

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390039

研究課題名（和文） 抗癌剤による骨髄毒性発現個人差の定量的予測システムの構築

研究課題名（英文） Establishment of quantitative prediction method for the individual variabilities in hematologic toxicity of anti-cancer agents.

研究代表者

鈴木 洋史（SUZUKI HIROSHI）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号 80206523

研究成果の概要：がん化学療法に伴うリスクの中でも特に危険な、血液毒性による免疫力の低下とそれに伴う日和見感染症の発症、を予測する方法論の構築を目指して検討を行った。具体的には、免疫系で中心的な役割を果たす CD4+T 細胞に対して、抗がん剤感受性を評価する手法の確立を行い、得られた抗がん剤感受性のデータを基に、生体内での CD4+T 細胞減少プロファイルを予測できる、数学的モデルの構築・検証を行った。がん化学療法に伴うリスクをより正確に予測し、最適な薬物療法の構築に寄与すると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2008 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：臨床薬理動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬剤反応性・個人差・癌・感染症・薬理学・シミュレーション・モデル・毒性学

## 1. 研究開始当初の背景

好中球減少はがん化学療法における最も一般的な用量規制因子であるが、中でも重症の好中球減少症（循環血中好中球数が 1000 /  $\mu$ L 未満、かつ 500 /  $\mu$ L 未満になる可能性がある状況）に加えて口腔内温で 38 以上の発熱を伴う病態は、「発熱性好中球減少症(FN)」と呼ばれ、緊急の治療が必要と考えられている。発熱の伴わない好中球減少症から FN への転換は主に弱毒日和見感染の合併によるものと考えられており、その危険性は非常に高い。例えば合併症が緑膿菌敗血症と診断された症例では、発熱第一日目に治療を開始すれば死亡率が 15%であるのに対し、治療開始

が二日目以降に遅れると死亡率は 70%と著明に高くなると報告されている。FN が発症した際には入院下での広域抗生物質治療を要し、さらにはがん化学療法の中断あるいはレジメン変更を余儀なくされたための原疾患の予後不良や、長期入院に伴うコスト増加を含む治療費の増大にもつながる。FN の発症メカニズムは現時点でも十分には解明されていないが、今日までの疫学調査の結果から、抗がん剤の種類・がんの種類・全身状態などが FN 発症のリスクと関連することが示されている。

現在まで、抗癌剤投与後の好中球数の変動については、夥しい数の臨床報告がなされて

いるが、どのような機構により、どの程度の好中球減少につながるのかに関する定量的な研究には至っていない。事実好中球減少に関する定量的な解析は、Karlsson らによってなされているのみであるが、彼らの解析も *in vivo* で観察された結果をコンパートメントモデルにあてはめただけでなく、機構論に基づいた汎用性を有するファーマコダイナミックモデル解析は全くなされていない。

一方で、近年行われた複数の疫学調査の結果から、FN の発症におけるリンパ球数の重要性が新たに示唆されている。特に、Borg らはリンパ球サブタイプの分類を行った上で同様な FN リスクに関する多変量解析を行い、がん化学療法開始前の血中 CD4+T 細胞数が  $450/\mu\text{L}$  以下であること、および化学療法の種類がそれぞれ独立に FN 発症のリスク因子になることを報告している。CD4+T 細胞はいわゆるヘルパー T 細胞として機能し、免疫系の制御を行う細胞として生体防御の中心的役割を果たしており、HIV 感染患者では CD4+T 細胞数の減少が原因で日和見感染症の発症に至ることは良く知られている。生体における CD4+T 細胞の免疫応答に対する重要性を考慮すると、これまで主に解析対象とされてきた、化学療法による骨髄抑制とそれに伴う好中球減少だけでなく、CD4+T 細胞に対する化学療法の影響と、FN 発症に対する寄与をより詳細に検討することが必須になると考えられた。

