

201015032A

厚生労働科学研究費補助金  
臨床研究推進研究事業  
医療技術実用化総合研究事業

「新しく発明された概念に基づく  
抗がん剤アルクチゲニンの臨床導入」  
に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 江角 浩安  
平成23 (2011) 年 5月

# 目 次

## I. 総括研究報告

新しく発明された概念に基づく抗がん剤アルクチゲニンの臨床導入	1
江角 浩安	

## II. 分担研究報告

1. 臨床導入の統括とTRの実施及び統括	江角 浩安	8
2. 臨床試験の計画及び統括	大津 敦	14
3. 臨床試験の計画、臨床試験実施支援	佐藤 暁洋	16
4. 臨床試験の実施	池田 公史	18
5. 臨床試験の実施	奥坂 拓志	20
6. 臨床試験の実施	畠 清彦	22

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	24
---------------------	----

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）

（総括）研究報告書

新しく発明された概念に基づく抗がん剤アルクチゲニンの臨床導入

研究代表者 江角浩安

独立行政法人国立がん研究センター東病院 理事長付

#### 研究要旨

既存の抗がん剤は、酸素や栄養供給が不足している腫瘍組織では有効性が極端に低くなるが、この微小環境下で最大の効果を得られ、かつ正常組織に低毒性の抗腫瘍薬をスクリーニングしアルクチゲニンを見いだした。局方に登録されたゴボウシ抽出エキスにアルクチゲニンが多く含まれる事に注目し、アルクチゲニンと同じ効果を得られるかを検討した。アルクチゲニンの代用と出来ることが分かった。臨床ですい臓がんに対する標準治療薬として用いられているゲムシタピンあるいはTS-1との併用効果についても検討し前臨床試験を実施した。その結果ゲムシタピンあるいはTS-1との併用では明らかに抗腫瘍効果が増強され、また、単独での毒性及びゲムシタピンとの併用による毒性は2週連続投与で見ると特記するほどのものはなかった。初歩的吸収試験から、十分な血中濃度を得られること、腸肝循環をする可能性があることが分かった。これに基づき、前臨床試験を追加実施し、プロトコール検討を行い臨床試験の準備は終了し間もなく症例登録予定である。

#### 分担研究者氏名及び所属施設

江角浩安 国立がん研究センター東病院  
大津 敦 国立がん研究センター東病院  
佐藤暁洋 国立がん研究センター東病院  
池田公史 国立がん研究センター東病院  
奥坂拓志 国立がん研究センター中央病院  
畠 清彦 癌研究会有明病院

#### A. 研究目的

既存の抗がん剤は、酸素供給や栄養供給が不足している腫瘍組織では有効性が極端に低くなる。そこで我々は、そういった腫瘍組織微小環境下で細胞障害性を最大に発揮する物質の探索を目的として、がん組織に特異的な適応反応を標的とした、正常組織に対して相対的に低毒性の抗腫瘍薬をスクリーニングしてきた。

天然物の中からこれまでにキガマイシン、アルクチゲニンなどを見いだしてきたが、本研究では、既に局方薬として登録されているゴボウシにアルクチゲニンが多く含まれる事に注目し、ゴボウシ抽出エキスによって、精製アルクチゲニンと同じ効果を得られる

事を確認し、さらに臨床ですい臓がんに対する標準治療薬として用いられているゲムシタピン、TS-1との併用効果についても検討し、研究成果の早期の臨床導入を目的とした。

#### B. 研究方法

##### 前臨床試験

ヒト由来の膵臓がん細胞株である AsPc1、BxPc3、CAPAN1、CAPAN2、CFPAC、MIAPaCa2、PANC1、PSN1、Su8686、KP3 の 10 株用いたゼノグラフトで抗腫瘍性を検討した。

牛蒡子抽出エキスは、クラシエ製薬との共同研究によりアルクチゲニンおよびその配糖体であるアルクチインの含量が一定になるような抽出法を確立し特許の申請をした。この抽出法で牛蒡子エキスを GMP グレードで調製し供給を受けた。細胞の実験には、ジメチルスルフォキシド (DMSO) で用時溶解したものを培地の 1/100 量で添加した。動物に投与する際は、0.5%のカルボキシメチルセルロースで懸濁したものを用いた。ゲムシタピンはイーライリリー社より購入し、生理食塩水で希釈して細胞および動物実験に用いた。TS-1は大鵬薬品から供与を受けた。

## 細胞の培養条件

すい臓がん細胞株の培養には、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; CAPAN1, CAPAN2, CFPAC, MIAPaCa2, PANC1) または、RPMI1640 (AsPc1, BxPc3, PSN1, KP3, Su8686) に 25 mM HEPES (pH7.4)、1/100 量の non-essential amino acid, 200 mM L-glutamine、抗生物質に 10% 血清を加えた培地に NaHCO<sub>3</sub> で最終 pH を 7.4 に調整したものを用いた。

栄養欠乏培地は、Sigma 社製の DMEM-base に 25 mM HEPES (pH7.4)、1/100 量の non-essential amino acid, 200 mM L-glutamine、および抗生物質に 10% の透析血清を加え通常培地と同様に NaHCO<sub>3</sub> で、最終 pH を 7.4 に調整して用いた。

## 細胞への傷害性の評価

細胞は、96 穴プレートへ 1 穴あたり 10,000 個播種した。24 時間後に培地を除去し、通常栄養培地または栄養欠乏培地に置き換え、それぞれに 10 倍または 5 倍で段階希釈したアルクチゲニンまたはゲムシタビンを加えた。添加の 72 時間後に WST-8 (Dojindo) キットで比色定量し算出された細胞数から細胞生存率を評価した。

## マウス臓がん細胞移植モデルの作製

マウスの皮下への移植には、細胞の実験に用いた 10 種類の細胞株を用いた。各腫瘍細胞株、それぞれ 500,000 個をヌードマウスの背皮下に移植して、経時的に腫瘍体積を測定した。アルクチゲニンおよびアルクチゲニン含有エキスは、週に 5 回、0.5 mg/マウスあるいは 5mg/マウスを胃内投与した。ゲムシタビンは、週に 1 回 100 mg/kg を腹腔内投与した。

## 亜急性毒性試験

アルクチゲニンに関してマウス一匹あたり、500 μg に相当する牛蒡子エキス約 5mg を 0.1ml に懸濁し一日一回週 5 日経口投与した。ゲムシタビンとの併用に関してはゲムシタビンを 100mg/kg となるように投与した。投与は 2 週間続けた。経時的に 2 週目まで、

血算、肝機能、腎機能検査と体重変化、最後に屠殺し病理組織学的検討を行った。

## 血中アルクチゲニン濃度の測定

初歩的な吸収試験を行うため、血中のアルクチゲニンおよびアルクチゲニングルクロン酸抱合体の測定を行った。牛蒡子エキス顆粒は 1g (牛蒡子エキス 330mg、アルクチゲニン 33mg に相当) あるいは 3g を内服し、0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 24 時間後にヘパリン採血をした。血漿からは 12 倍量のメタノールにて抽出をした。蒸発乾固した後 HPLC-UV あるいは HPLC-MS でアルクチゲニン、アルクチゲニングルクロン酸抱合体を分離定量した。

