

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790145

研究課題名(和文)薬動力学解析に基づく抗体医薬品の最適な個別化投与設計法の構築

研究課題名(英文)administration planning of antibody drugs based on PK/PD analysis

研究代表者

荒木 拓也 (ARAKI, TAKUYA)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00568248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：がん患者およびリウマチ患者を対象とした抗体医薬品の薬物動態解析を行い、また同時に二次無効発現要因を検索することで、抗体製剤の最適な投与設計支援システムを構築することを目的とした。TOF型質量分析計ならびにタンデム四重極質量分析計を用い、主成分分析を中心とするバイオマーカー探索手法を行うことで、アミノ酸配列に関する情報の有無に関わらず短時間で抗体医薬品ならびに関連成分の分析が可能となった。本プロセスはアミノ酸配列情報の有無に関わらず対応できることから、多くの抗体医薬品や、その効果に影響を与える成分の分析に応用できると考えられる。現在本法を用いて二次無効関連因子の網羅的検索を進めている。

研究成果の概要(英文)：Antibody drugs (ADs) show remarkable benefits, while resistance to AD or infusion reaction, which are associated with expression of anti-AD antibody, are often induced. In this study, we tried to develop simple process to establish the method for quantitation of unknown proteins and find factors of resistant to AD therapy.

Blank serum samples and serum spiked with ADs were reduced, alkylated and digested by trypsin and analyzed by LC-TOF MS. Several specific precursor ion peaks for AD were determined from total ion chromatogram data using principal component analysis (PCA). Then, those peaks were analyzed by LC-MS/MS. Using purified peak with SPE process, we could detect ADs in serum with sufficiently lower limit of quantification. Our method is applicable to analyze other ADs and unknown substances such as anti-AD antibody, because it does not require structural determination of target substance. Now we have been assessing factors affecting the efficacy of AD using clinical samples.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：抗体医薬 個別化医療 薬物療法

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト IgG 抗体等の人由来タンパクの一部を改変させた抗体医薬品の使用が自己免疫疾患や悪性腫瘍に対する新たな治療の選択肢として注目を浴びている。抗体医薬品は特定の遺伝子型を有する悪性腫瘍に対して高い治療効果をもたらす一方、それ以外の腫瘍に対しては無効であるということが知られており、さらに抗体医薬品による治療には多額の費用が掛かることから患者の的確な選択が重要である。ゲノミクス研究の発展により、各種薬物療法の効果に影響するとされる多くの遺伝的要因が解明され、非常に多くの遺伝的要因とがん化学療法の効果と関係が検討されており、抗体医薬品の投与においてもそれらの遺伝子解析をもとに患者の選択が行われている。しかし、遺伝子型によって対象患者を抽出したにもかかわらず期待した効果が得られない患者や、重篤な副作用に伴い治療を継続できない患者が多いことも事実である。また、一時的に効果が認められた場合にも、治療の継続に伴い耐性化が生じ、二次無効として治療の変更を余儀なくされることもある。同様のことがリウマチ等の自己免疫疾患に対する治療でも生じており、長期に亘る病状のコントロールが重要とされる自己免疫疾患や悪性腫瘍等の疾患に対する治療としては患者を的確に選択し、さらに二次無効の発現を抑制することが大きな課題である。

遺伝子多型等に基づく患者の選択を行ったにもかかわらず十分な治療効果予測ができない要因の一つとして、薬物動態における個人差や、薬物療法の二次無効を惹起するタンパクなどにより新たに発生する要因等が関係すると考えられる。一般的に治療効果や副作用の予測方法としては遺伝子解析以外に薬物血中濃度解析が用いられており、がんやリウマチに対する治療においても同様に、一部の薬剤については薬物血中濃度解析に基づいた薬物投与支援が行われている。一方、抗体医薬品はその分子量の大きさから、その薬物体内動態は分布容積(血液量)のみに依存し、個人差は少ないと考えられ、患者の状態、併用薬の影響等に伴う個人差については詳細に検討されていない。現在までに一部の臨床試験で薬物体内動態における性差や、遺伝子解析に基づく患者選択を行うことによる治療成績の向上が確認されているが、その一方で治療効果に関する個人差や副作用の発現について大きな個人差も認められている。これらのことから薬物体内動態を詳細に解析することによって治療効果、副作用が予測できる可能性が十分考えられ、さらには二次無効の発現メカニズムの解明につながる事が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、がん患者およびリウマチ患者を対象とした抗体医薬品の薬物動態解析を行い、また同時に二次無効発現要因を検索することで、抗体製剤の最適な投与設計支援システムを構築することを目的とした。現在、抗体医薬品の体内動態解析は ELISA 法などの免疫測定法を用いて行われているが、これらは抗体医薬品に対する抗体が血液中に存在する場合には正確に測定できず、また代謝物の影響を受けることが国際学会で報告されており、詳細な体内動態解析には適さないと考えられる。抗体医薬品の適切な投与設計法を確立するためには、薬物代謝物や抗薬物抗体の存在に左右されない、正確な薬物動態解析方法の確立が必要であり、その技術を用いて薬物動態解析を行うことで、適切な目標薬物動態プロファイルを得る必要がある。

