

# 博士学位論文

造血器腫瘍細胞におけるスタチンのアポトーシス  
誘導機序の解明とがん化学療法における支持療法の  
評価解析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

藤原 大一郎

## 目次

序論.....	1
<b>第1章</b> <b>スタチンによるヒト造血器腫瘍細胞におけるアポトーシス誘導機序                   解明に関する研究.....</b>	<b>4</b>
I. 緒言.....	4
II. 試薬および方法.....	6
1. 試薬.....	6
2. 細胞培養.....	6
3. Trypan blue dye exclusion assay.....	6
4. Annexin-V apoptosis assay .....	7
5. Caspase-9 および caspase-3 活性の測定.....	7
6. ミトコンドリア膜電位 $\Delta\Psi_m$ の測定.....	7
7. プロテアソーム活性の測定.....	7
8. Western blotting.....	8
9. 免疫沈降.....	8
10. 細胞周期分析.....	9
11. 統計学的解析.....	9
III. 結果.....	10
1. スタチンによるミトコンドリアを介したアポトーシス誘導 効果.....	10
2. スタチンによる GGPP 生合成阻害によるアポトーシス誘導 効果.....	12
3. スタチンによる Ras シグナル伝達経路阻害を介した Bim および p27 発現増加.....	13
IV. 考察.....	17
<b>第2章</b> <b>Prognostic nutritional index を使用した日本人頭頸部癌患者における                   化学放射線療法中および化学放射線療法後の栄養状態の客観的評価                   の検討.....</b>	<b>20</b>

I. 緒言.....	20
II. 方法.....	22
1. 対象患者と研究デザイン.....	22
2. 調査項目.....	22
3. 統計学的解析.....	23
4. 倫理的配慮.....	23
III. 結果.....	24
1. 患者背景.....	24
2. 治療開始前と治療終了時における栄養状態の変化.....	25
3. 粘膜炎の程度による栄養状態の変化.....	26
4. 治療終了後から退院までの日数.....	27
5. 退院時の PNI のカットオフ値.....	28
IV. 考察.....	29
<b>第3章    FEC100 療法翌日のペグフィルグラスチム投与が好中球数に与える           影響.....</b>	<b>32</b>
I. 緒言.....	32
II. 対象と方法.....	34
1. 調査方法.....	34
2. G-CSF 製剤の投与方法と 1 コース目の好中球数の測定.....	34
3. 統計学的解析.....	34
4. 倫理的配慮.....	35
III. 結果.....	36
IV. 考察.....	39
総括.....	42

引用文献.....44

謝辭

## 序論

造血器腫瘍は、主として白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫に大きく分類され、その治療として放射線療法および化学療法が行われている。特に化学療法においては、治癒を目指した治療が積極的に行われており、造血幹細胞移植も治療の選択肢の1つとなっている。しかし、これらの集学的治療を用いても5年生存率は白血病で39.2%、悪性リンパ腫で65.5%、多発性骨髄腫で36.4%であり、治療法の改善が必要となっている。造血器腫瘍の発症や病態形成には、低分子GタンパクであるRasの関与が報告されている [1,2]。Rasは下流のシグナル伝達を活性化させることで、細胞の生存・増殖を促進することから、Rasの恒常的活性化あるいは下流のシグナル伝達の活性化を阻害することにより、造血器腫瘍に対して細胞死を誘導できる可能性が考えられる。

3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA)還元酵素阻害剤であるスタチンは、脂質異常症や心血管疾患の治療薬として汎用されている [3,4]。近年、スタチンは婦人科癌、食道癌、乳癌、多発性骨髄腫、大腸癌、肺癌等様々ながん種において死亡率や予後を改善することが報告されている [5-10]が、その機序は明確にされていない。このことから、スタチンによるアポトーシス誘導機序を解明できれば、造血器腫瘍における臨床応用が期待できる。

臨床検査値は、患者の状態、副作用等を評価する際に有用な指標である。特にがん化学療法においては、投与量の決定や自覚症状のない副作用の早期発見、治療効果の判断や投与可否の判断等、様々な面で活用される。そのため、薬剤師においても臨床検査値を評価し、適切な薬学的管理を行うことが求められる。

頭頸部癌に対する標準的な治療は、手術療法、放射線療法、化学療法を組み合

合わせた集学的治療である。放射線療法と化学療法を同時に行う **concurrent chemoradiotherapy (CCRT)** は、抗がん薬の放射線感受性増強作用による放射線治療の効果増強を期待して行われるが、副作用としてほぼ 100%の頻度で口腔粘膜炎を発症することが報告されている [11]。また、入院にて頭頸部癌に対して CCRT を施行される患者では、血液毒性からの回復だけでなく、栄養状態の改善も退院する際には重要である。栄養状態の評価は、一般的に食事摂取量や体重の変化等によって主観的に評価されるが、経時的な栄養状態の評価では評価者のバイアスを避けるため、より客観的な指標が必要とされる。

医薬品の投与量は、第Ⅱ相試験の結果をもとに設定される。そのため、日本と海外において同じ医薬品でも、その投与量は国によって異なる場合がある。したがって、海外と承認用量が異なる医薬品については、日本人におけるデータの集積が重要となる。

乳癌化学療法の FEC100 療法は、**granulocyte-colony stimulating factor(G-CSF)**適正使用ガイドライン [12]において発熱性好中球減少症(febrile neutropenia : FN)の発症率が 20%以上とされ、ペグフィルグラスチム等の G-CSF 製剤を一次予防的に用いることが推奨されている。ペグフィルグラスチムは国内第Ⅱ相試験の結果より国内では 3.6 mg が投与量として承認されているが、海外では 6.0 mg が投与量として承認されている。また海外では、FEC100 療法においてペグフィルグラスチムを投与した群の方が従来の G-CSF 製剤を使用した群よりも重篤な好中球減少が起こることが報告されている [13]。そのため、日本人における FEC100 療法において、ペグフィルグラスチムを使用した際の安全性と忍容性に関する検討が必要である。

第 1 章では、種々の造血器腫瘍細胞を用いて、スタチンによるヒト造血器腫瘍細胞におけるアポトーシス誘導機序について検討した。また、第 2 章では、入

院での頭頸部癌治療において、通常、定期的に行われる血液検査の結果を用いて CCRT 施行時および施行後の栄養状態について客観的に評価を行い、客観的な退院基準の設定について検討した。さらに、第 3 章では、日本人の乳癌 FEC100 療法においてペグフィルグラスチムを一次予防的投与した場合の安全性と忍容性についてレトロスペクティブに調査し、従来の G-CSF 製剤であるレノグラスチムを使用した場合と比較して評価を行った。

以下に、本検討の内容を詳述する。

# 第1章

## スタチンによるヒト造血器腫瘍細胞におけるアポトーシス 誘導機序解明に関する研究

### I. 緒言

3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素阻害剤であるスタチンは脂質異常症や心血管疾患の治療薬として汎用されている [3,4]。近年、スタチンは婦人科癌、食道癌、乳癌、多発性骨髄腫、大腸癌、肺癌等様々ながん種において死亡率や予後を改善することが報告されている [5-10]。このことから、スタチンは抗がん薬あるいは補助療法における併用薬として有用である可能性が考えられる。

スタチンは HMG-CoA 還元酵素を阻害することによりメバロン酸の生合成を抑制することで、メバロン酸経路の中間生成物である farnesyl pyrophosphate (FPP)、geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP)、ubiquinone、dolichol および squalene の産生を減少させる。これらの中間生成物は細胞内シグナル伝達、細胞呼吸、糖タンパク質の産生、細胞膜の構成など、様々な細胞機能を制御している [14,15]。化学誘発性肝細胞癌のラットモデルにおいて、ロバスタチンは ubiquinone の産生を抑制することで肝腫瘍発生および腫瘍増殖を減少させることが報告されている [16]。また、dolichol はヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞においてシンバスタチンによる小胞体ストレス応答およびアポトーシス誘導を抑制することが示されている [17]。ロバスタチンはヒト造血器腫瘍細胞株において細胞増殖を阻害し、細胞周期の停止を引き起こすことも報告されている [18]。FPP や GGPP



は Ras などの低分子量 GTPase のプレニル化に関与しており、スタチンは GGPP の生合成阻害により Ras のプレニル化およびその下流シグナル伝達因子である extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)、Akt および mTOR の活性化を抑制することでアポトーシスを誘導することが示されている [19-24]。さらに、ラクトン構造を有するスタチンはプロテアソーム活性を抑制し、アポトーシスを誘導することが報告されている [25]。しかし、スタチンによるアポトーシス誘導機序の詳細なメカニズムは不明である。本研究では、ヒト造血器腫瘍細胞株におけるスタチンのアポトーシス誘導機序の詳細なメカニズムについて検討した。

## II. 試薬および方法

### 1. 試薬

フルバスタチン、シンバスタチンおよび MG132 は Calbiochem から購入した。メバロン酸ラクトン (MVA)、FPP、GGPP、squalene、ubiquinone、isopentenyladenine および dolichol は Sigma から購入した。U0126 は Promega から購入した。ラパマイシン、z-VAD-fmk、z-LEHD-fmk および z-DEVE-fmk は Wako から購入した。これらの試薬を dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 0.05 M, pH 7.4) で再懸濁し、シリンジフィルター(0.45  $\mu$ m, IWAKI GLASS) でろ過滅菌したものを使用した。

### 2. 細胞培養

HL-60 (ヒト急性前骨髄球性白血病) および U937 (ヒト組織球性リンパ腫) 細胞は Riken Cell Bank から入手した。IM9 (ヒト多発性骨髄腫) 細胞は Health Science Research Resources Bank から入手した。ARH77 (ヒト多発性骨髄腫) 細胞は DS Pharma Biomedical から入手した。これらの細胞を 10% fetal bovine serum、100  $\mu$ g/mL penicillin、100 U/mL streptomycin および 25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES; pH 7.4) を含む RPMI-1640 (Sigma) 培養液にて、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

### 3. Trypan blue dye exclusion assay

細胞の生存率は trypan blue dye exclusion assay により判定した。各細胞を 96 well プレートに播種し、24 時間培養後、フルバスタチンおよびシンバスタチンを細胞に添加し、一定時間培養した。その後、等量の細胞懸濁液と trypan blue 溶液を緩やかに混合し、生存細胞と死細胞を計数した。

#### 4. Annexin-V apoptosis assay

アポトーシスは、Annexin V-FITC apoptosis detection kit を用いて測定した。細胞を PBS で 2 回洗浄後、Annexin V-FITC を添加し、細胞を再懸濁した。その後、15 分間室温でインキュベートし、BD LSRFortessa フローサイトメーターを用いて分析した。

#### 5. Caspase-9 および caspase-3 活性の測定

Caspase-9 と caspase-3 酵素活性は caspase-9 fluorometric assay kit と caspase-3 fluorometric assay kit を用いて測定した。HL-60 細胞をフルバスタチンまたはシンバスタチンで 48 時間処理した後、PBS で洗浄し、cell lysis buffer で溶解した。細胞溶解液に LEHD-AFC (caspase-9 の基質)および DEVD-AFC (caspase-3 の基質)を添加し 37°C、1 時間インキュベートした。その後、fluorescence spectrophotometer (F-4010) を使用し、励起光 400 nm、蛍光 505 nm で蛍光定量的に測定を行った。

#### 6. ミトコンドリア膜電位 $\Delta\Psi_m$ の測定

ミトコンドリア膜電位 $\Delta\Psi_m$  を測定するため、細胞を 37°C、5 分 3,3-dihexyloxacarboocyanine iodide でインキュベートした。細胞は PBS で洗浄後、BD LSRFortessa フローサイトメーターにて、励起光 482 nm、蛍光 504 nm で解析を行った。