## (倫理面への配慮)

動物実験に関しては、国立がんセンターでの動物実験に関する審査を受けて行っているが、今後も同様に行う必要がある。臨床試験に関しては、プロトコールを国立がん研究センター受託研究審査委員会に提出し審査を受けている。UMIN への臨床試験登録を行った。(報告書提出の時点では審査は終わり、受理され、UMIN 登録も終了した)

## C. 研究結果

### 皮下移植モデルマウスにおけるアルクチゲニンとゲムシタビンおよび TS-1 との併用効果

ゲムシタビンとアルクチゲニンとは、薬効を示す細胞のおかれた微小環境が異なることが考えられる。アルクチゲニンは低酸素の阻血状態の腫瘍部で、ゲムシタビンあるいは TS-1 は、腫瘍血管の灌流の豊富な部分で薬効を期待できる。ヒトでも動物でも腫瘍組織は同一腫瘍組織内でも微小環境は極めて不均一である。従って、この複雑な微小環境においては、ゲムシタビンとアルクチゲニン、あるいは TS-1 とアルクチゲニンの併用によってより大きな効果が期待された。そこで動物ゼノグラフト系でゲムシタビンあるいは TS-1 との併用について検討した。

本実験には、増殖速度が比較的緩やかで組織内の細胞の壊死が少ない MIAPaCa-2 (JCRB) および CAPAN-1 細胞を用いた。

ゲムシタビンは、被験物質全量を生理食塩

液 6.7 mL で溶解し、100 mM 溶液を調製し、これを保存溶液とした。投与検体は、2.01 mL の 100 mM 溶液に生理食塩液 0.99 mL を加え、20 mg/mL 溶液とした。被験薬物ゲムシタビンの保存溶液は分注し-30℃に保存した。投与検体は用時調製し、調整後直ちに使用した。

TS-1 は被験物質 72.51 mg を秤量し、0.5%CMC 水溶液を加えて全量を 16 mL にし、超音波処理により原末を完全に溶解させた。使用するまで 4℃に保存した。

アルクチゲニン含有エキスはアクチゲニン含有エキス 219.2 mg (アクチゲニン 25 mg 当量) を秤量し、2.5 mL の 1%CMC で溶解後、超純水で総量 5 mL とした。

平均腫瘍サイズが 200-300 mm<sup>3</sup> 程度になった時点で各群の腫瘍サイズが均一になるよう選別・群分け (各群 10 匹) を行った。尚、腫瘍サイズは以下計算式により算出した。

腫瘍サイズ Tomor Volume (mm<sup>3</sup>) =  $4/3 \times \pi \times L/2 \times W/2 \times W/2$

(L: 腫瘍長径 [mm], W: 腫瘍短径 [mm])

群構成表の条件に従って薬剤投与を 28 日間行った。この間、腫瘍サイズおよび体重を 1 週間に 2 回の頻度で測定し、一般症状観察 (月～金曜日) を行った。

MIaPaCa 細胞の場合は、群分けは移植日より 27 日目に行い、同日投与を開始した。

### 1) 一般症状観察

実験期間中、動物に特に異常は認められなかった。

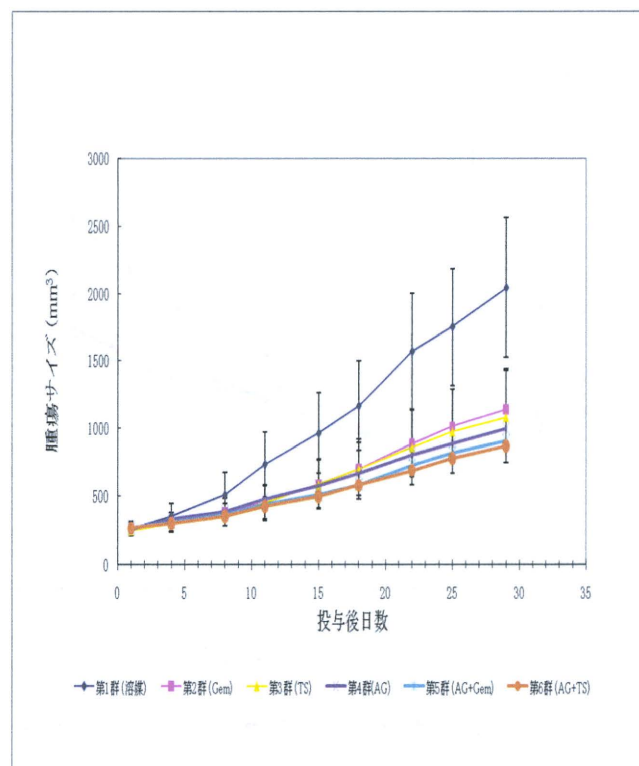
### 2) 体重

実験期間中、特に異常は認められなかった。腫瘍サイズ

溶媒投与群では著しい腫瘍増殖が認められ、実験終了時 (Day 29) には 2041.96 ± 546.87 mm<sup>3</sup> のサイズにまで達した。一方、各薬剤投与群では抗腫瘍性効果が認められ、実験終了時 (Day 29) にはゲムシタビン投与群の腫瘍サイズは 1140 ± 314 mm<sup>3</sup>、TS-1 投与群の腫瘍サイズは 1084 ± 362 mm<sup>3</sup>、アルクチゲニン投与群の腫瘍サイズは 997 ± 367 mm<sup>3</sup>、アルクチゲニン/ゲムシタビン投与群の腫瘍サイズは 905 ± 279 mm<sup>3</sup>、アルクチゲニン/TS-1 投与群の腫瘍サイズは 868 ± 225 mm<sup>3</sup> 程度であった。

腫瘍サイズの変化を 6 群間で比較したところ、Day 15 以降で溶媒投与群に対して各薬剤投与群で有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。

MIaPaCa 細胞での結果を図示する。

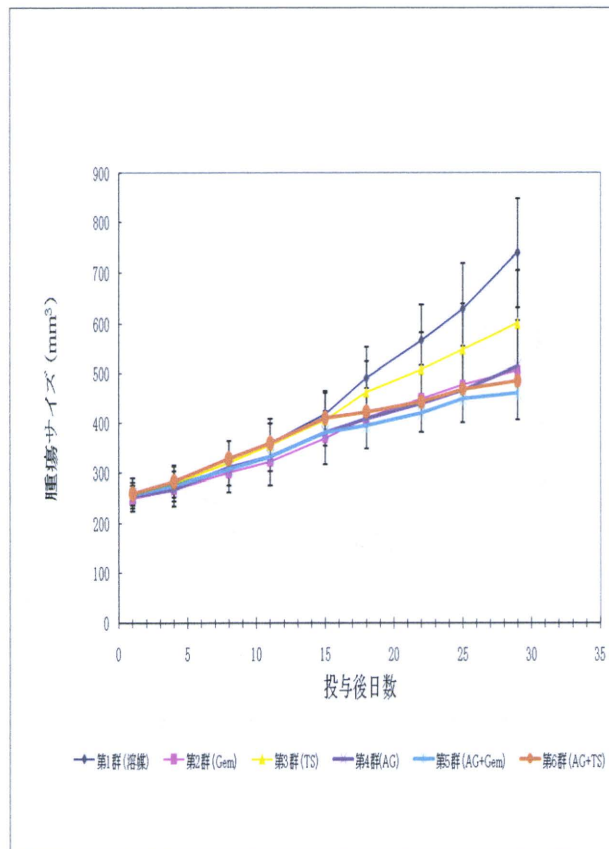


CAPAN-1 細胞は、ヌードマウスに細胞移植前に細胞培養フラスコで (培養面積 225 cm<sup>2</sup>) あたり 4.8 x 10<sup>6</sup> 個の細胞を培養した。移植時、総細胞 5.60 x 10<sup>8</sup> 個回収され、そのうち生細胞は 5.55 x 10<sup>8</sup> 個で生存率は 99.1% であった。群分けは移植日より 33 日目に行い、同日投与を開始した。

