

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590188

研究課題名(和文)白金系抗がん薬の過敏症発現機序に基づく再投与可能患者の選別法構築

研究課題名(英文) Risk evaluation of carboplatin-induced allergy based on basophil activation test and FcεRI expression.

研究代表者

岩本 卓也 (Iwamoto, Takuya)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30447867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：白金系薬物は、繰り返し投与により重篤な過敏症を引き起こすことが知られている。また、白金系薬物であるカルボプラチンによる過敏症の既往のある患者では、末梢血のin vitroでのカルボプラチンの刺激により、好塩基球が活性化することが確認されている。本研究では、カルボプラチンによる好塩基球の活性化機序を解明するために、13名の患者(過敏症発症者5名、未発症者8名)を対象に研究を行った。その結果、カルボプラチンによる好塩基球の活性化はIgE依存性の反応であり、IgE受容体であるFcεRIの過剰発現を伴い反応性変化を引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It is well known that platinum drugs induced severe hypersensitivity reaction (HR) after the repeated administration, and basophil activation was observed in patients with a history of carboplatin induced severe HR. However, the precise mechanism by which carboplatin induces basophil activation. To investigate whether IgE-dependent mechanisms, including the overexpression of FcεRI, participate in carboplatin-induced basophil activation, 13 ovarian cancer patients were enrolled: 5 with a history of carboplatin-induced severe HR within the past 2 years, and 8 with no such history. Our results indicated that an IgE-dependent mechanism incorporating FcεRI overexpression participates in carboplatin-induced severe HR.

研究分野：医療薬学

キーワード：好塩基球 バイオマーカー カルボプラチン 白金系抗がん薬 アレルギー IgE

1. 研究開始当初の背景

クームス分類 型アレルギーの *in vitro* 測定法として、抗原刺激により活性化した好塩基球からのヒスタミン遊離量を測定する方法があるが、薬物などの低分子化合物に対する陽性一致率は一般的に低い。近年、白金製剤であるシスプラチンの過敏症患者において、好塩基球の CD63 発現量が上昇していることが報告された (Hautarzt 59: 883-884, 2008)。さらに、好塩基球に特異的に発現する CD203c は CD63 に比べ、ラテックスアレルギーに対する陽性一致率が有意に高い (75% vs. 50%) と報告されている (Clin Exp Allergy 33: 259-265, 2003)。これらの報告から、白金製剤の過敏症では、好塩基球の CD203c の発現量が優れた臨床指標となる可能性が高い。また、白金製剤は肥満細胞/好塩基球を活性化してヒスタミンを遊離することが報告されているが (Cancer 73: 2218-2222, 1994)、その詳細な機序は解明されておらず、IgE を介する免疫機序のみならず、IgE を介さない非免疫機序の存在も示唆されている (Bone Marrow Transplant 21:727-729, 1988)。そして、IgE を介さない機序の場合、白金製剤を緩徐に投与することで、安全に再投与を実施できる可能性が示唆されている (Allergol Immunopathol (Madr) 31: 342-344, 2003)。

最近、IgE を介して過敏症を引き起こすニューキノロン系抗生物質では、過敏症患者の 71% に好塩基球の CD63 の発現上昇がみられ、それら患者の CD63 発現量は、IgE を介する免疫系を賦活するホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PI3-K) の阻害薬である wortmannin により著しく抑制されることが示された (Allergy 66: 247-254, 2011)。この手法を応用して、白金製剤過敏症の IgE 依存性を患者毎に定量することにより、白金製剤の再投与の可否を判断できる可能性がある。これまでに、好塩基球の活性化を指標として白金製剤の過敏症を評価した報告は無く、その機序解明を目的とした研究や、再投与可能患者を選別することを目的とした研究も見当たらないことから、本研究は、治療個別化に向けて新しい評価系の導入を試みる革新的な研究と位置づけられる。

