

# 博士学位論文

がん化学療法における  
Quality Of Life の向上に関する  
基礎及び臨床学的研究

近畿大学大学院

薬学研究科薬学専攻

藤本 伸一郎

# 博士学位論文

がん化学療法における  
Quality Of Life の向上に関する  
基礎及び臨床学的研究

平成 31 年 1 月 9 日

近畿大学大学院  
薬学研究科薬学専攻

藤本 伸一郎

## 目次

序論.....	1
<b>第1章 レバミピドによる Akt/mTOR 経路活性化と Bcl-2 ファミリータンパク質の発現調整を介した 5-FU 誘導細胞死抑制効果.....</b>	<b>4</b>
I. 緒言.....	4
II. 実験材料および方法.....	5
1. 試薬.....	5
2. 細胞株.....	5
3. Trypan blue exclusion assay.....	6
4. Western blotting.....	6
5. 統計解析.....	7
III. 結果.....	7
1. レバミピドによる NHOK 細胞での 5-FU 誘導細胞死抑制効果...7	
2. レバミピド添加による NHOK 細胞でのシグナル伝達因子活性動態及び細胞生存関連因子発現動態の検討.....	9
3. 5-FU 単剤及びレバミピド併用によるシグナル伝達及び生存関連因子発現動態.....	11
4. レバミピド併用による 5-FU 誘導細胞死抑制効果におけるシグナル伝達阻害剤の影響.....	14
IV. 考察.....	16
<b>第2章 乳癌骨転移患者におけるゾレドロン酸治療中の SSE 発現に関する因子の探索.....</b>	<b>19</b>
I. 緒言.....	19
II. 対象および方法.....	20
1. 調査方法.....	20
2. 安全性評価.....	20
3. 検定.....	21

4. 研究実施の可否及び利益相反の有無.....	21
III. 結果.....	21
1. 患者背景.....	21
2. 症候性骨関連事象.....	22
3. 多変量解析.....	26
IV. 考察.....	28
<b>第3章 パクリタキセル・カルボプラチン療法での 後発品製剤安全性の検討.....</b>	<b>31</b>
I. 緒言.....	31
II. 対象および方法.....	32
1. 調査方法.....	32
2. 安全性評価.....	32
3. 統計解析.....	32
4. 研究実施の可否及び利益相反の有無.....	33
III. 結果.....	33
1. 患者背景.....	33
2. 有害事象.....	33
IV. 考察.....	37
<b>総括.....</b>	<b>39</b>
<b>引用文献.....</b>	<b>40</b>
<b>謝辞</b>	

## 序論

がん化学療法において、副作用を軽減することは、治療強度の確保、医療費の削減、安全な治療を行う上で重要であり、これらはがん患者の quality of life(QOL)の向上に直結する。そのため、抗がん剤の副作用メカニズムを明確にし、適切な支持療法を選択する必要がある。

がん化学療法における一般的な副作用として口内炎があり、がん治療を受けている患者の約 20-40%が経験する[1]。口内炎を発症すると、疼痛による QOL の低下だけでなく、原因薬剤の減量及び休薬により、治療強度が低下する要因となる。海外では、化学療法誘発性口内炎に対して、keratinocyte growth factor(KGF)である palifermin が臨床で使用されているが、効果が限定的であり費用対効果が明確になっていないこと及び腫瘍増大の懸念があることなどから、より効果的な薬剤が必要とされている[2-4]。

近年、頭頸部癌で化学放射線療法を受けている患者において、レバミピドの含嗽が口内炎の発症抑制に効果的である可能性が示唆されたが[5]、その機序は明確にされていない。よって、化学療法誘発性口内炎に対するレバミピドの抑制機序を明確にすることで、より確固たるエビデンスの基での臨床応用が期待できる。

がん治療における QOL の低下が認められるものとして、骨転移による骨関連事象 (SRE: skeletal related events) ・ 症候性骨関連事象 (SSE: symptomatic skeletal events) が挙げられる。骨指向性の固形腫瘍としては、乳癌、肺癌、前立腺癌などが知れているが、中でも転移性乳癌は 80%以上の患者で骨転移を持つことが報告されており[6]、SRE を経験する可能性が高い。乳癌は heterogeneous な疾患であり、Estrogen receptor (ER)、Progesteron receptor (PgR)及び Human epidermal growth factor 2 (HER2)の発現、遠隔転移及び閉経の有無などにより治療方針が検討され、治療効果や予後に関連する。

乳癌における骨転移の治療としては、手術、放射線及び薬物療法など包括的なアプローチが必要である。薬物療法としては、化学療法に加え、骨吸収抑制薬であるゾレドロン酸(ZA)

が SRE 抑制効果を持つため、強く推奨されている[7]。ZA は骨に特異的に吸着し、破骨細胞の骨吸収作用を抑制することで、SRE の発生を低下させる。しかし、効果が十分に得られず、ZA 治療中に SRE が発現する症例は少なくない。ZA 治療と SRE の関連性について、臨床的因子をレトロスペクティブに調査した報告があり、高齢、ZA 治療前の SRE 発現歴、ALP や lactate dehydrogenase(LDH)値の上昇、NTX 高値患者で相関性が見られたと報告している[8]。一方で、ZA 治療患者における SRE 発現と ER、PgR、HER2 による subtype の関連性や、骨転移の多発性、他臓器転移の併発など、臨床学的特徴の関連を検討した報告は少ない。ZA 治療中の SRE 発現に関する因子を明確にすることは、今後の乳癌治療に大きく貢献できると考えられる。

上述の通り、副作用の回避は医療費の削減にも効果的である。海外でのシステマティック・レビューにおいて、医薬品の副作用を経験した患者は、経験していない患者と比較して入院期間の延長が示唆されており[9]、それに生じるコストは年間最大 4 億ドルと報告されている[10,11]。本邦でも年々医療費の増加が問題となっており、政府は、品質・有効性・安全性が先発医薬品と同等であるものとして後発医薬品の使用を推進している。特に、高価な薬剤が多いがん化学療法施行時には、切り替えによる医療経済への貢献は高い。後発医薬品の切り替えに際する問題点として、臨床試験での報告が義務付けられていないことが挙げられる。安全域が狭いがん化学療法において、切り替えによる有害事象発現の差異が治療に影響する可能性は高く、実臨床での薬剤評価が必要と考える。

婦人科悪性腫瘍治療では、パクリタキセル・カルボプラチン(TC)療法は重要なレジメンとして位置づけられている。副作用として、血液毒性を代表に、重篤なものではアレルギーなど多くの副作用を発現することが JCOG0505 試験等で報告されているが[12]、後発医薬品レジメンでの副作用評価はなされておらず、エビデンスが少ない中で治療が行われているのが現状であり、安全性に関する検証は必要である。

第 1 章では、ヒト正常口腔ケラチノサイト(nomal human oral keratinocyte: NHOK cell)を用

いて、5-FU 誘発性細胞死に対するレバミピドの抑制機序について検討した。第 2 章では、多変量解析を用いて、乳癌骨転移患者におけるゾレドロン酸治療中の SRE 発現に関する因子の探索を行った。第 3 章では、後発医薬品を用いた TC 療法における有害事象の発現をレトロスペクティブに調査し、先発医薬品レジメンでの有害事象と比較して評価した。

以下に本検討の内容を詳述する。

## 第1章

### レバミピドによる Akt/mTOR 経路活性化と

### Bcl-2 ファミリータンパク質の発現調整を介した 5-FU 誘導細胞死抑制効果

#### I. 緒言

口内炎は細胞傷害性抗がん剤の最も一般的な副作用であり、抗がん剤治療を受けた患者の 20-40%が経験し、特に 5-fluorourasil (5-FU)のような DNA 合成阻害剤は口内炎のリスクが高い[1,13]。疼痛などの口内炎の症状が出現すると、咀嚼などの機能低下、QOL の低下を引き起こすだけでなく、化学療法の減量・休薬を余儀なくされ、治療強度の低下につながる。

口内炎に対する従来のアプローチは、症状及び合併症の軽減を目的とし、クライオセラピー、オピオイド、亜鉛サプリメントの経口全身投与、スクラルファートの含嗽、グルタミンの経静脈投与[14]などが使用されるが、口内炎に対するこれらの治療に確固たるエビデンスはない[15]。ヨーロッパでは、ケラチノサイト増殖因子(keratinocyte growth factor:KGF)の palifermin が、化学療法及び放射線誘発性口内炎に使用されている。しかし、palifermin の使用は、費用対効果、投与頻度及び潜在的に腫瘍増殖を誘発する懸念があるため、口内炎に対して、より効果的なアプローチが必要である[2-4]。

レバミピドは急性胃炎などによる胃粘膜病変の治療に使用される粘膜保護剤であり、胃粘膜血流量の増加、プロスタグランジンの産生増加、抗炎症作用を有することが示されている[16-19]。さらに、レバミピドはマウスにおいて 5-FU 誘発性の小腸粘膜炎を抑制することが示されている[17]。5-FU はチミジル酸の合成を阻害し、DNA 合成及び細胞周期を停止することで、細胞死を誘導する[20]。また、ヒト結腸がんの細胞においては、Akt 及び mammalian target of rapamycin (mTOR)の活性化を阻害することが示されている[21,22]。さらに、ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 において、phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K)/Akt 経路及び



nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)活性化の両方を抑制して、細胞死を誘導することが報告されている。したがって、5-FU の細胞傷害性は、DNA 合成の阻害、細胞周期の停止及びシグナル伝達経路など様々な機序により誘導される可能性がある。近年、口腔癌患者の化学放射線療法を受けている患者において、レバミピドの含嗽が、重度の口内炎の発症を抑制したと報告されている[5]。また、化学放射線療法を受けている頭頸部癌患者において、レバミピドの含嗽が、口内炎発症までの期間を延長させ、重篤化を予防するのに有効であるとの報告もある[23,24]。しかし、口腔粘膜におけるレバミピドの細胞保護効果のメカニズムは依然として不明である。本研究では、正常ヒト口腔ケラチノサイト(normal human oral keratinocytes: NHOK cells)を用い、口腔粘膜におけるレバミピドの細胞保護効果の機序を検討した。

## II. 実験材料および方法

### 1. 試薬

レバミピドは Otsuka Pharmaceutical(Tokushima, Japan)より提供していただいた。5-FU、シスプラチン、rapamycin は Wako(Tokyo, japan)より購入した。LY294002、SB203580、U0126 は Wako(Tokyo, japan)より購入した。これらの試薬は dimethyl sulfoxide にて溶解し、phosphate-buffered saline (PBS; 0.05 M, pH 7.4)にて希釈後、シリンジフィルター(0.45  $\mu$ m, IWAKI GLASS, Tokyo, Japan)にて滅菌後、使用した。

ヒト KGF は Peprtech(Rocky Hill, NJ, USA)より購入した。PBS(0.05 M, pH 7.4)にて希釈後、使用した。

### 2. 細胞株

NHOK 細胞は ScienCell Research Laboratories (San Diego, CA)より購入した。この細胞をコ

ラーゲン処理したフラスコに播種し、low level calcium (0.15 mM)と bullet kit を添加した Keratinocyte Growth Medium(KGM; Cambrex, East Rutheford, NJ)で培養した。

### 3. Trypan blue dye exclusion assay

細胞を 1000 cells/well となるように 96-well plate に播種した。24 時間培養した後、各種薬剤を添加し、種々の時間培養した。その後、細胞懸濁液と同量の 0.4% トリパンプルーを混合し、血球計算板を用いて、生細胞と死細胞を算定した。