そこで本研究では高速液体クロマトグラム-質量分析計を用いた抗体製剤、抗抗体製剤抗体の解析方法を確立し、薬物動態と臨床効果・副作用発現の関係について検討することとした。また、著効した患者と治療に失敗した患者の薬物動態および血液中タンパクを解析、比較し、抗体医薬品による効果の予測血中マーカーを検索し、遺伝子とタンパク質解析の両側から治療対象患者の適切な選択方法を確立することとした。さらに二次無効の発現要因の一つとして薬物の代謝物、生体内因子の検索を同時に行い、抗体製剤の最適な投与設計支援システムを構築することを目的とした。

具体的には以下の A から D の点を中心に検討することとした。

(1) 高速液体クロマトグラム-質量分析計を用いたがん治療もしくはリウマチ治療に用いる抗体医薬品の体内動態解析法ならびに抗抗体医薬品抗体の解析法を確立する。

(2) 1 で確立した解析法を用いて患者血中抗体医薬品濃度を解析し、効果および副作用との関係进行评估する。

(3) 抗体医薬品が著効した患者と治療に失敗した患者の治療中血液中タンパク質を解析、比較し、著効患者に特有のマーカー並びに治療指標を検索する。

(4) 二次無効発現前後の患者血液サンプルを比較することで二次無効の発現因子(無効発現予測マーカー)を検索する。

本研究により、幅広い種類の抗体医薬品に関する TDM が確立でき、最大限の治療効果を得るための薬物動態プロファイルおよび治療効果予測マーカーを活用し、同時に二次無効発現の抑制方法を確立することで、より効果的な治療を継続することが可能となると期待でき、医療経済的観点からもその意義は極めて大きいと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 抗体医薬品および抗抗体医薬品抗体等の生体内濃度解析法確立に関するプロセスの検討

高速液体クロマトグラム - 質量分析計を用いた抗体医薬品の血中濃度解析方法を確立した。対象薬は抗腫瘍薬および抗リウマチ薬とし、抗腫瘍薬として抗 EGFR 抗体、抗リウマチ薬として抗 TNF- α 抗体を中心に解析した。なお、本研究では未知構造の抗抗体医薬品抗体等の分析も検討するため、通常はタンパク分析の最初に行うアミノ酸配列の確認を経ずに抗体医薬品の解析方法を確立する方法を検討した。具体的には血液サンプルおよび血液サンプルに少量の抗リウマチ抗体医薬品であるインフリキシマブを加えた試料をそれぞれ還元アルキル化した後にトリプシンで分解し、TOF 型質量分析計 (LCT premier XE, Waters) で分析した。また、より詳細な分析プロセスとして、ペプチド断片化したタンパクを導電点電気泳動により 12 のフラグメントに分離し、各フラグメントを同様に TOF 型質量分析計で分析した。得られた各全成分ピークを対象にソフトウェア (Marker Lynx, Waters) を用いて主成分分析を行い、インフリキシマブを添加したサンプルに特有の成分ピークを複数種類抽出した。これらの成分について複数種類の固相抽出用カラムを用いて抽出および濃縮を行い、タンデム四重極質量分析計 (4000QTRAP, ABSciex および XEVO TZ, Waters) を用いて定量した。最終的に得られた成分ピークについてはインフリキシマブ由来の成分であることを確認し、さらに別の 2 種類の抗体医薬品についても同様の検討を行うことで、本プロセスが未知タンパクを含む抗体医薬品ならびに抗抗体医薬品の解析法として十分に機能することを確認した。

(2) 抗体医薬品による二次無効要因の探索

抗体医薬品を投与したリウマチ患者の多くは治療開始から 1、2 年程度経過すると治療効果が減弱してくることが報告されていることから、抗体医薬品を投与継続中の患者の血液を回収し、二次無効が発現する前後の血液中タンパク成分を TOF 型質量分析計で解析し、Marker Lynx ソフトウェアにより、二次無効発現後の血液に特有の物質を検索することとした。その後、抽出されたピークについてタンデム四重極質量分析計を用いて詳細に評価し、そのタンパク成分を解析することとした。

