

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07204

研究課題名(和文)チロシンキナーゼ阻害薬レゴラフェニブ活性代謝物の遊離形血漿中濃度の臨床的意義

研究課題名(英文)Clinical impact of unbound-base pharmacokinetics of active metabolites of a tyrosine kinase inhibitor regorafenib

研究代表者

藤田 健一 (Fujita, Ken-ichi)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：60281820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：レゴラフェニブは転移性結腸・直腸がん患者において延命効果を示すが、投与量やスケジュールの変更が必要となる副作用が生じる場合がある。レゴラフェニブは、肝のCYP3A4によって活性代謝物M-2及びM-5に変換される。著者らは、これらの化合物の遊離形血漿濃度-時間曲線下面積(AUC<sub>0-∞</sub>)を調べた。M-2およびM-5の遊離形分率はレゴラフェニブよりも約10倍高く、1日目と15日目の活性代謝物のAUC<sub>0-∞</sub>はレゴラフェニブよりも有意に高かった。M-2またはM-5のAUC<sub>0-∞</sub>が高い患者は、他の患者よりも有意に短い無増悪生存期間を示した。1サイクル目に発症した副作用による治療中止が一因と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

著者らは、レゴラフェニブの薬効と毒性を支配するのは、親化合物ではなく、遊離形の活性代謝物M-2とM-5への曝露量であることを見出した。これらは世界初の知見である。また、体重がこれらの遊離形活性代謝物への曝露量と有意に相関したため、レゴラフェニブは160 mgの固定用量ではなく、体重に基づいた用量の設定が適切である可能性が示された。これらの結果は、現在固定用量で投与されている他のチロシンキナーゼ阻害薬の投与戦略をも変える可能性がある。以上本研究では、レゴラフェニブを含むチロシンキナーゼ阻害薬の毒性を回避し、治療効果を維持するための至適投与法の構築に必要な薬物動態学的基盤の一端を確立した。

研究成果の概要(英文)：Regorafenib treatment improves survival of patients with metastatic colorectal cancer, but it is also characterized by detrimental side effects that may require modified dosing or interval schedules. Regorafenib is metabolized by cytochrome P450 3A4 in the liver to its active metabolites, M-2 and M-5. We examined area under the unbound plasma concentration-time curve (AUC<sub>0-∞</sub>) to these compounds to establish pharmacokinetic bases for individualized dosing strategies. The plasma protein binding of M-2 and M-5 was approximately 10-fold lower than that of regorafenib, whereas AUC<sub>0-∞</sub> values for active metabolites on both days 1 and 15 were significantly higher than that of regorafenib. Patients with higher AUC<sub>0-∞</sub> values of M-2 or M-5 on day 1 showed significantly shorter progression-free survival than others, likely due, at least in part, to treatment discontinuation as a result of adverse events, especially occurred during first cycle.

研究分野：抗悪性腫瘍薬の臨床薬理学

キーワード：レゴラフェニブ 遊離形血漿中濃度 無増悪生存期間 治療強度 AUC ABCG2 副作用 多形紅斑

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

レゴラフェニブは経口マルチキナーゼ阻害薬である。本抗がん薬は、切除不能進行・再発大腸がん患者における薬物治療の最後の砦として、重要なオプションの一つになっている。レゴラフェニブの効果は日本人と欧米人でほぼ同等であるが、日本人においては有害事象の頻度が高く程度も強い傾向にある。中でも手足症候群(hand-foot syndrome, HFS)の発症は全グレードで80%、グレード3以上では28%と高頻度である(引用文献)。したがって、HFSの発症を決定する因子の解明は学術的、臨床的の両面で重要である。レゴラフェニブは肝に発現するCYP3A4/5により代謝され、M-2に変換される。M-2はさらに同酵素により代謝され、M-5に変換される。M-2及びM-5は親化合物レゴラフェニブとほぼ同等の抗腫瘍活性を有する活性代謝物である。レゴラフェニブと活性代謝物の体内動態には大きな個体差が存在する(引用文献)。レゴラフェニブは肝細胞の胆管側膜、腸管上皮細胞の管腔側膜、及び皮膚ケラチノサイトの基底膜や内皮細胞に発現する輸送担体である、ABCG2(BCRP)及びABCB1(P-gp)の基質である(引用文献)。著者らはM-2とM-5もこれら輸送担体の基質であることを証明し、*Abcb1a/1b/bcrp*のトリプルノックアウトマウスを用いた研究により、これらの輸送担体がM-2とM-5の全身曝露量に関与することを解明した(引用文献)。ヒトの*ABCG2*遺伝子には、蛋白の発現低下を惹起し、多くの薬物の体内動態と関連する*ABCG2* 421C>A(引用文献)が存在する。

