

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：32409
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22501033
 研究課題名（和文） 卵巣癌／腹膜癌の新規 TC 療法効果予測因子のゲノム薬理学的解析と新規分子標的の探索
 研究課題名（英文） Pharmacogenetic analyses of a novel TC chemotherapy on ovarian and peritoneal cancers and exploration of molecular targets
 研究代表者
 江口 英孝 (EGUCHI HIDETAKA)
 埼玉医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：00260232

研究成果の概要（和文）：

週1回パクリタキセル(TXL)/腹腔内カルボプラチン(CBDCA)投与による 卵巣癌/腹膜癌治療の第2相臨床試験において、各種の遺伝子多型 について決定し、初回投与時のTXLの各種薬物動態学(PK)パラメーターならびに副作用出現との関連について検討した。その結果*GSTM1*欠失、*ABCB1* 2677G>T/A, *CYP3A5* rs776746 G>A の各遺伝子多型が、血中TXLのPKパラメーターならびに重篤な好中球減少および白血球減少の程度と有意に関連することを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

In a phase II clinical trial of weekly paclitaxel (TXL)/ IP carboplatin (CBDCA) administration on ovarian and peritoneal cancers, we determined various genetic polymorphisms and analyzed their associations with pharmacokinetics (PK) parameters of TXL at first administration and adverse effects. We found that *GSTM1* deletion, *ABCB1* 2677G>T/A and *CYP3A5* rs776746 gene polymorphisms were significantly associated with the PK parameters, appearance of grade 4 neutropenia and extent of leukopenia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：薬効評価と予測、卵巣癌

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌/腹膜癌の進行癌（II～IV期）における初回手術後の残存腫瘍が1cm以上のsuboptimalな症例の場合、TXL(180 mg/m²)ならびにCBDCA (AUC=5～6)を3週毎にivで投

与するTC療法が標準的に行われている。しかしながら標準TC療法の奏効率は60%程度であり、より奏効率の高い治療法開発が必要とされている。連携研究者である藤原はCBDCAの投与経路をipに変更し、奏効率の著しい

向上が得られることを報告している (1) Fujiwara K, et al. *Int J Gynecol Cancer*. 19:834-837. 2009; 2) Nagao S, Fujiwara K, et al. *Int J Gynecol Cancer*. 18:1210-1214. 2008)。また、TC 療法を改善したものとして、TXL を 80mg/m²(dose dense) で毎週 iv 投与する臨床試験 (JGOG3016) が婦人科悪性腫瘍化学療法研究機構によって行われ、標準的 TC 療法に比べ高い抗腫瘍効果が認められている (Katsumata N *et al.* *Lancet*. 374:1331-8. 2009)。一方、この試験では TXL の dose dense 投与による血液毒性などの副作用の頻度が高いことが報告され、患者個人々の遺伝的背景や癌の個性 (遺伝子発現/メチル化パターン等) に合わせたテーラーメイド医療の確立が急務である。これらの結果を踏まえ、我々は岩手医科大学産婦人科、自治医科大学産婦人科、鳥取大学がんセンターと共同で、CBDCA 腹腔内投与/weekly TXL 併用療法という新たな投与方法による TC 療法の臨床研究 (DOFMET Protocol #4/UMIN000001713) を立ち上げた。この研究では、臨床研究と並行し、新規 TC 療法の有用性・安全性をゲノム薬理学的解析によって検証するため、末梢血リンパ球 DNA、腫瘍部・非腫瘍部の迅速凍結組織の保管ならびに初回投与時の PK 採血を行っている。本研究では、まずこれらを基に卵巣がん/腹膜がんにおけるテーラーメイド医療に向けた分子基盤の確立を行う。

2. 研究の目的

予後不良である卵巣癌/腹膜癌のより良い治療法開発に資するため、

(1) TC 療法の新規投与方法 [Carboplatin (CBDCA) 腹腔内投与/weekly Paclitaxel (TXL) 併用療法] の有用性と安全性に関する予測因子をゲノム薬理学的解析によって策定する。

(2) 新規分子標的候補遺伝子を網羅的遺伝子発現解析ならびに分子腫瘍学・バイオインフォマティクスの手法を用いて同定し、その生物学的機能について検討し、新たな治療への礎を築く。

3. 研究の方法

上記第 II 相臨床試験において TXL 初回投与時に 0, 2, 8, 24 時間後の PK 採血が行われた 47 名の患者について解析を行った。血漿分離後、TXL の測定は株式会社 SRL (八王子、東京) に委託した、PK パラメーターはノンコンパートメントモデルに基づき、統計言語環境 “R” [R Development Core Team (2010).

