

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16040

研究課題名（和文）抗EGFR抗体薬の血中動態・糖鎖修飾の定量的評価に基づくがん治療効果の個人差解明

研究課題名（英文）Investigation of anti-cancer effect of anti-EGFR antibody based on quantitative evaluation of its pharmacokinetics and glycosylation in cancer patients

研究代表者

柴田 海斗（Shibata, Kaito）

信州大学・医学部附属病院・薬剤主任

研究者番号：00857055

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：がん治療に用いられる抗EGFR抗体薬の臨床効果には大きな個人差が存在する。その要因として、抗体薬の体内動態に加えて、がん病態の進行や抗体構造内の糖鎖修飾による影響が考えられる。本研究では、がん悪液質の病態に着目して、頭頸部がん患者におけるセツキシマブの体内動態及び臨床症状の個人差要因を明らかにするとともに、血中セツキシマブの糖鎖構造解析法の開発を行った。本研究の成果として、がん悪液質の進行とそれに関連する炎症性サイトカイン及び血清アルブミンの挙動は、血中セツキシマブ濃度の低下に関連していた。また、悪液質の病態における全身性の炎症は、セツキシマブによる全身倦怠感の重症化に寄与していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、進行がん患者における抗EGFR抗体薬の体内動態や臨床効果の個人差を規定する要因が一部明らかとなった。この研究成果の学術的意義として、がん悪液質の進行度やがん進行に伴う全身性の炎症度を評価することで、抗EGFR抗体薬の体内動態や身体症状の予測が可能となる。本研究の社会的意義として、がん患者における抗EGFR抗体薬の体内動態や臨床症状の予測は、その忍容性を向上させるとともに、がん化学療法における抗体薬の薬物治療管理の質向上が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Cancer patients have a large variation in anti-cancer and adverse effects of anti-EGFR antibody drugs. The variation is partially associated with individual pharmacokinetics. In addition, the cancer progression and glycosylation of the antibody structure are potentially responsible for clinical responses to anti-EGFR antibody drugs. This study focused on the pathology of cancer cachexia and clarified the factors of individual variability in the pharmacokinetics and clinical symptoms of cetuximab in head and neck cancer patients. Although it is still in the development stage, this study developed a method for determining the carbohydrate structure of serum cetuximab. The progressive cancer cachexia and its related alteration of serum proinflammatory cytokine and albumin were associated with the decrease of serum cetuximab. The elevated systemic inflammation in cachectic cancer patients led to severe fatigue under cetuximab treatment, regardless of its pharmacokinetics.

研究分野：医療薬学、臨床薬理学、薬物動態学

キーワード：がん化学療法 抗EGFR抗体薬 薬物動態 臨床効果 がん悪液質 炎症性サイトカイン 糖鎖修飾 セツキシマブ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 大腸がんや頭頸部がんの治療に用いられる抗ヒト上皮成長因子受容体 (EGFR) 抗体薬の臨床効果には大きな個人差が存在する。近年、がん治療効果の予測因子として、抗体薬の血中濃度が注目されており、抗 EGFR 抗体薬であるセツキシマブの血中濃度が高値を示すがん患者において、無増悪生存期間の延長が確認された [1]。セツキシマブの治療では、重篤な皮膚障害により休薬や治療中止となる場合があるため、その重症度予測や早期の皮膚治療の実施も重要となる。報告者らは、頭頸部がん患者において、セツキシマブの血中トラフ濃度が皮疹の重症度と関連することに加えて、その症状緩和療法を選択に関連するセツキシマブ濃度のカットオフ値を報告している [2]。しかしながら、実臨床において、セツキシマブの臨床効果の十分な予測には至っていない。

(2) 抗体薬の体内動態を規定する因子として、免疫グロブリン G やアルブミン、標的抗原タンパクがあり [3]、これらの血中濃度が基準値から大きく逸脱する病態では、抗体薬治療の有効性・安全性が低下するおそれがある。がん悪液質は、体重減少や骨格筋減少を特徴とする代謝障害症候群であり、内因性タンパク質の分解が亢進する進行性の病態である [4]。がん悪液質の病態では、全身性炎症を背景としたタンパク質の異化亢進と種々の身体症状・精神症状が発現することで、抗体薬の体内動態や臨床効果に個人差が生じると考えられる。

