

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790169

研究課題名（和文） ソラフェニブ誘発性肝障害における早期予測マーカーの探索

研究課題名（英文） Searching of early predictive marker in sorafenib-induced hepatotoxicity.

研究代表者

鈴木 裕之（SUZUKI HIROYUKI）

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50588978

研究成果の概要（和文）：本研究は、ソラフェニブの肝障害における予測マーカーの探索を目的に行った。その結果、ソラフェニブによる肝障害発現は、ソラフェニブ本体が作用していることが明らかとなった。さらに、肝細胞を用いた実験からソラフェニブ *N*-オキシドがソラフェニブに変換されることで細胞毒性を引き起こす可能性が示唆された。これらの結果から、CYP3A4 の機能低下によりソラフェニブの代謝が低下すると、肝障害発現が引き起こされる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to explore the predictive marker for liver injury caused by sorafenib-treatment. From the results using hepatoma cells, it showed that sorafenib itself was due to occurring liver injury. In addition, sorafenib *N*-oxide also showed cytotoxicity, which *N*-oxide might convert to sorafenib in cells. Sorafenib is metabolized to sorafenib *N*-oxide via CYP3A4 in human liver. Combined together, when CYP3A4 function decreased in a patient, sorafenib convert ration maintained high level in serum. Therefore, this pharmacokinetic profile may be a key role for causing liver injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：薬物動態・代謝学、抗がん剤

## 1. 研究開始当初の背景

ソラフェニブは、『切除不能な肝細胞癌』『根治切除不能又は転移性の腎細胞癌』に対する効能・効果を持ち、2008年に日本で発売が開始された薬剤であり、販売開始から約1年で約3,500例の腎細胞癌患者、約2,000例の肝細胞癌患者に投与されている。報告された重篤な副作用のうち、肝不全と肝性脳症は、肝細胞癌患者に集中していた。これらの患者において、ソラフェニブ投与後のAST、ALTに加え、急激なビリルビン値の上昇が認められている。こうした検査値以上を認めた後、す

ぐにソラフェニブ投与を中止しても、死に至ったケースもある。このような背景から、肝障害発現の早期予測マーカーの決定は急務であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞毒性発現とソラフェニブ未変化体及び代謝物の動態プロファイルとの関連性を明らかにし、早期肝障害発現予測マーカーを調べることを目的とした。

## 3. 研究の方法

ソラフェニブは、体内でCYP3A4、やUGT1A9により代謝され、排泄されることが知られて

いる (Latia C. *et al*, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **57** (2006) 685-692)。本研究では、まず細胞毒性とソラフェニブの動態プロファイルとの関連性を明らかにするため、ソラフェニブ未変化体及び代謝物を培養肝細胞に直接添加し、細胞内及び培地中のソラフェニブ、ソラフェニブ代謝物の測定と細胞毒性発現の評価を行う。次に、薬物代謝酵素量の変動に伴う代謝プロファイルと毒性との関連を明らかにする目的で、代謝酵素の細胞内発現量を変化させ、細胞毒性と関連性を精査する。

続いて、細胞実験の結果から、早期肝障害予測に有用なマーカー候補を見出す。次に、ソラフェニブを服用している患者検体を用い、血中のソラフェニブ、ソラフェニブ代謝物の濃度を測定し、*in vitro* で得られた早期肝障害予測マーカーと、肝障害発現および患者情報との関連を精査し、本マーカーが診療に応用可能であることを検証する。

#### 4. 研究成果

##### I. ソラフェニブ及びソラフェニブ N-オキシドの細胞増殖に対する影響

ソラフェニブ、及びその主代謝物であるソラフェニブ N-オキシドをヒト肝臓がん由来細胞 HepG2 細胞へ添加し、24, 48 時間培養後の細胞生存率を MTT assay 法で測定した。その結果、HepG2 細胞に対するソラフェニブの  $EC_{50}$  は、24 時間後で 5.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48 時間後で 1.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。一方、HepG2 細胞に対するソラフェニブ N-オキシドの  $EC_{50}$  は、48 時間後で 8.64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、72 時間後で 7.71  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (図 1, 図 2) であった。

