

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2007-2008
課題番号：19590149
研究課題名(和文) 薬物動態制御因子群の遺伝子解析に基づく抗癌薬個別投与設計法の基盤開発
研究課題名(英文) Development of an individualized therapy for establishing the optimal dosage by analysis of pharmacological gene
研究代表者 濱田 哲暢(HAMADA AKINOBU) 熊本大学・医学部附属病院・准教授 研究者番号：00322313

研究成果の概要：

抗癌薬個別投与設計に有用と考えられる体内動態に影響を与える因子の探索を行った。アムルピシンに影響する薬物輸送タンパクとしてP糖タンパク質であることを明らかにした。イマチニブの体内動態と投与量に影響を与える因子に体表面積が関与することを明らかにした。エルロチニブの皮膚毒性と体内動態にP糖タンパク質の遺伝多型が影響することを明らかにした。本研究により、抗癌薬においても体内動態を制御する遺伝子群の解析が体内動態の個人間変動の解明に有効であることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：オーダーメイド医療、個別投与設計、抗悪性腫瘍薬

1. 研究開始当初の背景

新規抗癌薬が数多く臨床に供されているが、副作用も顕在化し社会的問題となっている。進行非小細胞肺癌患者に対する分子標的治療薬ゲフィチニブは、急性肺障害による副作用のため死亡例が報告されており、抗癌薬の安全性確保の重要性が改めて認識されている。抗癌薬の投与量は第Ⅰ相試験において設定されているが、上市前の臨床試験では比較的全身状態が良い患者を対象としているため、腎あるいは肝機能障害患者および高齢者を対象とした実地医療における至適投与量は不明である場合がある。これらハイリスク患者に対する投与量は添付文書上「適宜増減」の表現にとどまることが多く、いわゆる「医師の匙加減」にて投与されることがある。

薬物血中濃度モニタリング(TDM)は治療域が狭い薬物の投与設計に応用されていることから、患者毎の投与設計を可能にするTDMの実施は癌化学療法の有効性と安全性の向上が期待される。しかし、治療域と毒性域が近接しており致死的な副作用も認められるにもかかわらず、癌化学療法においてTDMを取り入れた個別投与設計はメトトレキサートが利用されているに過ぎない。

2. 研究の目的

抗癌薬のTDMを実践するには目標血中濃度の設定が重要である。しかしながら、抗癌薬の薬理効果には個人差が大きいことから、薬理効果の個人差を識別する新たな指標(診断マーカー)を用いて薬剤感受性を予測し、感

受性に従った患者毎の血中濃度と臨床効果との相関解析が必要である。本研究では、抗癌薬の個別投与設計における TDM 導入を目標に、薬物血中濃度と薬理作用の相関並びに患者個々の薬物動態制御に関わる遺伝子多型を同時に評価・解析し、癌化学療法におけるオーダーメイド医療の基盤構築に有用な情報を収集することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 塩酸アムルピシンの薬物動態に影響を与える因子の探索研究

塩酸アムルピシンおよび活性代謝物アムルピシノールの P 糖タンパク質(P-gp)に対する基質特異性を評価するために、ブタ腎由来培養上皮細胞 (LLC-PK1)およびヒト P-gp を過剰発現させた L-MDR1 細胞を用いた薬物取込実験を実施し、各薬物濃度は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて定量した。

塩酸アムルピシンは他の抗癌薬との併用投与が検討されるため、動物モデルを用いて薬物相互作用の有無を評価した。SD 系雄性ラットの頸静脈より塩酸アムルピシン(10mg/kg)及びイリノテカン(10mg/kg)を瞬時投与後、経時的に採血を行い、採血終了後に各種組織(肝臓、腎臓、小腸、肺)を摘出した。また、同様に薬物を投与したラットから経時的に胆汁を採取した。比較のため各々の単独投与も行い、血中・胆汁中濃度並びに組織分布について評価した。

