目次

2.4 非臨床試験の概括評価 4
2.4.1 非臨床試験計画概略 4
2.4.2 薬理試験 6
2.4.2.1 主薬効薬理 6
2.4.2.2 副次的薬理 7
2.4.2.3 安全性薬理 8
2.4.3 薬物動態試験 8
2.4.3.1 分析法 8
2.4.3.2 吸収 8
2.4.3.3 分布 9
2.4.3.4 代謝 10
2.4.3.5 排泄 12
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 13
2.4.3.7 その他の薬物動態試験 13
2.4.4 毒性試験 14
2.4.4.1 単回投与毒性試験 15
2.4.4.2 反復投与毒性試験 15
2.4.4.3 遺伝毒性試験 17
2.4.4.4 生殖発生毒性試験 17
2.4.4.5 光毒性試験 18
2.4.4.6 毒性発現機序に関する試験 18
2.4.4.7 不純物に関する毒性試験 19
2.4.5 総括及び結論 19
2.4.6 参考文献一覧 27

非臨床試験の概括評価の略号一覧表

略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
α1-AGP	α1-acid glycoprotein	α1-酸性糖タンパク
$AUC_{(0\text{-}t)}$	AUC from zero time to time of last quantifiable concentration	投与時から定量が可能であった最終採血時間（t）までの濃度-時間曲線下面積
BID	twice daily	1 日 2 回
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性タンパク
BSEP	bile salt export pump	胆汁酸移送ポンプ
BWL	body weight loss	体重減少
C_{max}	maximum observed concentration	最高濃度
CL	total plasma clearance	（血漿中濃度基準の）全身クリアランス
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450
DDI	drug-drug interaction	薬物間相互作用，薬物動態学的薬物相互作用
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma	びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫
EC_{50}	50% effective concentration, concentration causing half maximal effect	最大効果の 50%の効果をもたらす濃度
eq.	equivalent	当量
E_{max}	maximum induction effect	最大誘導作用
F	absolute bioavailability	絶対的バイオアベイラビリティ
FL	follicular lymphoma	濾胞性リンパ腫
FOB	functional observational battery	機能観察バッテリー
GCB	germinal center B-cell-like	胚中心 B 細胞様
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
H3K4	histone H3 lysine 4	ヒストン H3 の 4 番目のリジン残基
H3K27me3	trimethylated histone H3K27	トリメチル化 H3K27
HEK	human embryonic kidney cells	ヒト胎児腎臓
hERG	human ether à-go-go-related gene	ヒト ether à-go-go 関連遺伝子
HG	human γ-globulin	ヒト γ-グロブリン
HMT	histone methyltransferase	ヒストンメチル基転移酵素
HSA	human serum albumin	ヒト血清アルブミン
IC_{50}	half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
K_I	inhibitor concentration causing half-maximal inactivation	50%不活性化濃度
K_i	inhibition constant	阻害定数
k_{inact}	maximal inactivation rate constant	最大不活性化速度定数
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析
LE	Long-Evans	―
LSC	liquid scintillation counter	液体シンチレーションカウンター
MATE	multidrug and toxin extrusion	多剤・毒性化合物排出

略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
mRNA	messenger RNA	メッセンジャーRNA
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
NZW	New Zealand white	（ウサギの系統名）
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
P-gp	P-glycoprotein	P 糖タンパク
PK	pharmacokinetic, pharmacokinetics	薬物速度論，薬物動態，ファーマコキネティクス
R	ratio of victim AUC in the presence and absence of perpetrators (inhibitors or inducers), predicted with basic models	基本モデルで予測された相互作用薬（阻害薬又は誘導薬）の存在下又は非存在下での被相互作用薬の AUC の比率
PRC2	polycomb repressive complex 2	ポリコーム抑制複合体 2
RaLV	rat leukemia virus	ラット白血病ウイルス
R_B	blood to plasma concentration ratio	血液／血漿中濃度比
rCYP	recombinant human cytochrome P450	遺伝子組み換えヒトチトクローム P450
SAM	S-adenosylmethionine	S-アデノシルメチオニン
SCCOHT	small cell carcinoma of the ovary hypercalcemic type	高カルシウム血症型卵巣小細胞癌
SD	Sprague Dawley	－（ラット系統名）
SET	su(var)3-9, enhancer of zeste, trithorax	－
SWI/SNF	switch/sucrose nonfermentable	－
T-ALL	T-cell acute lymphoblastic leukemia	T 細胞急性リンパ芽球性白血病
TGI	tumor growth inhibition	腫瘍増殖抑制
TK	toxicokinetic, toxicokinetics	トキシコキネティクス
T-LBL	T-cell lymphoblastic lymphoma	T 細胞リンパ芽球性リンパ腫
t_{max}	time at which the highest drug concentration occurs	最高濃度到達時間
$t_{1/2}$	terminal elimination phase half-life	最終消失半減期
V_{ss}	volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積

－は該当なしを示す。

2.4 非臨床試験の概括評価

タゼメトスタットは，ヒストンメチル基転移酵素（HMT）の一種，EZH2 に対する選択的かつ可逆的な低分子阻害薬である。標的分子 EZH2 はポリコーム抑制複合体 2（PRC2）の活性サブユニットとして，ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基（H3K27）を特異的にメチル化（モノメチル化，ジメチル化及びトリメチル化）し，ヒストンによる様々な遺伝子のエピジェネティクス制御に関わっている。EZH2 の特定領域における遺伝子変異，あるいは EZH2 の抑制因子（INI1，SMARCA2，SMARCA4 等）の機能不全により EZH2 の活性制御が外れると H3K27 のメチル化が亢進し，濾胞性リンパ腫（FL），びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫（DLBCL）等の B 細胞性リンパ腫をはじめ，悪性ラブドイド腫瘍，滑膜肉腫，高カルシウム血症型卵巣小細胞癌（SCCOHT）を含む様々ながん腫の発症や悪性化を誘引する。FL 及び DLBCL では，EZH2 の su(var)3-9, enhancer of zeste, trithorax（SET）ドメイン領域（Y646 等）に変異があり，EZH2 のトリメチル化活性の亢進により高レベルのトリメチル化 H3K27（H3K27me3）が生成されて，変異 EZH2 に依存した腫瘍増殖をおこすことが知られている（Morin, et al., 2010; Sneeringer, et al., 2010）。本薬は EZH2 に対するファーストインクラスの低分子阻害薬であり，FL に対する有効な治療法を提供できると期待される。

2.4.1 非臨床試験計画概略

タゼメトスタットの非臨床薬理試験は，タゼメトスタット塩酸塩あるいはタゼメトスタット臭化水素酸塩を用いて実施されたが，本章では特に断らない限り，両者を含めてタゼメトスタット，あるいは本薬と記載する。

本薬の非臨床薬理試験は，ヒト FL で *EZH2* 変異を有する細胞株は知られていないことから，ヒト B 細胞性リンパ腫としてヒト胚中心 B 細胞（GCB）型 DLBCL の細胞株を用いた。GCB 型 DLBCL は，FL と同様に，リンパ節濾胞の胚中心芽細胞及び胚中心細胞を由来とする B 細胞性リンパ腫であり，高頻度の *EZH2* 変異が報告され，*EZH2* 変異を有する細胞株は変異 EZH2 に依存した増殖を起こすことが知られている（Morin, et al., 2010; Sneeringer, et al., 2010; Yap, et al., 2011; Bodor, et al., 2013）。

In vitro 試験として，野生型 EZH2，変異型 EZH2 を含む各種 HMT に対する本薬の阻害活性を評価した。また，各種細胞株核内 H3K27 のメチル化レベル等に対する影響を評価した。*EZH2* 変異を有する各種 DLBCL 細胞株，また EHZ2 の活性亢進が考えられる各種ヒトがん細胞株の細胞増殖に対する本薬の阻害作用を評価した。

In vivo 試験として，*EZH2* 変異を有する各種ヒト DLBCL 細胞株，及び *EZH2* が野生型である DLBCL 細胞株のマウス移植モデルにおける本薬の抗腫瘍効果を評価した。*EZH2* 変異を有する各種ヒト DLBCL 細胞株移植モデルにおいては，本薬の抗腫瘍効果と本薬の腫瘍内レベル及び腫瘍内 H3K27me3 の低下との対応を確認した。また，本薬と DLBCL の治療に使用される化学療法レジメンとの併用による抗腫瘍効果も評価した。

副次的薬理試験として，受容体，トランスポーター及びイオンチャネルからなる 80 種類の分子パネルのリガンド結合に対する本薬の影響を，標識リガンド結合アッセイで評価した。また，40 種類のキナーゼの酵素活性に対する本薬の影響を評価した。非腫瘍組織（ラット及びカニクイザルの末梢血単核球，骨髄，脾及び皮膚）における細胞内 H3K27me3 レベルに対する本薬の

作用を評価した。

本薬の心血管系に及ぼす影響について，ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）導入ヒト胎児腎臓（HEK）293 細胞を用いた電気生理学的 in vitro 試験，ウサギ心室ウェッジ標本を用いた電気生理学的 ex vivo 試験，テレメトリー送信機を埋め込んだ覚醒サルの単回経口投与試験を行った。中枢神経系及び呼吸器系に及ぼす影響については，サル反復経口投与毒性試験に組み込み検査を実施した。

タゼメトスタットの薬物動態（PK）試験で用いた動物種（系統）は，マウス（CD-1），ラット（Sprague Dawley［SD］），ウサギ（New Zealand white［NZW］）及びサル（カニクイ）であった。ラット（SD）及びサル（カニクイ）は薬理試験及び毒性試験で用いられている動物種（系統）であり，ウサギ（NZW）は胚・胎児発生毒性試験で用いられている動物種（系統）であった。反復投与時の PK は，ラット（SD）及びサル（カニクイ）での毒性試験時のトキシコキネティクス（TK）の結果を利用した。白色ラット（SD），有色ラット（Long-Evans［LE］）又はサル（カニクイ）の吸収，分布，代謝又は排泄は，^{14}C 標識-タゼメトスタット（[^{14}C]タゼメトスタット）を用いて評価した。血漿タンパク結合率及び血球移行性は，in vitro で評価した。代謝については，肝細胞，遺伝子組換えヒトチトクローム P450（rCYP）又は肝ミクロソームを用いた in vitro 試験系により評価した。チトクローム P450（CYP）誘導及び阻害作用は，それぞれヒト肝細胞及びヒト肝ミクロソームを用いて評価した。トランスポーターに対する基質認識性及び阻害作用は，トランスポーター発現細胞又は膜小胞を用いて評価した。

PK 試験には，被験物質として非標識タゼメトスタットあるいは[^{14}C]タゼメトスタットを用いた。PK 試験のタゼメトスタットの投与量はタゼメトスタット臭化水素酸塩としての量を示し，濃度はタゼメトスタットフリー体として表示した。[^{14}C]タゼメトスタット臭化水素酸塩を投与した試験での投与量はタゼメトスタットフリー体換算量を示し，放射能濃度はタゼメトスタットフリー体当量（μg eq./mL or g）として表示した。非標識のタゼメトスタットを用いた場合には，血漿中薬物濃度の定量には液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析（LC-MS/MS）を用いた。[^{14}C]タゼメトスタットを用いた場合には，放射能濃度の測定には外部標準線源法による液体シンチレーションカウンター（LSC）あるいは定量的全身オートラジオグラフィーを用いた。

タゼメトスタットの毒性を評価するため，ラット及びカニクイザルを用いた経口投与による単回及び反復投与毒性試験（いずれの動物種も 13 週まで），2 種の in vitro 遺伝毒性試験（復帰突然変異試験及び小核試験）及び in vivo のラット小核試験を実施した。また，ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験，幼若ラット毒性試験，in vitro 光毒性試験も実施した。さらに，ラットにおける 13 週間反復投与毒性試験でみられた T 細胞リンパ芽球性リンパ腫（T-LBL）の発現機序に関する一連の検討試験，並びに新規不純物を含むロットの毒性試験を実施した。

医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）非適用の復帰突然変異試験，ラット単回投与毒性試験，ラット 7 日間用量設定毒性試験はタゼメトスタット塩酸塩を用いて行われた。その他の毒性試験は，臨床で使用されたタゼメトスタット臭化水素酸塩を用いて行われた。タゼメトスタット塩酸塩及び臭化水素酸塩は生殖発生毒性試験を除き，いずれも塩を含んだ被験物質としての投与量を表示しており，フリー体としての投与量はそれぞれ 0.8396 及び 0.8762 を乗じることにより計算される。例えば，タゼメトスタット臭化水素酸塩の 1000 mg/kg は，タゼメトスタットフリー体として約 876 mg/kg に相当する。

