

博士学位論文

乳がんにおける新規治療法の開発と
がん化学療法における支持療法に関する
臨床的研究

近畿大学大学院
薬学研究科薬学専攻

鶴島 克将

目次

序論.....	1
第1章 DMFによるヒト TNBC細胞での NF-κB 阻害を介したアポトーシスの誘導とパクリタキセルおよびアドリアマイシンの殺細胞作用増強効果	3
I. 緒言.....	3
II. 方法.....	4
1. 細胞株および試薬.....	4
2. 細胞生存率およびアポトーシス解析.....	4
3. Immunoblotting.....	5
4. Gene Expression Omnibus dataset.....	5
5. Kaplan Meier Plotter analysis.....	5
6. 統計学的解析.....	6
III. 結果.....	6
1. リン酸化 NF- κ B p65 タンパク質および NFKBIA 遺伝子発現は TNBC 患者の予後に関与する.....	6
2. DMFによる MDA-MB-231細胞および BT549細胞でのアポトーシス誘導効果.....	8
3. DMFによる MDA-MB-231細胞および BT-549細胞での NF- κ B p65 核移行および XIAP、Survivin、Bcl-xL および Bcl-2 発現抑制効果.....	10
4. DMFによる MDA-MB-231細胞および BT-549細胞でのパクリタキセルおよびアドリアマイシン殺細胞作用増強効果.....	12
IV. 考察.....	16

第2章 FEC 療法における制吐目的としてのオランザピン投与日数に関する探索

的調査.....	19
I. 緒言.....	19
II. 方法.....	20
1. 調査方法.....	20
2. 調査項目.....	20
3. 統計学的解析.....	20
4. 倫理的配慮.....	21
III. 結果.....	21
IV. 考察.....	23
総括.....	25
引用文献.....	27
謝辞	

序論

乳がんは世界的にも罹患者数の多いがんであり、日本においても女性のがん罹患者数で第 1 位となっている。乳がんは乳腺の組織にできる悪性腫瘍であり、多くは乳管から発生し、一部は乳腺小葉から発生する。

乳がんは、エストロゲン受容体 (Estrogen Receptor : ER)、プロゲステロン受容体 (Progesteron Receptor : PR) およびヒト上皮成長因子受容体 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 : HER2) に対して陽性または陰性に分類される。乳がんのサブタイプには、Luminal A (ER/PR 陽性、Ki-67 低値および HER2 陰性)、Luminal B (ER/PR 陽性、Ki-67 高値および HER2 陰性/陽性)、HER2 陽性およびトリプルネガティブ乳がん (Triple Negative Breast Cancer : TNBC ; ER/PR/HER2 陰性) があり、進行速度や再発率および治療選択肢の点で異なる [1]。その中でも TNBC は、全乳がんの約 20% を占め、3 年間の再発率が最も高く全ての乳がんサブタイプの中で最も予後が悪いとされている [2]。近年、poly ADP-ribose polymerase-1 (PARP-1) 阻害剤や抗 programmed cell death ligand 1 (PD-L1) 抗体の開発により治療奏効率は向上したが、従来の化学療法が標準的な治療法である [3]。また、TNBC は ER、PR、HER2 が陰性であり、明確な治療標的分子がないため、TNBC に対する新たな治療法が必要とされている。

NF- κ B p65 (*RELA*) 遺伝子発現は、他の乳がんサブタイプと比較して TNBC で増加し、TNBC 幹細胞の生存に深く関与することとともに、TNBC を含む乳がんの再発時に活性化されることが報告されている [4-6]。NF- κ B は、細胞の増殖、分化、生存を促進する転写因子であり、膵臓がん、肺がん、子宮頸がん、前立腺がん、乳がん、胃がんを含む様々な悪性腫瘍における発生および増殖に関与している [7]。したがって、NF- κ B は TNBC の新しい治療標的分子となる可能性

が考えられる。

TNBC における抗がん剤治療では、ホルモン療法や抗 HER2 抗体の効果が期待できないため、化学療法を主軸とした治療が適応される [3]。特に早期乳がんに対して周術期に行う薬物療法は、潜在的な微小転移を制御することにより、病気を治癒し生存期間を延長させる重要な治療である [8]。また術前に薬物療法を行うことにより、乳房温存療法が可能となる場合には患者の QOL 向上が期待される [8]。しかし、周術期治療で使用される治療は従来の殺細胞性抗がん剤を使用することから、治療阻害要因となる副作用発現割合も高い [9]。周術期治療においては、予後や再発率の観点から相対用量強度 (relative dose intensity : RDI) を高く維持することが重要とされているため、有害事象による治療の延期や減量は避けるべきである。特に乳がんは化学療法誘発性悪心・嘔吐 (chemotherapy induced nausea and vomiting : CINV) のリスク因子となる若年女性に発症しやすい疾患のひとつである。高度催吐リスクに分類されるアンストラサイクリン系の抗がん剤を含む治療が行われる乳がんの周術期治療では、CINV が治療を阻害する可能性があり、治療の延期や減量など RDI が低下することが懸念される [10]。このことから、支持療法により CINV をコントロールすることができれば、早期乳がんの予後向上することが期待される。

第 1 章では、NF- κ B 阻害剤であるフマル酸ジメチル(dimethyl fumarate : DMF) による TNBC 細胞でのアポトーシス誘導機序の解明とパクリタキセルおよびアドリアマイシンの殺細胞作用を増強するか否かについて検討した。また第 2 章では、乳がん術後補助療法として FEC 療法を受けた患者についてレトロスペクティブに調査し、施行後に生じる Grade 2 以上の CINV に対して 4 日間のオランザピン (OLZ) 内服が与える影響について検討した。

以下に、本検討の内容を詳述する。

第1章

DMFによるヒト TNBC 細胞での NF- κ B の阻害を介したアポトーシスの誘導とパクリタキセルおよびアドリアマイシンの殺細胞作用増強効果

I. 緒言

乳がんのサブタイプの一つである TNBC は ER、PR および HER2 が全て陰性であり、乳がんの約 20%を占め、3 年間の再発率が高く全ての乳がんの中で最も予後不良である [2]。近年、BRCA1 および BRCA2 の変異が 20%の TNBC 患者で認められることが示されており [11]、この変異に対応した PARP-1 阻害剤や PD-L1 高発現 TNBC に対しては抗 programmed cell death ligand 1 (PD-L1)抗体の開発されている [12]。これら治療薬により治療奏効率は向上したが、従来の化学療法が標準的な治療法である [3]。また、TNBC は ER、PR、HER2 に対して陰性であり、明確な治療標的分子がないため、TNBC に対する新たな治療法が必要とされている。

近年、TNBC において、悪性腫瘍の増殖や生存に関与する NF- κ B の活性化が認められており、TNBC 幹細胞の維持や再発に関与することが示されていることから、NF- κ B が新たな治療標的となる可能性が示唆されている [4-6]。

DMF は多発性硬化症の治療薬として使用されており、成人における経口投与量である 240 mg/日での血中濃度は約 12 μ M であり、その安全性は確認されている [13]。また、DMF は NF- κ B の活性化を抑制することにより、様々ながん細胞

にアポトーシスを誘導することが知られている [14-17]。したがって、DMF は NF- κ B が恒常的に活性化されている TNBC に有効である可能性が考えられる。そこで本研究では、NF- κ B 阻害剤である DMF が TNBC 細胞においてアポトーシスを誘導するか否かと共に、パクリタキセルおよびアドリアマイシンの殺細胞作用を増強するか検討を試みた。

II. 方法

1. 細胞株および試薬

MCF-10A 細胞 (正常乳房上皮細胞株)、MDA-MB-231 細胞 (TNBC 細胞株) および BT-549 細胞 (TNBC 細胞株) を、American Tissue Culture Collection (Manassas, VA, USA) から入手した。これらの細胞を、10% fetal bovine serum (Gibco, Carlsbad, CA, USA)、25 mM 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンサルホン酸 (FUJIFILM Wako)、100 μ g/mL ストレプトマイシン (Gibco)、100 U/mL ペニシリン (Gibco) を含む RPMI-1640 培地 (Sigma, St Louis, MO, USA) で 5% CO₂ で培養した。DMF、パクリタキセルおよびアドリアマイシンは FUJIFILM Wako から入手した。DMF およびパクリタキセルを dimethyl sulfoxide に溶解し、phosphate-buffered saline (PBS; 0.05M, pH7.4) を用いて希釈した。アドリアマイシンは PBS に溶解した。

2. 細胞生存率およびアポトーシス解析

各細胞を 2×10^4 cells/mL の濃度で 96 ウェルプレートに播種し、様々な濃度の DMF、パクリタキセルまたはアドリアマイシンで 72 時間処理した。インキュベーション後、細胞を 0.4% トリパンブルー溶液で染色し、死細胞と生細胞を計数した。アポトーシスは、Annexin V-FITC apoptosis detection kit (Nacalai Tesque, Inc.,

Kyoto, Japan)を用いて検出した。DMF、パクリタキセルまたはアドリアマイシン処理した細胞を PBS 中で 3 回洗浄し、次いでアネキシン V-FITC を含む結合緩衝液に再懸濁した。細胞を室温で 15 分間インキュベートし、次いで BD-LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson, Bedford, MA, USA)を用いて解析した。