レゴラフェニブにより惹起されるHFSなどの毒性を回避し、治療効果を維持するための至適投与法を構築するためには、レゴラフェニブや活性代謝物の薬物動態学的特性、及び薬物動態関連因子の遺伝子多型とレゴラフェニブの効果やHFSを含む毒性との関係を解明する必要があった。そこで著者らは、昭和大学の腫瘍内科と共同で、レゴラフェニブ及び活性代謝物の薬物動態、遺伝子多型と薬物応答の関係を調査するための前向きな臨床研究を実施した。本臨床研究では、投与初日に投与から48hまでの体内動態解析用の経時的採血を行うのみならず、同意を得た患者においては体内動態が定常状態に達した15日目にも同様に投与から24hまでの動態解析用採血を経時的に行った。抗がん薬を含む薬物治療において、薬効や毒性と直接関連するのは、アルブミンなどの血漿中蛋白質や、組織中の蛋白質に結合していない遊離形の薬物であることは旧来から広く知られている。そこで本研究では、総血漿中濃度に基づく解析(総濃度基準PK/PD解析)のみならず、遊離形血漿中濃度に基づく解析(遊離形基準PK/PD解析)も行った。

### 2. 研究の目的

本研究では、レゴラフェニブや活性代謝物の遊離形血漿中濃度を基準とした体内動態の臨床的意義の解明を目的とする。最終的な出口は、レゴラフェニブにより惹起されるHFSなどの毒性を回避し、治療効果を維持するための至適投与法の構築に必要な薬物動態学的基盤を確立することである。また、遊離形血漿中濃度に基づく体内動態解析が薬効や毒性の評価において重要であるとの旧来概念を、至適投与法の樹立を目的とした臨床研究や実臨床に応用するための基盤を確立する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 研究デザイン

昭和大学病院においてレゴラフェニブを投与した転移性大腸がん患者を対象とした前向き臨床研究を行った。研究の開始に先立ち、研究のプロトコールは昭和大学倫理委員会の承認を得た。十分な肝機能、腎機能、及び骨髄機能を有する患者をエントリーした。すべての患者より、血液検体と診療情報を研究目的で使用することについて、書面による同意を得た。本臨床研究は、UMIN臨床試験登録システムに登録した(UMIN000013939)。

#### (2) レゴラフェニブ投与

レゴラフェニブは、各サイクル(4週間)の1~3週目に1日1回、160 mg/body 経口投与した。患者はレゴラフェニブ治療開始日前に入院し、その後1週間入院し、通常の食事(1,460 kcal/日、脂肪 52 g/日)を摂取した。

#### (3) 薬物動態解析用の採血

レゴラフェニブ及び活性代謝産物の薬物動態解析用の血液検体は、最初のサイクルの1日目に採取した。血液検体は、レゴラフェニブ投与の直前および投与後0.25、0.5、1、2、4、8、24、および48時間後に採取した。患者が15日目(±2日)の2回目の採血に同意した場合は、レゴラフェニブ投与後48時間を除いて、1日目と同様に血液検体を採取した。

#### (4) レゴラフェニブ、M-2、及びM-5の総血漿中濃度と遊離形血漿中濃度の測定

レゴラフェニブ及びM-2の総血漿中濃度は、逆相高速液体クロマトグラフィーにより測定した。M-5の総血漿中濃度は、液体クロマトグラフ-トリプル四重極型質量分析により測定した。それぞれの化合物の遊離形分率は平衡透析法により算出した。透析液検体中の薬物濃度は、液体クロマトグラフ-タンデムトリプル四重極型質量分析により測定した。