### 4. Western blotting

NHOK 細胞の細胞質分画は ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, San Diego, CA, USA)を用いて抽出した。タンパク質の定量は BCA protein-assay kit を使用した。抽出したタンパク 40 $\mu$ g を polyacrylamide-SDS ゲルにて電気泳動し、polyvinylidene fluoride(PVDF)メンブレン(GE health/Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)に転写した。タンパクを転写した PVDF メンブレンを 3%のスキムミルク溶液にてブロッキングを行った。次に、目的とするタンパクに特異的な一次抗体[anti-phospho-extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 (Thr202/Tyr204) antibody, anti-phospho-Akt (Ser473) antibody, anti-phospho-c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Thr183/Tyr185) antibody, anti-phospho-p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Thr180/Tyr182) antibody, anti-phospho-mTOR (Ser2448) antibody, anti-ERK1/2 antibody, anti-Akt antibody, anti-JNK antibody, anti-NF- $\kappa$ B antibody, anti-p38MAPK antibody, anti-XIAP antibody, anti-Survivin antibody, anti-AIF antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), anti-Bcl-2 antibody, anti-Bcl-xL antibody, anti-Bax antibody, anti-Bim antibody (Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA)及び anti- $\beta$ -actin antibody (Sigma)]を 4 $^{\circ}$ C条件下で一晩反応させた。その後、PVDF メンブレンに、二次抗体として horseradish peroxidasecoupled anti-rabbit IgG sheep 抗体 (GE health/Amersham Biosciences)を室温下で 1 時間反応させた。反応したタンパ

ク質は、Luminata Forte (Merck Millipore, Nottingham, UK)を用い発光させた。

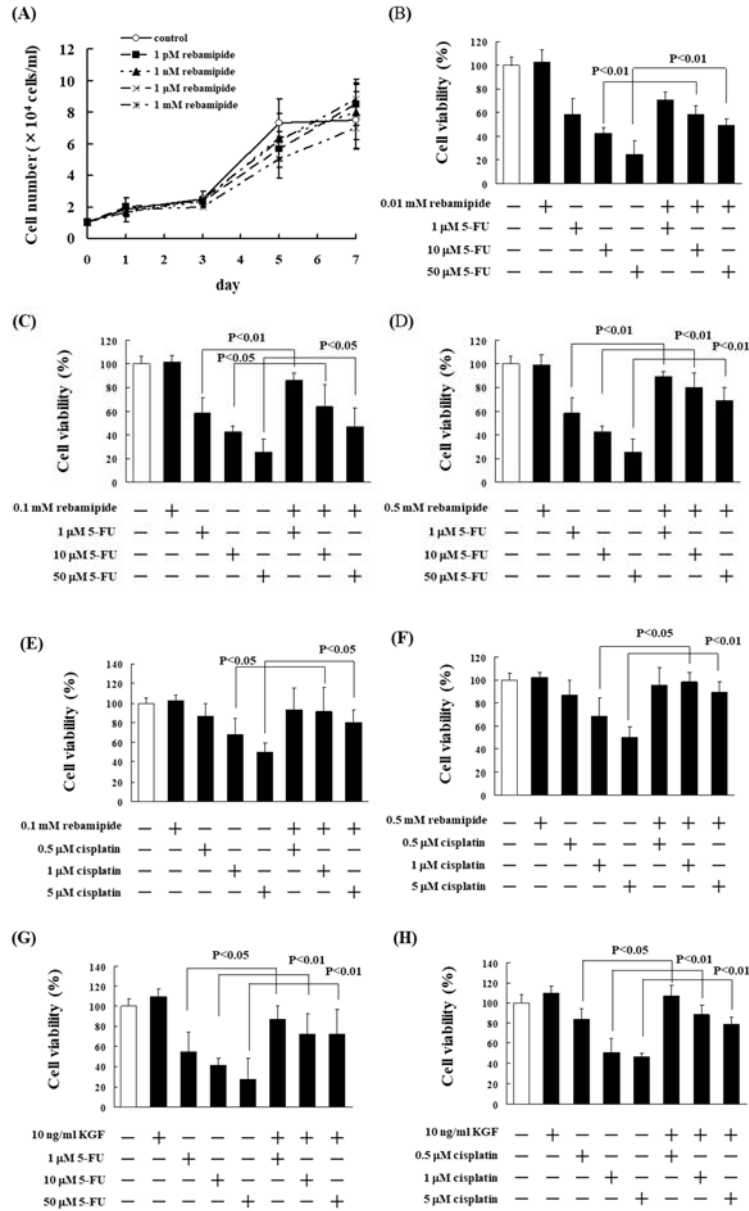
## 5. 統計解析

すべての結果は、平均±標準偏差を用いて表した。データの多重比較には ANOVA with Dunnet 検定を使用した。また、p 値が 5%未満のとき、統計学的に有意であると判定した。

## III. 結果

### 1. レバミピドによる NHOK 細胞での 5-FU 誘導細胞死抑制効果

レバミピド添加により NHOK 細胞増殖への影響を検討したが、全ての濃度において変化は認められなかった (Figure 1A)。次に、NHOK 細胞においてレバミピド添加により抗がん剤誘導細胞死が抑制できるか否か検討した。5-FU(1-50 $\mu$ M)あるいはシスプラチン(0.5-5 $\mu$ M)に、レバミピド(0.01-0.5mM)を併用して処理し、細胞生存率を測定した。その結果、レバミピドは 5-FU 及びシスプラチンの細胞死誘導を顕著に抑制した(Figure 1B-F)。KGF が化学放射線療法誘発性口内炎に対して有効であることが報告されている[25]。また、10ng/mL KGF による処置は、ケラチノサイトにおける menadione 誘導細胞死を抑制することが知られている[26]。そこで、レバミピドが KGF と同様の細胞死抑制効果を有するか、KGF による抗がん剤誘導細胞死抑制効果について検討した。0.5mM レバミピドの併用投与が、KGF の 5-FU 及びシスプラチン誘導細胞死抑制効果と同様であることを確認した(Figure 1G-H)。これらの結果は、レバミピドが 5-FU 誘導細胞死に対して、KGF と同様の細胞保護効果があることを示唆した。



**Figure 1**

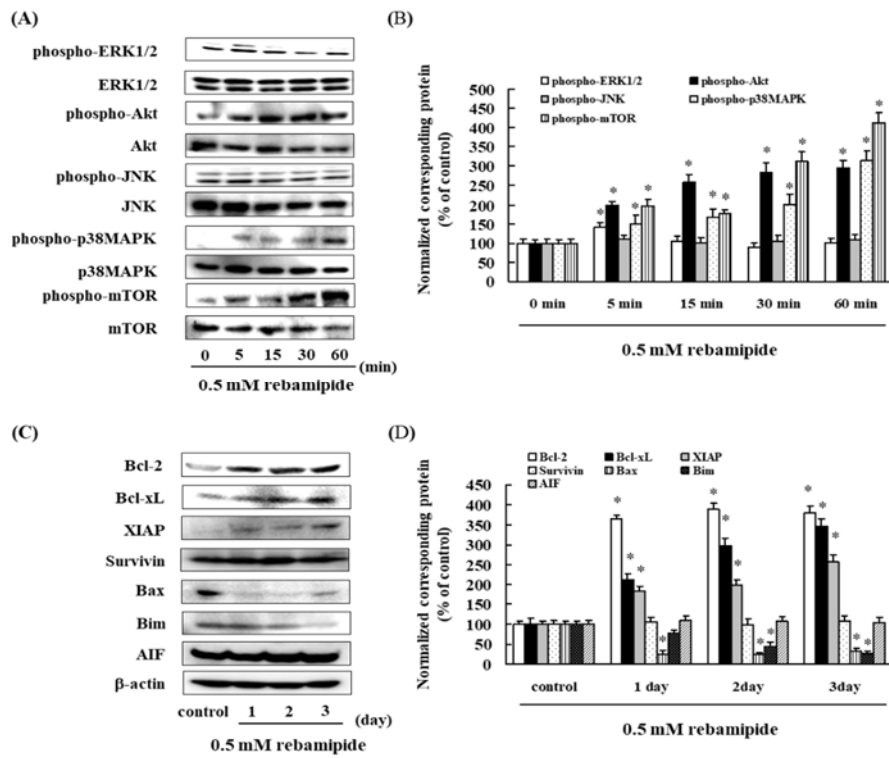
(A) Primary NHOK cells were exposed to the indicated concentrations of rebamipide. After 1, 3, 5, and 7 days of incubation, the number of viable cells was counted by trypan blue staining; (B–D) NHOK cells were co-treated with various concentrations of 5-FU and (B) 0.01 mM rebamipide, (C) 0.1 mM rebamipide, or (D) 0.5 mM rebamipide; (E, F) NHOK cells were co-treated with various concentrations of cisplatin and (E) 0.1 mM rebamipide, or (F) 0.5 mM rebamipide; (G, H). NHOK cells were co-treated with various concentrations of (G) 5-FU or (H) cisplatin, and 10 ng/mL KGF. (B–H) The trypan blue exclusion test was performed after 72 h. All the results are representative of 5 independent experiments. \* $p < 0.01$  vs. controls (analysis of variance with Dunnett's test).

## 2. レバミピド添加による NHOK 細胞でのシグナル伝達因子活性動態及び細胞生存関連因子発現動態の検討

レバミピドによる 5-FU 誘導細胞死抑制が明らかになったことから、シグナル伝達因子の活性動態について検討を行った。0.5mM レバミピド存在下に NHOK 細胞を培養し、ERK1/2、Akt、JNK、p38MAPK 及び mTOR の活性動態を確認した。NHOK 細胞において、レバミピド添加 5 分後に ERK1/2 の一時的な活性化を認めた。また、レバミピド添加 5、15、30 及び 60 分後で、Akt、p38MAPK 及び mTOR の活性化を確認した。一方、JNK の活性動態には変化が認められなかった(Figure 2A-B)。

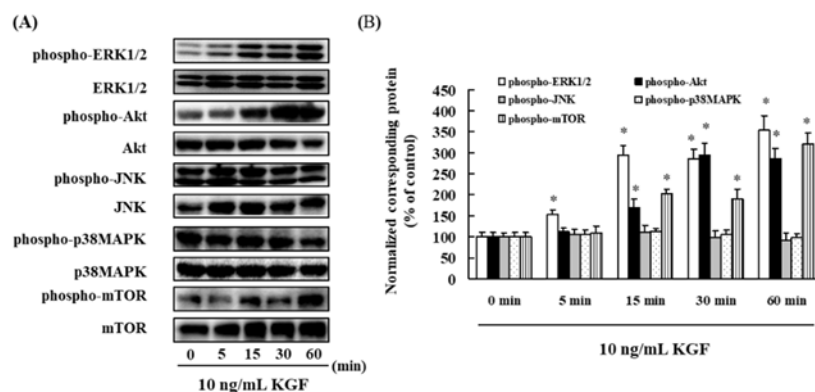
次に、NHOK 細胞においてレバミピドと同様の抗がん剤誘導細胞死抑制効果を示唆した KGF の添加によるシグナル伝達因子活性動態の検討を行った。10ng/mL KGF 存在下に NHOK 細胞を培養し、ERK1/2、Akt、JNK、p38MAPK 及び mTOR の活性動態を確認した。KGF 添加 5、15、30 及び 60 分後で、ERK1/2 の活性化を認めた。また、KGF 添加 15、30 及び 60 分後で Akt 及び mTOR の活性化を確認した。一方、JNK 及び p38MAPK の活性動態には変化が認められなかった(Figure 3)。上記より、レバミピドによる 5-FU 誘導細胞死抑制効果には ERK、p38MAPK、Akt 及び mTOR の活性化が関与することが示唆された。

続いて、細胞生存関連因子の発現動態について検討を行った。0.5mM レバミピド存在下に NHOK 細胞を培養し、Bcl-2、Bcl-xL、XIAP、survivin、Bax、Bim 及び AIF の発現動態を確認した。レバミピド添加 1 日後に Bcl-2、Bcl-xL 及び XIAP の発現増加を認めた。また、Bax 及び Bim の時間依存的な減少を認めた(Figure 2C-D)。上記より、レバミピドによる 5-FU 誘導細胞死抑制効果には Bcl-2、Bcl-xL、XIAP の発現増加及び Bax、Bim の発現低下が関与することが示唆された。



**Figure 2**

Rebamipide activates ERK1/2, Akt, p38MAPK, and mTOR, and regulated the expression of survival factors in NHOK cells. (A, C) Cytoplasmic fractions were prepared and immunoblotted with antibodies against phosphorylated ERK1/2 (phospho-ERK1/2), phosphorylated Akt (phospho-Akt), phosphorylated JNK (phospho-JNK), phosphorylated p38MAPK (phospho-p38MAPK), phosphorylated mTOR (phospho-mTOR), ERK1/2, Akt, JNK, p38MAPK, mTOR, Bcl-2, Bcl-xL, XIAP, Survivin, Bax, Bim, AIF, and  $\beta$ -actin in NHOK cells. (B, D) Quantification of the amount of phospho-ERK1/2, phospho-Akt, phospho-JNK, phospho-p38MAPK, phospho-mTOR, Bcl-2, Bcl-xL, XIAP, Survivin, Bax, Bim, or AIF normalized to the amounts of the corresponding proteins, respectively. The results are representative of 5 independent experiments. \* $p < 0.01$ , compared to controls (analysis of variance with Dunnett's test).