前の実験と同様に、一般症状観察で実験期間中、動物に特に異常は認められなかった。また、体重についても実験期間中、特に異常は認められなかった。

腫瘍サイズに関しては Day 15 以降、溶媒投与群では著しい腫瘍増殖が認められ、実験終了時 (Day 29) には 739 ± 113 mm<sup>3</sup> のサイズにまで達した。一方、各薬剤投与群では抗腫瘍性効果が認められ、実験終了時 (Day 29) にはゲムシタビン投与群の腫瘍サイズは 506 ± 106 mm<sup>3</sup>、TS-1 投与群の腫瘍サイズは 603 ± 107 mm<sup>3</sup>、アルクチゲニン投与群の腫瘍サ

イズは  $515 \pm 111 \text{ mm}^3$ 、アルクチゲニン/ゲムシタピン投与群の腫瘍サイズは  $461 \pm 70 \text{ mm}^3$ 、アルクチゲニン/TS-1 投与群の腫瘍サイズは  $486 \pm 132 \text{ mm}^3$  程度であった。



各群の腫瘍サイズの変化。平均値±標準偏差 (n=10) で示す。Day 1：投与開始日。

腫瘍サイズの変化を 6 群間で比較したところ、TS-1 は Day 29 で、その他の薬剤は Day 18~Day 22 以降で溶媒投与群に対して有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。

各薬剤単独投与群間の比較では、TS-1 よりゲムシタピンおよびアルクチゲニンの方が効果は大きく、ゲムシタピンおよびアルクチゲニン間では差はなかった。

薬剤併用群に関しては、アルクチゲニン/TS-1 併用は TS-1 単独に対して有意な併用治療効果が認められた

#### 急性及び亜急性毒性試験

アルクチゲニンおよびゲムシタピン併用療法の臨床試験に先立ち、アルクチゲニンの 2

週間連続経口投与およびゲムシタピン 2 週間における 1 回/週腹腔内投与ならびに両薬併用時の急性毒性試験を一般症状観察、体重測定、毒性評価パラメーターの測定ならびに病理組織学的検査を指標に実施した。

薬剤投与は抗腫瘍性試験と同じ条件で行った。動物は、Cr1j:CD1 ICR マウスを用いた。6 週齢で実験施設に搬入し、一週間の馴化の後試験を行った。

アルクチゲニン含有エキスは 2 週間経口投与した。また、ゲムシタピンは 1 週間に 1 回腹腔内投与した。実験期間中、一般症状観察及び体重測定を行った。投与開始日および投与開始後 2 週目に血液を採取した。また、採血後、剖検し必要な器官・組織を摘出した。

外部業者に委託して血液生化学的検査及び組織切片作製を行った

マウス一般症状観察：1 週間のうち 5 日間観察した。

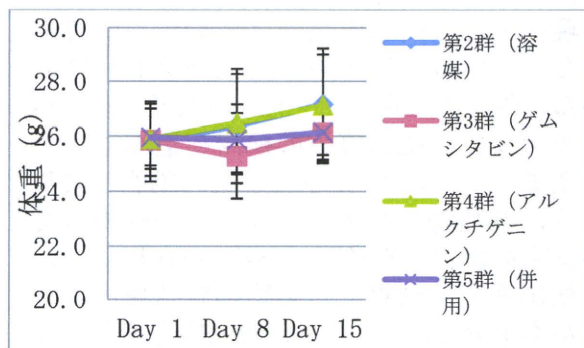
体重測定：投与開始日、投与開始後 1 週目および 2 週目に測定した。血液学的検査：投与直前（ゼロポイント群）および投与開始後 2 週目に採血し、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、白血球数(WBC)、血小板数(PLT)をセルタック α（日本光電工業株式会社）で測定した。

血液生化学的検査：投与直前および投与開始後 2 週目に採血し、血漿中の総蛋白、アルブミン、グロブリン、A/G 比、グルコース、総コレステロール、トリグリセリド、尿素窒素、クレアチニン、AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、ナトリウム、カリウム、クロールを測定した（財団法人食品農医薬品安全性評価センターに委託）。

器官・組織重量測定：投与直前（ゼロポイント群）および投与開始後 2 週目の採血後、全例の心臓、肺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓（左右）の重量を測定した。

病理組織学的検査（所見）：胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、骨髄、巨核細胞数

## 体重変化



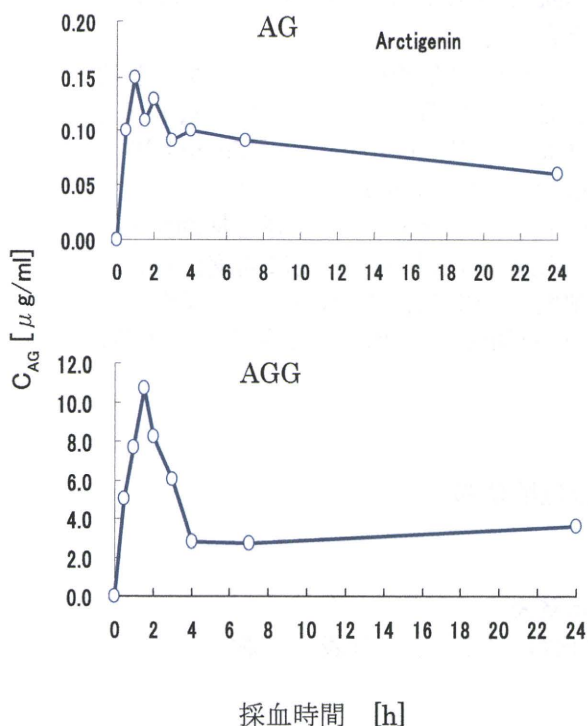
併用によりゲムシタビンの毒性によると思われる体重変化を更に増強することなかった。

一般症状、臨床検査いずれにおいても、ゲムシタビンの影響を増強することはなかった。臨床検査項目、データの詳細については報告書の記載からは割愛する。

## 初歩的吸収試験

まず牛蒡子エキス 500mg、アルクチゲニンにして 33mg を、牛蒡子エキス顆粒の形で服用し経時的に血中濃度を測定した。その結果を図に示す。

ゴボウシ顆粒剤 1.0 g (Arctigenin 33 mg)



上はアルクチゲニン下のグラフはアルクチゲニングルクロン酸抱合体である。グルクロン酸抱合体はアルクチゲニンより約 30 分後にピークを迎える。その後ゆっくりとした経過で 24 時間後でも十分な濃度が検出され、腸肝循環を疑わせた。なお培養細胞に対する抗腫瘍性という意味では生物学的にはグルクロン酸抱合体も活性であり、動物における抗腫瘍性も示すであろうと考えられる。

