

2.6.2.2.4.2 MGMT 活性に及ぼすテモゾロミドの影響

腫瘍細胞の MGMT 活性に及ぼすテモゾロミドの影響を *in vitro* 及び *ex vivo* にて検討した報告を以下に示した。

2.6.2.2.4.2.1 *In vitro* における検討 [4.2.1.1.11]

ヒト結腸癌由来細胞の MGMT 活性に及ぼすテモゾロミドの影響を *in vitro* において検討した報告を以下に示した。

方法

SW480, HCT116 及び HCT15 細胞 (3×10^5 細胞) を $50 \sim 1200 \mu\text{M}$ ($9.7 \sim 233 \mu\text{g/mL}$) のテモゾロミド又は $0.5 \sim 10 \mu\text{M}$ の O^6 -BG と共に 2 時間培養した。細胞抽出液を $[^3\text{H}]$ メチル化 DNA と共にインキュベート後, DNA を加水分解し, HPLC にて分離後, $[^3\text{H}]O^6$ -メチルグアニンの放射活性を測定し, MGMT 活性を求めた。

成績

結果を図 2.6.2-13 に示した。テモゾロミド及び O^6 -BG はいずれの細胞の MGMT 活性も低下させた。

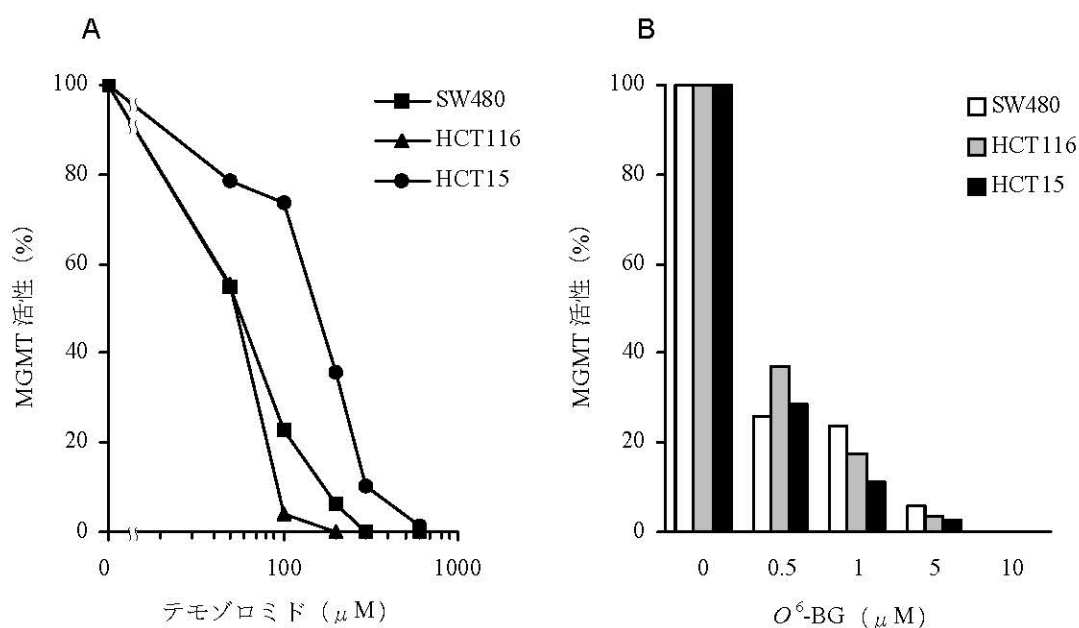


図 2.6.2-13 MGMT 活性に及ぼすテモゾロミド及び O^6 -BG の影響 (*in vitro*)

2.6.2.2.4.2.2 Ex vivo における検討 [4.2.1.1.12]

ヌードマウスに皮下移植したヒト膵癌由来細胞の MGMT 活性に及ぼすテモゾロミドの影響を検討した報告を以下に示した。

方法

MIA PaCa-2, CFPAC-1, PANC-1 及び BxPC-3 細胞($3 \sim 4 \times 10^6$ 細胞)をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍体積が $300 \sim 400 \text{ mm}^3$ となった時点で 340 mg/m^2 のテモゾロミド又は 160 mg/m^2 の O^6 -BG を腹腔内投与した。投与後 48 時間まで経時的に腫瘍を摘出し、細胞抽出液を $[^3\text{H}]$ メチル化 DNA と共にインキュベート後、DNA を加水分解し、HPLC にて分離後、 $[^3\text{H}]O^6$ -メチルグアニンの放射活性を測定し、MGMT 活性を求めた。

成績

結果を図 2.6.2-14 に示した。各腫瘍細胞の MGMT 活性はテモゾロミド及び O^6 -BG 投与後速やかに低下し、投与後 24 時間までほとんど回復しなかった。

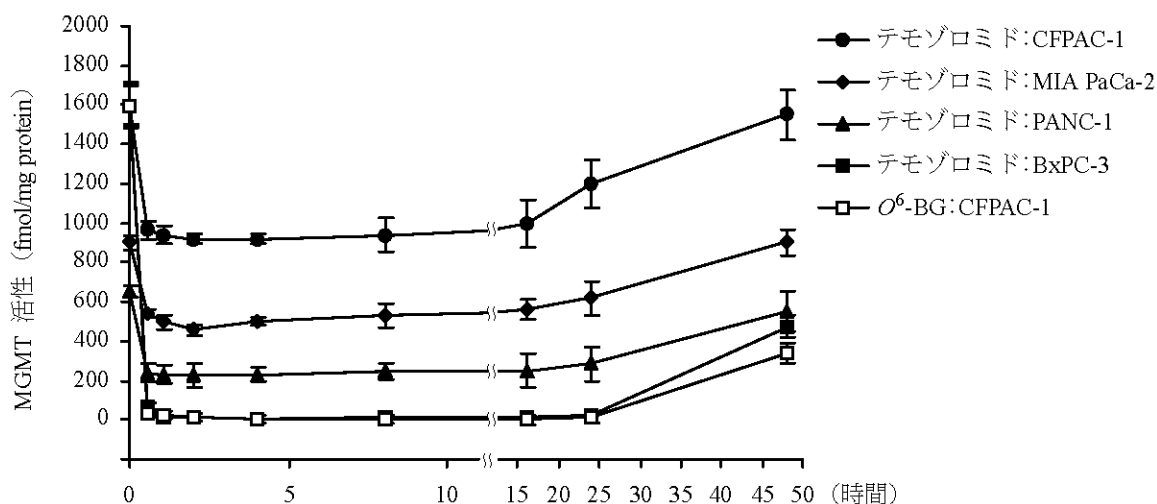


図 2.6.2-14 MGMT 活性に及ぼすテモゾロミド及び O^6 -BG の影響 (ex vivo)

各点は 3 実験の平均値 \pm S.D. を示す。
4.2.1.1.12, Fig.1 を変更して示した。

2.6.2.2.2.5 細胞増殖抑制作用におけるミスマッチ修復 (MMR) の関与 [4.2.1.1.11]

MMR 野生型及び MMR 変異ヒト結腸癌由来細胞に対するテモゾロミドの細胞増殖抑制作用を検討した報告を以下に示した。

方法

MMR 野生型 SW480 細胞並びに MMR 変異 HCT116 及び HCT15 細胞 (2×10^3 細胞) を播種した。18 時間培養後に O^6 -BG ($10 \mu\text{M}$) を添加し、さらに 2 時間後にテモゾロミド又は BCNU を添加して、それぞれ 4 又は 2 時間培養した。細胞を洗浄し、さらに 7 日間培養した後、メチレンブルー染色により、コロニー数を計数し、 IC_{50} 値を算出した。また、MMR の構成酵素である hMLH1 が変異している HCT116 細胞に hMLH1 の遺伝子を導入した HCT116+Ch3 細胞を用いて、同様に IC_{50} 値を算出した。

成績

結果を表 2.6.2-11 に示した。MMR 変異細胞である HCT15 及び HCT116 細胞はテモゾロミドに対して耐性を示し、MGMT 阻害薬である O^6 -BG による感受性の増強はみられなかった。テモゾロミドに対して耐性を示した HCT116 細胞 ($IC_{50} = 170 \mu\text{g/mL}$) に、hMLH1 を発現させることにより感受性は約 5 倍増加し ($IC_{50} = 32 \mu\text{g/mL}$)、 O^6 -BG によりさらに感受性が増加した。一方、BCNU では MMR の有無に関わらず、細胞増殖抑制作用を示し、 O^6 -BG によりいずれも作用は増強された。このことから、テモゾロミドの細胞増殖抑制作用の発現に MMR が関与することが示された。

表 2.6.2-11 テモゾロミド及び BCNU の細胞増殖抑制作用における MMR の関与

細胞	MMR 表現型	IC_{50} 値, μM [$\mu\text{g/mL}$]			
		テモゾロミド		BCNU	
		単独	+ O^6 -BG	単独	+ O^6 -BG
SW480	野生型	350 [68]	25 [4.9]	12 [2.6]	3 [0.6]
HCT15	hMSH6 変異	1600 [311]	1600 [311]	53 [11]	20 [4.3]
HCT116	hMLH1 変異	875 [170]	875 [170]	30 [6.4]	7 [1.5]
HCT116+Ch3	野生型	167 [32]	25 [4.9]	29 [6.2]	6 [1.3]

4.2.1.1.11, Table 1 を変更して示した。

2.6.2.2.2.6 細胞周期に及ぼす影響及びアポトーシスの誘導 [4.2.1.1.13]

テモゾロミドの細胞増殖抑制作用発現の過程で、細胞周期の停止及びアポトーシスの誘導がみられるという報告を以下に示した。

方法

細胞増殖抑制作用: ヒト B リンパ芽球細胞 TK6 及び MT1 細胞 (1×10^5 細胞 / mL) をテモゾロミド ($3.12 \sim 50 \mu\text{M}$, $0.61 \sim 9.7 \mu\text{g/mL}$) と共に 72 時間培養後、トリパンプルー色素排除法により生細胞数を計数した。

細胞周期及びアポトーシス: TK6 及び MT1 細胞をテモゾロミド ($12.5 \mu\text{M}$) と共に 24 ~ 72 時間培養し、培養終了 1 時間前に、 $10 \mu\text{M}$ の 5-ブロモデオキシウリジン (5-BrdU, チミジンの代わりに DNA に取り込まれることにより DNA 合成期 (S 期) の指標となる) を添加した。細胞をエタノールで固定後、2N の HCl により DNA を変性させ、0.5% Tween 20 で処理し、マウス抗 5-BrdU IgG 抗体及びフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体で染色した。さらに、 $50 \mu\text{g/mL}$ のプロピジウムイオダイド (PI) により DNA の二本鎖部分を染色した。フローサイトメーターを用いて、FITC による蛍光強度 (DNA への 5-BrdU 取込み量) 及び PI による蛍光強度 (DNA 量) を測定し、二次元表示法により解析した。細胞内の DNA 含量が 2n 未満、2n 及び 4n の細胞をそれぞれアポトーシス細胞、 G_1/G_0 期及び G_2/M 期並びに 5-BrdU 標識細胞を S 期の細胞として同定し、それぞれの比率を求めた。

成績

細胞増殖抑制作用の結果を図 2.6.2-15 に示した。テモゾロミドは MMR が野生型である TK6 細胞に対して細胞増殖抑制作用を示したが、MMR 欠損細胞である MT1 細胞に対しては細胞増殖抑制作用を示さなかった。

細胞周期及びアポトーシスに関する結果を表 2.6.2-12 に示した。テモゾロミドは $12.5 \mu\text{M}$ ($2.4 \mu\text{g/mL}$) の濃度で TK6 細胞に対しては培養 48 時間で明らかな細胞周期の G_2/M 期での停止及びアポトーシスを誘導したが、テモゾロミドの細胞増殖抑制作用が認められない MT1 細胞に対しては細胞周期に影響を及ぼさず、アポトーシスを誘導しなかった。

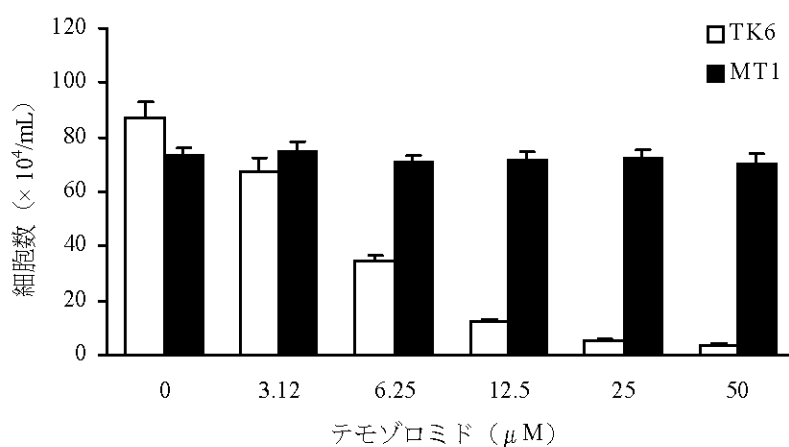


図 2.6.2-15 TK6 及び MT1 細胞に対するテモゾロミドの細胞増殖抑制作用

各値は 2 実験 (各実験, $n=4$) の平均値 \pm S.E. を示す。
4.2.1.1.13, Fig. 1 の A を示した。

表 2.6.2-12 テモゾロミドの TK6 及び MT1 細胞の細胞周期に及ぼす影響及び
アポトーシス誘導作用

細胞	比率 (%)							
	培養時間 (時間)	24		48		72		
	テモゾロミド (μM)	0	12.5	0	12.5	0	12.5	
TK6 MMR 野生型, MGMT 欠損	細胞周期	G ₁ /G ₀ 期	30	24	39	31	57	30
		S 期	55	54	43	10	22	16
		G ₂ /M 期	7	10	10	29	14	15
	アポトーシス	8	12	8	30	7	39	
MT1 MMR 欠損, MGMT 欠損	細胞周期	G ₁ /G ₀ 期	37	38	39	38	59	57
		S 期	55	52	51	53	31	30
		G ₂ /M 期	5	7	8	7	7	9
	アポトーシス	3	3	2	2	3	4	

各値は 2 実験 (各実験, n=4) の平均値を示す (S.E. はいずれも 10% 以下であった).
4.2.1.1.13, TABLE 2 を変更して示した.

