

平成28年9月17日
第38回京阪血液研究会

抗腫瘍薬のがん細胞内統合的薬理解析に 基づく白血病治療の基礎的検討

Pharmacologically-directed leukemia chemotherapy



福井大学附属病院
血液・腫瘍内科
山内高弘

CO I 開示

プリストルマイヤーズスクイブ
帝人ファーマ
大正富山化学
中外製薬
富士薬品
(以上2015年度)

発表者名: 山内 高弘



福井→大阪

サンダーバード16号
福井10:42～大阪12:37

福井県

総面積 4190 km²

人口 785,862人(2016年)

人口密度 187人/km²

県の木 松

県の花 水仙

県の鳥 つぐみ

日本海側気候 豪雪地帯

原子炉15基が設置されている

メガネフレーム、全国生産の90%以上を生産

漁業 越前がに

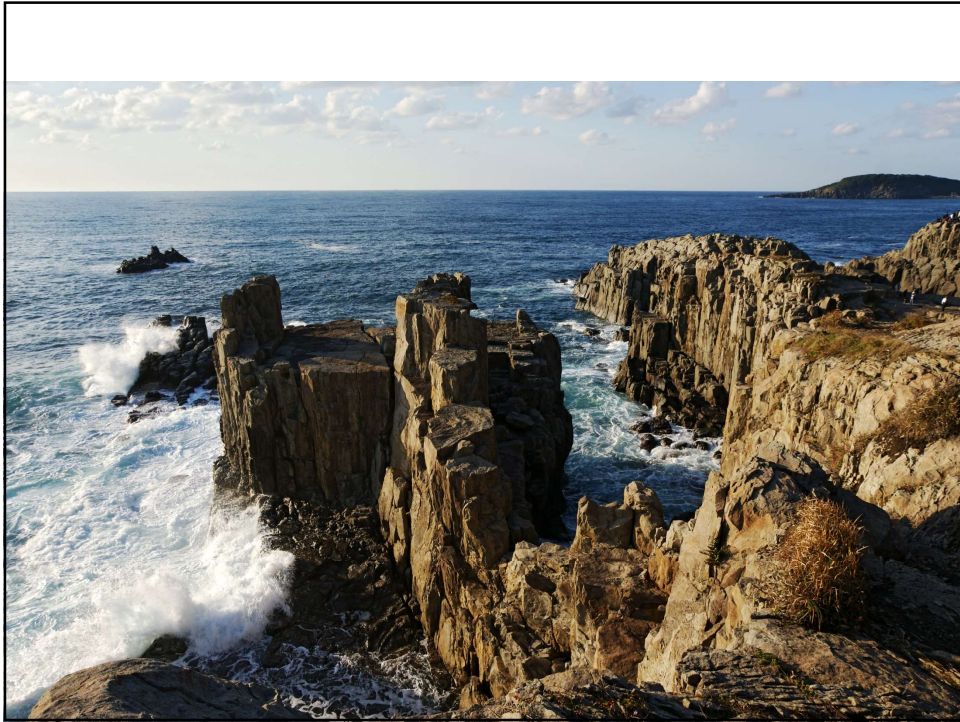
観光 恐竜

東尋坊

永平寺(道元 曹洞宗)

恐竜王国 福井





本日の内容

抗がん薬-シタラビンモデルに-

- 抗がん薬の作用機序・耐性
- ファーマコキティクス(薬物動態)
- がん細胞内薬理に基づく投与法の至適化

白血病の種類

	急性	慢性
骨髄性	AML (夏目雅子 本田美奈子 渡辺 謙 アンディ・フグ 市川団十郎 吉井 怜 大豊泰昭)	CML (蔵間)
リンパ性	ALL (大塚範一 ホセ・カレラス)	CLL

(敬称略)

AMLの治療理念

Total Cell Kill

急性白血病の治療理念

Total cell kill

副作用が耐えうる最大量の抗がん薬投与
によりすべての白血病細胞を根絶する

AMLの治療理念

抗がん薬による体内の全白血病細胞の殲滅

寛解導入療法：

抗がん薬により白血病細胞を減らし、
正常造血を回復させる

寛解後療法：

治療の反復により白血病細胞を更に減らし、寛
解の持続ひいては治癒を目指す

造血細胞移植：

予後中間群・不良群、再発例に施行

AMLの寛解導入療法

Conventional-dose ara-C

3 + 7

薬剤	投与量	日数
標準量シタラビン (Ara-C)	100 mg/m ²	Day 1-7
Idarubicin	12 mg/m ²	Day 1-3
または Daunorubicin	50 mg/m ²	Day 1-5

AMLの地固め療法

High-dose ara-C

大量シタラビン 2,000 mg/m² 12時間おき
5日間

シタラビン

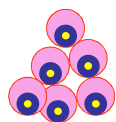
1-β-D-arabinofuranosylcytosine (ara-C)

シトシンヌクレオシドアナログ

増殖がん細胞



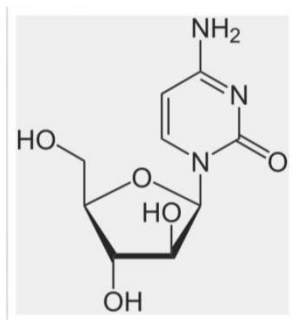
↓ 増殖



シタラビン

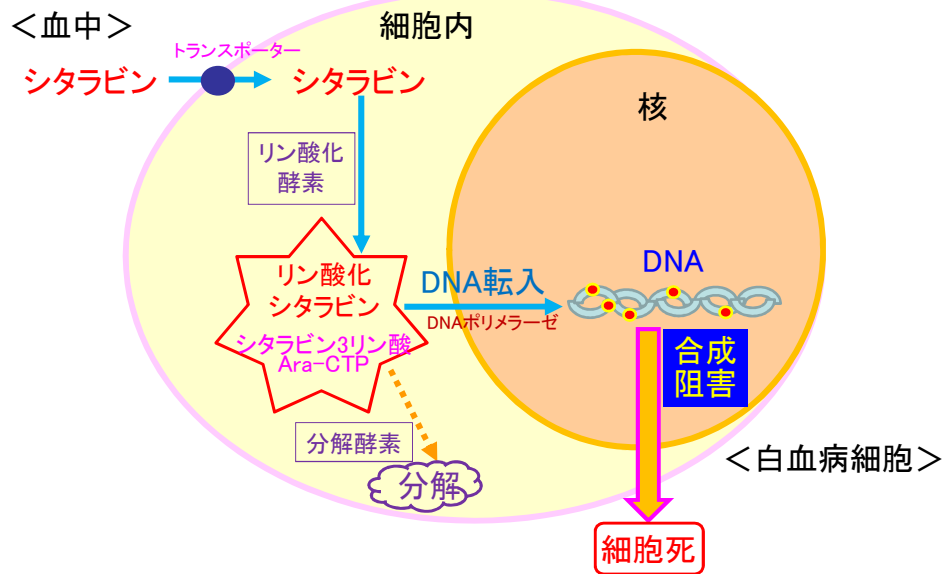


アポトーシス
による細胞死



- AML治療のKey drug
- DNA複製(合成)を阻害する
- 分裂細胞に効く殺細胞効果

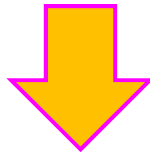
シタラビン効果の要は細胞内シタラビン3リン酸



シタラビンはがん細胞のデオキシシチジンキナーゼでシタラビン3リン酸 (ara-CTP), 活性型シタラビンになり核DNA内に転入されDNA合成を阻害する。

細胞内リン酸シタラビンが最も重要

白血病細胞内のリン酸シタラビン濃度を測定



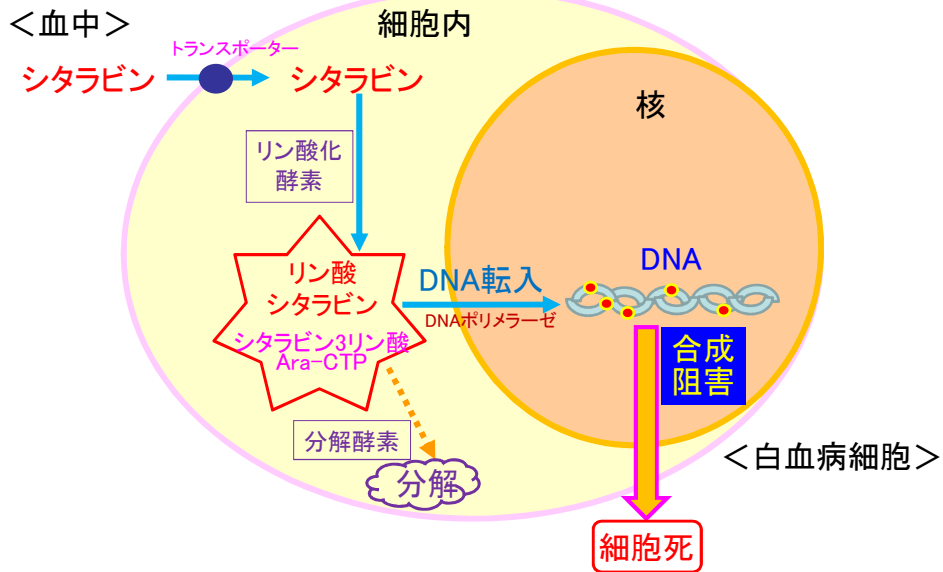
シタラビン至適投与のために

リン酸シタラビンを核に

- Pharmacokinetic optimization
(薬物動態から投与量方法の最適化)
- Sensitivity of leukemic cells to ara-C
(感受性の予測)
- Modulation of ara-C metabolism
(シタラビンリン酸を増量する併用法)
- Sensitization of leukemic cells to ara-C
(静止期細胞の攻略)

シタラビンの薬物動態

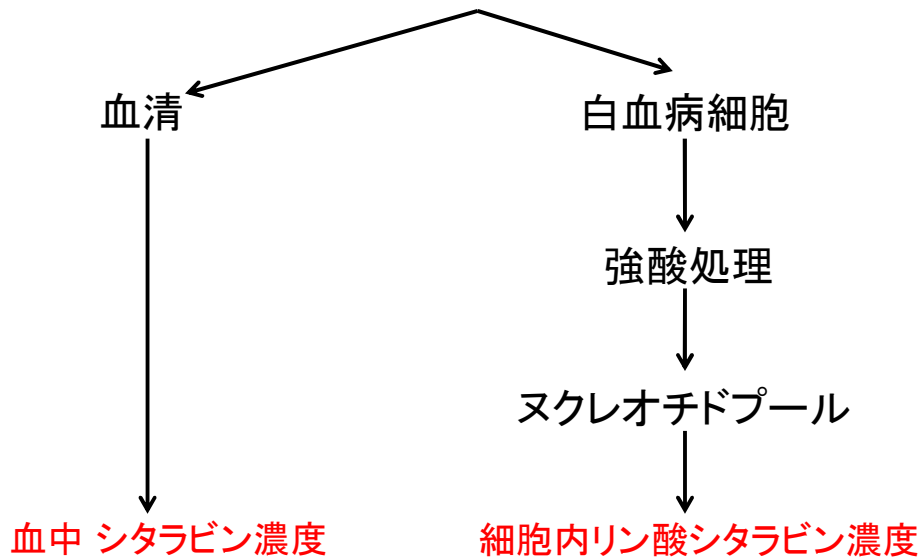
シタラビン効果の要は細胞内シタラビン3リン酸



シタラビンはがん細胞のデオキシシチジンキナーゼでシタラビン3リン酸 (ara-CTP)、活性型シタラビンになり核DNA内に転入されDNA合成を阻害する。

ファーマコキネティクス(薬物動態)

