

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 28 日現在

機関番号：82601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659078

研究課題名(和文) 逆方向多層的オミックス解析による手足症候群の発症機序の解明と予測系の構築

研究課題名(英文) Reverse omics analysis for mechanisms on hand-foot syndrome and predictive system construction.

研究代表者

齋藤 嘉朗 (Saito, Yoshiro)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・部長

研究者番号：50215571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：最も表現系に近く強い相関が期待される生体内低分子代謝物(メタボローム)情報を主とし、上流に遡る逆方向の多層的オミックス解析を、手足症候群を対象に行った。培養細胞を用いたメタボローム解析で、陰性対照に比して、手足症候群を起こしやすいソラフェニブ、スニチニブで同方向に有意にレベルが変化し、起こしにくいイマチニブ、ゲフィチニブで変化が見られない脂質として、ジアシルグリセロールが認められた。従って、発症へのPKCの関与が示唆された。またヒト試料を用いた遺伝子多型解析は、対象とする8遺伝子11多型に関し、36症例の解析が終了した。ヒト試料の解析については、継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：Metabolome, vast majority of endobiotic metabolites, is the most down-stream of omics layers and close to phenotype including drug adverse reactions. Purpose of this study is to reveal onset mechanisms of molecularly-targeted drug-related hand-foot syndrome, using mainly metabolomic analysis and upstream genomics. First, metabolomic analysis was performed with extracts from human A431 cell line treated with sorafenib and sunitinib (likely to cause the syndrome) as well as imatinib and gefitinib (unlikely to cause the syndrome). Among the measured lipids, a diacylglycerol was significantly changed by sorafenib and sunitinib, but not by imatinib and gefitinib. Based on this result, protein kinase C was suggested to be involved in the onset of hand-foot syndrome. Since recruiting sorafenib-administered patients have been continuing, genomic and metabolomic analyses of patient samples have not been obtained the final results and would be publicized it near future.

研究分野：医薬品安全性学

キーワード：副作用 抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤に特徴的な副作用として、「手足症候群」が挙げられる。これは手足の平の部分の感覚異常、発赤等を初期症状とし、進行すると疼痛を伴う浮腫や過角化による皮膚の肥厚、水疱、亀裂、潰瘍などが出現し歩行困難となる他、休薬による治療中断を余儀なくされる。特に疼痛は、「熱傷のような痛み」と表現され、日常生活に重大な支障を来す重篤副作用である。カペシタピンおよびドキシルピシン等の細胞障害性抗がん剤の他、近年、ソラフェニブ・スニチニブ等のマルチキナーゼ阻害作用を有する抗がん剤でも好発することが知られている。これらの医薬品では、投薬患者の約半数が発症し、重篤とされるグレード3以上も1-2割で発症する。一旦、グレード3以上が出現すると、2ヶ月ほどの休薬が必要となり、治療計画に重大な支障を来す。保湿剤によるハンドケアなどのごく簡単な対処療法は行われているものの、根本的な治療方法はなく、休薬による回復を待つのが有効な唯一の方法である。

手足症候群の発生に関しては多くの報告がある。特徴としては、a) 投薬初期から発症すること、b) 発症に用量依存性や血中濃度依存性があること(血中濃度-時間曲線下面積値や最高血中濃度と相関)、c) 細胞障害型抗がん剤とマルチキナーゼ阻害剤で、病理学的な特徴は共通する点が多いこと、が挙げられる。発症機序に関しては、1) 細胞障害作用による膜蛋白質発現変化による移植拒絶様反応、2) 血管新生阻害、3) 抗がん剤が手足部分に高濃度に集積し皮膚毒性を示すため、等の諸説が提唱され、さらに何らかの炎症反応の関与はその症状から示唆されているものの、上記の特徴すら十分説明できていない。また、その発症予測は全く不可能である。

オミックス解析は、従来、最も上流であるゲノムまたは変動が大きいトランスクリプトーム(mRNA)研究が主流であったが、近年ではより表現形質に近いメタボローム(生体内代謝物)やプロテオーム(タンパク質)解析も、その測定系の発展により可能となってきた。我々は脂質に関し、リン脂質、トリグリセリド、コレステロールエステル、酸化脂肪酸等を測定しうるLC-MS/MS系を構築した。一方で表現形質と相関するバイオマーカー探索に関しては、いまだ候補遺伝子の多型解析が盛んに行われているが、その表現形質の発現機序が未知の場合、相関を認める多型を見出すことは難しい。網羅的遺伝子多型解析では、予見無く解析できるものの、偶然に相関が認められる多型が非常に多く認められ、別患者群を用いた検証が必須であり、検証の結果、相関する多型が全く残らないこともあり、時間と研究費が多く浪費されている。

