

A Retrospective Cohort Study and Mechanism Studies on the Effects of Co-administration of Dexamethasone on Severity of Neutropenia by Methotrexate, Vinblastine, Adriamycin, Cisplatin Combination Chemotherapy.

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2018-02-27 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/2297/00050236

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



博 士 論 文

MVAC (Methotrexate, Vinblastine, Adriamycin, Cisplatin) 療法における
デキサメタゾン併用による好中球減少症の重篤化と機序の解明

金沢大学大学院自然科学研究科 (博士後期課程)
生命科学専攻

学績番号 1123032304

学生氏名 板井 進悟

主任指導教官 石崎 純子

論文提出 2017年1月5日

目次	1
略語	2
第1章 序論	3
第2章 DexによるMVAC療法施行患者における好中球減少発現の早期化及び好中球減少症の重篤化	
第1節 緒言	5
第2節 結果	5
第3節 考察	7
第3章 マウスを用いたcisplatinによる大腿骨造血幹細胞減少に及ぼすDexの影響	
第1節 緒言	10
第2節 結果	10
第3節 考察	11
第4章 HL-60細胞におけるcisplatinの殺細胞効果と細胞内取り込みに及ぼすDexの影響	
第1節 緒言	13
第2節 結果	13
第3節 考察	15
第5章 総括	17
第6章 研究方法	
6-1 臨床研究デザイン	19
6-2 統計解析	20
6-3 実験試薬	20
6-4 実験機器	21
6-5 実験動物、実験細胞	21
6-6 実験方法	22
謝辞	29
引用文献	30
図表	35

略語

本文中において以下の略語を用いた。

なお、本文中、初出の箇所の（ ）内に略語を示し、以後は略語を使用した。

Dex	Dexamethasone
MVAC	Methorexate, vinblastine, adriamycin and cisplatin
PS	Performance status
BMI	Body mass index
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
CFC assay	Colony Forming Cell assay
OCT2	Organic cation transporter 2
MDCK	Madin-Darby canine kidney
C/M ratio	Cell-to-medium ratio
MRP2	Multidrug resistance transporter 2
MATE1	Multidrug and toxin extrusion transporter 1
DMSO	Dimethyl Sulfoxide

第1章 序論

がんは現在、日本国民の死因の第一位となっており、全体の約 1/3 を占めている。薬物療法、手術、放射線治療が中心となるがん治療において、薬物療法は新規の作用機序を有する薬剤が多数、開発・市販され、その進歩が著しい領域である。患部に局在しているがんに対して治療する手術、放射線治療と比較すると、がん化学療法は患部の腫瘍のみならず、目に見えないがん細胞を標的とした全身を対象とした治療であり、がん治療の中心的役割となっている。がん化学療法には、腫瘍の縮小や消失を目指した治療目的の場合と、手術前後における補助化学療法による治療成績の向上や再発抑制の目的で実施される場合がある[1]。しかし、がん化学療法は、がん細胞のみならず全身の正常細胞にも悪影響を及ぼすことで様々な副作用を生じるため、副作用症状を軽減する支持療法はがん治療の成果にも影響を及ぼす重要な役割を担っている。

1983 年、1997 年の報告によると殺細胞性抗がん薬によるがん化学療法の有害事象において最も苦痛なことは『悪心・嘔吐』であった[2,3]。しかし、5-HT₃拮抗薬や NK-1 受容体阻害薬などの優れた新規の制吐薬の開発など支持療法の進歩に伴い、2002 年の報告では、その順位は 11 位にまで落ちてきている[4]。その制吐療法における標準的な薬剤が dexamethasone (Dex) である。高用量の Dex は、がん化学療法における悪心・嘔吐に対して有効であることが多くの比較臨床試験で証明されており[5]、制吐療法に関する American Society of Clinical Oncology や European Society of Clinical Oncology、Multinational Association of Supportive Care in Cancer などのガイドラインで推奨されている[6,7]。フェレットにおいて、抗がん薬による嘔吐に対して、Dex は 5-HT₃拮抗薬の制吐作用を高めることが確認されている[8-10]。さらに、基礎的な検討で、ステロイド治療をがん化学療法施行前に予防的に行うことで、抗がん薬による肝毒性や汎血球減少を抑制することが報告されている[11-14]。一方で、Dex はステロイドであり、多様な副作用が起こることが考えられる。初期のがん化学療法における制吐療法の臨床試験では、有効性を中心として評価されており、安全性の評価が不十分であった。そのため、がん化学療法における制吐療法での Dex の安全性に関する情報は乏しい。

金沢大学附属病院泌尿器科では、尿路上皮がん患者に対して標準療法である MVAC (Methotrexate, Vinblastin, Adriamycine, Cisplatin) 療法を行っていた。

MVAC 療法は、がん化学療法の中でも高い頻度で重度の好中球減少や発熱性好中球減少が認められる化学療法であり、入院で施行されていた[15-17]。制吐療法の標準治療薬の一つである 5-HT₃ 受容体拮抗薬の発売後、Dex による副作用の経験や血糖値上昇や易感染症、副腎への影響等を懸念し、制吐薬として使用していない時期があった。著者が泌尿器科病棟を担当した当初、上記の理由で Dex は制吐薬として使用されていなかったが、実際の副作用モニタリングを行ったところ、多くの患者で嘔吐や悪心の訴えがあり、十分な制吐療法が行われていないと考えられたため、制吐療法ガイドライン[6,7]を根拠に Dex の使用を提案した。泌尿器科医としては、Dex の安全性の懸念があったため、当初は 1 日投与のみで開始し、ある程度の症例数で制吐効果と安全性を確認した後に、ガイドラインで推奨されている 3 日間で投与することとなった。その結果、MVAC 療法を受けた患者における悪心・嘔吐の症状は劇的に改善し、嘔吐する症例はほぼ皆無となった。一方で、Dex 導入後、導入前と比べて好中球減少症がより重篤になり、発現時期が早くなっている傾向があることに気づいた。過去にそのような報告はなく、がん化学療法時の制吐薬として使用されている Dex の安全性に関する検討自体が乏しかった。Mishler らは、Dex の主に自覚症状に関する副作用について報告している[18]が、検査値等に関する副作用は含まれておらず、好中球減少症への影響は不明であった。

そこで本研究では、後方視的コホート研究として Dex 併用による MVAC 療法施行患者における重篤な好中球減少症の発現率や発現時期への影響を検討した。また、Dex による抗がん薬による好中球減少に影響を及ぼした結果について再現性の確認と機序の解明を目的に CD-1 マウスと HL-60 細胞を用いて、Dex の cisplatin による血球細胞毒性への影響について検討した。

第2章 DexによるMVAC療法施行患者における好中球減少発現の早期化及び好中球減少症の重篤化

第1節 緒言

MVAC療法は膀胱と尿管及び腎盂における尿路上皮がんに対して行われる標準的な化学療法の一つである[15]。根本的治療である膀胱全摘術や尿管・腎摘出術の術前および術後補助化学療法や全身治療目的で施行されている。一方で、重篤な好中球減少症の高い発現率や発熱性好中球減少症などによる治療死も認められるがん化学療法であり、日本では外来ではなく入院で投与されることがほとんどである。

本章では、金沢大学附属病院泌尿器科においてMVAC療法を施行された尿路上皮がん患者を対象とした後方視的コホート研究の結果について記述した。ここでのday 1は、MVAC療法開始日とした。MVAC療法はmethotrexate 30 mg/m²をday 1、15、22に、vinblastine 3.0 mg/m²をday 2、15、22に、cisplatin 70 mg/m²とadriamycin 30 mg/m²をday 2に静脈投与するプロトコールとなっている。治療開始時とday 15、22では必ず血液検査を実施し、好中球数などが基準値を満たしていることを確認した上で治療の開始、抗がん薬の投与の可否を決定した。

著者は、Dex導入前ではday 15以降に好中球減少症のnadir（最低値）となる症例を多く経験していたが、Dex導入後、day 15の前にnadirとなり、day 15が中止となるケースが増えたことに気づいたが、過去にDexが抗がん薬による好中球減少症に影響を及ぼすといった報告はなかった。そこで、Dex併用によるMVAC療法における好中球減少症への影響について、好中球減少症の重篤度、発現時期、重篤な好中球減少症に関連する危険因子などに関する検討を行った。

第2節 結果

2-1 患者背景

各群の患者背景についてTable 1に記した。各群において年齢、性別、performance status (PS)、体表面積、Body mass index (BMI)、クレアチニンクリア

ランス、総ビリルビン値、Aspartate Aminotransferase (AST)、経口 5-HT₃ 受容体拮抗薬、抗ドパミン薬、白血球減少症の報告がある薬剤、緩下剤などの併用薬における有意な差は認められなかった。

2-2 好中球減少症の重篤化

Dex 1 day 群と Dex multiday 群では、Dex (-) 群と比較し、G3 および G4 の好中球減少症が高い発現率で認められた。特に G4 の好中球減少症は Dex (-) 群では認められず、Dex multiday 群では有意に高い発現率であった (Table 2)。

Dex (-) 群、Dex 1 day 群、Dex multiday 群における MVAC 療法 1 クール目 (28 日間) の血液検査の平均実施回数はそれぞれ 11.3 ± 2.2 回、 11.4 ± 2.5 回、 10.0 ± 2.3 回であり、有意な差は認められなかった。

2-3 好中球減少症の発現時期の早期化

Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 4 をもとに好中球減少症の Grade (以下、G) 3 である $1,000$ 個/ m^3 を初めて下回った日について調査した。その結果、初めて G3 以上の好中球減少症が認められた日は Dex (-) 群が 17.7 ± 2.1 日、Dex 1 day 群が 15.1 ± 2.1 日、Dex multiday 群が 13.2 ± 1.0 日と、Dex 使用日数が増えるに従い、発現日が早まる結果となった。また、Dex multiday 群は Dex (-) 群と比較して有意に早い発現日となった (Table 3)。

2-4 G-CSF の使用率、使用開始日

各群における granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) の使用率と、使用した症例における使用開始日を Table 4 に示した。Dex 投与日数が増加するほど、G-CSF の使用率は高くなる傾向が認められた。また、使用開始日は、Dex (-) 群と Dex 1 day 群で有意な差は認められなかったが、Dex (-) 群と比較して、Dex multiday 群では有意に早期に使用していた。