## 2. 研究の目的

循環血中 CD4+T 細胞に関しても、化学療法によって細胞数が減少することは知られており、その基準値への回復に数ヶ月から半年かかる例も報告されている。これらの背景を踏まえ、がん化学療法に伴う FN 発症のリスクを予測する方法論の将来的な構築を目指し、まず抗がん剤の CD4+T 細胞に対する *in vitro* 毒性評価と、それに基づく *in vivo* 末梢 CD4+T 細胞数減少プロファイルの、定量的予測法の確立を目的として検討を行うこととした。

## 3. 研究の方法

### (1) *In vitro* 毒性感受性試験

#### CD4+T 細胞の単離法

マウスを安楽死させた後に脾臓を単離し、磁気標識単離法である CD4 マイクロビーズを、メーカー推奨プロトコルに従って用い、CD4+T 細胞を単離した。その純度はフローサイトメトリーの解析から、92%以上であることを確認した。

#### CD4+T 細胞の維持培養法

単離した CD4+T 細胞は 7.5 % FBS および  $5 \text{ ng / mL}$  murine rIL-7 を添加した RPMI 1640 培地を用いて、 $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  存在下で

維持培養を行った。

#### 化学発光法を用いた細胞生存率の測定法

単離した CD4+T 細胞を 96-well プレートに  $2 \times 10^6 \text{ cells/ml}$  の細胞密度で播種し、各薬物を添加後 12, 24, 48 時間後の各時点において細胞生存率を測定した。

#### Caspase 3/7 活性測定法

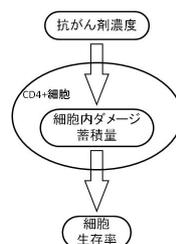
単離した CD4+T 細胞を 384-well プレートに  $2 \times 10^6 \text{ cells/ml}$  の細胞密度で播種し、細胞生存率の評価と同様に、各薬物添加後、12, 24, 48, 72 時間後の各時点で caspase 3/7 活性を測定した。

### (2) Semimechanistic model の構築

エトポシド、シタラビン、5-フルオロウラシル、ドキシソルピシン、シスプラチンの計 5 種類の抗がん剤に関して、CD4+T 細胞に対する毒性発現を記述するため、以下の二点の仮説に基づいて、統一的な薬力学モデルの構築を行った。

A. 細胞内ダメージコンパートメントを想定し、抗がん剤暴露に伴って CD4+T 細胞内に細胞内ダメージが生成される。

B. 生成された細胞内ダメージ量に依存して、CD4+T 細胞の死亡速度が決定される



CD4+T 細胞の抗がん剤感受性を記述するモデルの概念図

上記モデルを用いて、*in vitro* 検討から得られた抗がん剤感受性プロファイルをフィッティングしてパラメータの値を決定した。

### (3) *In vivo* 毒性試験

#### 抗がん剤の投与

マウスに対し、以下の投与量で各抗がん剤を静脈内投与し、以降の検討に用いた。

エトポシド：30, 50, 70 mg / kg

シタラビン：20, 80 mg / kg

5-フルオロウラシル：65 mg / kg

フローサイトメトリー解析に用いるサンプルの調製法

マウス頸静脈より 100  $\mu\text{L}$  の末梢血を採取し、FITC 標識抗 CD4 抗体および PE 標識抗 CD3 抗体によって染色を行った。死細胞を選別するためにポピドンヨードをデータ取得の 10 分前に添加した。

またリンパ組織(脾臓、胸腺)を採取し、各組織をナイロンメッシュフィルターに通し、単細胞懸濁液を調製した。  $1 \times 10^7 \text{ cells/ml}$  になるよう調製した組織細胞懸濁液 100  $\mu\text{L}$  を、脾臓細胞に関しては FITC 標識抗 CD4 抗体と PE 標識抗 CD3 抗体を用いて、胸腺細胞に

関しては FITC 標識抗 CD4 抗体と PE 標識抗 CD8 抗体によって染色した。

フローサイトメトリーによる解析

データ取得は Coulter EPICS XL を使用し、WinMDI 2.9 software を用いて解析した。各細胞集団の大きさは各組織の全懸濁液量(または推定全血液量)とフローサイトメトリー解析で得られた絶対数を掛け合わせることで計算された。なお、マウス一匹あたりの全血量は 1.73 mL と推定した。