2. 研究の目的

最も表現系に近く強い相関が期待される

生体内低分子代謝物(メタボローム)情報を主とし、上流に遡る逆方向の多層的オミックス解析を、手足症候群を対象に行う。具体的には、ヒト培養細胞を用いた発症機序の解明と、その発症機序に基づく発症個人差の機序の検討、およびそのヒト試料での検証を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

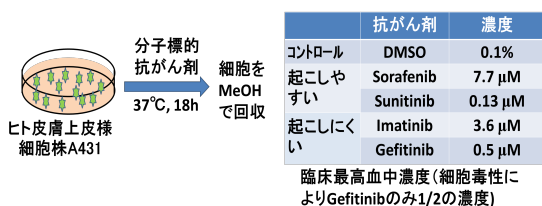
1) 手足症候群を起こしやすい医薬品の調査
平成20年4月~平成25年12月までに医薬品医療機器総合機構に報告された手足症候群の数を、公開されている「医薬品副作用データベース」を用いて集計した。

2) ヒト培養細胞を用いた発症機序の解明

2-1) 分子標的薬による処理(図1)

細胞としては、ヒト上皮様細胞癌由来細胞株 A431 を用いた。本細胞株を解凍後、DMEM+10% FCS+ペニシリン/ストレプトマイシンにて、37℃で5% CO₂存在下、培養した。

対象とする医薬品は、上記の調査結果、および分子標的薬に絞るという基準にもとづき、手足症候群を起こしやすいソラフェニブ、スニチニブと、起こしにくいイマチニブ、ゲフィチニブとした。添加濃度は、各医薬品が臨床使用される際の最高血中濃度とし、添付文書により調査を行った。即ち、7.7 μM ソラフェニブ、0.13 μM スニチニブ、3.6 μM イマチニブ、0.5 μM ゲフィチニブとした。なお、ゲフィチニブの最高血中濃度は1 μMであるが、細胞毒性が認められたため、1/2濃度で処理を行った。細胞が80% confluentの状態、DMSOに溶解した各医薬品またはDMSOを1/1000量添加し、18時間培養した。生理食塩水で2回洗浄後、メタノールを加え細胞を溶解して回収した。回収後は、-90℃にて



保存した。

図1 分子標的薬による A431 細胞処理

2-2) 脂質抽出とメタボローム測定(図2)

脂質の抽出は Bligh & Dyer 法にて行った。即ち、10⁷個の細胞にジルコニアビーズを加え、遠心を3サイクル行って破碎した。これにクロロホルムおよびリン酸バッファーを加え攪拌後、さらに同溶液を加えて攪拌し、遠心して有機層画分及び親水層画分を分取した。

グリセロリン脂質・スフィンゴ脂質・中性脂質等の脂溶性の高い代謝物を含む有機層(下層)は、超高性能液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析計(UPLC-TOFMS、超高性能液体クロマトグラフは Waters 社 ACQUITY

UPLC、飛行時間型質量分析計は Waters 社 LCT Premier XE) を用いて、脂質代謝物を網羅的に相対定量した。

酸化脂肪酸を含む親水層(上層)は、さらに Oasis HLB Vac RC cartridge (Waters 社) を用いて固相抽出を行い、ギ酸メチル画分を分取し、サンプルとした。超高速液体クロマトグラフ-三連四重極リニアイオントラップ型質量分析計(UPLC-MS/MS、高速液体クロマトグラフは Waters 社 ACQUITY UPLC、三連四重極リニアイオントラップ型質量分析計は AB SCIEX 社 QTRAP5500)を用いたネガティブイオンモードでの多重反応モニタリング法にて測定した。

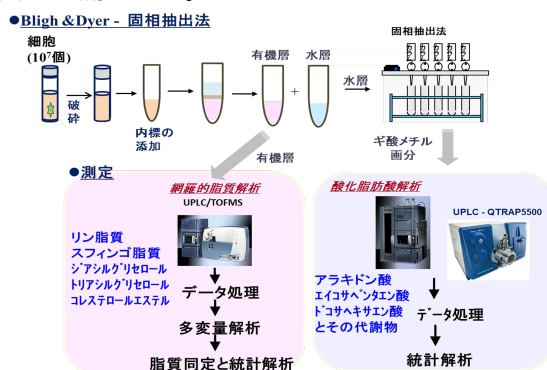


図2 脂質抽出とメタボローム測定の方法

2-3) データ解析

UPLC-TOFMS により得られたデータは、2DICAL (三井情報株式会社) を用いてピークを抽出し、UPLC-TOFMS の保持時間、精密質量及びマススペクトルのデータに基づき、代謝物の同定を行った。相対定量には、内部標準物質 (IS) により補正を行った各ピークの height 値を用い、One-way ANOVA および Dunnet 解析を行い、 $p < 0.05$ を有意な差と判定した。

