

26-A-20 未承認薬の早期臨床開発試験における薬物動態  
・薬力学解析・薬理遺伝学解析の標準化に関する研究  
濱田 哲暢  
国立がん研究センター 先端医療開発センター

**研究の分類・属性**

TR/早期開発分野

**研究の概要**

医薬品開発研究における薬物動態試験は、未承認薬の薬物特性を評価する重要な試験のひとつであり、ガイドラインに基づいた分析バリデーションが必須である。開発主流とされる抗体薬は、分析法としてリガンド結合法・酵素免疫測定法が汎用されているが、構造情報を確認できない問題点が指摘されている。一方、遺伝子診断技術の進展も著しく、昨年末に米国 FDA がデスクトップ型次世代シーケンサーを診断機器として認可したことから、ヒトゲノム解読・高速シーケンス技術開発を基盤としたゲノム医療の実現化が更に加速し、治療薬の有効性と安全性を予測する次世代ファーマコゲノミクス(PGx)を応用した個別化治療が医療現場に導入されることが期待されている。そこで本研究では、従来の薬物動態・薬力学解析に加えて、全ゲノム解読 PGx と次世代薬物動態 PK 解析を導入した高度先駆的システムを開発し、未承認薬の早期臨床開発試験における PK/PD/PGx の基盤整備を行う。①LC-MS/MS を用いた生体試料中の薬物分析方法の構築とイメージングマスでの生体試料中の薬物分布可視化方法の構築、②質量分析装置を用いた抗体医薬の生体試料中濃度測定方法の標準化、③次世代高速シーケンサーを用いた全ゲノム解析プローブ作成と網羅的解析法の構築を実施する。①②では、医薬品の製造販売承認申請資料に用いる分析法とするための実用化研究を推進し、分析手法の標準化・再現性・信頼性・安定性に関する非臨床試験を行う。高分子量で複雑な構造の抗体薬の生体試料中濃度測定では、酵素処理により得られた複数の可変領域ペプチド断片を質量分析法にて一斉定量する手法を応用し、抗体ごとに異なる相補性決定領域 (CDR) ペプチドの分析を三連四重極型の LC-MS/MS による MMR 法を用いた定量を行う。③次世代高速シーケンサーを用いた全ゲノム解析プローブ作成と網羅的解析法の構築では、薬剤関連遺伝子のエクソン並びにプロモーター領域について、稀な遺伝子多型を含めた日本人多型ゲノムデータを収集する。

**平成 27 年度研究経費**

10,000 千円

**研究班の組織**

研究者名	所属研究機関名・職名	分担研究課題名
濱田 哲暢	国立がん研究センター・先端医療開発センター臨床薬理TR分野・分野長	未承認抗悪性腫瘍薬のPK/PD解析手法の開発
山本 昇	国立がんセンター中央病院・先端医療科・科長	呼吸器領域の臨床試験の実施

田村 研治	国立がん研究センター・中央病院・乳腺腫瘍内科・科長	乳腺領域の未承認抗悪性腫瘍薬のPK/PD解析標準化に関する研究
吉野 孝之	国立がん研究センター・東病院・消化器内科・科長	消化器領域の未承認抗悪性腫瘍薬のPK/PD解析標準化に関する研究
北野 滋久	国立がん研究センター・中央病院・先端医療科・医員	抗体医薬の免疫学的活性評価
細田 文恵	国立がん研究センター・研究所・がんゲノミクス研究分野・ユニット長	全ゲノム解読による薬効関連遺伝子多型解析パイプライン構築
南 博信	神戸大学・大学院医学研究科・血液腫瘍内科・教授	イメージング分析の臨床試験
安藤 雄一	名古屋大学・医学部附属病院・化学療法科・教授	イメージング分析の臨床試験
磯部 威	島根大学・医学部・呼吸器腫瘍内科・教授	肺癌実験動物モデルを用いたPK/PD研究・呼吸器領域の臨床試験の実施
岡本 勇	九州大学・病院・ARO次世代医療センター・特任准教授	肺癌実験動物モデルを用いたPK/PD研究・呼吸器領域の臨床試験の実施
佐伯 祥	熊本大学病院・呼吸器内科・助教	呼吸器領域の臨床試験の実施
樋坂 章博	千葉大学薬学部・臨床薬理学・教授	早期臨床開発試験におけるモデリングシュミレーションの構築

