

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07163

研究課題名(和文) 遺伝子プロファイルと血中濃度解析を活用した抗EGFR抗体薬の治療抵抗性の解明

研究課題名(英文) Development of a sandwich ELISA to detect Panitumumab, Cetuximab and Pembrolizumab concentration in patient plasma and its clinical application

研究代表者

須野 学 (Sunno, Manabu)

和歌山県立医科大学・薬学部・教授

研究者番号：20621189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究により、ペムプロリズマブの副作用である下痢は、ペムプロリズマブ血中濃度が高く推移した症例で発現する傾向にあることを明らかにした。ペムプロリズマブ血中濃度測定とともに下痢の評価を行うことは、下痢の重症化を防止し、ペムプロリズマブの治療継続、治療成績の向上につながり、患者のQOL維持向上が可能になると考えられる。

本研究の限界点として、症例数が少ないことが上げられる。今後は、症例数を重ね、下痢発現および重症化の要因がペムプロリズマブ血中濃度とその免疫応答にあることについて研究を展開する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、抗体医薬品パニツムマブ、セツキシマブ、ペムプロリズマブを用いた大腸癌治療において、各薬剤の血中濃度と治療効果としての生存期間、無病生存期間および副作用と各薬剤血中濃度の関連について検討した。各薬剤血中濃度と生存期間、無病生存期間に関連は認めなかった。しかし、ペムプロリズマブの副作用である下痢は、最低血中濃度が高く推移した症例で発現し、なかには入院処置を要した患者を認めた。ペムプロリズマブ最低血中濃度および下痢症状のモニタリングを行うことにより、早期に対処し、重症化を防ぐことが治療継続、治療成績の向上につながり、患者のQOL維持向上が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that diarrhoea, a side effect of pembrolizumab, tends to occur in patients with a persistent high trough concentration of pembrolizumab. Pembrolizumab plasma concentrations monitoring and diarrhoea scoring should prevent the severity of diarrhoea and discontinuation of pembrolizumab treatment. Continuation of pembrolizumab treatment will lead to improved treatment outcomes and the QOL of patients.

A limitation of this study is the small number of cases. Further studies will be conducted to investigate whether pembrolizumab blood levels and the immune response to pembrolizumab are factors in the onset and severity of diarrhoea in cancer patients.

研究分野：医療薬学

キーワード：抗EGFR薬 ペムプロリズマブ 副作用 薬物体内動態 遺伝子プロファイル

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

切除不能進行再発大腸がんに対し、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)や上皮細胞増殖因子(EGF)などの分子標的治療薬が臨床に導入されたことにより、その治療戦略は延命を目標とした緩和的治療だけでなく、治癒を目指すことも可能となってきた。しかし、分子標的治療薬（特に抗 EGFR 抗体薬）の使用は、大腸がん化学療法分野において獲得耐性または二次耐性という問題を改めて浮き彫りにした (Misale S *et al*, Nature 2012)。分子標的治療薬による獲得耐性は、EGFR-TKI（チロシンキナーゼ阻害剤）治療により認められる EGFR の二次変異（獲得変異）の出現が有名である (Kobayashi S *et al*, NEJM 2005)。次いで MET 遺伝子増幅や HGF 過剰発現等の側副経路の活性化 (Yano S *et al*, Can Res 2008) といった耐性機構が挙げられる。しかしながら、これら遺伝子変異だけで EGFR-TKI 耐性の全てを網羅することはできない。

また、大腸がんにおける発がん要因の1つとして、マイクロサテライト不安定性 (Microsatellite Instability; MSI) がある。MSI とは、DNA 複製におけるミスマッチ修復 (mismatch repair; MMR) 機能の低下 (MMR deficient; dMMR) により、1塩基から数塩基の繰り返し配列であるマイクロサテライト配列の反復回数に変化が生じた状態のことである。MSI を高頻度に認める場合を MSI-High (MSI-H)、低頻度に認める場合を MSI-Low (MSI-L)、認めない場合を Microsatellite Stable (MSS) と呼ぶ。MSI により、腫瘍抑制、細胞増殖、DNA 修復、アポトーシスなどに関与する遺伝子群に、修復異常による変異が集積し、がんの発生および増殖に関与する。大腸がんにおいて、MSI-H は大腸がん全体の約 15%を占め、12%が散発性、3%が遺伝性の症例である。MSI-H の腫瘍は 5-FU に対する反応性が低いことを示唆するエビデンスが増えているが、MSI の状態別の治療に対する明確な規定はなく、依然として従来の化学療法が標準治療として用いられている。