#### (5) 薬物動態パラメータ

レゴラフェニブ、M-2、及び M-5 の総濃度基準及び遊離形濃度基準の血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC<sub>t</sub> 及び AUC<sub>u</sub>) は、WinNonlin バージョン 7.0 ソフトウェア 用いてノンコンパートメントモデルにより算出した。

(6) レゴラフェニブの効果と毒性評価

レゴラフェニブの効果は、RECIST version 1.1 により評価し、無増悪生存期間(PFS)を算出した。毒性の評価は、CTCAE version 4.0 を用いて行った。

(7) ABCG2 ジェノタイプング

QIAamp Blood Kit を用いて末梢血からゲノム DNA を抽出した。ABCG2 421C>A (rs2231142、Q141K) は、ダイレクト DNA シークエンシングにより解析した。

(8) ヒト白血球抗原(HLA)ハプロタイプ解析

HLA のハプロタイプは、WAKFlow HLA Typing Kit HLA-A, -B and -C を用いて解析した。

(9) 統計解析

統計解析は JMP ソフトウェア、バージョン 14.0 を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 患者背景

2013 年 12 月から 2018 年 10 月までに、40 名の症例がエントリーした。40 名中 38 名が 3 次治療以降にレゴラフェニブによる治療を行った。全ての患者の肝機能、腎機能、及び骨髄機能は正常であった。

(2) レゴラフェニブと代謝物の体内動態

40 名中 36 名の患者について、血漿中濃度を測定し、AUC を算出した。Day 1 及び day 15 におけるレゴラフェニブ、M-2、及び M-5 の総血漿中濃度推移と AUC<sub>t</sub> を図 1 に示す。各化合物の総血漿中濃度プロファイル及び AUC<sub>t</sub> は、レゴラフェニブが最も高く、M-2、M-5 の順に低下した。

それぞれの化合物の遊離形分率  $f_u$  を図 2 に示す。M-2 と M-5 の  $f_u$  はレゴラフェニブと比較して約 10 倍高いことを見出した。レゴラフェニブ、M-2、及び M-5 の各採血ポイントの総血漿中濃度に  $f_u$  を掛け、遊離形血漿中濃度を算出した。これらの値をもとに AUC<sub>u</sub> を算出した。Day 1 及び day 15 におけるレゴラフェニブ、M-2、及び M-5 の遊離形血漿中濃度推移と AUC<sub>u</sub> を図 3 に示す。各化合物の遊離形血漿中濃度プロファイル及び AUC<sub>u</sub> は、M-2 が最も高く、M-5 が 2 番目に高かった。興味深いことに、レゴラフェニブの遊離形血漿中濃度プロファイル及び AUC<sub>u</sub> は、3 つの化合物の中で最も低かった。これらは、世界初の知見であり、レゴラフェニブの薬効や毒性の発現に寄与するのは遊離形の活性代謝物 M-2 と M-5 の体内動態であり、親化合物の寄与はこれらの化合物よりも低い可能性を示すものである。

(3) レゴラフェニブと代謝物の AUC と PFS

続いて、レゴラフェニブ、M-2、及び M-5 の AUC<sub>t</sub> 及び AUC<sub>u</sub> と PFS の関係を検討した。全患者をそれぞれの化合物の各 AUC の平均値を基準にそれ以上と以下の群に分け、それぞれの群における PFS をカプランマイヤー法により算出し、ログランク検定にて比較した。M-2 または M-5 の AUC<sub>u</sub> が高い群の患者においては、低い群の患者と比較して有意に PFS が短いことを明らかにした(図 4)。一方、レゴラフェニブの AUC<sub>u</sub> や各化合物の AUC<sub>t</sub> は PFS と関連しなかった。