UPLC-MS/MS により得られたデータは、MultiQuant ソフトウェア (AB SCIEX 社) を用いて検出された代謝物ピークの面積値を求めた後、IS により抽出操作の補正を行い、補正後のピークにつき、UPLC-TOFMS により得られたデータと同様に One-way ANOVA および Dunnet 解析を行い、 $p < 0.05$ を有意な差と判定した。

3) 患者ゲノム DNA・血漿および臨床情報の収集

国立がん研究センターにて、臨床的に進行肝細胞がんと診断され、全身化学療法であるソラフェニブの投与が予定された患者のうち、本人から本研究への参加について文書で同意が得られた患者を対象とした。上腕部より末梢血をソラフェニブ投与前1回、治療開始後最大4回採取した。投与前採血の一部から、ゲノム DNA を抽出した。またメタボローム測定用に血漿を分離した。個人情報管理者により連結可能匿名化された後、国立衛研に提供され、ゲノムおよびメタボローム解析に

供した。また患者背景、併用薬、臨床検査値、手足症候群の診断等、臨床情報を収集した。

4) 遺伝子多型解析

候補遺伝子として、ソラフェニブの代謝に関わるシトクロム P450 酵素 *CYP3A4* (rs12721627) と *CYP3A5* (rs776746)、韓国人で grade 2 以上の手足症候群発現と関連の報告がある *UGT1A9* (rs7574296, rs58597806)、*TNF* (rs1800629)、*VEGFA* (rs2010963, rs3025000)、同じく腫瘍増悪との関連の報告がある *HIF1A* (rs2301113) 並びに胆汁うっ滞との関連報告がある *ABCB11* (rs2287622)、標的の一つとされる *FLT4/VEGFR3* (rs307821, rs307826) の 8 遺伝子 11 多型を選定した。多型解析は TaqMan 法にて行った。

4. 研究成果

1) 手足症候群を起こしやすい医薬品の調査

薬機法(旧薬事法)に基づく重篤副作用報告は、因果関係が検証されていない、重複報告の可能性があり、投与数が不明なため頻度を算出することはできない等の欠点を有するが、大まかな傾向を把握することに役立つ。平成 20 年からの約 5 年半の手足症候群の総報告件数及び年平均報告数を下記に示す。

表 1 手足症候群の総報告数と年平均報告数 (平成 20 年 4 月 ~ 平成 25 年 12 月)

| 被曝薬 | 投与経路 | 総報告数 | 年平均報告数 |
|-----------------------------|------|------|--------|
| レゴラフェニブ水和物 | 内服薬 | 99 | 99.0 |
| ソラフェニブシル酸塩 | 内服薬 | 301 | 50.2 |
| カベシタピン | 内服薬 | 222 | 37.0 |
| ラパチニブシル酸塩水和物 | 内服薬 | 149 | 29.8 |
| ドキシビルジン塩酸塩 | 注射薬 | 106 | 17.7 |
| スニチニブシル酸塩 | 内服薬 | 49 | 8.2 |
| バソピニブ塩酸塩 | 内服薬 | 5 | 2.5 |
| ドセタキセル水和物 | 注射薬 | 14 | 2.3 |
| エペロリムス | 内服薬 | 9 | 2.3 |
| アキシチニブ | 内服薬 | 4 | 2.0 |
| ベバ(シズマブ(遺伝子組換え)) | 注射薬 | 11 | 1.8 |
| テガフルール・ギムラシル・オテラシルカリウム配合剤 | 内服薬 | 7 | 1.2 |
| テガフルール・ウラシル | 内服薬 | 5 | 0.8 |
| トラスツマブ(遺伝子組換え) | 注射薬 | 5 | 0.8 |
| メトトレキサート | 注射薬 | 4 | 0.7 |
| イマチニブシル酸塩 | 内服薬 | 3 | 0.5 |
| シズマブ | 注射薬 | 3 | 0.5 |
| ソレドロン酸水和物 | 注射薬 | 3 | 0.5 |
| バケリタキセル | 注射薬 | 3 | 0.5 |
| テラプレビル | 内服薬 | 1 | 0.3 |
| シタラピン | 注射薬 | 2 | 0.3 |
| デュクステリド | 内服薬 | 1 | 0.2 |
| イリリテカン塩酸塩水和物 | 注射薬 | 1 | 0.2 |
| インターフェロン アルファ-2b(遺伝子組換え) | 注射薬 | 1 | 0.2 |
| オキサリプラチン | 注射薬 | 1 | 0.2 |
| セツキシマブ(遺伝子組換え) | 注射薬 | 1 | 0.2 |
| テモゾロミド | 内服薬 | 1 | 0.2 |
| フルオロウラシル | 注射薬 | 1 | 0.2 |
| ベグイインターフェロン アルファ-2b(遺伝子組換え) | 注射薬 | 1 | 0.2 |