マウス，ラット，イヌ，サル及びヒトの肝ミクロソーム及び肝細胞を用いて代謝プロファイルを比較した結果，SD ラット及びカニクイザルは毒性試験に使用する動物種として適切であると考えられた。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 主薬効薬理

タゼメトスタットは無細胞系において，野生型及び変異型 EZH2 を IC_{50} 値 2～38 nmol/L で阻害し，野生型 EZH2 に対する阻害は EZH1 に対する阻害と比較して 36 倍，またその他の HMT に対する阻害と比較して 3000 倍以上強かった。タゼメトスタットは各種細胞株のヒストンにおいて特異的にメチル化 H3K27 のレベルを減少させた。タゼメトスタットは *EZH2* 変異を有する各種ヒト DLBCL 細胞株，*INI1* が欠損あるいは INI1 がタンパク質として不安定化した各種ヒト悪性軟部腫瘍細胞株，また *SMARCA2* 及び *SMARCA4* をともに欠損しているヒト SCCOHT 細胞株の細胞増殖を強力に阻害した。細胞増殖阻害の機序は，細胞周期の G1 期停止とそれに続くアポトーシス誘導であり，G1 期停止の時期（培養 4 日～7 日）は細胞内 H3K27me3 が消失する時期と対応していた。

EZH2 変異を有するヒト DLBCL 細胞株及び *EZH2* が野生型であるヒト DLBCL 細胞株を用いたマウス移植モデルにおいて，タゼメトスタットの抗腫瘍効果を評価した（表 2.4.2-1）。*EZH2* 変異を有するヒト DLBCL 細胞株移植モデルにおいて，タゼメトスタットの 1 日 2 回あるいは 3 回，28 日等の経口投与は 34.2 から 532 mg/kg（臭化水素酸塩）の用量において腫瘍内 H3K27me3 レベルを低下させるとともに腫瘍増殖抑制（TGI）から腫瘍縮小に至る抗腫瘍効果を示した。*EZH2* が野生型であるヒト DLBCL 細胞株移植モデルにおいて，タゼメトスタット（571 mg/kg，臭化水素酸塩）の 1 日 2 回，17～28 日間の経口投与は，腫瘍縮小は示さないものの有意な TGI を示した。タゼメトスタットと DLBCL の治療に使用される化学療法レジメンとの併用は，それぞれの単独投与より優れた抗腫瘍効果を発揮した。以上の各種ヒト腫瘍移植モデルにおいて，タゼメトスタット単剤の投与群でマウスの体重減少（BWL）はほとんどないあるいは 10%以下であった。

表 2.4.2-1 ヒト DLBCL 細胞株移植モデル

移植モデル（*EZH2* 遺伝子）	マウス	用量，投与スケジュール	腫瘍増殖阻害	試験番号
WSU-DLCL2（Y646F 変異）	SCID 雌 12 匹/群	タゼメトスタット[a] 40, 80, 160 mg/kg (TID×28)	160 mg/kg で TGI	E7438-PD001
KARPASS-422（Y646N 変異）	無胸腺雌 9 匹/群	タゼメトスタット[a] 80.5, 161, 322, 644 mg/kg (BID×28)	80.5 mg/kg で TGI，161 mg/kg 以上で腫瘍縮小，644 mg/kg は最大耐量を超える用量	M[redacted]024
	無胸腺雌 8～9 匹/群	タゼメトスタット[b] 90, 361 mg/kg (BID×28, [BID×7/2W]×2, BID×21/4W)	3 種のスケジュールとも，90 mg/kg で TGI，361 mg/kg で腫瘍縮小	M[redacted]002
	無胸腺雌 6 匹/群	タゼメトスタット[b] 75, 150, 301, 602 mg/kg (BID×7), 150, 301, 602, 1203 mg/kg (QD×7)	（腫瘍内 H3K27me3 解析のみ）	W-20[redacted]0483

移植モデル（*EZH2* 遺伝子）	マウス	用量，投与スケジュール	腫瘍増殖阻害	試験番号
Pfeiffer（A682G 変異）	NOD-SCIDγ 雌 9 匹/群	タゼメトスタット[b] 34.2, 114, 342 mg/kg (QD×28), 1140 mg/kg (QD×12)	34.2 mg/kg で TGI，114 mg/kg 以上で腫瘍縮小，1140 mg/kg は最大耐量を超える用量	PPC-20[redacted]-03N
OCI-Ly19（野生型）	SCID 雌 8 匹/群	タゼメトスタット[b] 143, 571 mg/kg (BID×20)	全ての用量で TGI	CPB-P[redacted]-5184-OCI-Ly19
Toledo（野生型）		タゼメトスタット[b] 143, 571 mg/kg (BID×28)	571 mg/kg で TGI	CPB-P[redacted]-5184-Toledo
MC116（野生型）		タゼメトスタット[b] 143, 571 mg/kg (BID×17)	571 mg/kg で TGI	CPB-P[redacted]-5184-MC116
WSU-DLCL2（Y646F 変異）	SCID 雌 12 匹/群	タゼメトスタット[a] 160 mg/kg (TID×28) 239, 319 mg/kg (BID×28) 638 mg/kg (QD×28) CHOP レジメン[c]	タゼメトスタット単独では全て TGI，239 mg/kg(BID×28)と CHOP の併用はそれぞれの単独よりも有意に強い TGI,	E7438-PD001
SUDHL10（Y646F 変異）	SCID 雌 16 匹/群	タゼメトスタット[b] 133, 266, 532 mg/kg (BID×28) COP レジメン[d]	タゼメトスタット単独では 266 mg/kg 以上で腫瘍縮小。266 mg/kg(BID×28)と COP の併用はそれぞれの単独よりも有意に強い腫瘍縮小	E7438-PD002

タゼメトスタットは全て経口で投与した。用量（mg/kg）は塩形の用量として記載した。
BID = 1 日 2 回，IP = 腹腔内，IV = 静脈内，PO = 経口，QD = 1 日 1 回，SCID = 重症複合免疫不全症，TGI = 腫瘍増殖抑制，TID = 1 日 3 回.
a: タゼメトスタット塩酸塩
b: タゼメトスタット臭化水素酸塩
c: シクロホスファミド(30 mg/kg IP)，ドキソルビシン(2.475 mg/kg IV)，ビンクリスチン(0.375 mg/kg IV)をそれぞれ Day 1 と Day 22，プレドニゾン(0.15 mg/kg PO)を Day1 から及び Day22 から 1 日 1 回 5 日間
d: 上記レジメンよりドキソルビシンを除いたレジメン

2.4.2.2 副次的薬理

各種受容体，トランスポーター及びイオンチャネルからなる 80 種の分子パネルのリガンド結合に対するタゼメトスタット（10 μmol/L）の作用を標識リガンド結合アッセイで検討した。その結果，79 種の各種受容体，トランスポーター及びイオンチャネルでは各々のリガンド結合に対する有意な（50%を超える）阻害あるいは促進は認められなかった。タゼメトスタットは，ムスカリン性アセチルコリン受容体 M4 とそのリガンドとの結合を IC_{50} 値 4.6 μmol/L で阻害したが，同受容体の細胞機能アッセイではアゴニスト作用，アンタゴニスト作用のいずれも示さなかった。また，タゼメトスタット（10 μmol/L）は 40 種類のヒトキナーゼ（セリン・スレオニンキナーゼ及びチロシンキナーゼを含む）パネルにおいて，いずれの酵素活性に対しても有意な阻害を示さなかった。

タゼメトスタットは，ラット及びカニクイザルの末梢血単核球，骨髄，脾及び皮膚における H3K27 のメチル化を用量依存的に阻害した。特に骨髄で最も強力であった。ラットにおいて皮膚における H3K27 のメチル化は 1 日 1 回 7 日間投与では観測されず，1 日 1 回 22～28 日間投与

で有意に阻害された。

2.4.2.3 安全性薬理

心血管系に及ぼす影響については，hERG を発現させた HEK293 細胞を用いた電気生理学的 in vitro 試験，ウサギ左心室ウェッジ標本を用いた電気生理学的 ex vivo 試験及びテレメトリー送信器を埋め込んだ覚醒サルを用いた単回経口投与試験を実施した。中枢神経系及び呼吸器系に及ぼす影響については，サルを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験に組み込んで検査した。

タゼメトスタット塩酸塩の 10 µmol/L は hERG チャネル発現細胞における hERG カリウム電流を 15.1%阻害した。ウサギ左心室ウェッジ標本において，タゼメトスタット塩酸塩の 20 µmol/L まで QRS 時間には影響しなかったが，20 µmol/L で QT 間隔は短縮し，7 及び 20 µmol/L で Tp-e 間隔は短縮した。しかし，どの濃度でも不整脈性事象の発生は認められなかった。覚醒サルにおいて，最高投与量の 1000 mg/kg（タゼメトスタット臭化水素酸塩として）まで心血管パラメータ（心拍数，平均血圧及び心電図）への影響は認められなかった。サル反復経口投与毒性試験の第 7 日に実施された神経学的機能検査において，タゼメトスタット臭化水素酸塩の 300 mg/kg まで影響は認められず，最高用量の 1000 mg/kg では両側後肢の筋緊張低下がみられたが，これは一般状態悪化の影響と考えられた。同試験の第 6 日に実施された呼吸機能測定において，1000 mg/kg まで呼吸機能（呼吸数及び 1 回換気量）への影響はみられなかった。

これらの結果から，心血管系，中枢神経系及び呼吸器系に対するリスクは認められなかった。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 分析法

ラット（SD），ウサギ（NZW）及びサル（カニクイ）血漿試料中タゼメトスタット及び代謝物（EPZ-6930）の定量のため，LC-MS/MS 法による定量法のバリデーションを行った。いずれの動物種においても，条件を満たす検量線，直線性，回収率，真度及び精度が得られた。血漿中タゼメトスタット及び EPZ-6930 の定量下限値は 1 ng/mL であった（2.6.4.2 項参照）。

2.4.3.2 吸収

タゼメトスタット臭化水素酸塩を雄 CD-1 マウスに 10 mg/kg で単回静脈内投与したときの血漿中タゼメトスタット濃度は，最終消失半減期（$t_{1/2}$）が 1.4 時間で消失し，全身クリアランス（CL）及び定常状態における分布容積（V_{ss}）は 1.36 L/h/kg 及び 1.10 L/kg であった。投与量 10 mg/kg における絶対的バイオアベイラビリティ（F）は 38.3%であった。マウスにおいてタゼメトスタットは中程度のクリアランス及び中程度の分布容積を有し，検討した経口投与量範囲内（10～100 mg/kg）において最高濃度（C_{max}）及び暴露量が投与量比を下回る増加を示す非線形の PK プロファイルであった。

タゼメトスタット臭化水素酸塩を雄 SD ラットに 5 mg/kg で単回静脈内投与したときの血漿中タゼメトスタット濃度は，$t_{1/2}$ が 0.4 時間で消失し，CL 及び V_{ss} は 3.49 L/h/kg 及び 1.80 L/kg であった。投与量 5 mg/kg における F は 3.2%であった。ラットにおいてタゼメトスタットは高クリアランス及び中程度の分布容積を有し，検討した経口投与量範囲内（5～100 mg/kg）において C_{max} 及び暴露量が投与量比を上回る増加を示す非線形の PK プロファイルであった。また，単回

静脈内投与及び単回経口投与における尿中排泄の検討から，タゼメトスタットのラットでの腎クリアランスは低いことが示唆され，単回静脈内投与における胆汁排泄の検討から，タゼメトスタットのラットでの胆汁排泄クリアランスも低いことが示唆された。

タゼメトスタット臭化水素酸塩を雄カニクイザルに 3.09 mg/kg で単回静脈内投与したときの血漿中タゼメトスタット濃度は，$t_{1/2}$ が 1.6 時間で消失し，CL 及び V_{ss} は 1.39 L/h/kg 及び 2.04 L/kg であった。投与量 5 mg/kg における F は 1.9%であった。サルにおいてタゼメトスタットは中程度のクリアランス及び中程度の分布容積を有し，検討した経口投与量範囲内（5～100 mg/kg）において C_{max} 及び暴露量が投与量比を上回る増加を示す非線形の PK プロファイルであった。サルにおけるタゼメトスタットの食餌効果を単回経口投与（30 mg/kg）において検討した結果，摂食下投与での C_{max} 及び暴露量は絶食下投与のそれらに対して，それぞれ 10 分の 1 及び 5 分の 1 程度の低い値であり，相対バイオアベイラビリティとして 20%程度の食餌効果が示唆された（以上，2.6.4.3.1 及び 2.6.4.6.1 項参照）。

