

20114000/A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業研究事業

国立がん研究センターPhase Iセンター
早期開発研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大津 敦

平成24 (2012) 年 5月

目 次

I. 総括研究報告書	
国立がん研究センターPhase I センター早期開発研究 研究事業全体の総括 [大津敦]	1
II. 分担研究報告	
1. 研究事業 1. 抗体 DDS 製剤開発 [松村保広、安永正浩、土井俊彦、佐藤暁洋、大津敦]	5
2. 研究事業 2. TAS102 に関する研究 [土井俊彦、安井博史、設楽紘平、仁科智裕、土原一哉]	7
3. 研究事業 3. RPN2 標的核酸医薬に関する研究 [藤原康弘、落谷 孝広、竹下文隆、小野麻紀子、松田範昭、小林智]	9
4. 研究事業 4. VEGF 阻害薬 [藤原康弘、細田雅人、小松弘嗣、肥塚靖彦、松崎尹雄]	13
5. 研究事業 5. PARP 阻害剤 医師主導治験 [藤原康弘、田村研治、安藤正志、米盛勸]	21
III. 研究成果の刊行に関する一覧票	27

総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業研究事業）
総括 研究報告書

国立がん研究センターPhase Iセンター早期開発研究

研究代表者 大津 敦 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

早期・探索的拠点整備事業で整備中の基盤を用いて、アカデミア・ベンチャー発シーズの臨床導入（研究事業 1, 3, 4）、製薬企業と共同で未承認薬を用いた早期臨床開発（研究事業 2, 5）を実施した。平成 23 年度は、医師主導治験 1 試験を開始するなど概ね順調な進捗が認められた。次年度以降は、産学連携体制の整備などの環境整備と合わせて、各研究事業を更に進める。

研究分担者氏名	所属研究機関名および職名	加茂 昌之	インタープロテイン株式会社、主任
大津 敦	独) 国立がん研究センター東病院、臨床開発センター長	安藤 正志	独) 国立がん研究センター中央病院、医長
松村 保広	独) 国立がん研究センター東病院臨床開発センター、部長	田村 研治	独) 国立がん研究センター中央病院、医長
安永 正浩	独) 国立がんセンター東病院 臨床開発センター、室長	米盛 勲	独) 国立がん研究センター中央病院、医員
土井 俊彦	独) 国立がん研究センター東病院、副科長		
安井 博史	静岡県立静岡がんセンター、部長		
設楽 紘平	愛知県がんセンター中央病院、医長		
仁科 智裕	国立病院機構四国がんセンター、医師		
土原 一哉	独) 国立がん研究センター東病院臨床開発センター、室長		
佐藤 暁洋	独) 国立がん研究センター東病院臨床開発センター、室長		
藤原 康弘	独) 国立がん研究センター中央病院、科長/副院長		
落谷 孝広	独) 国立がん研究センター研究所、分野長		
竹下 文隆	独) 国立がん研究センター研究所、主任研究員		
小野 麻紀子	独) 国立がん研究センター研究所、リサーチレジデント		
松田 範昭	(株)スリー・ディー・マトリックス、社員		
小林 智	(株)スリー・ディー・マトリックス、社員		
細田 雅人	インタープロテイン株式会社、代表取締役		
小松 弘嗣	インタープロテイン株式会社、本部長		
肥塚 靖彦	インタープロテイン株式会社、部長		
松崎 尹雄	インタープロテイン株式会社、ラボヘッド		

A. 研究目的

高い基礎研究能力を有するわが国が、特にアカデミアでの医薬品開発において欧米の後塵を拝するに至っている原因は、前臨床～早期臨床開発に至る開発能力がアカデミアに決定的に欠如しているためであり、これが現在のドラッグラグの一因となっている。これを是正するために、早期・探索的拠点整備事業で整備を進める基盤を用いて、アカデミア・ベンチャー発シーズの臨床導入（研究事業 1, 3, 4）、製薬企業と共同で未承認薬を用いた早期臨床開発（研究事業 2, 5）を実施し、各々の薬剤開発のみならず産官学連携の早期臨床開発のモデルを確立することが本研究の目的である。

○研究事業1 (抗体付加抗がん剤内包ミセル製剤)

平成23年度は、EPR効果にもとづくDDS製剤抗がん剤内包ミセルに遺伝子改変した新規の抗体を付加したミセル製剤を作製し、次年度以降に非臨床研究、GMP、GLP対応試験を施行し、First in human治験および引き続きPOC取得を目的とした医師主導治験を実施し後期開発に橋渡しする事を目標とする。

○研究事業2 (TAS102)

平成23年度は、未承認薬であるTAS102を、欧米での開発で用いられた推奨用量より多い70mg/m²（日本での推奨用量）を用いて、進行性胃癌患者を対象に有効性及び安全性を探索的に検討するPOC取得を目的とした医師主導治験を開始する。次年度以降に良好な結果が得られれば企業主導の治験として承認申請治験を実施する。

○研究事業3 (RPN2核酸製剤)

乳癌検体よりRPN2の発現量と腫瘍サイズおよび予後の悪さに相関を見出した。siRNAを用いたRPN2

のノックダウンにより、がん幹細胞の造腫瘍性、薬剤耐性、転移等の能力を顕著に抑制し、自然発症乳癌のアポトーシスを惹起することが確認されており、平成23年度はこのRPN2を標的とした新規抗がん剤の前臨床試験を実施する。次年度以降よりFirst in humanの医師主導治験での早期臨床開発を目指す。

○研究事業4 (経口VEGF阻害剤)

抗VEGF抗体製剤を、同じ作用メカニズムの低分子化合物に置き換える新規薬剤を開発することを目的とする。

○研究事業5 (Olaparib)

予後不良の乳がんを対象とし、国内外未承認の新規薬剤の早期開発試験を、POC取得を目的とした医師主導治験として実施することで、新たな治療法を開発し後期大規模開発(国際共同試験)への橋渡し、医師主導治験で未承認薬の早期開発の経験をとおして、その手法・管理体制の国内確立を目指す。

B. 研究方法

国立がん研究センターを中心に産官学が連携し、アカデミア・ベンチャー発シーズの臨床導入(研究事業1, 3, 4)、製薬企業と共同で未承認薬を用いた早期臨床開発(研究事業2, 5)を医師主導治験・治験として実施する。前臨床・TR実施に当たっては、TR支援部門(東病院臨床開発センター、研究所、中央病院)、医師主導治験に当たってはPhase Iチーム(東・中央病院)が中心で、臨床試験支援室(両院)が支援する。また、公開シンポジウムなどにて新薬開発に関する啓蒙活動を行う。

○研究事業1 (抗体付加抗がん剤内包ミセル製剤)

平成23年度は、抗組織因子(TF)抗体および抗アミノ酸トランスポーター抗体の遺伝子改変scFv抗体を作製し、ELISAや免疫染色で親和性を評価後、抗体付加ミセル製剤を作製する。

○研究事業2 (TAS102)

前治療で増悪した進行性胃癌患者を対象に、TAS102の非盲検single-armの早期第II相医師主導治験を行う。平成23年はプロトコール・IC文書などの作成および各種SOPを作成したうえで、治験届けを提出し医師主導治験を開始する。参加施設は国立がん研究センター東病院を中心とする4施設を計画した。また、平成24年度以降に別薬剤での医師主導治験を実施すべく治験薬提供者との交渉・検討などを実施する。

○研究事業3 (RPN2核酸製剤)

平成23年度はRPN2siRNAおよびペプチドキャリアA6KのGMP製造を検討し、安定性試験およびGLPでの全身急性毒性、慢性(亜急性)毒性試験、安全性薬理試験(中枢神経系、循環器系、呼吸器系)、免疫毒性試験、薬物動態試験、遺伝毒性試験を実施して安全性を検証する。