3. Immunoblotting

核および細胞質画分は ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, San Diego, CA, USA)を用いて抽出し、各抗体には anti-NF- κ B p65、anti-phospho-JNK、anti-JNK、anti-phospho-p38MAPK、anti-p38MAPK、phospho-ERK1/2、anti-ERK1/2、anti-phospho-Akt、anti-Akt、anti-XIAP、anti-Survivin (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)、anti-Bcl-xL、anti-Bcl-2、anti-Bax、anti-Bim、anti-caspase 3、anti-Lamin A/C (Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA)、anti- β -actin (Sigma, St Louis, MO, USA)を使用した。検出されたタンパクの量は CS analyzer (ATTO, Tokyo, Japan)を用いて測定し、検出されたタンパクを対応するタンパクで標準化した。

4. Gene Expression Omnibus dataset

マイクロアレイデータセット(accession number GSE45827)の遺伝子発現プロフィールは、National Center of Biotechnology Information Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)から入手した。TNBC および正常乳房組織における *RELA* の発現を解析した。

5. Kaplan Meier Plotter analysis

TNBC における phospho-NF- κ B p65 (Ser536)タンパクと *NFKB1A* 発現に関する

予後解析は、臨床データとタンパク質及び遺伝子発現データを統合したデータベースである Kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com/analysis/>)を用いて算出した [18,19]。患者サンプルを2つのグループ (高発現と低発現)に分け、Kaplan-Meier プロットを用いて比較した。また log-rank 解析を行い、P 値を算出した。

6. 統計学的解析

それぞれの実験の結果は平均値 ± 標準偏差で示した。データの解析は ANOVA with Dunnett test で行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

III. 結果

1. リン酸化 NF- κ B p65 タンパクおよび *NFKB1A* 遺伝子発現は TNBC 患者の予後に関与する

TNBC 患者の予後とリン酸化 NF- κ B 発現および I- κ B α をコードする *NFKB1A* の発現との関係を Kaplan Meier Plotter を用いて検討した。TNBC 患者におけるリン酸化 NF- κ B p65 (Ser536)の発現増加および *NFKB1A* の発現低下は、それぞれリン酸化 NF- κ B p65 低発現患者および *NFKB1A* 高発現患者と比較し、全生存期間を優位に低下させた (Figure 1A-D)。さらに、TNBC における NF- κ B p65 をコードする *RELA* 遺伝子の発現は、正常な乳房組織における発現よりも高発現であることが認められた (Figure 1E)。これらのことから、NF- κ B p65 活性化が TNBC 患者の予後不良に関与していることが示唆された。

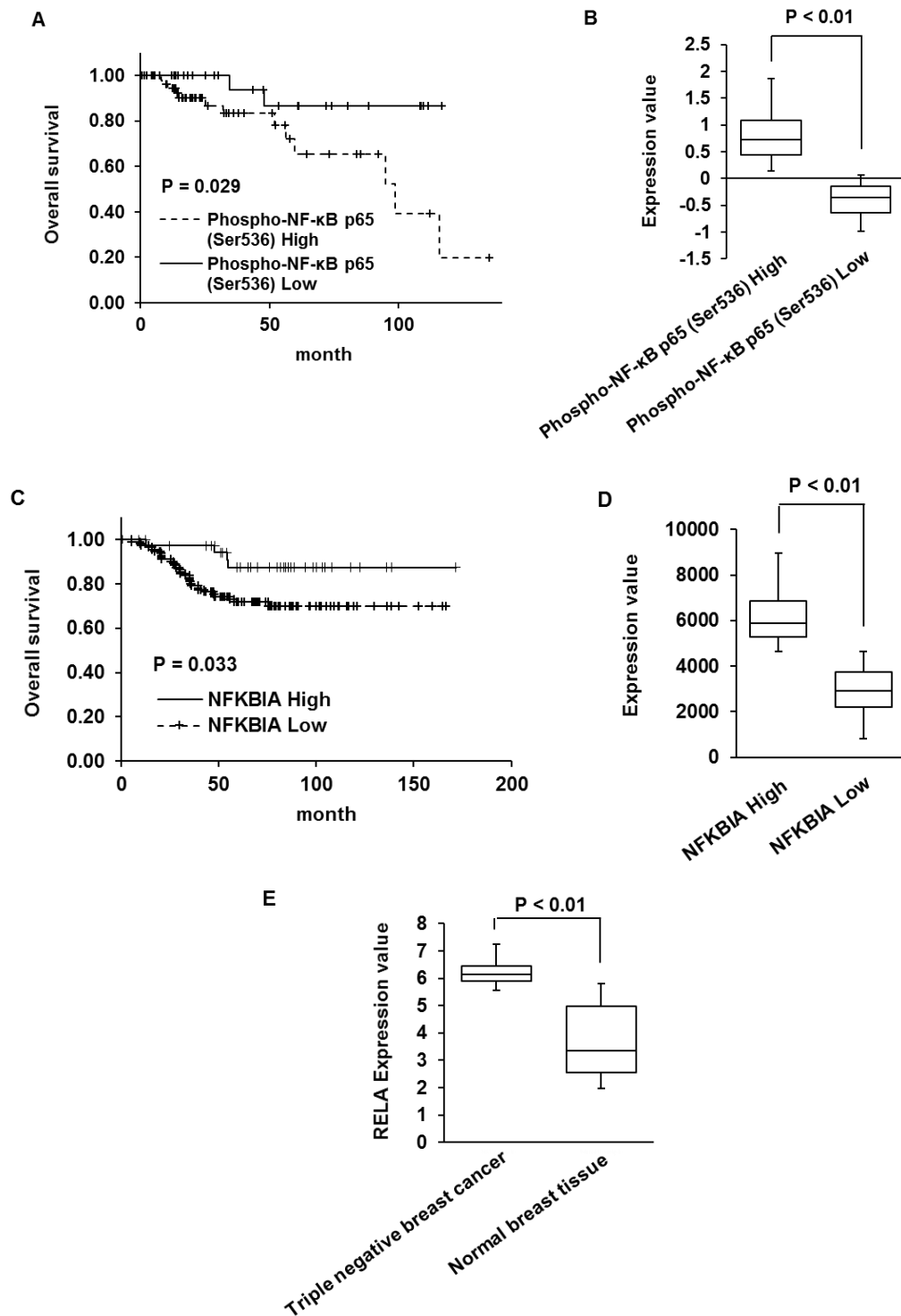


Figure 1. Activation of NF-κB p65 was involved with poor prognosis in patients with TNBC. (A) Relation between phospho-NF-κB p65 (Ser536) expression and overall survival. Survival rates were appraised using Kaplan-Meier Plotter. (B) High and low phospho-NF-κB p65 (Ser536) expression groups were analyzed using Kaplan-Meier Plotter. (C) Relation between *NFKB1A* expression and overall survival. Survival rates were appraised using Kaplan-Meier Plotter. (D) High and low *NFKB1A* expression groups were analyzed using Kaplan-Meier Plotter. (E) Expression of RELA in TNBC and normal tissues was analyzed using the GSE45827 dataset.

2. DMF による MDA-MB-231 細胞および BT-549 細胞でのアポトーシス誘導効果

MCF-10A 細胞、MDA-MB-231 細胞および BT-549 細胞における NF- κ B と I- κ B α の活性化および発現を調べた。NF- κ B p65 の活性化および発現は MCF-10A 細胞と比較し、MDA-MB-231 細胞および BT-549 細胞において高いことが認められた (Figure 2)。さらに、I- κ B α の発現は MCF-10A 細胞と比較し、MDA-MB-231 および BT-549 細胞において低いことが明らかとなった (Figure 2)。次に、DMF 添加により MCF-10A 細胞、MDA-MB-231 細胞および BT-549 細胞において細胞死を誘導するか検討した。その結果、DMF は MDA-MB-231 細胞および BT-549 細胞の生存率を濃度依存的に低下させたが、MCF-10A 細胞では生存率の低下は認められなかった (Figure 3A)。さらに、DMF は MDA-MB-231 細胞および BT-549 細胞におけるアネキシン V 陽性細胞数および cleaved caspase-3 発現を顕著に増加させることが認められた (Figure 3B,C)。これらの結果は、DMF が正常な乳房上皮細胞に影響を及ぼさない濃度で TNBC 細胞においてアポトーシスを誘導することを示唆した。

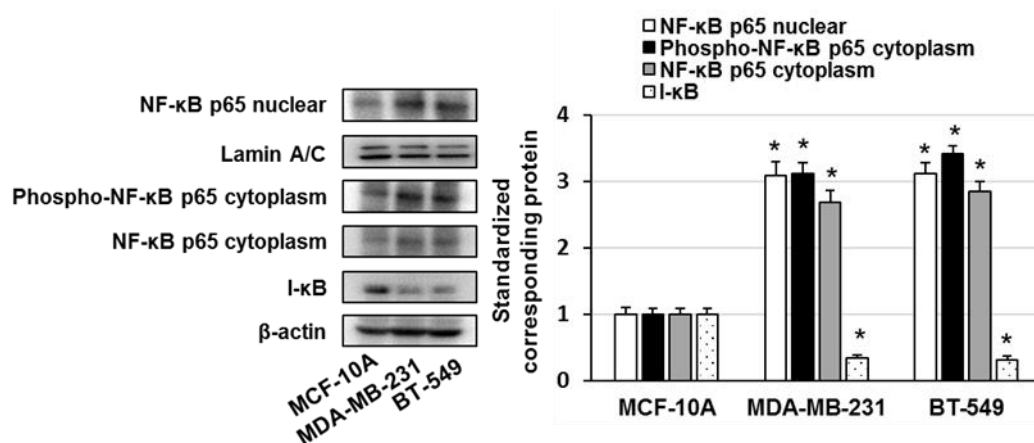


Figure 2. Cell lysates were evaluated by immunoblotting using the showed antibodies. The content of nuclear NF- κ B p65, cytoplasmic phospho-NF- κ B p65, cytoplasmic NF- κ B p65, and I- κ B was quantified, standardized to the content of Lamin A/C or β -actin. The results are representative of three independent experiments. *P < 0.01 vs. untreated cells.