**Figure 3**

KGF activated ERK1/2, Akt, and mTOR in NHOK cells. (A) Cytoplasmic fractions were prepared and immunoblotted with antibodies against phosphorylated ERK1/2 (phospho-ERK1/2), phosphorylated Akt (phospho-Akt), phosphorylated JNK (phospho-JNK), phosphorylated p38 MAPK (phospho-p38 MAPK), phosphorylated mTOR (phospho-mTOR), ERK1/2, Akt, JNK, p38 MAPK, and mTOR in NHOK cells. (B) Quantification of the amount of phospho-ERK1/2, phospho-Akt, phospho-JNK, phospho-p38 MAPK, and phospho-mTOR, normalized to corresponding protein concentrations. The results are representative of 3 independent experiments. \* $p < 0.01$ , compared to controls (analysis of variance with Dunnett's test).

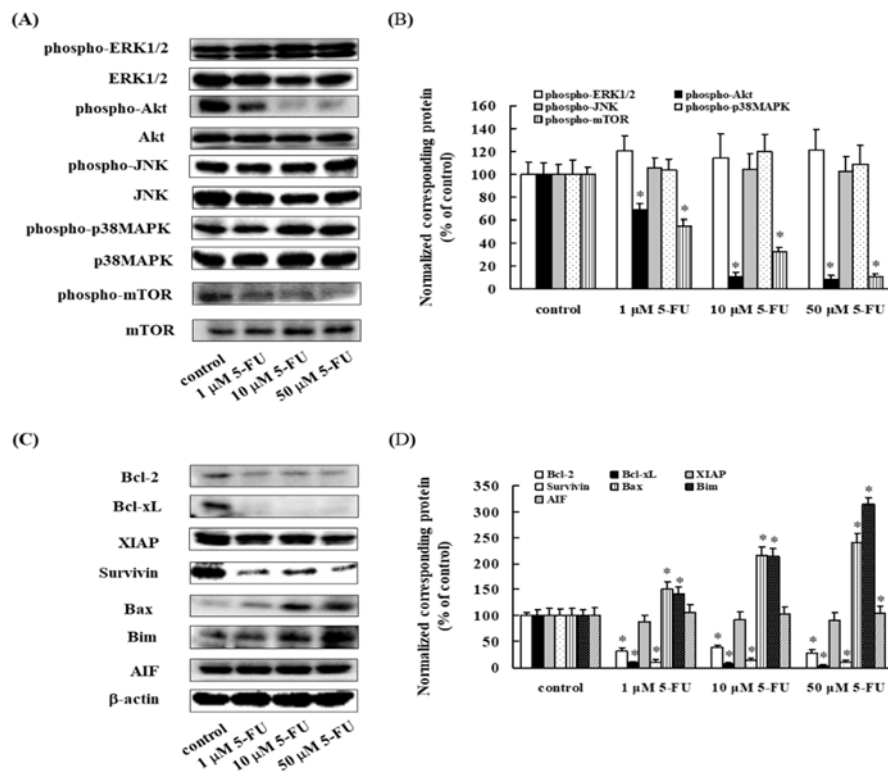
### 3. 5-FU 単剤及びレバミピド併用によるシグナル伝達及び生存関連因子発現動態

上記検討により、レバミピド添加による 5-FU 誘導細胞死抑制効果のシグナル活性因子及び細胞生存関連因子の関与が示されたことから、5-FU 単剤及び 5-FU+レバミピド添加時における上記因子の発現動態について検討を行った。

1、10、50 $\mu$ M 5-FU を添加し、3 日後の ERK1/2、Akt、JNK、p38MAPK 及び mTOR のシグナル活性動態を確認した。NHOK 細胞において、5-FU 添加により Akt 及び mTOR の濃度依存的な発現低下を認めた(Figure 4A-B)。続いて、5-FU 添加による Bcl-2、Bcl-xL、XIAP、survivin、Bax、Bim 及び AIF の生存関連因子発現動態を確認したところ、Bcl-2、Bcl-xL、Survivin の発現低下及び Bax、Bim の発現増加を認めた(Figure 4C-D)。

次に、5-FU+レバミピド併用時における上記シグナル活性動態を確認した。レバミピドの併用は、5-FU による Akt 及び mTOR の発現低下を抑制した(Figure 5A-B)。さらに、5-FU+レバミピド併用時における上記生存関連因子発現動態を確認したところ、5-FU による Bcl-2、

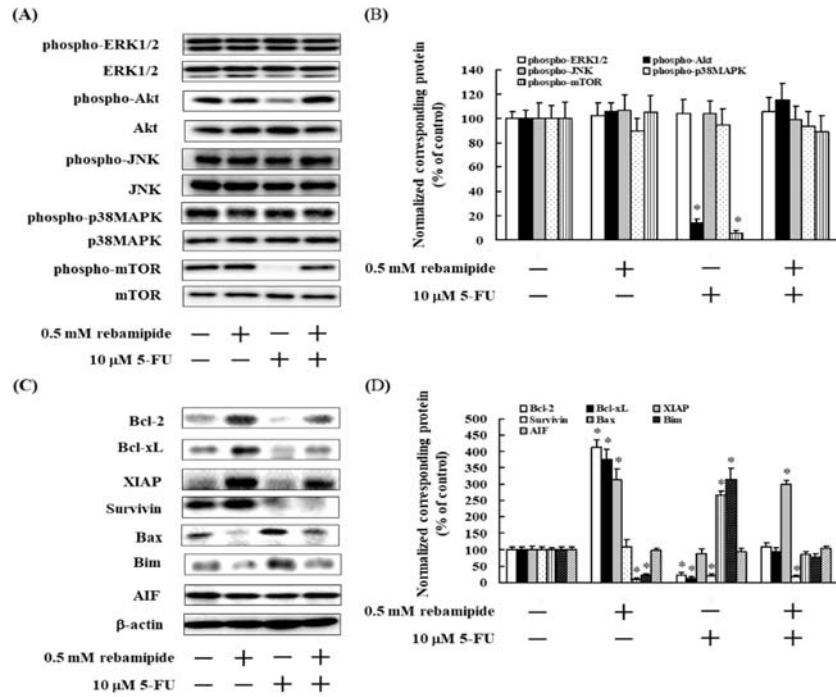
Bcl-xL 発現低下及び Bax、Bim 発現増加を解除した(Figure 5C-D)。一方、レバミピドの併用は 5-FU による Survivin 発現低下に影響を与えなかった。加えて、レバミピドによる XIAP 発現増加は 5-FU による影響を受けなかった(Figure 5C-D)。



**Figure 4**

5-FU suppressed Akt and mTOR activation, and regulated the expression of survival factors in NHOK cells. (A, C) Cytoplasmic fractions were prepared and immunoblotted with antibodies against phosphorylated ERK1/2 (phospho-ERK1/2), phosphorylated Akt (phospho-Akt), phosphorylated JNK (phospho-JNK), phosphorylated p38MAPK (phospho-p38MAPK), phosphorylated mTOR (phospho-mTOR), ERK1/2, Akt, JNK, p38MAPK, mTOR, Bcl-2, Bcl-xL, XIAP, Survivin, Bax, Bim, AIF, and β-actin in NHOK cells. (B, D) Quantification of the amount of phospho-ERK1/2, phospho-Akt, phospho-JNK, phospho-p38MAPK, phospho-mTOR, Bcl-2, Bcl-xL, XIAP, Survivin, Bax, Bim, or AIF normalized to the amounts of the corresponding proteins, respectively. The results are representative of 5 independent experiments. \*p < 0.01, compared to controls (analysis of variance with Dunnett's test).



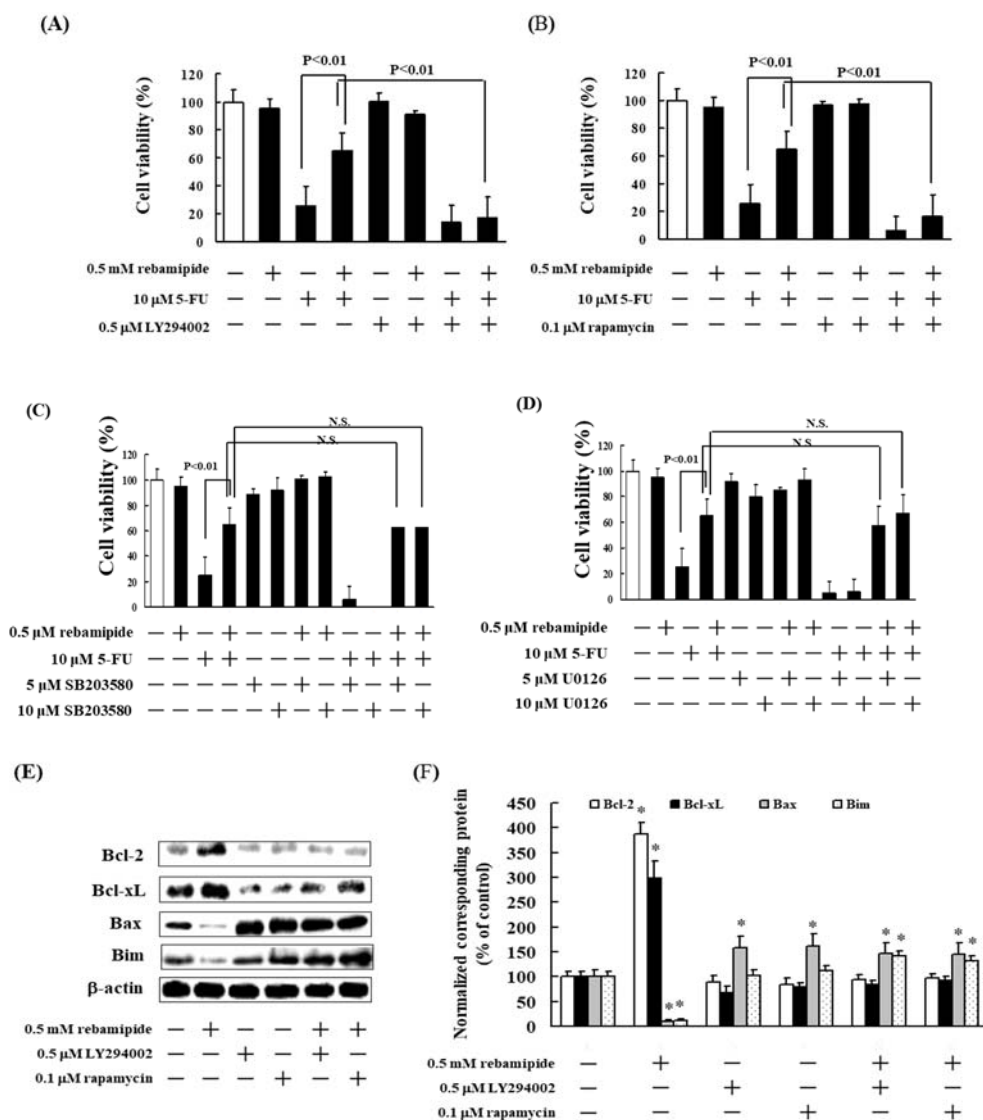


**Figure 5**

Rebamipide prevented 5-FU-induced the suppression of Akt and mTOR activation, decreased Bcl-2 and Bcl-xL expressions, and enhanced the expression of Bax and Bim in NHOK cells. (A, C) Cytoplasmic fractions were prepared and immunoblotted with antibodies against phosphorylated ERK1/2 (phospho-ERK1/2), phosphorylated Akt (phospho-Akt), phosphorylated JNK (phospho-JNK), phosphorylated p38MAPK (phospho-p38MAPK), phosphorylated mTOR (phospho-mTOR), ERK1/2, Akt, JNK, p38MAPK, mTOR, Bcl-2, Bcl-xL, XIAP, Survivin, Bax, Bim, AIF, and β-actin in NHOK cells. (B, D) Quantification of the amount of phospho-ERK1/2, phospho-Akt, phospho-JNK, phospho-p38MAPK, phospho-mTOR, Bcl-2, BclxL, XIAP, Survivin, Bax, Bim, or AIF normalized to the amounts of the corresponding proteins, respectively. The results are representative of 5 independent experiments. \*p < 0.01, compared to controls (analysis of variance with Dunnett's test).