患者血液



(Cancer Res 1996)

細胞内リン酸シタラビン微量定量法の確立

導入療法での細胞内リン酸シタラビン濃度測定は感度の点で困難

シタラビン点滴投与後の患者さんから採血



白血病細胞を分離



ヌクレオチド(リン酸シタラビンが含有)の抽出



クロマトグラフィ(HPLC)による単離



リン酸化シタラビンの脱リン酸



抗シタラビン抗体によるラジオイムノアッセイ



がん細胞内活性型シタラビン測定

(Cancer Res 1996)

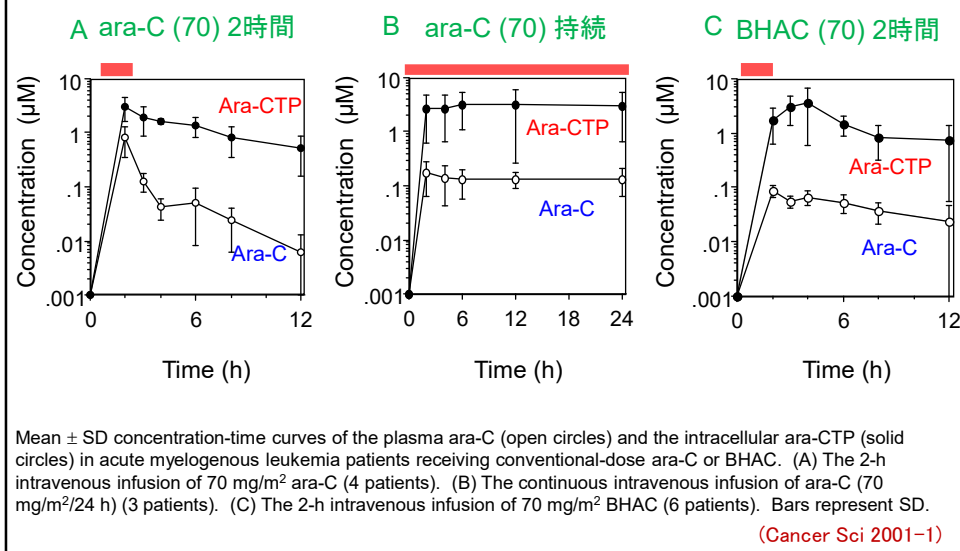
シタラビン投与中の患者白血病細胞内薬物動態

No. of patients entered	20
Sex (n)	
Male	13
Female	7
Age (y)	
Median	60
Range	24-82
M 0	2
M 1	4
M 2	13
M 3	0
M 4	1

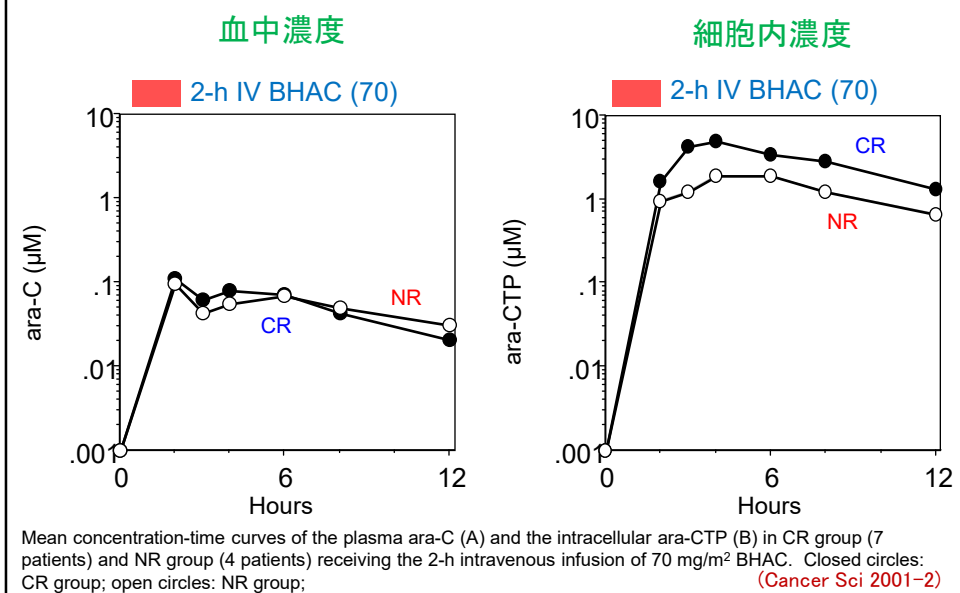
n, Number of patients; FAB, French-American-British.

(Cancer Res 1996)