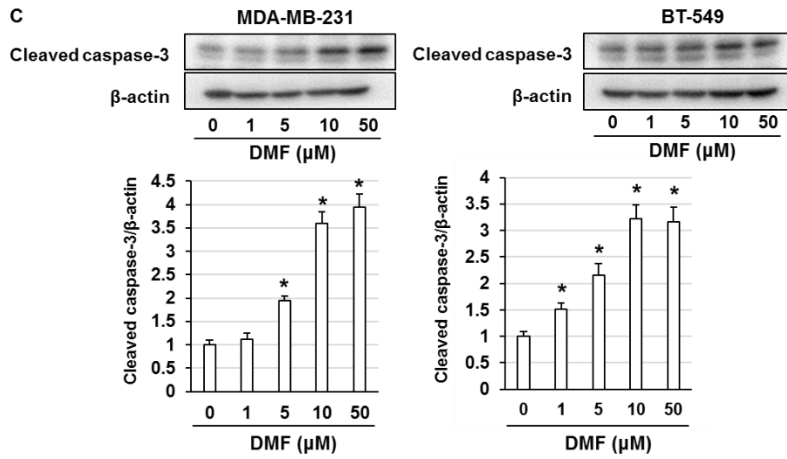
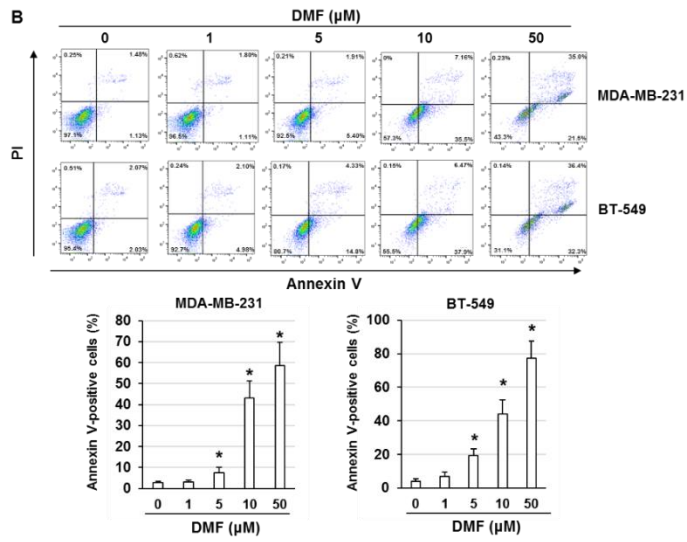
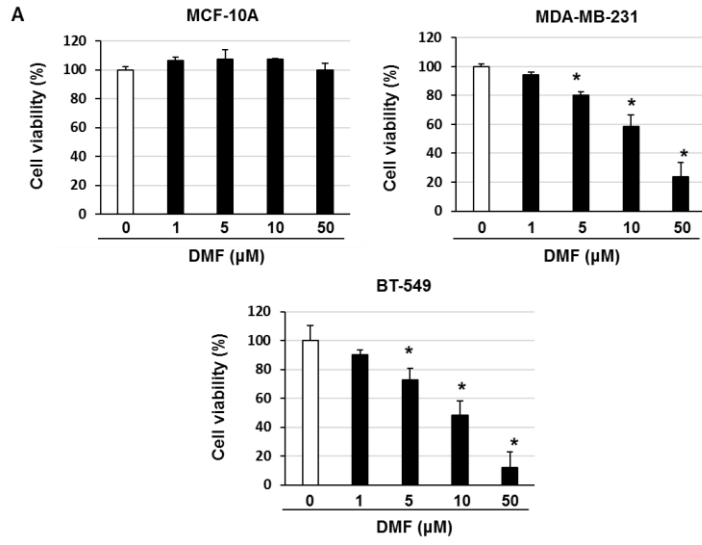


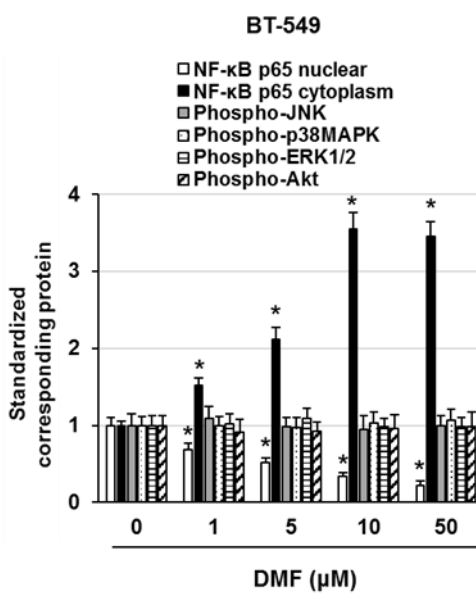
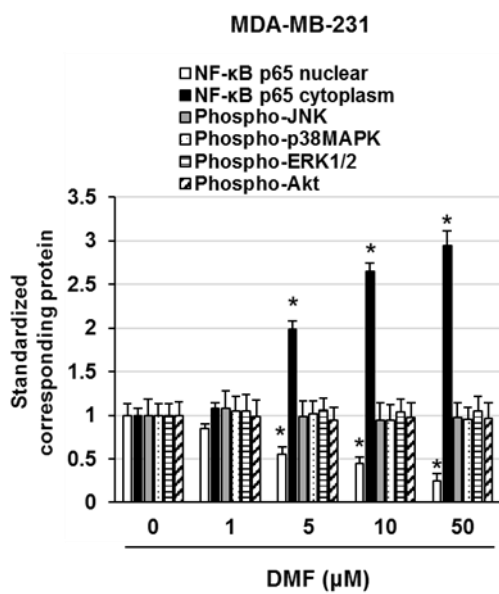
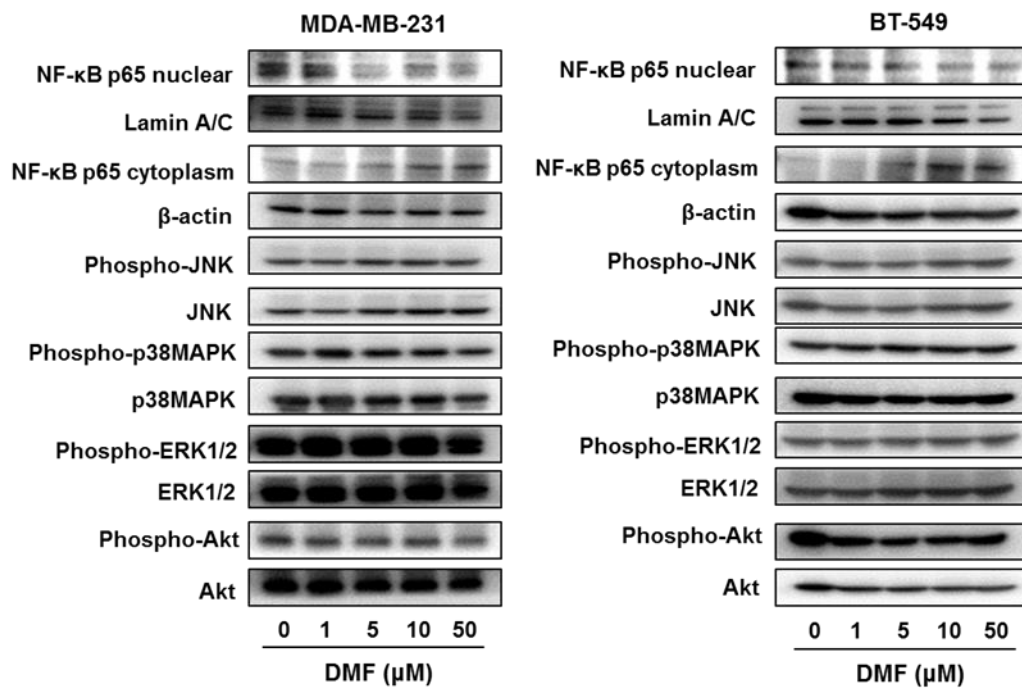
Figure 3. DMF induced apoptosis in MDA-MB-231 and BT-549 cells. (A) Viability of DMF-treated MCF-10A, MDA-MB-231, and BT-549 cells, as determined by the trypan blue staining assay. Cells were administrated with the showed concentrations of DMF for 3 days. The results are representative of five independent experiments. * $P < 0.01$ vs. untreated cells. (B) MDA-MB-231 and BT-549 cells were administrated to the showed concentrations of DMF for 72 h and then stained using an Annexin V apoptosis assay kit. The results are representative of four independent experiments. * $P < 0.01$ vs. untreated cells. (C) Cell lysates were evaluated by immunoblotting using the showed antibodies. The content of cleaved caspase-3 was quantified, standardized to the content of β -actin. The results are representative of three independent experiments. * $P < 0.01$ vs. untreated cells.

