

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08918

研究課題名(和文)パゾパニブの毒性と体内曝露量に関する臨床研究

研究課題名(英文)Clinical study of the relationship between toxicity induced by pazopanib and pharmacokinetics

研究代表者

石田 博雄 (Ishida, Hiroo)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：00407404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：パゾパニブの肝取り込みにはOATP1B1が主な輸送担体として作用すると報告されていた。われわれは、パゾパニブの肝取り込みに関与する輸送担体についてヒト肝細胞を用いて検討した。その結果、OATP1B1よりもOCT1が主に関与することが明らかとなった。また、パゾパニブと塩酸イリノテカンには薬物間相互作用について、その機序について検討を行った。パゾパニブの濃度依存的にSN-38Gが低下することから、パゾパニブにはUGT1A1阻害作用を持つことが示された。一方、パゾパニブの濃度に関わらず、OATP1B1によるSN-38の肝取り込みには変化がないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OCT1には遺伝子多型の存在が報告されており、遺伝子多型の有無によりOCT1活性に個体差が生じ、結果として肝細胞内パゾパニブ濃度にも個体差が生じることが考えられる。パゾパニブによる肝機能障害とOCT1遺伝子多型の関連については今後検討が必要であるが、OCT1遺伝子多型がパゾパニブによる薬剤性肝障害のバイオマーカーとなる可能性がある。また、パゾパニブはUGT1A1阻害作用を有し、これによる薬物間相互作用を起こすことが明らかとなった。これからの結果はパゾパニブの臨床薬理学的特徴を明らかとし、より安全な治療の実践に寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：Pazopanib, a multi-target tyrosine kinase inhibitor, is mainly metabolized by hepatic enzymes such as cytochrome P450. Pazopanib is a substrate of OATP1B1, and it has been considered that organic anion-transporting polypeptide (OATP) 1B1 have significant role as hepatic drug-uptake transporter. We assessed the hepatic drug-uptake transporters related to pazopanib, and elucidated that pazopanib is transported from blood to hepatocyte by organic cation transporter (OCT) 1 than OATP1B1. Furthermore, we assessed the mechanism of drug-drug interaction between pazopanib and irinotecan. We revealed that pazopanib have a role of inhibition to UDP-glucuronosyl transferase (UGT) 1A1 and this induced increase of SN-38 concentration. On the other hand, it was clarified that pazopanib is not influenced hepatic uptake of SN-38 via OATP1B1.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：パゾパニブ 薬物動態 有害事象 トランスポーター 遺伝子多型

