

13 - 10 抗悪性腫瘍薬の至適投与法確立のための薬理的指標に関する研究

主任研究者 埼玉医科大学 佐々木 康綱

研究成果の要旨

本研究では以下の成果を得た。薬剤排泄ポンプである、BCRPについて、これまで報告されているSNP (V12M, Q141K, A149P, R163K, Q166E, P269S, S441N)を導入し、細胞膜への局在・発現量、輸送活性について野生型と比較した結果、Q141Kは、日本人で非常に頻度が高いSNPであり(29%)、特に日本人においてBCRP基質となる抗癌剤の個人差の要因の一つとなり得ると考えられた。アロマターゼ阻害薬であるファドロゾールの代謝に関与するCYP2A6の遺伝子多型が、本剤の代謝の個人差の影響因子であるか否かを検討した結果、CYP2A6*1/*7 および CYP2A6*4/*4 を有するヒト肝マイクロゾームにおけるファドロゾールシス8-水酸化酵素活性は、CYP2A6*1/*1 を有するヒト肝マイクロゾームによる本酵素活性と比較して有意に低いことが示され、ファドロゾールのシス8-水酸化反応にCYP2A6遺伝子多型が影響する可能性が示唆された。サリドマイドのpharmacokineticsとpharmacodynamicsを解析した結果、血漿M-タンパク質濃度の低下率の高低に基づいて有効と判定された18症例のC₁₂値の平均濃度と無効と判定された18症例のC₁₂値の平均濃との間に有意差は認められなかった。塩酸イリノテカンの薬物代謝に関与するトランスポーターの一つで肝細胞のcanalicular membraneに発現しているmultidrug resistance-associated protein 2(MRP2)の遺伝子ATP binding cassette, subfamily C, member 2(ABCC2)の遺伝子多型と毒性との関連について解析した。Exon13 T1815+2A・Exon18 C2302T C2366T・Exon25 G3449A A3517Tについては、多型を認めず、promoterとexon10についての単変量解析では、毒性発現についてのオッズ比がそれぞれ0.777と1.049と相関を認めなかった。上皮成長因子受容体(EGFR)チロシキナーゼ阻害剤ゲフィチニブの投与を受ける非小細胞肺癌症例を対象に、ゲフィチニブ投与による代謝酵素CYP3A4の誘導・阻害の有無および血中ゲフィチニブ薬物動態の変化と個体差を検討した。内因性コルチゾルの代謝物である6-β-OHFの尿中濃度は、ゲフィチニブ投与前に比し増加傾向を示した。CYP3A4活性の個体内変動の指標とされる尿中6-β-OHF/FC比は、ゲフィチニブ投与前に比べ有意な上昇を認め、ゲフィチニブ投与によるCYP3A4の酵素誘導が強く示唆された。一方、本年米国よりEGFR遺伝子上のATP結合部位に相当するエクソン18から21の領域に体細胞変異を有する患者においてはゲフィチニブの臨床効果が有意に高いとの報告がなされた。この報告を受けて非小細胞肺癌症例でEGFR遺伝子の変異と臨床効果について長期間の奏効を示した5例の非小細胞肺癌組織を解析した結果、ゲフィチニブに著効を示した1名の患者では、EGFR遺伝子のエクソン19に欠失変異を認めたが他の4例に関しては、変異は認めず、EGFRの変異のみではイレッサの効果を正確に予測することは困難であると考えた。

