptor α with CSL362 effectively depletes CML progenitor and stem cells. Blood. 2014; 123: 1218-28. ＜資料番号 4.3-32＞

29. Frolova O, Benito J, Brooks C, Wang RY, Korchin B, Rowinsky EK, et al. SL-401 and SL-501, targeted therapeutics directed at the interleukin-3 receptor, inhibit the growth of leukaemic cells and stem cells in advanced phase chronic myeloid leukaemia. Br J Haematol. 2014; 166: 862-74. ＜資料番号 4.3-33＞

30. Bénet C, Gomez A, Aguilar C, Delattre C, Vergier B, Beylot-Barry M, et al. Histologic and immunohistologic characterization of skin localization of myeloid disorders: a study of 173 cases. Am J Clin Pathol. 2011; 135: 278-90. ＜資料番号 4.3-34＞

31. Li LJ, Tao JL, Fu R, Wang HQ, Jiang HJ, Yue LZ, et al. Increased $CD34^{+}CD38^{-}CD123^{+}$ cells in myelodysplastic syndrome displaying malignant features similar to those in AML. Int J Hematol. 2014; 100: 60-9. ＜資料番号 4.3-35＞

32. Babcook MA, Lozanski G, Wall SA. CD123 as a therapeutic target in accelerated and blast phase myeloproliferative neoplasms (MPNs). Transplant Cell Ther. 2024; 30 (Supplement): S100-1. ＜資料番号 4.3-36＞

33. Pardanani A, Reichard KK, Zblewski D, Abdelrahman RA, Wassie EA, Morice Ii WG, et al. CD123 immunostaining patterns in systemic mastocytosis: differential expression in disease subgroups and potential prognostic value. Leukemia. 2016; 30: 914-8. ＜資料番号 4.3-37＞

34. Angelova E, Audette C, Kovtun Y, Daver N, Wang SA, Pierce S, et al. CD123 expression patterns and selective targeting with a CD123-targeted antibody-drug conjugate (IMGN632) in acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2019; 104: 749-55. ＜資料番号 4.3-38＞

35. Djokic M, Björklund E, Blennow E, Mazur J, Söderhäll S, Porwit A. Overexpression of CD123 correlates with the hyperdiploid genotype in acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2009; 94: 1016-9. ＜資料番号 4.3-39＞

36. Venkataraman G, Aguhar C, Kreitman RJ, Yuan CM, Stetler-Stevenson M. Characteristic CD103 and CD123 expression pattern defines hairy cell leukemia: usefulness of CD123 and CD103 in the diagnosis of mature B-cell lymphoproliferative disorders. Am J Clin Pathol. 2011; 136: 625-30. ＜資料番号 4.3-40＞

37. Fromm JR. Flow cytometric analysis of CD123 is useful for immunophenotyping classical Hodgkin lymphoma. Cytometry B Clin Cytom. 2011; 80: 91-9. ＜資料番号 4.3-41＞

38. Muñoz L, Nomdedéu JF, López O, Carnicer MJ, Bellido M, Aventín A, et al. Interleukin-3 receptor α chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. Haematologica. 2001; 86: 1261-9. ＜資料番号 4.3-42＞

39. Aldinucci D, Poletto D, Gloghini A, Nanni P, Degan M, Perin T, et al. Expression of functional interleukin-3 receptors on Hodgkin and Reed-Sternberg cells. Am J Pathol. 2002; 160: 585-96. ＜資料番号 4.3-43＞

40. Uckun FM. Dual Targeting of multiple myeloma stem cells and myeloid-derived suppressor cells for treatment of chemotherapy-resistant multiple myeloma. Front Oncol. 2021; 11: 760382. ＜資料番号 4.3-44＞

41. Ray A, Das DS, Song Y, Macri V, Richardson P, Brooks CL, et al. A novel agent SL-401 induces anti-myeloma activity by targeting plasmacytoid dendritic cells, osteoclastogenesis and cancer stem-like cells. Leukemia. 2017; 31: 2652-60. ＜資料番号 4.3-45＞

42. Choe S, Bennett MJ, Fujii G, Curmi PM, Kantardjieff KA, Collier RJ, et al. The crystal structure of diphtheria toxin. Nature. 1992; 357: 216-22. ＜資料番号 4.3-46＞

43. Murphy JR. Mechanism of diphtheria toxin catalytic domain delivery to the eukaryotic cell cytosol and the cellular factors that directly participate in the process. Toxins. 2011; 3: 294-308. ＜資料番号 4.3-47＞

44. Tsuneoka M, Nakayama K, Hatsuzawa K, Komada M, Kitamura N, Mekada E. Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. J Biol Chem. 1993; 268: 26461-5. ＜資料番号 4.3-48＞

45. Drazin R, Kandel J, Collier RJ. Structure and activity of diphtheria toxin: II. Attack by trypsin at a specific site within the intact toxin molecule. J Biol Chem. 1971; 246: 1504-10. ＜資料番号 4.3-49＞

46. Ladokhin AS. pH-triggered conformational switching along the membrane insertion pathway of the diphtheria toxin T-domain. Toxins. 2013; 5: 1362-80. ＜資料番号 4.3-50＞

47. Ren J, Kachel K, Kim H, Malenbaum SE, Collier RJ, London E. Interaction of diphtheria toxin T domain with molten globule-like proteins and its implications for translocation. Science. 1999; 284: 955-7. ＜資料番号 4.3-51＞

48. Collier RJ, Kandel J. Structure and activity of diphtheria toxin: I. Thiol-dependent dissociation of a fraction of toxin into enzymically active and inactive fragments. J Biol Chem. 1971; 246: 1496-503. ＜資料番号 4.3-52＞

49. Iwamoto R, Higashiyama S, Mitamura T, Taniguchi N, Klagsbrun M, Mekada E. Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. EMBO J. 1994; 13: 2322-30. ＜資料番号 4.3-53＞

50. Yamaizumi M, Mekada E, Uchida T, Okada Y. One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. Cell. 1978; 15: 245-50. ＜資料番号 4.3-54＞

51. Alkharabsheh O, Frankel AE. Clinical activity and tolerability of SL-401 (Tagraxofusp): recombinant diphtheria toxin and interleukin-3 in hematologic malignancies. Biomedicines. 2019 ; 7: 6. ＜資料番号 4.3-55＞

2.6.2 薬理試験の概要文

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 1
2.6.2.1 まとめ 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.2.3 副次的薬理試験 15
2.6.2.4 安全性薬理試験 16
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 17
2.6.2.6 考察及び結論 18
2.6.2.7 図表 20
2.6.2.8 参考文献 21

略語一覧表

語句略語	語句略語内容
ADP	adenosine diphosphate：アデノシン二リン酸
AML	acute myeloid leukemia：急性骨髄性白血病
BPDCN	blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm：芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍
CD	cluster of differentiation：分化抗原群
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
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor：顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
cpm	count per minute：計数率
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration：50%阻害濃度
IL	interleukin：インターロイキン
IL-3Rα	IL-3 receptor α subunit：インターロイキン-3 受容体 α サブユニット、CD123
K_d	dissociation constant：解離定数
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide：ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
PBS	phosphate-buffered saline：リン酸緩衝生理食塩液
PDX	patient-derived xenograft：患者腫瘍組織移植
SPR	surface plasmon resonance：表面プラズモン共鳴

2.6.2.1 まとめ

タグラキソフスプは、ジフテリア毒素とヒトインターロイキン（IL）-3 からなる遺伝子組換え融合タンパク質である。

（1） 効力を裏付ける試験

1） 受容体への結合能

表面プラズモン共鳴（SPR）法を用いて、タグラキソフスプのヒト及びマウスの IL-3 受容体 α サブユニット（IL-3Rα）への結合能を調べたところ、タグラキソフスプはヒト IL-3Rα に解離定数（K_d）470 nmol/L で結合したが、マウス IL-3Rα には結合しなかった。また、TF/H-ras 細胞（*H-ras* 遺伝子を導入したヒト白血病細胞株）を用いて、IL-3R と ^{125}I 標識インターロイキン-3（IL-3）の結合におけるタグラキソフスプの阻害活性を調べたところ、50%阻害濃度（IC_{50} 値）は 1.5 nmol/L であった。

2） アデノシンニリン酸（ADP）リボシル化活性

ウサギ網状赤血球溶解液中で、^{14}C 標識ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）を ADP リボースの供給源としてタグラキソフスプの ADP リボシル化活性を調べたところ、濃度依存的な ADP リボシル化活性が認められた。

3） 白血病細胞及び芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍（BPDCN）細胞に対する作用

TF/H-ras 細胞及び CAL-1 細胞（BPDCN 患者由来のヒト形質細胞様樹状細胞株：IL-3Rα 発現細胞）に対するタグラキソフスプの作用を調べたところ、濃度依存的な細胞傷害作用が認められた。

