

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 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590132

研究課題名（和文） がん化療法処方設計支援システムの構築

研究課題名（英文） Establishment of system for supporting formulation in cancer chemotherapy

研究代表者

島田 美樹 (Miki Shimada)

東北大学・病院・准教授

研究者番号：10196488

研究成果の概要（和文）：

まず、血中イリノテカン、およびゲムシタビンについて代謝物も同時に測定可能な分析法を構築した。本研究に対する同意を取得できた患者を対象とし、血中濃度を測定し、薬物動態学的パラメーターを求めた。いずれの患者においても副作用の発現は認められなかった。一方、膵癌細胞の培地中にゲムシタビンを添加し、細胞内および培地中のゲムシタビン、および代謝物である dFdU 濃度を計時的に観察したところ、非感受性細胞のゲムシタビンの取り込み、ゲムシタビンから dFdU への代謝、あるいは細胞外への排泄が亢進している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

We developed the simultaneous analysis for anti-cancer drug and its metabolite about irinotecan and gemcitabine. Then, we analyzed serum concentration of anti-cancer drug and its metabolite with time in patients obtained the agreement to be part of this study and calculated pharmacokinetic parameters. As observed no adverse effect in this period for all of patients, we would assess changes over time in future.

When we preliminary added gemcitabine to medium of pancreas cancer cell lines derived from patients with pancreas cancer to know the correlation between the pharmacokinetic profile and gemcitabine-induced cytotoxicity. These results suggest that enhancement of incorporation of gemcitabine to cells, metabolism of gemcitabine to dFdU, or elimination of dFdU extracellularly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：抗がん剤、薬物動態、副作用

1. 研究開始当初の背景

我が国における死亡原因の第1位はがんであり、国家を挙げてがんの罹患率と死亡率の激減を目指している。がんの治癒率の向上には早期発見が最も重要であるが、同時にがん化学療法の進歩が相乗的に大きく貢献している。特に近年の分子標的薬の上市は、がん化学療法の様相を一変するものであり、今後の新薬開発に大きな期待が寄せられている。近年のがん均てん化政策により、レジメン管理によるがん化学療法の標準化が進み、多くの病院で外来化学療法が実施され、患者のQOLは大きく向上しているが、一方でそうしたがん化学療法の急速な進歩にも係らず、十分な治療効果を得られないまま副作用の発現により治療を断念するケースもあり、未だ解決すべき課題は多い。

同じ薬物療法を行っても、患者によっては効果や副作用の発現が異なる時、薬物の体内動態の個人差がその原因となることが多い。これは、抗がん剤においても例外ではなく、イマチニブのようにCYP3A5の遺伝子多型により酵素活性が低下し、それに伴って薬物の血中濃度が上昇し、副作用が発現する。このように、薬物代謝および薬物動態の変動が、抗がん剤の効果や副作用に大きく影響するケースにおいて、がん化学療法による治療の最適化が十分なされていないのが現状である。このような背景から、薬物動態学的観点から、治療効果や副作用との関連を明確にしていく。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がん化学療法における抗がん剤の血中濃度と薬剤関連因子の遺伝子多型、治療効果、副作用情報ならびに臨床所見を組み合わせたデータベースを構築し、クラスター解析によって「抗がん剤の効く患者、効かない患者」あるいは「副作用が発現する患者、発現しない患者」を分類するのに有効なパラメーターを抽出し、これを基にした安全かつ有効ながん化学療法の処方設計支援システムを構築することである。

3. 研究の方法

本研究は、がん化学療法における抗がん剤および代謝物の薬物動態学的解析と薬剤関連因子のSNP解析、治療効果や副作用情報ならびに臨床所見を併せたデータベースを構築するため、1) 抗がん剤の代謝物を含めた測定系の確立、2) 抗がん剤の体内動態に関わる因子のSNP解析、3) 抗がん剤の体内動態解析結果、遺伝子解析情報、患者アンケート

