

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460203

研究課題名(和文)造血幹細胞移植時の抗がん薬併用療法における薬物投与順序の最適化

研究課題名(英文) Optimization of drug administration order in anti-cancer drug combination therapy in hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者

菅原 満 (SUGAWARA, Mitsuru)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60332467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：殺白血病細胞効果へのエトポシドとシクロホスファミドの曝露順序の影響を検討した。白血病由来K-562細胞に対し、低濃度4-HPC(シクロホスファミドの活性化体) エトポシドの順に曝露した場合には、エトポシドを単独曝露した場合に比較してその効果が有意に増大した。この原因として、先に4-HPCに曝露すると細胞周期依存的でS期に作用するエトポシドの殺細胞効果が増強することが明らかとなった。さらに、この作用は薬剤耐性の要因とされる排出トランスポーターであるP糖蛋白質(P-gp)を発現している細胞においても同様に認められた。これらの結果より、投与順序や方法による最適化が可能であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)： We demonstrated schedule-dependent cytotoxicity of VP-16 and 4-HPC (preactivated form of cyclophosphamide) in K-562 cells. When K-562 cells were pretreated with low concentrations of 4-HPC, cells subsequently exposed to VP-16 showed reduced viability. In contrast, there was no change in the viability of K-562 cells pretreated with low concentrations of VP-16, followed by exposure to 4-HPC. It was shown that 4-HPC caused cell cycle arrest at S phase. It was suggested that since VP-16 have cell cycle specificity for cell killing from early-S to mid-S phase, the effect of VP-16 was increased by pretreatment with 4-HPC. We also demonstrated schedule-dependent cytotoxicity of VP-16 and 4-HPC in P-gp-overexpressed K-562/P-gp cells. Cytotoxicity of VP-16 was enhanced in K-562/P-gp cells that were pretreated with a non-cytotoxic concentration of 4-HPC compared to that of cells not treated with 4-HPC. The findings may lead to improvements in clinical combination chemotherapy.

研究分野：薬物動態学

キーワード：エトポシド 細胞周期 白血病 造血幹細胞移植

1. 研究開始当初の背景

急性白血病の地固め療法として、しばしば造血幹細胞移植が行われる。従来、抗がん剤であるシクロホスファミド投与と全身放射線照射の併用による前処置が用いられてきたが、再発率が高く、3年生存率は40-50%と十分な成績が得られなかった。そこで、薬物治療効果をさらに高めるために、エトポシド (VP-16) を追加するレジメンが考案された。しかし、当初海外で用いられたエトポシドの投与量 (60 mg/kg) では、再発率は減少したものの肝性静脈閉鎖症や血栓性微小血管障害などの副作用発生率が増大した。一方、重松らは、エトポシドの投与量を半分の30 mg/kgとすることで再発率の減少が認められたのに対して副作用の増大は認められず、また、3年生存率が89%に増大するなど、良好な治療成績が得られたことを報告した (Shigematsu A. et al., *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 14:568-575)。薬物の曝露濃度や細胞内薬物濃度あるいは曝露時間は、効果発現に影響するが、薬物濃度や曝露時間と殺細胞作用との関係は明らかではない。また、抗がん剤の使用順序はしばしばその治療効果の良し悪しに影響するが、本レジメンにおける薬物曝露順序と殺細胞作用との関係も明らかではない。したがって、現在使用されている投与量や投与順序が最適か否かはさらに詳細に検討すべきであると考えた。

白血病細胞はP-糖タンパク質を発現しており、エトポシドを含む種々の抗がん剤を細胞外に排出することにより薬剤耐性を示す可能性がある。Kourtiらは、急性リンパ性白血病患者の白血病芽細胞におけるP-糖タンパク質発現量は患者間で差があり、高発現群の患者では低発現群に比べてP-糖タンパク質の基質となるアンスラサイクリン系およびビンクリスチンなどを用いた治療の効果が低いことを報告している (Kourti M. et al., *International Journal of Hematology*, 86:166-173 (2007))。また、P-糖タンパク質発現量は、急性骨髄性白血病においても薬物治療の予後に影響する因子であることが報告されている (Benderra Z. et al., *Clinical Cancer Research*, 10:7896-7902 (2004))。したがって、本レジメンにおいてもP-糖タンパク質の発現が治療効果や予後に大きく影響するものと考えられるが、治療効果に及ぼすP-糖タンパク質発現の影響は不明であった。

さらに、本治療法における重篤な副作用である血管障害の原因の一つと考えられる「血管内皮細胞に与える障害の程度」にこれら薬物の濃度や曝露順序が与える影響に関してはほとんど検討されていなかった。