(2) 慢性白血病治療薬イマチニブの体内動態に影響を及ぼす因子の探索、ならびに臨床における目標血中濃度の設定と投与量決定因子の探索

イマチニブ血中濃度測定方法を HPLC にて確立後、イマチニブを服用する慢性骨髄性白血病患者のイマチニブ血中濃度、および臨床効果および副作用との相関解析を実施した。すなわち、イマチニブ耐性の診断マーカーとして末梢血からイマチニブ体内動態を制御すると推定される薬物トランスポータ ABCB1, ABCG2, 代謝酵素 cytochrome P450 [CYP] 2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5 の遺伝子多型解析を実施し、イマチニブの体内動態および臨床効果への影響を評価した。イマチニブの投与は患者の病態に応じて、200-600mg を 1 日 1 回経口投与を行った。投与開始後経時的に採血を行い、末梢単核球中の ABCB1 の mRNA の定量と血漿、赤血球およびリンパ分画中のイマチニブ濃度を HPLC 法にて定量した。投与開始後 6 ヶ月で効果判定(組織学的・分子学的寛解率)を行い、至適薬物濃度ならびに用量との関連を評価した。得られた複数の遺伝子多型解析結果に関して薬物血中濃度と臨床効果との関係を多変量解析にて分析し、臨床効果に

影響を与える患者背景と遺伝子を同定した。

(3) 非小細胞肺癌患者におけるエルロチニブの薬物動態変動ならびに毒性との相関解析試験

非小細胞肺癌で用いられる分子標的薬エルロチニブには 3 用量の剤型があり毒性発現時に減量することが推奨されている。しかしながら、日本人におけるエルロチニブの血中濃度と毒性との相関は明確でないため、エルロチニブの毒性の発現時期や程度と血中濃度の相関を把握することを目的として行った。薬物血中濃度測定は HPLC を用いて行い、毒性と薬物血中濃度および細胞内輸送に影響する遺伝子群の多型解析も合わせて実施し、相関を詳細に評価した。

4. 研究成果

(1) 塩酸アムルピシンの薬物動態に影響を与える因子の探索研究

ブタ腎由来培養上皮細胞 (LLC-PK1)およびヒト P-gp を過剰発現した L-MDR1 細胞を用いた実験により、塩酸アムルピシンおよびアムルピシノールの細胞内蓄積量は L-MDR1 細胞で有意な低下が観察された。P-gp 阻害薬シクロスポリンの併用により L-MDR1 細胞における細胞内蓄積量は LLC-PK1 細胞と同程度にまで上昇した。塩酸アムルピシンおよびアムルピシノールの経細胞輸送実験において、L-MDR1 細胞における apical 側への輸送亢進並びに basal 側への輸送低下が認められた。一方、シクロスポリンの併用により L-MDR1 細胞における経細胞輸送は LLC-PK1 細胞と類似した挙動を示した。これらの結果から、塩酸アムルピシンおよびアムルピシノールは P-gp の基質であることが明らかとなった。P-gp の発現レベルの個人差が薬効に及ぼすことが示唆された。

ラットを用いた塩酸アムルピシンに及ぼす塩酸イリノテカンの影響に対する薬物相互作用の評価では、以下の点が明らかとなった。ラットにおいて、塩酸イリノテカン併用投与によりアムルピシノール血漿中濃度の有意な低下が認められた。アムルピシノールの C_{max} 及び AUC は塩酸アムルピシン単独投与時と比較して、それぞれ 59% 及び 56% に低下することが明らかとなった。塩酸アムルピシンとアムルピシノールの各 AUC から求めた変換率は、塩酸アムルピシン単独投与時に 8.0% であったのに対し、塩酸イリノテカン併用投与時では 5.3% と有意に低下することが判明した。塩酸アムルピシン併用投与により、活性代謝物 SN-38 の C_{max} 上昇が観察されたが、塩酸アムルピシンは塩酸イリノテカン及び SN-38G の薬物動態パラメータに影響は認められなかった。塩酸アムルピシン、塩酸イリノテカン及びそれらの代謝物の臓器移行性

並びに胆汁排泄率は、塩酸アムルピシン/塩酸イリノテカン併用により変動しないことが観察された。ラット肝サイトゾル及び血球成分を用いた検討において、塩酸イリノテカンが塩酸アムルピシンの代謝を阻害することが認められた。一方、SN-38 は塩酸アムルピシン代謝に影響を与えなかった。ヒト肝サイトゾルを用いた検討において、塩酸イリノテカンによる塩酸アムルピシンの代謝阻害が認められた。カルボニルリダクターゼ活性は、ラット肝サイトゾルに比べてヒト肝サイトゾルにおいて約3倍高いことが明らかとなった。

CPT-11 併用により活性代謝物アムルピシノールの血漿中濃度が低下することを明らかにした。肝臓中における CPT-11 の塩酸アムルピシン代謝阻害がアムルピシノールの体内動態変動に一部関与している可能性を示した。