これまでに抗 EGFR 抗体薬治療に対する進行再発大腸癌の獲得耐性機序の解明について種々の報告がなされているが、統一の見解は得られていない。加えて、大腸がんにおける抗 EGFR 抗体薬の使用によって惹起される獲得耐性、遺伝子変異発現について、抗 EGFR 抗体薬の生体内濃度、治療期間および総投与量等との関連性は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

パニツムマブ(Pmab)、セツキシマブ(Cmab)は、切除不能進行再発大腸がんの効果を示す抗 EGFR（上皮成長因子受容体）抗体薬である。近年、抗 EGFR 抗体薬は RAS 遺伝子野生型の患者に強く奏功することが期待されるため、RAS 野生型の患者に投与されるが、継続投与により、最終的には治療抵抗性、すなわち獲得耐性を示し、全ての症例は増悪への道を辿る。獲得耐性の原因には、EGFR 下流の RAS シグナル伝達経路に属する遺伝子群の二次的変異の出現等が報告されているが、それら変異は獲得耐性を呈した患者の半数にしか認められない。既報では、抗体薬血中濃度と奏功の関連性は否定的報告が多いが、抗体薬血中濃度と副作用の関連を検討した報告はない。本研究では、患者の検体を用い、抗 EGFR 抗体薬の獲得耐性の発現率やパターン、奏功率や副作用などの治療経過情報と抗 EGFR 抗体血中濃度の関連を検討し、抗 EGFR 抗体薬の個別化投与プログラムの構築に繋げる。加えて、Pmab や Cmab の抗体薬に対しても耐性を生じる症例が多数報告され、Pembrolizumab (PEM)が導入されているが、PEM の効果および有害事象と血中濃度の関連性は不明である。本研究は臨床応用を目的とし、ELISA を用いたヒト生体試料中の PEM 血中濃度測定法を確立し、PEM 血中濃度と効果および有害事象の関連性を明らかにするこ

とを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 患者データ

本研究では、2019年4月1日から2021年7月31日までに岡山大学病院にて切除不能な進行再発大腸がんと診断され、PEMによる治療を行った患者を対象とした。PEMの投与開始から3週、6週、12週目の投与直前およびPDと判定された時点での血清を採取し、PEMの血中濃度を測定した。高頻度マイクロサテライト不安定性(MSI-H)の検出は、コンパニオン診断薬であるMSI検査にて行なった。

#### (2) 試薬および測定機器

Cmab および Pmab 標準品はフナコシ株式会社、PEM 標準品は BioVision 社から購入した。捕捉抗体および検出抗体 HCA220, HCA228P, HCA297P, HCA297P, 抗体希釈液 HISPEC Assay Diluent(BUF049A)は BIO-RAD 社から購入した。その他、PBS (Phosphate buffered saline) tablet (タカラバイオ株式会社), Tween20 (BIO-RAD 社), BSA (Bovine serum albumin) (Sigma 社), QuantaBlu™ Fluorogenic peroxidase substrate (Thermo Fisher Scientific 社), コンセーラ 1 号 (日水製薬) を購入し用いた。マイクロタイタープレート (MICROPLATE, 96WELL, PS, HALF AREA, SCHWARZ, HIGH BINDING, STERIL, 10ST. / BTL) は Greiner 社から購入した。

#### (3)測定機器

蛍光強度は、FlexStation 3 (MOLECULAR DEVICES 社) を用い、Excitation : 325nm, Emission : 420nm で測定した。測定したデータの解析は、SoftMax Pro 5.4 (MOLECULAR DEVICES 社) を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1)血中濃度測定法の確立

Cmab, Cmab および PEM 血中濃度の測定はサンドイッチ ELISA 法を用いて確立した。図 1 に PEM 血中濃度測定法の結果を示す。得られた検量線は、4 パラメーターロジスティックモデルにより  $y = (-26.8-17700)/(1+(x/30.3)^{1.16})+17700$  で表されるシグモイド型の曲線を示し、相関係数  $r=0.999$  であった。PEM (キイトルーダ®) 添付文書薬物動態パラメータより、PEM 200 mg を