トおよびカルテ情報の統合し、データベース化、4) 腫瘍細胞における抗がん剤の感受性調査、5) 抗がん剤の感受性に影響を及ぼすタンパク質の網羅的解析について行う。

4. 研究成果

抗がん剤の代謝物を含めた同時分析法については、殺細胞作用を有するイリノテカン、ゲムシタビンについて構築した。

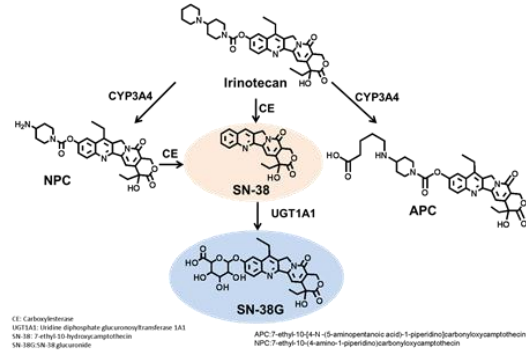


図1 イリノテカンの代謝経路

イリノテカンの代謝経路については、図1に示した。分析対象物は、イリノテカンおよびその活性本体であるSN-38とそのグルクロン酸抱合体、SN-38Gとし、蛍光検出器を接続したHPLCにて分析を行うこととした。まず、イリノテカン、SN-38、SN-38G、および内標準物質 (IS) であるカンプトテシンの検出波長の最適化を行い、励起波長を370 nm、蛍光波長を550 nmに設定した。続いてHPLCの移動相の条件を最適化し、イリノテカン、SN-38、SN-38G、およびISが相互に分離する条件を決定した。移動相として、50 mMリン酸/アセトニトリル (95:5, v/v) (移動相A)、および (5:95, v/v) (移動相B) を用いたグラジエント溶出を行った。上記の条件にて、まず測定対象物の標品を200 pg、およびIS、100 pgをHPLCに注入し、クロマトグラムを得たところ、各々の溶出時間は、イリノテカン、約14.6分、SN-38が約23.1分、SN-38Gが約12.1分、ISが約25.3分となり、各ピークが良好に分離できることが確認された。次いで、血清の前処理について検討を行ったところ、メタノールを加えた除タンパク操作のみでイリノテカン、SN-38、およびSN-38Gの相対回収率は良好であった。そこで、患者検体測定のための手順を図2に示す通りとした。本法

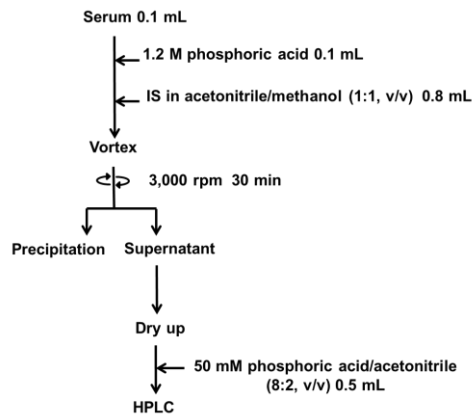


図2 患者検体測定の手順

のバリデーションを行ったところ、表1に示すように各々の測定対象物は、求められる血中濃度範囲において良好な直線性が得られ

表1 本法における測定対象物の直線性と日内、および日間再現性試験

	Linear regression equations	Quantitative range (ng/mL)	R ²
Irinotecan	y=0.0165x-0.0250	2.5-2500	1.000
SN-38	y=0.0139x+0.0182	2.5-1000	0.999
SN-38G	y=0.0187x+0.0177	2.5-1000	0.999

