

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590536

研究課題名（和文） 薬物代謝酵素 CYP2A6 遺伝子多型に基づいた抗癌剤 S1 による肺癌治療の有用性

研究課題名（英文） The usefulness of chemotherapy with S-1 for Japanese patients with non-small-cell lung cancer based on CYP2A6*4 gene polymorphism

研究代表者

乾 直輝 (NAOKI INUI)

浜松医科大学・医学部・臨床薬理学・助教

研究者番号：80402254

研究成果の概要（和文）：肺癌患者 46 名を対象に S-1 代謝に関与する薬物代謝酵素 CYP2A6 の遺伝子多型を検討したところ、CYP2A6*4 アレルが 17.4% の割合で認められた。CYP2A6*4 アレルを持つ患者では、多型を持たない患者に比べ、5-FU の最高血中濃度や濃度曲線下面積が低く、プロドラッグであるテガフルの血中濃度が増加していた。CYP2A6 遺伝子多型に関する知見は効率的な S-1 の投与方法の確立のための有用と考えられた。

研究成果の概要（英文）： The frequencies of the CYP2A6*4C was 17.4%. In the S-1 pharmacokinetic analysis, the area under the concentration-time curve from 0 to 10 hours (AUC) ratios of 5-FU/tegafur showed large interindividual variabilities, ranging from 5.14 to 112.6. The AUC for tegafur was 1.5-fold higher in patients with the CYP2A6*4C allele than in patients without the CYP2A6*4C allele. Patients with the CYP2A6*4C allele had a significantly lower maximum plasma concentration for 5-FU than patients without the CYP2A6*4C allele.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：薬物治療学、薬物代謝酵素、個別化治療、抗癌剤 S-1、肺癌

1. 研究開始当初の背景

我が国では、生物・医学技術の進歩によって得られた知見を利用し、個人の性質に応じて最適な薬剤の選択や治療を行う個別化医療への期待が高まっている。特に癌治療における薬物療法は、生体へ及ぼす影響が非常に重篤なことやその強い副作用などから、より一層の個別化医療が必要とされる。

肺癌は我が国における癌死亡者数 1 位の難治性がんである。治療に対する反応性から

小細胞肺癌と非小細胞肺癌に大別され、病状の進行や他臓器への転移により手術が不可能な非小細胞肺癌患者では化学療法や放射線療法が行われる。現在の化学療法では、プラチナ製剤と新規抗癌剤と呼ばれるパクリタキセル、イリノテカンなどの 1 剤を組み合わせ投与方法が一般的である。これら化学療法は、支持療法に比べ生存期間を延長するが、その効果は満足できるものではない。更なる治療効果の向上が求められるが、有効

な薬剤は限られており、既存の薬剤を科学的エビデンスに基づき効率よく使用することが必要とされている。

新規抗癌剤のS-1は経口フッ化ピリミジン系抗悪性腫瘍剤で、5-FUのプロドラッグであるテガフルにギメラシルおよびオテラシルカリウムを配合した薬剤である。テガフルにギメラシルを加えることにより、ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼによる5-FUの分解を抑え、血中および腫瘍内濃度を高めることで抗腫瘍効果を増強することを可能としている。テガフルから5-FUへの変換は、CYP2A6が中心的役割を果たすと考えられている。CYP2A6は現在までに30以上の遺伝子多型が報告され、遺伝子多型の頻度は人種間で大きく異なること、多型の存在によってCYP2A6の薬物代謝酵素活性が欠損または低下することが明らかになっている。日本人ではCYP2A6*4、CYP2A6*7、CYP2A6*9の遺伝子多型の頻度が高いが、CYP2A6*4は欠損型変異で酵素活性を示さず、CYP2A6*9はTATA-boxの点突然変異で酵素活性が低下する。S-1の代謝にはCYP2A6遺伝子多型が大きく関与すると予想される。特に酵素活性の低下を伴う遺伝子多型の頻度が多い日本人ではテガフルから5-FUへの変換が不十分で、S-1の抗腫瘍効果が低下している可能性がある。薬物治療効果に影響を及ぼす様々な因子の中で、遺伝子多型による代謝酵素活性の変化は効果大きな影響を与えると考えられるが、S-1の薬物代謝に関してCYP2A6遺伝子多型の観点から検討した検討は行われていない。