2-5 重篤な好中球減少発現に及ぼす臨床的要因の解析

G3以上の重篤な好中球減少症発現に関連する臨床的要因についてロジスティック回帰分析により解析した結果を示した (Table 5)。単変量ロジスティック回帰分析では、Dex 使用のみが重篤な好中球減少症発現に関連する有意な臨床的要因となった。(オッズ比 17.0; 95%信頼区間: 1.3-223.1) 過去に、発熱性好中球減少症の危険因子として報告されている加齢、低い活動度、BMIなどは今回の重篤な好中球減少症に関する検討においては、関連する臨床的要因とはならなかった。

第3節 考察

Dex の使用が MVAC 療法における好中球減少症に対して、症状の重篤化や発現時期の早期化など影響を及ぼす結果が得られた。いずれの結果も、Dex の投与日数が1日、3日と増加するほど、好中球減少症の重篤化、発現時期の早期化の影響が大きくなっており、Dex 併用の影響であると考えられた。また、Dex 併用が重篤な好中球減少症発現に関連する有意な臨床的要因であったことから、Dex 併用は、MVAC 療法における重篤な好中球減少症の重篤化に関連していることが示唆された。重篤な好中球減少症は抗がん薬の減量につながる副作用である。さらに Dex multiday では day12 に G3 の好中球減少症が認められ、その後 G4 まで悪化するケースがほとんどのため、day 15 の抗がん薬投与ができなくなることで、治療強度を低下させている可能性も考えられた。

Dex 併用が抗がん薬の好中球減少を重篤化したとする報告は過去にない。一方で、Dex を予防投与することで、抗がん薬の薬物動態を変化させ、抗がん薬への耐性を生じるという報告がある[11,12]。また、グルココルチコイドの前処置がヒトの子宮頸癌や肺癌細胞のシスプラチンによるアポトーシスへの耐性を生じることとも報告されている[19]。しかし、今回の検討では Dex は MVAC 療法と同時に投与しており、予防投与による影響はないと考えられる。

胸中球減少症の発症を検討するに当たっては、患者における併用薬の影響を健闘する必要がある。本研究において白血球・好中球減少の報告のある薬剤 () の併用についても検討したが、好中球減少症発症の有無において有意な差は認められなかった。重篤な好中球減少症の発現頻度などに対して G-CSF が影響し

ている可能性が考えられる。G-CSF は好中球減少症に影響を与える薬剤であり、G-CSF 適正使用ガイドラインでは発熱性好中球減少症の発現を抑制するために、ハイリスク症例では予防投与が推奨されている[20]。しかし、本研究の対象期間における日本の保険診療では、G-CSF は好中球数が 1,000 個/m³ 以下になった場合に使用可能であり、本研究では G-CSF の予防投与は一切行われていない。G-CSF の使用率や使用開始日の結果は、重篤な好中球減少症の発現率と発現日と近似した結果となっており、重篤な好中球減少症が発現してから G-CSF を使用していると考えられるため、本研究の重篤な好中球減少症の発現率に関する結果に G-CSF は影響していないと考えられた。また、制吐療法における Dex の有効性と安全性を検討する際には、併用する制吐薬や緩下剤の影響も考えられる。そこで本研究においては併用薬に関しても検討を行ったが、各群で有意な差は認められなかった。

これまでの報告では、発熱性好中球減少症のリスク因子として、加齢、低い活動度、合併症、がんの進行、治療開始時の低い好中球数、体表面積と BMI、骨髄抑制作用を有する抗がん薬によるがん化学療法、特定の遺伝子多型が挙げられている[21]。がんの進行、合併症、特定の遺伝子多型は今回、検討していないが、他の因子については、単変量ロジスティック回帰分析で解析した結果、臨床的に関連する因子とはならず、Dex 使用のみが MVAC 療法における重篤な好中球減少症に関連する有意な臨床的要因となった。異なる結果が得られた理由として、本研究では重篤な好中球減少症について検討しており、過去の報告は発熱性好中球減少症に関する検討であったため異なる結果になったと考えられる。

今回認められた Dex による MVAC 療法の好中球減少症の重篤化のメカニズムとして以下の 2 点が考えられる。一つは Dex による白血球増加作用に基づく抗がん薬との薬力学的な薬物相互作用である。Dex による白血球数増加作用の機序は、骨髄から血中への白血球の誘導、アポトーシス遅延、炎症部位への白血球への遊走などが考えられている[22]。骨髄から血液中に動員されたばかりの白血球は未分化な顆粒球であり、これらの血球は抗がん薬への感受性が高い。強力な骨髄から白血球を誘導する作用を有する G-CSF 製剤は、抗がん薬との同時投与によって好中球減少症の重篤化、遷延化が報告されているため、前後 24 時間以内の併用を避けることがガイドライン等で推奨されている[23,24]。同様の機序で、Dex は抗がん薬による好中球減少症を重篤化し、発現を早期化した可能性が考えられる。

もう一つの機序として、Dex と MVAC 療法で用いる抗がん薬との薬物動態学的な薬物相互作用が考えられる。ヒトとラットにおいて methotrexate による肝毒性が Dex 併用にて増強されることが報告されている[25,26]。この機序として、methotrexate の胆汁排泄が Dex により阻害されることで、肝臓での methotrexate 濃度が上昇するためと考察されている[27]。しかし、cisplatin、vinblastine、adriamycin の薬物動態に対する Dex の影響についてはヒトでも動物でも、報告されていないため現時点では不明である。

本研究における limitation として以下のことが考えられる。

- (1) 後ろ向きのカルテ調査であるため、血液検査は個々の医師の判断により実施されているため、統一した検査日とはなっておらず、これにより好中球減少症の nadir を正確に検出できなかった可能性が考えられる。
- (2) Dex 以外の併用薬の影響については各群において差がないことを確認したが、発熱性好中球減少症発現のリスク因子として認識されている遺伝子多型、がんの進行度、合併症の影響については検討していない。
- (3) 今回の検討は単施設の限られた症例で実施されており、様々なバイアスが含まれていると考えられる。また、ロジスティック回帰分析も症例数が少ないことから単変量でしか実施できていないため、交絡因子による影響は避けることができていない。

本研究結果は、Dex による抗がん薬の好中球減少症の重篤化と発現の早期化を示唆するものであるが、その後の対応について検討するにはデータが不十分である。なお Dex は急性期・遅発期の悪心・嘔吐に対して優れた制吐作用を有することから、がん化学療法における制吐療法ガイドラインにおいて、使用が推奨されている薬剤であるため、Dex を使用しない症例を追加することは倫理的に難しい。また 2009 年に発売となった標準的な制吐薬の一つである NK-1 阻害薬は Dex との薬物相互作用を有する薬剤でもあり、Dex 単独による好中球減少症への影響について臨床実地においてこれ以上の例数の追加や検討は困難であった。そこで、次章からはマウスおよび細胞を用いて、本現象の再現性の確認と機序の解明を目的とした検討が必要と考えた。

第3章 マウスを用いた cisplatin による大腿骨造血幹細胞減少に及ぼす Dex の影響

第1節 緒言

尿路上皮がん患者において、MVAC 療法における重篤な好中球減少症発現に対して Dex が重篤化する可能性が第2章の後方視的コホート研究にて示唆された。しかし、症例数が少ない検討だったため、Dex が抗がん薬における好中球減少症に影響を及ぼすかについての根拠は不十分である。そこで、マウスを用いて、この現象の再現性の確認と機序の解明を目的に検討を行った。

過去にプラチナ製剤の血球細胞に対する毒性について Colony Forming Cell assay (以下、CFC assay) を用いて検討した報告がある[28]。CFC assay は、骨髄細胞を特定の培地で培養することで特定の造血幹細胞前駆細胞が形成することを利用し、抗がん剤を投与したマウス的大腿骨から採取した造血幹細胞前駆細胞のコロニー数をカウントすることで、薬剤の影響を検討する方法である。

そこで今回は臨床で認められた抗がん薬による好中球減少を Dex が増強するか再現性の確認と、骨髄内での影響について明らかにすることを目的に本研究においてもマウス的大腿骨における造血幹細胞前駆細胞のコロニー数の変化について検討した。

なお、今回は MVAC 療法の中で、最も好中球減少作用を有すると考えられる cisplatin に注目し、Dex の単剤、および cisplatin との併用による影響について検討した。最初に cisplatin の投与量について検討し、引き続き Dex による cisplatin の細胞毒性増強作用について実験を行った。

第2節 結果

2-1 Cisplatin の用量の決定

Cisplatin の投与量を 2.5 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg の3群にて検討した。その結果 CFU-G のコロニー数はコントロール群の 72.5 ± 9.1 個と比較して 2.5 mg/kg cisplatin では 79.8 ± 12.3 個、5 mg/kg cisplatin 群では 62.8 ± 8.2 個、10 mg/kg cisplatin 群では、 48.8 ± 6.6 個と用量依存的に CFU-GM

のコロニー数の減少がみとめられた。

2-2 CFC assay を用いた Dex 併用の検討

Cisplatin 群では CFU-GM のコロニー数が 68.5 ± 11.7 個と、コントロール群の 105 ± 14.3 個と比較して、有意な減少が認められた。また、Dex 0.1 mg with cisplatin 群における CFU-GM は 49.5 ± 6.3 個と cisplatin 群と比較して有意な減少が認められたが、Dex 0.01 mg with cisplatin 群では 71.3 ± 11.9 個と、cisplatin 群と比較して、差は認められなかった。一方、Dex 単独群における CFU-GM のコロニー数は 106.5 ± 24.3 個と、コントロール群と比較して差は認められなかった (Figure 1)。

第3節 考察

CFC assay を用いて、造血幹細胞前駆細胞への各薬剤の影響を検討した結果、cisplatin は CFU-GM のコロニー数を用量依存的に減少させ、10 mg/kg cisplatin で約 50 個とコントロール群の約 67% のコロニー数に減少していた。過去の CFC assay を用いてプラチナ製剤の血球毒性を検討した報告では 6.5 mg/kg cisplatin 投与により、コントロール群と比較して約 59% まで減少していた結果と比較すると [42]、ほぼ同等と考えられた。過去の報告では 12 mg/kg 以上の cisplatin 用量がマウスの致死投与量として使用されており [28]、本研究において 10 mg/kg cisplatin 投与群でも 6 例中 1 例の死亡が認められた。以上より、cisplatin は 10 mg/kg を超えた用量での検討が困難であり、10 mg/kg cisplatin 投与時の CFU-GM のコロニー数は、Dex 併用による減少量の増強が仮に起こったとしても評価可能な数であると判断し、Dex 併用試験は 10 mg/kg cisplatin を用いることとした。