○研究事業4 (経口VEGF阻害剤)

平成23-24年度に医薬候補化合物確定および非臨床試験を終え、平成25年度に早期臨床開発(医師主導臨床試験)を開始する。その後、国立がん研究センター中央病院が中心となりFirst in humanの医師主導治験として実施する。

○研究事業5 (Olaparib)

アンスラサイクリン系薬剤・タキサン系薬剤の治療歴を有し、ホルモン受容体陰性・HER2過剰発現のない再発・転移性乳がんを対象とし、Olaparib(未承認薬: PARP阻害薬、アストラゼネカ社)とエリブ

リン(国内承認薬: 抗悪性腫瘍薬剤、エーザイ社)併用の第I/II相試験を、POC取得を目的とする医師主導治験として実施することを目的とし、平成23年度はプロトコール等の作成及び体制構築を行う。

(倫理面への配慮)

国立がん研究センターにて運用している受託研究審査委員会および倫理審査委員会を構成する。また、それらの委員会には施設外部からの委員も含む。これらの体制によってヘルシンキ宣言、臨床研究に関する倫理指針、GCPなどの臨床研究に関する各指針に従って臨床研究・治験を実施する。また、倫理審査委員会委員に対しては臨床試験の方法論や倫理に関する教育を行い委員の質の均一化を図る。院内の臨床研究に関わるスタッフに対しても同様の教育を行い人材の育成を図る。多施設臨床試験における参加施設においても上記と同様の体制を取る。患者の個人情報に関しては各施設の個人情報管理規定なども考慮しつつ最大限の保護を行う。

動物を用いる実験においては「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を踏まえ、各施設における動物取扱の取り決めを遵守して行う。また、遺伝子改変動物の取り扱いについては「カルタヘナ法」を順守し、各施設における動物倫理委員会および遺伝子組換え実験安全委員会の審査を受けて実施する。

C. 研究結果

未承認薬を用いた医師主導治験を支援する臨床試験支援室の整備・TRを支援するTR支援部門を整備すると共に、以下の各研究事業を推進した。また、平成24年3月24日に公開シンポジウム「日本のがん患者さんへ新薬をより早く届けるために」を患者団体と共同で開催した。

○研究事業1 (抗体付加抗がん剤内包ミセル製剤)

抗ヒトTF抗体および抗マウスTF抗体を樹立し、膵がん肝転移モデルおよび腹膜播種モデルにおいて転移抑制効果を証明した。また、グレード3-4のグリオーマでTFが高発現(75%)していることを示した。抗ヒトTF抗体をエピルピシン内包ミセルに付加することに成功した。

○研究事業2 (TAS102)

プロトコールおよび各種必要文書の作成、Electronic Data Capturing System (EDC) 構築などを行い、平成24年2月14日に治験届けを提出し、国立がん研究センター東病院、国立病院機構四国がんセンター、愛知県がんセンターの3施設で3月13日に登録開始し第1例目が登録された。

また、次年度以降には別薬剤での医師主導治験を開始すべく準備を開始しており、2剤において治験薬提供者側からの大筋での同意が得られた。

○研究事業3 (RPN2核酸製剤)

イヌのRPN2siRNA+ペプチドキャリアA6Kのコンプレックス製剤の製造方法を確立した。この製剤を用いて、乳がん動物モデルを用いて有効性およびPOCを検証した。また、ヒトのRPN2siRNA+ペプチドキャリアA6Kについても製造方法を確立し、安定性試験を実施。ペプチドキャリア単体のGLPでの前臨床試験を開始した。コンプレックス製剤についても分析手法を確立下上でGLPでの前臨床試験を順次開始す

る。

なし

○研究事業4 (経口VEGF阻害剤)

リード化合物より誘導体を合成し、in vitro活性の測定、VEGFR2受容体への選択制、安全性評価およびXenograft Modelでの抗腫瘍効果の評価を行った。その結果、平成23年度ではリード化合物の最適化には至らなかった。平成24年度はよりin vitro活性・選択性が向上した化合物の探索を継続して行う。

○研究事業5 (Olaparib)

プロトコール及び説明同意文書、薬物動態研究の立案などを行った。第III相治験の結果および剤形変更の影響からOlaparibの提供について治験薬提供者との再協議が必要となった。(平成24年4月末に提供についての合意を得た)また、同じ治験薬提供者のPIM阻害剤に関する国際共同の第I/II相試験を企業治験として実施した。

D. 考察

未承認薬を用いた医師主導治験1試験(研究事業2)を開始し、次年度より他の医師主導治験についても開始の目処が立っている(研究事業2,5)。また、前臨床段階にあるシーズ(研究事業1,3,4)についても、一部に遅れがあるものの進捗が見られている。これらを支援する臨床試験支援部門及びTR支援部門の整備も順調に進捗しており、全体的に順調に進捗していると考えられる。

次年度以降は、この研究事業1~5で得られた早期開発の経験・ノウハウ・問題点について出来る限り蓄積し、効率的な運営管理体制を確立していくと共に、産官学連携の場の構築や広報活動を通じて他のアカデミアおよび規制当局、製薬企業等とも共有し、政策提言などにつなげていくことを目指すことが重要となる。

E. 結論

各研究事業ともに、整備事業の進捗と共にほぼ順調に進捗した。次年度以降は、より効率的な運営管理体制の確立、産官学連携体制の構築、広報活動などを充実させることによって、各研究事業の進捗を促進していくと共に政策提言などへのつなげる取り組みを進める必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表の通り

2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業研究事業）
分担 研究報告書

研究事業1. 抗体DDS製剤開発に関する研究

研究分担者	松村 保広	国立がん研究センター東病院	臨床開発センター	がん治療開発部	部長
	安永 正浩	国立がん研究センター東病院	臨床開発センター	がん治療開発部	室長
	土井 俊彦	国立がん研究センター東病院	臨床開発センター	消化管内科	副科長
	佐藤 暁洋	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	室長
	大津 敦	国立がん研究センター東病院	臨床開発センター	センター長	

研究要旨

抗がん剤内包ミセルの一部は phase 3 が開始されようとしている。一方でがん治療領域において抗体療法あるいは抗体抗がん剤複合体の有用性も証明されつつある。このような状況でがん関連抗体をいくつか樹立しその腫瘍学領域での意義を解析するとともにそれら抗体をミセルに付加し第2世代のDDSを創製した。

A. 研究目的

我々が提唱した腫瘍血管の血管透過性亢進を利用して選択的腫瘍集積性を計る抗がん剤内包ミセルの機能をさらに高めるためにがん細胞表面特異抗体あるいはがん間質特異抗体を作製し、それらを低分子化し、ミセル表面に付加した。これにより passive targeting および active targeting 能力の両方を持たせることでさらにパワーアップしたDDS製剤を創製し、非臨床研究、GMP/GLP 対応試験を施行後 First in human 治験および引き続く POC 取得を目的とした医師主導治験を実施し、良好な結果が得られれば企業治験に引き渡すことを目標とする。

B. 研究方法

- 1) 血液凝固のトリガー組織因子Tissue factor (TF)の抗マウスおよび抗ヒトTFモノクローナル抗体 (mAb) 作製
TFは外因系血液凝固のトリガー因子として知られている。また、多くのヒトがん細胞表面に発現し、腫瘍血管を含む異常血管および間質細胞においても強発現している。ラットにてヒトあるいはマウスTF抗原で免疫しそれぞれの抗体を作製した。
- 2) TFの腫瘍浸潤・転移における役割と抗TF抗体による治療研究
- 3) 悪性グリオーマ手術検体におけるTF発現の検討
- 4) 抗がん剤内包ミセル表面への抗TF抗体の付加