2. 研究の目的

非小細胞肺癌患者におけるCYP2A6の遺伝子多型の存在とその頻度を明らかにし、CYP2A6遺伝子多型がS-1の薬物代謝と薬効に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 研究の対象

S-1投与中の日本人非小細胞肺癌患者で①画像上の測定可能病変を有し、②Performance statusが0から2で一般状態が良好と判断され、③遺伝子解析を含め本研究の内容について説明を行い理解が得られ、参加同意が文書で取得可能な症例を対象とする。症例は浜松医科大学附属病院を中心に協力病院として静岡県内の8総合病院で組織する静岡県肺癌治療グループで募集し、検体の収集および臨床効果判定のための情報収集を行う。倫理委員会にて本研究実施の承認済みである。

(2) 研究の方法

①S-1の投与方法および投与量

体表面積に応じて増減し1.25㎡未満は40mg、1.25㎡以上1.5㎡未満は50mg、1.5㎡以上は

60mgを1日2回、朝夕食後に内服する。

②遺伝子多型の検討

EDTA採血管を用いて採血を行う。この血液を用いてBlood & Cell Culture DNA kit (Qiagen)で白血球から遺伝子(ゲノムDNA)を抽出する。DNA濃度は分光光度型

(Genesys10UV:Thermo Spectronic)を用いて吸光度OD260値より算出する。得られたゲノムDNAを用いてPCR-RFLP法とallele specific-PCR法により、CYP2A6の遺伝子多型を解析する。検討する多型は、野生型のCYP2A6*1Aおよび日本人に多型の頻度が高いと報告されているCYP2A6*4、CYP2A6*7、CYP2A6*9とする。このうちCYP2A6*1AとCYP2A6*4はRFLP-PCRにて、CYP2A6*7、CYP2A6*9はallele specific-PCRを用いて解析する。PCRはDNA増幅装置(Mastercycler gradient:Eppendorf)、Taq DNA Polymerase (Qiagen)を用いて行う。RFLP-PCRでは得られたPCR産物を制限酵素Eco8IとAccIIを用いて切断し、2%アガロースゲル上で電気泳動する。全血200μlより平均6μgのゲノムDNA抽出が可能であり、それぞれのPCRで多型判別が可能である。

③S-1の薬物代謝の検討

S-1の体内動態が安定する内服開始5日目以降の、内服直前と内服後2、4、6、8、10時間の時点で計6回の採血を行い、5-FUの血中濃度はGC/MS法で、テガフルの血中濃度はHPLC法で測定する。これら測定値より、area under the curve (AUC)、maximum plasma concentrations (Cmax)、time to reach maximum plasma concentration (Tmax)などの薬物動態の検討を行う。

A:測定用試料の調製

上記タイムスケジュールで採取した血液を遠心分離して上清を採り、内標準溶液上記タイムスケジュールで採取した血液を遠心分離して上清を採り、内標準溶液を加えて測定用試料とする。これに0.2mol/lリン酸緩衝液及びジクロロメタンを加え、10分間震盪後、遠心分離しジクロロメタン層を採取する。水層を再度抽出し35℃に設定した水浴中、窒素気流下で乾固する。10mmol/lリン酸緩衝液/メタノール混液(85:15、v/v)を加えて超音波槽中で約5分間溶解後、遠心分離した上清をテガフル測定用試料とする。残りの水層に、リン酸二水素カリウム溶液と酢酸エチル層を加え10分間震盪後、遠心分離し酢酸エチル層を採取する。水層を窒素気流下で乾固する。これにアセトニトリル、ペンタフルオロベンジルブロマイド及びトリエチルアミンを加えて、室温で約30分間放置する。反応液にノルマルヘキサン/酢酸エチル混液(10:1、v/v)を加えて約30秒混和し、遠心分離後の上清を採取し、35℃に設定した水浴中、窒素気流下で乾固する。これを酢酸エチ