Dex 単独群では CFU-GM のコロニー数への影響はなかったが、cisplatin に 0.1 mg/body Dex を併用することで cisplatin による CFU-GM の減少が有意に増強される結果が得られた。このことから、Dex は骨髄中において cisplatin の好中球減少症を増強することが考えられた。一方、CFU-GM のコロニー数の減少効果は cisplatin と 0.01 mg/body Dex の併用では、cisplatin 群と同等であったことから、Dex の低用量では、Dex による cisplatin の殺細胞効果の増強作用

が小さくなることが示唆された。これは臨床において、Dex を減量することで、好中球減少症の重篤化を回避できる可能性が示唆された。

Dex は抗がん薬と併用することで、固形がんに対して殺細胞効果を減弱させるまた亢進させるといった報告や、リンパ球系がんに対しては、殺細胞効果を増強するといった報告があるが[31]、好中球に対する影響について十分には検討されていない。活性酸素種による好中球のアポトーシスを Dex が阻害するという報告があるが[32]本研究結果とは逆の結果となることから cisplatin による血球細胞毒性の Dex による増強は活性酸素種によるアポトーシスを介したものではないと考えられた。本実験結果より、Dex 併用による cisplatin による細胞毒性の増強作用は、CD-1 マウスの大腿骨における骨髄中で、なんらかの作用が発現した結果と考えられた。Cisplatin による骨髄における造血幹細胞前駆細胞のコロニー数の減少を Dex が増強した機序としては、Dex 併用により、骨髄中での cisplatin の濃度上昇、殺細胞効果の亢進、活性酸素種以外によるアポトーシス誘導が考えられた。

以上より、Dex 併用投与が MVAC 療法による骨髄抑制作用を増強した要因として、cisplatin による骨髄中 CFU-GM に対する血球毒性を DEX が増強されていたこと、またその作用には用量依存性があることが示唆された。そこで引き続き、骨髄中の未分化な血球細胞に対する cisplatin と Dex の影響を検討するため前骨髄球性白血病細胞である HL-60 細胞を用いて実験を行った。

第4章 HL-60 細胞における cisplatin の殺細胞効果と細胞内取り込みに及ぼす Dex の影響

第1節 緒言

第2章の臨床研究で確認された MVAC 療法薬剤と Dex の併用による好中球減少症の重篤化と発現の早期化、第3章で確認された cisplatin と Dex 併用による CD-1 マウスにおける造血幹細胞前駆細胞の減少効果の増強とについて報告した。そこで本章では、*in vitro* 系実験としてそのメカニズムを明らかにすることを目的に、前骨髄球のモデル細胞として前骨髄球性白血病細胞 (HL-60 細胞) を用い検討を行った。

Dex 併用が cisplatin による血球毒性を増強する機序の一つとして、血球細胞における cisplatin の細胞膜輸送の取り込み過程における薬物相互作用が起きている可能性が考えられる。Cisplatin の取り込み機構としては、ヒト腎において有機カチオントランスポーターの Organic cation transporter 2 (OCT2) の関与が報告されている [29]。また、イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の細胞である Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞において Dex が OCT2 の mRNA 発現レベルを増加させたという報告がある [33]。このことから、cisplatin の取り込みトランスポーターである OCT2 の発現が Dex により増加し、cisplatin の血球細胞内の取り込みが増えることで血球毒性が増加したのではないかという仮説を立て、実験を行うこととした。

なお本研究では、Dex の濃度は 0.1-100 nM の濃度範囲で検討した。用量設定の設定根拠として、Dex 4 mg または 20 mg 静脈投与した際の Dex 最高血中濃度がそれぞれ 132.5 nM、1,500 nM と報告されており [34,35]、また、第2章で行った臨床研究での Dex の投与量は1日目 8mg、2、3日目は 2mg であったためである。

第2節 結果

2-1 Dex 併用時における cisplatin による HL-60 細胞生存率の変化

Dex 及び cisplatin 単剤または併用時における細胞毒性の変化を明らかにす

る目的で、MTT assay を行った。48 時間の Dex 単剤処置では、Dex の臨床用量による濃度と考えられる 0.1-100 nM の濃度範囲では MTT assay における細胞生存率はほぼ 100%であり、細胞毒性は認められなかった。Cisplatin 単剤処置では、0.1-30 μM の濃度範囲において用量依存的な細胞毒性が確認でき、 IC_{50} は $1.24 \pm 0.078 \mu\text{M}$ であった (Figure 2, Table 6)。Dex と 0.1-30 μM の cisplatin を併用したところ、1 nM Dex を併用した際に、cisplatin の IC_{50} は $0.85 \pm 0.058 \mu\text{M}$ となり cisplatin 単剤処置と比較して有意に IC_{50} の低下が認められた (Table 6)。一方 10 nM Dex 併用により IC_{50} 値は、逆に増加し Dex の用量と細胞生存率の低下に相関はみられなかった。

また、methotrexate、vinblastine および adriamycin の IC_{50} は、それぞれ 16.4 ± 1.1 、 1.57 ± 1.2 、 $16.48 \pm 1.4 \mu\text{M}$ であり、Dex 併用による IC_{50} 値の有意な変化はなかった (Table 6)。

2-2 Cisplatin 取り込み試験

2-2-1 HL-60 細胞の cisplatin 取り込みの時間・濃度推移

HL-60 細胞における cisplatin 取り込み特性を確認し、取り込み実験における適切な時間かつ濃度を設定する目的で、cisplatin 取り込みの時間・濃度依存性試験を行った。取り込み時間は 2、4、6 時間、cisplatin 濃度は 200、400、800 μM で試験を行った。その結果、初期取り込み (cell-to-medium ratio: C/M ratio) は時間では 4 時間、cisplatin 濃度では 400 μM まで直線的に増加した。(Figure 3) 以上の結果より HL-60 細胞内への取り込み実験は、取り込み時間を 4 時間並びに cisplatin 400 μM に設定し検討を行った。

2-2-2 Cisplatin 取り込みに対する Dex の影響

Cisplatin の HL-60 細胞への取り込みに対する Dex の影響を調べる目的で、Dex を併用して cisplatin の取り込み実験を行った。Cisplatin 単剤の C/M ratio と比較して Dex 1 nM 併用群、Dex 100 nM 併用群の結果は、いずれも有意な差が認められなかった (Figure 4)。(cisplatin 単剤: $0.739 \pm 0.198 \mu\text{L}/\text{mg protein per 4 hr}$ 、Dex 1 nM 併用時: $0.853 \pm 0.109 \mu\text{L}/\text{mg protein per 4 hr}$ 、Dex 100

nM 併用時 : $0.953 \pm 0.267 \mu\text{L}/\text{mg protein per 4 hr}$)

2 - 3 OCT2 mRNA 発現レベルに対する Dex の影響

HL-60 細胞において cisplatin の取り込みに関与する OCT2 が Dex によりどのような影響を及ぼすかを調べる目的で、real-time PCR 法により遺伝子発現レベルを解析した。その結果、Dex 処置 48 時間後においてコントロールの mRNA 発現レベルを 1 としたとき、1 nM Dex を併用した際は、 1.3 ± 0.033 、100 nM Dex を併用した際は 1.2 ± 0.033 となり、OCT2 mRNA 発現レベルの有意な変動はなかった。

第 3 節 考察

Dex が肝臓や小腸における薬物トランスポーターを誘導することで、薬物相互作用を起こすことは報告されているが[36-38]、血球細胞における抗がん薬との薬物相互作用について直接、報告したものは過去にない。また、本研究で用いた前骨髄性血球細胞である HL-60 細胞には multidrug resistance transporter (MRP) が発現していることは報告されているが[39]、他の薬物トランスポーターの発現については不明である。

第 2 章、第 3 章で示された結果から、Dex によって cisplatin による血球細胞毒性が増強された機序として、細胞膜の輸送過程において、cisplatin の取り込みが促進された可能性が考えられた。これまでにヒト腎において cisplatin の取り込み過程に OCT2 が関与していること[40]、イヌ腎臓尿管上皮細胞由来の細胞である MDCK 細胞において Dex が OCT2 の mRNA 発現レベルを増加させたという報告があることから[33]、前骨髄細胞において Dex が OCT2 の発現増加を介して cisplatin の取り込みを促進することで、cisplatin の血球細胞毒性を増強すると仮説をたてた。実験方法として MTT assay による細胞生存率の変化、cisplatin の細胞内取り込み、HL-60 細胞における OCT2 発現への Dex の影響について検討した。

HL-60 細胞において Dex 併用により cisplatin の細胞毒性が 30% 増強されたことから、Dex 併用による MVAC 療法剤の好中球減少症の重篤化は、cisplatin の血球細胞毒性を増強したことによる現象であることが示唆された。一方、

cisplatin の血球細胞内への取り込みへの Dex による影響について検討したが、cisplatin に対して Dex の有意な影響は認められなかった (Figure 3)。これらの結果から、Dex は cisplatin の細胞内取り込み以外の機序で、血球細胞毒性を増強している可能性が考えられる。

また、本研究において、HL-60 細胞における OCT2 発現が確認され、Dex 処置により発現が増加する傾向が認められたものの、その影響は小さかった。OCT2 の mRNA 発現レベルに対する Dex の影響を検討した結果、Dex 未処置の mRNA 発現レベルを 1 としたとき、1 nM Dex、100 nM Dex を 48 時間処置した結果、それぞれ 1.3 倍、1.15 倍と増加する傾向はあったが有意な差は認められなかった。(Figure 4)。MDCK 細胞において Dex は、OCT2 の mRNA 発現レベルを約 2 倍に増加させているが[33]、本研究と比較し、Dex の処置時間は 72 時間処置とより長く、また Dex の処置濃度は 10 μ M と高濃度であった。また、本研究において HL-60 細胞における OCT2 の蛋白や DNA の発現量の検討は出来ておらず、cisplatin の細胞内取り込みに対して OCT2 がどの程度関与しているかは不明である。