(倫理面への配慮)

動物を用いる実験においては「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を踏まえ、

各施設における動物取扱の取り決めを遵守して行う。また、遺伝子改変動物の取り扱いについては「カルタヘナ法」を順守し、各施設における動物倫理委員会および遺伝子組換え実験安全委員会の審査を受けて実施する。

C. 研究結果

- 1) がん特異的ターゲットになりうる抗ヒトTF IgG mAb 1849および抗マウスTFmAb 1157の樹立に成功した。また、併せて抗TF抗体の大量培養、大量精製の条件を確立した。更に抗TF IgGにペプシン処理を行って、抗TF F(ab)'₂を作製した。4℃保存により F(ab)'₂ (分子量100 kDa) は分子量50 kDaの分子に分解された。また、V_H、V_Lからなる組換え体としてscFvの作製にも成功した。これにより、IgG (150 kDa)、F(ab)'₂ (100 kDa)、F(ab)' (50 kDa)、scFv (25kDa) という分子量の大きく異なる4種の抗体分子を作製することに成功した。
- 2) 抗ヒトTF mAb 1849投与により腫がBxPC3肝転移モデルあるいは腹膜播種モデルで有意な転移、浸潤を抑制することを証明した。
- 3) 脳腫瘍グリオーマを抗ヒトTF抗体1849で染色したところグレード1-2では70%が陰性であったのに対しグレード3-4の悪性群では逆に75%が陽性をしめした。
- 4) エピルビシン内包ミセルの外郭のポリエチレングリコール (PEG) にマレイミドを介して抗ヒトTF 抗体をつけることに成功した。粒子径を計測したところ径120nmであることが判明した。またタキソール内包ミセルにも抗マウスおよび抗ヒトTF抗体を付加することに成功した。この径は118nmであった。

D. 考察

TFはがん細胞および腫瘍血管内皮細胞で恒常的に発現し、がん以外では病的状態でのみ一過性に

発現していることから、腫瘍特異的ターゲットになる可能性が示唆される。抗マウスと抗ヒトのTF抗体が得られさらに両者において低分子化抗体の作製と精製方法を確立した。さらにそれら抗体をミセルに結合する方法もほぼ確立できた。次年度は担がんマウスモデル系において抗腫瘍効果を評価するが、腫瘍細胞へのターゲティングが優位なのか腫瘍血管へのターゲティングが優位なのか抗腫瘍効果のメカニズムを解明していくことになるであろう。

E. 結論

TFをターゲットにした抗体DDS製剤開発は臨床応用が期待できるものと考えられた。同時に抗体付加ミセルの非臨床評価に必要な項目、GMP/GLP試験なども視野にいれて開発を推進すべきである。また抗TFだけでなく、我々が開発したその他の抗体についてもDDS化を考える必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表
1. Y Matsumura. Preclinical and clinical studies of NK012, an SN-38-incorporating polymeric micelles, which is designed based on EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev*, 63(3), 184-192, 2011
2. M Yasunaga, S Manabe, Y Matsumura. New Concept of Cytotoxic Immunoconjugate Therapy Targeting Cancer-Induced Fibrin Clots. *Cancer Sci*. 102, 1396-1402, 2011
3. M. Yasunaga, S. Manabe, D. Tarin, Y. Matsumura. Cancer-stroma targeting therapy by cytotoxic immunoconjugate bound to the collagen 4 network in the tumor tissue. *Bioconjug Chem* 22, 1776-1783, 2011.
4. R Plummer, Y Matsumura, et al. A phase I clinical study of cisplatin-incorporated polymeric micelles (NC-6004) in patients with solid tumors. *Brit J Cancer* 104, 593-598, 2011
5. N Katori, Y Matsumura, et al. Genetic variations of orosomucoid genes associated with serum alpha-1-acid glycoprotein level and the pharmacokinetics of paclitaxel in Japanese cancer patients. *J Pharm Sci*, 22648, 2011.
6. C Tanai, Y Matsumura, et al. Characteristics and Outcomes of Patients With Advanced Gastric Cancer Who Declined to Participate in a Randomized Clinical Chemotherapy Trial. *Journal of Oncology Practice* 7(3), 148-154, 2011
7. K Kato, Y. Matsumura, et al. Phase II study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, for previously treated advanced or recurrent gastric cancer. *Invest New Drugs*, 2011 (published online.)
8. Y Saito, Y Matsumura, et al. The inhibiti

on of pancreatic cancer invasion-metastasis cascade in both cellular signal and blood coagulation cascade of tissue factor by its neutralisation antibody. *Eur J Cancer*. 47, 2230-2239. 2011

9. Y Matsumura. Cancer stromal targeting (CAST) therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012 (online 24 December)

2. 学会発表

1. Y Matsumura. Anticancer agents incorporating polymer micelles under clinical evaluation, Phase II: Lessons learned from early clinical trials. 4th European Conference for Clinical Nanomedicine. May, 2011. Basel, Switzerland.
2. Y Matsumura. New aspects of DDS in oncology. 2011 International Advanced Drug Delivery Symposium. April, 2011. Taipei, Taiwan.
3. Masahiro Yasunaga, Shino Manabe, Yasuhiro Matsumura "New drug concept of cytotoxic immunoconjugate for stroma-rich solid tumor" The Chemo-Bio Informatics Society Annual Meeting 2011. Nov, 2011. Kobe.
4. 松村 保広 臨床腫瘍における新しいドラッグデリバリーシステムの開発 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月3日 名古屋国際会議場

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
発明の名称 : Novel cancer targeting therapy using complex of substance capable of binding specifically to constituent factor of cancer stroma and anti-tumor compound.
発明人 : 松村保広 安永正浩 眞鍋史乃
出願人 : 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 独立業際法人理化学研究所 特願2010-9139572(平成23年6月22日)
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（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業研究事業）
分担 研究報告書

研究事業2. TAS102に関する研究

研究分担者	土井 俊彦	国立がん研究センター東病院	消化管内科	副科長
	安井 博史	静岡がんセンター	消化管内科	部長
	設楽 紘平	愛知県がんセンター中央病院	薬物療法家	医長
	仁科 智裕	四国がんセンター	8階西病棟	医員
	土原 一哉	国立がん研究センター東	病院臨床開発センター	室長

研究研究要旨

未承認薬である新規抗がん剤 TAS102 を用いた医師主導治験体制を確立し胃がんに対する第Ⅱ相試験を開始した。平成 24 年 2 月 14 日に治験届けを実施、国立がん研究センター東病院、国立四国がんセンター、愛知県立がんセンターの 3 施設で 3 月 2 日キックオフ会議施行し、1 名の登録を本年度で行った。今後、静岡県立がんセンター、埼玉県立がんセンター、癌研究所有明病院が施設拡充する予定である。

A. 研究目的

未承認薬である新規抗がん剤 TAS102 を用いた胃がんに対する第Ⅱ相試験医師を主導治験として実施する。本剤はわが国で開発された新規代謝拮抗剤であり、大腸がんでの国内第Ⅱ相試験で良好な成績が得られ、日本を中心とした国際共同第Ⅲ相試験が計画されている。胃がんでは当初実施された米国での少数例の検討で十分な効果が得られていなかったが、米国での使用用量は 50mg/d と日本での推奨用量 70mg/d より少ない用量で実施されていたことから、十分な用量での再検討が必要と考えられ、本医師主導治験を計画するに至った。