ルに溶解し、5-FU 測定用試料とする。検量線範囲を超えた試料は純水で希釈する。

B:テガフル・5FUの血中濃度の測定方法
 テガフルの測定はSPD-6A紫外吸光度計を備えたWaters 616 series(島津)を用いて、HPLC法で行う。カラムはInertsil ODS-2(GL Sciences、内径4.6mm×150mm)を用いて、恒温槽温度を35℃とし流速1.0ml/分で行う。紫外吸光度波長は270nmで測定を行う。5-FUの測定はGC/MS法で行う。GCはTRACE/GC(VG Masslab)を使用する。測定試料は化学イオン化法によりイソブタンを用いてマイナスイオン化を行う。分離はDB-5カラム(J&W、内径0.32mm×30mm、膜厚0.25μm)を用いて行う。カラムオーブンは、試料注入後100℃を1分保持し、続いて40℃/分の割合で280℃まで昇温させる。その後20℃/分の割合で320℃まで昇温させ2分間温度を維持する。これにより分離された試料は質量測定器(TRACE/MS:VG Masslab)でMSスペクトルを測定する。

④臨床効果の判定

臨床効果は奏効率および有害事象発生率で評価する。奏効率は治療前後で胸部CTを実施しWHOのResponse Evaluation Criteria In Solid Tumors(RECIST)に従って算出する。判定基準は、完全奏効:すべての標的病変の消失、部分奏効:最長径の和が30%以上減少、進行:最長径の和が20%以上増加、安定:部分奏効と進行の間の変化とする。奏効率は全適格症例のうち、完全奏効と部分奏効のいずれかである症例の割合とする。有害事象は、CTCAE(NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events)ver. 3.0日本語訳JCOG版に従って重症度判定を行い、その発現率および重症度を評価する。

4. 研究成果

(1)非小細胞肺癌患者46例で検討した。31例はシスプラチンとの併用治療、15例はS-1単剤治療であった。シスプラチン併用の有無や、性別、癌の組織型など他の臨床的因子によりテガフルと5-FUの薬物動態に差を認めなかった。このため以後全46例を用いて検討を行った。

(2)CYP2A6アレルの頻度は*1、*4C、*7、*9でそれぞれ47.8、17.4、19.6、15.2%だった。酵素活性のないCYP2A6*4C/*4Cは1例であった。5-FUのC_{max}とAUC₀₋₁₀はそれぞれ54.4~344.9 ng/mlと376.2~1224.3 ng h/ml、テガフルのC_{max}とAUC₀₋₁₀はそれぞれ1213.0~5685.0 ng/mlと6092.0~51821.0 ng h/mlだった(表)。CYP2A6の代謝指数としての5-FUとテガフルの比は5.12~112.6と個体差が大きかった。

パラメーター	CYP2A6*4C	CYP2A6*4C
--------	-----------	-----------

		アレルなし	アレルあり
FT	C _{max} (mg/mL)	2647.2 ± 788.2	3425.1 ± 1244.7
	AUC (ng·hr/mL)	19289.6 ± 7646.5	28174.1 ± 12241.6
	T _{max} (hr)	2.8 ± 1.0	3.3 ± 1.2
5-FU	C _{max} (mg/mL)	157.0 ± 65.5	102.6 ± 32.9
	AUC (ng·hr/mL)	755.3 ± 253.5	589.1 ± 179.0
	T _{max} (hr)	3.2 ± 1.0	4.1 ± 1.8
	T _{1/2} (hr)	1.8 ± 0.9	1.7 ± 1.4

表: CYP2A6*4 アレルによる5-FUとFTの薬物動態パラメーター(平均±SD)

(3)次にテガフルと5-FUの薬物動態をCYP2A6*4Cアレルの有無で検討した(図)。CYP2A6*4C陽性群(*1/*4C、*4C/*4C、*4C/*7、*4C/*9、図中黒丸)ではCYP2A6*4C陰性群(*1/*1、*1/*7、*1/*9、*7/*7、*7/*9、図中白ぬき丸)と比較して、5-FUのC_{max}が低値であり、一方、テガフルのC_{max}とAUC₀₋₁₀は高値だった。