2. 研究の目的

カルボプラチンやオキサリプラチンなどの白金製剤は、投与回数を重ねるとアナフィラキシー様症状を発症する危険性が高まることから、治療を継続する上で問題となっている。最近、申請者等は、カルボプラチンによるアレルギーを予測する手段として、好塩基球の CD203c を定量する方法が有用であることを既に報告している (Biol Pharm Bull 35:1487-1495, 2012)。しかしながら、CD203c の顕著な上昇は、通常、アレルギー発症から数週間後であり、発症前の血液検体では判断に迷うケースが多い。また、抗 IgE 抗体の刺

激 (ポジティブコントロール) により、好塩基球に CD203c が発現しないテスト不適合患者も約 10% みられることも臨床応用を目指すうえで問題である。したがって、アレルギー発症前に起きる好塩基球の機能変化について、CD203c 以外の関連分子についても検討する必要がある。

本研究は、白金製剤による好塩基球の細胞応答性の変化に着目し、反応性の個人差を応用した新規オーダーメイド医療の基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 対象

三重大学医学部附属病院にてカルボプラチンによる治療を行い、アレルギー症状を発症した患者および 6 回以上投与しアレルギーを発症していない患者のうち、本研究の趣旨に賛同し文書による同意を得た患者を対象とした。最終的にアレルギー発症者 5 名、未発症者 8 名をエントリーした。

(2) 好塩基球の膜蛋白 CD203c および PI3K 活性の測定

対象患者の末梢血にカルボプラチン希釈溶液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えて 37、30 分間インキュベーションする。反応液中に蛍光ラベルした抗 CD203c 抗体、CD3 (T 細胞マーカー) 抗体および CRTH2 (プロスタグランジン D2 受容体) 抗体、活性化緩衝液を加え染色する。CRTH2 発現細胞のうち、好酸球と CD3 陽性の T 細胞集団をゲートで排除し、好塩基球中に発現する CD203c をフローサイトメーターにて定量する。また、PI3K 活性の測定については、PI3K の阻害剤である Wortmannin を用いて定量した。

(3) 好塩基球活性化における IgE 依存性の検討

好塩基球に CD203c を高発現する患者の末梢血を乳酸処理することにより、Fc ϵ R1 から IgE を剥離させる (Allergology International 57:347-358, 2008)。乳酸処理による IgE の剥離については、蛍光ラベルした抗 IgE 抗体、および Fc ϵ R1 の IgE 結合サイトに結合する CRA2 および非特異的に結合する CRA1 を用いて確認した。乳酸処理後の検体に、カルボプラチンのみ、アレルギー陽性患者血清 + カルボプラチン、アレルギー陰性患者血清 + カルボプラチン、患者血清 + PBS を加え、フローサイトメーターにて好塩基球をゲーティングして、CD203c の発現量を定量した。それぞれの条件における好塩基球の応答性の差から、IgE 依存性を評価した。

(4) 好塩基球の Fc ϵ R1 α 、Fc ϵ R1 β 、Fc γ 発現量の測定

細胞膜に発現する Fc ϵ R1 α について、上記方法にて好塩基球をゲーティングし、蛍光ラベルしたそれぞれの特異抗体を用いてフローサイトメーターにて蛍光強度を定量する。さらに、患者検体の全血から total RNA を抽出

し、FcεRIα、FcεRIβ、FcγRの mRNA 発現量を RT-PCR により定量した。

4. 研究成果

(1) Wortmannin による好塩基球活性化の抑制効果

カルボプラチンによる好塩基球の ex-vivo 活性化に対する PI3-K 阻害薬である wortmannin の効果を検討した(図1)。0.1 μM および 10 μM の wortmannin の前処理により、カルボプラチンによる好塩基球の活性化 (CD203c 陽性率の上昇) は、過敏症歴のある 3 名の患者全てにおいて、ほぼ完全に抑えられた ($p < 0.05$)。このように PI3-K を介する好塩基球の活性化を抑制することでカルボプラチンによる好塩基球の活性化が抑えられたことから、IgE を介する好塩基球の活性化が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