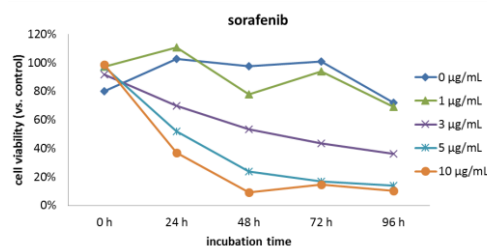


図 1 HepG2 細胞におけるソラフェニブの細胞増殖に対する影響

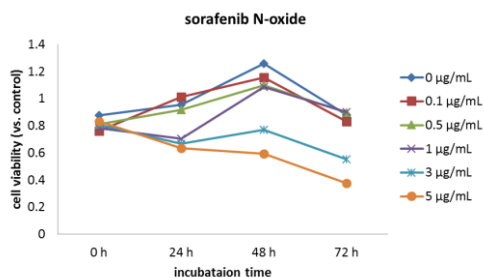


図 2 HepG2 細胞におけるソラフェニブ N-オキシドの細胞増殖に対する影響

また、Huh7 細胞についても同様の検討を行ったところ、Huh7 細胞に対するソラフェニブの  $EC_{50}$  は、72 時間後で 5.66  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、96 時間後で 3.57  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。(data not shown)

さらに、細胞障害の検討を、LDH assay により行った。その結果、HepG2 細胞へソラフェニブを暴露させたときの LDH の産生は Huh7 細胞と比較して強かった。これらの結果より、ソラフェニブによる細胞毒性は HepG2 において強く発現することが示唆され、(図 3, 図 4) ソラフェニブの感受性が細胞株によって異なることが分った。しかし、ソラフェニブ N-オキシドが細胞毒性を示す報告は無いため、この現象について、更なる検討を行った。

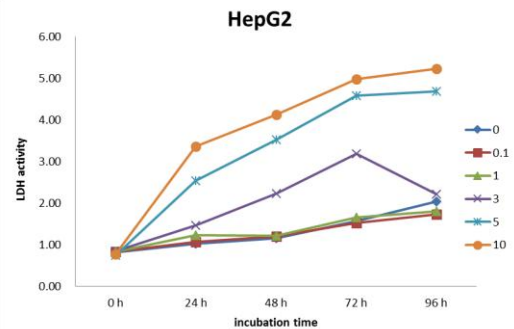


図 3 HepG2 細胞におけるソラフェニブの LDH 産生に対する影響

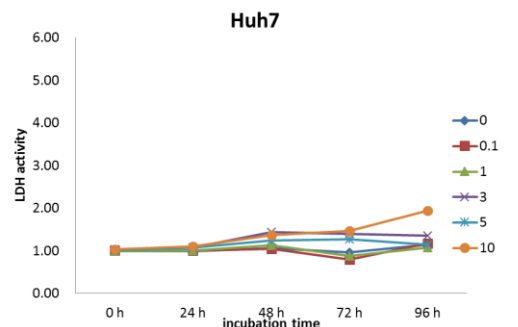


図 4 Huh7 細胞におけるソラフェニブの LDH 産生に対する影響

##### II. 培養細胞中及び培養液中におけるソラフェニブ及びソラフェニブ N-オキシドの濃度測定系の構築

これまでの結果から、培養細胞において、ソラフェニブ及びソラフェニブ N-オキシド、が HepG2 細胞に対して毒性を示し、その濃度は、血中ソラフェニブ濃度と近接していることが明らかとなった。

そこで、細胞毒性とソラフェニブの動態プロファイルとの関連性を明らかにするため、ソラフェニブ未変化体及び代謝物を肝細胞に直接添加し、培養細胞内及び培地中のソラフェニブ、ソラフェニブ代謝物の測定と細胞毒性発現の評価を行うこととした。

まず、培養細胞内及び培養液中のソラフェニブ、ソラフェニブ N-オキシドの濃度を測定するために、培養細胞内及び培養液中のソ

ラフェニブ及びソラフェニブ *N*-オキサイドの測定系の構築を行った。培養細胞内のプロトコールは、細胞  $1 \times 10^7$  に対し、リン酸緩衝液 (pH 7.5) 350  $\mu$ L、IS であるトルナフテートを 150  $\mu$ L 添加し、ホモジナイズ、超音波破碎を行った。遠心分離後、上清をアセトニトリル 200  $\mu$ L により除タンパク操作を行った。遠心分離後、上清 300  $\mu$ L に水 75  $\mu$ L を加え、そのうちの 250  $\mu$ L を Bond Elut C18 により不純物との分離を行った。溶出画分を窒素気流下で乾固させ、移動相 100  $\mu$ L にて再溶解させ、HPLC で測定を行った。(図 5)