急性骨髄性白血病（AML）患者由来細胞に対するタグラキソフスプの作用を調べたところ、細胞表面の IL-3R の発現量に相関したアポトーシス誘導作用が認められた。

4） BPDCN 細胞及び AML 細胞を移植したマウスモデルに対する作用

IL-3Rα を発現する GEN2.2 細胞（ヒト BPDCN 細胞株）をマウスに移植した xenograft モデルにおいて、生存期間の平均値が媒体投与群で移植後 17 日であったのに対し、タグラキソフスプ投与群では 58 日と有意に延長した（P<0.001）。

IL-3Rα 陽性 BPDCN 患者由来細胞をマウスに移植した patient-derived xenograft（PDX）モデルでは、媒体投与群の生存期間中央値が投与開始後 35 日であったのに対し、タグラキソフスプ投与群では 71 日と有意に延長した（P=0.0003）。また、タグラキソフスプは本 PDX モデルにおいて末梢血中の腫瘍細胞の割合を減少させた。さらに、1 サイクル目のタグラキソフスプ投与終了後に腫瘍細胞が再増殖した後、タグラキソフスプを 2 サイクル目として再投与すると、再び腫瘍細胞の割合が減少した。

IL-3Rα 陽性 AML 患者由来細胞を移植した PDX モデルにおいて、タグラキソフスプ投与群では媒体投与群に比べて移植後の生存期間が有意に延長し（P=0.0069）、骨髄中の腫瘍細胞数が有意に減少した（P=0.004）。

（2） 副次的薬理試験

タグラキソフスプのヒト正常組織への結合を免疫組織化学的検査により評価した。その結果、タグラキソフスプは IL-3Rα（CD123）への結合特異性を有しており、ヒトの正常組織（骨髄、小脳、脊髄、肺、心臓、骨格筋、脾臓、肝臓、膵臓、胃、乳房、副腎、結腸、腎臓、膀胱及び皮膚）には結合しないことが示された。

カニクイザルにおける 3 ヵ月間静脈内投与毒性試験では、タグラキソフスプを 35 及び 45 μg/kg/日の用量で投与した雌雄で脳脈絡叢の変性／壊死／炎症等が観察されたため、同試験の脳脈絡叢の切片を用いて IL-3Rα、IL-3 又はサル IgG に対する免疫組織化学的染色試験を実施した。その結果、対照群とタグラキソフスプ群間で明らかな差は認められなかった。

（3） 安全性薬理試験

安全性薬理試験については独立した試験は実施せず、反復投与毒性試験において中枢神経系、心血管系及び呼吸系への影響を評価した。

カニクイザルにタグラキソフスプを 0（対照群、媒体：5%ブドウ糖溶液）、30 及び 60 μg/kg/日の用量で 1 日 1 回静脈内投与し、0 及び 60 μg/kg/日群については 3 週間の回復期間を設定した。タグラキソフスプに起因した心電図影響は認められず、また、呼吸系への影響も認められなかった。一方で、一般症状観察では、タグラキソフスプ投与群で食欲不振が認められ、回復期間中も持続した。また、病理組織学的検査では、脳脈絡叢の変性／壊死／炎症等が認められたことから、中枢神経系への影響が示唆された。

カニクイザルにタグラキソフスプを 0（対照群、媒体：生理食塩液）、35 及び 45 μg/kg/日の用量で 3 サイクル（1 サイクルは 5 日間投与＋21～22 日間の休薬）静脈内投与した。タグラキソフスプ起因の心電図影響は認められず、また、呼吸系への影響も認められなかった。一方で、一般状態観察では、安楽死した 45 μg/kg/日群の雌 1 例で中等度の活動性低下が、生存例で食欲不振、振戦、活動性の低下が認められた。また、病理組織学的検査では、タグラキソフスプ投与群で脳脈絡叢の変性／壊死／炎症等が認められ、中枢神経系への影響が示唆された。

以上より、タグラキソフスプによる心血管系及び呼吸系への影響は認められなかったが、一般状態観察で、食欲不振、振戦、円背位及び活動性低下が認められ、病理組織学的検査では、脳脈絡叢の種々の傷害性変化（変性／壊死／炎症等）が認められたことから、中枢神経系への影響が示唆された。

（4） 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験として添付した試験報告書並びに公表文献の中で記載されている「IL-3Rα」または「CD123」は同一であるため、CTD 2.6.2.2 では「IL-3Rα」に記載を統一した。

2.6.2.2.1 受容体への結合能

タグラキソフスプのヒト及びマウス IL-3Rα への結合特異性を SPR 法により検討した。また、TF/H-ras 細胞を用いた競合結合アッセイにより IL-3R への結合親和性を検討した[1)]。

2.6.2.2.1.1 SPR 法によるヒト及びマウス IL-3Rα への結合（試験番号 Stemline 2018-01、資料番号 4.2.1.1-1、参考資料）

（1） 方法

タグラキソフスプのヒト及びマウス IL-3Rα に対する結合能を調べるため、SPR 法を用いて結合アッセイを行った。SPR 法とは、単離したタンパク質をセンサーチップ上に固定化することで、タンパク質に薬物が結合した際の質量変化を検出し、薬物の結合能を評価する手法である。本試験の SPR 測定装置には Biacore 2000 を用いた。組換えヒト IL-3Rα 又は組換えマウス IL-3Rα をセンサーチップに固定化し、3 種類のアナライト（タグラキソフスプ、組換えヒト IL-3、又は組換えマウス IL-3）をセンサーチップ上に流した。タグラキソフスプは最高濃度を 1.733 μmol/L、組換えヒト IL-3 及び組換えマウス IL-3 は最高濃度を 1 μmol/L として、公比 3 で希釈した 6 濃度を用いた。受容体及びアナライトのそれぞれの組み合わせにおける結合活性について K_d 値を算出した。

（2） 結果

本試験において、タグラキソフスプはヒト IL-3Rα に結合したが（K_d=470 nmol/L）、マウス IL-3Rα には結合しなかった（表2.6.2.2.1.1–1）。なお、組換えヒト IL-3 はヒト IL-3Rα に結合し（K_d=670 nmol/L）、組換えマウス IL-3 はマウス IL-3Rα に結合した（K_d=158 nmol/L）。組換えマウス IL-3 とヒト IL-3Rα や組換えヒト IL-3 とマウス IL-3Rα の組み合わせでの結合は認められなかった。このように、タグラキソフスプはヒト IL-3Rα に対して選択的に結合した。

表 2.6.2.2.1.1-1 25°C における結合定数

受容体	アナライト	K_d (nmol/L)
ヒト IL-3Rα	タグラキソフスプ	470
	組換えヒト IL-3	670
	組換えマウス IL-3	NB
マウス IL-3Rα	タグラキソフスプ	NB
	組換えヒト IL-3	NB
	組換えマウス IL-3	158

NB：no binding observed

［4.2.1.1-1 Table 1 を改変］

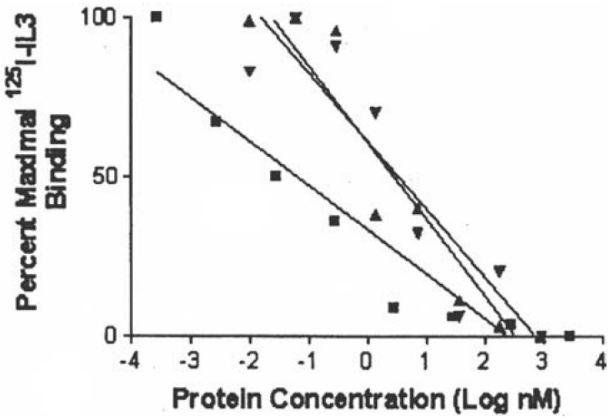
2.6.2.2.1.2 IL-3R への結合 [1)]

（1） 方法

本試験で使用するタグラキソフスプとして、大腸菌から精製及び調製し、生化学的手法により分析した 2 バッチ（AT-1 及び AT-2）を用いた。TF/H-ras 細胞を用いて、^{125}I 標識 IL-3 の存在下で、非標識タグラキソフスプ（AT-1 若しくは AT-2）又は非標識ヒト IL-3 を各種濃度で処置することで、競合結合アッセイを行った。線形回帰分析を行うことで、IL-3R と ^{125}I 標識 IL-3 の結合におけるタグラキソフスプの IC_{50} 値を算出した。

（2） 結果

タグラキソフスプ（AT-1 及び AT-2）は、^{125}I 標識 IL-3 の IL-3R への結合を IC_{50} 値 1.5 nmol/L で阻害した（図 2.6.2.2.1.2-1）。このように、タグラキソフスプは内在性リガンドである IL-3 と低濃度で競合したことから、タグラキソフスプの IL-3R への高い結合親和性が示された。



