

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590177

研究課題名(和文) がん病態下における薬物の腎クリアランス亢進メカニズムの解明

研究課題名(英文) The pharmacokinetic study on enhanced vancomycin renal clearance in patients with malignancies.

研究代表者

松下 良 (Matsushita, Ryo)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：20293368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「がん患者において薬物の腎排泄が亢進し、薬効の低下を招く症例が報告されている。」事に対して、その原因解明を行った。我々の収集した臨床データを基に、母集団薬物動態プログラムNONMEMプログラムを用いて解析を行った結果、がん患者で、クリアランス(CL)の上昇が確認された。Fisher344ラットの足窩に筋肉内骨肉腫を移植したモデルを用いた検討により、がん病態によるVCMのCLの亢進は、腎臓における尿細管分泌または再吸収が関与していることが示唆された。更に、in vitroヒト腎臓近位尿細管培養細胞を用いた実験より、その現象には、サイトカインが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been reported that vancomycin (VCM) total clearance (CL<sub>tot</sub>) is significantly higher in patients with malignancies compared to those without malignancies. In the present study, to clarify the mechanism of VCM CL<sub>tot</sub> enhancement in malignancy, we adopted the population pharmacokinetic analysis and the rat animal models, using chemical carcinogen-induced osteosarcoma, transplanted into thigh muscles. The CL<sub>tot</sub> and renal clearance (CL<sub>r</sub>) of VCM in the tumor-bearing rats were increased compared to that of the control rats. However, there was no difference in the glomerular filtration rate. The plasma concentrations of cytokines, were elevated in tumor-bearing rats. When cytokines were simultaneously exposed to renal proximal tubular epithelial (RPTEC) cells, VCM secretory ratio increased significantly. These findings suggest that the change in VCM tubular secretion or reabsorption by cytokines might be associated with the VCM CL<sub>tot</sub> enhancement in the tumor-bearing rats.

研究分野：医歯薬学

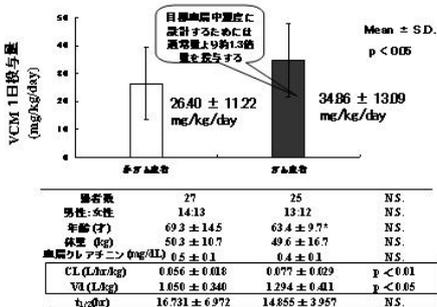
科研費の分科・細目：医療系薬学・医療薬剤学

キーワード：がん パンコマイシン 腎クリアランス 亢進 サイトカイン 骨肉腫

1. 研究開始当初の背景

感染症克服のためには耐性菌の発生及び、拡散の抑止が大きな問題となっている。特に日本では黄色ブドウ球菌の60%以上が既に耐性菌(MRSA)であるとする報告もあり深刻な問題となっている。この様な状況の中でMRSA治療薬であるグリコペプチド系抗菌薬 vancomycin(VCM)を適正に使用することは重要である。このVCMが、がん患者で血漿中濃度が異常に低下する臨床例が、諸外国で報告されるようになった(D. Chang et al., *Pediatr Infect Dis J*,1995;14:673-8)。しかし、そのメカニズムは不明である。現在、死因の第1位は、悪性新生物であり、がん患者が感染症に罹患する可能性も高いことに鑑み、本研究では、本現象の定量的評価、メカニズムの解明に臨床的(母集団薬物動態学的解析法)かつ、基礎的(病態動物モデルを用いた薬物動態学的検討)に多角的に取り組む事を目的とした。本研究を行う上で、臨床研究により、既に下図のような結果を得ていた。