#### 4. 研究成果

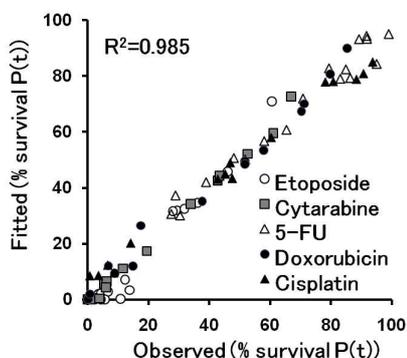
##### (1) in vitro 抗がん剤感受性評価手法の確立

###### CD4+T 細胞の抗がん剤感受性評価

マウス脾臓より磁気ビーズによって単離した CD4+T 細胞を 5 ng / mL IL-7 存在下で培養したところ、72 時間まで約 80% の安定した生存率を維持することを確認した。本培養系を用いて CD4+T 細胞に対する抗がん剤毒性試験を行った。5 種類の抗がん剤を各濃度で暴露させ、その細胞生存率の推移を、化学発光法を用いて測定した。その結果、エトポシド、シタラビン、ドキシソルピシンでは暴露 24 時間までに、薬物濃度依存的に急速な生存率の減少が観察された。一方、5-フルオロウラシルでは暴露 48 時間まで緩やか、かつ薬物濃度依存的な生存率の減少が観察された。同じ代謝拮抗薬に分類されるシタラビンと 5-フルオロウラシルであるが、CD4+T 細胞に対する毒性発現プロファイルは大きく異なることが示唆された。

Semimechanistic モデルを用いた抗がん剤感受性の記述

分子実体として細胞内アポトーシス誘導分子を想定する細胞内ダメージコンパートメントを導入し、細胞内ダメージ量に依存して細胞の生存率が統一的に決定される semimechanistic モデルを構築し、本モデルが in vitro で観察された各薬物の毒性発現プロファイルを適切に記述可能であることを検証した。その結果、in vitro 毒性試験から得られた毒性発現プロファイルと、非常に良好なフィッティングが得られた( $r^2=0.98$ )。



なお、臨床濃度における CD4+T 細胞に対する毒性の強さの指標となる  $\lambda$  の値を計算した

ところ、エトポシドおよびシタラビンにおいて高い値を示し、臨床における報告と傾向の一致が見られた。

##### (2) in vivo 抗がん剤感受性の予測

抗がん剤投与によって生じる CD4+T 細胞減少プロファイルの取得

In vitro の結果から、CD4+T 細胞に対する毒性が高いと考えられた薬剤を中心に、マウスを用いた動物実験により in vivo での末梢 CD4+T 細胞数の変動を検討した。

エトポシド、シタラビン、5-フルオロウラシルを各投与量で急速静注した結果、エトポシドでは投与量依存的な血中 CD4+T 細胞数の低下が観察された。また、シタラビンにおいても使用した投与量において細胞数の減少が観察された。一方、5-フルオロウラシルでは有意な細胞数の減少は観察されなかった。一方、骨髄抑制の指標である好中球数に関しては、5-フルオロウラシル投与群では 5 日目の段階で好中球数の有意な減少が観察されたが、他の薬物投与群では、いずれも有意な減少は観察されなかった。以上より、in vivo 正常細胞の抗がん剤に対する毒性感受性は、細胞種に依存することが示唆された。