▲：タグラキソフスプ（AT-1）
▼：タグラキソフスプ（AT-2）
■：ヒト IL-3

図 2.6.2.2.1.2-1 ^{125}I 標識 IL-3 を用いたタグラキソフスプの競合結合アッセイ

［4.3-1 Fig.8 を引用］

2.6.2.2.2 ADP リボシル化活性 [1)]

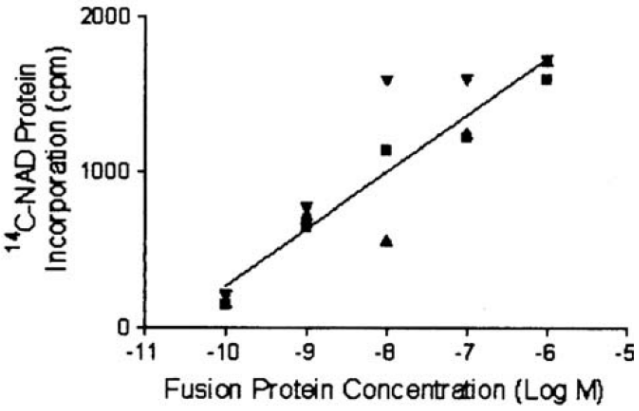
タグラキソフスプの ADP リボシル化活性について、^{14}C 標識基質の取り込み量を指標として検討した。

（1） 方法

2.6.2.2.1.2 項と同様に、タグラキソフスプ（AT-1 及び AT-2）並びに陽性対照である DT_{388}GM-CSF［タグラキソフスプと同じアミノ酸長のジフテリア毒素と顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）との融合タンパク質］を調製し、これらジフテリア毒素融合タンパク質の ADP リボシル化活性を測定した。タグラキソフスプ又は DT_{388}GM-CSF を、ADP リボース供給源である ^{14}C 標識 NAD 及びウサギ網状赤血球溶解液とインキュベートした後、反応物を 10%トリクロロ酢酸で沈殿させた。沈殿物を洗浄した後、液体シンチレータで溶解した。液体シンチレーションカウンターで ^{14}C の計数率（cpm 値）を測定し、^{14}C 標識 NAD の取り込み量を評価した。

（2） 結果

タグラキソフスプ（AT-1 及び AT-2）は ^{14}C 標識 NAD の取り込み量を濃度依存的に増加させたことから（図 2.6.2.2.2-1）、ADP リボシル化活性を有することが示された。線形回帰分析の結果、タグラキソフスプの ADP リボシル化活性は DT_{388}GM-CSF（陽性対照）と同等であったことから、ジフテリア毒素に起因した ADP リボシル化活性を示すと考えられた。



▲：タグラキソフスプ（AT-1）
▼：タグラキソフスプ（AT-2）
■：DT_{388}GM-CSF（陽性対照）

図 2.6.2.2.2-1 タグラキソフスプの ADP リボシル化活性

［4.3-1 Fig.9 を引用］

2.6.2.2.3 白血病細胞及び BPDCN 細胞に対する作用

タグラキソフスプの腫瘍細胞に対する作用について、TF/H-ras 細胞 [1)]、CAL-1 細胞及び AML 患者由来細胞 [2)]を用いて検討した。

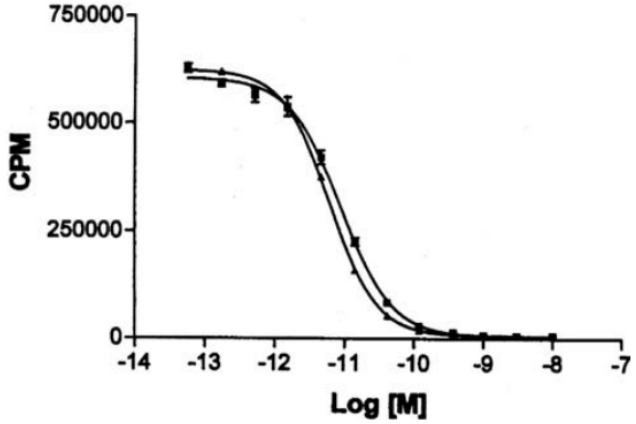
2.6.2.2.3.1 TF/H-ras 細胞に対する細胞傷害作用 [1)]

（1） 方法

2.6.2.2.1.2 項と同様にタグラキソフスプ（AT-1 及び AT-2）を調製し、TF/H-ras 細胞に 24 時間処置した。さらに ^{3}H 標識チミジンを加えて 18 時間インキュベートした後、セルハーベスターを用いて細胞をグラスファイバーマットに回収した。液体シンチレータに浸漬した後、液体シンチレーションカウンターで ^{3}H の cpm 値を測定し、^{3}H 標識チミジンの取り込み量を評価した。

（2） 結果

タグラキソフスプ（AT-1 及び AT-2）は ^{3}H 標識チミジンの取り込み量を濃度依存的に減少させたことから、細胞傷害作用を有することが示された（図 2.6.2.2.3.1-1）。また、タグラキソフスプの AT-1 バッチ及び AT-2 バッチの IC_{50} 値はそれぞれ 6.1 pmol/L 及び 8.7 pmol/L であった。



▲：タグラキソフスプ（AT-1）
■：タグラキソフスプ（AT-2）

図 2.6.2.2.3.1-1 TF/H-ras 細胞に対するタグラキソフスプの細胞傷害作用

［4.3-1 Figure 10 を引用］

2.6.2.2.3.2 CAL-1 細胞に対する細胞傷害作用（試験番号 PH-401-001、資料番号 4.2.1.1-2、評価資料）

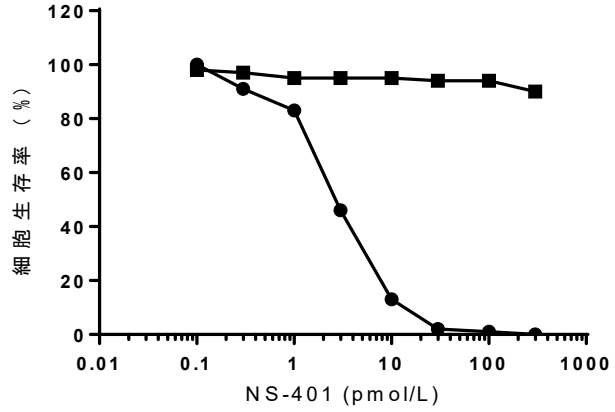
IL-3Rα を発現する CAL-1 細胞[3)]及び IL-3Rα を発現しない DAUDI 細胞（バーキットリンパ腫患者由来細胞株）[4)]を用いて、タグラキソフスプの IL-3Rα 発現細胞に対する選択的な細胞傷害作用を検討した。

（1） 方法

CAL-1 細胞及び DAUDI 細胞にタグラキソフスプ（0.1～300 pmol/L）を 72 時間処置した。さらに WST-8 を加えて 3 時間インキュベートした後、プレートリーダーで 450 nm 及び 650 nm の吸光度を測定した。450 nm の吸光度から 650 nm の吸光度を差し引き、陰性対照群（培地のみ）を 0%、陽性対照群（タグラキソフスプ無処置）を 100%としてタグラキソフスプ処置群の脱水素酵素活性の百分率を算出し、これを細胞生存率（%）とした。

（2） 結果

CAL-1 細胞においてタグラキソフスプは IC_{50} 値 2.7（95%信頼区間：2.6～2.9）pmol/L で細胞生存率を低下させたものの、DAUDI 細胞においてはタグラキソフスプを最大処置濃度である 300 pmol/L まで処置しても、その細胞生存率は 90%以上であった（図 2.6.2.2.3.2-1）。すなわち、タグラキソフスプは IL-3Rα 発現細胞においてのみ濃度依存的な細胞傷害作用を示した。



●：CAL-1 細胞
■：DAUDI 細胞

図 2.6.2.2.3.2-1　CAL-1 細胞に対するタグラキソフスプの細胞傷害作用

各点は平均値±標準誤差（n=4）

［4.2.1.1-2 図を引用］

2.6.2.2.3.3　AML 患者由来細胞に対するアポトーシス誘導作用 [2)]

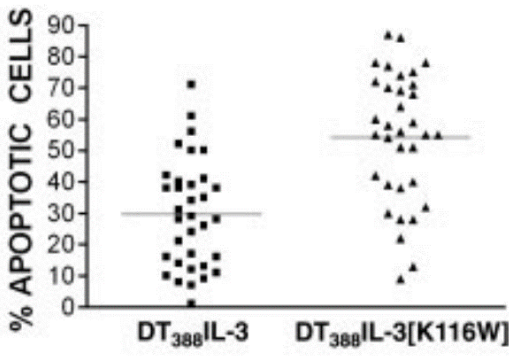
AML 患者由来細胞に対するタグラキソフスプのアポトーシス誘導作用並びに IL-3R 発現量との相関について検討した。

