

dorsal flanks of C.B-17/IcrCrI SCID mice (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) (100 μ l per mouse). Five mice were injected with each clone. The tumor volume was measured daily until day 141 with a caliper rule. The tumors' major and minor diameters were measured and the volume was estimated at $4/3\pi \times (\text{major radius}) \times (\text{minor radius})^2$. Mice were killed when the major diameter of the tumor had reached 2 cm. In all the experiments, the ethical guidelines for investigations in conscious animals were followed and the experiments were approved by the local Ethics Committee for Animal Research.

Deglycosylation

Cells were lysed in a denaturing buffer (PBS, 0.5% SDS, 1% β -mercaptoethanol) and boiled for 10 min. The supernatant was incubated for 1 h with endoglycosidases F (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) as recommended by the manufacturer.

Immunoprecipitation

Cells were lysed in a lysis buffer (PBS, 20 mM EDTA, 1 mM PMSE, 1% Elugent (Calbiochem, Darmstadt, Germany)) at 4°C for 30 min and centrifuged at 12 000 g at 4°C for 20 min. The supernatant was incubated with anti-HA affinity matrix (Roche Molecular Biochemicals) at 4°C overnight and the matrix was washed with the lysis buffer six times.

Proteolytic Activity of Napsin A

Recombinant proSP-B lacking the entire 102 amino-acid C-terminal domain (SP-B Δ C) was synthesized in the baculovirus system. The sequence encoding residues 1–279 of the human SP-B proprotein (SP-B Δ C) was cloned in-frame with a six-residue C-terminal histidine tag and ligated into pVL1393 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Recombinant baculovirus was produced by homologous recombination in *Spodoptera frugiperda* cells, as previously described.²² Fresh monolayers of *Trichoplusia ni* cells were infected with plaque purified recombinant virus at an MOI of 2 and cultured in serum-free media for 72 h. Recombinant SP-B Δ C was purified from the culture media of infected insect cells by NTA affinity chromatography, under non-denaturing conditions, as previously described.²³ Purified SP-B Δ C was incubated with immunoprecipitates from the stable transfectants of control, napsin A or either mutant in an incubation buffer (0.1 M sodium acetate, 20 mM EDTA, pH 4.7) at 37°C for 2 h.

Immunofluorescence

Cells grown on coverslips were fixed (4.0% formaldehyde in PBS, pH 7.4, 10 min), permeabilized (0.1% Triton X-100 in PBS, 3 min) and blocked for 30 min in medium containing 5% normal goat serum. After rinsing with PBS, immunostaining was performed by incubating the cells with antibodies in the following order with rinsing between antibodies: anti-HA (2 ng/ μ l; clone 3F10; Roche Molecular

Biochemicals), Cy3-conjugated anti-rat IgG (H + L) (1:100; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), anti-LAMP-1 (1:200; BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) and fluorescein-conjugated anti-mouse IgG heavy and light chain (1:30; Calbiochem). Coverslips were mounted onto slides with VECTASHIELD Mounting medium with DAPI (H-1200, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Cells were visualized by an immunofluorescence microscope (Axioplan 2 imaging, ZEISS). Cells in collagen gels were stained after digestion of collagen with 100 U/ml collagenase (Sigma-Aldrich Sweden AB, Stockholm, Sweden) for 15 min. Cells were fixed (4.0% formaldehyde in PBS, pH 7.4, 15 min), permeabilized (0.5% Triton X-100 in PBS, 15 min), incubated (0.5 mg/ml sodium borohydride in PBS) and blocked for 30 min in medium containing 5% normal goat serum. After rinsing with PBS, immunostaining was performed as above.

RESULTS

Lack of Napsin A mRNA Expression in Renal Cell Carcinoma

Napsin A mRNA expression was examined in normal and cancerous kidney tissue using *in situ* hybridization (Figure 1). In normal kidney tissue, napsin A mRNA expression was observed in proximal convoluted and straight tubules and collecting ducts in agreement with previous reports (Figure 1a and b).^{12,19} Twenty-nine renal carcinomas were

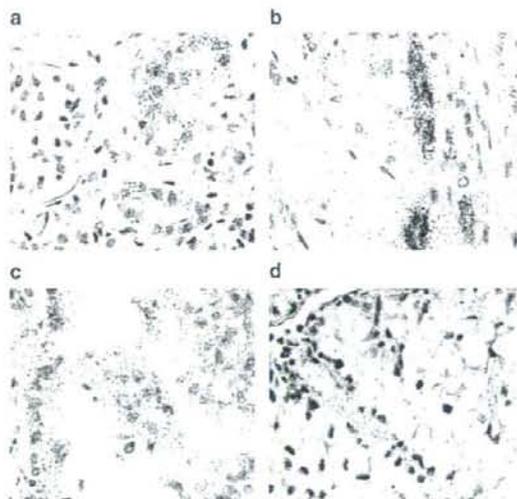


Figure 1 Analysis of napsin A mRNA expression in kidney tissues by *in situ* hybridization. In normal parts of the kidney, proximal convoluted tubules (a), proximal straight tubules and collecting ducts (b) showed napsin A expression. One positive case of renal cell carcinoma, which expressed napsin A mRNA (a grade II tumor), is shown (c). The majority of renal carcinomas studied did not express napsin A mRNA (d). Magnification $\times 40$.

examined (10 grade I, 12 grade II and 7 grade III tumors). Only one of these tumors (a grade II tumor) showed detectable napsin A mRNA expression (Figure 1c), whereas the remaining 28 renal cell carcinomas examined did not show napsin A signals above background (Figure 1d).

Generation and Characterization of Cells Expressing Wild-Type and Catalytically Defective Napsin A

The observation of downregulation of napsin A in kidney tumors prompted us to generate kidney tumor cells that stably express napsin A. HEK293 is a tumorigenic cell line originally derived from human embryonic kidney cells by transfection of adenovirus type 5 DNA.²⁴ This cell line does not express a detectable amount of napsin A.¹² An HA-tagged cDNA napsin A construct (Figure 2a) was generated and transfected into HEK293 cells. Three clones that were stably expressing napsin A (napsin 1, napsin 2 and napsin 3) were isolated, together with two clones transfected with empty vector as a control. We also generated a mutation in the catalytic site by changing Asp283 into an Asn (napsin^{D283N}) (Figure 2a). The mutant was transfected into HEK293 cells and clones stably expressing the mutant were selected (clones napsin^{D283N} 21 and napsin^{D283N} 22). The level of expression of wild-type and mutated napsin A was comparable in these clones (Figure 2b). Napsin A expression was also analyzed by immunofluorescence staining and we found >99% of the cells to stain positive. Cells expressing the mutant had similar population doubling times as napsin A transfectants and significantly ($P < 0.001$) longer time than control cells (25.3 ± 1.3 and 24.9 ± 1.5 h for control 1 and 2; 29.2 ± 0.4 and 27.2 ± 1.6 h for napsin 1 and 2; 29.4 ± 3.5 and 31.4 ± 1.2 h for napsin^{D283N} 21 and 22).

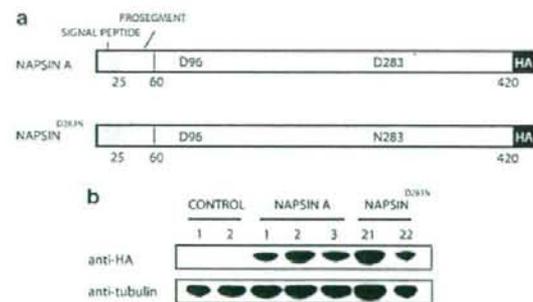


Figure 2 (a) Structures of wild-type and mutant napsin A cDNA constructs. The first amino acid (Met) predicted from the full cDNA sequence is numbered as 1. Deduction of the initial residue of mature protein is based on the result by Schauer-Vukasovic *et al.*²⁵ In napsin^{D283N}, Asp²⁸³ in the catalytic site was changed to an Asn by site-directed mutagenesis. Napsin cDNA constructs have HA tags in their C-termini. (b) Protein expression levels of each clone. Clones that express napsin A or the catalytically inactive napsin^{D283N} protein were analyzed together with control clones transfected with empty vector. The expression level is shown by western blotting using an anti-HA antibody with tubulin as control.

We examined whether the D283N mutation resulted in loss of catalytic activity and whether the mutation altered the processing and intracellular localization of the enzyme. The N-terminal propeptide of proSP-B has been reported to be a physiological substrate of napsin A.¹⁶ Mutation of the catalytic aspartic acid residue D283 resulted in loss of the ability of napsin to cleave a truncated form of recombinant proSP-B (SP-B_{ΔC}) (Figure 3a). Napsin A is synthesized in a proform and processed into the mature form by removal of its N-terminal prosegment. The mature protein is glycosylated in some or all of the three potential N-linked oligosaccharide attachment sites.²⁵ Wild-type napsin A and napsin^{D283N} both migrated as 41 kDa proteins in SDS-PAGE (Figure 3b). Deglycosylation by endoglycosidase F resulted in a decrease in the molecular weight to 38 kDa (Figure 3b), in agreement with the estimated molecular weight (38.9 kDa) of mature napsin A. These results suggest that wild-type and mutant napsins were glycosylated in the same way. As inactivation of the catalytic site did not affect processing, maturation of napsin A is not dependent on intramolecular autocatalysis in HEK293 cells.

Finally, to examine if the D283N mutation affects the intracellular localization of napsin A, we generated an expression vector expressing wild-type napsin A fused with GFP. This vector was transfected into cells expressing either wild-type or mutated napsin A containing an HA tag. As shown in Figure 3c, mutated napsin A (stained with a Cy3-labeled antibody) colocalized with wild-type napsin A (GFP), suggesting that mutation in the catalytic site did not affect the localization of napsin A.

Napsin A Expression Leads to Tube Formation and Reduced Colony Formation in Soft Agar Independent of Its Catalytic Activity

The phenotype of the HEK293 cell clones expressing wild-type or mutant napsin A was examined in detail. The cells of different clones were grown in collagen gels for 2 weeks. Phase-contrast microscopy showed that napsin A-transfected cells formed tube-like structures with branching morphology in the collagen gels whereas control cells did not (Figure 4a). Cells expressing napsin^{D283N} also formed tube-like structures in collagen (not shown). The difference in the organization of the cells in the collagen gels was more clearly discerned after DAPI staining of cell nuclei (Figure 4b). Napsin A-expressing cells formed cyst-like structures whereas control cells did not (Figure 4b and c). Interestingly, napsin A staining was observed in the center of the cyst-like structures (Figure 4c). These results suggest that napsin A promotes differentiation of HEK293 cells.

