

201438111A

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

アンメットメディカルニーズにおける抗がん薬の PK/PD  
に基づく最適化医療の実施に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 濱田 哲暢

平成27(2015)年 3月

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

アンメットメディカルニーズにおける抗がん薬の PK/PD  
に基づく最適化医療の実施に関する研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 濱田 哲暢

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の革新的がん医療実用化研究事業による委託業務として、濱田哲暢が実施した平成26年度「アンメットメディカルニーズにおける抗がん薬のPK/PDに基づく最適化医療の実施に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

## 目 次

## I. 委託業務成果報告（総括）

アンメットメディカルニーズにおける抗がん薬の PK/PD に基づく最適化医療の実施に関する研究	1
濱田 哲暢	

## II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 抗がん薬の PK/PD 解析方法の開発	7
濱田哲暢、北野滋久、山下万貴子、相川博明	
2. PG x 解析手法の構築	15
齋藤嘉朗	
3. 小児がん（神経芽腫）に対するデシタビン・タミバロテン併用療法 PhaseI/II 試験、レチノイドの PK/PD 試験の実施に関する研究	20
河本 博	
資料：難治性神経芽腫に対する Valproic Acid (VPA) と 13-cis-RA (isotretinoin) 併用療法 第 Ib 試験	
4. ゲムシタビン不応および S-1 不応の切除不能膵管癌に対する三次治療以降としての L-OHP+CPT-11+5FU/1-LV 併用療法 (FFX) の第 I 相試験	83
井岡達也	
資料：ゲムシタビン不応および S-1 不応の切除不能膵管癌に対する三次治療以降としての L-OHP+CPT-11+5FU/1-LV 併用療法 (FFX) の第 I 相試験	
5. Gemcitabine+nab-Paclitaxel を投与された膵癌に対するマスイメージング技術を用いた腫瘍内薬物動態の研究	103
上野秀樹	
6. 切除不能局所進行・再発 HER2 要請乳がんに対する T-DM1 の薬物動態・免疫応答の新規測定系による測定可能性確認試験	106
田村研治	
資料：切除不能局所進行・再発 H E R 2 陽性乳がんに対する T-DM1 の薬物動態・免疫応答の新規測定系による測定可能性確認試験	
7. ハイリスク患者（Frailty を有する高齢者・肝機能腎機能低下）に対する低用量エルロチニブ Phase II 試験	120
山田一彦	
資料：Frailty を有する EGFR 遺伝子変異陽性再発・進行非小細胞肺癌に対する低用量 erlotinib の第 II 相試験 (TORG1425)	

8. 高齢者（75歳以上）EGFR 遺伝子変異陽性再発・進行非小細胞肺癌患者に対するア ファチニブの有効性と安全性の検討- 薬物動態および毒性と遺伝子多型の多施設共 同研究- -----	180
水柿 秀紀	
資料：高齢者(75歳以上)EGFR 遺伝子変異陽性再発・進行非小細胞肺癌患者 に対するアファチニブの有効性と安全性の検討 -薬物動態および 毒性と遺伝子多型の多施設共同研究-	
9. ALK 融合遺伝子陽性、PS 不良の進行再発非小細胞肺癌症例に対するアレクチニブの 第 II 相試験 -----	241
岡本 勇	
資料：ALK 融合遺伝子陽性、PS 不良の進行再発非小細胞肺癌に対する アレクチニブの第 II 相試験 (LOGIK1401)	
10. 成人 T 細胞白血病リンパ腫(ATL)に対する抗 CCR 抗体（モガリズマブ）の PK/PD 試験 -----	282
木村晋也	
資料：ヒト T リンパ球向性ウイルス（HTLV-1）陽性者および健常人に おける免疫動態解析研究計画書	
III. 学会等発表実績 -----	302
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	303

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告書

アンメットメディカルニーズにおける抗がん薬の PK/PD に基づく最適  
化医療の実施に関する研究

平成 26 年度総括研究報告

濱田哲暢 国立がん研究センター 部門長

研究要旨：抗がん薬の PK/PD 解析に基づく個別化医療は有益であるが臨床応用は十分でないため、日本人を対象とした結果が少なく、目標濃度と投与量の相関が明らかでない。そこで本研究班では、患者毎の生理学的特性に併せた用量設定の根拠となる、PK/PD 基礎情報を収集し、臨床への還元を目指すものである。本年度は、プロトコール作成と生体試料中の各種抗がん薬濃度測定方法を開発し、薬理遺伝学解析・免疫モニタリングを整備した。

担当者（研究協力者）	木村 晋也 佐賀大学 血液腫瘍内科
田村 研治 国立がん研究センター 中央病院 科長	教授
河本 博 国立がん研究センター 中央病院 医長	口羽 文 国立がん研究センター 研究支援センター 研究員
上野 秀樹 国立がん研究センター 中央病院 医長	相川 博明 国立がん研究センター 研究所 リサーチレジデント
北野 滋久 国立がん研究センター 中央病院 医員	山下 万貴子 国立がん研究センター 研究所 特任研究員
斎藤 嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 医療安全科学部長	A. 目的
井岡 達也 大阪府立成人病センター 検診部 副部長	医薬品の有効性・安全性評価に薬物動態・薬力学(PK/PD)試験が重要であり、Gaoらは、分子標的薬の血中濃度測定は個別化医療に有益であることを報告しており (Gao, <i>J Clin Oncol</i> , 2012)、胃癌患者におけるトラスツズマブのトラフ血中濃度は臨床効果と相関するため、前向き臨床試験で検証が進められている。しかしながら、抗がん薬の分野において PK/PD に基づき最適化された投与方法の開発は、不十分である。
山田 一彦 久留米大学病院 呼吸器内科 講師	
岡本 勇 九州大学病院 ARO 医療センター 特任准教授	
水柿 秀紀 北海道大学病院 内科 1 医員	

