2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

タゼメトスタット（以下本薬）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。

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（H3K27）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 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, et al., 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トリメチル化体 H3K27（H3K27me3）のレベルの異常亢進は，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），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），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 に対するファーストインクラスの低分子阻害薬であり，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可能性がある。

本薬の化学構造式を図 2.6-1 に示す

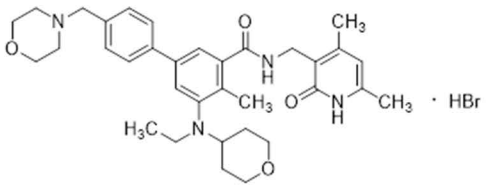
構造式：	
化学名：	*N*-[(4,6-ジメチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル]-5-[エチル(オキサン-4-イル)アミノ]-4-メチル-4'-[(モルホリン-4-イル)メチル]ビフェニル-3-カルボキシアミド一臭化水素酸塩
分子式：	$C_{34}H_{44}N_4O_4 \cdot HBr$
分子量：	653.65

図 2.6-1 タゼメトスタットの構造

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，本薬の非臨床薬理試験ではヒト B 細胞性リンパ腫として，ヒト胚中心 B 細胞型 DLBCL の細胞株を用いた。

本薬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，その阻

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 倍以上強かった。本薬は *EZH2* 変異を有する各種ヒト DLBCL 細胞株，また EZH2 活性が亢進していると考えられる各種ヒト悪性軟部腫瘍細胞株及び各種ヒト SCCOHT 細胞株の H3K27me3 レベルを低下させるとともに増殖を強力に阻害した。

EZH2 変異を有するヒト DLBCL 細胞株を用いたマウス移植モデルにおいて，本薬の 1 日 2 回あるいは 3 回，28 日間等の経口投与は 34.2 から 532 mg/kg の範囲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から腫瘍縮小に至る有意な抗腫瘍効果を示した。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。*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，本薬 571 mg/kg 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腫瘍増殖抑制を示した。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マウス体重減少はほとんどないあるいは 10%以下であった。

本薬の効能又は効果並びに用法及び用量は以下のとおりである。

【効能又は効果】 再発又は難治性の *EZH2* 遺伝子変異陽性の濾胞性リンパ腫（標準的な治療が困難な場合に限る）
【用法及び用量】 通常，成人にはタゼメトスタットとして 1 回 800 mg を 1 日 2 回経口投与する。なお，患者の状態により適宜減量する。

参考文献

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.

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.

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

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

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.

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.

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 3
2.6.2.1 まとめ 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.2.3 副次的薬理試験 35
2.6.2.4 安全性薬理試験 42
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 43
2.6.2.6 考察及び結論 43
2.6.2.7 図表 47
2.6.2.8 参考文献 47

薬理試験の概要文の略号一覧表

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）
BWL	body weight loss	体重減少
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma	びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫
dT/C	delta treatment/control	処理群の変化／対照群の変化
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
FL	follicular lymphoma	濾胞性リンパ腫
GCB	germinal center B-cell-like	胚中心 B 細胞様
H3K4	histone H3 lysine 4	ヒストン H3 の 4 番目のリジン残基
H3K9	histone H3 lysine 9	ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基
H3K27	histone H3 lysine 27	ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基
H3K27me3	trimethylated histone H3K27	トリメチル化 H3K27
H3K36	histone H3 lysine 36	ヒストン H3 の 36 番目のリジン残基
H3K79	histone H3 lysine79	ヒストン H3 の 79 番目のリジン残基
hERG	human ether à-go-go-related gene	ヒト ether à-go-go 関連遺伝子
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎臓
HMT	histone methyltransferase	ヒストンメチル基転移酵素
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
IHC	immunohistochemistry	免疫組織化学染色
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
LCC	lowest cytotoxic concentration	最小細胞毒性濃度
me1	monomethylated form	モノメチル化体
me2	dimethylated form	ジメチル化体
me3	trimethylated form	トリメチル化体
NaCMC	sodium carboxymethyl cellulose	カルボキシメチルセルロースナトリウム
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells	末梢血単核球
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PRC2	polycomb repressive complex 2	ポリコーム抑制複合体 2
RBW	relative body weight	比体重
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
SCID	severe combined immunodeficiency	重症複合免疫不全症
SD	Sprague Dawley	（ラット系統名）
SET	su(var)3-9, enhancer of zeste, trithorax	—
SWI/SNF	switch/sucrose nonfermentable	—
TGI	tumor growth inhibition	腫瘍増殖抑制
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate nick end labeling	ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ・デオキシウリジン三リン酸ニック末端標識

2.6.2 薬理試験の概要文

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した。

2.6.2.1 まとめ

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

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，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）。そのため，EZH2 に対する阻害薬であるタゼメトスタットは FL，DLBCL 等の B 細胞性リンパ腫に対する有効な治療法を提供できると期待される。

タゼメトスタットの効力を裏付ける試験として以下の in vitro 及び in vivo 試験が実施された。なお in vitro 及び in vivo 試験に供することにできる *EZH2* 変異を有する FL の細胞株は知られていないことから 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。

効力を裏付ける in vitro 薬力学的試験；

- 無細胞系での各種 HMT に対する阻害プロファイル
- 細胞系での EZH2 阻害作用
- 各種リンパ腫細胞株に対する細胞増殖抑制作用及びその作用機序

効力を裏付ける in vivo 薬力学的試験；

- 変異型 *EZH2* を発現している DLBCL 細胞株のマウス移植モデルにおける抗腫瘍効果
- 野生型 *EZH2* を発現している DLBCL 細胞株のマウス移植モデルにおける抗腫瘍効果

タゼメトスタットは無細胞系において，野生型 EZH2 及び SET ドメインに変異を有する EZH2（以下変異型 EZH2）の酵素活性を IC_{50} 値 2～38 nmol/L で阻害し，野生型 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 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 のレベルを低下させたことより，細胞系においても EZH2 を特異的に阻害することが示唆された。タゼメトスタットは *EZH2* 変異を有する各種ヒト DLBCL 細胞株，*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，*SMARCA2* 及び *SMARCA4* をともに欠損しているヒト SCCOHT 細胞株の増殖及び *EZH2* 野生型の各種 DLBCL 細胞株の細胞増殖を阻害した。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（WSU-DLCL2，KARPAS-422，Pfeiffer 及び SU-DHL-10）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 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）*の用量で腫瘍増殖抑制（TGI）から腫瘍縮小に至る抗腫瘍効果を示した。腫瘍組織において，用量及び時間依存的に細胞内 H3K27me3 レベルが低下した。*EZH2* が野生型であるヒト DLBCL 細胞株（OCI-Ly19，Toledo 及び MC116）を用いたマウス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。*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，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（ドキソルビシン併用の有りと無しを含む）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独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。

* タゼメトスタット塩酸塩を用いた試験でもこの範囲に入る 40 から 322 mg/kg（塩酸塩）で TGI から腫瘍縮小に至る抗腫瘍効果を示した。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

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（PBMCs），骨髄，脾臓及び皮膚における H3K27me3 レベルを用量依存的に低下させ，その作用は特に骨髄で最も強力であった。ラット皮膚における H3K27me3 レベルの低下は 1 日 1 回 7 日間投与では観測されず，1 日 1 回 22～28 日間投与で有意に認められた。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

心血管系に及ぼす影響については，ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）を発現させたヒト胎児腎臓（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（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。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（タゼメトスタット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。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験の一覧表は 2.6.3.1 項に記載した。

2.6.2.2.1 In vitro 試験

タゼメトスタットの効力を裏付ける in vitro 試験は塩酸塩あるいは臭化水素酸塩を用いて実施された。タゼメトスタットの無細胞系及び細胞系での EZH2 阻害とその特異性，EZH2 の変異ないし機能異常を有するがん細胞に対する細胞増殖阻害とその作用機序について検討した。

2.6.2.2.1.1 無細胞系での各種メチル基転移酵素阻害作用（添付資料 4.2.1.1.1 [試験番号 E7438-PD006]）

本試験では無細胞系において，ヒト野生型 EZH2 及び変異型 EZH2 を含む 24 種類の HMT に対するタゼメトスタットの阻害作用とその選択性について検討した。各酵素はヒト組換え体（ラット EZH2 についてのみラット組換え体）を用い，EZH1 及び EZH2 については PRC2 複合体のサブユニットとして酵素活性を発揮するため，PRC2 複合体としての HMT 活性を測定した。メチル基を提供する基質（ドナー基質）としては一律 S-アデノシルメチオニン（SAM）を用い，メチル基を受け取る基質（アクセプター基質）としては各酵素に対応するヒストン由来のペプチド（EZH1 及び EZH2 については H3K27 を含むペプチド）あるいは細胞から抽出したオリゴヌクレオソームを用いた。

タゼメトスタットは，ヒト野生型 EZH2 の HMT 活性（基質：H3K27 を含むペプチド）を阻害定数 2.5±0.5 nmol/L で阻害した。表 2.6.2.2-1 に示すように，その IC_{50} 値は，11±5 nmol/L（基質：H3K27 を含むペプチド）あるいは 16±12 nmol/L（基質：オリゴヌクレオソーム）であった。EZH2 に対する阻害の IC_{50} 値は 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，タゼメトスタットによる阻害が SAM 競合的であることが示唆された（Knutson, et al., 2013）。タゼメトスタットのヒト変異型 EZH2（A682G，A692V，Y646F，Y646C，Y646H，Y646N，Y646S）*及びラット EZH2 に対する IC_{50} 値は，2～38 nmol/L でありヒト野生型 EZH2 とほぼ同程度であった。

一方，タゼメトスタットのヒト EZH1 に対する IC_{50} 値は 392 nmol/L，その他の 14 種類の HMT（CARM1，DOT1L，EHMT1，EHMT2，PRMT1，PRMT3，PRMT5/MEP50，PRMT6，PRMT8，SETD7，SMYD2，SMYD3，WHSC1，WHSC1L1）に対する IC_{50} 値は 50,000 nmol/L 以上であり，タゼメトスタットは EZH2 に対し高い選択性（EZH1 に比べ 36 倍，14 種類の HMT に対し 3000 倍以上）を示した。

* 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。これらの変異は A677G，A687V，Y641F，Y641C，Y641H，Y641N，Y641S（それぞれアミノ酸残基の番号が 5 つ多い）としても知られている。

表 2.6.2.2-1　無細胞系における各種 HMT に対するタゼメトスタットの阻害作用

HMT		IC_{50} (nmol/L)	10,000 nmol/L における%阻害 [a]
ヒト EZH2[b]	EZH2	11±5[e]	ND
	EZH2[c]	16±12[e]	100±1
ヒト EZH2 変異型[b]	A682G EZH2	2[f]	ND
	A692V EZH2	2[f]	ND
	Y646F EZH2	14±5[e]	ND
	Y646C EZH2	16[g]	ND
	Y646H EZH2	6[g]	ND
	Y646N EZH2	38[f]	ND
	Y646S EZH2	6[g]	ND
ラット EZH2[b]	rat EZH2	4[g]	ND
ヒト EZH1[b]	EZH1	392±72[e]	98±1
その他のヒト HMT	CARM1	>50,000[f]	5±3
	DOT1L[c]	>50,000[g]	2±8
	EHMT1	>50,000[g]	6±6
	EHMT2	>50,000[g]	7±3
	PRMT1	>50,000[g]	5±4
	PRMT3	ND	2±2
	PRMT5/MEP50	>50,000[g]	2±6
	PRMT6	ND	3±3
	PRMT8	>50,000[g]	7±3
	SETD7	ND	4±3
	SMYD2	>50,000[g]	1±2
	SMYD3[d]	ND	0±5
	WHSC1[c]	>100,000[g]	8±3
	WHSC1L1[c]	>100,000[g]	9±8

Rat EZH2（ラット組換え体）を除きヒト組換えタンパク質，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。特に記載する場合を除き，アクセプター基質は各酵素に対応するヒストン由来のペプチドを使用した。
HMT＝ヒストンメチル基転移酵素，IC_{50}＝50%阻害濃度.
a: 2 例（n=2）の平均値±標準偏差
b: PRC2 複合体としての酵素活性を測定
c: アクセプター基質としてヌクレオソームを使用
d: アクセプター基質として MEKK2 を使用
e: 平均値±標準偏差（EZH1: n=4，EZH2: n=4，EZH2[c]: n=6，Y646F EZH2: n=3）
f: 2 例の平均値
g: 1 例の値
データ引用元; 試験番号 E7438-PD006

2.6.2.2.1.2 細胞系でのメチル基転移酵素阻害作用（添付資料 4.2.1.1.2 [試験番号 E7438-PD007]，添付資料 4.2.1.1.3 [試験番号 E7438-PD009]）

本試験では野生型又は変異型 *EZH2* を発現している数種類のヒト DLBCL 細胞株を用い，細胞内 HMT 活性に対するタゼメトスタットの阻害作用について，濃度依存性，時間依存性及び H3K27 に対する基質特異性を検討した。タゼメトスタットで処理した細胞から抽出したヒストンにおける H3K27 のメチル化レベル等ヒストン H3 の翻訳後修飾状態を評価した。

EZH2 変異（Y646F）を有するヒト DLBCL 細胞株，WSU-DLCL2 をタゼメトスタット（0.0013～25 μmol/L）存在下 4 日間培養後，細胞から抽出したヒストンの H3K27 のメチル化状態（細胞増殖に伴って新たに産生されたヒストンにおける H3K27 のトリメチル化，及び脱メチル化された H3K27 の再トリメチル化）を，H3K27me3 に対する特異抗体を用いた酵素免疫測定法（ELISA）により解析した。その結果，図 2.6.2.2-1A に示すように，タゼメトスタットは，媒体対照と比較しての H3K27me3 レベルを濃度依存的に低下させ，IC_{50} 値の平均値は 0.26 μmol/L（n=21）であった（試験番号：E7438-PD007）。

WSU-DLCL2 にタゼメトスタット（1 μmol/L）を加えて最大 7 日まで培養し，様々な時間に抽出したヒストン中の H3K27me3 レベルを western blotting 法で解析した。図 2.6.2.2-1B に示すように，媒体対照と比較して H3K27me3 レベルが 50%低下するのに要する日数は約 1 日であり，95%以上の低下は培養 3～4 日後に認められた（試験番号：E7438-PD009）。

EZH2 が野生型であるヒト DLBCL 細胞株 OCI-Ly19 をタゼメトスタット（2.7 μmol/L）存在下 4 日間培養後，細胞から抽出したヒストン H3 の翻訳後修飾状態（メチル化あるいはアセチル化）の変化について，一連のヒストン H3 翻訳後修飾に対する特異抗体（抗 H3K27me1，抗 H3K27me2，抗 H3K27me3，抗アセチル化 H3K27，抗 H3K4me3，抗 H3K9me3，抗 H3K36me2，抗 H3K79me2 の抗体）及び抗 H3 マウスモノクローナル抗体を用いた western blotting 法で解析した。図 2.6.2.2-1C に示すように，タゼメトスタットにより H3K27 のモノメチル化体（H3K27me1），ジメチル化体（H3K27me2）及びトリメチル化体（H3K27me3）が減少したが，H3K4，H3K9，H3K36，H3K79 のジあるいはトリメチル化体（H3K4me3，H3K9me3，H3K36me2，H3K79me2）はほとんど影響されなかった。一方 H3K27 のアセチル化体（H3K27acetyl）は若干の上昇を認めた。H3K27me1，H3K27me2 及び H3K27me3 は PRC2 の EZH1 あるいは EZH2 によって特異的に生成することが知られている（Copeland, 2013）ことから，前項 2.6.2.2.1.1 の結果とあわせ，タゼメトスタットが，細胞内の EZH2 を特異的に阻害したことが示唆された（試験番号：E7438-PD009）。

図 2.6.2.2-1 において OCI-Ly19 と WSU-DLCL2 における H3K27me3 レベルの低下を比較すると，OCI-Ly19 ではタゼメトスタット（2.7 μmol/L）の 4 日間処理により H3K27me3（western blotting 解析）がほぼ消失した（図 2.6.2.2-1C）。同様に WSU-DLCL2 の H3K27me3 レベル（ELISA 解析）は，タゼメトスタットの 1 μmol/L 以上 4 日間の処理によりほぼ 100%（図 2.6.2.2-1A），またタゼメトスタット 1 μmol/L の 3 日間以上の処理により 95%以上低下した（図 2.6.2.2-1B）。したがって，タゼメトスタットは *EZH2* が野生型である OCI-Ly19 と *EZH2* が変異型である WSU-DLCL2 において，ほぼ同程度に EZH2 を阻害することが示唆された。以上，タゼメトスタットはヒト DLBCL 細胞株の変異型（Y646F）EZH2 及び野生型 EZH2 を強力かつ選択的に阻害すること，WSU-DLCL2 においてタゼメトスタット添加後，H3K27me3 が 95%以上低下するのに要する培養期間は 3～4 日であることが示された。