Inter-day (n=6)				Intra-day (n=6)					
	Added (ng/mL)	Observed (ng/mL)	RSD (%)	RE (%)		Added (ng/mL)	Observed (ng/mL)	RSD (%)	RE (%)
Irinotecan	10	10.5	3.23	5.10	Irinotecan	10	10.6	2.79	6.29
	100	100	6.15	-0.063		100	103	5.56	2.94
	1000	985	8.66	-1.37		1000	1034	4.69	3.44
SN-38	10	10.1	8.14	0.646	SN-38	10	10.6	6.87	5.99
	100	104	6.20	3.83		100	90.4	5.37	5.47
	250	244	2.17	-2.29		250	244	0.892	-2.40
SN-38G	10	10.1	3.76	1.39	SN-38G	10	10.4	3.14	4.2
	100	108	6.09	7.76		100	103	4.61	2.9
	250	259	4.65	3.75		250	243	0.760	-3.0

RSD, relative standard deviation, RE, relative error.

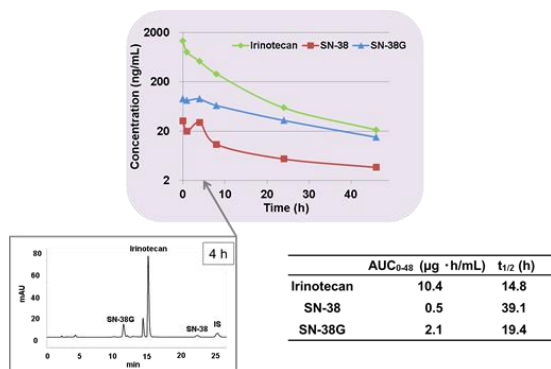


図3 患者検体におけるイリノテカン、SN-38、およびSN-38G濃度の経時的変化と薬物動態学的パラメーター

た。また、日内、日間変動試験の結果から、真度、精度に優れた方法であることが判った。そこで、本研究に対して同意の得られた大腸がんペバシズマブ (5) FOLFROI 両方の1コース目の患者について、イリノテカン点滴終了直後、1、4、8、24、48時間後の血液を採

取し、イリノテカン、SN-38、およびSN-38G濃度の経時的変化を調べた(図3)。この間、本患者に副作用は認められず、そのまま治療が継続され、4コース目終了後のCTによる効果判定では、腫瘍の縮小が認められた。

一方、ゲムシタビン療法における治療効果や副作用と、薬物および代謝物の関連を精査することを目的として、HPLCを用いるゲムシタビン及び代謝物dFdUのヒト血清中濃度測

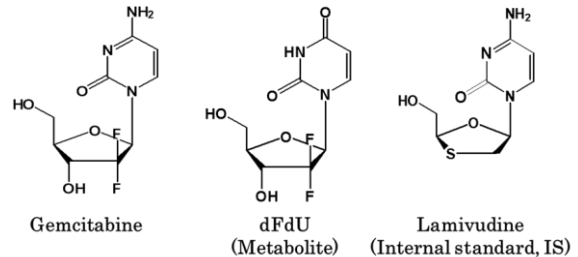


図4 ゲムシタビン、代謝物dFdU、およびラミブジンの構造式

定法の構築を行った。なお、ISには、構造の類似しているラミブジンを用いることとした(図4)。まず、移動相のpHと溶質の保持挙動の関係性を調べ、移動相として10mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)/メタノール(98:2, v/v)を用い、カラムとしてHydrosphere C18 (150mm×2.0mm i.d., 5μm)を用いて、流速200μL/minに設定してUV 265nmでモニターするとき、ゲムシタビン、dFdUおよびISを相互に明確に分離でき、これらを高感度に分析できることが判明した。次に、血清試料の前処理操作について検討した。すなわち、血清に対して5倍容量のアセトニトリルを用いることにより、血清タンパ