年平均報告数 5 以上の分子標的薬は、レゴラフェニブ (99)、ソラフェニブ (50.2)、ラパチニブ (29.8)、スニチニブ (8.2) であるが、試薬の入手可能性の点から、ソラフェニブ、スニチニブを対象とした。また発生数が少ない分子標的薬として、イマチニブ (0.5)、ゲフィチニブ (0) とした。当初、ボルテゾミブ (0) も対象としたが、毒性が強く最高血中濃度 (500 μM) の 1/10 濃度しか用いることができなかったため、除外した。

2) ヒト培養細胞を用いた発症機序の解明

対照である DMSO に比して、手足症候群を起こしやすい分子標的薬（ソラフェニブ、スニチニブ）で同様に変化し、起こしにくい分子標的薬（イマチニブ、ゲフィチニブ）で変化しない脂質代謝物を探索した。その結果、一般脂質では 2 種で有意な変化が認められた（図 3）。このうち、同定が可能であった 1 種はジアシルグリセロール（DG, 33:1）であった。

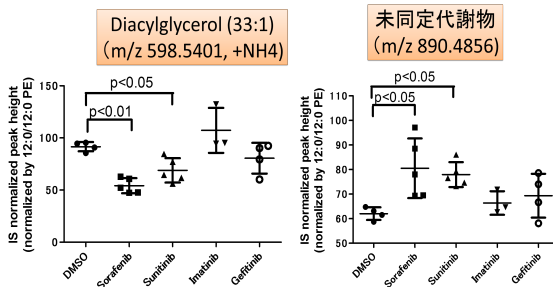


図 3 ソラフェニブとスニチニブのみで有意差が認められた脂質分子種

また統計学的に有意ではないものの、他のジアシルグリセロール分子種でも同様の傾向が認められた（図 4）。ソラフェニブで最も変化が認められており、DG32:2 では有意差が見られている。

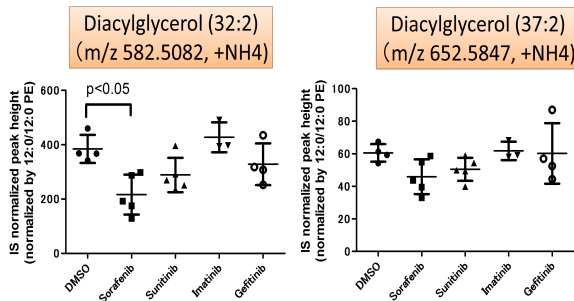


図 4 他のジアシルグリセロール分子種の変化

なお、酸化脂肪酸代謝物で同様の傾向が見られる分子種は検出されなかった。以上の結果から、手足症候群発症に関連する可能性のある脂質分子種が探索されたが、当該分子種はジアシルグリセロールであったことから、Protein kinase C (PKC) の関与が示唆された。PKC は皮膚角化細胞の分化に関与することが報告されており、ソラフェニブとスニチニブによるその活性低下が、手足症候群の発現に関与している可能性が考えられた。従って、ジアシルグリセロールレベルの制御に関する代謝酵素の活性の個人差が、手足症候群発症の個人差に関連する可能性が考えられた。

3) 遺伝子多型解析

ヒト試料を用いた遺伝子多型解析は、国立がん研究センターから国立衛研に提供され

た 36 症例に関し、8 遺伝子 11 多型の解析が終了した。ヒト試料の解析については、これまでの収集試料数が 42 症例と予定より遅延しているため、今後も継続する予定であり、まだ関連解析を行うことができないが、頻度結果を下記の表 2 に示す。