## 臨床試験のためのプロトコール研究

班員全員が再三に渡り会合を持ち臨床試験の進め方に関して検討した。

その結果、

1. まず第 I 相試験として念のために安全性試験を行う。ただし、最大耐量が出るとは考えられないので pharmacokinetics の検討を並行して行い、適切な投与量を決定する。
2. 対象は抗腫瘍性も同時に見る第 I/II 相として行うためにゲムシタビン不応性膀胱がん患者とする pharmacokinetics を行う観点から少なくとも前半は国立がん研究センター東病院および臨床開発センターで行い、安全性および適切な投与量が決定したら、国立がん研究センター中央病院、癌研有明病院での第 II 相試験部分への参加を可能とする。
3. POC のためのバイオマーカーを考える必要があるが、メタボローム、PET、perfusion CT, contrast-enhanced MRI あるいは Ultrasonography や Diffusion-weighted MRI 等を検討する
4. 出来るだけ早い時期に高度医療評価制度への申請、或いは医師主導治験のための PMDA への相談を行うことにする。
5. プロトコールは確定し、国立がん研究センター受託研究審査委員会に提出し年度内に審査はほぼ終了した。

## D. 考察

### 前臨床試験

精製アルクチゲニンおよびゴボウシから



得られた粗抽出エキスをを用いた検討の結果、通常栄養培地においては、細胞障害性がみられなかったのに対して、腫瘍の微小環境を模倣した栄養欠乏培地では、アルクチゲニンの含量に従った抗腫瘍活性がみられた。また、ゴボウシの粗抽出物は、精製アルクチゲニンと同等の抗腫瘍活性を持つことが *in vitro* および *in vivo* の研究結果から明らかになった。

現在の前臨床試験での弱点は、ヒトでの薬物動態解析に関しては初步的とはいえ十分に期待の持てる結果が出ているが、これに相当する動物モデルでの薬物動態試験が遅れていることである。至適投与量を算出する上では薬物動態が最も信頼性の高いデータになると思われるのでこの部分の補強が急がれる。

アルクチゲニン或いは牛蒡子エキスの抗腫瘍性の POC に関し現在のところ充分にこれに適した動物モデルがあるわけではない。しかし、新しい概念に基づく新しいカテゴリーの抗腫瘍性であることを十分な説得性をもって示すためにはメタボロームやイメージングを駆使する必要があるであろう

アルクチゲニンとゲムシタピンさらに TS-1 との併用効果を動物モデルにおいて検討したところ、併用によってより大きな抗腫瘍性を発揮することが明らかになった。しかしながら、ゲムシタピンとアルクチゲニンが実際に異なる環境で作用しているのかについては、本研究の中で明らかにできなかったため、今後動物モデルを用いて実証していく必要があると考えられる。

アルクチゲニンは、従来の抗がん剤とは、異なる作用機序によって抗腫瘍効果を示すことから、従来の抗がん剤では、効果の薄かったがんに対して有効な治療薬となる可能性があると考えられた。

急性及び連続投与による毒性試験に関しては毒性は見られなかった。また、ゲムシタピンとの併用によっても、ゲムシタピンの毒性を大きく増強するような反応は見られなかった。しかし、アルクチゲニン、アルクチインなどは腸内細菌で代謝されることも知られている。ヒト腸内細菌の影響がどの様に出るのか現在は予測が付かない。動物では安全であったが、また、過去の文献から見る限り牛蒡子に大きな毒性があるとは考えにく

いが、臨床試験を行う上で毒性の問題は慎重に検討される必要がある。

現在までの前臨床試験は膵臓がんの特化したものであるが、将来の事を考えれば膵臓がん以外への応用も考え他の細胞株、他の動物モデルでの抗腫瘍性の検討を追加するのが望ましい。また、ヒトでの薬物動態と同じように抗腫瘍性を示す投与量での動物の薬物動態を検討する必要がある。現在用いている検出系では動物での薬物動態試験には感度が不十分であり、新しい研究協力者として明治薬科大学の岸野教授を招き血中濃度測定のため、感度を改良している。

## E. 結論

1. まず第 I 相試験として念のために安全性試験を行う。ただし、最大耐量が出るとは考えられないので pharmacokinetics の検討を並行して行い、適切な投与量を決定する。
2. 対象は抗腫瘍性も同時に見る第 I/II 相として行うためにゲムシタピン不応性膵がん患者とする pharmacokinetics を行う観点から少なくとも前半は国立がん研究センター東病院および臨床開発センターで行い、安全性および適切な投与量が決定したら、国立がん研究センター中央病院、癌研有明病院での第 II 相試験部分への参加を可能とする。
3. POC のためのバイオマーカーを考える必要があるが、メタボローム、PET、perfusion CT, contrast-enhanced MRI あるいは Ultrasonography や Diffusion-weighted MRI 等を検討する
4. 出来るだけ早い時期に高度医療評価制度への申請、或いは医師主導治験のための PMDA への相談を行うことにする。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

研究の刊行に関する一覧表に記載。

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 江角浩安 アルクチゲニン高含有ゴボウ  
シエキス及びその製造方法  
出願番号[2010-505497]

3. その他  
なし

2. 実用新案登録

## Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）

（総括）研究報告書

臨床導入の統括と TR の実施及び統括

研究（代表）分担者 江角浩安

独立行政法人国立がん研究センター東病院 理事長付

#### 研究要旨

既存の抗がん剤は、酸素や栄養供給が不足している腫瘍組織では有効性が極端に低くなるが、この微小環境下で最大の効果を得られかつ正常組織に低毒性の抗腫瘍薬をスクリーニングしキガマイシン、アルクチゲニンなどを見いだした。局方に登録されたゴボウシにアルクチゲニンが多く含まれる事に注目し、アルクチゲニンとその配糖体が安定して高い濃度で含まれる中手鬱方を工夫し特許を出願、GMP 裂ベルで製剤化し前臨床試験を実施した。その結果、牛蒡子エキスはそのアルクチゲニン含量から想定される抗腫瘍性を示した。ゲムシタピンあるいは TS-1 との併用では明らかに抗腫瘍効果が増強されたが、単独での毒性及びゲムシタピンとの併用による毒性は 2 週連続投与で見ると特記するほどのものはなかった。初歩的吸収試験で血中に有効なアルクチゲニンおよびそのグルクロン酸抱合体が認められた。腸肝循環の可能性も明らかになった。ジェムシタピン不応性膵がん患者を対象にした、臨床試験プロトコルの確定をし倫理審査委員会に提出し受理された。

#### 分担研究者氏名及び所属施設

江角浩安 国立がん研究センター東病院  
大津 敦 国立がん研究センター東病院  
佐藤暁洋 国立がん研究センター東病院  
池田公史 国立がん研究センター東病院  
奥坂拓志 国立がん研究センター中央病院  
畠 清彦 癌研究会有明病院

#### A. 研究目的

既存の抗がん剤は、酸素供給や栄養供給が不足している腫瘍組織では有効性が極端に低くなることを報告してきた。そこで我々は、そういった腫瘍組織の微小環境下で細胞障害性を最大に発揮する物質の探索を目的として、がん組織に特異的なエネルギー代謝系を標的とした、正常組織に対して相対的に低毒性の抗腫瘍薬をスクリーニングしてきた。