（1）　方法

AML 患者由来細胞（n=34）にタグラキソフスプ（100 nmol/L）を 24 時間処置した後、アポトーシスが誘導された細胞の割合を、アネキシン V 及びヨウ化プロピジウム染色を用いてフローサイトメーターで測定した。また、AML 患者由来細胞における IL-3Rα 及び IL-3Rβ の発現量を、それぞれの受容体構造に特異的なフィコエリスリン標識抗体を用いてフローサイトメーターで測定した。

（2）　結果

AML 患者由来細胞においてタグラキソフスプ（100 nmol/L）はアポトーシスを誘導し、その割合は 27.1±3.5%であった（図 2.6.2.2.3.3-1）。また、アポトーシスが誘導された細胞の割合と IL-3Rα 又は IL-3Rβ の発現量はいずれも正の相関を示した（図 2.6.2.2.3.3-2）ことから、タグラキソフスプのアポトーシス誘導作用に対する細胞感受性の違いは細胞表面における IL-3R の発現量に起因すると考えられた。

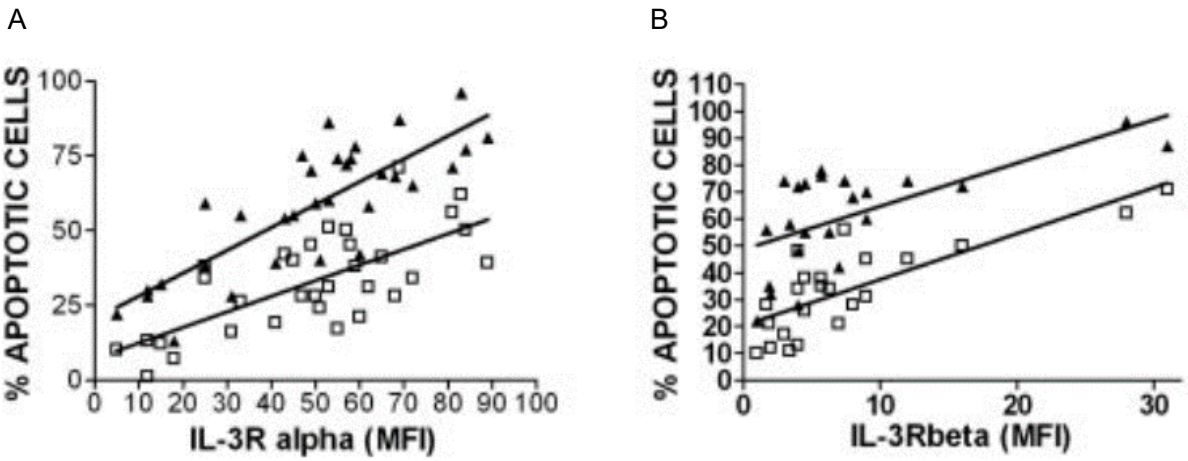


■：タグラキソフスプ（DT_{388}IL-3）
▲：ジフテリア毒素／変異型 IL-3 融合タンパク質（DT_{388}IL-3[K116W]）

図 2.6.2.2.3.3-1　AML 患者由来細胞に対するタグラキソフスプのアポトーシス誘導作用

DT_{388}IL-3[K116W]はジフテリア毒素と変異型 IL-3 の融合タンパク質である。DT_{388}IL-3[K116W]は DT_{388}IL-3 よりも高い IL-3 への結合能を有する variant であり、アポトーシス誘導能は DT_{388}IL-3 よりも高かった。

［4.3-2 Figure 1B を引用］



□：タグラキソフスプ
▲：ジフテリア毒素／変異型 IL-3 融合タンパク質

図 2.6.2.2.3.3-2　アポトーシスが誘導された細胞の割合と IL-3Rα（A）又は IL-3Rβ（B）の発現量との相関

［4.3-2 Figure 1 C 及び D を引用］

2.6.2.2.4 BPDCN 細胞及び AML 細胞を移植したマウスモデルにおける作用

タグラキソフスプの *in vivo* での作用について、GEN2.2 細胞（IL-3Rα を発現するヒト BPDCN 細胞株）を移植したマウスモデル[5]、IL-3Rα 陽性 BPDCN 患者由来細胞を移植したマウスモデル[6]及び IL-3Rα 陽性 AML 患者由来細胞を移植したマウスモデル[7]を用いて検討した。

2.6.2.2.4.1 GEN2.2 細胞を移植したマウスモデルにおける生存延長作用（xenograft モデル）[5]

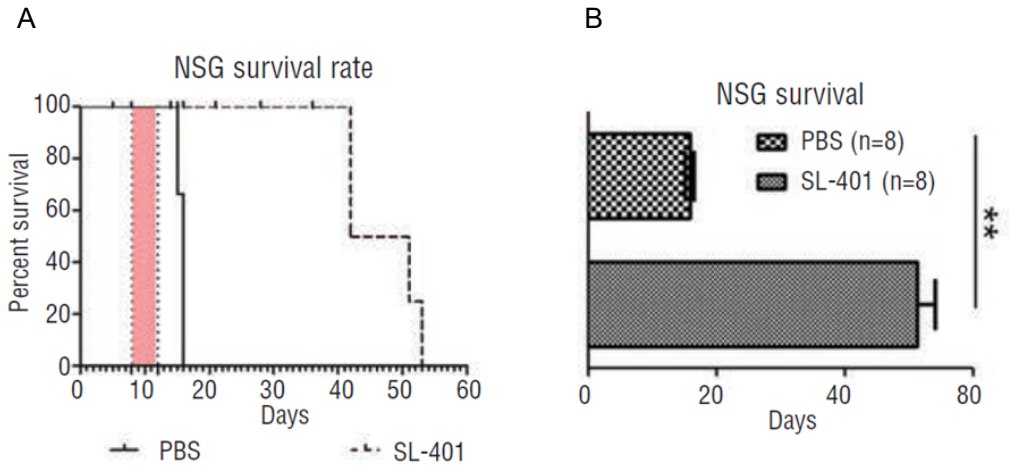
（1） 方法

NSG マウス（NOD-SCID IL2Rγc deficient マウス、7±2 週齢、雌雄）に対して 2Gy で X 線照射を行い、その 24 時間後に 1×10^6 個の GEN2.2 細胞を尾静脈から移植することでマウスモデルを作製した。媒体投与群又はタグラキソフスプ投与群それぞれ 8 匹のマウスに対して、移植 8 日後からリン酸緩衝生理食塩液（PBS）又はタグラキソフスプ（2 μg/日）を 5 日間腹腔内投与してマウスの生存を観察し、生存延長作用を評価した。実験は 3 回に分けて行った。

（2） 結果

図 2.6.2.2.4.1-1 (A)は 3 回の実験のうちの代表例（媒体投与群 3 匹及びタグラキソフスプ投与群 4 匹）の生存期間を示し、図 2.6.2.2.4.1-1 (B)は 3 回の実験の生存期間の平均値を示したものである。本試験の結果、タグラキソフスプは GEN2.2 細胞を移植したマウスの生存期間を有意に延長させ（図 2.6.2.2.4.1-1 A）、生存期間（平均値±標準誤差）は媒体投与群で移植後 17±1 日であったのに対し、タグラキソフスプ投与群では 58±2 日と有意に増加した［P<0.001、Student's t-test、図 2.6.2.2.4.1-1 (B)］。

以上のように、タグラキソフスプは GEN2.2 細胞（IL-3Rα を発現するヒト BPDCN 細胞株）移植モデルにおいて有意な生存延長作用を示した。



PBS：媒体投与群、SL-401：タグラキソフスプ投与群

図 2.6.2.2.4.1-1 GEN2.2 細胞（ヒト BPDCN 細胞株）を移植した NSG マウスモデルにおけるタグラキソフスプの生存延長作用

（A）3 回の実験のうちの代表的な実験回の生存期間を示した。実線は媒体投与群（n=3）、破線はタグラキソフスプ投与群（n=4）、ピンクの帯は投与期間（移植 8 日後から 5 日間）を表す。