表 2 遺伝子多型解析結果

| 遺伝子名 | 1 LTAL/TB.TNF | | 2 VEGFA | | | 3 HIF1A | | 4 FLT4 | | |
|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------|-----------|--------|-----------|--|
| rs番号 | rs1800629 | rs2010963 | rs3025000 | rs2301113 | rs307821 | rs307826 | | | | |
| 日本人の頻度 (NCBIより) | G 0.977 A 0.023 | G 0.617 C 0.383 | C 0.628 T 0.372 | A 0.523 C 0.477 | 不明 | T 1.00 C 0.00 | | | | |
| Sorafenib 36例体の頻度 | G 1.00 A 0.00 | G 0.54 C 0.46 | C 0.54 T 0.46 | A 0.56 C 0.44 | T 1.00 C 0.00 | T 1.00 C 0.00 | | | | |
| 遺伝子名 | 7 UGT1A9 | | 8 UGT1A9 | | 9 CYP3A4 | | 10 CYP3A5 | | 11 ABCB11 | |
| rs番号 | rs7574296 | rs58597806 | rs12721627 | rs776746 | rs2287622 | | | | | |
| A | 0.727 | G 0.990 | G 0.986 | C 0.733 | G 0.788 | | | | | |
| G | 0.273 | A 0.010 | C 0.014 | T 0.267 | A 0.212 | | | | | |
| A | 0.63 | G 0.97 | G 0.97 | C 0.71 | G 0.76 | | | | | |
| G | 0.38 | A 0.00 | C 0.00 | T 0.29 | A 0.24 | | | | | |

試料収集が終了次第、関連解析を行う予定である。また患者血漿を用いたメタボローム解析も同様である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Azuma Y, Hata K, Sai K, Udagawa R, Hirakawa A, Tohkin M, Ryushima Y, Makino Y, Yokote N, Morikawa N, Fujiwara Y, Saito Y, Yamamoto H.: Significant association between hand-foot syndrome and efficacy of capecitabine in patients with metastatic breast cancer. *Biol Pharm Bull.* 2012; 35(5): 717-24.
Ishikawa M, Tajima Y, Murayama M, Senoo Y, Maekawa K, Saito Y.: Plasma and serum from nonfasting men and women differ in their lipidomic profiles. *Biol Pharm Bull.* 2013; 36(4): 682-5.

Saito Y, Sai K, Kaniwa N, Tajima Y, Ishikawa M, Nishimaki-Mogami T, Maekawa K.: Biomarker exploration and its clinical use. *Yakugaku Zasshi.* 2013; 133(12): 1373-9.

Saito Y, Kodama S, Sugiyama E, Nakamura R.: Predictive genomic markers for severe adverse drug reactions. *Yakugaku Zasshi.* 2015; 135(4): 589-95

〔学会発表〕(計 7 件)

齋藤嘉朗, 鹿庭なほ子, 杉山永見子, 黒瀬光一, 前川京子: 日本人を対象とした副作用に関するゲノム・メタボローム解析. 第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012.7, 仙台)

齋藤嘉朗, 佐井君江, 鹿庭なほ子, 田島陽子, 石川将己, 最上(西巻)知子, 前川京子: バイオマーカー探索研究とその臨床応用に向けての課題. 日本薬学会第 133 年会 (2013.3 横浜)

斎藤嘉朗, 鹿庭なほ子, 佐井君江, 花谷忠昭, 中村亮介, 前川京子: ゲノミクスおよびメタボロミクス解析によるバイオマーカー探索. 第 16 回日本医薬品情報学会総会・学術大会 (2013.8. 名古屋)

斎藤嘉朗, 頭金正博, 中村亮介, 関根章博, 鹿庭なほ子: 重篤副作用における GWAS 解析. 日本人類遺伝学会第 58 回大会 (2013.11. 仙台)

斎藤嘉朗, 児玉進, 杉山永見子, 中村亮介: 重篤副作用に関する予測ゲノムマーカー. 日本薬学会大 134 年会 (2014.3. 熊本)

斎藤嘉朗, 齊藤公亮, 児玉進, 熊谷雄治, 前川京子: ヒト試料を用いたバイオマーカー開発のためのレギュラトリーサイエンス. 第 35 回日本臨床薬理学会学術総会 (2014.12. 松山)

斎藤嘉朗, 松澤由美子, 嶽本和久, 石川将己, 齊藤公亮, 細井寛子, 近藤俊輔, 上野秀樹, 奥坂拓志, 前川京子: リピドミクス解析による手足症候群関連代謝物候補の *in vitro* 探索. 日本薬学会第 135 年会 (2015.3. 神戸)

〔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

<http://www.nihs.go.jp/mss/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斎藤 嘉朗 (SAITO YOSHIRO)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・部長

研究者番号: 50215571

(2) 研究分担者

前川 京子 (MAEKAWA KEIKO)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・室長

研究者番号: 70270626

近藤 俊輔 (KONDO SHUNSUKE)

国立がん研究センター中央病院・肝胆膵内科・医員

研究者番号: 90546201