To determine whether the change in phenotype was associated with an altered ability for anchorage-independent growth, the ability of these cell lines to form colonies in soft agar was determined. All three clones of napsin A-expressing cells formed fewer colonies in soft agar than control clones (Figure 5). Cells expressing napsin^{D283N} formed a similar

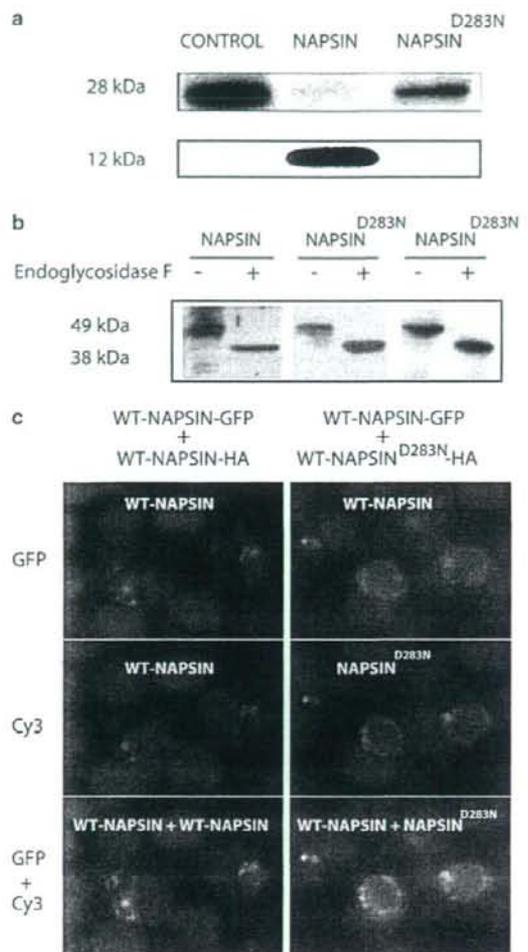


Figure 3 Functional analysis of wild-type and mutated napsin A proteins. (a) Recombinant SP-B_{ΔC} was synthesized in the baculovirus system, and napsin A and its mutant were expressed in HEK293 cells. Recombinant SP-B_{ΔC} was incubated with napsin A or its mutant at pH 4.7 at 37°C for 2 h. Napsin A cleaved SP-B_{ΔC} whereas napsin^{D283N} had lost the catalytic activity. (b) Deglycosylation of wild-type and mutated napsin A proteins. Napsin A and Napsin^{D283N} migrated as 41 kDa proteins and both these proteins migrated as 38 kDa proteins after deglycosylation by endoglycosidase F. Stable HEK293 clones expressing napsin A were analyzed; napsin-1 (expressing wild-type napsin) and clones napsin^{D283N} 21 and napsin^{D283N} 22 (expressing catalytically inactive napsin A). (c) Colocalization of wild-type and mutant napsin A proteins. A vector for wild-type napsin A fused with GFP was transfected into cells expressing HA-tagged napsin A or the napsin^{D283N} mutant. HA-tagged napsin A and the D283N mutant were visualized with Cy3-labeled anti-HA antibody (red). Wild-type napsin A fused with GFP (green) was colocalized with napsin^{D283N} with HA tag (red) (lower panel).

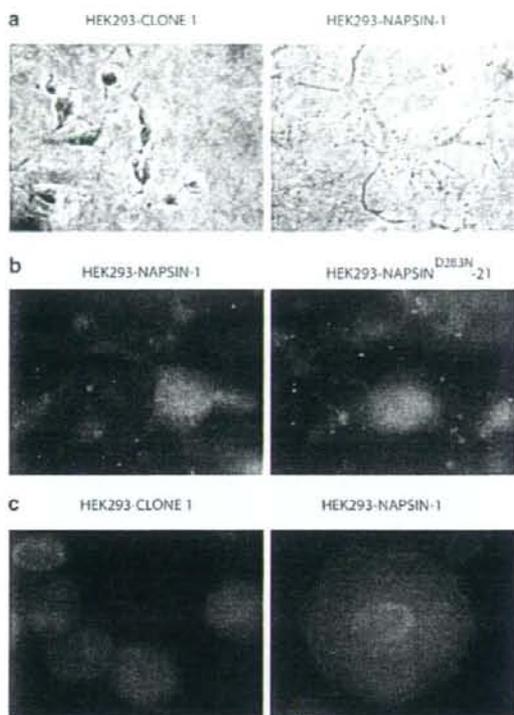


Figure 4 Cyst and branch formation by napsin A-expressing cells. HEK293 cells expressing napsin A and vector-transfected cells were grown in three-dimensional collagen gels for 14 days. (a, b) Effect of napsin A on cell morphology. (a) Phase-contrast photographs of HEK293 cells in collagen gels. Note that napsin A-expressing cells formed a tube-like structure with branching morphology whereas control cells did not. (b) HEK293 cells in collagen gels visualized by fluorescence microscopy. Cell nuclei were stained with DAPI (blue) and cytoplasm was visualized by immunostaining for LAMP-1. (c) Staining of napsin A in cells forming cysts. HEK293 cells in collagen gels were visualized by fluorescence microscopy. Cell nuclei were stained with DAPI (blue) and napsin A was visualized by immunostaining (red). Napsin A was expressed within the central portions of the cysts.

number of colonies as cells expressing wild-type napsin, and fewer than control (Figure 5). The catalytic activity of napsin A therefore does not appear to be required for suppression of colony formation in soft agar.

Tumor Growth *In Vivo*

Tumor formation of cells expressing wild-type or mutated napsin A was examined in SCID mice. Injection of HEK293 cells transfected with empty vector resulted in tumors first detected between days 30 and 36 (Figure 6). All injections resulted in tumor formation. The wild-type napsin A-expressing clones formed tumors with delayed onsets (day 70 to day 133). Six injections out of 10 in this group (2 from napsin 1 and 4 from napsin 2) did not result in detectable

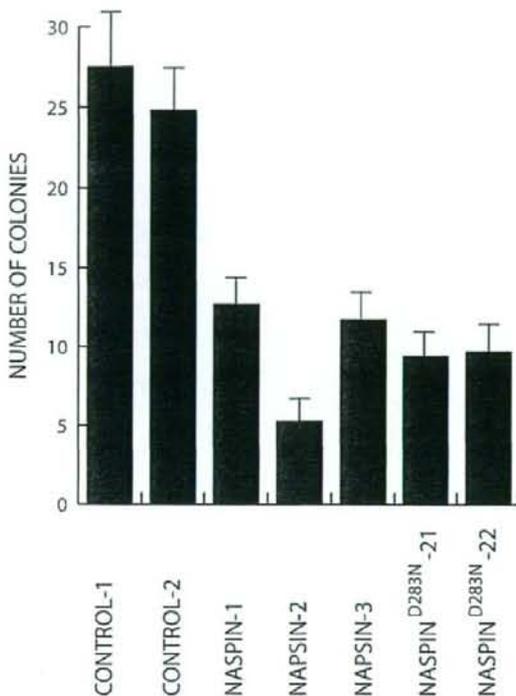


Figure 5 Inhibition of anchorage-independent growth of HEK293 cells by napsin A. Five hundred cells of each clone were suspended in 0.35% soft agar in three replica wells of 12-well plates. After 10 days, colonies with more than 20 cells were counted. All three clones stably transfected with napsin A formed fewer colonies in soft agar than the control cells transfected with vector alone. Both clones expressing napsin^{D283N} formed soft agar colonies with a similar efficiency as cells expressing wild-type napsin A.

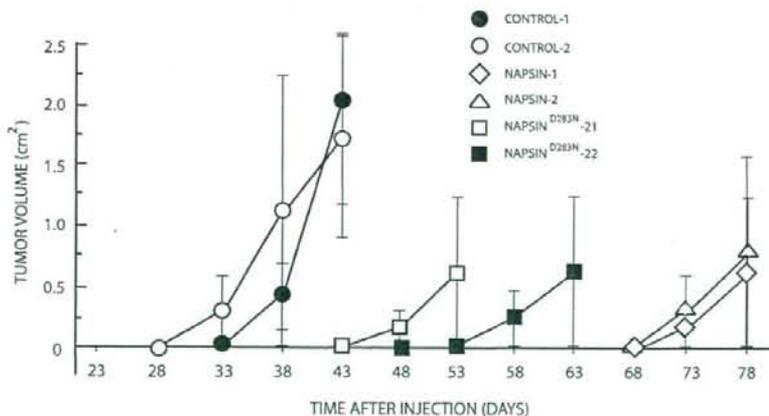


Figure 6 Tumor growth of HEK293 cells in SCID mice. SCID mice were subcutaneously injected with 2×10^6 cells at the dorsal flank. Each group consisted of five mice. Data are mean \pm s.e.m. Cells expressing wild-type napsin A and napsin^{D283N} showed reduced growth of tumors compared with control cells. Animals with large tumors were killed in accordance with local ethical committee regulations.

tumors during the observation period (141 days). Similarly, the napsin^{D283N}-expressing clones formed tumors with delayed onsets (onset: day 46 to day 102). Five injections out of 10 (3 from napsin^{D283N} 21 and 2 from napsin^{D283N} 22) did not form tumors during the observation period. These data show that expression of wild-type napsin A and catalytically defective napsin A delayed tumor formation of HEK293 cells in SCID mice.

DISCUSSION

Napsin mRNA expression is detected in mesonephric tubules of the mouse kidney at embryonic day 13.¹⁹ Expression is observed in proximal convoluted tubules in the mouse¹⁹ and human (this study). Despite the fact that renal cell carcinomas arise mostly from proximal convoluted tubules,²⁶ napsin A mRNA was detected only in one of 29 cases of renal cell carcinoma. This result is consistent with a previous report where no staining of napsin A was observed in 15 cases of renal cell carcinoma by immunohistochemistry.¹⁵ A similar pattern of napsin expression during embryogenesis and carcinogenesis is observed in the lung. Napsin expression is detected at the onset of differentiation of type II cells at embryonic day 15¹⁹ and is maintained in type II cells in the adult.^{11,12} Napsin A is expressed in well-differentiated lung adenocarcinomas, whereas expression is weak in poorly differentiated tumors.^{15,16}

Napsin A has no known role in kidney. The pattern of napsin A expression during development and carcinogenesis raises the possibility that napsin A may have a function in inducing and/or maintaining the differentiated state. We engineered HEK293 kidney cells to express napsin A cDNA. Napsin A is strongly expressed in normal kidney and lung tissue; in the lung, napsin A was originally identified as a strong spot (TA02) on two-dimensional gels²⁷ and kidney

expression has also been reported to be strong.¹⁰ We were therefore not concerned that stably transfected cells would express unphysiological levels of the protein. Napsin A-transfected HEK293 cells had somewhat (10–20%) longer population doubling times compared with vector-transfected cells. Interestingly, when napsin A-expressing cells were grown in three-dimensional collagen gels, they were found to form cyst-like structures. Induction of this phenotype was not dependent on the catalytic activity of napsin A. Although the mechanism(s) involved is presently unknown, this result suggests that napsin A may have a function in the differentiation of kidney epithelial cells.

Napsin A-expressing HEK293 cells showed a reduced capacity for anchorage-independent growth. Furthermore, napsin A-expressing cells formed tumors in SCID mice with a lower efficiency and with a delayed onset. This finding is consistent with an association of napsin A in maintaining a higher degree of differentiation of kidney epithelial cells. The inhibition of anchorage-independent growth and tumor formation was found to be independent of the catalytic activity of napsin.

Previous studies have implicated aspartic proteases in tumorigenesis. Cathepsin D has been shown to stimulate cancer growth *in vitro* and *in vivo*.^{28,29} Downregulation of cathepsin D by antisense methods leads to decreased tumorigenicity of breast cancer cells in nude mice.³⁰ Interestingly, a mutated cathepsin D lacking its catalytic activity stimulates cancer cell proliferation as efficiently as the wild type.⁶ It has been hypothesized that stimulation of cancer growth by cathepsin D is mediated by an as yet unknown receptor.⁶ As the overall structure of napsin A is similar to that of cathepsin D, one possible mechanism of tumor suppression by napsin A is that napsin A may antagonize the growth stimulatory effect of a hypothetical cathepsin D receptor.