（B）3 回の実験を統合して解析した生存期間の平均値±標準誤差を示す。**P<0.001（Student's t-test、媒体投与群との比較、n=8）

［4.3-3 Figure 4 A 及び B を引用］

2.6.2.2.4.2 BPDCN 患者由来細胞を移植したマウスモデルにおける抗腫瘍作用（PDX モデル）[6)]

（1） 方法

IL-3Rα 陽性 BPDCN 患者由来細胞を移植した PDX モデルを用いて、タグラキソフスプの抗腫瘍作用として腫瘍細胞減少作用及び生存延長作用を評価した。

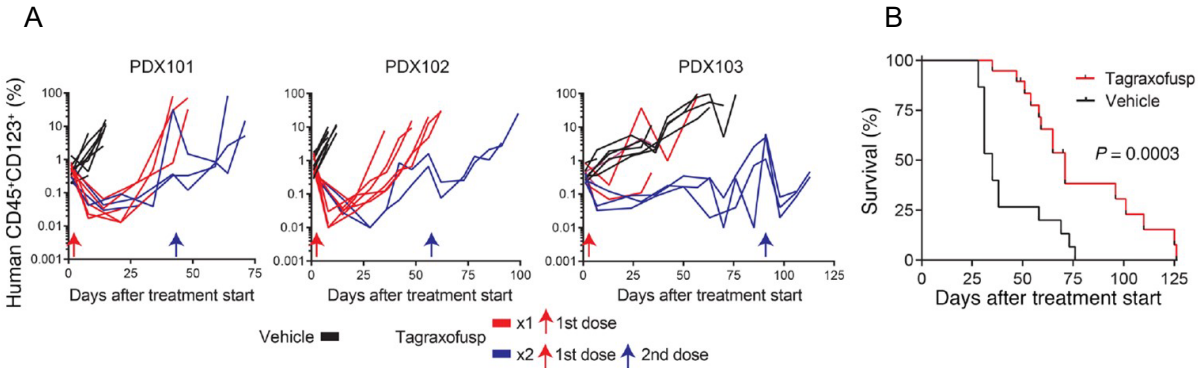
3 種類の IL-3Rα 陽性 BPDCN 患者由来細胞（PDX101、PDX102 及び PDX103）をそれぞれ、レシピエントである NSG マウスで増殖させ、得られた白血病性の脾臓細胞（1×10^6 個）を NSG マウス（8 週齢、雌性）に尾静脈から移植することで PDX モデルを作製した。各 PDX モデルのうち 3～5 匹のマウスで 1～2 週間毎に尾静脈から末梢血を採取し、フローサイトメーターでヒト CD45 陽性 CD123 陽性細胞（腫瘍細胞）を測定した。末梢血中の腫瘍細胞比率の平均値が 0.2%を超えた時点で、全てのマウスを媒体投与群及びタグラキソフスプ投与群に無作為に割付け、1 サイクル目の投与として、タグラキソフスプ投与群にはタグラキソフスプ 0.1 mg/kg/日を 5 日間腹腔内投与し、1～2 週間毎に末梢血中の腫瘍細胞比率を測定した。タグラキソフスプ投与群については、腫瘍細胞比率の平均値が 5%を超えた時点で媒体投与群及びタグラキソフスプ再投与群に無作為に割付け、2 サイクル目の投与としてタグラキソフスプ再投与群には 1 サイクル目と同様にタグラキソフスプ 0.1 mg/kg/日を 5 日間腹腔内投与した。末梢血中の腫瘍細胞比率を測定し、タグラキソフスプの腫瘍細胞減少作用を評価した。また、これら PDX マウスの生存を観察し Kaplan-Meier 法によりタグラキソフスプの生存延長作用を評価した。

（2） 結果

タグラキソフスプの 1 サイクル目の投与について、媒体投与群では末梢血中の腫瘍細胞の割合が増加したのに対し、タグラキソフスプ投与群ではタグラキソフスプ投与開始以降に腫瘍細胞の割合が減少した。1 サイクル目の投与終了後の観察期間中に末梢血中の腫瘍細胞の割合が増加してきたため、タグラキソフスプ投与群を媒体投与群とタグラキソフスプ再投与群に割付け、2 サイクル目の投与を行ったところ、タグラキソフスプの再投与により末梢血中の腫瘍細胞の割合が再び減少した［図 2.6.2.2.4.2-1 (A)］。

また、これらの患者由来細胞を移植した PDX モデルにおいてマウスの生存延長作用を評価したところ、生存期間中央値は媒体投与群が投与開始後 35 日、タグラキソフスプ投与群が 71 日であり、タグラキソフスプによる有意な延長作用が認められた［P=0.0003、log-rank 検定、図 2.6.2.2.4.2-1 (B)］。

以上の結果より、タグラキソフスプは IL-3Rα 陽性 BPDCN 患者由来細胞を用いた PDX モデルにおいて、末梢血中の腫瘍細胞の割合を減少させ、さらに、1 サイクル目のタグラキソフスプ投与終了後に腫瘍細胞が再増殖した後、2 サイクル目として再投与することでタグラキソフスプは再び腫瘍細胞の割合を減少させた。また、タグラキソフスプは有意な生存延長作用を示した。



Vehicle：媒体投与群、Tagraxofusp：タグラキソフスプ投与群

図 2.6.2.2.4.2-1 BPDCN 患者由来細胞を移植したマウスモデル（PDX モデル）における タグラキソフスプの腫瘍細胞減少作用（A）及び生存延長作用（B）

（A）3 種類の BPDCN 患者由来細胞（PDX101、PDX102 又は PDX103）を NSG マウスに移植し、末梢血中におけるヒト CD45 陽性 CD123 陽性細胞の割合を測定した。媒体投与群は黒線、タグラキソフスプの 1 サイクル投与群は赤線で示し、赤矢印は投与開始日を示す。青線はタグラキソフスプの 2 サイクル投与群を示し、赤矢印は 1 サイクル目の投与開始日、青矢印は 2 サイクル目の投与開始日を示す。
（B）BPDCN 患者由来細胞を移植した PDX モデルにおける生存期間を示す。黒線は媒体投与群（n=15）、赤線はタグラキソフスプ投与群（n=19）を示す。P 値は log rank 検定による媒体投与群との比較。

［4.3-4 Figure 5 A 及び D を引用］

2.6.2.2.4.3 AML 患者由来細胞を移植したマウスモデルにおける抗腫瘍作用（PDX モデル）[7)]

（1） 方法

IL-3Rα 陽性 AML 患者由来細胞を移植した PDX モデルを用いて、タグラキソフスプの抗腫瘍作用として生存延長作用及び腫瘍細胞減少作用を評価した。

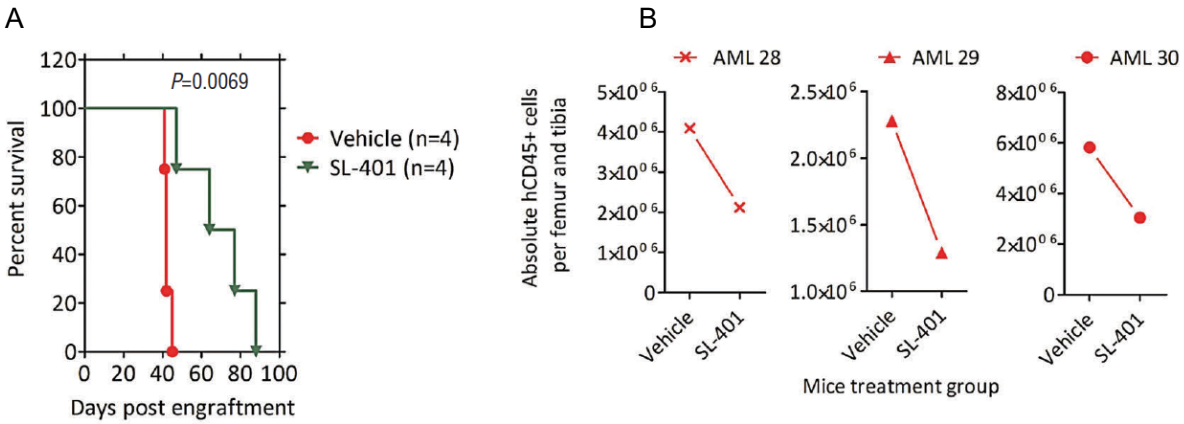
IL-3Rα 陽性 AML 患者由来細胞（AML 28 及び 29）を IL-3、GM-CSF 及び幹細胞因子と共に 72 時間培養した後、抗 CD3 抗体を用いて AML 患者由来細胞に含まれる T 細胞を除去し、移植細胞を調製した。NRG-SGM3（NRGS）マウス（6～8 週齢）にブスルファン（20 mg/kg）を腹腔内投与し、24 時間後に調製した移植細胞（4～6×10^6 個）を尾静脈より移植し PDX モデルを作製した。移植 10 日後からマウスを媒体投与群及びタグラキソフスプ投与群に無作為に割付け（各群 4 匹）、タグラキソフスプ投与群にはタグラキソフスプ（50 μg/kg）を月曜日・水曜日・金曜日の週 3 回、5 週間腹腔内投与してマウスの生存を観察し、生存延長作用を評価した。

また、同様の方法を用いて培養・調製した AML 患者由来細胞（AML 28、29、30）を NRGS マウスに尾静脈より移植して PDX マウスモデルを作製し、移植後から 3～6 週間に媒体又はタグラキソフスプを盲検下で投与した。移植後 7 週目に骨髄細胞を採取し、フローサイトメーターを用いてヒト CD45 陽性細胞（腫瘍細胞）数を計測し、タグラキソフスプの腫瘍細胞減少作用を評価した。

（2） 結果

タグラキソフスプ投与群では媒体投与群に比べて生存期間が有意に延長した［P=0.0069、two-sample t-test、媒体投与群との比較、図 2.6.2.2.4.3-1 (A)］。また、タグラキソフスプの投与により骨髄中の腫瘍細胞数が有意に減少した［P=0.004、two-sample t-test、媒体投与群との比較、図 2.6.2.2.4.3-1 (B)］。