R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.]ならびに “PK” パッケージ ver. 1.2-5 (Jaki T and Wolfsegger MJ. Estimation of pharmacokinetic parameters with the R package PK. *Pharmaceutical Statistics*. 2011 10: 284-8.) を用いて算出した。ABCB1 rs3213619, rs1128503, rs2032582, rs1045642, ABCC1 rs4148356, ABCC2 rs3740066, CYP1B1 rs1056836, CYP2C8 rs11572093, CYP3A4 rs12721627, CYP3A5 rs776746 遺伝子多型は、ライフテックノロジーズ社の TaqMan® SNP Genotyping Assays あるいは TaqMan® Drug Metabolism Assays, Absolute QPCR Mix (サーモフィッシャー) ならびに Light Cycler480 (ロシュ) を用いて測定した。GSTM1, GSTT1 の遺伝子欠失多型は既報 (Medeiros R, et al. *Int J Clin Oncol*. 8:156-161. 2003) に基づき、マルチプル PCR 後、アガロースゲル電気泳動にて決定した。評価可能であった 44 名については、CTCAE v4.0 に従って副作用の評価を行った。

4. 研究成果

患者の年齢および体表面積、TXL の最高血中濃度 (Cmax), 血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) ならびに平均滞留時間 (MRT) は表 1 の通りであった。

表 1. 患者背景と TXL PK パラメーター

	Mean	95%CI	Range
Age (yrs)	59.9	(56.5-63.2)	(37-78)
Body surface area (m ²)	1.43	(1.40-1.47)	(1.10-1.76)
Cmax (ng/mL)	2364	(2062-2665)	(285-4620)
AUC _{0-24hr} (ng*hr/ml)	4756	(4260-5253)	(1996-9611)
MRT (hr)	5.41*	(4.99-5.81)	(3.14-13.67)

47 名の日本人卵巣癌/腹膜癌患者の各遺伝子型分布を表 2 に示す。各遺伝子型の頻度は HapMapJPT などの既報における日本人一般集団のものとはほぼ一致していた。

表 2. 47 名の日本人卵巣癌/腹膜癌患者の遺伝子型分布

Gene symbol	Polymorphism	Genotype	N
<i>GSTM1</i>		Null	24
		Wt	23
<i>GSTT1</i>		Null	22
		Wt	25
<i>GSTP1</i>	rs1695	A/A	32
		A/G	14
		G/G	1
<i>ABCB1</i>	rs3213619	T/T	38
		T/C	9
	rs1128503	T/T	14
		T/C	26
		C/C	7
		rs2032582	T/T
	A/T		9
		G/T	12
		G/G	12
		G/A	5
A/A		2	
rs1045642	T/T	9	
	C/T	19	
	C/C	19	
<i>ABCC1</i>	rs4148356	A/A	2
		A/G	8
		G/G	37
<i>ABCC2</i>	rs3740066	C/C	31
		C/T	14
		T/T	2
<i>CYP1B1</i>	rs1056836	C/C	1
		C/G	14
		G/G	32
<i>CYP2C8</i>	rs11572093	G/G	42
		G/A	5
<i>CYP3A4</i>	rs12721627	C/G	2
		C/C	45
<i>CYP3A5</i>	rs776746	A/A	3
		A/G	11
		G/G	33

各遺伝子の多型と PK パラメーターとの関連を単変量解析で見たところ、*GSTM1* の欠失多型で AUC との間に有意な相関が認められた (図 1)。すなわち *GSTM1* 遺伝子を欠失している患者は、同遺伝子を有する患者に比べ、有意に血中 TXL AUC が高値を示していた (P=0.033)。