#### 7. プロテアソーム活性の測定

カスパーゼ様、トリプシン様、キモトリプシン様活性を測定するために、HL-60 細胞をフルバスタチン、シンバスタチンまたは MG132 で 24 時間処理後、PBS

で1回洗浄した。洗浄後の細胞ペレットに lysis buffer を添加し、よく混和して細胞を破壊した。またタンパク定量は BCA Protein Assay (PIERCE: USA)にて行った。

細胞抽出液に reaction buffer を添加後、10 $\mu$ M の蛍光発生基質 Z-Leu-Leu-Glu-AMC (カスパーゼ様)、Bz-Val-Gly-Arg-AMC (トリプシン様)、または Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (キモトリプシン様)で1.5時間インキュベートした後、fluorescence spectrophotometer (F-4010)を用いて励起光 360 nm、蛍光 465 nm で蛍光定量的に測定した。

## 8. Western blotting

様々な条件下において処理した HL-60 細胞を cell lysis buffer で溶解し、BCA protein assay kit を用いて得られた細胞溶液のタンパク濃度を決定した。タンパクサンプルを SDS-polyacrylamide ゲル中にて電気泳動で分画し、polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane に転写した。この PVDF membrane を、3%スキムミルクを含む溶液でブロッキングを行い、各抗体とそれぞれ4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。その後、PVDF membrane を horseradish peroxidase 結合二次抗体と室温で1時間インキュベートした。タンパクは Luminata Forte にて可視化した。

## 9. 免疫沈降

様々な条件下で処理した HL-60 細胞を cell lysis buffer で溶解した。その後、protein A-sepharose と抗 ubiquitin 抗体を結合させたものとインキュベートした後、western blotting にて解析した。

## 10. 細胞周期分析

細胞周期は propidium iodide を用いて解析した。細胞を 2 回 PBS で洗浄した後、70%エタノールで固定した。24 時間後、細胞を 2 回 PBS で洗浄し、DNAase-free RNAase A および propidium iodide を添加した後、15 分間インキュベートし、次いで BD LSRFortessa フローサイトメーターを用いて解析した。

## 11. 統計学的解析

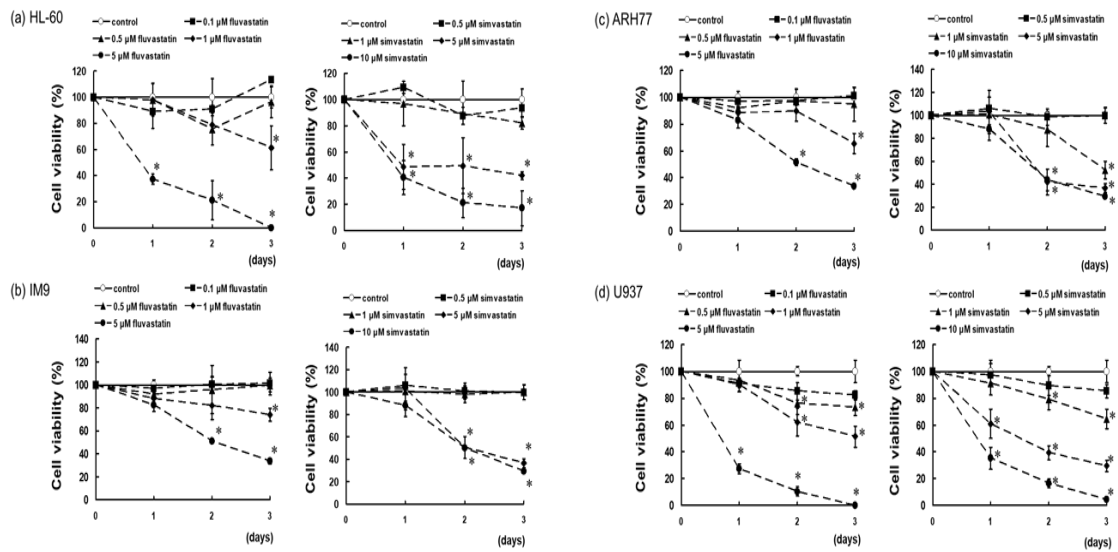
それぞれの実験で得られた結果は平均値±標準偏差で示した。多群間の検定には ANOVA with Dunnett 検定を使用した。危険率が 5%未満のとき、有意差ありとした。

### III. 結果

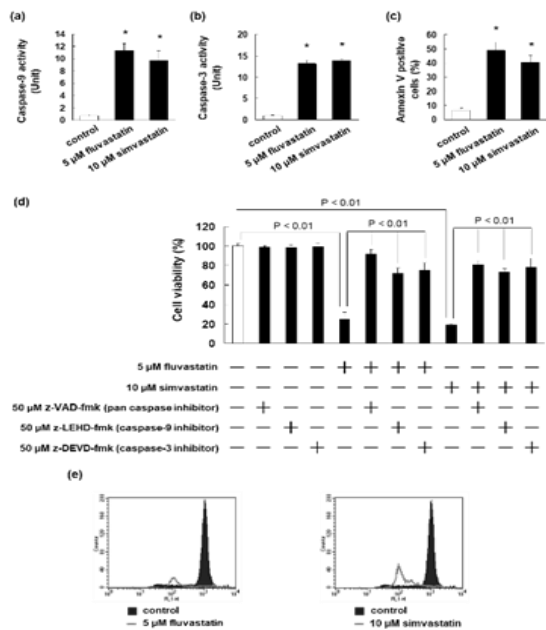
#### 1. スタチンによるミトコンドリアを介したアポトーシス誘導効果

フルバスタチンとシンバスタチンは HL-60、IM9、ARH77 および U937 細胞において、濃度および時間依存的に細胞死を誘導することが認められた (Figure 1)。また、フルバスタチンおよびシンバスタチン添加により caspase-9 活性、caspase-3 活性および Annexin V 陽性細胞数は顕著に増加することを確認した (Figure 2a-c)。さらにスタチンによるアポトーシス誘導において caspase-9 および caspase-3 の関与を明らかにするために、スタチンと pan-caspase 阻害剤 (z-VAD-fmk)、caspase-9 選択的阻害剤 (z-LEHD-fmk) および caspase-3 選択的阻害剤 (z-DEVD-fmk) を併用した結果、各種 caspase 阻害剤により、スタチンによるアポトーシスを抑制することが認められた (Figure 2d)。

次に、スタチンがミトコンドリア膜電位に及ぼす影響について検討した結果、フルバスタチンおよびシンバスタチン添加によりミトコンドリア膜電位の低下が認められた (Figure 2e)。



**Figure 1.** Statins induce cell death in hematopoietic tumor cell lines. Cell viability of fluvastatin or simvastatin-treated (a) HL-60, (b) IM9, (c) ARH77, and (d) U937 cells as measured by the trypan blue dye exclusion assay. The cells were treated with various concentrations of fluvastatin or simvastatin for 1, 2, and 3 days. The results are representative of 5 independent experiments. \* $p < 0.01$  vs. control (ANOVA with Dunnett's test).



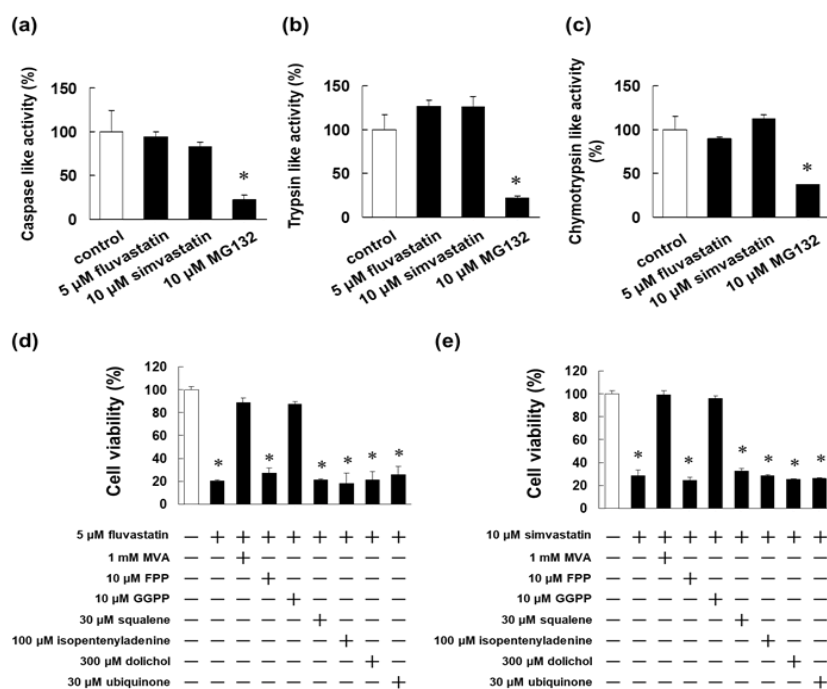
**Figure 2.** Increase in Annexin V-positive cells and caspase-3 activities are associated with statin-induced cell death. (a and b) HL-60 cells were exposed to the indicated concentrations of fluvastatin and simvastatin for 48 h. (a) Caspase-9 and (b) caspase-3 activities are expressed as the amount of the caspase-9 substrate LEHD-AFC and caspase-3 substrate DEVD-AFC proteolytically cleaved in picomoles per hour per mg of protein. The results are representative of 5 independent experiments. \* $p < 0.01$  vs. control (ANOVA with Dunnett's test). (c) HL-60 cells were exposed to the indicated concentrations of fluvastatin and simvastatin for 48 h and then stained with an Annexin V apoptosis assay kit. The results are representative of 5 independent experiments. \* $p < 0.01$  vs. control (ANOVA with Dunnett's test). (d) HL-60 cells were treated with fluvastatin and simvastatin for 72 h in the presence or absence of 50 μM z-VAD-fmk, 50 μM z-LEHD-fmk, or 50 μM z-DEVE-fmk, and the cell viability was measured. The results are representative of 5 independent experiments. \* $p < 0.01$  vs. control (ANOVA with Dunnett's test). (e) Mitochondrial transmembrane potential is decreased in cells treated with fluvastatin or simvastatin for 48 h.

## 2.スタチンによる GGPP 生合成阻害によるアポトーシス誘導効果

ラクトン環を有するスタチンは低分子 G タンパクのプレニル化抑制ではなく、プロテアソーム活性の阻害を介してアポトーシスを誘導することが報告されている [25]。そこで、スタチンが HL-60 細胞においてプロテアソーム活性を阻害するか否か検討した結果、スタチンは、カスパーゼ様活性、トリプシン様活性、キモトリプシン様活性を抑制しないことを確認した (Figure 3a-c)。

スタチンはメバロン酸経路中の HMG-CoA 還元酵素を阻害することが知られている。メバロン酸経路は、細胞増殖および代謝に必須のコレステロールやプレニル化に関与するイソプレノイドを産生するため、各メバロン酸経路中間産物がスタチンのアポトーシス誘導を阻害するか MVA、FPP、GGPP、squalene、isopentenyladenine、dolichol および ubiquinone を前処理し検討を行った。その結果、FPP、squalene、isopentenyladenine、dolichol および ubiquinone の存在下でスタチンと併用した場合、スタチンによるアポトーシス誘導は阻害されなかったが、MVA および GGPP で前処置した場合、スタチンによるアポトーシス誘導が有意に阻害された(Figure 3d-e)。





**Figure 3.** Statins induced apoptosis by suppressing GGPP biosynthesis. (a-c) Non inhibition of the proteasome activity by fluvastatin and simvastatin. After treatment of 5  $\mu$ M fluvastatin, 10  $\mu$ M simvastatin, and 10  $\mu$ M MG132 for 24 h at 37  $^{\circ}$ C, HL-60 cells were lysated. Cell extracts were incubated for 1.5 h, at which point the fluorogenic peptide substrate for the (a) caspase-like activity, (b) trypsin-like activity, and (c) chymotrypsin-like activity of the proteasome 7-AMC was added to the extracts. The fluorescence assays (excitation, 360 nm; emission, 465 nm) were conducted at room temperature. These results are representative of 5 independent experiments. \* $p$  < 0.01 vs. control (ANOVA with Dunnett's test). (d and e) HL-60 cells were pretreated with 1 mM mevalonate (MVA), 10  $\mu$ M farnesyl pyrophosphate (FPP), 10  $\mu$ M geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), 30  $\mu$ M squalene, 100  $\mu$ M isopentenyladenine, 300  $\mu$ M dolichol, or 30  $\mu$ M ubiquinone for 4 h and then with (d) fluvastatin or (e) simvastatin for 72 h. These results are representative of 5 independent experiments. \* $p$  < 0.01 vs. control (ANOVA with Dunnett's test).

