

110. 癌分子標的薬の代謝プロファイルと有害事象の関連解明

福土 将秀

旭川医科大学病院 薬剤部

Key words : がん, 分子標的薬, 代謝物, 薬物動態, 細胞毒性

緒言

近年、経口製剤の分子標的抗がん薬が次々に開発され、がん治療成績の向上に大きく貢献しているが、重篤な有害事象のために服薬継続が困難となるケースが臨床上問題となっている。我々はこれまでに、経口分子標的薬の適正使用法の確立を目指して、腎細胞がん患者と肝細胞がん患者におけるソラフェニブの薬物動態を評価し、手足皮膚反応や高血圧の発症とソラフェニブ血中濃度が密接に関連することを明らかにしてきた¹⁾。一方、ソラフェニブにフッ素原子が1個付加した類似構造を持つレゴラフェニブに関して、毒性がより強く、重篤な肝機能障害や手足皮膚反応などの副作用に対して注意が必要とされているが、レゴラフェニブの有害事象を予測しうる有用なバイオマーカーについては十分に解明されていない。そこで本研究では、ソラフェニブおよびレゴラフェニブの安全で最適な投与方法の開発を目指して、未変化体および代謝物と薬物トランスポーターとの相互作用やソラフェニブの細胞毒性に及ぼす代謝反応の影響を評価した。また、レゴラフェニブ治療大腸がん患者を対象に、代謝物プロファイルと有害事象の関連性について検討した。

方法、結果および考察

1. ソラフェニブ/レゴラフェニブのグルクロン酸抱合代謝物に関する検討

ソラフェニブとレゴラフェニブは、主に肝臓においてCYP3A4とUGT1A9によって代謝され、活性代謝物であるN-オキサイド体(M-2)と不活性型のグルクロン酸抱合体(M-7)に変換される²⁾。また、レゴラフェニブに関して、M-2以外にもN-オキサイドアミド体(M-5)が生成し、M-2のグルクロン酸抱合体としてM-8が存在することも知られている(Fig. 1)。我々は、これらの代謝物を用いて詳細な薬物動態解析を行うことを目的に、市販で入手可能であった代謝物(M-2およびM-5; ALSACHIM, フランス)以外に、M-7代謝物の調製を試みた。Sparidansらの文献³⁾を参考にしながら、ソラフェニブをブタまたはウシ由来肝ミクロソームと反応させ、反応液をHPLCにてピークを追跡しながらLC-MS/MSを用いてフラグメントを測定し、文献データをもとに目的化合物の同定を試みた(ソラフェニブ m/z 465.1>252.9、N-オキサイド体 m/z 481.0>286.0、グルクロン酸抱合体 m/z 641.2>270.1)。しかし、様々な反応条件を検討したが、目的とするM-7代謝物が得られなかった。理由として、精製酵素ではなく動物由来の肝ミクロソームを用いたため、分解に働く酵素などの影響によりM-7代謝物が得られなかったと推測している。その後さらに、海外の試薬メーカー2社にソラフェニブおよびレゴラフェニブのM-7代謝物の受託合成を依頼したが、いずれも最終産物の精製が困難であることが判明した。そこで、グルクロン酸抱合代謝物の標準物質を用いた定量法に代わる分析手法として、サンプルに β -グルクロニダーゼ(*E. coli* K12由来)を処置することにより脱抱合させ、レゴラフェニブのM-7とM-8濃度をそれぞれ未変化体とM-2の濃度として間接的に定量する手法を開発した。 β -グルクロニダーゼの反応条件を最適化することで、血液および尿中に排泄されたレゴラフェニブのグルクロン酸抱合代謝物を再現性良く測定できることが確認された(CV% < 10%)。現在、本手法を用いて、レゴラフェニブ治療大腸がん患者における代謝物プロファイルについて検討を進めている。