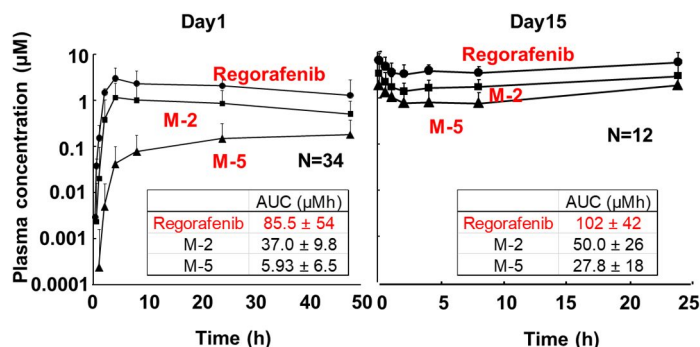


図1 Day 1及びday 15におけるレゴラフェニブ、M-2、及びM-5の総血漿中濃度推移

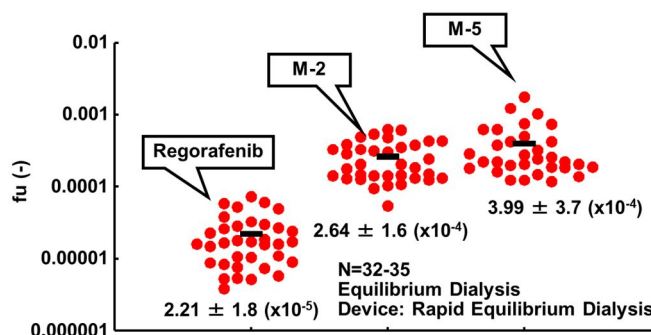


図2 レゴラフェニブ、M-2、及びM-5の遊離形分率 $f_u$

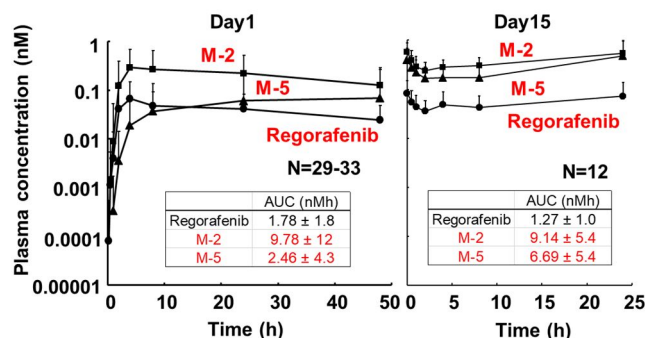


図3 Day 1及びday 15におけるレゴラフェニブ、M-2、及びM-5の遊離形血漿中濃度推移

見出された現象の原因を解明するために、レゴラフェニブ投与1サイクル目の相対治療強度 (RDI) を算出して、M-2 または M-5 の AUC<sub>0-24</sub> が高い群の患者と低い群の患者で比較した。RDI は1日の投与量 160 mg/day に1サイクル目の投与日数 21 日を掛けた値を 100 として、この値に対して1サイクル目に実際に投与された量の比率として算出した。結果を図5に示す。M-2 または M-5 の AUC<sub>0-24</sub> が高い患者においては、低い患者と比較して RDI が有意に低いことを見出した。一方、レゴラフェニブの AUC<sub>0-24</sub> は RDI と関連しなかった。M-2 または M-5 の AUC<sub>0-24</sub> が高い患者においては、1サイクル目の RDI が低かったため、結果として PFS が短くなった可能性が考えられた。

そこで、M-2 または M-5 の AUC<sub>0-24</sub> と1サイクル目の治療期間との関連を調べた。結果を図6に示す。M-2 または M-5 の AUC<sub>0-24</sub> の高い群では、21 日以前に様々な副作用を発生して治療が中止となった患者が有意に多く認められた。すなわち、M-2 または M-5 の AUC<sub>0-24</sub> の高い患者は、(1) 1 サイクル目に副作用を発生したために治療が中止となり、結果として RDI が低下したこと、(2) その結果これらの患者では PFS が短くなったことを明らかにした。

M-2 または M-5 の AUC<sub>0-24</sub> と HFS の発症までの期間の関連を調べたところ、M-2 または M-5 の AUC<sub>0-24</sub> は HFS の発症までの期間と有意に逆相関すること、すなわち M-2 または M-5 への高い暴露が HFS の早期発症に関連することを明らかにした(図7)。