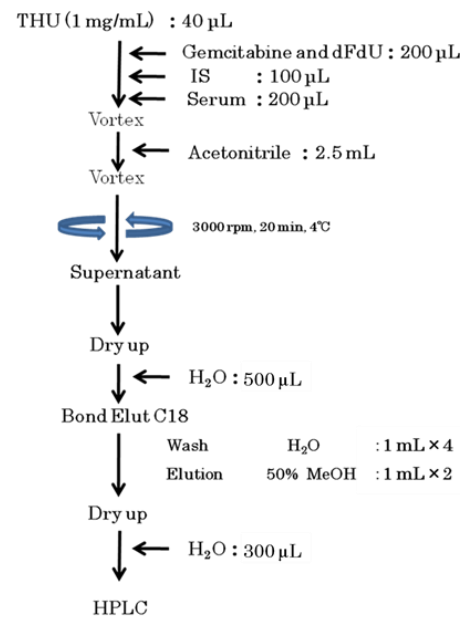


図5 患者検体測定の手順

ク質を十分に排除でき、分析対象化合物を定量的に回収できることが判った。しかしながら、除タンパク操作のみではベースラインが不安定なうえ、対象物質の保持時間付近に血清由来の夾雑物のピークも観測され、そのままでは低濃度領域における定量性が十分ではないことが示唆された。そこで、血清中の夾雑物のさらなるクリーンアップを目的に、除タンパク後に Bond Elut C18 による固相抽出を組み合わせたところ、血清由来の夾雑物のピークが激減したうえ、ベースラインも安定した。患者検体の測定手順について図 5 に示した。そこで、本法における分析法バリデーションを実施した結果、真度および精度について十分満足し得る結果が得られ、今回構築した方法が信頼度に優れた分析法であることが判明した。本分析法の分析時間の短縮に向けた改良を行いながら、本研究について同意の得られたゲムシタビン (1,000 mg/m²、30 min 持続注入) 隔週投与患者からゲムシタビン投与前、投与後 30 分、45 分、60 分、90 分、120 分の血液を採取し、ゲムシタビンおよび dFdU の血中濃度の計時的変化を確認した。得られた値から算出した dFdC の AUC は 7.07 mg・h/L、消失速度定数は 0.726 h⁻¹ であり、dFdU の AUC は 37.02 mg・h/L であった(図 6)。ゲムシタビンの代謝酵素であるシチジンデアミナーゼ (CDA) の変異のある領域を同様に PCR にて増幅し、ダイレクトシーケンスにて解析する手法を構築

	dFdC	dFdU
AUC	7.07 mg・h/L	37.02 mg・h/L
消失速度定数	0.726 h ⁻¹	

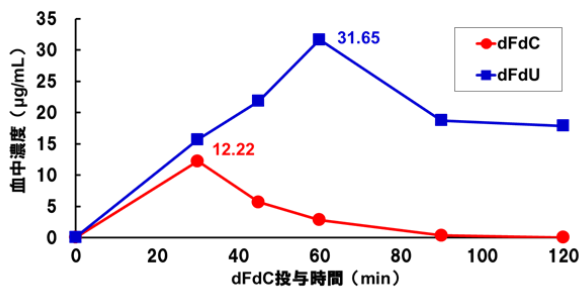


図 6 ゲムシタビン投与患者のゲムシタビンおよび dFdU の血中濃度の計時的変化と薬物動態学的パラメーター

した。そこで、本患者の CDA*2、CDA*3 の変異を調べたところ、いずれも野生型であった。現在、顕著な副作用も無く、治療効果が認められており、今後、臨床所見や検査値の異常時に血中濃度を確認し、ゲムシタビンの継続的な投与支援を行う予定である。