雄 SD ラットに[^{14}C]タゼメトスタット臭化水素酸塩（50 mg/kg［フリー体換算量］）を単回経口投与後の血漿中放射能濃度の最高濃度到達時間（t_{max}）及び C_{max} は，それぞれ 1 時間及び 11.656 µg eq./mL で，速やかな吸収であった。血漿中放射能濃度は速やかに消失し，$t_{1/2}$ は 0.948 時間であった。雌雄カニクイザルに[^{14}C]タゼメトスタット臭化水素酸塩（50 mg/kg［フリー体換算量］）を単回経口投与後の血漿中放射能濃度の t_{max} 及び C_{max} は，雄でそれぞれ 2 時間及び 12.653 µg eq./g，雌でそれぞれ 2 時間及び 11.512 µg eq./g であり，速やかな吸収であった（以上，2.6.4.3.2 項参照）。

雌雄 SD ラットにタゼメトスタット臭化水素酸塩を 1 日 1 回 4 週間経口投与（投与量 100～1000 mg/kg）したとき，タゼメトスタットの暴露量には総じて性差が認められ（雌＞雄），雌雄ともに概ね投与量比を上回る増加を示した。4 週間の反復投与において，雄の暴露量に蓄積傾向が認められた。雌雄 SD ラットにタゼメトスタット臭化水素酸塩を 1 日 1 回 13 週間経口投与（投与量 100～600 mg/kg）したときのタゼメトスタットの雌の暴露量は総じて雄の暴露量を上回り，一方，EPZ-6930（*N*-脱エチル化体）の雌の暴露量は雄の暴露量より低かった。タゼメトスタット及び EPZ-6930 の暴露量は雌雄ともに概ね投与量比を上回る増加を示し，13 週間の反復投与において，雄のタゼメトスタット暴露量及び雌の EPZ-6930 暴露量に蓄積傾向が認められた（2.6.4.3.3 項参照）。

雌雄カニクイザルにタゼメトスタット臭化水素酸塩を 1 日 2 回 4 週間経口投与（1 日投与量 100～1000 mg/kg）したとき，タゼメトスタットの暴露は投与量比以上に上昇し，投与初日に比べて投与 28 日目の暴露が 1/3～1/5 の値であった。また，投与初日と 28 日目のいずれにおいても顕著な性差はなかった。雌雄カニクイザルにタゼメトスタット臭化水素酸塩を 1 日 2 回 13 週間経口投与（1 日投与量 100～600 mg/kg）したときのタゼメトスタットの暴露量は雌雄ともに概ね投与量に比例して増加した。また，雌雄ともに総じて EPZ-6930 の暴露量はタゼメトスタットの暴露量に比べて高かった。13 週間反復投与後のタゼメトスタット及び EPZ-6930 の暴露量は概ね投与初日に比べて低い値であった（2.6.4.3.4 項参照）。

2.4.3.3 分布

マウス（CD-1），ラット（SD），ウサギ（NZW），サル（カニクイ）及びヒトにおけるタゼメ

トスタット（1～30 μmol/L）の in vitro 血漿タンパク結合率を検討したところ，ウサギ：91.1%～91.9%，サル：83.3%～84.7%，ヒト：87.7%～91.1%であり，これらの動物種で濃度依存性は認められなかった。一方，マウス及びラットの血漿タンパク結合率は，マウス：91.8%～98.1%，ラット：88.8%～94.7%であり，濃度依存性が認められた。

ヒト血漿中に存在するヒト血清アルブミン（HSA），α1-酸性糖タンパク質（α1-AGP）及びヒト γ-グロブリン（HG）のうち，タゼメトスタットは HSA に対して最も強い結合を示した。

マウス（CD-1），ラット（SD），サル（カニクイ）及びヒトにおけるタゼメトスタット（添加濃度 50～50,000 ng/mL）の in vitro 血液/血漿中濃度比（R_B）は 0.53～1.06 であり，添加最高濃度（50,000 ng/mL）でやや高値を示したものの，5000 ng/mL 以下では濃度依存性を認めず，また，全般に動物種差も認められなかった（2.6.4.4.2 及び 2.6.4.4.3 項参照）。

雄 SD ラット及び雄 LE ラットに[^{14}C]タゼメトスタット臭化水素酸塩（50 mg/kg［フリー体換算量］）を単回経口投与後の放射能の組織分布について定量的全身オートラジオグラフィーで検討した。雄 SD ラットに単回経口投与後，放射能は迅速に吸収され広範に分布した。投与後 0.25～24 時間までの放射能濃度は，大半の組織で心血流中と同等かそれよりも高かった。心血流中放射能濃度は投与後 1 時間で C_{max}（7.549 μg eq./g）に到達し，投与後 72 時間で速やかに定量限界未満まで低下した。大半の組織で，放射能濃度は投与後 1 時間で C_{max} に到達し，それ以外の組織でも投与後 4 時間までに C_{max} に到達した後に低下し始めた。放射能は投与後 168 時間以内に大半の組織からほぼ消失した。大動脈，肝，腎皮質及び甲状腺では投与後 168 時間の時点で放射能濃度が検出されたが，いずれの組織でも定量限界値の約 1～4 倍の値であった。LE ラットの眼球血管膜や有色皮膚等のメラニン含有組織では SD ラットよりも放射能濃度が顕著に高く，[^{14}C]タゼメトスタット由来放射能がメラニンに対して親和性を有することが示唆された。ただし，有色組織で放射能濃度の低下が認められたことから，メラニンとの親和性は可逆的であると考えられた。SD ラット及び LE ラットにおける放射能の組織分布パターンは，メラニン含有組織を除き，類似していた（2.6.4.4.1 項参照）。

2.4.3.4 代謝

マウス，ラット，イヌ，サル及びヒトの肝ミクロソーム又は凍結肝細胞におけるタゼメトスタット代謝プロファイルの検討から，16 個（M1～M16：M 番号は当該試験の代謝物通し番号）の代謝物の生成が確認された。肝ミクロソームでは，*N*-脱エチル化体（M5［EPZ-6930］），ピリドンの酸化体（M7）及び二重酸化体（M12）が主に検出され，肝細胞では，*N*-脱エチル化体 M5，酸化及び脱水素化体（M11）並びにピリドンの *N*-脱アルキル化体（M13）が主に検出された。サル及びヒトの肝ミクロソーム及び肝細胞においては，*N*-脱エチル化体 M5 が主要代謝物であると考えられた。本 in vitro 検討においては，ヒトに特異的な代謝物は認められなかった。前述の in vitro 代謝試験以降に実施されたラット，ウサギ，サル及びヒトの凍結肝細胞におけるタゼメトスタット代謝プロファイルの検討からは 10 個（H1～H10：H 番号は当該試験の代謝物通し番号）の代謝物が検出された。その内訳は，4 個の *N*-脱アルキル化体（*N*-脱エチル化体 H1［EPZ-6930，M5］，*N*-脱テトラヒドロピラン体 H2［M6］，H3 及び H4），4 個の一酸素付加体（H5，H6，H7 及び H8），1 個のタゼメトスタットの *N*-脱エチル化及び一酸素付加体（H9［M2］）並びに 1 個の構造不明体（H10）であった。ラット，サル及びヒト肝細胞における主代謝物は *N*-脱アル

キル化体 H1（M5）及び一酸素付加体 H5 であった。本 in vitro 検討においても，ヒトに特異的な代謝物は認められなかった（2.6.4.5.1.1 項参照）。

雄 SD ラットに[^{14}C]タゼメトスタット臭化水素酸塩（50 mg/kg［フリー体換算量］）を単回経口投与後のタゼメトスタットの代謝プロファイルを検討した。ラットにおいて，[^{14}C]タゼメトスタットは広範に代謝された。循環血漿中において，未変化体は *N*-脱エチル化体 EPZ-6930（M5 あるいは H1）に比べて少量の放射性成分であった（投与後 8 時間までの血漿中総放射能の AUC に対して，それぞれ 11.56%と 62.86%）。ラットにおける主な代謝経路は *N*-脱エチル化であった。雌雄カニクイザルに[^{14}C]タゼメトスタット臭化水素酸塩（50 mg/kg［フリー体換算量］）を単回経口投与後の代謝プロファイルを検討した。サルにおいて，[^{14}C]タゼメトスタットは広範に代謝された。循環血漿中において，*N*-脱エチル化体 EPZ-6930 が主放射能成分であり，*N*-脱テトラヒドロピラン体 EPZ006931（M6 あるいは H2）と未変化体がマイナーな放射性成分であった（投与後 8 時間までの血漿中総放射能の AUC に対して，雄：それぞれ 84.1%，7.8%及び 5.0%，雌：それぞれ 81.1%，7.7%及び 8.0%）。サルにおける主な代謝経路はラットと同様 *N*-脱エチル化であった（2.6.4.5.1.2 項参照）。

タゼメトスタットを反復経口投与後の血漿中代謝物プロファイルをヒトと動物で比較した。ヒトの試料はタゼメトスタット 800 mg を 1 日 2 回（BID）反復投与（800 mg BID）したときの投与 15 日目の血漿を用い，動物の試料はラット 13 週反復毒性試験（投与量：100 mg/kg）及びサル 13 週反復毒性試験（投与量：300 mg/kg BID）で得られた投与 91 日目の血漿並びにウサギ胚・胎児反復投与毒性試験（投与量：400 mg/kg）で得られた投与 13 日目の血漿を用いた。これらヒト及び各種動物の血漿より AUC を見積もることができるようにプール血漿試料を調製後，代謝分析を行った。ヒト血漿中の主要な代謝物は *N*-脱エチル化体 EPZ-6930，*N*-脱テトラヒドロピラン体 EPZ006931 及び *N*-脱エチル化及び *N*-脱テトラヒドロピラン体 EPZ034163（H3）の 3 つであり，いずれの代謝物の暴露量も親化合物タゼメトスタットの 25%より高いと考えられた。タゼメトスタットを反復経口投与後の動物種間の代謝プロファイル比較においても，ヒト特異的な代謝物は観察されなかった（2.6.4.5.1.3 項参照）。

タゼメトスタットの酸化的代謝にかかわるチトクローム P450（CYP）を同定するため，ヒト肝ミクロソーム又は各遺伝子組み換えヒト CYP（rCYP）分子種を用いて代謝実験を行った結果，タゼメトスタットの CYP による代謝には主として CYP3A が関与していることが示された。選択的阻害剤による検討結果から，CYP3A 以外では程度は低いものの CYP2C8 及び CYP2D6 の関与が示唆された。前述の CYP 同定試験以降に実施された酸化的代謝にかかわる CYP の寄与度を算定する試験の結果，タゼメトスタットの CYP による代謝には主として CYP3A4 が関与（寄与率 99%）しており，その他に CYP2J2 及び CYP3A5 も関与していることが示唆された（いずれも寄与率 1%未満）。主要代謝物 EPZ-6930 の CYP による代謝には主として CYP3A4 が関与（寄与率 89%～92%）しており，一部 CYP2J2 も関与（寄与率 8%～11%）していることが示唆された（2.6.4.5.4 項参照）。

ヒト肝ミクロソームにおけるタゼメトスタットの各 CYP 分子種（CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6，CYP2E1 及び CYP3A）に対する阻害能を検討した。タゼメトスタットは CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19 及び CYP2D6 活性をそれぞれ 50%阻害濃度（IC_{50}）値 6.3，9.0，3.8 及び 15.5 μmol/L で阻害した。ミダゾラム 1′-水酸化，ニフェジピン脱水

素化及びテストステロン 6β-水酸化活性で評価した CYP3A に対するタゼメトスタットの IC_{50} 値は 12.7，19.4 及び 5.9 μmol/L であった。また，タゼメトスタットは時間依存的に CYP3A を阻害し（テストステロン 6β-水酸化活性での評価），50%不活性化濃度（K_I）は 6.4 μmol/L，最大不活性化速度定数（k_{inact}）は 0.077 min^{-1} であった。前述の CYP 阻害試験以降新たに試験を行い，タゼメトスタットの CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 及び CYP3A に対する阻害能を検討した。タゼメトスタットは CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 及び CYP3A 活性をそれぞれ阻害定数（K_i）値 1.27，15.0，6.65，9.16 及び 3.06 μmol/L で阻害した。また，タゼメトスタットは CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19 及び CYP2D6 の時間依存的阻害剤ではないことが示された。代謝物 EPZ-6930，EPZ006931 及び EPZ034163 の各 CYP 分子種（CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 及び CYP3A）に対する阻害能を検討した。評価した各 CYP 分子種に対する IC_{50} 値はいずれも 45.9 μmol/L 以上であった（2.6.4.5.5.1 項参照）。