天然物の中からこれまでにキガマイシン、アルクチゲニンなどを見いだしてきたが、本研究では、既に局方薬として登

録されているゴボウシにアルクチゲニンが多く含まれる事に注目し、ゴボウシ抽出エキスを用いた臨床導入を目的とした。

#### B. 研究方法

##### 前臨床試験

ヒト由来の膵臓がん細胞株である AsPc1、BxPc3、CAPAN1、CAPAN2、CFPAC、MIAPaCa2、PANC1、PSN1、Su8686、KP3 の 10 株用いたゼノグラフトで抗腫瘍性を検討した。

牛蒡子抽出エキスは、クラシエ製薬との共同研究によりアルクチゲニンおよびその配糖体であるアルクチインの含量が一定になるような抽出法を確立し特許の申請をした。この抽出法で牛蒡子エキスを GMP グレードで調製し供給を受けた。細胞の実験には、ジメチルスルフォキシド（DMSO）で用時溶解したものを培地の 1/100 量で添加した。動物に投与する際は、0.5% のカルボキシメチルセルロースで懸濁したものをを用いた。ゲムシタピンはイーライリリー社より購入し、生理食塩水で希釈して細胞および動物実験に用いた。TS-1 は大鵬薬品から供

与を受けた。

#### 細胞の培養条件

すい臓がん細胞株の培養には、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; CAPAN1, CAPAN2, CFPAC, MIAPaCa2, PANC1) または、RPMI1640 (AsPc1, BxPc3, PSN 1, KP3, Su8686) に 25 mM HEPES (pH7.4)、1/100 量の non-essential amino acid, 200 mM L-glutamine、抗生物質に 10% 血清を加えた培地に  $\text{NaHCO}_3$  で最終 pH を 7.4 に調整したものを用いた。

栄養欠乏培地は、Sigma 社製の DMEM-base に 25 mM HEPES (pH7.4)、1/100 量の non essential amino acid, 200 mM L-glutamine、および抗生物質に 10% の透析血清を加え通常培地と同様に  $\text{NaHCO}_3$  で、最終 pH を 7.4 に調整して用いた。

#### 細胞への傷害性の評価

細胞は、96 穴プレートへ 1 穴あたり 10,000 個播種した。24 時間後に培地を除去し、通常栄養培地または栄養欠乏培地に置き換え、それぞれに 10 倍または 5 倍で段階希釈したアルクチゲニンまたはゲムシタピンを加えた。添加の 72 時間後に WST-8 (Dojindo) キットで比色定量し算出された細胞数から細胞生存率を評価した。

#### マウス臓がん細胞移植モデルの作製

マウスの皮下への移植には、細胞の実験に用いた 10 種類の細胞株を用いた。各腫瘍細胞株、それぞれ 500,000 個をヌードマウスの背皮下に移植して、経時的に腫瘍体積を測定した。アルクチゲニンおよびアルクチゲニン含有エキスは、週に 5 回、0.5 mg/マウス或いは 5mg/マウスを胃内投与した。ゲムシタピンは、週に 1 回 100 mg/kg を腹腔内投与した。

#### 亜急性毒性試験

アルクチゲニンに関してマウス一匹あたり、500  $\mu\text{g}$  に相当する牛蒡子エキス約 5 mg を 0.1 ml に懸濁し一日一回週 5 日経口投与した。ゲムシタピンとの併用に関してはゲムシタピンを 100mg/kg となるように投与した。投与は 2 週間続けた。経時的に 2 週目まで、血算、肝機能、腎機能検査と体重変化、最後に屠殺し病理組織学的検討を行った。

#### 血中アルクチゲニン濃度の測定

初歩的な吸収試験を行うため、血中のアルクチゲニンおよびアルクチゲニングルクロン酸抱合体の測定を行った。牛蒡子エキス顆粒は 1 g (牛蒡子エキス 330 mg、アルクチゲニン 33 mg に相当) 或いは 3 g を内服し、0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 24 時間後にヘパリン採血をした。血漿からは 12 倍量のメタノールにて抽出をした。蒸発乾固した後 HPLC-UV あるいは HPLC-MS でアルクチゲニン、アルクチゲニングルクロン酸抱合体を分離定量した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験に関しては、国立がんセンターでの動物実験に関する審査を受けて行っているが、今後も同様に行う必要がある。臨床試験に関しては、プロトコールを国立がん研究センター受託研究審査委員会に提出し倫理的審査を受けた。UMIN で臨床試験登録を行った。

### **C. 研究結果**

#### 皮下移植モデルマウスにおけるアルクチゲニンとゲムシタピンおよび TS-1 との併用効果

ゲムシタピンとアルクチゲニンとでは、薬効を示す細胞のおかれた微小環境が異なることが考えられる。アルクチゲニンは低酸素の阻血状態の腫瘍部で、ゲムシタピンあるいは TS-1 は、腫瘍血管の灌流の豊富な部分で薬効を期待できる。ヒトでも動物でも腫瘍組織は同一腫瘍組織内でも微小環境は極めて不均一である。

従って、この複雑な微小環境においては、ゲムシタピンとアルクチゲニン、あるいはTS-1とアルクチゲニンの併用によってより大きな効果が期待された。そこで動物ゼノグラフト系でゲムシタピンあるいはTS-1との併用について検討した。

本実験には、増殖速度が比較的緩やかで組織内の細胞の壊死が少ないMIaPaCa-2 (JCRB) およびCAPAN-1細胞を用いた。

ゲムシタピンは、被験物質全量を生理食塩液 6.7 mL で溶解し、100 mM 溶液を調製し、これを保存溶液とした。投与検体は、2.01 mL の 100 mM 溶液に生理食塩液 0.99 mL を加え、20 mg/mL 溶液とした。被験薬物ゲムシタピンの保存溶液は分注し-30℃に保存した。投与検体は用時調製し、調整後直ちに使用した。

TS-1 は被験物質 72.51 mg を秤量し、0.5%CMC 水溶液を加えて全量を 16 mL にし、超音波処理により原末を完全に溶解させた。使用するまで 4℃に保存した。

アルクチゲニン含有エキスはアクチゲニン含有エキス 219.2 mg (アクチゲニン 25 mg 当量) を秤量し、2.5 mL の 1%CMC で溶解後、超純水で総量 5 mL とした。

平均腫瘍サイズが 200-300 mm<sup>3</sup> 程度になった時点で各群の腫瘍サイズが均一になるよう選別・群分け (各群 10 匹) を行った。尚、腫瘍サイズは以下計算式により算出した。

腫瘍サイズ Tomor Volume (mm<sup>3</sup>) =  $4/3 \times \pi \times L/2 \times W/2 \times W/2$

(L: 腫瘍長径[mm], W: 腫瘍短径[mm])