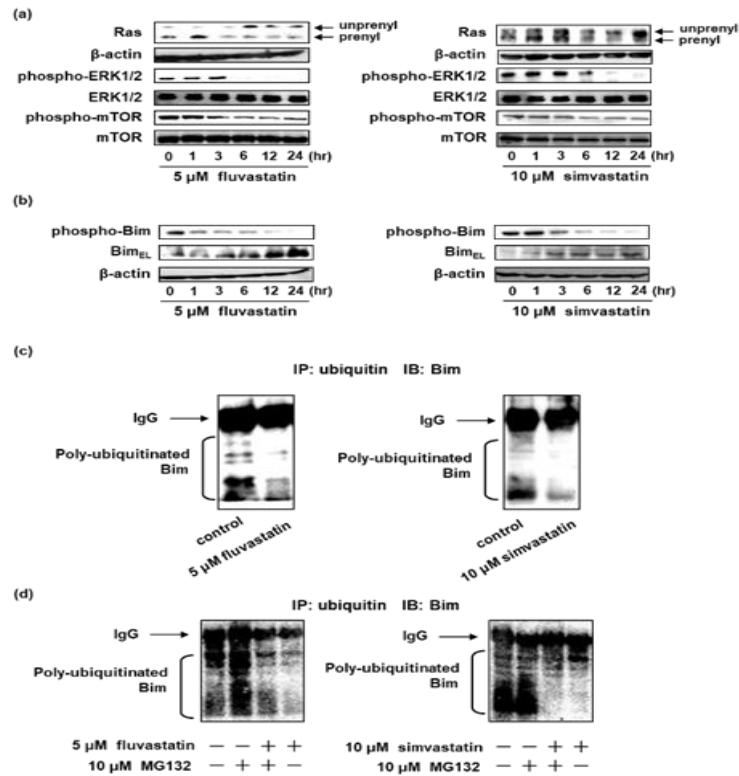
### 3.スタチンによる Ras シグナル伝達経路阻害を介した Bim および p27 発現増加

スタチン誘導アポトーシスに関与する分子を同定するため、Ras タンパクのプレニル化およびその下流シグナル伝達因子の活性動態を検討した。フルバスタチンおよびシンバスタチンは Ras のプレニル化を阻害することで、リン酸化 ERK1/2 および mTOR の発現を抑制することを確認した (Figure 4a)。

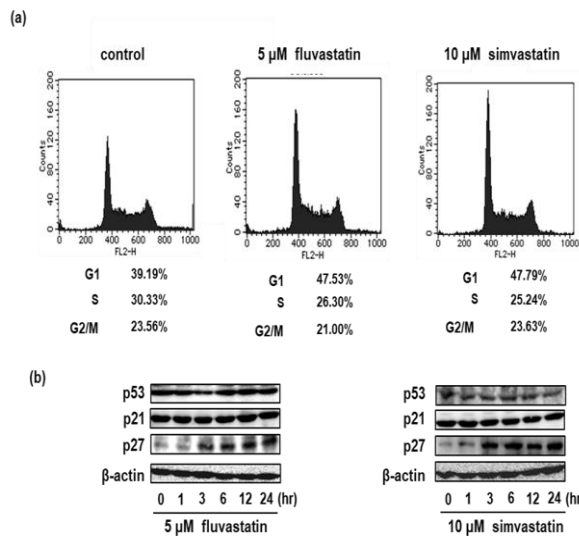
Bcl-2 ファミリータンパクは、ミトコンドリアを介したアポトーシス経路の必

須成分として知られている。我々は、頭頸部癌および造血器腫瘍においてスタチンまたは窒素含有ビスホスホネートが Ras/ERK および Ras/mTOR 経路を阻害し、Bim の発現を増強させることを示している [23,24]。ERK1/2 の活性化は Bim<sub>EL</sub> のリン酸化を促進することで、ユビキチン化を誘導しプロテアソームにおける Bim<sub>EL</sub> の分解を亢進させ [26,27]、mTOR は Bim タンパク発現を調節する [28]。スタチンによるアポトーシス誘導での Bim<sub>EL</sub> の関与を確認するため、Bim<sub>EL</sub> の発現を検討した。その結果、スタチン添加により Bim<sub>EL</sub> 発現が増加することともに、リン酸化 Bim を抑制することを確認した (Figure 4b)。また、スタチンはリン酸化 Bim の抑制を介して Bim のユビキチン化を阻害することを確認した (Figure 4c)。さらに、プロテアソーム阻害剤である MG132 はポリユビキチン化 Bim の発現を増強したが、スタチンによる Bim ユビキチン化の発現低下には影響を与えなかった (Figure 4d)。これらの結果は、スタチンが Ras/ERK および Ras/mTOR 経路の抑制を介して Bim<sub>EL</sub> の発現を増加させることでアポトーシスを誘導していることを示している。

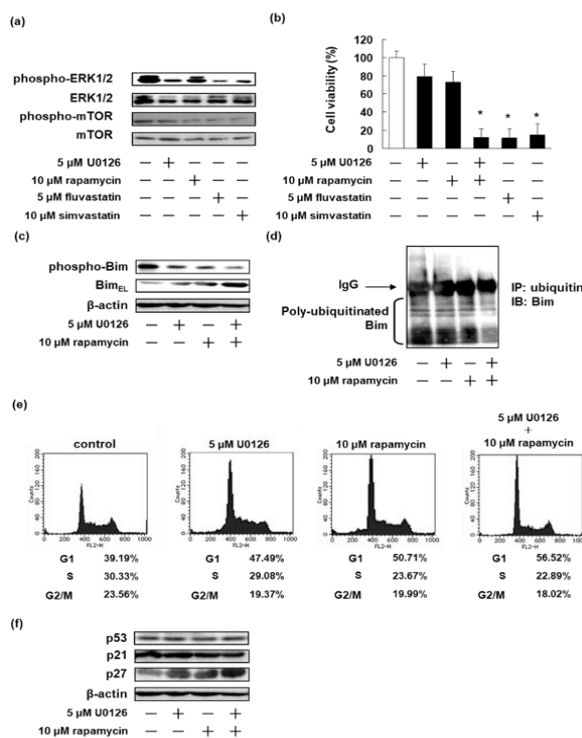
ERK1/2 および mTOR の活性は、cyclin-dependent kinase inhibitor である p21 および p27 発現の調節を介して細胞周期の進行を促進する [29-31]ことから、フルバスタチンおよびシンバスタチン処理による細胞周期阻害を検討した。フルバスタチンおよびシンバスタチンは G1 期で細胞周期を停止し、G1 から S 期へのチェックポイントを担う重要な調節因子である p27 発現を増強したが、p53 および p21 の発現に変化は認められなかった (Figure 5)。さらに、MEK 阻害剤である U0126 および mTOR 阻害剤であるラパマイシンとの併用は、G1 期での細胞周期の停止とアポトーシスを誘導し、リン酸化およびユビキチン化 Bim 発現を低下させることを確認した (Figure 6)。



**Figure 4.** Statins specifically increase the expression of Bim by suppressing the activation of the Ras/ERK and Ras/mTOR pathways in HL-60 cells. (a) HL-60 cells were treated with fluvastatin or simvastatin for 1, 3, 6, 12, or 24 h. Control cells were treated with PBS and cultured in serum-containing medium for 24 h. Whole-cell lysates were generated and immunoblotted with antibodies against Ras, phosphorylated ERK1/2 (phospho-ERK1/2), phosphorylated mTOR (phospho-mTOR), ERK1/2, and mTOR. (b) Whole-cell lysates were generated and immunoblotted with antibodies against phosphorylated-Bim (phospho-Bim), Bim<sub>EL</sub>, and  $\beta$ -actin (internal standard). (c) Ubiquitylation of Bim in HL-60 cells. HL-60 cells were incubated with fluvastatin and simvastatin for 24 h. Control cells were treated with PBS and cultured in serum-containing medium for 24 h. Proteins immunoprecipitated with anti-ubiquitin antibody were immunoblotted with anti-Bim antibody. Ubiquitylated Bim was detected as upper-shifted bands in anti-Bim blotting. (d) Effect of MG132 on statin-induced down-regulation of Bim ubiquitylation. HL-60 cells were incubated with MG132. After 4 h, cells were treated with fluvastatin and simvastatin for 24 h. Proteins immunoprecipitated with the anti-ubiquitin antibody were immunoblotted with the anti-Bim antibody. Ubiquitylated Bim was detected as an upper-shifted band in anti-Bim blotting.



**Figure 5.** Induction of cell cycle arrest at G1 phase and p27 expression by statins on HL-60 cells. (a) HL-60 cells were treated with fluvastatin or simvastatin, for 24 h. The cell cycle distribution changes were monitored by flow cytometry. Relative percentages of cells in each phase of the cell cycle as indicated. (b) HL-60 cells were treated with fluvastatin or simvastatin for 1, 3, 6, 12, or 24 h. Whole-cell lysates were generated and immunoblotted with antibodies against p53, p21, p27, and  $\beta$ -actin.



**Figure 6.** U0126 and rapamycin induce cell death via Bim and p27 expression. (a) HL-60 cells were treated with 5  $\mu$ M U0126, 10  $\mu$ M rapamycin, 5  $\mu$ M fluvastatin, and 10  $\mu$ M simvastatin for 24 h. Whole-cell lysates were generated and immunoblotted with antibodies against phosphorylated ERK1/2 (phospho-ERK1/2), phosphorylated mTOR (phospho-mTOR), and mTOR. (b) HL-60 cells were treated with 5  $\mu$ M U0126, 10  $\mu$ M rapamycin, 5  $\mu$ M fluvastatin, and 10  $\mu$ M simvastatin for 24 h. Cell viability was measured by the trypan blue dye exclusion assay. The results are representative of 5 independent experiments. \* $p$  < 0.01 vs. control (ANOVA with Dunnett's test). (c and d) HL-60 cells were treated with U0126 and rapamycin for 24 h. (c) Whole-cell lysates were generated and immunoblotted with antibodies against phospho-Bim, Bim<sub>EL</sub>, and  $\beta$ -actin. (d) Proteins immunoprecipitated with anti-ubiquitin antibody were immunoblotted with anti-Bim antibody. Ubiquitylated Bim was detected as upper-shifted bands in anti-Bim blotting. (e) HL-60 cells were treated with U0126 and rapamycin for 24 h. The cell cycle distribution changes were monitored by flow cytometry. Relative percentages of cells in each phase of the cell cycle as indicated. (f) HL-60 cells were treated with U0126 and rapamycin for 1, 3, 6, 12, or 24 h. Whole-cell lysates were generated and immunoblotted with antibodies against p53, p21, p27, and  $\beta$ -actin.