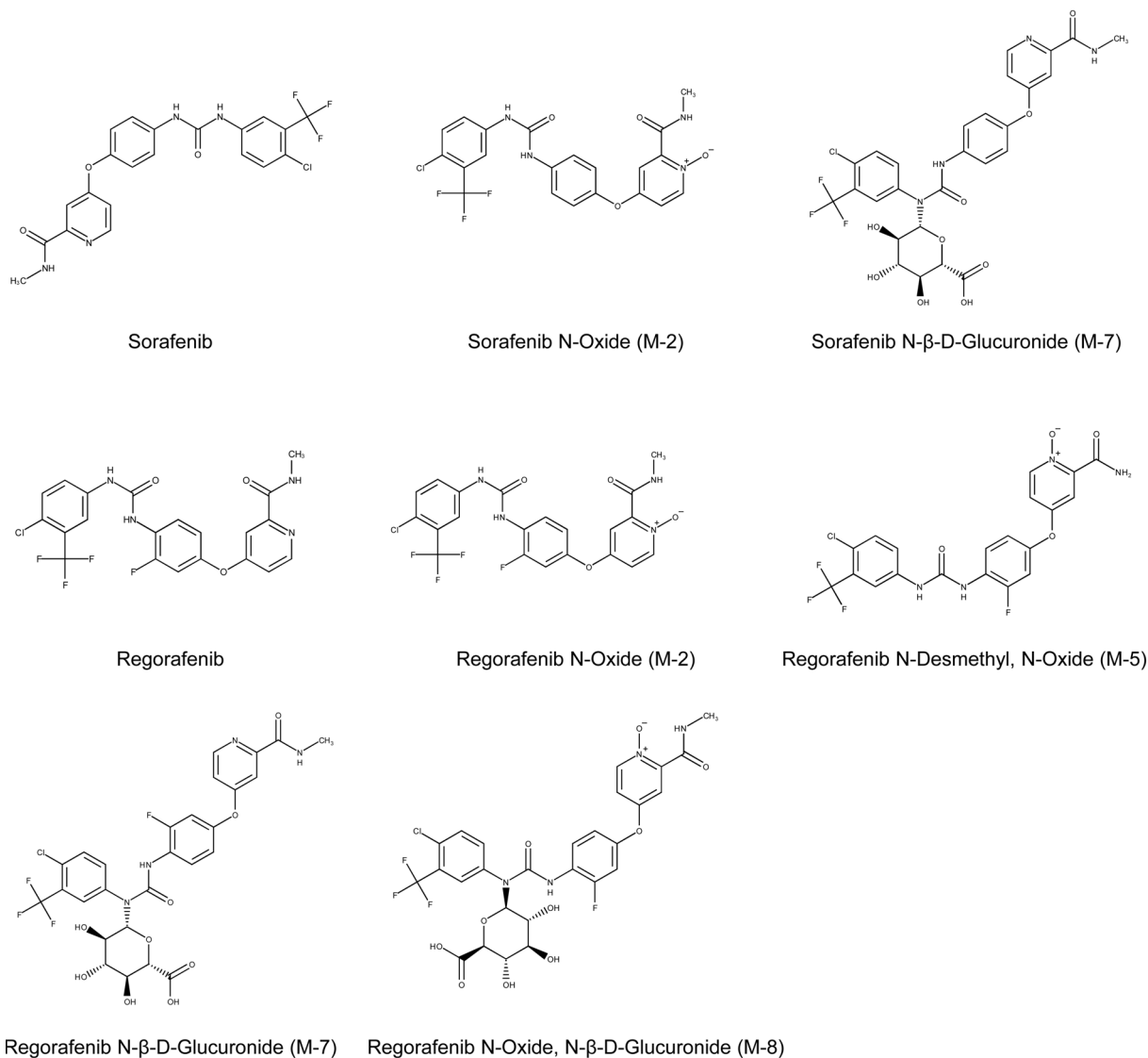


Fig. 1. Structures of sorafenib and regorafenib and their respective metabolites

2. ソラフェニブ/レゴラフェニブおよび活性代謝物の肝取込・排泄過程に関する検討

ヒト肝芽腫由来細胞株 HepG2 を用いて、ソラフェニブおよびレゴラフェニブの細胞内取込について、37℃で一定時間処置後の細胞内と培養液中濃度を LC-MS/MS 法によって定量した。その結果、1μM のソラフェニブまたはレゴラフェニブを 1 時間処置した後の細胞内蓄積量は、レゴラフェニブの方がソラフェニブと比べて約 2 倍高く、いずれも 4℃の条件下で取込量が有意に低下した。また、OCT1 (SLC22A1) 阻害剤のキニジン (100μM) の共存によって取込量に有意な変化が認められなかったことから、OCT1 以外のトランスポーターが両薬物の肝取込に寄与していることが示唆された。一方、P-糖タンパクや BCRP、MRP2 発現メンブレンを用いて、ソラフェニブとレゴラフェニブおよび活性代謝物による ATPase 活性の促進作用を評価し、薬物排泄トランスポーターとの相互作用を検討した。その結果、ソラフェニブとその活性代謝物である M-2、およびレゴラフェニブとその活性代謝物である M-2/M-5 は、いずれも P-糖タンパクおよび BCRP の ATPase 活性を濃度依存的に促進することが判明した。また、10μM 以上の高濃度処置によって ATPase 活性の低下が認められたことから、高濃度域では両トランスポーターの ATPase 活性に対して阻害作用を示すことが示唆された。一方、MRP2 (ABCC2/cMOAT) の ATPase 活性に対する促進効果は認められなかった。これまでに、MRP2 遺伝子欠損ラットである EHBR と野生型 SD ラットを用いて、レゴラフェニブの胆汁排泄クリアランスに両群間で有意差が認められないことが報告されていることから⁴⁾、レゴラフェニブは MRP2 の基質にならないことが推察された。