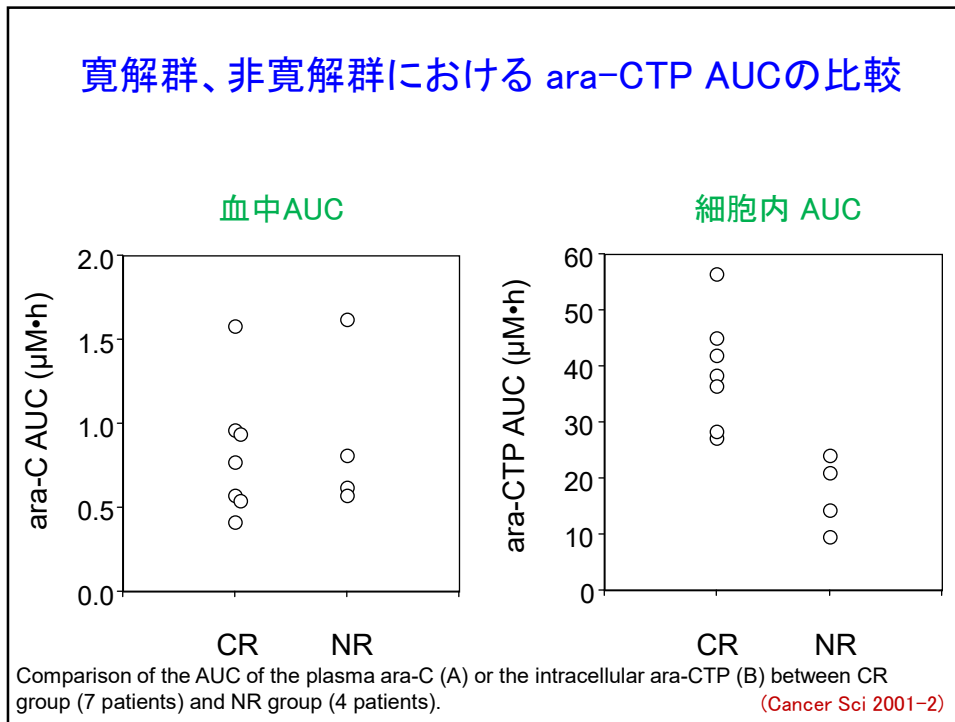
シタラビン通常量投与における薬物動態



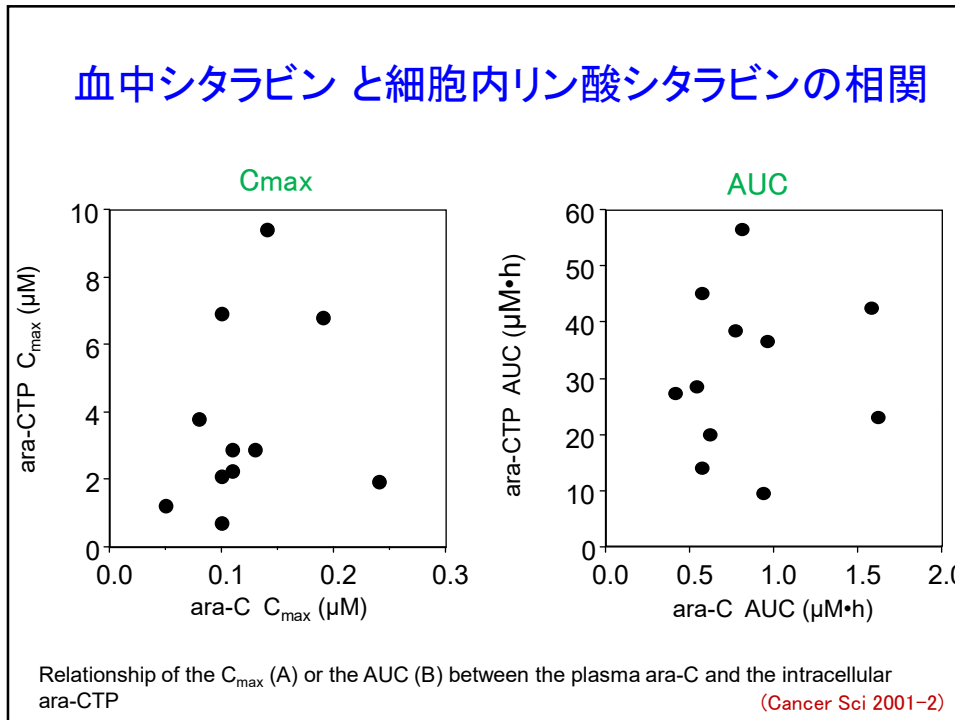
寛解群、非寛解群における ara-CTP薬物動態の比較

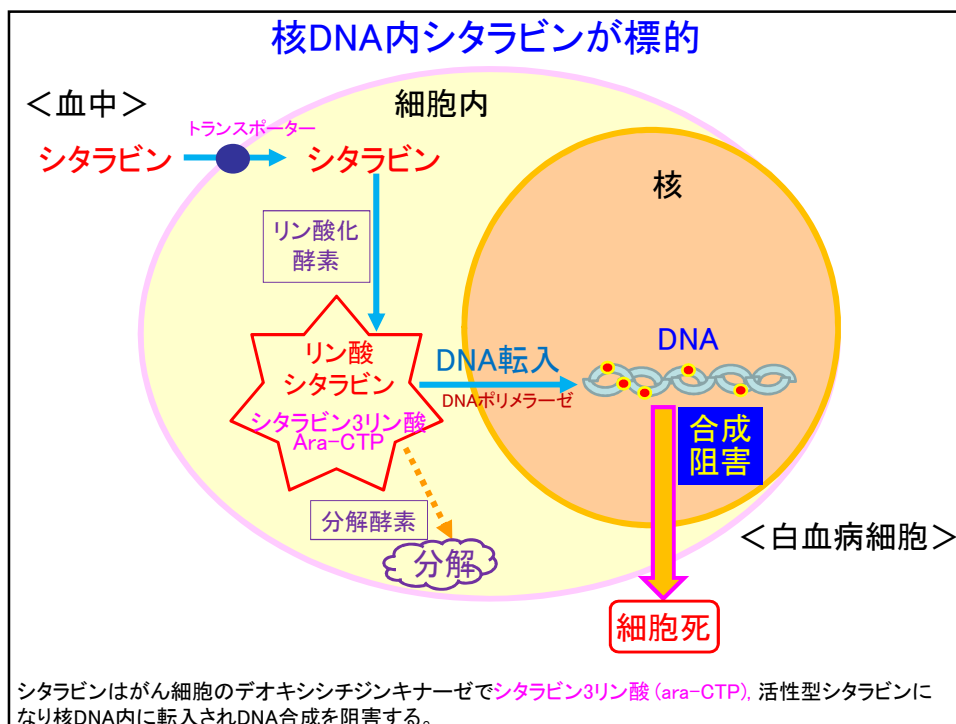


寛解群、非寛解群における ara-CTP AUCの比較

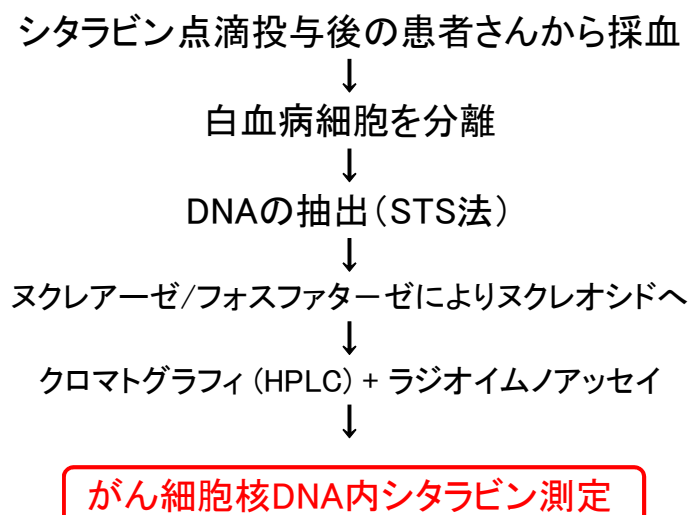


血中シタラビン と細胞内リン酸シタラビンの相関



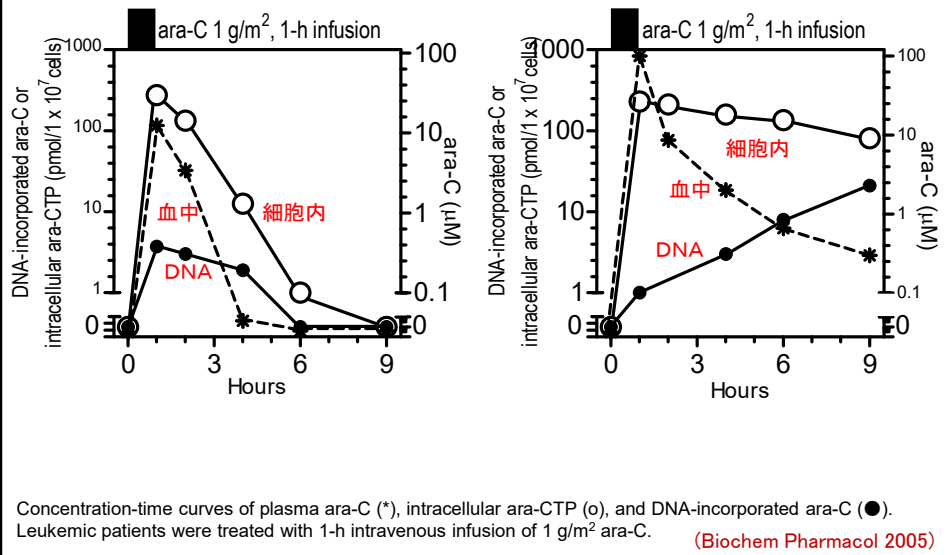


細胞核DNA内シタラビン転入法の確立



(Biochem Pharmacol 2005)

シタラビン濃度モニタリング (TDM)



シタラビンの薬物動態

- シタラビン持続投与において血中濃度が持続し、細胞内リン酸シタラビン生成が最大であった
- 細胞内リン酸シタラビンは治療効果に関連した
- DNA内シタラビン転入のために細胞内リン酸シタラビン持続が必須であった

シタラビン感受性の同定

シタラビンの効果は細胞内リン酸シタラビンに依存する

- 細胞内リン酸シタラビン生成量が感受性に相関
- 細胞内薬剤活性化に関連する転入、リン酸化、分解の3因子が感受性を規定すると推測

AML患者白血病細胞の検討

No. of patients evaluated	33
Sex (n)	
Male	17
Female	16
Age (y)	
Median	69
Range	18-86
Diagnosis	Number
ML-LM	1
ALL (L2)	3
CLL	1
PCL	2
AML (M0)	2
AML (M1)	7
AML (M2)	12
AML (M4)	2
AML (M5)	2
AML (M7)	1

No. or n, number; y, age; ML-LM, leukemic manifestation of malignant lymphoma; ALL, acute lymphoblastic leukemia; PCL, plasma cell leukemia; AML, acute myeloid leukemia; M0-7, subclass of FAB classification

(Biochem Pharmacol 2009)

方法

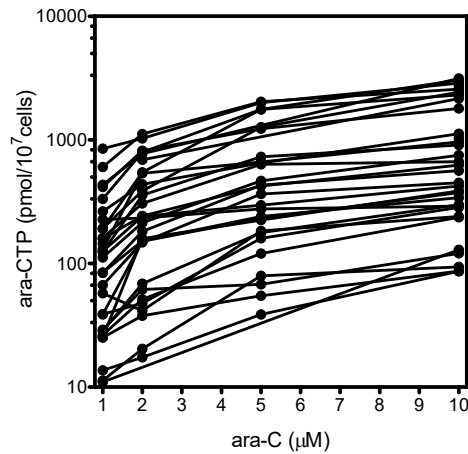
患者白血病細胞浮遊液



各濃度シタラビンと
一定時間共培養

HPLCによる細胞内リン酸シタラビン定量

In vitro における細胞内リン酸シタラビン生成(33 検体)



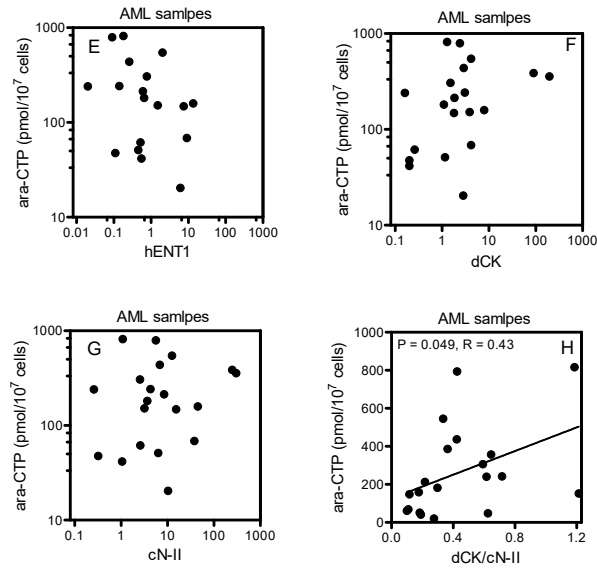
Primary leukemic cells (1×10^6 cell/ml, 10 ml) were incubated for 6 h with various concentrations (1, 2, 5, 10 μ M) of ara-C in media, followed by extraction of the nucleotide pool and measurement of intracellular ara-CTP concentrations using HPLC.

(Biochem Pharmacol 2009)

シタラビン細胞内代謝関連因子

トランスポーター	hENT1
リン酸化酵素	dCK (deoxycytidine kinase)
分解酵素	cN-II (5'-nucleotidase II)

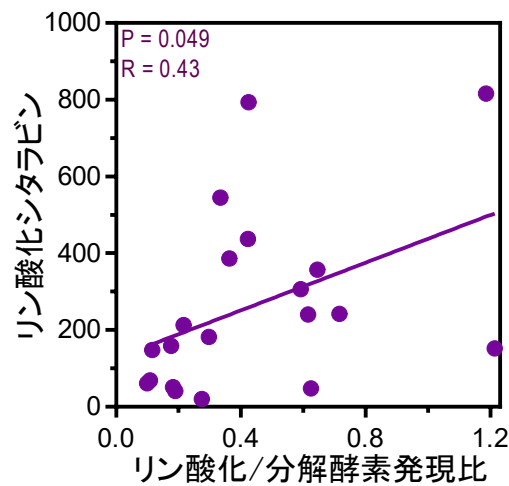
シタラビン関連因子発現レベルと細胞内リン酸シタラビン 生成



(Biochem Pharmacol 2009)

リン酸シタラビンはリン酸化酵素/分解酵素比に相関

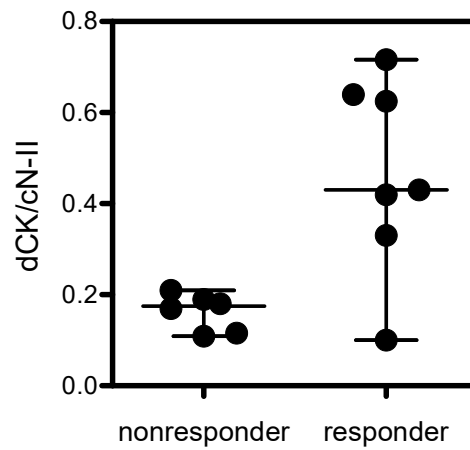
白血病細胞の酵素発現レベルから予測



20人の急性骨髄性白血病患者で培養液中でシタラビン処理(10 μ M, 6 h)後の白血病細胞内シタラビン生成量と細胞のリン酸化酵素/分解酵素比との相関を検討した。

(Biochem Pharmacol 2009)

シタラビン細胞内代謝関連因子と臨床効果

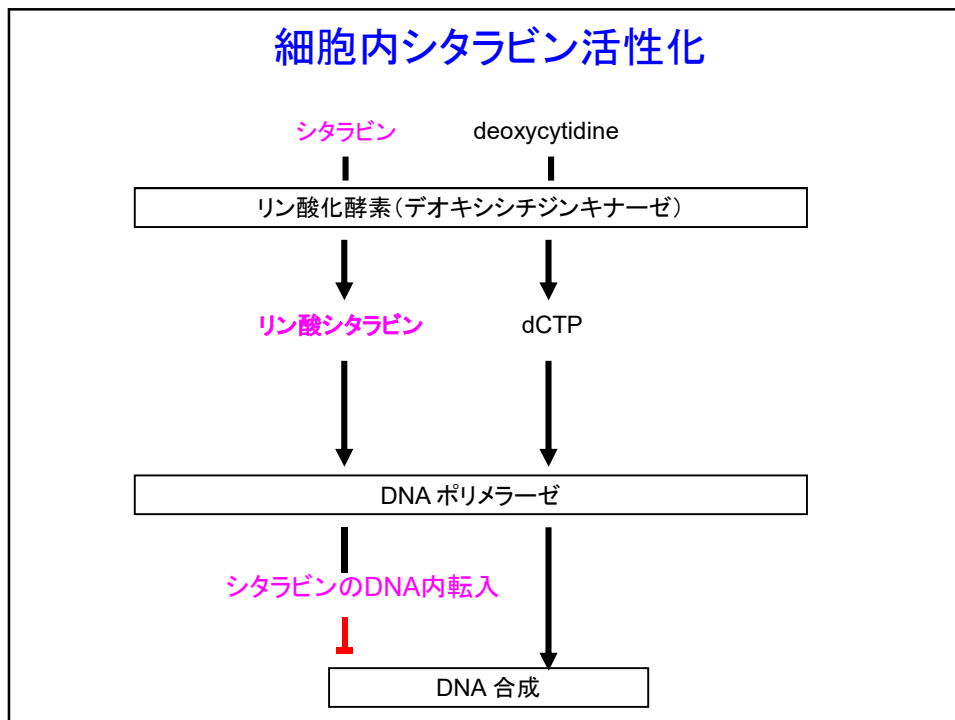


Among 20 AML patients with complete data sets, 12 received chemotherapy, and the dCK/cN-II ratio was examined to have any correlation to therapeutic outcomes.