B. 研究方法

前治療で増悪した切除不能進行・再発胃癌患者を対象として、TAS-102 を投与したときの有効性と安全性を探索的に評価する非盲検、単群、多施設共同第Ⅱ相臨床試験を計画した。対象は 2 レジメンの投与歴を有する症例で、臓器機能の保持が十分に保たれている症例。本試験は第 1 ステージ (12 例) と第 2 ステージ (16 例) の 2 段階から構成され、主要評価項目：病勢制御割合 (DCR)、副次的評価項目は奏功割合 (RR)、無増悪生存期間 (PFS)、全生存期間 (OS)、有害事象、薬物動態学的パラメータである。

本試験は、プロトコール作成後に主要参加施設の倫理審査委員会での審査・承認を得て、医薬品医療機器総合機構 (PMDA) へ治験届けを提出、承認を得たのちに治験を開始する。医師主導治験のセントラル機能は国立がん研究センター東病院臨床試験支援室が請け負い、本治験全体の登録やデータ収集、管理を行う。また、薬剤は大鵬薬品工業株式会社との契約で供与を受け、本治験の監査も同企業が行うこととしたが、それ以外はすべて研究者および参加施設の方で実施体制を構築している。実際の実施に際

しては、4 名の医師からなる治験調整委員会を設置し、試験の実施上の諸問題や SAE などに対して中心としてコントロールする体制とした。

(倫理面への配慮)

本事件は、治験として薬事法の下で行われる。本試験に関するすべての研究者はヘルシンキ宣言および「臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年厚生労働省告示 415 号)」に従って本試験を実施する。本試験における「医療機関」は上記指針における「臨床研究機関」に対応している。

C. 研究結果

平成 23 年 6 月の会議でプロトコール骨子の検討を行い、参加施設の医師主導治験体制に関する調査を実施して本治験への参加施設を確定。さらに大鵬薬品工業株式会社との共同研究契約締結後、参加施設 4 施設での施設倫理審査委員会での審査と承認を取得。平成 24 年 2 月 14 日に PMDA に治験届けを実施、大きな問題点は指摘されなかった。

国立がん研究センター東病院、国立四国がんセンター、愛知県立がんセンターの 3 施設で 3 月 2 日キックオフ会議施行し、1 名の登録を本年度で行った。今後、静岡県立がんセンター、埼玉県立がんセンター、癌研究所有明病院が施設拡充する予定である。

D. 考察

わが国では医師主導治験の実施体制が十分ではなく、従来実施されていた治験もほとんどは既承認薬の適応拡大に当たるものである。それに対し本試験は本邦における初の未承認薬による医師主導治験である。

本剤はわが国で開発され、すでに大腸がんでの国内第Ⅱ相試験で有効性が証明され、今後承認申請も

期待される薬剤である。胃がんにおいても大腸がんと同様の効果が示されれば国民への大きな利益還元となり、胃がんにおける有効性を世界に先駆けて報告することが期待される。

本試験のような未承認薬を用いた医師主導治験実施体制が確立されれば、phase1試験終了後のPOC試験が施行しやすくなり、わが国からのイノベーション実現の可能性が高まるとともに、海外とのドラッグラグを縮小できるようになることが期待される。本試験の実施とともに医師主導治験の支援体制を構築することで、わが国からの早期開発試験実施数の増加が見込まれることから、国家的にも大きな利益を生み出し、何よりも日本人患者へ最大かつ最速の利益還元が提供できることが予想される。

E. 結論

未承認薬である新規抗がん剤TAS102を用いた医師主導治験体制を確立し、胃がんに対する第Ⅱ相試験を国内で開始した。平成24年2月14日に治験届けを実施、国立がん研究センター東病院、国立四国がんセンター、愛知県立がんセンターの3施設で3月2日キックオフ会議施行し、1名の登録を本年度で行った。今後さらに3施設の参加が予定され、登録スピードの上昇が期待される。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記すべき事無し

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業研究事業）
分担 研究報告書

研究事業3. RPN2標的核酸医薬に関する研究

研究分担者	藤原 康弘	独) 国立がん研究センター中央病院、乳腺科・腫瘍内科	科長／副院長
研究分担者	落谷 孝広	独) 国立がん研究センター研究所、分子細胞治療研究分野	分野長
研究分担者	竹下 文隆	独) 国立がん研究センター研究所、分子細胞治療研究分野	主任研究員
研究分担者	小野 麻紀子	独) 国立がん研究センター研究所、分子細胞治療研究分野	リサーチレジデント
研究分担者	松田 範昭	(株)スリー・ディー・マトリックス、事業開発部	社員
研究分担者	小林 智	(株)スリー・ディー・マトリックス、事業開発部	社員

研究要旨

乳癌の「がん幹細胞」に特異的に発現するRPN2に対し、その発現をノックダウンするRPN2siRNAと、合成ペプチドA6Kをキャリアとしたコンプレックス製剤について、安全性試験、自然発症乳癌に対する非臨床試験を実施し、Triple Negative乳癌に対するFirst in humanの医師主導治験の開始を目標とする。本年度では、自然発症乳癌に対する非臨床試験を実施し、RPN2の発現解析、コンプレックス製剤投与によるアポトーシスの惹起および腫瘍縮小に関する有効性を確認した。RPN2siRNAおよびペプチドキャリアA6Kの原薬としての安定性を確認し、コンプレックス製剤の至適調製条件を見出した。ペプチドキャリアA6K単体の投与量設定試験および単回投与試験を実施した。

A. 研究目的

研究分担者らは、Ribophorin II (RPN2)遺伝子が乳癌の「がん幹細胞」に特異的に発現することを見出しており、乳癌検体よりRPN2の発現量と腫瘍サイズおよび予後の悪さの相関を確認している。また、RPN2遺伝子に対しその発現をノックダウンするRPN2siRNAの導入による、乳癌に対する抗腫瘍効果をマウスにおいて検証している。本研究では、siRNAのキャリアとして、研究分担者らの開発した合成ペプチドA6Kを用い、RPN2siRNAとのコンプレックス製剤を作製する。自然発症乳癌に対する非臨床試験を実施し、有効性を検証する。GLPにて、コンプレックス製剤の安全性試験を実施し、投与量の設定と安全性を検証する。通常の治療法が効を奏しにくいTriple Negative乳癌症例に対して、本コンプレックス製剤を用いたFirst in humanの医師主導治験の開始を目標とする。日本発の核酸医薬の推進役として期待される。

コンプレックス製剤の複数回投与と長期的経過観察を行う。

抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン (ICH S9ガイドライン) に則って非臨床試験を設定する。GMP対応施設にて、ヒトRPN2siRNAおよびペプチドキャリアA6Kを合成し、確認試験および各種品質試験を実施する。原薬および投与水溶液について、委託試験施設での信頼性基準にて、長期安定性試験および非臨床試験期間を担保する安定性試験を実施する。GLP施設での委託試験にて、試験液の分析バリデーション、投与量設定試験、単回投与試験等の非臨床試験を実施する。

(倫理面への配慮)

動物を用いる実験においては「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を踏まえ、各施設における動物取扱の取り決めを遵守して実施した。

B. 研究方法

自然発症乳癌に対する非臨床試験においては、イヌ乳癌腫瘍のRT-PCR解析によりRPN2遺伝子を同定し、RPN2発現レベルと乳癌腫瘍の悪性度の相関を確認する。イヌRPN2に対するsiRNAを設計し、ペプチドキャリアA6Kとのコンプレックスの形成を検証する。自然発症乳癌腫瘍症例のうち、悪性度が高いと推測される症例にコンプレックス製剤を投与し、腫瘍の縮小効果および経過観察を行う。一部の症例を除いて、投与約48時間後に手術により腫瘍を摘出し、免疫染色によるアポトーシスの測定および、RPN2mRNAのノックダウンの確認を行う。また、炎症性乳癌の症例に対しては手術を行わず、