#### 4. レバミピド併用による 5-FU 誘導細胞死抑制効果におけるシグナル伝達阻害剤の影響

上記の結果により、レバミピド添加による 5-FU 誘導細胞死抑制効果には Akt 及び mTOR の関与が考えられたことから、これら阻害剤により 5-FU による細胞死が引き起こされるか否か、レバミピド+5-FU 添加時においてシグナル伝達阻害剤を併用することで検討を行った。結果として、ERK1/2 活性化を阻害する MEK 阻害剤 U0126 及び p38MAPK 阻害剤である SB203580 併用ではレバミピドによる細胞死抑制効果は解除されなかった。しかし、Akt の活性化を阻害する PI3K 阻害剤 LY294002 及び mTOR の阻害剤である rapamycin 併用においては、レバミピドによる 5-FU 細胞死抑制効果が解除されることが明らかになった(Figure 6A-D)。これらの結果から、レバミピドによる 5FU 誘導細胞死抑制効果には Akt/mTOR 経路が関与していることが示唆された。さらに、LY294002 と Rapamycin では、レバミピドによる Bcl-2 及び Bcl-xL 発現増加、Bax 及び Bim の発現減少を抑制することが明らかになった(Figure 6E-F)。



**Figure 6**

Inhibition of Akt, mTOR, p38MAPK or ERK1/2 by these inhibitors abolished cytoprotective effect by rebamipide in NHOK cells. (A-D) NHOK cells were exposed to the indicated concentrations of rebamipide, 5-FU, LY294002, rapamycin, SB203580, U0126. After incubation for 72 h, the number of dead cells was counted by trypan blue staining. The results are representative of 5 independent experiments. \* $p < 0.01$  vs. untreated cells (analysis of variance with Dunnett's test). (D) NHOK cells were exposed to the indicated concentrations of rebamipide, LY294002, or rapamycin. After incubation for 72 h, the cytoplasmic fractions were extracted and then subjected to SDS-PAGE/immunoblotting with anti-Bcl-2, anti-Bcl-xL, anti-Bax, and anti-Bim antibodies. Anti- $\beta$ -actin and anti-lamin antibodies were used as internal standards. (E) Quantification of the amount of Bcl-2, Bcl-xL, Bax, or Bim, normalized to the amounts of the corresponding proteins, respectively. The results are representative of 5 independent experiments. \* $p < 0.01$ , compared to controls (analysis of variance with Dunnett's test).

#### IV. 考察

本研究で、レバミピドが NHOK 細胞の増殖に影響を与えず、5-FU 及びシスプラチン誘発性の細胞死を抑制することを認め、この細胞保護効果は、KGF と同等であることを明らかにした。レバミピドによる細胞保護効果について様々な報告があり、Watanabe らは、*Helicobacter pylori* に感染したモンゴリアン・ジャービルを用いた検討で、レバミピドが好中球の活性化を抑制することで、胃潰瘍の予防に有効であることを報告している[27]。また、RGM1 細胞を用いた研究で、レバミピドが ROS 誘発性のミトコンドリア損傷及び caspase 活性化の阻害により、インドメタシン誘発性細胞死を抑制することも示されている[28,29]。さらに、レバミピドが nitric oxide synthase、transforming growth factor  $\beta$ 1、tumor necrosis factor  $\alpha$  及びマクロファージ活性を抑制することにより、小腸粘膜炎を抑制するとの報告もある[30]。これらの報告は、レバミピドが 5-FU 及びシスプラチン誘発性口内炎の予防に有効である可能性を示唆している。

レバミピドによるシグナル伝達経路に関する報告として、epidermal growth factor receptor (EGFR) と ERK1/2 の活性化により、ムチン分泌を促進するという知見がある[31]。さらに、レバミピドは、COX-2 欠損マウスを用いた検討で、basic fibroblast growth factor の発現を増強することにより、胃潰瘍を抑制することも示されている。したがって、MAPK 経路などの活性化は、レバミピドの胃保護効果と関連している可能性がある[32]。本研究では、5-FU 誘発性細胞死に対するレバミピドの細胞保護効果のメカニズムを検討した結果、NHOK 細胞において、レバミピドは ERK1 / 2、Akt、p38MAPK、及び mTOR を活性化することを示した。また、レバミピドが Bcl-2、Bcl-xL、及び XIAP の発現を増強し、Bax、及び Bim の発現を減少させることを明らかにした。さらに、5-FU は Akt、mTOR の活性阻害、Bcl-2、Bcl-xL、Survivin の発現抑制及び Bax、Bim の発現を誘導することで、細胞死を誘導することを示した。一方で、レバミピドは 5-FU 誘導性の Akt 及び mTOR 活性阻害、Bcl-2 及び Bcl-xL

発現低下、並びに Bax 及び Bim 発現増加の抑制効果を示した。Akt 及び mTOR の活性化は、生存因子の発現に重要な役割を示す。これらのシグナルの伝達は、ミトコンドリアでのアポトーシス制御に関する Bcl-2 ファミリー及びカスパーゼ活性を抑制する IAP ファミリーの発現を制御することが示されている[33,34]。さらに、Akt の活性化は FOXO タンパク質リン酸化を介して、Bim の発現を抑制する[35]。また、殺細胞性の抗がん剤には ROS を産生させる効果があり[36-38]、これは mTOR 経路を抑制することが示されており、mTOR の抑制は Bim の発現を増加させる[39,40]。レバミピドは、Bax 発現の減少を介して、セレコキシブ誘導性胃粘膜細胞アポトーシスを抑制すること[41]、さらに、胃粘膜上皮細胞の GES-1 及び SGC7901 細胞において、Helicobacter pylori は Bax の発現増加及び Bcl-2 の発現低下を介してアポトーシスを誘導することが知られているが[42,43]、レバミピドはランダム化比較試験において胃潰瘍の患者の治癒を促進したとの報告がある[44]。これらの知見は、レバミピドの細胞保護効果が、Akt 及び mTOR の活性化、Bcl-2 及び Bcl-xL の発現増加、そして Bax 及び Bim の発現減少に関連することを示唆する。レバミピドの細胞保護効果が Akt 及び mTOR の活性化と関連する可能性が推測されたため、NHOK 細胞における 5-FU 誘発性細胞死におけるレバミピドの効果が、Akt、mTOR、p38MAPK、もしくは ERK1/2 の活性化と関連するか確認するため、PI3K 阻害剤の LY294002、mTOR 阻害剤の Rapamycin、p38MAPK 阻害剤の SB203580 及び MEK 阻害剤の U0126 を用いて検討した。その結果、LY294002、もしくは Rapamycin の併用で、レバミピドの細胞保護効果を抑制することを確認した。さらに、それら併用時において、Bcl-2 及び Bcl-xL の発現を有意に抑制し、Bax 及び Bim の発現を増強することを明らかにした。しかし SB203580 及び U0126 は、レバミピドの細胞保護効果に影響を与えなかった。これらの結果から、NHOK 細胞におけるレバミピドの細胞保護効果は、Akt/mTOR 経路の活性化による Bcl-2 及び Bcl-xL の発現増加、Bax 及び Bim の発現減少を介することが示唆された。

以上より、5-FU 誘発性細胞死に対するレバミピドの効果は、Akt/mTOR 経路の活性化による Bcl-2 及び Bcl-xL の発現増加、Bax 及び Bim の発現減少を介して行われるという分子経路の根拠を示した。今回の結果より、化学療法誘発性口内炎に対して、レバミピドが有用である可能性が示唆された。

## 第2章

### 乳癌骨転移患者におけるゾレドロン酸治療中のSSE発現に関する因子の探索

#### I. 緒言

骨は乳癌の転移における好発部位であり、転移性乳癌患者の80%以上が経験し、骨転移を有する患者は、疼痛、高Ca血症及び病的骨折など、骨関連事象(Skeletal Related Events : SRE)を引き起こし、QOLを著しく損なう[6]。したがって、乳癌、前立腺癌及び肺癌など骨指向性の悪性腫瘍において、SREの予防は重要である。Bisphosphonate(BP)は骨に蓄積し、Ras/MEK/ERK経路の活性化を抑制することで、破骨細胞のアポトーシス誘導を介して、骨吸収を抑制するため[45]、SREの予防におけるkey drugである。BPのゾレドロン酸(ZA)とイバンドロネートは、骨転移を有するがん患者におけるSREを減少させることが証明されている。本邦においてもZAとプラセボとを比較したランダム化試験において、ZA治療により1年でSREを39%減少させ、有意にSREの発現時期を遅らせることが報告されている[7]。しかし、ZAの長期使用によりSREを発現する患者やZA治療によるSRE抑制効果を十分に得られず、ZA治療中にSREを発現する患者は存在する。

BPとSREの関連性について、BrownらはN-telopeptide of type 1 collagen(NTX)高値が骨合併症の予測因子であると報告している[46]。また、BrownらはZA治療患者におけるSRE発現に関連する臨床的因子をレトロスペクティブに調査し、高齢、ZA治療前のSRE発現歴のある患者、Alkaline Phosphatase(ALP)やlactate dehydrogenase(LDH)値の上昇、NTX高値患者であることも報告している[8]。一方で、ZA治療患者におけるSRE発現とER、PgR、HER2によるsubtypeの関連性や骨転移の多発性、多臓器転移の併発など臨床学的特徴の関連を検討した報告は少なく、ZA治療中のSRE発現に関する因子を明確にすることは今後の乳がん治療に大きく貢献できると考えられる。そこで、ZA治療によるSRE発生抑制効果と乳がん

の臨床学的特徴に関連があると仮定した。これらを検証するためには ZA とプラセボの比較試験において各項目で層別解析する必要があるが、現在、ZA は標準治療であるため倫理的に不可能であり、過去の臨床試験でもこのような解析は行われていない。しかし、ZA を投与されている患者群において、SRE の少ない群を見つけることで、探索的に患者群を推定することは可能であるため、レトロスペクティブに検討した。

## II. 対象および方法

### 1. 調査方法

近畿大学医学部附属病院及び兵庫県立がんセンターにおいて、2007年1月1日から2011年12月31日までに、乳癌の骨転移に対して ZA を投与された患者 183 例のうち、高カルシウム血症など SRE 予防以外の目的で投与された症例、他院での投与歴が不明な症例を除外した 176 例を調査対象とした。

### 2. 調査項目

症例の診療録より、年齢、ER 発現、PgR 発現、HER2 発現、骨以外の他臓器転移の有無、ZA 開始時における骨転移の多様性、乳癌診断日から ZA 治療開始までの期間、ZA 治療以前の SRE 発現有無を調査した。また、ZA 治療における項目として、ZA 治療期間、ZA 投与中の骨に対する薬物治療、症候性骨関連事象(Symptomatic Skeletal Event : SSE)発現状況と非定型大腿骨骨折の有無についてレトロスペクティブに調査した。

ER 及び PgR は 1%未満を陰性、1%以上を陽性と定義した。HER2 は、Hercep Test<sup>TM</sup> でスコアが 3+以上、もしくは FISH 染色にて陽性の場合、陽性とみなした。FISH 染色は、Hercep Test<sup>TM</sup> でスコアが 2+である全ての標本について実施している。ER かつ/または PgR 陽性を