シタラビンの感受性

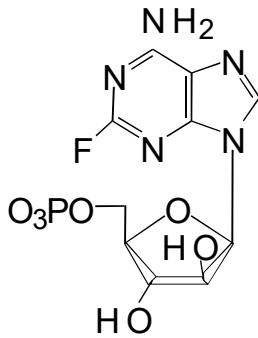
- dCK/cN-II 比が細胞内リン酸シタラビン生成に最も関連した
- dCK/cN-II 比は臨床効果とも関連
- dCK/cN-II 比により患者シタラビン感受性を予測

細胞内リン酸シタラビン増量の ための併用療法



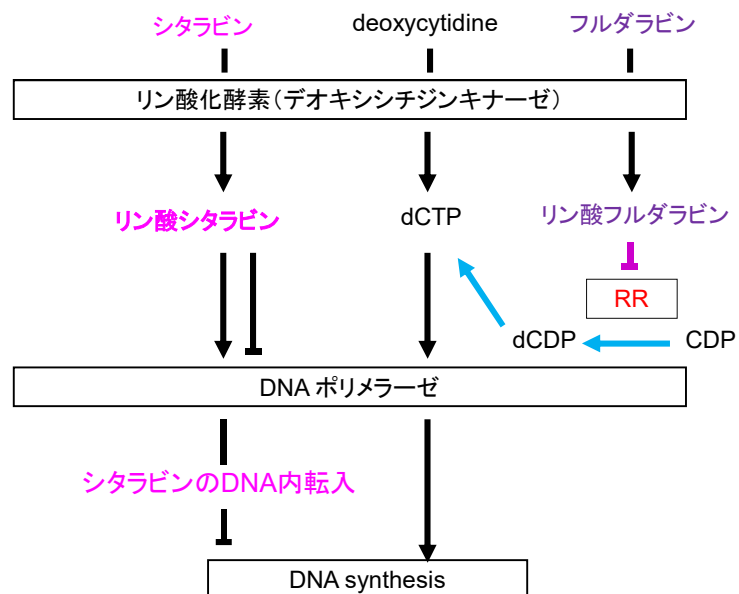
フルダラビン

(9-β-D-arabinofuranosyl 2-fluoroadenine 5'-monophosphate)



- ヌクレオシドアナログ
- 細胞内でリン酸フルダラビンへ代謝

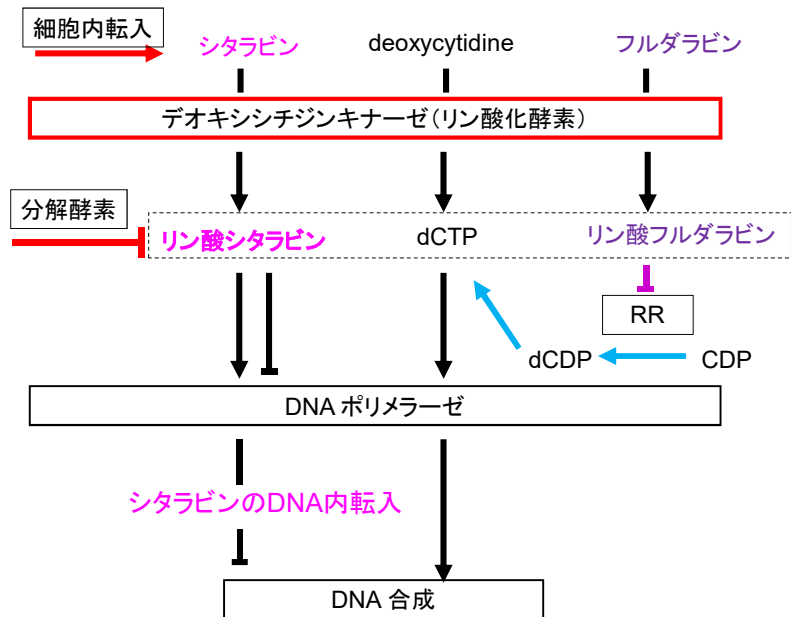
シタラビンとフルダラビンの薬理的相互作用



再発・難治性白血病に対するFLAG療法

薬剤	投与量(/m ²)	0	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Fludara	15 mg	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
Ara-C	2 g	■	■	■	■	■	■	■	■		
G-CSF	300 μg	↓	↓		↓			↓			

シタラビン耐性機序は細胞内濃度低下



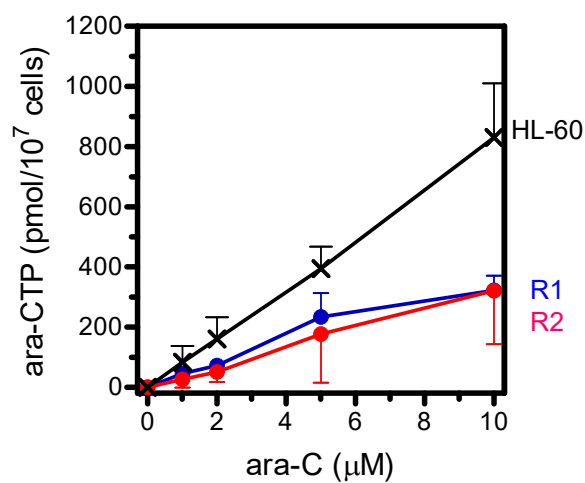
シタラビン 耐性白血病細胞の感受性

	ara-C	
	IC ₅₀ (μM)	Relative resistance
HL-60	0.4	
R1	3.2	8
R2	4.0	10

HL-60, R1, and R2 cells were incubated with various concentrations of ara-C for 72 h, and evaluated for proliferation using XTT assay. The IC₅₀ value was determined as a mean of at least three independent experiments. The relative resistance value was obtained by dividing the IC₅₀ values of R1 and R2 cells by that of HL-60 cells. Doubling time was determined using Trypan blue dye exclusion assay.

(Int J Hematol 2009)

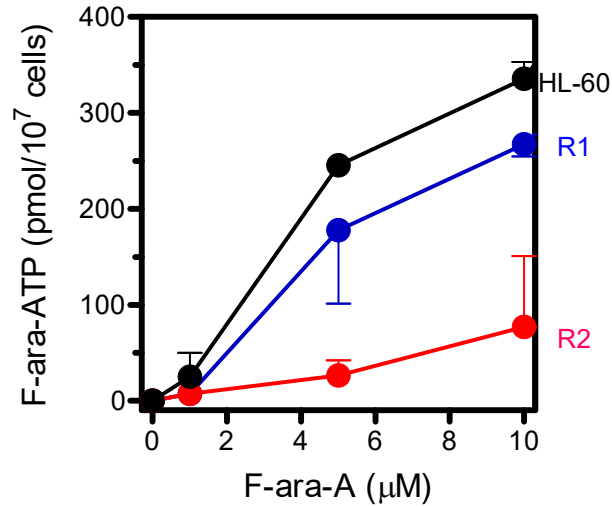
細胞内リン酸シタラビン生成量の比較



HL-60, R1, and R2 cells were incubated for 6 h with ara-C (0 μM, 1 μM, 2 μM, 5 μM, or 10 μM), followed by an extraction of the nucleotide pool and subsequent measurement of ara-CTP.

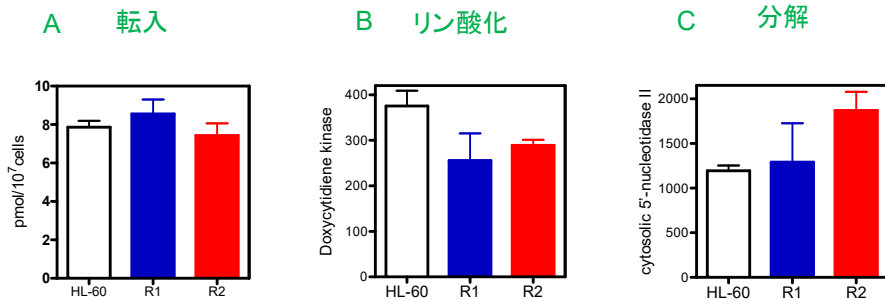
(Int J Hematol 2009)

リン酸フルダラビン生成の定量



Cells were incubated with or without F-ara-A at different concentrations for 72 h. Proliferation was determined using XTT assay. HL-60, R1, and R2 cells were incubated for 3 h with F-ara-A (0 μM, 1 μM, 5 μM, or 10 μM), followed by an extraction of the nucleotide pool and subsequent measurement of F-ara-ATP. (Int J Hematol 2009)

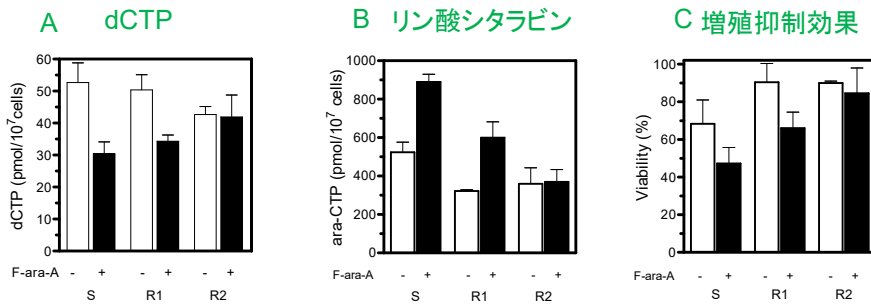
Ara-C 関連因子



After pulse treatment with 1 μM tritiated ara-C for 60 sec, drug uptake was determined by scintillation counting. Deoxycytidine kinase (A) and cytosolic 5'-nucleotidase II

(Int J Hematol 2009)

フルダラビンによるリン酸シタラビン生成量の増強



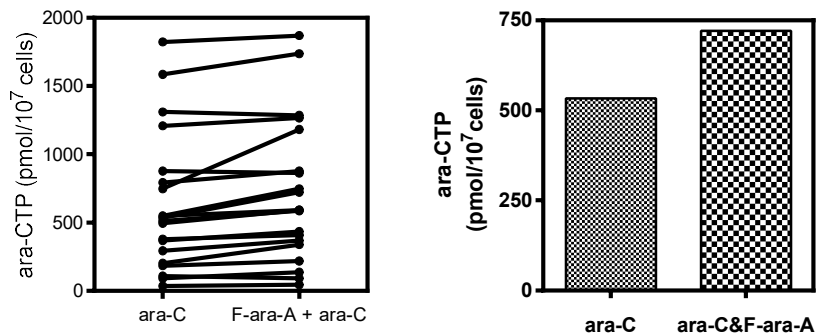
The effect of pre-incubation with 10 μ M F-ara-A on intracellular dCTP (A) and ara-CTP (B) concentrations and on subsequent cytotoxicity (C) was evaluated.