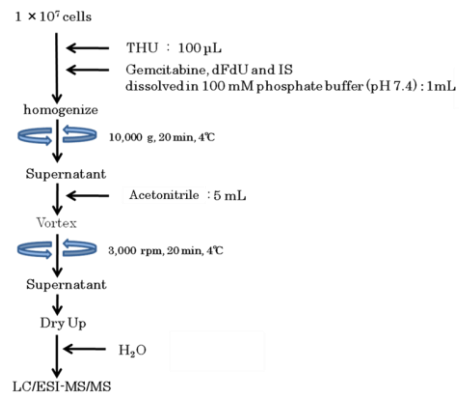


図 7-1 膵癌細胞内のゲムシタビン、および dFdU の濃度測定手順

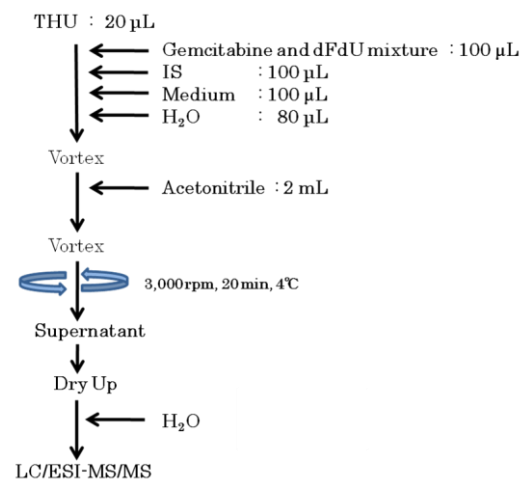


図 7-2 膵癌細胞培地中のゲムシタビン、および dFdU の濃度測定手順

一方、異なる患者から樹立した株化細胞を用いて、ゲムシタビンを培地中に添加した際のゲムシタビンおよび代謝物の細胞内外の動態を経時的に解析し、ゲムシタビン感受性との関連を試験的に調べることにした。細胞内におけるゲムシタビンや代謝物 dFdU の挙動解析を目的に、LC/ESI-MS/MS を用いるゲムシタビン及び dFdU の細胞内濃度測定法の構築を試みることにした。まず、MS および MS/MS に関連する各種パラメーターの最適化を行った結果、ISV を 3500 V に設定し、ゲムシタビン、dFdU および IS の DP をそれぞれ 80 V、60 V および 40 V に設定することとした。また、CID の最適化を試みたところ、各化合物に共通のピリミジン環部分のプロダクトイオンが、30 eV の時に最も強く生成することが判明したことから、いずれの化合物においても CID を 30 eV に設定することとした。細胞および培地の前処理条件についても種々検討を加えた後、本分析法のバリデーションを実施した。その結果、真度および精度について満足し得る値が得られ、本法が信頼

度に優れる分析法であることが判明した。細胞内、および培地中のゲムシタピン、および dFdU の濃度測定は、図 7-1、2 に示す手順にて行うこととした。次に、膵がん由来 PK-1 および PK-9 細胞、およびそれぞれの非感受性細胞である RPK-1 および RPK-9 細胞を用い、ゲムシタピンを培地に添加してインキュベートしたときの、経時的なゲムシタピンおよび dFdU の挙動を調べた。その結果、n=1 の予試験的なデータではあるものの、非感受性細胞におけるゲムシタピンの細胞内への取り込みや、dFdU への代謝、あるいは dFdU の細胞外への排出が亢進している可能性が考えられた。

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 8 件)