その理由として、早期臨床開発試験では、臓器機能が正常で比較的若い患者を対象に、薬物動態パラメータと毒性との相関解析を目的 (Mathijssen, *Nature Rev Clin Oncol.* 2014) としたものであり、至適投与量を予測するには国内外の情報が少ない。研究代表者は、エルロチニブ血中濃度と皮膚障害が ABCB1 遺伝子多型に決定されること (Hamada, *Pharmacogenomics*, 2014)、イマチニブの薬物動態に SLC01A2 遺伝子多型が影響すること (Yamakawa, *Clin Pharmacol Ther*, 2011)、カルボプラチン投与量を決定するカリバート式を日本人向け最適化 (Shimokata, *Cancer Sci*, 2010) について報告してきた。これまでの研究成果により、PK/PD に基づく最適化医療を臨床に応用するには、血中濃度から投与量を最適化するアルゴリズムが必要であり、日本人を対象とした前向き臨床試験において検討されることが不可欠と考えている。

本研究では、小児がん (神経芽腫)、難治性がん (膵がん)、ハイリスク患者における乳がん・肺がんを対象とする臨床試験を実施している臨床研究グループと連携し、抗がん薬の至適投与方法の確立を目指した PK/PD 研究とトランスレーショナルリサーチを実施し、至適投与量と治療域濃度を推定、さらに個人差の変動要因探索として、薬理遺伝学解析、免疫学的解析を行い、薬剤の直接的な影響に加え、宿主の薬剤反応応答性についても検討する。

本研究の独創的な点は、抗体医薬の血中濃度測定は、リガンド結合試験法が用いられるが、測定委託費用が極めて高価あるいは委託できないことが経験されることから、小分子医薬品と同様に抗体医薬品の生体試料中薬物濃度分析法を独自に構築し、バリデーション実施後に

PK/PD 試験を行う。既に申請者らは、イメージング質量顕微鏡を用いた腫瘍組織中の薬物分布の可視化 (Shimma S, *J Mass Spectrom*, 2013)、質量分析法による抗体医薬濃度分析システム開発 (Iwamoto N, *Analyst*, 2013) を行っており、解析拠点を整備しているため、研究の進展により標準治療開発のための多施設共同臨床研究移行後も解析拠点として対応可能である。

## B. 研究方法

### ①小児がん (神経芽腫) に対するデシタビン・タミバロテンおよびレチノイド濃度測定方法の開発

(背景) 神経芽腫は、抗がん薬の反応は良いが、5-6 割のハイリスク症例の 7 割は再発後死亡するため、治療抵抗症例に対する新規治療法の開発が望まれる。分化誘導薬を併用した脱メチル化治療の基礎的有用性から、脱メチル化薬 (デシタビン) を 5 日間投与後、分化誘導薬 (タミバロテン) を 2 週間内服する Phase I 試験を行う。デシタビンは、細胞毒性が強く血液毒性が DLT となるため、用量設定試験にて薬物動態試験を実施し、毒性との相関を評価する。さらに、Phase II 試験 (症例数 34 例 : 閾値 PFS10 週、期待値 18 週、両側  $\alpha$  0.05、 $\beta$  0.2) にて、血漿および末梢リンパ球と骨髄病変の薬剤濃度と組織分布は、質量分析装置を用いて評価し、推奨投与量における PK/PD 試験を実施する。研究デザインは、PMDA との対面助言を受けて、試験デザインが適切であることを確認している。

#### a. 血漿および腫瘍組織における薬物濃度測定方法の開発

質量分析装置を用いた濃度測定方法の構築を行う。また、分析バリデーションを実施し、測定結果の真度・精度・再現性を検討する。なお、

測定方法は、医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン（薬食審査発 0711 第 1 号）に基づき構築する。

## ②難治性がん（膵がん）に対する FOLFIRINOX 療法の PK/PD 試験および nab-Paclitaxel /Gemcitabine を対象とした分子イメージング解析

（背景）膵癌診療ガイドライン（2013 年）では、切除不能膵癌に対する標準化学療法として、ゲムシタビン単剤、S-1 単剤、ゲムシタビン+エルロチニブ併用療法が推奨されているが、新たな治療選択として L-OHP+CPT-11+5FU/1-LV（FORFIRINOX）療法、および nab-paclitaxel/Gemcitabine 併用療法が承認された。しかしながら、イリノテカンの下痢、オキサリプラチンの末梢神経障害、3 剤併用による重度の骨髄抑制に特に注意すべきである。そこで、用法用量に従い投与される日本人膵がん患者を対象に、イリノテカン、オキサリプラチン、5-FU の血中動態を評価し、骨髄毒性、末梢神経障害、下痢について相関解析を実施する。なお、毒性発現が強く、治療継続が困難と予想される場合、至適投与量を決定する用量設定試験を計画する。