(3) 抗体薬には血中濃度の個人差に加えて、分子構造の多様性が見られる。抗体薬の基本骨格には糖鎖が結合しており、糖残基の付加や脱離によって糖鎖構造の不均一性が生じる。実際に、ヒトの体内において、抗体薬の糖鎖構造変化が確認されているものの、その臨床効果への影響については明らかではない [5]。セツキシマブに関しては、N 型糖鎖の脱フコース化により、抗腫瘍活性である ADCC 活性が 5 倍以上に上昇したことが *in vitro* で報告されている [6-8]。しかし、がん患者において血中セツキシマブの糖鎖構造を同定する方法は確立されておらず、糖鎖修飾を定量的に評価した場合の臨床的有用性については明らかではない。

2. 研究の目的

がん悪液質の病態に着目して、セツキシマブの体内動態・糖鎖修飾の定量的評価に基づきがん治療効果の個人差要因を解明することを目的とする。これらの目的を達成するための検討項目を (1-3) に示す。

(1) がん悪液質の病態進行の観点から、頭頸部がん患者における血中セツキシマブ濃度の個人差要因を明らかにする。

(2) がん悪液質の病態進行の観点から、頭頸部がん患者におけるセツキシマブ投与時の臨床症状の個人差要因を明らかにする。

(3) がん患者に適用可能な血中セツキシマブの糖鎖構造解析法の開発を行う。セツキシマブの糖鎖修飾と体内動態及び臨床効果との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 倫理事項

本研究のヒトを対象とした臨床研究は浜松医科大学及び信州大学の臨床研究倫理委員会の承認を受けて実施した。本研究は、ヘルシンキ宣言及び「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」に従い実施した。被験者には、本研究の実施計画、研究の意義、考えられる有害反応及び試験への参加中止の自由などについて、口頭及び文書で説明した後、自由意思に基づく参加への同意を文書で得た。

(2) 対象患者、試験スケジュール

浜松医科大学医学部附属病院において、頭頸部がんに対してセツキシマブを週 1 回点滴静脈内投与する患者 49 名を登録した。また、入院加療を要する感染症を併発している患者、高度肝機能障害 (血清総ビリルビン値 > 2.0 mg/dL) を有する患者、活動性の自己免疫性疾患を有する患者、IL-6 を強力に抑制する薬剤 (カルシニューリン阻害薬など) の投与を受けている患者は除外した。対象患者については、セツキシマブの投与 4 回目以降の投与直前において、上腕部静脈から通常の臨床検査とともにプレーン採血管にて血液を採取した。

(3) 薬物動態解析

セツキシマブの血清中濃度測定には、報告者らの構築した液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法を用いた[9]。検量線範囲及び定量下限は、それぞれ、4-200 $\mu\text{g/mL}$ 及び 4 $\mu\text{g/mL}$ とした。セツキシマブの血中曝露量の評価については、薬物血中濃度を体表面積あたりの投与量で除した補正值を用いた。一方、臨床症状との関係解析においては、補正を行わない絶対濃度を用いた。

(4) がん悪液質、炎症マーカーの評価

がん悪液質の進行度の評価方法について、炎症に基づく進行度分類である血清アルブミン値及びC反応性タンパク (CRP) 値による Glasgow Prognostic Score (GPS) での評価[10]と症状に基づく進行度分類である体重減少及び生存予後による Fearon らの国際基準での評価[11]を行った。血中 IL-6 濃度は市販の ELISA キット (BioLegend Inc. USA) を用いて測定した。

(5) 臨床症状の評価

悪液質に関連する身体症状及び中枢症状として、それぞれ、全身倦怠感及びせん妄の発現を診療録から収集した。各臨床症状の重症度については、CTCAE ver. 4.0 を用いて評価し、グレード 1 以上を症状ありと判定した。患者情報として、全身倦怠感及びせん妄の発現に影響を及ぼす可能性のあるオピオイド鎮痛薬、睡眠薬、抗精神病薬、抗うつ薬の併用の有無についても評価した。