2.6.2.2.2.7 ニトロソウレア系抗腫瘍薬耐性細胞におけるテモゾロミドの作用機序 [4.2.1.1.5]

BCNU 耐性 CEM-R 細胞に対してテモゾロミドは親株である BCNU 感受性 CEM-S 細胞と比較して高感受性を示した(2.6.2.2.1.1.4; 10 頁参照). そこで, CEM-R 細胞のテモゾロミドに対する感受性増加の作用機序を検討した.

2.6.2.2.2.7.1 アポトーシス誘導

CEM-S 及び CEM-R 細胞におけるテモゾロミドのアポトーシス誘導能を検討した.

方法

CEM-S 及び CEM-R 細胞(1×10^6 細胞 /mL)をテモゾロミド(1 ~ 1000 μM , 0.19 ~ 194 $\mu\text{g/mL}$)と共に 24 時間培養後, 2 $\mu\text{g/mL}$ の Hoechst 33342 と共に 30 分間培養することにより核を染色した. 200 個の細胞について核の形態観察を行い, アポトーシス細胞の比率を計測した.

成績

テモゾロミドのアポトーシス誘導能の濃度依存性を図 2.6.2-16 に, 194 $\mu\text{g/mL}$ のテモゾロミド処理時のアポトーシス細胞の形態を図 2.6.2-17 に示した. テモゾロミドは CEM-S 及び CEM-R 細胞に対してアポトーシスを誘導し, その誘導能は CEM-R 細胞で強く認められた(図 2.6.2-16). また, 194 $\mu\text{g/mL}$ のテモゾロミド処理時では, 24 時間後に CEM-R 細胞においてアポトーシスの特徴である核の凝集及び断片化が確認された(図 2.6.2-17).

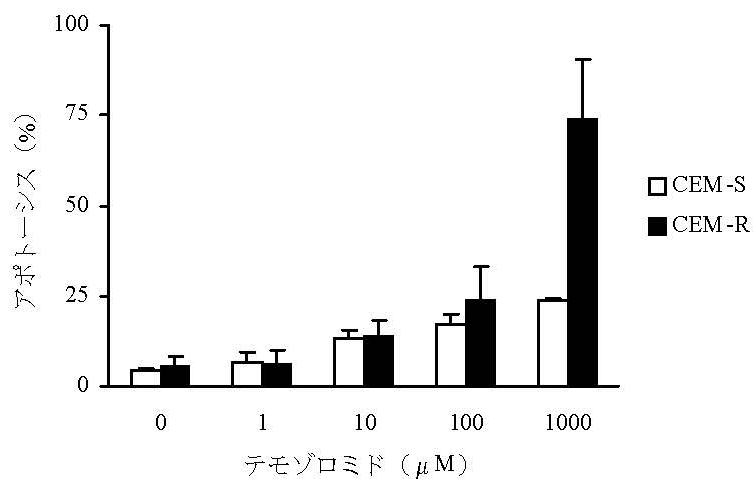
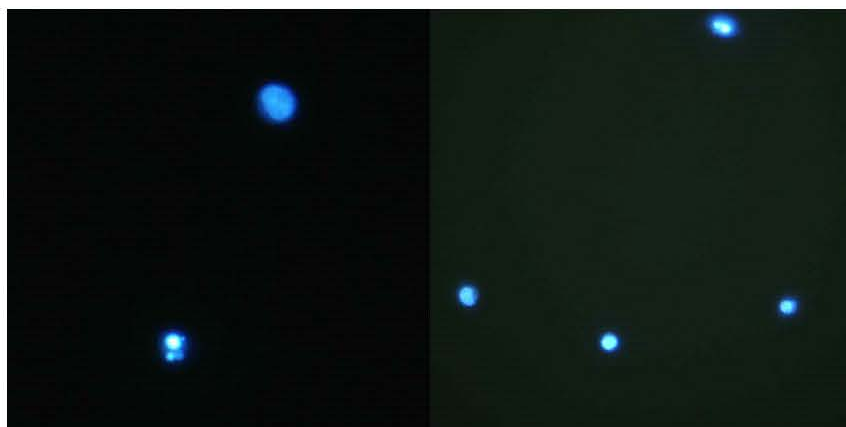


図 2.6.2-16 CEM-S及びCEM-R細胞におけるテモゾロミドのアポトーシス誘導能
各値は 2 又は 3 実験の平均値 ± S.D. を示す。

CEM-S細胞



CEM-R細胞

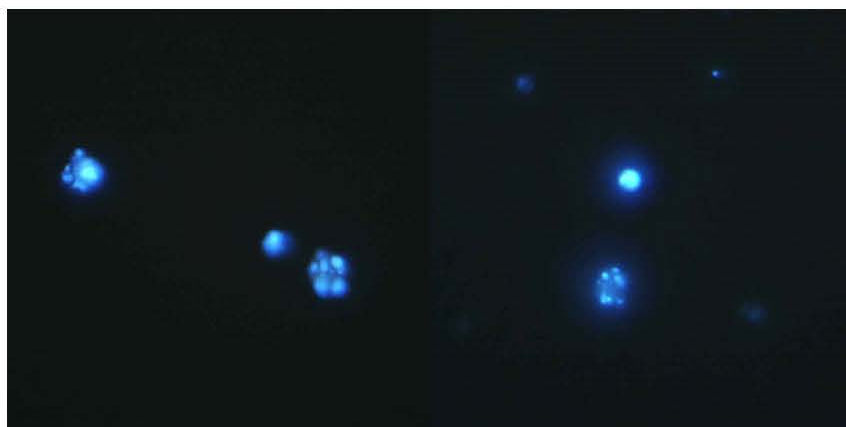


図 2.6.2-17 テモゾロミド処理 CEM-S 及び CEM-R 細胞の核の形態

2.6.2.2.7.2 DNA 除去修復の誘導

テモゾロミドにより形成される N^7 -メチルグアニン及び N^3 -メチルアデニン塩基除去修復 (BER) 及び NER を含む DNA 除去修復により速やかに除去修復されることが報告されている^{2,3)}。BER 及び NER の両修復過程はエンドヌクレアーゼによる損傷塩基の切断及び除去, DNA の再合成によるギャップ修復, 並びにリガーゼによる再連結からなる。そこで, テモゾロミド処理細胞の DNA 除去修復能を測定するため, コメットアッセイ (alkaline single cell gel electrophoresis assay) にて DNA 単鎖切断量を経時的に測定した¹⁾。

方法

CEM-S 及び CEM-R 細胞を 1 ~ 100 μM (0.19 ~ 19 $\mu\text{g/mL}$) のテモゾロミドと共に 1 時間培養後, 20 μL の 0.5% 低融点アガロースリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) に 37 $^{\circ}\text{C}$ で懸濁した細胞 (約 3×10^3 個) を, 予めスライドガラスのすりガラス部分にコートした 70 μL の 0.65% アガロース PBS 上に重層し, さらに 80 μL の低融点アガロース PBS を重層した。スライドガラスを細胞溶解液中で 4 $^{\circ}\text{C}$ にて 1 時間インキュベートした。泳動バッファー (1 mM エチレンジアミン四酢酸, 300 mM NaOH, pH 13) 中で 4 $^{\circ}\text{C}$ にて 40 分間インキュベートし, DNA を一本鎖化した。90 V で 450 mA にて 15 分間, 電気泳動を行った後, 中和し, 25 μL のエチジウムブロマイド (20 $\mu\text{g/mL}$) により染色した。各処理あたり 100 個の細胞について, DNA の移動距離と移動した DNA の相対量の積をテールモーメントとして算出し, DNA の単鎖切断量を定量した。なお, 濃度依存性の検討では, テモゾロミド処理終了直後に測定を行い, また, 時間依存性の検討では, 50 μM のテモゾロミドにて処理を行った。

成績

結果を図 2.6.2-18 に示した。DNA 単鎖切断量を反映したテールモーメントは, テモゾロミドの濃度依存的に増加した。また, テモゾロミド処理終了直後にテールモーメントは最大となった後, 速やかに減少し, 4 時間後にはコントロール値にほぼ復したことから, 修復過程が正常に完了したことが示された。CEM-R 細胞では CEM-S 細胞と比較して処理終了直後のテールモーメントが大きく, その後の減少が速いことから, DNA 除去修復の活性が亢進していることが示された。

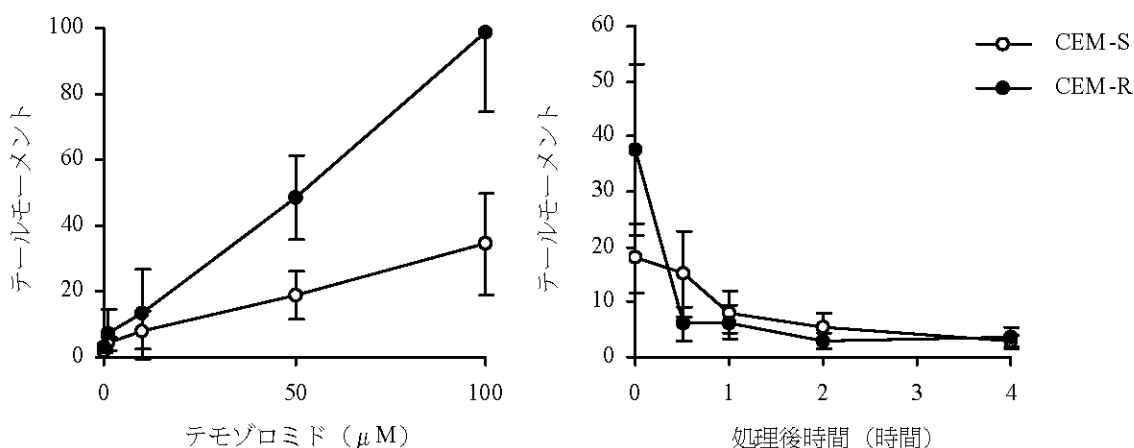


図 2.6.2-18 CEM-S 及び CEM-R 細胞におけるテモゾロミドによる DNA 除去修復の濃度及び時間依存性

各点は 2 ~ 9 実験の平均値 \pm S.D. を示す。
時間依存性の検討におけるテモゾロミド非処理時のテールモーメントは CEM-S 及び CEM-R 細胞でそれぞれ 1.7 及び 2.6 であった (コントロール値)。

2.6.2.2.7.3 薬物感受性関連遺伝子の発現

抗腫瘍薬の感受性に関与する以下の酵素の遺伝子発現を両細胞間で比較した。

- MGMT: O^6 -アルキル化グアニンの修復酵素
- グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST) π : グルタチオン抱合反応を触媒することによりメルファラン, シスプラチン等の薬物の解毒に関連

方法

CEM-S 及び CEM-R 細胞より total RNA を抽出後, cDNA に逆転写した. この cDNA より, MGMT 及び GST π の mRNA 発現量をリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)法により測定し, 内部標準である β -アクチンの mRNA 量を 1 として相対値を算出した.

成績

結果を図 2.6.2-19 に示した. MGMT の mRNA 量は CEM-S 細胞では検出限界以下であったが, CEM-R 細胞においては発現の誘導が認められた. GST π については CEM-S 及び CEM-R 細胞の間で差は認められなかった.