タゼメトスタットの CYP（CYP1A2，CYP2B6，CYP2C9 及び CYP3A）に対する誘導能を，3 ドナーのヒト凍結肝細胞を用いて検討した（濃度：0.03～30 μmol/L）。タゼメトスタットは CYP3A4 メッセンジャーRNA（mRNA）に対して最大効果の 50%の効果をもたらす濃度（EC_{50}）2.18～2.96 μmol/L で誘導し，最大誘導作用（E_{max}）は 15.62～103.5 倍であり，誘導能は陽性対照であるリファンピシン（10 μmol/L）と同程度であった。タゼメトスタットの CYP3A 活性誘導は CYP3A4 mRNA 誘導よりも低かったが，これはタゼメトスタットの CYP3A に対する時間依存的阻害と誘導の複合効果に起因すると考えられた。タゼメトスタットの CYP1A2，CYP2B6 及び CYP2C9 に対する誘導能は CYP3A 誘導に比べてかなり弱かった。前述の CYP 誘導試験以降新たに試験を行い，タゼメトスタットの CYP（CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19 及び CYP3A4）に対する誘導能を 3 ドナーのヒト凍結肝細胞を用いて検討した（濃度：0.2～50 μmol/L）。タゼメトスタットは，CYP3A4 及び CYP2C8 の mRNA レベルを 3 ドナー全てにおいて 2 倍を超えて増加（CYP2C8：2.9～4.29 倍，CYP3A4：9.14～15.3 倍）させ，誘導能を認めた。CYP3A4 で観察された最大誘導は陽性対照であるリファンピシンと同程度であった。CYP2B6 及び CYP2C9 については 2 ドナーで，CYP1A2 については 1 ドナーで mRNA レベルの 2 倍を超える増加（CYP2B6：2.26 及び 3.16 倍，CYP2C9：2.83 及び 3.19 倍，CYP1A2：2.37 倍）が観察された。CYP2C19 の mRNA に対する誘導は 3 ドナー全てで 2 倍未満であった（2.6.4.5.5.2 項参照）。

2.4.3.5 排泄

雄 SD ラットに[^{14}C]タゼメトスタット臭化水素酸塩（50 mg/kg［フリー体換算量］）を単回経口投与後の放射能の主排泄経路は糞中であり，投与後 168 時間までに投与量の 86.1%が糞中に排泄され，投与量の 8.0%が尿中に排泄された。投与後 168 時間までの総放射能回収率は投与量の 94.4%であった。胆管カニューレ挿入雄 SD ラットに[^{14}C]タゼメトスタット臭化水素酸塩（50 mg/kg［フリー体換算量］）を単回経口投与後の放射能の主排泄経路は胆汁中であり，投与後 96 時間までに投与量の 53.5%が胆汁中に排泄され，また，17.9%及び 24.0%がそれぞれ尿及び糞中に回収された。投与後 96 時間までの総放射能回収率は投与量の 96.1%であった。ラットにおける[^{14}C]タゼメトスタット経口投与後の放射能の主排泄経路は，胆汁を介した糞中排泄であることが示された。

雌雄カニクイザルに[^{14}C]タゼメトスタット臭化水素酸塩（50 mg/kg［フリー体換算量］）を単回経口投与後の放射能の主排泄経路は糞中であり，投与後 168 時間までに雌雄ともに投与量の約 82%が糞中に排泄され，尿中排泄は雄で投与量の 4.0%，雌で投与量の 3.3%であった。投与後 168 時間までの総放射能回収率は雄で投与量の 88.0%であり，雌で投与量の 91.2%であった（以上，2.6.4.6.2 及び 2.6.4.6.3 項参照）。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

非臨床 in vivo における薬物間相互作用（DDI）試験は検討されていない。In vitro 評価系によるヒト代謝酵素誘導及び阻害については 2.4.3.4 項に示し，トランスポーターに対する基質認識性及び阻害活性については 2.4.3.7 項に示した。

「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン（2018 年）」に準拠し，タゼメトスタットが基質薬として薬物相互作用を生じる可能性，並びにタゼメトスタットが代謝酵素の阻害薬及び誘導薬，トランスポーターの阻害薬として薬物相互作用を引き起こす可能性について評価した。加えて，未変化体より極性が高く，AUC が未変化体を超える代謝物 EPZ-6930 について，CYP 及びトランスポーター阻害薬として，薬物相互作用を引き起こす可能性を評価した。結果については，2.6.4.7 項に示した。

2.4.3.7 その他の薬物動態試験

In vitro 経細胞輸送実験の結果から，タゼメトスタットは P 糖タンパク（P-gp）の基質であるが，乳癌耐性タンパク（BCRP）の基質ではないことが示された。タゼメトスタットは P-gp 及び BCRP をそれぞれ IC_{50} 値 5.9 及び 34.1 μmol/L で阻害した。

In vitro 細胞取り込み実験の結果から，タゼメトスタットは有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1，OATP1B3，有機アニオントランスポーター（OAT）1，OAT3，有機カチオントランスポーター（OCT）2 の基質ではなかった。この後に実施された in vitro 細胞取り込み試験結果からもタゼメトスタットは OATP1B1 及び OATP1B3 の基質ではないことが示された。また，タゼメトスタットは多剤・毒性化合物排出（MATE）1 の基質ではなかった。

タゼメトスタットは OATP1B1，OATP1B3，OCT2 及び OAT3 に対して阻害効果を示し，その IC_{50} 値はそれぞれ 19.7，14.4，14.7 及び 10.0 μmol/L であった。一方，OAT1 に対する阻害効果はほとんど無いことが示された（IC_{50} 値 >100 μmol/L）。また，タゼメトスタットは MATE1 及び MATE2-K に対して阻害効果を示し，その IC_{50} 値はそれぞれ 2.65 及び 1.89 μmol/L であった。タゼメトスタットは 20 μmol/L で OCT1 の活性を阻害しなかった。

In vitro 膜ベシクル実験の結果から，タゼメトスタットは胆汁酸移送ポンプ（BSEP）を IC_{50} 値 20.0 μmol/L で阻害することが示唆された。

In vitro 経細胞輸送又は細胞取り込み実験により，タゼメトスタットの主要代謝物 EPZ-6930，EPZ006931 及び EPZ034163 の各トランスポーター（BCRP，P-gp，MATE1，MATE2-K，OAT1，OAT3，OCT1，OCT2，OATP1B1 及び OATP1B3）に対する阻害能を検討した。

EPZ-6930 は 25 μmol/L で OAT1，OAT3，OCT1，OATP1B1，OATP1B3 及び BCRP の活性を阻害しなかった。EPZ-6930 は 25 μmol/L で OCT2，MATE1，MATE2-K 及び P-gp の活性をそれぞれ 25.7%，79.9%，64.4%及び 54.6%阻害した。フォローアップ試験により，EPZ-6930 の MATE1

及び MATE2-K に対する IC_{50} 値はそれぞれ 4.79 及び 12.1 μmol/L であった。

EPZ006931 は 10 μmol/L で OAT1，OAT3，OCT1，OCT2，OATP1B1，OATP1B3 及び BCRP の活性を阻害しなかった。EPZ006931 は 10 μmol/L で MATE1，MATE2-K 及び P-gp の活性をそれぞれ 65.4%，35.8%及び 39.7%阻害した。

EPZ034163 は 10 μmol/L で OAT1，OAT3，OCT1，OCT2，OATP1B1，OATP1B3，BCRP 及び P-gp を阻害しなかった。EPZ034163 は 10 μmol/L で MATE1 及び MATE2-K の活性をそれぞれ 48.7%及び 23.0%阻害した（以上，2.6.4.8 項参照）。

以上，これらの試験結果は，動物におけるタゼメトスタットの薬物動態特性，代謝の動物種差並びにヒトにおける薬物代謝酵素及び薬物トランスポーターを介した薬物間相互作用の可能性を評価する上で適切であり，十分なものであると考えられた。

2.4.4 毒性試験

毒性試験のリストを表 2.4.4-1 に示した。

表 2.4.4-1 毒性試験リスト

試験の種類と投与期間	投与経路	動物種	GLP の適否
単回投与毒性試験			
単回投与	経口	ラット・カニクイザル	否
反復投与毒性試験			
5 日間	経口	カニクイザル	否
7 日間	経口	ラット	否
4 週間	経口	ラット・カニクイザル	適
13 週間+4 週間回復	経口	ラット・カニクイザル	適
遺伝毒性試験			
復帰突然変異試験	in vitro	細菌 [a]	否／適
小核試験	in vitro	ヒト末梢血リンパ球	適
小核試験	経口	ラット	適
生殖発生毒性試験			
胚・胎児発生（用量設定）	経口	ラット・ウサギ	否
胚・胎児発生	経口	ラット・ウサギ	適
幼若動物（用量設定）	経口	ラット	否
幼若動物，13 週間＋4 週間回復	経口	ラット	適
光安全性試験			
光毒性試験	in vitro	BALB/c 3T3 細胞	適
毒性発現機序に関する試験			
ラット 13 週反復投与毒性試験から得られたリンパ組織及び造血組織の細胞系統解析	ex vivo	ラット	否
ラット白血病ウイルス再組み込み試験	ex vivo	ラット	否
Notch 標的遺伝子発現解析	ex vivo	ラット	否
EPZ-10961 のラット 13 週間反復投与毒性試験	経口	ラット	適

試験の種類と投与期間	投与経路	動物種	GLP の適否
EPZ-10961 のラット 13 週間反復投与毒性試験から得られた胸腺組織の細胞系統解析	ex vivo	ラット	否
EPZ011989 のラット 13 週間反復投与毒性試験	経口	ラット	否
EPZ011989 のラット 13 週間反復投与毒性試験における Notch 標的遺伝子発現解析	ex vivo	ラット	否
EPZ011989 のラット 13 週間反復投与毒性試験における *Myc* 遺伝子発現解析	ex vivo	ラット	否
EPZ011989 のラット 13 週間反復投与毒性試験における RNA 配列データ解析	ex vivo	ラット	否
SD ラットにおける胸腺退縮に関する検討	該当せず	ラット	否
その他の毒性試験			
新規不純物を含むロットを用いた 4 週間反復投与毒性試験	経口	ラット	適

GLP = Good Laboratory Practice.
EPZ-10961 及び EPZ011989：構造的に異なるが，タゼメトスタットと同様の EZH2 阻害作用を有する化合物
a：予試験（非 GLP 試験）ではネズミチフス菌 TA100，TA1535，TA98 を用いて，本試験（GLP 試験）ではネズミチフス菌 TA100，TA1535，TA98，TA1537 及び大腸菌 WP2 *uvrA* を用いて，それぞれ実施した。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

経口投与による単回投与毒性試験をラット（タゼメトスタット塩酸塩）及びカニクイザル（タゼメトスタット臭化水素酸塩）で実施した。いずれの動物種においても，1000 mg/kg まで忍容性は良好であった。

ラット（投与量：100，300 及び 1000 mg/kg）では 1000 mg/kg で活動性の低下と体重低下，300 mg/kg 以上で検体の物理化学的性質に起因すると考えられるケージや尾をなめる行動がみられたが，いずれも一過性であり，剖検における肉眼所見はなかった（2.6.6.2.1）。

サル（投与量：100，300 及び 1000 mg/kg）では，1000 mg/kg で嘔吐がみられたのみであった（2.6.6.2.2）。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

ラット

SD ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験（投与量：100，300 及び 1000 mg/kg）では，1000 mg/kg で投与 7～21 日にかけて消化器への影響が原因と考えられる死亡がみられた。1000 mg/kg 群の死亡例では，消化管（腺胃粘膜のびらん／潰瘍，腺胃粘膜及び消化管上皮の変性／壊死）並びにその他臓器（腎尿細管における好酸性小滴及び上皮細胞壊死，骨髄細胞の減少，リンパ系組織のリンパ球減少，骨芽細胞の過形成／骨梁形成）で病理組織学的変化がみられ，臨床検査では二次的あるいは状態悪化に起因すると考えられる変化もみられた。1000 mg/kg の生存例について，投与 21 日以降投与を中止して 2 週間の休薬期間を設けて回復性を確認した

ところ，全ての変化は回復又は回復傾向が示された。100 及び 300 mg/kg では，尿沈渣中に小顆粒状物が認められたものの関連する組織学的変化はみられなかった（2.6.6.3.2）。