群構成表の条件に従って薬剤投与を 28 日間行った。この間、腫瘍サイズおよび体重を 1 週間に 2 回の頻度で測定し、一般症状観察 (月～金曜日) を行った。

MIaPaCa 細胞の場合は、群分けは移植日より 27 日目に行い、同日投与を開始した。

### 3) 一般症状観察

実験期間中、動物に特に異常は認められなかった。

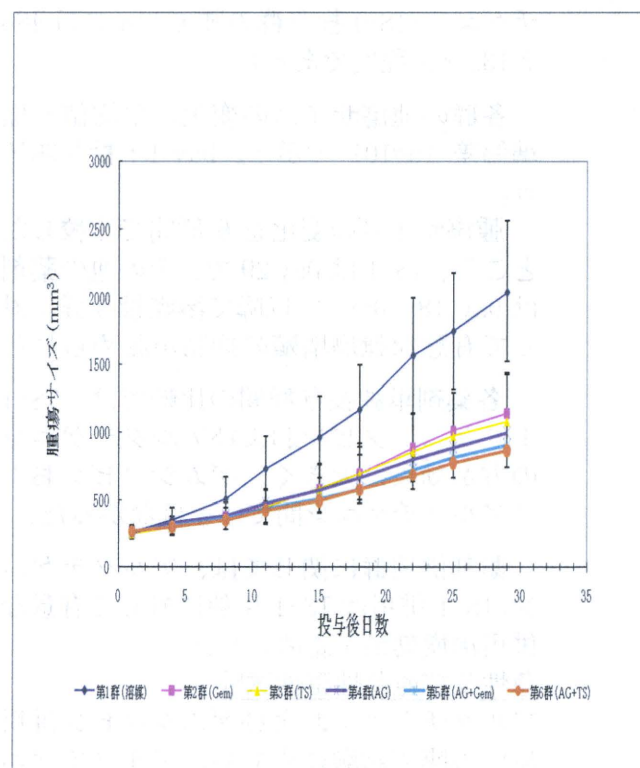
### 4) 体重

実験期間中、特に異常は認められなかった。腫瘍サイズ

溶媒投与群では著しい腫瘍増殖が認められ、実験終了時 (Day 29) には 2041.96 ± 546.87 mm<sup>3</sup> のサイズにまで達した。一方、各薬剤投与群では抗腫瘍性効果が認められ、実験終了時 (Day 29) にはゲムシタピン投与群の腫瘍サイズは 1140 ± 314 mm<sup>3</sup>、TS-1 投与群の腫瘍サイズは 1084 ± 362 mm<sup>3</sup>、アルクチゲニン投与群の腫瘍サイズは 997 ± 367 mm<sup>3</sup>、アルクチゲニン/ゲムシタピン投与群の腫瘍サイズは 905 ± 279 mm<sup>3</sup>、アルクチゲニン/TS-1 投与群の腫瘍サイズは 868 ± 225 mm<sup>3</sup> 程度であった。

腫瘍サイズの変化を 6 群間で比較したところ、Day 15 以降で溶媒投与群に対して各薬剤投与群で有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。

MIaPaCa 細胞での結果を図示する。



CAPAN-1 細胞は、ヌードマウスに細胞移植前に細胞培養フラスコで（培養面積 225 cm<sup>2</sup>）あたり 4.8 x 10<sup>6</sup> 個の細胞を培養した。移植時、総細胞 5.60 x 10<sup>8</sup> 個回収され、そのうち生細胞は 5.55 x 10<sup>8</sup> 個で生存率は 99.1%であった。群分けは移植日より 33 日目に行い、同日投与を開始した。

前の実験と同様に、一般症状観察で実験期間中、動物に特に異常は認められなかった。また、体重に関しても実験期間中、特に異常は認められなかった。

腫瘍サイズに関しては Day 15 以降、溶媒投与群では著しい腫瘍増殖が認められ、実験終了時（Day 29）には 739 ± 113 mm<sup>3</sup> のサイズにまで達した。一方、各薬剤投与群では抗腫瘍性効果が認められ、実験終了時（Day 29）にはゲムシタビン投与群の腫瘍サイズは 506 ± 106 mm<sup>3</sup>、TS-1 投与群の腫瘍サイズは 603 ± 107 mm<sup>3</sup>、アルクチゲニン投与群の腫瘍サイズは 515 ± 111 mm<sup>3</sup>、アルクチゲニン/ゲムシタビン投与群の腫瘍サイズは 461 ± 70 mm<sup>3</sup>、アルクチゲニン/TS-1 投与群の腫瘍サイズは 486 ± 132 mm<sup>3</sup> 程度であった。

各群の腫瘍サイズの変化。平均値 ± 標準偏差（n=10）で示す。Day 1：投与開始日。

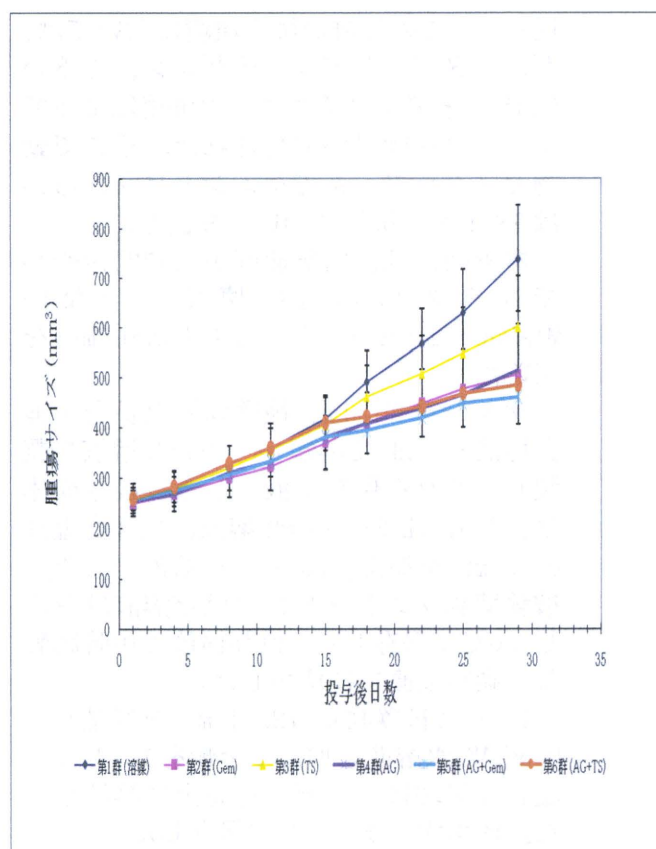
腫瘍サイズの変化を 6 群間で比較したところ、TS-1 は Day 29 で、その他の薬剤は Day 18～Day 22 以降で溶媒投与群に対して有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。

各薬剤単独投与群間の比較では、TS-1 よりゲムシタビンおよびアルクチゲニンの方が効果は大きく、ゲムシタビンおよびアルクチゲニン間では差はなかった。

薬剤併用群に関しては、アルクチゲニン/TS-1 併用は TS-1 単独に対して有意な併用治療効果が認められた

#### 急性及び亜急性毒性試験

アルクチゲニンおよびゲムシタビン併用療法の臨床試験に先立ち、アルクチゲニンの 2 週間連続経口投与およびゲムシタビン 2 週間における 1 回/週腹腔内投与な



らびに両薬併用時の急性毒性試験を一般症状観察、体重測定、毒性評価パラメーターの測定ならびに病理組織学的検査を指標に実施した。

薬剤投与は抗腫瘍性試験と同じ条件で行った。動物は、Cr1j:CD1 ICR マウスを用いた。6 週齢で実験施設に搬入し、一週間の馴化の後試験を行った。

アルクチゲニン含有エキスは 2 週間経口投与した。また、ゲムシタビンは 1 週間に 1 回腹腔内投与した。実験期間中、一般症状観察及び体重測定を行った。投与開始日および投与開始後 2 週目に血液を採取した。また、採血後、剖検し必要な器官・組織を摘出した。