【予備検討で行われた非がん患者とがん患者でのバンコマイシン1日投与量の比較】



まず、研究分担者の寺町が、前任時、公的病院の病院薬剤師(JA中濃病院、岐阜)として勤務時に、薬物血中濃度モニタリングを行ったMRSA患者(50症例)を腫瘍の有無で2群に分けた。そして、その体内動態パラメータを比較したところ、年齢、体重、血清クレアチニン値および血漿中濃度に差がみられないにもかかわらず、腫瘍群(右カラム)の投与量とクリアランスが上昇する結果が得られた。この結果は、遡及的な検討ではあるが、我々の仮説「がん患者では、VCMのクリアランスが上昇する」を支持するものである。本結果は、本邦初のものであるばかりでなく、多様ながんの種類を扱っている点で、世界的にも価値のあるものといえる。本結果については既に論文誌に発表済みである(寺町ひとみ、松下良、辻彰、悪性腫瘍患者におけるバンコマイシンの薬物動態パラメータの変動-ベイジアン法による解析-, 日本化学療法学会雑誌, 2005,53(6): 357-363)しかしながら、なぜ、このような現象が起こるのか。このような現象が起こるのは、VCMだけなのか。がんの種類に依存するのか等の問題点は未解決のままであった。

一方、我々の報告を受けて、京都大学医学

部附属病院薬剤部の表、矢野らは、悪性腫瘍・非腫瘍患者におけるバンコマイシン体内動態の比較解析を対象患者106名に対して遡及的調査を実施し、がん患者でのクリアランスの変動は、腎機能に相関し、がんの有無に関係しなかったと報告している(Omote S et al., *Bio Pharm Bull*, 2009; 32: 99-104)。この相反した結果に対しては、より詳細な検討を行い、早急に結論を出す必要がある。以上より、本研究は薬物の代謝、排泄臓器とは違う臓器が障害される疾患により、体内動態がアップレギュレーションされるという希少な事例の存在の確定と解明に繋がる独創的なものと着想し本研究を企画した。

2. 研究の目的

本研究では、がん病態によってVCMの薬物動態の何が、どの程度薬物動態学的に変化しているのか。そして、その変化が、腫瘍からからどの様にレギュレーションされているのか。また、この現象が、他のどのような薬物にもみられるのか。また、がんの種類によって変動がみられるかを明らかにする。

これらの問題点に答えるべく、次項のように実験計画を立案した。

まず、本現象の適用範囲(癌種、薬物の特徴)等の解明を母集団薬物動態解析の手法を使い明らかにする。次に、がんの病態モデルラットを作成し、ヒトでの現象が再現するか検討するとともにメカニズムの検討を薬物速度論的、分子生物学的手法により行う。

3. 研究の方法

(1) がん患者におけるVCMの母集団薬物動態パラメータの遡及的算出

JA中濃病院(岐阜)にて薬物治療モニタリング(TDM)の目的で採取されたデータを基に、母集団薬物動態プログラムNONMEMプログラムを用いて解析を行う。体重、年齢、血清クレアチニン、血清アルブミン値、癌疾患の有無、がん病名(ex,乳がんなど)、主要な疾患名、感染症名、dopamine、dobutamine等の併用薬の有無等の項目について遡及的に調査した内容を元に疾患による影響または、併用薬による影響を定量的に評価する。

(2) VCMの薬物動態学的検討

腫瘍モデルの作製: 大腿筋肉内へCSLM細胞を背部皮下に骨肉腫を移植したラット(SC群)と大腿部筋肉内に骨肉腫を移植したラット(IM群)とコントロール群のラットにVCMを5 mg/kg単回静注し、体内動態を比較した。VCM以外の薬物での検討: 大腿筋肉内へCSLM細胞を移植した骨肉腫(CSLM細胞)移植ラット(腫瘍群)とコントロール群のラットにAMK、tobramycin(TOB)を5 mg/kg単回静注し、体内動態を比較した。血漿中内因性物質の検討: 血漿中内因性物質としてアルブミン、総ビリルビン、グルコース、尿酸、サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF-)を測定し、両群で比較した。血漿蛋白非結合