佐々木 治一郎	北里大学医学部附属新世紀医療開発センター横断的医療領域開発部門	呼吸器領域の臨床試験の実施
---------	---------------------------------	---------------

## 研究の目的と到達目標及び実績要点

### 全期間（目的と到達目標）

#### 全期間

##### （目的と到達目標）

従来の薬物動態・薬力学の手法に加えて、次世代薬物動態解析 PK を導入した高度先駆的 PK/PD を実施のための基盤整備を行い、実用化に向けたバリデーション研究と feasibility 試験を実施する。分子イメージングの結果を速度論解析する場合の方法論を確立し、早期臨床開発試験における新技術導入の必要性について評価を行う。本研究計画の最終目標は、社会的要請が高い抗悪性腫瘍薬の創薬研究に特化した PK/PD/PGx 解析拠点を構築することである。本年度は、高度先駆的解析拠点の整備・標準化を目指して、分析バリデーション実施と業務操作標準手順書の作成を行う。分析ガイドラインでは、分析過程の妥当性が適切に確認され、十分な信頼性を有することが求められており、フルバリデーションとして、選択性、定量性の確認（定量下限・検量線）、真度、精度等を評価する。バリデーションが完了した分析手法を用いて、小分子化合物・抗体医薬の薬物動態・薬力学解析を計画する。すなわち、GLP に準拠した PK/PD/PGx 試験を実施する体制整備により、アカデミアおよび国内外創薬ベンチャーのシーズを用いた早期臨床開発試験を受託し、未承認薬の開発促進を目指す体制構築である。

#### 第2年次

##### （到達目標）

1. イメージング質量分析による薬物分布の可視化は、薬剤の局在を明らかにする革新的な技術であるため、再現性・感度・実用性について検討を行い、適応可能な薬剤特性を把握し、解析手法の標準化を目標とする。
2. イメージング画像情報を解析する統計学的解析手法の検討を開始する。
3. 抗体医薬の血中濃度測定結果と治療効果との相関解析を行い、Modeling & Simulation の導入による投与量の推定方法に関する検討を行う。

##### （当該年評価時点の実績要点）

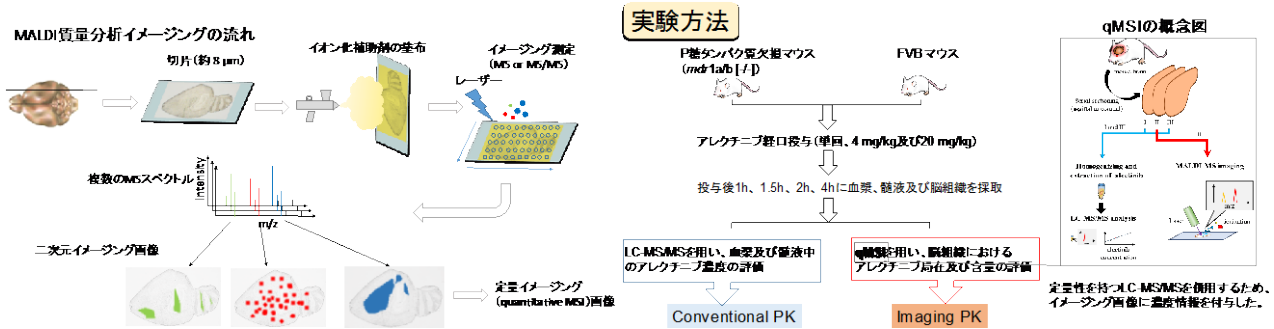
1. 2 次元画像で得られるイメージングの結果に定量性を付与する分析手法を検討し、再現性が高い測定方法が暫定的に構築し、組織切片をイメージング解析によりシグナルを得て、組織全体の薬剤量からシグナル毎に濃度を振り分ける手法を開発し高い相関関係を確認した。
2. 1 の手法を用いて、アレクチニブの腫瘍内移行性と脳内移行を動物モデルにて、また、エルロチニブ皮膚ならびに腫瘍内移行性に関して臨床応用を実施した。
3. 抗体医薬の血中濃度測定を質量分析装置にて用いて行うため、トラスツズマブならびにベバシズマブの測定方法を確立し、分析バリデーションを実施した。
4. 抗体医薬品の免疫学的活性評価系の確立に向け、健常人末梢血を用いて、改良型のエフェクター細胞とターゲット細胞を識別して評価できる ADCC アッセイ系の条件検討を行った。健常人新鮮血を用いた検討で再現性をもって安定した系を確認できたため、末梢血採血後、凍結保存状態からどのくらいの期間にわたって安定したアッセイ系を維持できるか検討中である。
5. イメージング画像情報を解析する統計学的解析手法の検討し、情報処理プログラムのプロトタイプを作成した。
6. 肺がん患者血液サンプル DNA を用いて、薬剤関連 147 遺伝子の多型を検出するキャプチャープローブシステム (NCC\_PGx panel\_ver1) によるゲノムシーケンス解析を実施した。うち、クリゾチニブ薬物動態試験に提供された 75 症例について、クリゾチニブ投与による有害事象と相関する遺伝子多型の解析を行ない、候補遺伝子を同定した。