外部業者に委託して血液生化学的検査及び組織切片作製を行った

マウス一般症状観察:1週間のうち5日間観察した。

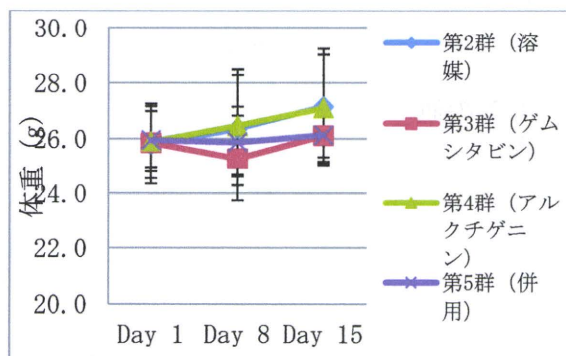
体重測定:投与開始日、投与開始後1週目および2週目に測定した。血液学的検査:投与直前(ゼロポイント群)および投与開始後2週目に採血し、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、白血球数(WBC)、血小板数(PLT)をセルタックα(日本光電工業株式会社)で測定した。

血液生化学的検査:投与直前および投与開始後2週目に採血し、血漿中の総蛋白、アルブミン、グロブリン、A/G比、グルコース、総コレステロール、トリグリセリド、尿素窒素、クレアチニン、AST(GOT)、ALT(GPT)、ALP、ナトリウム、カリウム、クロールを測定した(財団法人食品農医薬品安全性評価センターに委託)。

器官・組織重量測定:投与直前(ゼロポイント群)および投与開始後2週目の採血後、全例の心臓、肺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓(左右)の重量を測定した。

病理組織学的検査(所見):胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、骨髓、巨核細胞数

体重変化



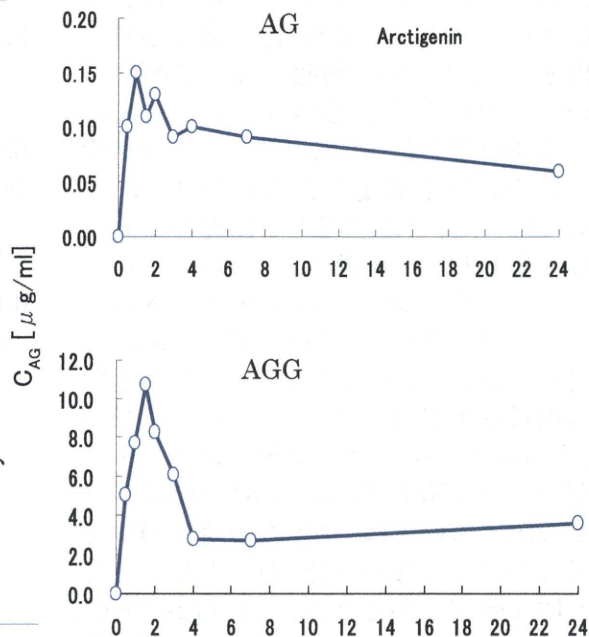
併用によりゲムシタピンの毒性によると思われる体重変化を更に増強することなかった。

一般症状、臨床検査いずれにおいても、ゲムシタピンの影響を増強することはなかった。臨床検査項目、データの詳細については報告書の記載からは割愛する。

初歩的吸収試験

まず牛蒡子エキス 500mg、アルクチゲニンにして 33mg を、牛蒡子エキス顆粒の形で服用し経時的に血中濃度を測定した。その結果を図に示す。

ゴボウシ顆粒剤 1.0 g (Arctigenin 33 mg)



上はアルクチゲニン下のグラフはアルクチゲニングルクロン酸抱合体である。グルクロン酸抱合体はアルクチゲニンより約30分後にピークを迎える。その後ゆっくりとした経過で24時間後でも十分な濃度が検出され、腸肝循環を疑わせた。なお培養細胞に対する抗腫瘍性という意味では生物学的にはグルクロン酸抱合体も活性であり、動物における抗腫瘍性も示すであろうと考えられる。

D. 考察



## 前臨床試験

GMP グレードで調製したゴボウシエキスをういアルクチゲニンの含量から予想される抗腫瘍性を確認することが出来た。このエキスは、患者で投与を予定している体重あたりの量の十倍量を 2 週間連続投与しても何の毒性も認められなかった。その意味では安全と考えられるが、一方でアルクチゲニンに関しては腸内細菌により代謝を受けることも分かっており、十分な注意が必要であると考えている。

現在の前臨床試験での弱点は、ヒトでの薬物動態解析に関しては初歩的とはいえ十分に期待の持てる結果が出ているが、これに相当する動物モデルでの薬物動態試験が遅れていることである。至適投与量を算出する上では薬物動態が最も信頼性の高いデータになると思われるのでこの部分の補強が急がれる。これまで、アルクチゲニンの濃度を測定した方法が HPLC-UV であったので、この感度を更に十分に高くするため HPLC-MS の導入を行っている。

アルクチゲニンとゲムシタピンさらに TS-1 との併用効果を動物モデルにおいて検討したところ、併用によってより大きな抗腫瘍性を発揮することが明らかになった。しかしながら、ゲムシタピンとアルクチゲニンが実際に異なる環境で作用しているのかについては、本年度の研究の中でも明らかにできなかった。POC としてとても大切な研究であるために、perfusion CT, Perfusion MRI, Diffusion MRI などの機能画像を用いた研究を追加していく予定である。

各種のヒト腫瘍細胞を用いた抗腫瘍性の研究で、細胞株によりアルクチゲニンの効果に差があることが分かった。このことはバイオマーカーを見いだす可能性を示唆するものであり、既に開始したが、腫瘍の全エクソン塩基配列決定などを用いた効果を予測するバイオマーカーの探索に

繋げていく。

アルクチゲニンは、従来の抗がん剤とは、異なる作用機序によって抗腫瘍効果を示すことから、従来の抗がん剤では、効果の薄かったがんに対して有効な治療薬となる可能性があると考えられた。

## E. 結論

牛蒡子エキスはヒトへの応用が可能な製剤であることが分かった。一方 POC のためのバイオマーカーをゲノム、昨日画像を含めて考える必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

研究の刊行に関する一覧表に記載。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

2. 江角浩安 アルクチゲニン高含有ゴボウシエキス及びその製造方法  
出願番号[2010-505497]

