

氏名	松本 健
学位の種類	博士(創薬科学)
学位記番号	医薬保博乙70号
学位授与の日付	令和3年9月27日
学位授与の題目	ゲムシタビン内包リポソーム(FE-10832)の薬物動態・薬力学モデルに基づく腫瘍指向性評価
論文審査委員	主査 加藤 将夫 副査 中島 美紀 副査 鈴木 亮 副査 小川 数馬 副査 菅 幸生

# 学位論文要旨

## Abstracts:

FF-10832, a liposomal gemcitabine (GEM), was designed to achieve extended circulation in plasma, high accumulation and payload release in tumors, and promising antitumor efficacy in murine pancreatic cancer models. The present study first demonstrated that FF-10832 exhibits potent antitumor efficacy in animal models of pancreatic cancer and a favorable pharmacokinetic profile compared to unencapsulated GEM. Increased exposure achieved at lower GEM doses resulted in potentially superior efficacy and a more tolerable safety profile for FF-10832 compared to unencapsulated GEM. We then conducted *in vivo/in vitro* studies and gathered information from the literature to develop a physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model that characterizes GEM and active metabolite GEM triphosphate pharmacokinetics in plasma and tumors. The inhibition of tumor growth after GEM and FF-10832 administration was further evaluated based on the PBPK/pharmacodynamics (PD) model, which quantitatively revealed critical factors for antitumor activity of FF-10832 and GEM, including (1) systemic stability of liposomes, (2) liposome uptake activity in tumors, (3) metabolic inactivation activity for GEM in tumors, and (4) metabolic activation activity for GEM in tumors. Thus, these activities could be potential biomarkers for predicting the efficacy of FF-10832 in preclinical models, and further validation of these biomarkers in the clinical setting is needed.

## 要旨:

### 【序論】

代謝拮抗剤であるゲムシタビン (GEM, dFdC) は、主に DNA 合成が行われている S 期の細胞に対して特異的な作用を示し、その作用は時間依存的であると考えられている。しかし、GEM は、シチジンデアミナーゼ (CDA) により素早く代謝を受け不活化される。この代謝的に不安定な事が、有効性を限定的にしている要因の一つと考えられている。リポソームは、生体膜の構成成分であるリン脂質などをカプセル状にした微粒子のことで、体内で必要な量の薬物を必要な部位に必要なタイミングに送達するドラッグデリバリー技術の一種である。血中での安定性と固形がんを集積する (Enhanced Permeability Retention: EPR) 効果を期待して、これまでも GEM のリポソーム製剤化は非臨床試験において報告されてきたが、臨床試験の報告はされておらず、血中での 1) 薬剤の安定性向上、2) 腫瘍部位への指向性、3) 腫瘍部位での薬剤放出性の両立が課題になっていると考えられる。

本研究では、新規ゲムシタビン内包リポソーム製剤 (FF-10832) のマウス膵臓がんモデルにおける薬物動態特性及び有効性を検証した。さらに、実測データに基づく生理学的薬物動態 (PBPK) /薬力学 (PD) モデルを構築し、FF-10832 の腫瘍指向性を定量的に評価する事を目的とした。まず、FF-10832 が、1) 血中での薬剤の安定性向上、2) 腫瘍部位への指向性、3) 腫瘍部位での薬剤放出の 3 要件を満たすかを明らかにするため、膵臓がん皮下移植モデルマウスを用いて、血中、腫瘍中薬物動態を評価し GEM と比較した。また、3 種類の膵臓がん移植モデルを用いて FF-10832 の抗腫瘍効果及び生存期間延長効果を確認し、GEM と比較した。さらに、FF-10832 の有効性を規定する腫瘍への集積及び薬剤放出メカニズムについても検証した。次に、膵臓がん皮下移植モデルにおける FF-10832 の薬物動態及び有効性の実測データに GEM の膜透過・代謝活性の *in vitro* データを加え、PBPK/PD モデルを構築した。モデル構築は 4 段階に分けて行い、第 1 にマウスにおける非内包型 GEM の PBPK モデルを構築し、第 2 にマウス膵臓がん皮下移植モデル (Capan-1) における非内包型 GEM 及