形分率 (fp) の検討: コントロール群と腫瘍群について invitro での VCM の fp を測定し、fp の体内動態に及ぼす影響について検討した。系球体ろ過速度の影響: 腫瘍群とコントロール群に VCM を inulin と同時に投与し、VCM クリアランス、系球体ろ過速度などを求めることに加えて、probenecid, cimetidine, quinidine を併用し阻害効果を検討した。VCM の腎臓内蓄積率: コントロール群と腫瘍群で VCM の腎臓内蓄積量を測定し、血漿中に対する腎臓への VCM の蓄積量を組織血漿間分配係数  $K_p$  値で表した。腎臓でのトランスポーターの変動: 腎臓に発現することが知られている薬物トランスポーターについて RT-PCR 法によりその発現を比較した。ヒト近位尿細管上皮細胞 (RPTEC) を用いた VCM の腎臓における排泄機構の検討: RPTEC における再吸収方向 (apical-to-basal: a-to-b) と分泌方向 (basal-to-apical: b-to-a) の VCM の細胞透過性を検討した。

#### 4. 研究成果

がん患者における VCM の母集団薬物動態パラメータの遡及的解析を NONME プログラムを用いて行ったところ、腎機能正常患者において以下の関係が得られ、確かに、癌患者の方が CL が亢進していることが確認された。但し、WT は体重を、GAN は、癌患者の場合 1 を非癌患者の場合 0 とする。

$$CL(L/hr) = 4.42 \times 10^{-2} \times WT \times 1.20^{GAN}$$

一方、併用薬の効果や癌の種類による差は見いだせなかった。

次にがんの病態モデルラットを作成し、ヒトでの現象が再現するか検討するとともにメカニズムの検討を行った。その結果、SC 群では VCM CL の亢進はみられなかったが、IM 群では VCM CL が 1.8 倍に亢進した。SC 群と IM 群で CLtot の差が生じた原因として筋肉内は腫瘍付近に血管が豊富であり、類骨形成にも好条件の場合であるとの報告があり、これらの違い、ないしはサイトカイン等の放出の差が生じていたかもしれない。骨肉腫移植ラットを用いた AMK、TOB の単回静注実験より、VCM と同様に腫瘍群で CLtot が亢進することが分かった。腫瘍群において血漿中アルブミン濃度は低下していたが、AMK、TOB は VCM と同様血漿蛋白非結合型分率 (fp) が高いため、その影響により CLtot が増加したとするのは困難であり、腎臓の固有クリアランス (CLr,int) の上昇が示唆された。次に、骨肉腫腫瘍移植ラットを用いて、VCM の体内動態に及ぼす影響を、コントロール群と腫瘍群で比較した。その結果、CLtot の亢進は、腫瘍群での CLtot はさらに CLr の亢進が寄与していることが明らかとなった。さらに、コントロール群と腫瘍群で GFR には有意差は SC 群では VCM CL の亢進はみられなかったが、IM 群では VCM CL が 1.8 倍に亢進した。SC 群と IM 群で CLtot の差が生じた原因として筋肉内は腫瘍付近に血管が豊富であり、類骨形成に

も好条件の場合であるとの報告があり、これらの違い、ないしはサイトカイン等の放出の差が生じていたかもしれない。骨肉腫移植ラットを用いた AMK、TOB の単回静注実験より、VCM と同様に腫瘍群で CLtot が亢進することが分かった。腫瘍群において血漿中アルブミン濃度は低下していたが、AMK、TOB は VCM と同様血漿蛋白非結合型分率 (fp) が高いため、その影響により CLtot が増加したとするのは困難であり、腎臓の固有クリアランス (CLr,int) の上昇が示唆された。次に、骨肉腫腫瘍移植ラットを用いて、VCM の体内動態に及ぼす影響を、コントロール群と腫瘍群で比較した。その結果、CLtot の亢進は、腫瘍群での CLtot はさらに CLr の亢進が寄与していることが明らかとなった。さらに、コントロール群と腫瘍群で GFR には有意差はみられなかった。また、腫瘍群で血漿中アルブミン濃度の有意な低下が見られた。しかし、fp には有意差は見られず、VCM の腎臓内蓄積量においても有意差は見られなかった。したがって、腎血流量の増加や fp の変動により系球体ろ過速度が増加し、CL が亢進したということは考えにくい。併用薬を用いての実験では、有機アニオントランスポーターの基質となるプロベネシド併用時、有機カチオントランスポーターの基質となる cimetidine,