## 研究成果と考察

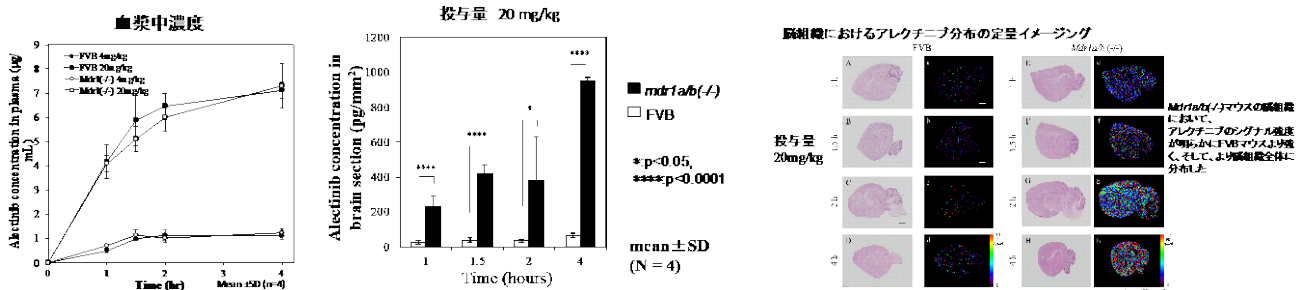
### 第2年次評価時点

#### 生体試料中の薬物分析方法の構築と質量分析イメージング法での生体試料中の薬物分布可視化 ALK チロシンキナーゼ阻害薬の分子イメージング

EML4-ALK 陽性非小細胞肺癌に対しては、ALK 阻害剤が著効し、新規 ALK 阻害剤の開発が行われている。EML4-ALK 陽性細胞株 H3122 を用いたマウス皮下移植モデルに、新規 ALK 阻害剤アレクチニブを投与し、質量分析イメージングにより、腫瘍組織中へアレクチニブが到達していることを確認している。本年度は新たに前年度までに構築された質量分析イメージング手法を用いて、アレクチニブの脳内移行性の評価を行った。なお、測定結果の妥当性を検証するため、任意の組織切片をマイクロダイセクションにて採取し、定量性が高いとされる LC-MS/MS にて組織切片面積単位の薬剤量を測定し相関性を確認した。

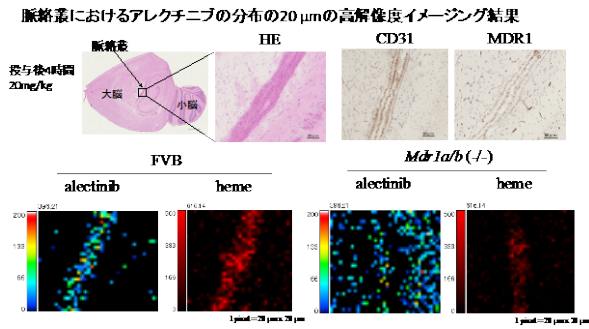


アレクチニブは P 糖タンパク (*mdr1*) の基質でないことが報告されており、FVB と *Mdr1a/1b(-/-)* におけるアレクチニブの血漿中濃度に有意差が認めなかった。一方、FVB と *Mdr1a/1b(-/-)* におけるアレクチニブの脳組織切片中含量に顕著な有意差が認められた。この結果は、質量分析イメージング解析においても確認された。このことから、組織レベルの薬剤分布を解析する場合、組織ホモジネートと比較し、薬剤分布を正確に示すことが可能であることが示された。