以上の結果より、IL-3Rα 陽性 AML 患者由来細胞を移植した PDX モデルにおいて、タグラキソフスプは生存期間を有意に延長させ、骨髄中の腫瘍細胞を減少させた。



Vehicle：媒体投与群、SL-401：タグラキソフスプ投与群

図 2.6.2.2.4.3-1 AML 患者由来細胞を移植したマウスモデル（PDX モデル）における タグラキソフスプの生存延長作用（A）及び腫瘍細胞減少作用（B）

（A）AML 患者由来細胞（AML 28 又は AML 29）を移植した PDX モデルにおける生存期間を示す。媒体投与群（n=4）及びタグラキソフスプ投与群（n=4）は、それぞれ AML 28 を移植したマウス 3 匹及び AML 29 を移植したマウス 1 匹を含む。

（B）AML 患者由来細胞（AML 28、AML 29 又は AML 30）を移植した PDX モデルの骨髄中におけるヒト CD45 陽性細胞数を示す。

［4.3-5 Figure 5 A 及び B を引用］

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 ヒト正常組織への結合能 [1)]

タグラキソフスプのヒトの各種正常組織（骨髄、小脳、脊髄、肺、心臓、骨格筋、脾臓、肝臓、膵臓、胃、乳房、副腎、結腸、腎臓、膀胱及び皮膚）への結合を免疫組織化学的検査により評価した。

その結果、ヒトの正常組織ではタグラキソフスプとの結合を示唆する染色性は認められなかった。なお、IL-3R を発現する陽性対照細胞（TF/H-ras 細胞）については顕著な陽性反応がみられた。

以上より、タグラキソフスプは IL-3R への結合特異性を有しているが、本試験で用いたヒトの正常組織には結合しないことが示された。

2.6.2.3.2 サル反復投与試験における脳脈絡叢への結合能（試験番号 20255431、資料番号 4.2.1.2-1、参考資料）

カニクイザルにおける 3 ヵ月間静脈内投与毒性試験（試験番号 2231-007、試験方法は 2.6.2.4.1 項参照）では、35 及び 45 µg/kg/日群の雌雄で脳脈絡叢の変性／壊死／炎症等が観察されたため、同試験の脳脈絡叢の切片を用いた IL-3Rα（CD123）、IL-3 又はサル IgG に対する免疫組織化学的染色試験を実施し、タグラキソフスプの脳脈絡叢への結合について検討した。脳の組織切片の脈絡叢における IL-3Rα、IL-3 及びサル IgG に対する免疫組織化学的染色による陽性領域を、自動画像解析によって定量解析した。解析領域には、正常領域と炎症や線維化を含むタグラキソフスプの影響領域が含まれていた。

その結果、IL-3Rα、IL-3 又はサル IgG に対する免疫組織化学的染色において、対照群とタグラキソフスプ群間で明らかな差は認められず、タグラキソフスプの脳脈絡叢への結合と脳脈絡叢の傷害性変化との関連性は明らかでなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

本剤は悪性腫瘍の治療を目的としているため、ICH S9 ガイドライン（抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドラインについて、平成 22 年 6 月 4 日付 薬食審査発 0604 第 1 号）に基づき、独立した安全性薬理試験は実施していない。GLP 適用の反復投与毒性試験 2 試験（試験番号 2231-002、2231-007）において、安全性薬理評価項目として以下を実施した。

表 2.6.2.4-1 タグラキソフスプを用いた安全性薬理試験の概要

試験項目	動物種	投与方法	投与量（μg/kg/日）	性別及び動物数/群	GLP適用	試験番号
心血管系						
心電図検査	カニクイザル	静脈内	0, 30, 60	雌雄各群 3（2）	適	2231-002
心電図検査	カニクイザル	静脈内	0, 35, 45	雌雄各群 3	適	2231-007
呼吸系、中枢神経系						
一般状態観察 病理組織学的検査	カニクイザル	静脈内	0, 30, 60	雌雄各群：3（2）	適	2231-002
一般状態観察 病理組織学的検査	カニクイザル	静脈内	0, 35, 45	雌雄各群：3	適	2231-007

（ ）内は回復群の0及び60 μg/kg/日の動物数

2.6.2.4.1 心血管系

（試験番号 2231-002, 2231-007、資料番号 4.2.3.2-3, 4.2.3.2-4、評価資料）

カニクイザルにおける 5 日間静脈内投与毒性試験及び 3 週間回復性試験（試験番号 2231-002）では、およそ 2～4 歳齢の雌雄カニクイザル（雌雄各群 3 例）にタグラキソフスプを 0（対照群、媒体：5%ブドウ糖溶液）、30 及び 60 μg/kg/日の用量で 1 日 1 回、5 分間かけて静脈内投与した。また、回復性評価のため、さらに 0 及び 60 μg/kg/日群を設け（雌雄各群 2 例）、3 週間の回復群とした。全動物について、試験前、1、4 日目の投与 1～2 時間後、休薬後解剖前に心電図検査を実施した。標準心電図（10 誘導）は 50 mm/sec で記録した。RR、PR、QT 間隔及び QRS 持続時間を測定し、心拍数から補正 QT（QTc、Bazett 補正）間隔を算出した。その結果、いずれのパラメータについてもタグラキソフスプ起因の変化は認められなかった。

カニクイザルにおける 3 ヵ月間静脈内投与毒性試験（試験番号 2231-007）では、およそ 2～4 歳齢の雌雄カニクイザル（雌雄各群 3 例）にタグラキソフスプを 0（対照群、媒体：生理食塩液）、35 及び 45 μg/kg/日の用量で 3 サイクル投与した。各投与は 1 日 1 回、5 分間かけて静脈内投与し、「5 日間連続投与＋21～22 日間休薬」を 1 サイクルとした。心電図検査は、生存動物について、試験前、29 及び 56 日目の投与後 2～4 時間に実施した。標準心電図（10 誘導）は 50 mm/sec で記録した。RR、PR、QT 間隔及び QRS 持続時間を測定し、心拍数から補正 QT（QTc、Bazett 補正）間隔を算出した。その結果、いずれのパラメータについてもタグラキソフスプ起因の変化は認められなかった。

以上の 2 試験の結果から、タグラキソフスプによる心血管系への影響は認められなかった。

2.6.2.4.2 呼吸系及び中枢神経系

（試験番号 2231-002, 2231-007、資料番号 4.2.3.2-3, 4.2.3.2-4、評価資料）

カニクイザルにおける 5 日間静脈内投与毒性試験及び 3 週間回復性試験（試験番号 2231-002）（試験方法は 2.6.2.4.1 項参照）では、60 μg/kg/日群の雌 1 例がタグラキソフスプ投与に関連した状態悪化を示し、投与 6 日目に安楽死した。

生存例の一般症状観察では、投与 2 日目に 60 μg/kg/日群の雌 2 例、投与 4 及び 5 日目に 30 及び 60 μg/kg/日群の全例で食欲不振が認められた。食欲不振は 60 μg/kg/日群の動物では回復期間中も持続した。病理組織学的検査では、脳でタグラキソフスプに起因する変化が認められ、投与後解剖動物の 30 及び 60 μg/kg/日群の雌雄及び回復後解剖動物の 60 μg/kg/日群の雌雄で脈絡叢の炎症／壊死／変性等が認められた。

カニクイザルにおける 3 ヵ月間静脈内投与毒性試験（試験番号 2231-007）（試験方法は 2.6.2.4.1 項参照）では、45 μg/kg/日群の雌 1 例が状態悪化を示し、投与 9 日目に安楽死した。当該動物の一般状態観察では、中等度の活動性低下、削痩、中等度の脱水、体温上昇、腹部及び後肢の打撲傷、右鼠径部、後肢及び投与部位の腫脹がみられた。病理組織学的検査では、脳脈絡叢の変性／壊死／炎症等が認められた。

生存例の一般状態観察では、タグラキソフスプに関連すると考えられる変化は主に投与後 1～2 時間及び 4 時間で観察され、食欲不振、振戦、円背位、活動性低下が認められた。病理組織学的検査では、35 μg/kg/日以上の群の雌雄の脳でタグラキソフスプ投与に関連した変化として脈絡叢の変性／壊死／炎症等が認められた。

以上の 2 試験の結果より、タグラキソフスプによる呼吸系への影響は認められなかったが、中枢神経系への影響が示唆された。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし。