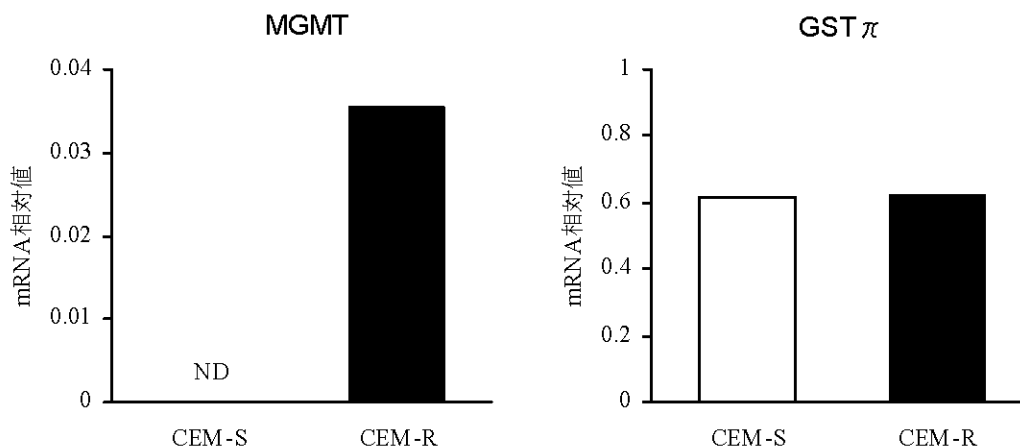


図 2.6.2-19 CEM-S 及び CEM-R 細胞における薬物感受性関連遺伝子の mRNA 発現量

各値は内部標準 (β -アクチン) の mRNA 量を 1 とした時の mRNA 量の平均値を示す.
ND: 検出限界以下

2.6.2.2.2.7.4 MMR 遺伝子の発現

テモゾロミドの作用発現にはMMRが関与していると考えられることから、MMRの構成酵素である hMLH1 及び hMSH2 の遺伝子発現を両細胞間で比較した。

方法

2.6.2.2.2.7.3 項の cDNA を用いて、hMLH1 及び hMSH2 の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により測定し、内部標準である β - アクチンの mRNA 量との差を求めた。CEM-S 細胞に対する CEM-R 細胞での相対値を算出した。

成績

結果を図 2.6.2-20 に示した。CEM-S 細胞に対する CEM-R 細胞での hMLH1 及び hMSH2 の mRNA 量の相対値はそれぞれ 1.79 及び 1.97 であり、CEM-R 細胞では MMR の構成酵素である hMLH1 及び hMSH2 の mRNA 量の増加が認められた。

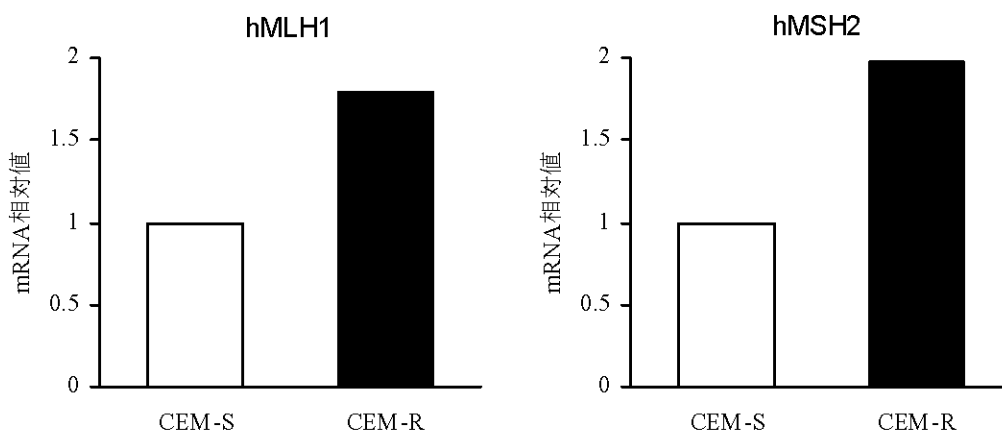


図 2.6.2-20 CEM-S 及び CEM-R 細胞における MMR 遺伝子の mRNA 発現量

各値は CEM-S 細胞における mRNA 量を 1 とした時の平均値を示す。

2.6.2.3 副次的薬理試験

該当する試験を実施しなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

テモゾロミドのラット及びイヌにおける1クール経口投与毒性試験成績より、生体機能に関連した成績を安全性薬理試験項目として以下に記載した。また、ラットにおける胃腸管系、ヒト造血器系及び免疫系への影響を検討した成績を示した。

テモゾロミドの薬理作用である細胞増殖抑制作用に基づくと推測される種々の影響が胃腸管系、造血器系及び免疫系に認められた。

2.6.2.4.1 中枢神経系に及ぼす影響

2.6.2.4.1.1 一般症状に及ぼす影響

2.6.2.4.1.1.1 ラット（低用量）1クール経口投与毒性試験（GLP試験）〔4.2.1.3.1〕

方法

雌雄SDラット(1群雌雄各30例、投与開始6日目に各15例を剖検のため屠殺)にテモゾロミド(25～200 mg/m²)を1日1回、5日間経口投与し、その後23日間休薬した。一般症状の変化を投与期間中には投与後約2及び4時間、休薬期間中には1日1回以上観察し、体重を投与開始1(投与前)、8、15、22及び29日目に、摂餌量を週1回、4週間測定した。

成績

テモゾロミドの50 mg/m²以上で体重増加の抑制、200 mg/m²で摂餌量の減少がみられた。200 mg/m²で休薬期間中に30例中1例が死亡した。また、25及び200 mg/m²で休薬期間中の採血時に各1例が死亡したが、被験薬物の投与に関連のない死亡と考えられた。その他には一般症状に影響はみられなかった。

2.6.2.4.1.1.2 ラット1クール経口投与毒性試験（GLP試験）〔4.2.1.3.2〕

方法

雌雄SDラット(1群雌雄各30例、投与開始6日目に各15例を剖検のため屠殺)にテモゾロミド(雌:200、400及び600 mg/m²、雄:200、400及び800 mg/m²)を1日1回、5日間経口投与し、その後23日間休薬した。一般症状の変化を投与期間中には投与後約2及び4時間、休薬期間中には1日2回観察し、体重を投与開始1(投与前)、8、15、22及び29日目に、摂餌量を週1回、4週間測定した。

成績

テモゾロミドの200 mg/m²以上で休薬期間中に粗毛及び体重増加の抑制、400 mg/m²以上で休薬期間中に全身蒼白化、自発運動低下、るい瘦、糞便量減少、円背位及び摂餌量減少がみられた。また、休薬期間中に200及び400 mg/m²ではそれぞれ30例中1及び18例が、600及び800 mg/m²では各15例全例が死亡又は全身状態悪化のため切迫屠殺された。

2.6.2.4.1.1.3 イヌ（低用量）1クール経口投与毒性試験（GLP試験）〔4.2.1.3.3〕

方法

雌雄ビーグル(1群雌雄各7例、投与開始6日目に各3例を剖検のため屠殺)にテモゾロミド(25～125 mg/m²)を1日1回、5日間経口投与し、その後23日間休薬した。一般症状の変化を投与期間中には投与後約2及び4時間、休薬期間中には1日1回以上観察し、体重を投与開始1(投与前)、8、15、22及び29日目、体温及び摂餌量を1日1回、4週間測定した。

成績

テモゾロミドの 50 mg/m² で投与開始 3 及び 5 日目に, 125 mg/m² で 1 ~ 3 日目に嘔吐がみられた. 休薬期間中に 50 mg/m² 以上で歯肉蒼白化, 125 mg/m² で体温上昇がみられた. また, 125 mg/m² の 1 例において 1 日目に嘔吐, 休薬期間中に体温上昇, 流涎及び自発運動低下がみられ, 全身状態悪化のため切迫屠殺された.

2.6.2.4.1.1.4 イヌ 1 クール経口投与毒性試験 (GLP 試験) [4.2.1.3.4]

方法

雌雄ビーグル(1 群雌雄各 7 例, 投与開始 6 日目に各 3 例を剖検のため屠殺)にテモゾロミド(200 ~ 1000 mg/m²)を 1 日 1 回, 5 日間経口投与し, その後 23 日間休薬した. 一般症状の変化を投与期間中には投与後約 2 及び 4 時間, 休薬期間中には 1 日 1 回観察した. 体重を投与開始 1 (投与前), 8 及び 15 日目, 体温を投与開始 4 及び 7 ~ 13 日目, 摂餌量を 1 日 1 回, 2 週間測定した.

成績

テモゾロミドの 200 mg/m² 以上で投与開始 1 日目より嘔吐がみられた. また, 200 mg/m² 以上で休薬期間中に自発運動低下, 下痢, 拒食, 体重減少, 摂餌量減少, 体温上昇, 脱水, 糞便量減少 / 無便及び便変色がみられた. 200 mg/m² 以上で休薬期間中に各 8 例全例が死亡又は全身状態悪化のため切迫屠殺された.

2.6.2.4.2 心血管系に及ぼす影響 (血圧, 心拍数及び心電図)

2.6.2.4.2.1 イヌ (低用量) 1 クール経口投与毒性試験 (GLP 試験) [4.2.1.3.3]

方法

2.6.2.4.1.1.3 項の動物において, 投与開始 3 及び 27 日目に無麻酔下で 10 誘導心電図による心電図を, 4 及び 28 日目に血圧(平均血圧, 収縮期及び拡張期血圧)を測定した.

成績

テモゾロミドは 125 mg/m² まで血圧及び心電図に影響を及ぼさなかった.

2.6.2.4.2.2 イヌ 1 クール経口投与毒性試験 (GLP 試験) [4.2.1.3.4]

方法

2.6.2.4.1.1.4 項の動物において, 投与開始 3 日目に無麻酔下で 10 誘導心電図による心電図及び心拍数を, 4 日目に血圧(平均血圧, 収縮期及び拡張期血圧)を測定した.

成績

テモゾロミドは 1000 mg/m² まで血圧, 心拍数及び心電図に影響を及ぼさなかった.

2.6.2.4.3 呼吸系に及ぼす影響

2.6.2.4.3.1 イヌ (低用量) 1 クール経口投与毒性試験 (GLP 試験) [4.2.1.3.3]

方法

2.6.2.4.1.1.3 項の動物において, 投与開始 4 及び 28 日目に無麻酔下で呼吸数を測定した.

成績

テモゾロミドは 125 mg/m² まで呼吸数に影響を及ぼさなかった.

2.6.2.4.3.2 イヌ 1 クール経口投与毒性試験 (GLP 試験) [4.2.1.3.4]

方法

2.6.2.4.1.1.4 項の動物において、投与開始 4 日目に無麻酔下で呼吸数を測定した。

成績

テモゾロミドは 1000 mg/m² まで呼吸数に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.4 腎 / 泌尿器系に及ぼす影響

2.6.2.4.4.1 ラット (低用量) 1 クール経口投与毒性試験 (GLP 試験) [4.2.1.3.1]

方法

2.6.2.4.1.1.1 項の動物において、投与開始 4 ~ 5 (投与後) 及び 27 ~ 28 日目の 0 ~ 4 時間の蓄尿について色調, ビリルビン, グルコース, ケトン体, pH, 蛋白, 還元物質, 比重, 尿沈渣, ウロビリノゲン及び潜血を測定した。さらに 0 ~ 24 時間の蓄尿について, 尿浸透圧, P, K, Cl, Na, Ca 及び尿量を測定し, 血清クレアチニン及び尿中クレアチニンよりクレアチニンクリアランスを算出した。なお, 蓄尿前一晩は絶食させた。

成績

テモゾロミドは 200 mg/m² まで腎 / 泌尿器系に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.4.2 ラット 1 クール経口投与毒性試験 (GLP 試験) [4.2.1.3.2]

方法

2.6.2.4.1.1.2 項の動物において、投与開始 4 ~ 5 (投与後) 及び 27 ~ 28 日目の 0 ~ 4 及び 0 ~ 24 時間の蓄尿について 2.6.2.4.4.1 項と同じ検査項目を測定した。

成績

テモゾロミドの 400 mg/m² 以上で投与開始 4 ~ 5 日目 (0 ~ 24 時間蓄尿) に尿量の増加並びにそれに伴う浸透圧及び電解質の減少がみられた。

2.6.2.4.4.3 イヌ (低用量) 1 クール経口投与毒性試験 (GLP 試験) [4.2.1.3.3]

方法

2.6.2.4.1.1.3 項の動物において、投与開始 1 ~ 2 (投与後) 及び 23 ~ 24 日目の 0 ~ 4 及び 0 ~ 24 時間の蓄尿について 2.6.2.4.4.1 項と同じ検査項目を測定した。

成績

テモゾロミドは 125 mg/m² まで腎 / 泌尿器系に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.4.4 イヌ 1 クール経口投与毒性試験 (GLP 試験) [4.2.1.3.4]

方法

2.6.2.4.1.1.4 項の動物において、投与開始 1 ~ 2 日目の投与後 0 ~ 4 及び 0 ~ 24 時間の蓄尿について 2.6.2.4.4.1 項と同じ検査項目を測定した。

成績

テモゾロミドは 1000 mg/m² まで腎 / 泌尿器系に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.5 胃腸管系に及ぼす影響 (非 GLP 試験) [4.2.1.3.5]

2.6.2.4.5.1 胃潰瘍形成

方法

一晚絶食させた雄性 SD ラット (1 群 6 例) にテモゾロミド (200 mg/m²) 又はインドメタシン (10 mg/kg) を経口投与し, 4 時間後に胃を摘出した. 胃を大弯にそって切開し, 胃粘膜上の障害部位の有無を評価した.

成績

テモゾロミドは 200 mg/m² で胃潰瘍形成作用を示さなかったが, 陽性対照として用いたインドメタシンは 10 mg/kg で全例に胃潰瘍形成作用を示した.

2.6.2.4.5.2 胃内容物排出能

方法

一晚絶食させた雄性 SD ラット (1 群 6 例) にテモゾロミド (200 mg/m²) 又はアトロピン (10 mg/kg) を胃内投与した. 30 分後に 3 mL の試験食 (メチルセルロース 10 g, カゼイン 16 g, 粉砂糖 8 g, コーンスターチ 8 g 及び固形ビーフブイヨン 2 個を 300 mL の蒸留水に懸濁) を胃内投与した. 30 分後に頸椎脱臼死させ, 胃を摘出して重量を測定した. 胃を切開して内容物を洗浄した後, 重量を再度測定し, 胃内容物排出率を算出した.

成績

テモゾロミドは 200 mg/m² で胃内容物排出を 47% 抑制し, また, 陽性対照として用いたアトロピンは 10 mg/kg で 83% 抑制した.

2.6.2.4.5.3 小腸炭末輸送能

方法

一晚絶食させた雄性 SD ラット (1 群 6 例) にテモゾロミド (200 mg/m²) 又はアトロピン (10 mg/kg) を経口投与した. 30 分後に炭末, 小麦粉及び水を 1:2:6 の容量比で含む懸濁液 (5 mL) を経口投与し, 10 分後に小腸を摘出した. 小腸全長及び幽門部から炭末の移動先端部までの長さを測定し, 小腸全長に対する炭末移動率を算出した.

成績

テモゾロミドは 200 mg/m² で小腸炭末輸送能に影響を及ぼさなかったが, 陽性対照として用いたアトロピンは 10 mg/kg で小腸炭末輸送能を 50% 抑制した.