3. DMF による MDA-MB-231 細胞および BT-549 細胞での NF- κ B p65 核移行阻害、XIAP、Survivin、Bcl-xL および Bcl-2 発現抑制効果

我々は以前、DMF が腫瘍細胞における NF- κ B p65 核移行を阻害することを明らかにしている [14,17]。そこで DMF が MDA-MB-231 細胞および BT-549 細胞における NF- κ B の核移行、JNK、p38MAPK、ERK1/2 および Akt などの他の生存シグナルの活性化を阻害するか否か検討した。その結果、DMF は MDA-MB-231 細胞および BT-549 細胞において、NF- κ B p65 核移行を阻害することが認められたが、JNK、p38MAPK、ERK1/2 および Akt の活性化には影響を与えなかった (Figure 4A)。

NF- κ B は、Bcl-2 ファミリータンパクや IAP ファミリータンパクなどのアポトーシス調節因子の発現を制御することが知られている [20]。そこで DMF がアポトーシス調節因子の発現に影響を与えるか否かについて検討を行った。その結果、DMF は MDA-MB-231 細胞および BT-549 細胞での Bim および Bax 発現に影響を与えなかったが、Survivin、XIAP、Bcl-xL および Bcl-2 の発現を低下させることを確認した (Figure 4B)。これらの結果から、DMF は NF- κ B p65 核移行阻害、Survivin、XIAP、Bcl-xL および Bcl-2 発現抑制を介してアポトーシスを誘導することが示唆された。

A



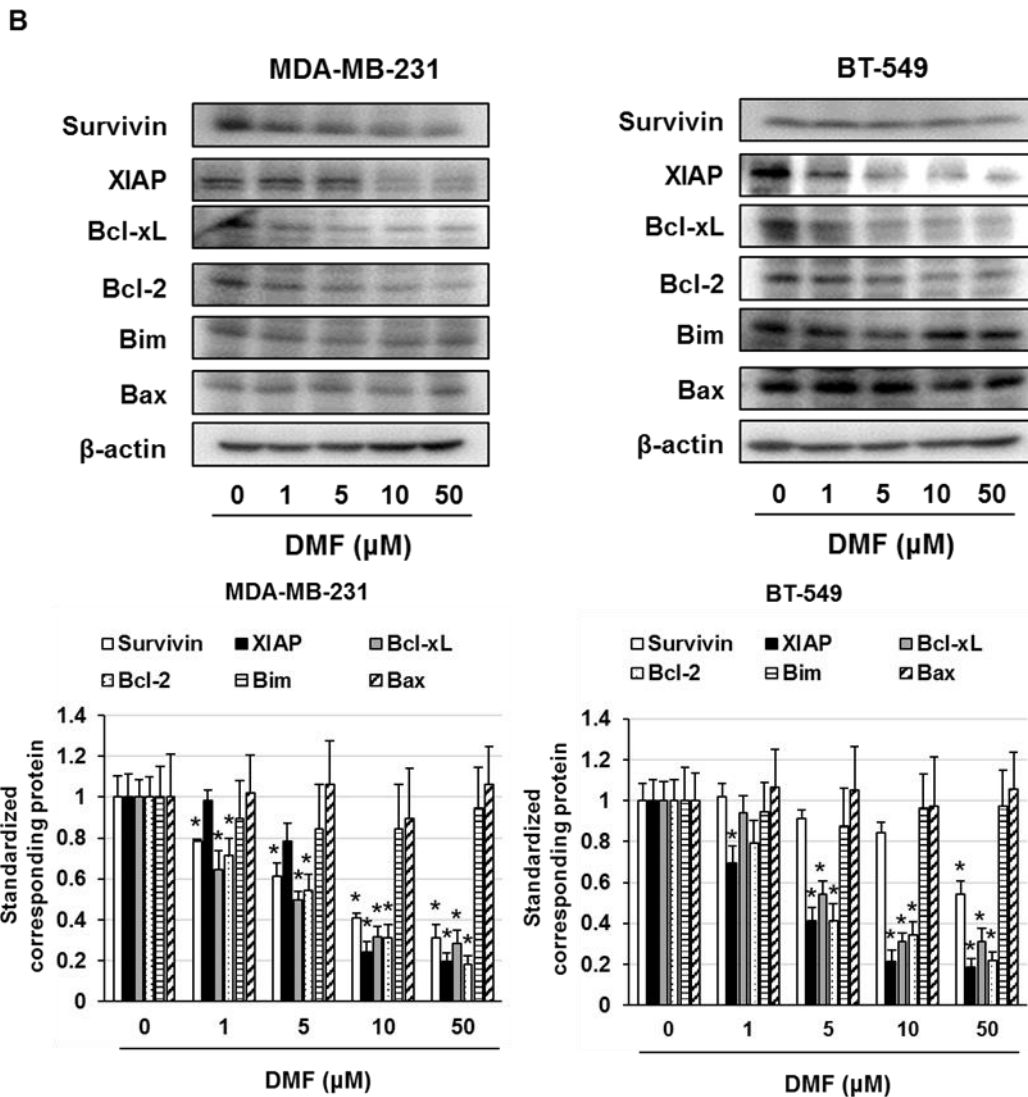


Figure 4. DMF suppressed NF- κ B nuclear translocation and Survivin, XIAP, Bcl-xL, and Bcl-2 expression in MDA-MB-231 and BT-549 cells. (A) Cell lysates were evaluated by immunoblotting using the showed antibodies. The content of nuclear NF- κ B p65, cytoplasmic NF- κ B p65, phospho-JNK, phospho-p38MAPK, phospho-ERK1/2, phospho-Akt, and was quantified, standardized to the content of Lamin A/C, β -actin, JNK, p38MAPK, ERK1/2, or AKT. The results are exemplary of three independent experiments. * $P < 0.01$ vs. untreated cells. (B) Cell lysates were evaluated by immunoblotting using the showed antibodies. The content of Survivin, XIAP, Bcl-xL, Bcl-2, Bim, and Bax was quantified, standardized to the content of β -actin. The results are exemplary of three independent experiments. * $P < 0.01$ vs. untreated cells.

4. DMF による MDA-MB-231 細胞および BT-549 細胞でのパクリタキセルおよびアドリアマイシン殺細胞作用増強効果

パクリタキセルとアドリアマイシンは TNBC 患者の治療に使用されている 抗

がん剤である [9]。DMF によりこれら抗がん剤の効果が増強されれば、臨床において併用薬として有用である可能性が考えられる。そこで、DMF が MDA-MB-231 細胞および BT-549 細胞でのパクリタキセルおよびアドリアマイシンの殺細胞作用を増強するか検討した。その結果、DMF とパクリタキセルまたはアドリアマイシンの併用投与は、DMF、パクリタキセルまたはアドリアマイシン単独投与と比較して顕著に細胞死を誘導した (Figure 5A,B)。MCF-10A 細胞では、パクリタキセルおよびアドリアマイシンは細胞死を誘導したが、DMF はこれら細胞死誘導作用に影響を及ぼさなかった (Figure 5C)。さらに、MDA-MB-231 細胞において DMF とパクリタキセルまたはアドリアマイシンの併用投与は、アネキシン V 陽性細胞数が著しく増加させ (Figure 6A)、NF- κ B 核移行阻害、Survivin、XIAP、Bcl-xL および Bcl-2 発現低下ならびに cleaved caspase-3 発現増加を誘導することを明らかにした (Figure 6B)。

