

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2021

課題番号：18H06108・19K21226

研究課題名(和文) アプレピタントの体内動態及び薬効解析による戦略的個別化投与設計理論の確立

研究課題名(英文) PK-PD analysis for aprepitant personalized dose adjustment to optimize individualized antiemetic therapy

研究代表者

勝部 友理恵 (Katsube, Yurie)

九州大学・大学病院・薬剤師

研究者番号：10827223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000 円

研究成果の概要(和文)：癌化学療法における遅発性嘔吐に有効なNK1受容体阻害剤の非侵襲的なバイオマーカーとして、NK1受容体のリガンドであるサブスタンスP (SP) の液体クロマトグラフ・タンデム質量分析法(LC-MS/MS)を用いた唾液濃度の測定系の樹立を目指した。その結果、ELISA分析に匹敵するpg/mLオーダーのSPの検出を可能としたが、健康者より採取した唾液中のSPは検出限界以下であった。同一検体を用いたELISA分析では1200 pg/mLを示した。ELISA分析を用いた既報における濃度よりも、より低い濃度でSPは唾液中に存在することが推察され、SP動態の指標には代替マーカーの探索が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SPの脱NH<sub>3</sub>化やリン酸化といった定量分析における課題は残るものの、本研究においてSPは既報において報告されるより低い微量濃度で生体試料中に存在することが明らかとなった。SPと共通アミノ酸配列を有するタキニンペプチドとの交差反応性の高さがELISA分析において問題視されてきたが、どの程度結果に影響を及ぼすかこれまで明らかにされていなかった。現時点においてSPのCINVのバイオマーカーとしての実現性は低いものの、ELISA分析を用いた唾液中のSPと嘔下能との関連性は数多く報告されており、本研究結果は既報における疾患との関連性が高いと考えられてきた末梢中のSPの解釈に一石を投じる結果である。

研究成果の概要(英文)：Oral administration of aprepitant, NK-1 receptor antagonists, is essential to give cancer patients releasing from chemotherapy-induced nausea and vomiting (CINV). However, in some patients, CINV is not well controlled. Therefore, in this study, we aimed to develop and apply the concentration of salivary substance P (SP), a ligand for the NK1 receptor, as non-invasive biomarker with LC-MS/MS. The results showed that LC-MS/MS could detect SP in the order of pg/mL, which is comparable to ELISA analysis, but SP in saliva collected from healthy subjects was below the detection limit. The maximum concentration of SP in saliva was 1200 pg/mL in ELISA analysis using the same subject, suggesting that SP is present in saliva at lower concentration than the previously reported concentration by ELISA analysis, and that it is necessary to search for alternative markers for SP.

研究分野：薬物トランスポーター 薬物代謝酵素 薬物動態 医療薬学

キーワード：白金系抗癌剤による悪心・嘔吐 サブスタンスP アプレピタント

## 1. 研究開始当初の背景

アプレピタントは、高度催吐リスク薬物に分類される抗がん薬による悪心・嘔吐 (CINV) に適応を有し、急性症状のみならず、遅発性症状に対しても制吐作用を示す。従って、催吐頻度が90%を超える高度リスクの抗がん薬を用いた治療法において積極的に用いられている。一方、支持療法の効果は一部の患者では期待される効果が得られず、未だ全ての患者に対する有効性を確保できていない。

日本人における脳内線条体中ニューロキニン 1 (NK1) 受容体を 90% 占有するときの血漿中アプレピタント濃度は 502.8 ng/mL であること (承認時審査報告書; P075 試験)、血漿中アプレピタント濃度が 331.1 ng/mL を上回る患者群では CINV 予防が 100% であるのに対して、低い患者群では 60% 未満であること (参考文献 1) などが報告されている。さらに、血漿中アプレピタント濃度は、患者間で大きな個人差を示すにもかかわらず (参考文献 2)、その用法は、抗がん薬投与 1 日目は 125 mg、2 日目以降は 80 mg を 1 日 1 回経口投与され、個別の用量調節は行われていない。したがって、一部の患者では用量過少のため、十分な制吐作用が得られない可能性が考えられる。

NK1 受容体アゴニストであるサブスタンス P は、抗がん薬投与後に一過性に上昇し、アプレピタントが投与された患者群のうち、遅発性症状を示した患者群では、サブスタンス P 濃度が高値を示すことが知られる (参考文献 3)。すなわち、アプレピタントの有効治療域は、血中サブスタンス P 濃度の個人差も加わることによって、患者個々によって大きく変動することが考えられる。これまで生体試料中のサブスタンス P の分析手法は酵素結合免疫アッセイ (ELISA) が主流であった。サブスタンス P をコードする *TAC1* 遺伝子は主に脳における発現量が高く、選択的スプライシングによってサブスタンス P と共通のアミノ酸配列を有する Neurokinin A を生成する。また、2000 年以降、末梢組織に多く発現する *TAC4* 遺伝子に由来した Hemokinin-1 の存在が報告された。市販されているサブスタンス P の ELISA キットの多くは、Neurokinin A および Hemokinin-1 と 100% に近い交差反応性を示すことから、一部のキットでは血液検体は適さないと記載が加えられるようになった。こうした背景から、ELISA 分析を用いたサブスタンス P のバイオマーカーとしての臨床応用は限定的であり、ELISA 法に代わる特異性および信頼性の高い分析系の確立が必要である。