今回の細胞膜輸送に関する研究としては cisplatin の取り込みトランスポーターに注目したが、排出過程における cisplatin の細胞膜輸送に対する Dex の影響は検討していない。Cisplatin の排出トランスポーターとして MRP2 や multidrug and toxin extrusion transporter 1 (MATE1) が報告されている[41,42]。これまでに Dex は MRP2 mRNA 発現および活性を増強させるという報告があるが[43,44]、今回の結果を説明することは出来ないことから、Dex による MRP2 発現誘導作用が cisplatin の細胞毒性を増強させた可能性は低いと考えられる。

また、本研究では、前骨髄性白血病細胞である HL-60 細胞を用いたが本細胞はがん化した細胞であり、他の未分化な段階での正常血球細胞では、cisplatin や Dex による反応性、薬物トランスポーターの発現量が異なる可能性がある。そのため、造血幹細胞、骨髄系前駆細胞、顆粒球・単球・マクロファージ系前駆細胞などを用いて、cisplatin による血球細胞毒性に及ぼす Dex の影響を検討する必要が考えられる。

第5章 総括

本臨床研究は、Dex による MVAC 療法時における好中球減少症が重篤化し、発現が早期化する可能性を初めて報告した。重篤な好中球減少症の発現率は、Dex 投与日数依存的に上昇させ、発現時期も早まる結果が示された。次に、重篤な好中球減少症に関連する危険因子について検討した結果、Dex 使用のみが関連因子として挙げられた。本結果は過去に報告がなく、関連する基礎実験もほとんどなかったため、基礎実験で再現性を確認し、その機序について検討した。

CD-1 マウスを用いた検討の結果、臨床で得られた知見と同様に、造血幹細胞コロニー数の cisplatin 投与による減少が 0.1 mg Dex 併用により、増強される結果が得られた。このことから、Dex が骨髄中において cisplatin の好中球への細胞毒性を増強することが示唆された。一方、その影響は 0.01 mg/kg Dex の低用量では、消失した。続いて、HL-60 細胞を用いた検討では、MVAC 療法に用いる各種抗がん薬の中で、cisplatin のみ、Dex 併用により MTT assay を用いた細胞生存率における IC₅₀ 値を約 30%低下させることが確認されたものの、その影響は小さいことが確認された。

現時点では、Dex が cisplatin による造血幹細胞前駆細胞のコロニー数の減少を増強させた機序は不明である。過去の報告では、Dex は cisplatin などの抗がん薬の殺細胞効果を固形がんでは増強させる報告と減少させる報告、リンパ球系がんでは、増強させる報告があり、がん種による違いや現象の違いがある。一方、cisplatin などの殺細胞性抗がん薬による白血球や好中球における殺細胞作用に対する Dex の影響について研究した報告は未だされていない。今後、さらなる検討を行い、Dex の影響の機序を明らかにする必要がある。

血液毒性で G3 以上が認められた場合、適切に抗がん薬の用量を減量するが推奨されており、本研究で示された Dex による抗がん薬における好中球減少症の重篤化は、がん化学療法の治療強度に影響を及ぼす可能性がある。CD-1 マウスを用いた検討において、0.1 mg Dex では増強作用が確認され、0.01 mg Dex ではその影響がほとんどなくなった結果から、現時点では、まだ強く推奨することはできないが、悪心・嘔吐がコントロールできている患者においては Dex を減量することで、好中球減少症やステロイドによる副作用が軽減する可能性が考えられる。

今後の課題として、Dex による抗がん薬の好中球減少を重篤化する影響が

cisplatin 以外の抗がん薬にもあるのか検討する必要がある。もし、他の抗がん薬にも影響するのであれば、悪心・嘔吐がコントロールされていることを前提としたうえで、Dex の適切な減量が患者の好中球減少症の発現に影響を及ぼすかについて前向き臨床研究を行う必要がある。

本研究により、制吐薬として用いている Dex 併用が MAVC 療法における好中球減少症を重篤化し、発現を早期化する可能性が示唆された。また、その機序の 1 つとして cisplatin による血球細胞毒性を Dex が増強している可能性が CD-1 マウスと HL-60 細胞を用いた基礎研究により示唆された。一方で、低用量・低濃度の Dex ではその影響が小さくなることが CD-1 マウス、HL-60 細胞を用いた検討では示唆された。がん化学療法施行中の患者で悪心・嘔吐がコントロールできている場合は、Dex を減量・中止することでこれらの影響を軽減できる可能性が示された。本研究は、がん化学療法における制吐薬物療法に対して新たな知見を提供し、今後の制吐薬物療法を見直す一助となる重要なものと考えられる。

第6章 研究方法

6-1 臨床研究デザイン

後方視的コホート研究として金沢大学附属病院の電子カルテを調査することで研究を行った。2005年1月1日2009年12月31日の期間に、金沢大学附属病院泌尿器科においてMVAC療法を施行された尿路上皮がん患者を研究対象とした。除外基準として、アプレピタント使用患者とデキサメタゾン以外のステロイド剤を使用した患者とした。

MVAC療法の投与レジメンは以下の通りである。30 mg/m²の methotrexate を day 1、15、22 に点滴静注する。3 mg/m²の vinblastine を day 2、15、22 に点滴静注する。30 mg/m²の adriamycin と 70 mg/m²の cisplatin を day 2 に点滴静注する。これを28日毎に投与を繰り返す。Day 15 と 22 においては、血液検査を行い、好中球数が 1,000 個/m³ 以上であることを確認して、投与を行う。

患者群はMVAC療法施行時のDexの投与方法によって3つのグループに分けて、検討を行った。Dexを使用していないグループはDex(-)群(n=6)、Dex 8 mg を day 2 の cisplatin 投与前に1日だけ投与された群をDex 1 day 群(n=12)、day 2 にDex 8 mg、day 3、4 に2 mg 投与した群をDex multiday 群(n=6)に分類した。各患者の最初のコースの結果を検討に用いた。

MVAC療法施行後の好中球減少症の nadir を主要評価項目として検討した。CTCAE version 4 を用いて評価し、Grade 3 以上の好中球減少症を重篤な好中球減少症と定義した。

併用された制吐療法として、5-HT₃拮抗薬（granisetron 3 mg または ondansetron 4 mg）が day 2 の cisplatin 投与前後の2回、静注で全例に併用されていた。その他の併用薬については、Table 1 に示した。

血液検査は、医師の判断のもと実施されていた。ただし、day 15 と 22 においては抗がん薬投与の予定があり、好中球数が 1,000 個/m³ 以上であることを確認するため、その前後には、必ず血液検査を実施していた。

重篤な好中球減少症に関連する因子は、肺癌患者を対象として vinorelbine による好中球減少症について検討していた過去の報告[45]を参考に、化学療法開始直前の好中球数 2000 個/m³、総ビリルビン値 > 0.5 mg/dL、AST > 27 U/L、

24 時間蓄尿により算出したクレアチニンクリアランス <60 mL/min、年齢 > 65 歳、性別とし、単変量ロジスティック回帰分析を用いて検討した。

本研究は金沢大学医学部倫理委員会の承認のもと、実施された (No. 1008)。全てのデータは患者名を非連結匿名化した上で、研究を実施した。

6 - 2 統計解析

○第 2 章

臨床研究における患者の背景データや患者の併用薬の情報は記述した統計方法を用いて検討を行った。計量値は中央値±標準偏差、カテゴリーデータはパーセンテージで表示した。単変量ロジスティック回帰分析は重篤な好中球減少症を従属変数として、関連する因子について検討した。

統計解析は、SPSS ver.19.0 (SPSS 株式会社、東京)、Microsoft Excel 2010 (マイクロソフト、東京) を用い、 p 値が 0.05 未満のものを統計学的に有意と判定した。

○第 3、4 章

基礎研究における全ての定量値は平均値±SEM の形式で表記した。

全ての統計解析は、Microsoft Excel 2010 (マイクロソフト、東京)、GraphPad PRISM version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用い、 p 値が 0.05 未満のものを統計学的に有意と判定した。

6 - 3 実験試薬

完全 MethoCult®培地 (#03434) (株式会社ベリタス、東京)

ランダ注 10 mg/20 mL (日本化薬株式会社、東京)

デキサメタゾン 100 mg (シグマアルドリッチ ジャパン合同会社、東京)

シリコンオイル（比重 1.07g/cm³）（東レ・ダウコーニング株式会社，東京）

流動パラフィン（和光純薬株式会社，大阪）

Pierce® BCA™ Protein Assay Kit（Thermo Fisher Scientific K.K.， 神奈川）

Gen Elute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit（シグマアルドリッチ ジャパン合同会社，東京）

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（Applied Biosystems， CA, USA）

THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix（東洋紡株式会社，大阪）

その他、上記以外の試薬は、すべて市販試薬特級を用いた。

6-4 実験機器

島津原子吸光分光光度計 AA-6650（株式会社島津製作所，京都）

Mx3000p Real-Time QPCR System（アジレント・テクノロジー株式会社，東京）

6-5 実験動物、実験細胞

CD-1系雄性マウス 5週齢、体重約30g（ニノックスラボサプライ、金沢）を使用した。餌と水は自由に摂取させた。なお動物実験は、金沢大学動物実験規程 本学宝町キャンパス動物実験倫理指針に基づき、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守して行った。本研究は金沢大学動物実験委員会の承認のもと、実施された（承認番号 AP-112240, AP-122323, AP-132703, AP-143072, AP-153443, AP-163752）。

前骨髄性白血病細胞株 HL-60 細胞は国立研究開発法人理化学研究所バイオリソースセンター（茨城，日本）より購入した。10 cm dish 上に細胞を播種し、37°C、飽湿、5%CO₂のインキュベーター中で 90% confluent まで培養した。培地は RPMI1640 培地を用いた。

6-6 実験方法

6-6-1 CFC assay

A) 大腿骨の採取

5% EtOH 生理食塩水に溶解した Dex (0.1 mg/body or 0.01 mg/body) を腹腔内に投与した。Cisplatin も同様に腹腔内投与した。コントロール群は何も投与しなかった。マウスに cisplatin は 1 日目のみ、Dex は 1 日目から 5 日間連続で投与した。同日に 2 剤投与する場合は、cisplatin 投与の 30 分以上前に Dex を投与した。8 日目にエーテル麻酔をかけ、頸椎脱臼後、大腿骨を採取した。