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

- (1) 希少がんである軟部肉腫は予後不良の疾患である。これまで本邦において軟部肉腫の標準的治療薬は、アドリアマイシンとイホスファミドのみであった。パゾパニブは **vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-1, VEGFR-2, VEGFR-3** など血管新生に関わるシグナル伝達経路の受容体に加え、**platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), fibroblast growth factor receptor (FGFR), KIT** などにも阻害活性をもつ経口マルチキナーゼ阻害薬である¹。アントラサイクリン系抗がん薬を含む治療に耐性となった軟部肉腫患者において、無増悪生存期間を有意に延長したことから、本邦でも本疾患に対する治療薬として承認された。本邦においてパゾパニブを軟部肉腫に対して承認するきっかけとなった第3相国際共同臨床試験においては、有害事象として下痢、高血圧、肝機能障害および蛋白尿などが認められた²。一方、申請者が関与したパゾパニブの第1相臨床試験に参加した日本人がん患者においては、特筆すべき薬物有害反応は認められなかった³。一般に新規抗がん薬の開発治験は、対象となるがん種に対する治療効果を評価するために、合併症や臓器障害などが無く、全身状態の良好な患者に対して行われる。一方、実地医療では高齢者や合併症を有する患者など様々な背景の患者に対して治療が行われる。治験においてこれらの患者群に対する至適な投与法を決定することは難しく、市販後の医師主導型臨床研究による育薬が必要である。パゾパニブに関しても例外ではなく、実地医療における日本人の安全性に関するエビデンスは十分ではない。承認後に申請者らの施設においてパゾパニブを投与した軟部肉腫患者では、実に6名中5名が高血圧、肝機能障害、疲労などの毒性のために減量・中止を余儀なくされた。有害事象のためパゾパニブの減量・休薬または中止が必要となる症例においては、パゾパニブの効果が十分に得られない可能性がある。実地医療での広範な背景を有する軟部肉腫患者において、パゾパニブの毒性に影響する因子（バイオマーカー）を同定することにより、毒性を減らして効果を高める個別化医療を確立することは喫緊の課題である。
- (2) エルロチニブやスニチニブなどの分子標的薬の毒性は、薬物の暴露量と相関するとの報告がある^{4,6}。したがって、パゾパニブの毒性をその体内動態、さらには体内動態に関連する因子の遺伝子多型と対応させることができれば、問題解決の突破口となる可能性が考えられる。すなわち、**therapeutic drug monitoring (TDM)** や薬物投与前遺伝子診断による至適な投与量の設定に繋がると期待される。これまでの第1相臨床試験の結果を見ると、パゾパニブの体内動態には大きな個体差が認められたが ($> CV 50\%$)³、これらの第1相試験では検討した患者数が少ないため、体内動態と毒性に関係については正確な評価がなされていない。しかも、これまでに実地医療においてパゾパニブの毒性や薬物動態を評価した臨床研究は存在しない。一般に、バイオアベイラビリティーの低い経口薬の体内動態には大きな個体差が認められる。パゾパニブの絶対バイオアベイラビリティーは20~30%と低い。バイオアベイラビリティーを低下させる要因としては、消化管および肝における薬物の解毒的な代謝や、輸送担体による薬物の排泄が考えられる。パゾパニブは主に **CYP 3A4/5, 1A2** および **2C8** により代謝される¹。パゾパニブはまた、**ABC**トランスポーターである **ABCG2**、また弱いながら **ABCB1** の基質になることが知られている⁷。これらの因子の機能の個体差が、パゾパニブの体内動態の個体差に関連すると考えられる。そこでこれらの因子をコードする遺伝子の多型とパゾパニブの体内動態や毒性の関係を調べる。特に、**ABCG2** 遺伝子において終始コドンを引き起こす **376C>T** (日本人のアリル頻度2%)、蛋白の発現低下をもたらす **421C>A** (日本人のアリル頻度約30%) を有する患者では⁸、野生型の患者と比較してパゾパニブの吸収が増加することにより血中濃度が有意に高くなり、結果としてパゾパニブの毒性が強くなる可能性が考えられる。すでに本申請研究には5名の被験者を登録しており、**421C>A** を有する2例にのみ **grade3** の有害事象発現を認めている。今後、本申請研究を継続することにより **ABCG2** 遺伝子多型とパゾパニブによる重篤な有害事象発現の関連性が明らかになる可能性がある。パゾパニブの体内動態に対する **ABCB1** と **ABCG2** 以外の輸送担体の関与については、未だ明らかになっておらず。本研究では他の輸送担体の役割についても定性的かつ定量的に検討し、その全体像を解明する。
- (3) 一方、薬物代謝や膜輸送の個人差は薬物代謝酵素や輸送担体をコードする遺伝子に存在する多型では説明がつかないことも多い。肝や腸管におけるこれらの蛋白質の発現レベルは、他の様々な因子により制御されているためである。近年では薬物代謝酵素や輸送担体の発現量を負に制御する因子として、**microRNA (miRNA)** が報告されている⁹。miRNA をコードする遺伝子および miRNA のプロセッシングに関与する **Drosha** などの酵素の遺伝子多型は、miRNA の発現に影響し、ひいては薬物代謝酵素や輸送担体の発現レベルに影響を与え得ると考えられる。したがって、本研究では薬物代謝酵素や輸送担体の発現を制御すると報告されている miRNA の遺伝子多型とパゾパニブの体内動態および毒性との関係も、世界に先駆けて探索的に解析する。

- (4) さらに、弱塩基化合物であるパゾパニブの消化管における溶解度は、消化管内 pH の影響を受け、制酸薬の投与による pH の上昇により低下する¹⁰。また、パゾパニブの吸収は食事の摂取により上昇する¹¹。これらの外的な要因もまた、パゾパニブのバイオアベイラビリティ、ひいては動態の個体差に対して影響を及ぼす可能性がある。そこで本研究では、制酸薬や食事の摂取を厳密に管理した上で、実地医療におけるパゾパニブの毒性と薬物動態の関係、および体内動態の個体差の要因を調べ、パゾパニブの至適な投与方法を樹立することを目的とする。

2. 研究の目的

パゾパニブは軟部肉腫の患者にとって、延命効果が実証された新たな治療のオプションとして大いに期待される一方、実地医療においては毒性による減量や中止が見られることから、適正な投与方法の確立は喫緊の課題である。本研究では、実地医療におけるパゾパニブの毒性と薬物動態の関係、および体内動態の個体差の要因を調べ、パゾパニブの至適な投与方法を樹立することを目的とする。

