

安全で効果的なcaffeine併用癌化学療法のための臨床薬学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16641

氏名	河原昌美
生年月日	
本籍	長野県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第632号
学位授与の日付	平成16年3月25日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	安全で効果的な caffeine 併用癌化学療法のための臨床薬学的研究
論文審査委員(主査)	辻 彰(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	宮本 謙一(医学部附属病院・教授) 長谷川高明(名古屋大学・教授) 横川 弘一(医学部附属病院・助教授) 清水 栄(自然科学研究科・助教授)

学位論文要旨

Abstract

Rapid determination method of caffeine by using high performance liquid chromatography for monitoring of caffeine-assisted chemotherapy has been established. This method can measure caffeine and its three major metabolites in serum samples within 8 minutes. Caffeine clearance in patients who received caffeine-assisted chemotherapy was one third of reported value. There was no correlation between caffeine clearance and metabolite/caffeine ratio, suggesting that metabolic saturation has been occurred. Caffeine concentrations in patients were well controlled by monitoring using a one-compartment constant infusion model based on the serum caffeine concentrations at 24 and 48 hours.

Caffeine clearance in rats was also nonlinear and decreased by successive administration. Hepatic *CYP1A2* mRNA expression and its activity were increased by successive caffeine administration. By caffeine treatment, the IC_{50} value for cisplatin in various osteosarcoma cells and ATM kinase activity were decreased, whereas p53 protein expression was increased.

Cisplatin antitumor effect was enhanced as twice by coadministration of caffeine at a dose of 100, 60, 60 mg/kg every 8 hours in osteosarcoma cell bearing rats, and its antitumor effect was increased with concentration dependency. Caffeine concentration in tumor was significantly increased and *mrp3* mRNA level in tumor was also increased. It was suggested that caffeine blocked the cisplatin efflux from the tumor.

In conclusion, caffeine concentration control by monitoring is important for safe and effective caffeine-assisted chemotherapy.

要旨

骨軟部悪性腫瘍は稀な腫瘍であり、有効な抗癌剤が少なく難治性である。金沢大学医学部附属病院(以下本院)整形外科では caffeine が *in vitro* で抗癌剤の効果を増強するという研究成果を基に、1989年から骨軟部悪性腫瘍の化学療法に caffeine を併用し、良好な治療成績をあげている。

In vitro では caffeine による抗腫瘍効果増強作用は濃度依存的であるとされ、本院整形外科の caffeine 併用化学療法では 1,500 mg/m²/day という大量の caffeine が3日間にわたって点滴投与される。

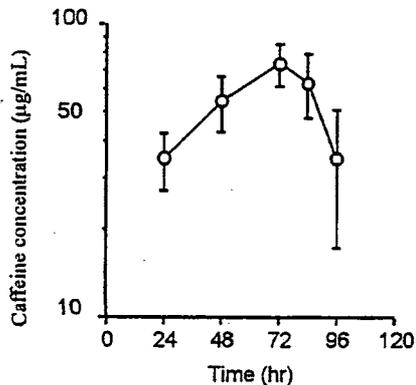


Figure 1. Caffeine concentration-time profile in patients. Patients were administered caffeine by constant intraarterial or intravenous infusion at a dose of 1,500 mg/m²/day x 3 days. Each point with bar represents the mean ± S.D. (n=35).

Table 1. Pharmacokinetic parameters of caffeine

	CL (L/hr/kg)	Vd (L/kg)	Ke (hr ⁻¹)
This study ¹⁾	0.025 ± 0.011	0.65 ± 0.23	0.044 ± 0.024
Blanchard and Sawers ²⁾	0.084 ± 0.030	0.61 ± 0.02	0.140 ± 0.050

Each value represents the mean ± S.D.

1) Intraarterial or intravenous constant infusion at a dose of 1,500 mg/m²/day x 3 days (n = 35).

2) Intravenous constant infusion at a dose of 5 mg/kg for 30 minutes.