#### IV. 考察

本研究では、スタチンがミトコンドリア膜電位の低下、caspase-9 および caspase-3 活性の増強、MVA および GGPP 生合成の抑制を介してアポトーシスを誘導するとともに G1 期で細胞周期を停止させることを示した。しかし、プロテアソーム阻害との相関は確認されなかった。ロバスタチンは乳癌細胞においてプロテアソーム活性を阻害することで p21 および p27 の発現を促進しアポトーシスを誘導するが、メバロン酸経路中間産物の抑制は細胞死に関与しないことが報告されている [32]。しかし、シンバスタチンはバーキットリンパ腫細胞においてプロテアソーム活性を阻害せず、GGPP 生合成を抑制することによって細胞死を引き起こすことが示されている [33]。さらに我々は以前の研究において、メバスタチンがメバロン酸経路中の GGPP の生合成阻害および ERK1/2 の活性阻害を介してアポトーシスを誘導することを明らかにしている [22]。これらの知見は、スタチンが造血器腫瘍において GGPP 生合成阻害を介した G1 期での細胞周期の停止およびミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導することを示唆している。

スタチンによる細胞死誘導は small GTPase のプレニル化の阻害が関与していることが示されている [34-36]。GGPP は Ras の膜への移行に重要な因子であり、GGPP の生合成阻害は、細胞質から細胞膜への Ras の移行を阻害し、それによって Ras を介したシグナル伝達を抑制する [37,38]。本研究結果により、スタチンが Ras のプレニル化を抑制し、ERK1/2 および mTOR の活性を阻害することを明らかにした。我々は、以前の研究により頭頸部癌細胞株においてスタチンがリン酸化 ERK1/2 および mTOR の発現を減少させることを報告している [24]。また、窒素含有ビスホスホネートが GGPP 生合成の阻害によって Ras のプレニル化、ERK1/2 および mTOR の活性を抑制することを示している [23]。これらの知

見は、スタチンが造血器腫瘍において Ras/ERK および Ras/mTOR 経路の抑制を介してアポトーシスを誘導することを示唆している。

ミトコンドリアを介したアポトーシスは Bcl-2 および Bim などの Bcl-2 ファミリータンパクが関与する。我々は、ERK1/2 および mTOR 活性阻害が Bim の発現とミトコンドリアおよびカスパーゼ依存経路を介したアポトーシスの誘導を促進することを示している [23,24]。本研究では、スタチンが Bim のリン酸化の抑制を介して Bim のユビキチン化を阻害することにより Bim<sub>EL</sub> の発現を増加させることを明らかにした。さらに、U0126 とラパマイシンを併用することで、Bim のユビキチン化およびリン酸化を抑制し、Bim<sub>EL</sub> の発現を促進させることでアポトーシスを誘導することを確認した。ERK1/2 による Bim<sub>EL</sub> のリン酸化は、Bim のユビキチン化およびプロテアソーム経路を介した分解を促進し [26]、mTOR の活性化は Bim の発現を調節することが知られている [39]。さらに、選択的 MEK1/2 阻害剤である PD184352 は、ERK1/2 および Bim のリン酸化を阻害することによって MG132 が誘導する Bim のユビキチン化を減少させることが報告されている [26]。これらの知見は、スタチンが Ras/ERK および Ras/mTOR 経路を阻害することにより、Bim のリン酸化およびユビキチン化を抑制し、Bim<sub>EL</sub> の発現を増加させることを示している。このことから、スタチンは Bim 発現を増強させることによってアポトーシスを誘導していることが示唆された。

本研究では、スタチンが ERK1/2 および mTOR の活性化を阻害し、p27 の発現を促進することにより G1 期で細胞周期の停止を誘導することを明らかにした。U0126 とラパマイシンの併用においても、G1 期から S 期への細胞周期の進行を抑制し、p27 の発現を増加させることを確認した。ロバスタチンは、ヒト造血器腫瘍において Ras のプレニル化の阻害を介して G1 期での細胞周期の停止を促進することが報告されている [40]。アトルバスタチンによる G1 チェックポイ

ントでの細胞周期阻害は、CD4 陽性 T 細胞において Ras シグナル伝達の阻害と関連していることも明らかにされている [41]。さらに、ERK1/2 および mTOR の活性化は、p27 の E3 ユビキチンリガーゼとして知られる Skp2 の活性化を介して p27 の発現レベルを調節する [42,43]。これらの知見は、スタチンによる Ras/ERK および Ras/mTOR 経路の阻害が G1 期での細胞周期の停止を誘導することを示唆している。

本研究ではスタチンが Ras/MEK/ERK および Ras/mTOR 経路の阻害により Bim と p27 の発現を増加させることで、ミトコンドリアを介したアポトーシス誘導および細胞周期の停止を誘導することを示唆した。これらのことから、スタチンは Ras 変異をもつ悪性腫瘍に対して、より効果的に作用する可能性があり、造血器腫瘍の治療において抗がん薬および他の抗がん薬との併用薬として有用であることを示唆している。

## 第 2 章

# Prognostic nutritional index を使用した日本人頭頸部癌患者 における化学放射線療法中および化学放射線療法後の 栄養状態の客観的評価の検討

### I. 緒言

頭頸部癌に対する標準的な治療は、手術療法、放射線療法、化学療法を組み合わせた集学的治療である。放射線療法と化学療法を同時に行う concurrent chemoradiotherapy (CCRT) は、抗がん薬の放射線感受性増強作用による放射線治療の効果増強を期待して行われる。しかし CCRT は、副作用としてほぼ 100% の頻度で口腔粘膜炎を発症することが報告されている [11]。

Cisplatin (CDDP) は頭頸部癌における CCRT のキードラッグであるが、高度催吐性リスクの薬剤である [44]。そのため、CDDP を用いた CCRT では口腔咽頭粘膜炎、嘔気、食欲不振が患者の経口摂取能を低下させ、栄養状態をさらに悪くさせる可能性がある。このことは、患者の治療および quality of life に大きな影響を与える可能性がある。また、CCRT の中断は、がん治療の効果を低下させる可能性があり、これらの副作用を適切に管理することは重要である [45,46]。さらに、入院にて頭頸部癌に対する CCRT を受ける患者では、退院する際には血液毒性からの回復だけでなく、栄養状態の改善も重要である。栄養状態は、一般的に食事摂取量や体重の変化等によって主観的に評価されるが、経時的な栄養状態の評価では評価者のバイアスを避けるため、より客観的な指標が望まれる。



血液検査はがん化学療法による副作用を評価するために必須であり、血液毒性、腎機能、肝機能を評価するため定期的の実施され、放射線療法による血液毒性を評価するため定期的に行われている。小野寺らの prognostic nutritional index (PNI) は血清アルブミン値と総末梢リンパ球数より計算される [47]。これらは、副作用を評価する目的で実施される定期的な血液検査の結果で算出できるため、患者に対して新たに侵襲的な検査を必要としない。PNI は周術期がん患者の手術実施可否の予測マーカーとして報告されており [47]、化学療法の中止を決定する予測マーカーとしての有用性も報告されている [48,49]。また、PNI は結腸直腸癌 [50]、悪性黒色腫 [51]、上部尿路上皮癌 [52]、および胃癌 [53]などの悪性腫瘍で有用な予後因子として報告されており、頭頸部癌においても同様に報告されている [54-56]。そのため、PNI はがん患者の栄養状態を評価するために使用される指標の1つである。現在のところ、CCRT を受ける頭頸部癌患者において栄養状態を客観的かつ経時的に評価する指標の報告はなく、また、退院時に改善が必要とされる栄養状態を客観的に評価する指標も明らかではない。そこで本章では、PNI を用いて CCRT を受けた頭頸部癌患者の栄養状態を客観的に評価し、PNI に基づいた退院基準を決定することを目的として検討を行った。

## II. 方法

### 1. 対象患者と研究デザイン

2012年4月から2017年3月までの期間に、日本赤十字社和歌山医療センター耳鼻咽喉科部で頭頸部癌に対して入院にて CDDP+RT (Radiotherapy 70 Gy, 2 Gy × 35 fr) (CCRT) の治療が実施された患者の臨床データをカルテよりレトロスペクティブに収集した。CCRT 治療中に CDDP が3回投与されなかった患者、CCRT 治療中に入院を継続しなかった患者は除外した。また、CCRT 治療完遂後に引き続いて他疾患の治療を継続した患者についても除外した。

治療開始前と治療終了時の栄養状態を判断するため PNI を算出し評価した。PNI は以下で計算した:  $PNI = [10 \times \text{serum albumin level (g/dL)} + 0.005 \times \text{peripheral lymphocyte count (/mm}^3\text{)}]$ 。また粘膜炎の程度によって患者を grade 2 以下と、grade 3 以上の2つの群に分けた。治療期間中の PNI の推移と治療終了後から退院までの日数について比較した。粘膜炎については、Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0 を用いて評価した。胃瘻造設術を受けた患者または経鼻チューブを挿入した患者については grade 3 と評価した。さらに、PNI を使用して退院時の栄養状態を評価した。

### 2. 調査項目

年齢、性別、疾患の原発部位、TNM 腫瘍病期、化学療法歴、体表面積 ( $\text{m}^2$ )、1回あたりの CDDP 用量 ( $\text{mg/m}^2$ )、臨床検査値 (白血球数、好中球数、リンパ球数、血清アルブミン(Alb)、aspartate aminotransferase、alanine aminotransferase、creatinine、C-reactive protein)、治療日数および治療終了から退院までの日数について調査を行った。

### 3. 統計学的解析

2 群間の比率の比較には Fisher's exact test を、2 群間の中央値の比較には Mann-Whitney's U-test を用いた。それぞれ  $P < 0.05$  の場合を有意差ありとした。退院基準における PNI の最適なカットオフ値は、receiver operating characteristic (ROC) 曲線を使用して決定した。すべての統計解析は、EZR (埼玉医療センター、自治医科大学: Ver.1.36) を用いて行った [57]。

### 4. 倫理的配慮

本研究は、日本赤十字社和歌山医療センター倫理委員会の承認 (受付番号: 520) を得て、個人情報に十分配慮し実施した。

### III. 結果

#### 1. 患者背景

42名の患者が対象期間内に CCRT の治療を受けた。このうち 17名については、CDDP の投与回数が 2 回以下であったため除外した。1 名は治療期間中に途中退院し、1 名は CCRT の治療後も入院を継続し、他の治療を継続した。これらの 2 名の患者についても除外した。その結果、最終的に 23 名を解析の対象患者とした。

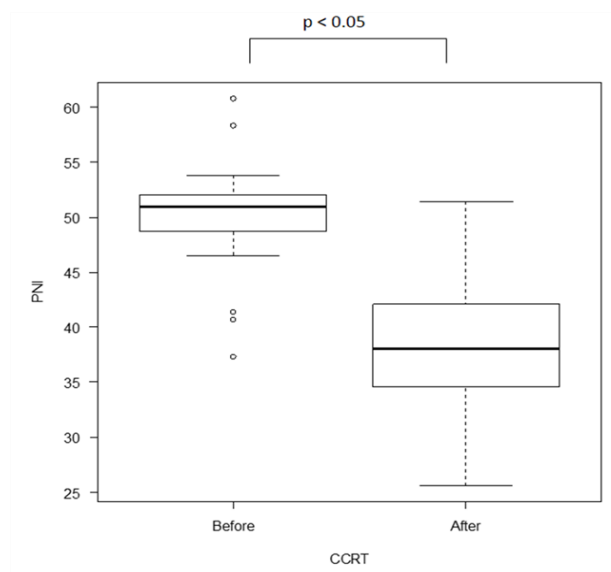
Table 1 に患者背景のベースラインを示す。23 名の患者のうち、19 名が男性、4 名が女性であった。年齢の中央値は 66 歳であった (範囲:32-74 歳)。疾患の原発部位は、喉頭 (8 名、34.8%)、上咽頭 (1 名、4.3%)、中咽頭 (6 名、26.1%)、下咽頭 (2 名、8.7%)、その他 (6 名、26.1%)であった。TNM 腫瘍病期は stage I (1 名、4.3%)、stage II (7 名、30.4%)、stage III (4 名、17.4%)、stage IV (9 名、39.1%)、その他 (2 名、8.7%)であった。4 名(17.4%)は FP (5-Fluorouracil+CDDP)療法の化学療法歴があった。