2.6.2.4.6 造血器系及び免疫系への影響

2.6.2.4.6.1 血液学的検査及び骨髄検査

2.6.2.4.6.1.1 ラット (低用量) 1 クール経口投与毒性試験 (GLP 試験) [4.2.1.3.1]

方法

2.6.2.4.1.1.1 項の動物において, 投与開始 5, 15 及び 28 日目に採血し, 血液学的検査項目 [赤血球, ヘモグロビン濃度 (Hb), ヘマトクリット値 (Ht), 平均赤血球容積, 平均赤血球血色素量, 平均赤血球血色素濃度, 白血球, 有核赤血球, 血小板, 白血球分画, 網赤血球, プロトロンビン時間, 活性化部分ト

ロンボプラスチン時間]を測定した。なお、プロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間については5及び28日目に測定した。また、6及び29日目に顆粒球/赤芽球比を測定した。

成績

投与開始5又は15日目にテモゾロミドの25 mg/m²以上で好中球の減少, 50 mg/m²以上で網赤血球, 白血球, リンパ球及び血小板の減少, 100 mg/m²以上で赤血球の減少がみられた。また, 投与開始6日目に100 mg/m²以上で顆粒球/赤芽球比の増加がみられた。

2.6.2.4.6.1.2 ラット1クール経口投与毒性試験 (GLP 試験) [4.2.1.3.2]

方法

2.6.2.4.1.1.2 項の動物において, 投与開始5, 15 及び28日目に採血し, 2.6.2.4.6.1.1 項と同じ血液学的検査項目を測定した。また, 6 及び29日目に顆粒球/赤芽球比を測定した。

成績

テモゾロミドの200 mg/m²以上で赤血球, Hb, Ht, 白血球, リンパ球, 好中球, 好酸球及び血小板の減少, 400 mg/m²以上で単球の減少がみられた。

2.6.2.4.6.1.3 イヌ (低用量) 1クール経口投与毒性試験 (GLP 試験) [4.2.1.3.3]

方法

2.6.2.4.1.1.3 項の動物において, 投与開始2日目より隔日毎に採血し, 2.6.2.4.6.1.1 項と同じ血液学的検査項目を測定した。また, 6 及び29日目に顆粒球/赤芽球比を測定した。

成績

テモゾロミドの50 mg/m²以上で投与開始4日目にリンパ球の減少, 125 mg/m²で概ね4~12日目に白血球及び好中球の減少, 16 及び18日目に骨髓抑制からの回復によると考えられる白血球及び好中球の増加, 並びに8~18日目に血小板の減少がみられた。

2.6.2.4.6.1.4 イヌ1クール経口投与毒性試験 (GLP 試験) [4.2.1.3.4]

方法

2.6.2.4.1.1.4 項の動物において, 投与開始2又は13日目に採血し, 2.6.2.4.6.1.1 項と同じ血液学的検査項目を測定した。また, 6日目に顆粒球/赤芽球比を測定した。

成績

テモゾロミドの200 mg/m²以上で投与開始2日目に白血球, リンパ球及び好中球の減少, 13日目に200 mg/m²で血小板, 赤血球, Hb 及びHtの減少がみられた。

2.6.2.4.6.2 骨髓細胞のコロニー形成 (非 GLP 試験) [4.2.1.3.6]

方法

8例のヒト胸骨由来骨髓単核細胞 $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞をテモゾロミド(5~55 µM)及び20% ウシ胎児血清を含む軟寒天 IMDM 培地に播種し, 9日間培養後, コロニー数を計数した。

成績

テモゾロミドにより顆粒球・マクロファージコロニーの形成が抑制され, 37%抑制する濃度は8例中6例では18.2~45.7 µM(3.5~8.9 µg/mL), 残り2例では55 µM(11 µg/mL)以上であった。

2.6.2.4.6.3 免疫細胞の機能（非 GLP 試験） [4.2.1.3.7]

テモゾロミドの免疫細胞の機能[インターロイキン-2(IL-2)に対する増殖応答, ナチュラルキラー(NK)活性, リンホカイン活性化キラー(LAK)活性及び付着細胞の CD1b 抗原の発現]に及ぼす影響を *in vitro* にて検討した成績を示した。

方法

IL-2 に対する増殖応答: ヒト末梢血単核細胞 (1×10^6 細胞 /mL) をテモゾロミド (62.5 ~ 500 μ M, 12 ~ 97 μ g/mL) と共に 4 時間培養後, 洗浄した細胞 (2×10^5 細胞 /well) を IL-2 (500 IU/mL) と共に 4 日間培養した。培養終了 18 時間前に [3 H] チミジンを添加し, 細胞の増殖を [3 H] チミジンの取込み量にて評価した。

NK 活性: ヒト末梢血単核細胞 (E, 1×10^6 細胞 /mL) をテモゾロミド (62.5 ~ 500 μ M) と共に 4 時間培養後, 洗浄した細胞を標的細胞 (T) である [51 Cr] 標識ヒト骨髄性白血病由来 K562 細胞 (2×10^3 細胞, E/T 比 = 100:1 ~ 12.5:1) と共に 4 時間培養した。上清を回収し, 傷害された細胞から遊離した放射活性を測定し, NK 活性を評価した。

LAK 活性: ヒト末梢血単核細胞 (E, 1×10^6 細胞 /mL) をテモゾロミド (62.5 ~ 500 μ M) と共に 4 時間培養後, 洗浄した細胞を IL-2 (500 IU/mL) と共に 4 日間培養した。細胞を洗浄後, 標的細胞 (T) である [51 Cr] 標識ヒトバーキットリンパ腫由来 Daudi 細胞 (2×10^3 細胞, E/T 比 = 100:1 ~ 12.5:1) と共に 4 時間培養した。上清を回収し, 傷害された細胞から遊離した放射活性を測定し, LAK 活性を評価した。

MGMT 活性: ヒト末梢血単核細胞抽出液を [3 H] メチル化 DNA と共にインキュベート後, 蛋白質画分への放射能の移行量を測定し, MGMT 活性を求めた。

付着細胞の CD1b 発現: ヒト末梢血単核細胞より分離したプラスチック付着細胞 (5×10^6 細胞 / flask) を顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF, 200 ng/mL), IL-4 (200 IU/mL) 及びテモゾロミド (500 μ M, 97 μ g/mL) と共に 3 日間培養後, 洗浄した細胞の CD1b の発現を CD1b に対するモノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーにより測定した。

成績

テモゾロミドはヒト末梢血単核細胞の NK 活性を抑制し, その時の IC₅₀ 値は約 400 μ M (約 78 μ g/mL) であった。また, IL-2 に対する増殖応答及び LAK 活性を抑制し, その時の IC₅₀ 値は細胞の MGMT 活性と正の相関を示し, それぞれ約 170 ~ 約 400 μ M (約 33 ~ 約 78 μ g/mL) 及び約 70 ~ 約 400 μ M (約 14 ~ 約 78 μ g/mL) であった。

末梢血単核細胞のプラスチック付着細胞の 60% ~ 70% は CD14 陽性の単球であり, GM-CSF 及び IL-4 と共に 3 日間培養することにより, 付着細胞の約 60% が CD1b 陽性の抗原提示細胞に分化した。このプラスチック付着細胞の抗原提示細胞への分化に対して, テモゾロミドは 500 μ M (97 μ g/mL) で影響を及ぼさなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験を実施しなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験の考察及び結論

2.6.2.6.1.1 抗腫瘍作用

神経膠細胞である星状膠細胞に由来する星細胞系腫瘍は分化度に応じて星細胞腫、退形成性星細胞腫、膠芽腫等に分類されており、そのうち退形成性星細胞腫及び膠芽腫は未分化型であり、悪性度が高いことが報告されている。そこで、ヒト膠芽腫由来細胞である U87 MG 細胞に対するテモゾロミドの作用を *in vitro* 及び *in vivo* にて検討した。その結果、*in vitro* においてテモゾロミドは添加 2 日後より細胞増殖抑制作用を示し、その IC₅₀ 値は 6.5 µg/mL であった (2.6.2.2.1.1.1; 5 頁参照)。また、ACNU も同様に細胞増殖抑制作用を示し、その作用はテモゾロミドより低濃度で認められた。さらに、*in vivo* では、U87 MG 細胞頭蓋内移植マウスに対して、テモゾロミドは 14.7 mg/m² の 1 日 1 回、5 日間反復投与 (経口又は腹腔内) により生存日数を延長させた (2.6.2.2.1.2.1.1.1; 13 頁参照)。同用量の DTIC も生存日数を延長させたが、その延長率はテモゾロミドの方が高かった。テモゾロミド及び DTIC はいずれも MTIC を経てメチルジアゾニウムイオンとなり DNA をメチル化することから (図 2.6.2-8; 20 頁参照)、テモゾロミドは DTIC と同じ作用機序を介して抗腫瘍作用を発現すると考えられるが、このマウスモデルに対する抗腫瘍作用に差が認められた理由として以下に示すとおり、両者の体内動態の違いが関与すると考えられる。テモゾロミドは経口投与後ほぼ全てが未変化体の状態で血液中に出現し、血液中及び血液脳関門を通過した後の腫瘍部位にて生理的 pH 条件下で非酵素的に MTIC へと代謝されるのに対して、DTIC は代謝酵素により MTIC に代謝された後、循環血を介して頭蓋内の腫瘍部位へ移行するが、MTIC の半減期が約 5 分と短いため (2.6.2.2.2.1; 21 頁参照)、腫瘍局所へ到達する MTIC 量がテモゾロミドよりも少なくなることが予想され、その結果、頭蓋内移植した腫瘍に対する DTIC の作用がテモゾロミドより弱くなったと考えられた。

さらに、テモゾロミドは *in vitro* 及び *in vivo* において、U87 MG 細胞以外にも神経膠腫である星細胞腫又は退形成性星細胞腫、黒色腫、リンパ腫、骨髄性白血病、結腸癌由来腫瘍細胞等を含む各種ヒト腫瘍細胞に対して幅広い抗腫瘍作用を示した。*In vitro* におけるテモゾロミドのこれら腫瘍細胞に対する細胞増殖抑制作用の IC₅₀ 値は 1.9 ~ 202 µg/mL であり (2.6.2.2.1.1.2; 7 頁参照)、脳転移を有する悪性黒色腫患者に臨床推奨用量である 150 mg/m² を 1 日 1 回、5 日間経口投与した時の 5 日目の脳脊髄液中での未変化体の C_{max} 値 0.95 µg/mL (2.7.2.2.8 参照) と比較して高値を示した。この理由については明らかではないが、*in vivo* では、腫瘍細胞の栄養血管の発達が十分ではないため、血液からの酸素及び栄養の供給が少なく、また、宿主の癌免疫監視機構等のストレスを受けていることから、*in vitro* 培養系と比較して増殖能が著しく低いと考えられている⁴⁾。なお、脳腫瘍では他の腫瘍と比較して MGMT 活性が低値を示すことから⁵⁾、テモゾロミドに対する感受性は高い可能性が考えられる。このため、*in vitro* での抑制濃度と比較して、*in vivo* ではより低濃度で抗腫瘍作用を示す可能性があると考えられる。また、*in vivo* ではこれら腫瘍細胞を移植したマウスモデルにおいて、臨床推奨用量である 150 ~ 200 mg/m²/日よりも低用量から高用量までの広範囲 (14.7 ~ 約 1210 mg/m²/日) で抗腫瘍作用を示した (2.6.2.2.1.2.1; 13 頁参照)。この有効用量に幅がみられた原因として、腫瘍細胞の耐性に関わる MGMT の発現の程度及び MMR 機能の有無により、テモゾロミドに対する感受性が異なるためと考えられる (2.6.2.6.1.3; 47 頁参照)。

テモゾロミドの臨床試験では、1日1回、5日間反復投与し、その後23日間休薬する用法が取られている。ヒト膠芽腫由来細胞（SF-295 及び U251 細胞）をマウスの頭蓋内に移植したモデルでは、1回投与と分割反復投与による抗腫瘍作用に明らかな違いが認められず、臨床での用法の妥当性を示唆する成績は得られなかった（2.6.2.2.1.2.1.1.2；15頁参照）。

悪性神経膠腫の初回治療では施行可能な場合には外科的切除による腫瘍減量を行い、その後補助療法として化学療法及び放射線療法を行うことが標準的とされている。化学療法と放射線療法が併用される場合があるため、ヒト星細胞腫由来 D384 細胞及びヒト膠芽腫由来 U251 細胞に対する放射線の細胞増殖抑制作用に及ぼすテモゾロミドの影響を *in vitro* にて検討した。その結果、テモゾロミドはヒト脳腫瘍由来細胞の放射線感受性を相加的又はそれ以上に増強することが示された（2.6.2.2.1.1.3；9頁参照）。このことから、臨床において放射線療法にテモゾロミドを併用することにより、抗腫瘍作用が増強する可能性のあることが示された。

2.6.2.6.1.2 作用機序

図 2.6.2-21（次頁）に現在までに得られているテモゾロミドの主要な抗腫瘍作用の機序を示す。

2.6.2.6.1.2.1 テモゾロミドによる DNA のメチル化及び MMR による DNA 二本鎖切断の誘導

テモゾロミドは培地中で MTIC を経て速やかにメチルジアゾニウムイオンに分解されることから、MGMT 活性の低い U87 MG 細胞を用いて細胞増殖抑制作用を誘導するのに必要なテモゾロミドの処理時間を検討したところ、1時間の処理で細胞増殖抑制作用がプラトーとなった（2.6.2.2.2.2；24頁参照）。この結果から、比較的短時間の暴露で DNA のメチル化が終了し、細胞増殖抑制作用を誘導し得ることが裏付けられた。