## 2. 研究の目的

ELISA 法を用いたサブスタンス P の血漿中濃度は 1~1000 pg/mL を推移することが報告されている。しかしながら、血漿中のサブスタンス P は血漿中に存在するエステラーゼやプロテアーゼによって速やかに分解されるため (参考文献 3)、採血後、検体への分解酵素阻害剤の添加等の前処理を迅速に行わなければならない。血漿に代わる低侵襲性かつ高い安定性を維持できる生体試料を用いる必要がある。興味深いことに、サブスタンス P は唾液中にも存在し、唾液中のサブスタンス P は嚥下機能の恒常性維持に寄与することが報告されているものの (参考文献 4)、CINV との関連性は明らかにされていない。そこで、本研究は特異的かつ高感度分析を可能とする液体クロマトグラフ・タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を用いた唾液試料中におけるサブスタンス P の安定的な測定系の樹立を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 固相抽出を用いた唾液試料中におけるサブスタンス P の前処理条件設定

サブスタンス P の保管条件設定について最適な溶解液の検討を行った。また、前処理には固相抽出法を選択し、InertSep<sup>®</sup> HLB (N 含有ビニルポリマーとスチレンジビニルベンゼンの複合ポリマー-固相)、MonoSpin<sup>®</sup> 逆相カラム (C8)、Oasis PRiME<sup>®</sup> HLB (スチレンジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム) を用いて、それぞれの抽出条件におけるサブスタンス P の固相回収率及び唾液試料中の夾雑物の影響 (マトリックス効果) について検討を行った。

### (2) 健常者唾液試料中におけるサブスタンス P 濃度の同等性評価

対象は、本研究の内容および目的に対して書面を用いて説明し、同意の得られた健常成人とした。唾液の採取には、唾液採取用サリベット<sup>®</sup> (合成繊維) を用い、あらかじめサリベット<sup>®</sup> の検体採取容器の回収部にプロテアーゼ阻害剤を添加して行った。測定機器には、超高速液体クロマトグラフ (UPLC)-MS/MS (島津製作所製 LCMS-8050) を用いた。なお、本研究は九州大学病院長の倫理審査委員会の承認を得て行った (許可番号 21127-00)。

## 4. 研究成果

(1) サブスタンス P の標準溶液は 0.1% ギ酸水溶液を用いて 0.1 mg/mL に調製し、使用まで -80°C で保管した。なお、検討期間中におけるサブスタンス P の検出値に有意な減少が見られないことを LC-MS/MS を用いて確認している。サブスタンス P の血漿中濃度は ELISA 法を用いて pg/mL

から ng/mL オーダの範囲であることが報告されている。低濃度領域において、サブスタンス P の容器への吸着性が課題となったことから、容器への吸着性を抑制する目的として異なる濃度のジメチルスルホキシド (DMSO) を添加したところ、DMSO 濃度が 25% 以上で高い回収率が得られたことから、固相抽出の溶出操作および固相抽出以降における試料中の DMSO 濃度が 25% – 45% となるよう調製した。検量線は、50 – 2000 pg/mL の濃度範囲において良好な直線性を示した ( $r^2 = 0.99$ )。次に、唾液試料中におけるサブスタンス P の InertSep® HLB、MonoSpin® 逆相カラム (C8)、Oasis PRiME® HLB、Oasis® MAX を用いて、それぞれの抽出条件下で単一検体を用いて標準試料を分析し、定量値の精度について検討を行ったところ、Oasis PRiME® HLB において最も精度の高い定量値が得られた。しかしながら、いずれの条件においても個体間差は大きく FDA のバリデーションガイドラインにおける許容範囲外であった。一方で、単一マトリックス中におけるサブスタンス P は 250 – 2000 pg/mL の濃度範囲において、良好な直線性を示した ( $r^2 = 0.99$ )。

(2) ELISA 法を用いて唾液試料中のサブスタンス P 濃度を測定したところ、大きな個体差が認められた (80 – 1200 pg/mL)。このうち最もサブスタンス P 濃度が高い唾液検体を用いて LC-MSMS による定量分析を行ったところ、検出限界以下であった。また、一部の検体においても LC-MSMS を用いて定量分析を行ったところ、サブスタンス P は検出されなかった。

測定試料中における類縁物質や夾雑物による誤検出により、ELISA 分析と LC-MSMS 分析とで得られた結果が一致しないことは少なくないものの、当初の予想と比べて ELISA 分析と大きく乖離する結果が得られた。本研究結果より、サブスタンス P の唾液中濃度は検出限界値である 50 pg/mL よりさらに低い可能性が考えられ、SP は既報において報告されるより低い微量濃度で生体試料中に存在することが明らかとなった。SP はタキキニンペプチドに分類され、タキキニンペプチドの一部は SP と同様に NK1 受容体に対して親和性を示すことが知られている。近年、SP と共通アミノ酸配列を有するタキキニンペプチドとの交差反応性の高さが ELISA 分析において問題とされているが、ELISA 分析により唾液試料中の SP と嚥下能との相関関係や血漿中の SP と CINV との関連性は数多く報告されている。固相抽出条件の再検討による夾雑物や類縁物質との分離および濃縮操作による検出感度の向上や脱 NH<sub>3</sub> 化やリン酸化に関する検討が今後の課題であり、現時点において CINV のバイオマーカーとしての実現性は低いものの、本研究はこれまで報告されてきた疾患との関連性が高いと考えられてきた SP の解釈に一石を投じる結果であると考えられる。

- 1) Nishizawa K, *Int J Clin Oncol.* 20 (3) 538–542, (2015).
- 2) Motohashi S, *Biol Pharm Bull.*, 36 (4) 676–681, (2013).
- 3) Mosher RA, *Am J Vet Res.*, 75, 109–116, (2014).
- 4) Bulmer JM, *Gerontol Geriatr Med.*, 7, 1–13, (2021).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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