

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) PDX モデルを用いた非臨床試験の実施に係る標準化に関する研究  
(英語) Study on standardization of non-clinical studies using PDX model

研究開発実施期間: 令和 2 年 7 月 1 日～令和 4 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 柳下 薫寛  
(英語) Shigehiro Yagishita

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター 研究所 分子薬理研究分野 研究員  
(英語) Staff Scientist, Division of Molecular Pharmacology, National Cancer Center Research  
Institute

## II 研究開発の概要

### 研究開発の成果およびその意義等

抗がん剤の開発成功率は5%程度と低く、前臨床段階でのProof of conceptの取得の難しさが一因である。近年、患者由来の腫瘍組織を免疫不全マウスへ移植するPDXモデルが新たな薬効評価基盤として注目を浴びている。特に元患者とPDXの薬効の一致率は50～80%と非常に高いことが報告されており、既に抗がん剤開発ではPDXモデルを用いた評価が主流である(Nat Med, 2015)。

国立がん研究センターは、国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 医療研究開発革新基盤創成事業 (CiCLE) の支援のもと、進行・再発期で抗がん剤抵抗となった患者を中心に、がん種横断的な日本人由来のPDXライブラリーを構築した(「がん医療推進のための日本人がん患者由来PDXライブラリー整備事業」)。本PDXライブラリーを活用し、患者と樹立されたPDXモデルでの抗がん剤感受性の比較検討を進めているが、必ずしも既報通り効果が一致するわけではないことを認識している。患者とPDXにおける薬効の乖離の一つの要因として、非臨床試験の適切な実施方法が定まっていないことがある。例えば、PDXは患者腫瘍の不均一性を保持するため、同時に複数のマウスへ移植した場合に移植する腫瘍片によって増大速度が著しく異なる。このため複数のマウスへ移植し、一群あたり6匹程度のマウスに群わけし、同時に薬効評価を開始することが一般的である。しかし、複数のマウスを使用するコストの問題から、一群1匹から3匹とする方法や、腫瘍体積が一定以上になった順に薬剤投与を開始する方法なども試みられている(Cancer Cell, 2016)。また、効果判定法(腫瘍縮小や腫瘍増大までの期間など)、薬剤の種別(殺細胞性抗がん剤、分子標的治療薬、抗体製剤など)、投与量設定(RD, MTD)、薬理的評価項目(血中濃度やAUCなど)といった個々の項目についても共通の認識がない。PDXモデルを用いた非臨床試験が、近年一般化された新たな評価系であること、PDXの入手は容易ではないこと、利用に係る高額な費用などから、評価方法は各研究者、各施設によって異なる方針のもと行われているのが実情である。

以上の背景より、本研究開発ではPDXを用いた非臨床試験において、臨床効果を適切に反映する実施方法の標準化に向けた検討を行うこととした。研究開始時点で、PDXを用いた非臨床試験に係る変動要因として、主に以下の6つの因子を候補として検討した。

- ① 各群の動物数：腫瘍体積のばらつきを吸収するため、 $n=3$ 以上の動物数で実施することが一般的であるが、PDXの場合元腫瘍の不均一性により細胞株移植モデルよりも腫瘍体積のばらつきが大きい。一方PDX 1株を一人の患者とみなし $n=1$ で評価を行う試みもある(Cancer Cell 2016, Nat Med 2015)。血液腫瘍などの不均一性が少ない腫瘍においては $n=1$ の結果に代表される可能性もあるが、癌種やドライバー遺伝子の有無によって検証を行う必要がある。
- ② 薬効評価の開始時期：腫瘍が $200\text{mm}^3$ 程度になった段階で腫瘍体積により各群のばらつきを調整し、同時に投与開始する方法が従来より行われているが、PDXの腫瘍増殖が不均一であることから各個体で体積が一定量を超えた段階で順次投与開始する方法(rolling base method)もPDXでは用いられている。これらの手法の違いによる影響は検証が不十分である。
- ③ 効果判定方法：無治療群との比較による単純な腫瘍体積の比較方法のほか、薬剤投与により縮小した腫瘍が再増大するまでの期間を観察する方法などが行われている。臨床効果の推定をエンドポイントとした場合の、適切な判定法は定まっていない。
- ④ 薬剤の種別と投与量：殺細胞性抗がん剤、分子標的治療薬、抗体製剤などの種別によりマウス個体内での代謝や分布が異なる。また移植した腫瘍の蛋白や遺伝子プロファイルによっても影響を受けうる。投与量はマウスにおける最大耐用量、推奨用量など定まっていないが、臨床効果の推定を行うことが目的

であるため臨床用量から考えて許容可能な（臨床的過剰/過少ではない）投与量である必要がある。

- ⑤ 薬理学的評価項目：臨床用量から考えて許容可能かどうかの判断基準として、血中濃度（PK）や AUC の測定と比較検証も必要である。
- ⑥ その他：PDX マウスの由来となる腫瘍組織が胸水や腹水検体の場合、患者の薬剤抵抗性を PDX が反映しないとの報告もある。これは液性成分中に薬剤が十分量移行していない事による現象と考えられ、このような患者や検体に関する情報も重要である。

以上のような変動要因につき検証を行うべく、J-PDX ライブラリーを用いた検討を行った。

令和 2 年度は予備検討として非小細胞肺がん PDX で Gefitinib, Osimertinib を投与した株について最終投与日の血漿・腫瘍検体を用いた濃度測定を実施した。この結果、血中および腫瘍内濃度がともに極低値でありマウスにおけるクリアランスが非常に早いことを確認した (Jo H, Yagishita S, et al, Mol Cancer Ther. 2022)。このため、最終投与日における経時的なマイクロサンプリング法による血中濃度解析を実施し、薬剤の暴露量を推定することとした。マイクロサンプリングによる血中濃度測定の妥当性検証として非担がんマウスに対し EGFR-TKI 単回経口投与を行い、経時的に尾静脈からのマイクロサンプリングを実施、LC-MS/MS による濃度測定を行った。この結果、マイクロサンプリングによる経時的な血中濃度測定の妥当性が示され、系の構築が完了した。