分子標的抗悪性腫瘍薬の早期臨床試験においてバイオマーカーを測定することが第Ⅰ相試験以降の至適投与量を決定のための有用な情報になりうるか否かについて、文献的検討を行った。分子標的薬としては、EGFRチロシキナーゼ阻害薬(小分子製剤およびモノクローナル抗体)、Farnesyl Transferase阻害薬、Rafキナーゼ阻害薬、MMP阻害薬を取り上げ、それぞれの第Ⅰ相試験を解析した。血中薬物濃度が至適投与量決定のための一助となる場合があるものの、バイオマーカーの測定自体が大半の薬剤では至適投与量決定に際して有力な情報とならず“Proof of Principles”を示すにとどまった。バイオマーカー測定の臨床的意義については、期臨床試験から市販後調査まで一貫して行った上で評価する必要がある。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
佐々木 康綱	埼玉医科大学 教授	抗腫瘍活性発現のためのバイオマーカーに関する研究
杉山 雄一	東京大学大学院薬学系研究科 教授	トランスポーターが関与する抗癌剤の体内動態特性の in vitro からの予測
鎌滝 哲也	北海道大学大学院薬学研究科 教授	最適ながんの化学療法の確立に分子的基盤を与える薬物代謝酵素の遺伝的多型に関する研究
谷川原 祐介	慶應義塾大学医学部 教授、薬剤部長	多発性骨髄腫におけるサリドマイドの Pharmacokinetics と Pharmacodynamics
下方 薫	名古屋大学大学院医学系研究科 教授	薬物代謝関連酵素の遺伝子多型解析と個別化学療法
田村 友秀	国立がんセンター中央病院 部長	至適投与設計のための薬理作用マーカーと個体差
安宅 信二	国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 医長	進行非小細胞肺癌における UFT, Gemcitabine (GEM), Vinorelbine (VNR) 併用化学療法の第 Ⅰ 相試験および薬物動態の検討
山根 祥晃	国立病院機構米子医療センター	再発結腸直腸癌に対する抗癌剤至適投与法確立のための薬理学的指標に関する研究

総括研究報告

1 研究目的

本研究の目的は、抗悪性腫瘍薬の薬理学的指標が至適投与法決定のための有用なバイオマーカーとなりうるか否を検討することにある。この目的に沿って以下の研究課題を検討した。トランスポーターの遺伝子多型の意義を解明するために遺伝子発現系を構築し、種々の基質薬物の ATP 依存的な輸送活性に及ぼす変異型と野生型との基礎薬理学的な比較、アロマターゼ阻害薬の薬物代謝におけるヒト P450 の遺伝的多型の解析、サリドマイドの pharmacokinetics と pharmacodynamics の解析、塩酸イリノテカンのトランスポーターの遺伝子多型と毒性の臨床薬理学的な検討、ゲフィチニブ薬物動態変動の規定因子の解析と上皮性増殖因子受容体の変異と臨床効果との検討、抗悪性腫瘍薬第Ⅰ相試験におけるバイオマーカー検討の意義に関する解析。

2 研究成果

本研究班の成果を以下に示す。

Breast Cancer Resistant Protein (BCRP/*ABCG2*) について、遺伝子多型 (SNP) が細胞膜へのトランスポーター・輸送活性について与える影響を検討した結果、日本人で頻度の高い SNP である Q141K の変異で細胞膜上での発

現低下すること、S441N の変異により発現が見られなくなる事が明らかとなった。発現量で補正すると、Q141K の変異でも野生型と同程度の輸送活性が検出されたことから、単位発現量あたりの輸送活性には差が見られないことが明らかとなった。BCRP 欠損マウスを用いた解析から、消化管上皮細胞内で生成するグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体の管腔側の排出に一部 BCRP が関与していること、消化管で加水分解を受けた後 ME3277 の管腔側の排出に BCRP が関与していることを見出した。

臨床血中濃度においてレトロゾール酸化反応に関与する P450 分子種を同定し、さらにその P450 分子種の一つである *CYP2A6* 遺伝子多型がレトロゾール酸化酵素活性に影響を及ぼすか否か検討した。市販の P450 発現系、欧米人肝と *CYP2A6* 遺伝子型を明らかにした日本人肝ミクロゾームを用い、カルピノール代謝物を HPLC で測定してレトロゾール酸化酵素活性を調べた。12 種の薬物代謝型 P450 分子種のうち、高いレトロゾール酸化酵素活性を示したのは *CYP2A6* および *CYP3A4* であり、その他の分子種のレトロゾール酸化酵素活性は低かったことより、*CYP2A6* および *CYP3A4* がレトロゾール酸化酵素活性を有することが示唆された。またレトロゾールはアロマターゼ (*CYP19*) の競合阻害薬であることから、*CYP19* がレトロゾール酸化反応を触媒するか否かを検討するため、*CYP19* 発現系を用いてレトロゾール酸化酵素活性を測