Cited from *J. Pharmacokin. Biopharm.* 1983, 11: 109-126.

なるため、代謝物/caffeine 濃度比と caffeine クリアランスの間には相関性が認められると報告されているが、大量投与時には 24 時間目において、すでに報告されている高親和性 Km 値である 35.3 ± 3.9 µg/mL とほぼ等しい濃度に達しており、代謝が飽和を示したために代謝物/caffeine 濃度比とクリアランスの間には、全く相関性が認められなかった。また caffeine のクリアランスは、投与量のみならず化学療法プロトコールによっても異なり、輸液量とそれに伴う尿量変化によって左右されることがわかった。しかし、点滴開始後、48 時間目と 72 時間目の血中濃度には相関性が認められたことから、24 時間目の濃度と 48 時間目の血中濃度をもとに 1-コンパートメントモデルを用いて 72 時間目の濃度を予測し、80 µg/mL を超える場合には、caffeine 投与速度を調節することによって、すべての患者で血中濃度を安全に保つことができた。

臨床での caffeine 併用化学療法の効果を動物実験において確認し、より安全で効果的な投与法を確立するためにラットを用いた *in vivo* での検討を行った。臨床で得られた患者の血中濃度をラットで得るための投与量について検討した結果、ラットでも代謝の飽和によってクリアランスに非線形性が認められ、45 mg/kg 以上の投与量では著しく血中濃度が上昇した。ラットの腹腔内へ caffeine の繰り返し投与を行ったところ、caffeine 血中濃度が低下する現象が見られ、4 回の繰り返し返

る。Caffeine は中枢興奮作用が強く、高濃度では致死の可能性もある。また、caffeine は CYP1A2 の代謝多型を判定する指標薬物として知られているため、caffeine 併用化学療法を受ける患者が低代謝型であった場合、caffeine 濃度は予期せぬものとなる可能性がある。

そこで、caffeine 併用化学療法を安全に遂行するためには、血中濃度モニタリングが必要であると考えられ、既報の方法をもとに、除蛋白前処理に固相抽出法を用い、内部標準とカラム温度に改良を加えて、臨床で遂行可能な、簡便で迅速な高速液体クロマトグラフィーによる測定法を確立した。

この方法を用いて、caffeine 併用化学療法を受けた患者の caffeine 血中濃度を測定した結果、Figure 1 に示すように caffeine 濃度は 3 日間を通して上昇を続け、体内動態値は、報告されているものに比べ、クリアランスが 1/3 にまで減少していることがわかった。(Table 1 参照)。

Caffeine は CYP1A2 の代謝活性の指標と

し投与によって、クリアランスが単回投与時の 1/3 以下にまで減少し、代謝物濃度は大きく上昇していた。この原因として、ラットの肝臓で *CYP1A2* mRNA の発現が有意に亢進し、約 40% の酵素活性の上昇を認めた。以上のことから、ラットに *caffeine* を繰り返し投与すると代謝の飽和によるクリアランスの減少と、酵素活性の上昇によるクリアランスの増加が同時に見られるために、3 日間を通して一定の血中濃度を得ることは困難であることが示され、24 時間の *caffeine* 血中濃度コントロールによる検討を行った。

Caffeine の抗腫瘍効果増強作用は、すべての抗癌剤や腫瘍に対して認められるわけではないため、骨肉腫培養細胞を用いて、あらかじめ *caffeine* による *cisplatin* の抗腫瘍効果増強作用を検討した。その結果、*p53* 遺伝子が野生型である OST 細胞あるいは変異型である HOS 細胞では *caffeine* の併用で *cisplatin* に対する IC_{50} 値の低下が認められたが、*p53* 遺伝子が欠損している Saos-2 細胞では *caffeine* の併用効果は認められなかった。