B) CFC assay

大腿骨から骨髓を採取し、PBS を用いて洗浄した。3000 rpm, 5 min で遠心後、PBS を除去し、PBS 500 μ L~1 mL を加え、10 μ L をとって PBS 490 μ L で希釈し、1/50 の割合に希釈した。細胞数をカウントし、細胞濃度が約 100×10^4 個になるよう調整した。完全 MethoCult®培地(#03434 株式会社ベリタス, 東京) 3 mL に調製した骨髓細胞を 0.3 mL 添加し、1.1 mL ずつ分注し、シャーレ 2 枚分とした。加湿インキュベーター内、37°C、5%CO₂ 下で 12 日間インキュベートし、7 日後に BFU-E、12 日後に CFU-GM のコロニー数を評価した。
[30]

6-6-2 MTT assay

10 cm dish より HL-60 細胞をコニカルチューブに回収し、血球算定盤を用いて細胞数を計数し、約 0.5×10^5 cell/mL となるように RPMI1640 培地により希釈し、96 well plate に各 200 μ L ずつ播種した。24 時間前培養した後、plate を 50 x g, 2 min で遠心し、上澄みをアスピレーターで取り除き、コントロールには、0.1%DMSO/ Saline/RPMI1640 液を添加し、cisplatin, adriamycin, vinblastine, methotrexate 及び Dex を含む培地を添加し、48 時間または 72 時間培養させた。その後、5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L を各ウェルに添加し、イン

キュベーター内で4時間呈色反応させた。Plateを50 x g、2 minで遠心し、上清をアスピレーターで取り除き、1×PBS溶液で洗浄後、DMSO 200 μL添加し、ホルマザンを完全溶解させ、マイクロプレートリーダーを用いて570 nmの吸光度を測定した。細胞生存率(%)は下記の式に各ウェルの値を代入し、算出した。

$$\text{細胞生存率(\%)} = \frac{\text{Sample-Blank}}{\text{Control-Blank}} \times 100$$

IC₅₀はGraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad Software Inc., CA, USA)を用いて算出した。

6-6-3 Cisplatin 取り込み実験

実験はKlingenbergらとSchwarzらが報告しているシリコンレイヤー法を参考に行った。[46,47]

10 cm dishよりHL-60細胞をコンカルチューブに回収し、50 x g、2 minで遠心後、上澄みを除去し、HBSSに懸濁しなおした。その後、血球算定盤を用いて細胞数を計数し、約0.5 × 10⁸ cells/mLとなるようにHBSSで希釈し、細胞懸濁液を得た。懸濁液は氷上で保存し、直ちに実験で使用した。

細胞懸濁液を110 μLずつ96well plateに播種し、インキュベーター内で10 min前培養した。前培養後、細胞懸濁液にcisplatin溶液を添加し、所定の時間、反応させた。所定の時間経過後、反応液から200 μLを採取し、あらかじめ3 M KOH 50 μLおよび比重を1.01~1.017 g/cm³の範囲に調整した流動パラフィン-シリコンオイル混合液100 μLを重ねた0.4 mLマイクロチューブに重層して、直ちに微量高速冷却遠心機を用いて10,000 x g、1 min、4 °Cで遠心分離し、反応を停止させた。

反応停止後、室温で3 h以上静置して細胞を溶解させた。その後、マイクロチューブのオイル層の部分をカッターナイフで切り、マイクロピペットを用いて細胞溶解液(KOH層)をパラフィルム上に移し、混合オイルをパラフィルムに吸着させた。その後、5 M HCl溶液30 μLを入れた1.5 mLマイクロチューブに移し、十分に混和し中和した。全量約80 μLの細胞溶解液のうち、50 μLを0.6 mLスタンダード丸底チューブに移し、超純水で希釈後、10,000 x g、5 secにより遠心し、不純物を沈殿させ、cisplatinの測定サンプルとした。

残りの細胞懸濁液は、Pierce® BCA™ Protein Assay Kit を用いて BCA 法によってタンパク定量を行った。定量のために、マイクロプレートリーダーを用いて 540 nm の吸光度を測定した。

得られたサンプル中の cisplatin 濃度は以下の条件のもと原子吸光分光光度計 AA-6650 により測定した。サンプルは超純水で希釈し、250 μ L とした。また、ランダ注を超純水で希釈して、cisplatin 濃度 0.025、0.125、0.25、0.5、1.0、1.5 μ M の標準液を調製し、サンプルと同様の測定条件で定量を行い、検量線を作製した。

[原子吸光分光光度計条件]

分光器パラメーター

元素 : Pt

ランプ電流 (mA) : 14

波長 (nm) : 265.9

スリット幅 (nm) : 0.5

測定パラメーター

測定方法 : ファーネス

信号処理 : ピーク高さ

GFA チューブ : プラットフォーム形チューブ

測定条件

注入量 (μ L) : 20

注入速度 (μ L/sec) : 25

吸入速度 (μ L/sec) : 130

吐出速度 (μ L/sec) : 150

温度プログラム

No.	温度 (°C)	時間 (sec)	ガス流量 (L/min)	サンプリング
1	120	20	0.1	OFF
2	250	10	1	OFF
3	1200	10	1	OFF
4	1200	15	1	OFF
5	1200	3	0	OFF

6	2400	3	0	ON
7	2500	2	1	OFF

得られた CISPLATIN 量及びタンパク質量から、cell-to-medium ratio (C/M ratio) を以下の式を用いて算出した。

$$\text{C/M ratio} = \frac{\text{細胞内 CISPLATIN 量 } (\mu\text{mol/mg protein})}{\text{上層 CISPLATIN 濃度 } (\mu\text{mol}/\mu\text{L})}$$

6 - 6 - 4 rt-PCR

A) Total RNA の抽出

1×10⁶ 個の細胞を 300×g で 5 分遠心してから培地を完全に取り除いた。Dex(+),(-)それぞれについて3つずつ、別のウェルから細胞を採取して用意した。

Lysis solution/2-ME mixture 250 μL を添加し、ペレットをボルテックスし細胞同士を解離させ、溶解した細胞をピペットで GenElute Filtration Column にいれ 16,000×g で 2 分間遠心した。その後、Filtration Column は廃棄した。

ろ過したライセートに 250 μL の 70%エタノール溶液を添加し、混和した。ライセート/エタノール混合液をピペットで GenElute Binding Column にいれ、16,000×g で 15 秒間遠心した。カラムと collection tube を残し、カラムを通過した溶液は廃棄した。

500 μL の wash solution 1 をカラムにいれ 16,000×g で 15 秒間遠心し、カラムを 2 mL collection tube に移し替えることを 2 回繰り返した後に、16,000×g で 2 分間遠心しカラムを乾燥させた。

カラムを通過した溶液を廃棄し、再び 16,000×g で 1 分間遠心した。カラムを 2 mL collection tube に移し替え、50 μL の elution solution をカラムにいれ 16,000×g で 1 分間遠心した。

カラムを通過した溶液をすぐに用いない場合は-70°Cで保存した。

B) cDNA への逆転写

2×Reverse Transcription Master Mix (RT Master Mix) を調整した。氷上で試薬を融解させた。以下の操作はすべて氷上で行った。

RNA 溶液を 0.14 µg/µL に希釈した。希釈液は 1.5 mL チューブで作成した。まず buffer をすべて入れてからそれぞれの RNA 原液を入れた。

2×RT Master Mix を 10 µL、RNA 希釈液 10 µL が入った 1.5 mL チューブに入れた。軽くピペッティングをして混和した。

チューブ壁に付着した 2×RT Master Mix は遠心して回収した。このとき気泡が除去されたかを確認した。

サーマルサイクラーに step1 の温度条件を設定し、温度が設定温度に到達してから 1.5mL チューブをサーマルサイクラーにセットし、既定の時間反応をかけた。

Step を切り替えるときも温度が設定温度に到達してからの時間を計測した。

Step4 に関してはもう一方の場所であらかじめ設定しておき step3 が終わったところでチューブを移し替えた。

反応終了後 (一晚経過後)、回収し -30°C で保存した。また、RNA 原液も同様に -30°C で保存した。

C) Real time PCR

1. 薬液処置

10 cm dish より HL-60 細胞をコニカルチューブに回収し、血球算定盤を用いて細胞数を計数し、約 0.5×10^5 cell/mL となるように RPMI1640 培地により希釈し、12 well plate に各 2.1 mL ずつ播種した。24 時間前培養した後、plate を 50 x g、2 min で遠心し、上澄みをアスピレーターで取り除き、検量線用サンプル、コントロールは Dex を含まない培地、サンプルには所定の Dex 濃度を含む培地を添加し、48 時間培養させた。

2. HL-60 細胞の total RNA 抽出

HL-60 細胞の total RNA 抽出には、Gen Elute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit を用いた。2 mL マイクロチューブに薬液処置後の HL-60 細胞を

1 × 10⁶ cell 回収し、lysis solution/2-ME mixture 250 μL を添加し、試験管ミキサー-DeltaMixer Se-08 によって細胞を溶解させた。溶解した細胞液は GenElute Filtration Column に入れ、16,000g x 2 min, 20°C で遠心し、濾過したライセートに 70%エタノール 250 μL 添加、ピペッティングにより混和した。ライセート/エタノール混合液を GenElute Binding Column に入れ、16,000 g x 15 sec, 20°C で遠心し、濾液を捨てた。洗浄のため、wash solution1 500 μL をカラムに入れ、16,000 g x 15 sec, 20°C で遠心した。さらにカラムを新しい 2 mL collection tube に移し替え、wash solution 2 (エタノール含有) 500 μL においても 16,000 g x 15 sec, 20°C で遠心後、再度 wash Solution 2 (エタノール含有) 500 μL で 16,000 g x 2 min, 20°C 遠心し、濾液を捨てた後、16,000g x 1 min, 20°C で遠心して洗浄した。カラムを新しい 2 mL collection tube に移し替え、Elute solution 50 μL を添加し、16,000 g x 1 min, 20°C で遠心し、total RNA を抽出した。

3. total RNA 濃度の測定

NanoDrop Lite を用いて、抽出した total RNA 濃度を測定した。

4. cDNA への逆転写反応

逆転写反応には、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を用いた。

2 の操作で単離した total RNA 2 μg を使用し、反応のボリュームを 20 μL として行った。逆転写の装置は DOUBLE ALUMI BATH ALB-301 を使用した。
(逆転写条件 : 25°C 10 min、37°C 120 min、85°C 5 min、4°C ∞)

5. Real-time PCR

使用した forward primer 及び reverse primer の配列は次のページの通りである。Primer は全てシグマアルドリッチ ジャパン合同会社、東京より購入した。