C. 研究結果

自然発症乳癌に対する非臨床試験では、悪性・良性乳癌腫瘍RT-PCR解析によりイヌRPN2遺伝子を同定し、RPN2発現レベルは悪性症例において高いことを見出した。RPN2siRNAとペプチドキャリアA6Kによるコンプレックス製剤の作製に成功し、その至適調製条件を見出した。自然発症乳癌腫瘍症例のうち、悪性例4症例、良性例3例にコンプレックス製剤を投与したところ、悪性症例では有意な腫瘍の縮小がみられた。摘出腫瘍 (悪性) においては、ア

ポトシスおよびRPN2mRNAのノックダウンが確認された。炎症性乳癌症例において複数回投与を行ったところ、長期に渡り安定 (SD) を保つ結果が得られ、本報告時点においても継続中である。

ヒトRPN2siRNAおよびペプチドキャリアA6Kについて、確認試験および各種品質試験項目を設定し、試験法のバリデーションが完了した。原薬および投与水溶液について、委託試験施設での信頼性基準にて安定性試験を実施したところ、非臨床試験期間を十分に担保する安定性をもつことが見出された。ペプチドキャリア単体の投与量設定試験、単回投与試験について、GLP施設での委託試験にて実施した。コンプレックス製剤の品質・安定性試験については、GLP非臨床安全性試験実施のための分析手法の開発を行った。

D. 考察

RPN2siRNAとペプチドキャリアA6Kのコンプレックス製剤の局所投与により、自然発症悪性乳腺腫瘍に対するアポトーシスの惹起および縮小効果が得られた。また、RPN2siRNA、ペプチドキャリアA6Kともに原薬の安定性が確認され、コンプレックス製剤の至適調製条件を見出したことから、本製剤の有効性が確認された。ペプチドキャリア単体の投与量設定試験、単回投与試験を実施したことで、コンプレックス製剤におけるGLP非臨床安全性試験条件の設定が可能となった。次年度においてコンプレックス製剤の分析手法を確立し、GLP非臨床安全性試験を実施する。ICH-S9ガイドライン、医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンスに基づいて十分な安全性試験結果を蓄積することで、First in humanの医師主導治験の開始が可能になると考える。

E. 結論

RPN2siRNAおよびペプチドキャリアA6Kの原薬としての安定性を確認し、コンプレックス製剤の乳癌に対する有効性を見出した。平成24年度では、コンプレックス製剤のGLP非臨床安全性試験を実施するとともに、自然発症乳癌に対する非臨床試験の症例数を重ね、有効性をさらに検証する。

F. 研究発表

1. 論文発表

落谷孝広、竹下文隆、小野麻紀子

- 1) Takahashi RU, Takeshita F, Fujiwara T, Ono M, Ochiya T. Cancer stem cells in breast cancer. *Cancers*, 3:1311-1328, 2011

落谷孝広、竹下文隆

- 2) Yamamoto Y, Yoshioka Y, Minoura K, Takahashi RU, Takeshita F, Taya T, Horii R, Fukuoka Y, Kato T, Kosaka N, Ochiya T. An integrative genomic analysis revealed the relevance of microRNA and gene expression for drug-resistance in human breast cancer cells. *Mol Cancer*, 10:135, 2011

2. 学会発表

落谷孝広

- 1) Ochiya T. 「Ribophorin II (RPN2) as a novel

therapeutic target for cancer stem cells」. International Conference and Exhibition on Cancer Science and Therapy 2011, 15-17, Las Vegas, USA. August 12-18

- 2) Ochiya T. 「Ribophorin II (RPN2) as a novel therapeutic target for cancer stem cells」 「cancer cells and their tumorigenicity」. 16th European Meeting for Vascular Biology and Medicine, 2011, Krakow, Poland. September 4-10
- 3) Kosaka N, Ochiya T. 「nSMase 2 regulates metastatic ability of breast cancer cells through the regulation of exosome secretion」. Exosomes and Microvesicles 2011, Orlando, USA. October 14-19
- 4) Ochiya T. 「Exosome/microRNA as a novel diagnostic marker」 ISIN 2012, Nagoya, 2012, March 22
- 5) 「miRNAと発がん機構」、落谷孝広、第100回日本病理学会総会 (2011.4.28-30 横浜)
- 6) 「分泌型microRNAの生物学的意義と疾患診断への応用」、落谷孝広、小坂展慶、第52回日本生化学会中国・四国支部例会、落谷孝広、(2011.5.13-14 広島)
- 7) 「エクソソームによる細胞間microRNAデリバリー」、落谷孝広、2011年アンチセンス・遺伝子・デリバリー合同シンポジウムでの招待講演 (2011.9.1-2 大阪)
- 8) 「RNAi医薬によるがんの新しい診断と治療」、落谷孝広、千里ライフサイエンス振興財団セミナー (2011.7.8 大阪)
- 9) 「多彩な生命現象を伝搬するエクソソーム」、落谷孝広、第84回日本生化学会シンポジウム (2011.9.22-24 京都)
- 10) 「発生、老化、疾患を制御するmicroRNA/Exosomeの解明」、落谷孝広、第12回関東ハートセミナー (2011.9.30 東京)
- 11) 「Roles of non-coding RNAs in cancer development (including miRNAs)」, 小坂展慶、落谷孝広、第70回日本癌学会学術総会 (2011.10.2-5 名古屋)
- 12) 「Exosomeによる遺伝情報の伝達と疾患とのかわり」、落谷孝広、日本人類遺伝学会第56回大会 (2011.11.10 千葉)
- 13) 「エクソソームによる遺伝情報の伝達とがんの進展」、落谷孝広、10th 中国四国口腔癌研究会 (2011.11.25-26 松山)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許出願

落谷孝広

- 1) 出願番号: 国際出願PCT/JP2011/064527, 発明者: 落谷孝広: がん幹細胞を含むまたはそれに由来するがんの治療、予防および診断のための方法および組成物 (日本国、国際特許出願済み)
- 2) 出願番号: 特願2011-33772, 発明者: 落谷孝広、小坂展慶、井口晴久: 腫瘍縮小剤 (日本国特許申請済み)

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業研究事業）
分担 研究報告書

研究事業4. VEGF阻害薬

研究分担者	藤原 康弘	国立がん研究センター中央病院	副院長
	細田 雅人	インタープロテイン株式会社	代表取締役
	小松 弘嗣	インタープロテイン株式会社	事業開発本部長
	肥塚 靖彦	インタープロテイン株式会社	研究開発部長
	松崎 尹雄	インタープロテイン株式会社	分子設計ラボヘッド

研究要旨

高額抗体医薬アバスチン（ベバシズマブ）と同じメカニズムによる経口 VEGF阻害薬のFirst in humanを含む早期臨床試験を医師主導臨床開発により完遂し、アライアンス、グローバル臨床試験につなぎ、日本発、世界初のサイトカインと受容体の結合阻害、すなわち低分子蛋白質間相互作用（VEGFとVEGF受容体相互作用）制御薬のグローバル市場での価値創出を目論む。

A. 研究目的

分子標的薬主流の抗がん剤開発は新しい段階に入ろうとしている。蛋白質間相互作用の制御薬が新規分子標的として注目され、抗体医薬のメカニズムを低分子化させた抗がん剤、或いは細胞内蛋白質間相互作用を標的とした抗がん剤研究が盛んである。本研究は世界に先駆け、サイトカインと受容体の結合阻害、すなわち抗体医薬の低分子経口薬化を目指す。（表1）

線結晶構造解析の展開などをパラレルに行い、医薬最適化をインタープロテインの独自分子設計法（INTENDD-SBSG法※）コンピュータ計算化学により確認しながらリード最適化を図る。