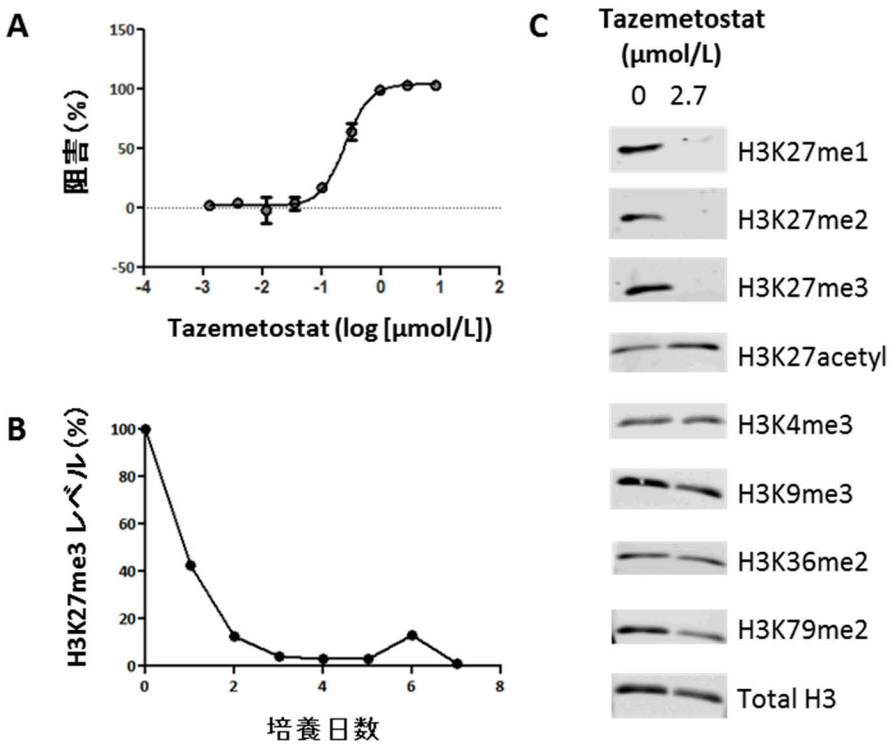


図 2.6.2.2-1　細胞内ヒストンのメチル化に対するタゼメトスタットの影響

A：ヒト WSU-DLCL2（*EZH2* 変異株）細胞内 H3K27 トリメチル化の阻害（濃度依存性）
WSU-DLCL2 を各種濃度のタゼメトスタット存在下 4 日間培養した。縦軸は媒体対照と比較しての H3K27me3 レベル（ELISA 測定）の低下割合（%），各点は 2 重測定の平均値±標準誤差を示す。
独立して実施した 21 回の実験からの 1 例を示す。
B：ヒト WSU-DLCL2（*EZH2* 変異株）細胞内 H3K27me3 レベル（時間依存性）
WSU-DLCL2 をタゼメトスタット（1 µmol/L）存在下 1～8 日間培養した。縦軸は媒体対照と比較しての H3K27me3 レベル（western blotting）（%），各点は 1 例の値を示す。
C：ヒト OCI-Ly19（*EZH2* 野生株）細胞内ヒストン H3 の翻訳後修飾状態
OCI-Ly19 をタゼメトスタット（2.7 µmol/L）存在下あるいは非存在下 4 日間培養した。
各種メチル化ヒストン H3 及びアセチル化ヒストン H3 に対する特異抗体を用いた western blotting を示す。
H3KXmeY = ヒストン H3 の X 番目のリジン残基の Y 個のメチル化体.
データ引用元; 試験番号 E7438-PD007，E7438-PD009

2.6.2.2.1.3 タゼメトスタット代謝物の in vitro 活性（添付資料 4.2.1.1.4 [試験番号 E7438-PD018]）

本試験では，タゼメトスタットの代謝物（M1 [EPZ034163]，M2 [EPZ006633]，M3 [EPZ006931]，M4 [EPZ006938]，M5 [EPZ-6930]，M6 [EPZ007028]，M7 [EPZ034396] 及び M8 [EPZ033883]）（2.6.4.5.1.3 項）について，in vitro 無細胞系及び細胞系での EZH2 酵素活性に対する阻害活性を検討した。2.6.2.2.1.1 項及び 2.6.2.2.1.2 項に記載の方法にしたがって，無細胞系では EZH2 野生型を含む PRC2 複合体（ヒト組換え体）の HMT 活性を SAM（ドナー基質）及び H3K27 を含むヒストン由来ペプチド（アクセプター基質）を用いて測定した。細胞系では WSU-DLCL2 細胞を被験物質存在下 4 日間培養後，細胞から抽出したヒストンの H3K27 のメチル化状態を H3K27me3 に対する特異抗体を用いた ELISA により解析した。

M1～M8 の無細胞系 EZH2 活性に対する阻害活性の IC_{50} 値は 3.4～5900 nmol/L であり，細胞系 EZH2 活性（ヒストン H3K27 メチル化）に対する阻害活性の IC_{50} 値は 0.28～>50 μmol/L の範囲であった。主要な代謝物 M1（EPZ034163），M3（EPZ006931）及び M5（EPZ-6930）（2.6.4.5.1.3 項）の無細胞系での IC_{50} 値を，同じ測定法で求めたタゼメトスタットの IC_{50} 値（11±5 nmol/L，表 2.6.2.2-1）と比較すると，M1 は 1/540，M3 は 1/134，M5 は 1/11～1/31 の活性（タゼメトスタットとの比）であった（表 2.6.2.2-2）。

表 2.6.2.2-2　タゼメトスタット代謝物の in vitro 活性

代謝物 ID，EPZ No,		無細胞系 EZH2 阻害 IC_{50} (nmol/L)	細胞系 EZH2 阻害 IC_{50} (μmol/L)
M1	EPZ034163	5920±1070[a]	>50
M2	EPZ006633	5.6±3.4[a]，　3.4 ±2.0[a]	0.428±0.205[d]
M3	EPZ006931	1470±60[a]	>50
M4	EPZ006938	620±80[b]	>20
M5	EPZ-6930	340±5[a]，　120±30[c]	15.5±8.37[a]
M6	EPZ007028	3.7±1.4[a]	0.277±0.271[d]
M7	EPZ034396	780±330[a]	>50
M8	EPZ033883	180±30[b]	19.5±8.41[a]

M5（EPZ-6930）の無細胞系 EZH2 に対する阻害活性については別に 2 例，DMSO 保存した標品を用いた測定も行ったが，用時調製した標品を用いた測定値より著しく弱く（IC_{50} 値はそれぞれ 830±140，1480±240 nmol/L）保存中に分解したものと考えられたため，その測定値は表から外した。IC_{50}＝50%阻害濃度.
a, b, c, d: それぞれ 2 例，3 例，4 例及び 5 例の平均値±標準偏差
データ引用元; 試験番号 E7438-PD018

2.6.2.2.1.4 *EZH2* 変異を有するヒトリンパ腫細胞に対する細胞増殖阻害作用（添付資料 4.2.1.1.5 [試験番号 E7438-PD008]，添付資料 4.2.1.1.3 [試験番号 E7438-PD009]，添付資料 4.2.1.1.6 [試験番号 E7438-PD010]）

本試験では *EZH2* 変異を有するヒト DLBCL 細胞株，WSU-DLCL2 の細胞増殖に対するタゼメトスタットの阻害作用について検討した。WSU-DLCL2 をタゼメトスタット（0.003～20 μmol/L）存在下 6 日間培養し，CellTiter-Glo®（ATP 測定）を用いて生細胞数を求めた。タゼメトスタットの細胞増殖阻害の IC_{50} 値は 0.28 μmol/L（4 例の平均値)であった（試験番号：E7438-PD008）

別途行った実験において WSU-DLCL2 をタゼメトスタット（0.00015～10 μmol/L）存在下 11 日間培養し，Guava ViaCount Assay（蛍光染色法）により生細胞数を求めた。タゼメトスタットの細胞増殖阻害の IC_{50} 値は 0.0086 μmol/L（15 例の平均値）であり，6 日間培養に比較して阻害作用が強くなった。細胞数の経日変化をみたところ，図 2.6.2.2-2 に示すように，細胞増殖速度の低下ないし増殖停止は，培養 4 日以後に顕著に認められた。この遅延性の細胞増殖阻害は，タゼメトスタット（1 μmol/L）により細胞内 H3K27me3 が 95%以上低下するのに要する日数が 3～4 日であること（前項 2.6.2.2.1.2）と対応していた（試験番号：E7438-PD009）。

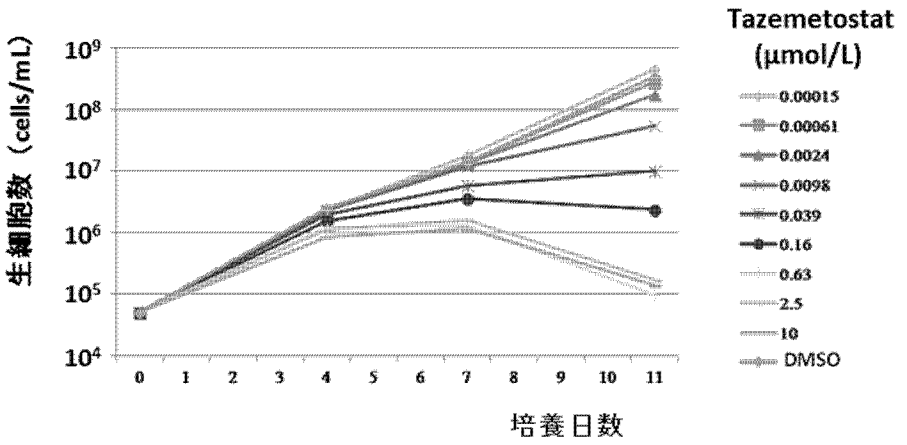


図 2.6.2.2-2　*EZH2* 変異を有するヒト DLBCL 細胞株 WSU-DLCL2 に対するタゼメトスタットの細胞増殖阻害作用

独立して実施した 15 回の実験からの 1 例を示す。DMSO = ジメチルスルホキシド.
データ引用元; 試験番号 E7438-PD009

表 2.6.2.2-3 に示す各種 DLBCL 細胞株，すなわち *EZH2* 変異を有するヒト DLBCL 細胞株 6 株（KARPAS-422，Pfeiffer，RL，SU-DHL-10，SU-DHL-6，WSU-DLCL2），*EZH2* が野生型であるヒト DLBCL 細胞株 4 株（DOHH-2，Farage，OCI-Ly19，Toledo）についての *EZH2* 変異を，細胞 cDNA の sequencing で確認した（試験番号：E7438-PD010）。

これらの細胞をタゼメトスタット（2.4 pmol～10 μmol/L，ただし RL 及び OCI-Ly19 については 2.4 pmol～25 μmol/L）存在下 11 日間培養し，Guava ViaCount Assay（蛍光染色法）により生細胞数を求めた。タゼメトスタットの細胞増殖阻害の IC_{50} 値を求めた結果，表 2.6.2.2-3 に示すように，RL（IC_{50} 値=5.8 μmol/L）を除く *EZH2* 変異株 5 株に対する IC_{50} 値は 0.00049～0.0086 μmol/L，一方 *EZH2* 野生株 4 株の IC_{50} 値は 0.099～7.6 μmol/L であり，*EZH2* 変異株のほうが *EZH2* 野生株よりもタゼメトスタットに対する感受性がより高かった。また 11 日間の細胞増殖におけるタゼメトスタットの最小細胞毒性濃度（LCC：細胞増殖が 100%阻害されるが，増殖開始時に比較し生細胞数の減少は見られない濃度）を算出した。RL（LCC 値>25 μmol/L）を除いた *EZH2* 変異株の LCC 値は，0.0005～0.21 μmol/L，一方 *EZH2* 野生株の LCC 値は 10 μmol/L 以上であった。したがって LCC 値においても概ね *EZH2* 変異株のほうが *EZH2* 野生株よりもタゼメトスタットに対する感受性がより高いことが確認された。一方で表 2.6.2.2-3 に示すように，タゼメトスタットの H3K27 のトリメチル化阻害に対する IC_{50} 値では *EZH2* 変異株 5 株（KARPAS-422，Pfeiffer，RL，SU-DHL-6，WSU-DLCL2）では 2～90 nmol/L，*EZH2* 野生株 OCI-Ly19 では 8 nmol/L であった（試験番号：E7438-PD009）。

WSU-DLCL2 と OCI-Ly19 におけるタゼメトスタットの H3K27 トリメチル化阻害が同程度であることは，前項（2.6.2.2.1.2）でも確認されている。OCI-Ly19 の細胞増殖が，タゼメトスタットにより阻害されにくいことは，少なくともタゼメトスタットによる H3K27 のトリメチル化阻害

の強弱とは対応しなかった。以上，タゼメトスタットは RL を除く *EZH2* 変異を有するヒト DLBCL 細胞株 6 株の内 5 株に対し 10^{-10}～10^{-9} モルオーダーの IC_{50} 値で強力な細胞増殖阻害を示した。また *EZH2* が野生型であるヒト DLBCL 細胞株 4 株に対しても，10^{-8}～10^{-6} モルオーダーの IC_{50} 値で細胞増殖阻害を示した。*EZH2* 変異にともないリンパ腫細胞増殖の EZH2 経路への依存性が高くなる可能性が示唆された。

表 2.6.2.2-3　各種ヒト DLBCL 細胞株におけるタゼメトスタットの H3K27 トリメチル化阻害及び細胞増殖阻害

細胞の種類	細胞株名	*EZH2* 遺伝子	H3K27 トリメチル化阻害 [a] IC_{50} (nmol/L)[a]	細胞増殖阻害 [b] IC_{50} (μmol/L)	LCC (μmol/L)
DLBCL	KARPAS-422	Y646N 変異	90	0.0018	0.12
	Pfeiffer	A682G 変異	2	0.00049	0.0005
	RL	Y646N 変異	22	5.8	>25
	SU-DHL-10	Y646F 変異	ND	0.0058	0.14
	SU-DHL-6	Y646N 変異	20	0.0047	0.21
	WSU-DLCL2	Y646F 変異	9	0.0086	0.17
	DOHH-2	野生型	ND	1.7	>10
	Farage		ND	0.099	>10
	OCI-Ly19		8	>6.2	>10
	Toledo		ND	7.6	>10

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。これらの変異は Y641N，A677G，Y641N，Y641F，Y641N，Y641F（それぞれアミノ酸残基の番号が 5 つ多い）としても知られている。
IC_{50} = 50%阻害濃度，LCC = 最小細胞毒性濃度，ND = 測定せず.
a:　H3K27 トリメチル化阻害は 4 日間の培養後測定（各 n=1）
b:　細胞増殖阻害は 11 日間の培養（タゼメトスタットは計 3 回添加）後測定した。測定値は，OCI-Ly19 については 9 回，Pfeiffer については 2 回，WSU-DLCL2 については 15 回の実験の平均値を示す。それ以外の細胞株については 1 回の実験からの結果を示す。　データ引用元; 試験番号 E7438-PD009，E7438-PD010

2.6.2.2.1.5 INI 機能不全ヒト悪性軟部腫瘍細胞株に対する細胞増殖阻害作用（添付資料 4.2.1.1.7 [試験番号 E7438-PD011]，添付資料 4.2.1.1.8 [試験番号 M[redacted]023]）

がん抑制遺伝子産物として知られる INI1（別名 SNF5，switch/sucrose nonfermentable [SWI/SNF] クロマチンリモデリング複合体のサブユニット）は，EZH2 の HMT 活性を抑制的に調節しているが，悪性ラブドイド腫瘍や滑膜肉腫等の悪性軟部腫瘍では，この調節機構に異常があることが知られている。悪性ラブドイド腫瘍では，*INI1* 欠損のため，また滑膜肉腫では INI1 タンパク質の不安定化によりいずれも INI1 機能不全となり，このために EZH2 活性制御が外れて細胞増殖を支配するようになり，がん化と悪性化の要因になっていると考えられる（Wilson, et al, 2010; Alimova, et al., 2013）。滑膜肉腫では INI1 機能不全が，遺伝子転座による融合タンパク質 SS18-SSX1/2 の発現と相関している。これは SWI/SNF 複合体において，SS18 の替わりに SS18-SSX1/2 が組み込まれることによって，INI1 が SWI/SNF 複合体から追い出され，タンパク質分解酵素による分解を受けやすくなるためである（Shen, et al., 2016; Kawano, et al., 2016）。

本試験では，*INI1* を欠損している（*INI1*[–]）各種ヒト悪性軟部腫瘍（悪性ラブドイド腫瘍）細胞株（G401，A204，G402，KYM-1）とその対照とした *INI1* 発現（*INI1*[+]）各種悪性軟部腫瘍（ヒト横紋筋肉腫）細胞株（RD，SJCRH30）及びヒト胎児腎臓細胞株 HEK293 に対するタゼメトスタットの細胞増殖作用を検討した（試験番号：E7438-PD011）。また，融合タンパク質 SS18-SSX1/2 発現にともない INI1 が不安定化していている各種悪性軟部腫瘍（ヒト滑膜肉腫）細胞株（Fuji, HS-SY-II：*SS18-SSX1/2* 融合を伴う）とその対照とした INI1 が正常である悪性軟部腫瘍細胞株 SW982 に対するタゼメトスタットの細胞増殖阻害作用を検討した（試験番号：M[redacted]023）

各種ヒト悪性ラブドイド腫瘍細胞株，各種ヒト横紋筋肉腫細胞株及びヒト胎児腎臓細胞株をタゼメトスタット（0.006～1100 nmol/L）存在下 4 日間培養し，タゼメトスタットによる H3K27 のトリメチル化阻害の IC_{50} 値を検討した。またこれらの細胞をタゼメトスタット（0.0006～10 μmol/L）存在下 14 日間培養し，タゼメトスタットによる細胞増殖阻害の IC_{50} 値を検討した。また，各種ヒト滑膜肉腫細胞株と SW982 をタゼメトスタット（0.039～10 μmol/L）存在下 14 日間培養し，タゼメトスタットの細胞増殖阻害（14 日間培養後）の IC_{50} 値を検討した。

その結果，表 2.6.2.2-4 に示すように，悪性ラブドイド腫瘍，横紋筋肉腫及び胎児腎臓細胞において，タゼメトスタットの H3K27 トリメチル化阻害作用は，*INI1*(+) 細胞及び *INI1*(–) 細胞で同様であったが（IC_{50} 値：1.4～5.6 nmol/L），タゼメトスタットの細胞増殖阻害作用は，*INI1*(–) 細胞に対しては IC_{50} 値 0.032～1.00 μmol/L，*INI1*(+) 細胞に対しては IC_{50} 値 5.1 μmol/L 以上であり，*INI1*(–) 細胞に対してより強力であった。なお *INI1* 欠損細胞におけるタゼメトスタットの細胞増殖阻害作用は，培養 4 日以降に認められ，この遅延性の作用発現は前述した *EZH2* 変異を有するリンパ腫細胞での結果（2.6.2.2.1.4 項）と一致した。（試験番号：E7438-PD011）。ヒト滑膜肉腫細胞株 Fuji 及び HS-SY-II に対し，タゼメトスタットの細胞増殖阻害作用の IC_{50} 値はそれぞれ 0.15 μmol/L（95%CI: 0.065–0.35）及び 0.52 μmol/L（95%CI: 0.36–0.75）であり，INI1 が正常である悪性軟部腫瘍細胞株 SW982 細胞（IC_{50} 値：>10 μmol/L）に比べ，より強かった（試験番号：M[redacted]023）。