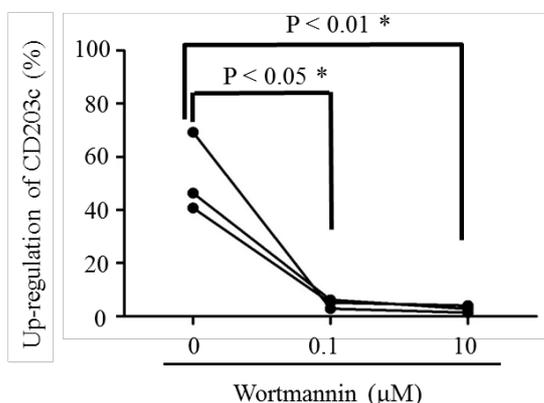


図1 カルボプラチンにより活性化された好塩基球に対する wortmannin による抑制効果

(2) IgE の受動感作の確認

カルボプラチンによる好塩基球の活性化が IgE を介して行われていることを証明するために、IgE の受動感作実験を行った。図2a に示すとおり、酸処理により好塩基球への抗 CRA1 抗体結合量に変化はみられなかったが、抗 CRA2 抗体結合量は顕著に増加した。抗 CRA2 抗体は、FcεRI における IgE 結合部位に直接結合するため、抗 CRA2 抗体結合量の増加は、好塩基球上から IgE が剥離したことを意味している。また、IgE の受動感作により、抗 CRA2 抗体結合量は酸処理時に比べ低下したことから、好塩基球上に IgE が再結合したことが確認された。

同様に、上記の現象について抗 IgE 抗体を用いて確認したところ、図2b に示すとおり、酸処理により好塩基球上の IgE の低下が認められ、IgE の受動感作により、好塩基球への IgE の再結合が認められた。さらに、IgE の Fc 部分に結合し FcεRI との結合を阻害する omalizumab 処理により、好塩基球に結合する抗 IgE 抗体の量が減少したことから、IgE の