(Int J Hematol 2009)

JALSG

再発及び難反応性急性骨髄性白血病に
対するフルダラビン・シタラビン・G-CSF・
ミキサントロン併用療法 (FLAGM療法)
の臨床第II相試験

FLAGM療法における フルダラビンによるリン酸シタラビン生成量の増強



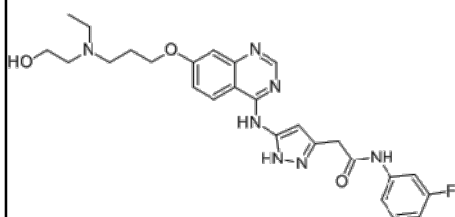
フルダラビンによるリン酸シタラビン増量

- シタラビン耐性機序によりリン酸フルダラビン生成は異なった
- フルダラビンの併用効果は異なった
- リン酸シタラビン増量が抗腫瘍効果の閾値に達したかについてはわからない

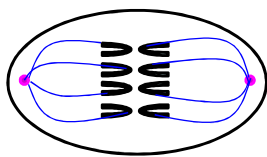
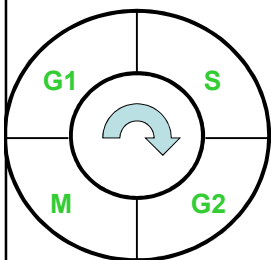
バラサチブ

Barasertib (AZD1152)

バラサチブ Barasertib (AZD1152)



- 選択的aurora B 阻害薬
- 第2相臨床試験中(急性骨髄性白血病を対象)
- 細胞分裂M期に作用
(mitotic catastrophe)



本邦での第I相試験

急性骨髄性白血病(高齢 再発、難治)

50~1200mg Barasertib cont. iv. inf 7 days q21

50 mg (n=5)

400 mg (n=3)

800 mg (n=5)

1200 mg (n=3) 投与可能

有害事象 (grade 3-4)

好中球減少症 (54%)

発熱性好中球減少症 (50%)

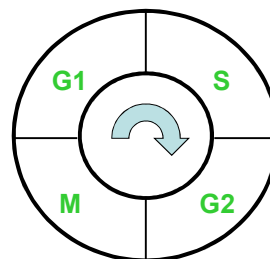
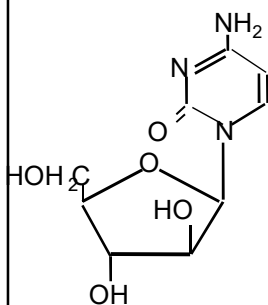
血小板減少症 (44%)

効果

血液学的奏功率 19%

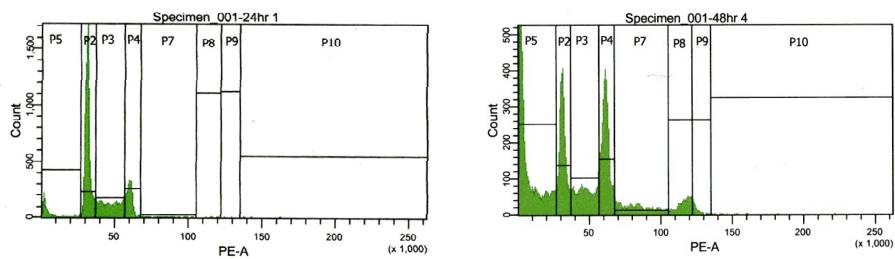
(Leukemia Res 2011)

シタラビンはS期で作用する



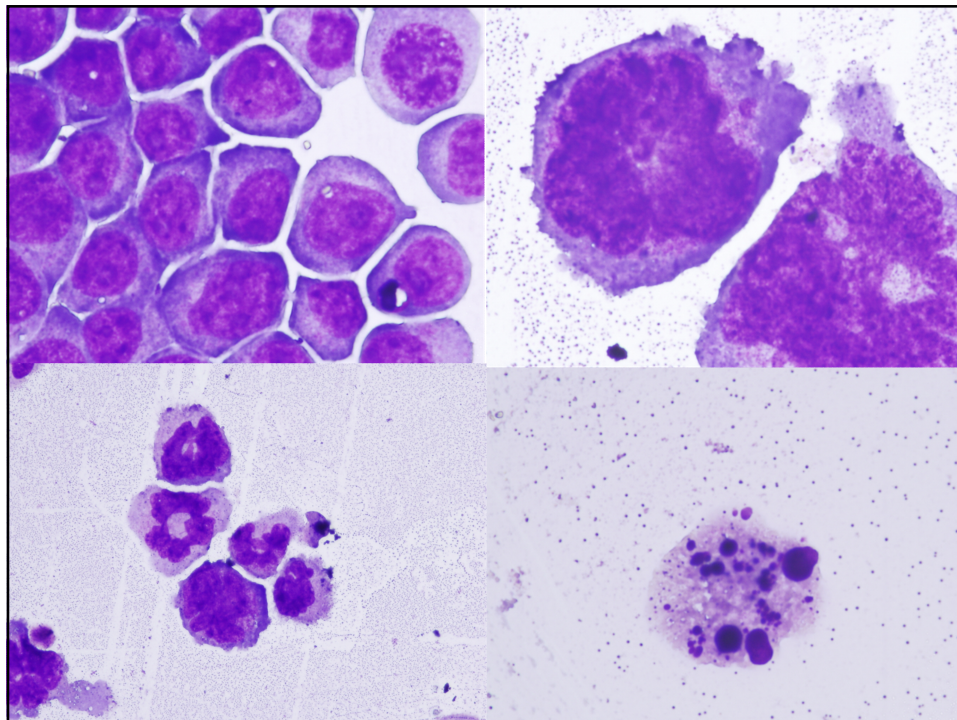
バラサチブ 単独投与

M期に作用



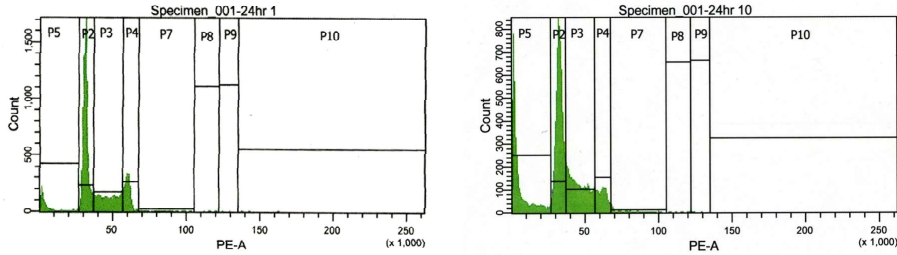
Cells were treated with AZD1152 for indicated periods, followed by flowcytometric analysis.

(Cancer Sci 2013-1)



ara-C 単独投与

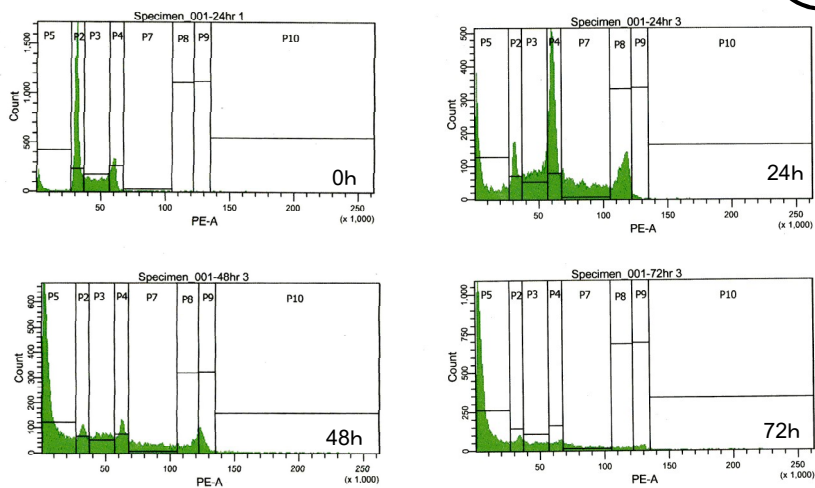
S期に作用



Cells were treated with AZD1152 for indicated periods, followed by flowcytometric analysis.

(Cancer Sci 2013-1)

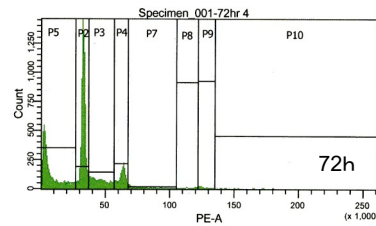
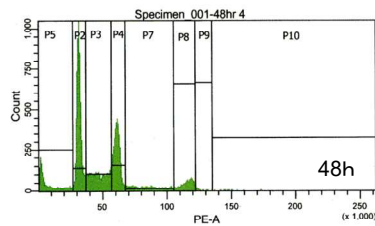
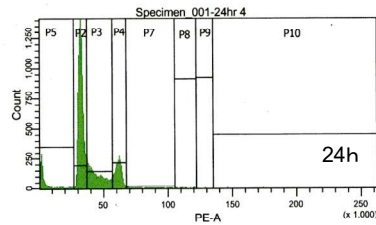
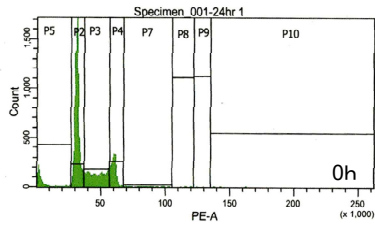
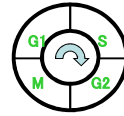
併用 バラサチブ→シタラビン



Cells were treated with AZD1152 24 h prior to ara-C administration, and incubated for indicated periods. Flowcytometric analysis was then performed.

(Cancer Sci 2013-1)

併用 シタラビン→バラサチブ



Cells were treated with ara-C24 h prior to AZD1152 administration, and incubated for indicated periods. Flowcytometric analysis was then performed.