テモゾロミドは図 2.6.2-8（20頁参照）に示した反応機構により DNA の O^6 - グアニン、 N^7 - グアニン及び N^3 - アデニンをメチル化し、その比率はそれぞれ約 5%、70% 及び 9% であることが報告されている²⁾。そのうち、 N^7 -メチルグアニン及び N^3 -メチルアデニンは BER 又は NER により速やかに除去修復され、テモゾロミドの抗腫瘍作用にほとんど寄与していないことが報告されている^{2,3)}。また、ニトロソウレア系抗腫瘍薬耐性細胞において、テモゾロミド処理終了直後より DNA 除去修復が認められ、約 4 時間で修復過程が完了したことから（2.6.2.2.2.7.2；34頁参照）、 N^7 -メチルグアニン及び N^3 -メチルアデニンは速やかに除去修復されることが示された。一方、 O^6 -アルキル化グアニンに対して特異的に除去修復を行う MGMT が欠損した細胞に MGMT を遺伝子導入することにより、テモゾロミドに対する感受性が低下することから（2.6.2.2.2.4.1；27頁参照）、テモゾロミドは約 5% の O^6 - グアニンのメチル化を介して抗腫瘍作用を示すと考えられた。

O^6 -メチルグアニンは DNA の複製の際にシトシン以外にチミンとも対合できるため、新生 DNA 鎖には本来対合すべきシトシンの代わりに誤ってチミンが取り込まれた結果、ミスマッチ塩基対が形成され、MMR により認識される²⁾。MMR による新旧 2 本の DNA 鎖の識別にはアデニンのメチル化が関与していることが報告されているが、このアデニンのメチル化は複製後経時的に起こるため、新生 DNA 鎖ではまだメチル化されておらず、MMR はメチル化アデニンを指標に鋳型 DNA 鎖であることを識別し、新生 DNA 鎖上のミスマッチ塩基を特異的に除去する⁶⁾。このように、MMR は鋳型 DNA 鎖上の O^6 -メチルグアニンではなく、新生 DNA 鎖上のチミンを特異的に除去するため、MMR による修復過程でポリメラーゼが働く際に、誤ってチミンが取り込まれる。再度形成されたミスマッ

チ塩基対に対して、同様に MMR が無効な修復を繰り返すうちに修復が完結せず、DNA の一本鎖切断が残ったままで次の DNA の複製時に二本鎖切断が誘導される可能性がある。

MMR の欠損によりテモゾロミドに対する感受性が低下するという報告があり⁷⁾、また、テモゾロミドに耐性を示す MMR 変異細胞に MMR 遺伝子を発現させることによりテモゾロミドに対する感受性が増加するという成績から (2.6.2.2.5 ; 30 頁参照)、テモゾロミドの抗腫瘍作用には上記の MMR による修復過程が関与していることが明らかにされた。

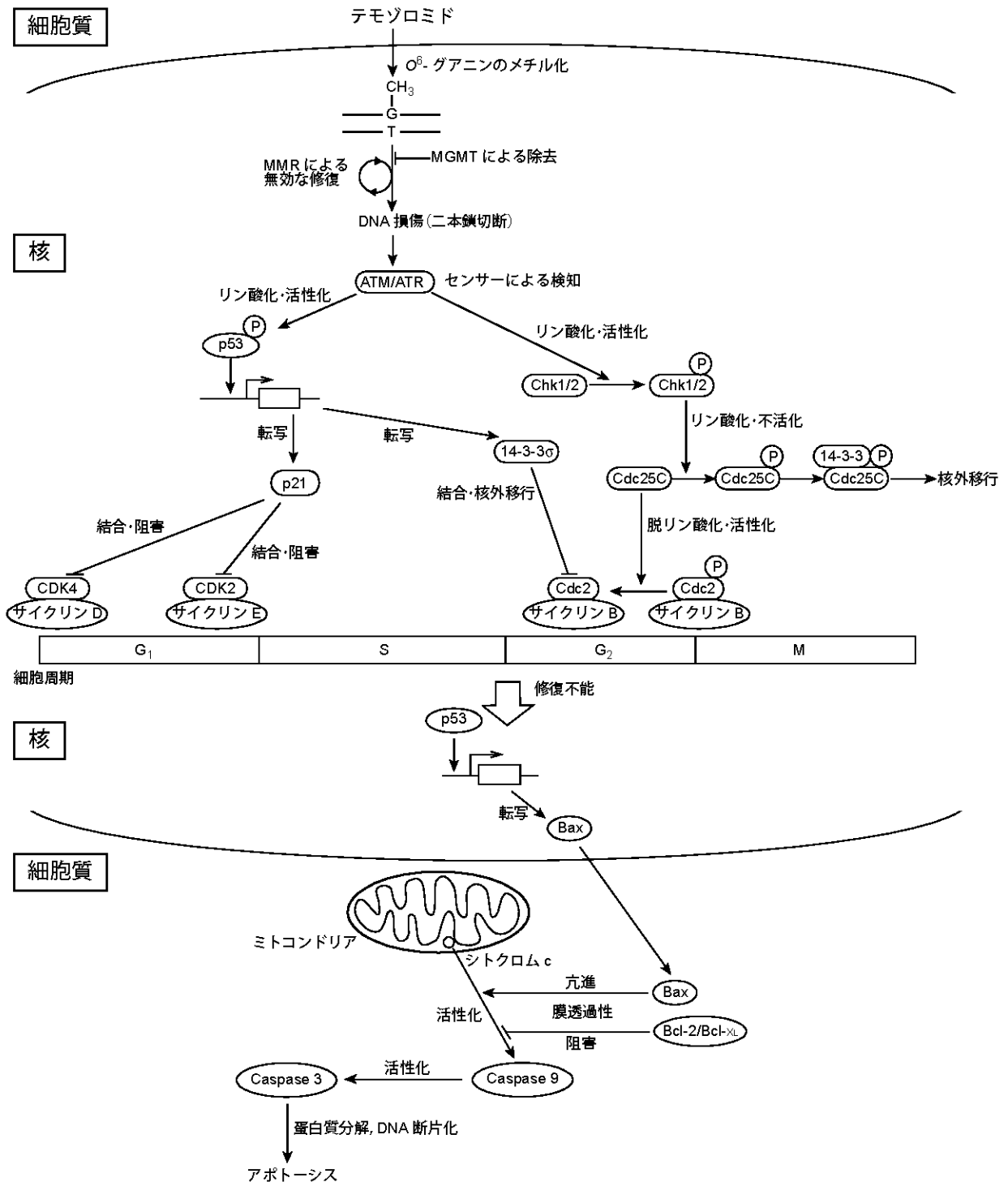


図 2.6.2-21 テモゾロミドの主要な作用機序 (推定)

2.6.2.6.1.2.2 細胞周期の停止及びアポトーシスの誘導

テモゾロミドの抗腫瘍作用発現には、細胞周期停止による細胞増殖抑制作用及びアポトーシスによる細胞死の誘導が関与することが報告されている (2.6.2.2.2.6 ; 31 頁及び 2.6.2.2.2.7.1 ; 32 頁参照)。

形成された二本鎖切断等の DNA の損傷はリン酸化酵素である ataxia telangiectasia mutated (ATM) 又は ATM and Rad3-related (ATR) により検出される (図 2.6.2-21 ; 45 頁参照)。テモゾロミドにより、ATM/ATR を介して checkpoint kinase (Chk) 1/2 及び p53 がリン酸化され、G₂/M 期での細胞周期の停止が起こることが報告されている^{8,9)}。Chk1/2 のリン酸化により、G₂/M 期での細胞周期の停止が起こる機序として、リン酸化された Chk1/2 により cell division cycle 25C (Cdc25C) がリン酸化され、不活化することにより、Cdc2/サイクリン B による M 期への細胞周期の移行が阻止されると説明されている。なお、テモゾロミドにより活性化された p53 が p21 を誘導し、G₁/S 期で細胞周期が停止するという報告もある¹⁰⁾。

二本鎖切断等の DNA 損傷が修復不可能な場合、細胞にアポトーシスが誘導されることが知られており、テモゾロミドでも腫瘍細胞に対してアポトーシスの誘導が認められている (2.6.2.2.2.6 ; 31 頁及び 2.6.2.2.2.7.1 ; 32 頁参照)。テモゾロミドによるアポトーシスの誘導には p53 の活性化が関与するが、p53 欠損細胞にもアポトーシスが誘導されることから、p53 非依存性の経路もあることが報告されており^{11,12)}、テモゾロミドによるアポトーシスの誘導機構についての詳細は明らかにされていない。

2.6.2.6.1.2.3 ニトロソウレア系抗腫瘍薬との作用機序の比較

テモゾロミドは DNA にメチル基を付加する一価アルキル化薬であり、一方、ACNU、ラニムスチン (MCNU) 等のニトロソウレア系抗腫瘍薬は 2 個の官能基を持つアルキル基を生成し、DNA をアルキル化する二価アルキル化薬である。前者が DNA の O⁶-グアニンにメチル基を付加することにより抗腫瘍作用を示すのに対し、後者は DNA の鎖間にクロスリンクを形成することにより (図 2.6.2-8 ; 20 頁参照)、DNA の複製及び転写の阻害 (2.6.2.2.2.3 ; 25 頁参照)、並びに二本鎖切断を誘導することで抗腫瘍作用を示すことが報告されている¹³⁾。このように、テモゾロミドとニトロソウレア系抗腫瘍薬の抗腫瘍作用の発現に関わるアルキル化様式が異なることから、両者の作用機序は異なると考えられた。なお、DNA 鎖間クロスリンクは複製、転写等の細胞の重要な生理的プロセスを阻害するため、その細胞毒性は極めて強いと予想されることから、ニトロソウレア系抗腫瘍薬はテモゾロミドより低用量で作用を発現すると考えられた (2.6.2.2.1 ; 5 頁参照)。

テモゾロミド及びニトロソウレア系抗腫瘍薬の主要な作用機序及び修復機構を表 2.6.2-13 に纏めた。テモゾロミドでは、修復機構として O⁶-メチルグアニンを直接修復する MGMT が関与し、この MGMT にて修復されなかった O⁶-メチルグアニンにより mismatches 塩基対が形成される。前述のように、この mismatches 塩基対に対する MMR の無効な修復がテモゾロミドの抗腫瘍作用の発現に関与する。一方、ニトロソウレア系抗腫瘍薬では O⁶-クロロエチルグアニンを経て形成される鎖間クロスリンクが作用発現に関与し、その修復機構として MGMT、並びに鎖間クロスリンクを修復する NER 及び相同組換え修復がある。さらに腫瘍細胞の MMR 欠損によりニトロソウレア系

抗腫瘍薬に対する感受性が亢進したことから、テモゾロミドとは逆に MMR もその修復に関与することが報告されている^{14,15}。

表 2.6.2-13 テモゾロミド及びニトロソウレア系抗腫瘍薬の作用機序及び DNA 修復機構¹⁶⁾

分類	抗腫瘍薬	作用発現に関連するアルキル化物	作用機序 (DNA に及ぼす影響)	修復機構	
アルキル化薬	一価	テモゾロミド DTIC	O ⁶ -メチルグアニン	① ミスマッチ塩基対の形成 ② ミスマッチ塩基対の MMR による修復過程での二本鎖切断の誘導	MGMT
	二価	ACNU MCNU BCNU	O ⁶ -クロロエチルグアニン	① 鎖間クロスリンク形成 ② DNA 複製及び転写の阻害 ③ 二本鎖切断の誘導	MGMT NER 相同組換え修復 MMR

参考文献 16) の表 1 を変更して示した。

2.6.2.6.1.2.4 ニトロソウレア系抗腫瘍薬耐性細胞に対するテモゾロミドの作用及びその機序

現在、本邦において神経膠腫に適応のある抗腫瘍薬として、ニトロソウレア系抗腫瘍薬である ACNU 及び MCNU が用いられているが、これらを用いた化学療法施行後の再発例又は無効例ではニトロソウレア系抗腫瘍薬に対して耐性化している可能性がある。テモゾロミドはニトロソウレア系抗腫瘍薬と作用機序が異なり、特に MMR が両者の作用に相反して関与していることから（前項参照）、ニトロソウレア系抗腫瘍薬に耐性を示す腫瘍に対して抗腫瘍作用を示す可能性が考えられる。そのため、ニトロソウレア系抗腫瘍薬に耐性を示す腫瘍細胞に対するテモゾロミドの作用を *in vitro* において検討した。その結果、テモゾロミドは親株と比較してニトロソウレア系抗腫瘍薬耐性株に対してより強い細胞増殖抑制作用を示した（2.6.2.2.1.1.4；10 頁参照）。この作用機序を検討したところ、耐性株では親株と比較して DNA 除去修復の活性が亢進し、また、MGMT の mRNA 発現が誘導されており、さらに、MMR の構成酵素である hMLH1 及び hMSH2 の mRNA 発現量が増加していた（2.6.2.2.2.7；32 頁参照）。これらは、ニトロソウレア系抗腫瘍薬による DNA 損傷である O⁶-クロロエチルグアニン、鎖間クロスリンク等に対応した DNA 修復機構が誘導された結果か、又はそれらの DNA 修復機構を保持した細胞が選択された結果と考えられる。耐性株では耐性化の過程でテモゾロミドの主要な抗腫瘍作用の機序である MMR 活性が増加していることから、MGMT 活性が誘導されているにもかかわらず、テモゾロミドは親株よりも耐性株に対して強い細胞増殖抑制作用を示したものと考えられる。以上のことから、ニトロソウレア系抗腫瘍薬を中心とした化学療法後の無効例又は再発例ではニトロソウレア系抗腫瘍薬による曝露の過程で腫瘍細胞に MMR が誘導され、そのため、テモゾロミドに対して逆に感受性が亢進する可能性のあることが示唆された。