Fc 部分を介して好塩基球と結合していることも確認された。

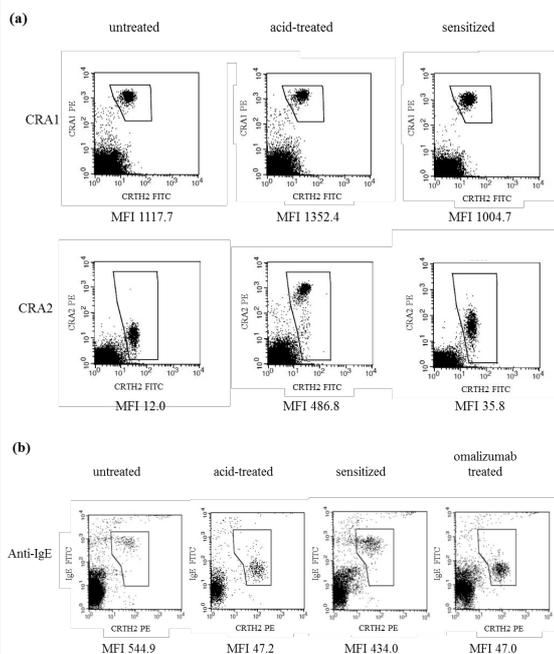


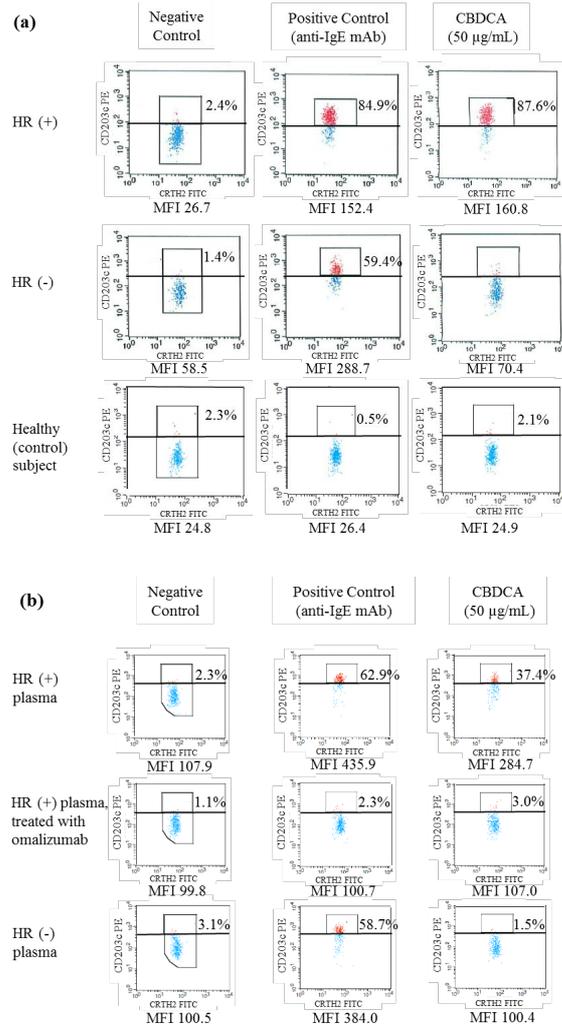
図2 酸処理による好塩基球からの IgE の剥離と IgE の受動感作

(3) IgE 受動感作による好塩基球の活性化変化

ポジティブコントロール(抗 IgE 抗体)による刺激により好塩基球が活性化しない健康被験者をコントロールとして、実験を行った。この健康被験者では、カルボプラチンによる刺激でも好塩基球が活性化しない (CD203c の発現上昇が見られない)ことを確認した(図3a)。カルボプラチンによる過敏症の既往のある患者 (HR+) では、ポジティブコントロールの刺激に加え、カルボプラチンの刺激により好塩基球の活性化がみられた(図3a)。一方、カルボプラチンによる過敏症の既往のない患者 (HR-) では、ポジティブコントロールの刺激により好塩基球は活性化するが、カルボプラチンの刺激では好塩基球の活性化はみられなかった(図3a)。

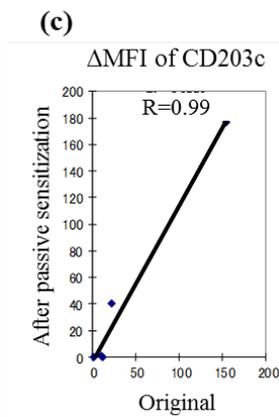
次に、ポジティブコントロール(抗 IgE 抗体)に反応を示さない健康被験者の好塩基球に HR(+)患者または HR(-)患者の IgE を受動感作し、好塩基球の反応性変化を確認した(図3b)。HR(+)および HR(-)患者の IgE を受動感作した両者において、ポジティブコントロールでの刺激により好塩基球が活性化したことから、IgE が置換されたことが確認された。そして、HR(+)患者の IgE を受動感作した場合には、カルボプラチンによる刺激により好塩基球の活性化がみられたが、HR(-)患者の IgE を受動感作した場合には、カルボプラチン刺激による好塩基球の活性化はみられなかった。さらに、HR(+)患者の IgE を受動感作の過程で omalizumab 処理を加えることにより、ポジティブコントロールおよびカルボプラチン刺激による好塩基球の活性

化が消失することから、HR(+)患者の IgE を介して好塩基球が活性化されることが確認された。また、5名の患者において、それぞれの好塩基球のカルボプラチン刺激による CD203c の発現量、健常被験者の好塩基球に IgE を受動感作した場合の CD203c の発現量の両者を比較したところ、CD203c の平均蛍光強度 (MFI) には良好な相関がみられた (図 3c,