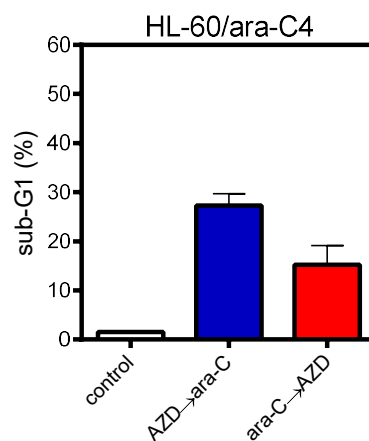
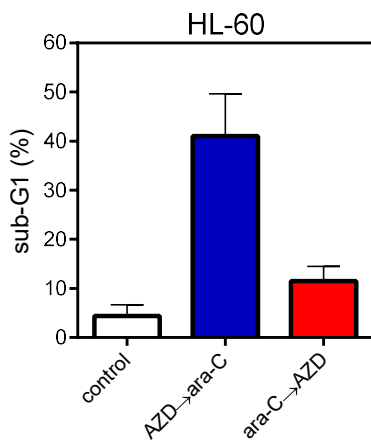
(Cancer Sci 2013-1)

併用による殺細胞効果



シタラビン感受性白血病細胞

シタラビン耐性白血病細胞



Cells were treated with AZD1152 plus ara-C for indicated periods, followed by flowcytometric analysis.

(Cancer Sci 2013-1)

結果

- AZD1152はM期に作用し細胞分裂を阻害し細胞死に導くと考えられた
- S期特異的代謝拮抗薬ara-Cとの併用では投与スケジュールにより併用効果が異なった
- AZD1152は ara-C耐性白血病細胞にもara-Cとの併用で効果的であった

静止期細胞の攻略

シタラビンの効果はS期特異的

リン酸シタラビンによるDNA 鎖伸長阻害

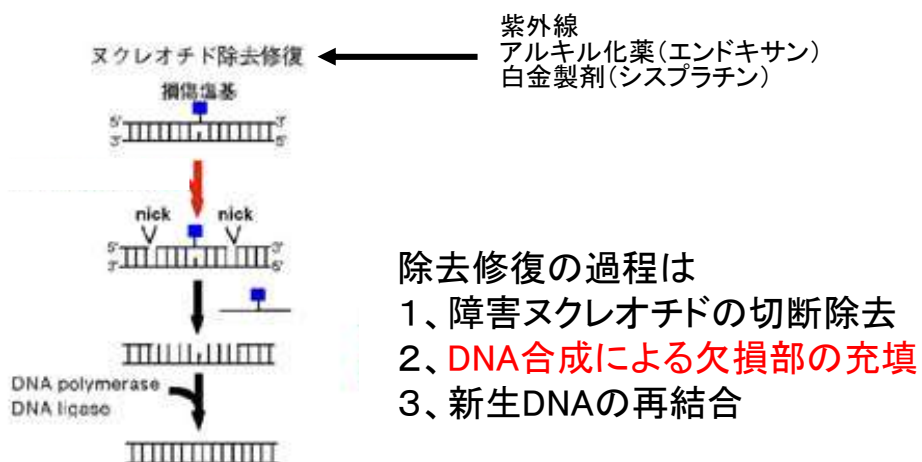


DNA合成期特異的

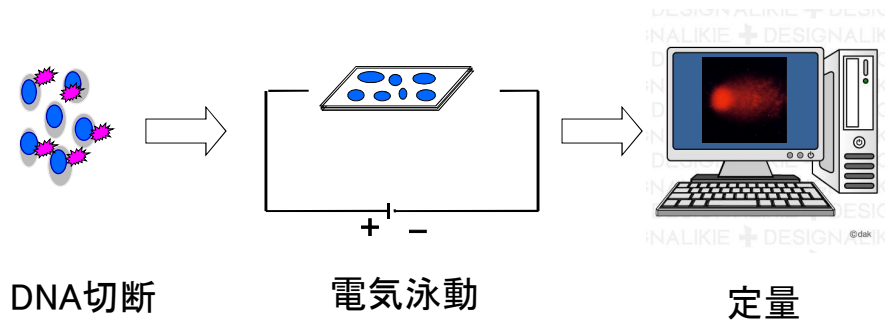


細胞回転していない静止細胞に及ばない

DNA 修復の誘導



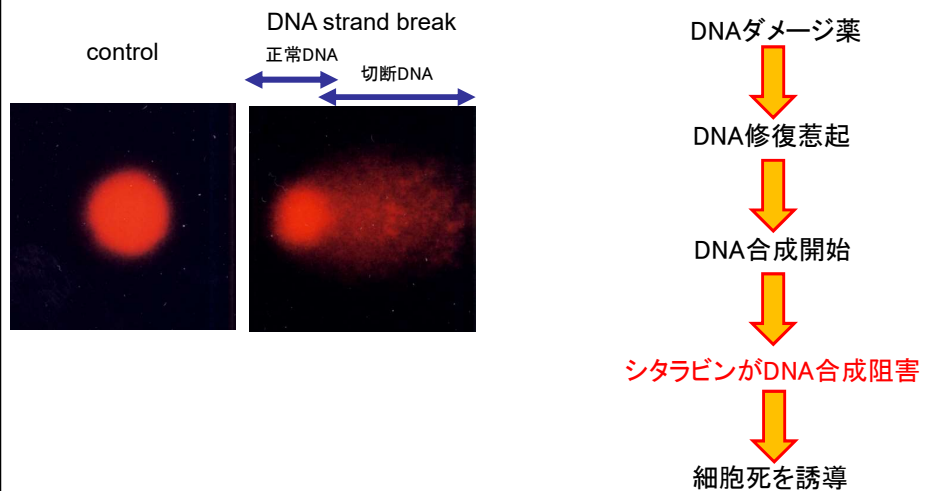
コメットアッセイ (Single Cell Gel Electrophoresis)



(Clin Cancer Res 2001; Mol Pharm 2008)

DNA切断量の定量

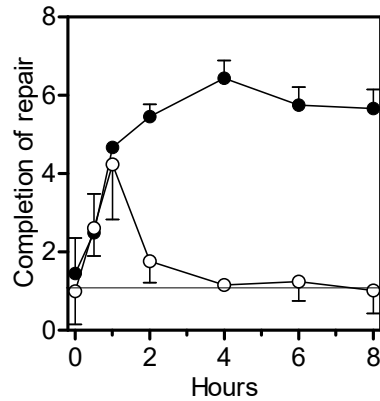
DNA修復機能解析に応用



(Cancer Sci 2002; Anticancer Res 2014)

正常リンパ球でのシタラビンによるDNA 合成阻害

修復過程

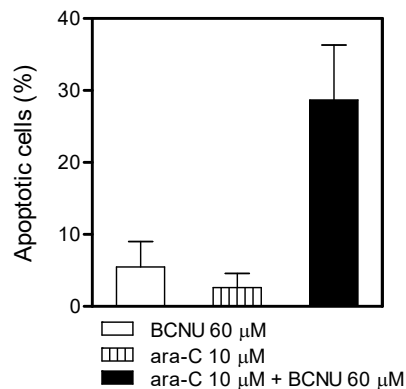


Normal lymphocytes from 5 healthy donors were pre-incubated with 10 μ M ara-C or not, followed by 5 J/m² UV exposure. Tail moments were determined (mean \pm SD) whereas the radioactivities of the cellular DNA were measured at 6 h after the subsequent incubation with tritiated thymidine following the washing (mean \pm SD) (C).

(Cancer Sci 2002; Anticancer Res 2014)

正常リンパ球でのDNA 修復阻害による殺細胞効果

アルキル化薬 + ara-C



Normal lymphocytes from 5 healthy donors were treated with a 2-h incubation with 20 μ M ara-C, or with 5 J/m² UV exposure, or with both in combination. Normal lymphocytes from 5 healthy donors were treated with a 2-h incubation with 5 or 10 μ M ara-C, or with 60 μ M BCNU, or with both in combination. Apoptotic cell death was determined by nuclear morphology using Hoechst No. 33342 staining at 24 h after the treatments.

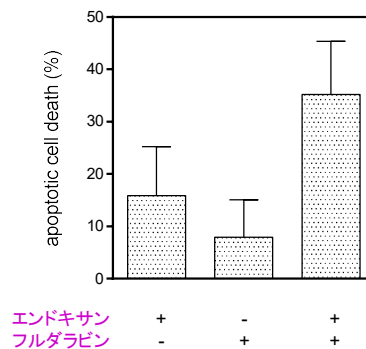
(Cancer Sci 2002; Anticancer Res 2014)

DNA修復を利用した静止期細胞の攻略

静止期リンパ球においてアルキル化薬+シタラビンはDNA修復機転に作用し殺細胞効果を示した

CLL細胞における殺細胞効果の増強

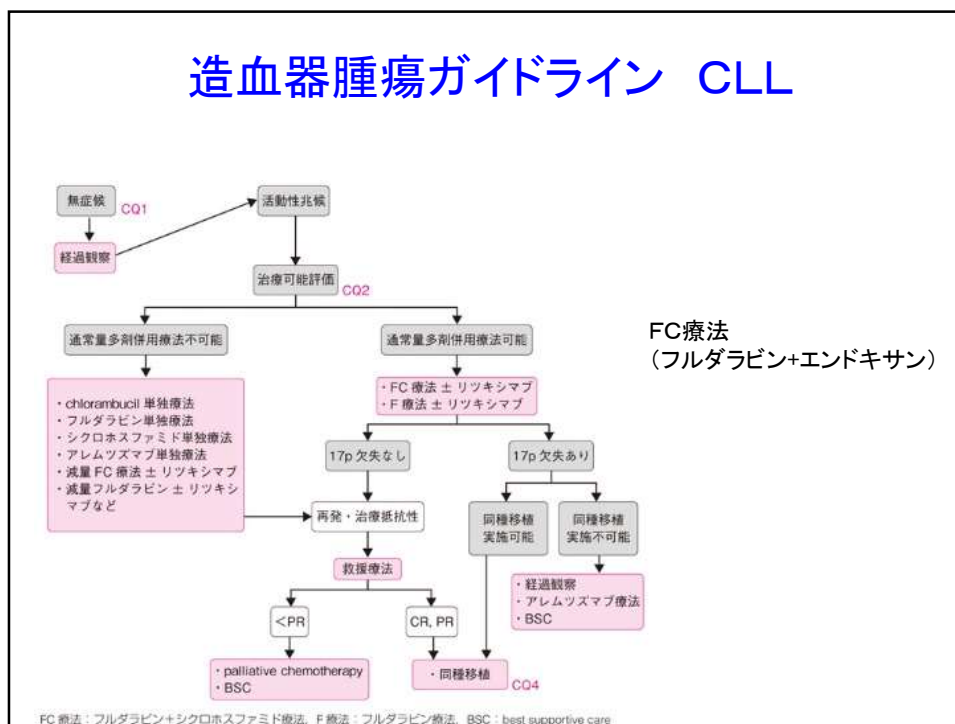
DNA修復阻害



CLL細胞におけるフルダラビン+エンドキサンの殺細胞効果。

(Clin Cancer Res, 2001)

造血器腫瘍ガイドライン CLL



臨床応用

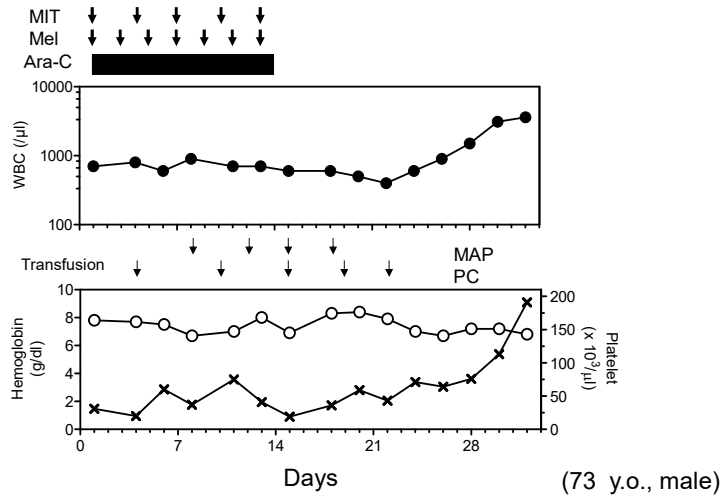
Therapeutic regimen

Agent	Dose	Period of administration (days)
シタラビン	10 mg/m ² x 2/day, s.c.	1-14
メルファラン	2 mg/body/day, po	1, 3, 5, 7, 9, 11, 13
ミトザントロン	3 mg/m ² /day, i.v. inf 30 min	1, 4, 7, 10, 13

Ara-C: cytarabine; Mel: melphalan; Mit: mitoxantrone; s.c.: subcutaneous injection; po: by mouth; i.v. inf: intravenous infusion.