1. Yuriko Saiki, Yuki Yoshino, Hiroko Fujimura, Tatsuya Manabe, Yuki Kudo, Miki Shimada, Nariyasu Mano, Tomohiro Nakano, Yoonha Lee, Shinjiro Shimizu, Shinya Oba, Sho Fujiwara, Hideyuki Shimizu, Na Chen, Zhaleh K Nezhad, Guo Jin, Shinichi Fukushige, Makoto Sunamura, Masaharu Ishida, Fuyuhiko Motoi, Shinichi Egawa, Michiaki Unno, and Akira Horii: DCK is frequently inactivated in acquired gemcitabine-resistant human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 421 98-104 (2012).
<http://www.journals.elsevier.com/biochemical-and-biophysical-research-communications/>
2. Ayako Furugen, Hiroaki Yamaguchi, Nobuaki Tanaka, Hajime Ito, Kazuaki Miyamori, Asuka Fujikawa, Natsuko Takahashi, Jiro Ogura, Masaki Kobayashi, Takehiro Yamada, Nariyasu Mano, and Ken Iseki: Quantification of intracellular and extracellular prostanoids stimulated by A23187 by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 879, 3378-3385 (2011).
<http://www.journals.elsevier.com/journal-of-chromatography-b/>
3. Lee R. Hagey, Takashi Iida, Shoujiro Ogawa, Yuuki Adachi, Mizuho Une, Kumiko Mushiake, Masamitsu Maekawa, Miki Shimada, Nariyasu Mano, and Alan F. Hofmann: Biliary bile acids in birds of the Cotingidae family - (24R, 25R)-3 α , 7 α , 24-trihydroxy-5 β -cholestan-27-oic acid and two epimers (25R and 25S) of 3 α , 7 α -dihydroxy-5 β -cholestan-27-oic acid. *Steroids*, 76, 1126-1135 (2011).
<http://www.journals.elsevier.com/steroids/>
4. Nariyasu Mano, Mayumi Sato, Marina Nozawa, Yotaro Matsumoto, Masaru Mori, Hiroaki Yamaguchi, Junichi Goto, and Miki Shimada: An accurate quantitative LC/ESI-MS/MS method for sirolimus in human whole blood. *J. Chromatogr. B*, 879, 987-992 (2011).
<http://www.journals.elsevier.com/journal-of-chromatography-b/>
5. Nariyasu Mano, Marina Nozawa, Mayumi Sato, Masaru Mori, Hiroaki Yamaguchi, Katsuhiko Kanda, Makoto Nogami, Junichi Goto, Miki Shimada: Identification and elimination of ion suppression in the quantitative analysis of sirolimus in human blood by LC/ESI-MS/MS. *J. Chromatogr. B*, 879, 968-974 (2011).
<http://www.journals.elsevier.com/journal-of-chromatography-b/>
6. Hiroaki Yamaguchi, Toshiko Takeuchi, Masahiro Okada, Minako Kobayashi, Michiaki Unno, Takaaki Abe, Junichi Goto, Takanori Hishinuma, Miki Shimada, and Nariyasu Mano: Screening of Antibiotics That Interact with Organic Anion-Transporting Polypeptides 1B1 and 1B3 Using Fluorescent Probes. *Biol. Pharm. Bull.*, 34 (3), 389-395 (2011).
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/bpb>
7. Toshihiro Matsuda, Miki Shimada, Akira Sato, Takanori Akase, Koichi Yoshinari, Kiyoshi Nagata, and Yasushi Yamazoe: Tumor necrosis factor- α -nuclear factor- κ B-signaling enhances St2b2 expression during 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced epidermal hyperplasia. *Biol. Pharm. Bull.*, 34 (2), 183-190 (2011).
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/bpb>
8. Hiroaki Yamaguchi, Misa Sugie, Masahiro Okada, Tsuyoshi Mikkaichi, Takafumi Toyohara, Takaaki Abe, Junichi Goto, Takanori Hishinuma, Miki Shimada, and Nariyasu Mano: Transport of estrone 3-sulfate mediated by organic anion transporter OATP4C1: Estrone 3-sulfate binds to the different recognition site for digoxin in OATP4C1. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 25, 314-317 (2010).

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/dmpk>

[総説] (計 3 件)

1. 島田美樹、眞野成康:臨床現場に貢献する分析科学. ぶんせき, 10, 502-505 (2010).
2. 眞野成康、島田美樹、後藤順一:化学診断並びに薬物療法の適正化に寄与する質量分析法. 臨床化学, 39, 70-78 (2010).
3. 眞野成康:メタボローム・プロテオーム解析法. 日本臨床化学会東北支部会誌, 19 巻, 1-10 (2010).