Real-time PCR には、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix を用いた。滅菌水 6.76 μL に 0.1 × ROX qPCR Mix 10.04 μL、及び各遺伝子に対する forward/reverse primer 各 0.6 μL を加えた混合液を MicroAmp Optical 96-

Well Reaction Plate に 18 μ L ずつ添加し、さらに各 well に 6.4 で合成した cDNA サンプルを 2 μ L ずつ加えた。cDNA の増幅・検出は Mx3000p Real-Time QPCR System にて行った。(PCR 条件：初期変性 95°C 15 min を行った後、変性 95°C 10 sec、アニーリング/伸長 60°C 30 sec のステップを 40 サイクル、その後、融解曲線解析のため、95°C 1 min、55°C 30 sec、95°C 30 sec)

Gene		Sequence (5'→3')	Products (bp)
Beta-actin (actb)	Forward	TGAGCGCAAGTACTCTGTGTGGA T	129
	Reverse	TAGAAGCATTTGCGGTGCACGAT G	
OCT2 (slc22a2)	Forward	GATGGCAGCAAGACCAAAAGTA	109
	Reverse	ACTCCACTGGCTGTAGACCTAGGT	

謝辞

稿を終えるにあたり、終始、多大なるご指導、ご鞭撻を賜った金沢大学附属病院薬剤部崔吉道 教授に謹んで感謝の意を表するとともに、厚く御礼申し上げます。

本研究および本稿を遂行するにあたり、終始、温かいご指導、ご助言を賜った金沢大学附属病院薬剤部 嶋田努 准教授、赤下 学 特任助教、澤本 一樹元特任助教ならびに臨床薬物動態学研究室 石崎純子 准教授に深甚なる謝意を表するとともに心より御礼申し上げます。

また、本研究の臨床研究を遂行するにあたって終始ご協力を頂いた臨床薬物動態学研究室 菅幸夫 助教、薬剤部副薬剤部長・原祐輔 先生に心から感謝の意を表します。

さらに、基礎研究を遂行するにあたり、終始ご協力を頂いた金沢大学附属病院薬剤部研究室 高木春乃氏ならびに高田昌季氏をはじめとする諸先生方、諸先輩ならびに学生諸賢に深く感謝いたします。

また、本研究を遂行するにあたり犠牲となった実験動物に感謝すると共に、冥福を祈ります。

最後になりましたが、学生生活を送る上でよき理解者となり、精神的に支えてくれた家族に深く感謝します。

引用文献

- 1 新臨床腫瘍学 改訂第4版 日本臨床腫瘍学会 南江堂 (2015)
- 2 Coates A, Abraham S, Kaye SB, Sowerbutts T, Frewin C, Fox RM, Tattersall MH. (1983) On the receiving end—patient perception of the side-effects of cancer chemotherapy. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19(2):203-208
- 3 M de Boer-Dannert, R de Wit, PIM Schmitz, J Djontono, V v Beurden, G Stoter and J Verweij. (1997) Patients perceptions of the side-effects of chemotherapy: the influence of 5HT3 antagonists. *Br J Cancer* 76(8):1055-1061
- 4 Carelle N, Piotto E, Bellanger A, Germanaud J, Thuillier A, Khayat D. (2002) Changing patient perceptions of the side effects of cancer chemotherapy. *Cancer* 95(1):155-163
- 5 Morran C, Smith DC, Anderson DA, McArdle CS. (1979) Incidence of nausea and vomiting with cytotoxic chemotherapy: a prospective randomized trial of antiemetics. *Br Med J.* 1:1323-1324.
- 6 Basch E, Prestrud AA, Hesketh PJ, Kris MG, Feyer PC, Somerfield MR, Chesney M, Clark-Snow RA, Flaherty AM, Freundlich B, Morrow G, Rao KV, Schwartz RN, Lyman GH; American Society of Clinical Oncology. (2011) Antiemetics: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol.* 29:4189-4198.
- 7 Roila F, Herrstedt J, Aapro M, Gralla RJ, Einhorn LH, Ballatori E, Bria E, Clark-Snow RA, Espersen BT, Feyer P, Grunberg SM, Hesketh PJ, Jordan K, Kris MG, Maranzano E, Molassiotis A, Morrow G, Orver I, Rapoport BL, Rittenberg C, Saito M, Tonato M, Warr D, ESMO/MASCC Guidelines Working Group. (2010) Guideline update for MASCC and ESMO in the prevention of chemotherapy- and radiotherapy-induced nausea and vomiting: results of the Perugia consensus conference. *Ann Oncol Suppl.* 21 Suppl 5:v232-243.
- 8 Stables R, Andrews PL, Bailey HE, Costall B, Gunning SJ, Hawthorn J, Naylor RJ, Tyers MB. (1987) Antiemetic properties of the 5HT3-receptor antagonist, GR38032F. *Cancer Treatment Reviews.* 14:333-336.
- 9 Hawthorn. J, Cunningham. D. (1990) Dexamethasone can potentiate the antiemetic action of a 5HT3 receptor antagonist on cyclophosphamide induced vomiting in the ferret. *Br J Cancer.* 61:56-60.

- 10 Rudd JA, Naylor RJ. (1996) An interaction of ondansetron and Dexamethasone antagonizing cisplatin-induced acute and delayed emesis in the ferret. *Br J Pharmacol.* 118:209-214.
- 11 Kriegler AB, Bernsrdo D, Verschoor SM. (1994) Protection of murine bone marrow by Dex during cytotoxic chemotherapy. *Blood.* 83:65-71.
- 12 Rinehart J, Keville L, Measel J, Spiekerman AM, Burke K. (1995) Corticosteroid alteration of carboplatin-induced hematopoietic toxicity in a murine model. *Blood.* 86: 4493-4499.
- 13 Grosso F, Dileo P, Sanfilippo R, Stacchiotti S, Bertulli R, Piovesan C, Jimeno J, D'Incalci M, Gescher A, Casali PG. (2006) Steroid premedication markedly reduces liver and bone marrow toxicity of trabectedin in advanced sarcoma. *Eur J Cancer.* 42:1484-1490.
- 14 Leggas M, Kuo KL, Robert F, Cloud G, deShazo M, Zhang R, Li M, Wang H, Davidson S, Rinehart J. (2009) Intensive anti-inflammatory therapy with Dex in patients with non-small cell lung cancer: effect on chemotherapy toxicity and efficacy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 63:731-743.
- 15 Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, Watoson RC, Herr HW, Morse MJ, Sogani PC, Vaughan ED, Bander N, Weiselberg L, Rosado K, Smart T, Lin SY, Penenberg D, Fair WR. (1988) MVAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for advanced transitional cell carcinoma of urothelium. *J Urol.* 139:461-469.
- 16 Loehrer PJ Sr, Einhorn LH, Elson PJ, Crawford ED, Kuebler P, Tannock I, Raghavan D, Stuart-Harris R, Sarosdy MF, Lowe BA, Blumenstein B, Trump D. (1992) A Randomized comparison of cisplatin alone or in combination with methotrexate, vinblastin, and doxorubicin in patients with metastatic urothelial carcinoma: a cooperative group study. *J Clin Oncol.* 10:1066-1073.
- 17 Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, Watoson RC, Geller N, Herr HW, Morse MJ, Sogani PC, Vaughan ED, Bander N. (1989) Methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. Efficacy and patterns of response and relapse. *Cancer.* 64:2448-2458.
- 18 Mishler JM, Emerson PM. (1977) Development of neutrophilia by serially increasing doses of Dex. *Br J Haematol.* 36:249-257.

- 19 Herr I, Ucur E, Herzer K, Okouoyo S, Ridder R, Krammer PH, von knebel Doebelitz M, Debatin KM. (2003) Glucocorticoid cotreatment induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas. *Cancer Res.* 63:3112-3120.
- 20 Smith TJ, Bohlke K, Lyman GH, Carson KR, Crawford J, Cross SJ, Goldberg JM, Khatcherrecian JL, Leighl NB, Perkins CL, Somlo G, Wade JL, Wozniak AJ, Armitage JO; American Society of Clinical Oncology. (2015) Recommendations for the use of WBC growth factors: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol.* 33:3199-3212.
- 21 Lyman GH, Abella E, Pettengell R. (2013) Risk factors for febrile neutropenia among patients with cancer receiving chemotherapy: a systematic review. *Crit Rev Oncol/Hemat.* 90:190-199.
- 22 Nakagawa M, Terashima T, D'yachkova Y, Bondy GP, Hogg JC, van Eeden SF. (1990) Glucocorticoid-induced granulocytosis. *Circulation.* 98:2307-2313.
- 23 Meropol NJ, Miller LL, Korn EL, Braiman LE, MacDermott ML, Schuchter LM. (1992) Severe myelosuppression resulting from concurrent administration of granulocyte colony-stimulating factor and cytotoxic chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 84:1201-1203.
- 24 Shaffer DW, Smith LS, Burris HA, Clark GM, Eckardt JR, Fields SM, Weiss GR, Rinaldi DA, Bowen KJ, Kuhn JG. (1993) A randomized phase I trial of chronic oral etoposide with or without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with advanced malignancies. *Cancer Res.* 53:5929-5933
- 25 Wolff JE, Hauch H, Kühl J, Egeler RM, Jürgens H. (1998) Dexamethasone increases hepatotoxicity of MTX in children with brain tumors. *Anticancer Res.* 18:2895-2899
- 26 English J, Aheme GW, Arendt J, Marks V. (1987) The effect of abolition of the endogenous corticosteroid rhythm on the circadian variation in methotrexate toxicity in the rat. *Cancer Chemother Pharmacol* 19:287-290
- 27 Fuksa L, Brackova E, Kolouchova G, Hirsova P, Hroch M, Cermanova J, Staud F, Micuda S. (2010) Dexamethasone reduces methotrexate biliary elimination and potentiates its hepatotoxicity in rats. *Toxicology* 267:165-171
- 28 Damia G, Komschlies KL, Futami H, Back T, Gruys ME, Longo DL, Keller JR, Ruscetti FW, Wiltout RH. (1992) Prevention of acute chemotherapy-induced death in mice by recombinant human interleukin