(4) M-2 または M-5 の AUC<sub>0-24</sub> と体重の関係

M-2 または M-5 の AUC<sub>0-24</sub> を日常臨床で測定し、治療に反映させることは難しい。そこで、これらの AUC<sub>0-24</sub> と関連する患者のパラメータを検討した。その結果、M-2 または M-5 の AUC<sub>0-24</sub> は患者の体重と有意に逆相関することを見出した(図8)。これらの AUC<sub>0-24</sub> は体表面積とも有意に逆相関した(データは示さない)。経口投与されるチロシンキナーゼ阻害薬の投与量は、体格によらず一律であるケースが多い。しかしながら、これらの結果は、体重に応じて投与量を調整する必要性、すなわち、体重の軽い患者の投与量を少なくし、重い患者の投与量を多くすることにより、

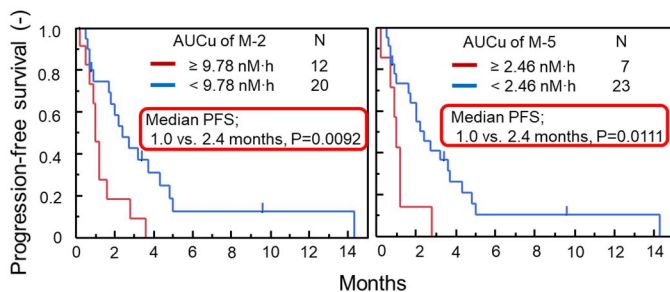


図4 M-2とM-5のAUC<sub>0-24</sub>が平均より高い患者と低い患者におけるPFSの比較

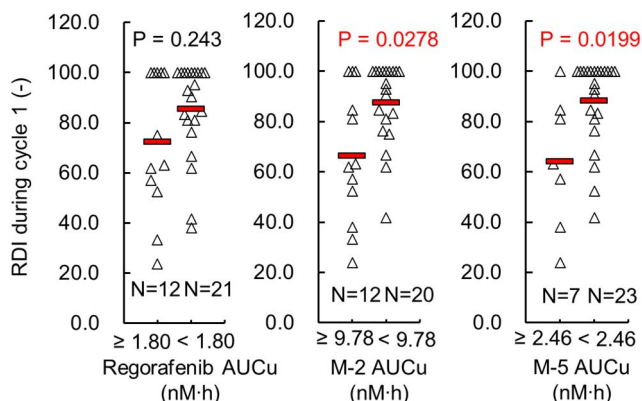


図5 レゴラフェニブ、M-2、及びM-5のAUC<sub>0-24</sub>が平均より高い患者と低い患者における相対治療強度(RDI)の比較

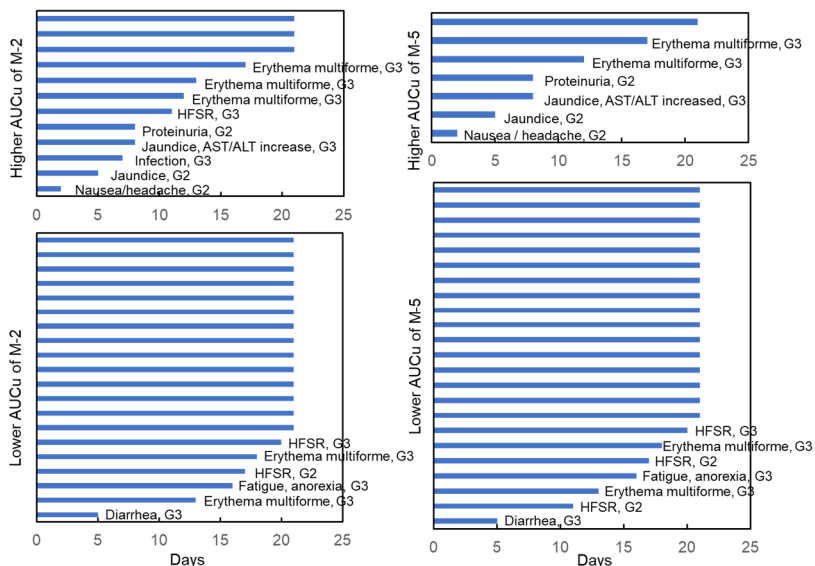


図6 M-2とM-5のAUC<sub>0-24</sub>が高い患者と低い患者における1サイクル目のレゴラフェニブ投与期間

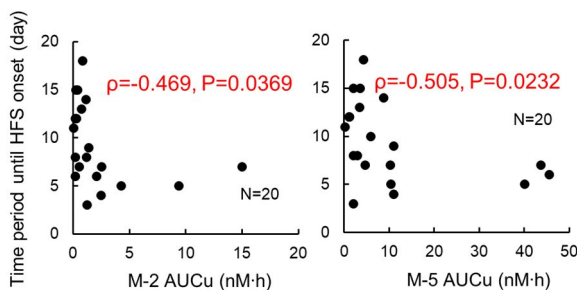


図7 M-2とM-5のAUC<sub>0-24</sub>とHFS発症までの期間



全ての患者において、M-2 または M-5 の AUC<sub>Cu</sub> を一定に調整することが可能になることを示唆する。

(5) レゴラフェニブと活性代謝物の AUC<sub>Cu</sub> と ABCG2 421 C>A の関係