The localization of the catalytic mutant was found to be indistinguishable from that of wild-type napsin A. Furthermore, the mutant enzyme was processed and glycosylated in the same way as wild-type napsin A. Different activation mechanisms have been described for aspartic proteases, including autoactivation (pepsinogen³¹), activation *in trans* by other enzyme(s) (prorenin³²) and a combination of auto-activation and assisted cleavage (procathepsin D³³). A previous study showed that purified napsin A does not cleave a 15-amino-acid peptide covering its own propeptide cleavage site.²⁵ This suggested that napsin A is not activated by auto-activation. Our data directly show that processing of napsin A is not dependent on intramolecular autocatalysis, at least not in HEK293 cells.

In conclusion, we showed that napsin A suppressed tumor growth in HEK293 cells independent of its catalytic activity. Further insight into the mechanism(s) involved may help in defining targets for therapeutic intervention in renal cancer. One possible strategy would be to reintroduce napsin A into cells. Other strategies could involve design of drugs or other agents that mimic the activity of napsin A. It is important to

further elucidate the mechanisms of tumor suppression by napsin A to better understand the biology of kidney cancer development.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Vivianne Eklund for technical assistance and Kikki Edwardsson and Cecilia Brodning for assistance with mouse experiments. This study was supported by grant from Cancerfonden, Gustav V Jubilee Foundation, Cancerföreningen in Stockholm and Vetenskapsrådet.

1. Rochefort H, Garcia M, Gloudu M, et al. Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. *Clin Chim Acta* 2000;291:157–170.
2. Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J, et al. Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer* 1999;79:300–307.
3. Scambia G, Panici PB, Ferrandina G, et al. Clinical significance of cathepsin D in primary ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1994;30A:935–940.
4. Nazeer T, Church K, Amato C, et al. Comparative quantitative immunohistochemical and immunoradiometric determinations of cathepsin D in endometrial adenocarcinoma: predictors of tumor aggressiveness. *Mod Pathol* 1994;7:469–474.
5. Liudet E, Garcia M, Rochefort H. Cathepsin D maturation and its stimulatory effect on metastasis are prevented by addition of KDEL retention signal. *Oncogene* 1994;9:1145–1154.
6. Gloudu M, Coopman P, Laurent-Matha V, et al. A mutated cathepsin-D devoid of its catalytic activity stimulates the growth of cancer cells. *Oncogene* 2001;20:6920–6929.
7. Wild PJ, Herr A, Wissmann C, et al. Gene expression profiling of progressive papillary noninvasive carcinomas of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2005;11:4415–4429.
8. Tatnell PJ, Cook M, Kay J. An alternatively spliced variant of cathepsin E in human gastric adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2003;1625:203–206.
9. Mori K, Ogawa Y, Tamura N, et al. Molecular cloning of a novel mouse aspartic protease-like protein that is expressed abundantly in the kidney. *FEBS Lett* 1997;401:218–222.
10. Tatnell PJ, Powell DJ, Hill J, et al. Napsins: new human aspartic proteinases. Distinction between two closely related genes. *FEBS Lett* 1998;441:43–48.
11. Chuman Y, Bergman A, Ueno T, et al. Napsin A, a member of the aspartic protease family, is abundantly expressed in normal lung and kidney tissue and is expressed in lung adenocarcinomas. *FEBS Lett* 1999;462:129–134.
12. Schauer-Vukasinovic V, Bur D, Kling D, et al. Human napsin A: expression, immunohistochemical detection, and tissue localization. *FEBS Lett* 1999;462:135–139.
13. Brasch F, Ochs M, Kahne T, et al. Involvement of napsin A in the C- and N-terminal processing of surfactant protein B in type-II-pneumocytes of the human lung. *J Biol Chem* 2003;278:49006–49014.
14. Ueno T, Linder S, Na CL, et al. Processing of pulmonary surfactant protein B by napsin and cathepsin H. *J Biol Chem* 2004;279:16178–16184.
15. Hirano T, Gong Y, Yoshida K, et al. Usefulness of TA02 (napsin A) to distinguish primary lung adenocarcinoma from metastatic lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2003;41:155–162.
16. Ueno T, Linder S, Elmerberger G. Aspartic proteinase napsin is a useful marker for diagnosis of primary lung adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2003;88:1229–1233.
17. Dejmek A, Naucner P, Smedjebeck A, et al. Napsin A (TA02) is a useful alternative to thyroid transcription factor-1 (TTF-1) for the identification of pulmonary adenocarcinoma cells in pleural effusions. *Diagn Cytopathol* 2007;35:493–497.
18. Hirano T, Auer G, Maeda M, et al. Human tissue distribution of TA02, which is homologous with a new type of aspartic proteinase, napsin A. *Jpn J Cancer Res* 2000;91:1015–1021.
19. Mori K, Kon Y, Konno A, et al. Cellular distribution of napsin (kidney-derived aspartic protease-like protein, KAP) mRNA in the kidney, lung and lymphatic organs of adult and developing mice. *Arch Histol Cytol* 2001;64:319–327.

20. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, *et al*. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 1989;77:51–59.
21. Lin S, Phillips KS, Wilder MR, *et al*. Structural requirements for intracellular transport of pulmonary surfactant protein B (SP-B). *Biochim Biophys Acta* 1996;1312:177–185.
22. McCormack FX, Damodarasamy M, Elhalwagi BM. Deletion mapping of N-terminal domains of surfactant protein A. The N-terminal segment is required for phospholipid aggregation and specific inhibition of surfactant secretion. *J Biol Chem* 1999;274:3173–3181.
23. Holzinger A, Phillips KS, Weaver TE. Single-step purification/solubilization of recombinant proteins: application to surfactant protein B. *Biotechniques* 1996;20:804–806, 808.
24. Graham FL, Smiley J, Russell WC, *et al*. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36:59–74.
25. Schauer-Vukasinovic V, Bur D, Kitas E, *et al*. Purification and characterization of active recombinant human napsin A. *Eur J Biochem* 2000;267:2573–2580.
26. Shen SS, Krishna B, Chirala R, *et al*. Kidney-specific cadherin, a specific marker for the distal portion of the nephron and related renal neoplasms. *Mod Pathol* 2005;18:933–940.
27. Okuzawa K, Franzen B, Lindholm J, *et al*. Characterization of gene expression in clinical lung cancer materials by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1994;15:382–390.
28. Garcia M, Platet N, Liaudet E, *et al*. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Stem Cells* 1996;14:642–650.
29. Berchem G, Glondu M, Gleizes M, *et al*. Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps *in vivo*: proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene* 2002;21:5951–5955.
30. Glondu M, Liaudet-Coopman E, Derocq D, *et al*. Down-regulation of cathepsin-D expression by antisense gene transfer inhibits tumor growth and experimental lung metastasis of human breast cancer cells. *Oncogene* 2002;21:5127–5134.
31. Tang J, Wong RN. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J Cell Biochem* 1987;33:53–63.
32. Hsueh WA, Baxter JD. Human prorenin. *Hypertension* 1991;17:469–477.
33. Larsen LB, Bolsen A, Petersen TE. Procathepsin D cannot autoactivate to cathepsin D at acid pH. *FEBS Lett* 1993;319:54–58.

Prolonged neutropenia after dose-dense chemotherapy with pegfilgrastim

In the dose-dense (DD) chemotherapy trial result reported by Piedbois et al. [1], they found more hematological toxicity leading to treatment discontinuation in the pegfilgrastim supported DD chemotherapy arm. The manufacturer's product information for pegfilgrastim indicates that it should be used once per chemotherapy cycle and should not be used in the period between 14 days before and 24 h after administration of cytotoxic chemotherapy, which is not practically possible in DD chemotherapy. Although pegfilgrastim has not been approved in Japan, we observed an episode of prolonged neutropenia in a Japanese patient who had undergone DD doxorubicin plus cyclophosphamide (AC) neo-adjuvant chemotherapy in the United States before being referred to us to continue chemotherapy then perform resection.

She was a 48-kg female in her mid-30s who presented at the Ithaca Medical Group clinic (New York) with locally advanced breast cancer. She underwent four cycles of DD AC, with pegfilgrastim 6 mg s.c. on day 2 of each cycle. Her absolute neutrophil count (ANC) was 2350/mm³, 3650/mm³, 4150/mm³, and 7300/mm³ at the start of the each cycle. After the fourth AC cycle, she was referred to us for further chemotherapy. ANC at day 20 of the fourth AC cycle was 3300/mm³ but decreased to 500/mm³ on day 26. Therefore, we had to postpone chemotherapy. Two weeks later (1 week after the last dose of filgrastim), the patient's ANC recovered to 1500/mm³ and she received the first cycle of docetaxel (100 mg/m²). She had received a total of 14 administrations of filgrastim starting from day 3 of the first cycle of docetaxel and had been severely neutropenic from day 7 (300/mm³) to day 22 (300/mm³). Her ANC on days 29 and 36 were 600/mm³ and 1100/mm³, respectively. Due to prolonged neutropenia, we decided to proceed to surgery. The patient has completed weekly paclitaxel as adjuvant chemotherapy, begun 3 months after the last docetaxel, with no major hematological toxicity.

Serum pegfilgrastim remained elevated in some patients even 14 days after the administration [2] and this seems dependent on weight-adjusted dose [3]. Chemotherapy administration during this period may very well cause more bone marrow suppression. It is possible that a 6-mg dose of pegfilgrastim is too large for Japanese patients in general. In our patient, the elevated ANC (3300/mm³) on day 20 and grade 4 neutropenia on day 26 suggests that the effect of pegfilgrastim lasted at least 3 weeks. We therefore

caution against the routine use of pegfilgrastim in DD chemotherapy until an optimal dose in this setting is ascertained, especially for low-weight patients. We strongly recommend that the European Society of Medical Oncology warns oncologists against the routine use of pegfilgrastim in DD chemotherapy, which is not an indication approved, and in which situation the drug has never been formally tested for optimal dosage. Such a recommendation would be particularly effective if made through the *Annals of Oncology*, given that this journal is well known and influential publication for clinical oncologists worldwide.