- 1:protection from hematological and nonhematological toxicities. *Cancer Res.* 52:4082-4089
- 29 Wierda d, pazdernik tl. (1979) Toxicity of platinum complexes on hemopoietic precursor cells. *J Pharmacol Exp Ther* 198(1):246-253
- 30 StemCell Technologies. (2005) MethoCult を用いたマウス造血幹細胞のコロニーアッセイ テクニカルマニュアル Catalog#28405 Version 3.1.1.
- 31 Schlossmacher G, Stevens A, White A (2011) Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *J Endocrinol* 211:17-25
- 32 Ruiz LM, Bedoya G, Salazar J, Garcia de OD, Patino PJ. (2002) Dexamethasone inhibits apoptosis of human neutrophils induced by reactive oxygen species. *Inflammation* 26(5):215-222
- 33 Shu Y, Bello CL, Mangravite LM, Feng B, Giacomini KM. (2001) Functional characteristics and steroid hormone-mediated regulation of an organic cation transporter in Madin-Darby canine kidney cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 299(1):392-398
- 34 li S, Okamoto H, Yokoyama H, Suyama T (1988) Comparative pharmacokinetic study of dexamethasone palmitate and dexamethasone disodium phosphate in chronic rheumatoid arthritis patients. *薬理と治療*, 16(2) : 551-557
- 35 デカドロン注射液 1.65mg/3.3mg/6.6mg IF 改訂第 12 版 (2015) アスペンジャパン株式会社
- 36 Fardel O, Lecureur V, Guillouzo A. (1993) Regulation of dexamethasone of P-glycoprotein expression in cultured rat hepatocytes. *FEBS Lett* 327(2):189-193
- 37 Zhao JY, Ikeguchi M, Eckersberg T, Kuo MT. (1993) Modulation of multidrug resistance gene expression by dexamethasone in cultured hepatoma cells. *Endocrinology.* 133(2):521-528
- 38 Lin JH, Chiba M, Chen IW, Nishime JA, deLuna FA, Yamazaki M, Lin YJ. (1999) Effects of dexamethasone on the intestinal first-pass metabolism of indinavir in rats: evidence of cytochrome P-450 3A and p-glycoprotein induction. *Drug Metab Dispos* 27(10):1187-1193
- 39 Legrand O, Perrot JY, Tang RP, Simonin G, Gurbuxani S. (1996)

- Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) mRNA and protein in normal peripheral blood and bone marrow haemopoietic cells. *Br J Haematol* 94:23-33
- 40 Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstädt H, Koepsell H, Piechota HJ, Haier J, Jaehde U, Zisowsky J, Schlatter E. (2005) Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2 *Am J Pathol.* 167(6):1477-1484
- 41 Guminski AD, Balleine RL, Chiew YE, Webster LR, Tapner M, Farrell GC, Harnett PR, Defazio A (2006), MRP2 (ABCC2) and cisplatin sensitivity in hepatocytes and human ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 100(2):239-246
- 42 Nakamura T, Yonezawa A, Hashimoto S, Katsura T, Inui K (2010) Disruption of multidrug and toxin extrusion MATE1 potentiates cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 80(11):1762-1767
- 43 Narang VS, Fraga C, Kumar N, Shen J, Throm S, Stewart CF, Waters CM (2008) Dex increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the rat blood-brain barrier, *Am J Physiol Cell Physiol* 295(2):C440-450
- 44 Courtois A, Payen L, Guillouzo A, Fardel O. (1999) Up-regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) expression in rat hepatocytes by Dex, *FEBS Lett* 459(3):381-385
- 45 Yano R, Tani D, Watanabe K, Tsukamoto H, Igarashi T, Nakamura T, et al. Evaluation of potential interaction between vinorelbine and clarithromycin. *Ann Pharmacother* 2009;43:453-458
- 46 Schwarz LR, Burr R, Schwenk M, Pfaff E, Greim H. (1975) Uptake of taurocholic acid into isolated rat-liver cells. *Eur J Biochem* 55(3):617-623
- 47 Klingenberg M, and E. Pfaff. (1967) Means of terminating reactions. *Methods Enzymol* 10:680-684

Table 1 Patient demographics

	Dex (-) (n=6)	Dex 1 day (n=12)	Dex multiday (n=6)
Age (year)	67.3 (58-73)	67.0 (57-79)	69.5 (57-76)
Sex (male/female)	5/1	12/0	3/3
PS (0/1/2)	5/1/0	10/1/1	6/0/0
Body surface area (m ²)	1.8 (1.5-2.0)	1.7 (1.5-1.8)	1.6 (1.4-1.8)
Body mass index (kg/m ²)	22.9 (19.8-28.1)	21.2 (15.9-27.5)	24.7 (19.3-30.0)
Creatinine clearance (mL/min)	94.5 (62.3-125.1)	99.8 (55.6-143.7)	98.5 (65.9-143.8)
Total bilirubin (mg/dL)	0.53 (0.4-0.8)	0.63 (0.3-1.4)	0.72 (0.5-1.3)
AST (IU/L)	24.7 (12-31)	22.0 (10-32)	18.3 (15-21)
Concomitant medications			
Oral 5HT ₃ receptor antagonists (%)	83.3	33.3	100
Dopamine antagonists (%)	50	33.3	50
Drugs reported leucopenia (%)	50	41.7	33.3
Purgative medicine (%)	50	50	50

Data are mean values (range in parentheses).

PS: performance status, AST: aspartate transaminase,

5HT₃ receptor: serotonin type 3 receptor

Table 2 Severity of neutropenia in patients on the first course of MVAC chemotherapy

Neutropenia	Dex (-) (n = 6)	Dex 1 day (n = 12)	Dex multiday (n = 6)
G3 (%)	50.0	41.7	0
<i>P</i> value		1.0	0.18
G4 (%)	0	50.0	100.0
<i>P</i> value		0.054	0.002
G3/4 (%)	50.0	91.7	100.0
<i>P</i> value		0.08	0.18

P values are for G3,G4 and G3/4 neutropenia with Dex (1 day or multiday) versus Dex (-), as determined by Fisher's exact test.

Table 3 Day of onset of first severe neutropenia in patients on the first course of MVAC chemotherapy

Neutropenia	Dex (-) (n = 3)	Dex 1 day (n = 11)	Dex multiday (n = 6)
Day of onset of severe neutropenia	17.7 ± 2.1	15.1 ± 2.1	13.2 ± 1.0
<i>P</i> value		0.113	0.008

Data are mean ± SD. *P* values are for day of onset of severe neutropenia with Dex (1 day or multiday) versus Dex (-), as determined by ANOVA with post hoc Tukey's test.

Table 4 G-CSF usage at the first course of MVAC chemotherapy

	Dex (-) (n=6)	Dex 1 day (n=12)	Dex multiday (n=6)
G-CSF use (%)	50	75	100
<i>P</i> value		0.34	0.18
Day of Onset of first G-CSF use	18.0 ± 2.0	15.1 ± 2.7	13.7 ± 1.5
<i>P</i> value		0.17	0.04

P values are for G-CSF use with Dex 1day and multiday versus Dex (-), as determined by Fisher's exact test.

Onset day of G-CSF first use data are mean ± SD. *P* values are for onset day of G-CSF use with Dex (1 day or multiday) versus Dex (-), as determined by ANOVA with post hoc Tukey's test.

Table 5 Risk factors associated with Grade 3/4 neutropenia among 24 patients undergoing MVAC therapy at first course, univariate logistic regression analysis

Variable	Incidence of severe neutropenia (%)	OR (95% CI)	P value
Dexamethasone	(+) : 94.4 (-) : 50.0	17.0 (1.3-223.1)	0.03
Age (> 65 y)	(+) : 88.2 (-) : 71.4	3.0 (0.33-27.2)	0.33
Female	Female : 75.0 Man : 85.0	0.5 (0.04-7.0)	0.63
PS (> 0)	(+) : 66.7 (-) : 85.7	0.3 (0.02-4.9)	0.42
Total bilirubin (> 0.5 mg/dL)	(+) : 90.9 (-) : 76.9	3.0 (0.3-34.0)	0.38
BMI (< 23 kg/m ²)	(+) : 84.6 (-) : 81.8	1.2 (0.1-10.5)	0.86

OR: odds ratio, CI: confidence interval, PS: performance status, BMI: body mass index

Table 6 Comparison of IC₅₀ values for MVAC therapy drugs with and without Dex in HL-60 cells

Dex (nM)	Cisplatin IC₅₀ (μM)	<i>p</i>
0	1.24 ± 0.08	---
0.1	0.96 ± 0.07	0.079
1	0.85 ± 0.06	0.005*
10	0.93 ± 0.07	0.054
100	1.11 ± 0.07	0.452

Dex (nM)	Adriamycin IC₅₀ (μM)	<i>P</i>
0	16.48 ± 1.4	---
100	10.3 ± 1.4	0.52
10,000	14.73 ± 1.4	0.88

Dex (nM)	vinblastine IC₅₀ (μM)	<i>P</i>
0	1.57 ± 1.2	---
100	1.46 ± 1.1	0.52
10,000	1.47 ± 1.1	0.88

Dex (nM)	methotrexate IC₅₀ (μM)	<i>p</i>
0	16.4 ± 1.1	---
100	18.79 ± 1.1	0.43
10,000	20.82 ± 1.1	0.23

Data are expressed as mean values ± SEM of three or four independent experiments. Asterisks indicate significant difference from Dex 0 nM ($p < 0.05$).