び dFdCTP の PBPK モデルを構築し、第 3 にマウス膵臓がん皮下移植モデル (Capan-1) における内包型 GEM の PBPK モデルを構築し、第 4 に PD モデルと PBPK モデルを腫瘍サイズと腫瘍内 dFdCTP 濃度で連結させ PBPK/PD モデルを構築した。さらに、構築したモデルを用いて抗腫瘍効果を最大化する素過程を感度分析により明らかにした。本研究によって、FF-10832 の薬物動態及び薬効における特徴が明らかになり、現在米国で遂行中の Phase 1 試験 (NCT03440450) の開発推進に寄与する事が期待されるとともに、PBPK/PD モデルを活用したナノ粒子製剤の設計、開発の実例が今後増加する事が期待される。

## 【本論】

膵臓がん皮下移植モデル (Capan-1 皮下移植モデル) 及び膵臓がん同所移植モデル (SUIT-2 同所移植モデル) マウスにおいて、FF-10832 は、GEM 単独投与に比較して 60 倍低用量で生存期間延長効果及び抗腫瘍効果が優れていた。また、Capan-1 皮下移植モデルにおいて、FF-10832 および GEM を投与した時の用量で補正した GEM の AUC は、GEM 投与に比べ FF-10832 投与において血中で 672 倍、腫瘍で 1047 倍と高い暴露量を示した。GEM は腫瘍細胞内へ取り込まれた後、トリリン酸体 (dFdCTP) に変換されて薬効を示す。FF-10832 投与後の腫瘍と骨髄中の dFdCTP を測定し、その AUC の腫瘍/骨髄比を算出したところ、GEM 投与時に比較して 8 倍高く、リポソーム化により安全域が拡大していることが示唆された。興味深いことに、FF-10832 は GEM 不応答の膵臓がん皮下移植モデル (BxPC-3) においても、腫瘍内で dFdCTP 濃度が維持されており、抗腫瘍効果も観察されることが明らかになった。免疫染色法やフローサイトメトリーを用いた解析により、FF-10832 は腫瘍間質にある腫瘍随伴マクロファージ (TAM) に優先的に貪食され、ex vivo の解析で FF-10832 を貪食したマクロファージは、GEM を効率よく放出することが明らかとなった。これらの結果から、腫瘍において TAM が FF-10832 を貪食し、GEM のリザーバー様に機能し、GEM の持続的な暴露と優れた抗腫瘍効果をもたらすことが考えられた (Fig. 1)。

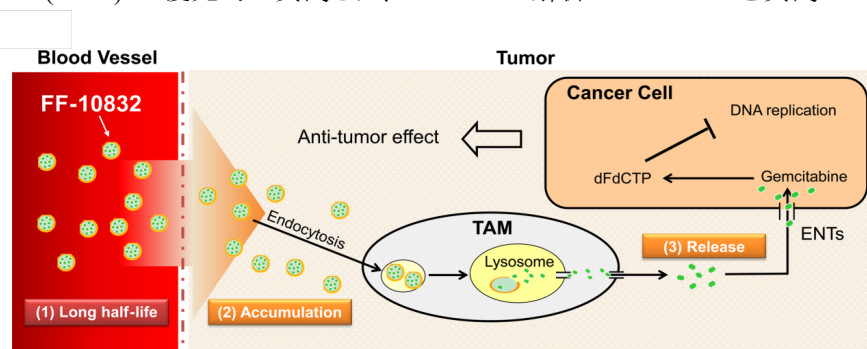


Fig. 1 Summary of FF-10832

次に FF-10832 の抗腫瘍効果に影響を及ぼす因子を明らかにすべく、Capan-1 モデルにおける生理学的薬物速度論 (PBPK) /薬力学 (PD) モデルを構築した (Fig. 2)。まず、肝 S9 分画及び遊離肝細胞を用いて in vitro における代謝及び細胞輸送活性を算出した。次にモデル構築を 4 段階の step に分けて実施した。1 段階目は、マウスに GEM を静脈内投与後の血中 GEM 濃度推移と尿中排泄率データに対して fitting を実施し、代謝酵素及び細胞膜輸送活性の in vitro/in vivo 間スケールアップ因子と腎の再吸収固有クリアランスを推定した。2 段階目は、Capan-1 モデルに GEM 投与後の腫瘍中 GEM 及び dFdCTP 濃度推移に対して fitting を実施し、GEM のリン酸化固有クリアラン