R=0.99

図 3 IgE 受動感作による好塩基球の活性化の変化



(4) 好塩基球における FcεR1α, FcεR1β, FcγR 発現量

カルボプラチンによる過敏症の既往のある (HR+)患者 8名と既往のない HR(-)患者 5名の FcεR1 の発現量を比較した。その結果、フローサイトメーターで比較した好塩基球における FcεR1αの発現量は、HR(+)患者では HR(-)患者および健常被験者に比べ有意に高値であった (それぞれ P<0.05, P<0.01) (図 4)。また、末梢血における FcεR1α, FcεR1β, FcγR の mRNA 発現量は、HR(+)患者では HR(-)患者に比べ有意に高値であった (それぞれ P<0.05, P<0.01, P<0.05) (図 5)。特に、FcεR1β は好塩基球特異的に発現していることから、顕著な差がみられた。

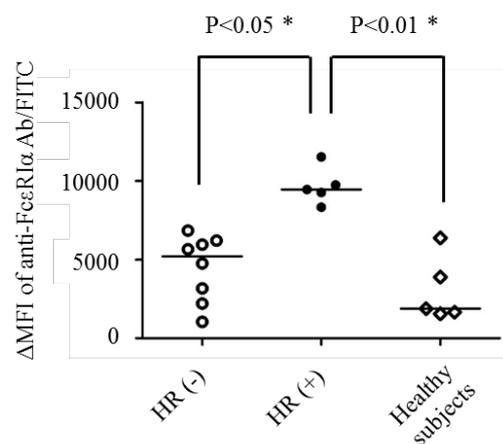


図 4 好塩基球における FcεR1α発現量の比較

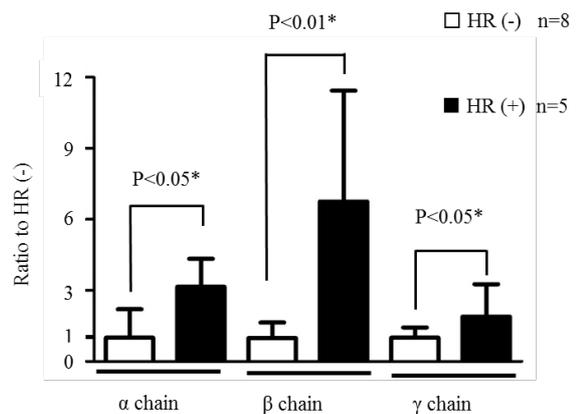


図 5 FcεR1α, FcεR1β, FcγR mRNA の発現量の比較

(5) 考察

本研究において、カルボプラチンによる過敏症では、好塩基球の活性化が起こり、その反応にはカルボプラチンを特異的に認識する IgE の存在が必須であることを世界で初めて示した。また、カルボプラチンによる過敏症の既往のある患者では、IgE の受容体である FcεR1 の発現量が増加しており、このよう

な好塩基球の環境変化も過敏症発現に關与することを初めて明らかにした。カルボプラチンの重篤なアレルギー反応は投与8回目以降に発現することがほとんどであるが、この間に好塩基球や肥満細胞におけるFcεRIの発現量の増加やカルボプラチン特異的IgEが生成されることで、アレルギー反応が引き起こされることが明らかになった。したがって、カルボプラチンによる重篤なアレルギー反応を未然に予測するためには、好塩基球のFcεRIの発現量変化やカルボプラチン特異的IgEの存在を検出する方法が有用であると考えられた。これらの情報は、同じ白金系抗がん薬であるシスプラチンやオキサリプラチンにも当てはまる可能性があり、それら抗原に特異的なIgEの存在等を検討していくことが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

Iwamoto T, Monma F, Fujieda A, Nakatani K, Gayle AA, Nobori T, Katayama N, Okuda M. Effect of genetic polymorphism of CYP3A5 and CYP2C19, and concomitant use of voriconazole on blood tacrolimus concentration in patients receiving hematopoietic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit.* 2015 Jan 6. [Epub ahead of print] 査読有り

Iwamoto T, Hirai H, Yamaguchi N, Kobayashi N, Sugimoto H, Tabata T, Okuda M. Carboplatin-induced severe hypersensitivity reaction: the role of IgE-dependent basophil activation and Fc RI. *Cancer Sci.* 105:1472-1479 (2014) 査読有り