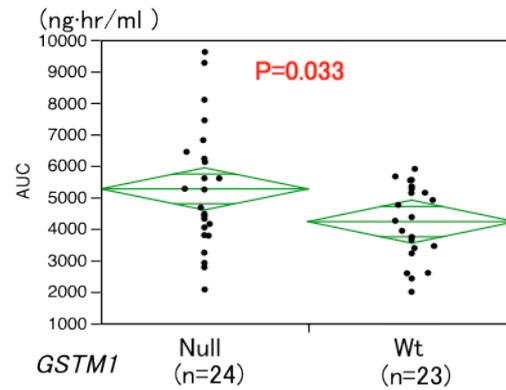


図 1. *GSTM1* 欠失多型と TXL AUC との関連

一方、*ABCB1* 2677G>T/A 多型 (rs2032582) において、A アリルを有する遺伝子型 (G/A or A/T or A/A) の患者は、その他の遺伝子型の患者に比べ、MRT (対数変換) が有意に長かった (P=0.010, 図 2)。

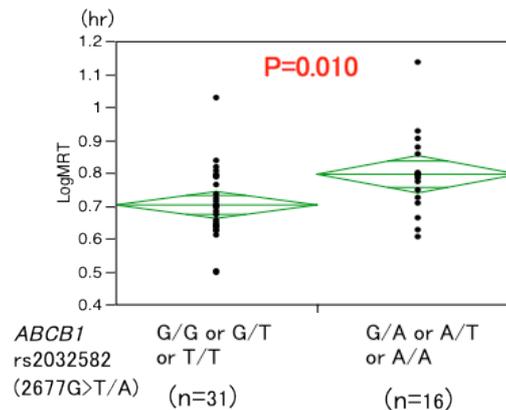


図 2. *ABCB1* 2677G>T/A 多型における A アリルの有無による TXL MRT の比較

単変量解析において、これら以外の遺伝子多型と TXL の各種 PK パラメーターとの間に有意な相関は認められなかった。

次に *GSTM1* の多型が TXL の血中動態に影響を及ぼすことが考えられたため、*GSTM1* の有無で層別化を行い、解析を行った。*ABCB1* 2677G>T/A 多型は、*GSTM1* 欠失型の患者では A アリルを有する患者と有さない患者の間で MRT に有意な差が認められなかった (P=0.31) が、一方 *GSTM1* 野生型の患者においては、A アリルを有する患者の MRT が有意に長かった (P=0.045, 図 3)。

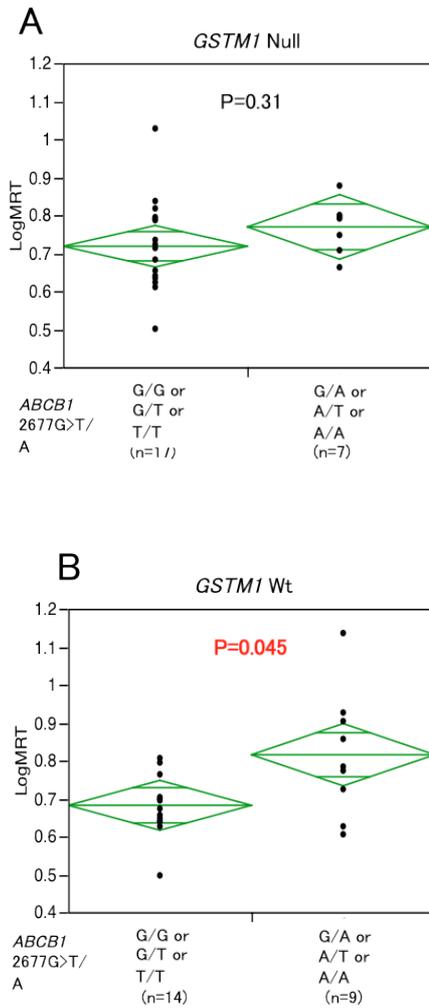


図 3 *GSTM1* の有無別、*ABCB1* 2677G>T/A 多型における A アレルの有無による TXL MRT の比較

一方、*CYP3A5* rs776746 多型では、*GSTM1* 欠失型の患者で、A アレルを有する (A/A or A/G) もの、G/G 型の患者に比べ、有意に C_{max} が高値を示した ($P=0.048$, 図 4A)。一方、このような差異は *GSTM1* を有する患者では認められなかった (図 4B)。