2. 研究の目的

白血病の地固め療法である造血幹細胞移植時の抗がん薬による前処置で使用される抗がん薬併用療法の治療成績向上を目指して、エトポシド/シクロホスファミド併用療法をモ

デルに以下の検討を行った。

(1) シクロホスファミドとエトポシドの投与順序が殺細胞効果に及ぼす影響を白血病由来細胞を用いて検証し、エビデンスに基づく投与方法確立の一助とする。

(2) 両薬物併用時の殺細胞効果に及ぼす薬物トランスポーターの影響を明らかにする。

(3) 本レジメンによる重篤な副作用である血管障害の原因の一つと考えられる「血管内皮細胞に与える障害の程度」に、これら薬物の曝露順序が与える影響を明らかにし、安全性を支持するエビデンスを得る。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養法

K-562およびK-562/P-gp細胞は非働化したFBSを10%、ペニシリンを100 IU、ストレプトマイシンを100 µg/mL含むRPMI-1640を培養液とした。細胞はCO₂インキュベーターを用いて37°C-5% CO₂-95% air条件下で培養し、播種後3-5日目に継代した。HUVEC細胞は培養液としてEBM-2 Bullet Kit (LONZA CC-3162)を用い、CO₂インキュベーター(37°C, 5%CO₂)で培養した。培養液の交換を1-2日おきに行い、播種4-5日後に継代した。

(2) 細胞生存率の測定

WST-8 assay法を用いた。細胞懸濁液(2.0 × 10⁴ cells/well)を、96 well 平底マイクロプレートに50 µL/wellずつ播種した。培養液48 µLをwellに添加した後、終濃度に合わせて調製した薬液を2 µL/wellずつ添加した。一定時間後、Cell counting Kit-8 (WST-8) 溶液を10 µL添加し、3時間発色させた。反応後、マイクロプレートリーダーにて450 nmにおける吸光度を測定し、生成したWST-8 formazanを定量した。細胞生存率は薬物未処理群(control)の吸光度に対する薬物処理群の吸光度の比(% of control)で示した。

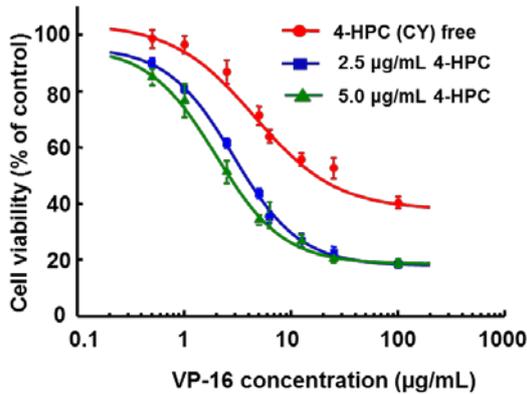
(3) 細胞周期解析

細胞を1 × 10⁶ cells/mLに調製し24 well プレートに980 µLずつ加えた。薬物処理群に終濃度に合わせて調製した薬液を20 µL、コントロール群に培養液を20 µL加え24時間CO₂インキュベーターで培養した。回収した細胞懸濁液を1,000 × g, 3分間, 4°Cで遠心分離して上清を除去した後、氷冷したPBS (EDTA-free)で1回洗浄し、再び遠心分離して上清を除去した。氷冷したPBS (EDTA-free) 100 µLに懸濁した後、氷冷したEtOHを900 µL添加してよく攪拌し、-20°Cで保存した。保存していたサンプルを1,200 × g, 3分間, 4°Cで遠心分離して上清を除去した後、氷冷したPBS (EDTA-free)で1回洗浄し、再び遠心分離して上清を除去した。染色用バッファーを1サンプルあたり300 µL添加して37°Cで20分間反応させた。反応後、目開き46 µmのメッシュを通してフローサイトメーターで細胞周期を解析した。

4. 研究成果

(1) エトポシドとシクロホスファミド投与順序が殺細胞効果に与える影響

ヒト慢性骨髄性白血病由来K562細胞を、エトポシドと4-HPC (シクロホスファミドの活性体) にその順序を変えて曝露したところ、4-HPC曝露を先に、その後にエトポシドを曝露した群で殺細胞効果が増強された (図1)。その逆の曝露順序では殺細胞効果に変化は認められなかった。



| | EC ₅₀ value VP-16 (µg/mL) |
|------------|---|
| 4-HPC free | 19.8 ± 8.34 |
| 2.5 µg/mL | 3.83 ± 0.54** |
| 5.0 µg/mL | 2.74 ± 0.41** |

** : p<0.01

図1 VP-16と4-HPCの曝露順序が殺細胞効果に与える影響 (4-HPC → VP-16)

K-562細胞に2.5, 5.0および0.1 µg/mLの4-HPCを事前に24時間曝露後、0.5-100 µg/mLのVP-16を24時間曝露した群と4-HPCを事前曝露していない群の生存曲線 (n=3, ±SD)