また、*caffeine* の併用で *p53* 蛋白の発現亢進、ATM (ataxia-telangiectasia-mutated) キナーゼの活性低下が認められたことから、*caffeine* の効果は *p53* 蛋白を介したアポトーシスの誘導、ATM キナーゼの活性低下による細胞周期の G2/M 期の停滞解除が関与していると示唆された。

ラットに移植可能な骨肉腫細胞である C-SLM 細胞でも *caffeine* による *cisplatin* に対する IC_{50} 値の低下が認められたことから、*caffeine* は骨肉腫細胞に対する *cisplatin* の抗腫瘍効果を、*in vitro* に

おいて増強していることが確認された。

C-SLM 細胞を背部に移植した骨肉腫担癌ラットに、*cisplatin* を単独、あるいは *caffeine* と併用投与し、腫瘍増殖を観察した結果、Figure 2 に示すように *cisplatin* 単独投与ではコントロールに比べて 14 日目の腫瘍体積は 1/3 となっており、明らかな抗腫瘍効果が認められたが、100, 60, 60 mg/kg の *caffeine* を併用すると、抗腫瘍効果はさらに約 2 倍に増強した。

また、Figure 3 に示すようにこの抗腫瘍効果増強作用は、*caffeine* の濃度

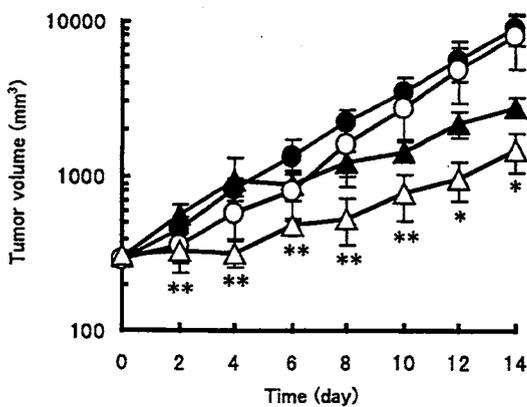


Figure 2. Antitumor effects of *cisplatin* and *caffeine* against C-SLM cells bearing rats. All drugs were intraperitoneally administered to rats. (●): control, (○): *caffeine* alone (100, 60, 60 mg/kg at 0, 8, 16 hr), (▲): *cisplatin* alone (3.5 mg/kg), and (Δ): *cisplatin* (3.5 mg/kg 2 hr before *caffeine* administration) + *caffeine* (100, 60, 60 mg/kg at 0, 8, 16 hr). Rats were inoculated C-SLM cells into the back and housed until use. *, ** Significantly different from *cisplatin* alone at $p < 0.05$ and $p < 0.005$, respectively. Each point with bar represents the mean \pm S.D. ($n = 5$).

が高くなるほど大きく、平均血中濃度が 26 $\mu\text{g/mL}$ 以下の場合には抗腫瘍効果増強作用は認められなかったことから、caffeine 併用化学療法を行う際には、caffeine をできる限り高濃度にすることが抗腫瘍効果増強につながることを示された。

Caffeine による cisplatin の抗腫瘍効果増強作用の機序について検討するため、血液、腎臓、肝臓、筋肉および腫瘍内の cisplatin 濃度を測定した。その結果、caffeine の併用で、cisplatin 投与後 48 時間目の腫瘍内 cisplatin 濃度が約 1.4 倍に上昇していたが、腫瘍以外の臓器では変化は認められなかった。また、caffeine の併用によって cisplatin を輸送すると報告されている *mrp3* (multidrug resistant protein-associated protein 3) mRNA の発現が低下していることがわかった。腫瘍での *mrp3* 遺伝子の働きは cisplatin 排出に関与していると考えられるため、caffeine の併用によって、腫瘍内からの cisplatin 排出が抑制されることによる濃度上昇が、抗腫瘍効果を増強したと示唆された。