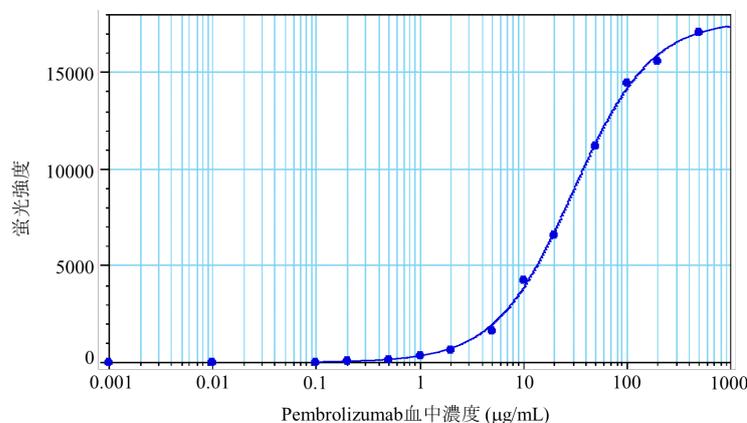


図 1. Pembrolizumab 血中濃度の検量線

x 軸に PEM 濃度の対数, y 軸に蛍光強度をプロットし作成した。

$$y = (-26.8-17700)/(1+(x/30.3)^{1.16})+17700, r=0.999.$$

単回投与時の最高濃度は 59.1 $\mu$ g/mL, トラフ濃度は 18.1 $\mu$ g/mL, 3 週間間隔で反復投与した時の定常状態におけるトラフ濃度は 30.9 $\mu$ g/mL であり, 検量線はおおよそ 5-200 $\mu$ g/mL の範囲で直線性を示し, 本測定法は臨床サンプル中の PEM 濃度定量に適していると考えられる。同様に, C<sub>mab</sub> 血中濃度測定法は定量下限を 10 $\mu$ g/mL とする  $y = (-174 - 19600)/(1 + (x/45)^{1.31}) + 19600$  ( $r = 0.999$ ) で表されるシグモイド型の検量線を, P<sub>mab</sub> においては, 0.71  $\mu$ g/mL を定量下限とする,  $y = (172-22900)/(1+ (x/ 34)^{1.64}) + 22900$  ( $r=0.999$ ) で表されるシグモイド型の検量線を得た。

### (2) Pembrolizumab トラフ血中濃度と治療効果の関連性

9名の患者を MSI の状態に応じて, MSI-H 群 (n=3) および MSI-L 群 (n=6) に分け, 解析を行った。各群において, 測定した PEM トラフ血中濃度の 4 点のうちの最高濃度を抽出し, MSI-H 群と MSI-L 群の間に差について Mann-Whitney の U 検定を行ったところ, MSI の状態と PEM トラフ血中濃度との間に有意な差は認められなかった (PEM トラフ血中濃度の中央値, 28.0 mg/mL vs. 33.3 mg/mL) (図 2)。また, MSI-H 群と MSI-L 群において PFS の中央値について比較したところ, 同様に MSI-H 群と MSI-L 群の間に有意差は認められなかったが, PFS は MSI-H 群においてより長い傾向にあった (10 か月 vs. 8.3 か月)。

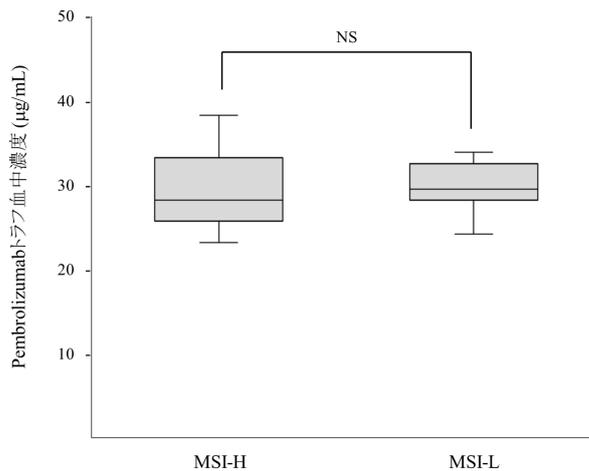


図 2. MSI の状態別の Pembrolizumab トラフ血中濃度  
MSI-H 群と MSI-L 群で, Pembrolizumab トラフ血中濃度を比較した。  
NS : Not Significant ( $P > 0.05$ ) Mann-Whitney の U 検定