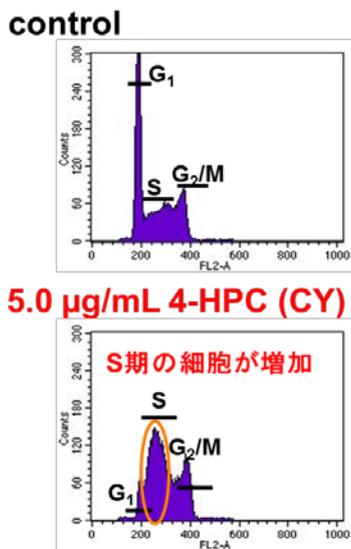


図2 4-HPC曝露後の細胞周期変化

K-562細胞を5.0 µg/mLの4-HPCで24時間曝露し、フローサイトメーターで細胞周期を解析した。

4-HPC曝露がエトポシドの殺細胞効果を増強する要因について検討した結果、4-HPCによる細胞周期の変動が影響していることが明らかとなった。すなわち、4-HPC曝露後の細胞周期を解析したところ、G1期の細胞が減少し、S期の細胞が増加した (図2)。一方、エトポシド曝露の場合にはそのような細胞周期の変動は認められなかった。

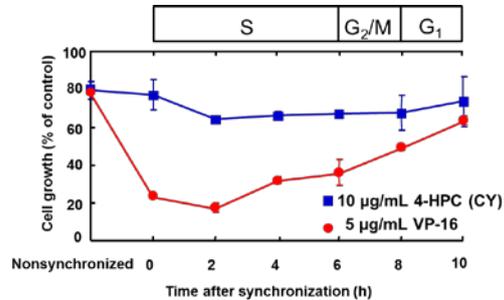
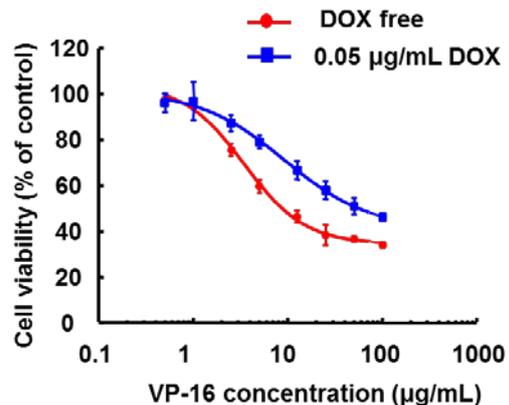


図3 各細胞周期におけるVP-16と4-HPCの殺細胞効果

細胞生存率はWST-8 assay法で評価した (n=3, ±SD)

両薬物の殺細胞効果と細胞周期の関係を検討したところ、エトポシドは細胞周期依存的な殺細胞効果を示し、その効果はS期に最も高く、G2/M期、G1期へとサイクルが進むにつれて減弱したが、4-HPCの殺細胞効果は細胞周期に依存しなかった (図3)。したがって、4-HPCによりS期の細胞の割合が増大し、それらがエトポシドに対する感受性が高いことから殺細胞効果が増強されたものと考えられた。



| | EC ₅₀ value VP-16 (µg/mL) |
|------------|---|
| DOX free | 8.97 ± 1.74 |
| 0.05 µg/mL | 58.1 ± 17.9** |

** : p<0.01

図4 DOXの事前曝露順序がVP-16の殺細胞効果に与える影響

0.05 µg/mLのDOXを24時間曝露後に0.5-100 µg/mLのVP-16を24時間曝露した群とDOXを事前曝露していない群の生存曲線 (n=3, ±SD)

同様な検討をエトポシドとドキソルビシン (DOX) の組み合わせで行なった。その結果、ドキソルビシンを先に、その後エトポシドに曝露すると、4-HPCの場合とは異なりエトポシドの殺細胞効果は減弱した (図4)。細胞周期の変化を解析したところ、ドキソルビシン曝露によりS期の細胞を減少しG2/M期の細胞を増加した。

(2) 薬物排出タンパク質であるP糖タンパク質 (P-gp) 発現が殺細胞効果に与える影響

P-gpを安定に発現する細胞において、VP-16の取り込み量の減少に伴いVP-16による殺細胞効果に対する感受性は低下したものの (図5)、P-gpを発現していない細胞と同様に4-HPC前処理はVP-16の殺細胞効果を増強させることが明らかとなった。