2.6.2.6.1.3 耐性機序

アルキル化薬等の抗腫瘍薬は DNA を中心とした核酸代謝に損傷を与えることにより抗腫瘍作用を示すため、DNA 修復機構がその耐性化に関与していると考えられる。DNA 修復機構には MMR、BER、NER、相同組換え修復、MGMT による直接修復等があり、複数の DNA 修復機構が各抗腫瘍

薬の耐性に関与していると考えられている。テモゾロミドに関与すると考えられる DNA 修復機構 (図 2.6.2-22) について以下に記載し、また、テモゾロミドに対する耐性の獲得及び交差耐性の可能性についても併せて記載した。

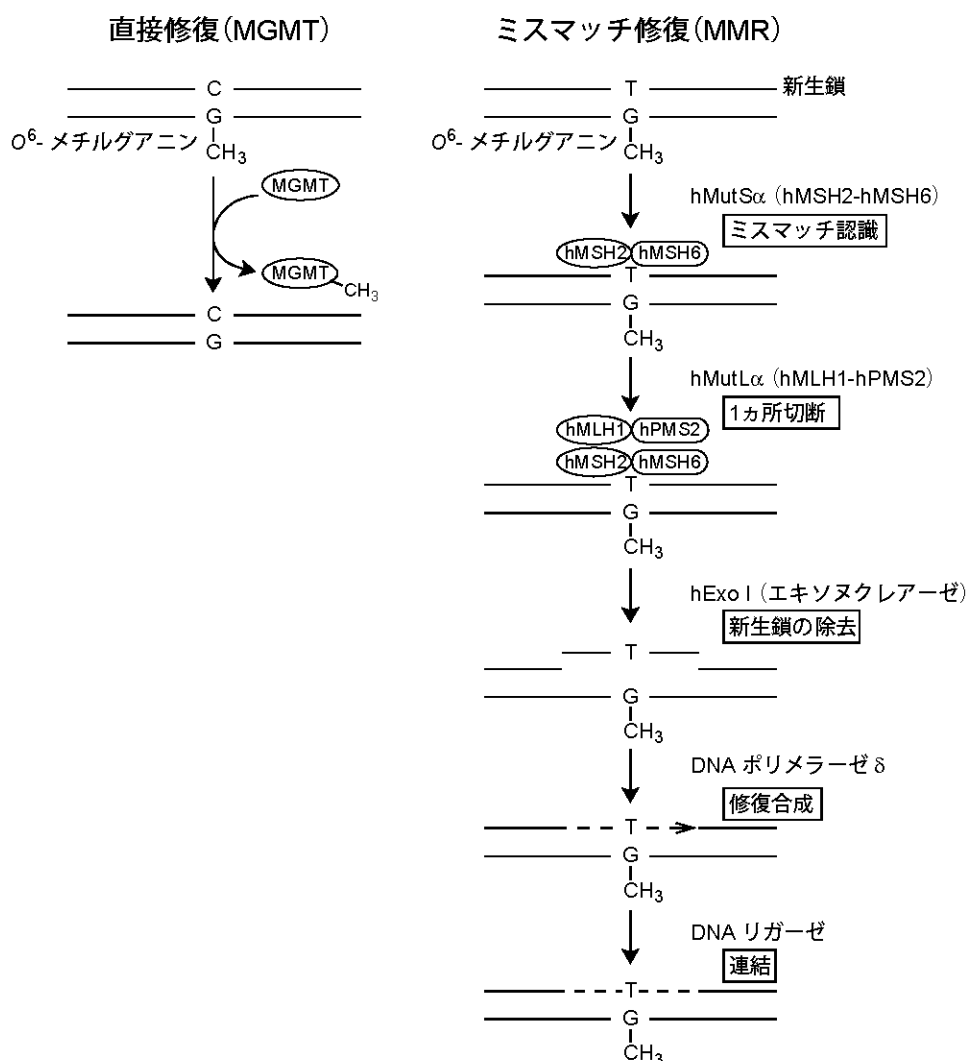


図 2.6.2-22 テモゾロミドの耐性及び作用機序に関する DNA 修復機構

テモゾロミドの作用発現には O⁶-メチルグアニンが関与し (2.6.2.6.1.2.1; 44 頁参照), MGMT 活性とテモゾロミドの抗腫瘍作用には逆相関傾向が認められていることから (2.6.2.2.1.1.2; 7 頁及び 2.6.2.2.1.2.1.2.1; 17 頁参照), MGMT がテモゾロミドに対する耐性形成に関与していると考えられる。この MGMT は O⁶-グアニンに付加されたアルキル基を、自身の活性システイン残基に転移することにより除去し、グアニンに修復するが、この反応は不可逆的であり、失活後速やかにユビキチン化され、分解を受ける¹⁷⁾。その後、再び活性が回復するためには蛋白質の再合成が必要となることが知られている^{2,17)}。また、テモゾロミドにより MGMT 活性が低下し、約 24 時間低下が持続することから (2.6.2.2.2.4.2; 28 頁参照), テモゾロミドを反復投与することにより MGMT 活性低下を持続させ、テモゾロミドに対して感受性を高めることが可能であると考えられるが、*in vivo* における抗腫瘍作用の検討では、分割反復投与により抗腫瘍作用が増強するという結果は得ら

れなかった (2.6.2.2.1.2.1.1.2 ; 15 頁及び 2.6.2.2.1.2.1.2.1 ; 17 頁参照)。さらに、MMR の変異により、腫瘍細胞はテモゾロミドに対して耐性となることが示された (2.6.2.2.2.5 ; 30 頁参照)。

また、テモゾロミド濃度を段階的に増加させた条件下でヒト神経膠腫細胞を 6 カ月間培養することにより、テモゾロミド耐性細胞が樹立されたことが報告されている¹⁸⁾。このテモゾロミド耐性細胞では、親株と比較して MGMT 活性が亢進し、アポトーシスに関連する蛋白質 (Bad, Bax 及び Bcl-Xs) の発現が減少していた。なお、MMR の構成酵素である hMLH1 及び hPMS2 の発現には変化は認められなかった。この結果から、テモゾロミドの長期投与により、耐性を獲得する細胞が出現する可能性が考えられる。また、腫瘍はその増殖過程で変異により異なった表現形を獲得した細胞からなる不均一な集団であるため、腫瘍中にテモゾロミドに感受性の低い細胞が存在し、テモゾロミドの投与中に選択的に増殖してくる可能性も考えられる。

抗腫瘍薬に対する耐性化には各種 DNA 修復機構が関与していることから、同じ DNA 修復機構を誘導する抗腫瘍薬に対しては交差耐性を示す可能性がある。本邦で承認されている悪性脳腫瘍に対する抗腫瘍薬として、ACNU, MCNU 及びインターフェロン β (IFN β) があるが、これらとテモゾロミドとの交差耐性の可能性を以下に示す。IFN β は I 型 IFN 受容体を介した直接的及び宿主免疫系の賦活作用による間接的作用により抗腫瘍作用を示すことから^{19,20)}、テモゾロミドとは作用部位が異なり、交差耐性を示す可能性は低いと考えられる。テモゾロミド及びニトロソウレア系抗腫瘍薬の抗腫瘍作用発現に関与する *o*⁶-メチルグアニン及び *o*⁶-クロロエチルグアニンはいずれも MGMT により修復されることから、MGMT 活性の亢進は、テモゾロミド及びニトロソウレア系抗腫瘍薬のどちらに対しても耐性化の原因になり得ると考えられる。実際に BCNU 耐性マウス L1210 細胞はテモゾロミドに対しても耐性を示し、その MGMT 活性は親株と比較して増加していることが報告されている^{21,22)}。

2.6.2.6.2 安全性薬理試験の考察及び結論

本邦での臨床試験開始にあたっては、GLP 試験としてラット及びイヌにおける 1 クール経口投与毒性試験、非 GLP 試験として胃腸管系に及ぼす影響に関する試験及び公表論文より、生体機能に関連した試験項目である安全性薬理試験のコアバッテリー試験項目 (中枢神経系、心血管系及び呼吸系)、腎 / 泌尿器系、胃腸管系、造血器系及び免疫系についてのテモゾロミドの影響を評価することが可能であった。なお、テモゾロミドは末期癌患者の治療に用いられる細胞毒性薬物であり、本邦で既に承認されている DTIC と同じ作用機序を有すると考えられることから (2.6.2.2.2 ; 20 頁参照)、臨床試験開始に際して安全性薬理試験の適用対象外と判断された^{23,24)}。今回、安全薬理試験の項にそれらの成績を要約して記載した。

一般症状に対しては、テモゾロミドをラット及びイヌに反復投与することにより 50 mg/m² 以上で体重増加の抑制及び嘔吐、また、200 mg/m² 以上ではこれらの症状以外にも摂餌量の減少、下痢等の胃腸管系への影響が認められ、ラットでは 200 mg/m² 以上で、イヌでは 125 mg/m² 以上で死亡又は全身状態悪化のため切迫屠殺された。これらはいずれも臨床推奨用量又はそれ以下の用量で認められ、また、他のアルキル化薬の反復投与と毒性試験で認められる所見であった。

心血管系及び呼吸系に対しては、テモゾロミドは 1000 mg/m² までイヌに反復投与しても影響を及ぼさなかった。

腎 / 泌尿器系に対しては、ラットにテモゾロミドの 400 mg/m² 以上を反復投与することにより、尿量の増加並びにそれに伴う浸透圧及び電解質の減少が認められたが、クレアチニンクリアランスを含むその他の測定値に腎機能の悪化を示唆する異常はみられなかった。また、イヌに 1000 mg/m² まで反復投与しても尿量を含むいずれの測定項目にも影響は認められなかった。

胃腸管系に対して、非 GLP 試験として実施した試験成績では、テモゾロミドは 200 mg/m² の単回投与によりラットで胃潰瘍形成作用を示さず、小腸炭末輸送能に影響を及ぼさなかったが、同じ用量で胃内容物排出能を 47% 抑制した。このラットでみられた胃内容物排出能の抑制作用の機序は不明である。

造血器系に対して、テモゾロミドはラット及びイヌにおいて、それぞれ臨床推奨用量以下である 25 及び 50 mg/m² 以上の反復投与により末梢血白血球、血小板の減少等がみられた。さらに、*in vitro* において、テモゾロミドは、癌患者（外国人）にテモゾロミドの 200 mg/m² を 1 日 1 回、5 日間反復投与した際の 5 日目の C_{max} 値 13.0 µg/mL (2.7.2.2.4 参照) とほぼ同濃度又は低濃度でヒト骨髓細胞の増殖・分化を抑制した。免疫系に対しては、テモゾロミドは、薬理作用を示す濃度で、ヒト末梢血単核細胞の NK 活性、IL-2 に対する増殖応答及び LAK 活性を抑制した。

以上のことから、テモゾロミドの臨床推奨用量又はそれ以下の用量で、他のアルキル化薬と同じく主に胃腸管系、造血器系及び免疫系への影響が認められた。また、胃内容物排出能の抑制作用の機序については不明であるが、反復投与後のそれら組織 / 器官への影響についてはいずれも細胞増殖が比較的早い組織 / 器官であること、及びテモゾロミドの薬効発現用量で認められることから、薬理作用に基づくものと推察された。

2.6.2.7 図表

本文中の該当箇所に挿入した。

2.6.2.8 参考文献

- 1) Yamauchi T, Kawai Y, Ueda T. Enhanced DNA excision repair in CCRF-CEM cells resistant to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, quantitated using the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Biochem Pharmacol.* 2003;66:939-46.
- 2) Tentori L, Graziani G. Pharmacological strategies to increase the antitumor activity of methylating agents. *Curr Med Chem.* 2002;9:1285-301.
- 3) Plosky B, Samson L, Engelward BP, Gold B, Schlaen B, Millas T, et al. Base excision repair and nucleotide excision repair contribute to the removal of *N*-methylpurines from active genes. *DNA Repair.* 2002;1:683-96.
- 4) O'Byrne KJ, Dalglish AG, Browning MJ, Steward WP, Harris AL. The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *Eur J Cancer.* 2000;36:151-69.
- 5) Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001;61:3225-9.
- 6) Modrich P. Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. *J Biol Chem.* 1997;272:24727-30.

