

13-10 抗悪性腫瘍薬の至適投与法確立のための薬理学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。①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。②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 を有するヒト肝ミ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 を有するヒト肝ミ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た。③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 C_{12} 値の平均濃度と無効と判定された 18 症例の C_{12} 値の平均濃度の間に有意差は認められなかった。④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、毒性発現について相関を認めなかった。⑤上皮成長因子受容体 (EGFR) チロシン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。内因性コルチゾールの代謝物である 6β -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。⑥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。⑦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 II 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。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。⑧Methotrexate の ATP 依存的な輸送を検出することができた。⑨Fadrozole 代謝における *CYP2A6*, *CYP2C19*, *CYP3A4* の関与を解析した結果、*CYP1A2*, *CYP2A6* および *CYP2D6* には、主にシス 8 位水酸化酵素活性が、*CYP2C19*, *CYP2D6* および *CYP3A4* には、主にトランス 8 位水酸化酵素活性が認められた。⑩Docetaxel の CL に対する影響因子として AAG のみが有意であり、*CYP3A5* 遺伝多型には有意差は認められず、CL に対する *CYP3A5* 遺伝多型の関与は小さかった。⑪UGT1A1 のプロモーター領域で *UGT1A1**28 よりさらに上流域に存在するフェノバルビタール反応増強モジュール (PBREM) の PBREM 領域にある遺伝子多型 T-3263G と irinotecan の副作用との関係は乏しかった。⑫日本人がん患者における paclitaxel の血中薬物濃度の個体間のバラツキを検討した結果、体表面積に基づいて投与量を設定した場合の対数変換した AUC の “coefficients of determination” は、84% であり実投与量の 78% よりも相関が高かった。⑬ *CYP3A4* 活性個体差予測に基づく Docetaxel 個別化投与量設定法を用いることにより、従来の体表面積による投与量設定に比べて個別化投与量設定法により AUC のバラツキが 46% 減少し、個別化投与量設定法により 29.1% の患者がメリットを享受することが示された。

13-10 抗悪性腫瘍薬の至適投与法確立のための薬理学的指標に関する研究

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名
佐々木 康綱	埼玉医科大学 教授
杉山 雄一	東京大学大学院薬学系研究科 教授
鎌 滝 哲也	北海道大学大学院薬学研究科 教授
谷川原 祐介	慶應義塾大学医学部 教授、薬剤部長
下 方 薫	名古屋大学大学院医学系研究科 教授
田 村 友 秀	※国立がんセンター中央病院 医長
1	国立がんセンター中央病院 部長
安 宅 信 二	※2 国立療養所近畿中央病院 医長
	国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 医長
山 根 祥 晃	※3 国立米子病院
	国立病院機構米子医療センター

分担研究課題

抗腫瘍活性発現のためのバイオマーカーに関する研究
 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 からの予測に関する研究
 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
 多発性骨髄腫におけるサリドマイドの
 Pharmacokinetics と Pharmacodynamics
 薬物代謝関連酵素の遺伝子多型解析と個別化学療法
 至適投与設計のための薬理作用マーカーと個体差
 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 / II 相試験および
 薬物動態の検討
 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

※1 平成15年4月1日～平成16年3月31日

※2 平成15年4月1日～平成16年3月31日

※3 平成15年4月1日～平成16年3月31日

総括研究報告

1 研究目的

本研究の目的は、抗悪性腫瘍薬の至適投与法の確立を目指して、その基盤となる ①抗悪性腫瘍薬の薬物動態と薬力学的作用の個体差を規定する要因の解明とこれに基づく個別化投与指針を構築するとともに、②分子標的薬剤をはじめとする抗悪性腫瘍薬の薬力学とりわけ抗腫瘍作用の指標となる生物学的マーカーを解析すること、により至適投与スケジュール設定および効果の予測を行う。新たな展開として遺伝薬理学的手法を導入することにより個別化治療に向けた投薬設計を行い、臨床効果、薬物有害反応に影響する因子について従来の血中薬剤濃度のみならずより包括的な解析を行う。

2 研究成果

本研究班の成果を以下に示す。

①Breast 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ティング・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が低下すること、S441N の変異により発現が見られなく

なることが明らかとなった。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。

②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、カルビノール代謝物を 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ミ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 検体の肝ミ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ミ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。

③200 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 $\mu\text{g/mL}$ および 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、同様に血中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{24}) はそれぞれ 23.3 $\mu\text{g/mL}$ および 37.7 $\mu\text{g/mL}$ 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 $2.25 \pm 0.32 \mu\text{g/mL}$ 、後者が $2.30 \pm 0.34 \mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ vs 1.95 $\mu\text{g/mL}$)、末梢神経障害 (2.44 vs 1.84 $\mu\text{g/mL}$)、便秘 (2.40 $\mu\text{g/mL}$ vs 2.00 $\mu\text{g/mL}$)、口渴 (2.42 $\mu\text{g/mL}$ vs 1.96 $\mu\text{g/mL}$) 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。

④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髓機能を有した 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。

⑤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、P S0-2、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 β -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 β -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 β -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、ハイドロコトロン投与を行った 20 例の 24 時間尿中 6 β -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、ハイドロコトロン非投与例の 6 β -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 β -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。

⑥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つ

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。

⑦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Ⅱ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。