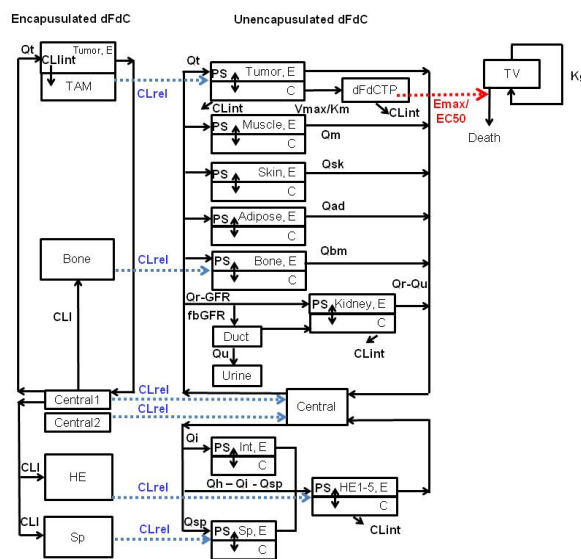


Fig. 2. Schematic diagram of PBPK/PD model for FF-10832

ス及び dFdCTP の消失固有クリアランスを推定した。3 段階目は、リポソーム膜に蛍光標識した FF-10832-DiI を用いて、組織へのリポソーム取り込みクリアランス及び GEM 放出クリアランスを実験的に算出するとともに、Capan-1 モデルに FF-10832 投与後の血中 GEM 濃度推移および腫瘍中 GEM 及び dFdCTP 濃度推移に対して fitting を実施し、PBPK モデルを構築した。構築された PBPK モデルによって、マウス Capan-1 モデルに FF-10832 を投与後の血中 GEM 濃度推移および腫瘍中 GEM 及び dFdCTP 濃度推移が良好に再現された。4 段階目は、薬剤投与後の腫瘍中 dFdCTP 濃度推移を表す式と腫瘍増殖曲線を表す式を関連付けて連結させることにより、PBPK/PD モデル構築した (Fig. 3)。腫瘍増殖曲線に大きな影響を及ぼすパラメーターを把握するため、構築された PBPK/PD モデルを用いて、感度分析を実施した (Fig. 4)。感度分析により、FF-10832 投与後に関連するパラメーターは、GEM 投与後に比較して腫瘍増殖曲線に影響を与える程度が大きく、全身及び腫瘍関連のパラメーター間に複雑な協奏関係があることが示された。全身において、腫瘍増殖阻害効果に対して負に高い感度を有するパラメーターとして、FF-10832 投与後の血中における薬剤放出 ( $CL_{rel,b1}$ ) 及び肝臓におけるリポソームの取り込みクリアランス ( $CL_{int,lipo,h}$ ) が見出された (Fig. 4)。腫瘍において、高い感度を有するパラメーターとして、FF-10832 及び GEM 投与後の dCK ( $V_{max,t}$ ) 及び CDA ( $CL_{int,t1}$ ) に関連するパラメーターが見出された (Fig. 4)。また、FF-10832 投与後の腫瘍におけるリポソームの取り込み固有クリアランス ( $CL_{int,lipo,t}$ ) は、正に感度を有するパラメーターとし推定された。一方、腫瘍や肝臓における薬剤放出速度 ( $CL_{rel,h}$ ,  $CL_{rel,t}$ ) の影響は、軽微であると考えられた。

### 【結論】

FF-10832 が 1) 血中での高い安定性 2) EPR 効果及び TAM を介した貪食による腫瘍指向性、3) 腫瘍部位での効率の良い薬剤放出性能を有し、リポソーム製剤として具備すべき 3 要件を満たす薬剤である事を示した。さらに、GEM に比較して優れた有効性を示すことを明らかにした。また、優れた有効性は、腫瘍における dFdCTP 濃度の維持と関連していることを示した。in vivo/in vivo 試験及び文献から引用した情報を用いて血中及び腫瘍中の GEM 及び dFdCTP の濃度推移を良好に再現する PBPK モデルを構築した。