Ikemura K, Iwamoto T, Okuda M. MicroRNAs as regulators of drug transporters, drug-metabolizing enzymes, and tight junctions: Implication for intestinal barrier function. *Pharmacol Ther.* 143:217-224 (2014) 査読有り

福森史郎, 藤井英太郎, 藤田聡, 杉浦伸也, 村木優一, 岩本卓也, 辻泰弘, 藤秀人, 伊藤正明, 奥田真弘 持続性心房細動に対するカテーテルアブレーション後の血漿中ベプリジル濃度と心房細動再発予防効果との関連性 *TDM 研究* 31: 62-68 (2014) 査読有り

Kurata T, Iwamoto T, Kawahara Y, Okuda M. Characteristics of pemetrexed transport by renal basolateral organic anion transporter hOAT3. *Drug Metab Pharmacokinet* 29:148-153 (2014) 査読有り

Miyake T, Iwamoto T, Tanimura M, Okuda M. Impact of closed-system drug transfer device on exposure of environment and healthcare provider to cyclophosphamide in Japanese hospital. *SpringerPlus* 2: 273 (2013) 査読有り

Ikemura K, Nakagawa E, Kurata K, Iwamoto T, Okuda M. Altered pharmacokinetics of cimetidine caused by down-regulation of renal rat organic cation transporter 2 (rOCT2) after liver ischemia-reperfusion injury. *Drug Metab Pharmacokinet* 28: 504-519 (2013) 査読有り

Ikemura K, Yamamoto M, Miyazaki S, Mizutani H, Iwamoto T, Okuda M. MicroRNA-145 post-transcriptionally regulates the expression and function of P-glycoprotein in intestinal epithelial cells. *Mol Pharmacol* 83: 399-405 (2013) 査読有り

Iwamoto T. Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: review of the efficacy and side effects of approved drugs. *Biol Pharm Bull.* 36:715-718 (2013) 査読有り

Nishikawa K, Masui S, Nakatani K, Nobori T, Enokiya T, Muraki Y, Iwamoto T, Okuda M, Sugimura Y. Influence of genetic polymorphisms in CYP3A5 genes on the dosage of extended-release tacrolimus in patients undergoing de novo renal transplantation. *Renal Transplant Vasc Surg* 24: 14-20 (2012) 査読有り

Iwamoto T, Yuta A, Tabata T, Sugimoto H, Gabazza EC, Hirai H, Kojima S, Okuda M. Evaluation of Basophil CD203c as a Predictor of Carboplatin-Related Hypersensitivity Reaction in Patients with Gynecologic Cancer. *Biol Pharm Bull.* 35:1487-95 (2012) 査読有り

Ikemura K, Inoue K, Mizutani H, Oka H, Iwamoto T, Okuda M. An antioxidant Trolox restores decreased oral absorption of cyclosporine A after liver ischemia-reperfusion through distinct mechanisms between CYP3A and P-glycoprotein in the small intestine. *Eur J Pharmacol.* 690:192-201 (2012) 査読有り

Ueno Y, Matsuda H, Mizutani H, Iwamoto T, Okuda M. Involvement of Specific Transport System on Uptake of Lactone Form of SN-38 in Human Intestinal Epithelial Cell Line Caco-2. *Biol Pharm Bull.* 35:54-58 (2012) 査読有り

〔学会発表〕(計 12 件)

Takuya Iwamoto, Fumihiko Monma, Atsushi Fujieda, Kaname Nakatani, Naoyuki Katayama, Masahiro Okuda. Effect of genetic polymorphism of CYP3A5 and CYP2C19, and concomitant use of voriconazole on the blood tacrolimus concentration in patients receiving hematopoietic stem cell transplantation. The 49th ASHP Midyear Clinical Meeting and Exhibition. 2014.12.8 (Anaheim, CA, USA)

岩本卓也, 奥田真弘. 造血幹細胞移植患者の CYP 遺伝子多型が全血中タクロリムス濃度に及ぼす影響 第 24 回医療薬学会年会 2014.9.27 「名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)」