(2)慢性白血病治療薬イマチニブの体内動態に影響を及ぼす因子の探索

慢性骨髄性白血病株 K562 細胞のイマチニブ耐性 (K562-IM) 細胞を樹立し、さらにイマチニブ耐性獲得 CML 患者の骨髄単核球及び白血球細胞を用いて、標的細胞内濃度の規定因子の一つと考えられる薬物トランスポータ、特に細胞外排出輸送担体である P-gp、BCRP 及び細胞内への輸送担体である有機カチオントランスポータ 1 (OCT1) のイマチニブ耐性獲得への寄与について検討した。

K562-IM 細胞では K562 細胞と比較して約 47 倍のイマチニブ耐性を示し、P-gp 及び BCRP の発現量の上昇が観察されたものの OCT1 の発現量の変動は認められなかった。K562-IM 細胞において、イマチニブによる殺細胞効果及び細胞内イマチニブ蓄積量は、P-gp 阻害剤の併用により有意な回復が認められたが、BCRP 阻害剤 (fumitremorgin C: FTC) の併用では変化は認められなかった。一方、OCT1 阻害剤 (amantadine) を用いた検討より、OCT1 によるイマチニブの細胞内への取り込みは K562-IM 細胞と K562 細胞との間で有意な差は観察されなかった。以上の結果より、イマチニブ耐性獲得機序には、P-gp の発現増大に伴う細胞内イマチニブ濃度の低下が関与し、BCRP 及び OCT1 の寄与は小さいものと推察された。

(3)臨床における慢性白血病治療薬イマチニブの目標血中濃度の設定と投与量決定因子の探索

慢性骨髄性白血病治療薬イマチニブの標準投与量は欧米と同じ 400mg に設定されているが、副作用発生により減量投与が行われるため、イマチニブ血中濃度モニタリングを実施し至適投与量との関連を評価した。体内

動態に影響を与える因子として患者背景と遺伝的背景を合わせて評価した。イマチニブ治療を実施された 31 名の CML 患者 (男性 18 名、女性 13 名、治療開始時平均年齢 49 歳) を対象とした。イマチニブ血中濃度は HPLC を用いて測定した。更に、イマチニブ投与後定常状態に到達した血中濃度を用いて NONMEM を用いて母集団薬物動態解析を行った。27 例が細胞遺伝学的完全寛解を示したが、標準投与量は 13 例であり、9 例は副作用により減量、5 人は効果不十分のため増量した。4 例はイマチニブ抵抗性と副作用のため治療を中止した。効果が認められた患者で標準投与群と減量投与群の血中濃度は 1.4 と 1.2µg/mL であり、両者とも Picard (Blood, 2007) が提唱している 1,002ng/mL 以上の目標血中濃度に到達していた。イマチニブ治療開始から 1 年未満では血漿中イマチニブ濃度が治療効果に反映されにくいことが示されたが、血漿中イマチニブ濃度が高いと、早期に治療効果が得られやすい傾向を認めた。

血漿中イマチニブ濃度だけでなく、細胞内の薬物濃度を評価した。白血球細胞内イマチニブ濃度の測定により、患者間でのバラつきを認め、血漿中イマチニブ濃度と白血球細胞内イマチニブ濃度とは相関しないことが観察された。白血球細胞内イマチニブ濃度に薬物輸送トランスポータ mRNA 発現量の影響しないことが示唆された。また、病期が安定していない患者では血漿中イマチニブ濃度が 1mg/mL に到達しているものの、白血球細胞内イマチニブ濃度が一定に保たれていないことが観察されたことから、白血球細胞内のイマチニブ蓄積量が個々の用量設定に重要と推定されるが今後の検討が必要と思われる。

減量投与群の患者は標準投与群と比較して、体表面積が有意に小さく、女性ならびに高齢者が多い傾向が認められた。一方、年齢、体表面積、ALT、CCr などがクリアランス変動要因として見出されたが、欧米人と比較しクリアランスが低い傾向を認めた。また、イマチニブクリアランスと体内動態を制御すると推定される薬物トランスポータ ABCB1, ABCG2、代謝酵素 CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5 の遺伝子多型解析を実施したが、いずれの遺伝子の変異形も体内動態に影響することは認められなかった。今後は別のターゲットを決定し更に体内動態へ影響する因子探索が必要であると考えられる。