### a. 血漿中の薬物濃度測定に関わる解析方法の構築

質量分析装置を用いた測定方法の構築を行う。また、分析バリデーションを実施し、測定結果の真度・精度・再現性を検討する。

## ③高齢者（乳がん）に対するトラスツズマブ・エムタンシン(T-DM1)の PK/PD 試験

（背景）HER2 陽性手術不能又は再発乳がんに適応を持つ T-DM1 は、抗体医薬トラスツズマブにチューブリン重合阻害作用を有するエムタン

シン(DM1)を結合させた抗体薬物複合体である。作用機序は、HER2 に結合後の細胞内への DM1 送達による作用とトラスツズマブが有する抗体依存性細胞障害作用 (ADCC) 活性によるとされる。国内第 II 相臨床試験において DM1 によると推定される Grade3 以上の血小板減少が注意すべき有害事象である。本研究計画では、日本人の HER2 陽性進行・再発乳がん患者を対象に、血漿中のトラスツズマブ・エムタンシン結合体および free の DM1 を質量分析装置により解析する。更に、腫瘍部位への DM1 の到達を評価するため、生検検体を用いてイメージング質量分析装置を用いた組織分布も解析する。既に、申請者らは、質量分析計を用いた血漿中トラスツズマブ濃度測定方法、イメージング質量分析装置を用いた薬物動態可視化技術を構築しており、基盤技術は構築している。本剤の ADCC 活性は、トラスツズマブより高いとされるが、個人差の要因は不明な点が多い。そこで、Fc $\gamma$  受容体の薬理遺伝学的解析と末梢血を用いた ADCC 活性を評価し、治療効果の予測が可能か評価を併せて行い、薬剤性あるいは宿主の反応性によるものか詳細に評価する。

### a. 血漿中の薬物濃度測定に関わる解析方法の構築

質量分析装置を用いた測定方法の検討を行う。測定対象であるトラスツズマブ・エムタンシン複合体である (T-DM1) は、そのままでは濃度測定が困難であるため、酵素処理にてペプチド断片化後に質量分析装置にて測定を行う。すなわち、トラスツズマブ由来の断片とエムタンシンをそれぞれ定量する。

### b. ADCC 活性評価方法の構築

悪性腫瘍患者の血液サンプルを試料に、患者固有の ADCC 活性を測定することを目的としてア



ッセイ系の構築を行う。まずは、培養細胞株を用いて、抗HER2抗体トラスツズマブによるADCC活性誘導系をモデルとして、フローサイトメーターを用いたアッセイ系の構築を試みる。また、各種免疫担当細胞のポピュレーション解析のための抗体パネルを作成する。その後、健常人血液を用いてヒト検体用アッセイの詳細を検討した後、実際に、トラスツズマブ・エムタンシン（T-DM1）治療適用となった乳がん患者固有のADCC活性・リンパ球ポピュレーション解析を行い、治療効果との関連を検証する。

#### c. PGx 解析手法の構築

トラスツズマブ・エムタンシンの薬理作用を予測するために、薬理遺伝学的解析手法を検討する。

#### ④ハイリスク患者（Frailtyを有する高齢者・肝機能腎機能低下）に対する低用量エルロチニブ試験

（背景）EGFR 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌に対するエルロチニブの有効性は既に証明されているが、多くはPS良好な非高齢者、さらにはハイリスクな合併症を除いた例に対する試験結果に基づくものであり、標準的な抗がん剤の適応とならない予後不良群に対する有用性は未だ不明である。國頭らは、全身状態が良好なEGFR 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌患者に対して低用量（50mg）エルロチニブは明らかな毒性の軽減と一定の有効性があることを示しており、この結果をもとに、標準的な化学療法による毒性増強が懸念される frailty を有するEGFR 遺伝子変異陽性再発・進行非小細胞肺癌患者70例（閾値奏効率50%、期待奏効率65%、 $\alpha$  0.05、 $\beta$  0.2）に対して、低用量エルロチニブは、十分な有効性を示し、毒性の軽減とQOL向上に寄与するか検討する。定常状態のト

ラフ値の血中濃度を測定し、薬理遺伝学的影響を含めて治療効果との関連を検討する。

#### a. 血漿中の薬物濃度測定に関わる解析方法の構築

質量分析装置を用いた測定方法の構築を行う。また、分析バリデーションを実施し、測定結果の真度・精度・再現性を検討する。

#### <倫理面への配慮>

本研究は、ヒトの血中薬物濃度測定を含む臨床研究を含むため、ヘルシンキ宣言を尊重して計画された臨床試験計画に基づいて実施する。すなわち、厚生労働省「臨床研究倫理指針」「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいた研究計画書を作成する。研究計画書、インフォームド・コンセント用紙、患者説明書について各医療施設の生命倫理委員会の承認を得るとともに、臨床試験対象者の書面によるインフォームド・コンセントを得ることとする。ガイドラインに従い、採取された患者の検査結果について守秘義務を守ること、研究成果の発表に際しては、個人が特定されない方法でのみ行うことを遵守する。本研究で採取される血液および組織は、通常の臨床検査で行う範囲であり、患者に著しい苦痛を与えるものでないことから、患者に不利益及び危険性は伴わないと考えられる。

#### C. 結果

本研究で解析対象となる薬剤の血中濃度測定方法を構築することができた。本研究で対象とする薬剤の評価系（血中濃度測定・免疫モニタリング）は計画通りに準備することができた。併せて、本研究班で検討すべき薬剤に関して討議を行ったところ、ATLにおけるモガリズマブ、

ならびに肺がんを対象としたアレクチニブ、アフアチニブを検討すべきとの指摘を受け、次年度より解析を行うことを目指してプロトコール作成を行い、新たに分担研究者を加えて準備を行う。

#### D. 考察

本研究で研究対象とする薬剤の評価系は計画通りに準備することができた。併せて、本研究班で検討すべき薬剤に関して討議を行ったところ、ATLにおけるモガリズマブ、ならびに肺がんを対象としたアレクチニブ、アフアチニブを検討すべきとの指摘を受け、次年度より解析を行うこととした。

#### E. 結論

本研究計画は、初年度であるため、プロトコール作成と評価系の構築を中心に行った。以下に、期待される研究成果を纏める。

**学術的メリット**：目標血中濃度が決定されるならば、薬物血中濃度に基づく抗がん薬の投与量調整が可能になることから、減量による副作用回避と増量による効果増大が期待される。また、性別、病態、併用医薬品、臓器機能等が薬物動態に与える影響が明らかになる。