J-PDX ライブラリーで樹立された PDX のうち、EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺がん株で EGFR チロシンキナーゼ阻害剤（EGFR-TKI）耐性となった株を選定し、複数マウスへ移植、コントロール群と EGFR-TKI 投与群でそれぞれ N=1, N=3, N=6 と使用マウス数を振り、投与実験を実施した。採取投与日に経時的な血中濃度評価、腫瘍濃度測定、薬効評価結果との関連解析を実施した。EGFR-TKI 投与群では全ての PDX において一様な縮小傾向を認めたものの、対象群では増大速度のばらつきが大きく、最終観察時点での腫瘍体積が最大で 5 倍程度の差が認められた。このため対象群の腫瘍増大速度によっては、1 群あたりの使用するマウス数によって、治療効果を見誤る可能性が確認された。一方血中濃度評価では N=1, 3, 6 いずれにおいても良好な一致が確認され、PDX モデルでのマイクロサンプリングによる薬物動態評価の再現性が確認された。

次に EGFR-TKI 投与量を 4 段階に振り、各群 N=6 での評価を実施した。投与量依存的な腫瘍縮小効果と薬物動態の変化が確認された。本検討に使用した PDX は、EGFR 遺伝子変異陽性であり、かつ EGFR-TKI 耐性となった時点での患者腫瘍から作成されている。PDX では EGFR-TKI の投与量が一定の値を下回った段階で腫瘍縮小効果の減弱が確認されており、この結果からも臨床効果予測を目的した PDX での薬効評価においては、薬物投与量の最適化を行わなければ結果の乖離をもたらすことが示唆された。PDX マウスにおける薬理学的指標の検討では、暴露量、最大血中濃度いずれも同等の投与量におけるヒトの値と比べ 10 倍以上の差が認められており、ヒトとマウスにおける体内動態の大きな違い、マウスの結果からヒトへ外挿するためのモデル式の構築が必要と考えられた。

一方、上記検討を進める中で使用するマウスの系統による体内動態の差異が疑われた。このため複数種類の免疫不全マウスにおける小分子化合物と抗体製剤の体内動態変化を、追加で検討を行った。使用したマウスは SCID 系統（SCID-Beige, NOG）、Balb 系統（Balb-c/nu）、C57/BL 系統とし、それぞれの系統種において EGFR-TKI の単回投与後 24 時間までのマイクロサンプリングによる薬物動態評価を実施した。この結果、明らかにマウス系統によって最大血中濃度、暴露量が変化することが確認された。

The success rate of anticancer drug development is as low as about 5%, partly due to the difficulty of obtaining a proof of concept at the preclinical stage. Recently, the patient-derived xenograft (PDX) model, in which patient-derived tumor tissue is transplanted into immunodeficient mice, has attracted attention as a new basis for evaluating drug efficacy. In particular, it has been reported that the concordance rate of drug efficacy between original patients and PDX is very high, ranging from 50 to 80%, and the PDX model is already the mainstay of evaluation in anticancer drug development (Nat Med, 2015).

The National Cancer Center, with support from the Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) Cyclic Innovation for Clinical Empowerment (CiCLE), has constructed a PDX library of Japanese origin across cancer types, focusing on patients with advanced or recurrent disease who have become resistant to anticancer drugs (J-PDX library). Using J-PDX library, we are now comparing anticancer drug sensitivity between patients and the established PDX models. However, we recognize that the effects do not necessarily coincide with each other. One factor contributing to the discrepancy of drug efficacy between patients and PDXs is the lack of proper conduct of nonclinical studies. For example, since PDX preserves patient tumor heterogeneity, the rate of growth varies markedly among tumor fragments when transplanted into multiple mice simultaneously. For this reason, it is common to transplant PDX into multiple mice, grouping them into groups of about six mice per group, and to begin evaluation of drug efficacy at the same time. However, due to the cost of using multiple mice, methods such as using one to three mice per group or starting drug administration in the order in which tumor volumes exceed a certain level have also been attempted (Cancer Cell, 2016). There is also no common understanding of individual items such as the method for determining efficacy (e.g., time to tumor shrinkage or tumor growth), type of drug (e.g., cytotoxic drugs, molecular targeted drugs, antibody drugs), dosage setting (recommended dose, maximum tolerated dose), and pharmacological endpoints (e.g., blood concentration, area under the curve).

In light of the above background, we decided to conduct a study to standardize the method of conducting non-clinical studies using PDX to appropriately reflect the clinical efficacy. At the start of the study, the following six factors were considered and investigated as candidates as factors that may cause variation in nonclinical studies using PDX.

- (1) Number of animals in each group
- (2) Start of drug efficacy evaluation
- (3) Method of determining efficacy
- (4) Type and dose of drug
- (5) Pharmacological endpoints
- (6) Others

In FY2020, as a preliminary study, the validity of the measurement of blood concentration over time by micro-sampling was demonstrated, and the construction of the system was completed. It was suggested that the evaluation of drug efficacy with PDX for the purpose of predicting clinical efficacy may lead to discrepancies in results if the dosage of drug is not optimized. The major difference between human and mouse pharmacokinetics and the need to construct a model equation to extrapolate the mouse results to humans were considered necessary. We suspected that there were differences in pharmacokinetics

between the strains of mice used in the PDX study. Therefore, we additionally examined the pharmacokinetic changes of small molecule compounds and in several strains of immunodeficient mice.