以上，タゼメトスタットは *INI1* 欠損あるいは INI1 が不安定化している各種悪性軟部腫瘍の細胞株に対し，IC_{50} 値 10^{-8}～10^{-7} モルオーダーの細胞増殖阻害を示し，これは対照とした *INI1*[+]あるいは INI1 正常の細胞 4 株に対する株に対する阻害（IC_{50} 値 >5 あるいは>10 × 10^{-6} モル）より強力であった。

表 2.6.2.2-4　各種ヒト悪性軟部腫瘍細胞株及び胎児腎細胞におけるタゼメトスタットの H3K27 トリメチル化阻害及び細胞増殖阻害

細胞の種類	細胞株名	INI1 遺伝子/タンパク質	H3K27 トリメチル化阻害[a] IC_{50} (nmol/L)	細胞増殖阻害[b] IC_{50} (μmol/L)			
				実験回数	個別値	平均値	標準誤差
悪性軟部腫瘍・悪性ラブドイド腫瘍	G401	*INI1* (–)	2.7	2	0.141, 0.129	0.135	NA
	A204		1.4	3	0.59, 1.34, 1.41	1.11	0.262
	G402		1.7	2	0.170, 0.119	0.145	NA
	KYM-1		4.3	3	0.019, 0.040, 0.038	0.032	0.007
悪性軟部腫瘍・横紋筋肉腫	RD	*INI1* (+)	5.6	2	6.1, >10	NA	NA
	SJCRH30		4.9	2	5.1, >10	NA	NA
胎児腎細胞[c]	HEK293		2.4	2	>10, >10	>10	NA
悪性軟部腫瘍・滑膜肉腫	Fuji	INI1 不安定化（*SS18-SSX1/2* 融合を伴う）	ND	3	0.10, 0.20, 0.16	0.15	0.029
	HS-SY-II		ND	3	0.44, 0.58, 0.54	0.52	0.042
悪性軟部腫瘍[d]	SW982	INI1 正常（*SS18-SSX1/2* 融合を伴わない）	ND	3	>10, >10, >10	>10	NA

IC_{50} = 50%阻害濃度，NA = 該当せず，ND = 測定せず.
a: H3K27 トリメチル化阻害は 4 日間の培養後測定（n=1）
b: 細胞増殖阻害は 14 日間の培養後に測定
c: 正常細胞
d: 組織型は不明
データ引用元；試験番号 E7438-PD011，M[redacted]023

2.6.2.2.1.6 SMARCA2/4 欠損ヒト SCCOHT 細胞株に対する細胞増殖阻害作用（添付資料 4.2.1.1.9 [試験番号 E7438-PD026]）

SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体のサブユニットである SMARCA2 及び SMARCA4 の欠損もまた SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体の機能不全を起こし，これによって EZH2 活性制御が外れることが知られている。*SMARCA2* 及び *SMARCA4* の遺伝子が二重に欠損している SCCOHT では EZH2 に依存した細胞増殖が認められ，これががん化と悪性化の要因になっている（Chan-Penebre, et al., 2017）。本試験では，4 種のヒト SCCOHT 細胞株（Bin-67，COV434，TOV112D，OVK18）をタゼメトスタット（0.000508～10 μmol/L）存在下 4 日間あるいは 14 日間培養し，タゼメトスタットによる H3K27 のトリメチル化阻害（4 日間培養後）と細胞増殖阻害（14 日間培養後）の IC_{50} 値を比較検討した。

表 2.6.2.2-5 に示すように，SCCOHT 細胞株において，タゼメトスタットの H3K27 トリメチル化阻害作用の IC_{50} 値は 8～32 nmol/L，細胞増殖阻害作用は 0.073～0.86 μmol/L であった。以上，

タゼメトスタットはSCCOHT細胞株4株に対しても*INI1*欠損あるいはINI1が不安定化している悪性軟部肉腫細胞株と同様，IC_{50}値10^{-8}～10^{-7}モルオーダーの細胞増殖抑制を示した。

表 2.6.2.2-5　各種ヒトSCCOHT細胞株におけるタゼメトスタットのH3K27トリメチル化及び細胞増殖阻害

細胞の種類	細胞株名	SMARCA2/4 遺伝子	H3K27トリメチル化 阻害[a] IC_{50} (nmol/L)	細胞増殖阻害[b] IC_{50} (µmol/L)
SCCOHT	Bin-67	*SMARCA2*(–) *SMARCA4*(–)	8	0.29
	COV434	*SMARCA2*(–) *SMARCA4*(–)	8	0.073
	TOV112D	*SMARCA2*(–) *SMARCA4*(–)	10	0.34
	OVK18	*SMARCA2*(–) *SMARCA4*(–)	32	0.86

IC_{50}＝50%阻害濃度，SCCOHT＝ 高カルシウム血症型卵巣小細胞癌.
a:　H3K27トリメチル化阻害は4日間の培養後測定
b:　細胞増殖阻害は14日間の培養後に測定
データ引用元; 試験番号E7438-PD026

2.6.2.2.1.7 細胞増殖阻害作用の機序（添付資料 4.2.1.1.3 [試験番号 E7438-PD009]，添付資料 4.2.1.1.7 [試験番号 E7438-PD011]）

本試験ではタゼメトスタットの*EZH2*変異を有する細胞あるいは*INI1*欠損細胞に対する細胞増殖阻害作用について，細胞周期及びアポトーシスとの関連を検討した。

*EZH2*変異を有するヒトDLBCL細胞株WSU-DLCL2をタゼメトスタット（1 µmol/L）存在下，1日～最長7日間培養し，細胞周期（sub-G1，G1，S，G2/M）の変化をフローサイトメーターで解析した。その結果，図 2.6.2.2-3Aに示すように，培養開始後2日からG1期の細胞の割合が増加し，S期及びG2/M期の細胞の割合が低下した。この変化は培養開始4日後に最大となった。Sub-G1期の細胞の明らかな増加は認められなかったことから，タゼメトスタットとの7日間までの培養ではアポトーシスは誘導されないことが示唆された（試験番号：E7438-PD009）。

WSU-DLCL2細胞をタゼメトスタット（1 µmol/L）存在下14日間培養し，ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ・デオキシウリジン三リン酸ニック末端標識（TUNEL）法によってアポトーシスの指標としてのDNA断片化を解析した。その結果，図 2.6.2.2-3Bに示すように，DNA断片化を起こした細胞が培養開始後14日に媒体対照と比較して増加したことから，タゼメトスタットによる生細胞数減少は，主としてアポトーシスによるものであった。2.6.2.2.1.4項で示した増殖曲線の結果とあわせ，タゼメトスタット処理によって*EZH2*変異を有するヒトWSU-DLCL2細胞では培養4日以降に細胞の増殖停止が起き，続いて培養7日以降に，アポトーシスによる生細胞数減少が起こることが示された（試験番号：E7438-PD009）。

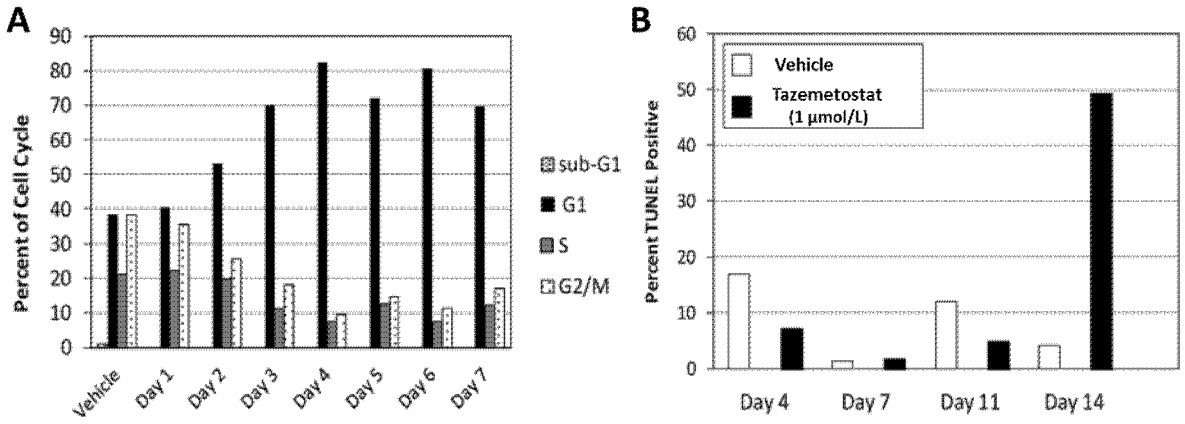


図 2.6.2.2-3　WSU-DLCL2 細胞におけるタゼメトスタットの細胞周期への影響及びアポトーシス誘導

A：細胞周期解析（培養 1～7 日）
B：アポトーシス解析（培養 4～14 日）
縦軸は各細胞周期にある細胞あるいは TUNEL 染色陽性（アポトーシスを起こした細胞）の割合（%）。
細胞はタゼメトスタット（1 µmol/L）を含む培地中で最長 14 日まで培養した（途中 4，7 及び 11 日に継代）
TUNEL = ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ・デオキシウリジン三リン酸ニック末端標識．　データ引用元; 試験番号 E7438-PD009

INI1 欠損（*INI1*[–]）の悪性ラブドイド腫瘍細胞株 G401 及び *INI1* 発現（*INI1*[+]）の横紋筋肉腫細胞株 RD をタゼメトスタット（1 µmol/L）存在下最長 14 日間培養し，細胞周期（sub-G1, G1, S, G2/M）の変化並びに TUNEL 法によるアポトーシスを起こした細胞の割合を解析した。

図 2.6.2.2-4A に示すように，タゼメトスタット処理した G401 細胞では，培養開始 7 日後に G1 期にある細胞の割合が増加し，S 期及び G2/M 期の細胞の割合が低下した。sub-G1 期の割合及び TUNEL 法によって示されるアポトーシスを起こした細胞の割合が培養開始後 11～14 日に順次増加した。以上の結果から，前述した *EZH2* 変異を有する DLBCL 細胞と同様に，*INI1* 欠損の G401 細胞でも，タゼメトスタット処理によって増殖停止とそれに続くアポトーシスが起こることが示された。ただし増殖停止とアポトーシスが起きるまでの時間はいずれも DLBCL 細胞の場合より約 2 倍近くを要した。一方図 2.6.2.2-4B に示すように，タゼメトスタット処理した *INI1* 発現 RD 細胞では最長 14 日間までの培養で，細胞周期の割合は変化せず，アポトーシスはほとんど生じなかった（試験番号：E7438-PD011。）

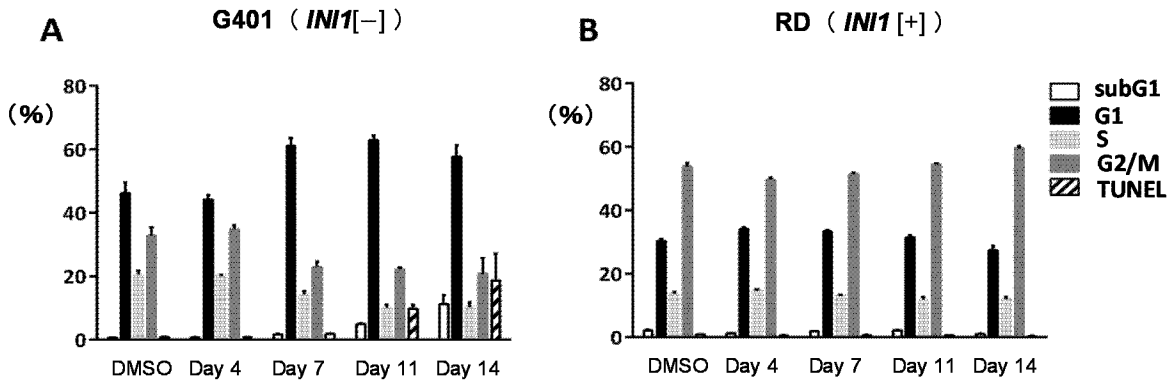


図 2.6.2.2-4　*INI1* 欠損細胞及び *INI1* 発現細胞におけるタゼメトスタットの細胞周期への影響及びアポトーシス誘導

A：G401（*INI1*[−]），培養 4～14 日
B：RD （*INI1*[+]），培養 4～14 日
縦軸は各細胞周期にある細胞あるいは TUNEL 染色陽性（アポトーシスを起こした細胞）の割合（%）。
各カラムは平均値±標準誤差（n=2）を示す。
細胞はタゼメトスタット（1 μmol/L）を含む培地中で最長 14 日まで培養した（途中 4，7 及び 11 日に継代）
データ引用元; 試験番号 E7438-PD011

2.6.2.2.2 In vivo 試験

タゼメトスタットの効力を裏付ける in vivo 試験は塩酸塩あるいは臭化水素酸塩を用いて実施された。タゼメトスタットの抗腫瘍効果は，*EZH2* 変異を有する 4 種類のヒト DLBCL 細胞株（WSU-DLCL2，KARPAS-422，Pfeiffer，SU-DHL-10）及び *EZH2* 変異を有しない 3 種類ヒト DLBCL 細胞株（OCI-Ly19，Toledo，MC116）を皮下移植したマウスモデルを用いて評価した。WSU-DLCL2 移植モデルと SU-DHL-10 移植モデルにおいては，それぞれ CHOP レジメン及び COP レジメンとの併用による抗腫瘍効果も評価した（表 2.6.2.2-6）。

初回投与日を Day 1 とし，腫瘍体積及び体重は Day 1 以降少なくとも週に 2 回測定を行った。腫瘍体積は「腫瘍体積 (mm^3) = 長径 (mm) × (短径 [mm])^2 × 1/2」によって算出した。投与最終日における腫瘍増殖の程度を「dT/C (%) = dT/dC × 100（dT と dC はそれぞれ処理群と対照群の投与開始日*からの腫瘍体積の変化）」により求めた。腫瘍体積が投与開始時よりも少さくなった場合は腫瘍縮小とした。一部のモデルにおいてマウス血漿及び腫瘍中のタゼメトスタットの濃度を液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析（LC-MS/MS）で測定した。タゼメトスタットの血漿中濃度及び腫瘍組織内濃度は，重量濃度（μg/mL あるいは μg/g）にモル濃度（μmol/L あるいは μmol/kg）を併記した。また腫瘍からヒストンを抽出後，ヒストン H3 あたりの H3K27me3 レベルを抗ヒト H3 マウスモノクローナル抗体及び抗 H3K27me3 ウサギモノクローナル抗体を用いた ELISA で測定した。比体重（RBW）は，個々のマウスにおいて「RBW = 測定日の体重 / 投与開始日*の体重」により算出し，群における平均値で評価した。投与群の RBW の平均値が 0.8 未満である場合，顕著な体重減少（BWL）とした。投与群に顕著な BWL を認めない場合に忍容性があるとした。

* 一部の試験では投与開始日（Day 1）の代わりにその前日の群分け日（Day –1）を基準に dT/C (%) 及び RBW を算出した。

表 2.6.2.2-6　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 例/群	タゼメトスタット[a] 40, 80, 160 mg/kg (TID×28)	160 mg/kg で TGI	E7438-PD001
KARPAS-422（Y646N 変異）	無胸腺雌 9 例/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 9 例/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 例/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
Pfeiffer（A682G 変異）	NOD-SCIDγ 雌 9 例/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	PPC20[redacted]-03N
OCI-Ly19（野生型）	SCID 雌 8 例/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 例/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強い TGI	E7438-PD001
SU-DHL-10（Y646F 変異）	SCID 雌 16 例/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

2.6.2.2.2.1 ヒト DLBCL 細胞株 WSU-DLCL2 移植モデルにおける抗腫瘍効果（添付資料 4.2.1.1.10 [試験番号 E7438-PD001]）

本試験では，*EZH2* Y646F 変異を有するヒト DLBCL 細胞株 WSU-DLCL2 を重症複合免疫不全症（SCID）マウス（雌）に移植したモデルにおいて，タゼメトスタットの抗腫瘍効果を検討した。対照として抗 DLBCL 療法に一般に使用されているシクロホスファミドの抗腫瘍効果を確認した。WSU-DLCL2 を 8～9 週齢の雌 SCID マウスに皮下移植し，平均腫瘍体積 117～119 mm^3 の時点（Day 1）で，媒体対照の（0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム [NaCMC]，0.1% Tween 80）あるいはタゼメトスタット塩酸塩（40，80，160 mg/kg）の 1 日 3 回 28 日間（Day 1～29：Day 1 は 2 回，Day 29 は 1 回）の経口投与を開始した（各群 12 例）。また同時に 2 つの対照群（各群 6 例）をもうけ，一つの群はシクロホスファミド（100 mg/kg）を 1 日 1 回 5 日間投与，もう一群は無処理群として投与を行わなかった。腫瘍体積は週に 2 回，体重は Day 5 まで 1 日 1 回，以降週に 2 回測定した。Day 29 最終投与の 3 時間後にマウスの血漿と腫瘍を採取し，タゼメトスタットの濃度を測定するとともに腫瘍中の H3K27me3 レベルを測定した。なお腫瘍中の H3K27me3 レベルの時間経過を評価する目的で，別途 160 mg/kg の 1 日 3 回 7 日間（Day 1～8：Day 1 は 2 回，Day 8 は 1 回）の経口投与を行った（6 例）。

タゼメトスタットの Day 29 最終投与 3 時間後の血漿中濃度は，40，80，160 mg/kg 投与群でそれぞれ 1.14，3.30，6.52 µg/mL（モル換算 1.99，5.76，11.4 µmol/L）であった（12 例の平均値）。また腫瘍組織中濃度は，それぞれ 1.83，9.36，50.7 µg/g（モル換算 3.20，16.3，88.5 µmol/kg）であった（9～11 例の平均値）。これより，タゼメトスタットの腫瘍組織中濃度は用量依存的に増加していることが示された。