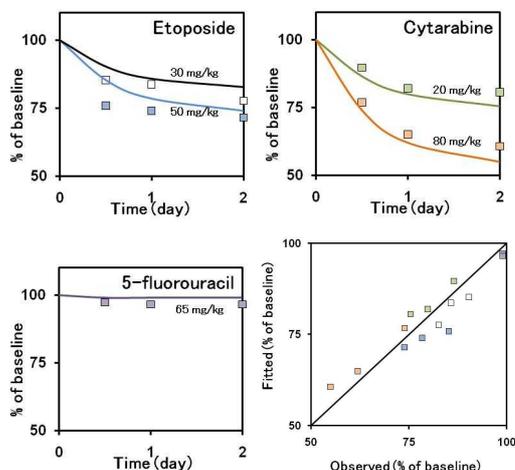
また、脾臓はマウスにおいて全末梢 CD4+T 細胞の約 40% を占める、最も CD4+T 細胞が多い組織であるため、抗がん剤投与後の末梢リンパ組織中 CD4+T 細胞数の推移を調べる上で、最も適切な組織と考えられた。抗がん剤投与後、エトポシドおよびシタラビン投与群では、血中 CD4+T 細胞数のプロファイルと同様、脾臓中の CD4+T 細胞数に関しても、急激な細胞数の減少が観察された。なお、共に薬物濃度依存的な減少が観察されたが、血中 CD4+T 細胞のプロファイルと比較すると、一部異なる部分も見出された。すなわちエトポシド 50 mg/kg 投与群では、脾臓においては投与前 CD4+T 細胞数に対して、最大で 70% 程度まで減少が観察されたのに対し、血液中 CD4+T 細胞においては、最大 30% 程度の減少であった。またシタラビン 20 mg/kg 投与群では、脾臓において最大 80% まで減少が観察される一方、血液では最大 60% 程度であり、血中 CD4+T 細胞数の変動プロファイルのみから、末梢組織中 CD4+T 細胞数の変動を予測することは困難であることが示唆された。

さらに、抗がん剤投与の胸腺細胞数に与える影響を調べることにした。毒性発現終末期と考えられる抗がん剤投与後 2 日目と、末梢 T 細胞ホメオスタシス回復期に入っていると考えられる 5 日目での胸腺細胞数を測定した。その結果、エトポシドは未熟 CD4+T 細胞 (CD4+ CD8-)、および成熟段階にある CD4+T 細胞 (CD4+ CD8-) のどちらに対しても、強い毒性を示し、シタラビンおよび 5-

フルオロウラシルに関して、胸腺細胞の有意な減少が観察された。また、いずれの抗がん剤投与群においても、抗がん剤投与5日目の時点では CD4+ CD8-T 細胞数の回復は観察されなかった。一方、このような胸腺細胞の減少している状況にも関わらず、5-フルオロウラシル投与群では脾臓中および血中の有意な CD4+T 細胞数の減少は観察されていない。これらの結果から、抗がん剤投与時の末梢 CD4+T 細胞数の変動には、胸腺細胞からの新規 T 細胞の供給が与える影響は、無視できると考えられた。

in vitro で構築したモデルを用いた in vivo 末梢 CD4+T 細胞数減少の予測

In vitro 抗がん剤毒性試験を基に構築された本モデルの応用性を検討するため、各抗がん剤の体内動態および血漿中タンパク非結合率を考慮して抗がん剤投与後の in vivo 末梢 CD4+T 細胞数の推移を予測した。各薬物の血中プロファイルは過去の報告を基に推測した。また、CD4+T 細胞は末梢循環細胞であり、末梢全体の CD4+T 細胞数の変動を解析する必要があるため、「末梢 CD4+T 細胞数 = 血中 CD4+T 細胞数 + 2 × 脾臓中 CD4+T 細胞数」として算出することとした。各抗がん剤の CD4+T 細胞毒性発現プロファイル、抗がん剤血漿中濃度の実測値に基づいて予測した結果、CD4+T 細胞の各実測値に対して高い予測精度が得られており、本モデルの有用性を示すことができた。



### (3) 考察

まず、抗がん剤の CD4+T 細胞に対する毒性発現能を評価するために、休止期にあるマウス CD4+T 細胞を用いて毒性感受性試験を行った。その結果、同じ代謝拮抗薬であるシタラピンと 5-フルオロウラシルではその殺細胞効果に大きな差異があることも確認された。本実験では 10,000 μM もの 5-フルオロウラシルを暴露させたにも関わらず、CD4+T 細胞の 5-フルオロウラシルに対する毒性感受性は低いことが観察された。