H. Ishiguro^{1*}, T. Kitano², H. Yoshibayashi³, M. Toi³, T. Ueno³, H. Yasuda¹, K. Yanagihara², C. L. Garbo⁴ & M. Fukushima¹

¹Department of Clinical Trial Management/Outpatient Oncology Unit, Translational Research Center, ²Department of Translational Clinical Oncology/Outpatient Oncology Unit, ³Department of Breast Surgery, Kyoto University Hospital, Kyoto 606-8507, Japan, ⁴Ithaca Medical Group, Ithaca, NY 14850, USA

(*E-mail: hishimd@kuhp.kyoto-u.ac.jp)

references

- Piedbois P, Serin D, Priou F et al. Dose-dense adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer: docetaxel followed by epirubicin/cyclophosphamide (TEC), or the reverse sequence (ECT), every 2 weeks, versus docetaxel, epirubicin and cyclophosphamide (TEC) every 3 weeks. AERO B03 randomized phase II study. *Ann Oncol* 2007; 18: 52-57.
- Green MD, Koelbl H, Baselga J et al. A randomized double-blind multicenter phase III study of fixed-dose single-administration pegfilgrastim versus daily filgrastim in patients receiving myelosuppressive chemotherapy. *Ann Oncol* 2003; 14: 29-35.
- Johnston E, Crawford J, Blackwell S et al. Randomized, dose-escalation study of SD/01 compared with daily filgrastim in patients receiving chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2522-2528.

doi:10.1093/annonc/mdn051

Published online 5 March 2008

がんバイオマーカー 研究の現状と展望

近畿大学 医学部 ゲノム生物学教室 教授

西尾 和人

京都大学大学院 医学研究科
外科学講座 乳腺外科学 教授

戸井 雅和

協和発酵工業株式会社 医薬研究センター
薬理研究所 がん薬理グループ マネジャー

塩津 行正

司会) 財団法人癌研究会
癌化学療法センター 所長

鶴尾 隆

鶴尾——本日はお忙しい中お集まりいただき、ありがとうございました。これから「がんバイオマーカー研究の現状と展望」という内容で、ヒューマンサイエンス振興財団の座談会を始めさせていただきたいと思っております。

バイオマーカー研究は、最近非常に盛んになってきて、その必要性が謳われています。抗がん剤におきましても、その開発あるいは臨床応用の面でも注目されております。また、バイオマーカー研究は、これからの新薬の開発に非常に必要なツールではないかと思っております。このような背景から、本日は近畿大学の西尾先生、京都大学医学部附属病院の戸井先生、それから企業から協和発酵工業株式会社の塩津先生にお集まりいただき、バイオマーカーとはどのようなものであるか、どのような研究が進んでいるか、さらにはその将来の研究、開発におけるインパクト等についてもお話していただければ幸いです。

バイオマーカーとは

鶴尾——まずはバイオマーカーの定義、分類について、西尾先生に話していただきたいと思っております。

西尾——バイオマーカーという言葉は古くからありますが、臨床で使われるようになってから特に重要になってきて、いくつかのグループによって定義の試みがなされてきました。代表的なものがFDA (Food and Drug Administration) のバイオマーカーのdefinitionワーキンググループによる定義で、“バイオマーカーは正常な生物学的過程、発病の過程、もしくは治療介入による薬理学的反応を反映する測定及び評価可能な特性”であると思っております。ヒューマンサイエンス振興財団のワーキンググループでも、バイオマーカーを日本において定義しようとしているように聞き及んでお

ります。

鶴尾——バイオマーカーにはどのようなものがあるかについては、後ほど各論で触れさせていただきたいと思っております。

研究開発における バイオマーカー導入の背景

鶴尾——バイオマーカーは薬の研究、あるいは開発に重要であるということは一般的な認識であると思っております。バイオマーカーの研究が進んできた、あるいはこのような概念が導入されてきたのはFDAの力が非常にあったからだと思います。塩津先生にバイオマーカー研究の導入の背景について、研究開発における重要性ということも含めましてお話いただければと思います。

塩津——近年、製薬企業がバイオマーカーを導入しようとしてきた背景というのは、薬剤のパイプラインの不足と成功率の低下が最大の理由ではないかと思っております。パイプラインが不足しており、その成功率も低下しているということがその一つの大きな要因として挙げられます。薬剤開発は、フェーズⅠ、フェーズⅡ、フェーズⅢと進んでいくに従ってコストがかかりますが、臨床開発が後期に進むほど開発コストが上昇するにも関わらず、全体としての成功率が下がってきたことがバイオマーカー導入の非常に大きな要因ではないかと思っております。そのような背景で、2004年にFDAからInnovation or Stagnationというタイトルのレポートが提出され、その後2006年に続報としてCritical Path Opportunity Reportが提出されました。これら二つのレポートの中で、幾つかの問題提言がなされていますが、その大きな方向性として、薬剤開発を合理的に進めるために取り組むべきこととして、具体的には六

つのテーマに関して提言がなされております。その中で最も強調されていることが、バイオマーカーの有効利用で、その次に言われていることが臨床試験の合理化です。これは、基礎研究の進歩に比べると臨床研究は旧態依然としていて進歩が少なく、非合理的な進め方がされているためと言えます。それ以外にもいくつかのポイントが提言されておりますが、バイオマーカーを有効利用して臨床開発を合理化することによって確率を高めることがSTAKEHOLDER（患者・医療関係者・製薬企業）にとって重要であることが認識されつつあり、近年、非常に注目されております。バイオマーカーを有効利用することによって、薬剤に感受性が非常に高い患者さんを集めて治療することが可能となりますし、裏返せば恩恵を蒙らない患者さんに投与しないで済みますし、あるいは有効性を高めるのに最適な投与スケジュールを決めたりすることが可能になってくるであろう、といった将来性も注目されている理由です。

鶴尾——アメリカではFDAが最初のスタートであったということですが、アメリカでは応用を含めて、新薬の研究開発において使っていこうというのは明白になっていて、実行されているということですね。

塩津——はい。バイオマーカー研究はアメリカで先行していると言えます。私の所属する協和発酵ではバイオマーカーを活用しながら、新規メカニズムの抗がん剤を開発しています。具体的にはFLT3キナーゼ阻害剤（KW-2449）やHsp90拮抗薬（KW-2478）や抗CCR4抗体（KW-0761）などといった分子標的薬の治療において、バイオマーカーを使って患者さんを選択したり、薬剤が患者さんの体内で作用していることを指標に、臨床試験を進めております。

薬効を予測するバイオマーカー

鶴尾——バイオマーカーにはいろいろな側面からのアプローチの方法があると思いますが、一番重要なのは薬効です。薬効を予測するバイオマーカー、いわゆるefficacyバイオマーカーというものがあると思います。これは先ほどもお話があったと思いますが、その延長上でいろいろなバイオマーカーが研究されていると思います。最初に薬効を予測するバイオマーカーについて各論的にお話を伺いたいと思います。まずは、チロシンキナーゼ阻害剤ですが、この領域の薬が非常に多く開発されております。そのバイオマーカーについて西尾先生に解説していただきたいと思います。

西尾——チロシンキナーゼ阻害剤には、腫瘍を標的とするものと、血管新生の小分子化合物があります。ここでは腫瘍を標的とするもの、いわゆるEGFR（epidermal growth factor receptor）に対するチロシンキナー

ゼ阻害剤、あるいはc-kit等に対するメシル酸イマチニブといった薬剤に対するマーカーが念頭にあると思います。肺がんに対してEGFR-TKI（EGFR-tyrosine kinase inhibitor）、ゲフィチニブ、あるいはエルロチニブ等がありますが、当初はバイオマーカーははっきりしませんでした。EGFRを標的としていますので、EGFRの発現量、あるいはリン酸化の状態を免疫染色で見て、それらと効果との関係を見てきました。その後、2004年にEGFRの遺伝子変異、あるいはメシル酸イマチニブに関してはc-kitの遺伝子変異が明らかになり、それは腫瘍特異的、いわゆる体細胞変異で、そういったものが感受性と強く関係することがわかってまいりました。例えばゲフィチニブの場合、EGFRの変異のある肺がんにおきましては約80%の奏効率を示すという事例があり、強力な効果予測バイオマーカーであるということがわかりました。現在このようなマーカーを用いていかに患者さんを選択していくかという方向で、臨床的にも考えられていると思っております。もう一つ重要な点は、メシル酸イマチニブ、あるいはEGFR-TKIの例にありますように、新たな変異が起こることによって耐性になる、すなわち遺伝子の変異が、高い感受性のみならず耐性にも関わっているということもあります。それは耐性のマーカーであります。メカニズムが明確で耐性になったものに対して効果を表そうという新たな戦略が、創薬の分野でもなされております。実際、例えばメシル酸イマチニブに対する耐性を克服するような次世代のkinase inhibitor、あるいはゲフィチニブ、エルロチニブの耐性を克服するような薬というものが臨床的にも開発される時代になってきていると思います。

鶴尾——この研究で、ヒトの細胞レベルでDNAに変異があることが高感受性につながるということがクリアに証明されましたが、日本で先行してできなかったことを非常に残念に思います。私も同じような研究をしておりましたが、発表されたデータが非常にきれいなデータなので驚かされました。先ほどおっしゃったように、変異が場合によっては耐性に結びつくということから新しい薬を開発する動きがあります。これは大きな動きであり、サイエンスという面からも非常にきれいにストーリーができつつあると思います。もう一つ新しい分子薬剤として注目されているものに血管新生阻害剤があります。これもいろいろなバイオマーカーが研究されつつあり、新しい薬の開発アプローチというものがあると思いますが、いかがでしょうか？

西尾——我が国でベバシズマブが上市されて臨床的に使えるようになったこと、あるいはたくさんの血管新生阻害剤が開発中であるということで、当然我が国においてもバイオマーカー研究の必要性が叫ばれています。しかし、海外において、ものすごく進んでいるか

という、そうでもないような気がいたします。それは何故かと考えてみますと、先ほどのチロシンキナーゼ阻害剤の効果予測のマーカーを遺伝子変異で予測できるというのは腫瘍での体細胞変異でありまして、一方、血管新生阻害剤の相手をしているのは腫瘍血管です。腫瘍そのものを相手にしているのではなくて、正常細胞からなる血管・微小環境といったものの変化の中で感受性を明確に示すバイオマーカーを探すのはなかなか難しいというのが前提にあります。一般的には血管密度を測定したり、あるいはmolecular imagingで血管の状態、腫瘍の状態を把握しよう、その代理マーカーとして血管新生に関係するようなケモカインやサイトカインといったようなもの、あるいは血管の状態を反映するような、例えば低酸素で誘導される因子を見ようといった探索的なアプローチが進んでいるということでもあります。このような研究が盛んですが、臨床上で患者さんのお薬の選択に使えるようなマーカーは、これからでてくると認識しております。そして、流血中の末梢血の細胞を使ったアプローチは臨床上使いやすいという観点から、今非常に注目されている血管新生のバイオマーカーの一つと考えております。

鶴尾——血管新生というのは実際に成功した分子標的薬剤があるということで非常に注目されております。

しかし、おっしゃるように内皮細胞以外に間質などいろいろな問題があります。組織のmicrobial environmentが絡んでいるということで、研究として未熟な段階にあるという理解でよろしいでしょうか。

西尾——その通りです。言い忘れましたが、臨床的なマーカーといいますが、例えばベバシズマブといった血管新生の薬と抗がん剤との併用で効果があるという点が特徴的ですので、併用効果があるものとないものを区別するようなバイオマーカーといった側面からのアプローチも必要と考えています。

鶴尾——基礎的にはそういったバイオマーカーが研究されているということですが、臨床でバイオマーカーがどういう重要性があるか、あるいはどういったところで使われているのかということも大事であると思います。それが進んでいる領域として乳がん治療があり、実際、バイオマーカーが臨床、治療にも使われております。戸井先生、臨床治療におけるバイオマーカー、さらにホルモン療法や化学療法予測ということにも触れていただきたいと思います。

戸井——乳がんには現在、二つの主要な分子標的治療薬があります。一つは非常に長い歴史を持っておりますホルモン療法です。これはホルモンの受容体をターゲットとしたものです。タモキシフェンが出てから30