図 2.6.2.2-5 に示すように，160 mg/kg 投与群では有意な TGI がみられ，Day 29 における dT/C は 42%であった。シクロホスファミド投与群では Day 4 以降腫瘍縮小がみられた。タゼメトスタット投与群で平均の BWL は最大用量でも 6%以内であり忍容性は良好であった。

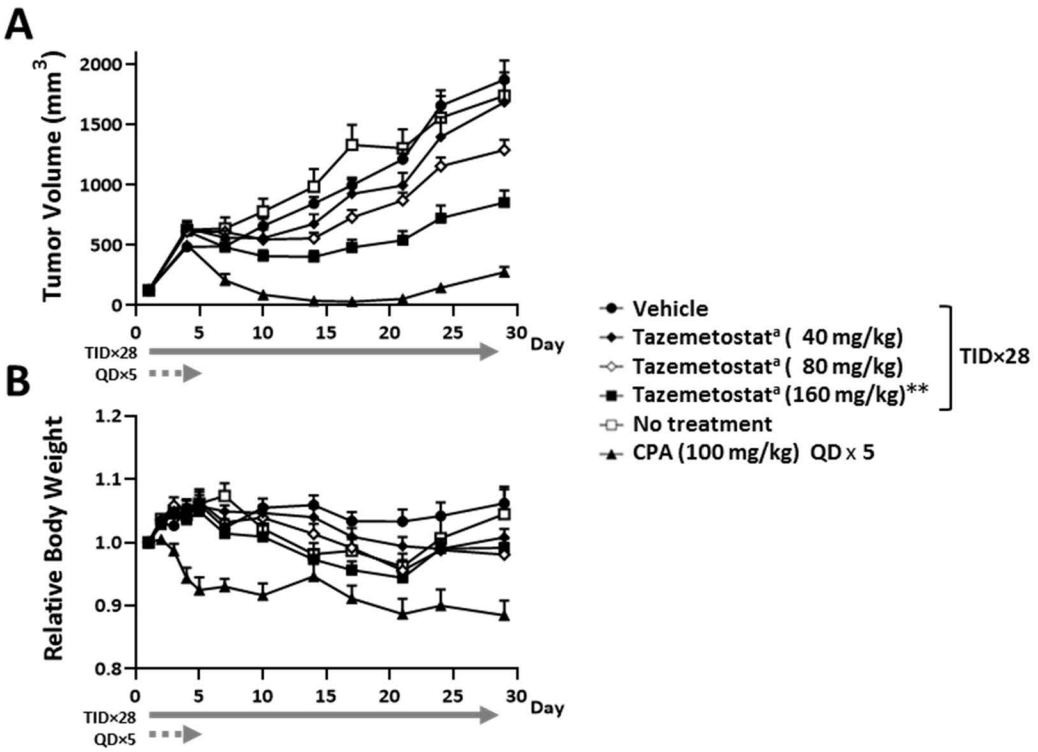


図 2.6.2.2-5　ヒト DLBCL 細胞株 WSU-DLCL2 移植モデルにおけるタゼメトスタットの抗腫瘍効果

A：腫瘍体積変化
B：マウス体重変化
各点は平均値+標準誤差（n=12，ただし No treatment 群及び CPA 投与群は n=6）を示す。横軸下の実線の矢印はタゼメトスタットの，破線の矢印は CPA の投与期間を示す。
CPA＝ シクロホスファミド，QD＝1 日 1 回，TID＝1 日 3 回.
a:　タゼメトスタット塩酸塩
** P<0.01　経時変化における媒体対照群との比較（反復測定分散分析後，Dunnett 型多重比較検定）
データ引用元; 試験番号 E7438-PD001

図 2.6.2.2-6 に示すように，最終投与 3 時間後に採取した腫瘍組織の H3K27me3 レベルはタゼメトスタットの用量依存的に低下していた。160 mg/kg の 1 日 3 回 28 日間投与群の H3K27me3 レベルを，同用量の 1 日 3 回 7 日間投与群の H3K27me3 レベルと比較すると，28 日間投与群のほうが有意に低かった。これらの結果から，タゼメトスタットにより H3K27me3 レベルが用量及び時間依存的に低下したことが示された。

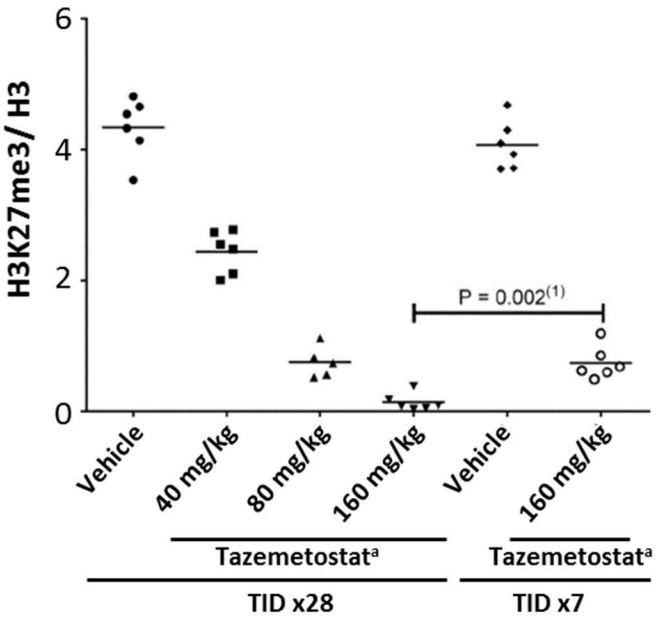


図 2.6.2.2-6　ヒト DLBCL 細胞株 WSU-DLCL2 移植モデルにおけるタゼメトスタット投与後の腫瘍内 H3K27me3 レベル

タゼメトスタットを TID×28 投与若しくは TID×7 投与し，最終投与 3 時間後腫瘍を摘出した。縦軸は，腫瘍内のヒストン H3 あたり H3K27me3 レベルを示す。各点は個体別の値，バーは平均値（n=6）を示す。
TID = 1 日 3 回.
a: タゼメトスタット塩酸塩
b: *P* 値は *t* 検定（両側）
データ引用元; 試験番号 E7438-PD001

2.6.2.2.2 ヒト DLBCL 細胞株 KARPAS-422 移植モデルにおける抗腫瘍効果（添付資料 4.2.1.1.11 [試験番号 M[redacted]024]，添付資料 4.2.1.1.12 [試験番号 M[redacted]002]，添付資料 4.2.1.1.13 [試験番号 W-20[redacted]0483]）

本試験では，*EZH2* Y646N 変異を有するヒト DLBCL 細胞株 KARPAS-422 を無胸腺マウス（雌）に移植したモデルにおいて，タゼメトスタットの各用量，各投与スケジュールにおける抗腫瘍効果を検討した。

KARPAS-422 を 7 週齢の雌無胸腺マウスに皮下移植し，平均腫瘍体積 150 mm^3 の時点（Day 1）で，媒体対照（0.5% NaCMC，0.1% Tween 80）あるいはタゼメトスタット塩酸塩（80.5，161，322，644 mg/kg）を 1 日 2 回 28 日間（Day 1～29：Day 1 と Day 29 は 1 回）経口投与した（各群 9 例）。腫瘍体積及び体重を週に 2 回測定した。Day 29 最終投与の 3 時間後にマウスの血漿を採取し，タゼメトスタットの血漿中濃度を測定した（試験番号：M[redacted]024）。

Day 29 最終投与の 3 時間後に各群から全例（644 mg/kg 投与群からは生存していた 7 例）の血漿を採取し，LC-MS/MS によりタゼメトスタットの血漿中濃度を測定した。80.5，161，322，644 mg/kg 投与群で，タゼメトスタットの血漿中濃度はそれぞれ 1.16，3.52，9.31，27.08 μg/mL

（モル換算 2.03，6.15，16.3，47.3 μmol/L）であった。

図 2.6.2.2-7A に示すように，1 日 2 回 28 日間投与は 80.5 mg/kg で TGI，161 及び 322 mg/kg では腫瘍縮小を起こした。Day 29 までに 161mg/kg 及び 322 mg/kg 投与群ではともに 7/9 例で腫瘍消失が認められた。644 mg/kg 投与群では Day 17 と Day 29 にそれぞれ 1 例，計 2/9 の死亡例が出たため，最大耐量を超えているとした。322 mg/kg まで死亡例はなく，投与群の平均の BWL は 5%以内であった（図 2.6.2.2-7B）。

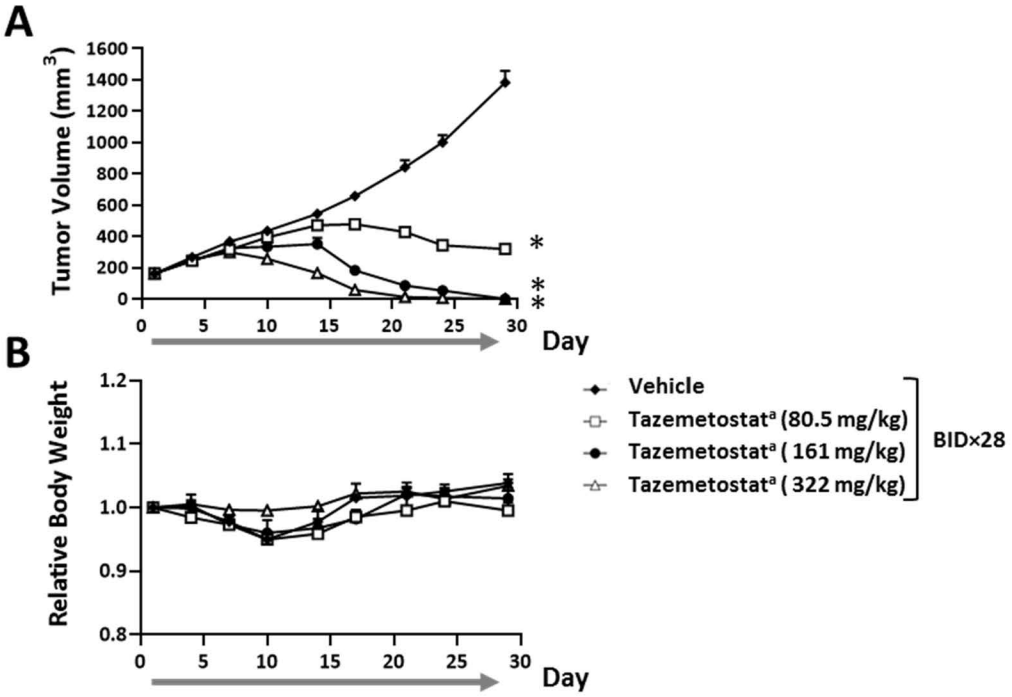


図 2.6.2.2-7　ヒト DLBCL 細胞株 KARPAS-422 移植モデルにおけるタゼメトスタットの抗腫瘍効果 (1)

A：腫瘍体積変化
B：マウス体重変化
各点は平均値+標準誤差（n=9），横軸下の矢印はタゼメトスタットの投与期間を示す。644 mg/kg 投与群のデータは本試験での最大耐量を超えるため表示せず。BID = 1 日 2 回.
a:　タゼメトスタット塩酸塩
* $P<0.05$ vs. Day 29 の媒体対照（反復測定分散分析後，Dunnett 型多重比較検定）.
データ引用元; 試験番号 M[redacted]024

同モデルにおいてタゼメトスタットを 3 種類のスケジュールで投与し，抗腫瘍効果を比較した。KARPAS-422 を 6 週齢の雌無胸腺マウスに皮下移植し，14 日後，各群 9 例（各群の平均腫瘍体積は 203～209 mm^3）とし（Day 1），媒体対照（0.5% NaCMC，0.1% Tween 80）あるいはタゼメトスタット臭化水素酸塩（90，361 mg/kg）を a) 1 日 2 回 28 日間（BID×28），b) 7 日間投与＋7 日間休薬の投与サイクル 2 回繰り返し（[BID×7/2W]×2），あるいは c) 21 日間投与＋7 日間休薬（BID×21/4W）の各スケジュールで経口投与した。腫瘍体積及び体重を週に 2 回測定した（試験番号：M[redacted]002）。

図 2.6.2.2-8A に示すように，3 種類のスケジュールいずれにおいても，90 mg/kg 投与群では TGI が，361 mg/kg 投与群では腫瘍縮小がみられた。361 mg/kg では BID×28，(BID×7/2W)×2，BID×21/4W でそれぞれ，9/9 例，4/8，9/9 例で腫瘍消失が認められた。361 mg/kg 投与群の (BID×7/2W)×2 では Day 7 に 1/9 例の死亡が見られたが，全ての投与スケジュールで投与群の BWL もほとんどなく（5%以内）忍容性が認められた（図 2.6.2.2-8B）。

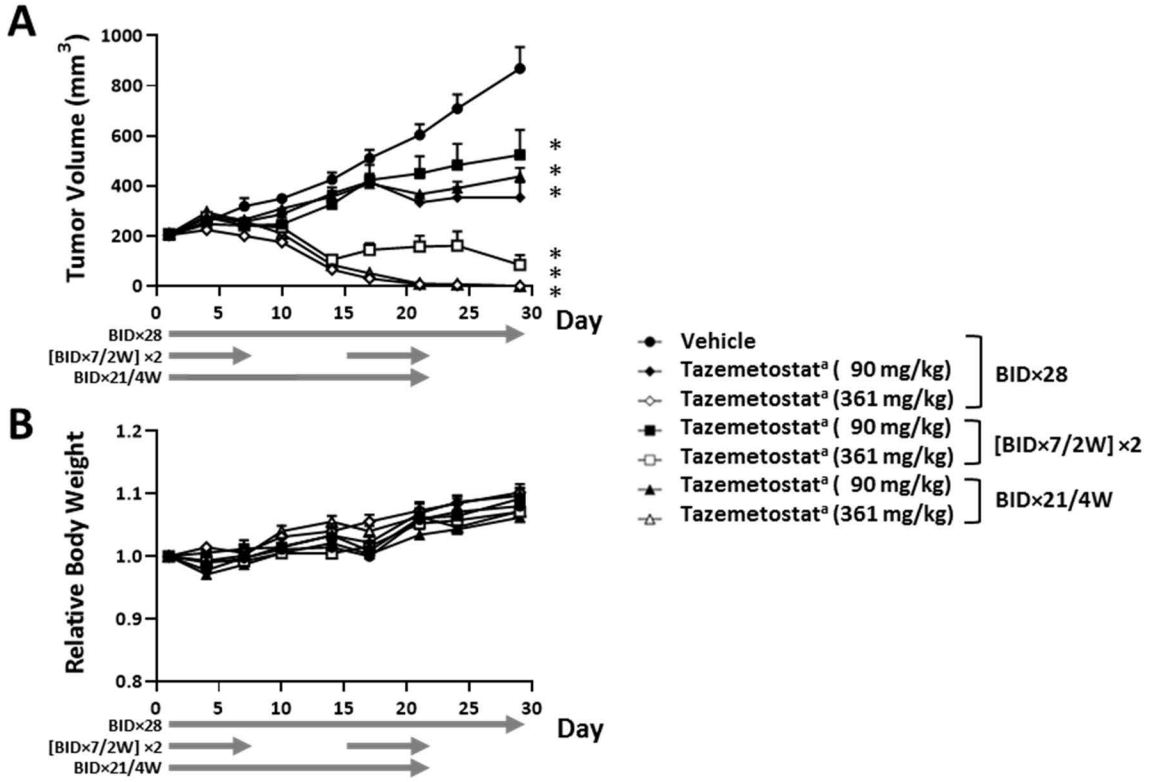


図 2.6.2.2-8　ヒト DLBCL 細胞株 KARPAS-422 移植モデルにおけるタゼメトスタットの抗腫瘍効果 (2)

A：腫瘍体積変化
B：マウス体重変化
各点は平均値+標準誤差（n=8～9），横軸下の矢印はタゼメトスタットの投与期間を示す。361 mg/kg の (BID×7/2W)×2 では Day 7 に 1/9 例の死亡が見られた。BID＝1 日 2 回.
a:タゼメトスタット臭化水素酸塩
* $P<0.05$ vs.媒体対照，Day 29（反復測定分散分析の後，Dunnett の多重比較検定）
データ引用元; 試験番号 M[redacted]002

同モデルにおいて，タゼメトスタット投与後の腫瘍中 H3K27me3 レベルを評価した（試験番号：W-20[redacted]0483）。KARPAS-422 を 9 週齢の雌無胸腺マウスに皮下移植し，平均腫瘍体積が 250 mm^3 になった時点で各群 6 例とし（Day 1），媒体対照（0.5% NaCMC，0.1% Tween 80）あるいはタゼメトスタット臭化水素酸塩の 75，150，301，602 mg/kg を 1 日 2 回 7 日間，あるいは 150，301，602，1203 mg/kg を 1 日 1 回 7 日間のスケジュールで経口投与した。最終投与（Day 7）の 3 時間後にマウスの血漿と腫瘍を採取し，血漿中のタゼメトスタットの濃度，また腫瘍中 H3K27me3 レベルを測定した。

最終投与 3 時間後のタゼメトスタットの血漿中濃度は，75，150，301，602 mg/kg を 1 日 2 回 7 日間投与では，それぞれ 1.30，3.50，8.90，14.4 μg/mL（モル換算 2.27，6.11，15.5，25.1 μmol/L），150，301，602，1203 mg/kg を 1 日 1 回 7 日間投与では，それぞれ 3.03，8.72，14.0，27.6 μg/mL（モル換算 5.29，15.2，24.4，48.2 μmol/L）であり（各群 6 例の平均値），どちらのスケジュールでも用量依存的な増加が認められた。

図 2.6.2.2-9 に示すように，タゼメトスタットの 1 日の総投与量をそろえた 2 種類のスケジュールにおいて，最終投与後の腫瘍中 H3K27me3 レベルは，いずれも用量依存的に低下した。媒体対照と比較した H3K27me3 レベルは，75，150，301，602 mg/kg の 1 日 2 回 7 日間投与では，それぞれ 76%，42%，26%，22%に低下，150，301，602，1203 mg/kg の 1 日 1 回 7 日間投与では，それぞれ 85%，65%，37%，20%に低下した。1 日あたり総用量が同じでも 1 日 1 回より 1 日 2 回のほうがより強い H3K27me3 レベルの低下がみられた。