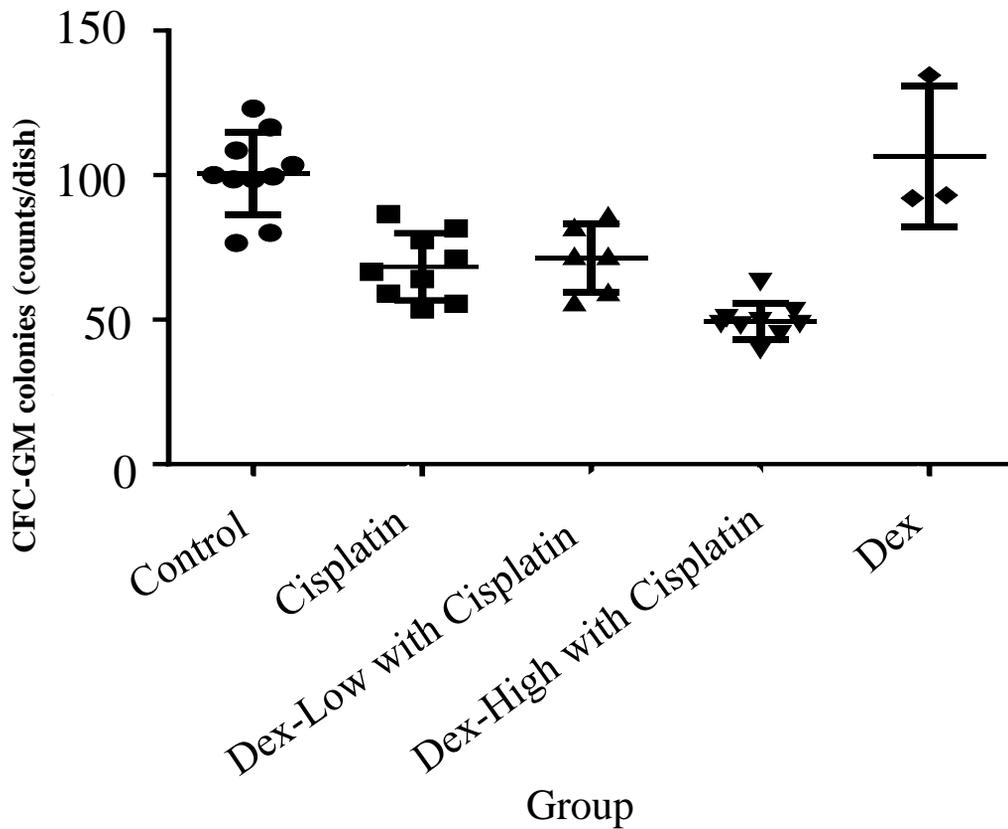


Figure 1 CFU-GM colony counts after treatment of drugs in CD-1 mice

Control group is no treatment (n=10). Cisplatin group is administrated 10 mg/kg cisplatin on day 1 (n=9). Dex-Low with cisplatin group is administrated 10mg/kg cisplatin on day 1 and 0.01 mg/body dexamethasone on day 1-5 (n=6). Dex-High with cisplatin group is administrated 10 mg/kg cisplatin on day 1 and 0.1 mg/body dexamethasone on day 1-5 (n=9). Dex group is administrated 0.1 mg/body dexamethasone on day 1-5 (n=3). Data are expressed as mean values \pm SEM of 3-10. All drugs are administered by intraperitoneal administration.

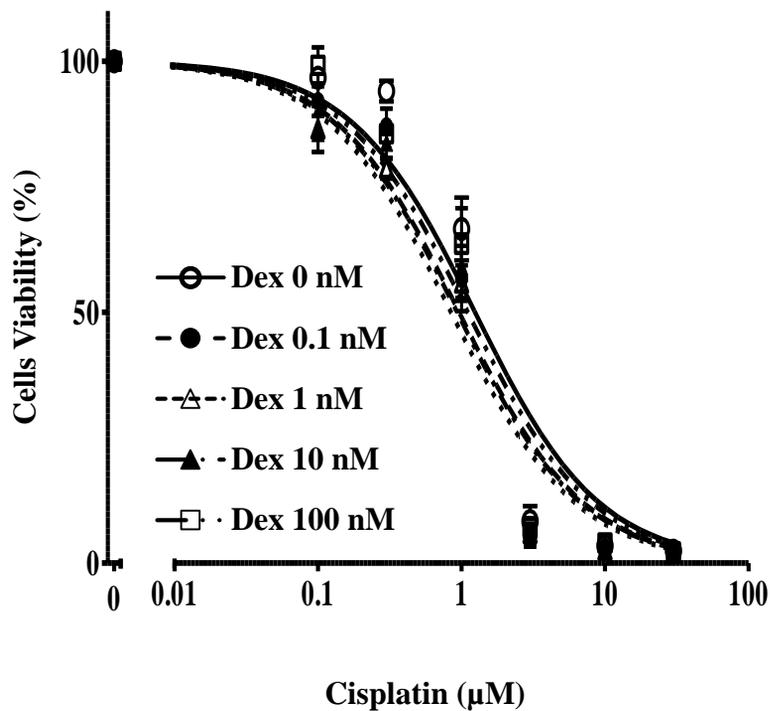


Figure 2 Cells viability of HL-60 cells after exposure to Cisplatin and Dex for 48hr

Data are expressed as mean values \pm SEM of three independent experiments.

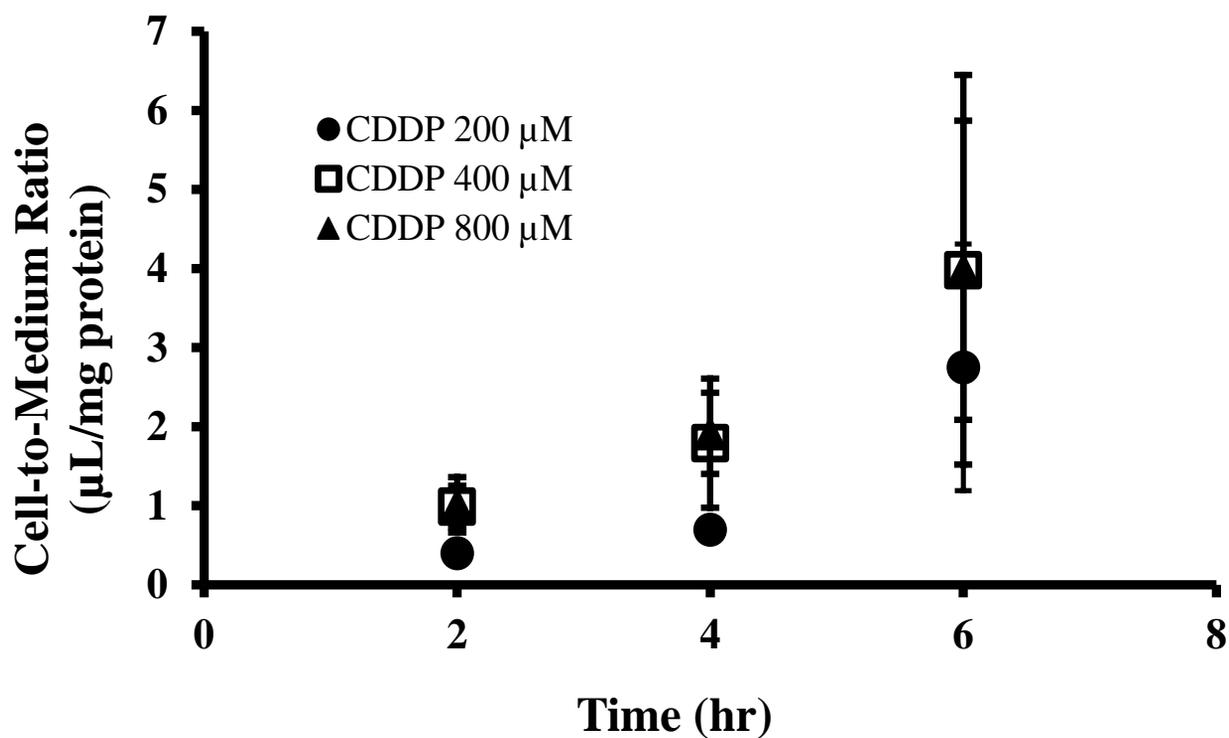


Figure 3 Time- and Concentration-dependence of CDDP Uptake in HL-60 cells

Data are expressed as mean values \pm SEM of four or five independent experiments.

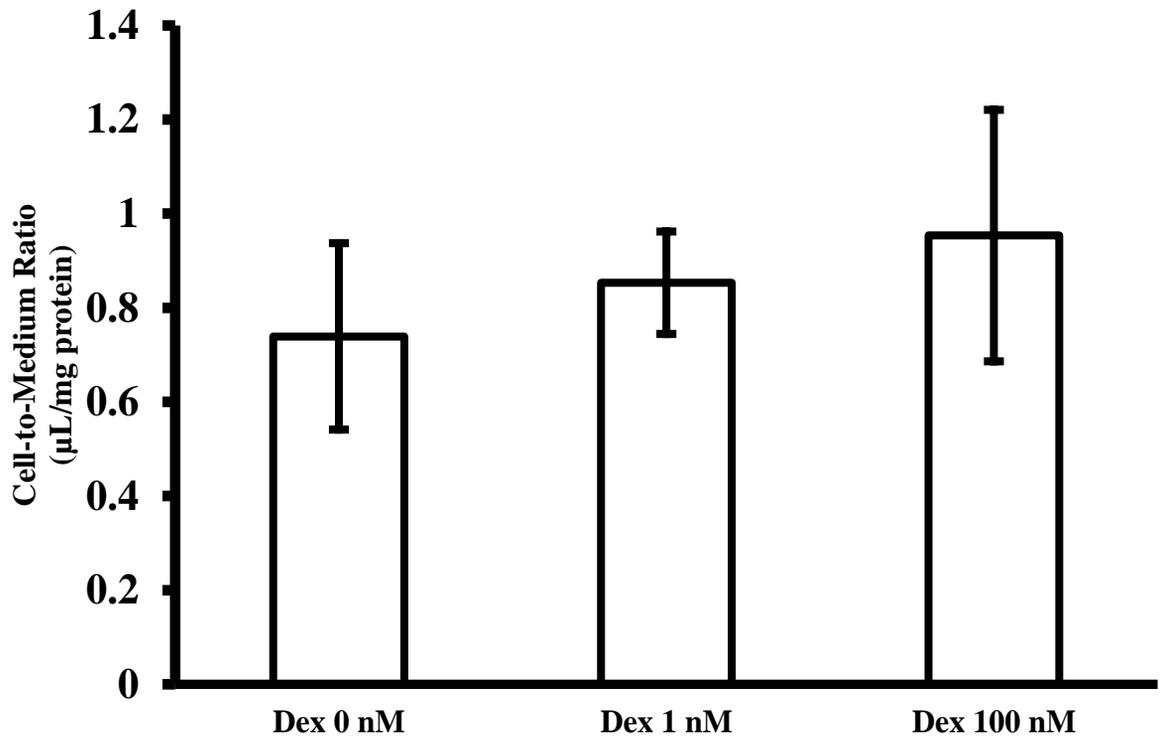


Figure 4 Effect of Dex on Cisplatin Uptake in HL-60 cells

Cells were incubated with 400 µM Cisplatin for 4 hr in the presence of Dex at concentrations of 1 nM and 100 nM or without drug (Dex 0 nM). Data are expressed as mean values \pm SEM of eight independent experiments.