**社会的メリット**：今後、多くの抗体医薬・抗がん薬が市場に導入されることから、安全性確保の面から PK/PD 解析は重要である。ドラッグラグ解消のため、海外でエビデンスが得られている場合、少数例の日本人臨床試験結果で承認申請されている。しかしながら、標準的な化学療法による毒性増強が懸念される高齢者、臓器機能低下患者、特に高齢者で frailty 患者への

PK/PD に基づく投与量の調整は、有効性の向上と安全性の保証が期待される。

**経済的メリット**：本研究により、適切な治療対象を選択することが可能となれば、医療の質の向上と医療費の増大を抑え、費用対効果の高い医療を実現の一翼を担える。また、薬物有害事象の発生は、患者に多大な苦痛を強いるだけでなく、入院期間延長など新たな医療費増大につながるため、医薬品適正使用と医療費削減が期待できる。

本研究成果により、新規抗がん薬の個別化医療と安全使用が推進されることにより、がん化学療法の質的向上と適正化が期待される。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表等

Yagishita S, Hamada A. Clinical pharmacology of EGFR/Met inhibitors in non-small cell lung cancer, *Current Drug Target*, 21:312-321 (2014).

学会発表等

該当なし

報道発表等

該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

平成26年度厚生労働科学研究委託費(革新的がん医療実用化研究事業)  
アンメットメディカルニーズにおける抗がん薬のPK/PDに基づく最適化医療の実施

**目的** 製薬企業の資金援助を受けないアカデミア主導の市販後臨床研究を計画し、患者の血液・組織を収集・回収、医薬品適正使用に資するPK/PD/PGxのTR研究支援体制の構築

**現状**

- 国際共同治験により日本人における使用経験が少なくなりつつある
- 治験の対象とならない高齢者・臓器機能低下患者への投与量の調整は医師の匙加減となっている



**期待される成果**

- 製造販売後に速やかに日本人を対象とした薬物動態と投与量に関する情報が得られる
- 治験の対象とならないunmet population(ハイリスク患者)における投与量に関する情報が得られる
- 副作用発生時に迅速に検体を収集・解析できる全国ネットワークの構築
- 臨床情報に基づくコンパニオン診断薬開発の促進

創薬研究プロセスにおける薬物動態・薬力学(PK/PD)の位置付け

【医薬品】

基礎 → 実用化

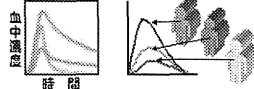


Pre-PK test  
物性評価

PK test in vitro

Pre Clin PK/PD

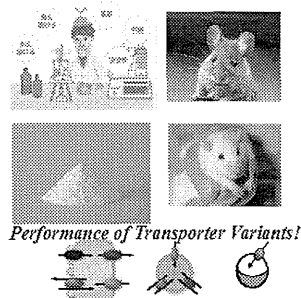
Clinical Phenotype & PK Studies!



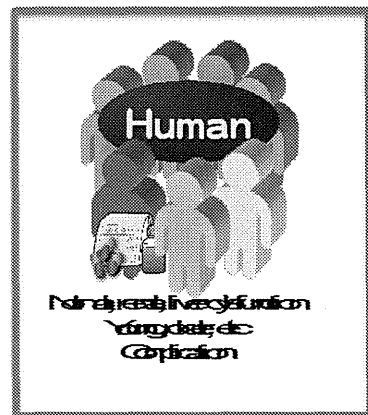
DEATH VALLEY

PK/PD for First in man

PK/PD for Phase I



本研究班の目的



## 抗がん薬の PK/PD 解析方法の開発

濱田哲暢 国立がん研究センター 研究所 部門長

研究要旨：抗がん薬の血中濃度測定方法を質量分析装置により構築し、さらに抗体薬投与患者における ADCC 活性の評価系を新たに構築した

担当者（研究協力者）

北野滋久 国立がん研究センター 中央病院  
医員

相川 博明 国立がん研究センター 研究所  
リサーチレジデント

山下 万貴子 国立がん研究センター 研究所  
特任研究員

### A. 目的

薬物血中濃度測定を実施するには、一連の分析過程を通じて妥当性が適切に確認され、十分な信頼性が保証された分析方法の構築が必須である。そこで、本研究班にて研究対象とする薬剤を高速液体クロマトグラフィーに質量分析装置を連結した LC-MS/MS を用いて解析系を構築し、「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」に従い構築した。すなわち、アフアチニブ、アレクチニブ、クリゾチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブの多成分一斉分析の測定方法の構築を目指した。本測定法の構築により、それぞれ異なる薬剤の検体に対して同様の処理を行い、一斉測定が可能となるため、測定の高スループット化が期待できる。また、同様

に LC-MS/MS システムを用いて、血漿中の 13-cis-レチノイン酸の血漿中濃度測定方法の検討を併せて行った。

HER2 陽性手術不能又は再発乳がんに対して適応承認されたトラスツズマブ・エムタンシン (T-DM1) は、抗 HER2 抗体トラスツズマブに化学療法剤 DM1 を結合させた抗体薬物複合体である。T-DM1 は、トラスツズマブを介して HER2 陽性のがん細胞に結合し、抗体依存性細胞傷害 (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity : ADCC) 活性によりがん細胞を攻撃する。また同時に、到達したがん細胞内に DM1 を放出してがん細胞を死滅させるものと考えられている。抗体はターゲットとの結合特異性が高く、分子標的薬の標的ストラテジーとして頻用され、近年、様々な種類の抗体医薬が開発されている。しかしながら、抗体医薬のような複雑な構造を持つ高分子は、小分子化合物と異なり LC-MS/MS などの質量分析装置による解析が困難である。今後、市場が拡大することが予想される抗体医薬に関して、その薬物動態を評価するための基盤を創ることは非常に重要な課題である。そこで、抗体薬の一つであるトラスツズマブを用いて、抗体の酵素処理法や、質量分析装置による濃度