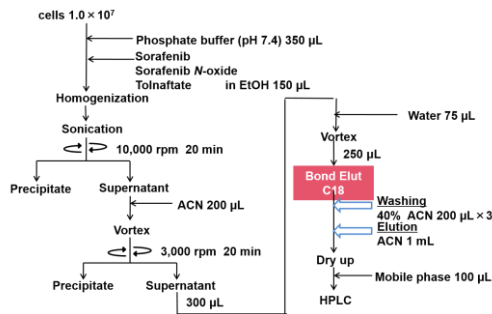


図 5 細胞内のソラフェニブ及びソラフェニブ *N*-オキサイド測定系

その結果、ソラフェニブ及びソラフェニブ *N*-オキサイドそれぞれで、0.03-30  $\mu$ g/mL の範囲で良好な直線性が得られた。また、日内及び日間変動試験を行った結果、RSD、RE が  $\pm 15\%$  以内であった。

Intra-day				Inter-day			
Added ( $\mu$ M)	Observed ( $\mu$ M, n=6)	RSD (%)	RE (%)	Added ( $\mu$ M)	Observed ( $\mu$ M, n=6)	RSD (%)	RE (%)
Sorafenib 0.22	0.23	8.4	-0.88	Sorafenib 0.22	0.22	14	2.3
1.1	1.1	5.2	-2.7	1.1	1.1	9.6	-1.6
5.4	21	6.7	7.1	5.4	5.4	5.9	-8.1
Sorafenib N-oxide 0.21	0.20	7.7	-10	Sorafenib N-oxide 0.21	0.22	13	2.0
1.0	1.2	5.0	9.7	1.0	1.2	11	6.9
5.2	5.3	14	-10	5.2	5.9	8.7	7.0

RSD, relative standard deviation, RE, relative error

図 6 細胞内のソラフェニブ及びソラフェニブ *N*-オキサイド測定系の日間、日内変動試験

培地中ソラフェニブ及びソラフェニブ *N*-オキサイドの濃度は、まず培地 500  $\mu$ L に酢酸エチルに溶解したトルナフテートを 1 mL 添加した。遠心分離後、有機相を窒素気流下で乾固させ、移動相で溶解後 HPLC にて測定を行った。(図 7)

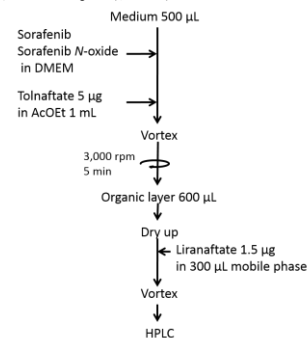


図 7 培地中のソラフェニブ及びソラフェニブ *N*-オキサイド測定系

その結果、ソラフェニブ及びソラフェニブ *N*-オキサイドそれぞれで、0.1-30  $\mu$ g/mL の範囲で良好な直線性が得られた。また、日内及び日間変動試験を行った結果、RSD、RE が  $\pm 15\%$  以内であった。(図 8)

Intra-day				Inter-day			
Added ( $\mu$ g/mL)	Observed ( $\mu$ g/mL, n=6)	RSD (%)	RE (%)	Added ( $\mu$ g/mL)	Observed ( $\mu$ g/mL, n=6)	RSD (%)	RE (%)
Sorafenib 0.1	0.100	9.7	-0.2	Sorafenib 0.1	0.095	3.8	-4.3
1	0.987	9.0	-1.4	1	0.967	3.7	-3.5
10	9.778	6.7	-2.3	10	11.382	1.0	12.1
Sorafenib N-oxide 0.1	0.093	6.6	-7.3	Sorafenib N-oxide 0.1	0.092	2.9	-9.3
1	1.031	8.9	3.1	1	1.000	9.3	-0.0
10	10.494	5.6	4.7	10	10.327	1.3	3.2