岡本明大, 濱口直美, 須藤宏文, 石永一, 竹内万彦, 村木優一, 岩本卓也, 奥田真弘, セツキシマブによる infusion reaction 対策における薬剤師の介入効果, 第 24 回医療薬学会年会 2014.9.27 「名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)」

岩本卓也, 奥田真弘. 併用薬との相互作用を含むがん薬物療法の有害反応の発現要因. 第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2014.7.18 「福岡国際会議場(福岡県・福岡市)」

山口希実, 平井博之, 小嶋慈之, 熊谷智彰, 田畑務, 奥田真弘, 岩本卓也. カルボプラチン(CBDCA)アレルギーの発症予測における好塩基球活性化試験(BAT)の有用性 第 56 回日本婦人科腫瘍学会 2014.7.17 「栃木県総合文化センター (栃木県・宇都宮市)」

平井博之, 山口希実, 田畑務, 岩本卓也. 好塩基球の受動感作によるカルボプラチン特異的 IgE の証明 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014.5.9 「国立京都国際会館(京都府・京都市)」

Takuya Iwamoto, Evaluation of Leukocyte Activity to Construct Immunobiomarker-based Personalized Chemotherapy. Translational & Personalized medicine 2013 2013.8.5 (Chicagao, USA)

小嶋慈之, 岩本卓也, 平井博之, 熊谷智彰, 杉本浩子, 湯田厚司, 田畑務, Esteban C Gabazza, 奥田真弘, 好塩基球活性化試験によるカルボプラチンアレルギー患者検体の解析 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2013.5.11-12 「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」

池村健治, 山本弥里, 宮崎さおり, 水谷秀樹, 岩本卓也, 奥田真弘, miR-145 による小腸上皮細胞 P-糖蛋白質の転写後発現調節機構 第 59 回日本薬学会東海

支部総会 2013.7.6 「名城大学薬学部(愛知県・名古屋市)」

岩本卓也, 杉本浩子, 平井博之, 谷田耕治, 田畑務, 奥田真弘, 好塩基球の活性化を指標としたカルボプラチン過敏症の予測性と IgE 依存性の評価 日本薬学会第 133 年会 2013.3.28-30 「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」

岩本卓也, 門間文彦, 藤枝敦史, 小暮佳史, 片山直之, 奥田真弘, CYP3A4 活性を指標としたシクロスポリンとアゾール系抗真菌薬との肝代謝相互作用の評価: 症例報告, 第 29 回日本 TDM 学会 2012.6.16-17 「神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)」

池村健治, 山本弥里, 宮崎さおり, 水谷秀樹, 岩本卓也, 奥田真弘, miR-145 は小腸上皮細胞 P-糖蛋白質の発現・機能調節に關与する 日本薬剤学会第 27 年会 2012.5.24 「神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)」

〔図書〕(計 2 件)

岩本卓也 他, 「抗がん剤によるアレルギー」特集・がん領域における注意すべき医薬品副作用のメカニズムと対応 医薬ジャーナル社 2014 年 4 月号、200(101-107)

岩本卓也 他, 病気と薬パーフェクトブック 2012 薬局増刊号 2012、1595 (1496-1497、1504-1506、1510-1511)

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

名称: マイクロ RNA145 (miR-145) による MDR1/P-糖タンパク質(P-gp)の転写後発現調節

発明者: 池村健治、岩本卓也、奥田真弘

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特開 2013-224860

出願年月日: 2012 年 4 月 20 日

取得年月日: 2013 年 10 月 31 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

三重大学大学院医学系研究科臨床医学系講座臨床薬理学

http://www.medic.mie-u.ac.jp/organization/course/cl_pharmacy/

三重大学医学部附属病院薬剤部

<http://hpl.medic.mie-u.ac.jp/pharmacy/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本卓也 (IWAMOTO, Takuya)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 30447867

(2) 研究分担者

奥田真弘 (OKUDA, Masahiro)

三重大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 70252426