13 週間反復投与毒性試験（投与量：100，300 及び 600 mg/kg）では，300 mg/kg 以上で胸腺原発のリンパ芽球性リンパ腫が観察され，種々の臓器組織への転移もみられた。これに起因する死亡あるいは瀕死が投与 65 日以降にみられた。発生頻度は，300 mg/kg で 3/20（雄）及び 8/20（雌），600 mg/kg で 1/20（雄）及び 0/20 例（雌）であった。600 mg/kg の生存例でみられた変化は，死亡例の T-LBL 以外の変化と類似し，リンパ球の減少，切歯の異形成，大腿骨及び胸骨における骨梁形成，上部消化管におけるびらん／潰瘍及び再生性の変化，腎盂の顆粒状物質沈着などであった。300 mg/kg では，程度は軽いものの 600 mg/kg と同様の変化が観察された。100 mg/kg では 300 mg/kg 以上でもみられた皮膚/皮下局所の膿瘍（口唇結節）が雄 1 例でみられたことを除き，毒性学的に意義のある変化は認められなかった。4 週間の休薬期間によって，脾のリンパ球減少，骨及び切歯の変化を除き，主な非腫瘍性変化は回復性を示した（2.6.6.3.3）。

サル

カニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験（投与量：100，300 及び 1000 mg/kg）では，1000 mg/kg で投与 8～9 日に投与を中止し，瀕死の個体 3 例を安楽殺した。生存例については，投与量を 600 mg/kg に下げて投与 11 日あるいは 12 日に投与を再開した（状態の悪かった雌 1 例のみ，投与を中止し 21 日間の回復性を検討した）。投与期間中，1000 mg/kg では投与 6 日の朝の投与後にのみ複数回の嘔吐がみられた。被験物質に直接関連する心拍数又は心電図への影響は本試験では認められなかった。1000 mg/kg 群の瀕死解剖例では，投与 7 日に一般状態の変化（活動性低下，傾眠，円背位及び協調運動不全）及び四肢の筋緊張の低下，臨床検査値の異常（軽度～中等度の貧血，ビリルビン上昇，アルブミン，総タンパク及び総コレステロールの低下），消化管の変化（胃及び結腸膨満，十二指腸のびらん又は潰瘍）及び肝の変化（退色）が認められた。消化管への影響が考えられたが，瀕死の原因は明らかではなかった。1000 mg/kg 群の瀕死動物及び同群で 600 mg/kg に減量した生存動物で，肝（肝細胞及びクッパー細胞の肥大）及び腎（尿細管上皮での色素沈着）で変化が認められ，ALT 及びトリグリセリドの上昇が認められた。300 mg/kg 以上で，リンパ系組織におけるリンパ球減少の頻度及び程度が用量依存的に増加した。1000 mg/kg 群の回復群の 1 例では，21 日間の回復期間後に毒性の回復又は回復傾向が認められた（2.6.6.3.5）。

13 週間反復投与毒性試験では，カニクイザルにタゼメトスタット臭化水素酸塩を 1 日 2 回，1 日用量として 100，300 又は 600 mg/kg で経口投与した。主な一般状態の変化及び剖検所見は 4 週間投与毒性試験と同質であったが，より重度であった。600 mg/kg 群の 1 例では，投与 83 日に活動性低下，体温低下，円背位，震え又は振戦などが認められた後，瀕死状態となった。この個体では，生存例と同様のタゼメトスタットに起因する病理組織学的変化がみられたが，瀕死の原因は明らかではなかった。タゼメトスタットに関連する一般状態の変化として，嘔吐及び便の異常（軟便，粘液便，着色便）等が全てのタゼメトスタット投与群で散発的に発現した。嘔吐の発現頻度は用量依存的であった。300 mg/kg 以上で RR 間隔が軽度に短縮（心拍数が増加）したが，統計学的に有意ではなかった。脾，リンパ節及び胸腺で用量依存的なリンパ球減少，ALT 及び AST 増加，並びに肝での肝細胞肥大，クッパー細胞肥大又は色素沈着，胆管過形成が

認められた。600 mg/kg では ALP 増加，糸球体病変及び腎尿細管の色素沈着が認められた。100 mg/kg では，毒性学的に有意な変化は認められなかった。4 週間の回復期間後，多くの変化が回復傾向を示していたが，いくつかの変化（600 mg/kg 群の ALT，ALP，AST，胆管過形成，クッパー細胞肥大又は色素沈着等）については，4 週間では回復性を確認するには十分ではなかった（2.6.6.3.6）。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

In vitro の復帰突然変異試験及び小核試験，in vivo のラット小核試験（投与量：500，1000 及び 2000 mg/kg）を実施したが，いずれも陰性であった（2.6.6.4.1, 2.6.6.4.2, 2.6.6.4.3）。

2.4.4.4 生殖発生毒性試験

SD ラットを用いた胚・胎児発生毒性試験の用量設定試験として，タゼメトスタット臭化水素酸塩（フリー体として 100，300 及び 600 mg/kg）を妊娠 7 日から妊娠 17 日まで反復投与した（2.6.6.6.1.1）。その結果，全ての用量で母動物の体重増加抑制がみられた。300 mg/kg では胎児体重の減少がみられ，着床後胚死亡の増加が 300 及び 600 mg/kg でみられた。

SD ラットを用いた胚・胎児発生毒性試験では，タゼメトスタット臭化水素酸塩（フリー体として 50，100 及び 200 mg/kg）を妊娠 7 日から 17 日まで反復投与した（2.6.6.6.1.2）。その結果，200 mg/kg で母動物に体重増加抑制と，着床後胚死亡の増加による生存胎児数の減少，胎児体重の低値がみられた。胎児観察では，50 mg/kg 以上で肋骨，頸椎，頭蓋骨，胸骨の骨格変異がみられ，100 mg/kg 以上では肋骨，頸椎，頭蓋骨，前肢骨の骨格異常がみられた。さらに 200 mg/kg では頭部，尾，四肢の外表異常もみられた。

New Zealand white（NZW）ウサギにおける胚・胎児発生毒性試験の用量設定試験として 2 試験を実施した（2.6.6.6.1.3, 2.6.6.6.1.4）。タゼメトスタット臭化水素酸塩（フリー体として 250，500 及び 1000 mg/kg）を妊娠 7 日から妊娠 11 日まで反復投与した結果，1000 mg/kg で母動物の体重減少がみられ，500 mg/kg 以上で着床後胚死亡の増加による生存胎児数の減少がみられた。タゼメトスタット臭化水素酸塩（フリー体として 150，250 及び 450 mg/kg）を妊娠 7 日から妊娠 19 日まで反復投与した試験では，250 mg/kg 以上で胎児体重の減少がみられ，450 mg/kg において着床後胚死亡の増加がみられた。

NZW ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験では，タゼメトスタット臭化水素酸塩（フリー体として 100，200 及び 400 mg/kg）を妊娠 7 日から 19 日まで反復投与した（2.6.6.6.1.5）。その結果，母動物では一般状態及び肉眼検査で異常はみられなかった。400 mg/kg では，生存胎児数の減少及び早期及び後期吸収胚増加による着床後死亡の増加がみられた。胎児検査では，400 mg/kg で頭部・四肢及び尾の異常の他，全身浮腫などの外表異常がみられ，内臓観察では心血管系異常，肺・腎の異常，横隔膜ヘルニア，小眼球，内臓の位置異常がみられた。骨格観察では，100 mg/kg 以上で骨格変異（体幹及び体肢の骨化異常や遅延），200 mg/kg 以上では催奇形性（頭蓋骨の奇形あるいは欠損，四肢及び脊椎の奇形）が観察された。

幼若ラットを用いた用量設定試験（投与量：50，150，500 及び 1000 mg/kg）では，生後 7 日齢より 4 週間反復投与を実施した。その結果，500 及び 1000 mg/kg の雌雄で，1～2 回投与後に活動性低下，体温低下，蒼白などがみられたことから，当該群全例を安楽殺した。これらの動

物の病理組織学的検査では，腺胃のびらん，胸腺及びリンパ節におけるリンパ球減少／壊死，骨髄，脾及び肝における造血細胞の単細胞壊死，腎乳頭部における石灰沈着及び尿細管上皮空胞化がみられた。腺胃では，びらん・潰瘍を伴っていたことから，これらが瀕死の原因と考えられた（2.6.6.6.2.1）。

幼若ラットを用いた反復投与毒性試験（フリー体として 50，100，150/300 及び 150/600 mg/kg）では，生後 7 日齢より 13 週間反復投与して毒性を評価するとともに 4 週間の回復性を検討した（2.6.6.6.2.2）。その結果，先に実施した成熟ラットにおける 13 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.3）同様，雌雄の胸腺に T-LBL が 50 mg/kg より認められた。T-LBL の発生時期は投与 11 週以降であり，成熟ラットの結果と同様であった。生後の発育分化（亀頭包皮分離及び膣開口）で投与に起因した異常はみられず，Functional observational battery（FOB）検査において，薬物の直接的な中枢神経系への作用は認められなかった。

2.4.4.5 光毒性試験

タゼメトスタットの紫外（UV）吸収スペクトルとして，290 nm 以降に極大吸収を認めたため，3T3 細胞を用いた in vitro 光毒性試験を実施した。溶解度の上限である 100 μg/mL まで検討した結果，E7438 は光毒性のポテンシャルを有することが示された（2.6.6.8.1.1）。

2.4.4.6 毒性発現機序に関する試験

タゼメトスタットのラットにおける 13 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（2.6.6.3.3）では，胸腺原発の T-LBL が観察されたことから，その発現機序について検討を行うとともに，構造的に異なり，タゼメトスタットと同様の薬理作用を有する 2 種類の EZH2 阻害薬（EPZ-10961 及び EPZ011989）について，ラットにおける 13 週間反復投与毒性試験を行った。2 種類の EZH2 阻害薬は，いずれも EZH2 に対する特異的阻害作用を示し，細胞の H3K27Me3 レベルをタゼメトスタットの 3～4 倍の強度で阻害した。両化合物ともに，タゼメトスタットと同様，投与 8～10 週間に T-LBL を誘発したが，用量相関性は明らかではなかった（2.6.6.8.2.4, 2.6.6.8.2.6）。

タゼメトスタットにより発生したラットの胸腺リンパ腫の胸腺，骨髄，脾サンプルを用いた免疫表現型解析の結果，$CD8^+$ T 細胞の比率，αβ T 細胞の割合が高く，$CD4^+$ T 細胞及び γδ T 細胞の比率が低かった。一方，T-LBL がみられなかったタゼメトスタット投与個体の胸腺，骨髄及び脾サンプルでは，逆に αβ T 細胞の割合は用量依存的に低下し，γδ T 細胞の割合が増加していた（2.6.6.8.2.1）。EPZ-10961 でも同様の結果が得られた（2.6.6.8.2.5）。

タゼメトスタットあるいは EPZ011989 を 13 週間投与したラットの組織を用いて，リンパ腫の発生にラット白血病ウイルス（RaLV）再活性化あるいは Notch シグナル経路の変化が関与している可能性を検討したが，いずれについてもその関与は示されなかった（2.6.6.8.2.2, 2.6.6.8.2.3, 2.6.6.8.2.7）。EPZ011989 を投与し T-LBL を発現したラットより得られた胸腺組織を用いた遺伝子発現解析及び全トランスクリプトーム解析では，Myc の発現量が増加していることが示されたが（2.6.6.8.2.8），ヒト T 細胞急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）で認められる遺伝子異常や転写異常は認められなかった（2.6.6.8.2.9）。

T-LBL 発生に関する薬物投与以外の要因として，加齢による胸腺の退縮について検討した。

薬物投与を実施していない 6 ヵ月齢から 12 ヵ月齢の SD ラットの血液及び胸腺サンプルの免疫表現型解析，胸腺重量測定，胸腺の病理組織学的検査を実施した（2.6.6.8.2.10）。その結果，加齢による胸腺重量の減少や胸腺の退縮を示唆する病理変化がみられ，6 ヵ月齢においても軽度の胸腺の退縮がみられた。

2.4.4.7 不純物に関する毒性試験

臨床試験の錠剤を製造する際に用いたロット（ロット番号：[redacted]）中に新規不純物が含まれていたことから，ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験を追加で実施した（2.6.6.8.3.1）。その結果，新規不純物に起因すると考えられる変化は認められなかった。

2.4.5 総括及び結論

遺伝子発現のエピジェネティクス制御において，クロマチンの主要タンパク質であるヒストンの翻訳後修飾（メチル化，アセチル化，ユビキチン化，リン酸化等々）は重要な役割を果たしており，様々ながんの発症や悪性化に関与している。このうちヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のトリメチル化は，造血幹細胞など多くの幹細胞やがん細胞のクロマチンにおいて亢進しており，細胞分化にかかわる遺伝子あるいは癌遺伝子の発現制御や細胞増殖に関与している（Margueron and Reinberg, 2011; Copeland, 2013）。