測定法の構築を試みる。血漿中および組織中のトラスツズマブ濃度測定方法を確立後、トラスツズマブ投与患者の血漿中および腫瘍組織中のトラスツズマブ濃度を測定し、トラスツズマブの体内薬物動態について評価を行う。

がんに対する抗体療法においては、必ずしも臨床効果を認めるとは限らず、患者毎に ADCC 活性を *in vitro* において評価することが期待されている。今回、我々はフローサイトメーターを用いてより情報量の多い ADCC assay 系を構築して患者毎の治療効果予測を行えるかどうか検討する。すなわち、患者の治療経過に伴うエフェクター機能の変化をモニタリングし、評価した報告はない。一般的に、抗体医薬の適用は、がん細胞上の標的分子の発現量により決定されるとともに、その効果は患者自身の ADCC 活性に強く影響を受けると考えられている。しかし、ADCC 活性の測定法は煩雑で、測定者により方法も様々であることなどから、実地臨床には適用患者自身の ADCC 活性を測定することなく抗体療法が施行されている。また、近年の研究より、ADCC 活性の制御には各種免疫抑制細胞が関与すると考えられているが、実際のがん患者における免疫細胞のポピュレーション変化を解析し、治療効果や ADCC 活性との相関を追跡した報告はない。

本研究では、まず、T-DM1 の重要なエフェクター機能の 1 つである ADCC 活性とそれを制御する免疫細胞ポピュレーションの変化を評価するアッセイ系を確立する。その上で、実際に、T-DM1 治療の適用となった乳がん患者自身のそれら活性・機能が、治療経過に伴いどのように変化するのかを経時的にモニタリングし、治療効果との関連性を評価する。

最終的には、他の班員が担当する質量分析解析技術を用いた薬物動態解析との関連についての検証を試みる。

## B. 研究方法

### 分子標的薬血中濃度測定方法

測定機器は高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計を使用した。装置構成は、HPLC として Nexera X2 (島津製作所)、三連四重極質量分析計として QTRAP5500 (AB SCIEX) を使用した。分析条件の最適化として、標準試料を用いて質量分離部の最適化を行なった。質量分離部の各種パラメーターの最適化では、シリンジポンプを用いたインフュージョン測定を各成分に対して行なった。一方、イオン源の各種パラメーターの最適化はフローインジェクション測定によって行なった。次に、LC 条件構築を行なった。移動相は 0.1%ギ酸-水、0.1%ギ酸-アセトニトリル、カラムは XBridge C18 カラム (3.5  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm $\times$ 50mm, Waters 製) を使用した。検量線の作成では、標準溶液を 50%メタノールで段階希釈して標準液を調製した。これらの標準溶液 10  $\mu\text{L}$  にリン酸溶液 800  $\mu\text{L}$ 、血漿マトリックスを 25  $\mu\text{L}$  を添加し混和した溶液を作成した。混和溶液は固相抽出 (Oasis HLB(10mg)) による精製を行ない、精製後の試料を LC-MS/MS で測定し検量線を作成した。

血漿中 13-*cis*-レチノイン酸の血漿中濃度測定法は、AB SCIEX QTRAP4500 を用いて構築を行った。なお、前処理方法は、光による分解を抑えるために遮光が必要である。前処理方法を以下に示す。

試料 (ヒト血漿 100  $\mu\text{L}$ )

└←各 13-*Cis*-レチノイン酸の標準溶液 10  $\mu\text{L}$

←内標準物質溶液 (500 ng/mL) 20  $\mu$ L  
 ←アセトニトリル 300  $\mu$ L  
 混和  
 遠心分離 (15000 rpm、10 分間、4° C)  
 上清 200  $\mu$ L を分取  
 ←水 100  $\mu$ L  
 混和  
 LC-MS/MS システムに注入

LC 条件

Analytical column:  
 2.5Cholesterol  
 (3.0 mm I.D.  $\times$  75 mm, particle size 2.5  $\mu$ m)  
 Mobile phase:  
 A: 0.1% ぎ酸  
 B: 0.1% ぎ酸アセトニトリル  
 Gradient:  

Time (min)	A (%)	B (%)
0	10	90
5	10	90

  
 Rinse solution: 50% MeOH  
 Flow rate: 0.4 mL/min  
 Column temperature: 30°C  
 Autosampler temperature: 4°C  
 Injection volume: 5  $\mu$ L  
 Run time: 5min

MS/MS 条件

Ionization mode: Electrospray ionization  
 Polarity: Positive ion mode  
 Scan type: multiple reaction monitoring  
 Curtain gas: 30 psi  
 Nebulizer gas (GS1): 60 psi  
 Turbo gas (GS2): 60 psi

Ion spray voltage: 5000V  
 Heater gas temperature: 400° C  
 Collision gas: 8  
 Valve position:

Time (min)	Valve position
0	Waste
1.8	MS
5	Waste

Monitoring ions and collision energy:

Target	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	Collision energy (V)
13-cis-RA	301	123	21
IS	306	127	21

質量分析を用いた抗体医薬の濃度測定

トラスツズマブ投与患者の血漿サンプル中のトラスツズマブの濃度を測定することを目的に、ヒト標準血漿中にトラスツズマブを投与した試料におけるトラスツズマブ濃度の測定を LC-MS/MS を用いて試みた。

標準品としてトラスツズマブ (市販品) を用いて、酵素処理法の検討および、LC-MS/MS 測定に用いるトラスツズマブ由来フラグメントの選別を行った。選択したフラグメントから生成されるプロダクトイオンをシミュレーションし、MS/MS のトランジションプログラムを作成した。酵素 (トリプシン) 処理により切断したトラスツズマブ断片について、構築した LC-MS/MS 測定条件にて測定を行った。