**Table 1.** Demographic characteristics of the included patients (n = 23).

	Patients, N (%)
Age (year)	
Median	66
Range	32-74
Sex	
Male	19 (82.6%)
Female	4 (17.4%)
Tumor site	
Larynx	8 (34.8%)
Nasopharynx	1 ( 4.3%)
Oropharynx	6 (26.1%)
Hypopharynx	2 ( 8.7%)
Other	6 (26.1%)
Stage	
I	1 ( 4.3%)
II	7 (30.4%)
III	4 (17.4%)
IV	9 (39.1%)
Other	2 ( 8.7%)
Chemotherapy history	
Yes(FP:5-Fluorouracil+CDDP)	4 (17.4%)
No	19 (82.6%)

## 2. 治療開始前と治療終了時における栄養状態の変化

Figure 1 に治療開始前と治療終了時における PNI の変化を示す。治療終了日に血液検査が行われなかった場合は、最も直近の採血結果を用いた。治療開始前および治療終了時の PNI 値の中央値はそれぞれ 51.0 および 38.0 であった ( $p < 0.05$ )。



**Figure 1.** Change in the value of PNI before and after CCRT. Box-and-whisker plot represents the value of PNI before and at the end of the treatment. The line indicates median, the box indicates 1st to 3rd quartile, the whiskers denote the range, and the circle indicates outlier. Significant differences ( $p < 0.05$ ), Mann-Whitney's U-test was performed and a p value of  $< 0.05$  was considered as statistically significant. PNI, prognostic nutritional index.

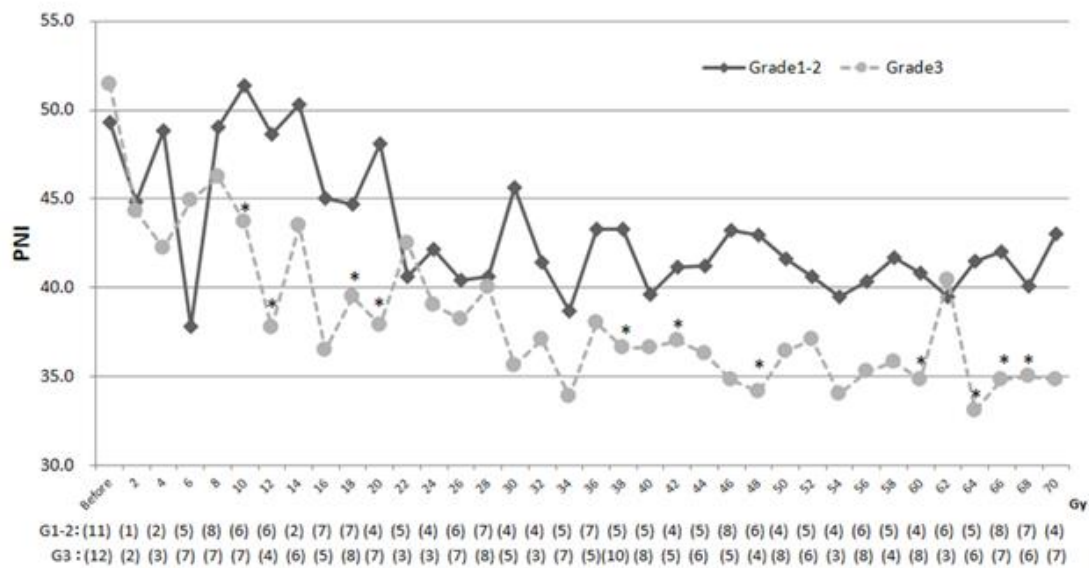
### 3. 粘膜炎の程度による栄養状態の変化

粘膜炎の程度によって患者を grade 1-2 および grade 3 の 2 つのグループに分けた。今回の調査では grade 0 および grade 4 以上の患者はいなかった。Table 2 に対象患者の背景を示す。年齢、性別、疾患の原発部位、TNM 腫瘍病期、化学療法歴、体表面積 (m<sup>2</sup>)、1 回あたりの CDDP 用量 (mg/m<sup>2</sup>)、治療開始前の臨床検査値、治療開始前の PNI 値、治療期間について有意な差はなかった。Figure 2 に治療期間中の PNI の変化を示す。PNI は累積照射線量に伴って減少する傾向を示した。PNI 値は grade 1-2 の粘膜炎患者に比べ、grade 3 の粘膜炎患者の方が低値であった。累積照射線量が 10, 12, 18, 20, 38, 42, 48, 60, 64, 66 および 68 Gy の時点において grade 1-2 の粘膜炎患者と grade 3 の粘膜炎患者でそれぞれ PNI 値に有意な差が認められた(p < 0.05)。

**Table 2.** Demographic characteristics at baseline (n = 23).

Grade evaluation of the mucositis		Grade1-2	Grade3	p value
N		11	12	
Gender (Male/Female)		10/1	9/3	0.59 <sup>a)</sup>
Age Median (range)		66 (32-73)	65 (35-74)	0.766 <sup>b)</sup>
Body surface area (m <sup>2</sup> )		1.63 (1.47-1.76)	1.70 (1.35-2.05)	0.902 <sup>b)</sup>
Dose of CDDP per once (mg/m <sup>2</sup> )		69.6 (65.6-80.7)	70.7 (64.4-78.9)	0.805 <sup>b)</sup>
Stage	I	0	1	0.172 <sup>a)</sup>
	II	5	2	
	III	3	1	
	IV	2	7	
	other	1	1	
Tumor site	Larynx	6	2	0.223 <sup>a)</sup>
	Nasopharynx	0	1	
	Oropharynx	1	5	
	Hypopharynx	1	1	
	other	3	3	
Chemotherapy history	No	9	10	1 <sup>a)</sup>
	chemotherapy (FP)	2	2	
Test value	WBC (× 100/μL)	62 (37-91)	61.5 (38-105)	0.579 <sup>b)</sup>
	NEUT (× 100/μL)	33.4 (16.1-64.4)	37.7 (13.6-69.9)	0.518 <sup>b)</sup>
	Alb (g/dL)	4.10 (3.25-4.81)	4.24 (2.96-4.57)	0.926 <sup>b)</sup>
	AST (U/L)	21 (12-41)	18 (11-71)	0.711 <sup>b)</sup>
	ALT (U/L)	19 (11-50)	20 (7-60)	0.734 <sup>b)</sup>
	CRE (mg/dL)	0.78 (0.55-1.03)	0.78 (0.50-0.91)	0.518 <sup>b)</sup>
	CRP (mg/dL)	0.08 (0.01-0.91)	0.19 (0.01-1.90)	0.667 <sup>b)</sup>
PNI		49.3 (40.7-60.8)	51.5 (37.3-58.3)	0.525 <sup>b)</sup>
Treatment period (days)		51 (47-53)	51.5 (50-57)	0.148 <sup>b)</sup>

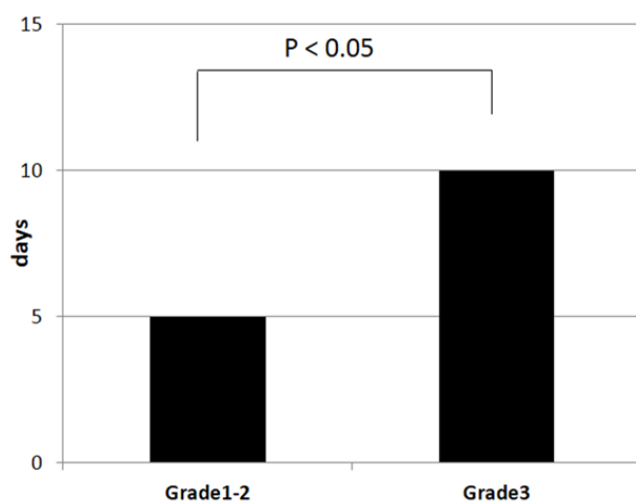
<sup>a)</sup>Fisher's exact test, <sup>b)</sup>Mann-Whitney's U-test



**Figure 2.** Change in the value of PNI during the treatment period. The relationship between the irradiation dose and the median PNI is shown. The dots show the median PNI values at the particular points. The PNI values between the groups developing grade 1–2 mucositis and grade 3 mucositis were analyzed using the Mann-Whitney’s U test. \*p < 0.05. The numbers within the brackets signify the number of patients who calculated PNI at the particular points. PNI, prognostic nutritional index.

#### 4. 治療終了後から退院までの日数

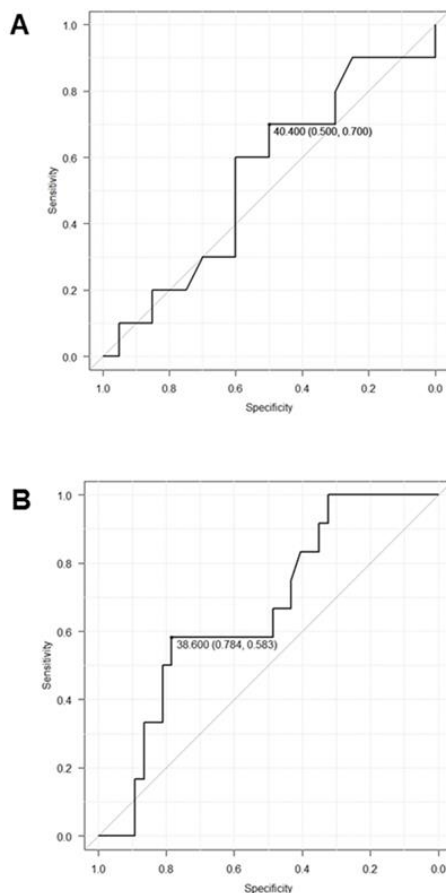
Figure 3 に CCRT 最終日から退院日までの日数を示す。日数の中央値は、grade 1-2 の群で 5 日(範囲: 1-16)、grade 3 の群で 10 日(範囲: 0-20)であった (p < 0.05)。



**Figure 3.** The median number of days in hospital after completion of treatment is shown. There was a significant difference between the groups developing grade 1–2 mucositis and grade 3 mucositis (p < 0.05, Mann-Whitney’s U-test).

## 5. 退院時の PNI のカットオフ値

CCRT 終了後から退院までの間に、23 名の患者から合計 79 回の血液検査が行われた。それぞれにおいて PNI 値を算出し、退院直前の PNI の値を退院基準の栄養状態とした。退院基準として PNI のカットオフ値を予測する ROC 曲線を Figure 4A および B に示す (grade 1-2 の粘膜炎群; grade 3 の粘膜炎群)。ROC 曲線の結果、最大感度と特異度を示すカットオフ値は、grade 1-2 の粘膜炎群で 40.4、grade 3 の粘膜炎群で 38.6 であった。これらのカットオフ値において感度と特異度はそれぞれ grade 1-2 の粘膜炎群で 70.0%、50.0%、grade 3 の粘膜炎群で 58.3%、78.4% であった。AUC はそれぞれ grade 1-2 の粘膜炎群で 0.540 (95% CI: 0.314-0.766)、grade 3 の粘膜炎群で 0.662 (95% CI: 0.494-0.831) であった。



**Figure 4.** Receiver operating characteristic (ROC) curve of PNI depicting the optimal cutoff value as a criterion for discharge. The ROC curves were obtained for the groups developing grade 1–2 mucositis (A) and grade 3 mucositis (B) considering the PNI value just before discharge as a marker of the nutritional status for discharge criterion. The cutoff value of PNI was 40.4 in the group developing grade 1–2 mucositis and 38.6 in the group developing grade 3 mucositis. The area under the curve was 0.540 for the group developing grade 1–2 mucositis and 0.662 for the group developing grade 3 mucositis.