[学会発表] (計 15 件)

招待講演・依頼講演 (計 8 件)

1. 島田美樹:安全で有効な薬物療法を目指した臨床現場での取り組み. 薬物代謝・分子毒性学仙台セミナー～基礎研究から創薬・臨床へ～, (仙台), 2013. 2. 16
2. 島田美樹、眞野成康:治療薬物モニタリングにおける質量分析法の活用. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 (京都), 2012. 11. 30.
3. 島田美樹、眞野成康:抗がん剤の血中濃度モニタリング:治療効果と副作用管理. 日本医療薬学会 第 46 回 公開シンポジウム (秋田), 2012. 7. 28.
4. 島田美樹、眞野成康:抗がん剤の血中濃度モニタリングと副作用管理. 日本病院薬剤師会東北ブロック第 1 回学術大会 (弘前), 2011. 11. 26-27.
5. 木皿 重樹、我妻 恭行、久道 周彦、村井 ユリ子、島田美樹、眞野成康:当院化学療法センターにおける薬剤師の役割. 日本病院薬剤師会東北ブロック第 1 回学術大会 (弘前), 2011. 11. 26-27
6. 島田美樹:がん化学療法の副作用管理とその取り組み. 平成 23 年度日本薬学会東北支部第 10 回医療薬学若手研究者セミナー (仙台), 2011. 9. 17.
7. 島田美樹、眞野成康:当院薬剤部の試験研究における分析科学. 第 23 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (松島), 2010. 7. 21-7. 23.
8. 島田美樹:抗がん剤の副作用管理と薬剤部の取り組み. 第 1 回東北大学病院がんセミナー (仙台), 2010. 4. 15

一般講演 (計 7 件)

1. 前嶋隆弘、大川星美、近藤泰輝、久道周彦、松浦正樹、下瀬川徹、島田美樹、眞野成康:腎機能の低下した肝細胞癌患者における血中 sorafenib 濃度の推移. 日本薬学会第 133 年会 (横浜), 2013. 3. 27-30.
2. 柳利樹、荒屋世一、前川正充、鈴木裕之、齋藤英郎、荒井陽一、久道周彦、島田美樹、眞野成康:LC/ESI-MS/MS による

- Sunitinib および代謝活性物 SU12662 の血中濃度測定法の構築. 第 29 回日本 TDM 学会・学術大会 (神戸), 2012. 6. 16-17.
3. 鈴木裕之、工藤由起、相馬真志、菊地正史、木皿重樹、松浦正樹、久道周彦、江川新一、海野倫明、島田美樹、眞野成康:膵がんゲムシタピン療法の PK/Pgx. 日本薬学会第 132 年会 (札幌), 2012. 3. 28-31.
 4. 鈴木澄子、松浦正樹、赤坂和俊、土屋雅美、木皿重樹、久道周彦、石岡千加史、島田美樹、眞野成康:HPLC によるイリノテカンおよび代謝物の同時定量法の構築. 第 24 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2011. 8. 31-9. 2.
 5. 大川星美、前嶋隆弘、柳 利樹、赤坂和俊、土屋雅美、松浦正樹、久道周彦、近藤泰輝、下瀬川徹、島田美樹、眞野成康:肝細胞癌患者のソラフェニブおよび代謝物の血中モニタリング. 第 24 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2011. 8. 31-9. 2.
 6. 大川星美、鈴木裕之、森大、前川正充、島田美樹、眞野成康:培養細胞中のソラフェニブおよび代謝物定量法の構築. 日本薬学会第 131 年会 (静岡), 2011. 3. 28-3. 31.
 7. 工藤由起、田村淳、前川正充、鈴木裕之、森大、島田美樹、眞野成康:HPLC によるゲムシタピンおよび代謝物の血中濃度測定法の構築. 日本薬学会第 131 年会 (静岡), 2011. 3. 28-3. 31.

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.hosp.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 美樹 (MIKI SHIMADA)
東北大学・病院・准教授
研究者番号: 10196488

(2) 研究分担者

眞野 成康 (NARIYASU MANO)
東北大学・病院・教授
研究者番号: 50323035

(3) 連携研究者