年ほど経過しておりますので、分子標的治療薬としては30年の歴史を持っていることになります。もう一つは抗HER2療法で、これは臨床的に10年弱の歴史です。この二つはいずれも予め標的を選択して、ホルモン療法の場合はエストロゲン受容体陽性の乳がん、乳がん全体の6~7割、抗HER2療法の場合はHER2陽性の15~20%の乳がんだけを対象とした治療法で、完全に臨床に導入されています。従いまして、先ほどお話のありましたような、予め選択をしほって治療法を開発するという意味では既にそれが実践されているがんということになります。最近では更に、例えばOncotype DX[®] といった21遺伝子signatureも加わり、その中をさらに細かく切り分けていくという作業も臨床レベルで行われるようになりました。

鶴尾——歴史的にトラスツマブ、あるいはタモキシフェンというのは、バイオマーカーという、現在ほど強い認識がなかった時代から先行して実際に臨床に使われていたということですね。そしてきれいな治療戦略の中に組み込まれていると考えてよろしいですね。

戸井——そうですね。その背景にありますのはバイオマーカーのアクセシ系です。再現性の高い鋭敏なアクセシ系を開発することで、そのような臨床展開が可能になった側面があるかと思えます。

鶴尾——これが成功したということは、測定系がきれいなものであって、それが臨床のbed sideで使えるということですね。乳がんでHER2やホルモン受容体を測定して云々ということに対しては、現在研究が進んでいるバイオマーカーが将来到達しなくてはならない道程ということになりますね。

戸井——はい。

鶴尾——先ほどおっしゃった遺伝子のsignatureということに関しては、現在、発現解析などいろいろなものが出てきております。また、論文上でも有効性を予測するものについて、乳がん領域においてはかなり信頼性のあるsignatureができつつあると理解してよろしいでしょうか。

戸井——はい。ある程度既存のbiologicalデータに基づいて作られたsupervised signatureと、unsupervisedで選択されたsignatureと二つありますが、21遺伝子signatureは前者、MammaPrint[®] は後者になると思います。更に、三つ目として、最近乳がんstem cellのsignatureというものが出てきました。これは乳がんstem cellと考えられる細胞分画をもとに作られたsignatureです。Oncotype DX[®] やMammaPrint[®] は既に臨床に導入されており、化学療法をやるかやらないかというcriticalなところのdecision makingに使われております。

鶴尾——論文上で見させていただきますと、先ほどおっしゃっていただいたものは実際に使われていることを目にしますが、非常に米国の動きはダイナミックで、



鶴尾 隆

日本はついていけないという気がいたします。

戸井——そうですね。21遺伝子signatureの中でも日本でクローニングされたものが入っておりますから、その辺は残念な気がいたします。

鶴尾——このように、乳がんはバイオマーカーの研究の成果が臨床まで結びついていて、新しい治療戦略がいろいろと作られつつあると理解してよいと思います。代表的なバイオマーカーとして基礎から二つ、あるいは臨床で乳がんについてお話をさせていただきましたが、それ以外にもいろいろなバイオマーカーがあると思います。一つは例えばモニタリングバイオマーカーといったもの、CEA (carcinoembryonic antigen) やHER2のECD (extracellular domain) などがあると思います。戸井先生、この中で臨床的に使われているモニタリングのバイオマーカーについてお話をいただけますと幸いです。

戸井——モニタリングをしようということで、特に標的治療の抗HER2療法の動きをダイナミックに調べるための細胞外のフラグメント測定にはいろいろなものがあります。それらを血清レベルで検出して効果をみるという試みがありますが、まだ完全に臨床導入される段階までには到っておりません。ただ、いくつか有用性を示すデータは既にあります。それから抗体療法に関しましては、違う観点ですが、抗体に対するABCCに注目した動きも出てきています。

鶴尾——それからもう一つ私がサーチした範囲では、surrogate tissue analysisによるバイオマーカーというものがあります。西尾先生、これについての研究の状況がどういうものであるかということについてコメントしていただければと思います。

西尾——STAと略されるsurrogate tissue analysisというのは、代理組織による解析です。代理組織というものはさまざまありますが代表的なものとして末梢血があります。その利点は患者さんに負担がかからないこと、また、ほとんどの患者さんで採取することができることです。特に肺がんのような、生検サンプルを取るのが困難な症例において、血液で解析できれば良いだろうという臨床側の強い希望があります。臨床試験においては、バイオマーカーの意義を検討する場合に、やはりfeasibilityの問題が大きくありまして、肺がんの場合、組織を採って遺伝子の解析をしますと平均的には20%くらいしか採取できません。がん種によって違いますが、20%解析したpopulationだけで全体を説明して良いのかという問題があります。具体的には流血中に漏れ出てきた腫瘍由来のDNAや後から話題になるcirculating tumor cellという、流血中にあるがん細胞を測定、解析するというアプローチです。我々は流血中のEGFR変異を高感度アッセイ系で見るということを試みてきました。同様のアプローチ

は、例えば肺がんにおける末梢血のRas遺伝子変異といったものが、保険適用される検査として実施されています。STAは、海外でもバイオマーカーのシンポジウムでセッションとして取り上げられる状況を考えますと、実用に近い、臨床に優しい、患者さんにも優しいアプローチとして、注目されている分野になるかと思っています。

鶴尾——確かに血液を材料にするということで、それがうまくいった場合にはインパクトも大きいですし、患者さんには非常に優しい方法であると思います。ただし、surrogateということで、その有用性についてはこれからかなり詰めていかないといけない、また、いろいろな局面があると理解してよろしいでしょうか。

西尾——おっしゃる通りで、例えばmutationを見る場合、末梢血だけを見て真の値、真のmutationの有無を判断するという事は、もともとある原発巣をどれだけ反映しているのかということを検証していなければ難しいです。そういった検証の難しさは新しい問題点です。また、腫瘍組織でもそうですが、擬陽性という問題がありますので、こういった検査を臨床に持っていく時には、sensitivityやspecificity、アッセイ系自身のqualityが再度問われるような状況にあると思います。その上でしっかりと臨床試験で腫瘍そのものを探るのと同様の、あるいはそれより優れた成績を示すということが、今後必要とされることであると思います。

鶴尾——研究と、その応用も含めて将来楽しみな一つのバイオマーカーということかもしれませんね。もう一つ最近お話を聞いて驚いたことは、CTC (circulating tumor cell) というもので、血中に腫瘍がある程度回っていて、一定量の中に何個がん細胞があったら予後が推定できるか、といった話があることです。こういった研究は、例えば乳がんの領域ではどのようなになっているのでしょうか。

戸井——先ほどと同様米国の話になってしまいますが、米国では既に臨床応用の段階で、一般応用されつつあります。原発性の乳がんはサンプリングは比較的容易ですが、再発性の乳がんの場合サンプリングは非常に困難です。その中で、血液の中からがん細胞が検出できるというのは重要なことだと思います。再発性の乳がんの場合、概ね40%程度の患者さんで10cc弱の採血に対して数個レベルのCTCを検出できます。CTCが出ているものは、出ていないものと比較すると予後が不良です。治療の効果によってCTCの数が減った場合は予後が良くなるというダイナミックな予測ができるということで、ここ最近注目度が増えています。また、採血の量は多くなりますが、原発の乳がんにも利用し



西尾 和久

ようという動き、あるいは検出される腫瘍細胞を更に細かく分析しようという試みが同時に進んでいます。

鶴尾——乳がんに限らず、他のがんでもこういったアプローチはなされていると考えてよろしいでしょうか。

戸井——大部分のがん種でやられております。例えば前立腺がんでは、報告によりますとCTCの数が多いというデータがあります。

鶴尾——西尾先生には先ほど血管新生についてお話していただきましたが、血液中の血管内皮細胞もバイオマーカーの一つとして考えられているかと思えます。そこで、現在の状況についてお話していただきたいと思えます。

西尾——臨床面に関しましては戸井先生に補足していただきたいと思えますが、血管新生阻害剤のバイオマーカーとしてCEC (circulation endothelial cell) やEPC (endothelial progenitor cell) は非常に注目されております。例えばCECやEPCの数が投与前後で変化することは血管新生阻害剤として作用しているということであるというproof of conceptのための臨床試験が数多くされています。もともとCECあるいはEPCの数が多い方が、血管新生阻害剤が効くであろうというデータも出ています。しかしながら、それがどれくらい確固たる患者さんの薬の選択まで持っていけるかについては、現在、種々の血管新生阻害剤で検討されているところですが、例えば国立がんセンター中央病院の肺がん症例であります、カルボプラチンとパクリタキセルを投与した群でCEC、EPCの数によりレスポンスが異なっているというデータが出つつあります。そういった面で今後期待されるべきものであると考えております。臨床的な側面や予後診断の側面について、戸井先生に補足していただきたいと思えます。

戸井——バイオロジーそのものの研究と言いますか、ヒトにおけるダイナミズムについての研究が進んでいるのだと思えます。従ってCTCのように直ちに臨床応用されるかという点では少し違うかも知れません。技術的にもCTCの場合にはしっかりとしたプラットフォームができており、そちらを使うと再現性の高いデータが出るのですが、CECの場合は多数のチャンネルが必要です。ただ、欧州等では、組織的に、がんだけではなくいろいろな血管に関わる成人病を含めて、幅広い角度からCECあるいはEPCの解析が行われるようになってきました。がんにつきましては、血管新生阻害剤の予測性が一番注目されております。特にEPCの部分です。さらに抗がん剤のリバウンドによるEPCの誘導も興味を持たれています。抗がん剤によりがんは一過性に減少しますがまた増えてくる場合もしばしば

です。その耐性のメカニズムの一つにEPCの誘導というのに関係していると考えられています。

鶴尾——これも楽しみなバイオマーカーの一つで、おそらく血管新生の阻害剤の研究と並行して有用性が分かってくると思います。それから、最近文献的に見ておもしろいと思ったバイオマーカーがあります。抗がん剤というのは細胞死を誘導するわけですが、細胞死のバイオマーカーで効果を予測しようというものがありません。乳がんの領域でも結構ですが、これについて少しお話をいただけたらと思えます。

戸井——細胞死に直接関連するマーカー、特にサイトケラチンのフラグメントに標的を当てた検討が行われています。古くはヌクレオソームを対象に行われましたが、上皮系のがんに特異的という点では不満足でありました。その後、M30やM65というようなサイトケラチンのbreak down productあるいはアポトーシスよりもっと広い細胞死を検出できる測定系が出てきました。ELISAがベースとなっていますので、比較的容易にヒトのサンプルを使った解析ができる利点があります。In vitroにおいては抗がん剤による細胞死を定量的に検出可能です。ヒトでも試験が行われていますが、ヒトでの抗がん剤によるアポトーシスのピークは1日前後という結果も出ています。いろいろな意味で重要ではないかと思えます。

PDバイオマーカー

鶴尾——薬効を予測するバイオマーカー以外に、PD (pharmacodynamics) バイオマーカーというのをごぞいます。これは薬の開発上いろいろな面で研究されているバイオマーカーだと思います。塩津先生はこの領域がご専門だと思いますので、お話していただきたいと思えます。

塩津——PDバイオマーカーについて、実際に前臨床の試験結果をどれくらい臨床に取り入れてきたかを、いくつかのお薬について紹介していただきたいと思えます。まず一つはプロテアソーム阻害剤のボルテゾミブという薬があります。これはfirst in classのプロテアソーム阻害剤として2003年に米国で先に承認され、2007年に日本でも承認された薬です。対象は多発性骨髄腫の患者さんで、患者さんに対する臨床投与スケジュールは週に二回、しかも3~4日の間歇投与で、多くは四回投与です。この薬剤は非常に不思議な投与スケジュールであると私自身思い、いくつか調べたことがございます。もともとターゲットであるプロテアソームを阻害することが薬効なのですが、副作用として消化器系に対する毒性や骨髄抑制作用が出てくることが、前臨床の試験で分かっていました。もう少し具体的に説明すると、複数の動物試験で末梢リンパ