次に、CD4+T 細胞における抗がん剤毒性

感受性プロファイルを、統一的に記述するモデルの構築を試みた。細胞内アポトーシス誘導分子を想定した細胞内ダメージコンパートメントを仮定し、薬物暴露に伴って生成される細胞ダメージ量に依存して細胞生存率が決定されると仮定する semimechanistic model を用いた。本モデルは細胞内ダメージ生成速度を記述する抗がん剤特異的な速度論パラメータ ( $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $r$ ) と、生成した細胞ダメージ量に依存して細胞生存率を記述する、システム特異的なアポトーシス誘因パラメータ ( $k_{elm,d}$ ,  $LD_{50}$ ,  $D_{max}$ ,  $r_s$ ) から構成されている。アポトーシス誘因パラメータに関しては薬物間で共通の値をとると仮定しており、in vitro 毒性試験で観察された各抗がん剤の毒性発現プロファイル、本モデルに対して同時にフィッティングすることで決定した。その結果、構築したモデルは各抗がん剤に関する毒性発現プロファイルと非常に良く適合することが示され、抗がん剤による細胞死を記述する上での有用性が示唆された。システム特異的なパラメータ ( $k_{elm,d}$ ,  $D_{max}$ ,  $r_s$ ) を本研究によって得られた値に固定してフィッティングを行えば、新規の抗がん剤についても CD4+T 細胞に対する毒性発現プロファイルを記述するパラメータの決定が可能である。さらに、このようなシステム特異的なパラメータに基づいて、抗がん剤の毒性発現プロファイルを評価する方法論は、他の細胞種に対しても適用可能であると考えられ、応用性の広い解析手法と言える。

さらに、in vitro 解析から得られたパラメータを基に、抗がん剤投与後のマウス in vivo CD4+T 細胞数の変動プロファイルが予測可能であるかを検証するため、in vivo 抗がん剤投与実験を行った。5-フルオロウラシル投与群では血液・脾臓のいずれにおいても CD4+T 細胞数の有意な変動は観察されなかったが、エトポシドおよびシタラピン投与群に関しては、有意な細胞数の減少が観察され、in vitro 毒性試験で観察された感受性プロファイルと同様の傾向を示した。血中 CD4+T 細胞数は抗がん剤投与 0.5 日以降では回復傾向にあるのに対し、ほとんどの脾臓中 CD4+T 細胞数は 1 日目、2 日目においても継続的に低値を示す傾向があった。循環血中 CD4+T 細胞数の早期回復は、血中 T 細胞数に対するホメオスタシスの寄与によるものと考えられる。ヒトにおいては加齢に伴った胸腺の萎縮によって、新規成熟 T 細胞の末梢への供給が減少するにも関わらず、血中 T 細胞数は生涯を通じて維持されていること、また HIV 感染に対する HAART 治療の際に、血中の CD4+T 細胞数の上昇は観察されるもののリンパ組織での上昇は必ずしも確認されていないことなどが報告されており、血液-二次リ

ンパ組織間の分布平衡が変動する可能性が考えられる。また in vitro および in vivo の結果から、5-フルオロウラシルは CD4+T 細胞に対する毒性が低い薬物として分類可能な抗がん剤であるが、一方で好中球に関しては、5-フルオロウラシル投与後 5 日目において有意な減少が観察されている。好中球は骨髓にて多段階の分化過程を経て血中に出現する、半減期の短い細胞であり、常に骨髓から供給され続けている。好中球減少症は抗がん剤が骨髓幹細胞に対して殺細胞効果を示した結果として現れる病態と考えられており、骨髓抑制の指標として広く用いられている。本結果から、抗がん剤は正常細胞に対しても、ある程度選択的に殺細胞効果を示すことが明らかとなり、化学療法に伴う好中球減少症と CD4+T 細胞減少症は、必ずしも併発するとは限らないことが示唆された。それぞれの病態の発症および重篤度は、抗がん剤の種類や用量に依存するものと考えられる。FN 発症のリスク要因として「抗がん剤の種類」は重要な判断基準となっているが、抗がん剤の骨髓毒性とリンパ球毒性を分離して評価することで、FN の発症リスクの高い抗がん剤を、定量的に峻別できる可能性が示唆された。