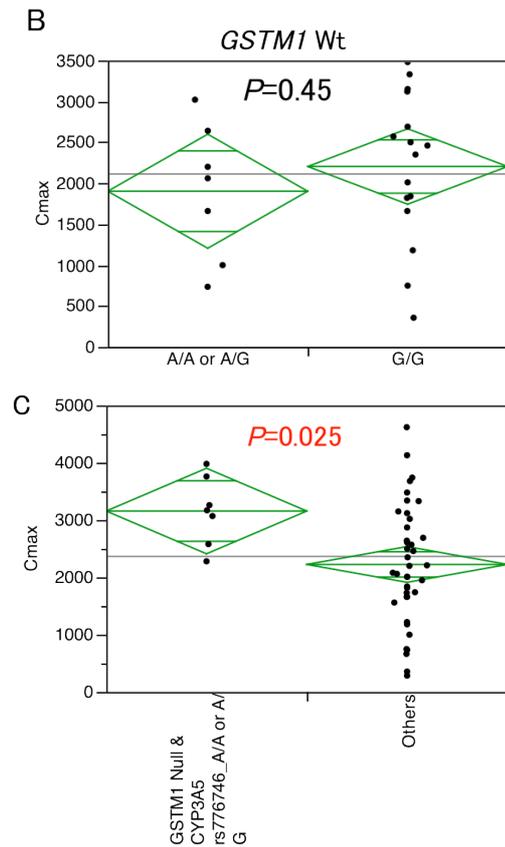
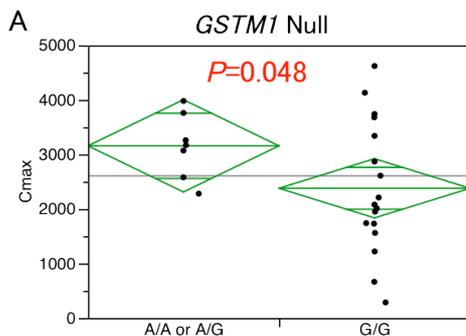


図 4. *CYP3A5* rs776746 遺伝子多型による C_{max} の比較 A, *GSTM1* 野生型患者における比較。B, *GSTM1* 野生型患者における比較。C, *GSTM1* と *CYP3A5* 遺伝子多型の組み合わせによる C_{max} の比較。

次に *GSTM1* と *CYP3A5* の遺伝子型を組み合わせ比較を行った。*GSTM1* が欠失していて、*CYP3A5* rs776746 で A アレルを有する患者はそれ以外の患者に比べ、有意に C_{max} が高値を示した ($P=0.025$, 図 4C)。

次に PK 採血を行ったもののうち、副作用の評価が可能であった 44 名の患者についての、その出現頻度を表 3 にまとめた。これらの頻度は、従来の標準治療である TC 療法 (3 週 1 回、TXT・CBDCA iv 投与) で報告されているものと、同様の傾向を示した。