戸井 雅和

球中で80%以上のプロテアソーム阻害作用を有する用量では、MTD (maximum tolerable dose: 最大耐用量) を超えるような閾値になってしまいます。その結果を活用して、ヒトの末梢血中のプロテアソーム阻害活性を測ることによって、何ミリigramのところでプロテアソームの阻害が出て何ミリigramでMTDとなるかといった、標的阻害であるPDマーカーと投与スケジュールを解析する研究が行われておりました。この薬の血中半減期は非常に短く10~20分です。それにも関わらず末梢血中のプロテアソーム阻害というのは3~4日継続するといったことがヒトの臨床試験およびGLP毒性試験等でわかっております。初期臨床試験でもPDマーカーを用いて投与量との関係を解析した結果、1.3~1.9mg/m²程度で80%のプロテアソーム阻害を有することや、更にその作用は72時間程度持続することがわかりました。このような検討結果を重ねてヒトでの投与を1.3mg/m²とし投与間隔を週に二回(3~4日間で間歇投与)とするという臨床投与スケジュールを決定してきたというのが一つの例として挙げられます。それ以外にもう一つ、チロシンキナーゼ阻害剤の場合、1日一回のスケジュールのものとは1日二回のもの、中には1日三回にするものがあります。これもPDマーカーを用いて標的阻害を持続的にすることが理由として挙げられると思います。低分子薬剤の血漿中の半減期は薬剤に依って異なりますが、チロシンキナーゼ阻害剤は持続的な標的阻害が薬効発現に重要であると考えられています。その様なことから、血中薬剤濃度のトラフ (trough) のレベルで、標的がきちんと阻害されているかを前臨床で検討して、それを人の臨床試験でも外挿できるか実際の臨床試験に取り入れながら投与スケジュールを決めているということが、いくつか薬で検討されております。PDマーカーにおいても、cytotoxicityを主薬効とした薬剤ではできなかったことが、分子標的薬になって初めてできるようになった部分がかかなりあると思います。今後、臨床試験、あるいは前臨床試験で検討した結果を臨床試験に持っていくトランスレーショナルリサーチ的なことが現実に行えるような時代になって、薬効バイオマーカーとPDマーカーとをうまく組み合わせることによって成功確率を上げることができるようになると思います。

鶴尾——それは素晴らしい研究であると思います。私の過去の経験でも臨床でどのような投与スケジュールがベストであるかというのは、必ずしも論理的には進んでいなかったと思います。経験や臨床成績で反映させるということで、経験的なことを経て投与スケジュールがあったと思います。塩津先生から先ほどご紹介がありましたが、PDからそういったものが決まってくると可能性があるということは素晴らしいことです。基礎的な前臨床研究が臨床へ大きなフィードバックを

与えるようなバイオマーカーが研究されつつあるということで、将来薬の開発では重要な位置を占めると思っています。よろしいのでしょうか。

塩津——我々もその部分はとても重要なポイントであると思っています。特に分子標的薬を評価する場合、それが非常に重要になってきますので、キナーゼ阻害剤やプロテアソーム阻害剤だけでなく、HDAC (histone deacetylase) 阻害剤や一部の抗体医薬に関しても、標的阻害がどれくらい持続するかということとその深さ (efficacy) が投与量、あるいは投与スケジュールを決めることの根拠になってくると思います。

安全性バイオマーカー

鶴尾——それからもう一つ、安全性バイオマーカーというものもあります。これは最近遺伝子解析研究が進んでまいりまして、SNPsの情報等いろいろと集まってきました。これらを利用して薬の安全性を担保していこうという研究が進められていると思います。これについて塩津先生に解説していただきたいと思っております。

塩津——安全性バイオマーカーで一番有名なのは塩基多型です。塩基多型で薬剤の曝露が変わってしまうことがいくつかの薬で知られています。最も有名なのはトポイソメラーゼを阻害する塩酸イリノテカンであると思います。UTG1A1*28という薬代謝酵素の個人差によって薬剤の曝露がかなり変わり、それが有効性、あるいは消化管毒性に結びついているということが分かっています。ただしこれは実際に臨床をやってから分かってきた後付けの解析というイメージがあります。そういった観点で我々製薬企業としても個々の薬剤、特に低分子薬剤の場合、その主代謝酵素は何であるか、それに対する遺伝子多型、SNPsの部分がどれくらい影響しているかについての解析を事前にして、できるだけ課題の少ないお薬が臨床試験を進める戦略を取るようにしております。それ以外にも肺障害などの毒性発現のメカニズムに関する研究は多数されていますが、残念ながらバイオマーカーという形で公に認識されているものは未だありません。

鶴尾——恐らく企業にとっては安全性ということで、このバイオマーカー研究は非常に重要な位置付けになると思います。これからは、薬効、PD、安全性のバイオマーカーの研究がグローバルに進んでいくと理解しております。



塩津 正

バイオマーカー研究のインパクト

鶴尾——バイオマーカー研究は、企業の開発戦略上、あるいは治療戦略上、医療経済にいろいろなインパクトを与えたと思っています。最後に、バイオマーカー研究のインパクトについて先生方からお話していただこうと思います。まず企業から見まして、開発戦略上バイオマーカー研究のインパクトは何か、将来何が期待できるかということについて、塩津先生にお話ししていただきたいと思います。

塩津——これまで先生方にお話しいただきました薬は、ほとんどのケースが分子標的薬であると思っています。ですので、分子標的薬において薬効を予測するバイオマーカーを予めある程度持っていることは、製薬企業が薬を開発していく上で非常に重要なポイントだと考えております。その最大の理由は、レスポンドの患者さんを濃縮することによって、成功率を高めることができるためです。患者さんを集めることによって、患者さんのpopulation、市場が小さくなるように見えることもあります。患者さんを短期間に集めることによって開発のコストや期間等も短縮することができるのではないかと思います。実際にトラスツマブの例でもその解析は行われているようで、HER2 positiveの場合とnegativeの場合で開発のコスト、期間等かなり差があったと論文にも出ておりました。逆の観点から言いますと、先ほど西尾先生がおっしゃったようなproof of conceptを目指して、ターゲット阻害をすることによって薬効を示すような患者さんを集めたにも関わらず、何のレスポンスも出なかった場合、多分その薬の未来は考えにくいと言えます。つまり、それ以上投資してもfailすることが分かっていますから、コストが高い後期の臨床試験へ進まなくて済みます。このような観点で、私個人としてもfail fastという考え方を持っています。早めに有効性の高そうな患者さんを選択できるという意味で薬効のバイオマーカーと、先ほど述べたようなPDバイオマーカーでより良いスケジュールを用いて、合理的に臨床試験へ進めることが大事ではないかと思います。

鶴尾——既に戸井先生には治療戦略上のインパクトについても触れていただきました。現在、あるいはこれからバイオマーカー研究が治療戦略上に与えるインパクトとして個別化医療が言われておりますが、そういった内容も含めてお話ししていただきたいと思います。

戸井——乳がんは、先ほどもお話したように大分個別化されておまして、個別化医療は一般臨床に導入されております。バイオマーカーを新たに導入できるプラットフォームは既にでき上がっていると思います。今の臨床開発は複合戦略であり、予後因子、あるいは効果予測因子、モニタリングマーカー、PD、PGx

(pharmacogenomics) など全てうまく取り込みながら進めていく戦略です。例えばPGxでは、CYP2d6のSNPsによってタモキシフェンをtailoringするというようなことも臨床にきています。また、この点について興味深いことは、SNPsのパターンが欧米人と東洋人とかなり違うということです。従って、欧米人のデータをそのまま東洋人に応用はできません。Globalな開発といっても地域性や民族性も重要であるということも示しております。そして、もう一つ重要な動きは、臨床試験の中で前向きにバイオマーカーを解析しているという動きです。トラスツマブの開発ではアジュバントの大規模試験が行われましたが、その際腫瘍サンプルをバンクとして保存することが行われました。人類の共通した財産として30年間保存するというプロジェクトです。ただ、解析はレトロスペクティブです。その次の世代の薬剤では薬剤の臨床検討と同時にプロスペクティブにバイオマーカー解析が行われております。

鶴尾——現在もそうですが、これからの薬の研究、臨床研究、臨床開発というのは、こういった情報を入れながら進められていくと思います。流れは大きく変わってきましたが、それについていけないといけません。こういった研究は日本の医療経済に与えるインパクトもかなり大きいと思います。最後に西尾先生、専門から少し離れると思いますが、その辺について解説していただきたいと思います。

西尾——臨床の先生方で話題になっていることは、例えばペバシズマブが導入された時に、薬価が高い、低いに関わらず、分子標的薬は高価なお薬でしかも長期間投与する必要があることでした。例えばそれでSD (stable disease) の状態が長く続く場合、あるいはそれで予後が改善される場合、非常に長く投与します。そうしますと、一回の治療で数千万円かかることとなります。保険の仕組みが日本と違うということもありますが、米国ではよく議論されていることです。日本でもコストについては問題になってくると思います。特に分子標的薬のような高価な薬が標準的治療に用いられた場合、日本の医療経済に及ぼす影響は大きいと予想されます。分子標的薬を用いて治療を行った場合、あまり効果のない患者さんは副作用が多いという事例もありますので、効果のある患者さんに限って使って治療を行った方が、患者さんのためにも医療経済的にも良いのではないかと思います。臨床的に、ずっと使っていても効いているかどうかわからない薬は、恐らく効いていないと考えられますが、耐性になった場合、突然止めることは難しいと思います。しかし、遺伝子の変異によって耐性になった場合、薬を止めるための割とクリアな判断材料になるかと思えます。投与の止め時期をバイオマーカーで見つけると

いうことも今後重要になってくると思います。その中でバイオマーカーは診断薬として分子標的薬と同じ土俵にのってきます。即ち、診断と治療の融合と考えた場合、診断薬の値段もやはり考慮しなくてはならないと思います。我が国におきましては、EGFRの遺伝子変異等の検査についても保険適用の制度があります。検査の保険点数が低ければ検査会社はやりませんが、検査は必須といったことも起こってきます。即ち、診断と薬が融合されて開発されていく時に、診断の価値ということも考えていく必要があると思います。

鶴尾——バイオマーカー研究で薬を合理的に使うという方向で、将来、開発あるいは治療が進んでいくと思います。

今日は三人の先生方にバイオマーカー研究の重要性、その将来について、非常におもしろいお話をしていただいたと思います。国の方も「イノベーション25」というプロジェクトがあり、バイオマーカー研究というのはその創薬研究の一つの柱になっており、今後日本でも進めていかななくてはならない重要な研究とされています。一方、私共基礎研究者としての興味から言いますと、この研究は新しい薬のシーズになるという可能性を含めていると思います。そして研究が進めば、最終的にはがん患者さんに、より有用な治療法を届けることができると期待できることから、バイオマーカー研究が更に進んでいけば素晴らしいと思います。