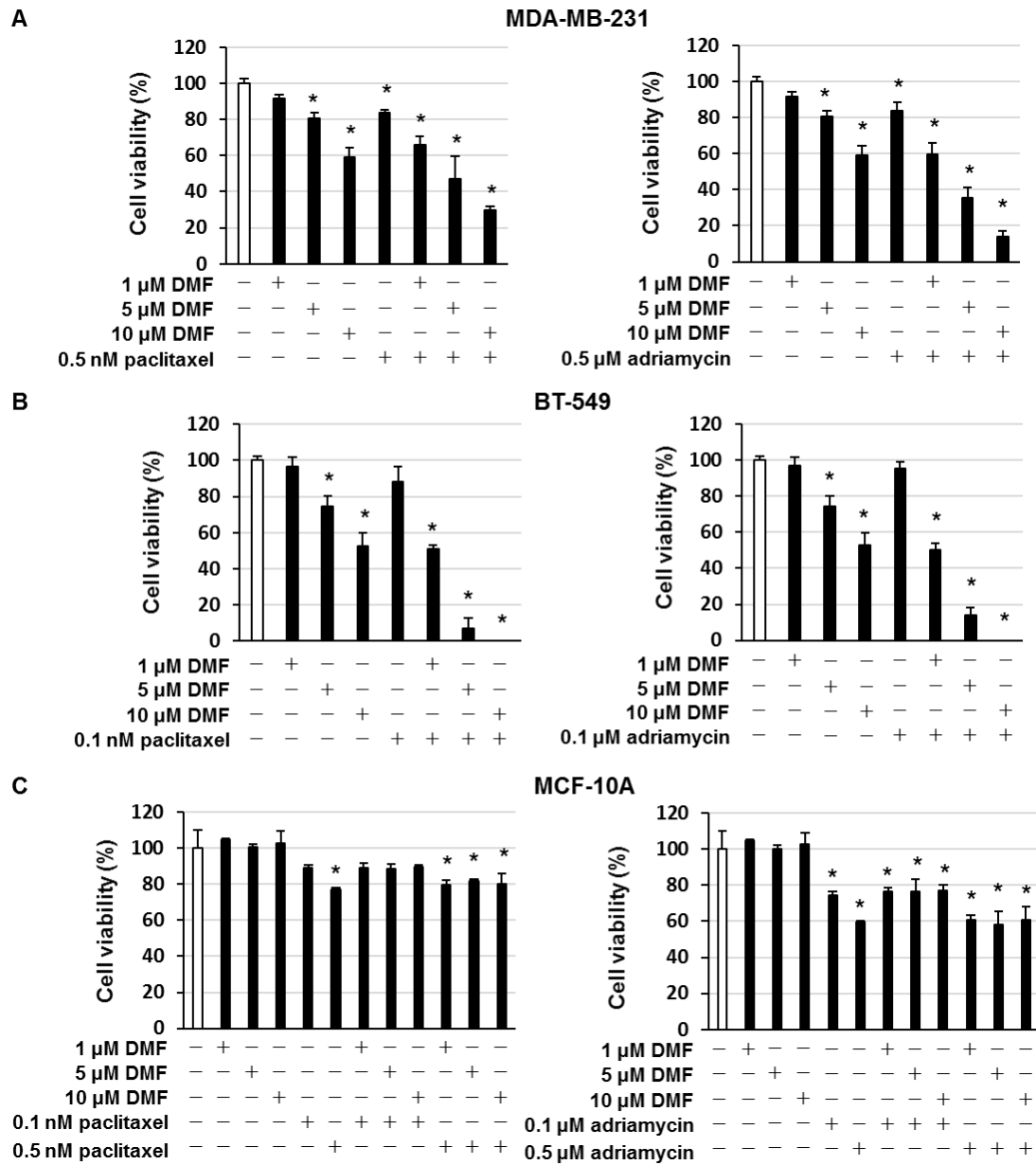


Figure 5. DMF enhanced the cytotoxic effect of paclitaxel and adriamycin in TNBC cells. (A) MDA-MB-231, (B) BT-549, and (C) MCF-10A cells were administrated to the showed concentrations of DMF and paclitaxel or adriamycin. After incubation for 72 h, the number of dead cells was quantified using the trypan blue staining assay. The results are exemplary of five independent experiments. *P < 0.01 vs. untreated cells.

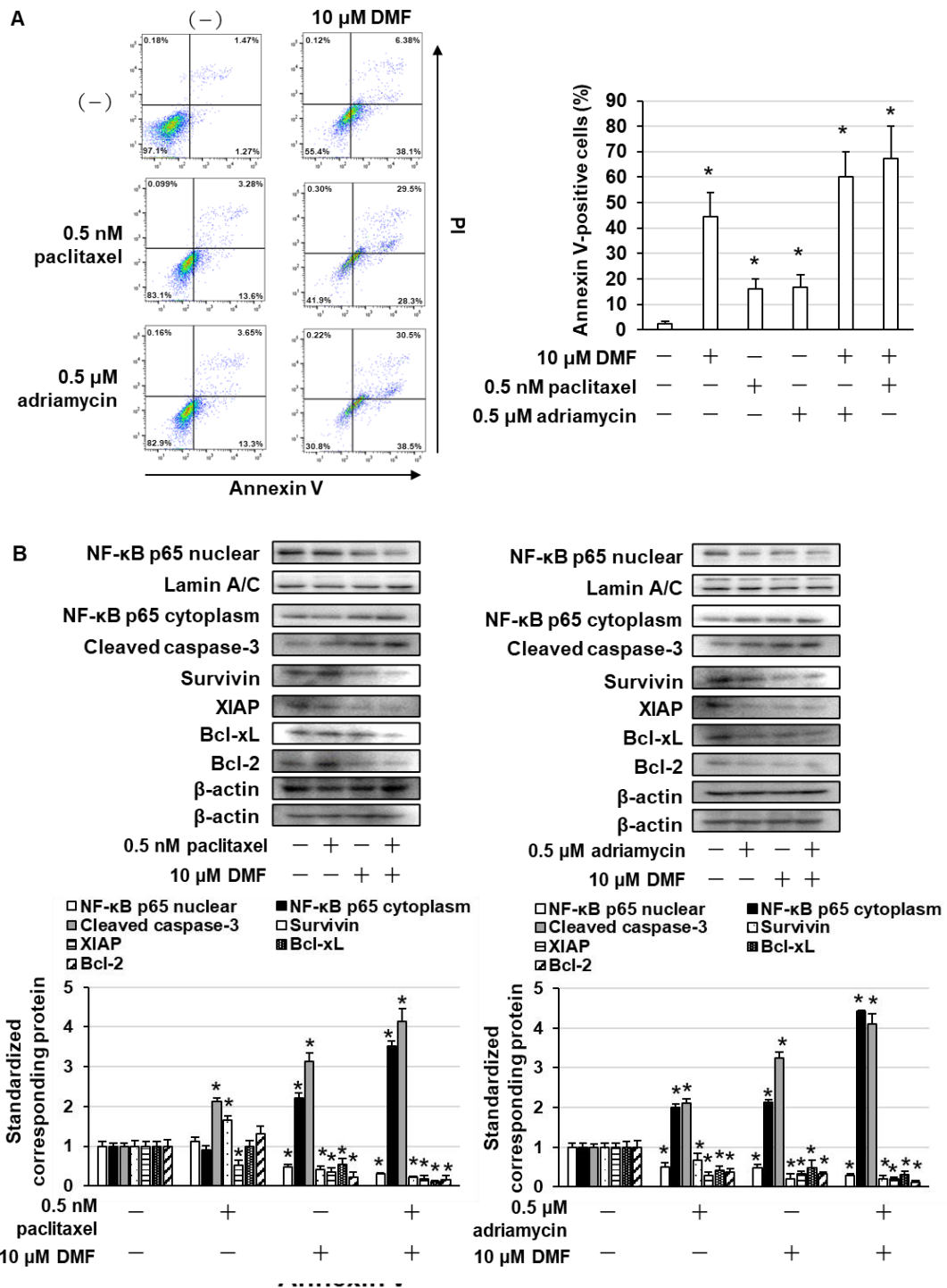


Figure 6. DMF enhanced the apoptosis-inducing effect of paclitaxel and adriamycin in MDA-MB-231 cells. (A) MDA-MB-231 cells were administrated to the showed concentrations of DMF, paclitaxel, or adriamycin for 72 h and then stained using an Annexin V apoptosis assay kit. The results are exemplary of four independent experiments. * $P < 0.01$ vs. untreated cells. (B) DMF-, paclitaxel-, or adriamycin-treated cell lysates were evaluated by immunoblotting using the showed antibodies. The content of nuclear NF- κ B p65, cytoplasmic NF- κ B p65, cleaved caspase-3, Survivin, XIAP, Bcl-xL, and Bcl-2, was quantified, standardized to the content of Lamin A/C or β -actin. The results are exemplary of three independent experiments. * $P < 0.01$ vs. untreated cells.

IV. 考察

本研究により、リン酸化 NF- κ B p65 の過剰発現および *NFKB1A* の低発現は、TNBC 患者における予後不良と相関することが認められた。また、NF- κ B p65 発現は MCF-10A 細胞と比較し、MDA-MB-231 細胞および BT-549 細胞で高く、I- κ B 発現は TNBC 細胞株で低いことを確認した。*RELA* (NF- κ B p65 をコードする遺伝子)の発現は、TNBC 患者において、他の乳がんサブタイプ (Luminal A、Luminal B および HER2 陽性)および正常な乳房組織よりも高いことが報告されている [4]。さらに *NFKB1A* (I- κ B をコードする遺伝子)欠失は、TNBC 患者における生存率、無再発生存期間および遠隔転移生存期間と関連していることも示されている [21]。我々の知見は、TNBC における NF- κ B p65 の過剰発現、活性化および *NFKB1A* (I- κ B)の低発現が予後不良と相関していることを示した。したがって、NF- κ B p65 は TNBC における治療標的分子になると考えられる。

MCF-10A 細胞に対して細胞死を誘導しない濃度において、DMF が MDA-MB-231 細胞および BT-549 細胞における cleaved caspase-3 発現およびアネキシン V 陽性細胞数を増加させ、アポトーシスを誘導することを認めた。さらに、DMF は NF- κ B p65 核移行を阻害したが、JNK、p38MAPK、ERK1/2 および AKT の活性化には影響を与えないことが認められた。DMF は、NF- κ B 活性化の阻害を介して様々な悪性腫瘍細胞においてアポトーシスを誘導することが示されている [14-17]。また以前に、DMF は、NF- κ B が恒常的に活性化している悪性腫瘍に対して有効であることが示されている [14-17]。したがって、DMF は NF- κ B 過剰発現を示す TNBC に対して有効であると考えられる。

NF- κ B は、IAP ファミリータンパクや Bcl-2 ファミリータンパクなどの様々なアポトーシス調節因子の転写や発現を制御することが報告されている [20]。