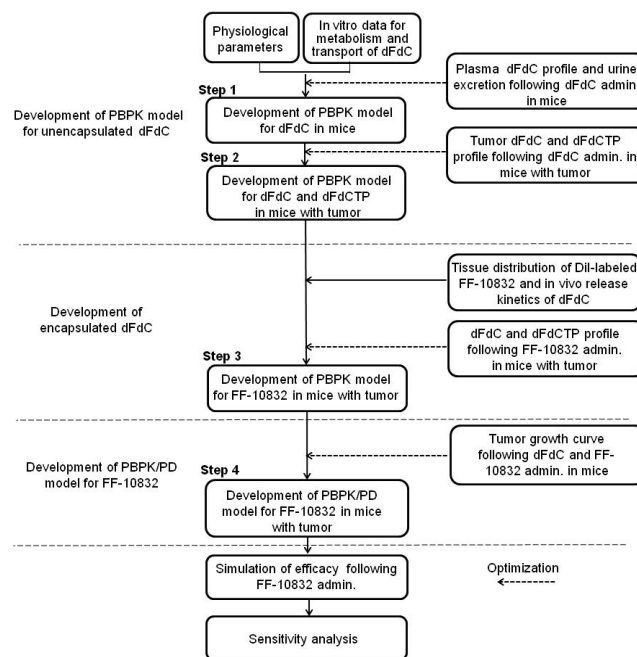


Fig. 3 Framework of PBPK/PD model development

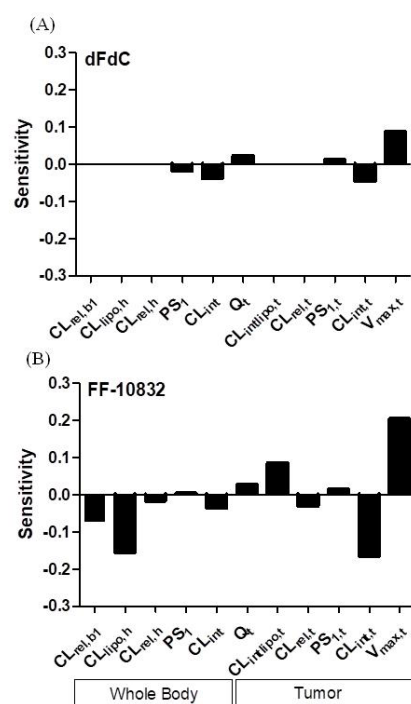


Fig. 4 Sensitivity analyses for dFdC (A) and FF-10832 (B) were conducted on key model parameters that are responsible for whole body and tumor deposition. Parameters whose values were not estimated in the present study, including normal tissue volumes and blood flow, were excluded from the analysis. Sensitivity analysis used the doses of dFdC (240 mg/kg) and FF-10832 (2 mg/kg) that achieved similar tumor growth inhibition. The model parameters were modulated by 20%, and their effect on tumor growth was determined as a sensitivity index in the Materials and Methods section.

さらに FF-10832 及び dFdC 投与後の腫瘍増殖阻害効果を PBPK/PD モデルで評価した。その結果、(1) 全身におけるリポソームの安定性 (2) リポソームの腫瘍への取り込み (3) 腫瘍内での GEM の不活性化、(4)腫瘍内での GEM の活性化が薬効を決める決定的な因子であることを明らかにした。従って、これらの活性は、非臨床における FF-10832 の有効性を予測するバイオマーカーとして有望であり、臨床において更なる検証が必要である。本研究によって、FF-10832 の薬物動態及び薬効における特徴が明らかになり、現在米国で遂行中の臨床試験 (NCT03440450) の推進に寄与する事が期待される。

# 審査結果の要旨

進行性膵がん等に用いられる代謝拮抗薬ゲムシタビン(GEM)は、非選択的な組織分布や代謝的に不安定なため臨床での効果が限定的と考えられている。本論文では、血中安定性と腫瘍指向性の向上、腫瘍部位での薬剤放出を目指し、論文提出者を中心に開発中の GEM 内包リポソーム FF-10832 について、その有効性を科学的に検証するとともに、治療の最適化とバイオマーカー探索を目的として数理モデルに基づく治療効果決定因子の解明が試みられた。膵がん腫瘍移植マウスにおいて FF-10832 は、GEM に比べ 60 倍低用量で抗腫瘍効果が優れていた。用量補正した AUC は GEM に比べ血中で約 700 倍、腫瘍で約 1,000 倍高く、血中安定性が裏付けられた。GEM の薬効に関与する活性化体 dFdCTP の腫瘍/骨髄 AUC 比は GEM に比べ 8 倍高く、安全域の拡大も示唆された。免疫組織学的解析より、FF-10832 は腫瘍間質の腫瘍随伴マクロファージに貪食され、GEM が持続的に放出されるものと推測された。以上、実験的に得られた薬物動態、抗腫瘍効果と文献情報をもとに、体内動態と効果を記述する生理学的薬物速度論/薬力学モデルを構築し感度分析を行ったところ、全身でのリポソームの安定性、リポソームの腫瘍への取り込み、GEM の不活性化と活性化が抗腫瘍効果の決定因子であることが示された。以上の知見は現在進行中の臨床試験に有益であるばかりでなく、GEM 封入リポソームの製剤化において学術的に価値あるものと考えられるため、本論文が博士(創薬科学)論文に値すると判定された。