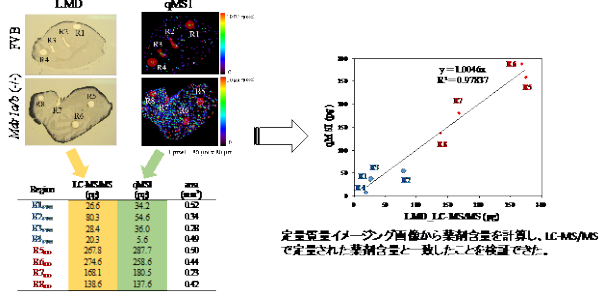


FVB マウスにおいても、薬剤分布シグナルが検出されることから、高解像度で観察をしたところ、脈絡叢であることが確認された。血液分布を確認するために赤血球の構成成分であるヘムならびにアレクチニブの分布を比較した。FVB マウスでは血管-アレクチニブ-ヘムの分布がほぼ一致しているが、*Mdr1a/1b(-/-)* マウスでは、血管-ヘムの位置は一致しているが、アレクチニブは全体に拡散分布していることが認められる。このことから、脳内においてアレクチニブの分布を p 糖タンパク質は制御している可能性が示唆された。

イメージング解析による定量性を検証するために、任意の部位を採取し、LC-MS/MS の定量結果の妥当性を確認し、高い相関関係を示した。



LMD(レーザーマイクロディセクション)及びLC-MS/MSによるqMSIのバリデーション



定量免疫イメージング画像から薬剤含量を計算し、LC-MS/MSで定量された薬剤含量と一致したことを検証できた。

### エルロチニブの薬物濃度の分布画像化に関する研究

ゲムシタピンとエルロチニブによる併用療法中の皮疹発現部と正常皮膚の皮膚組織内での薬物濃度の画像化に関する研究では、疹部、正常部ともに、エルロチニブは真皮より表皮に分布する傾向を認めた。2例において、正常部と比べ、皮疹部で濃度が高かったが、1例では逆のパターンであり、皮疹部で高い傾向は示せなかった。正常部で濃度が高かった症例で、EGFR免疫染色を施行したが、正常部でEGFRが高発現している傾向は認められず、エルロチニブ分布とEGFR発現に相関は認められなかった。

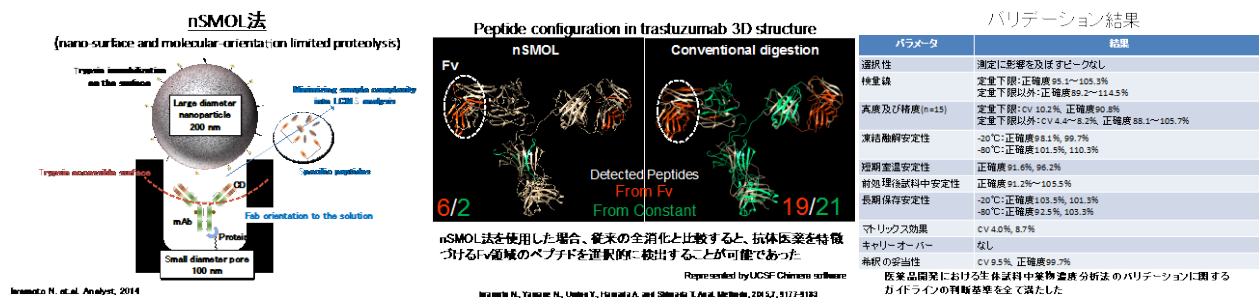
エルロチニブを投与されていた剖検検体(非小細胞肺癌患者、EGFR-mutation positive、最終薬剤投与48時間前)を用いて薬剤分布を評価した。単位面積( $\text{ng}/\text{mm}^2$ )あたり正常肺組織と比較し、腫瘍部位(原発・胸膜)の濃度がほぼ同程度であることが示され、一方、正常の脳組織への薬剤分布は約1/6であることが示された。