本日は先生方、ありがとうございました。

この座談会は2008年1月18日に行われました。

西尾 和人 にしお・かずと
近畿大学 医学部 グノム生物学教室 教授
大阪府生まれ
和歌山県立医科大学卒
医学博士
専門は分子生物学

戸井 雅和 とい・まさかず
京都大学大学院 医学研究科
外科学講座 乳腺外科学 教授
広島県生まれ
広島大学 医学部卒
医学博士
専門は乳腺外科学

塩津 行正 しおつ・ゆきまさ
協和発酵工業株式会社 医薬研究センター
薬理研究所 がん薬理グループ マネジャー
東京都生まれ
東京大学大学院 薬学系研究科 博士課程修了
薬学博士
専門は腫瘍生物学

鶴尾 隆 つるお・たかし
財団法人癌研究会
癌化学療法センター 所長
香川県生まれ
東京大学 薬学部卒
東京大学大学院 薬学研究科修了
薬学博士
専門はがん化学療法学

座談会

「トラスツズマブの臨床的評価と医療経済評価」

司会

京都大学医学部附属病院 乳腺外科診療科長・教授

戸井 雅和 氏

ディスカッサント

愛知県がんセンター中央病院 乳腺科部長

岩田 広治 氏

筑波大学保健医療政策学分野 講師

近藤 正英 氏

分子標的治療薬であるHER2 (Human Epidermal growth factor Receptor type 2) モノクローナル抗体「トラスツズマブ (ハーセプチン®)」に、乳癌の術後補助療法薬としての有用性が確認されたことから、2008年2月、効能効果に「HER2過剰発現が確認された乳癌における術後補助化学療法」が追加された。

この適応追加により、トラスツズマブの持つ乳癌の再発抑制効果が実地臨床に大きく寄与することが期待される。しかしながら、一方で画期的ゆえの高薬価を背景とした保険医療財政への影響、および患者の自己負担の増加も懸念される。そこで、本日は乳癌臨床の第一人者で臨床試験及び医療経済評価の分野にも明るい戸井雅和先生にご司会をお願いし、乳腺外科の専門家であり、トラスツズマブの国際共同治験にご参加された岩田広治先生と、医療経済学の専門家である近藤正英先生のお二人のディスカッサントとともに、医療経済評価の解説と、実際のトラスツズマブの術後補助療法薬としての評価について討議していただく。



医療経済学の目指す方向性は 限りある医療財源の適正配分

戸井 本日は、トラスツズマブに対する乳癌術後補助療法の適応追加を受けまして、その有用性についての試験結果を検証するとともに、国民医療費の適正化が声高に叫ばれる昨今、この薬剤の適応追加が医療経済的な面からはどのように評価されるかについて、それぞれの分野の専門家と議論して参りたいと思います。ディスカッサントには、愛知県がんセンター中央病院の岩田広治先生と筑波大学の近藤正英先生をお招きしております。

本題に入る前に、トラスツズマブはHER2過剰発現が確認された転移性乳癌の適応で2001年6月に臨床応用され、その有効性の高さから既に汎用されているわけですが、患者さんの経済的な負担について何か印象をお持ちですか。

岩田 トラスツズマブに代表される分子標的治療薬は、作用機序の画期的ゆえに総じて高薬価です。加えて、トラスツズマブの投与期間は長期間にわたりますので、患者さんから治療費に関する相談を受けることがあります。

戸井 他方で、高齢社会の影響が大きいと思うのですが、国民医療費が増加の一途をたどっており、その適正化に向けた行政の動きが目立ちます。従来、われわれ臨床医は、治療法の選択の際に経済的側面に重きを置いて来なかった点は否めないと思います。しかし、国の医療財源を考慮し、有効な治療技術のみならず恩恵を患者さんに最大限に享受していただくには、もはや、医療の経済的な評価を抜きには議論できない時代に突入したようです。

岩田 最近、副次評価項目に経済的な指標を挙げている臨床試験が増えてきました。私自身も含め、臨床試験に携わる医師の医療の経済性に対する関心も高まってきていると思います。

戸井 医療経済学、あるいは医療経済評価が目指すところはどこにあるのでしょうか。

近藤 医療経済学は限りある医療財源の適正配分という方向性を目指す、なかでも医療経済評価という手法は、より多くの患者さんを救う方法を選ぶというものです。

医療経済評価の実際

戸井 医療経済評価への取り組みは海外ではどうなっているのでしょうか。

近藤 英国が先駆者です。欧州、カナダ、オーストラリア、ニュージーランド等は比較的社会的な医療保険システムをとっており、基本的には政府が国民に必要な医療が行き渡らせるような仕組みをとっています。その中でも英国は、国民医療費を全て税金で賄うシステムですから、必然性も大きいわけです。英国ではNICE (National Institute for Health and Clinical Excellence) という組織が創られ、新たな医療技術の導入にあたり、その有用性と経済性を同時に評価し、NICEの評価結果を基に新規の導入を判断することがいち早く制度化されています。また欧州では英国のNICE以外にもフランスやドイツでもそのような組織が出来ており、医療経済評価というものが政策に反映されるべく広がっています。一方、米国は私的保険が主体ですから、保険会社が医療経済評価を基に提供可能な医療技術のパッケージを設定しています。

戸井 その国の医療保険制度により異なるということですか？

近藤 その通りです。ですから、特定の患者さん個人だけではなく健康人も含めた国民全体の立場に立って限りある医療財源の上手な使い方を考える上で、医療経済評価は、特定疾患の治療に対し新たな医療技術を導入すべきか否かを判断するための指標となります。

戸井 では、医療経済評価が実際にはどのように行われるか。この点の解説をお願いします。

近藤 医療経済評価は費用と効果を同時に評価しますので、“費用効果分析”(表1)と呼ばれます。その際、効果は延命効果で評価されることが多いため、単位を“生存年数”としています。また、医療の目的は単なる延命のみではなくQOLも考慮されることから、医療経済評価においても、QALYs (Quality-Adjusted Life Years: 質調整生存年) というQOLを考慮した概念を採り入れることもあります。



戸井 豊

表1 費用効果分析

● ① どんな分析か？

・ 効果を評価する(臨床)研究に基づいて費用も同時に評価する分析

● ② 目的

・ 新薬を既存薬と比較して、医療財源の上手な使い方という観点から、どちらを使うべきか決める

● ③ 効果の分析

・ (臨床)研究などから得られたエビデンスによる

● ④ 費用の分析

・ 診療報酬点数のモデル化やレセプトの実査による

● ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ ⑫ ⑬ ⑭ ⑮ ⑯ ⑰ ⑱ ⑲ ⑳ ㉑ ㉒ ㉓ ㉔ ㉕ ㉖ ㉗ ㉘ ㉙ ㉚ ㉛ ㉜ ㉝ ㉞ ㉟ ㊱ ㊲ ㊳ ㊴ ㊵ ㊶ ㊷ ㊸ ㊹ ㊺

・ 限りある医療財源のもとで国民の健康水準を高めるためには、例えば、新薬を普及すべきである、あるいは、既存薬の使用を続けるべきである

表2 効果と費用を同時に評価するエンドポイント

ICERは、臨床試験のエンドポイントと比較してみると分かりやすい例え、新薬と既存薬の比較では

	エンドポイント
臨床試験	増分効果 = 効果 _{新薬} - 効果 _{既存薬}
経済評価	増分費用効果比 (ICER) = $\frac{\text{増分費用} = \text{費用}_{\text{新薬}} - \text{費用}_{\text{既存薬}}}{\text{増分効果} = \text{効果}_{\text{新薬}} - \text{効果}_{\text{既存薬}}}$

医療経済評価の具体的算定方法

～経済的先進国では、増分費用効果比(ICER)が600万円/年が目安

戸井 具体的にはどのように算定するのでしょうか。

近藤 費用効果分析では、“増分費用効果比 (Incremental Cost-Effectiveness Ratio: ICER)” という指標を使います。ICERの意味するところを解釈しやすくするために、臨床試験におけるエンドポイントと対比して示したのが表2です。表3に具体的事例を示します。RCT (ランダム化比較試験)

表3 増分費用効果比(ICER)の具体例

① 100人対100人のランダム化比較試験(RCT)を行った結果
→ 既存薬で奏効率30%、新薬で奏効率60%というエビデンス

② 効果の分析 (モデル化)

→ 経済評価では、増分効果は(QOLで調整した)延命年数として計算する
奏効率30% → 生存30年、奏効率60% → 生存50年とすると増分効果は20年 (50年 - 30年)

③ 費用の分析

→ 適応患者100人に使う総医療費を
既存薬で1億5000万円、
新薬で2億円と仮定すると
増分費用は5000万円

結果のまとめ

	既存薬	新薬
効果	30年	50年
費用	1億5,000万円	2億円
増分費用効果比 ICER = $\frac{20,000 - 15,000}{50 - 30} = \frac{5,000}{20} = 250 \text{ 万円/年}$		

の結果、奏効率が既存薬30%、新薬60%という新たなエビデンスが得られたとします。医療経済評価では効果は一般に生存年数で示しますから、この新しいエビデンスと他のエビデンスも含めて奏効後の予後に関して延命年数を算出します。その結果、延命年数が既存薬30年、新薬50年となったとすると効果の増分(増分効果)は20年ということになります。一方既存薬では年間1億5,000万円の費用がかかり、新薬では年間2億円の費用がかかることが計算されます。この場合の費用の増分(増分費用)は2億円-1億5,000万円=5,000万円となりますから、ICERは5,000万円÷20年つまり、250万円/年となるわけです。また、ICERは図1のように考えられます。費用の増減と、効果の増減を組み合わせ、4つの区分(象限)を考えます。このうち効果は減少するの、費用は増加するという第Ⅱ象限にあたる場合は新薬を導入すべきではないですし、効果が増すのに費用は減少するという第Ⅳ象限に属する新薬は明らかに導入すべきです。戸井 問題は第Ⅰ象限に入る場合であるということですか? 近藤 そうです。効果も高まるが、その分、費用も増える。これについては、図2に示したように、検討対象の新医療技術のICERを、モデル化した線で表すとわかりやすいと思います。赤い線分のように傾きが水平に近づくほどICERが小さいと言えます。これはつまり少ない費用増で大きな効果増が得られる(延命年数が長くなる)ということです。逆に青い線分のように垂直に近づくほどICERが大きいと言え、僅かな効果増を得るのに大きな費用負担増を強いられることが示されるわけです。先ほどのように具体例で示しますと、青い線分の新薬AのICERは1,500万円/年、新薬BのICERは250万円/年となります。そして、経済的先進国では、ICERが600万円/年を超えない程度であればその新医療技術を保険医療に導入すべきであると判断されています。つまりこの

具体例ではこの新薬Bを導入すべきという結論になります。戸井 その600万円/年という基準は、どのような形で決まったのですか。

近藤 一般の人が一年の長生きのためにいくら払えるかなどを聞いた調査に基づいて設定されてきています。また、600万円/年という基準には幅が持たせてあり、例えば、対象疾患が致死性であって代替手段がないという場合には、1,000万円/年程度まで許容するといった運用になっています。

岩田 発展途上国や新興諸国では、経済的先進国に比べ保険医療財政がより厳しい状況にあると思うのですが、ICERを用いた判断基準は同じなのでしょうか。

近藤 それぞれの国の情勢を勘案して、国民総生産額や国民一人当たりの所得額に基づき、発展途上国では150ドル/年(約18,000円/年)、新興諸国では3,000~10,000ドル/年(約36万~120万円/年)とされているようです。