EZH2 は H3K27 を特異基質とするヒストンメチル基転移酵素（HMT）であり，ポリコーム複合体 PRC2 の活性サブユニットとして，H3K27 のモノメチル化，ジメチル化及びトリメチル化を触媒する（Margueron and Reinberg, 2011; Copeland, 2013）。EZH2 の遺伝子変異，遺伝子増幅・過剰発現，あるいは活性亢進による H3K27me3 のレベルの異常亢進は，FL，DLBCL，悪性ラブドイド腫瘍，滑膜肉腫，SCCOHT，乳癌，前立腺癌，悪性黒色腫，膀胱癌等で報告がある（Varambally, et al., 2002; Arisan, et al., 2005; Chase and Cross, 2011; Yoo and Hennighausen, 2012; Zingg, et al., 2015; Kim and Roberts, 2016）。

タゼメトスタットは，EZH2 に対する選択的かつ可逆的な経口有効性の低分子阻害薬であり，本薬はこれらの EZH2 異常あるいは H3K27me3 亢進を伴うがん腫に対する新たな治療法を提供するものと期待される。

FL 及び GCB 型 DLBCL は，ともに代表的な B 細胞性リンパ腫であり，リンパ組織内濾胞の胚中心における胚中心芽細胞及び胚中心細胞を起源としている。胚中心芽細胞が盛んに分裂増殖後胚中心細胞になる過程で，免疫グロブリン遺伝子の可変領域は繰り返し体細胞突然変異を起こして多様性を獲得する。このような胚中心（芽）細胞の増殖と突然変異の厳密な制御，及びがん化防止において，EZH2 による遺伝子発現のエピジェネティクス制御は重要な役割を担っている（Velichutina, et al., 2010; Green, 2018; Mlynarczyk, et al., 2019）。EZH2 の発現レベルは，B 細胞の活性化に伴って増加し，胚中心芽細胞において最大となる。ここで EZH2 によって生じる H3K27me3 レベルの亢進は，細胞分化に関係する転写因子や細胞周期阻害因子等の遺伝子発現を抑制し，分化抑制・増殖促進の状態を保つ。その後，胚中心細胞の成熟化にむけて EZH2 の発現量は減少し，細胞分化が進捗する。一方，この過程において EZH2 の制御が外れて H3K27me3 が恒常的に高レベルになると，分化関連因子や細胞周期阻害因子の抑制が継続され，FL や GCB 型 DLBCL 等の B 細胞性リンパ腫発症の一因になると考えられる（Beguelin, et al., 2013;

Caganova, et al., 2013; Beguelin, et al., 2016)。

FL や GCB 型 DLBCL では EZH2 の SET ドメイン領域での遺伝子変異（A682G，A692V，Y646F，Y646C，Y646H，Y646N，Y646S 等*）が報告されており，EZH2 活性の亢進により高レベルの H3K27me3 が生成されて，変異型 EZH2 に依存した腫瘍増殖をおこす（Morin, et al., 2010; Sneeringer, et al., 2010; Yap, et al., 2011; Bödör, et al., 2013)。最近，変異型 EZH2 は組織適合性抗原クラス I とクラス II の発現を抑制し，宿主からの免疫攻撃を回避することによって腫瘍を悪性化するということも報告されている（Ennishi, et al., 2019)。したがって，タゼメトスタット等 EZH2 阻害剤は，FL や GCB 型 DLBCL 等に対する有力な治療法を提供する可能性がある（McCabe, et al., 2012; Knutson, et al., 2014; Brach, et al., 2017)。

* 変異アミノ酸残基の位置は GenBank データベース *EZH2* NM_004456.3 に基づく。

ヒト FL で *EZH2* 変異を有する細胞株は知られていない。一方，GCB 型 DLBCL では *EZH2* 変異を有する細胞株として WSU-DLCL2，KARPAS-422，Pfeiffer，RL，SU-DHL-10，SU-DHL-6 等，また *EZH2* が野生型の細胞株として OCI-Ly19，Toledo，MC116 等が知られている。上述のように，FL と GCB 型 DLBCL は，ともに胚中心芽細胞及び胚中心細胞を由来とし，EZH2 を含む各種クロマチン修飾酵素遺伝子の異常，BCL2 の高発現や PI3K シグナルの亢進など一定の共通した分子生物学的な性状を有している（Alizadeh AH, et al., 2000; van Besien and Schouten, 2007; Pon and Marria MA, 2016; Green, 2018)。このことから，タゼメトスタットの非臨床薬理試験（in vitro 及び in vivo 試験）においては，B 細胞性リンパ腫として各種ヒト GCB 型 DLBCL の細胞株を用いた。

EZH2 をサブユニットとして含むポリコーム抑制複合体 PRC2 の他，switch/sucrose nonfermentable（SWI/SNF）複合体もヒストンの翻訳後修飾に重要な役割を担っており，PRC2 と SWI/SNF 複合体は多くの場合互いに拮抗的に働く。がんの約 20%で SWI/SNF 複合体のサブユニットである INI1（別名 SNF5，SMARCB1），SMARCA2，SMARCA4，ADRID1A，PBRM1 等の遺伝子変異や欠損が認められている（Kadoch and Crabtree, 2013; Kadoch, et al., 2016)。この内，*INI1* 陰性悪性ラブドイド腫瘍では，INI1 欠損のため，SWI/SNF 複合体と PRC2 の不均衡により EZH2 の活性抑制が解除される（Wilson, et al., 2010)。滑膜肉腫では遺伝子転座による融合タンパク質 SS18-SSX1/2 形成のため INI1 がタンパク質として不安定化し，EZH2 の活性制御が解除される（Kadoch and Crabtree, 2013)。SCCOHT では *SMARCA2* 及び *SMARCA4* が二重に欠損しており，これにともない EZH2 に依存した細胞増殖をおこす（Jelinic, et al., 2016; Chan-Penebre, et al., 2017)。いずれの場合も EZH2 の活性抑制の解除により H3K2me3 レベルが亢進し，がん発症及び悪性化に至ると考えらえる。タゼメトスタットの非臨床薬理試験（in vitro 試験）においては，*INI1* 欠損あるいは *SS18-SSX1/2* 融合が生じている各種悪性軟部腫瘍，*SMARCA2/4* 二重欠損が生じている SCCOHT の各種細胞株を用いた。

タゼメトスタットは無細胞系において，野生型及び変異型 EZH2 の酵素活性を IC_{50} 値 2～38 nmol/L で阻害した。野生型及び変異型 EZH2 に対する阻害は EZH2 と最も類縁の HMT である EZH1 に対する阻害と比較して 36 倍，またその他の HMT に対する阻害と比較して 3000 倍以上強く，本薬は EZH2 に対する特異的阻害剤であることが示された。EZH2 に対する阻害の IC_{50} 値はメチル基のドナー基質である S-adenosylmethionine（SAM）の濃度に応じて増加したが，オ

リゴヌクレオソーム濃度を変えてもほとんど変化しないことから，本薬による阻害が SAM 競合的であることが示唆された。本薬は DLBCL 細胞株のヒストンにおいて特異的にメチル化 H3K27 のレベルを減少させ，細胞系においても EZH2 を特異的に阻害することが示された。

タゼメトスタットは *EZH2* 変異を有する各種ヒト DLBCL 細胞株の細胞増殖を強力に阻害し，IC_{50} 値は計 6 株の内 5 株に対し，10^{-10}～10^{-9} モルオーダーであった。次いで，*INI1* が欠損あるいは INI1 がタンパク質として不安定化したヒト悪性軟部腫瘍細胞 6 株，*SMARCA2* 及び *SMARCA4* をともに欠損しているヒト SCCOHT 細胞 4 株に対し，10^{-8}～10^{-7} モルオーダーの IC_{50} 値を示した。*EZH2* 野生型のヒト DLBCL 細胞 4 株の細胞増殖に対しても 10^{-8}～10^{-6} モルオーダーの IC_{50} 値を示した。対照とした *INI1*[+]あるいは INI1 正常の細胞 4 株に対する IC_{50} 値は 10^{-6} モル以上であった。以上，本薬は EZH2 変異ないし EZH2 活性が亢進していると考えられるがん細胞株に対し強い細胞増殖阻害を示した。細胞増殖阻害の機序は，細胞周期の G1 期停止とそれに続くアポトーシス誘導であり，G1 期停止の時期（培養 4 日～7 日）は細胞内 H3K27me3 が消失する時期と対応していた。

EZH2 変異を有するヒト DLBCL 細胞株（WSU-DLCL2，KARPAS-422，Pfeiffer 及び SU-DHL-10）のマウス移植モデルにおいて，タゼメトスタットの 1 日 2 回あるいは 3 回，28 日等の経口投与は 34.2 から 532 mg/kg（臭化水素酸塩）の範囲の用量において TGI から腫瘍縮小に至る抗腫瘍効果を示した。腫瘍組織細胞の H3K27me3 レベルは本薬の用量及び時間依存的に低下したことから，本薬の抗腫瘍効果が EZH2 阻害に基づくことが示唆された。*EZH2* が野生型であるヒト DLBCL 細胞株（OCI-Ly19，Toledo 及び MC116）の移植モデルにおいても，タゼメトスタット（571 mg/kg，臭化水素酸塩）の 1 日 2 回，17～28 日間の経口投与は，腫瘍縮小は示さないものの有意な TGI を示した。このことは本薬が in vitro において，*EZH2* が野生型であるヒト DLBCL 細胞株に対しても，*EZH2* 変異を有するヒト DLBCL 細胞株より弱いながら細胞増殖阻害作用を示したことと対応していた。*EZH2* 変異を有するヒト DLBCL 細胞株（WSU-DLCL2 及び SU-DHL-10）移植モデルにおいて，本薬と DLBCL の治療に使用される化学療法レジメンとの併用は，それぞれの単独投与より優れた抗腫瘍効果を発揮した。以上の各種ヒト腫瘍移植モデルにおいて，本薬単剤の投与群で BWL はほとんどないあるいは 10%以下であった。

以上の結果より，タゼメトスタットは各種ヒト DLBCL 細胞株移植モデルにおいて，顕著な BWL を伴わずに TGI から腫瘍縮小に至る抗腫瘍効果を発揮し，これは本薬の EZH3 阻害による腫瘍細胞内 H3K27me3 レベルの低下によるものと考えられた。以上の非臨床薬理成績は，タゼメトスタットが，FL など EZH2 に依存性のある腫瘍に対して有効な治療薬となる可能性を支持した。

各種受容体，トランスポーター及びイオンチャネルからなる 80 種の分子パネルのリガンド結合に対するタゼメトスタット（10 μmol/L）の作用を標識リガンド結合アッセイで検討した。その結果，79 種の各種受容体，トランスポーター及びイオンチャネルにおいて，各々のリガンド結合に対する 50%を超える阻害あるいは促進は認められなかった。タゼメトスタットは，ムスカリン性アセチルコリン受容体 M4 とそのリガンドとの結合を IC_{50} 値 4.6 μmol/L で阻害したが，同受容体の細胞機能アッセイではアゴニスト作用，アンタゴニスト作用のいずれも示さなかった。また，タゼメトスタット（10 μmol/L）は 40 種類のヒトキナーゼ（セリン・スレオニンキナ

ーゼ及びチロシンキナーゼを含む）パネルにおいて，いずれの酵素活性に対しても有意な阻害を示さなかった。

タゼメトスタットは，ラット及びカニクイザルの末梢血単核球，骨髄，脾及び皮膚における H3K27 のメチル化を用量依存的に阻害した。特に骨髄で最も強力であった。ラットにおいて皮膚における H3K27 のメチル化は 1 日 1 回 7 日間投与では観測されず，1 日 1 回 22～28 日間投与で有意に阻害された。

心血管系に及ぼす影響については，hERG を発現させた HEK293 細胞を用いた電気生理学的 in vitro 試験，ウサギ左心室ウェッジ標本を用いた電気生理学的 ex vivo 試験及びテレメトリー送信器を埋め込んだ覚醒サルを用いた単回経口投与試験を実施した。中枢神経系及び呼吸器系に及ぼす影響については，サルを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験に組み込んで神経学的機能検査及び呼吸機能測定を実施した。