(3) 患者血中薬物動態と効果および副作用の関係の評価

前述の高速液体クロマトグラム - 質量分析計を用いた抗体医薬品の血中濃度解析方法を用い、抗リウマチ抗体医薬品の患者血中薬物動態を解析している。血中薬物動態と治

療効果および副作用の発現の関係は現在評価中である。

(4) 二次無効の発現抑制方法の検討

リウマチ患者を中心に、二次無効の発現機構を評価することで、その抑制方法を検討する。一般的に二次無効は一時的に薬物血中濃度が低下した場合に生体内での防御反応が活性化するために生じるものと考えられることから、抗抗体医薬品抗体の寄与が大きいと考えられている。そこで、の方法で抗抗体医薬品抗体の発現を評価するとともに、薬物投与中止後にそれらの成分が体内から消失するか、また併用されることが多い免疫抑制薬の血中濃度によって二次無効の発現頻度が変化するかなどについて詳細に評価することとした。

4. 研究成果

(1) 抗体医薬品、抗抗体医薬品抗体ならびに二次無効発現要因の解析法に関する検討

本研究ではまず、抗体医薬品等の解析方法を構築するにあたり、アミノ酸配列がわからない未知タンパクに対しても応用できる解析法構築のプロセスを検討した。つまり、抗体医薬品等の既知タンパクは予断片ペプチドの分析により比較的容易に分析が行えるが、治療抵抗性に関与するような未知タンパクはそれが難しいため、バイオマーカー解析のプロセスを用いて、抗体医薬品の解析法構築が可能かを検討した。タンパクサンプルとして抗リウマチ抗体医薬品であるインフリキシマブを用いた。ブランク血液とブランク血液に低濃度インフリキシマブを加えたサンプル血液を 5 サンプルずつ準備し、それらのサンプルを常法により断片化した後に TOF 型質量分析計で分析した。得られた全成分ピークを対象に成分分析を行い、インフリキシマブを加えたサンプルにのみ検出される成分ピークを複数検出した。これをインフリキシマブ由来成分ピークとし、固相抽出法ならびにタンデム四重極質量分析計を用いた定量条件の検討を行い、最も感度の高い成分ピークを最終分析成分ピークとすることでインフリキシマブの測定系構築に成功した。なお、インフリキシマブのアミノ酸配列は既に報告されていることから、TOF 型質量分析計ならびにタンデム四重極質量分析計で得られた結果をインフリキシマブのアミノ酸配列を照合したところ、インフリキシマブ由来の成分であることが確認された。また、同様の方法を抗腫瘍薬であるセツキシマブやリツキシマブにも応用し、それぞれで特異的な成分ピークを検出できたことから、本プロセスが多くの抗体医薬品や、その効果に影響を与える成分の分析に応用できることが確認できた。

(2) 抗体医薬品の二次無効発現に関わる要因の検索

1 で構築した分析プロセスは道成分タンパクの分析にも応用できることから、本プロセスを用いた臨床検体の解析研究を進めている。抽出された成分が抵抗性発現に関係しているかについてはサンプル数の集積が必要であるため、十分なサンプル数が集まり次第報告する。また、本研究で構築した質量分析計による抗体医薬品の測定結果抗原抗体反応を用いた抗体医薬品の分析結果と比較することで、両分析法の分析精度等についても多くの臨床検体を用いて評価することで、今後の詳細な検討が可能になると思われる。現在、二次無効の要因の一つとして抗体医薬品の投与時に併用することが多い免疫抑制薬の細胞中濃度を合わせて評価するとともに、血中の免疫関連因子の活性を評価することで、これらの関連性についても詳細な評価を進めている。

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)

[学会発表](計4件)

Hironori Nakamura, Takuya Araki, Daisuke Nagano, Koujiro Yamamoto: Quantification of an antibody drug, infliximab, in human blood using biomarker analysis technique. International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology European Conference. August 28-30, 2014, Prague, Czech Republic.

Hironori Nakamura, Takuya Araki, Koujiro Yamamoto: Development approach using LC-MS/MS and biomarker analytical technique for the quantification of infliximab in human blood. 第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 仙台, 2013年11月23日

Hironori Nakamura, Takuya Araki, Koujiro Yamamoto: Establishment of prediction method for clinical efficacy of antibody drugs using LC-MS/MS with biomarker searching technique. 5th International Conference on Advanced Micro Device Engineering, December 19, 2012, Kiryu, Japan.

Hironori Nakamura, Takuya Araki, Tomonori Nakamura, Koujiro Yamamoto: LC-MS/MS method for the quantification of infliximab in human

blood. 13th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology (IATDMCT). September 21-26, 2012, Salt Lake City, USA.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

荒木 拓也 (ARAKI, Takuya)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 00568248

(2)研究協力者

山本 康次郎 (YAMAMOTO, Koujiro)
永野 大輔 (NAGANO, Daisuke)
中村 浩規 (NAKAMURA, Hironori)