本研究において、DMF は Survivin、XIAP、Bcl-xL および Bcl-2 の発現を抑制することを確認した。三酸化ヒ素は急性前骨髄球性白血病細胞株 NB-4 において、NF- κ B 阻害を介した Survivin、XIAP、cIAP2 および Bcl-xL 発現抑制によりアポトーシスを誘導することが示されている [22]。さらに、トリコテシンは恒常的 NF- κ B 活性化ヒトがん細胞において NF- κ B 活性阻害を介して XIAP、Bcl-xL、Bcl-2 および cyclin D1 の発現低下によりアポトーシスを誘導することが報告されている [23]。また、*Rumex dentatus* のメタノールおよびクロロホルム抽出物は、NF- κ B 活性化の阻害を介して Survivin、XIAP、Bcl-xL、Bcl-2 および cyclin D1 の発現低下を誘導し、MDA-MB-231 細胞にアポトーシスを誘導することも示されている [24]。これらのことから、DMF が TNBC 細胞において Survivin、XIAP、Bcl-xL および Bcl-2 発現低下によりアポトーシスを誘導することを示唆している。

本研究において、DMF が MDA-MB-231 細胞において NF- κ B 活性抑制および Survivin、XIAP、Bcl-xL および Bcl-2 発現低下を介して、パクリタキセルおよびアドリアマイシンのアポトーシス誘導を増強することを確認した。また、DMF は MCF-10A 細胞に対するパクリタキセルおよびアドリアマイシンの細胞死誘導に影響を及ぼさないことも認められた。DMF は複数のシグナル伝達経路を抑制することによって、BRAF 阻害剤であるベムラフェニブの悪性黒色腫に対する有効性を増強することが示されている [25]。膠芽腫患者におけるテモゾロミドおよび放射線療法と組み合わせた DMF の第 I 相臨床試験では、1 日 3 回 240 mg の投与が患者において安全で忍容性が高いことが報告され、12 人の患者のうち 4 人で部分的な応答が観察されたことも認められている [26]。さらに、皮膚 T 細胞リンパ腫患者における DMF 療法の第 II 相臨床試験では、有効性および高い忍容性が確認されている [27]。これらの結果は、DMF が単独療法およ

び併用療法として使用した場合における臨床的有効性および安全性を示唆しており、TNBC におけるパクリタキセルおよびアドリアマイシンなどの抗がん剤の併用薬として有用であることを示している。

DMF は、ヒト乳がん細胞において恒常的あるいは tumor necrosis factor α 誘導 NF- κ B 活性化を抑制し、細胞死を誘導することが報告されている [28]。また、DMF は in vivo での MDA-MB-231 細胞における腫瘍増殖を抑制することも示されている [28]。本研究では、DMF が NF- κ B 活性化阻害を介して Survivin、XIAP、Bcl-xL および Bcl-2 発現低下によりアポトーシスを誘導し、ヒト乳がん細胞におけるアドリアマイシンおよびパクリタキセルの殺細胞作用を増強することを明確に示した。さらに、リン酸化 NF- κ B p65 の発現増加および *NFKB1A*(I- κ B)発現低下は、TNBC 患者における予後不良と相関することを認めた。これらの結果から、リン酸化 NF- κ B p65 および *NFKB1A*(I- κ B)発現は、TNBC における DMF 療法のためのバイオマーカーとなることが考えられる。しかし、DMF によるアドリアマイシンまたはパクリタキセル抗腫瘍作用増強効果を in vivo で確認できていないため、in vivo での効果については今後の検討で明らかにする必要がある。

結論として、NF- κ B の活性化は、TNBC 患者の予後不良と関連していた。さらに、DMF は、NF- κ B の活性化および Survivin、XIAP、Bcl-xL、Bcl-2 の発現を阻害することにより、アポトーシスを誘導した。また DMF は、NF- κ B が恒常的に活性化している TNBC において、パクリタキセルとアドリアマイシンのアポトーシス誘導効果を増強した。これらの結果は、DMF が TNBC に対する治療薬として、また従来の抗がん剤に対する併用薬として有効である可能性を示唆している。

第2章

FEC療法における制吐目的としてのオランザピン投与日数 に関する探索的調査

I. 緒言

CINV に対する制吐薬の使用においては、本邦および海外から各ガイドラインが公表されている [29-32]。当院においても制吐薬適正使用ガイドラインを参考に、周術期乳がんにおける FEC療法に対して高度催吐性リスクの化学療法に対する予防的な制吐療法を行っているが、悪心によりやむを得ず治療が延期、減量される場合がある。しかし、周術期治療においては、予後や再発率の観点から RDI を高く維持することが重要とされているため、有害事象による治療の延期や減量は避けたい。2017年12月、OLZ がシスプラチンなどの抗悪性腫瘍薬による CINV に対して保険適応された。標準的な予防対策を行ってもコントロール不良な悪心・嘔吐を経験した患者に対し、OLZ を併用する機会が増えており、その有用性について国内外から報告されている [33-38]。しかし、日本人における乳がん周術期化学療法での OLZ 併用療法による有効性や安全性の報告は少ない。現在当院では、標準的な制吐療法を行ったにも関わらず Grade 2 以上の悪心を示した FEC療法中の乳がん患者に対し、次コース開始日より OLZ が併用されるケースがあり 4日間 (5mg : day 1-4 眠前)投与されている症例がある。そこで今回、当院における乳がん周術期の FEC療法中の4日間の OLZ 併用の妥当性について探索的調査を行った。

II. 方法

1. 調査方法

2018年1月から2019年12月までに当院にて周術期乳がんFEC療法(5-FU: 500 mg/m²/q3w、エピルビシン: 100 mg/m²/q3w、シクロホスファミド: 500 mg/m²/q3w)を4コース施行した患者で、1コース目に標準的な制吐療法(パロノセトロン: 0.75 mg/day 1、アプレピタント: 125 mg/day 1、80 mg/day 2-3、デキサメタゾン: 9.9 mg/day 1 i.v.、8 mg/day 2-4 p.o.)及び治療開始時より悪心・嘔吐増悪時用にグラニセトロン内服ゼリー2 mg 3回分が処方されていたにも関わらずGrade 2以上の悪心を示し、2コース目より悪心・嘔吐予防目的としてOLZを4日間(1日1回5 mg 眠前 day 1-4)併用した7例の患者を対象に、電子カルテを用いて後方視的に調査を行った。

2. 調査項目

調査項目として、患者背景(性別、年齢、術前術後、病期、ホルモン受容体発現の有無、HER2タンパク発現の有無、Performance Status、併用制吐剤の剤数)、OLZ併用の有効性(OLZ併用前後での悪心Grade、OLZ併用開始後のRDI)および安全性(OLZに関連性が高い有害事象: 体重増加、高血糖、傾眠、不眠)について調査した。症状の程度についてはカルテ記載を参考にCTCAE ver 4.0を用いて評価を行った。

3. 統計解析

OLZ併用開始前後における悪心Grade、体重、血糖値の比較は、Wilcoxon符合付き順位検定を用いてP<0.05を有意な差ありと判定した。

4. 倫理的配慮

本研究は、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針を遵守し、堺市立総合医療センター臨床研究倫理委員会の承認 (承認番号：157)を受けて実施した。

Ⅲ. 結果

対象症例は7例で、患者背景は表に示す通りであった(表1)。併用制吐剤としてグラニセトロン内服ゼリーを含む標準的な制吐療法およびOLZを除いては、メトクロプラミド、ロラゼパム、プロクロルペラジン、ジフェンヒドラミンサリチル酸塩ジプロフィリンが医師判断で併用されていた。

表1

項目	n=7
性別	
男性	0
女性	7
年齢(歳)	
中央値	46
年齢幅	42-71
Performance Status	
0	7
1	0
病期	
Stage I	1
Stage II	4
Stage III	2
ホルモン受容体	
陽性	5
陰性	2
HER2タンパク質過剰発現	
陽性	4
陰性	3
治療開始区分	
入院	0
外来	7
併用制吐剤 (種類)	
0	1
1	2
2	2
3	1
4	1
抗がん剤の1回投与量(AVE±SD)(mg)	
5-FU	770±57.2
エピルピシン	150±11.5
シクロホスファミド	770±57.2

悪心 Grade は OLZ 併用前が Grade 2 : 3 例、Grade 3 : 4 例であったが、併用後は Grade 1 : 1 例、Grade 0 : 6 例で全例において悪心 Grade の低下がみられ、有意に改善していた ($P < 0.05$) (図 1)。RDI は OLZ 併用開始以降で平均 $93.6 \pm 9.4\%$ であった。抗がん剤治療の減量および中止はなく、全例既定の投与量で治療完遂していた。延期は 3 例でみられ、好中球減少が 1 例 (1 週間の延期)、倦怠感が 1 例 (1 週間の延期)、患者希望によるスケジュール変更が 1 例 (3 週間の延期) であった。OLZ に関連すると考えられる有害事象として傾眠 1 例 (Grade 1)、不眠 1 例 (Grade 1) がみられた。傾眠については治療への影響はないと医師より判断され、薬剤の追加や変更なく治療を完遂していた。また、不眠については併診した心療内科より処方されたプロクロルペラジンによるアカシジアが疑われ、該当薬中止後すぐに不眠は軽快した。血糖値、体重においては治療開始前 (血糖値 107.0 ± 18.2 mg/dL、体重 60.2 ± 10.0 kg) と、治療完遂後 (血糖値 109.3 ± 13.9 mg/dL ; $P = 0.735$ 、体重 58.8 ± 10.5 kg ; $P = 0.272$) で有意な差はみられなかった。