(Anticancer Res, 2007)

AML症例



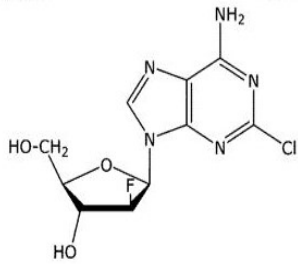
Clinical courses of an AML patients, who achieved complete remission following treatment. Ara-C: cytarabine; Mel: melphalan; Mit: mitoxantrone. ●: white blood cell (WBC); ○: hemoglobin; x: platelet; MAP: red blood cell transfusion; PC: platelet concentrate transfusion. (Anticancer Res, 2007)

クロファラビン

(2' - fluoro - 2' - deoxyarabinofuranosyl-
2-chloroadenine, Cl-F-ara-A)

クロファラビン

(2' - fluoro - 2' - deoxyarabinofuranosyl-2-chloroadenine, Cl-F-ara-A)

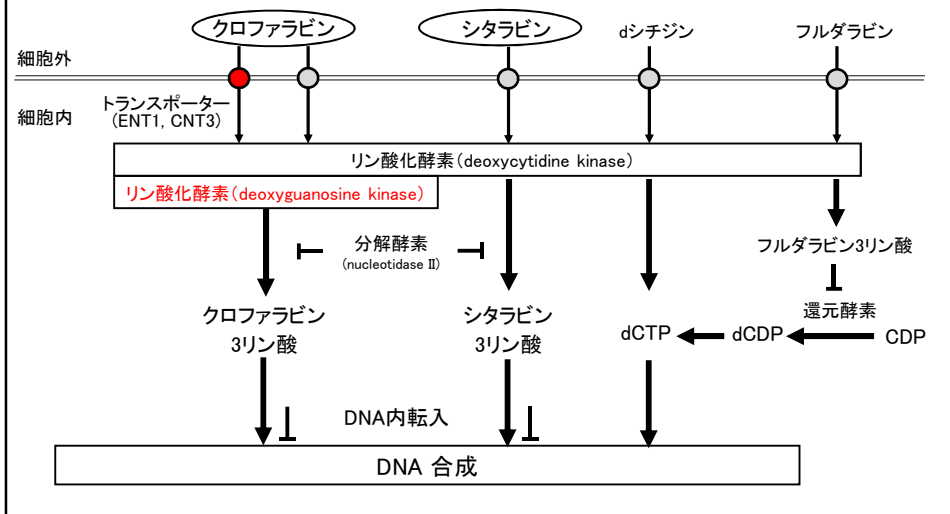


Clofarabine

- フルダラビンとクラドリビンから
- 細胞内でクロファラビン3リン酸へ活性化
- 核DNAを阻害
- 代謝経路はシタラビンとほぼ同様

クロファラビンの細胞内代謝

シタラビンに比してトランスポーターとリン酸化酵素が複数ある



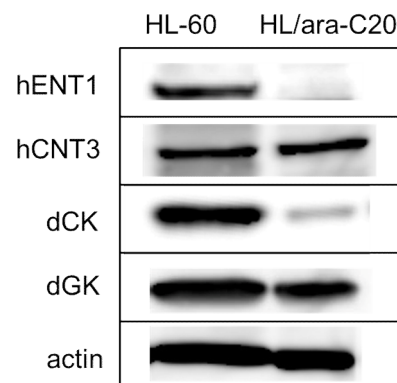
シタラビン感受性細胞と耐性細胞

Drugs	IC ₅₀		(RR)
	HL-60	HL/ara-C20	
シタラビン	335	5,300	(20)
クロファラビン	50	320	(6.4)

HL-60 cells and HL/ara-C20 cells were incubated with various concentrations of ara-C or CI-F-ara-A for 72 h. The IC₅₀ was then determined by using the XTT assay. The number in the parenthesis is the relative resistance (RR), which was obtained by dividing the IC₅₀ value of HL/ara-C20 cells by that of HL-60 cells.

(Cancer Sci 2013-2)

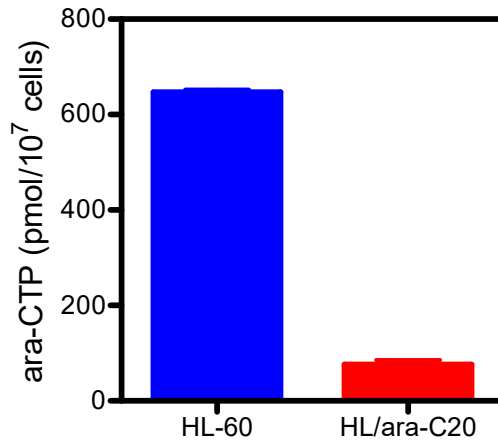
トランスポーター、リン酸化酵素



HL-60 cells and HL/ara-C20 cells were evaluated for the protein expression of hENT1, dCK, and dGK by Western blot.

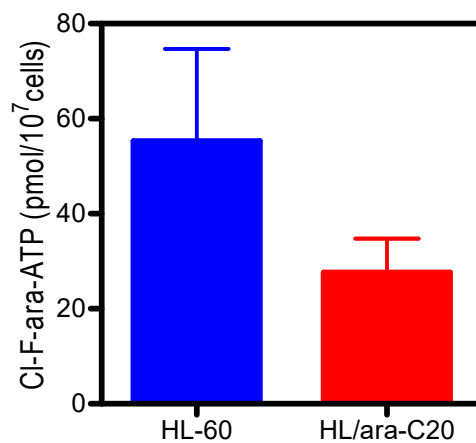
(Cancer Sci 2013-2, Anticancer Res 2014)

細胞内シタラビン3リン酸



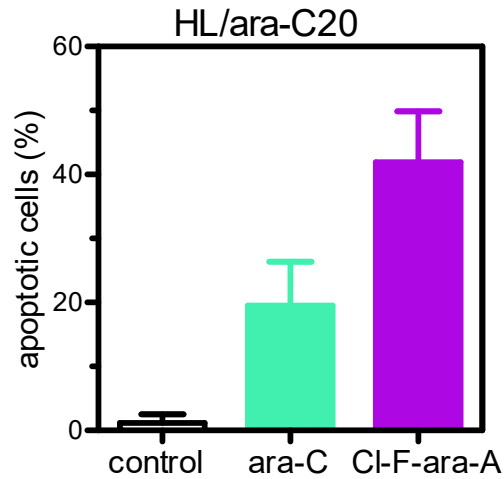
Analog triphosphate production. HL-60 cells and HL/ara-C20 cells were incubated with 10 μ M ara-C or CI-F-ara-A for 6 h, followed by the evaluation of the intracellular ara-CTP or CI-F-ara-ATP production using HPLC. (*P*<0.0001) (Cancer Sci 2013-2, Anticancer Res 2014)

細胞内クロファラビン3リン酸



Analog triphosphate production. HL-60 cells and HL/ara-C20 cells were incubated with 10 μ M ara-C or CI-F-ara-A for 6 h, followed by the evaluation of the intracellular ara-CTP or CI-F-ara-ATP production using HPLC. (*P*=0.06) (Cancer Sci 2013-2, Anticancer Res 2014)

シタラビン耐性細胞



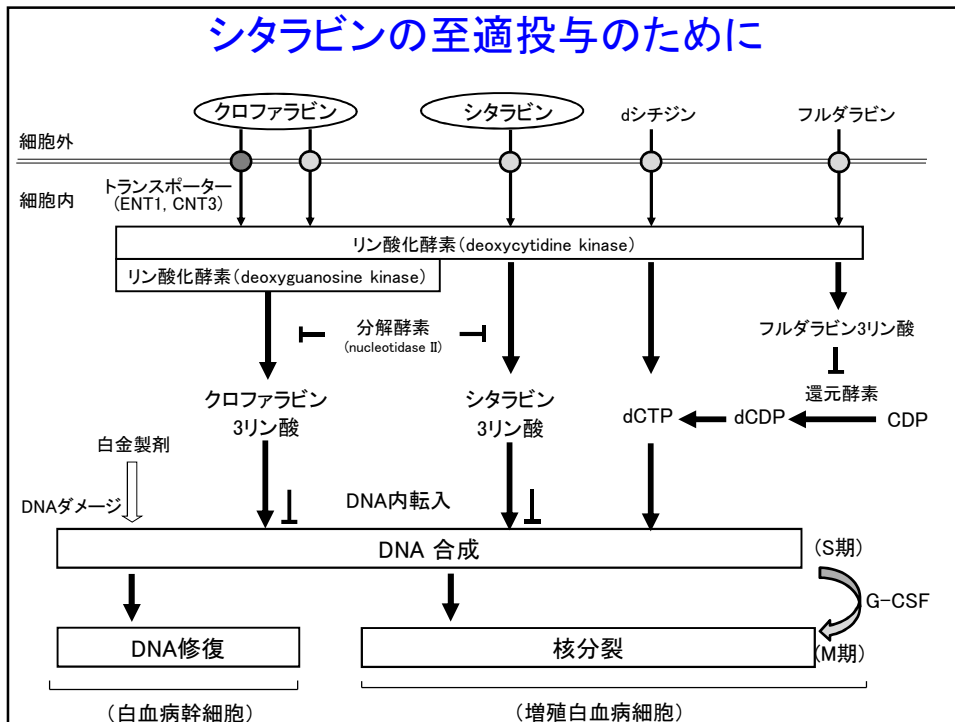
HL-60 cells were incubated with 300 nM ara-C or 50 nM CI-F-ara-A for 48 h. HL/ara-C20 cells were incubated with 5,000 nM ara-C or 300 nM CI-F-ara-A for 48 h. Both cell lines were evaluated for the induction of apoptosis using flow cytometry.