### 抗体医薬イメージング手法の検討

抗体医薬は大分子であるため、質量分析イメージング解析は困難であるため、トラスツズマブを酵素処理で切断される配列を決定する手法の検討を行った。組織切片の直接酵素処理を行う場合、標的となる薬剤以外の脂質の影響を軽減する必要がある。そこで、シグナル強度が相対的に高い脂質を除去することでイメージング解析を検討している。

### 質量分析装置を用いた抗体医薬の血中濃度測定方法の開発

未承認薬を含む複数の抗体医薬の血中濃度測定方法を測定する手法として、汎用性がある質量分析装置を用いる腫瘍を新たに開発した。生体試料中の抗体医薬を予めProtein Gに結合させ回収し、消化酵素にて効率的に消化後、特異的ペプチド断片を定量することで血中濃度を測定した。トラスツズマブの例を示すが、従来のELISA法と比較し、高い精度とダイナミックレンジを示した。その他、ベバシズマブならびにT-DM1に対しても応用が可能であることが確認された。今後、ベバシズマブ投与患者(症例集積済)を対象に経時的に採血された末梢血を用いて解析を行い、臨床効果・副作用との相関解析を実施する。



### 抗体医薬品の免疫学的活性評価系

抗体医薬品の免疫学的活性評価系の確立として、新規ADCCアッセイ系の条件検討を終えた。(Scientific Reports誌, revised中) 健常人新鮮血を用いて末梢血採血後、一旦凍結保存した状態から少なくとも1ヶ月間にわたって安定したアッセイ系を維持できることを確認した。さらに、がん患者宿主の免疫状態とADCC活性の相関をみるためにマルチカラーフローサイトメーターを用いた末梢血中各種免疫担当細胞のlineage解析のパネルの作成も完了し、計画通り進行乳がん患者において新規薬剤T-DM1を投与された患者を用いて患者個別に免疫抑制細胞がADCC活性にどの程度影響するのか解析を開始している。

フローサイトメーターを用いた ADCC 測定法は Qalcein 法より迅速で高い

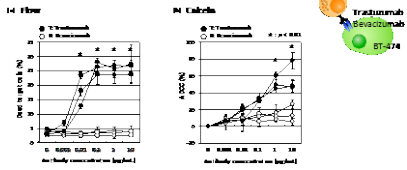


Figure 5. Comparison of the new fluorescent and calcein release assay. The flow cytometric (14) and calcein release (14) assays were performed on different days, independently, to assess the reliability and reproducibility for each ADCC assay using trastuzumab (100 ng/ml) and CD16a (1 μg/ml). The results of the analyses of the target cells (14) and ADCC (14) are presented as mean values ± SD of three independent experiments.

フローサイトメーターを用いた ADCC 測定法は凍結検体でも評価可能である

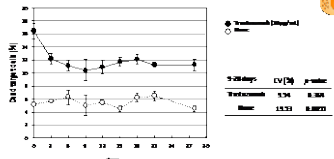
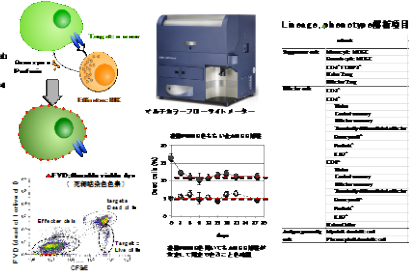


Figure 3. Assessment of the ADCC in cryopreserved PBMC. The stability of frozen PBMCs was assessed using the ADCC assay. PBMCs were isolated and cryopreserved at 4°C using CellSaver. Frozen PBMCs were thawed every 7-10 days after cryopreservation. ADCC activity was detected using CFSE4 as target cells at an E/T ratio of 4:1, and fresh PBMCs (circles) or cells 18 days after thawing (squares). The results are shown as mean target cells (TC) per preserved or fresh PBMC (1 cell). C values were calculated using the following formula:  $CV = \frac{SD}{mean} \times 100$  [%].