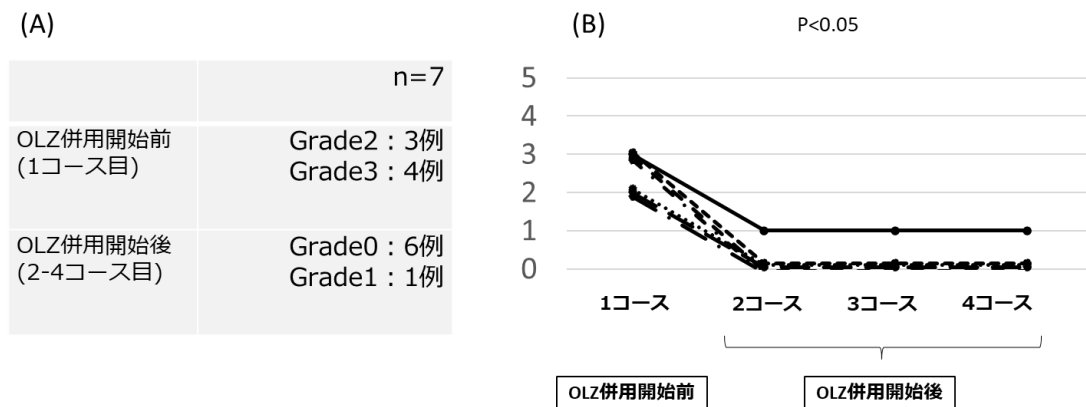


図 1 悪心の発現状況と推移

(A) 悪心の発現状況 (B) 悪心の Grade 推移. Wilcoxon 符合付き順位検定

悪心 Grade は次コース開始日及び開始日までのカルテ記載を参考に、有害事象共通用語基準 (CTCAE v4.0-JCOG) を用いて評価した。

IV. 考察

術前後の周術期治療においては、RDI を高く維持することが予後において重要である。そのため、悪心などの有害事象による RDI の低下は可能な限り対策し、避けなければならない。今回の調査では、周術期 FEC 療法において悪心のコントロールが不良であった患者における OLZ (5 mg : day 1-4 眠前)併用の有効性および安全性が示唆された。1 コース目に高度な悪心が発現した患者では RDI が低下することが予測されたが、OLZ 併用後も高い RDI を維持して FEC 療法を完遂していた。さらに OLZ 併用開始後、FEC 療法完遂まで悪心 Grade 増強や治療延期などもなく経過した。これは OLZ が治療完遂まで投与コース毎に CIN V の発現が予測される期間中効果を示していたと考えられる。今回は計測していないが、悪心が再燃することなく治療継続ができたことにより、患者の QOL 向上にも寄与していた可能性が考えられた。

OLZ 開始日の妥当性については、day 0 (抗がん剤治療開始前日)から併用を開始されている報告 [38]もあるが、抗がん剤治療が当日のバイタル変化などにより延期になる可能性も考えられるため、day 1 からの OLZ 併用開始は患者にとって不要に内服するなどの不利益が少ない投与方法であると考えられる。また、FEC 療法に対して OLZ の 4 日間併用処方が多かった理由としては橋本らの報告 [33]などを参考に 4 日間が選ばれているケースが多かったと考えられる。添付文書や各文献で様々な投与方法が挙げられているが、今回の調査で 4 日間投与は FEC 療法中においても有効かつ安全な投与方法であることが示唆された。ただし、今回の調査では、OLZ 併用により抗がん剤治療に影響する副作用はみられなかったが、臓器機能や代謝機能が低下していることが懸念される高齢者においては、副作用発現率や重篤度が上昇する可能性があり注意が必要であることが予測される。今後は高齢者乳がん患者を対象とした調査や前向き試験の計画

なども行っていく予定である。

総括

本研究では、TNBCにおけるDMFによるアポトーシス効果とアドリアマイシンおよびパクリタキセル併用による殺細胞作用増強効果と乳がん周術期FEC療法におけるOLZ 4日間投与の安全性および有効性について検討を行った。

1. NF- κ B阻害剤であるDMFはTNBC細胞においてアポトーシスを誘導し、パクリタキセルおよびアドリアマイシンのアポトーシス誘導効果を高めることを見出した。NF- κ B p65の活性化は、TNBC患者における予後不良と相関していた。またDMFは、MDA-MB-231およびBT-549細胞において、正常乳腺細胞株MCF-10Aに対して細胞死を誘導しない濃度でアポトーシスを誘導した。さらにDMFは、MDA-MB-231およびBT-549細胞におけるNF- κ B核移行抑制、Survivin、XIAP、Bcl-xLおよびBcl-2発現を阻害した。DMFはMDA-MB-231細胞におけるパクリタキセルおよびアドリアマイシンのアポトーシス誘導効果を増強した。以上より、DMFはNF- κ Bが恒常的に活性化しているTNBCの有用な治療薬として可能性があることを示唆した。またDMFは、従来の抗がん剤に対する併用薬としても有用であることが示唆された。
2. 乳がん術後補助療法としてFEC療法施行後に生じるGrade 2以上のCINVに対して、オランザピン(OLZ)の4日間併用が安全かつ有効に使用できることが示唆された。アンスラサイクリンを含む高度催吐リスクの抗がん剤治療による難治性のCINVに対しても使用可能であり、乳がん周術期治療の治療強度を維持し、再発予防に寄与する可能性が示唆された。

最後に、本研究結果が乳がん治療の臨床応用につながり、今後乳がん治療の成績の向上に貢献できることを期待する。

引用文献

1. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*. 2019 Jan 22;321(3):288-300.
2. Ferrari P, Scatena C, Ghilli M, Bargagna I, Lorenzini G, Nicolini A. Molecular Mechanisms, Biomarkers and Emerging Therapies for Chemotherapy Resistant TNBC. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 31;23(3):1665.
3. Mireștean CC, Volovăț C, Iancu RI, Iancu DPT. Radiomics in Triple Negative Breast Cancer: New Horizons in an Aggressive Subtype of the Disease. *J Clin Med*. 2022 Jan 26;11(3):616.
4. Kanzaki H, Chatterjee A, Hossein Nejad Ariani H, Zhang X, Chung S, Deng N, Ramanujan VK, Cui X, Greene MI, Murali R. Disabling the Nuclear Translocation of RelA/NF- κ B by a Small Molecule Inhibits Triple-Negative Breast Cancer Growth. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2021 Jul 5;13:419-430.
5. Ehmsen S, Ditzel HJ. Signaling pathways essential for triple-negative breast cancer stem-like cells. *Stem Cells*. 2021 Feb;39(2):133-143.
6. Kim JY, Jung HH, Ahn S, Bae S, Lee SK, Kim SW, Lee JE, Nam SJ, Ahn JS, Im YH, Park YH. The relationship between nuclear factor (NF)- κ B family gene expression and prognosis in triple-negative breast cancer (TNBC) patients receiving adjuvant doxorubicin treatment. *Sci Rep*. 2016 Aug 22;6:31804.
7. Zhang T, Ma C, Zhang Z, Zhang H, Hu H. NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *MedComm (2020)*. 2021 Dec 16;2(4):618-653.
8. Burstein HJ, Curigliano G, Loibl S, Dubsy P, Gnant M, Poortmans P, Colleoni M, Denkert C, Piccart-Gebhart M, Regan M, Senn HJ, Winer EP, Thurlimann B; Members of the St. Gallen International Consensus Panel on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2019. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. *Ann Oncol*. 2019 Oct 1;30(10):1541-1557.
9. Mittendorf EA, Zhang H, Barrios CH, Saji S, Jung KH, Hegg R, Koehler A, Sohn J, Iwata H, Telli ML, Ferrario C, Punie K, Penault-Llorca F, Patel S, Duc AN, Liste-Hermoso M, Maiya V, Molinero L, Chui SY, Harbeck N. Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with early-stage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet*. 2020 Oct 10;396(10257):1090-1100.
10. Bloechl-Daum B, Deuson RR, Mavros P, Hansen M, Herrstedt J. Delayed nausea and

- vomiting continue to reduce patients' quality of life after highly and moderately emetogenic chemotherapy despite antiemetic treatment. *J Clin Oncol*. 2006 Sep 20;24(27):4472-4478.
11. Fujisawa F, Tamaki Y, Inoue T, Nakayama T, Yagi T, Kittaka N, Yoshinami T, Nishio M, Matsui S, Kusama H, Kamiura S. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in Japanese patients with triple-negative breast cancer: A single institute retrospective study. *Mol Clin Oncol*. 2021 May;14(5):96.
 12. Adams S, Schmid P, Rugo HS, Winer EP, Loirat D, Awada A, Cescon DW, Iwata H, Campone M, Nanda R, Hui R, Curigliano G, Toppmeyer D, O'Shaughnessy J, Loi S, Paluch-Shimon S, Tan AR, Card D, Zhao J, Karantza V, Cortés J. Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol*. 2019 Mar 1;30(3):397-404.
 13. Lategan TW, Wang L, Sprague TN, Rousseau FS. Pharmacokinetics and Bioavailability of Monomethyl Fumarate Following a Single Oral Dose of Bafiertam™ (Monomethyl Fumarate) or Tecfidera® (Dimethyl Fumarate). *CNS Drugs*. 2021 May;35(5):567-574.
 14. Takeda T, Tsubaki M, Asano R, Itoh T, Imano M, Satou T, Nishida S. Dimethyl fumarate suppresses metastasis and growth of melanoma cells by inhibiting the nuclear translocation of NF- κ B. *J Dermatol Sci*. 2020 Sep;99(3):168-176.
 15. Kaluzki I, Hailemariam-Jahn T, Doll M, Kaufmann R, Balermipas P, Zöller N, Kippenberger S, Meissner M. Dimethylfumarate Inhibits Colorectal Carcinoma Cell Proliferation: Evidence for Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Autophagy. *Cells*. 2019 Oct 28;8(11):1329.
 16. Nicolay JP, Müller-Decker K, Schroeder A, Brechmann M, Möbs M, Géraud C, Assaf C, Goerdt S, Krammer PH, Gülow K. Dimethyl fumarate restores apoptosis sensitivity and inhibits tumor growth and metastasis in CTCL by targeting NF- κ B. *Blood*. 2016 Aug 11;128(6):805-815.
 17. Tsubaki M, Ogawa N, Takeda T, Sakamoto K, Shimaoka H, Fujita A, Itoh T, Imano M, Satou T, Nishida S. Dimethyl fumarate induces apoptosis of hematopoietic tumor cells via inhibition of NF- κ B nuclear translocation and down-regulation of Bcl-xL and XIAP. *Biomed Pharmacother*. 2014 Oct;68(8):999-1005.
 18. Györffy B, Lánckzy A, Szállási Z. Implementing an online tool for genome-wide validation of survival-associated biomarkers in ovarian-cancer using microarray data from 1287 patients. *Endocr Relat Cancer*. 2012 Apr 10;19(2):197-208.
 19. Ósz Á, Lánckzy A, Györffy B. Survival analysis in breast cancer using proteomic data from four independent datasets. *Sci Rep*. 2021 Aug 18;11(1):16787.