3. ソラフェニブとステロイド剤の相互作用に関する検討

HER-2 陽性乳がんに対する治療薬のラパチニブに関して、肝臓 CYP3A4/5 によって細胞毒性を有する中間代謝物 (キノノイミン体) が生成し、薬物性肝障害のリスクファクターである可能性が示唆されている⁵⁾。また、CYP3A 誘導作用をもつデキサメタゾン Maus 肝細胞に処置することによって、ラパチニブによる細胞増殖抑制効果が増強することが示されている⁶⁾。一方、ソラフェニブとレゴラフェニブに関して、反応性のキノノイミン体が生成することを示した報告は皆無であるが、O-脱アルキル化反応によってキノノイミン体が生成する可能性が考えられる。最初に我々は、384 ウェルプレート (Corning #3712) に播種した HepG2 細胞 (1,000 cells/well) に対する種々薬物による細胞毒性を PrestoBlue 試薬 (Invitrogen) を用いて評価した。その結果、レゴラフェニブの方がソラフェニブと比べて IC₅₀ が低いこと、ソラフェニブの M-2 代謝物およびレゴラフェニブの M-2/M-5 代謝物は、いずれも未変化体と同程度の細胞増殖抑制効果を示すことが確認できた (Fig. 2A)。

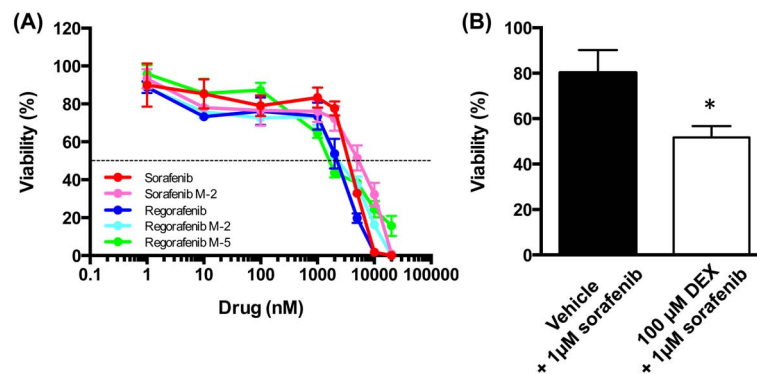


Fig. 2. (A) Effects of sorafenib and regorafenib and their respective metabolites on cell viability of HepG2 cells. (B) Effect of pretreatment with 100μM dexamethasone (DEX) on sorafenib cytotoxicity in HepG2 cells. Dotted line indicates 50 % inhibition of cell viability. Data are expressed as mean ± SEM (n=4). *p<0.05.

次に、デキサメタゾン (100μM) を HepG2 細胞に 72 時間処置した後ソラフェニブを 24 時間処置し、同様に細胞生存率を評価した。その結果、vehicle 処置のみの対照群と比較して、ソラフェニブの細胞毒性が増強する傾向が認められた (Fig. 2B)。この理由として、デキサメタゾンによって CYP3A 酵素が誘導されソラフェニブの代謝が亢進し、細胞毒性を有する代謝物の生成が上昇したことによる可能性が推察された。現在、レゴラフェニブについても同様に検討し、細胞内代謝物プロファイルの変化について検討中である。さらに、生体内におけるがん微小環境により近い環境で腫瘍細胞のスフェロイド形成を誘導する 3 次元培養プレート (Corning Spheroid Microplates) を用いて、薬物による細胞毒性と代謝能の関連を単層培養と比較しながら評価を進めている (Fig. 3)。