Hormone Receptor(HR)+と定義し、(HR+)(HER2-)を HR 陽性群、(HR+,-)(HER2+)を HER2 陽性群、(HR-)(HER2-)を triple negative(TN)群とした。

SSE は、病理学的骨折、骨への放射線治療及び外科的治療、または脊髄圧迫と定義した。

### 3. 解析方法

SSE 発現に影響する因子を探索的に検討するために、多変量ロジスティック回帰分析を用いて解析を行い、危険率 5%未満を有意水準と判断した。

### 4. 研究実施の可否及び利益相反の有無

本研究は近畿大学医学部倫理委員会及び近畿大学薬学部倫理委員会の承認を得て行った。本研究の著者等は関連するいずれの企業とも利益相反の関係になかった。

## Ⅲ. 結果

### 1. 患者背景

対象症例 176 例のベースラインを Table 1 に示す。年齢の中央値は 59 歳(30-87)であった。60 歳以上の症例は 87 人(49.4%)となった。ER 陽性の症例は 144 例(81.8%)、PgR 陽性の症例は 111 例(63.1%)、HER2 陽性の症例は 31 例(17.6%)であった。ZA 投与前の治療の有無について、27 例(15.3%)の症例ではホルモン剤を、27 例(15.3%)で化学療法による治療を受けていた。ZA 治療前に、SSE を経験していた症例は 27 例(15.3%)であった。サブグループとして、HR 陽性群は 125 例(71.0%)、HER2 陽性群では 31 例(17.6%)、TN 群は 20 例(11.4%)であった (Table 3)。

転移における患者背景の詳細について Table 2 に示す。53 例(30.1%)は転移が骨のみに局限していたが、123 例(69.9%)の症例では他臓器にも転移が見られた。また、骨転移についての詳細として、54 例(30.7%)は単発の骨転移であったが、122 例(69.3%)では多発的に骨転移が見られた(Table 1, 2)

乳癌と診断されてから ZA が開始されるまでの期間は平均で 55.5 月(0-349)であり、ZA 治療の平均期間は 15.5 月(0.4-56.1)であった(Table 1)。ZA 投与中の全身治療として、127 例(72.2%)の症例ではホルモン剤を、137 例(77.8%)の症例では化学療法を併用していた。

## 2. 症候性骨関連事象

42 例(23.9%)の症例で、ZA 投与にもかかわらず SSE の発生が確認された。30 症例(17.1%)は HR 陽性群、8 症例(4.6%)は HER2 陽性群、4 症例(2.3%)は TN 群であった(Table.3)。SSE の内訳として、病学的骨折が 12 例(28.6%)、脊髄圧迫が 4 例(9.5%)、外科的手術が 6 例(14.3%)であった。放射線治療は 25 例(59.5%:Table 4)で施行されていた。いずれの患者においても非定型大腿骨折は発生しなかった。各サブタイプの SSE 発生率は、HR 陽性群で 24.0%、HER2 陽性群で 25.8%、TN 群で 20.0%であった。

**Table 1. Baseline characteristics**

	n=176	%
<b>Median age (y)</b>	59 (30-87) <sup>1)</sup>	
≥60	87	49.4
<60	89	50.6
<hr/>		
<b>ER status</b>		
positive	144	81.8
negative	32	18.2
<b>PgR status</b>		
positive	111	63.1
negative	65	36.9
<b>HER2 status</b>		
positive	31	17.6
negative	145	82.4
<hr/>		
<b>Metastases</b>		
Bone only	53	30.1
Presence of other metastases	123	69.9
<hr/>		
<b>Bone metastases</b>		
Localized	54	30.7
Multiple	122	69.3
<b>Hormonal therapy prior to ZA</b>		
Yes	27	15.3
No	149	84.7
<b>Chemotherapy prior to ZA</b>		
Yes	27	15.3
No	149	84.7
<b>Hormone therapy in combination with ZA</b>		
Yes	127	72.2
No	49	27.8
<b>Chemotherapy in combination with ZA</b>		
Yes	137	77.8
No	39	22.2

ER: estrogen receptor, PgR:progesterone receptor, HER2: human epidermal growth factor 2 receptor, BC: breast cancer, ZA: zoledronic acid 1) mean(range). 2) median (range).

Table 1(continued)

	n=176	%
<b>Prior to SSE</b>		
Yes	27	15.3
No	149	84.7
<b>The median period from diagnosis of BC to the start of ZA therapy (m)</b>	55.5 (0-349) <sup>2)</sup>	
<b>The median period of ZA therapy (m)</b>	15.5 (0.4-56.1) <sup>2)</sup>	

Table 2. The detail of metastases site

	n	%
<b>Metastases site</b>		
Bone only	53	30.1
Lung	45	25.6
Liver	33	18.8
Lymph node	89	50.6
(Regional lymph node)*	(25)	
Other	29	16.5
<b>Site of bone metastases</b>		
Cervical	25	
Thoracic	70	
Lumbar	72	
Sacral	42	
Rib	70	
Ilium	43	
Sternum	42	
Scapula	24	
Femur	24	
Other	19	

\* Shows the patients metastasized regional lymph nodes.

**Table 3. The incidence rate of 1st SSE during ZA therapy in each subtypes.**

	Characteristics n=176 (%)	patients with a SSE N=42 (% of patients with a SSE)
<b>the HR positive group</b>	125(71.0%)	30(71.4%)
<b>the HER2 positive group</b>	31(17.6%)	8(19.1%)
<b>the TN group</b>	20(11.4%)	4(9.5%)

HR hormone receptor; TN triple negative; HER2 human epidermal growth factor 2 receptor;

HR positive group: ER and/or PgR positive, HER2 negative

HER2 positive group: HER2 positive

TN group: Triple negative

**Table 4. The detail of 1st SSE**

	N	%	Time to SSE(m)
	<b>42</b>	<b>23.9</b>	<b>11.9</b>
<b>Radiation therapy</b>	25	14.2	15.2
Lumbar	8		
Thoracic	6		
Cervical	2		
Sacral	2		
Ilium	2		
Other	5		
<b>Fracture</b>	12	6.8	6.3
Lumbar	4		
Thoracic	3		
Femur	3		
Other	2		
<b>Spinal cord compression</b>	4	2.3	13.6
<b>Surgery</b>	6	3.4	9.2
Spinal cord	3**		
Femur	2**		
Lumbar	1		

\* Time to SSE; time between initiation of ZA and 1st SSE.

\*\* We considered 5 patients who had surgery as multiple SSEs.

### 3. 多変量解析

多変量ロジスティック回帰分析により、乳癌のサブタイプによる違いは、ZA 治療中の SSE 発生率と関連がないことが示唆された。(TN/HR [OR: 1.016, 95% CI: 0.206–4.427; p = 0.983] 、 HER2/HR [OR: 1.158, 95% CI: 0.405–3.118; p = 0.777])。

一方、骨単独転移群と多臓器転移合併群において比較検討した結果、骨単独転移群で SSE 発現割合が有意に高かった(OR: 3.878, 95% CI: 1.647–9.481; p = 0.002)。さらに、ZA と化学療法併用の有無を比較検討したところ、併用群で SSE 発現割合は有意に高かった(OR: 3.116, 95% CI: 1.052–10.682; p = 0.040) (Table 5)。

**Table 5. Multivariable analysis of predictive factors for occurrence of SSE**

	<b>Odds ratio</b>	<b>95% CI</b>	<b>p value</b>
<b>age<sup>1)</sup></b>	1.013	0.978-1.050	0.458
<b>TN / HR positive</b>	1.016	0.206-4.427	0.983
<b>HER2 positive / HR positive</b>	1.158	0.405-3.118	0.777
<b>Presence of metastases</b>			
Bone only / Other	3.878	1.647-9.481	0.002
<b>Bone metastases</b>			
Multiple / Local	2.454	0.985-6.792	0.054
<b>Hormonal therapy prior to ZA</b>			
Yes / No	1.794	0.547-5.635	0.327
<b>Chemotherapy prior to ZA</b>			
Yes / No	1.128	0.322-3.704	0.845
<b>Hormonal therapy with ZA</b>			
Yes / No	1.746	0.641-5.225	0.282
<b>Chemotherapy with ZA</b>			
Yes / No	3.116	1.052-10.682	0.040
<b>The period from diagnosis of BC to the start of ZA<sup>1)</sup></b>	1.022	0.949-1.113	0.577
<b>The period of ZA<sup>1)</sup></b>	1.000	1.000-1.002	0.074
<b>SSE prior to ZA</b>			
Yes / No	2.041	0.743-5.460	0.163

HR hormone receptor; TN triple negative; HER2 human epidermal growth factor 2 receptor, BC breast cancer, ZA zoledronic acid.

1) Continuous variable

#### IV. 考察

ZA を始めとする BP 注射製剤は、骨転移を有する進行乳癌患者の SRE を予防するための第一選択薬である。米国臨床腫瘍学会は、X 線にて骨破壊像が確認された時点からの BP による治療を推奨しているが[47]、ZA による治療中にも関わらず、SRE を発生する患者は存在する。

HR、HER2 の発現は、乳癌患者における治療選択に重要であり、それぞれのサブタイプによる治療選択は、生存に影響を与えることが報告されている。乳癌は前記の通り heterogeneous な疾患であるため、ZA の有効性とサブタイプで相関し得ると仮定した。本研究では、各サブタイプの SSE 発生率は、HR 陽性群で 24.0%、HER2 陽性群で 25.8%、TN 群で 20.0%と有意な差は認められず、SSE の発生率がサブタイプと無関係であることを示唆した。乳癌の骨転移とサブタイプの関連性について、Luminal type では骨が再発部位として多いとの報告がある[48,49]。我々の結果からも、登録症例中に占める HR 陽性患者数は多く、この報告を支持している。なお、サブタイプと ZA 投与期間における単変量解析の結果、TN 群で投与期間が有意に短かった( $p=0.045$ 、date not shown)。10 年間のタモキシフェン術後補助療法の使用により、HR 陽性症例は生存期間が長く[50]、必然的に ZA 投与期間も長くなるが、多変量解析ではサブタイプと SSE の関連性に有意な差は認められなかった。

HR 陽性乳癌患者は、薬物療法として内分泌療法を選択する。Aromatase Inhibitor はエストロゲン産生を抑制することにより骨密度を低下させ、骨折のリスクが高くなる[51]。したがって、内分泌療法を受けている患者群において、SSE の発生率に影響を及ぼすか検討する必要がある。本検討では、多変量ロジスティック回帰分析において、内分泌療法は、ZA 治療中に SSE の発生率を増加させることは観察されなかった。

他臓器転移併発群と比較して、骨単独転移群では SSE が有意に発生した(OR: 3.878, 95%CI: 1.647–9.481;  $p = 0.002$ )。Plunkett らは、“軟部組織と骨”、“胸膜と骨”、“肝臓と骨”、“および”



骨のみ”に転移を有する進行乳癌患者 4 群において、骨のみに転移を有する患者群が最も病理学的骨折を経験することを報告している[52]。また、同患者群では、疼痛もしくは脊髄圧迫により、骨部位への放射線治療を必要とする可能性が最も高いことも併せて報告している。これらの報告は、我々の結果を支持している。乳癌患者での骨単独転移に関する別の知見として、他臓器に転移を有する患者より生存期間中央値が有意に長いことも報告されている[53]。より長い生存期間を有する患者は、SSE を発症するリスクが高い可能性があるため、本研究においても影響を及ぼす可能性があるが、本検討においては生存期間について調査しておらず、今後の課題である。

化学療法と ZA を併用していた患者群では、非併用群と比較して SSE のリスクが有意に高かった。Tanaka とも報告しているが、進行が早いタイプの乳癌患者では、SRE をより短期間で経験することが推測される[54]。