定した。CYP19 のレトロゾール酸化反応の触媒活性は低いことが明らかとなり、レトロゾールの作用部位における代謝は、消失クリアランスへ寄与しないことが示唆された。さらにレトロゾールヒト肝マイクロゾームにおけるレトロゾール酸化酵素活性に CYP2A6 遺伝子多型が影響を及ぼすか否かを検討するため、CYP2A6 遺伝子多型を判定した日本人 31 検体の肝マイクロゾームにおけるレトロゾール酸化酵素活性を測定した結果、臨床血中濃度付近における日本人肝マイクロゾームによるレトロゾール酸化酵素活性は、CYP2A6*4 (全欠損型変異) のホモ接合体では検出されなかったことをはじめとして、活性低下型変異である CYP2A6*7、CYP2A6*9、CYP2A6*10 のホモあるいはヘテロ接合体では活性が低いあるいは検出されず、CYP2A6 遺伝子多型との関連が認められた。以上より、レトロゾール酸化酵素活性に個人差が認められ、遺伝的多型を示す CYP2A6 の寄与が大きいことが判明した。

200 mg あるいは 400 mg のサリドマイド (TM) を単回投与後の血中濃度推移を 1-compartment model に当てはめて求められたパラメータは、クリアランス = 12 L/h、分布容積 = 121 L および消失半減期 = 7.9 h (いずれも平均値) であり、これらはいずれも用量には依存せず一定であった。一方、200 mg 投与群および 400 mg 投与群の最高血中濃度 (C_{max}) は、それぞれ 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、同様に血中濃度 時間曲線下面積 (AUC_{24}) はそれぞれ 23.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 37.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、これらの場合はほぼ用量に依存する傾向が認められた。血漿 M タンパク質濃度の 25% 以上の低下の有無などの Gore らの判定基準に基づき、維持投与を開始後 5 週目に部分緩解と判定された患者群 (19 例) と病状進行と判定された患者群 (18 例) について、TM の C_{12} 値を比較した結果、平均濃度 \pm SE は前者が $2.25 \pm 0.32 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、後者が $2.30 \pm 0.34 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり、両群の C_{12} 値の間に有意差は認められなかった。一方、副作用について、発現群と非発現群の TM の C_{12} 値を比較した結果、好中球減少以外のいずれの場合も、発現群と非発現群の間の血中濃度に有意差は認められなかったが、平均値を比較すると、眠気 (2.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs 1.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、末梢神経障害 (2.44 vs 1.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、便秘 (2.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs 2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、口渇 (2.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs 1.96 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の場合はいずれも非発現群より発現群の方が高値を示す傾向にあった。

塩酸イリノテカンの薬物代謝に関与するトランスポーターの一つで肝細胞の canalicular membrane に発現している multidrug resistance-associated protein 2 (以下 MRP2) の遺伝子 ATP binding cassette, subfamily

C, member 2 (gene name) (以下 ABCC2) の遺伝子多型と毒性との関連について解析した。MRP2 の機能低下は、高ビリルビン血症を引き起こし、先天性黄疸を特徴とする常染色体劣性遺伝子疾患である Dubin-Johnson 症候群の原因遺伝子の一つとされている。Dubin-Johnson 症候群に関与する遺伝子多型は、exon13、15、18、25、28、29、30 などで報告されている。また、健常日本人での検討では、promoter と exon10、18、28、30 で多型が報告されていることを踏まえ promoter と exon10、13、18、25 の遺伝子多型について検討を行った。1994 年から 2002 年に塩酸イリノテカンを含む抗がん剤治療を受けた十分な骨髄機能を有した 120 人のがん患者を対象とした。Exon13 T1815+2A、Exon18 C2302T C2366T、Exon25 G3449A A3517T については多型を認めなかった。Promoter と exon10 についての単変量解析では、オッズ比がそれぞれ 0.777 と 1.049 と相関を認めなかった。また、promoter と exon10 については多変量解析を行ったが有意差を認めなかった。以上の検討より promoter、exon10、13、18、25 の遺伝子多型は、CPT-11 の毒性に影響しないと考えられた。