（表2）

※Interprotein Engine for New Drug Design- Structure Based Scaffold Generation

（倫理面への配慮）

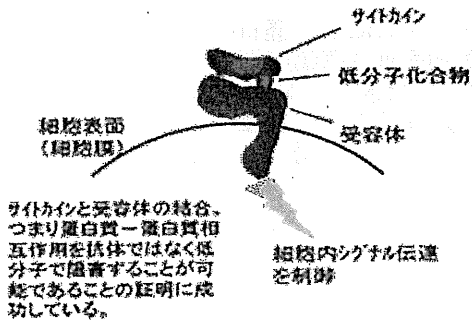
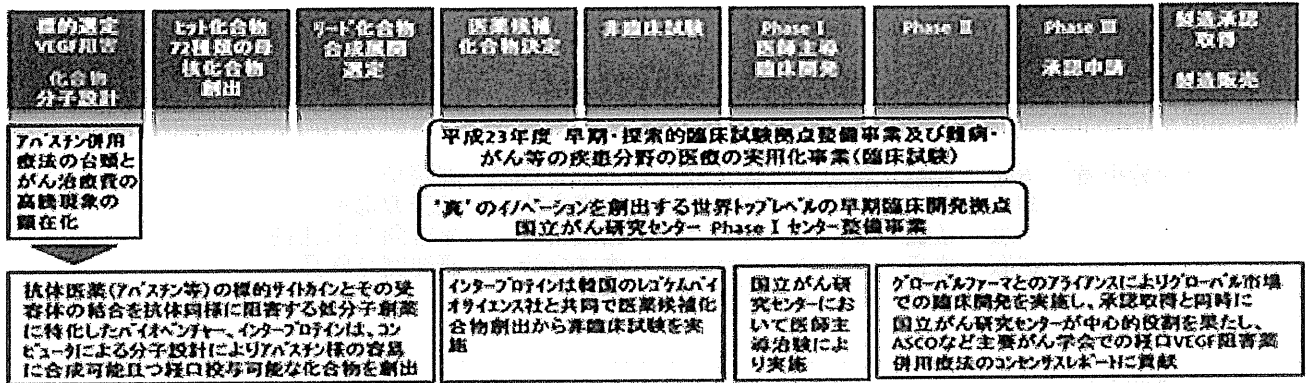
動物を用いる実験においては「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を踏まえ、各施設における動物取扱の取り決めを遵守して行う。また、遺伝子改変動物の取り扱いについては「カルタヘナ法」を順守し、各施設における動物倫理委員会および遺伝子組換え実験安全委員会の審査を受けて実施する。

B. 研究方法

広くコラボレーションを活用し、Lead Optimizationの展開を図る。具体的には、京都産業大学での生物評価を含めたプロジェクトマネジメントを中心としてLegoChem Bioscience社（韓国デジョン）との合成展開、エヌビー健康研究所（北海道）および理研とのproof of mechanism of actionの展開、丸和栄養食品社（奈良）および宇宙航空研究開発機構（JAXA）とのX

表1

研究事業4. 抗サイトカイン抗体医薬 アバスタチン(抗VEGF抗体医薬)を置き換える
経口VEGF阻害薬の研究開発計画

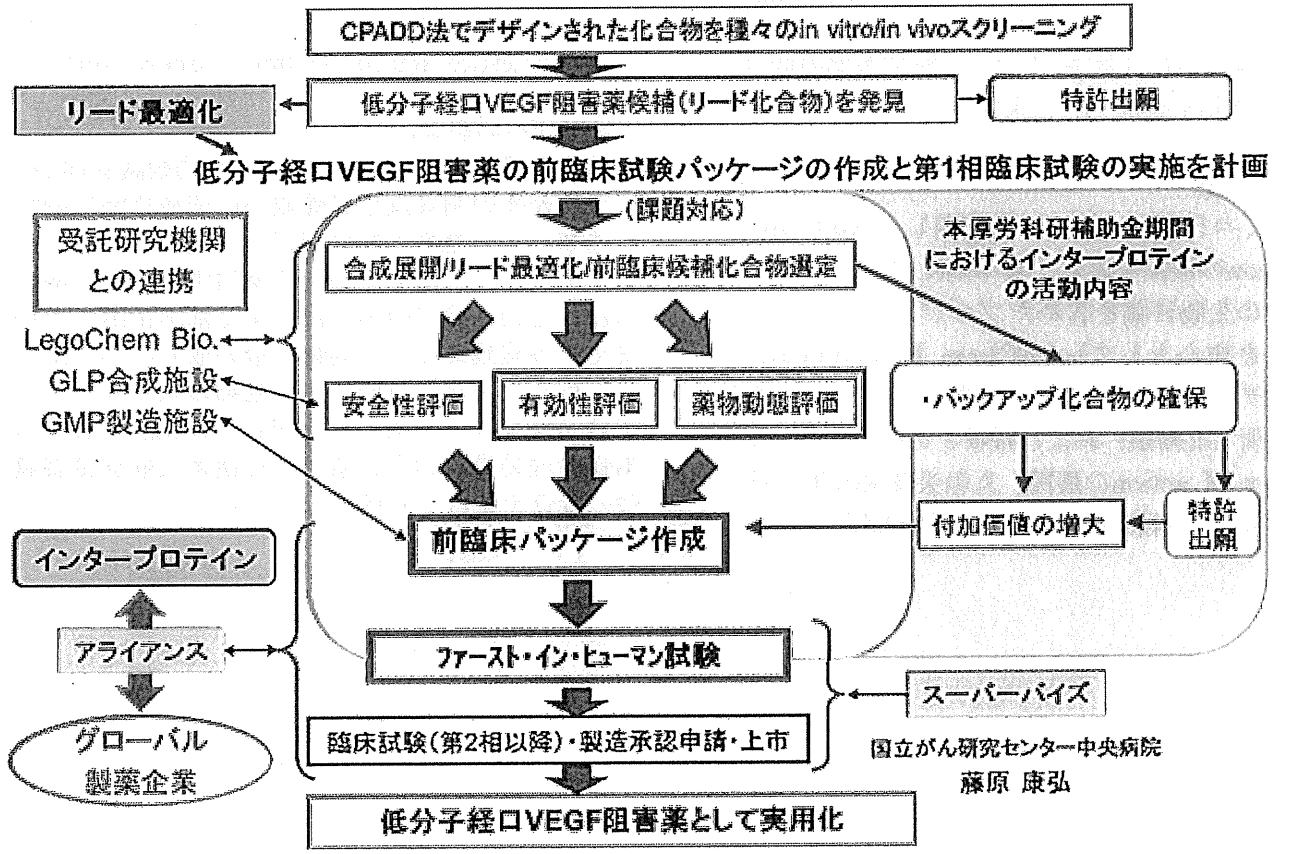


サイトカインを標的にした抗体医薬

標的サイトカイン	抗体医薬	適応疾患 ()内は、将来の適応拡大
VEGF	アバスタチン	大腸がん、非小細胞肺癌等固形がん
IL-6	アキサキマブ	慢性関節リウマチ、乾癬、(がん等の悪液質)
TNF α / β	レカド、ヒューマナ	慢性関節リウマチ、(がん等の悪液質)
IL-1 β / α	イラリス	クワイヒリン関連周期性発熱群

抗サイトカイン抗体医薬は、遺伝子組み換えにより製造され、薬効に限られる。しかし、いずれも高価医療の対象であり、使用できる患者は、限定的であり、一日も早く安価に合成可能な経口薬の開発が世界で望まれている。インタープロテイン社は、抗サイトカイン抗体医薬をはじめとする抗体医薬の標的膜蛋白質ターゲットに経口可能な低分子医薬の創薬に注力している。