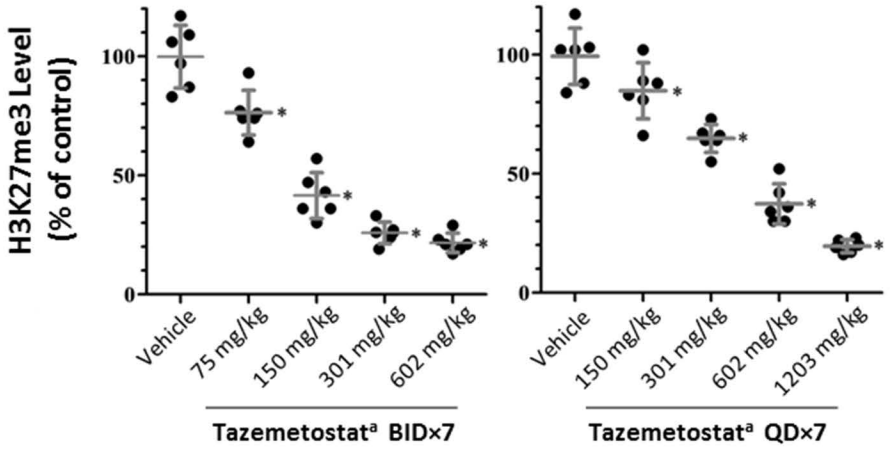


図 2.6.2.2-9　ヒト DLBCL 細胞株 KARPAS-422 移植モデルにおけるタゼメトスタット投与後の腫瘍内 H3K27me3 レベル

タゼメトスタットを BID×7 投与若しくは QD×7 投与し，最終投与 3 時間後腫瘍を摘出した。縦軸は腫瘍細胞の H3K27me3 レベル（媒体対照群の平均 H3K27me3 レベルに対する%），各シンボルは個体別の値，横線はその平均値±標準偏差を示す（n=6）
BID = 1 日 2 回，QD = 1 日 1 回.
a: タゼメトスタット臭化水素酸塩
* $P<0.05$ vs. 媒体対照（一元配置分散分析の後，Dunnett の多重比較検定）
データ引用元; 試験番号 W-20[redacted]0483

以上，*EZH2* Y646N 変異を有するヒト DLBCL 細胞株 KARPAS-422 を無胸腺マウス（雌）に移植したモデルにおいて，タゼメトスタット塩酸塩（80.5，161，322，644 mg/kg）1 日 2 回 28 日間経口投与は 322 mg/kg までの用量で忍容性があり，全ての用量で TGI，161 mg/kg 以上で腫瘍縮小を示した。タゼメトスタット臭化水素酸塩（90，361 mg/kg）について，BID×28，(BID×7/2W)×2，あるいは BID×21/4W の 3 種類のスケジュールを検討した結果，スケジュールによる抗腫瘍効果の違いは少なく，いずれも 90 mg/kg 投与群では TGI が，361 mg/kg 投与群では腫瘍縮小が認められた。全ての投与スケジュールで投与群の平均の BWL もほとんどなく（5%以

内）忍容性が認められた。タゼメトスタット臭化水素酸塩（75～602 mg/kg，1 日 2 回 7 日間，あるいは 150～1203 mg/kg，1 日 1 回 7 日間）の経口投与は，投与最終日においていずれも用量依存的にタゼメトスタットの血漿中濃度を増加させ，また腫瘍中の H3K27me3 レベルを低下させた。

2.6.2.2.2.3 ヒト DLBCL 細胞株 Pfeiffer 移植モデルにおける抗腫瘍効果（添付資料 4.2.1.1.14 [試験番号 PPC20[redacted]-03N]）

本試験では，*EZH2* A682G 変異を有する細胞株 Pfeiffer を NOD-SCIDγ マウス（雌）に移植したモデルにおいて，タゼメトスタットの抗腫瘍効果を検討した。マウスで in vivo 継代した Pfeiffer の移植片を 6 週齢の NOD-SCIDγ 雌マウスに皮下移植し，平均腫瘍体積 323 mm^3 の時点（Day 1）で，マウスを各群 9 例，5 群に群分けし，媒体対照（0.5% NaCMC，0.1% Tween 80）あるいはタゼメトスタット臭化水素酸塩（34.2，114，342 mg/kg）を 1 日 1 回 28 日間，あるいはタゼメトスタット臭化水素酸塩（1140 mg/kg）を 1 日 1 回 12 日間経口投与した。腫瘍体積及び体重を週に 2 回測定した。

図 2.6.2.2-10A に示すように，タゼメトスタットの 1 日 1 回投与は 34.2 mg/kg で TGI，また 114 mg/kg 以上で腫瘍縮小を起こした。さらには 114，342，1140 mg/kg 投与群の全例において腫瘍消失が認められ，投与終了の 36 日後（試験終了）まで腫瘍の再増殖は認められなかった。342 mg/kg までの投与群では平均の BWL は 7%以内であり忍容性が認められた（図 2.6.2.2-10B）。1140 mg/kg の 1 日 1 回投与群では，Day 12 の投与後，9 例中 3 例のマウスで極度の運動低下などの状態悪化が見られた。

タゼメトスタットが検討した各種 DLBCL 移植モデルの中で Pfeiffer 移植モデルに対し最も強い抗腫瘍効果を示したことは，タゼメトスタットが in vitro での各種 DLBCL を用いた増殖阻害試験において Pfeiffer に対し最も強力な細胞増殖阻害作用を示したこと（2.6.2.2.1.4 項）と対応していた。

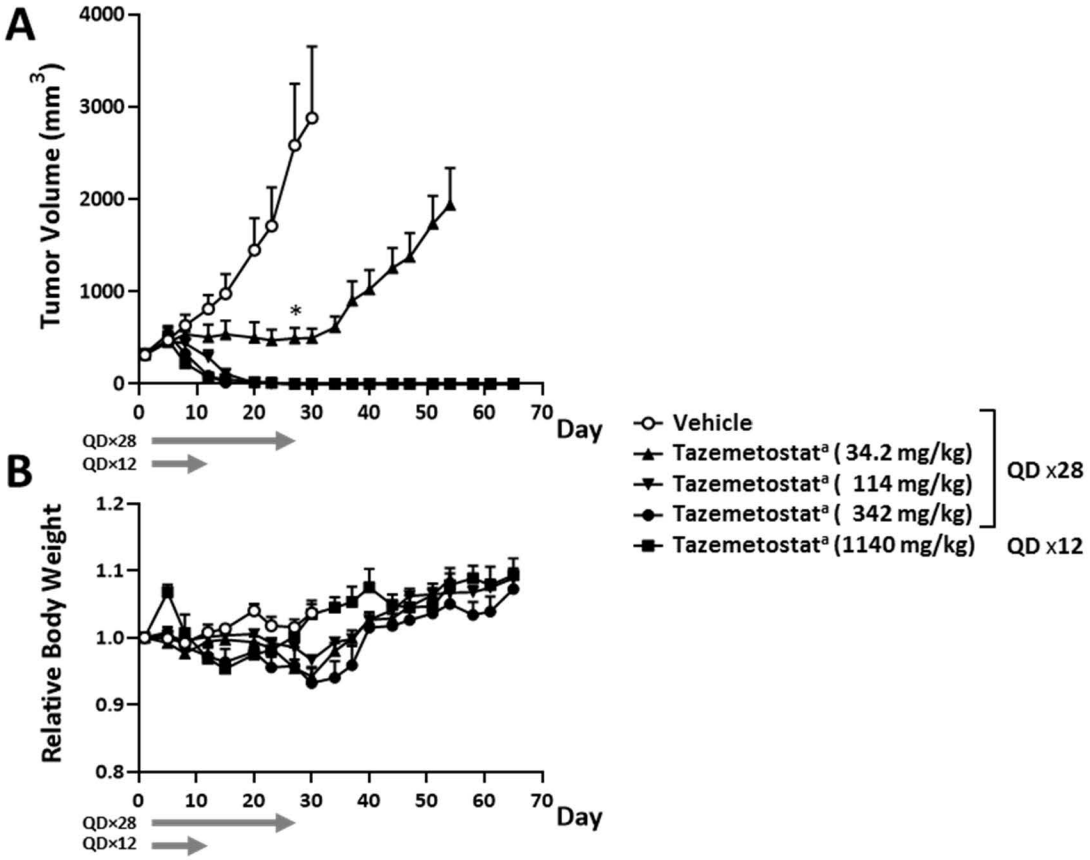


図 2.6.2.2-10　ヒト DLBCL 細胞株 Pfeiffer 移植モデルにおけるタゼメトスタットの抗腫瘍効果

A：腫瘍体積変化
B：マウス体重変化
各点は平均値+標準誤差を示す（n=6～9）。横軸下の矢印はタゼメトスタットの投与期間を示す。1140 mg/kg 投与群では Day 12 に 3/9 例が状態悪化のため除外され，以降投与を中止した。QD = 1 日 1 回.
a: タゼメトスタット臭化水素酸塩
* P<0.05 vs. 媒体対照群，Day 29（一元配置分散分析後，Dunnett 型多重比較検定）。グラフ中では 34.2 mg/kg 投与群のみ*マークを示しているが，全ての投与群についても同解析において* P<0.05
データ引用元; 試験番号 PPC20[redacted]-03N

2.6.2.2.2.4 ヒト DLBCL 細胞株 OCI-Ly19，Toledo 及び MC116 移植モデルにおける抗腫瘍効果（添付資料 4.2.1.1.15 [試験番号 CPB-P[redacted]-5184-OCI-Ly19]，添付資料 4.2.1.1.16 [試験番号 CPB-P[redacted]-5184-Toledo]，添付資料 4.2.1.1.17 [試験番号 CPB-P[redacted]-5184-MC116]）

EZH2 が野生型である 3 種のヒト DLBCL 細胞株 OCI-Ly19，Toledo，MC116 を SCID マウス（雌）に移植したモデルにおいて，タゼメトスタットの抗腫瘍効果を評価した。これらの移植モデルにおいては群分け日を Day –1 としその翌日（Day 1）より投与を開始した。dT/C 及び RBW は Day –1 の値を基準にした。

OCI-Ly19 を 6～8 週齢の雌 SCID マウスに皮下移植し，平均腫瘍体積が 142 mm^3（移植 15 日

目）の時点で群分けし（Day –1），媒体対照（0.5% NaCMC，0.1% Tween 80）あるいはタゼメトスタット臭化水素酸塩（143，571 mg/kg）の 1 日 2 回 20 日間の経口投与（各群 8 例）を開始した（Day 1）。腫瘍体積及び体重を週に 2 回測定した（試験番号 CPB-P[redacted]-5184-OCI-Ly19）。

図 2.6.2.2-11A に示すように本移植モデルにおいては，腫瘍縮小はみられなかったものの，143 及び 571 mg/kg 投与群でともに有意な TGI が示され，Day 21 における dT/C はそれぞれ 65%，26%であった。投与群の平均の BWL は 5%以内であり忍容性が認められた（図 2.6.2.2-11B）。

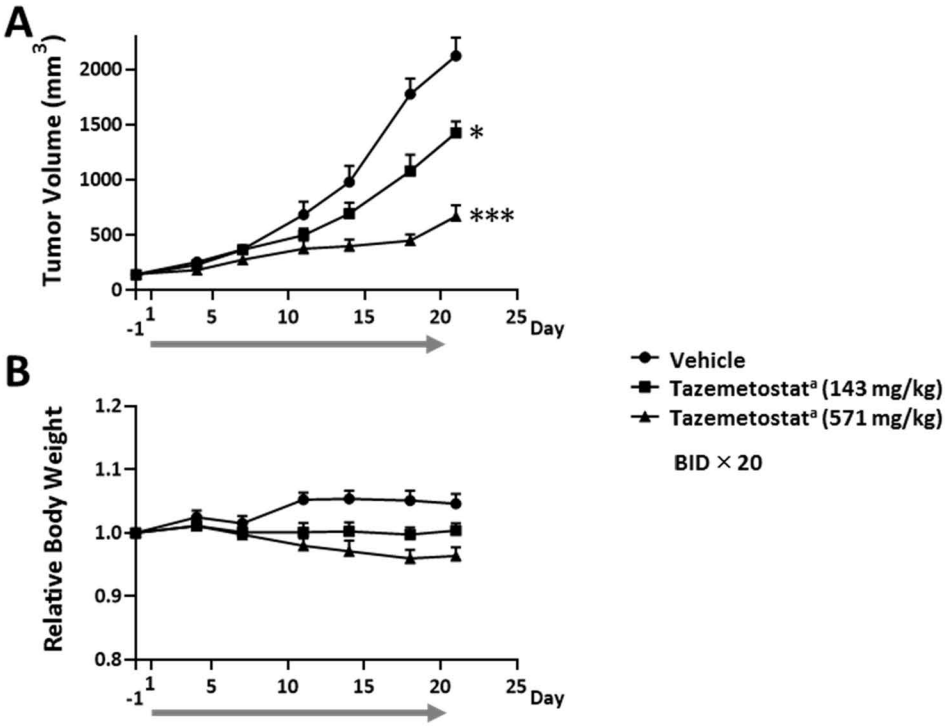


図 2.6.2.2-11　ヒト DLBCL 細胞株 OCI-Ly19 移植モデルにおけるタゼメトスタットの抗腫瘍効果

A：腫瘍体積変化
B：マウス体重変化
各点は平均値+標準誤差（n=8），Day –1 は群分け日，横軸下の矢印はタゼメトスタットの投与期間を示す。
BID = 1 日 2 回.
a: タゼメトスタット臭化水素酸塩
* $P<0.05$，*** $P<0.001$ vs.媒体対照群，Day21（一元配置分散分析後，Games-Howell の多重比較検定）
データ引用元; 試験番号 CPB-P[redacted]-5184-OCI-Ly19

同様に Toledo を 6～8 週齢の雌 SCID マウスに皮下移植し，平均腫瘍体積が 120 mm^3（移植後 19 日目）の時点で群分けし（Day –1），媒体対照（0.5% NaCMC，0.1% Tween 80）あるいはタゼメトスタット臭化水素酸塩（143，571 mg/kg）の 1 日 2 回 28 日間の経口投与（各群 8 例）を開始した（Day 1）。腫瘍体積及び体重を週に 2 回測定した。（試験番号 CPB-P[redacted]-5184-Toledo）。

図 2.6.2.2-12A に示すように本移植モデルにおいては，143 及び 571 mg/kg 投与群のうち，571 mg/kg 投与群でのみ有意な TGI が認められ，Day 29 における dT/C は 71%であった。投与群

の平均の BWL は 10%以内であり忍容性が認められた（図 2.6.2.2-12B）。

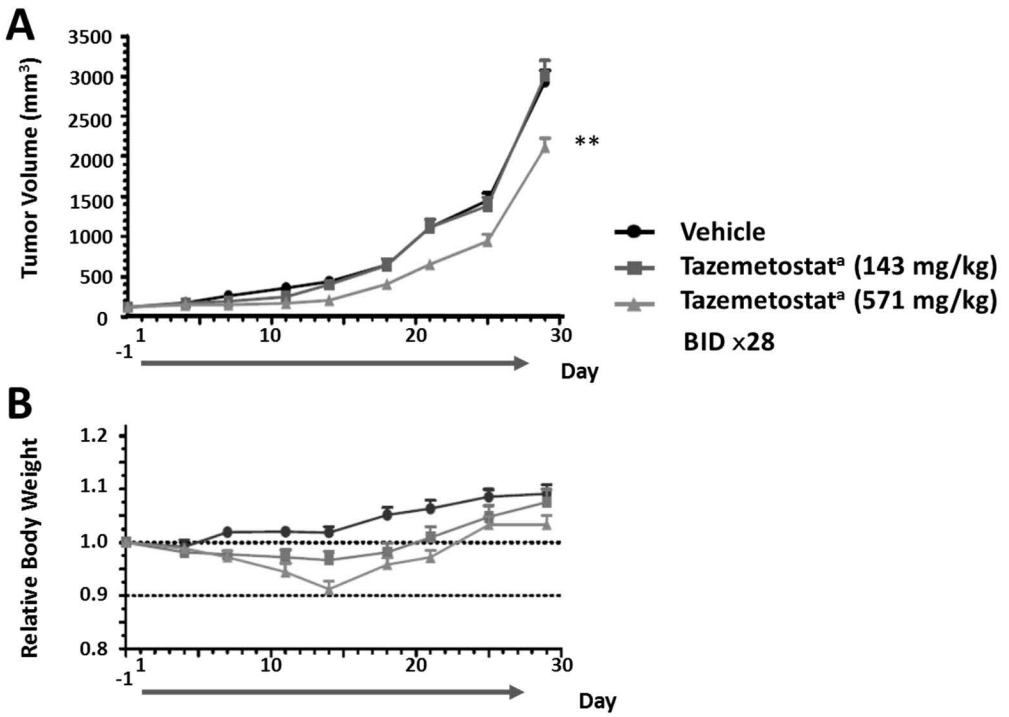


図 2.6.2.2-12　ヒト DLBCL 細胞株 Toledo 移植モデルにおけるタゼメトスタットの抗腫瘍効果

A：腫瘍体積変化
B：マウス体重変化
各点は平均値+標準誤差（n=8），Day –1 は群分け日，横軸下の矢印はタゼメトスタットの投与期間を示す。
BID = 1 日 2 回.
a: タゼメトスタット臭化水素酸塩
** P<0.01 vs. 媒体対照群，Day 29（一元配置分散分析後，Games-Howell の多重比較検定）
データ引用元; 試験番号 CPB-P[redacted]-5184-Toledo

同様に MC116 を 6～8 週齢の雌 SCID マウスに皮下移植し，平均腫瘍体積が 139.5 mm^3 の時点（移植後 12 日目）で群分けし（Day –1），媒体対照（0.5% NaCMC，0.1% Tween 80）あるいはタゼメトスタット臭化水素酸塩（143，571 mg/kg）の 1 日 2 回 17 日間の経口投与（各群 8 例）を開始した（Day 1）。腫瘍体積及び体重を週に 2 回測定した。（試験番号 CPB-P[redacted]-5184-MC116）。