上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブ投与を受ける非小細胞肺癌患者における代謝酵素活性マーカーの変化をモニターし、酵素誘導阻害の有無、ゲフィチニブ血中薬物動態への影響、薬物相互作用の可能性について検討した。対象は、ゲフィチニブの単独投与を予定している非小細胞肺癌患者で、20 才以上、PS 0-2、主要臓器機能が保持されている症例とした。ゲフィチニブ投与前 (day1)、ゲフィチニブ投与第 15 日 (day15) および第 29 日 (day29) に採血、採尿を実施し、血中ゲフィチニブ濃度、主代謝物である尿中 6-hydroxycortisol (OHF)、尿中 free-cortisol (FC) を測定した。また、一部の症例には、CYP3A4 活性推定法を用いた方法でより正確な評価を行った。解析した症例の抗腫瘍効果は 27%、グレード 3 の毒性の発現率は皮疹 2%、下痢 2%、肝酵素上昇 5% と、これまでの報告とほぼ同様であった。内因性コルチゾルの代謝物である 6-OHF の尿中濃度は、ゲフィチニブ投与前で $234.82 \pm 226.04 \text{ ng/ml}$ (範囲 23.20-1441.60)、day15 で 243.77 ± 237.95 (範囲 21.30-1550.70)、day29 で 345.61 ± 418.18 (範囲 20.20-1926.70) であり、day29 で投与前に比し増加傾向を示した ($p=0.177$)。従来から CYP3A4 活性の個体内変動 (誘導・阻害) の指標とされる尿中 6-OHF/FC 比は、ゲフィチニブ投与前で 7.4 ± 4.63 (範囲 1.5-22.9) であり、day15 では 7.3 ± 4.32 (範囲 1.5-22.6) とほぼ同様であったが、day29 には 12.6 ± 10.02 (範囲 1.8-50.6) と投与前

に比べ有意な上昇を認めた ($p=0.001$)。一方、ハイドロコートン投与を行った20例の24時間尿中6-OHC総量は、ゲフィチニブ投与前で $8.31 \pm 4.80\text{mg/day}$ (範囲 1.25-18.16)、day15で $8.19 \pm 4.26\text{mg/day}$ (範囲 2.85-18.24)、day29で $7.64 \pm 4.17\text{mg/day}$ (範囲 0.67-16.53)と有意な変動はなく、ハイドロコートン非投与例の6-OHF/FC比の変動とは異なる結果を得た。一方、測定を終了した42例のゲフィチニブ血中濃度には、大きな個体差を認めたが、day15で $274.0 \pm 160.2\text{ng/ml}$ (範囲 66.9-547.9)、day29で 274.0 ± 160.2 (範囲 91.6-494.1)と、day15とday29で変わりはないとの結果であった。また、各症例でのゲフィチニブ血中濃度、6-OHF/FCそれぞれのday29/day15(変動)比についても明らかな相関は認められなかった。一方、非小細胞肺癌組織にて上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子の、体細胞変異を有する患者ではゲフィチニブの臨床効果が有意に高いと報告された。この報告を踏まえ、EGFRの変異の有無とゲフィチニブの臨床効果の関係を解析した。病理診断を目的に得られ、ホルマリン固定されていた生検組織よりパラフィン包埋切片を作製し、包埋切片よりゲノムDNAを抽出、ダイレクトシーケンス法にてEGFRのATP結合領域であるエクソン18から21の遺伝子配列を解析した。Retrospective解析した6例中4例でゲフィチニブが著効した。著効した4例のうち、1例においてエクソン19に、既に報告されている欠失変異を検出したものの残りの3例には変異を認めなかった。効果を示さなかった他の2例においても報告されている変異を認めなかった。Prospectiveに解析した5例においては、いずれも報告されている変異を認めなかった。以上よりEGFRの変異は、ゲフィチニブの臨床効果に対する予測因子の一つではあるものの、変異がない症例においてもゲフィチニブに著効を示した症例もあることよりEGFRの変異の有無に基づいたゲフィチニブの適応を決定することは時期尚早である。

分子標的抗悪性腫瘍薬の早期臨床試験においてバイオマーカーを測定することが第Ⅰ相試験以降の至適投与量を決定のための有用な情報になりうるか否かについて、文献的検討を行った。分子標的薬としては、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬(小分子製剤およびモノクローナル抗体)、Farnesyl Transferase阻害薬、Rafキナーゼ阻害薬、MMP阻害薬を取り上げ、PubMedおよびmanual researchにより選択した分子標的薬剤第Ⅰ相試験のfull paper24編を解析した。血中薬物濃度が至適投与量決定のための一助となる場合があるものの、バイオマー