各種新規抗体薬の治癒効果予測のためのマルチカラーフローサイトメーターを駆使した新規高感度 ADCC アッセイの確立と宿主免疫モニタリング



次世代高速シーケンサーを用いた全ゲノム解析プローブ作成

薬剤関連 147 遺伝子のターゲットキャプチャーシーケンスによって、87 検体の延べ数として 112,799 個の SNP を検出した。このうち SNP データベース (dbSNP Build 138) に登録されているものが 3,536 種類、登録されていない新規のものが 1,082 種類あった。

機能的変化を起こすと考えられる機能性 SNP 候補として、アミノ酸置換を伴う配列多型を 135 遺伝子 11,475 個、ナンセンス配列多型を 10 遺伝子 73 個、スプライシング異常を伴う配列多型を 5 遺伝子 105 個、フレームシフトを伴う挿入欠失多型を 10 遺伝子 698 個、フレームシフトを伴わない挿入欠失多型を 6 遺伝子 99 個、検出した。他に、遺伝子の発現や翻訳、mRNA の安定性に関わる 5' 上流域や 5' ; 3' -非翻訳領域にも延べ 43,084 個の多型を検出した。

また、遺伝子コピー数多型については、シーケンスデータを用いた XHMM 解析を行なうことによって、CES1 (19 例)、CRHR1 (1 例)、CYP2A6 (52 例)、CYP2C19 (2 例)、CYP2D6 (43 例)、CYP2E1 (7 例)、CYP4F2 (3 例)、FCGR2A-FCGR3A (53 例)、G6PD (2 例)、GSTA1 (1 例)、GSTM1 (37 例)、GSTT1 (1 例)、SLC22A1-SLC22A2-LPA (2 例)、SULT1A1 (44 例)、UGT2B17 (49 例) の遺伝子領域にコピー数変化を検出した。

薬剤関連 147 遺伝子の網羅的シーケンス解析による PGx 研究は今回が初めての経験であるため、解析手法の妥当性を検証することが重要である。まず上記候補遺伝子において検出された配列多型とコピー数多型について TaqMan アッセイ法による検証実験を行ない、再検定する必要がある。その後、機能解析を進めて遺伝子多型の意義を検討する。

NCC ImmunoPGx Panel ver1 の設計

免疫調節分子を標的とした抗体医薬に対する反応性や有害事象についての関連解析を行なう目的で、免疫応答/免疫治療に関連する 141 遺伝子を選択し、キャプチャープローブ (NCC ImmunoPGx panel ver1) の設計を行なった。免疫系の多重遺伝子ファミリーの存在を考慮して最も厳しい条件での設計を行なった。

イメージング画像情報を解析する統計学的解析手法の検討

イメージング画像は情報量としては多いが、疾患の診断、進行の観察あるいは治療効果の判定に統計的に処理するためには、一定の方法により数値化し、クライテリアを設けて分類する必要がある。また、同一の試料であっても、切断面の配置、あるいは切片の作成技術や撮像分析の再現性の問題から異なる画像が得られることがあり、これを適切に補償する必要がある。さらに特定の形態の分布を判別する場合は、サンプリングの機会あるいは個人ごとの形態の揺らぎを考慮しなくてはならない。これらの要因を考慮して、画像処理の方法について検討した。一般に 1 次元の情報の汎用的な解析方法としてモーメント解析法があり、量、平均、分散、尖度、歪度など基本的なパラメーターに情報を縮約することができる。これを 3 次元に拡張した。このときに重心からの方向ごとに情報を整理するなどの方法を組み合わせることで、分析対象の増大、移動、拡張、形態変化などの動きを一般的にパラメータ化することができた。画像処理プログラムのプロトタイプを作成し、処理の実例の情報の収集を進めている。また、形態の揺らぎを考慮する方法などについて、さらなる検討を進めている。

＜研究課題の到達目標に対する研究成果と考察＞

質量分析イメージング法、抗体医薬血中濃度測定、薬理遺伝学解析を始めとする技術を未承認薬の開発研究において応用するための新規技術開発はスケジュールに従って進歩が認められる。開発された技術を用いることで、組織内の不均一分布が測定可能となり、薬物および複数のバイオマーカーが測定可能と期待される。これは創薬研究だけでなく、実地医療および基礎研究にとって大きなメリットとなる。以上の方法論は、測定の精度、再現