続いて、血漿中のトラスツズマブ濃度を測定するため、血漿中トラスツズマブ処理方法を検討した。ヒト標準血漿にトラスツズマブを添加 (2mg/ml, 1  $\cdot$  g/ml) した試料を作製し、ProteinGキットにより試料の IgG 精製を行った。精製した試料の溶媒を最適化し、トリプシン処

理を行い、LC-MS/MS に注入し、トラスツズマブ由来フラグメントが検出されるかについて検討した。

### 新規 ADCC assay 系の確立のための条件検討

本年度は、新規 ADCC assay 系の確立のための条件検討を行った。Effector 細胞として、CD16 (Fc $\gamma$ R) を遺伝子導入した NK 細胞細胞株、ターゲット細胞として HER2 陽性乳がん細胞株、抗体として trastuzumab (抗 HER2 モノクローナル抗体) を軸として、ADCC assay のバリデーションを行った。細胞数、E/T 比等の条件が安定したところで、effector 細胞として健常人末梢血単核球を用いて、新鮮および凍結保存後 (継凍結後継時的に観察) の末梢血単核球を用いて条件検討を行った。結果、末梢血単核球を effector 細胞とした場合は E/T ratio=4、target 腫瘍細胞  $2 \times 10^4$  の条件で凍結保存後一ヶ月の時点まで安定して再現性を持って ADCC assay を行うことができることを確認した。

さらに、従来型のカルセイン-AM を用いた ADCC assay との比較検討を行い、我々の新規 assay では抗体濃度  $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  と 1/10 の抗体濃度とより高い検出感度で細胞障害を検出できることを確認した (図 1)。さらに、トラスツズマブ・エムタンシン (T-DM1) 治療適用となった乳がん患者の ADCC 活性を測定し、また、各種免疫担当細胞のポピュレーション変化を解析する。さらに、T-DM1 複合体あるいは抗体・DM1 それぞれの PK/PD・組織内分布解析のデータも加えて、治療効果との関連を検証する。

① 培養細胞株モデルを使って、フローサイトメーター (SONY EC800 : 現有機器) を用いたアッセイ系の構築を行う。

② 健常人 10 人程度の末梢血検体を用いて、実

際に ADCC 活性を測定し、ヒト末梢血単核球を用いたアッセイについての詳細な条件設定を行う。

③ 同時に、各種免疫担当細胞のポピュレーションの変化を解析するための、マルチカラーフローサイトメーター用解析パネルを作成する。

④ T-DM1 適用乳がん患者を対象に症例を蓄積し、ADCC 活性および各種免疫担当細胞のポピュレーションの経時的変化をモニタリングしていく。末梢血検体の採取は、治療開始前・抗体療法投与中・増悪時・治療奏功時 (とくに寛解時) を予定している。

⑤ 当研究グループは、モノクローナル抗体の限定分解法を開発し、抗体の種類に依存しない可変領域ペプチドを液体クロマトグラフ-三連四重極型質量分析計にて選択的に検出・定量する方法を構築している。この方法を用いて、患者血中の T-DM1 複合体、あるいは free の抗体もしくは DM1 それぞれについてモニタリングを試みる。また、イメージング質量顕微鏡を用いた生体試料中の薬物分布可視化法の構築にも取り組んでおり、対象患者のうち、組織検体を得られた患者については、組織内の T-DM1 薬剤濃度分布の可視化を行う。これらのデータと、実際の臨床効果、ならびに本研究で得られた ADCC 活性などを総合的に考察し、治療効果との相関について検証する。

### <倫理面への配慮>

本研究は、ヒト試料を対象にした研究であるため、当センター研究倫理審査委員会での承認を得ている。次年度には、がん患者に投与する薬剤毎、がん種ごとに研究計画書を申請する予定である。

### C. 結果

分子標的治療薬のマルチ測定方法構築では、ヒト血漿を使って検量線を作成したところ、アフチニブ 2.5~500 ng/mL、アレクチニブ 10~2000 ng/mL、クリゾチニブ 7.5~1500 ng/mL、エルロチニブ 10~2000 ng/mL、ゲフィチニブ 10~2000 ng/mL の範囲で直線性のある検量線が得られた。なお、13-cis-RA は、5-2000ng/mL の範囲で測定可能であることが確認された。

抗体医薬血中濃度測定では、トラスツズマブを酵素処理により切断し、抗体の重鎖に相当する配列 (2種: DTYIHWVR, GLEWVAR) を LC-MS/MS により検出するための測定条件を構築した。ヒト血漿中のトラスツズマブ濃度を測定することを目的として、トラスツズマブをヒト標準血漿に添加し、含まれるトラスツズマブを LC-MS/MS により検出するための処理条件について検討を行った。その結果、含有トラスツズマブが高濃度 (2mg/mL) の場合および低濃度 (1ug/mL) の場合、双方の調製試料においてトラスツズマブ由来のフラグメントが検出された。

がん患者で行う前段階として、健常人採血を用いてフローサイトメーターを用いた我々独自の ADCC assay 系は確立しつつあり、データの再現性の確認を行っている段階である。従来のアッセイとは異なり、エフェクター細胞と標的細胞、および死細胞と生細胞を個別に解析が可能となった。さらに、前述のように、より検出感度の高い assay 系の確立に成功した。

以下に具体的に纏める。培養細胞株を用いて、フローサイトメーターを用いた ADCC 活性測定系を構築した。最初に、培養細胞株を用いた HER2-トラスツズマブによる ADCC の誘導をモデルとして、フローサイトメーター (SONY EC800)