図 2.6.2.2-13A に示すように本移植モデルにおいては 143 及び 571 mg/kg 投与群のうち，571 mg/kg 投与群でのみ有意な TGI が認められ，Day 17 における dT/C は 34%であった。投与群の平均の BWL は 10%以内であり忍容性が認められた（図 2.6.2.2-13B）。

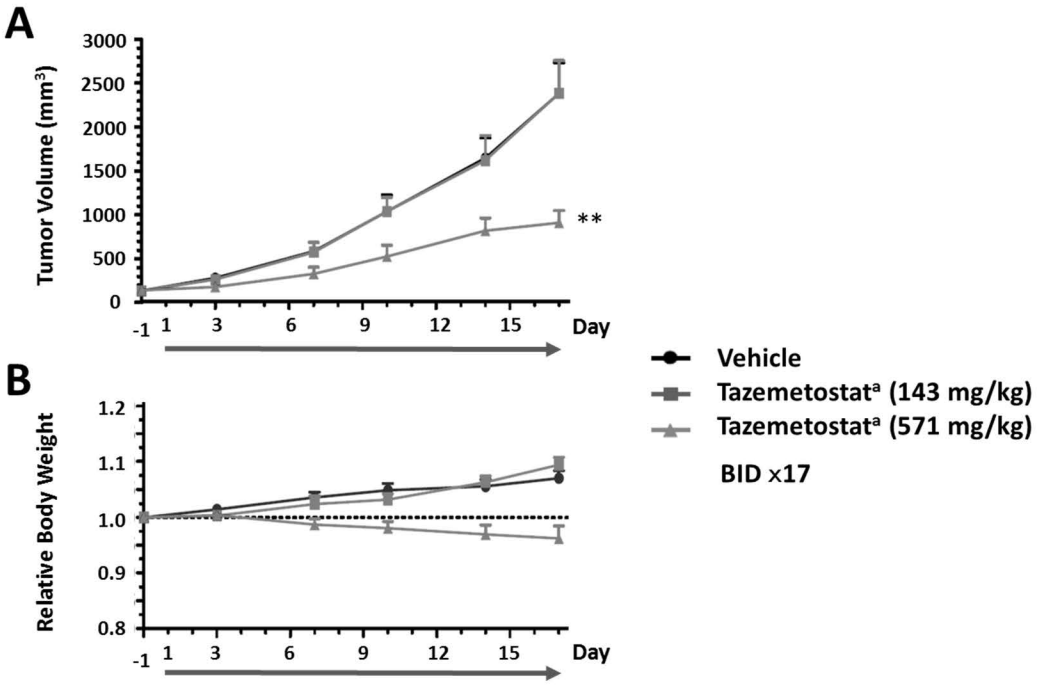


図 2.6.2.2-13　ヒト DLBCL 細胞株 MC116 移植モデルにおけるタゼメトスタットの抗腫瘍効果

A：腫瘍体積変化
B：マウス体重変化
各点は平均値+標準誤差 (n=8)，Day –1 は群分け日，横軸下の矢印はタゼメトスタットの投与期間を示す。
a: タゼメトスタット臭化水素酸塩。BID = 1 日 2 回.
** P<0.01 vs. 媒体対照群，Day 17（一元配置分散分析後，Games-Howell の多重比較検定）
データ引用元; 試験番号 CPB-P[redacted]-5184-MC116

2.6.2.2.1.4 項で示したように，*EZH2* が野生型の DLBCL 細胞株に対するタゼメトスタットの in vitro 細胞増殖阻害は，*EZH2* 変異を有する DLBCL 細胞株に対する阻害に比べて弱かったが，以上の OCI-Ly19，Toledo，MC116 移植モデルでの結果は，タゼメトスタットが EZH2 が野生型の DLBCL に対しても抗腫瘍効果を示しうることを示した。

2.6.2.2.2.5 ヒト DLBCL 細胞株移植モデルにおける CHOP との併用による抗腫瘍効果（添付資料 4.2.1.1.10 [試験番号 E7438-PD001]）

本試験では，変異型 *EZH2*（Y646F）を有するヒト DLBCL 細胞株 WSU-DLCL2 を移植した SCID マウスのモデルを用いて，抗 DLBCL 療法に一般に使用されている CHOP レジメン*と併用した場合のタゼメトスタットの抗腫瘍効果を評価した。WSU-DLCL2 を 8～9 週齢の雌 SCID マウスに皮下移植し，平均腫瘍体積 117～119 mm^3 の時点（Day 1）で，媒体対照（0.5% NaCMC，0.1% Tween 80），タゼメトスタット塩酸塩の 3 種のスケジュールでの経口投与（160 mg/kg の 1 日 3 回 28 日間，239 及び 319 mg/kg の 1 日 2 回 28 日間，638 mg/kg の 1 日 1 回 28 日間），CHOP レジメン，あるいはタゼメトスタット塩酸塩（239 mg/kg）1 日 2 回 28 日間経口投与と CHOP レジメンの併用を開始した（各群 12 例）。なお，1 日 3 回投与 28 日間は Day 1～29 に投与（Day 1 に

2 回，Day 29 に 1 回），また 1 日 2 回 28 日間投与は Day 1～29 に投与（Day 1 及び Day 29 にそれぞれ 1 回）とした。腫瘍体積は週に 2 回，体重は Day 5 まで 1 日 1 回，以降週に 2 回測定した。Day 29 最終投与の 3 時間後にマウスの血漿と腫瘍を採取し，タゼメトスタットの濃度を測定するとともに腫瘍中の H3K27me3 レベルを測定した。

*CHOP レジメン（動物実験用）：シクロホスファミド（30 mg/kg 腹腔投与）,ドキソルビシン（2.475 mg/kg，静脈内投与），ビンクリスチン（0.375 mg/kg，静脈内投与）の各 1 回投与及びプレドニゾン（0.15 mg/kg，経口投与）の 1 日 1 回 5 日間投与を 1 サイクルとし，これを Day 1 と Day 22 から 2 サイクル行う。

Day 29 においてタゼメトスタットの最終投与 3 時間後の血漿中濃度は，160 mg/kg の 1 日 3 回 28 日間投与，239 及び 319 mg/kg の 1 日 2 回 28 日間投与，638 mg/kg の 1 日 1 回 28 日間投与の各群において，それぞれ 3.29，3.38，8.59，17.9 μg/mL（モル換算 5.74，5.90，15.0，31.3 μmol/L），であった（各群 11～12 例の平均値））。また最終投与 3 時間後の腫瘍内濃度は，それぞれ 23.4，28.8，73.7，95.6 μg/g（モル換算 40.9，50.3，129，167 μmol/kg）であり（各群 9～11 例の平均値），用量依存的に増加していた。タゼメトスタット塩酸塩 239 mg/kg の 1 日 2 回 28 日間投与と CHOP の併用において，最終投与 3 時間後の血漿中濃度は，8.02 μg/mL（モル換算 14.0 μmol/L）であった（9 例の平均値）。この値は，タゼメトスタット 239 mg/kg 単剤の値とほぼ同じであった。

図 2.6.2.2-14A に示すように，タゼメトスタット単独の 160 mg/kg の 1 日 3 回 28 日間投与，239 及び 319 mg/kg の 1 日 2 回 28 日間投与，638 mg/kg の 1 日 1 回 28 日間投与は，いずれも TGI を示し，Day 29 における dT/C はそれぞれ 27%，29%，43%，42%であった。これらは CHOP レジメンのみの TGI（dT/C = 55%）よりも効果が高かった。タゼメトスタットと CHOP の併用は，さらに強力な TGI（dT/C = 7%）を示し，それぞれの単独レジメンよりも優れていた。タゼメトスタット単独及び CHOP レジメンで BWL はほとんどみられなかった。タゼメトスタットと CHOP の併用群では各サイクルで BWL がみられたが顕著（20%以上）ではなく，忍容性が認められた。（図 2.6.2.2-14B）。

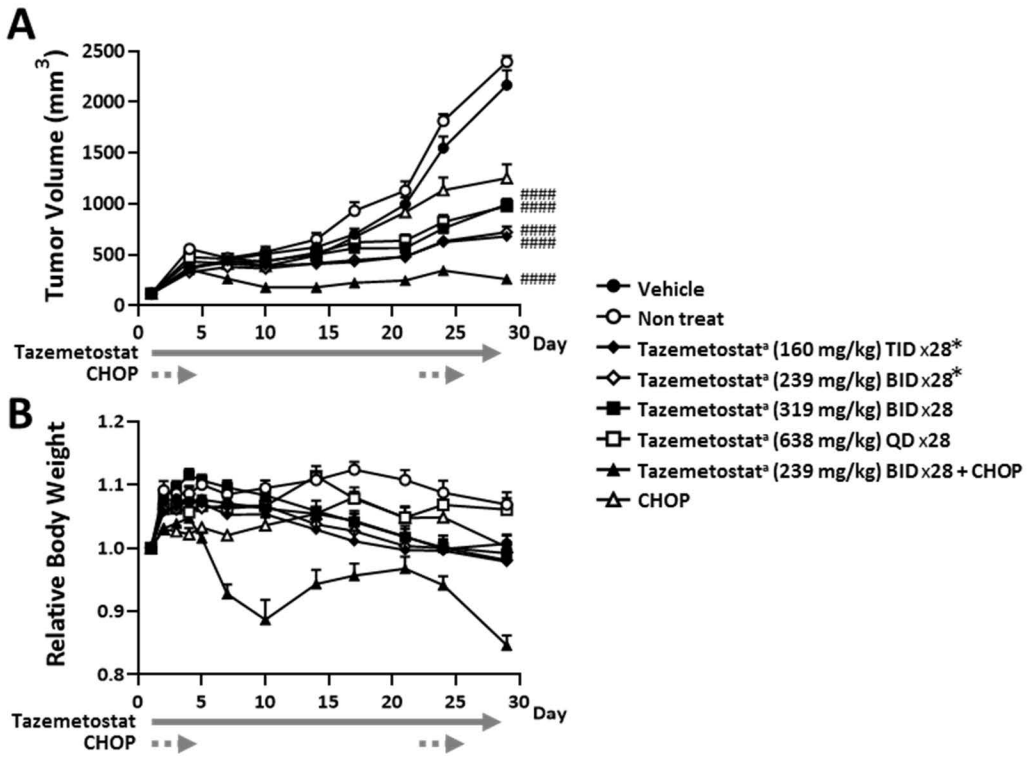


図 2.6.2.2-14　ヒト DLBCL 細胞株 WSU-DLCL2 移植モデルにおけるタゼメトスタットと CHOP レジメンの併用による抗腫瘍効果

A：腫瘍体積変化
B：マウス体重変化
各点は平均値+標準誤差（n=11～12，ただし Non treat 群は n=8），横軸下の実線矢印はタゼメトスタットの投与期間，破線矢印は CHOP のサイクル 1 及び 2 を示す。
BID = 1 日 2 回，TID = 1 日 3 回，QD = 1 日 1 回.
a: タゼメトスタット塩酸塩
* P<0.05 vs. 媒体対照（反復測定分散分析後 Dunnett 型多重比較検定）
P<0.0001 vs. 媒体対照，Day 29（二元配置分散分析後 Bonferroni 検定）
データ引用元; 試験番号 E7438-PD001

図 2.6.2.2-15 に示すように，Day 29 最終投与の 3 時間後に採取した腫瘍組織の H3K27me3 レベルは，全てのタゼメトスタット投与群においてほぼ完全に抑制された。160 mg/kg の 1 日 3 回 28 日間投与による H3K27me3 レベルの低下は，2.6.2.2.2.1 の結果を再現した。CHOP レジメン単独では，H3K27me3 レベルは媒体対照とほとんど変わらないことから，腫瘍増殖の低下が H3K27me3 レベルに影響することはないと考えられた。

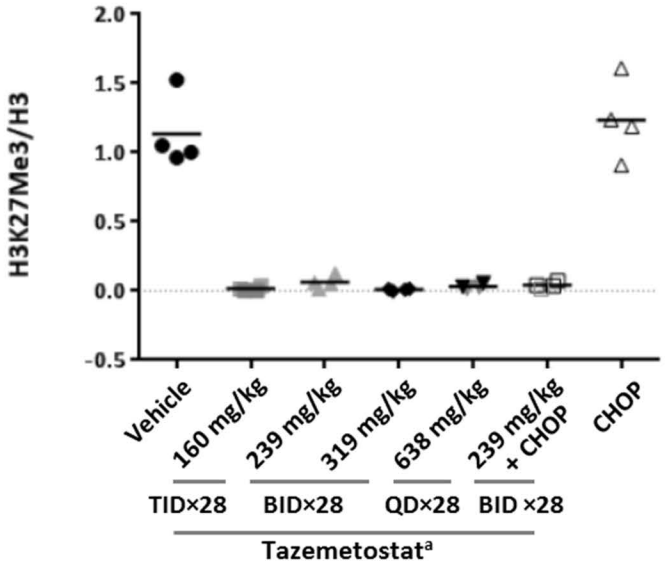


図 2.6.2.2-15　ヒト DLBCL 細胞株 WSU-DLCL2 移植モデルにおけるタゼメトスタット単独投与及び CHOP レジメンとの併用後の腫瘍内 H3K27me3 レベル

最終投与（Day29）の 3 時間後に摘出した腫瘍内のヒストン H3 あたり H3K27me3 レベルを示す（CHOP 投与群についてはサイクル 2 投与（Day22～26）後の Day29 に摘出した）。各点は個体別の値，バーは平均値（n=4）を示す。
BID = 1 日 2 回，TID = 1 日 3 回，QD = 1 日 1 回（Day2～29）.
a: タゼメトスタット塩酸塩
データ引用元; 試験番号 E7438-PD001

2.6.2.2.2.6 ヒト DLBCL 細胞株移植モデルにおける COP との併用による抗腫瘍効果（添付資料 4.2.1.1.18 [試験番号 E7438-PD002]）

本試験では，変異型 *EZH2*（Y646F）を有するヒト DLBCL 細胞株 SU-DHL-10 を移植した SCID マウスのモデルを用いて，タゼメトスタットの単独投与及び抗 DLBCL 療法に一般に使用されている COP レジメンとの併用による抗腫瘍効果を評価した。SU-DHL-10 を 6～8 週齢の雌 SCID マウスに皮下移植し，平均腫瘍体積 176 mm^3 の時点（Day 1）で，媒体対照（0.5% NaCMC，0.1% Tween 80），タゼメトスタット臭化水素酸塩（133，266，532 mg/kg）の 1 日 2 回 28 日間経口投与（Day 1～29：Day 1 と Day 29 は 1 回），COP レジメン*，あるいはタゼメトスタット臭化水素酸塩（266 mg/kg）1 日 2 回 28 日間経口投与と COP レジメンの併用を開始した（各群 16 例）。腫瘍体積は週に 2 回，体重は Day 5 まで毎日，Day 8 と Day 9，さらに Day 11 以降週に 2 回測定した。Day 29 の投与終了後，各群から腫瘍の大きいマウス 6～8 匹を抜き出し，腫瘍重量，タゼメトスタットの血漿中濃度及び腫瘍内濃度，さらに腫瘍組織における H3K27me3 レベルを測定した。

*COP レジメン（動物実験用）：シクロホスファミド（30 mg/kg 腹腔投与）,ビンクリスチン（0.375 mg/kg，静脈内投与）の 1 回投与，またプレドニゾン（0.15 mg/kg，経口投与）の 1 日 1 回 5 日間投与を 1 サイクルとし，これを Day 1 と Day 22 から 2 サイクル行う。

Day 29 においてタゼメトスタットの最終投与 3 時間後の血漿中濃度は，133，266，532 mg/kg の 1 日 2 回 28 日間投与の各群において，それぞれ 6.98，12.7，32.3 μg/mL（モル換算 12.2，22.2，56.4 μmol/L）であった（各群 7～8 例の平均値）。また最終投与 3 時間後の腫瘍内濃度は，それぞ

れ 11.4，41.3，191 μg/g（モル換算 19.9，72.1，333 μmol/kg），であり（各群 5～8 例の平均値），用量依存的に増加していた。

図 2.6.2.2-16A に示すように，タゼメトスタット単独投与は TGI を示し，133，266，532 mg/kg 投与群の Day 29 における dT/C (%) はそれぞれ 46%，–1%，–4%であった。一方，COP レジメン単独の dT/C は 58%であった。タゼメトスタット単独投与の 266 及び 532 mg/kg 投与群では腫瘍縮小を起こし，Day 29 までにそれぞれ 1/16 例，3/15 例で腫瘍消失がみられた。タゼメトスタット 266 mg/kg 投与群と COP レジメンとの併用群は腫瘍縮小を示し，その縮小はタゼメトスタット単独群に比べて，より早期から認められた。Day 29 における dT/C (%) は –7%，Day 29 までに 10/14 例で腫瘍消失がみられた。図 2.6.2.2-16B には Day 29 において各群から 6～8 例を抜き出したマウス個々の腫瘍重量を示す。併用群の平均腫瘍重量は，タゼメトスタット単独 266 mg/kg 投与群との比較，さらにはより高用量の 532 mg/kg 投与群との比較においても有意に小さかった。