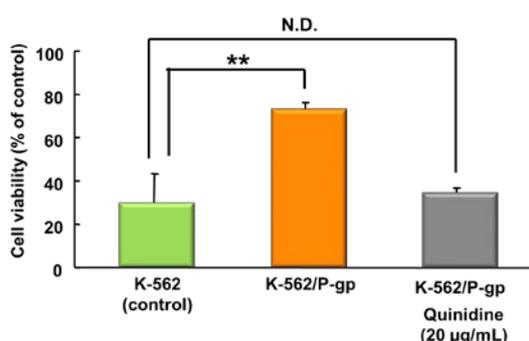


図5 VP-16の殺細胞効果に及ぼすP-gp発現の影響

VP-16を25 µg/mLで24時間曝露した。P-gp阻害剤のキニジンは20 µg/mLで30分プレインキュベーションした。細胞生存率はWST-8 assay法で評価した (n=3, +SD)

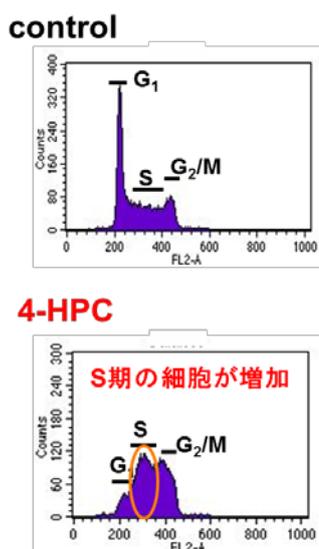


図6 4-HPCがP-gp発現K562細胞の細胞周期に及ぼす影響

5.0 µg/mLの4-HPCを24時間曝露し、細胞周期をフローサイトメーターで解析した

また、4-HPCを24時間曝露した後ではS期の細胞が増加したことから (図6)、4-HPC前処理によるVP-16の殺細胞効果の増強は、4-HPC前処理によって細胞周期がS期に停止し、VP-16に対する感受性が上昇することが要因であることが示された。

(3) 正常血管内皮細胞を用いた検討

安全性も考慮した薬物使用の最適化を目的として、ヒト血管内皮細胞由来の細胞 (HUVEC) を用いて、前述と同じ方法でVP-16と4-HPCの曝露順序が殺細胞効果に与える影響を検討した。その結果、先に低濃度の4-HPCに曝露させてもVP-16の殺細胞効果の増強は認められず、細胞周期の変化もほとんど認められなかった。

これらの結果より、VP-16の殺細胞効果の増強には薬物曝露による細胞周期のS期への同調が必要であると考えられる。

以上の結果より、抗がん薬の曝露順序 (投与順序) が治療効果や副作用発現に影響をあたえる可能性が示唆され、本研究の成果は造血幹細胞移植時の抗がん薬治療のレジメンを科学的に検証するための一助となるものと考えられる。

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1件)

① Yuki Tazawa, Ippei Usukubo, Kazuki Takada, Yoh Takekuma, Yoshihiko Shibayama, Mitsuru Sugawara, Schedule-dependent cytotoxicity of etoposide and cyclophosphamide in P-glycoprotein-expressing human leukemic K-562 cells. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 37(8) 1323-1329 (2014) 査読有
<http://doi.org/10.1248/bpb.b14-00207>

[学会発表] (計4件)

① 助畑 歩、武隈 洋、佐藤夕紀、鷺見正人、田中寛之、遠藤雅之、菅原 満、TDMへの応用を目指した3種のチロシンキナーゼ阻害剤の血中濃度測定法の検証、日本薬学会北海道支部第142回例会、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) (2015年5月16日)

② 田澤佑基、武隈 洋、佐藤夕紀、鷺見正人、笠師久美子、井関 健、菅原 満、中等量エトポシド (VP-16)/シクロホスファミド (CY)/全身放射線 (TBI) 前処置レジメンにおけるVP-16のPK/PD解析による投与量の最適化に関する検討、第22回クリニカルファーマシーシンポジウム/医療薬学フォーラム2014、ビッグサイトTFTホール (東京都江東区) (2014年6月28日)

③田澤佑基、吉岡美咲、武隈 洋、佐藤夕紀、
鷺見正人、菅原 満、細胞周期変化がエトポ
シド (VP-16) の殺細胞効果に与える影響、
日本薬学会北海道支部第 141 回例会、札幌コ
ンベンションセンター (北海道札幌市) (2014
年 5 月 24 日)

④吉岡美咲、田澤佑基、佐藤夕紀、鷺見正人、
武隈 洋、菅原 満、薬物曝露による細胞周
期変化が細胞周期依存性の抗癌剤の作用に
与える影響、第 27 回北海道 TDM 研究会研究
発表会、北海道薬科大学サテライトキャンパ
ス (北海道札幌市) (2013 年 11 月 30 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 満 (SUGAWARA, Mitsuru)
北海道大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：60332467

(2) 研究分担者

武隈 洋 (TAKEKUMA Yoh)
北海道大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：00396293