20. Leibowitz B, Yu J. Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol Ther.* 2010 Mar 15;9(6):417-422.
21. Bredel M, Kim H, Thudi N.K, Scholtens D.M, Bonner J.A, Sikic B.I. NFKBIA deletion in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013 31:15_suppl, 1012.
22. Momeny M, Zakidizaji M, Ghasemi R, Dehpour AR, Rahimi-Balaei M, Abdolazimi Y, Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Ghaffari SH. Arsenic trioxide induces apoptosis in NB-4, an acute promyelocytic leukemia cell line, through up-regulation of p73 via suppression of nuclear factor kappa B-mediated inhibition of p73 transcription and prevention of NF-kappaB-mediated induction of XIAP, cIAP2, BCL-XL and survivin. *Med Oncol.* 2010 Sep;27(3):833-842.
23. Su J, Zhao P, Kong L, Li X, Yan J, Zeng Y, Li Y. Trichothecin induces cell death in NF- κ B constitutively activated human cancer cells via inhibition of IKK β phosphorylation. *PLoS One.* 2013 Aug 1;8(8):e71333.
24. Batool R, Aziz E, Tan BK, Mahmood T. Rumex dentatus Inhibits Cell Proliferation, Arrests Cell Cycle, and Induces Apoptosis in MDA-MB-231 Cells through Suppression of the NF- κ B Pathway. *Front Pharmacol.* 2017 Oct 12;8:731.
25. Li H, Wang Y, Su R, Jia Y, Lai X, Su H, Fan Y, Wang Y, Xing W, Qin J. Dimethyl Fumarate Combined With Vemurafenib Enhances Anti-Melanoma Efficacy via Inhibiting the Hippo/YAP, NRF2-ARE, and AKT/mTOR/ERK Pathways in A375 Melanoma Cells. *Front Oncol.* 2022 Jan 24;12:794216.
26. Shafer D, Tombes MB, Shrader E, Ryan A, Bandyopadhyay D, Dent P, Malkin M. Phase I trial of dimethyl fumarate, temozolomide, and radiation therapy in glioblastoma. *Neurooncol Adv.* 2020 Jan 24;2(1):vdz052.
27. Nicolay JP, Albrecht JD, Assaf C, Dippel E, Stadler R, Wehkamp U, Wobser M, Guelow K, Goerdts S, Krammer PH. Dimethyl fumarate (DMF) therapy in CTCL: results from a clinical phase II study. *Eur J Cancer.* 2021 Oct;156 Suppl 1:S21-S22.
28. Kastrati I, Siklos MI, Calderon-Gierszal EL, El-Shennawy L, Georgieva G, Thayer EN, Thatcher GR, Frasor J. Dimethyl Fumarate Inhibits the Nuclear Factor κ B Pathway in Breast Cancer Cells by Covalent Modification of p65 Protein. *J Biol Chem.* 2016 Feb 12;291(7):3639-3647.
29. Hesketh PJ, Kris MG, Basch E, Bohlke K, Barbour SY, Clark-Snow RA, Danso MA, Dennis K, Dupuis LL, Dusetzina SB, Eng C, Feyer PC, Jordan K, Noonan K, Sparacio D, Somerfield MR, Lyman GH. Antiemetics: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2017 Oct 1;35(28):3240-3261.
30. Berger MJ, Ettinger DS, Aston J, Barbour S, Bergsbaken J, Bierman PJ, Brandt D, Dolan DE, Ellis G, Kim EJ, Kirkegaard S, Kloth DD, Lagman R, Lim D, Loprinzi C,

- Ma CX, Maurer V, Michaud LB, Nabell LM, Noonan K, Roeland E, Rugo HS, Schwartzberg LS, Scullion B, Timoney J, Todaro B, Urba SG, Shead DA, Hughes M. NCCN Guidelines Insights: Antiemesis, Version 2.2017. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017 Jul;15(7):883-893.
31. Roila F, Molassiotis A, Herrstedt J, Aapro M, Gralla RJ, Bruera E, Clark-Snow RA, Dupuis LL, Einhorn LH, Feyer P, Hesketh PJ, Jordan K, Olver I, Rapoport BL, Roscoe J, Ruhlmann CH, Walsh D, Warr D, van der Wetering M; participants of the MASCC/ESMO Consensus Conference Copenhagen 2015. 2016 MASCC and ESMO guideline update for the prevention of chemotherapy- and radiotherapy-induced nausea and vomiting and of nausea and vomiting in advanced cancer patients. *Ann Oncol*. 2016 Sep;27(suppl 5):v119-v133.
 32. 日本がん治療学会（編）. 制吐薬適正使用ガイドライン 2015年10月【第2版】. 金原出版 2015.
 33. Hashimoto H, Abe M, Yanai T, Yamaguchi T, Zenda S, Uchitomi Y, Fukuda H, Mori M, Iwasa S, Yamamoto N, Ohe Y. Study protocol for J-SUPPORT 1604 (J-FORCE): a randomized, double blind, placebo-controlled Phase III study evaluating olanzapine (5 mg) plus standard triple antiemetic therapy for prevention of chemotherapy induced nausea and vomiting in patients receiving cisplatin-based highly emetogenic chemotherapy. *Jpn J Clin Oncol*. 2018 Oct 1;48(10):950-952.
 34. Navari RM, Qin R, Ruddy KJ, Liu H, Powell SF, Bajaj M, Dietrich L, Biggs D, Lafky JM, Loprinzi CL. Olanzapine for the Prevention of Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting. *N Engl J Med*. 2016 Jul 14;375(2):134-142.
 35. Flank J, Schechter T, Gibson P, Johnston DL, Orsey AD, Portwine C, Sung L, Dupuis LL. Olanzapine for prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting in children and adolescents: a multi-center, feasibility study. *Support Care Cancer*. 2018 Feb;26(2):549-555.
 36. Yanai T, Iwasa S, Hashimoto H, Ohyanagi F, Takiguchi T, Takeda K, Nakao M, Sakai H, Nakayama T, Minato K, Arai T, Suzuki K, Shimada Y, Nagashima K, Terakado H, Yamamoto N. A double-blind randomized phase II dose-finding study of olanzapine 10 mg or 5 mg for the prophylaxis of emesis induced by highly emetogenic cisplatin-based chemotherapy. *Int J Clin Oncol*. 2018 Apr;23(2):382-388.
 37. Yang T, Liu Q, Lu M, Ma L, Zhou Y, Cui Y. Efficacy of olanzapine for the prophylaxis of chemotherapy-induced nausea and vomiting: a meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol*. 2017 Jul;83(7):1369-1379.
 38. Mizukami N, Yamauchi M, Koike K, Watanabe A, Ichihara K, Masumori N, Yamakage M. Olanzapine for the prevention of chemotherapy-induced nausea and

vomiting in patients receiving highly or moderately emetogenic chemotherapy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Pain Symptom Manage.* 2014 Mar;47(3):542-550.

謝辞

本研究の実施において、終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました近畿大学薬学部 西田 升三 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文をまとめるにあたり、主査として審査をお引き受け頂きました近畿大学薬学部 臨床薬学部門医療薬学分野 小竹 武 教授、副主査として審査をお引き受け頂きました近畿大学薬学部 臨床薬学部門 社会薬学分野 大鳥 徹 教授に厚く御礼申し上げます。

また、本研究に多大な御援助を賜りました近畿大学薬学部 薬物治療学研究室の椿 正寛 准教授、武田 朋也 助教ならびに所属学生の皆様に心から感謝致します。

さらに、今回の病院実習や臨床研究に際し、終始お世話になりました石坂 敏彦 副院長をはじめとする堺市立総合医療センター薬剤科の諸先生方に感謝致します。さらに実習および演習に際し、御指導を賜りました西田 升三 教授をはじめとする近畿大学薬学部がんプロ委員会の諸先生方に感謝致します。

そして、多大なる援助および温かい声援をいただきました家族に心から感謝の意を表します。