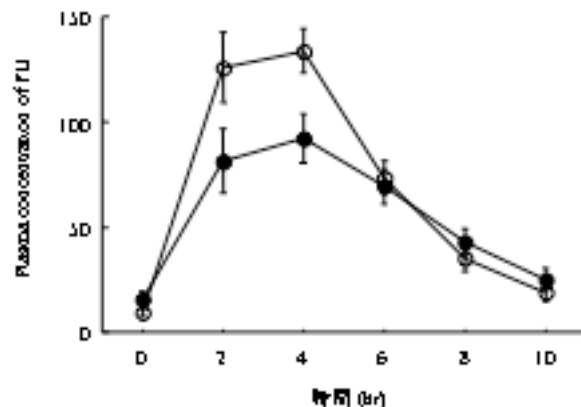


図: CYP2A6アレル有無による5-FUの血中濃度

CYP2A6*4Cアレルを持つ症例ではS-1投与の際に5-FUの血中濃度が上昇し難いことが強く示唆された。本研究の目的である非小細胞肺癌患者におけるCYP2A6の遺伝子多型の存在とその頻度を明らかにし、CYP2A6遺伝子多型がS-1の薬物代謝と薬効に与える影響を明らかになった。副作用を抑えた効率的なS-1の投与法の確立や個人の遺伝的体質に即したテーラーメイド治療のための有用な知見が得られたと考えられる。CYP2A6遺伝子多型を検討する事で、患者に優しい個別化した癌薬物療法の発展に寄与できる可能性がある。

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6件）

- ①. Ozawa Y, Inui N, Naitoh T, Yasuda K, Nagayama M, Shirai T, Suganuma H, Fujii M, Nakamura H, Suda T, Chida K. Phase II study of combination chemotherapy with S-1 and weekly cisplatin in patients with previously untreated advanced non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 査読有、63、2009 68-71.
- ②. Takahashi N, Inui N, Morita H, Takeuchi K, Uchida S, Watanabe H, Nakamura H. Effect of thyroid hormone on the activity of CYP3A enzyme in humans. J Clin Pharmacol. 査読有、50、2009: 88-93.
- ③. Kokudai M, Inui N, Takeuchi K, Sakaeda T, Kagawa Y, Watanabe H. Effects of statins on the pharmacokinetics of midazolam in healthy volunteers. J Clin Pharmacol. 査読有、49、2009: 568-573.
- ④. Kaida Y, Inui N, Suda T, Nakamura H, Watanabe H, Chida K. The CYP2A6*4 allele is determinant of S-1 pharmacokinetics in Japanese patients with non-small-cell lung cancer. Clin Pharmacol Ther. 査読有、83、2008、589-594
- ⑤. 貝田勇介, 乾直輝, 渡邊裕司、非小細胞肺癌患者における薬物代謝酵素 CYP2A6 遺伝子多型の存在と S-1 の薬物動態に及ぼす影響、臨床薬理の進歩、査読有、29、2008、81-87
- ⑥. Kaida Y, Inui N, Suda T, Watanabe H, Chida K. Response to “The Unanswered Question: What Is the Determinant of S-1 Pharmacokinetics?”. Clin Pharmacol Ther. 査読有、84、2008、204

〔学会発表〕（計2件）

- ①. 乾直輝、非小細胞肺癌患者における CYP2A6 遺伝子多型と S-1 の薬物動態、日本臨床薬理学会年会、2008.12、東京
- ②. Kaida Y, Inui N. The Influence of CYP2A6 Gene Polymorphism on S-1 Therapy in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. American Thoracic Society. 2008.5、Toronto

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乾直輝 (INUI NAOKI)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：80402254

(2) 研究分担者

渡邊裕司 (WATANABE HIROSHI)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：50262803
千田金吾 (CHIDA KINGO)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40197611

(3) 連携研究者

()

研究者番号：