本研究により、イマチニブの減量投与において十分な血中濃度に到達する場合、良好な治療効果が認められるため、血中濃度のモニタリングがイマチニブの患者個別投与と設計に有効と期待される。また、今回の結果では見出されていないが、本研究で選択した薬物

輸送に影響を与える因子として遺伝学的背景の評価が重要と考えられる。

(4) 非小細胞肺癌患者におけるエルロチニブの薬物動態変動ならびに毒性との相関解析試験

初回投与後 2-6 時間で最高血中濃度 C_{max} が得られその濃度は $1.71(0.39 \sim 3.0)\mu\text{g/mL}$ と個人差を認めた。投与後 1 週間で血中濃度は定常状態に達しており、トラフ血中濃度は $1.4(0.3 \sim 3.3)\text{g/mL}$ と大きな個人差を認めた。また、

31 の登録症例中、グレード 2 以上の皮疹 18 例、下痢 3 例、頭痛 1 例を認めた。1 例はグレード 3 の肺障害を発症しエルロチニブの投与を中止した。この症例では内服後急速な血中濃度の上昇(最高血中濃度、 $3.0\mu\text{g/mL}$)が観察された。血中濃度の上昇に従い、毒性の発生頻度が上昇する傾向にあった。また、クリアランスと体内動態を制御すると推定される薬物トランスポーター ABCB1, ABCG2、代謝酵素 CYP3A4, CYP3A5 の遺伝子多型解析を実施したが、ABCB1 の 1236, 2677, 3435 における遺伝多型のみエルロチニブの血中濃度に影響を与える傾向を認めた。すなわち、変異型の T allele を有する症例において血中濃度が上昇する傾向が認められた。これらの症例は全例 7 日間以内にグレード 2 以上の皮膚障害が認められたが、正常型では血中濃度は低く、毒性が少ない傾向を認めた。

日本人におけるエルロチニブの薬物血中濃度には大幅な個人差があることが明らかになった。特に、最も高い血中濃度を示した症例で、EGFR-TKI で最も重篤な副作用である急性肺障害が認められたことは、少なくとも血中濃度と肺障害の濃度依存性がある可能性が示された。しかしながら、ほぼ同程度に濃度が上昇した症例で急性肺障害を示さない患者も存在することから、更なる検討が必要と考えられる。

グレード 1 以上の副作用が 9 割の患者に認められたこと、血中濃度に個人差が大きく、毒性とある程度相関が認められることから、血中濃度および遺伝子検査を利用した投与量の設定の可能性が示された。本研究期間では体内動態と副作用との関連について評価を行ったが、今後は臨床効果である生存日数との関連を評価する必要がある。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Kawaguchi T, Hamada A, Hirayama C, Nakashima R, Nambu T, Yamakawa Y, Watanabe H, Horikawa H, Mitsuya H, Saito H. Relationship between an effective

dose of imatinib, body surface area, and trough drug levels in patients with chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol*, 2009 (in press). (査読有)

2. Yokoo K, Hamada A, Tazoe K, Sasaki Y, Saito H. Effects of oral administered S-1 on the pharmacokinetics of SN-38, irinotecan active metabolite, in patients with advanced colorectal cancer. *Ther Drug Monit*, 2009 (in press). (査読有)
3. Hira A, Watanabe H, Maeda Y, Yokoo K, Sanematsu E, Fujii J, Sasaki J, Hamada A, Saito H. Role of P-glycoprotein in accumulation and cytotoxicity of amrubicin and amrubicinol in MDR1 gene-transfected LLC-PK1 cells and human A549 lung adenocarcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, 75: 973-980, 2008. (査読有)
4. Hirayama C, Watanabe H, Nakashima R, Nambu T, Hamada A, Kuniyasu A, Nakayama H, Kawaguchi T, Saito H. Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells. *Pharm Res*, 25: 827-835, 2008. (査読有)

[学会発表](計 11 件)