(Cancer Sci 2013-2, Anticancer Res 2014)

結果

- 20倍シタラビン耐性細胞においてもクロファラビンは感受性を有していた
- シタラビンに比してクロファラビンでは細胞内3リン酸体生成が得られた
- シタラビン耐性に関与しないトランスポーター、リン酸化酵素によりクロファラビンは活性化された

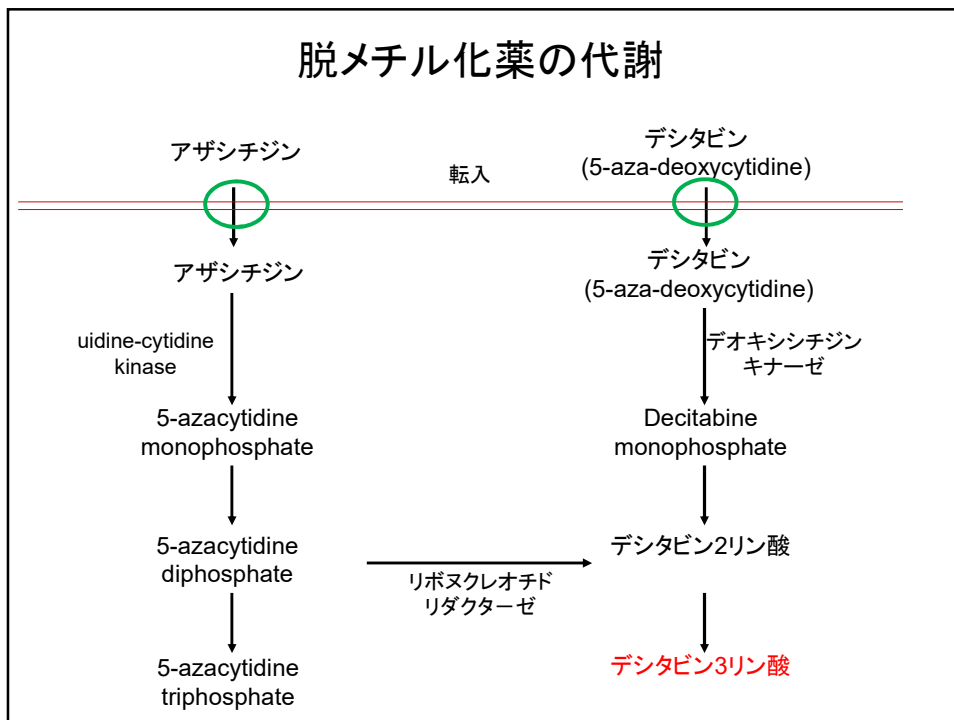
シタラビンの至適投与のために



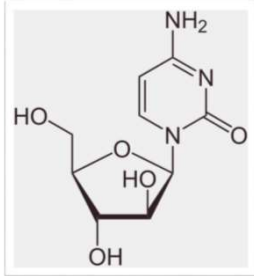
脱メチル化薬

デシタビン Decitabine (5-Aza-2'-deoxycytidine)

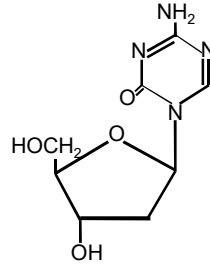
脱メチル化薬の代謝



デシタビン 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine)



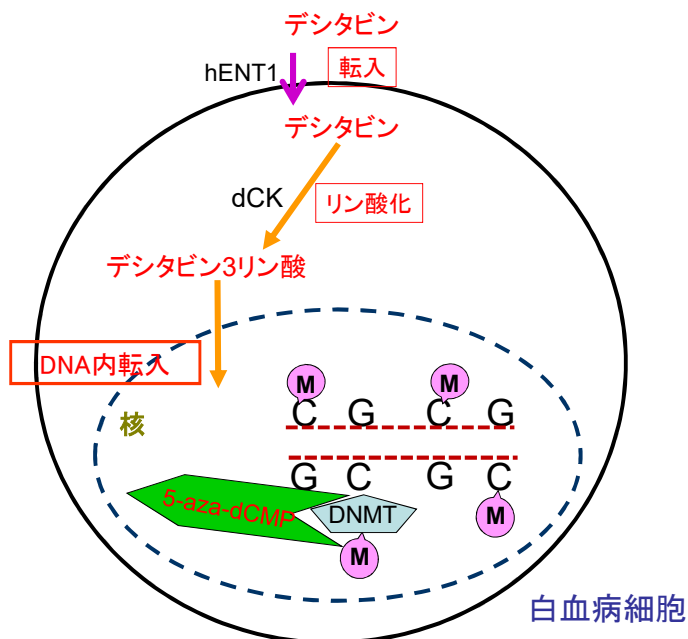
シタラビン



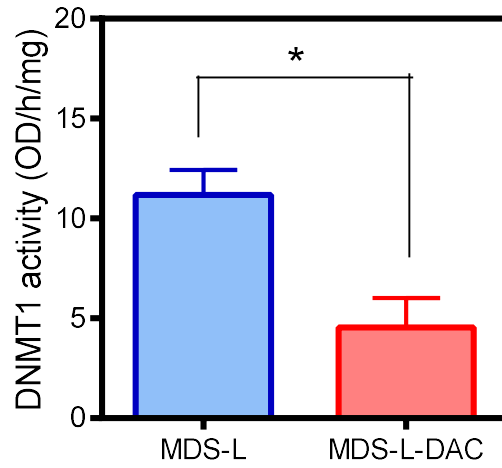
デシタビン

- シタラビン誘導体として開発
- DNAメチル化を阻害するエピジェネティック薬
- 類薬アザシチジンは骨髄異形成症候群に適応

デシタビンの細胞内活性化



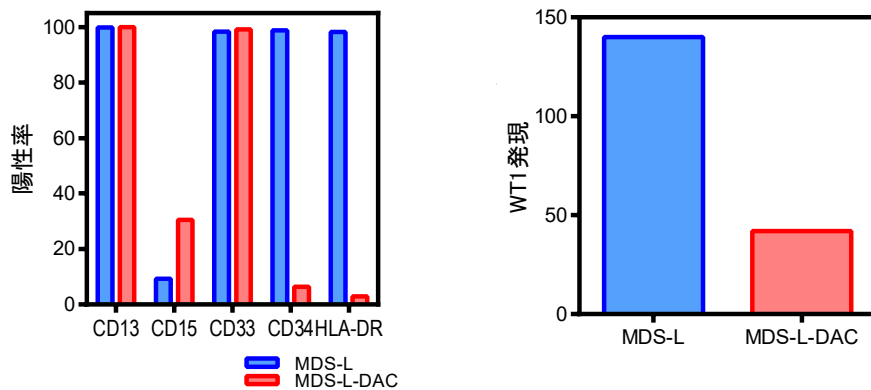
デシタビンによるメチル化酵素活性抑制



細胞数 1×10^7 個から Nuclear protein を抽出、タンパク定量後 DNMT activity キットで処理後測定 * $p < 0.05$
MDS-L-DAC : MDS-L 細胞株に 5nM のデシタビンを添加 6 か月以上培養した細胞

(unpublished data)

細胞表面抗原, WT1 mRNA 量



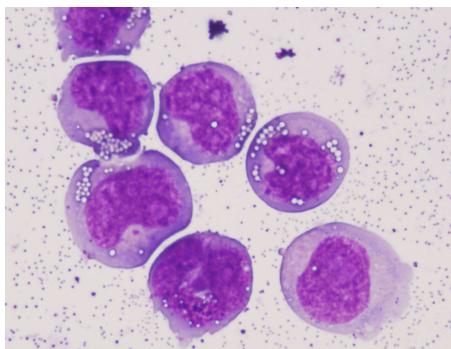
LLA CD45 ゲーティング 細胞数 3×10^6 個 フローサイトメトリーにて測定 SRL より

MDS-L-DAC : MDS-L 細胞株に 5nM のデシタビンを添加 6 か月以上培養した細胞

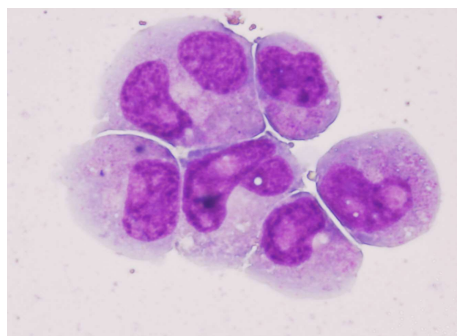
(unpublished data)

細胞形態の変化

MDS-L
× 1000



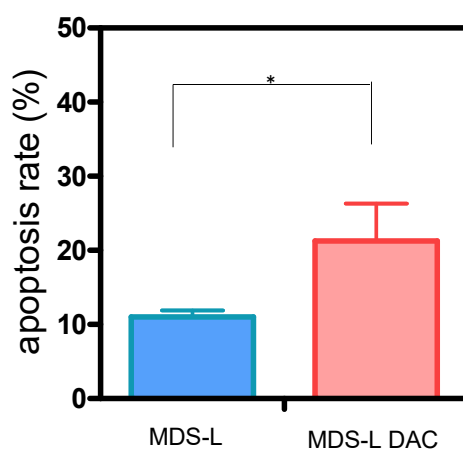
MDS-L-DAC
× 1000



MDS-L-DAC : MDS-L細胞株に5nMのデシタピンを添加6か月以上培養した細胞

(unpublished data)

デシタピンに対するアポトーシス率



デシタピン添加72h後、PI添加しフローサイトメーターで測定。*p<0.05

MDS-L-DAC : MDS-L細胞株に5nMのデシタピンを添加6か月以上培養した細胞 (unpublished data)

デシタビンにより脱メチル化された遺伝子 (メチレーションアレイ)

PRKC, apoptosis, WT1, regulator(PAWR)	WT1-interacting protein
CD40 ligand (CD40LG)	Cell death receptor
Apoptosis-inducing, TAF9-like domain 1 (APITD1)	Apoptosis induced
Lysyl Oxidase (LOX)	Inhibitor of stomach Cancer
Amphiphysin (AMPH)	Endocytosis
Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 3 (MS4A3)	Myeloid differentiation

Infinium HumanMethylation 450測定 (G&Gサイエンス)、測定データを解析。DNAメチル化レベルAVG.Beta値(メチル化なし:0.2以下,低メチル化:0.3~0.4,中メチル化:0.4~0.6,高メチル化:0.7以上1以下)差分解析にて値が0.2以上の箇所をpick up,各遺伝子DBTSSサイトでプロモーター領域を確認。プロモーター領域で脱メチル化が起きている箇所が多い遺伝子を選択。
(unpublished data)

結果

- 脱メチル化薬デシタビンにより白血病細胞は分化しアポトーシスが誘導された
- 脱メチル化による遺伝子発現パターンの変化が見られた
- 標的遺伝子、その下流シグナルを検討中である

結語

腫瘍細胞レベルでの抗腫瘍薬の
薬理的解析に基づき白血病治療の
至適治療を確立する

ご清聴ありがとうございました