(6) 血中セツキシマブの糖鎖構造解析

ヒト血中セツキシマブの糖鎖構造解析法の新規確立のために、以下の検討を行った。

① 固相化パパイイン (GL Science, Japan) を用いて、セツキシマブを遠心消化し、糖ペプチドに断片化した。消化したセツキシマブを蛍光検出逆相液体クロマトグラフィー (HPLC) (UFLCXR, Shimadzu Corporation, Japan) のグラジエント溶出を用いて測定し、セツキシマブの Fab および Fc フラグメントの分離分析における HPLC 条件を最適化した。

② ①で最適化した HPLC 条件に基づき、ナノ流速液体クロマトグラフィーに接続したフーリエ変換型質量分析計 (Q Exactive, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) を用いて、セツキシマブ由来の糖ペプチドを測定した。測定で得られたデコンボリューションマススペクトルに基づいて、セツキシマブの Fc フラグメントに結合する N 型糖鎖に関する構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) 血中セツキシマブ濃度の個人差要因

① 血中セツキシマブの絶対濃度の中央値及び四分位範囲 (IQR) は、それぞれ、53.5 及び 38.7-80.4 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、体表面積あたりの投与量で補正した血中セツキシマブ濃度の中央値及び IQR は、それぞれ、0.21 及び 0.16-0.32 $\mu\text{g/mL per mg/m}^2$ であり、大きな個人差が認められた。

② GPS 0、1 及び 2 を有する患者は、それぞれ、19 名、15 名及び 15 名であった。また、前悪液質、悪液質及び不応性悪液質を有する患者は、それぞれ、15 名、24 名及び 10 名であった。GPS 2 の患者および不応性悪液質患者では、血中 IL-6 濃度の上昇が認められた。

③ 血中セツキシマブ濃度は、GPS 0 及び前悪液質の患者に比べて、悪液質が進行した GPS 2 ($P = 0.030$) 及び不応性悪液質 ($P = 0.014$) の患者において、それぞれ低値を示した (図 1)。

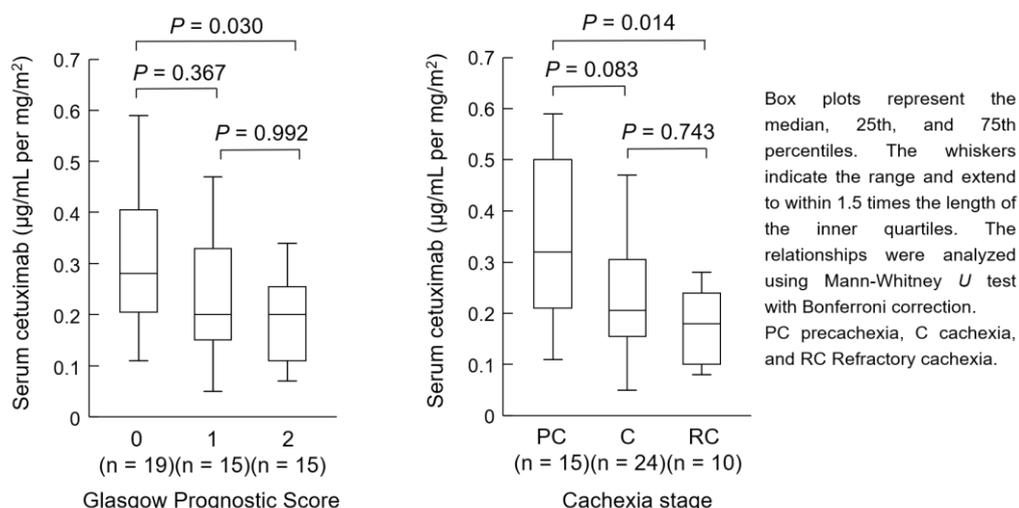


図1 悪液質の進行度と血清中セツキシマブ濃度との関係

単回帰分析において、血中セツキシマブ濃度は、血中 IL-6 濃度と負の相関を示し ($r_s = -0.305$, $P = 0.033$)、血清アルブミン値と正の相関を示した ($r_s = 0.331$, $P = 0.020$) (図 2)。一方で、血中セツキシマブ濃度は血清 CRP 値とは関連しなかった ($r_s = -0.229$, $P = 0.113$)。