1. 濱田哲暢, 川口辰哉, 平山知恵, 中島麗子, 南部健, 山川裕司, 堀川健太郎, 齋藤秀之. 慢性骨髄性白血病治療薬イマチニブの血中濃度と至適投与量の関連, 第 7 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 3 月 20-21 日, 2009, 名古屋.
2. 佐々木治一郎, 濱田哲暢, 岩本範博, 稲葉恵, 岸裕人, 浦田真紀, 牛島淳, 佐伯祥, 山下明寿, 千場博, 齋藤秀之, 興梠博次, 非小細胞肺癌患者におけるエルロチニブの薬物動態変動ならびに毒性との相関解析試験, 第 7 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 3 月 20-21 日, 2009, 名古屋.
3. 下方智也, 安田宜成, 河田健司, 濱田哲暢, 齋藤秀之, 松尾清一, 近藤征史, 今泉和良, 長谷川好規, 安藤雄一, 日本人におけるカルボプラチンの臨床薬理学的検討とカルバートの式の妥当性, 第 7 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 3 月 20-21 日, 2009, 名古屋.
4. 南部健, 中川亜衣子, 川口辰哉, 荒木令江,

濱田哲暢, 齋藤秀之, K562 細胞における BCR-ABL 非依存的活性化 ERK の imatinib 抵抗性獲得への寄与, 第 2 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 12 月 20-21 日, 2008, 京都

5. Kawaguchi T, Hamada A, Nakashima R, Horikawa K, Ishihara S, Saito H, Hiroaki Mitsuya, Characteristics of chronic-phase CML patients having durable cytogenetic response to low-dose imatinib, American Society of Hematology 50th Annual Meeting, December 6-9, 2008, San Francisco, USA.
6. 中島麗子, 南部健, 平山知絵, 濱田哲暢, 川口辰哉, 齋藤秀之, イマチニブ治療中の慢性骨髄性白血病患者における細胞内および血中薬物濃度の相関解析, 第 29 回日本臨床薬理学会年会, 12 月 4 日-6 日, 2008, 東京.
7. 山川 裕司, 中島 麗子, 平山 知絵, 濱田 哲暢, 川口 辰哉, 満屋 裕明, 齋藤 秀之, 日本人における慢性骨髄性白血病治療薬 イマチニブ(IM)の母集団薬物動態解析, 第 29 回日本臨床薬理学会年会, 12 月 4 日-6 日, 2008, 東京.
8. Hamada A, Kawaguchi T, Nakajima R, Hirayama C, Nanbu T, Watanabe H, Saito H. Therapeutic efficacy of imatinib at a reduced dose to relieve adverse effects was equivalent to the standard dose in chronic myeloid leukemia patients, American Association for Cancer Research 99th Annual Meeting, April 12-16, 2008, San Diego, USA.
9. 前田友紀子, 實松絵美子, 濱田哲暢, 齋藤秀之, 塩酸アムルピシンと塩酸イリノテカン併用における薬物動態学的検討, 第 28 回日本臨床薬理学会年会, 11 月 28 日-12 月 1 日, 2007, 宇都宮.
10. 南部健, 平山知絵, 渡邊博志, 中島麗子, 濱田哲暢, 國安明彦, 中山仁, 川口辰哉, 齋藤秀之, イマチニブ(IM)抵抗性白血病細胞株 K562-IM における ABC トランスポータ及び有機カチオントランスポータの発現・機能解析に基づく IM 耐性獲得機序の解明, 第 29 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 11 月 26-27 日, 2007, 仙台.
11. 横尾浩司, 濱田哲暢, 渡邊博志, 今井智之, 藤本裕美, 佐々木裕, 齋藤秀之, S-1 投与によるラット肝 breast cancer

resistance protein (Bcrp) の発現亢進と塩酸イリノテカン(CPT-11)体内動態変動, 第 29 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 11 月 26-27 日, 2007, 仙台.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)
エルロチニブの副作用又は薬効を判定する方法
発明者: 濱田哲暢, 佐々木治一郎, 齋藤秀之, 興梠博次
権利者: 国立大学法人熊本大学
番号: A91205A 特願 2009-116385
出願年月日: 2009.5.13
国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 哲暢(HAMADA AKINOBU)
熊本大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 0 0 3 2 2 3 1 3

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

齋藤 秀之(SAITO HIDEYUKI) (2007 年度は研究分担者)
熊本大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 4 0 2 2 5 7 2 7

川口 辰哉(KAWAGUCHI TATSUYA) (2007 年度は研究分担者)
熊本大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 5 0 2 4 4 1 1 6

松本 充博(MATSUMOTO MITSUHIRO) (2007 年度は研究分担者)
熊本大学・医学薬学研究部・准教授
研究者番号: 7 0 2 5 3 7 5 5

(3) 研究協力者

佐々木 治一郎(SASAKI JI-ICHIRO)
熊本大学・医学薬学研究部・助教
研究者番号: 6 0 4 1 9 6 3 7