有意な差は認められなかったものの、複数の骨転移を有する患者群において、単発の骨転移を持つ患者群と比較し、SSE のリスクが増加する傾向がみられた(OR: 2.454, 95% CI: 0.985-6.792; p=0.054)。また、我々の結果では、大多数の患者で ZA 治療中の新たな骨転移部位ではなく、既存の骨転移部位で SSE が発生していた。これら骨転移巣の結果より、骨転移のみを有する患者、または複数の骨転移を有する患者群両方で、ZA の治療効果は注意深く観察する必要がある。骨指向性と関連のある因子として NTX や ALP などが報告されている[8]が、本研究においては骨指向性のマーカーについては検討しておらず、今後の課題である。

近年、骨修飾薬として完全ヒトモノクローナル抗体であるデノスマブが使用されており、破骨細胞の活性阻害を介して SRE 発生の減少をもたらす。デノスマブは、様々な腫瘍において ZA より SRE 抑制効果が優れていると報告されている[55, 56]。しかし、低カルシウム血症のリスクが高く、この副作用を防ぐためにカルシウム製剤の投与が推奨されることが欠点である。一般的に、デノスマブは 4 週ごと、ZA は 3 週または 4 週ごとに、化学療法と

同時に投与される。ZA は骨転移を有する乳癌患者において、12 ヶ月の治療を完了した後、12 週ごとの維持投与としても、SRE の発生を減少させるとの報告[57]があり、投薬管理の観点からは ZA がデノスマブより有利である。

本検討により、ZA は乳癌のサブタイプと関係なく治療効果を示し、骨単独のみの転移を有する患者では SSE 発生のリスクが高いことが認められた。今後、このような期待される効果が得られなかった患者群に対して、デノスマブを投与した際の効果を検証することで、ZA との使い分けが明確になると考えられる。乳癌骨転移治療薬の個別化が進むことを期待したい。

## 第3章

### パクリタキセル・カルボプラチン療法での後発品製剤安全性の検討

#### I. 緒言

後発医薬品は、先発医薬品と品質・有効性・安全性が同等であるものとして承認が行われている医薬品であり、一般的に先発医薬品に比べて薬価が低くなっている。政府は、患者負担の軽減や医療保険財政の改善を目的に、後発医薬品の使用促進を進めており、特に高価な薬剤が多いがん化学療法においては、後発医薬品への切り替えによる医療経済への貢献は高い。しかし後発医薬品の切り替えに際する問題点として、臨床試験での報告が義務付けられていないことが挙げられる。安全域が狭いがん化学療法の分野において、切り替えによる有害事象発現の差異が治療に影響する可能性は高く、実臨床での薬剤評価が必要と考える。

婦人科悪性腫瘍における化学療法において、パクリタキセル・カルボプラチン(TC)療法は重要なレジメンとして位置づけられている。卵巣癌においては 1st line の化学療法であり、ベバシズマブと組み合わせることで、無増悪生存期間の改善が GOG-0218 試験[58]にて認められ、より重要な立ち位置を占めるレジメンとなった。再発・転移性子宮頸がん及び子宮体がんについては、1st line としての確固たるエビデンスは無いが、投与の簡便性や副作用の忍容性の面において、実臨床で TC 療法が選択される場面は少なくない。

TC 療法の主な副作用としては、JCOG0505 試験より好中球減少 45.2% (Grade4)、貧血 14.3% (Grade4)などの血液毒性の他、アレルギー反応 3.2% (Grade2)、関節痛 20.6% (Grade2)が報告されているが[12]、後発医薬品での TC 療法において上記のような副作用報告はなされておらず、エビデンスが少ない中で治療が行われているのが現状であり、安全性に関する検証は必要である。そのため、本章では婦人科 TC 療法での先発品と後発品の有害事象発現の実態調査をし、安全性についてレトロスペクティブに検討を行った。

## II. 対象および方法

### 1. 対象

2008年1月から2016年12月までの間に、近畿大学医学部附属病院において子宮体癌・子宮頸癌・卵巣癌に対して、tri-weekly TC(パクリタキセル・カルボプラチン)療法を初回導入された症例。①先発品群 (orig. TC) : タキソール注射液®(ブリストル・マイヤーズ スクイブ(株))、パラプラチン注®(ブリストル・マイヤーズ スクイブ(株))を使用した47例及び②後発品群(gx. TC):パクリタキセル注射液「サワイ」®(沢井製薬(株))、カルボプラチン点滴静注液「NK」®(日本化薬(株))を投与された53例を対象とした。なお、化学療法歴がある症例、観察期間中にベバシズマブを併用した症例、手術を行った症例については除外対象とした。観察期間は各診療ガイドラインに準じて6サイクルとした。

近畿大学医学部附属病院での婦人科における tri-weekly TC 療法は、がん種を問わずパクリタキセルとして180mg/m<sup>2</sup>、カルボプラチンとしてAUC=6を3週間に1回投与する。

### 2. 安全性評価

安全性評価として、患者背景及び有害事象の発現状況をレトロスペクティブに調査した。有害事象については、Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 4.0-JCOG版に従い grade 別に評価した。

### 3. 統計解析

2群の標本平均の検定には Student's t-test を、分割表の検定には Fisher's exact test を行った。いずれの検定においても危険率5%以下を有意水準とした。各有害事象について、オッズ比の臨床学的許容範囲を[0,2]と設定し、範囲内であれば、安全性が同等であると仮定した。

#### 4. 研究実施の可否及び利益相反の有無

本研究は近畿大学医学部倫理委員会及び近畿大学薬学部倫理委員会の承認を得て行った。本研究の著者等は関連するいずれの企業とも利益相反の関係になかった。

### III. 結果

#### 1. 患者背景

先発品群、後発品群の背景を Table 1、及び Table 2 に示す。患者背景として、各群の年齢、体表面積、肝機能、腎機能、骨髄機能などに差は無かった(Table 1)。

また、各群の治療内容として、初回投与量、相対治療強度、最終投与日までの治療日数、治療サイクル、6 サイクル中に減量を行った症例数、6 サイクル中に病勢進行が認められた症例数などを比較したが、両群間に差は無かった(Table 2)。

#### 2. 有害事象

本検討では、臨床上とくに問題となる Grade 以上の有害事象のみ調査を行った。その結果を Table 3 に示す。

血液毒性は tri-weekly TC 療法における有害事象の中でも比較的高頻度でおこることが報告されている。特に、治療の減量、中止など実臨床で問題となりやすい Grade3 以上の貧血、好中球減少、血小板減少などについて調査を行ったが、先発品群でやや多い傾向が見られたものの、同等性が示唆された。(Table 3)。発熱性好中球減少症については、オッズ比 0.575(95%CI: 0.092-3.600)と低下傾向であったものの、同等性は保証されなかった。

非血液毒性としては、比較的 ADL に影響がしやすい Grade2 以上の有害事象について検討を行った。特にアレルギー反応については、パクリタキセル、カルボプラチン共に注意す

る必要のある有害事象であり、治療の継続に大きく影響する副作用のため比較したところ、オッズ比 0.432(95%CI: 0.037-4.931)と後発品群に減少傾向であったものの同等性は保証されなかった。その他、腎機能障害、肝機能障害などの各項目について調査をしたが、同様に同等性は保証されなかった(Table 3)。

**Table 1. Background of patients studied**

Characteristics	orig. TC		gx. TC		p value <sup>a)</sup>
	N	%	N	%	
<b>No. of patients</b>	47		53		
<b>Age(y)</b>	56.6(27-80)		56.6(34-76)		n.p
<b>Original cancer</b>					
<b>ovarian</b>	23	48.9	17	32.0	
<b>cervix</b>	10	21.3	9	17.0	
<b>uterine</b>	14	29.8	27	51.0	
<b>Baseline</b>					
<b>Body Surface Area</b>	1.501m <sup>2</sup>		1.536m <sup>2</sup>		0.226
<b>Ccr(mL/min)*</b>	89.75		94.48		0.465
<b>AST(U/L)</b>	20.6		20.9		0.874
<b>ALT(U/L)</b>	17.8		17.9		0.966
<b>t-Bil(mg/dL)</b>	0.47		0.46		0.824
<b>WBC(/μL)</b>	5786		5653		0.741
<b>Neutrophil (/μL)</b>	3477		3348		0.698
<b>Platelet(×10<sup>4</sup>/μL)</b>	24.7		25.1		0.656
<b>Hemoglobin(g/dL)</b>	13.5		13.3		0.685

TC paclitaxel+carboplatin; orig. original drug; gx. generic drug; Ccr Creatinine Clearance; AST Aspartate Aminotransferase; ALT Alanine transaminase; t-Bil Total Bilirubin; WBC White Blood Cell

a) student's t-test

\*The creatinine clearance estimated by Cockcroft & Gault equation.

**Table 2. Therapy parameters in patients**

Parameters	orig. TC(N=47)		gx. TC(N=53)		p value
	N	%	N	%	
<b>No. of treatment days</b>	97.3		101.4		0.530 <sup>a)</sup>
<b>No. of treatment cycles</b>	5.21		5.38		0.541 <sup>a)</sup>
<b>Dose reduction for any reason</b>					
<b>Yes</b>	12	25.5	13	24.5	0.947 <sup>b)</sup>
<b>No</b>	35	74.5	40	75.5	
<b>Progression of disease by 6 cycles</b>	1	2.1	2	3.8	0.947 <sup>b)</sup>
<b>PTX</b>					
<b>Initial dose(mg/body)</b>	274.8		276.7		0.749 <sup>a)</sup>
<b>Relative dose intensity (%)</b>	92.4		94.6		0.105 <sup>a)</sup>
<b>CBDCA</b>					
<b>Initial dose(mg/body)</b>	592.9		614.1		0.330 <sup>a)</sup>
<b>Relative dose intensity (%)</b>	91.0		88.8		0.349 <sup>a)</sup>

TC paclitaxel+carboplatin; orig. original drug; gx. generic drug; PTX paclitaxel; CBDCA carboplatin

Data show therapy parameters in patients.

a) student's t-test

b) Fisher's exact test.

Table 3. Occurrence of adverse events

	orig.TC (N=47)	gx.TC (N=53)	OR of non-AE (95% CI)	p value <sup>a)</sup>
	Number (%)			
<b>Hematologic toxicities</b>				
<b>(grade 3-4)</b>				
<b>Anemia</b>	14(29.8%)	10(18.9%)	0.548(0.216-1.389)	0.244
<b>Neutropenia</b>	45(95.7%)	47(88.7%)	0.348(0.066-1.815)	0.276
<b>Thrombocytopenia</b>	11(23.4%)	8(15.1%)	0.582(0.211-1.589)	0.290
<b>Febrile Neutropenia</b>	3(6.4%)	2(3.8%)	0.575(0.092-3.600)	0.664
<b>Non-hematologic toxicities</b>				
<b>(grade 2-4)</b>				
<b>Acute kidney injury</b>	1(2.1%)	1(1.9%)	0.885(0.053-14.548)	1.000
<b>AST increased</b>	3(6.4%)	3(5.7%)	0.880(0.169-4.586)	1.000
<b>ALT increased</b>	6(12.7%)	6(11.3%)	0.872(0.261-2.915)	0.824
<b>Blood t-Bil increased</b>	1(2.1%)	1(1.9%)	0.885(0.053-14.548)	1.000
<b>Hypersensitivity/allergy</b>				
<b>PTX</b>	2(4.3%)	1(1.9%)	0.432(0.037-4.931)	0.600
<b>CBDCA</b>	0	0	-	-
<b>Pain (myalgia/arthralgia)</b>	32(68.1%)	34(64.2%)	0.839(0.365-1.926)	0.833
<b>Rash</b>	0	0	-	-

TC paclitaxel+carboplatin; orig. original drug; gx. generic drug; PTX paclitaxel; CBDCA carboplatin; OR Odds ratio; AST Aspartate Aminotransferase; ALT Alanine transaminase; t-Bil Total Bilirubin

Data show number of patients experiencing adverse events.

a) Fisher's exact test.