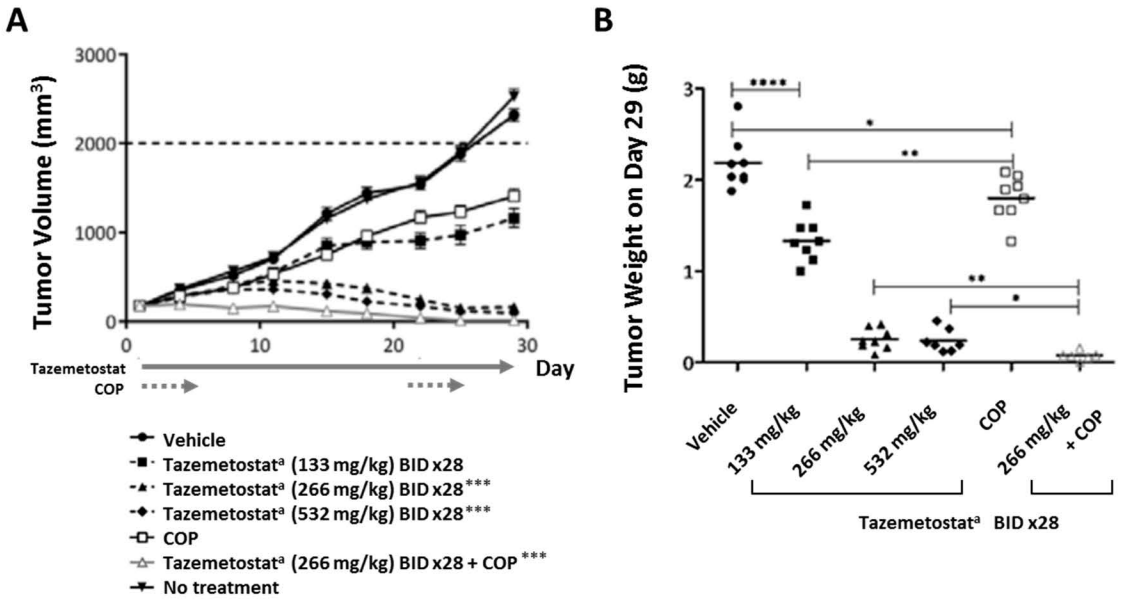


図 2.6.2.2-16　ヒト DLBCL 細胞株 SU-DHL-10 移植モデルにおけるタゼメトスタットと COP レジメン併用による抗腫瘍効果

A：腫瘍体積変化
各点は平均値±標準誤差（n=14～16，ただし No treatment 群のみ n=8）を，横軸下の実線矢印はタゼメトスタットの投与期間，破線矢印は COP のサイクル 1 及び 2 を示す。
***P<0.001 vs. 媒体対照，D29 までの経時変化（反復測定分散分析後，Dunnett 型多重比較検定）
B：Day 29 における個々の動物の腫瘍重量
個々のシンボルは Day 29 に各群から 6～8 匹抜き出したマウスにおける腫瘍重量の個体別の値，横線は平均値を示す。BID = 1 日 2 回.
* P<0.05，** P<0.01，**** P<0.0001（両側 t 検定）
a: タゼメトスタット臭化水素酸塩
データ引用元; 試験番号 E7438-PD002

図 2.6.2.2-17に示すように，タゼメトスタット単独投与群及びCOP レジメン単独投与群でBWL はほとんどみられなかった。ただしタゼメトスタットの 532 mg/kg 単独投与群では Day 18 に 1/16 例の死亡が認められた。タゼメトスタットと COP の併用群では，サイクル 2 の 4 日目（Day 25）

に BWL（群平均で約 10%）が見られ，Day 29 に 2/16 例の死亡が認められた。

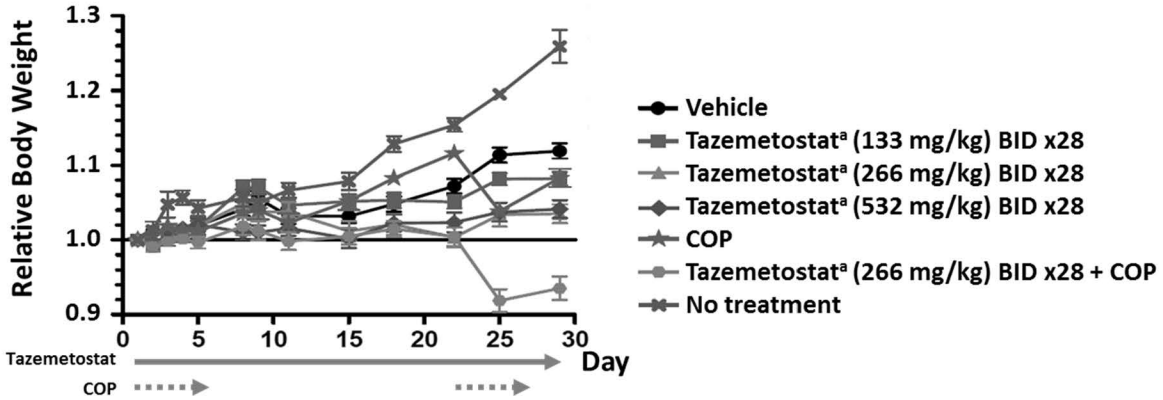


図 2.6.2.2-17　ヒト DLBCL 細胞株 SU-DHL-10 移植モデルにおける体重変化

各点は平均値±標準誤差（n=14～16，ただし No treatment 群のみ n=8）を示す。
横軸下の実線矢印はタゼメトスタットの投与期間，破線矢印は COP のサイクル 1 及び 2 を示す。
532 mg/kg 単独投与群では Day 18 に 1 例の死亡が認められた。併用群では 2 例において，サイクル 2 の 4 日目（Day 25）に低体温及び活動性低下がみられたため，Day 26～27 に休薬（タゼメトスタット及びプレドニゾンの投与を中止）後 Day 28 に投与を再開した。しかしこの 2 例とも Day 29 に死亡が確認された。
BID = 1 日 2 回.
a: タゼメトスタット臭化水素酸塩
データ引用元; 試験番号 E7438-PD002

タゼメトスタット臭化水素酸塩 266 mg/kg の 1 日 2 回 28 日間投与と COP の併用群において，タゼメトスタットの最終投与 3 時間後の血漿中濃度は，12.8 μg/mL（モル換算 22.3 μmol/L）であった（6 例の平均値）。この値は，タゼメトスタット 266 mg/kg 単独投与の値とほぼ同じであった。

腫瘍組織では H3K27me3 レベルが用量依存的に低下し，最大低下は 266 mg/kg 以上で認められた。（図 2.6.2.2-18）。タゼメトスタット塩酸塩と COP の併用は，タゼメトスタットによる H3K27me3 レベルの低下をわずかではあるが有意に阻害した。

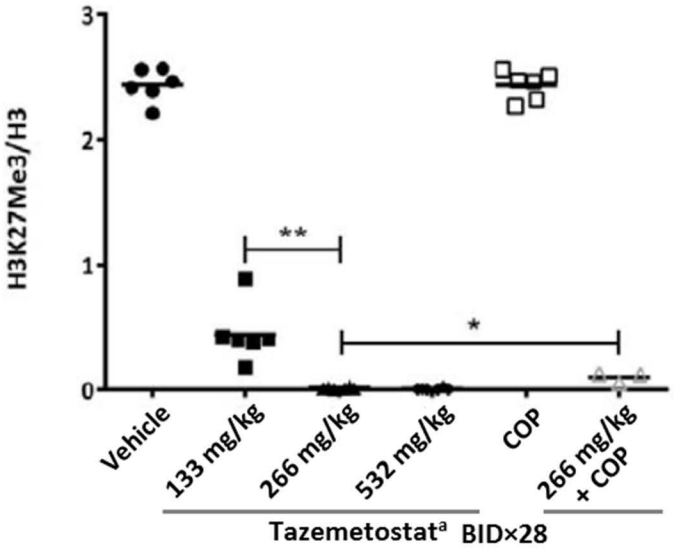


図 2.6.2.2-18　ヒト DLBCL 細胞株 SU-DHL-10 移植モデルにおけるタゼメトスタット単独投与及び COP レジメンとの併用後の腫瘍内 H3K27me3 レベル

Day 29 投与 3 時間後に摘出した腫瘍内の，ヒストン H3 あたり H3K27me3 レベルを示す。各点は個体別の値，バーは平均値（n=6～8）を示す。BID = 1 日 2 回.
a: タゼメトスタット臭化水素酸塩
*P<0.05，**P<0.01，t 検定（両側）　データ引用元; 試験番号 E7438-PD002

2.6.2.3 副次的薬理試験

タゼメトスタットの副次的薬理試験は塩酸塩あるいは臭化水素酸塩を用いて実施された。

2.6.2.3.1 各種膜タンパク質に対する作用（添付資料 4.2.1.2.1 [試験番号 864269-864279-864288]）

本試験では，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 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が，ムスカリン性アセチルコリン受容体 M4 とそのリガンド（1,1-dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium iodide）の結合に対し 68.3%の阻害がみられた。この結合に対するタゼメトスタットの IC_{50} 値は 4.6 µmol/L であったが，続いて実施した同受容体の細胞機能アッセイではタゼメトスタットはアゴニスト作用，アンタゴニスト作用いずれも示さなかった。

表 2.6.2.3-1　80 種の細胞標的分子

Cellular Target	Cellular Target	Cellular Target
adenosine R, A_1	PDGFR (mouse)	prostaglandin E_2 receptor, EP_4
adenosine R, A_{2A}	IL-8 RB, CXCR2	prostacyclin (PGI_2) R, IP
adenosine R, A_3	MP1-α R, CCR1	purinergic R, P2X (rat)
α_1 adrenergic R (ns) (rat)	TNF-α R	purinergic R, P2Y (rat)
α_2 adrenergic R (ns) (rat)	histamine R, H_1	serotonin R, 5-HT_{1A}
β_1 adrenergic R	histamine R, H_2	serotonin R, 5- HT_{1B} (rat)
β_2 adrenergic R	melanocortin R, MC_4	serotonin R, 5-HT_{2A}
angiotensin R, AT_1	melatonin$_1$R (ML_{1A})	serotonin R, 5-HT_{2B}
angiotensin R, AT_2	muscarinic R, M_1	serotonin R, 5-HT_{2C}
benzodiazepine R (central) (rat)	muscarinic R, M_2	serotonin R, 5-HT_3
benzodiazepine R (peripheral) (rat)	muscarinic R, M_3	serotonin R, 5-HT_{5A}
bombesin R, BB (ns) (rat)	muscarinic R, M_4	serotonin R, 5-HT_6
bradykinin R, B_2	muscarinic R, M_5	serotonin R, 5-HT_7
calcitonin gene related peptide (CGRP) R,	neurokinin R, NK1R	sigma receptor (ns) (rat)
cannabinoid receptor type 1 (CB_1)	neurokinin R, NK2R	somatostatin R (ns) (mouse)
cholecystokinin CCK_A R (CCK_1)	neurokinin R, NK3R	glucocorticoid receptor
cholecystokinin CCK_B R (CCK_2)	neuropeptide R, Y_1	vasoactive intestinal peptide R, VIP_1 ($VPAC_1$)
dopamine R, D_1	neuropeptide R, Y_2	vasopressin R, V_{1a}
dopamine R, D_{2S}	neurotensin R, NT_1 (NTS_1)	Ca^{2+} channel L-type phenylalkylamine site (rat)
dopamine R, D_3	δ_2 opioid R	K_V channel (rat)
dopamine R, D_{44}	κ opioid R (rat)	SK_{Ca} channel (rat)
dopamine R, D_5	μ opioid R	Na^+ channel (site2) (rat)
endothelin R, ET_A	nociceptin/NOP (ORL1) R	Cl^- channel (GABA-gated) (rat)
endothelin R, ET_B	PAC1 (PACAP) R	norepinephrine transporter
GABA R (ns) (rat)	PPARγ	dopamine transporter
galanin R, GAL_1R	phencyclidine (PCP) R (rat)	serotonin (5-HT) transporter
galanin R, GAL_2R	prostaglandin E_2 receptor, EP_2	

括弧でマウスあるいはラットと記載したものを除きヒト分子
ns＝ 非選択，R＝ 受容体.
引用元; 試験番号 864269-864279-864288

2.6.2.3.2 各種キナーゼに対する作用（添付資料 4.2.1.2.2 [試験番号 EPI001）

本試験では，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）パネルについて，タゼメトスタットの作用を検討した。タゼメトスタット（10 μmol/L）はいずれのキナーゼの酵素活性に対しても有意な阻害を示さなかった。

表 2.6.2.3-2　40 種類のキナーゼ

Kinase	Kinase	Kinase
ABL	FLT3	PKCγ
AMPKα1	GSK3β	PKCδ
CaMKIIβ	IR	PKCε
CaMKIIγ	LKB1	PKCη
CaMKIIδ	LYN	PKCι
CaMKIV	MAPK1	PKCμ
CDK1/cyclin B	MAPK2	PKCθ
CDK2/cyclin A	P70S6K	PKCξ
CDK2/cyclin E	PhKγ2	PKG1α
CDK3/cyclin E	PKA	PKG1β
CDK5/p25	PKBβ	ROCK-II
CDK5/p35	PKCα	SAPK2a
CDK7/cyclinH/MAT1	PKCβI	
CDK9/cyclin T1	PKCβII	

いずれもヒト組換えタンパク質　　引用元; 試験番号 EPI001

2.6.2.3.3 正常組織中の EZH2 に対する作用（添付資料 4.2.1.2.3 [試験番号 E7438-PD003]，添付資料 4.2.1.2.4 [試験番号 E7438-PD004]，添付資料 4.2.1.2.5 [試験番号 E7438-PD005]）

本試験では，ラット及びサルの正常組織における EZH2 阻害を，H3K27me3 レベルの低下で評価した。タゼメトスタットを経口投与した，SD ラット及びカニクイザルより，PBMCs，骨髄，脾臓，皮膚を採取し，抗 H3K27me3 ウサギモノクローナル抗体を用いた解析（ヒストン抽出後の ELISA，あるいはパラフィン包埋の薄切標本の IHC）で H3K27me3 レベルを測定した。ELISA ではヒストン画分中のトータル H3 に対する H3K27me3 の量比，IHC では H3K27me3 陽性細胞の割合をもって H3K27me3 レベルとした。

タゼメトスタット塩酸塩（106，319 mg/kg）を 1 日 1 回 7 日間経口投与（Day 1～Day 7）した SD ラット（各雌 4 例）より，Day 7 最終投与の 3 時間後に PBMCs，骨髄，脾臓，皮膚を採取した。図 2.6.2.3-1A 及び B に示すように，PBMCs 及び骨髄の H3K27me3 レベルは，タゼメトスタットの用量依存的に低下した。H3K27me3 レベルの低下（媒体対照群との比較）は，PBMCs で

の 319 mg/kg 投与群，骨髄での 106 及び 319 mg/kg 投与群で有意であった。脾臓の H3K27me3 レベルは，106，319 mg/kg 投与群ともに弱いながら有意に低下した（図 2.6.2.3-1C）。皮膚の H3K27me3 レベルは 106，319 mg/kg 投与群ともに有意な低下はみられなかった。H3K27me3 レベルの低下は PBMCs，骨髄，脾臓，皮膚のなかで，骨髄で最も強力であった（試験番号：E7438-PD003）。

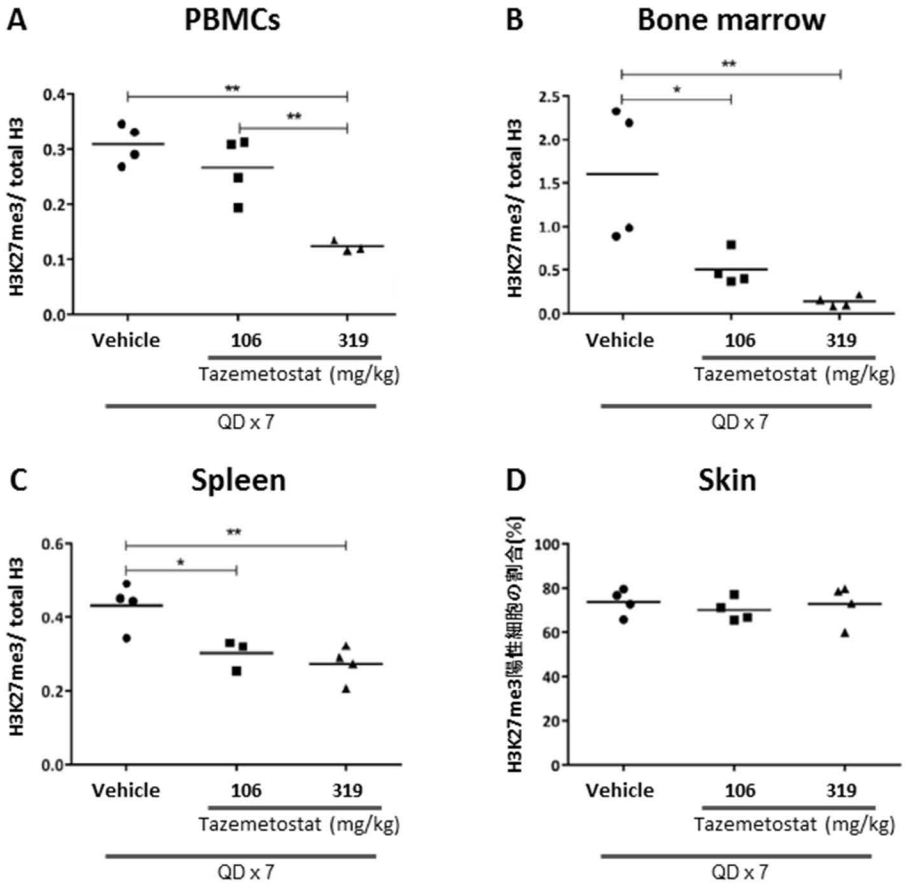


図 2.6.2.3-1　ラット正常組織の H3K27me3 レベルに対するタゼメトスタットの影響 (1)

A：ラット PBMCs における H3K27me3 レベル（トータル H3 に対する H3K27me3 の量比）
B：ラット骨髄における H3K27me3 レベル（トータル H3 に対する H3K27me3 の量比）
C：ラット脾臓における H3K27me3 レベル（トータル H3 に対する H3K27me3 の量比）
D：ラット皮膚における H3K27me3 レベル（H3K27me3 陽性細胞の割合）
タゼメトスタット塩酸塩（106，319 mg/kg）を 1 日 1 回 7 日間経口投与した SD ラットより最終投与 3 時間後に PBMCs，骨髄，脾臓を採取した。各シンボルは個体別の値，横線は平均値を示す。319 mg/kg 投与群の PMBCs と 106 mg/kg 投与群の脾臓ではそれぞれ 1/4 検体でヒストン量不十分のためプロットせず。
BID = 1 日 2 回，H3K27me3 = ヒストン H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化体，PBMCs = 末梢血単核球，QD = 1 日 1 回.
*P<0.05, **P<0.01（一元配置分散分析後 Bonferroni 検定）　データ引用元; 試験番号 E7438-PD003