quinidine 併用時に VCM の CLr の有意な低下がみられた。このことより、本機構には有機アニオントランスポーター及び有機カチオントランスポーターの発現の変動が関与していることが示唆された。また、CLtot-fpGFR では、非併用時での腫瘍群ではコントロール群に比べ有意に亢進しており、この結果からも腫瘍群での CLr 亢進の要因として、VCM の排泄過程における尿細管分泌、及び尿細管再吸収の寄与がある事が示唆された。また、腫瘍群では probenecid, cimetidine, quinidine 併用すべてにおいて非併用時と比べて有意な低下がみられ、この結果からも VCM の腎排泄の機構として有機アニオントランスポーター及び有機カチオントランスポーターの関与が示唆された。更に腫瘍群で変動する腎の薬物トランスポーターを探索したところ、OCT1、OAT3 の mRNA 発現量が有意に低下した。ラットの腎臓において、OAT3 は基底膜側に存在しており、細胞内外両方向への輸送を担っている。一方、OCT1 は基底膜側に発現しており、腎上皮細胞内から血管側への輸送を担っており、今回ラット腫瘍群がコントロール群に比べてこれらのトランスポーターの mRNA レベルの減少が、そのまま VCM 輸送機能的な変動の差に比例するならば、VCM の排泄を抑制させる方向に働くと考えられ、in vivo でみられた VCM の CLr 上昇と今回は mRNA の変動は一致しない。しかしながら、mRNA レベルと輸送能、蛋白レベルは必ずしも一致しない例も報告されている。VCM の腎排泄機構は温度依存的であり、a-to-b 方向の透過の方が b-to-a 方向の透過

よりも速く、VCM の腎排泄は近位尿細管において分泌、再吸収の関与が示唆された。また、阻害剤を用いた検討では、両方向ともに温度依存的なことから何らかのエネルギーを使った輸送系が関わっていることが示唆されたが、ATP 枯渇剤であるアジ化ナトリウム併用時に透過係数の変化がみられず、ATP 非依存性の輸送であると考えられた。方向別にみると、b-to-a 方向では TEA により VCM の透過が低下していることにより有機カチオントランスポーターの関与が示唆された。a-to-b での既知のトランスポーター阻害剤の影響はみられなかった。従って、何らかの温度依存性のトランスポーター、特に b-to-a 側に働く TEA で阻害されるトランスポーターによって、一部は VCM が輸送される可能性が示唆された。

また、in vivo におけるラット骨肉腫腫瘍モデルでの VCM の CLr 亢進機構の観点からすると、in vivo では OCT1 と OAT3 の mRNA 量の有意な低下と MRP 群の減少傾向を認めている。in vitro の結果と一致するものではなかった。しかし、骨肉腫ラットの腎臓における輸送活性を測定するためには腎初代培養細胞の利用が考えられるが、コンタミネーション等の問題で実現に至っていない。一方で、尿細管刷子縁膜側での VCM を排出するためトランスポーターの特定には至っていない。こちら側での TEA で阻害されるトランスポーターの関与は否定できない。最近、ヒトおよびラット等で MATE1、MATE2-K というトランスポーターが同定されているのでこれらの変動が関与しているかもしれないが、今後の検討が期待される。輸送の寄与としては a-to-b 側の方が大きいとこちらの寄与が大きいかもしれない。いずれにしても、今回 VCM の輸送には未知なものも含めて OTC1 等の有機カチオントランスポーターの関与が新たに示唆された。OTC1 の mRNA レベルの結果等からは、それらが、がん病態時で増加しているとは考えにくいことが示唆された。血漿中では、サイトカインの上昇も認められていることから、サイトカインが関与して VCM の CLr の亢進が起きているのではないかと考えた。そこで、各種サイトカインを RPTEC に曝露した。そして、24 時間刺激の OCT2 の mRNA レベルに低下が見られた。また in vivo で変動があった OAT3 は、RPTEC を用いた細胞系では検出できず、変動が検討できなかった。この原因として RPTEC には OAT3 の発現は少ないことも考えられる。今回問題としているがんの病態は慢性炎症の病態に類似していると考えられ 24 時間サイトカイン曝露を中心に考えると、In vivo における OCT1 mRNA レベルの低下は、in vitro においては上昇した。また、in vivo における OCT2 の変動は見られなかったが、サイトカイン曝露によって in vitro においては低下した。ラットにおいては不明であるが、ヒトにおいては有機カチオントランスポーター群の中では、OCT1 より OCT2 が