レゴラフェニブ、M-2、及び M-5 の AUC<sub>Cu</sub> と ABCG2 421 C>A の関係を調べた。結果を図 9 に示す。Day 15 における M-2 または M-5 の AUC<sub>Cu</sub> が、ABCG2 421 C>A と有意に相関した。一方、レゴラフェニブの AUC<sub>Cu</sub> は相関しなかった。Day 1 では、いずれの化合物の AUC<sub>Cu</sub> とともに、本遺伝子多型との相関は認められなかった(データは示さない)。

(6) レゴラフェニブによる多形紅斑と HLA ハプロタイプ

本臨床研究においてレゴラフェニブを投与した 40 名の患者のうち、7 名がグレード 3 の多形紅斑(erythema multiforme, EM)を発症した。EM の発症には免疫的な機序が関与するとされている(参考文献)。薬物による EM の発症には、主としてクラス I の

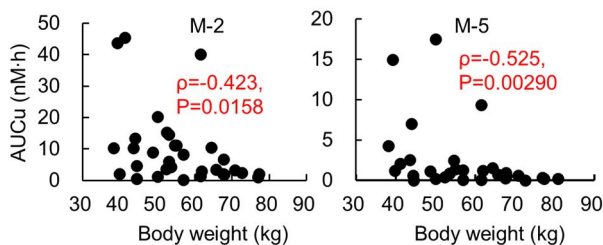


図8 M-2とM-5のAUC<sub>Cu</sub>と体重の関係

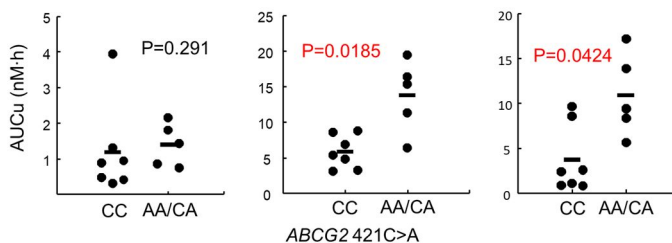


図9 Day 15におけるM-2とM-5のAUC<sub>Cu</sub>とABCG2 421C>A

本臨床研究においてレゴラフェニブを投与した 40 名の患者のうち、7 名がグレード 3 の多形紅斑(erythema multiforme, EM)を発症した。EM の発症には免疫的な機序が関与するとされている(参考文献)。薬物による EM の発症には、主としてクラス I の

表 1 HAL ハプロタイプとレゴラフェニブによるグレード 3 の多形紅斑の関係

HLA haplotype	EM		OR (95% CI)	P value
	Yes (N=7)	No (N=33)		
B*46:01	3 (42.9) <sup>a</sup>	2 (6.06)	11.6 (1.46-92.1)	0.0299
C*01:02	6 (85.7)	8 (24.2)	18.8 (1.95-180)	0.00437

HLA haplotypes observed in patients who suffer grade 3 EM are listed.