表2



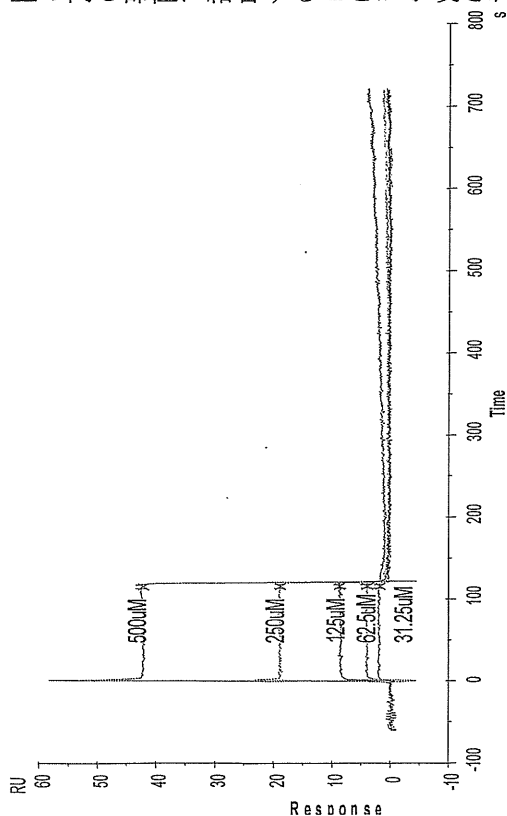
C. 研究結果

【Proof of Mechanism of Action】

リード化合物の基本骨格も含め、5種類の異なる基本骨格を有する様々な化合物と VEGF 蛋白質との共結晶を作成し、複数のシンクロトロンにおいて X 線回折実験を実施してきた。

まず、リード化合物の一つである V-103 シリーズの様々な化合物と VEGF 蛋白質の共結晶を作成し、回折実験を実施した。その結果、V-103-8-3 と VEGF との共結晶において、2.5Å の分解能で、化合物の電子密度と考えられる電子雲が観察された。得られた電子密度に、V-119-8-3 のモデルを当てはめて精密化した結果、結合モデルが得られた。

LCB-337 は V-103 シリーズと異なる基本骨格を有し、SPR (surface Plasmon resonance) により、VEGF 蛋白質に結合することが確認されている (図 1)。この LCB-337 と VEGF の共結晶を作成し、回折実験を実施した結果、分解能は 2.8Å であるものの、化合物の電子密度と考えられるかなり鮮明な電子雲が観察された。得られた電子密度に、LCB-337 のモデルを当てはめて精密化した結果、結合モデルが得られた。さらに、LCB-337 と V-103-8-3 は、VEGF 上の同じ部位に結合することが示唆された。



さらに、V-103 シリーズおよび LCB-337 シリーズと異なる骨格を有する V-119-8 が、VEGF 蛋白質に結合することを見出した (図 2)。この V-119-8 と VEGF の共結晶を作成し、回折実験を実施した結果、分解能は 2.9Å であるものの、化合物の電子密度と考えられるかなり鮮明な電子雲が観察された。得られた電子密度に、LCB-337 のモデルを当てはめて精密化した結果、結合モデルが得られた。そして、V-119-8 は、LCB-337 と同じ部位に結合することが示唆された。

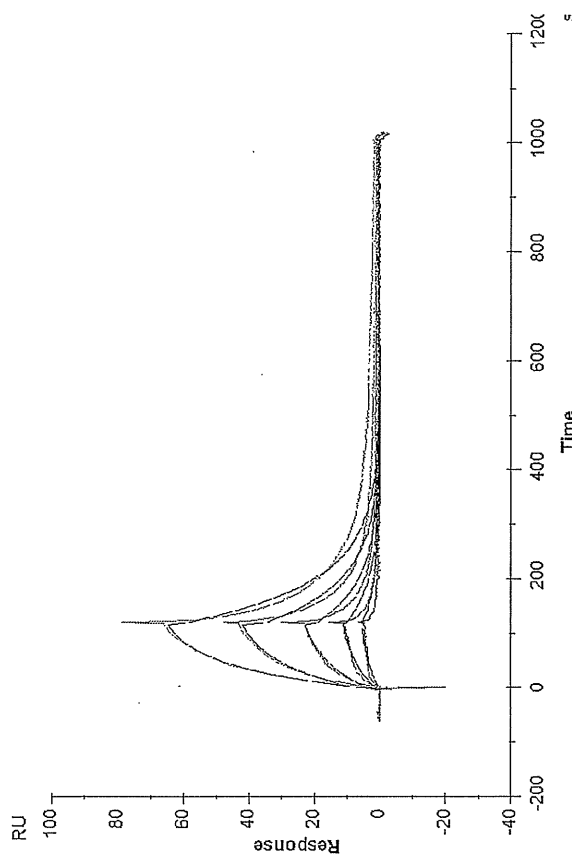


図2 V-119-8 の VEGF 蛋白質への結合の kinetic analysis

【リード化合物誘導体の合成展開】

韓国の LegoChem Biosciences (LCB) 社が、リード化合物の誘導体の合成を行い、平成 23 年 4 月 1 日から平成 24 年 3 月 31 日までの 12 ヶ月間に、226 種類の化合物を合成した。合成は、医薬最適化化合物決定およびバックアップ化合物決定まで今後も継続する。

【リード化合物誘導体の薬理的評価】

VEGF シグナル低分子阻害化合物の作用機構とそ

の確認方法について、図3に模式的に示した。目標とする低分子化合物は、VEGF に結合することにより、VEGF と VEGF 受容体 2 (VEGFR2)との相互作用を阻害することにより、VEGFR2 のキナーゼのリン酸化を抑制し、その結果として下流のシグナル伝達を抑制することを目指して設計している。そして、各作用段階で、低分子化合物が目標通りの作用を示しているか否かについては、以下のように検討している。1) SPR (surface plasmon resonance)法、NMR 法および共結晶により、低分子化合物が、VEGF に結合していることを確認する。2) VEGF と VEGFR2 の相互作用については、VEGF₁₆₅により引き起こされる VEGFR2 の 1175 番目のチロシンのリン酸化の状態を SureFire 法により検討し、そのリン酸化抑制作用は、低分子化合物のチロシンキナーゼの直接作用に起因するものではないことをキナーゼパネルにより確認している。3) さらに、下流のシグナルに対する効果は、VEGF 刺激時のヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の増殖に対する効果として確認している。

平成22年10月から、LCB社が合成した化合物につき、順次、VEGFで刺激したヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の増殖抑制作用について検討を行っており、V-103シリーズの骨格を有する化合物では、LCB-451が強いHUVEC増殖抑制作用を示し、また、LCB-337シリーズの骨格を有する化合物では、LCB-540が強いHUVEC増殖抑制作用を示した。

一方、両化合物のヒト大腸がん細胞株LS174Tの増殖に対するIC50値は、HUVECの増殖抑制のIC50値の約10倍程度弱い数値であったことから、両化合物は、がん細胞に直接作用するのではなく、血管新生を抑制することにより腫瘍増殖抑制効果を発揮することが示唆された (図4)。