100 倍以上多く発現していると言われている。従って、ヒトの細胞を用いて、in vitro で IL-1 、 IL-6 の添加により OCT2 の発現が減少したことは、in vivo における OCT2 等の発現に IL-1 または IL-6 が関与していることを示唆している。しかしながら、骨肉腫腫瘍移植ラットやがん患者における VCM の CLr の上昇と基底膜側に存在する OCT1、OCT2 の減少は方向性が逆であり、本メカニズムには少なくとも基底膜側の OCT1、OCT2 が関与しているとは考えにくいと思われる。一方で、RPTEC を用いた in vitro 輸送の検討結果により、VCM には何らかの能動輸送メカニズムが関与している事が示唆された。そして、IL-1 、 IL-6、TNF- の添加により、RPTEC における分泌方向の輸送の亢進が確認された。したがって、現在のところ VCM のがん病態下での輸送については、OTC1、OTC2、OAT3 等の尿細管基底膜側のトランスポーターの変動が関与する可能性は少なく、むしろ刷子縁膜側の TEA で阻害されるトランスポーター等が関与している可能性が示唆された。また作用させたサイトカイン量が in vitro では in vivo の 1000 倍と 25 ng/mL であることから in vivo の現象を in vitro で十分には説明することは難しかったが、in vivo でのトランスポーターの減少にサイトカインが関与していることが示唆された。サイトカインのトランスポーター調節機序は報告されておらず、サイトカインの他にもがん病態時においてトランスポーターの発現を調節する因子が存在し、その因子とサイトカイン が作用し、腎臓の薬物排泄トランスポーターを減少させている可能性が考えられる。

以上より結論として、

臨床例において、腎機能正常患者で VCM の癌患者での腎クリアランスの亢進が母集団解析においても確認された。

今回作製した筋肉に移植したラット骨肉腫モデルにおいて、臨床で起こった VCM クリアランスの亢進が再現することを見いだした。

骨肉腫腫瘍ラットにおける CL 亢進機構には VCM の尿細管分泌及び再吸収が関与している事を示した。

RPTEC を用いた in vitro 実験系により、VCM の尿細管における輸送機構には TEA により阻害される能動輸送の関与が示唆された。

ラット骨肉腫腫瘍モデルにおいて、IL-1 、 IL-6 の血漿中の上昇がみられたため、RPTEC 細胞に IL-1 、 IL-6、TNF- を曝露したところ、分泌比が亢進した。

従って、がん患者における VCM クリアランスの亢進のメカニズムとしては、尿細管分泌及び再吸収過程における能動輸送が関与し、その条件をして IL-1 、 IL-6 などのサイトカインが一部関与する可能性が示唆された。

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1件) Shimada I, Iwata C, Taga S, Teramachi H, Nomura M, Miyamoto K, Tsuciya H, Wada T, Kimura K, Matsushita R. Enhanced renal clearance of vancomycin in rats with carcinogen-induced osteosarcoma. Anticancer Res. 2012 ;32(3):823-9.(査読有り)

〔学会発表〕(計0件)

〔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〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

松下 良 (MATSUSHITA, Ryo)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：20293368

2)研究分担者

宮本謙一 (MIYAMOTO, Ken-ichi)

金沢大学・附属病院・教授

研究者番号：30100514

和田隆志 (WADA, Takashi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40334784

寺町ひとみ (TERAMACHI, Hitomi)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20405129