## IV. 考察

頭頸部癌における CCRT は、治療に伴う有害事象のため栄養状態を悪化させる。特に粘膜炎は疼痛を伴うことによって経口摂取能の低下を引き起こし、栄養状態の悪化につながる主な要因である。このことから、疼痛緩和や経口摂取能の向上のために、食前に鎮痛薬や含嗽薬が使用されている。日本において、粘膜炎に対する疼痛管理について多施設共同研究が行われ、Opioid-based pain control program として報告されている [58]。この研究では、確実な栄養・薬剤投与経路として胃瘻の造設や、オピオイドベースでの疼痛管理によって高い治療完遂率が示されている。しかし、すべての患者に対して胃瘻を造設するかどうかについては明確ではない。粘膜炎に対して臨床現場では、対症療法にて疼痛コントロールや栄養状態の保持を行っているのが現状である。

頭頸部癌に対して CCRT を受ける患者において、体重の変化は栄養状態の指標として使用されている [59]。しかし、この報告では治療終了後においてもしばらく体重減少が続くことが報告されている。Patient-Generated Subjective Global Assessment (PG-SGA)は、癌患者の栄養評価の指標としてアメリカ栄養士会の Oncology Nutrition Dietetic Practice Group で広く評価されている [60]。しかし、PG-SGA は患者の主観的な評価であり、詳細な指標 (体重、食事摂取量、症状、活動、機能など)や身体検査を必要とする。そのため、評価のバイアスを回避するためにも、より客観的で簡便な評価方法が必要である。我々は、頭頸部癌患者で CCRT を受ける患者の栄養状態を評価するための指標として、より良い指標が必要であると考えた。そこで、小野寺らによって提唱されている血液検査の結果から栄養状態を評価できる PNI によって栄養状態を評価した。

本研究では、治療前の PNI 値は 51.0、治療後の PNI 値は 38.0 であった。また、治療前と治療終了後で PNI 値の有意な差を認めた。小野寺らは栄養不良のない

状態では、PNI 値の正常範囲は 50-60 であり、40 が一般的にカットオフ値とみなされることを示している [47]。これらの結果に基づいて、PNI は頭頸部癌で CCRT を受ける患者の栄養状態を客観的に評価する指標として有用であることが示唆された。

次に、粘膜炎が栄養状態に与える影響について PNI を用いて客観的に評価を行った。Grade 1-2 の粘膜炎を発症した群と、grade 3 の粘膜炎を発症した群を比較したところ、重篤な粘膜炎を発症した患者では、より PNI 値が低下することが示唆された。一般的に、粘膜炎が重篤となると疼痛を伴い経口摂取が不十分となる。その結果、患者の栄養状態は悪くなることが、PNI 値にも客観的に反映されたと考えられる。

さらに、粘膜炎が入院期間に与える影響について評価を行った。治療終了後から退院までの入院日数は、重篤な粘膜炎を発症した患者で有意に延長した。そのため、治療期間中に粘膜炎が重篤化することによって栄養状態が悪化し、入院期間に影響を与えることが示唆された。

最後に、CCRT 後の退院基準としての PNI のカットオフ値を検討した。ROC 曲線にてカットオフ値は、grade 1-2 の粘膜炎患者では 40.4、grade 3 の粘膜炎患者では 38.6 として検出され、これらの値は小野寺らによって検出されたカットオフ値に近い値となった。しかし、grade 1-2 の粘膜炎患者においては AUC が低値であったため、CCRT 後の退院基準としての PNI は、粘膜炎が重篤な状況で有用である可能性が示唆された。

本研究では、頭頸部癌の CCRT における栄養状態の客観的な評価指標として PNI は有用であり、粘膜炎の影響による栄養状態を評価する際にも有用であることを示した。PNI は、CCRT を受けた頭頸部癌患者の客観的な退院基準として重篤な粘膜炎患者において特に有用であることが示された。そのため、重篤な粘膜

炎を避けること、重篤な粘膜炎を発症しても適切な栄養状態を維持することが治療完遂率の改善や入院期間の短縮に重要であると考えられる。

頭頸部癌における CCRT は、副作用を軽減するため多職種による連携が必要とされる。例えば、CCRT の開始前より歯科医師、歯科衛生士、看護師等による継続的な口腔ケアの実施や、CCRT 中の NST (Nutritional Support Team) による栄養サポートの実施が挙げられる。薬剤師においては、CCRT の有害事象として起こる嘔気や食欲不振を評価し、適切な支持療法薬を提案することが必要である。粘膜炎の予防においては、治療開始前からうがいを行い、治療期間中も口腔内の保清に努めるよう患者教育を行うこと、また、粘膜炎が発症した際は患者の状態を評価し、適切な鎮痛薬の提案を行うことも重要である。薬剤師は治療開始前から患者をサポートし、患者の栄養状態を維持することに貢献できると考えられる。CCRT を受けている頭頸部癌患者において、栄養状態を客観的に評価する共通の指標が必要である。PNI は、栄養状態が悪化する治療期間中だけでなく、栄養状態が徐々に改善する治療終了後においても継続して評価を行う場合に優れた指標として考えられる。

これらのことから、PNI は CCRT を施行される頭頸部癌患者の栄養状態を治療中および治療終了後も経時的かつ客観的に評価することが可能な指標である。また、PNI は日常的な血液検査の結果から算出できるため、患者に対して新たな侵襲を必要としない。そのため、PNI は多職種が栄養状態を評価する際に、簡便かつ有用な指標であると考えられる。

## 第3章

# FEC100 療法翌日のpegfilgrastim投与が 好中球数に与える影響

### I. 緒言

がん化学療法時における好中球減少は重篤な感染症を引き起こす可能性があるだけでなく、治療強度の低下や予定された治療スケジュールの遷延につながり、その結果、治療効果にも影響を与える可能性がある。特に、発熱を伴う好中球減少症は発熱性好中球減少症 (febrile neutropenia : FN) と呼ばれ、急速に重症化し生命に危険を及ぼす可能性があるため、支持療法薬として granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) 製剤が使用される。従来の G-CSF 製剤は一部のがん種を除き好中球数が 500/ $\mu$ L 未満に減少してから投与を開始する必要があったが、2014年9月、持続型 G-CSF 製剤であるpegfilgrastimが本邦で使用可能となったことで好中球数に関わらず予防投与が可能となった。G-CSF 適正使用ガイドライン [12]では、FNの発症率が20%以上の2週毎または3週毎投与レジメンを使用する際、pegfilgrastim等のG-CSF製剤を一次予防的に用いることが推奨されており、化学療法翌日に投与されることが多い。日本人におけるFEC100療法 (5-fluorouracil 500 mg/m<sup>2</sup>, epirubicin 100 mg/m<sup>2</sup>, cyclophosphamide 500 mg/m<sup>2</sup>) もこれに該当するレジメンである。現在のところ、日本人におけるFEC100療法施行時にpegfilgrastimを一次予防的投与した場合の安全性と忍容性についての報告はない。そこで、化学療法翌日に一次予防的投与した際の好中球減少、FNの発症率、平均相対治療強度について調査を行った。また、

ペグフィルグラスチム使用可能以前に行われていた従来の G-CSF 製剤であるレノグラスチムを使用した場合と比較検討を行った。

## II. 対象と方法

### 1. 調査方法

2014年4月から2016年3月までの期間に日本赤十字社和歌山医療センター乳腺外科部で、原発性乳癌の治療として1コース目より3コース以上FEC100療法を外来通院治療で受けた患者を対象とした。評価項目は1コース目の好中球数、FNの発症率、平均相対治療強度とした。調査は電子カルテに記載された処方記録、診療記録をもとに、レトロスペクティブに行った。有害事象のGrade評価については、Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0を用い判定を行った。

### 2. G-CSF製剤の投与方法と1コース目の好中球数の測定

ペグフィルグラスチムはFEC100療法翌日(FEC100施行終了から24時間以降)に投与を行った。レノグラスチムはFEC100療法施行1週間後に血液検査を行ったのち、担当医の判断で初回投与を行った。また、好中球数の減少に応じて担当医の判断で2回目以降の追加投与を行った。レノグラスチム投与時はノイトロジン®注100 $\mu$ gを1回皮下注射した。1コース目の好中球数の測定はFEC100療法開始日をday1とし、day8(1週間後)、day15(2週間後)、day22(3週間後)を基本とした。

### 3. 統計学的解析

年齢、好中球数についてはMann-Whitney's U-testを、治療強度についてはStudent's t-testを、FNの発症率についてはFisher's exact testを用いてそれぞれ統計処理を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

#### 4. 倫理的配慮

本研究は、日本赤十字社和歌山医療センター倫理委員会の承認 (受付番号 : 390)を得て、個人情報に十分配慮し実施した。

### III. 結果

Table 1 に患者背景を示す。対象患者は、PEGフィルグラスチム投与群 12 例、レノグラスチム投与群 19 例であった。延べ施行コース数は、PEGフィルグラスチム投与群 43 コース、レノグラスチム投与群 72 コースであった。治療開始時における好中球数、治療強度については両投与群間に有意な差はなかったが、年齢についてはレノグラスチム投与群の方がPEGフィルグラスチム投与群に比べ高かった。

Table 2 に 1 コース目の各 G-CSF 製剤使用時における好中球数の中央値と、好中球減少症の発症頻度を示す。PEGフィルグラスチム投与群における好中球数の中央値は化学療法 1 週間後に 180/ $\mu$ L (10-1460/ $\mu$ L)と最小値を示し、その後増加する傾向が見られた。一方、レノグラスチム投与群における好中球数の中央値は、化学療法 1 週間後で 1810/ $\mu$ L (1000-3210/ $\mu$ L)、化学療法 2 週間後に 890/ $\mu$ L (270-3280/ $\mu$ L)と最小値を示し、その後増加する傾向がみられた。PEGフィルグラスチム投与群での Grade 3-4 の好中球減少症の発症率は 91.7% (11 例/12 例)であり、83.3% (10 例/12 例)に Grade 4 の好中球減少症が見られた。一方、レノグラスチム投与群での Grade 3-4 の好中球減少症の発症率は 63.2% (12 例/19 例)であり、Grade 4 の好中球減少症の発症率は 31.6% (6 例/19 例)であった。

Figure 1 に各 G-CSF 製剤使用時における FN の発症率を示す。PEGフィルグラスチム投与群では 43 コース中 5 例に発熱が認められ、このうち FN は 3 例 (7.0%)であった。一方、レノグラスチム投与群では 72 コース中 11 例に発熱が認められ、このうち FN は 7 例 (9.7%)であった。FN の発症率については使用する G-CSF 製剤の違いによる有意な差は認められなかった ( $p=0.741$ )。また、FN に対してはPEGフィルグラスチム投与群、レノグラスチム投与群ともに入院を必要とする症例はなく、全例外来にて十分対応可能であった。各 G-CSF 製剤を併用