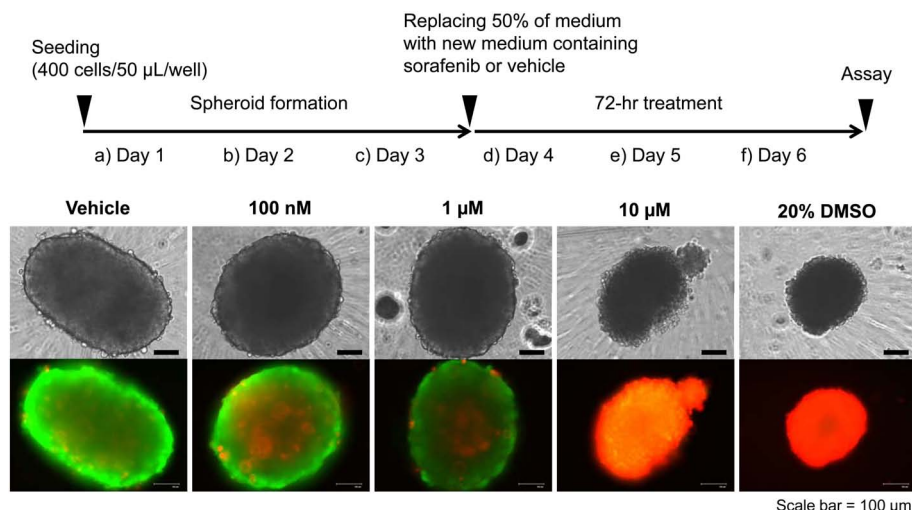


Fig. 3. Cytotoxicity of sorafenib on multicellular tumor spheroids of HepG2

Upper panels show bright-field images and lower panels are fluorescent images (**Live**, green; **Dead**, red).

4. レゴラフェニブ治療患者における代謝プロファイルと有害事象の関連解析

旭川医科大学病院でレゴラフェニブ治療を開始された大腸がん患者を対象に、文書による同意が得られた患者に協力をいただき、未変化体のレゴラフェニブおよび M-2/M-5 代謝物の血中濃度測定を LC-MS/MS 法を用いて実施した。また、先述した β -グルクロニダーゼ処置による M-7/M-8 代謝物の間接的な定量を行った。これまでに実施されたレゴラフェニブの国内第 1 相試験における薬物動態評価では、定常状態における血中濃度は、レゴラフェニブ > M-2 > M-5 の順であることが報告されている⁷⁾。我々の検討において、M-5 は治療開始後遅れて血中濃度が上昇してくること、休薬期間においても M-5 は体内に留まり続けることが示唆された。また、重篤な手足皮膚反応が発現した患者の代謝物プロファイルを調べた結果、M-7 の血中濃度が低下し M-2/M-5 の血中濃度がともに未変化体濃度と比べて顕著に上昇していることを見出した。現在、レゴラフェニブおよび M-2/M-5 血中濃度の個体間変動要因について、遺伝子多型を含めて解析を進めている。また、M-2 および M-5 の毒性バイオマーカーとしての可能性について、今後更に検証していく必要がある。

本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Fukudo M, Ito T, Mizuno T, Shinsako K, Hatano E, Uemoto S, Kamba T, Yamasaki T, Ogawa O, Seno H, Chiba T, Matsubara K. Exposure-toxicity relationship of sorafenib in Japanese patients with renal cell carcinoma and hepatocellular carcinoma. *Clin Pharmacokinet*. 2014;53(2):185-96. doi: 10.1007/s40262-013-0108-z. PubMed PMID: 24135988.
- 2) Lathia C, Lettieri J, Cihon F, Gallentine M, Radtke M, Sundaresan P. Lack of effect of ketoconazole-mediated CYP3A inhibition on sorafenib clinical pharmacokinetics. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006;57(5):685-92. doi: 10.1007/s00280-005-0068-6. PubMed PMID: 16133532.
- 3) Sparidans RW, Vlaming ML, Lagas JS, Schinkel AH, Schellens JH, Beijnen JH. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for sorafenib and sorafenib-glucuronide in mouse plasma and liver homogenate and identification of the glucuronide metabolite. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009 15;877(3):269-76. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.12.026. PubMed PMID: 19117812.
- 4) Hotta K, Ueyama J, Tatsumi Y, Tsukiyama I, Sugiura Y, Saito H, Matsuura K, Hasegawa T. Lack of Contribution of Multidrug Resistance-associated Protein and Organic Anion-transporting Polypeptide to Pharmacokinetics of Regorafenib, a Novel Multi-Kinase Inhibitor, in Rats. *Anticancer Res*. 2015;35(9):4681-9. PubMed PMID: 26254357.
- 5) Castellino S, O'Mara M, Koch K, Borts DJ, Bowers GD, MacLauchlin C. Human metabolism of lapatinib, a dual kinase inhibitor: implications for hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(1):139-50. doi: 10.1124/dmd.111.040949. PubMed PMID: 21965624.

- 6) Teo YL, Saetaew M, Chanthawong S, Yap YS, Chan EC, Ho HK, Chan A. Effect of CYP3A4 inducer dexamethasone on hepatotoxicity of lapatinib: clinical and in vitro evidence. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;133(2):703-11. doi: 10.1007/s10549-012-1995-7. PubMed PMID: 22370628.
- 7) Sunakawa Y, Furuse J, Okusaka T, Ikeda M, Nagashima F, Ueno H, Mitsunaga S, Hashizume K, Ito Y, Sasaki Y. Regorafenib in Japanese patients with solid tumors: phase I study of safety, efficacy, and pharmacokinetics. *Invest New Drugs.* 2014;32(1):104-12. doi: 10.1007/s10637-013-9953-8. PubMed PMID: 23553067.