RSD, relative standard deviation, RE, relative error

図 8 培地中のソラフェニブ及びソラフェニブ *N*-オキサイド測定系の日間、日内変動試験

今回構築した測定系を使用し、細胞内及び培地中のソラフェニブ、ソラフェニブ *N*-オキサイドの濃度を測定することとした。ソラフェニブ、及びソラフェニブ *N*-オキサイドを HepG2 細胞へ添加し、0、3、6、9、30 時間培養後、細胞及び培地を回収し、濃度を測定した。細胞内または培地中のソラフェニブ及びソラフェニブ *N*-オキサイドの合計を 100 として、それぞれの濃度の割合で示した。

その結果、ソラフェニブ添加後は細胞内へ速やかに取り込まれるが、ソラフェニブ *N*-オキサイドの検出はわずかであった。一方、ソラフェニブ *N*-オキサイドを添加した場合は、ソラフェニブ同様、速やかに取り込まれているが、細胞内及び培地中にソラフェニブが検出されていた。(図 9)

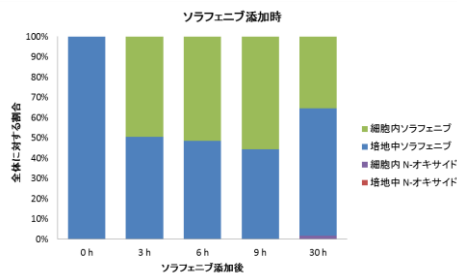


図 9 ソラフェニブ添加時のソラフェニブ及びソラフェニブ *N*-オキサイドの濃度変化

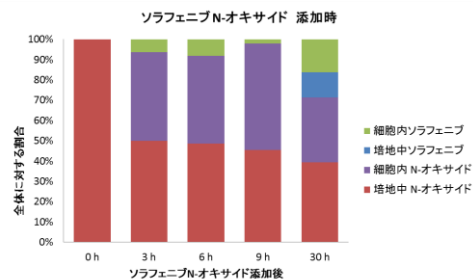


図 10 ソラフェニブ添加時のソラフェニブ及びソラフェニブ *N*-オキサイドの濃度変化

ソラフェニブから CYP3A4 の代謝によってソラフェニブ *N*-オキサイドが代謝産物として生成される。そのため、細胞内及び培地中

でのソラフェニブは検出されないと考えられる。しかし、今回の結果ではソラフェニブが検出されたことより、何らかの経路によりソラフェニブ N-オキシドからソラフェニブが産生されていると考察される。それにより、図2のソラフェニブ N-オキシドによる。毒性が発揮していた可能性が示唆された。そのメカニズムについては、今後更に検討していく必要がある。

以上の結果より、ソラフェニブによる肝障害発現は、ソラフェニブ本体が作用していることが明らかとなった。さらに、培養肝細胞ではソラフェニブ N-オキシドがソラフェニブに変化することで毒性を引き起こす可能性が示唆された。すなわち、CYP3A4 の機能低下等により、ソラフェニブの代謝が低下している場合には、肝障害発現が引き起こされる可能性がある。しかし、これらは、*in vitro* における結果であり、生体内での現象を示すとは限らない。生体内においては、排泄機能や胆汁鬱滞なども視野に入れる必要があるため、*in vivo* 評価系を用いたさらなる検討が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① T Kumagai, H Suzuki, T Sasaki, S Sakaguchi, S Miyairi, Y Yamazoe, K Nagata, Polycyclic aromatic hydrocarbons activate CYP3A4 gene transcription through human pregnane X receptor. Drug Metab. Pharmacokinet., 査読有, 27, 2012, 200-203

[学会発表] (計 14 件)

- ① 鈴木裕之、LC/ESI-MS/MS による患者血清中のゲムシタビン及び代謝物測定法の構築、第 51 回日本薬学会東北支部大会、2012 年 10 月 7 日、青森
- ② 柳利樹、LC/ESI-MS/MS による Sunitinib および代謝活性物 SU12662 の血中濃度測定法の構築、第 29 回日本 TDM 学会・学術大会、2012 年 6 月 17 日、神戸
- ③ 鈴木裕之、膀胱がんゲムシタビン療法の PK/P<sub>Gx</sub>、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 29 日、札幌
- ④ 前川正充、タンデム質量分析法を活用した抱合型胆汁酸メタボローム解析法の検討、第 24 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2011 年 9 月 2 日、鳥取
- ⑤ Masamitsu Maekawa、LC/ESI-MS/MS method for focusing metabolome of bile acid

conjugates、59th ASMS Conference、2011.9.2、Denver、USA

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鈴木 裕之 (SUZUKI HIROYUKI)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：50588978

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：