カーの測定自体が大半の薬剤では至適投与量決定に際して有力な情報とならず“Proof of Principles”を示すにとどまった。バイオマーカー測定の臨床的意義については、期臨床試験から市販後調査まで一貫して行った上で評価する必要がある。

3 倫理面への配慮

倫理面への配慮については、本研究班で行われた研究について、動物実験では施設の審査を、また遺伝子多型の解析を含めた臨床研究についても、ヘルシンキ宣言の精神を踏まえて、それぞれの施設内の倫理委員会による了承を得た上で被験者への説明を行い、患者の自由意思による文書同意を得た後に実施した。さらに臨床研究に関する倫理指針(平成15年厚生労働省)に従った。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. T Fumiyoshi Ohyanagi, Yuichi Ando, Fumio Nagashima, Masaru Narabayashi and Yasutsuna Sasaki. Acute gefitinib-induced pneumonitis. *Int. J. Clin. Oncol.* 9:406-409, 2004
2. Nozaki Y., Kusuhara H., Endou H., Sugiyama Y. Quantitative Evaluation of the Drug-Drug Interactions between Methotrexate and Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in the Renal Uptake Process based on the Contribution of Organic Anion Transporters and Reduced Folate Carrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 309:226-34, 2004
3. Kondo C., Suzuki H., Itoda M., Ozawa, S., Sawada, J-I., Kobayashi D., Ieiri I., Mine K., Otsubo K., Sugiyama, Y. Functional analysis of SNPs variants of BCRP/ABCG2. *Pharm. Res.*, 21:1895-903, 2004
4. Adachi Y., Suzuki H., Schinkel A.H., Sugiyama Y. Role of breast cancer resistance protein (bcrp1/abcg2) in the extrusion of glucuronide and sulfate conjugates from enterocytes to intestinal lumen. *Mol. Pharmacol.*, 67: 923-8, 2005
5. Yamazaki Y, and Kamataki T., Establishment of ten strains of genetically engineered *Salmonella typhimurium* TA1538 each co-expressing a form of human cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 reductase sensitive to various promutagens. *Mutat Res.*, 562:151-62, 2004
6. Ariyoshi N, and Kamataki T. Identification of

- deletion-junction site of CYP2A6*4B allele lacking entire coding region of CYP2A6 in Japanese. *Pharmacogenetics*, 14:701-5, 2004
7. T. Tsutsumi, A. Tokumura, M. Yamaguchi, S. Kitazawa, Y. Tanigawara, Phorbol Myristate Acetate Stimulates Degradation of a Structural Analogue of Platelet-Activating Factor to a nNeutral Lipid in Human Leukemic K562 Cells: Relevance to the Release of Lipids, *Biol. Pharm. Bull.*, 27: 24-28, 2004
 8. K. Kosaki, K. Tamura, R. Sato, H. Samejima, Y. Tanigawara, T. Takahashi, A major influence of CYP2C19 genotype on the steady-state concentration of N-desmethyloclobazam., *Brain & Development*, 26(8): 530-534 , 2004
 9. Hasegawa Y. and Shimokata K., Rapid detection of UGT1A1 gene polymorphisms by newly developed invader assay. *Clin. Chem.*,8:1479-1480, 2004
 10. Kitagawa C and Shimokata K., Genetic polymorphisms in the phenobarbital-responsive enhancer module of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene and irinotecan toxicity. *Pharmacogenetics*,15:35-41, 2005
 11. Sekine, I., Tamura, T., Phase I study of cisplatin analogue nedaplatin (254-S) and paclitaxel in patients with unresectable squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 90: 1125-8, 2004
 12. Sekine, I., Tamura, T., Treatment of small cell lung cancer in the elderly based on a critical literature review of clinical trials. *Cancer Treat Rev*, 30:359-368, 2004
 13. Takano, T., Tamura, T., Risk factors for tumor response in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with gefitinib. *Lung Cancer*, 45: 93-104, 2004