- (1) パゾパニブの毒性、薬物動態および動態関連因子の遺伝子多型の関係を解明する前向きな臨床研究を実施する。
- (2) 薬物動態関連因子の発現を制御する microRNA とその生合成に関わる因子の遺伝子多型が、パゾパニブの薬物動態および毒性と関連するか否かを検討する。
- (3) 本薬の動態に主として関わる全ての輸送担体を同定し、ヒトでのパゾパニブの毒性における輸送担体の役割の全貌を解明する。これらの結果をもとに、パゾパニブの至適な投与方法を設計する。

3. 研究の方法

(1) パゾパニブの毒性を規定する因子を同定する臨床研究

パゾパニブを投与する悪性軟部肉腫患者を対象として、毒性に関与する因子を検討するための前向きな探索的臨床研究を実施する。本臨床研究の計画書は既に、昭和大学の「ヒトゲノム・遺伝子解析倫理委員会」にて承認された。

① 患者のエントリー、治療及び毒性評価

研究への症例登録に引き続きパゾパニブによる治療を開始し、遺伝子多型の判定、薬物動態の解析を行い、CTCAE v4.0にて評価する薬物有害反応との関連について検討する。

② 治療スケジュール

パゾパニブ 800 mgを1日1回連日経口投与する。パゾパニブの吸収に対して影響を及ぼす食事や制酸剤の摂取については可及的に管理する（朝食後2時間以上経過した午前11時に内服）。下述の薬物動態解析用の採血のため、2日目および3日目の内服は行わず、4日目から連日投与する。Grade 3以上の有害事象を認めた場合や、担当医が減量を必要と判断した場合、パゾパニブの投与量を200 mgずつ減量する（減量幅は1日1回200 mgを限度とする）。治療は、病状の進行や重篤な副作用がない限り継続する。毒性評価パゾパニブの投与開始後は、1週間に1度CTCAE v4.0にて毒性を評価する。

③ 遺伝子解析用血液および薬物動態解析用血液の採取

パゾパニブによる治療の開始前に、患者よりゲノムDNA調製用の血液検体を5 mL採取する。薬物動態解析用血液の採血は、パゾパニブ投与前、パゾパニブ投与後0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72および96時間後、およびパゾパニブの体内動態が定常状態に達した22 (±2) 日後の投与前（トラフ）におこなう。各採血ポイントにおいて、抗凝固剤入りの採血管を用いて患者血液を5 mL採取する。採血後のサンプルはすぐに4°Cにて冷蔵保存する。冷蔵保存したサンプルは採血後1時間以内に4°C, 3,000 rpmで10分間遠心分離し、血漿を調製する。調製した血漿はバーコード管理し、-80°Cにて凍結保存する。

(2) パゾパニブの薬物動態解析

パゾパニブの血漿中濃度はHPLCまたはLC/MSMSにて測定する。パゾパニブの投与量、体内動態と毒性の関係を明らかにする。体内動態モデリングにより、パゾパニブの体内動態の個体差の要因となる膜透過過程などの因子を見いだす。

(3) 薬物動態関連因子の遺伝子多型解析

経口投与されたパゾパニブの初回通過に影響する因子として考えられる ABCG2 の遺伝子多型である 421C>A など、パゾパニブの薬物動態関連因子の遺伝子多型を解析し、薬物動態や毒性との関連を検討する。遺伝子多型の判定は、全血から抽出したゲノム DNA を用いて、ダイレクトシーケンス法、制限酵素切断長多型法、TaqMan 法またはライトサイクラーを用いた

FRET 法などにより行う。

(4) 薬物動態関連因子の発現を制御する miRNA の遺伝子解析

パゾパニブの体内動態を左右する因子 CYP3A4, ABCB1 および ABCG2 などの発現を制御する miRNA (miR-148a, miR-27b, miR-145, miR-451, miR-328 および miR-181a など) や、これらの miRNA の生合成に関わる Drosha, DGCR8, XPO5 および TRBP などの因子の遺伝子多型とパゾパニブの体内動態および毒性との関係を調べる研究を、症例収集にあわせて逐次行う。本年度には、前記 miRNA および関連因子の機能について、以下の基礎的な研究を精力的に行う。