### (3) Pembrolizumab トラフ血中濃度と有害事象の関連性

本研究では, PEM により発現する有害事象のうち, 特に発現頻度の高い下痢に着目した。9名の患者のうち, 4名で下痢が発現した。うち3名で1日5回以上, 1名で1日3回以上の下痢があった。1日5回以上の下痢があった患者は保水投与を行った。9名の患者を下痢発現 (+) 群と下痢発現 (-) 群に分け, PEM トラフ血中濃度について Mann-Whitney の U 検定を行ったところ, 下痢発現 (+) 群で PEM トラフ血中濃度が有意に高かった (PEM トラフ血中濃度の中央値, 33.3 mg/mL vs. 27.8 mg/mL,  $P < 0.05$ ) (図 3)。

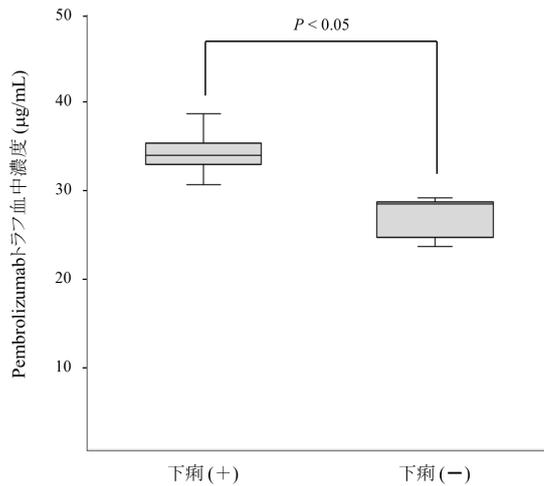


図 3. 下痢発現(+)群と下痢発現(-)群における Pembrolizumab トラフ血中濃度の比較

下痢が発現した群（下痢(+)）と発現しなかった群（下痢発現(-)）で、PEM トラフ血中濃度のうち最高血中濃度を比較した。 $P > 0.05$  : Mann-Whitney の  $U$  検定

大腸がんの治療において、PEMによるPFSの延長効果は、MSI-Hの患者に限定されることがこれまでの報告で知られている。本研究では、MSI-H群とMSI-L群のPFSの間に有意な差は認められなかったものの、MSI-H群ではMSI-L群と比較してPFSが長い傾向があり、これまでの報告と一致していた。MSIの状態以外にPFSに影響を与える因子はこれまでに明らかになっていないため、本研究ではPEMトラフ血中濃度とPFSとの関連について検討を試みた。しかしながら、MSI-H群とMSI-L群でPEMトラフ血中濃度の間に差がなかったことから、PEMトラフ血中濃度のモニタリングによってPEMによるPFS延長効果を予測することは難しいと考える。また、PEMの有害事象の一つとして下痢が挙げられる。下痢は、PEMを投与した患者の15%で発現するという報告があり、腸炎の症状として発現していた場合、腸炎が悪化すると穿孔やイレウスに至る可能性があり、早期の対処が必要であると報告されている。これまでに、PEMトラフ血中濃度と下痢の発現との関連は明らかにされていないため、本研究では、下痢に着目し、下痢の発現とPEMトラフ血中濃度の関連について検討した。その結果、下痢が発現した患者群では、下痢が発現しなかった患者群と比較してPEMトラフ血中濃度が有意に高いことを認めた。本研究の症例では、補水投与処置を要するまでの重度の下痢を発現した患者では、PEMトラフ血中濃度が $30 \mu\text{g/mL}$ を超えていた。PEMトラフ血中濃度の測定および有害事象のモニタリングを行うことにより、下痢に対して早期に対処できるよう備えることで、PEM治療の継続、治療成績の向上および患者のQOL維持・向上が可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 須野学, 米田紗英, 渡辺紗羅, 中村美沙樹, 永坂岳司
2. 発表標題 Cetuximab血中濃度測定法の開発と臨床応用
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須野学, 米田紗英, 松原和夫
2. 発表標題 Pembrolizumab血中濃度測定法の開発と臨床応用
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	永坂 岳司 (Nagasaka Takeshi) (30452569)	川崎医科大学・医学部・准教授  (35303)	
研究分担者	松本 准 (Matsumoto Jun) (60709012)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教  (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	母里 淑子  (Mori Yoshiko)  (70708081)	埼玉医科大学・医学部・講師    (32409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関