2.6.2.6 考察及び結論

BPDCN は形質細胞様樹状細胞を起源とする進行の速い悪性腫瘍であり、患者の大多数で診断時に皮膚病変を呈するが、骨髄、リンパ節、脾臓への浸潤も多くみられる [8]。BPDCN 患者の皮膚、リンパ節、骨髄や脾臓から採取された腫瘍細胞では IL-3Rα が発現することが知られている。また、IL-3Rα は BPDCN だけでなく、AML、骨髄異形成症候群、慢性骨髄単球性白血病、骨髄増殖性腫瘍、多発性骨髄腫、急性リンパ性白血病等でも発現することが知られている（2.6.1.2 項参照）。

IL-3Rα は、サイトカイン受容体スーパーファミリーに属するタイプ I 膜貫通型糖タンパク質である。IL-3R は α 及び β の 2 つのサブユニットから成り β サブユニットは IL-3、IL-5 及び GM-CSF の受容体でも共有される。

タグラキソフスプはジフテリア毒素の C 末端側の受容体結合ドメイン（膜結合型ヘパリン結合性上皮成長因子様前駆体への結合部位）をヒト IL-3 に置換した遺伝子組換え融合タンパク質であり、ヒト IL-3Rα を標的とした初の薬剤である。IL-3 は IL-3R の内在性リガンドであり、IL-3R に高い特異性と親和性で結合する。タグラキソフスプはジフテリア毒素の受容体結合部位がヒト IL-3 に置換されているため、この IL-3 を介してヒト IL-3R 発現細胞に対して特異的に結合し、IL-3R を介したエンドサイトーシスにより細胞内に輸送される。エンドソーム内の酸性条件下でタグラキソフスプのジフテリア毒素が切り出される。乖離したジフテリア毒素は細胞質に移行して、伸長因子-2 を ADP リボシル化することが知られている [9]。これによりタンパク質合成が阻害され、細胞死が誘導される。

タグラキソフスプの作用機序や BPDCN 及び AML に対する薬効は、これまで多くの学術文献により確認されてきた。ヒト IL-3Rα への結合活性については、SPR 法を用いた試験が実施され、タグラキソフスプはヒト IL-3Rα に結合するが、マウス IL-3Rα には結合しないことが示された。また、IL-3R を発現する TF/H-ras 細胞を用いた試験において、タグラキソフスプは ^{125}I 標識 IL-3 の IL-3R への結合を IC_{50} 値 1.5 nmol/L で阻害し、タグラキソフスプの IL-3R への結合親和性が示された。さらに、ウサギ網状赤血球溶解液を用いた ADP リボシル化アッセイにより、タグラキソフスプが ADP リボシル化活性を有することも示されている。

BPDCN 細胞及び AML 細胞を用いた *in vitro* 薬理試験においては、タグラキソフスプの細胞傷害作用及びアポトーシス誘導作用が示されている。今回、BPDCN 患者由来細胞株である CAL-1 細胞と陰性対照細胞としてバーキットリンパ腫患者由来細胞株である DAUDI 細胞を用いた *in vitro* 薬効試験を実施したところ、タグラキソフスプは CAL-1 細胞において IC_{50} 値 2.7 pmol/L で細胞傷害作用を示したが、DAUDI 細胞においては最大処置濃度である 300 pmol/L 処置においても、その細胞生存率は 90%以上だった。すなわち、タグラキソフスプは IL-3Rα 発現細胞である CAL-1 細胞には特異的に薬理作用を示す一方で、IL-3Rα 非発現細胞である DAUDI 細胞には薬理作用を示さず、タグラキソフスプのヒト IL-3Rα 特異的な薬効を確認できた。また、TF/H-ras 細胞を用いた同様の試験においても、タグラキソフスプは pmol/L オーダーで細胞傷害作用を示した。さらに、AML 患者由来細胞においてタグラキソフスプのアポトーシス誘導作用を調べたところ、細胞表面の IL-3R の発現量に相関したアポトーシス誘導作用が認められた。

BPDCN 細胞及び AML 細胞を移植したマウスモデルを用いた *in vivo* 薬理試験においても、次の結果を得ている。すなわち、ヒト BPDCN 細胞株であり IL-3Rα を発現する GEN2.2 細胞を移植した xenograft モデルにおいて、生存期間の平均値が媒体投与群で移植後 17 日であったのに対し、

タグラキソフスプ投与群では 58 日と有意に延長した（P<0.001）。さらに、IL-3Rα 陽性 BPDCN 患者由来細胞をマウスに移植した PDX モデルでは、媒体投与群の生存期間中央値が投与開始後 35 日であったのに対し、タグラキソフスプ投与群では 71 日と有意に延長した（P=0.0003）。タグラキソフスプは本 PDX モデルにおいて末梢血中の腫瘍細胞の割合を減少させ、さらに、タグラキソフスプの 1 サイクル目投与終了後に腫瘍細胞が再増殖した時にタグラキソフスプを再投与することで、再び腫瘍細胞の割合を減少させることが可能であった。また、IL-3Rα 陽性 AML 患者由来細胞を移植した PDX モデルにおいて、タグラキソフスプ投与群では媒体投与群に比べて移植後の生存期間が有意に延長し（P=0.0069）、タグラキソフスプ投与により骨髄中の腫瘍細胞数が有意に減少する（P=0.004）結果を得た。

副次的薬理試験については、タグラキソフスプのヒト正常組織への結合を免疫組織化学的検査により評価した。その結果、タグラキソフスプは IL-3Rα への結合特異性を有しており、ヒトの正常組織（骨髄、小脳、脊髄、肺、心臓、骨格筋、脾臓、肝臓、膵臓、胃、乳房、副腎、結腸、腎臓、膀胱及び皮膚）には結合しないことが示された。さらに、カニクイザルにおける 3 ヵ月間静脈内投与毒性試験では、タグラキソフスプ投与に起因した変化として、脳脈絡叢の変性／壊死／炎症等が観察されたため、同試験の脳脈絡叢の切片を用いて IL-3Rα、IL-3 又はサル IgG に対する免疫組織化学的染色試験を実施した。その結果、対照群とタグラキソフスプ群間で明らかな差は認められず、タグラキソフスプの脳脈絡叢への結合と脳脈絡叢の傷害性変化との関連性は明らかでなかった。

安全性薬理試験については独立した試験は実施せず、反復投与毒性試験において影響を評価した。その結果、タグラキソフスプ投与による心血管系及び呼吸系への影響は認められなかった。一方、一般状態観察で、食欲不振、振戦、円背位及び活動性低下等が認められ、病理組織学的検査では、脳脈絡叢の種々の傷害性変化（変性／壊死／炎症等）が認められていることから、中枢神経系への影響が示唆された。なお、国内第 I/II 相試験（5.3.5.2-2）では問題となる重篤な中枢神経系の副作用は認められていない。

以上のタグラキソフスプの薬理試験の結果から、次の薬理学的特徴が明らかとなった。

- タグラキソフスプはヒト IL-3Rα に特異的に結合した。
- タグラキソフスプはそのジフテリア毒素部分に起因して ADP リボシル化活性を示した。
- タグラキソフスプは IL-3Rα を発現する CAL-1 細胞（BPDCN 細胞株）に対して IC_{50} 値 2.7 pmol/L で細胞傷害作用を示したが、IL-3Rα を発現しない DAUDI 細胞（バーキットリンパ腫細胞株）にはほとんど作用しなかった。また、白血病細胞に対して細胞傷害作用及びアポトーシス誘導作用を示した。
- タグラキソフスプは、IL-3Rα 陽性の BPDCN 細胞や AML 細胞を移植したモデルマウスにおいて、腫瘍細胞減少作用及び生存延長作用を示した。
- 副次的薬理試験では、免疫組織化学的検査により、タグラキソフスプは IL-3Rα への結合特異性を有しており、ヒトの正常組織には結合しないことが示された。
- 安全性薬理試験の評価において、タグラキソフスプによる心血管系及び呼吸系への影響は認められなかったが、中枢神経系への影響が示唆された。

これらの結果は、タグラキソフスプの薬理作用を科学的に裏付けるものであり、タグラキソフスプは BPDCN や AML などの IL-3Rα を発現する悪性腫瘍の治療に貢献できるものと考えられた。

2.6.2.7 図表

図表は、本文中の適切な場所に記載した。

2.6.2.8 参考文献

1. Urieto JO, Liu T, Black JH, Cohen KA, Hall PD, Willingham MC, et al. Expression and purification of the recombinant diphtheria fusion toxin DT_{388}IL3 for phase I clinical trials. Protein Expr Purif. 2004; 33: 123-33. ＜資料番号 4.3-1＞

2. Testa U, Riccioni R, Biffoni M, Diverio D, Lo-Coco F, Foà R, et al. Diphtheria toxin fused to variant human interleukin-3 induces cytotoxicity of blasts from patients with acute myeloid leukemia according to the level of interleukin-3 receptor expression. Blood. 2005; 106: 2527-9. ＜資料番号 4.3-2＞

3. Maeda T, Murata K, Fukushima T, Sugahara K, Tsuruda K, Anami M, et al. A novel plasmacytoid dendritic cell line, CAL-1, established from a patient with blastic natural killer cell lymphoma. Int J Hematol. 2005; 81: 148-54. ＜資料番号 4.3-56＞