- ① miRNA 関連遺伝子多型の日本人における頻度が未解明であることから、保有している数百検体の健常日本人ゲノム DNA サンプルを用いて、日本人における遺伝子多型の頻度を明らかにする。
- ② ヒト肝臓試料 (現在約 30 検体を保有、さらに増加予定) を用いて、pri-miRNA や pre-miRNA の遺伝子変異が成熟型 miRNA の発現量に与える影響を明らかにする。miRNA 発現量は TaqMan miRNA assay により測定する (測定機器は現有)。
- ③ 成熟型 miRNA 上の配列、特に mRNA への結合性に重要な seed 配列上に多型を有する miRNA を中心に多型が標的遺伝子の発現抑制機能に与える影響をルシフェラーゼアッセイ等で調べる。

(5) パゾパニブの体内動態に関連する輸送担体の研究

本年度は、パゾパニブの輸送に関与し、その体内動態に影響を及ぼす可能性のある全ての輸送担体を *in vitro* の研究にて同定する。

- ① OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, OAT1, OAT2, OAT3, OCT1, OCT2, OCTN1, OCTN2, MATE1 および MATE2K などを安定的に発現する培養細胞株を用い、パゾパニブの輸送に関与する輸送担体を同定する。
- ② ABCB1 および ABCG2 を含む、パゾパニブの輸送に関与する輸送担体の遺伝子にヒトにおいて認められる変異 (例えば ABCG2 遺伝子の 421C>A) を導入し、パゾパニブの輸送活性の変化を研究することにより、パゾパニブの体内動態に対する遺伝子多型の影響を酵素学的に定量的に検討する。

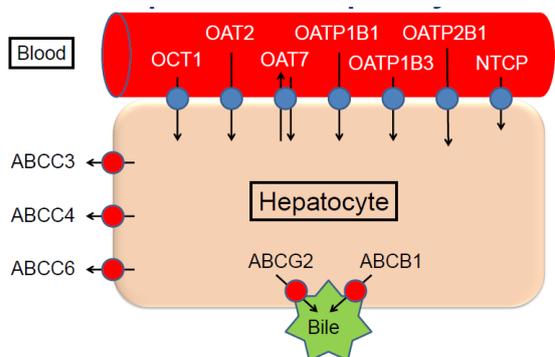
4. 研究成果

(1) パゾパニブの肝細胞取り込みに関与する輸送担体の検討

従来、パゾパニブの肝取り込みには OATP (organic anion-transporting polypeptide) 1B1 が主な輸送担体として作用すると報告されていた (図 1)。今回、われわれは、あらためてパゾパニブの肝取り込みに関与する輸送担体に関してヒト肝細胞を用いて検討した。

その結果、従来報告されていた OATP1B1 よりも、OCT (organic cation transporter) 1 が主に関与することが明らかとなった (図 2)。

OCT1 には遺伝子多型の存在が報告されており、遺伝子多型の有無により OCT1 活性に個体差が生じ、肝細胞内パゾパニブ濃度にも個体差が生じることが考えられる。パゾパニブによる肝機能障害と OCT1 遺伝子多型の関連については今後検討を行う必要がある。



OCT, organic cation transporter; OAT, organic anion transporter; OATP, organic anion transporting polypeptide; NTCP, sodium/taurocholate co-transporting peptide

図 1. 肝細胞に発現する輸送担体

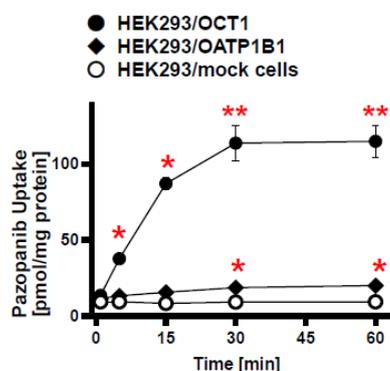


図 2. ヒト肝細胞におけるパゾパニブ取り込み

(2) パゾパニブの塩酸イリノテカンの薬物間相互作用の機序に関する検討

パゾパニブと塩酸イリノテカンの併用の安全性を検討した第1相試験において、パゾパニブとの併用により塩酸イリノテカンの活性代謝産物である SN-38 の血中濃度の上昇が認められたことから、パゾパニブと塩酸イリノテカンには薬物間相互作用が存在することが示唆された。しかしながら、その機序については十分に検討されていなかった。血液中の SN-38 は OATP1B1 により肝細胞内に取り込まれ、その後、肝細胞内の UGT1A1 によりグルクロン酸抱合をうけ SN-38 glucuronide (SN-38G) に不活化されることが分かっている。