- 7) Pepponi R, Marra G, Fuggetta MP, Falcinelli S, Pagani E, Bonmassar E, et al. The effect of O^6 -alkylguanine-DNA alkyltransferase and mismatch repair activities on the sensitivity of human melanoma cells to temozolomide, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, and cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;304:661-8.
- 8) Hirose Y, Katayama M, Berger MS, Pieper RO. Cooperative function of Chk1 and p38 pathways in activating G_2 arrest following exposure to temozolomide. *J Neurosurg.* 2004;100:1060-5.
- 9) Caporali S, Falcinelli S, Starace G, Russo MT, Bonmassar E, Jiricny J, et al. DNA damage induced by temozolomide signals to both ATM and ATR: role of the mismatch repair system. *Mol Pharmacol.* 2004;66:478-91.
- 10) Tentori L, Portarena I, Bonmassar E, Graziani G. Combined effects of adenovirus-mediated wild-type p53 transduction, temozolomide and poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor in mismatch repair deficient and non-proliferating tumor cells. *Cell Death Differ.* 2001;8:457-69.
- 11) Bocangel DB, Finkelstein S, Schold SC, Bhakat KK, Mitra S, Kokkinakis DM. Multifaceted resistance of gliomas to temozolomide. *Clin Cancer Res.* 2002;8:2725-34.
- 12) Tentori L, Lacal PM, Benincasa E, Franco D, Faraoni I, Bonmassar E, et al. Role of wild-type p53 on the antineoplastic activity of temozolomide alone or combined with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;285:884-93.
- 13) Spiro T, Liu L, Gerson S. New cytotoxic agents for the treatment of metastatic malignant melanoma: temozolomide and related alkylating agents in combination with guanine analogues to abrogate drug resistance. *Forum.* 2000;10:274-85.
- 14) Aquilina G, Ceccotti S, Martinelli S, Hampson R, Bignami M. *N*-(2-chloroethyl)-*N'*-cyclohexyl-*N*-nitrosourea sensitivity in mismatch repair-defective human cells. *Cancer Res.* 1998;58:135-41.
- 15) Fiumicino S, Martinelli S, Colussi C, Aquilina G, Leonetti C, Crescenzi M, et al. Sensitivity to DNA cross-linking chemotherapeutic agents in mismatch repair-defective cells *in vitro* and in xenografts. *Int J Cancer.* 2000;85:590-6.
- 16) 前原 喜彦, 杉町 圭蔵. 6.DNA 修復機構と抗がん剤感受性. *臨床病理レビュー* 2002;119:80-9.
- 17) Srivenugopal KS, Yuan XH, Friedman HS, Ali-Osman F. Ubiquitination-dependent proteolysis of O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O^6 -benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochemistry.* 1996;35:1328-34.
- 18) Ma J, Murphy M, O'Dwyer PJ, Berman E, Reed K, Gallo JM. Biochemical changes associated with a multidrug-resistant phenotype of a human glioma cell line with temozolomide-acquired resistance. *Biochem Pharmacol.* 2002;63:1219-28.
- 19) Nagao S, Tohgo A, Kohno M, Ogawa H. Cytostatic action of human fibroblast interferon in direct growth inhibition: effect on human malignant melanoma. *Gann.* 1983;74:452-8.
- 20) 若林 俊彦, 吉田 純, 小林 達也, 景山 直樹, 神崎 正紀. 悪性脳腫瘍に対するインターフェロンの効果. *癌と化学療法* 1982;9:1400-6.
- 21) Taverna P, Catapano CV, Citti L, Bonfanti M, D'Incalci M. Influence of O^6 -methylguanine on DNA damage and cytotoxicity of temozolomide in L1210 mouse leukemia sensitive and resistant to chloroethylnitrosoureas. *Anticancer Drugs.* 1992;3:401-5.

- 22) Catapano CV, Brogginini M, Erba E, Ponti M, Mariani L, Citti L, et al. *In vitro* and *in vivo* methazolastone-induced DNA damage and repair in L-1210 leukemia sensitive and resistant to chloroethylnitrosoureas. *Cancer Res.* 1987;47:4884-9.
- 23) ICH harmonised tripartite guideline (S7A) “Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals” (2000)
- 24) 藤森 観之助, 橋本 宗弘. 安全性薬理試験ガイドライン(S7)について. *医薬品研究*2000;31:744-61.

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表 (1 of 2)

被験物質：テモゾロミド

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	記載箇所 Sec.
効力を裏付ける試験 抗腫瘍作用 <i>In vitro</i> 細胞増殖抑制作用 ヒト膠芽腫由来細胞	U87 MG 細胞培養系	<i>In vitro</i>	████████	P001*	4.2.1.1.1 (評価)
各種ヒト腫瘍細胞	各種細胞培養系 GM892A, K562, A549, JAR, Raji, U87 MG, U373 MG, StML-11a, LS174T, HT29, Mawi 及び MCF-7 細胞	<i>In vitro</i>	公表論文	—	4.2.1.1.2 (参考) 4.2.1.1.3 (参考)
放射線との併用	D384 及び U251 細胞培養系	<i>In vitro</i>	公表論文	—	4.2.1.1.4 (参考)
ニトロソウレア系抗腫瘍薬耐性細胞	CCRF-CEM (親株: CEM-S, BCNU 耐性株: CEM-R) 細胞培養系	<i>In vitro</i>	████████	—	4.2.1.1.5 (参考)
<i>In vivo</i> 抗腫瘍作用 ヒト脳腫瘍由来細胞異種移植モデル 頭蓋内移植モデル	U87 MG 細胞移植ヌードマウス	経口又は腹腔内	████████	P001*	4.2.1.1.1 (評価)
	SF-295 及び U251 細胞移植ヌードマウス	経口	公表論文	—	4.2.1.1.6 (参考)
	D-54 MG, D-456 MG 及び D612 EP 細胞移植ヌードマウス	腹腔内	公表論文	—	4.2.1.1.7 (参考)
皮下移植モデル	各種細胞移植ヌードマウス D-341 Med, D528 EP, D612 EP, D-456 MG, D-212 MG, D-54 MG 及び D-245 MG 細胞	腹腔内	公表論文	—	4.2.1.1.7 (参考)
マウス腫瘍由来細胞同系移植モデル 頭蓋内移植モデル	B16 及び L5178Y 細胞移植ヌードマウス	腹腔内	公表論文	—	4.2.1.1.8 (参考)
作用機序 培養液中における安定性	TLX5 細胞培養系	<i>In vitro</i>	公表論文	—	4.2.1.1.9 (参考)
処理時間の細胞増殖抑制作用への影響 DNA, RNA 及び蛋白質合成に及ぼす影響	U87 MG 細胞培養系	<i>In vitro</i>	████████	P001*	4.2.1.1.1 (評価)
MGMT の関与 抗腫瘍作用発現における O ⁶ -グアニンのメチル化の関与	K562 及び U937 細胞培養系	<i>In vitro</i>	公表論文	—	4.2.1.1.10 (参考)
MGMT 活性に及ぼす影響	各種細胞培養系 SW480, HCT116 及び HCT15 細胞	<i>In vitro</i>	公表論文	—	4.2.1.1.11 (参考)
	各種細胞皮下移植ヌードマウス MIA PaCa-2, CFPAC-1, PANC-1 及び BxPC-3 細胞	腹腔内	公表論文	—	4.2.1.1.12 (参考)
MMR の関与	各種細胞培養系 SW480, HCT116+ Ch3, HCT15 及び HCT116 細胞	<i>In vitro</i>	公表論文	—	4.2.1.1.11 (参考)
細胞周期に及ぼす影響及びアポトーシスの誘導	TK6 及び MT1 細胞培養系	<i>In vitro</i>	公表論文	—	4.2.1.1.13 (参考)
ニトロソウレア系抗腫瘍薬耐性細胞における作用機序 アポトーシス誘導	CEM-S 及び CEM-R 細胞におけるアポトーシス誘導能	<i>In vitro</i>	████████	—	4.2.1.1.5 (参考)
DNA 除去修復の誘導	CEM-S 及び CEM-R 細胞におけるコメットアッセイ	<i>In vitro</i>			
薬物感受性関連遺伝子の発現	CEM-S 及び CEM-R 細胞における薬物感受性関連遺伝子の発現	<i>In vitro</i>			
MMR 遺伝子の発現	CEM-S 及び CEM-R 細胞における MMR 遺伝子の発現	<i>In vitro</i>			

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.3.1 薬理試験一覧表 (2 of 2)

被験物質：テモゾロミド

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	記載箇所 Sec.
安全性薬理試験 中枢神経系 一般症状	ラット ^a	経口	██████	P002*	4.2.1.3.1 (評価)
	ラット ^a	経口	██████	P003*	4.2.1.3.2 (評価)
	イヌ ^a	経口	██████	P004*	4.2.1.3.3 (評価)
	イヌ ^a	経口	██████	P005*	4.2.1.3.4 (評価)
心血管系 血圧, 心電図	無麻酔イヌ ^a	経口	██████	P004*	4.2.1.3.3 (評価)
	無麻酔イヌ ^a	経口	██████	P005*	4.2.1.3.4 (評価)
呼吸系	無麻酔イヌ ^a	経口	██████	P004*	4.2.1.3.3 (評価)
	無麻酔イヌ ^a	経口	██████	P005*	4.2.1.3.4 (評価)
腎 / 泌尿器系	ラット ^a	経口	██████	P002*	4.2.1.3.1 (評価)
	ラット ^a	経口	██████	P003*	4.2.1.3.2 (評価)
	イヌ ^a	経口	██████	P004*	4.2.1.3.3 (評価)
	イヌ ^a	経口	██████	P005*	4.2.1.3.4 (評価)
胃腸管系 胃潰瘍形成 胃内容物排出能 小腸炭末輸送能	ラット	経口	SPRI	P006*	4.2.1.3.5 (評価)
	ラット	胃内			
	ラット	経口			
造血器系及び免疫系 血液学的検査及び骨髄検査	ラット ^a	経口	██████	P002*	4.2.1.3.1 (評価)
	ラット ^a	経口	██████	P003*	4.2.1.3.2 (評価)
	イヌ ^a	経口	██████	P004*	4.2.1.3.3 (評価)
	イヌ ^a	経口	██████	P005*	4.2.1.3.4 (評価)
骨髄細胞のコロニー形成	ヒト骨髄単核細胞	<i>In vitro</i>	公表論文	—	4.2.1.3.6 (参考)
免疫細胞の機能	ヒト末梢血単核細胞	<i>In vitro</i>	公表論文	—	4.2.1.3.7 (参考)

^a: GLP に適合した試験.

██████ : ████████

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.3.2 効力を裏付ける試験 (1 of 2)

被験物質：テモゾロミド

試験項目	動物・細胞	薬物、濃度/用量 (投与経路)	試験成績	2.6.2 Page	報告書 番号	記載箇所 Sec.
抗腫瘍作用 <i>In vitro</i> 細胞増殖抑制作用 ヒト膠芽腫由来U87 MG 細胞に対する作用	U87 MG 細胞	テモゾロミド 0.19 ~ 58 μ g/mL ACNU 0.31 ~ 93 μ g/mL (<i>in vitro</i>) テモゾロミド 5.8 μ g/mL ACNU 9.3 μ g/mL (<i>in vitro</i>)	IC ₅₀ 値 テモゾロミド: 6.5 μ g/mL ACNU: 8.4 μ g/mL テモゾロミド及び ACNU は添加後 2 及び 3 日目に細胞増殖を抑制	5	P001*	4.2.1.1.1
各種ヒト腫瘍細胞に対 する作用	各種ヒト腫瘍細胞 GM892A, K562, A549, JAR, Raji, U87 MG, U373 MG, S1ML- 11a, LS174T, HT29, Mawi及びMCF-7細胞	テモゾロミド BCNU (<i>in vitro</i>)	IC ₅₀ 値 テモゾロミド: 1.9 ~ 202 μ g/mL BCNU: 5.5 ~ 61 μ g/mL 腫瘍細胞の薬物感受性と MGMT 活 性に逆相関傾向がみられた	7	—	4.2.1.1.2 4.2.1.1.3
放射線との併用	D384 及び U251 細胞	テモゾロミド 0.97, 1.9 μ g/mL, 4 日 間 X 線 1 ~ 6 Gy, 単回 (<i>in vitro</i>)	テモゾロミド反復処理により, 放射 線感受性が U251 細胞では相加的, D384 細胞では相加以上に増強	9	—	4.2.1.1.4
ニトロソウレア系抗腫 瘍薬耐性細胞に対する 作用	CCRF-CEM (親株: CEM-S, BCNU 耐性 株: CEM-R) 細胞	テモゾロミド 0.019 ~ 777 μ g/mL ACNU 0.031 ~ 310 μ g/mL BCNU 0.021 ~ 210 μ g/mL (<i>in vitro</i>)	CEM-R 細胞は BCNU 及び ACNU に 対して耐性を示した. CEM-R 細胞は CEM-S 細胞と比べてテモゾロミド に対して高い感受性を示した	10	—	4.2.1.1.5
<i>In vivo</i> 抗腫瘍作用 ヒト脳腫瘍由来細胞異種移植モデル 頭蓋内移植モデル	U87 MG 細胞移植 ヌードマウス	テモゾロミド DTIC 14.7 mg/m ² /日 (経口又は腹腔内) 5 日間投与 70 日間観察	テモゾロミド及び DTIC は共に, 生 存日数を延長. テモゾロミドの生存 日数延長率は DTIC よりも大きかつ た	13	P001*	4.2.1.1.1
	SF-295 及び U251 細胞 移植ヌードマウス	テモゾロミド 約 810 ~ 約 1810 mg/m ² (経口) BCNU 50 ~ 240 mg/m ² (静脈内) 単回又は 3 回分割投 与 90 日間観察	テモゾロミドの約 810 又は約 1210 mg/m ² でいずれの投与スケジュール でも生存日数の延長が認められた. BCNU ではいずれも生存日数の延長 がみられた	15	—	4.2.1.1.6
	D-54 MG, D-456 MG 及び D612 EP 細胞移 植ヌードマウス	テモゾロミド 411 mg/m ² /日, 5 日間 (腹腔内)	テモゾロミドはいずれの腫瘍細胞移 植マウスにおいても生存日数を延長	15	—	4.2.1.1.7
皮下移植モデル	各種腫瘍細胞移植 ヌードマウス D-341 Med, D528 EP, D612 EP, D-456 MG, D-212 MG, D-54 MG 及び D-245 MG 細胞	テモゾロミド 411 mg/m ² /日, 5 日間 1025, 1200 mg/m ² , 単 回 BCNU 100 mg/m ² , 単回 プロカルバジン 700 mg/m ² /日, 5 日間 (腹腔内)	テモゾロミドはいずれの腫瘍細胞移 植マウスにおいても腫瘍増殖を抑制 した. D-341 Med 細胞移植マウスで は反復投与時と比較して単回投与時 の作用が強かった. BCNU 及びプロ カルバジンも腫瘍の増殖を抑制. テモゾロミドの抗腫瘍作用と腫瘍細 胞の MGMT 活性には逆相関傾向が みられた	17	—	4.2.1.1.7
マウス腫瘍由来細胞同系移植モデル 頭蓋内移植モデル	B16 及び L5178Y 細胞 移植ヌードマウス	テモゾロミド 約 300 mg/m ² /日 (腹腔内) 3 日間投与 90 日間観察	テモゾロミドはいずれの細胞移植マ ウスにおいても生存日数を延長	19	—	4.2.1.1.8