4つの大規模臨床試験の成績からのトラスツズマブの臨床的評価 ~乳癌に対する臨床上的大変革~

戸井 それでは、話題をトラスツズマブに移したいと思います。岩田先生、今回のトラスツズマブの適応追加がどのくらいのインパクトを持つかについてお話しください。

岩田 トラスツズマブの乳癌術後補助療法薬としての有効性について、4つの大規模臨床試験が行われました。図3は、これらの試験で示されたトラスツズマブの有効性を、無病生存期間(DFS: Disease Free Survival)で検討した結果です。いずれもトラスツズマブを使うことで、再発リスクがほぼ半減することが示されています。

それらの一つであるHerceptin Adjuvant (HERA) 試験¹⁾は、日本人症例138名を含む5,102症例が登録されました。

図1 増分費用効果比の解釈

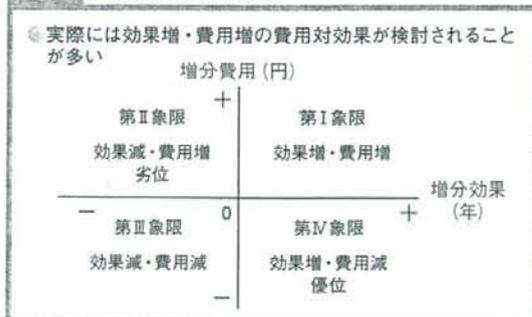


図2 費用対効果が効果増・費用増の事例

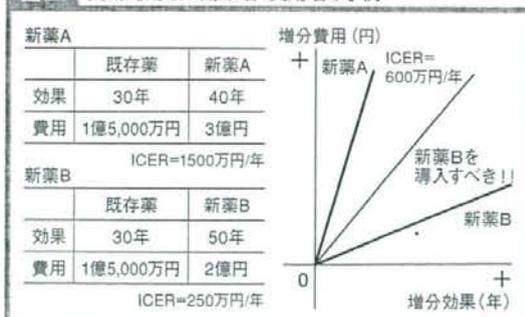


図4は、HERA試験における平均観察期間2年までのDFSです。トラスツマブの再発抑制効果は36%と、驚異的な値が示されています。他の3つの試験でも同様の成績が得られたことから、術後補助療法への適応が追加されました。私自身は、乳癌に対する臨床上の大変革と捉えています。

戸井 安全性についてはいかがですか。

岩田 トラスツマブを使用するときは心障害に注意が必要です。HERA試験では、トラスツマブ投与群にNYHA III・IVのうっ血性心不全が0.6%認められており、一方図5に示しますようにNSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) B-31試験ではNYHA III・IVかつ規定されたLVEFの低下が認められたうっ血性心不全が、5年間の累積発生率として3.8%に認められました。表4が、トラスツマブの臨床試験における心障害の発生状況のまとめです。すなわち、トラスツマブ投与により心障害の発現が懸念されますが、アンストラサイクリンと異なり、可逆的である

ことが報告されています。

効果という点ではHER2陽性という再発リスクの高い患者さんに対し、大規模試験の結果、トラスツマブ投与することによって再発のリスクがほぼ半減するということは画期的なことだと思います。ただ高価な薬剤ですので、心障害も含めたmedical careを考慮して医療経済的評価上の妥当性を検証しておく必要があると思います。



岩田 氏

トラスツマブの医療経済評価 ～日本での検討においても経済性に優れる～

戸井 トラスツマブについての医療経済評価がどのようなものか、実例を提示していただければ、この辺りの理解が進みそうですので、近藤先生、お願いします。

図3 早期乳癌に対するトラスツマブの効果(無病生存率)

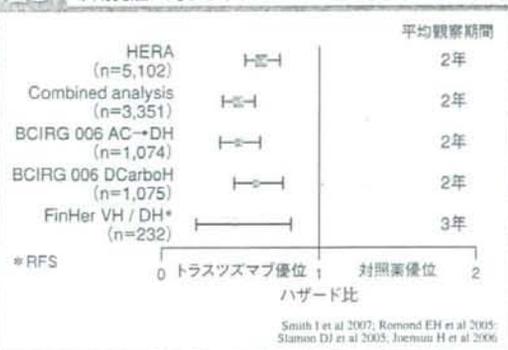


図5 心臓関連イベントの5年累積発生率 (NSABP B-31)

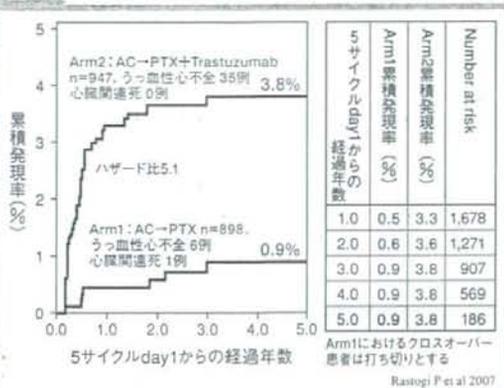


図4 HERA試験における無病生存率 (ITT解析)(観察期間中央値2年)

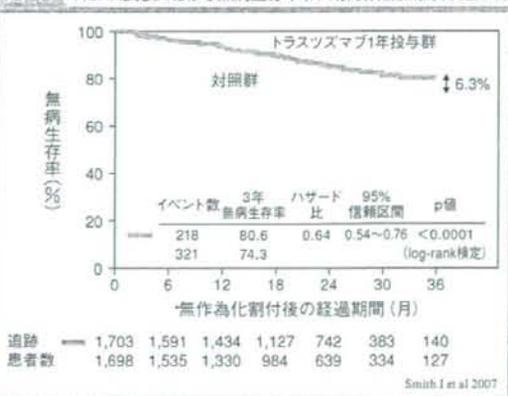


表4 早期乳癌におけるトラスツマブの心障害

試験	投与薬剤	左室駆出率 (%)	うっ血性心不全 (%)	心血管疾患死 (件)
HERA ¹⁾	H 1 year Nil	≥55	0.6 0	0 1
NSABP B-31 ²⁾	AC→P AC→PH	≥50	0.9 ^{cum} 3.8 ^{cum}	1 0
NCCTG ³⁾	AC→P	≥50	0.3 ^{cum}	1
N9831	AC→P→H AC→PH		2.8 ^{cum} 3.3 ^{cum}	1 0
BCIRG 006 ⁴⁾	AC→D AC→DH DCarboH	≥50	0.4 1.9 0.4	0 0 0
FinHer ⁵⁾	No H H		1 0	0 0

近藤 トラスツズマブは、医療経済評価の対象として非常に興味深い薬剤と言えます。すなわち、高い治療効果を有し、同時に高薬価でもあります。そして一方で、心毒性というリスクを伴っているからです。既に、医療経済性の調査機能を有する国で、トラスツズマブの医療経済評価が報告されています。

表5は、トラスツズマブを開発したロシュ社による検討結果です。ここでは7つのシナリオを創り、それぞれについて評価を行っています。7番目のシナリオは、“アジュバントでのトラスツズマブの効果の持続は5年間までで再発後にトラスツズマブを100%再投与する”という一番厳しいシナリオですが、その場合であっても英国の目安である30,000ポンド/QALY (約660万円/QALY)をはるかに下回っています。

その他の報告を表6にまとめます。英国のNICEの評価は、標準的なシナリオの場合は18,000ポンド/QALY (約396万円/QALY)で、最も厳しいシナリオでは33,000ポンド/QALY (約726万円/QALY)と、ロシュ社に比べかなり高くなっていますが、それでも許容の範囲内ということで導入すべきとの認可が下りています。

戸井 日本と他国のICERの間はかなり大きな開きがありますが。

近藤 医療経済評価の場合、増分効果の評価に用いた臨床試験が同一であっても、このような差が現れることは珍しくはありません。その国の医療保険制度に左右されるからです。したがって、国家間の値を直接比較することにあまり意味はありません。しかし、このモデルをもう少し詳細にみみると、投与量に体格差が反映されてきます。日本人の体格は英国人よりも小さいため、その分トラスツズマブの投与量が減りますから、薬剤費の部分は安くなるので、その影響

はあると思います。

戸井 わかりました。では、日本での検討について解説をお願いします。

近藤 日本での検討結果については、2007年に白岩ら²⁾による論文が報告されています。効果についてはHERA試験を用い、トラスツズマブの1年間投与群と観察群とを比較しています。費用は、社会保険診療報酬点数表と薬価基準表を用い、出来高払いで計算されています。

戸井先生が指摘されたように、トラスツズマブの効果の持続期間が不明ですので、それを2年、5年、10年と仮定した3つのシナリオを創り、それぞれについて費用効果分析が行われました。結果は表6のとおりです。患者さんの体重を60kgとした場合の3つのシナリオのいずれもICER 600万円/年を下回っており、論文の考察(表7)にもトラスツズマブ1年間投与は有効性・経済性の両面において優れているとされています。

戸井 今回のトラスツズマブの適応追加の妥当性が、有用性と医療経済性の両面から認められたことがよくわかりました。

表6 トラスツズマブの医療経済効果分析の概要

報告	増分費用効果比 (ICER)
SPRINT ¹⁾	£2,400 (¥528,000) /QALY \$51 (¥2,500,000) /LYG 10年: £1,800 (¥396,000) /QALY
Roche (HERA) ²⁾	£2,400 (¥528,000) /QALY
NICE (HERA) ³⁾	£18,000 (¥3,960,000) /QALY
US Trial	米国 ⁴⁾ \$26,417 (¥2,905,870) /QALY イタリア ⁵⁾ €14,861 (¥2,377,760) /QALY ノルウェー ⁶⁾ €35,947 (¥5,751,520) /LYG

NICEの推奨

£20,000-30,000 (440-660万円) 以内⇒Cost effectiveである。

LYG (Life year gained) 与QALY (Quality adjusted life years),
£=¥220, \$=¥110, €=¥160

1) Shiroya T et al 2007; 2) Wardley AM et al 2006; 3) NICE 2006;
4) Garrison Jr LP et al 2007; 5) Liberato NL et al 2007; 6) Norumi J et al 2007

表5 Rocheの検討結果

シナリオ番号	再発後の再投与を行った割合 (%)	トラスツズマブの治療効果	治療費/QALY
1	0	一生効果が持続	£587
2	0	効果は徐々に減弱したが、一生持続した	£2,396
3	50	効果は徐々に減弱したが、一生持続した	£6,673
4	50	5年間は効果が持続したが徐々に減弱、10年間経過以降は効果なし	£8,403
5	100	効果は徐々に減弱したが、一生持続した	£10,777
6	100	5年間は効果が持続したが徐々に減弱、10年間経過以降は効果なし	£13,266
7	100	5年間経過以降は効果なし	£18,942

仮定別の費用対効果の予測

Wardley AM et al 2006

表7 日本における検討結果 (HERA)

イギリスのNICE (National Institute for Health and Clinical Excellence) では1QALYあたり2万～3万ポンド (約400-600万円) が閾値の目安となっている。この値を参照すれば、本研究におけるトラスツズマブのICER (約260万円) は費用対効果に優れた値と考えられる。

NICEでは1年間トラスツズマブ投与のICERを18,000ポンド/QALY (約400万円) と推定しており、2006年6月に出されたdraft guidanceでは、術後補助療法での使用が推奨されている。

発表されているいくつかのRCTと今回の分析結果から、術後補助療法としてのトラスツズマブ1年間投与は、有効性・経済性の両面において優れていると考えられる。

Shiroya T et al 2007