われわれは、パゾパニブの UGT1A1 阻害もしくは、パゾパニブの OATP1B1 競合阻害作用により血中 SN-38 濃度上昇が生じると予測し検討を行った。

パゾパニブの濃度依存的に SN-38G が低下することから、パゾパニブには UGT1A1 阻害作用を持つことが示された (図3)。一方、パゾパニブの濃度に関わらず、OATP1B1 による SN-38 の肝取り込み量には変化がないことが明らかとなった (図4)。

この結果から、パゾパニブには UGT1A1 阻害作用を有し、これによる薬物間相互作用を起こすことが明らかとなった。

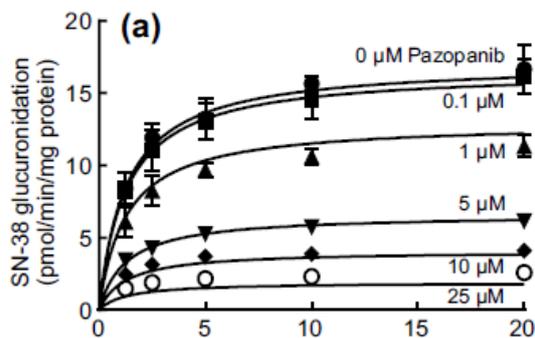


図3. パゾパニブによる UGT1A1 阻害

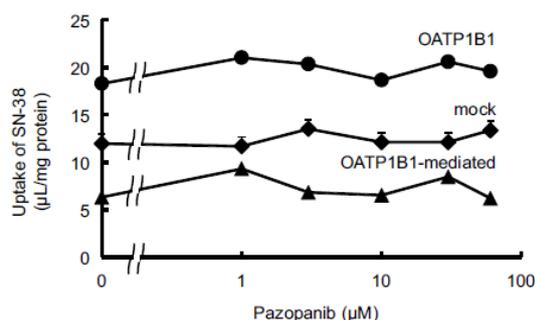


図4. パゾパニブによる OATP1B1 阻害

<引用文献>

1. Harris PA et al. J Med Chem, 2008;51:4632-40
2. van der Graaf WT et al. Lancet, 2012;379:1879-86
3. Inada-Inoue M et al, Cancer Chemother Pharmacol, 2014;73:673-83
4. Fukudo M et al. Clin Pharmacokinet, 2013;52:593-609
5. Mizuno T et al. Ann Oncol, 2010;21:1382-3
6. Mizuno T et al. Drug Metab Pharmacokinet, 2012;27:631-9
7. Minocha M et al. Int J Pharm, 2012;436:127-134
8. Fujita K. Curr Drug Metab 2006;7:23-37
9. Nakajima M et al. Pharmacol Ther 2011;131:330-337
10. Tan AR et al. Cancer Chemother Pharmacol, 2013;71:1635-43
11. Heath EI et al. Clin Pharmacol Ther, 2010;88:818-823

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iwase M, Fujita KI, Nishimura Y, Seba N, Masuo Y, Ishida H, Kato Y, Kiuchi Y.	4. 巻 83
2. 論文標題 Pazopanib interacts with irinotecan by inhibiting UGT1A1-mediated glucuronidation, but not OATP1B1-mediated hepatic uptake, of an active metabolite SN-38.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Chemother Pharmacol	6. 最初と最後の頁 993-998
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00280-019-03784-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ellawatty WEA, Masuo Y, Fujita KI, Yamazaki E, Ishida H, Arakawa H, Nakamichi N, Abdelwahed R, Sasaki Y, Kato Y.	4. 巻 46
2. 論文標題 Organic Cation Transporter 1 Is Responsible for Hepatocellular Uptake of the Tyrosine Kinase Inhibitor Pazopanib	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Drug Metab Dispos	6. 最初と最後の頁 33-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/dmd.117.076554	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田健一, Ellawatty Waleed E.A., 増尾友佑, 石田博雄, 佐々木康綱, 加藤将夫
2. 発表標題 有機カチオントランスポーター1はチロシンキナーゼ阻害薬であるパゾパニブの肝取り込みに関与する
3. 学会等名 第38回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田健一, 増尾友佑, 石田博雄, 佐々木康綱, 加藤将夫
2. 発表標題 ヒトにおけるパゾパニブの肝取り込みには有機カチオントランスポーター1が関与する
3. 学会等名 第76回日本癌学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石田博雄, WEA Ellawatty, 藤田健一, 増尾友佑, 加藤将夫
2. 発表標題 Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic uptake of pazopanibin humans
3. 学会等名 第15回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	藤田 健一 (Fujita Ken-ichi)	昭和大学・薬学部臨床薬学講座がんゲノム医療薬学部門・教授 (32622)	