#### IV. 考察

先発品から後発品へ変更する最大のメリットは医療費の削減である。昨今、特に抗がん剤の分野において、治療費の高額にともなう医療経済への圧迫が問題となっており、後発医薬品への切り替えによる経済的な恩恵は非常に大きい。しかし、後発医薬品は生物学的同等性試験、溶出試験、安全性試験などのデータにより評価されているものの、添加物は同一ではなく、臨床試験での報告も義務付けられてはいない。また、報告数は非常に少ないものではあるが、後発医薬品への切り替えにより有害事象が増加した報告[59]もあり、後発医薬品における安全性は不安が残る。パクリタキセルの後発医薬品については様々な報告がある。本研究と違う製剤ではあるが、山本らはパクリタキセル[NK]にタキソールと組成の違う添加物が含まれていることに着目し、副作用の違いについてレトロスペクティブに調査を行い、結果として治療の安全性に大きな影響はなかったと報告している[60]が、当院で使用しているパクリタキセル製剤での報告は無く、同様に検討する必要があると考えられた。また、パクリタキセル製剤には添加物としてクレモホールが含有されており、アレルギーを誘発する要因となる。添加物に関しては先発医薬品と同等ではある必要は無く、使用しているクレモホールの差異が実臨床での使用に影響する可能性がある。加えて、後発医薬品への切り替えに際し、パクリタキセル、カルボプラチンそれぞれ製剤毎での比較報告はあるが、後発医薬品併用での安全性に関する報告は少なく、長期成績や2剤併用化での薬物動態など、後発品レジメンに関して十分なエビデンスが少ないなかで治療が行われているのが現状である。

今回 TC 療法を 1st line として使用される卵巣癌、また、治療の簡便性などから 1st line として使用されることが多い子宮頸癌、及び子宮体癌にがん種を制限することによって、性別、初回投与量を始めとした患者背景を比較的均一にして検討した。相対治療強度に有意な差は見られなかったことも併せると、両群間での比較に整合性があったと考える。

有害事象の比較に際しては、支持療法の変遷による影響が危惧され、特に相対用量強度、

発熱性好中球減少症は G-CSF 及び輸血による影響を受けている可能性がある。しかし、両群間で減量した患者数に差は無く、本研究で検討した項目においては支持療法の影響は少なかったことを示唆する。TC 療法には様々な有害事象が報告されており、この研究では中止・減量の原因となりやすい有害事象として、Grade3 以上の血液毒性及びアレルギー反応等を注視して検討を行った。結果として、血液毒性は全体的に先発品群で多く発現していたものの同等性が示唆される結果となった。非血液毒性について、後発医薬品への切り替えによりオッズ比は全体的に低下傾向であったものの、同等性は保証されなかった。本検討において重要であったアレルギー反応については、オッズ比 0.432(95%CI: 0.037-4.931)であった。オッズ比 0.432 で同等性を保証するためには各群で約 150 症例必要となる。症例数の不足及び単施設であることから、本報告はプレリミナリーの調査である。なお、本来であれば tri-weekly TC 療法の特徴的な有害事象である末梢神経障害も検討するべきではあるが、①多くがパクリタキセル起因であること、②末梢神経障害に対する支持療法の増加、③薬理的な有害事象であり、添加物の影響はアレルギー等と比較して軽微であると考えられること、④パクリタキセルの後発品製剤における末梢神経障害に関しては様々な比較報告があり、有意な差はないと結論付けられていること[61,62]、等から本検討では比較を割愛した。

両群で減量及び中止された割合や治療中の病勢進行についても有意な差は認められなかった。これらより、gx.TC 療法への変更後も先発品群と同等の安全性が示唆されたが、症例数の不足から同等性については保証されていない。今後はアレルギー反応のような血中濃度による影響を受けない副作用のみに焦点をあて、対象症例を拡大することで同等性を証明する必要がある。

## 総括

本研究では、レバミピドによる 5-FU 誘発性細胞死抑制機序の解明、乳癌骨転移患者におけるゾレドロン酸ゾレドロン酸治療中の SSE 発現に関する因子の探索及び婦人科腫瘍領域におけるパクリタキセル・カルボプラチン併用療法での後発品製剤安全性の検討を行った。

1. ヒト正常口腔ケラチノサイトにおいて、レバミピドによる 5-FU 誘発性細胞死抑制効果は、Akt/mTOR 経路の活性化を介した Bcl-2 及び Bcl-xL の発現増加、Bax 及び Bim の発現減少であることを示した。これらのことは、化学療法誘発性口内炎に対して、レバミピドが有用である可能性を示唆した。
2. 乳癌骨転移患者の中でもより骨指向性の高い乳癌患者においては、ゾレドロン酸治療中であっても SSE を発現する可能性が高いことが示唆された。一方、臨床病理学的特徴であるサブタイプや年齢、内分泌療法・化学療法の有無について SSE 発現率に差は見られなかった。今後、乳癌骨転移治療薬の個別化に繋がることを期待したい。
3. 婦人科パクリタキセル・カルボプラチンレジメンにおいて、後発品製剤であるパクリタキセル注射液「サワイ」®、カルボプラチン点滴静注液「NK」®の組み合わせは、先発品製剤と副作用発現率について同等性は保証されなかったものの、安全性には影響を与えなかった。これらのことはパクリタキセル・カルボプラチン併用療法での後発品製剤への切り替えにおいても、同様に使用できることを示唆した。

最後に、本研究結果がレバミピドの支持療法への臨床応用、ゾレドロン酸適正使用に関するエビデンス構築につながることを期待する。さらに、抗悪性腫瘍剤の後発品製剤における安全性解明に寄与し、がん化学療法における QOL の向上に貢献できることを期待する。

## 引用文献

1. Yuan A, Sonis S. Emerging therapies for the prevention and treatment of oral mucositis. *Expert Opin Emerg Drugs*, 19, 343-351, 2014.
2. Brake R, Starnes C, Lu J, Chen D, Yang S, Radinsky R, Borges L. Effects of palifermin on antitumor activity of chemotherapeutic and biological agents in human head and neck and colorectal carcinoma xenograft models. *Mol Cancer Res*, 6, 1337-1346, 2008.
3. Brizel D.M, Murphy B.A, Rosenthal D.I, Pandya K.J, Glück S, Brizel H.E, Meredith R.F, Berger D, Chen M.G, Mendenhall W. Phase II study of palifermin and concurrent chemoradiation in head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 26, 2489-2496, 2008.
4. Zheng C, Cotrim A.P, Sunshine A.N, Sugito T, Liu L, Sowers A, Mitchell J.B, Baum B.J. Prevention of radiation-induced oral mucositis after adenoviral vector-mediated transfer of the keratinocyte growth factor cDNA to mouse submandibular glands. *Clin Cancer Res*, 15, 4641-4648, 2009.
5. Yasuda T, Chiba H, Satomi T, Matsuo A, Kaneko T, Chikazu D, Miyamatsu H. Preventive effect of rebamipide gargle on chemoradiotherapy-induced oral mucositis in patients with oral cancer: a pilot study. *J Oral Maxillofac Res*, 2, e3, 2012.
6. Coleman R.E. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treat Rev*, 27, 165-176, 2001.
7. Kohno N, Aogi K, Minami H, Nakamura S, Asaga T, Iino Y, Watanabe T, Goessl C, Ohashi Y, Takashima S. Zoledronic acid significantly reduces skeletal complications compared with placebo in Japanese women with bone metastases from breast cancer: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*, 23, 3314-3321, 2005.

8. Brown J.E, Cook R.J, Lipton A, Costa L, Coleman R.E. Prognostic factors for skeletal complications from metastatic bone disease in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 123 (3), 767-779, 2010.
9. Bond C.A, Raehl C.L. Adverse Drug Reactions in United States Hospitals. *Pharmacotherapy*, 26(5), 601-608, 2006.
10. Classen D.C, Pestotnik S.L, Evans R.S, Lloyd J.F, Burke J.P. Adverse drug events in hospitalized patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA*, 277(4), 301-306, 1997.
11. Bates D.W, Spell N, Cullen D.J, Burdick E, Laird N, Petersen L.A, Small S.D, Sweitzer B.J, Leape L.L. The costs of adverse drug events in hospitalized patients. Adverse Drug Events Prevention Study Group. *JAMA*, 277(4), 307-311, 1997.
12. Saito I, Kitagawa R, Fukuda H, Shibata T, Katsumata N, Konishi I, Yoshikawa H, Kamura T. A phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus paclitaxel plus cisplatin in stage IVB, persistent or recurrent cervical cancer: Gynecologic Cancer Study Group/JapanClinical Oncology Group Study (JCOG0505). *Jpn J Clin Oncol*, 40, 90-93, 2010.
13. Naidu M.U, Ramana G.V, Rani P.U, Mohan I.K, Suman A, Roy P. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis—complicating the treatment of cancer. *Neoplasia*, 6, 423-431, 2004.
14. Al-Ansari S, Zecha J.A, Barasch A, de Lange J, Rozema F.R, Raber-Durlacher J.E. Oral mucositis induced by anticancer therapies. *Curr Oral Health Rep*, 2, 202–211, 2015.
15. Keefe D.M, Schubert M.M, Elting L.S, Sonis S.T, Epstein J.B, Raber-Durlacher J.E, Migliorati C.A, McGuire D.B, Hutchins R.D, Peterson D.E. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer*, 109, 820-831, 2007.

16. Arakawa T, Kobayashi K, Yoshikawa T, Tarnawski A. Rebamipide: overview of its mechanisms of action and efficacy in mucosal protection and ulcer healing. *Dig Dis Sci*, 43, 5S-13S, 1998.
17. Kim H.J, Kim J.H, Moon W, Park J, Park S.J, Song G.A, Han S.H, Lee J.H. Rebamipide attenuates 5-fluorouracil-induced small intestinal mucositis in a mouse model. *Biol Pharm Bull*, 38, 179-183, 2015.
18. Kobayashi T, Zinchuk V.S, Garcia del Saz.E, Jiang F, Yamasaki Y, Kataoka S, Okada T, Tsunawaki S, Seguchi H. Suppressive effect of rebamipide, an antiulcer agent, against activation of human neutrophils exposed to formyl-methionylleucyl-phenylalanine. *Histol Histopathol*, 15, 1067-1076, 2000.
19. Arakawa T, Higuchi K, Fujiwara Y, Watanabe T, Tominaga K, Sasaki E, Oshitani N, Yoshikawa T, Tarnawski A.S. 15th anniversary of rebamipide: looking ahead to the new mechanisms and new applications. *Dig Dis Sci*, 50, S3-S11, 2005.
20. Longley D.B, Harkin D.P, Johnston P.G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3, 330-338, 2003.
21. Bartucci M, Svensson S, Ricci-Vitiani L, Dattilo R, Biffoni M, Signore M, Ferla R, De Maria R, Surmacz E. Obesity hormone leptin induces growth and interferes with the cytotoxic effects of 5-fluorouracil in colorectal tumor stem cells. *Endocr Relat Cancer*, 17, 823-833, 2010.
22. Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Kuwano H. Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model. *Eur J Cancer*, 46, 1900-1909, 2010.
23. Chaitanya B, Pai K.M, Yathiraj P.H, Fernandes D, Chhapparwal Y. Rebamipide gargle in preventive management of chemo-radiotherapy induced oral mucositis. *Oral Oncol*,

72, 179-182, 2017.

24. Yokota T, Ogawa T, Takahashi S, Okami K, Fujii T, Tanaka K, Iwae S, Ota I, Ueda T, Monden N, Matsuura K, Kojima H, Ueda S, Sasaki K, Fujimoto Y, Hasegawa Y, Beppu T, Nishimori H, Hirano S, Naka Y, Matsushima Y, Fujii M, Tahara M. Efficacy and safety of rebamipide liquid for chemoradiotherapy-induced oral mucositis in patients with head and neck cancer: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase II study. *BMC Cancer*, 17, 314, 2017.

25. Raber-Durlacher J.E, von Bültzingslöwen I, Logan R.M, Bowen J, Al-Azri A.R, Everaus H, Gerber E, Gomez J.G, Pettersson B.G, Soga Y, Spijkervet F.K, Tissing W.J, Epstein J.B, Elad S, Lalla R.V. Systematic review of cytokines and growth factors for the management of oral mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer*, 21, 343-355, 2013.