によるアッセイ系の構築を行った。標的細胞であるがん細胞としては HER2 高発現乳がん細胞株である BT-474 細胞、一方、エフェクター細胞である NK 細胞としてはヒト NK 細胞株 NK92-MI 細胞に低親和性 Fc $\epsilon$ R (Fc $\epsilon$ RIII:CD16a) を定常発現させた NK92MI+CD16a を用いた。なお、対照抗体として VEGF を認識し ADCC 活性を有しないベバシズマブを用いた。

その結果、従来の release assay では、抗体濃度が 1ug/mL 異常で細胞毒性が観察されたが、我々が構築した flowcytometric assay では、抗体濃度が 0.1ug/mL から細胞毒性を検出することが出来た。また、release assay は再現性に非常に乏しいが、flowcytometric assay は、安定で再現性よく細胞毒性を検出出来た。

また、マルチカラーフローサイトメーターによって患者毎に末梢血中の各種免疫担当細胞を数量的に測定する系はすでに確立済みである。

### D. 考察

分析手法構築のため、更にバリデーションを実施し、分解能の向上と感度上昇を検討する。血漿中トラスツズマブの濃度測定手法では、1ug/mL レベルの低濃度のトラスツズマブを検出しうる可能性が示された。次年度は、作成した測定手法を用いて、トラスツズマブの濃度範囲について検討し分析バリデーションを実施する。構築する解析手法は T-DM1 やその他の抗体医薬についても応用が可能と考えられる。

本年度行ってきた健常人血液検体で確立したアッセイ系をもとに、来年度は①進行がん患者末梢血において、マルチカラーフローサイトメーターを用いて各血液 Linage のポピュレーション



ョン割合を同定する。進行がん患者で増加する制御性 T 細胞、骨髄由来抑制細胞等の免疫抑制細胞についても測定する。②我々が開発した新規 ADCC assay を用いて患者毎の ADCC 活性を測定する。各種抗体薬を投与された患者での臨床データと、①②の相関を検証する予定である。

#### E. 結論

試料中におけるトラスツズマブを、酵素処理を経て LC-MS/MS により検出・測定する手法を構築した。

本年度は予定どおりに従来の ADCC assay よりも精度の高い我々独自のフローサイトメーターを用いた ADCC assay 系を構築できた。来年度はがん患者検体での検証を行っていく。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表等

論文発表等

学会発表等

該当なし

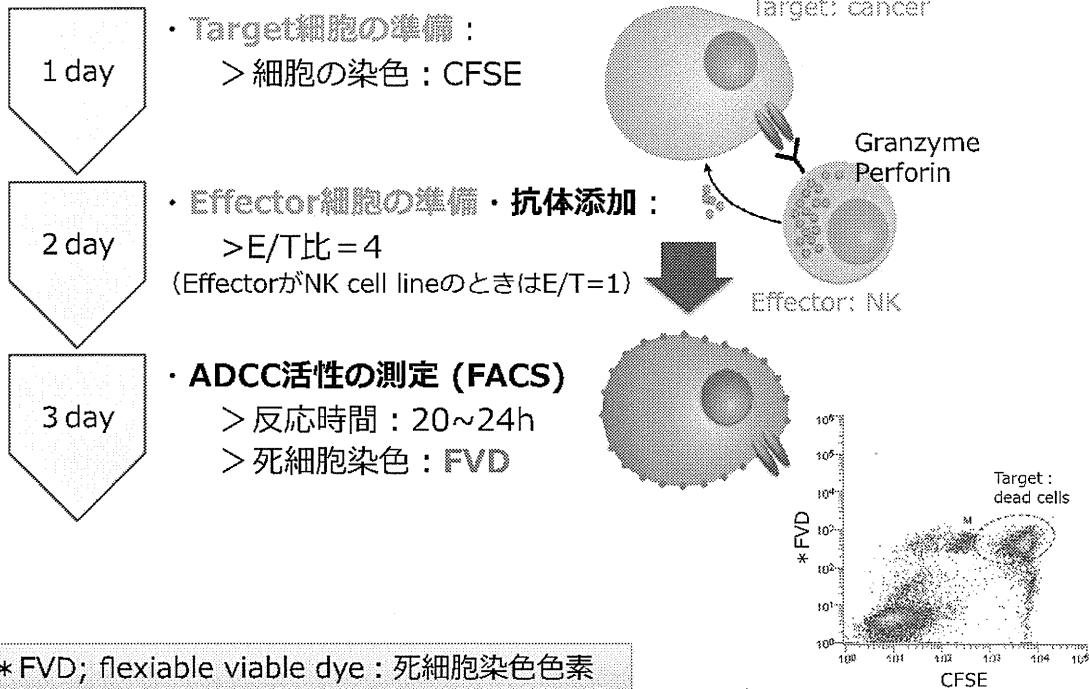
報道発表等

該当なし

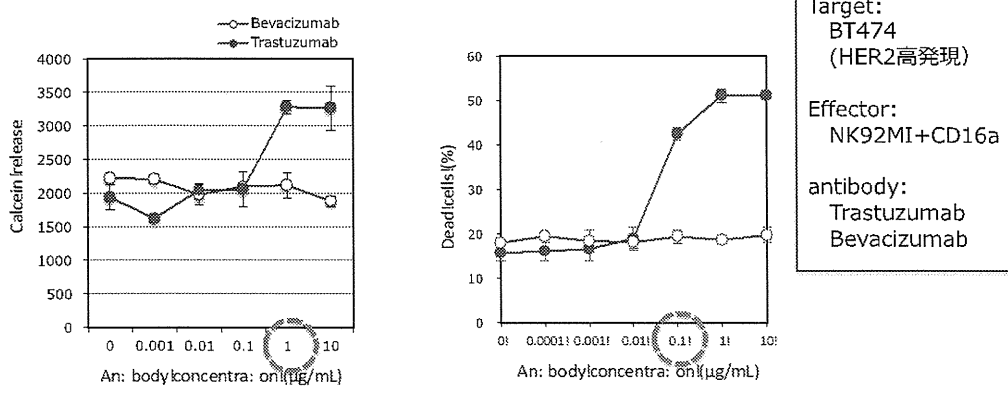
#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