タゼメトスタットの 10 μmol/L は hERG チャネル発現細胞における hERG カリウム電流を 15.1%阻害した。ウサギ左心室ウェッジ標本において，タゼメトスタットの 20 μmol/L まで QRS 時間には影響しなかったが，20 μmol/L で QT 間隔は短縮し，7 及び 20 μmol/L で $T_{p\text{-}e}$ 間隔は短縮した。しかし，どの濃度でも不整脈性事象の発生は認められなかった。覚醒サルにおいて，最高投与量の 1000 mg/kg（臭化水素酸塩として）まで心血管パラメータ（心拍数，平均血圧及び心電図）への影響は認められなかった。サル反復経口投与毒性試験の第 7 日に実施された神経学的機能検査において，タゼメトスタットの 300 mg/kg（臭化水素酸塩として）まで影響は認められず，最高用量の 1000 mg/kg（臭化水素酸塩として）では両側後肢の筋緊張低下がみられたが，これは一般状態悪化の影響と考えられた。サル反復経口投与毒性試験の第 6 日に実施された呼吸機能測定において，最高投与量の 1000 mg/kg（臭化水素酸塩として）まで呼吸機能（呼吸数及び 1 回換気量）への影響はみられなかった。

これらの結果から，心血管系，中枢神経系及び呼吸器系のリスクは認められなかった。

タゼメトスタットは，毒性評価動物種である SD ラット及びカニクイザルにおいて類似の PK プロファイルを示した。雄 SD ラット及び雄カニクイザルに単回静脈内投与後，タゼメトスタットは，中程度から高いクリアランス（ラット：3.49 L/h/kg，サル：1.39 L/h/kg）及び中程度の分布容積（ラット：1.80 L/kg，サル：2.04 L/kg）を示し，血漿からの $t_{1/2}$（ラット：0.4 時間，サル：1.6 時間）は短かった。雄 SD ラット及び雄カニクイザルに単回経口投与した後のタゼメトスタットの C_{max} 及び暴露量は，検討した投与量範囲内（ラット及びサル：5～100 mg/kg）において，投与量比を上回る増加を示し，投与量 5 mg/kg におけるラット及びサルの F（ラット：3.2%，サル：1.9%）は低かった。単回静脈内投与及び単回経口投与における尿中排泄の検討から，タゼメトスタットのラットでの腎クリアランスは低いことが示唆され，単回静脈内投与における胆汁排泄の検討から，タゼメトスタットのラットでの胆汁排泄クリアランスも低いことが示唆された。

反復経口投与試験におけるタゼメトスタットの暴露量は，雄ラットより雌ラットの方が大きかったが，サルでは暴露量に顕著な性差は認められなかった。反復経口投与後のタゼメトスタ

ットの暴露量は，サルでは投与初日に比べ低下し，ラットでは投与初日と同等若しくは蓄積傾向が認められた。

雄 SD ラット及び雌雄カニクイザルに[^{14}C]タゼメトスタット臭化水素酸塩（50 mg/kg［フリー体換算量］）を単回経口投与後の血漿中放射能濃度の t_{max} は，それぞれ 1 時間及び 2 時間（雌雄ともに）であり，吸収は速やかであった。その後，両動物種の血漿中放射能濃度は速やかに消失し，雄 SD ラットの $t_{1/2}$ は 0.948 時間であった。雄 SD ラット及び雌雄カニクイザルにおける放射能の主たる排泄経路は糞中であり，単回経口投与後 168 時間までに投与量の 82%以上が糞中に回収された。雄 SD ラット及び雌雄カニクイザルにおける単回経口投与後 168 時間までの総放射能回収率は，それぞれ投与量の 94.4%及び 88.0%～91.2%であった。胆管カニューレ挿入雄 SD ラットの放射能の主排泄経路は胆汁排泄であり，単回経口投与後 96 時間までに投与量の 53.5%が胆汁中に回収され，また，17.9%及び 24.0%がそれぞれ尿及び糞中に回収された。ゆえに，SD ラットにおける[^{14}C]タゼメトスタット経口投与後の放射能の主たる排泄経路は，胆汁を介した糞中排泄であることが示された。単回経口投与後の胆汁中及び尿中への放射能回収率より，胆管カニューレ挿入雄 SD ラットにおける[^{14}C]タゼメトスタットの消化管吸収率は，70%以上であると考えられた。

雄 SD ラット及び雄 LE ラットに[^{14}C]タゼメトスタット臭化水素酸塩（50 mg/kg［フリー体換算量］）を単回経口投与後，放射能は速やかに吸収され，中枢神経系組織（小脳，大脳，髄質及び脊髄）及び水晶体を除く組織に広く分布した。雄 SD ラットの大半の組織で，放射能濃度は投与後 1 時間で C_{max} に到達し，それ以外の組織でも投与後 4 時間までに C_{max} に到達した後に低下し始めた。放射能は投与後 168 時間以内に大半の組織からほぼ消失した。大動脈，肝，腎皮質及び甲状腺では投与後 168 時間の時点で放射能濃度が検出されたが，いずれの組織でも定量限界値の約 1～4 倍の値であった。雄 LE ラットにおける放射能の組織分布パターンは，メラニン含有組織を除き，雄 SD ラットと類似していた。雄 LE ラットの眼球血管膜や有色皮膚等のメラニン含有組織では，雄 SD ラットよりも放射能濃度が顕著に高く，[^{14}C]タゼメトスタット由来放射能のメラニンに対する親和性が示唆された。有色組織で放射能濃度の低下が認められたことから，メラニンとの結合は可逆的であると考えられた。

タゼメトスタットの in vitro 血漿中タンパク結合率は比較的高く，ウサギ（NZW）：91.1%～91.9%，サル（カニクイ）：83.3%～84.7%，ヒト：87.7%～91.1%であり，これらの動物種では，検討濃度範囲内（1～30 µmol/L）において濃度依存性は認められなかった。一方，マウス（CD-1）及びラット（SD）におけるタゼメトスタットの in vitro 血漿タンパク結合率は 1～30 µmol/L において，それぞれ 91.8%～98.1%及び 88.8%～94.7%であり，10 µmol/L 以上で結合率が低下傾向を示し，濃度依存性が認められた。ヒト血漿中に存在する HSA，α1-AGP 及び HG のうち，タゼメトスタットは HSA に対して最も強い結合を示した。マウス（CD-1），ラット（SD），サル（カニクイ）及びヒトにおけるタゼメトスタット（添加濃度：50～50,000 ng/mL）の in vitro での R_B 値は 0.53～1.06 であり，添加最高濃度（50,000 ng/mL）でやや高値を示したものの，5000 ng/mL 以下では濃度依存性を認めず，また，全般に動物種差も認められなかった。

ラット，サル及びヒトの in vitro 試料及び生体試料の代謝物分析から，これらの動物種においてタゼメトスタットの主たる消失経路は代謝によるものと考えられた。いずれの動物種においても，アニリン窒素の脱アルキル化反応が主代謝経路であり，*N*-脱エチルによる EPZ-6930 の生

成，*N*-脱テトラヒドロピランによる EPZ006931 の生成及びそれらの逐次代謝物が，血漿及び排泄物中に存在する代謝物の主要な構成成分であった。In vitro 試料中の代謝物は生体試料中の代謝物と概ね一致し，in vitro 試料及び生体試料中にヒト特異的な代謝物は見出されなかった。

ヒトマスバランス試験（外国 103 試験［EZH-103］）において，タゼメトスタット（22.40%），EPZ-6930（31.81%）及び EPZ006931（10.99%）が血漿中薬物関連総暴露量の 10%以上を示し，EPZ-6930 及び EPZ006931 がヒト血漿中主代謝物として同定された（2.7.2.2.2.3 項参照）。ラット及びサル 13 週間反復投与毒性試験では，タゼメトスタットに加え EPZ-6930 を定量し，両動物種における EPZ-6930 の暴露量はヒトよりも十分に高いことが示された（2.6.6.9 項参照）。代謝物の血漿中暴露量を半定量的に動物種間で比較した試験において，代謝物 EPZ006931 はラット及びサル血漿中の主代謝物の一つであることが示されている。ゆえに，非臨床毒性試験において，主代謝物（EPZ-6930 及び EPZ006931）を含めたタゼメトスタットの毒性学的評価が，適正に行われていると結論づけた。代謝物 EPZ-6930 のヒト血漿中暴露量はタゼメトスタットより大きかったが，in vitro セルフリー系における代謝物 EPZ-6930 の EZH2 に対する阻害活性は，タゼメトスタットに比べて 1/11～1/31 の活性であったことから，EPZ-6930 の薬効への寄与は小さいと考えられた（2.6.2.2.1.3 項参照）。

ヒトにおけるタゼメトスタットの主たる消失経路は代謝であり，ヒト肝ミクロソーム及び各 rCYP 分子種を用いた in vitro 試験から，タゼメトスタットの代謝には主に CYP3A4 が関与していることが示された。タゼメトスタットの臨床 PK プロファイルは，CYP3A 阻害薬及び誘導薬による影響を受ける可能性が考えられたため，臨床薬物相互作用試験（外国 105 試験［EZH-A001-105］）において，タゼメトスタットの臨床 PK に対する中程度の CYP3A 阻害薬（フルコナゾール）の影響を評価した（2.7.2.2.2.4 項参照）。1 日 1 回フルコナゾールを 400 mg 反復投与した後，タゼメトスタットの定常状態での C_{max} 及び投与時から定量が可能であった最終採血時間（t）までの濃度-時間曲線下面積（$AUC_{(0\text{-}t)}$）は中程度（それぞれ 2.3 倍及び 3.1 倍）の増加を示した。ゆえに，CYP3A に対する中程度～強い阻害薬との併用により，タゼメトスタットの C_{max} 及び AUC は中程度以上増加する可能性がある。タゼメトスタットは P-gp の基質であるが，P-gp 発現細胞におけるタゼメトスタットの濃度依存的な輸送低下とタゼメトスタットの臨床用量（800 mg BID）を考え合わせると，消化管では P-gp の輸送飽和が生じていると考えられ，P-gp 阻害薬の影響を受ける可能性は低いと考えられた。

In vitro 試験において，タゼメトスタットは複数の CYP 分子種に対して阻害又は誘導作用を示した。タゼメトスタットの各 CYP 分子種に対する in vitro 阻害パラメータ（K_i，IC_{50}，K_I 及び k_{inact}），臨床用量（800 mg BID）及び血漿中暴露量を考え合わせると，タゼメトスタットが CYP3A（消化管及び肝），CYP2C8，CYP2C19 及び CYP2D6 を可逆的に阻害し，CYP3A（消化管及び肝）を時間依存的に阻害する可能性が示された。In vitro 試験でのタゼメトスタット及び陽性対照による主要 CYP 分子種の mRNA 発現量の変動及びタゼメトスタットの臨床用量での血漿中暴露量を勘案すると，タゼメトスタットが CYP3A4 を誘導する可能性が示された。タゼメトスタットは CYP2B6 に対する誘導能も有しているが，その程度は限定的であると考えられた。タゼメトスタットが CYP3A4 に対する誘導能を示したことから，共通の核内受容体での発現制御が示唆されている CYP2C8，CYP2C9 及び CYP2C19 に対するタゼメトスタットの誘導能を in vitro で評価した。その結果，CYP2C8 及び CYP2C9 に対するタゼメトスタットの誘導能が示

唆された。さらに，タゼメトスタットは複数のトランスポーター分子種に対して阻害作用を示した。タゼメトスタットの各トランスポーター分子種に対する IC_{50} 値，臨床用量（800 mg BID）及び血漿中暴露量を考え合わせると，タゼメトスタットが P-gp，BCRP，OATP1B1，OATP1B3，MATE1 及び MATE2-K を阻害する可能性が示された。未変化体より極性が高く，AUC が未変化体を超える代謝物 EPZ-6930 は，IC_{50} 値及び臨床用量での血漿中暴露量を勘案すると，主要 CYP 分子種を阻害する可能性は低いと考えられた。同様に，代謝物 EPZ-6930 は，MATE1 及び MATE2-K 以外のトランスポーター分子種を阻害する可能性は低いと考えられた。以上の in vitro 試験から得られた知見に基づき，CYP3A 指標薬（ミダゾラム）との併用試験（外国 101 試験［EZH-A001-101］）並びに CYP2C8 及び CYP2C19 指標薬（それぞれレパグリニド及びオメプラゾール）との臨床薬物相互作用試験（外国 105 試験［EZH-A001-105］）を実施した。In vitro 試験において，タゼメトスタットは，CYP3A に対して阻害及び誘導の相反する作用を示したが，最終的に in vivo では CYP3A 指標薬であるミダゾラムに対して弱い誘導作用を示し，ミダゾラムの $AUC_{(0\text{-}t)}$は 38%低下した。タゼメトスタットとの併用により，CYP2C8 指標薬であるレパグリニドの C_{max} 及び $AUC_{(0\text{-}t)}$はそれぞれ 93%及び 117%上昇した。なお，レパグリニドは CYP2C8 の基質であると同時に，OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であることが知られている。タゼメトスタットの CYP2C8 に対する in vitro 阻害活性は，OATP1B1 及び OATP1B3 に対する in vitro 阻害活性よりも 10 倍以上強いことを考えると，レパグリニドの血漿中濃度上昇は主にタゼメトスタットによる CYP2C8 阻害に起因しているものと考えられ，タゼメトスタットが OATP1B1 及び OATP1B3 を阻害する可能性は低いと考えられた。タゼメトスタットは CYP2C19 指標薬であるオメプラゾールに対して影響を与えなかった。タゼメトスタットの CYP2D6 に対する R 値（基本モデルで予測された相互作用薬［阻害薬又は誘導薬］の存在下又は非存在下での被相互作用薬の AUC の比率）は，カットオフ基準（1.02）よりもわずかに大きかったが，臨床薬物相互作用の認められなかった CYP2C19 に対する R 値よりも小さく，かつタゼメトスタットは CYP2C19 指標薬（オメプラゾール）の PK に影響を与えなかったことを考え合わせると，タゼメトスタットが臨床用量で CYP2D6 を阻害する可能性は低いと考えられた。