表 3. 44 名の卵巣癌/腹膜癌患者における副作用の出現

Adverse effect	Grade	(n)	Frequency (%)	Adverse effect	Grade	(n)	Frequency (%)
Leucopenia	1	1	2.3	Albumin	0	11	25.6
	2	16	36.3		1	5	11.6
	3	23	52.3		2	20	46.5
	4	4	9.1		3	6	14.0
Neutropenia	1	1	2.3	4	1	2.3	
	2	7	15.9	T-Bil	0	42	97.7
	3	16	36.4	1	1	2.3	
	4	20	45.4	AST	0	30	69.8
Lymphopenia	0	1	2.3	1	13	30.2	
	1	23	52.3	ALT	0	30	69.8
	2	11	25.0	1	12	27.9	
	3	7	15.9	2	1	2.3	
Anemia (RBC)	4	2	4.5	ALP	0	27	62.8
	2	14	32.6	1	16	37.2	
	3	26	60.5	Creatinine	0	40	93.0
	4	1	2.3	1	3	7.0	
Thrombopenia	0	5	11.4	Na	0	43	100.0
	1	23	52.3	K	0	32	74.4
	2	9	20.4	1	9	20.9	
	3	6	13.6	2	2	4.7	
Anemia (Hb)	4	1	2.3	Uric acid	0	32	94.2
	1	2	4.5	1	1	2.9	
	2	15	34.1	4	1	2.9	
	3	26	59.1	Febrile neutropenia	0	44	100.0
Fever	4	1	2.3	Diarrhea	0	39	88.6
	0	40	90.9	1	3	6.8	
	1	3	6.8	2	2	4.6	
Infection with G3/4 neutrophils	2	1	2.3	Rash	0	34	91.9
	0	44	100.0	1	3	8.1	
	Hypersensitivity	0	43	97.7	Muscle pain	0	25
Fatigue	4	1	2.3	1	14	33.3	
	0	27	61.3	2	1	2.4	
	1	12	27.3	3	1	2.4	
	2	4	9.1	4	1	2.4	
Anorexia	3	1	2.3	Stomatitis	0	34	77.3
	0	18	41.9	1	8	18.2	
	1	16	37.2	2	2	4.5	
	2	8	18.6	Hair loss/alopecia	0	1	2.3
Nausea	3	1	2.3	1	15	34.9	
	0	12	27.3	2	27	62.8	
	1	18	40.9	Hypotension	0	39	92.8
	2	13	29.5	1	1	2.4	
Vomiting	3	1	2.3	2	2	4.8	
	0	32	74.4	Neuropathy (motor)	0	24	54.6
	1	5	11.6	1	14	31.8	
	2	6	14.0	2	4	9.1	
Constipation	3	2	4.5	3	2	4.5	
	0	18	40.9	Neuropathy (sensory)	0	11	25.0
	1	11	25.0	1	22	50.0	
	2	15	34.1	2	7	15.9	
				3	4	9.1	

次にこれらの副作用の出現と、上記の PK パラメーターとの関連が認められた遺伝子多型について検討を行った。

表 4. Grade4 好中球減少出現と遺伝子多型

		Neutropenia		Univariate analysis		
		Grade 4 (n)	Grade <=3 (n)	Odds Ratio	95%CI	P*
<i>GSTM1</i>	Null	13	8	3.71	(1.06-12.97)	0.036
	Wt	7	16			
<i>CYP3A5</i> rs776746	A/A or A/G	9	4	4.09	(1.02-16.40)	0.040
	G/G	11	20			
<i>ABCB1</i> 2677G>T/A	G/G or A/A or G/A	12	7	3.64	(1.03-12.78)	0.040
	T/A or T/G or T/T	8	17			

GSTM1 欠失型の患者は、野生型患者に較べて有意に Grade 4 好中球減少の出現頻度が高かった (OR=3.71, P=0.038)。 *CYP3A5* rs776746 では A アレルを有する患者が G/G ホモの患者に較べ Grade 4 好中球減少の出現頻度が高かった (OR=4.09, P=0.040)。さらに *ABCB1* 2677G>T/A 多型では、T アレルを有しない患者 (G/G, G/A, A/A) はその他の患者に較べ Grade 4 好中球減少の出現頻度が高かった (OR=3.64, P=0.010)。これらの遺伝子多型を共変量として多変量解析を行ったところ、これらの因子はいずれも独立に Grade 4 好中球減少の出現と関連することが明らかとなった (表 5)

表 5. ロジスティック回帰分析による Grade4 好中球減少と各遺伝子多型の関連

		Logistic regression		
		Adjusted OR	95% CI	P
<i>GSTM1</i>	Null	5.11	(1.22-26.42)	0.025
	Wt			
<i>CYP3A5</i> rs776746	A/A or A/G	10.04	(1.89-77.22)	0.005
	G/G			
<i>ABCB1</i> 2677G>T/A	G/G or A/A or G/A	7.11	(1.57-43.43)	0.010
	T/A or T/G or T/T			

また白血球減少の出現頻度は、 *ABCB1* 2677G>T/A 多型で A アレルを持つ患者 (T/A, A/A, G/A) はそれ以外の患者に較べ、より重篤な傾向を示すことが明らかとなった (P=0.038, Mann-Whitney's U test, 表 6)。