性、直線性の確立に併せて、情報処理の信頼性、再現性、効率性が高まることで、本研究の目的である臨床開発研究への積極的な活用が真に可能になると考えられる。

### 倫理面への配慮

本研究は、ヒトを対象とした組織および血液中の薬物濃度測定を含む臨床研究であり、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されるものである。本研究中の臨床試験は、厚生労働省「臨床研究倫理指針」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。本研究に参加する研究者は、臨床薬理研究を数多く経験しており、検体の匿名化、管理方法などの具体的手法に熟知している。

### 本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

#### 2年次

1. Fujiwara Y, Kobayashi S, Nagano H, Kanai M, Hatano E, Toyoda M, Ajiki T, Takashima Y, Hamada A, Minami H, Ioka T. Pharmacokinetic Study of Adjuvant Gemcitabine Therapy for Biliary Tract Cancer following Major Hepatectomy (KHBO1101), PLOS ONE, 2015(accepted).
2. Iwamoto N, Umino Y, Yamane N, Hamada A, Shimada T. Fully validated LCMS bioanalysis of Bevacizumab in human plasma using nano-surface and molecular-orientation limited (nSMOL) proteolysis, Drug Metab Pharmacokinet, 2015(accepted).
3. Otani S, Hamada A, Sasaki J, Wada M, Yamamoto M, Ryuge S, Takakura A, Fukui T, Yokoba M, Mitsufuji H, Toyooka T, Maki S, Kimura M, Hayashi N, Ishihara M, Kasajima M, Hiyoshi Y, Nagashima Y, Katono K, Igawa S, Kubota M, Katagiri M, Saito H, Masuda N. Phase I and Pharmacokinetic Study of Erlotinib Administered in Combination With Amrubicin in Patients With Previously Treated, Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. Am J Clin Oncol, 38:405-10(2015).
4. Iwamoto N, Umino Y, Yamane N, Hamada A, Shimada T. Development of the validated LCMS bioanalysis of Trastuzumab in human plasma using selective detection method for complementarity-determining regions of monoclonal antibody: nano-surface and molecular-orientation limited (nSMOL) proteolysis, Analytical Methods, 2015(in press).
5. Katsuya Y, Fujiwara Y, Sunami K, Utsumi H, Goto Y, Kanda S, Horinouchi H, Nokihara H, Yamamoto N, Takashima Y, Osawa S, Ohe Y, Tamura T, Hamada A. Comparison of the pharmacokinetics of erlotinib administered in complete fasting and 2 h after a meal in patients with lung cancer. Cancer Chemother Pharmacol, 76:125-32(2015).
6. Oguri T, Shimokata T, Ito I, Yasuda Y, Sassa N, Nishiyama M, Hamada A, Hasegawa Y, Ando Y. Extension of the Calvert formula to patients with severe renal insufficiency, Cancer Chemo Pharmacol, 76:53-9(2015).
7. Kurihara H, Shimizu C, Miyakita Y, Yoshida M, Hamada A, Kanayama Y, Yonemori K, Hashimoto J, Tani H, Kodaira M, Yunokawa M, Yamamoto H, Watanabe Y, Fujiwara Y, Tamura K. Molecular imaging using PET for breast cancer. Breast Cancer. 2015(in press).
8. Kurihara H, Hamada A, Yoshida M, Shimma S, Hashimoto J, Yonemori K, Tani H, Miyakita Y, Kanayama Y, Wada Y, Kodaira M, Yunokawa M, Yamamoto H, Shimizu C, Takahashi K, Watanabe Y, Fujiwara Y, Tamura K. <sup>64</sup>Cu-DOTA-trastuzumab PET imaging and HER2-specificity of brain metastases in HER2-positive breast cancer patients. EJNMMI Research, 5:8(2015).
9. Sakata S, Sasaki S, Saeki S, Hamada A, Kishi H, Nakamura K, Notsute D, Sato R, Saruwatari K, Iriki T, Tanaka H, Akaike K, Fujii S, Hirosako S, Kohrogi H. Dose escalation and pharmacokinetic study of carboplatin plus pemetrexed for elderly patients with advanced non-squamous, non-small-cell lung cancer: Kumamoto Thoracic Oncology Study Group Trial 1002, Oncology, 88:201-207(2015).