胸腺は、T 細胞前駆細胞が分化・増殖および成熟過程を経て、末梢 T 細胞が形成される組織である。胸腺細胞の約 80% を占める未成熟 CD4+ CD8+T 細胞は正負の選択を受けた後に、約 10% を占める CD4+ CD8-T 細胞へと分化し、さらに成熟過程を経て、成熟 CD4+T 細胞として循環血中へと供給されることで、末梢 CD4+T 細胞のホメオスタシスに寄与している。がん化学療法後の CD4+T 細胞ホメオスタシスの再構築に、胸腺の寄与が大きいとする報告例もあり、抗がん剤投与による末梢 CD4+T 細胞数の減少における胸腺の寄与を検討するため、抗がん剤の胸腺細胞に対する影響を調べた。高増殖能を有する未熟 CD4+T 細胞 (CD4+ CD8+)、最終の成熟段階にある CD4+T 細胞 (CD4+ CD8-) 共に、いずれの抗がん剤に対しても高い毒性感受性を有することが示された。5-フルオロウラシルは他の抗がん剤と同様に、末梢に供給されうる CD4+T 細胞を障害したが、末梢 CD4+T 細胞数の有意な減少は観察されなかった。過去の報告を基に推定される、胸腺から末梢への新規 CD4+T 細胞供給速度は  $0.1\sim 0.5 \times 10^6 / \text{day}$  であり、その一日当たりの細胞供給量は末梢全体の CD4+T 細胞数に対して 1~3% 程度を占めるのみである。本検討から得られた 5-フルオロウラシル投与群での知見も合わせると、抗がん剤投与に伴う急性期の CD4+T 細胞の減少プロファイルに対して、胸腺の与える影響は少ないと考えられた。

最後に、in vitro 解析から構築したモデルを基に、抗がん剤血中濃度プロファイルの実測値を用いて、抗がん剤投与に伴う in vivo 末梢 CD4+T 細胞数の減少プロファイルを予測した。その結果、いずれの抗がん剤においても実測された末梢 CD4+T 細胞数の減少と高い相関性が観察された。がん化学療法開始前の血中 CD4+T 細胞数は、末梢組織間での分布が平衡に達しているため、末梢全体の CD4+T 細胞数をより反映していると考えられる。そのため、がん化学療法開始前の血中 CD4+T 細胞数を基に全末梢 CD4+T 細胞数を推定し、本モデルを適用することで、抗がん剤投与に伴う全末梢 CD4+T 細胞数の減少プロファイルを予測することができる。これによって、抗がん剤投与に伴う FN 発症のリスクを、定量的に評価するための方法論の基礎が構築されたと考えている。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

小沢政成、本間雅、徳田篤志、鈴木洋史  
In vitro 抗癌剤毒性試験からの in vivo 末梢 CD4+T 細胞数減少の定量的予測  
日本薬学会 第 129 年会 2009 年 3 月 28 日 京都

本間雅、小沢政成、徳田篤志、鈴木洋史  
発熱性好中球減少症に関わる抗がん剤リンパ球毒性の評価  
第 2 回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2008 年 12 月 20 日 京都

小沢政成、本間雅、鈴木洋史  
血液毒性に対する抗がん剤の新規評価基準の提案  
日本薬物動態学会 第 23 回年会 2008 年 10 月 31 日 熊本

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鈴木 洋史 (SUZUKI HIROSHI)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：80206523

##### (2) 研究分担者

伊藤 晃成 (ITO KOUSEI)

東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：30323405

樋坂 章博 (HISAKA AKIHIRO)  
東京大学・医学部附属病院・客員准教授  
研究者番号：80420206

(3) 連携研究者

神田 善伸 (KANDA YOSHINOBU)  
自治医科大学・教授  
研究者番号：30334379

吉田 晴彦 (YOSHIDA HARUHIKO)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：60240305