以上の結果、caffeine による cisplatin 抗腫瘍効果増強作用は、*mrp3* による cisplatin の排出を抑制させることに基づくものであり、*in vivo* においても caffeine は濃度依存的に抗腫瘍効果を増強させることを明らかにし、骨軟部悪性腫瘍の治療において caffeine 併用化学療法をより効果的に行うためには、血中濃度モニタリングによる至適濃度コントロールが重要であることを実証した。

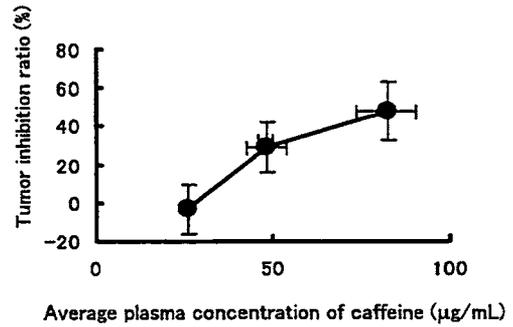


Figure 3. Relationship between tumor volume and average plasma concentration of caffeine.

Rats were inoculated C-SLM cells into the back and housed until use. Rats were intraperitoneally administrated caffeine every 8 hr. Caffeine dose was (1) 50, 30, 30 mg/kg, (2) 60, 60, 60 mg/kg and (3) 100, 60, 60 mg/kg at 0, 8, 16 hr. Each point with bar represents the mean \pm S.D. ($n = 3-5$).

学位論文審査結果の要旨

骨軟部悪性腫瘍は有効な抗がん剤が少ないため難治性であり、予後が極めて悪い腫瘍である。金沢大学医学部附属病院整形外科では、このような骨軟部腫瘍に対して cisplatin を中心とした化学療法に caffeine を併用することにより良好な治療成績を上げている。しかし、併用される caffeine は 1,500 mg/m²/day という大量を3日間にわたって点滴静脈内投与されるため、血中濃度は極めて高濃度となり危険な治療法でもある。

本研究は、患者における代謝の個人差などを考慮して、安全で効果的な caffeine 併用化学療法を遂行するための caffeine とその代謝物の血中濃度モニタリング法を確立するとともに、cisplatin と caffeine 併用療法の有用性の検討を行ったものであり、その成果は以下のように要約される。

- 1) まず、除蛋白前処理に固相抽出法を採用して臨床の通常業務に使用可能な迅速かつ簡便な caffeine 及び代謝物の同時測定法を確立した。この方法を用いて点滴 72 時間後の caffeine の最高血中濃度を点滴開始 24 時間あるいは 48 時間の血中濃度から予測し、本治療を受けている全ての患者の caffeine 血中濃度を危険閾値である 80 µg/mL 以下にコントロールすることを可能にした。
- 2) 次に、caffeine の血中濃度に依存して cisplatin の効果が増強されることを動物実験において確認した。一方では、ラットの腹腔内へ大量の caffeine を繰り返し投与すると、代謝の飽和によるクリアランスの非線形性が観察されると同時に、CYP1A2 の誘導が起こり caffeine 血中濃度が低下することを明らかにした。
- 3) Caffeine と cisplatin の併用で cisplatin 投与 48 時間後の腫瘍内 cisplatin 濃度は有意に上昇したが、他の臓器では変化はなかった。また、caffeine の併用で腫瘍内の mrp3 mRNA の発現が低下したことから、caffeine は腫瘍からの cisplatin 排出を抑制して、cisplatin 濃度を上昇させることによって抗腫瘍効果を増強させることを示唆した。
- 4) さらに、caffeine が cisplatin の抗がん効果を増強することを *in vitro* 実験で確認するとともに、この併用効果は caffeine が p53 蛋白の発現亢進、ATM キナーゼの活性低下を介してアポトーシスを誘導した結果であることを示した。

以上の研究成果は、骨軟部悪性腫瘍などの難治性腫瘍に対して caffeine 併用化学療法を効果的かつ安全に施行する基礎を築いたものであり、臨床薬学的に極めて意義ある研究であり、博士（薬学）論文に値すると判定した。