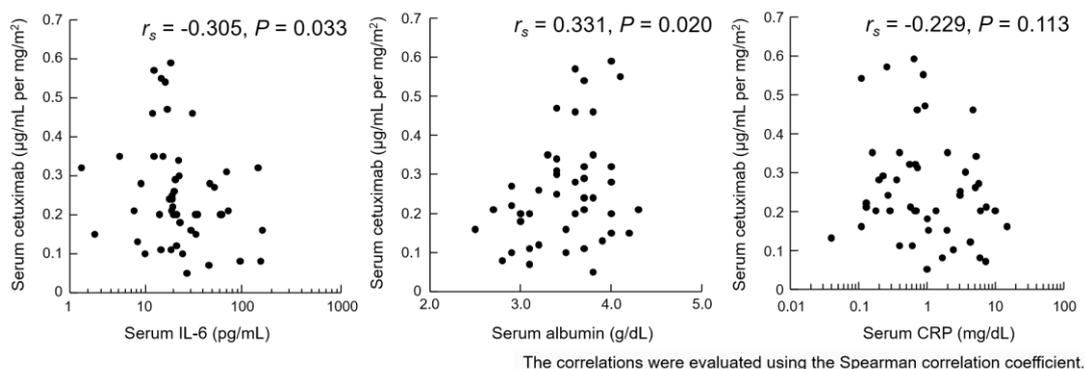


図2 悪液質マーカー濃度と血清中セツキシマブ濃度との関係

(2) セツキシマブ投与時の臨床症状の個人差要因

① 49名中36名で全身倦怠感(全グレード)の発現が確認され(発現率73%)、そのうち9名はグレード2-3の重症度であった(18%)。これらの発現率はPhase II試験の値と類似していた[12]。また、49名中5名でせん妄(全グレード)の発現が確認された(発現率10%)。

② GPS 0、1及び2の患者において、全身倦怠感(全グレード)を有していたのは、それぞれ、14名、11名及び11名であり、全身倦怠感(グレード2-3)を有していたのは、それぞれ、2名、1名及び6名であった。また、前悪液質、悪液質及び不応性悪液質の患者において、全身倦怠感(全グレード)を有していたのは、それぞれ、11名、16名及び9名であり、全身倦怠感(グレード2-3)を有していたのは、それぞれ、0名、1名及び8名であった。

③ GPS 0、1及び2の患者において、せん妄(全グレード)を有していたのは、それぞれ、2名、0名及び3名であった。また、前悪液質、悪液質及び不応性悪液質の患者において、せん妄(全グレード)を有していたのは、それぞれ、1名、1名及び3名であった。

④ 全身倦怠感を有する患者では、血中 IL-6 濃度の上昇が認められた ($P = 0.048$)。グレード2以上の全身倦怠感を有する患者では、グレード1以下の患者に比べて、血中 IL-6 濃度が上昇し ($P = 0.001$)、血清アルブミン値の低下が認められた ($P = 0.004$)。全身倦怠感の重症化と GPS による悪液質進行度 ($P = 0.033$) 及び国際基準による悪液質進行度 ($P < 0.001$) との間に関連性が認められた。一方、血中セツキシマブの絶対濃度は全身倦怠感の発現 ($P = 0.319$) 及び重症度 ($P = 0.140$) と関連しなかった。また、オピオイド鎮痛薬、睡眠薬、抗精神病薬及び抗うつ薬の併用は、全身倦怠感の発現及び重症度と関連しなかった。

⑤ 血中セツキシマブの絶対濃度、血中 IL-6 濃度及び悪液質の進行度はせん妄の発現と関連しなかった。また、オピオイド鎮痛薬、睡眠薬、抗精神病薬及び抗うつ薬の併用は、せん妄の発現と関連しなかった。

(3) 血中セツキシマブの糖鎖構造解析法の確立

① 蛍光検出逆相 HPLC を用いて、固相化パパイニン消化後のセツキシマブを測定したところ、Fab および Fc フラグメントと考えられるクロマトグラムのピークが、それぞれ、21.0 分及び 17.5 分に検出された。