表 6. *ABCB1* 2677G>T/A 多型と白血球減少の程度の関連

		Leukopenia			P
		Grade 1/2 (n)	Grade 3 (n)	Grade 4 (n)	
<i>ABCB1</i> 2677G>	G/G or T/G or T/T	14	14	1	0.038
	T/A	3	9	3	

PK パラメーターとの関連が認められなかった遺伝子多型のうち、 *ABCC2* 遺伝子の 3972C>T (rs3740066) 多型で、C/C ホモに有する患者は Grade2 以上の末梢神経障害が有意に高く起きることも確認された (P=0.023 表 7)

表 7. *ABCC2* 3972C>T 遺伝子多型と末梢神経障害との関連

		Neuropathy (sensor)		Univariate analysis		
		Grade 2/3 (n)	Grade 0/1 (n)	Odds Ratio	95%CI	P*
<i>ABCC2</i> 3972C>	C/C	10	18	8.33	(0.95-72.75)	0.023
	C/T or T/T	1	15			

本研究により、これまで卵巣癌の予後との関

連が報告されてきたが、その作用機序については全く未解明であった *GSTM1* 遺伝子の欠失多型が、TXL の血中動態に影響を与えることが示された。また最近、Grade4 の好中球減少出現が卵巣癌 TC 療法の予後良好と関連することが慶応大学の野村らによって報告されたが、本研究よりその要因として *GSTM1*, *CYP3A5*, ならびに *ABCB1* の遺伝子多型が関わっていることが推察される。

現在、第2相臨床試験は登録を完了し、予後の追跡中である。卵巣癌/腹膜癌組織中でのRNAの発現レベルが、予後予測のマーカーとなるかを検討するため、RNAの純度が十分であった全症例のオリゴマイクロアレイ解析を完了しており、遺伝子多型と併せて、予後を予測するための精緻なモデルならびに新規分子標的の探索の策定完成を目指す。

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)

[学会発表] (計4件)

- ① 岩佐紀宏、江口英孝、島田宗昭、竹内聡、藤原 寛行、和田智、長尾昌二、鈴木光明、杉山徹、紀 川純三、藤原恵一、西山正彦 「卵巣癌/腹膜癌に対する第2相臨床試験におけるパクリタキセルのPK-PG 相関解析」日本癌治療学会 2012年10月25日～27日パシフィコ横浜 神奈川県
- ② Iwasa N, Eguchi H, Shimada M, Takeuchi S, Fujiwara H, Wada S, Nagao S, Suzuki M, Sugiyama T, Kigawa J, Fujiwara K, Nishiyama M “PK-PG ASSOCIATION ANALYSIS OF TXL IN A PHASE II TRIAL OF WEEKLY TXL/IP CBDCA THERAPY FOR OVARIAN AND PERITONEAL CANCERS” International Gynecologic Cancer Society 2012年10月13日～16日 Vancouver Convention Centre, Vancouver, Canada
- ③ 江口英孝、岩佐紀宏、島田宗昭、竹内聡、藤原 寛行、和田智、長尾昌二、鈴木光明、杉山徹、紀 川純三、藤原恵一、西山正彦 「卵巣癌/腹膜癌における週1回パクリタキセル/腹腔内カルボプラチン併用療法の第2相試験: パクリタキセルのゲノム薬理学的解析」日本癌学会 2012年09月19日～21日 ロイトン札幌、北海道
- ④ Eguchi H, Iwasa N, Shimada M, Takeuchi S, Fujiwara H, Wada S, Nagao S, Suzuki M, Sugiyama T, Kigawa J, Fujiwara K, Nishiyama M “Pharmacogenetic analysis of the weekly paclitaxel/ IP carboplatin combination therapy for

ovarian and peritoneal cancers” American Association for Cancer Research. 2012年04月01日～04日 McCormick Place West, Chicago, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江口 英孝 (EGUCHI HIDETAKA)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00260232

(2) 研究分担者

西山 正彦 (NISHIYAMA MASAHIKO)
群馬大学・院医学系研究科・教授
研究者番号: 20198526

(3) 連携研究者

藤原 恵一 (FUJIWARA KEIICHI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20238629