4. Jin X, Xie D, Sun R, Lu W, Xiao X, Yu Y, et al. CAR-T cells dual-target CD123 and NKG2DLs to eradicate AML cells and selectively target immunosuppressive cells. Oncoimmunology. 2023; 12: 2248826. ＜資料番号 4.3-57＞

5. Angelot-Delettre F, Roggy A, Frankel AE, Lamarthee B, Seilles E, Biichle S, et al. *In vivo* and *in vitro* sensitivity of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm to SL-401, an interleukin-3 receptor targeted biologic agent. Haematologica. 2015; 100: 223-30. ＜資料番号 4.3-3＞

6. Togami K, Pastika T, Stephansky J, Ghandi M, Christie AL, Jones K, et al. DNA methyltransferase inhibition overcomes diphthamide pathway deficiencies underlying CD123-targeted treatment resistance. J Clin Invest. 2019; 129: 5005-19. ＜資料番号 4.3-4＞

7. Mani R, Goswami S, Gopalakrishnan B, Ramaswamy R, Wasmuth R, Tran M, et al. The interleukin-3 receptor CD123 targeted SL-401 mediates potent cytotoxic activity against $CD34^{+}CD123^{+}$ cells from acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome patients and healthy donors. Haematologica. 2018; 103: 1288-97. ＜資料番号 4.3-5＞

8. 坂本 佳奈, 竹内 賢吾. 芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍. 血液内科. 2020; 80: 718-23. ＜資料番号 5.4-1＞

9. Honjo T, Nishizuka Y, Hayaishi O, Kato I. Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. J Biol Chem. 1968; 243: 3553-5. ＜資料番号 4.3-58＞

2.6.3 薬理試験概要表

目次

2.6.3 薬理試験概要表 1
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 3
2.6.3.3 副次的薬理試験 4
2.6.3.4 安全性薬理試験 5
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 6
2.6.3.6 参考文献 6

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

一覧表

被験物質：tagraxofusp

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD 記載箇所
効力を裏付ける試験					
SPR 法によるヒト及びマウス IL-3Rα への結合	膜標本（組換えヒト IL-3Rα 又は組換えマウス IL-3Rα）	*in vitro*	[redacted]（米国）	Stemline 2018-01	4.2.1.1-1 （参考資料）
CAL-1 細胞に対する細胞傷害作用	CAL-1 細胞（BPDCN 患者由来ヒト形質細胞様樹状細胞株）	*in vitro*	日本新薬	PH-401-001	4.2.1.1-2 （評価資料）
副次的薬理試験					
免疫組織化学的検討	カニクイザル組織（脳脈絡叢）	*in vitro*	[redacted]（米国）	20255431	4.2.1.2-1 （参考資料）
安全性薬理試験					
心血管系、呼吸系、中枢神経系への影響	カニクイザル	静脈内	[redacted][a]（米国）	2231-002	4.2.3.2-3 （評価資料）
	カニクイザル	静脈内	[redacted][a]（米国）	2231-007	4.2.3.2-4 （評価資料）
薬力学的薬物相互作用試験：該当試験なし					

IL-3Rα：インターロイキン-3 受容体 α サブユニット
副次的薬理試験は、反復投与毒性試験（2231-007 試験）の追加試験として実施した。
安全性薬理試験は、反復投与毒性試験（2231-002 試験、2231-007 試験）の中で評価した。

a：現[redacted]

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 ヒト IL-3Rα に対する結合親和性

2.6.2.2.1.1 項参照。

2.6.3.2.2 CAL-1 細胞に対する細胞傷害作用

被験物質：tagraxofusp

試験項目	試験系	試験成績								試験番号（CTD 記載箇所）
		細胞生存率 [a]（%）	タグラキソフスプ（pmol/L）							
			0.1	0.3	1	3	10	30	100	300	
脱水素酵素活性	CAL-1 細胞	個別値	100	91	81	45	13	2	1	0	PH-401-001（4.2.1.1-2、評価資料）
			101	89	83	48	13	2	1	0	
			101	95	83	47	14	2	1	0	
			99	90	85	44	13	2	1	0	
		平均値	100	91	83	46	13	2	1	0	
		標準誤差	0.4	1.4	0.8	0.8	0.4	0.1	0.1	0.0	
	DAUDI 細胞	個別値	95	98	92	94	93	91	91	89	
			98	98	96	93	95	96	93	89	
			97	97	97	99	97	94	97	93	
			102	94	94	94	95	96	93	90	
		平均値	98	97	95	95	95	94	94	90	
		標準誤差	1.5	1.1	1.2	1.5	0.9	1.1	1.3	0.8	

CAL-1 細胞：BPDCN 患者由来ヒト形質細胞様樹状細胞株、DAUDI 細胞：バーキットリンパ腫患者由来細胞株

a：陰性対照群（培地のみ）を 0%、陽性対照群（タグラキソフスプ無処置）を 100%とした時の、タグラキソフスプ処置群の脱水素酵素活性の百分率として示した。

2.6.3.3 副次的薬理試験

2.6.3.3.1 カニクイザル反復投与毒性試験における脳脈絡叢への結合能

被験物質：tagraxofusp

試験項目	投与群	性別、例数	陽性率（%）[a]			試験番号（CTD 記載箇所）
			IL-3Rα（CD123）	IL-3	サル IgG	
免疫組織化学	0 μg/kg/日（対照群）	雌 3 例	88.36 (8.63)	1.50 (1.90)	18.07 (11.78)	20255431（4.2.1.2-1、参考資料）
		雄 3 例	78.77 (8.12)	1.30 (2.10)	18.32 (13.43)	
	35 μg/kg/日	雌 2 例	85.91 (6.08)	0.06 (0.03)	24.11 (15.63)	
		雄 3 例	68.65 (12.68)	3.40 (2.54)	30.63 (16.37)	
	45 μg/kg/日	雌 3 例	56.50 (6.22)	1.33 (1.77)	24.73 (12.75)	
		雄 3 例	64.74 (10.55)	1.78 (1.39)	17.82 (4.37)	

a：壊死、繊維化、炎症が認められた領域を「（タグラキソフスプによる）影響領域」、これらが認められなかった領域を「正常領域」と定義した。自動解析装置によってそれぞれの領域の染色強度を定量化し、陽性率（%）=（影響領域の染色強度）/（正常領域の染色強度＋影響領域の染色強度）×100 により算出した。

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：tagraxofusp

試験項目	試験系	投与期間、投与方法	投与量 (μg/kg/日)	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号 (CTD 記載箇所)
心血管系への影響						
心電図検査 （RR、PR、QT 間隔、QRS 持続時間、心拍数、QTc）	カニクイザル 雌雄各 3 例/群 （回復群[a]は雌雄各 2 例/群）	5 日間（1 日 1 回） 5 分かけて静脈内	0, 30, 60	いずれのパラメータも影響なし。	適	2231-002 （4.2.3.2-3、評価資料）
	カニクイザル 雌雄各 3 例/群	3 サイクル（1 日 1 回）[b] 5 分かけて静脈内	0, 35, 45	いずれのパラメータも影響なし。	適	2231-007 （4.2.3.2-4、評価資料）
呼吸系への影響						
一般状態観察 病理組織学的検査	カニクイザル 雌雄各 3 例/群 （回復群[a]は雌雄各 2 例/群）	5 日間（1 日 1 回） 5 分かけて静脈内	0, 30, 60	呼吸系に関する所見なし。	適	2231-002 （4.2.3.2-3、評価資料）
	カニクイザル 雌雄各 3 例/群	3 サイクル（1 日 1 回）[b] 5 分かけて静脈内	0, 35, 45	呼吸系に関する所見なし。	適	2231-007 （4.2.3.2-4、評価資料）
中枢神経系への影響						
一般状態観察 病理組織学的検査	カニクイザル 雌雄各 3 例/群 （回復群[a]は雌雄各 2 例/群）	5 日間（1 日 1 回） 5 分かけて静脈内	0, 30, 60	30 μg/kg/日以上の群で、一般状態観察では食欲不振が、病理組織学的検査では、脳脈絡叢の炎症／壊死／変性が認められた。	適	2231-002 （4.2.3.2-3、評価資料）
	カニクイザル 雌雄各 3 例/群	3 サイクル（1 日 1 回）[b] 5 分かけて静脈内	0, 35, 45	35 μg/kg/日以上の群で、一般状態観察では食欲不振、振戦、活動性低下が、病理組織学的検査では、脳脈絡叢の変性／壊死／炎症等が認められた。	適	2231-007 （4.2.3.2-4、評価資料）

a：回復群として、0 及び 60 μg/kg/日を設定した
b：5 日間投与＋21～22 日間休薬を 1 サイクルとした

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし。

2.6.3.6 参考文献

該当なし。