② フーリエ変換型質量分析計で得られたデコンボリューションマスペクトルの結果から、解析対象である N 型糖鎖が結合したセツキシマブ由来の Fc フラグメントが同定された。Fc フラグメントのマスペクトルにおいて、ガラクトース残基の結合数が異なる同位体ピークが検出されており、N 型糖鎖構造の不均一性が認められた。しかしながら、検出されたピークの強度が著しく低く、臨床検体の分析には感度不十分であった。その理由として、本研究で取り扱う抗体フラグメントの質量は約 50,000Da と高分子であり、これまでに我々が分析対象とした 1,000Da 程度のフラグメントとは HPLC 条件や質量分析条件が異なるため、それらの最適化が困難であった。結果として、ヒト血中セツキシマブの N 型糖鎖構造解析法は臨床適用可能な段階まで至らなかった。

<引用文献>

- [1] Azzopardi N, Lecomte T, Ternant D, et al. Cetuximab pharmacokinetics influences progression-free survival of metastatic colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2011;17:6329-6337
- [2] Shibata K, Naito T, Hirakawa S, et al. Correlations between serum cetuximab and EGFR-related markers, and skin disorders in head and neck cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2021;87:555-565
- [3] Abe K, Shibata K, Naito T, et al. Impacts of cachexia progression in addition to serum IgG and blood lymphocytes on serum nivolumab in advanced cancer patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2022;78:77-87
- [4] Fearon KC, Glass DJ, Guttridge DC. Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell Metab* 2012;16:153-166
- [5] Goetze AM, Liu YD, Zhang Z, et al. High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. *Glycobiology* 2011;21:949-959
- [6] Herter S, Herting F, Mundigl O, et al. Preclinical activity of the type II CD20 antibody GA101 (obinutuzumab) compared with rituximab and ofatumumab in vitro and in xenograft models. *Mol Cancer Ther* 2013;12:2031-2042
- [7] Yi CH, Ruan CP, Wang H, et al. Function characterization of a glyco-engineered anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 2014;35:1439-1446
- [8] Shields RL, Lai J, Keck R, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ₃ R1 and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 2002;277:26733-26740
- [9] Shibata K, Naito T, Okamura J, Hosokawa S, Mineta H, Kawakami J. Simple and rapid LC-MS/MS method for the absolute determination of cetuximab in human serum using an immobilized trypsin. *J Pharm Biomed Anal* 2017;146:266-272
- [10] Forrest LM, McMillan DC, McArdle CS, Angerson WJ, Dunlop DJ. Evaluation of cumulative prognostic scores based on the systemic inflammatory response in patients with inoperable non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2003;89:1028-1030
- [11] Fearon K, Strasser F, Anker SD, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol* 2011;12:489-495
- [12] Yoshino T, Hasegawa Y, Takahashi S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab for the first-line treatment of Japanese patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: results of a phase II trial. *Jpn J Clin Oncol* 2013;43:524-531

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shibata Kaito, Naito Takafumi, Hirakawa Satoshi, Suzuki Koji, Hosokawa Seiji, Mineta Hiroyuki, Kawakami Junichi	4. 巻 87
2. 論文標題 Correlations between serum cetuximab and EGFR-related markers, and skin disorders in head and neck cancer patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Chemotherapy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 555 ~ 565
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00280-020-04228-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田海斗、内藤隆文、細川誠二、前川真人、川上純一
2. 発表標題 頭頸部がんにおける悪液質の進行度と血清中セツキシマブ濃度および臨床症状との関係解析
3. 学会等名 第42回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田海斗、内藤隆文、平川聡史、細川誠二、峯田周幸、川上純一
2. 発表標題 頭頸部がん患者におけるセツキシマブの血中濃度に基づく皮膚障害の重症度予測とその症状緩和療法の選択
3. 学会等名 第14回日本緩和医療薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田海斗
2. 発表標題 抗体医薬品のTDM研究 ~がん領域の臨床研究を例に~
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2022/第30回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田海斗
2. 発表標題 がん領域における抗体医薬品のTDMとその臨床的意義
3. 学会等名 第43回日本臨床薬理学会学術総会
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
研究協力者	内藤 隆文 (Naito Takafumi)		
研究協力者	坂口 健太 (Sakaguchi Kenta)		
研究協力者	川上 純一 (Kawakami Junichi)		

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
---------	---------