26. Braun S, Krampert M, Bodó E, Kümin A, Born-Berclaz C, Paus R, Werner S. Keratinocyte growth factor protects epidermis and hair follicles from cell death induced by UV irradiation, chemotherapeutic or cytotoxic agents. *J Cell Sci*, 119, 4841-4849, 2006.

27. Watanabe T, Higuchi K, Hamaguchi M, Tanigawa T, Wada R, Tominaga K, Fujiwara Y, Arakawa T. Rebamipide prevents delay of acetic acid-induced gastric ulcer healing caused by *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Dig Dis Sci*, 47, 1582-1589, 2002.

28. Nagano Y, Matsui H, Muramatsu M, Shimokawa O, Shibahara T, Yanaka A, Nakahara A, Matsuzaki Y, Tanaka N, Nakamura Y. Rebamipide significantly inhibits indomethacin-induced mitochondrial damage, lipid peroxidation, and apoptosis in gastric epithelial RGM-1 cells. *Dig Dis Sci*, 50, S76-S83, 2005.

29. Naito Y, Kajikawa H, Mizushima K, Shimosawa M, Kuroda M, Katada K, Takagi T,

- Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Yoshida N, Matsui H, Yoshikawa T. Rebamipide, a gastro-protective drug, inhibits indomethacin-induced apoptosis in cultured rat gastric mucosal cells: association with the inhibition of growth arrest and DNA damage-induced 45 alpha expression. *Dig Dis Sci*, 50, S104-S112, 2005.
30. Kim H.J, Kim J.H, Moon W, Park J, Park S.J, Song G.A, Han S.H, Lee J.H. Rebamipide attenuates 5-fluorouracil-induced small intestinal mucositis in a mouse model. *Biol Pharm Bull*, 38, 179-183, 2015.
31. Ríos J.D, Shatos M.A, Urashima H, Dartt D.A. Effect of OPC-12759 on EGF receptor activation, p44/p42 MAPK activity, and secretion in conjunctival goblet cells. *Exp Eye Res*, 86, 629-636, 2008.
32. Watanabe T, Higuchi K, Taira K, Sasaki E, Shiba M, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Arakawa T. Rebamipide reduces delay in gastric ulcer healing in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Dig Dis Sci*, 50, S63-S69, 2005.
33. Hunter A.M, LaCasse E.C, Korneluk R.G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*, 12, 1543-1568, 2007.
34. Kuo M.T, Liu Z, Wei Y, Lin-Lee Y.C, Tatebe S, Mills G.B, Unate H. Induction of human MDR1 gene expression by 2-acetylaminofluorene is mediated by effectors of the phosphoinositide 3-kinase pathway that activate NF-kappaB signaling. *Oncogene*, 21, 1945-1954, 2002.
35. Stiles B.L. PI-3-K and AKT: onto the mitochondria. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 1276-1282, 2009.
36. Sarbassov D.D, Sabatini D.M. Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex. *J Biol Chem*, 280, 39505-39509, 2005.
37. Liu Y, Bi T, Dai W, Wang G, Qian L, Gao Q, Shen G. Oxymatrine synergistically



enhances the inhibitory effect of 5-fluorouracil on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Tumour Biol*, 37, 7589-7597, 2016.

38. Sun Z.P, Zhang J, Shi L.H, Zhang X.R, Duan Y, Xu W.F, Dai G, Wang X.J. Aminopeptidase N inhibitor 4cc synergizes antitumor effects of 5-fluorouracil on human liver cancer cells through ROS-dependent CD13 inhibition. *Biomed Pharmacother*, 76, 65-72, 2015.

39. Tsubaki M, Itoh T, Satou T, Imano M, Komai M, Ogawa N, Mukai J, Nishida S. Nitrogen-containing bisphosphonates induce apoptosis of hematopoietic tumor cells via inhibition of Ras signaling pathways and Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway. *Biochem Pharmacol*, 85, 163-172, 2013.

40. Tsubaki M, Komai M, Itoh T, Imano M, Sakamoto K, Shimaoka H, Ogawa N, Mashimo K, Fujiwara D, Takeda T, Mukai J, Sakaguchi K, Satou T, Nishida S. Inhibition of the tumour necrosis factor-alpha autocrine loop enhances the sensitivity of multiple myeloma cells to anticancer drugs. *Eur J Cancer*, 49, 3708-3717, 2013.

41. Ishihara T, Tanaka K, Tashiro S, Yoshida K, Mizushima T. Protective effect of rebamipide against celecoxib-induced gastric mucosal cell apoptosis. *Biochem Pharmacol*, 79, 1622-1633, 2010.

42. Terano A, Arakawa T, Sugiyama T, Suzuki H, Joh T, Yoshikawa T, Higuchi K, Haruma K, Murakami K, Kobayashi K. Rebamipide, a gastro-protective and anti-inflammatory drug, promotes gastric ulcer healing following eradication therapy for *Helicobacter pylori* in a Japanese population: a randomized, double-blind, placebocontrolled trial. *J Gastroenterol*, 42, 690-693, 2007.

43. Yang Y, Du J, Liu F, Wang X, Li X, Li Y. Role of caspase-3/E-cadherin in *Helicobacter pylori*-induced apoptosis of gastric epithelial cells. *Oncotarget*, 8, 59204-59216, 2017.

44. Terano A, Arakawa T, Sugiyama T, Suzuki H, Joh T, Yoshikawa T, Higuchi K, Haruma K, Murakami K, Kobayashi K. Rebamipide, a gastro-protective and anti-inflammatory drug, promotes gastric ulcer healing following eradication therapy for *Helicobacter pylori* in a Japanese population: a randomized, double-blind, placebocontrolled trial. *J. Gastroenterol*, 42, 690-693, 2007.
45. Tsubaki M, Satou T, Itoh T, Imano M, Yanae M, Kato C, Takagoshi R, Komai M, Nishida S. Bisphosphonate- and statin- induced enhancement of OPG expression and inhibition of CD9, M-CSF, and RANKL expressions via inhibition of the Ras/MEK/ERK pathway and activation of p38MAPK in mouse bone marrow stromal cell line ST2. *Mol. Cell Endocrinol*, 361, 219-231, 2012.
46. Brown J.E, Thomson C.S, Ellis S.P, Gutcher S.A, Purohit O.P, Coleman R.E. Bone resorption predicts for skeletal complications in metastatic bone disease. *Br J Cancer*, 89, 2031-2037, 2003.
47. Van Poznak C.H, Temin S, Yee G.C, Janjan N.A, Barlow W.E, Biermann J.S, Bosserman L.D, Geoghegan C, Hillner B.E, Theriault R.L, Zuckerman D.S, Von Roenn J.H. American Society of clinical Oncology executive summary of the clinical practice guideline update on the role of bone-modifying agents in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 29 (9), 1221-1227, 2011.
48. Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts A.M, Yu J, Klijn J.G, Foekens J.A, Martens J.W. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res*, 68 (9), 3108-3114, 2008.
49. Colleoni M, O'Neill A, Goldhirsch A, Gelber R.D, Bonetti M, Thürlimann B, Price K.N, Castiglione-Gertsch M, Coates A.S, Lindtner J, Collins J, Senn H.J, Cavalli F, Forbes J, Gudgeon A, Simoncini E, Cortes-Funes H, Veronesi A, Fey M, Rudenstam C.M.

Identifying breast cancer patients at high risk for bone metastases. *J Clin Oncol*, 18 (23), 3925-3935, 2000.

50. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, Abraham M, Medeiros Alencar V.H, Badran A, Bonfill X, Bradbury J, Clarke M, Collins R, Davis S.R, Delmestri A, Forbes J.F, Haddad P, Hou M.F, Inbar M, Khaled H, Kielanowska J, Kwan W.H, Mathew B.S, Mittra I, Müller B, Nicolucci A, Peralta O, Pernas F, Petruzelka L, Pienkowski T, Radhika R, Rajan B, Rubach M.T, Tort S, Urrútia G, Valentini M, Wang Y, Peto R. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet*, 381 (9869), 805-816, 2013.

51. Forbes J.F, Cuzick J, Buzdar A, Howell A, Tobias J.S, Baum M. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100month analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol*, 9 (1), 45-53, 2008.

52. Plunkett T.A, Smith P, Rubens R.D. Risk of complications from bone metastases in breast cancer. implications for management. *Eur J Cancer*, 36 (4), 476-482, 2000.

53. Coleman R.E, Smith P, Rubens R.D. Clinical course and prognostic factors following bone recurrence from breast cancer. *Br J Cancer*, 77 (2), 336-340, 1998.

54. Tanaka R, Yonemori K, Hirakawa A, Kinoshita F, Takahashi N, Hashimoto J, Kodaira M, Yamamoto H, Yunokawa M, Shimizu C, Fujimoto M, Fujiwara Y, Tamura K. Risk factors for developing skeletal-related events in breast cancer patients with bone metastases undergoing treatment with bone-modifying agents. *Oncologist*, 21 (4), 508-513, 2016.

55. Stopeck A.T, Lipton A, Body J.J, Steger G.G, Tonkin K, de Boer R.H, Lichinitser M, Fujiwara Y, Yardley D.A, Viniegra M, Fan M, Jiang Q, Dansey R, Jun S, Braun A.

Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol*, 28 (35), 5132-5139, 2010.

56. Lipton A, Fizazi K, Stopeck A.T, Henry D.H, Brown J.E, Yardley D.A, Richardson G.E, Siena S, Maroto P, Clemens M, Bilynskyy B, Charu V, Beuzeboc P, Rader M, Viniegra M, Saad F, Ke C, Braun A, Jun S. Superiority of denosumab to zoledronic acid for prevention of skeletal-related events: a combined analysis of 3 pivotal, randomised, phase 3 trials. *Eur J Cancer*, 48 (16), 3082-3092, 2012.

57. Amadori D, Aglietta M, Alessi B, Gianni L, Ibrahim T, Farina G, Gaion F, Bertoldo F, Santini D, Rondena R, Bogani P, Ripamonti C.I. Efficacy and safety of 12-weekly versus 4-weekly zoledronic acid for prolonged treatment of patients with bone metastases from breast cancer (ZOOM): a phase 3, open-label, randomised, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*, 14 (7), 663-670, 2013.

58. Burger R.A, Brady M.F, Bookman M.A, Fleming G.F, Monk B.J, Huang H, Mannel R.S, Homesley H.D, Fowler J, Greer B.E, Boente M, Birrer M.J, Liang S.X; Gynecologic Oncology Group. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med*, 365, 2473-2483, 2011.

59. Sekine I, Kubota K, Tamura Y, Asahina H, Yamada K, Horinouchi H, Nokihara H, Yamamoto N, Tamura T. Innovator and generic cisplatin formulation: comparison of renal toxicity. *Cancer Sci*, 102(1), 162-165, 2011.

60. Yamamoto D, Tsubota Y, Sueoka N, Yokoi T, Inoue K, Ohira M, Muranaka T. Comparison of a Safety Evaluation between Paclitaxel Injection NK and Taxol®. *Jpn J Cancer Chemother*, 40(7), 959-961, 2013.

61. Tsukiyama I, Hotta K, Takeuchi M, Onishi M, Toyama Y, Saito H, Sai Y, Miyamoto

K, Hasegawa T. Evaluation of safety in clinical use of generic paclitaxel [NK] for injection.

*Jpn J Cancer Chemother*, 39(4), 613-617, 2012.

62. Takahara S, Yamamoto H, Tokushima Y, Shiba E. Safety Evaluation of Paclitaxel

Injection NK in Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *Jpn J Cancer Chemother*, 36(11),

1851-1856, 2009.

## 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 薬物治療学研究室 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、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 医療薬剤学分野 小竹 武 教授、近畿大学薬学部 化学療法学研究室 中山 隆志 教授に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究に多大な御援助を賜りました近畿大学薬学部 医療薬学科 教育専門部門 松野 純男 教授、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。

また、臨床研究に際し、終始お世話になりました森嶋 祥之 薬局長をはじめとする近畿大学医学部附属病院薬剤部の諸先生方に感謝致します。さらに病院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7大学連携個別化がん医療実践者養成プラン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。