⑧MethotrexateのATP依存的な輸送を検出することができた。MRP4に対するKm値は100・Mであるのに対して、他のABCトランスポーター（BCRP、MRP2）に対するKm値1.5、5.2mMと大きく、大きな差があることを見出した。これらのトランスポーターの典型的な基質を用いて、NSAIDsによる阻害効果を検討したところ、MRP2を介したMTXの取り込みはほとんど阻害されず、またBCRPについてもindomethacin, diclofenac, phenylbutazoneにより比較的高濃度で阻害効果が見られた。MRP4の取り込みに対してはindomethacin, ketoprofen, sulindac, salicylateによる阻害が見られた。

⑨経口抗悪性腫瘍薬であるS-1を体重50kgあたり、50mgを1日2分割で服用した被検者において、CYP2A6*4/*7およびCYP2A6*4/*9の遺伝子型を持つ被検者は、最終投与13時間後の血中tegafur濃度が、CYP2A6*1/*4遺伝子型を持つ被検者の約7倍の高値を示した。一塩基置換変異のCYP2A6の活性に及ぼす影響について大腸菌破碎液を酵素源として*in vitro*で検討したところ、野生型および変異型CYP2A6の5-FU生成反応における代謝クリアランス値（Vmax/Km値）は、組換えCYP2A6.7およびCYP2A6.11ともに野生型CYP2A6.1の約2分の1程度であった。

⑩2種のヒト組換えP450を用いてFadrozole代謝におけるCYP2A6, CYP2C19, CYP3A4の関与を解析した結果、CYP1A2, CYP2A6およびCYP2D6には、主にシス8位水酸化酵素活性が、CYP2C19, CYP2D6およびCYP3A4には、主にトランス8位水酸化酵素活性が認められた。これらの分子種のうち、CYP2A6が最も低いKm値を示し、Vmax値はCYP2C19が高値を示したことから、これらがヒト肝における主要代謝酵素と推定されFadrozoleの8位水酸化反応にはCYP2A6以外にCYP2C19とCYP3A4等の複数のP450分子種が関与することが示された。

⑪Docetaxel代謝におけるCYP3A5の関与を検討し、遺

伝子サンプルが得られた患者32名の遺伝子診断の結果、CYP3A5*1/*1（野生型）1名（3.1%）、CYP3A5*1/*3（ヘテロ変異型）11名（34.4%）およびCYP3A5*3/*3（ホモ変異型）20名（62.5%）であった。また、CYP3A5*1/*1（野生型）の頻度に比べCYP3A5*1/*3（ヘテロ変異型）およびCYP3A5*3/*3（ホモ型変異）の頻度は著しく高いことが示された。なお、今回の患者群ではCYP3A5*6変異は検出されなかった。これらの結果をもとに、docetaxelのCLと遺伝多型およびAAGの関係を検討した。DocetaxelのCLと遺伝多型の検討では野生型およびヘテロ変異型群とホモ変異型群とのCLの平均値の間に有意差は認められなかったが、docetaxelのCLとAAGの間では有意差が認められた。そこで、docetaxelのCLに対する影響因子を探索する目的でAAG、性別、アルブミン、遺伝多型の4因子で重回帰分析を行なった。DocetaxelのCLに対する影響因子としてAAGのみが有意であった。また、CYP3A5遺伝多型には有意差は認められず、TXTのCLに対するCYP3A5遺伝多型の関与が小さいことが示された。

⑫UGT1A1のプロモーター領域でUGT1A1*28よりさらに上流域において、フェノバルビタール反応増強モジュール(PBREM)が発見されPBREM領域に遺伝子多型T-3263Gが存在することが明らかにされた。T-3263Gの多型と副作用との関係を解析したところ、単変量解析でヘテロ型では、オッズ比2.15 (CI, 0.80-5.77)と副作用との相関が認めなかったが、ホモ型では、オッズ比5.80 (CI, 1.67-20.1)と副作用との相関を認めた。しかし、UGT1A1*28を含む多変量解析ではこの有意差は消失した。これは、T-3263GとUGT1A1*28との間に有意に高い連鎖不均衡があるためと考えられた。

⑬個々の症例に対する抗悪性腫瘍薬の投与量は慣習的に患者の身長と体重より換算された体表面積に基づいて決定されている。しかしながら最近の報告によれば、体表面積に基づいた抗悪性腫瘍薬の投与量の決定方法は、結果として重要な抗悪性腫瘍薬のサロゲート・マーカーである血中薬剤濃度の患者間変動のバラツキを減少させることができないとしているそのため、paclitaxelの第Ⅰ相試験の成績をもとに、日本人がん患者におけるpaclitaxelの血中薬物濃度の個体間のバラツキを検討した。“Simple linear regression model”を用いて解析した結果、AUCの個体間のバラツキは、体表面積に基づいて投与量を設定した場合の対数変換したAUCの“coefficients of determination”は、84%であった。一方、実投与量に基づいて解析した場合には、対数変換したAUCの“coefficients of determination”は、78%であった。この結果、日本人症例においても、体表面積に基づいたpaclitaxelの投与量の設定の妥当性が示された。しかしながら実投与量を用いた場合でも“coefficients of determination”は、80%近傍であり、体表面積に基づいた投与量を設定した場合と大きな相違は認めなかった。

⑭コルチゾール投与後の尿中代謝物測定によるCYP3A4活性個体差予測に基づくDocetaxel個別化投与量設定法を用いることにより、従来の体表面積による投与量設定に比べて個別化投与量設定法によりAUCのバラツキが46%減少し、個別化投与量設定法により29.1%の患者がメリットを享受しうると期待された。また体表面積による投与量設定法で治療を受ける14.5%の患者にお

いて over-treatment が回避され、14.5%の患者において under-treatment が回避されるものと推定される。しかしながら個別化投与量設定法による薬力学的作用(毒性、抗腫瘍効果)のバラツキを減少しうることは示されなかった。

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。