# 方法



## 我々の新しい測定系 (flowcytometer base) の方がより低い抗体濃度からADCC活性を検出できる。



従来型のRelease Assay

我々のFlowcytometric Assay

細胞数 :	1x10 <sup>4</sup> cells/well	5x10 <sup>4</sup> cells/well	※2x10 <sup>4</sup> cells/wellまでは実験精度確認済み
E/T比 :	1 : 1	1 : 1	
反応時間 :	4 h	20 h	※4hでも同様の結果を確認済み

# ～新規抗体薬剤の開発における患者選択のためのアッセイ開発～

日本（アカデミア）の標的探索技術は世界トップレベル。  
しかし、薬剤開発のほとんどが海外でなされているのが現状、、、

薬剤開発における国際競争力を高める必要性！

いかにして薬剤開発のスピードアップと効率化を高めていくべきか

どの患者に投与すべきか・すべきではないか



治験の速度アップ

効果のない薬剤は早めに開発を止めるべき



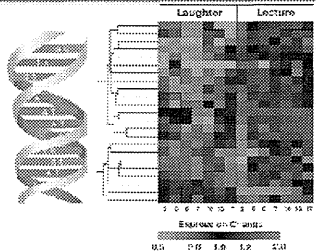
開発費用の削減

我々の独自開発によるの新規抗体薬開発における「患者個別」の薬剤効果判定予測アッセイ

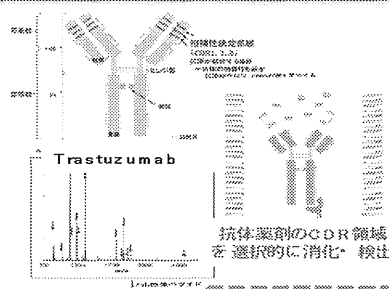
腫瘍における遺伝子  
プロファイリング解析  
(腫瘍組織)

質量分析技術を駆使  
した薬物動態解析  
(腫瘍組織・末梢血)

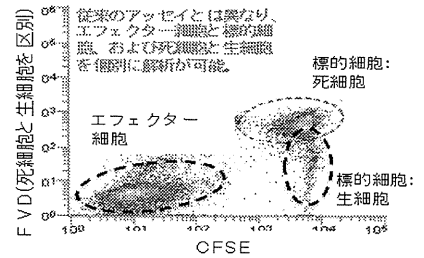
フローサイトメトリーを  
駆使した高精度なADCCアッセイ  
(患者末梢血)



新規薬剤の治療効果と相関する  
宿主の免疫に関わる因子の同定



抗体薬剤のCDR領域  
を選択的に消化・検出



従来のアッセイとは異なり、  
エフェクター細胞と標的細胞、  
および死細胞と生細胞を  
個別に解析が可能。

標的細胞:  
死細胞

標的細胞:  
生細胞

創薬  
標的

創薬  
シーズ  
発見

リード  
化合物  
同定

最適化  
研究

非臨床  
試験

早期臨床  
試験

後期臨床  
試験

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告書

PGx 解析手法の構築

斎藤 嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部長

研究要旨： 抗体薬物複合体に関するファーマコゲノミクス (PGx) 解析の有用性を検討するため、初年度である平成 26 年度は、薬効機序の観点からトラスツズマブ・エムタンシンの薬剤反応性に関連すると報告されている遺伝子について、機能影響に関連する多型情報を調査し、標的分子、受容体、薬物代謝酵素及びトランスポーターに関し、6 遺伝子 10 多型を抽出した。

担当者（研究協力者）

前川京子 国立医薬品食品衛生研究所

医薬安全科学部 室長

齊藤公亮 国立医薬品食品衛生研究所

医薬安全科学部 主任研究官

薬効関連分子に関しては、PGx 解析の知見が累積してきており、一部はその臨床現場での利用が進んでいる。

近年、毒性が強いなど、それ自体では医薬品になりにくい低分子化合物を抗体に結合することにより、標的特異性を高めた「抗体-薬物複合体」が注目を浴びている。しかしその PGx 解析の有用性は不明である。本研究は、抗体薬物複合体として、抗 HER2 抗体チューブリン重合阻害剤複合体トラスツズマブ・エムタンシンを対象に、その薬物動態や薬効・副作用に対する PGx 情報の有用性を解析し、その適用範囲を明らかにすることを目的とする（図）。

研究初年度となる平成 26 年度は、トラスツズマブ・エムタンシンの薬剤反応性に関連することが報告されている遺伝子について、遺伝子多型情報を調査し、そのうち機能影響に関連するとされる多型を抽出した。

A. 目的

ゲノム薬理学 (PGx) は、ICH E15 ガイドラインで「薬物応答と関連する DNA 及び RNA の特性の変異に関する研究」と定義されている。その利用は有効性の確保と副作用の低減に寄与しうることから、製薬企業及びアカデミアにおいて、ゲノム薬理学情報を利用した臨床試験・研究が進んでいる。

これまでに医薬品の添付文書収載に至った例としては、抗がん剤イリノテカンによる重篤な好中球減少の予測における UGT1A1 遺伝子多型の利用、同セツキシマブ、パニツムマブの有効性予測における RAS 変異の利用、同ゲフィチニブの有効性予測における EGFR 変異の利用などが知られている。このように化学薬品における薬物代謝酵素や標的分子、抗体医薬品における

B. 研究方法

トラスツズマブ・エムタンシンに関する公開