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.3.2 効力を裏付ける試験 (2 of 2)

被験物質：テモゾロミド

試験項目	動物・細胞	薬物、濃度/用量 (投与経路)	試験成績	2.6.2 Page	報告書 番号	記載箇所 Sec.
作用機序 培養液中における安定性	TLX5 細胞	テモゾロミド 20 μ g/mL MTIC 20 μ g/mL DTIC 40 μ g/mL (<i>in vitro</i>)	テモゾロミドは肝ミクロソームの有無にかかわらず MTIC へ変化 (半減期約 50 分). MTIC は肝ミクロソームの有無にかかわらず分解された (半減期 5.5 分). DTIC は肝ミクロソーム存在下でのみ MTIC に変化	21	—	4.2.1.1.9
		テモゾロミド 2.5 ~ 20 μ g/mL MTIC 2.5 ~ 20 μ g/mL DTIC 5 ~ 80 μ g/mL (<i>in vitro</i>)	テモゾロミド及び MTIC は肝ミクロソームの有無にかかわらず細胞増殖抑制作用を示した. DTIC は肝ミクロソーム非存在下では作用を示さなかった			
処理時間の細胞増殖抑制作用への影響	U87 MG 細胞	テモゾロミド 5.8 μ g/mL (<i>in vitro</i>)	テモゾロミドの処理時間が 1 時間以上では, 細胞増殖抑制作用は同程度 (<i>in vitro</i>)	24	P001*	4.2.1.1.1
DNA, RNA 及び蛋白質合成に及ぼす影響	U87 MG 細胞	テモゾロミド 0.58 ~ 58 μ g/mL ACNU 0.31 ~ 31 μ g/mL (<i>in vitro</i>)	テモゾロミド及び ACNU はいずれも DNA 合成を抑制. RNA 及び蛋白質合成に対し, テモゾロミドはほとんど影響せず, ACNU は高濃度で抑制	25	P001*	4.2.1.1.1
MGMT の関与 抗腫瘍作用発現における O ⁶ -グアニンのメチル化の関与	MGMT 欠損 K562 及び U937 細胞	テモゾロミド 1.2 ~ 39 μ g/mL (<i>in vitro</i>)	いずれの細胞も MGMT の遺伝子導入により, MGMT 活性が増加し, テモゾロミドに対する感受性が低下した	27	—	4.2.1.1.10
MGMT 活性に及ぼす影響	SW480, HCT116 及び HCT15 細胞	テモゾロミド 9.7 ~ 233 μ g/mL O ⁶ -BG 0.5 ~ 10 μ M (<i>in vitro</i>)	テモゾロミド及び O ⁶ -BG はいずれの細胞の MGMT 活性も低下させた	28	—	4.2.1.1.11
	各種腫瘍細胞皮下移植ヌードマウス MIA PaCa-2, CFPAC-1, PANC-1 及び BxPC-3 細胞	テモゾロミド 340 mg/m ² O ⁶ -BG 160 mg/m ² (腹腔内)	各腫瘍細胞の MGMT 活性はテモゾロミド及び O ⁶ -BG 投与後速やかに低下し, 投与後 24 時間までほとんど回復しなかった	29	—	4.2.1.1.12
MMR の関与	MMR 野生型 SW480 及び HCT116 + Ch3, 変異 HCT15 及び HCT116 細胞	テモゾロミド BCNU (<i>in vitro</i>)	テモゾロミドの IC ₅₀ 値 MMR 野生型; 32, 68 μ g/mL MMR 変異; 170, 311 μ g/mL HCT116 細胞は hMLH1 導入により感受性が約 5 倍増加 (170 → 32 μ g/mL). BCNU では MMR の有無にかかわらず, 細胞増殖抑制作用を示した	30	—	4.2.1.1.11
細胞周期に及ぼす影響及びアポトーシスの誘導	MMR 野生型 TK6 及び欠損 MT1 細胞	テモゾロミド 0.61 ~ 9.7 μ g/mL (<i>in vitro</i>)	テモゾロミドの細胞増殖抑制作用 TK6 細胞; 増殖抑制 MT1 細胞; 作用なし	31	—	4.2.1.1.13
		テモゾロミド 2.4 μ g/mL (<i>in vitro</i>)	細胞周期/アポトーシス誘導 TK6 細胞; 処理 48 時間後に G ₂ /M 期停止及びアポトーシスを誘導 MT1 細胞; 作用なし			
ニトロソウレア系抗腫瘍薬耐性細胞における作用機序 アポトーシス誘導	CEM-S 及び CEM-R 細胞	テモゾロミド 0.19 ~ 194 μ g/mL (<i>in vitro</i>)	テモゾロミドは CEM-S 及び CEM-R 細胞に対してアポトーシスを誘導し, その誘導能は CEM-R 細胞で強く認められた. 194 μ g/mL の添加 24 時間後に CEM-R 細胞において核の断片化等のアポトーシス様形態が確認された	32	—	4.2.1.1.5
DNA 除去修復の誘導 (コマットアッセイ)	CEM-S 及び CEM-R 細胞	テモゾロミド 0.19 ~ 19 μ g/mL (<i>in vitro</i>)	テモゾロミド処理終了直後に DNA 単鎖切断量は最大となり, 4 時間以内に修復過程は完了した	34		
薬物感受性関連遺伝子の発現	CEM-S 及び CEM-R 細胞	(<i>in vitro</i>)	各 mRNA 発現量 MGMT; CEM-R 細胞で発現誘導 GST π ; 両細胞間で差なし	35		
MMR 遺伝子の発現	CEM-S 及び CEM-R 細胞	(<i>in vitro</i>)	hMLH1 及び hMSH2 の mRNA 発現量 CEM-R 細胞で増加 (CEM-S 細胞に対する相対値: 1.79 及び 1.97)	36		

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当する試験を実施しなかった。

2.6.3.4 安全性薬理試験 (1 of 2)

被験物質：テモゾロミド

試験項目	動物種 / 系統, 細胞	投与方法	投与量 (mg/m ² , μg/mL)	性別 (n/群)	特記すべき所見	GLP 適用	2.6.2 Page	報告書 番号	記載箇所 Sec.
中枢神経系 一般症状	ラット /SD	経口	25, 50, 100, 150, 200 1 クール ^a	F/M (60) °	50 mg/m ² 以上で体重増加抑制. 200 mg/m ² で摂餌量減少. 200 mg/m ² で休薬期間中に 1 例死亡. 25 及び 200 mg/m ² で休薬期間中の採血時に各 1 例死亡	適	37	P002*	4.2.1.3.1
	ラット /SD	経口	200, 400, 600/800 ^b 1 クール ^a	F/M (60) °	休薬期間中に 200 mg/m ² 以上で粗毛, 体重増加抑制, 400 mg/m ² 以上で全身蒼白化, 自発運動低下, るい瘦, 糞便量減少, 円背位, 摂餌量減少. 休薬期間中に 200 及び 400 mg/m ² でそれぞれ 1 及び 18 例, 600 及び 800 mg/m ² で各 15 例全例が死亡又は全身状態悪化のため切迫屠殺	適	37	P003*	4.2.1.3.2
	イヌ	経口	25, 50, 125 1 クール ^a	F/M (14) °	50 mg/m ² で投与開始 3 及び 5 日目に, 125 mg/m ² で 1 ~ 3 日目に嘔吐. 休薬期間中に 50 mg/m ² 以上で歯肉蒼白化, 125 mg/m ² で体温上昇. 125 mg/m ² の 1 例で 1 日目に嘔吐, 休薬期間中に体温上昇, 流涎, 自発運動低下がみられ, 全身状態悪化のため切迫屠殺	適	37	P004*	4.2.1.3.3
	イヌ	経口	200, 500, 1000 1 クール ^a	F/M (14) °	200 mg/m ² 以上で投与開始 1 日目より嘔吐. 200 mg/m ² 以上で休薬期間中に自発運動低下, 下痢, 拒食, 体重減少, 摂餌量減少, 体温上昇, 脱水, 糞便量減少 / 無便, 便変色. 休薬期間中に 200 mg/m ² 以上で各 8 例全例が死亡又は全身状態悪化のため切迫屠殺	適	38	P005*	4.2.1.3.4
心血管系 血圧, 心電図	無麻酔イヌ	経口	25, 50, 125 1 クール ^a	F/M (14) °	作用なし	適	38	P004*	4.2.1.3.3
	無麻酔イヌ	経口	200, 500, 1000 1 クール ^a	F/M (14) °	作用なし	適	38	P005*	4.2.1.3.4
呼吸系	無麻酔イヌ	経口	25, 50, 125 1 クール ^a	F/M (14) °	作用なし	適	38	P004*	4.2.1.3.3
	無麻酔イヌ	経口	200, 500, 1000 1 クール ^a	F/M (14) °	作用なし	適	39	P005*	4.2.1.3.4
腎 / 泌尿器系	ラット /SD	経口	25, 50, 100, 150, 200 1 クール ^a	F/M (60) °	作用なし	適	39	P002*	4.2.1.3.1
	ラット /SD	経口	200, 400, 600/800 ^b 1 クール ^a	F/M (60) °	400 mg/m ² 以上で投与開始 4 ~ 5 日目に尿量増加, 浸透圧及び電解質減少	適	39	P003*	4.2.1.3.2
	イヌ	経口	25, 50, 125 1 クール ^a	F/M (14) °	作用なし	適	39	P004*	4.2.1.3.3
	イヌ	経口	200, 500, 1000 1 クール ^a	F/M (14) °	作用なし	適	39	P005*	4.2.1.3.4

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.3.4 安全性薬理試験 (2 of 2)

被験物質：テモゾロミド

試験項目	動物種/系統, 細胞	投与方法	投与量 (mg/m ² , μg/mL)	性別 (n/群)	特記すべき所見	GLP 適用	2.6.2 Page	報告書 番号	記載箇所 Sec.
胃腸管系 胃潰瘍形成	ラット/SD	経口	200	M (6)	作用なし	不適	40	P006*	4.2.1.3.5
			インドメタシン 10 mg/kg	M (6)	全例に胃潰瘍形成				
胃内容物排出能	ラット/SD	胃内	200	M (6)	47% 抑制				
			アトロピン 10 mg/kg	M (6)	83% 抑制				
小腸炭末輸送能	ラット/SD	経口	200	M (6)	作用なし				
			アトロピン 10 mg/kg	M (6)	50% 抑制				
造血器系及び免疫系 血液学的検査 及び骨髓検査	ラット/SD	経口	25, 50, 100, 150, 200 1 クール ^a	F/M (60) ^c	投与開始 5 又は 15 日目に 25 mg/m ² 以上で好中球減少, 50 mg/m ² 以上で網赤血球, 白血球, リンパ球及び血小板減少, 100 mg/m ² 以上で赤血球減少. 6 日目に 100 mg/m ² 以上で顆粒球/赤芽球比増加	適	40	P002*	4.2.1.3.1
	ラット/SD	経口	200, 400, 600/800 ^b 1 クール ^a	F/M (60) ^c	200 mg/m ² 以上で赤血球, Hb, Ht, 白血球, リンパ球, 好中球, 好酸球及び血小板減少, 400 mg/m ² 以上で単球減少	適	41	P003*	4.2.1.3.2
	イヌ	経口	25, 50, 125 1 クール ^a	F/M (14) ^c	50 mg/m ² 以上で投与開始 4 日目にリンパ球減少, 125 mg/m ² で概ね 4 ~ 12 日目に白血球及び好中球減少, 16 及び 18 日目に白血球及び好中球増加, 8 ~ 18 日目に血小板減少	適	41	P004*	4.2.1.3.3
	イヌ	経口	200, 500, 1000 1 クール ^a	F/M (14) ^c	200 mg/m ² 以上で投与開始 2 日目に白血球, リンパ球及び好中球減少, 13 日目に 200 mg/m ² で血小板, 赤血球, Hb 及び Ht 減少	適	41	P005*	4.2.1.3.4
骨髓細胞の コロニー形成	ヒト骨髓 単核細胞	<i>In vitro</i>	0.97 ~ 11	(8)	顆粒球・マクロファージコロニーの形成を 37% 抑制する濃度は 8 例中 6 例では 3.5 ~ 8.9 μg/mL, 残り 2 例では 11 μg/mL 以上	不適	41	—	4.2.1.3.6
免疫細胞の機能	ヒト末梢血 単核細胞	<i>In vitro</i>	12 ~ 97	(3)	各機能に対する IC ₅₀ 値 IL-2 に対する増殖応答; 約 33 ~ 約 78 μg/mL NK 活性; 約 78 μg/mL LAK 活性; 約 14 ~ 約 78 μg/mL 付着細胞の CD1b 発現; 作用なし	不適	42	—	4.2.1.3.7

^a: 5 日間投与, 23 日間休業 (1 クール) し, 投与期間終了翌日 (6 日目) に雌雄各 15 例 (ラット) 又は各 3 例 (イヌ) を剖検のため屠殺した.

^b: 雌には 200, 400, 600 mg/m², 雄には 200, 400, 800 mg/m² を投与した.

^c: 雌雄各 30 例 (ラット) 又は各 7 例 (イヌ)

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験を実施しなかった.

* 新薬承認情報提供時に置き換えた