した FEC100 療法の平均相対治療強度はペグフィルグラスチム投与群では 98%、レノグラスチム投与群では 97%と良好であった。

**Table 1.** Patients characteristics

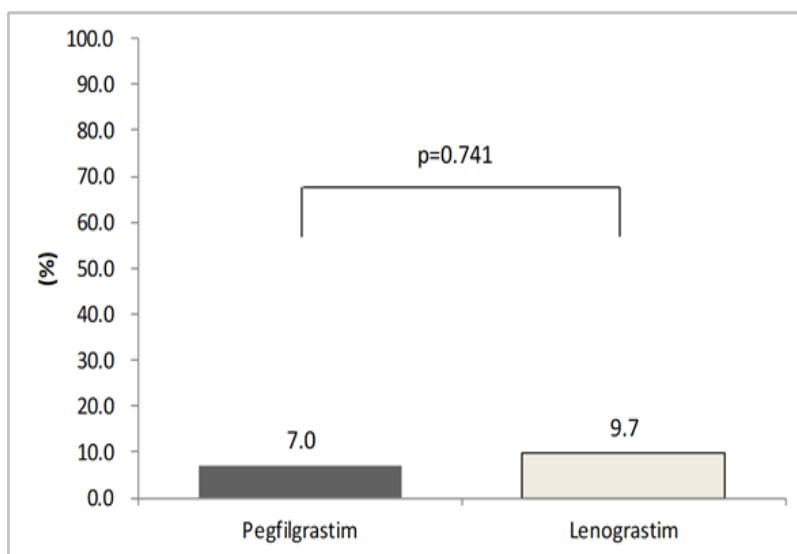
	Pegfilgrastim 12 patients	Lenograstim 19 patients	p
Number of course	43	72	
Age (median) (years old)	48	63	0.012 <sup>a)</sup>
[range]	[34-66]	[47-67]	
Gender (M/F)	0/12	0/19	
Baseline neutrophil count (median) (/μL)	4120	3420	0.372 <sup>a)</sup>
[range]	[2320-6410]	[1540-8160]	
Dose intensity (mg/m <sup>2</sup> /wk)			
5-fluorouracil	164.1±5.86	162.8±7.02	0.599 <sup>b)</sup>
epirubicin	32.7±1.20	32.1±1.20	0.177 <sup>b)</sup>
cyclophosphamide	164.1±5.86	162.8±7.02	0.599 <sup>b)</sup>

<sup>a)</sup>Mann-Whitney's U-test, <sup>b)</sup>Student's t-test

**Table 2.** Neutrophil count and incidence of neutropenia after 1st cycle of FEC100 therapy

	Pegfilgrastim 12 patients	Lenograstim 19 patients	p
Neutrophil count			
Baseline (median) (/μL)	4120	3420	0.372
[range]	[2320-6410]	[1540-8160]	
After 1week of chemotherapy (median) (/μL)	180	1810	< 0.001
[range]	[10-1460]	[1000-3210]	
After 2weeks of chemotherapy (median) (/μL)	6580	890	< 0.001
[range]	[2430-9300]	[270-3280]	
After 3weeks of chemotherapy (median) (/μL)	4395	3210	0.11
[range]	[1920-6950]	[1590-8440]	
Neutropenia			
Grade3 (<1,000-500 /mm <sup>3</sup> )	1 (8.3%)	6 (31.6%)	
Grade4 (<500 /mm <sup>3</sup> )	10 (83.3%)	6 (31.6%)	

Mann-Whitney's U-test



**Figure 1.** The incidence of FN in pegfilgrastim and lenograstim groups with FEC100 therapy.  
(Fisher's exact test)

## IV. 考察

がん化学療法を行う際に予測される副作用に対して事前に対策を行い、予定された治療スケジュールを完遂することは治療効果を高めるために非常に重要である。FEC 療法においては、エピルビシンの用量を高めた FEC100 療法が FEC50 療法 (5-fluorouracil 500 mg/m<sup>2</sup>, epirubicin 50 mg/m<sup>2</sup>, cyclophosphamide 500 mg/m<sup>2</sup>)よりも優れた Disease-Free Survival、Overall Survival を示す [61]一方、好中球減少が起こる割合が有意に高いことが報告されている [62]。そのため G-CSF 製剤を使用するなど、副作用予防を行うことは高い治療強度を維持することにつながり、その結果、治療成績の向上につながると考えられる。日本人の FEC100 療法における G-CSF 製剤の使用について藤澤らは、FN や重篤な好中球減少を予防する目的で早期からの G-CSF 製剤の予防投与の有用性を報告している[63]。乳癌化学療法に対するペグフィルグラスチムの使用について渡邊らは、dose-dense EC 療法においてペグフィルグラスチムを化学療法翌日に併用した際の安全性と忍容性について評価を行い、重篤な有害事象はなく忍容性は良好であるが、全 9 例に Grade 4 の好中球減少、うち 6 例に FN を認めたと報告している[64]。また、ペグフィルグラスチム投与時の anthracycline 系レジメンの好中球減少については早急にデータの集積と解析が必要であり、レジメンによって投与のタイミングを遅らせることについては検討の余地があると述べている[64]。さらに、Luigi らの報告では、FEC100 療法においてペグフィルグラスチム投与群とレノグラスチム投与群を比較した結果、ペグフィルグラスチムを投与した群の方が重篤な好中球減少が起こることが示されている[13]。ペグフィルグラスチムについては国内第 II 相試験の結果より海外と投与量が異なるため、日本人における FEC100 療法においても、ペグフィルグラスチムを化学療法翌日に併用した際の安全性と忍容性について評価する必要があると考えた。

今回我々の調査結果では、FEC100療法においてペグフィルグラスチムを化学療法翌日に投与した場合、91.7%にGrade 3以上の重篤な好中球減少を認めた。また、日本人におけるFEC療法において好中球数が最も減少する時期(nadir)は化学療法施行11-15日後[65]とされるが、ペグフィルグラスチムを化学療法翌日に投与した場合、nadirは化学療法施行後8日前後と通常よりも早く好中球減少が起こる結果となった。G-CSF製剤は抗がん薬と同時併用投与することで分化・増殖過程にある細胞が抗がん薬の作用を強く受け、より重篤な好中球減少を起こす可能性がある[66]。そのため、持続型G-CSF製剤であるペグフィルグラスチムもがん化学療法薬の投与終了後24時間以降に投与が行われる。ところが、ペグフィルグラスチムを化学療法翌日に投与した際の化学療法1週間後の好中球数の値はレノグラスチムを初回投与する直前の好中球数と比較し有意に低く、また、レノグラスチム投与1週間後の好中球数と比較しても有意に低い。これらのことから、ペグフィルグラスチムを化学療法翌日に投与することは重篤な好中球減少を引き起こす要因となる可能性が示唆された。一方で、ペグフィルグラスチムを化学療法翌日に投与した場合のFNの発症率は7.0%とレノグラスチムを使用した場合の9.7%と有意な差は認められなかった。また、それぞれ高い平均相対治療強度を維持することが可能であった。

以上のことから、日本人におけるFEC100療法ではペグフィルグラスチムを化学療法翌日に投与することは、レノグラスチムを併用した場合と同等の治療強度を維持することが可能であり、FNの発症率についても有意な差はないが、重篤な好中球減少が起こる傾向があり、FNのリスクを考慮すると避けることが望ましいことが示唆された。FEC100療法におけるペグフィルグラスチムの投与のタイミングについては、今後の検討が必要である。

薬剤師は持続型G-CSF製剤を使用する場合は従来とnadirの時期が異なるこ

と、重篤な好中球減少が起こる可能性があることを十分理解した上で患者に対して感染予防を徹底することを指導するなど、リスク管理を行うことが必要である。

## 総括

本研究では、種々の造血器腫瘍細胞を用いてスタチンによるヒト造血器腫瘍細胞におけるアポトーシス誘導機序の解明、また、頭頸部癌治療 CCRT 施行時および施行後の栄養状態の客観的評価と退院基準の設定、さらに乳癌 FEC100 療法におけるペグフィルグラスチムの一次予防的投与を行った場合の日本人における安全性と忍容性について検討を行った。

1. スタチンは造血器腫瘍細胞においてアポトーシスを誘導することを見出した。その機序は、スタチンが Ras/MEK/ERK 経路および Ras/mTOR 経路の阻害により Bim および p27 の発現を増加させることで、ミトコンドリアを介したアポトーシス誘導および細胞周期の停止に起因することを明らかにした。これらのことより、スタチンは造血器腫瘍の治療において抗がん薬および他の抗がん薬との併用薬として応用できる可能性が示唆された。
2. 小野寺らの PNI は、CCRT を施行される頭頸部癌患者の栄養状態を治療中および治療終了後も客観的、簡易的かつ経時的に評価する指標として有用であることが示唆された。また、退院時の栄養状態を客観的に評価する指標としても有用であることが示唆された。
3. 日本人における乳癌 FEC100 療法において、持続型 G-CSF 製剤ペグフィルグラスチムを化学療法翌日に投与することは、重篤な好中球減少を引き起こす可能性が示唆された。一方、これまで使用されていた G-CSF 製剤レノグラスチムを使用した場合と FN の発症率および平均相対治療強度については有意な差を認めなかった。これらのことより、ペグフィルグラスチムは、FN のリ

スクを考慮すると化学療法翌日に投与することは避けることが望ましいことが示唆された。

最後に、本研究結果が造血器腫瘍治療の臨床応用につながり、また PNI が CCRT を施行される頭頸部癌患者の栄養状態を客観的に評価する指標として活用されることを期待する。さらにペグフィルグラスチムの適正使用に関するエビデンスの構築につながることを期待する。

## 引用文献

1. Le DT, Shannon KM. Ras processing as a therapeutic target in hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol* 2002;9: 308-15.
2. Chang F, Steelman L S, Lee J T, et al. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* 2003; 17: 1263-1293
3. Endo A. The origin of the statins. 2004. *Atheroscler Suppl* 2004; 5: 125-130.
4. Chou R, Dana T, Blazina I, et al. Statins for Prevention of Cardiovascular Disease in Adults: Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA* 2016; 316: 2008-2024.
5. Xie W, Ning L, Huang Y, et al. Statin use and survival outcomes in endocrine-related gynecologic cancers: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2017; 8: 41508-41517.
6. Cardwell CR, Spence AD, Hughes CM, et al. Statin use after esophageal cancer diagnosis and survival: A population based cohort study. *Cancer Epidemiol* 2017; 48: 124-130.
7. Liu B, Yi Z, Guan X, et al. The relationship between statins and breast cancer prognosis varies by statin type and exposure time: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2017; 164: 1-11.
8. Epstein MM, Divine G, Chao CR, et al. Statin use and risk of multiple myeloma: An analysis from the cancer research network. *Int J Cancer* 2017; 141: 480-487.
9. Yokomichi H, Nagai A, Hirata M, et al. Statin use and all-cause and cancer mortality: BioBank Japan cohort. *J Epidemiol* 2017; 27: S84-S91.