ラット 4 週間毒性試験の一環として，タゼメトスタット臭化水素酸塩（100，300，1000 mg/kg）を 1 日 1 回 22 日間（Day 1～22）あるいは 1 日 1 回 28 日間（Day 1～28）経口投与した SD ラット（各雌 4 雄 4 例）から，Day 29（最終投与の 29 時間後）に PBMCs，骨髄，脾臓，皮膚を採取

した。1000 mg/kg 投与群の雌 4 例では，Day 20 前後に全例が状態不良となったため，Day 21 に PBMCs を採取し，Day 22 の投与のあと Day 23 に安楽死させて，骨髄，脾臓，皮膚を採取した。1000 mg/kg 投与群の雄 4 例及び 100 及び 300 mg/kg 投与群の全例は，Day 28 まで投与し，Day 29 に PBMCs，骨髄，脾臓，皮膚を採取した。

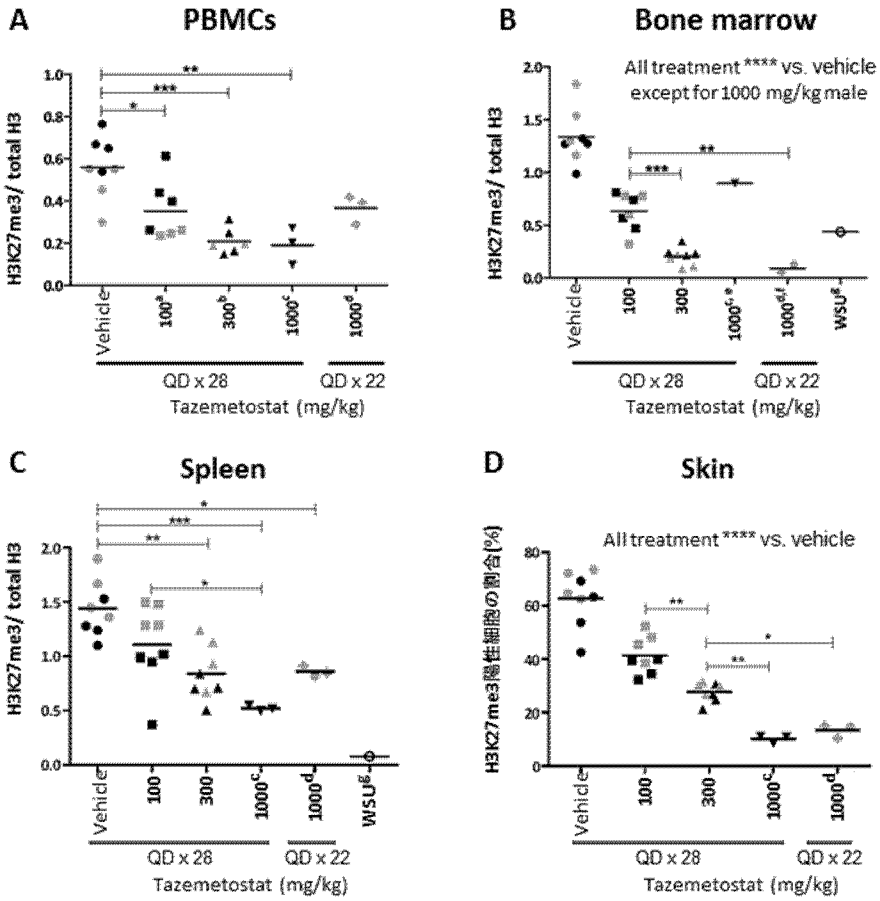


図 2.6.2.3-2 ラット正常組織の H3K27me3 レベルに対するタゼメトスタットの影響 (2)

A：ラット PBMCs における H3K27me3 レベル（トータル H3 に対する H3K27me3 の量比）
B：ラット骨髄における H3K27me3 レベル（トータル H3 に対する H3K27me3 の量比）
C：ラット脾臓における H3K27me3 レベル（トータル H3 に対する H3K27me3 の量比）
D：ラット皮膚における H3K27me3 レベル（H3K27me3 陽性細胞の割合）
タゼメトスタット臭化水素酸塩（100，300，1000 mg/kg）を 1 日 1 回 22 日間あるいは 28 日間経口投与した SD ラットより PBMCs，骨髄，脾臓，皮膚を採取した。各シンボルは個体別（黒は雄，灰色は雌）の値，横線は平均値を示す。BID = 1 日 2 回，H3K27me3 = ヒストン H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化体，PBMCs = 末梢血単核球，QD = 1 日 1 回.
a, e, f: それぞれ 1/8 検体，2/3 検体，1/3 検体で測定不能のためプロットせず
b: 2/8 検体で，ヒストン量が不十分のため測定できず
c, d: それぞれ雄のみ（28 日間投与），雌のみ（22 日間投与），組織検体はともに 4 例のうち 3 例でのみ得られた。
g: タゼメトスタット (25 µmol/L)と 4 日間培養した WSU-DLCL2 細胞中の H3K27me3 レベル
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001（一元配置分散分析後 Bonferroni 検定）データ引用元; 試験番号 E7438-PD004

図 2.6.2.3-2 に示すように，SD ラットの PBMCs，骨髄，脾臓，皮膚では，100～1000 mg/kg の

1 日 1 回 28 日間投与（各雌 4 雄 4 例，ただし 1000 mg/kg は雄 4 例のみ）により H3K27me3 レベルの用量依存的な低下が認められた。H3K27me3 レベルの低下（媒体対照群との比較）は，PBMCs，骨髄，皮膚では 100 mg/kg 以上（骨髄の 1000 mg/kg [1 例のみ測定] を除く），脾臓では 300 mg/kg 以上で有意であった。皮膚での有意な変化は前述のように 1 日 1 回 7 日間投与ラット（試験番号：E7438-PD003）ではみられなかったことより，皮膚組織で H3K27me3 レベル低下が見られるにはより長期間の投与が必要であることが示された。なお PBMCs の 1000 mg/kg，1 日 1 回 22 日間投与群（雌 4 例）での H3K27me3 レベルの低下は，より低用量の 100 及び 300 mg/kg の 28 日間投与（全例，あるいは雌 3 例）での H3K27me3 レベル低下に比べて弱く，PBMCs においても長期の投与により H3K27me3 レベルがさらに低下することが示唆された。PBMC，骨髄，脾臓，皮膚の比較では，骨髄での H3K27me3 レベル低下がより顕著であった（試験番号：E7438-PD004）。

サル 4 週間毒性試験の一環として，タゼメトスタット臭化水素酸塩（50，150，500 mg/kg）をカニクイザルに 1 日 2 回 28 日間の予定で Day 1 より投与開始した（各雌 4 雄 4 例）。50 及び 150 mg/kg は Day 28 まで投与し，Day 29（最終投与の 14～17 時間後）に PBMCs，骨髄，脾臓，皮膚を採取した。500 mg/kg 投与群では内 4 例（雄 2 雌 2 例）が Day 8 から Day 9 にかけて状態不良となったため，この 4 例では投与を中止，残る 4 例では一旦休薬のあと Day 11（雌 2 例）又は Day 12（雄 2 例）から，用量を 300 mg/kg に減量して 1 日 2 回の投与を再開し，Day 28 まで投与をした（500 [300] mg/kg 投与群とした）。Day 8 から Day 9 にかけて状態不良になった 4 例のうち 3 例（雄 2 雌 1 例）は直ぐに安楽死させ骨髄，脾臓，皮膚を採取，残る 1 例は休薬を続けた後，Day 29 に PBMCs，骨髄，脾臓，皮膚を採取した（500 mg/kg 8～9 日間投与群）。

図 2.6.2.3-3 に示すように，カニクイザルの PBMCs，骨髄，脾臓，皮膚では，50，150，500 [300] mg/kg の 1 日 2 回 Day 28 までの投与（各雌 4 雄 4 例，ただし 500 [300] mg/kg は雌 2 雄 2 例）により H3K27me3 レベルの低下が認められた。H3K27me3 レベルの低下（媒体対照群との比較）は PBMCs では 150 mg/kg 投与群でのみ有意であったが，骨髄と皮膚では 50 mg/kg 以上，脾臓では 150 mg/kg と 500 (300) mg/kg の投与群で有意であった。PBMCs，骨髄，脾臓，皮膚の比較では，骨髄での H3K27me3 レベル低下がより顕著であった。

500 mg/kg 8～9 日間投与群で，Day 8～9 に採取した骨髄，脾臓，皮膚（2～3 個体），また Day 29 に採取した PBMCs，骨髄，脾臓，皮膚（1 個体）における H3K27me3 レベルはいずれもあまり低下していなかった（媒体対照との比較で有意差なし，500 (300) mg/kg の投与群との比較で有意に高い）。このことは，カニクイザルにおいてタゼメスタットの 8～9 日間の投与では，各組織における H3K27me3 レベルの低下が顕著ではない，あるいは低下を持続させることができないことを示唆した。

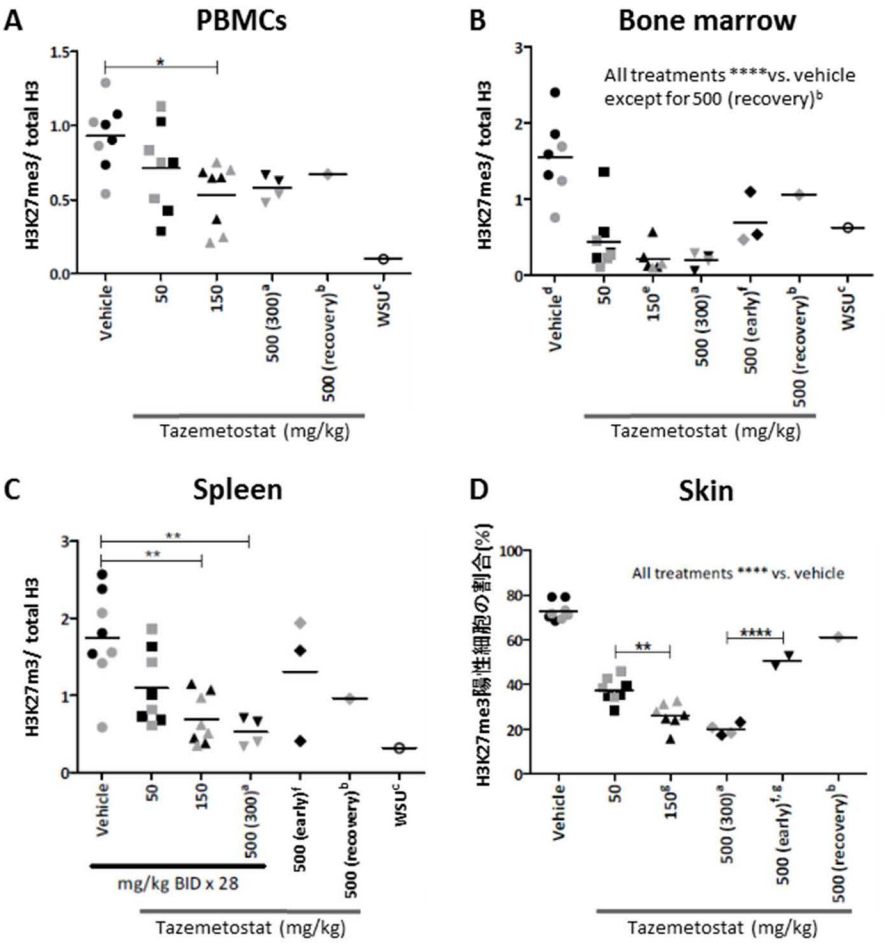


図 2.6.2.3-3　カニクイザル正常組織の H3K27me3 レベルに対するタゼメトスタットの影響 (2)

A：カニクイザル PBMC における H3K27me3 レベル（トータル H3 に対する H3K27me3 の量比）
B：カニクイザル骨髄における H3K27me3 レベル（トータル H3 に対する H3K27me3 の量比）
C：カニクイザル脾臓における H3K27me3 レベル（トータル H3 に対する H3K27me3 の量比）
D：カニクイザル皮膚における H3K27me3 レベル（H3K27me3 陽性細胞の割合）
タゼメトスタット臭化水素酸塩（50，150，500 [300[a]] mg/kg）を BID×28 で経口投与したカニクイザルより Day 29 に PBMCs，骨髄，脾臓，皮膚を採取した。各シンボル（黒は雄，灰色は雌）は個体別の値，横線は平均値を示す。
BID = 1 日 2 回，H3K27me3 = ヒストン H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化体，PBMCs = 末梢血単核球.
a:　2.5 日休薬の後，Day 11（雌）あるいは Day 12（雄）に 500 から 300 mg/kg に減量して投与再開
b:　Day 8 で投与中止後，回復した 1 例より Day 29 に組織採取
c:　タゼメトスタット(25 µmol/L)と 4 日間培養した WSU-DLCL2 細胞中の H3K27me3 レベル
d, e:　ぞれぞれ，1/8 検体，2/8 検体で測定不能のためプロットせず
f:　Day 8 と Day 9 に状態不良のため安楽死させた個体から組織採取
g:　1/8 検体につき組織状態不良のため定量的な IHC できないためプロットせず
*P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001（一元配置分散分析後 Bonferroni 検定）
データ引用元; 試験番号 E7438-PD005

以上，移植モデルの腫瘍の他，正常組織においてもタゼメトスタット投与による H3K27me3 レベルの低下が認められ，正常組織の EZH2 が阻害されたことが示唆された。PBMCs，骨髄，脾臓における H3K27me3 レベルの変化は投与開始数日後に観察されたが，皮膚での H3K27me3 レベルの低下には 22～28 日を要した。

2.6.2.4 安全性薬理試験

タゼメトスタットの安全性薬理試験は，塩酸塩あるいは臭化水素酸塩を用いて実施された。

2.6.2.4.1 心血管系に及ぼす影響

2.6.2.4.1.1 hERG カリウム電流に及ぼす影響（添付資料番号 4.2.1.3.1，[■0517.FQJ] ）

hERG チャネルを発現させた HEK293 細胞（4 細胞/濃度）にタゼメトスタットの 10 μmol/L を適用し，パッチクランプ法を用いて hERG 末尾電流に及ぼす影響を検討した。

その結果，10 μmol/L で hERG カリウム末尾電流を 15.1±1.4%阻害した。

2.6.2.4.1.2 ウサギ左心室ウェッジ標本における QT 間隔，Tp-e 間隔及び QRS 時間に及ぼす影響（添付資料番号 4.2.1.3.2，[LIMR-20■0801] ）

摘出ウサギ左心室ウェッジ標本における QRS 時間，QT 間隔，$T_{p\text{-}e}$ 間隔（貫壁性の再分極時間不均一性の指標）及び不整脈性事象発生に及ぼすタゼメトスタット（0.75，2.0，7，20 μmol/L）の影響を検討した。タイロード溶液を満たした溶液槽内に動脈灌流した標本（n=6）を浸して心内側表面に設置した電極により刺激し，溶液槽内の心内側と心外側に設置した電極により標本の貫壁性心電図を記録した。

その結果，0.75 及び 2.0 μmol/L では影響がなかった。7 μmol/L では $T_{p\text{-}e}$ 間隔の短縮が，20 μmol/L では $T_{p\text{-}e}$ 間隔及び QT 間隔の短縮がみられた。予測 TdP スコアは 7 及び 20 μmol/L で減少した。最高濃度の 20 μmol/L まで催不整脈作用は認められなかった。

2.6.2.4.1.3 心拍数，血圧及び心電図に及ぼす影響（添付資料番号 4.2.1.3.3，[20026297] ）

テレメトリー送信機を埋め込んだ覚醒カニクイザル（雌 4 例/群）にタゼメトスタット（臭化水素酸塩として 0，100，300，1000 mg/kg）を単回経口投与し，心拍数，平均血圧，QA 間隔，心電図（PR 間隔，QRS 時間，QT 間隔及び QTc 間隔），体温及び一般状態に及ぼす影響を検討した。

その結果，1000 mg/kg まで心拍数，血圧，QA 間隔，心電図及び体温への影響はみられなかった。一般状態では，嘔吐が 300 mg/kg（2 例）及び 1000 mg/kg（3 例）が観察された。

2.6.2.4.2 中枢神経系に及ぼす影響

2.6.2.4.2.1 サルの一般症状及び行動に及ぼす影響（添付資料番号 4.2.3.2.5，[20024293] ）

本試験は，カニクイザルを用いた 28 日間反復投与毒性試験（投与量：タゼメトスタット臭化水素酸塩として 0，100，300，1000 mg/kg/日，半量ずつ 2 回に分けて投与）に組み込み，試験前と第 1 週（第 7 日の 1 回目投与約 2～4 時間後）に実施した（2.6.6.3.5 項）。一般状態，行動，運動機能，脳脊椎神経，固有感覚及び姿勢反応を含む領域について，飼育ケージ内及び一時的な人的拘束下で動物を検査した。

その結果，100，300 mg/kg で影響は認められなかった。1000 mg/kg で雄 2 例に両側後肢の筋緊張低下がみられたが，これは一般状態の悪化（この 2 例は検査日の 1-2 日後に瀕死による安楽死処置となった）によるものと考えられた。

2.6.2.4.3 呼吸系に及ぼす影響

2.6.2.4.3.1 サルの呼吸系に及ぼす影響（添付資料番号 4.2.3.2.5，[20024293] ）

本試験は，カニクイザルを用いた 28 日間反復投与毒性試験（投与量：タゼメトスタット臭化水素酸塩として 0，100，300，1000 mg/kg/日，半量ずつ 2 回に分けて投与）に組み込み，試験前と第 1 週（第 6 日から 7 日）に実施した（2.6.6.3.5 項）。呼吸数及び 1 回換気量は呼吸誘導プレチスモグラフ法により測定した。動物の胸囲及び腹囲に装着したバンドにより呼吸波形を計測し，信号は体外ジャケット式テレメトリーシステムにより送信した。

その結果，最高用量の 1000 mg/kg まで呼吸数及び 1 回換気量への影響は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない

2.6.2.6 考察及び結論

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）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，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 HMT であり，ポリコーム抑制複合体 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 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阻害活性を有するファーストインクラスの低分子阻害薬であり，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可能性がある。

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して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