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）

（総括）研究報告書

臨床試験の計画及び統括

研究分担者 大津 敦

独立行政法人国立がん研究センター東病院 臨床開発センター長

#### 研究要旨

既存の抗がん剤は、酸素や栄養供給が不足している腫瘍組織では有効性が極端に低くなるが、この微小環境下で最大の効果を得られかつ正常組織に低毒性の抗腫瘍薬をスクリーニングしキガマイシン、アルクチゲニンなどを見いだした。局方に登録されたゴボウシにアルクチゲニンが多く含まれる事に注目し、アルクチゲニンとその配糖体が安定して高い濃度で含まれる中手鬱方を工夫し特許を出願、GMP 裂ベルで製剤化し前臨床試験を実施した。その結果、牛蒡子エキスはそのアルクチゲニン含量から想定される抗腫瘍性を示した。ゲムシタピンあるいは TS-1 との併用では明らかに抗腫瘍効果が増強されたが、単独での毒性及びゲムシタピンとの併用による毒性は 2 週連続投与で見ると特記するほどのものはなかった。初歩的吸収試験で血中に有効なアルクチゲニンおよびそのグルクロン酸抱合体が認められた。腸肝循環の可能性も明らかになった。ジェムシタピン不応性膀胱がん患者を対象にした、臨床試験プロトコルの確定をし倫理審査委員会に提出し受理された。

#### A. 研究目的

既存の抗がん剤は、酸素供給や栄養供給が不足している腫瘍組織では有効性が極端に低くなることを報告してきた。そこで我々は、そういった腫瘍組織の微小環境下で細胞障害性を最大に発揮する物質の探索を目的として、がん組織に特異的なエネルギー代謝系を標的とした、正常組織に対して相対的に低毒性の抗腫瘍薬をスクリーニングしてきた。

天然物の中からこれまでにキガマイシン、アルクチゲニンなどを見いだしてきたが、本研究では、既に局方薬として登録されているゴボウシにアルクチゲニンが多く含まれる事に注目し、ゴボウシ抽出エキスを用いた臨床導入を目的とした。

#### B. 研究方法

江角分担研究者の項目で述べられている通り、臨床導入のための前臨床試験を行いこの結果を班員全体で討議し、臨床導入のための道筋に関する討議と共にプロトコール検討を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験に関しては、国立がんセンターでの動物実験に関する審査を受けて行っているが、今後も同様に行う必要がある。臨床試験に関しては、プロトコールを国立がん研究センター受託研究審査委員会に提出し倫理的審査を受けた。UMIN で臨床試験登録を行った。

#### C. 研究結果

前臨床試験の結果は江角分担研究者の報告書に書かれているとおりである。初歩的な吸収試験の結果から毒性の検討の追加をする事にした。また、前臨床で用いられている細胞が全てヒトの膵臓がんであるため、他の腫瘍系、大腸がん、胃がん食道がんなどにも拡げて検討する事にした。

ヒトでの初歩的な薬物動態検討を行い、血中には十分な薬剤濃度が得られることが分かったが、代謝も含めてさらに詳細に検討することにした。また、薬剤の至適投与量設定のためにもヒトおよび動物での薬物動態を測定法の感度改善を含めて行い、プロトコールに反映することにした。この研究をより確実なものにする

ため、明治薬科大学岸野史志教授の協力を仰ぐこととした。

フェーズ 1 の設定を、当初 Pharmacokinetics を中心に行う案も出たが、単剤で抗腫瘍効果も検討する事、その上でゲムシタビンあるいはTS-1との併用による抗腫瘍効果を検討すべきとの結論を得た。また早い段階で医薬品機構との接触をし高度医療評価制度或いは医師主導治験を目指すべきと結論した。ジェムシタビン不応性膵がん患者を対象とした Phase1/II プロトコルを確定し、k 億立願研究センター受託研究審査委員会に提出し年度を越えたが受理された。5 月末から 6 月に臨床登録開始予定である。

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

#### D. 考察

どれだけ早く患者の元にこの成果を届けるのかと考えた時、早い段階で抗腫瘍効果を示す事によって、以降の大規模な臨床試験を企業ベースで出来るようにすべきであろう。高度医療評価制度、或いは医師主導治験も含め可能性を探るが、何処の段階でどの様に企業に手渡すのがポイントである。

#### E. 結論

牛蒡子のエキスとしての臨床試験を始めることになった。高度医療評価制度、医師主導治験の可能性を探る必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

研究の刊行に関する一覧表に記載。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許  
なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）

（総括）研究報告書

臨床試験の計画・解析・臨床試験実施支援

研究分担者 佐藤 暁洋

独立行政法人国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 臨床試験支援室

#### 研究要旨

既存の抗がん剤は、酸素や栄養供給が不足している腫瘍組織では有効性が極端に低くなるが、この微小環境下で最大の効果を得られかつ正常組織に低毒性の抗腫瘍薬をスクリーニングしキガマイシン、アルクチゲニンなどを見いだした。局方に登録されたゴボウシにアルクチゲニンが多く含まれる事に注目し、アルクチゲニンとその配糖体が安定して高い濃度で含まれる中手鬱方を工夫し特許を出願、GMP 裂ペルで製剤化し前臨床試験を実施した。その結果、牛蒡子エキスはそのアルクチゲニン含量から想定される抗腫瘍性を示した。ゲムシタピンあるいは TS-1 との併用では明らかに抗腫瘍効果が増強されたが、単独での毒性及びゲムシタピンとの併用による毒性は 2 週連続投与で見える限り特記するほどのものはなかった。初歩的吸収試験で血中に有効なアルクチゲニンおよびそのグルクロン酸抱合体が認められた。腸肝循環の可能性も明らかになった。ジェムシタピン不応性膀胱がん患者を対象にした、臨床試験プロトコルの確定をし倫理審査委員会に提出し受理された。

#### A. 研究目的

既存の抗がん剤は、酸素供給や栄養供給が不足している腫瘍組織では有効性が極端に低くなることを報告してきた。そこで我々は、そういった腫瘍組織の微小環境下で細胞障害性を最大に発揮する物質の探索を目的として、がん組織に特異的なエネルギー代謝系を標的とした、正常組織に対して相対的に低毒性の抗腫瘍薬をスクリーニングしてきた。

天然物の中からこれまでにキガマイシン、アルクチゲニンなどを見いだしてきたが、本研究では、既に局方薬として登録されているゴボウシにアルクチゲニンが多く含まれる事に注目し、ゴボウシ抽出エキスを用いた臨床導入を目的とした。

#### B. 研究方法

江角分担研究者の項目で述べられている通り、臨床導入のための前臨床試験を行いこの結果を班員全体で討議し、臨床導入のための道筋に関する討議と共にプロトコール検討を行った。

#### （倫理面への配慮）

動物実験に関しては、国立がんセンターでの動物実験に関する審査を受けて行っているが、今後も同様に行う必要がある。臨床試験に関しては、プロトコールを国立がん研究センター受託研究審査委員会に提出し倫理的審査を受けた。UMIN で臨床試験登録を行った。

#### C. 研究結果

前臨床試験の結果は江角分担研究者の報告書に書かれているとおりでである。初歩的な吸収試験の結果から毒性の検討の追加をする事にした。また、前臨床で用いられている細胞が全てヒトの膵臓がんであるため、他の腫瘍系、大腸がん、胃がん食道がんなどにも拡げて検討する事にした。

ヒトでの初歩的な薬物動態検討を行い、血中には十分な薬剤濃度が得られることが分かったが、代謝も含めてさらに詳細に検討することにした。また、薬剤の至適投与量設定のためにもヒトおよび動物での薬物動態を測定法の感度改善を含め