10. Hung MS, Chen IC, Lee CP, et al. Statin improves survival in patients with EGFR-TKI lung cancer: A nationwide population-based study. *PLoS One* 2017; 12: e0171137.
11. Naidu MUR, Ramana GV, Rani PU, et al. Chemotherapy-Induced and/or Radiation Therapy-Induced Oral Mucositis-Complicating the Treatment of Cancer. *Neoplasia* 2004;6:423–31.
12. 日本癌治療学会:G-CSF 適正使用ガイドライン 2013 年版 Ver.2.金原出版,東京, 2015,pp52-55.
13. Rossi L, Tomao F, Lo Gusso G, et al : Efficacy and safety analysis of once per cycle pegfilgrastim and daily lenograstim in patients with breast cancer receiving adjuvant myelosuppressive chemotherapy FEC 100: a pilot study. *Ther Clin Risk Manag* 9: 457–462, 2013.
14. Park J, Matralis AN, Berghuis AM, et al. Human isoprenoid synthase enzymes as therapeutic targets. *Front Chem* 2014; 2: 50.
15. Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* 2002; 16: 508-519.
16. Björkhem-Bergman L, Acimovic J, Torndal UB, et al. Lovastatin prevents carcinogenesis in a rat model for liver cancer. Effects of ubiquinone supplementation. *Anticancer Res* 2010; 30: 1105-1112.
17. Atil B, Berger-Sieczkowski E, Bardy J, et al. In vitro and in vivo downregulation of the ATP binding cassette transporter B1 by the HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2016; 389: 17-32.

18. Martínez-Botas J, Ferruelo AJ, Suárez Y, et al. Dose-dependent effects of lovastatin on cell cycle progression. Distinct requirement of cholesterol and non-sterol mevalonate derivatives. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1532: 185-194.
19. Tsubaki M, Mashimo K, Takeda T, et al. Statins inhibited the MIP-1 $\alpha$  expression via inhibition of Ras/ERK and Ras/Akt pathways in myeloma cells. *Biomed Pharmacother* 2016; 78: 23-29.
20. Tsubaki M, Satou T, Itoh T, et al. 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* 2012; 361: 219-231.
21. Yanae M, Tsubaki M, Satou T, et al. Statin-induced apoptosis via the suppression of ERK1/2 and Akt activation by inhibition of the geranylgeranyl-pyrophosphate biosynthesis in glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30: 74.
22. Nishida S, Matsuoka H, Tsubaki M, et al. Mevastatin induces apoptosis in HL60 cells dependently on decrease in phosphorylated ERK. *Mol Cell Biochem* 2005; 269: 109-114.
23. Tsubaki M, Itoh T, Satou T, et al. 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* 2013; 85: 163-172.
24. Tsubaki M, Fujiwara D, Takeda T, et al. The sensitivity of head and neck carcinoma cells to statins is related to the expression of their Ras expression status, and statin-induced apoptosis is mediated via suppression of the Ras/ERK and Ras/mTOR pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2017; 44: 222-234.

25. Efuet ET and Keyomarsi K. Farnesyl and geranylgeranyl transferase inhibitors induce G1 arrest by targeting the proteasome. *Cancer Res* 2006; 66: 1040-1051.
26. Ley R, Balmanno K, Hadfield K, et al. Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem* 2003; 278: 18811-18816.
27. Ley R, Ewings KE, Hadfield K, et al. Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death Differ* 2005; 12: 1008-1014.
28. Shinjyo T, Kuribara R, Inukai T, et al. Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 854-864.
29. Jung SM, Park SS, Kim WJ, et al. Ras/ERK1 pathway regulation of p27KIP1-mediated G1-phase cell-cycle arrest in cordycepin-induced inhibition of the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 2012; 681: 15-22.
30. Paternot S and Roger PP. Combined inhibition of MEK and mammalian target of rapamycin abolishes phosphorylation of cyclin-dependent kinase 4 in glioblastoma cell lines and prevents their proliferation. *Cancer Res* 2009; 69: 4577-4581.
31. Lee SH, Park C, Jin CY, et al. Involvement of extracellular signal-related kinase signaling in esculetin induced G1 arrest of human leukemia U937 cells. *Biomed Pharmacother* 2008; 62: 723-729.
32. Rao S, Porter DC, Chen X, et al. Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7797-7802.
33. Fuchs D, Berges C, Opelz G, et al. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes bortezomib-induced apoptosis resistance by disrupting a geranylgeranyl

- pyrophosphate-dependent survival pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374: 309-314.
34. Dai Y, Khanna P, Chen S, et al. Statins synergistically potentiate 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) lethality in human leukemia and myeloma cells by disrupting Ras farnesylation and activation. *Blood* 2007; 109: 4415-4423.
  35. Ahmed TA, Hayslip J and Leggas M. Simvastatin interacts synergistically with tipifarnib to induce apoptosis in leukemia cells through the disruption of RAS membrane localization and ERK pathway inhibition. *Leuk Res* 2014; 38: 1350-1357.
  36. Roy M, Kung HJ and Ghosh PM. Statins and prostate cancer: role of cholesterol inhibition vs. prevention of small GTP-binding proteins. *Am J Cancer Res* 2011; 1: 542-561.
  37. Shipman CM, Rogers MJ, Apperley JF, et al. Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: a novel anti-tumour activity. *Br J Haematol* 1997; 98: 665-672.
  38. Lee MV, Fong EM, Singer FR, et al. Bisphosphonate treatment inhibits the growth of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 2602-2608.
  39. Gillings AS, Balmanno K, Wiggins CM, et al. Apoptosis and autophagy: BIM as a mediator of tumour cell death in response to oncogene-targeted therapeutics. *FEBS J* 2009; 276: 6050-6062.
  40. Holstein SA and Hohl RJ. Synergistic interaction of lovastatin and paclitaxel in human cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2001; 1: 141-149.
  41. Brinkkoetter PT, Gottmann U, Schulte J, et al. Atorvastatin interferes with activation of human CD4(+) T cells via inhibition of small guanosine triphosphatase (GTPase) activity and caspase-independent apoptosis. *Clin Exp Immunol* 2006; 146: 524-532.

42. Foster JS, Fernando RI, Ishida N, et al. Estrogens down-regulate p27Kip1 in breast cancer cells through Skp2 and through nuclear export mediated by the ERK pathway. *J Biol Chem* 2003; 278: 41355-41366.
43. Shapira M, Kakiashvili E, Rosenberg T, et al. The mTOR inhibitor rapamycin down-regulates the expression of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2006; 8: R46.
44. Hesketh P J, Kris M G, Grunberg S M, et al. Proposal for classifying the acute emetogenicity of cancer chemotherapy. *J Clin Oncol* 1997;15:103–9.
45. McCloskey S A, Jaggernauth W, Rigual N R, et al. Radiation treatment interruptions greater than one week and low hemoglobin level (12 g/dL) are predictors of local regional failure after definitive concurrent chemotherapy and intensity-modulated radiation therapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am J Clin Oncol* 2009;32:587–91.
46. Patel U A, Patadia M O, Holloway N, et al. Poor radiotherapy compliance predicts persistent regional disease in advanced head/neck cancer. *Laryngoscope* 2009;119:528–33.
47. Onodera T, Goseki N, Kosaki G. Prognostic nutritional index in gastrointestinal surgery of malnourished cancer patients. *Nihon Geka Gakkai Zasshi* 1984;85:1001–5.
48. Fukushima T, Annen K, Kawamukai Y, et al. Value of the palliative prognostic Index, controlling nutritional status, and prognostic nutritional index for objective evaluation during transition from chemotherapy to palliative care in cases of advanced or recurrent gastrointestinal cancer. *Gan To*

Kagaku Ryoho 2014;41:853–6.

49. Saito K, Munemoto Y, Makino Y, et al. Objective evaluation during transition from chemotherapy to palliative care in cases of metastatic colorectal cancer. *Journal of Japanese Society for Parenteral and Enteral Nutrition* 2017;32:1329–33.
50. Luvían-Morales, González-Trejo, Carrillo JF, et al. Association of the prognostic nutritional index and overall survival in patients with colorectal cancer: A STROBE compliant retrospective cohort study. *Cancer Med* 2019 May 8. doi: 10.1002.
51. Mirili C, Yılmaz A, Demirkan S, et al. Clinical significance of prognostic nutritional index (PNI) in malignant melanoma. *Int J Clin Oncol* 2019 May 9. doi: 10.1007.
52. Xue W, Tan P, Xu H, et al. Impact of the preoperative prognostic nutritional index on survival outcomes in upper tract urothelial carcinomas. *Cancer Med* 2019 May 9. doi: 10.1002
53. Sasahara M, Kanda M, Ito S, et al. The Preoperative Prognostic Nutritional Index Predicts Short-Term and Long-Term Outcomes of Patients with Stage II/III Gastric Cancer: Analysis of a Multi-Institution Dataset. *Dig Surg* 2019;6:1–10. doi: 10.1159
54. Miao J, Xiao W, Wang L, et al. The value of the Prognostic Nutritional Index (PNI) in predicting outcomes and guiding the treatment strategy of nasopharyngeal carcinoma (NPC) patients receiving intensity-modulated radiotherapy (IMRT) with or without chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2017;143:1263–73.
55. Yang L, Xia L, Wang Y, et al. Low prognostic nutritional index (PNI) predicts unfavorable distant metastasis-free survival in nasopharyngeal carcinoma: a propensity score-matched analysis. *PLoS One* 2016;11:e0158853.
56. Bruixola G, Caballero J, Papaccio F, et al. Prognostic Nutritional Index as an independent prognostic factor in locoregionally advanced squamous cell head and

- neck cancer. *ESMO Open*. 2018 Oct 24;3(6):e000425. doi: 10.1136
57. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:452–8.
  58. Zenda S, Matsuura K, Tachibana H, et al. Multicenter phase II study of an opioid-based pain control program for head and neck cancer patients receiving chemoradiotherapy. *Radiother Oncol* 2011;101:410–4.
  59. Nakahara S, Yoshino K, Fujii T, et al. Nutritional surveillance in head and neck cancer patients during radiotherapy-the difference between concurrent chemoradiotherapy using high-dose cisplatin and radiotherapy alone. *Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 2012;115:902–9.
  60. Bauer J, Capra S, Ferguson M. Use of the scored Patient-Generated Subjective Global Assessment (PG-SGA) as a nutrition assessment tool in patients with cancer. *Eur J Clin Nutr* 2002;56(8):779–85.
  61. Bonnetterre J, Roché H, Kerbrat P, et al : Epirubicin Increases Long-Term Survival in Adjuvant Chemotherapy of Patients With Poor-Prognosis, Node-Positive, Early Breast Cancer: 10-Year Follow-Up Results of the French Adjuvant Study Group 05 Randomized Trial. *J Clin Oncol* 23(12): 2686-2693, 2005.
  62. French Adjuvant Study Group : Benefit of a high-dose epirubicin regimen in adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer patients with poor prognostic factors: 5-year follow-up results of French Adjuvant Study Group 05 randomized trial. *J Clin Oncol* 19(3): 602-611, 2001.
  63. 藤澤浩美, 橋田亨, 寺田智祐・他 : 乳がん化学療法 FEC100 における G-CSF 製剤の使用評価. *医療薬学* 35(1): 31-36, 2009.

64. 渡邊健一,佐藤雅子, 山本貢・他 : Pegfilgrastim 併用による乳癌 Dose-Dense EC 療法の経験-安全性と忍容性-.癌と化学療法 43(4): 435-438, 2016.
65. 北田徳昭, 西野雅行, 安田潤・他 : 一般病院における乳がん化学療法の均てん化をめざして(第2報) -FEC および TC 療法における安全性の検討-.癌と化学療法 36(10): 1671-1675,2009.
66. 尾上雅英, 加藤貴子, 寺田智祐・他 : 膀胱癌化学療法時のファーマシューティカルケア-塩酸ゲムシタビンによる白血球減少に対する G-CSF 製剤の適正使用 -.医療薬学 29(3): 391-396,2003.



## 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、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 医療薬剤学分野 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 薬学総合研究所 食品薬学研究室 森川敏生 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椿 正寛 准教授、武田 朋也 助教をはじめとする薬物治療学研究室の各位に心から感謝致します。

また、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阪口 勝彦 薬剤部長をはじめとする日本赤十字社和歌山医療センター薬剤部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。