毒性試験の動物種は，代謝プロファイルを元にラット及びカニクイザルを選択し，単回から 13 週間までの反復投与毒性試験，遺伝毒性試験（Ames 試験，in vitro 及び in vivo 小核試験），ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験，光毒性試験を実施した。また，不純物プロファイルが異なるロットでラット 4 週間反復投与毒性試験を行い，さらにラットでみられた T-LBL に関する各種検討試験を実施した。

タゼメトスタットの単回経口投与では，ラット及びサルのいずれの種でも 1000 mg/kg まで死亡はみられなかった。

4 週間の反復投与毒性試験では 1000 mg/kg はいずれの種でも致死量であり，消化管毒性がみられた。13 週間の反復投与毒性試験では，ラットでは 300 mg/kg 以上で T-LBL の発生による死亡が，サルでは 600 mg/kg で死亡が認められた。ラット及びサルの反復投与毒性試験における主な所見は，消化管毒性（潰瘍，びらん）及びリンパ組織のリンパ球減少であった。その他の重要な所見は，ラットの T-LBL 及び骨梁形成，皮膚/皮下局所の膿瘍，サルの肝細胞及びクッパー細胞の肥大と色素沈着及び胆管過形成，及びサルの糸球体病変であった。ラットの T-LBL とサ

ルの胆管過形成及び糸球体病変は，いずれも 13 週間反復投与毒性試験のみで認められた変化であった。ラットでみられた T-LBL に関して，胸腺，骨髄及び脾サンプルを用いた細胞系統解析，ラット白血病ウイルスの再活性化検討，Notch 遺伝子発現解析等を実施したが，原因の特定には至らなかった。一方で，構造的に異なりタゼメトスタットと同様の薬理作用を有する 2 種類の化合物（EPZ-10961 及び EPZ011989）を用いてラットでの 13 週間反復投与毒性試験を実施した結果，タゼメトスタットでの試験と同様，T-LBL の発生がみられたことから，EZH2 阻害と T-LBL の発生には関連があるものと考えられた。また，幼若ラットにおいて成熟ラットより低い暴露量で T-LBL が発生したこと，胸腺は加齢によって退縮することを考慮すると，T-LBL の発生リスクは年齢依存的に低下する可能性が考えられた。

実施したいずれの遺伝毒性試験でもタゼメトスタットによる遺伝毒性はみられなかった。

生殖発生毒性試験の結果，タゼメトスタットは催奇形性作用を有することが示唆された。タゼメトスタットの投与により，ラットでは 50 mg/kg，ウサギでは 100 mg/kg の用量で骨格変異，ラットの 100 mg/kg，ウサギの 200 mg/kg では骨格の異常がみられた。ラットの 200 mg/kg，ウサギの 400 mg/kg では生存胎児の減少並びに低体重がみられ，ウサギの 400 mg/kg では内臓の異常がみられた。催奇形性がみられた用量における母動物への暴露量は，臨床用量である 800 mg の 1 日 2 回投与による AUC と同程度であった。

タゼメトスタットは自然光の範囲内で光を吸収し，経口投与後の皮膚及び眼への分布が確認されている。また，BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いて実施した in vitro 光安全性試験では UV 照射による光毒性のポテンシャルを示した。そのため，タゼメトスタットを使用した臨床試験では，治療中の日光への長時間の暴露を避け，被験者は日焼け止めやサングラス，防護服の着用や日焼け用ベッドを使用しないことなど，UV 暴露を避けるための手段を講じることとした。臨床試験（E7438-G000-101, E7438-J081-106, E7438-J081-206）においては，休薬・減量の対象に至らなかったが，1 例の光線過敏症が報告されている。

ヒトに特異的な代謝物は特定されておらず，主要な代謝物として ER-897387-00（EPZ-6930），ER-897388-00（EPZ006931）及び EPZ034163 が確認されている（2.6.4.5.1.3 項参照）。毒性試験では，ラット及びサルにおける 13 週間反復投与毒性試験，ラット及びウサギにおける胚・胎児発生毒性試験において，タゼメトスタットに加えて主要代謝物の一つである ER-897387-00 についても血漿中濃度測定を実施した。その結果，いずれの動物種においても，ヒトにおける ER-897387-00 の暴露量を超える用量まで毒性評価を実施していることが確認された。その他の代謝物の血漿中濃度については，非臨床毒性試験では測定されていない。ICH S9 ガイドラインに示されているよう，本剤は進行がんの治療に用いられる薬剤であることから，代謝物の毒性を個別に調べる必要はないと考えられた。

タゼメトスタットのアニリン部位からエチル基及びテトラヒドロフランが脱離した脱アルキル分解生成物である ER-897389（あるいは EPZ034163 とも表記される）は，[redacted]及び[redacted]であり，また，ヒト及び動物で検出される二次代謝産物でもある（2.6.4.5.1.3 参照）。ER-897389（EPZ034163）は in silico 解析により遺伝毒性を有する可能性があることが示唆されている。ICHQ3A / Q3B 及び ICH S9 Q&A などのガイダンスを参照し，1 日量としては 1 mg/man を超える可能性があるものの，タゼメトスタットは長期に投与される医薬品には該当しないと考えられることから，ER-897389（EPZ034163）単独による細

菌を用いた復帰突然変異試験の実施は不要と判断された。なお，ER-897389（EPZ034163）は，タゼメトスタット臭化水素酸塩の原薬に含まれる不純物としては ICH M7 に従って 1 日摂取量が 10 μg を超えないよう，適切に管理される。親化合物であるタゼメトスタットは，Ames 試験並びに in vitro 及び in vivo 小核試験で陰性を示した。代謝物（ER-897389）は二次代謝物（アニリン置換基での連続的な N-脱アルキル化反応の生成物）であるため，in vitro 遺伝毒性試験での代謝活性化（S9）の存在下における形成はごくわずかであると考えられる。タゼメトスタットはがん治療に用いられる薬剤であり，標準治療法が限られている濾胞性リンパ腫の患者に対する治療による潜在的なベネフィット，遺伝毒性を有する薬剤による前治療歴の可能性を考慮すると，遺伝毒性を有する可能性のある微量の二次代謝物への暴露は許容されると考えた。

2.4.6 参考文献一覧

Alimova I, Birks DK, Harris PS, Knipstein JA, Venkataraman S, Marquez VE, et al. Inhibition of EZH2 suppresses self-renewal and induces radiation sensitivity in atypical rhabdoid teratoid tumor cells. Neuro-oncology. 2013;15:149–60.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature. 2000;403:503–11.

Arisan S, Buyuktuncer ED, Palavan-Unsal N, Çaşkurlu T, Çakir OO, Ergenekon E. Increased expression of EZH2, a polycomb group protein, in bladder carcinoma. Urologia Internationalis. 2005;75:252–7.

Beguelin W, Popovic R, Teater M, Jiang Y, Bunting KL, Rosen M, et al. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. Cancer Cell. 2013;23:677–92.

Beguelin W, Teater M, Gearhart MD, Calvo Fernández MT, Goldstein RL, Cárdenas MG, et al. EZH2 and BCL6 cooperate to assemble CBX8-BCOR complex to repress bivalent promoters, mediate germinal center formation and lymphomagenesis. Cancer cell. 2016;30:197–213.

Bödör C, Grossmann V, Popov N, Okosun J, O'riain C, Tan K, et al. EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. Blood. 2013;122:3165–8.

Brach D, Johnston-Blackwell D, Drew A, Lingaraj T, Motwani V, Warholic NM, et al. EZH2 inhibition by tazemetostat results in altered dependency on B-cell activation signaling in DLBCL. Molecular Cancer Therapeutics. 2017;16:2586–97.

Caganova M, Carrisi C, Varano G, Mainoldi F, Zanardi F, Germain P-L, et al. Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. The Journal of clinical investigation. 2013;123:5009–22.

Chan-Penebre E, Armstrong K, Drew A, Grassian AR, Feldman I, Knutson SK, et al. Selective killing of

SMARCA2- and SMARCA4-deficient small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type cells by inhibition of EZH2: in vitro and in vivo preclinical models. Molecular Cancer Therapeutics. 2017;16:850–60.

Chase A, Cross NCP. Aberrations of EZH2 in cancer. Clinical Cancer Research. 2011;17:2613–8.

Copeland RA. Molecular pathways: protein methyltransferases in cancer. Clinical Cancer Research. 2013;19:6344–50.

Ennishi D, Takata K, Béguelin W, Duns G, Mottok A, Farinha P, et al. Molecular and genetic characterization of MHC deficiency identifies EZH2 as therapeutic target for enhancing immune recognition. Cancer Discovery. 2019;9:546–63.

Green MR. Chromatin modifying gene mutations in follicular lymphoma. Blood. 2018;131:595–604.

Jelinic P, Schlappe BA, Conlon N, Tseng J, Olvera N, Dao F, et al. Concomitant loss of SMARCA2 and SMARCA4 expression in small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type. Modern pathology. 2016;29:60–6.

Kadoch C, Crabtree GR. Reversible disruption of mSWI/SNF (BAF) complexes by the SS18-SSX oncogenic fusion in synovial sarcoma. Cell. 2013;153:71–85.

Kadoch C, Copeland RA, Keilhack H. PRC2 and SWI/SNF chromatin remodeling complexes in health and disease. Biochemistry. 2016;55:1600-14.

Kawano S, Grassian AR, Tsuda M, Knutson SK, Warholic NM, Kuznetsov G, et al. Preclinical evidence of anti-tumor activity induced by EZH2 inhibition in human models of synovial sarcoma. PLoS One. 2016;11:e0158888.

Kim KH, Roberts CW. Targeting EZH2 in cancer. Nat Med. 2016;22:128–34.

Knutson SK, Kawano S, Minoshima Y, Warholic NM, Huang K-C, Xiao Y, et al. Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. Molecular Cancer Therapeutics. 2014;13:842–54.

Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. Nature. 2011;469:343–9.

McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. Nature. 2012;492:108–12.

Mlynarczyk C, Fontán L, Melnick A. Germinal center-derived lymphomas: The darkest side of humoral immunity. Immunological reviews. 2019;288:214–39.

Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. Nature genetics. 2010;42:181–5.

Pon JR, Marra MA. Clinical impact of molecular features in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma. Blood. 2016;127:181–6.

Shen JK, Cote GM, Gao Y, Choy E, Mankin HJ, Hornicek FJ, et al. Targeting EZH2-mediated methylation of H3K27 inhibits proliferation and migration of synovial sarcoma in vitro. Scientific Reports. 2016;6:25239.

Sneeringer CJ, Scott MP, Kuntz KW, Knutson SK, Pollock RM, Richon VM, et al. Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010;107:20980–5.

Van Besien K, Schouten H. Follicular lymphoma: a historical overview. Leukemia & Lymphoma. 2007;48:232–43.

Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. Nature. 2002;419:624–9.

Velichutina I, Shaknovich R, Geng H, Johnson NA, Gascoyne RD, Melnick AM, et al. EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. Blood. 2010;116:5247–55.

Wilson BG, Wang X, Shen X, Mckenna ES, Lemieux ME, Cho YJ, et al. Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation. Cancer Cell. 2010;18:316–28.

Yap DB, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng SWG, Moradian A, et al. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. Blood. 2011;117:2451–9.

Yoo KH, Hennighausen L. EZH2 methyltransferase and H3K27 methylation in breast cancer. International journal of biological sciences. 2012;8:59–65.

Zingg D, Debbache J, Schaefer SM, Tuncer E, Frommel SC, Cheng P, et al. The epigenetic modifier EZH2 controls melanoma growth and metastasis through silencing of distinct tumour suppressors. Nat Commun. 2015;6:6051.