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

<sup>a</sup> N (%).

HLA が関わる。そこで、HLA-A、HLA-B、及び HLA-C のハプロタイプと EM 発症の関連について検討した。

表 1 に示すように、グレード 3 の EM を発症した患者における HLA-C\*01:02 の頻度は(6/7)、発症しなかった患者の頻度(8/33)と比較して有意に高かった(オッズ比 [OR] = 18.8, 95% 信頼区間 = 1.95-180, P = 0.004)。HLA-B\*46:01 もまた、グレード 3 の EM と有意に相関した(OR = 11.6, 95%CI = 1.46-92.1, P = 0.029)。フィッシャーの正確確率検定では有意差が認められたが、調査したすべてのハプロタイプ(HLA-A, 12; HLA-B, 9; HLA-C, 6)によりボンフェローニ補正を行った場合、有意差は認められなかった。患者数を増やして評価する必要があると考えられる。

#### <引用文献>

Yoshino et al. Invest New Drugs 2015;33:740-50  
 Sunakawa et al. Invest New Drugs 2015;33:740-50  
 Kort et al. Pharm Res 2015;32:2205-16  
 Fujita et al. J Pharm Sci 2017;106:2632-41  
 Giacomini et al. Clin Pharmacol Ther 2013;94:23-6  
 Volkers et al. Allergy Asthma Clin Immunol. 2021;17:17.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasan Alshammari A, Masuo Y, Fujita KI, Shimada K, Iida N, Wakayama T, Kato Y	4. 巻 197
2. 論文標題 Discrimination of hand-foot skin reaction caused by tyrosine kinase inhibitors based on direct keratinocyte toxicity and vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114914
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2022.114914	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kubota Yutaro, Fujita Ken ichi, Takahashi Takehiro, Sunakawa Yu, Ishida Hiroo, Hamada Kazuyuki, Ichikawa Wataru, Tsunoda Takuya, Shimada Kazuhiro, Masuo Yusuke, Kato Yukio, Sasaki Yasutsuna	4. 巻 108
2. 論文標題 Higher Systemic Exposure to Unbound Active Metabolites of Regorafenib Is Associated With Short Progression Free Survival in Colorectal Cancer Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 586-595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cpt.1810	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aya Hasan Alshammari, Yusuke Masuo, Shotaro Yoshino, Reiya Yamashita, Takahiro, Ishimoto, Ken-ichi Fujita, Yukio Kato	4. 巻 49
2. 論文標題 Adeno-associated virus-mediated knockdown demonstrates the major role of hepatic Bcrp in the overall disposition of the active metabolite of the tyrosine kinase inhibitor regorafenib in mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100483
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2022.100483	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 2件）

1. 発表者名	Natsumi Matsumoto, Kosuke Takeshima, Yutaro Kubota, Hiroo Ishida, Takuya Taunoda, Yasutsuna Sasaki, Ken-ichi Fujita
2. 発表標題	Regorafenib-induced erythema multiforme is associated with HLA-C*01:02 and HLA-B*46:01 in Japanese cancer patients
3. 学会等名	The 19th Japanese Society of Medical Oncology annual meeting
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Kosuke Takeshima, Natsumi Matsumoto, Yutaro Kubota, Hiroo Ishida, Takuya Tsunoda, Yasutsuna Sasaki, Ken-ichi Fujita
2. 発表標題	Associations of HLA-C*01:02 and HLA-B*46:01 with regorafenib-induced erythema multiforme in Japanese patients with colorectal cancer
3. 学会等名	123rd American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics annual meeting (国際学会)
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Yutaro Kubota, Ken-ichi Fujita, Takehiro Takahashi, Yu Sunakawa, Hiroo Ishida, Kazuyuki Hamada, Wataru Ichikawa, Takuya Tsunoda, Yusuke Masuo, Yukio Kato, Yasutsuna Sasaki
2. 発表標題	High unbound plasma concentration of M-2, an active metabolite, is associated with shorter survival in patients with metastatic colorectal cancer who received regorafenib
3. 学会等名	110th American Association for Cancer Research annual meeting (国際学会)
4. 発表年	2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------