開発化合物の目標とする作用機構

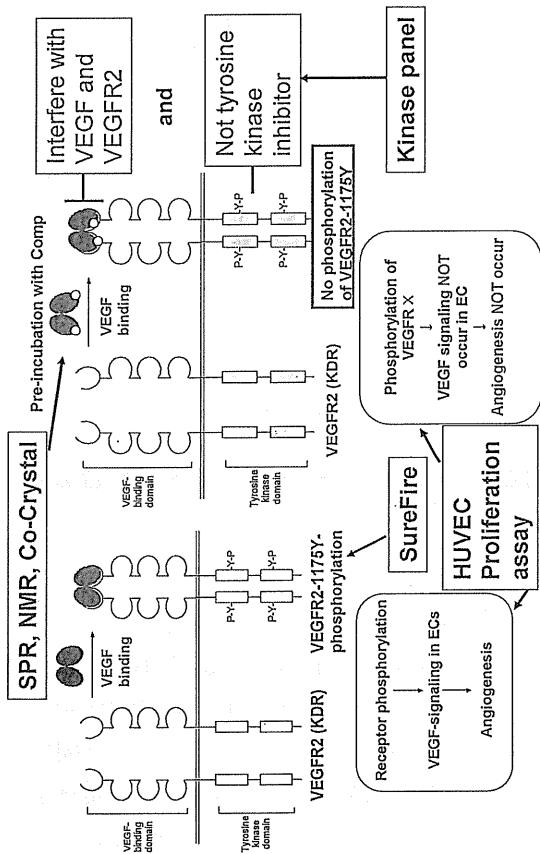


図3 VEGF シグナル低分子阻害剤の作用機構と確認方法の模式図

LCB-451およびLCB-540の25 ng/mL VEGFで刺激したHUVECおよびヒト大腸がんLS174T細胞の増殖に対する作用を供試した。

LCB-451およびLCB-540のHUVECの増殖に対するIC50値は、0.75 uMおよび0.14 uMであった。一方、大腸がん細胞の増殖に対するそれは、6.7 uMおよび>9 uMであった。

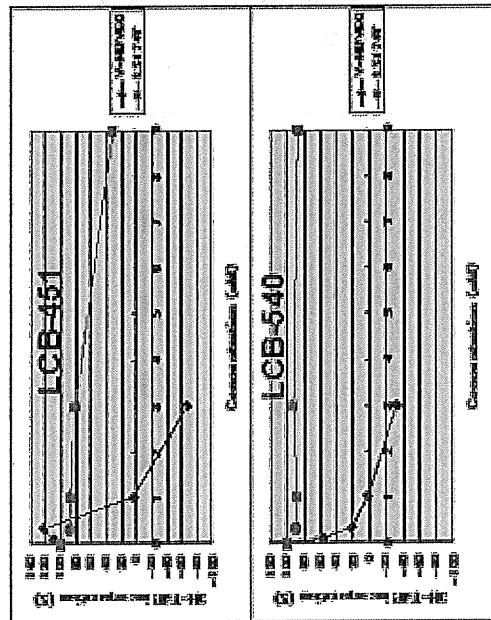
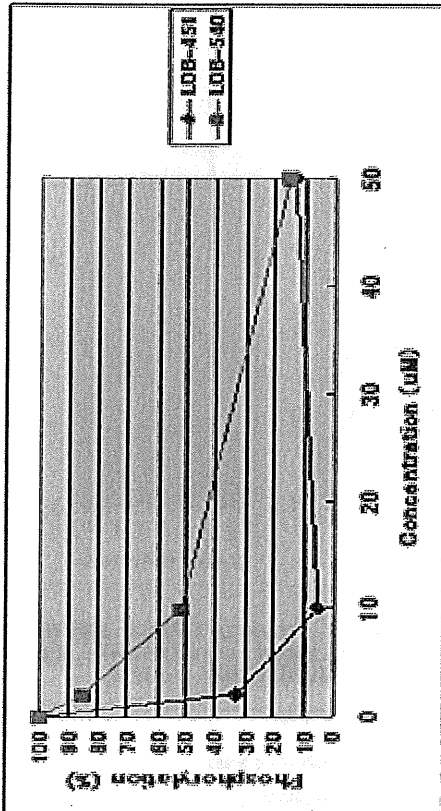


図4 LCB-451 および LCB-540 の HUVEC および LS174T 腫瘍増殖抑制作用

LCB-451とLCB-540が、VEGFR2のチロシンのリン酸化の抑制を介して、HUVECの増殖抑制作用を發揮することを確認するために、両化合物によるVEGFR2のチロシンリン酸化抑制効果を検討した結果、両化合物は1175番目のチロシン残基のリン酸化を抑制することが明らかとなった(図5)。



各化合物のVEGFR2リン酸化阻害活性は、エヌビ一健康研究所にて、Surefire法により、測定された。方法は、化合物とVEGFを1時間混合後、この混合物をHUVECに添加し、VEGFR2のリン酸化を評価した。数値は、VEGFによるリン酸化を100としたときの値。

図5 LCB-451 および LCB-540 の VEGFR2 リン酸化抑制用

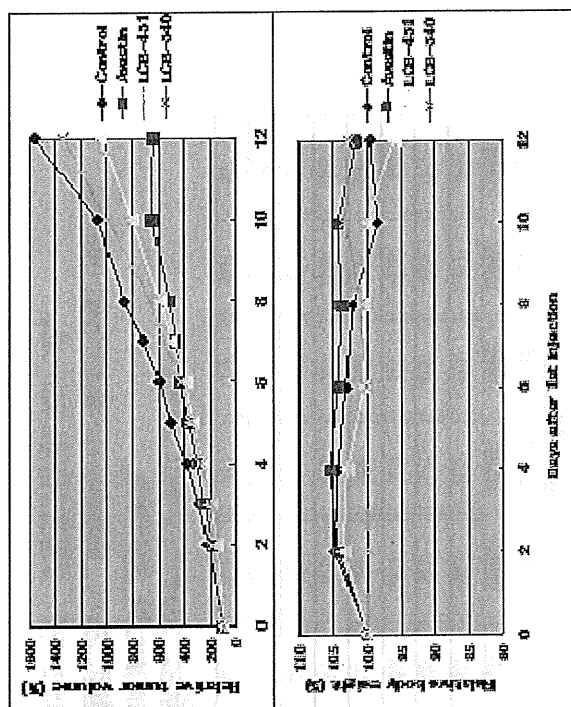
さらに、図6に示すように、このリン酸化抑制作用は、各化合物のVEGFR2チロシンキナーゼに対する直接的な抑制作用に起因するものではないことも確認した。

Kinase	Inhibition (IC50)									
	L-115 nM	L-115 nM	L-491 nM	L-491 nM	L-477 nM	L-477 nM	L-540 nM	L-540 nM	L-455 nM	L-455 nM
EGFR	2.2	64.4	43.3	33.2	19.1	19.1	11.1	11.1	36.5	36.5
EGFR 1uM	0.6	3.6	0.2	1.2	0.2	0.2	4.3	4.3	31.2	31.2
EGFR	0.5	20.4	19.4	3.5	3.5	3.5	31.8	31.8	51.8	51.8
EGFR 1uM	0.2	2.3	4.9	0.3	3.2	3.2	26.7	26.7	51.8	51.8
IGF1R	4.7	3.1	6.1	4.3	4.7	4.7	16.1	16.1	35.3	35.3
IGF1R 1uM	4.1	4.6	2.0	4.9	4.9	4.9	16.6	16.6	34.7	34.7
KDR	2.8	51.7	69.3	5.1	2.5	2.5	7.7	7.7	17.6	17.6
KDR 1uM	2.9	10.1	17.5	0.5	3.9	3.9	6.4	6.4	6.7	6.7

各化合物のキナーゼ阻害活性は、加ナバイオサイエンス社にて、Mobility Shift Assay (MSA)法により、測定された。LCB-451は、10 uMの濃度において、生理的なATP濃度である1 mMでは、全くKDR (VEGFR2)チロシンキナーゼ活性を阻害しなかった。

図6 LCB-451 および LCB-540 の VEGFR2 キナーゼに対する作用

次いで、LCB-451とLCB-540が、実際に、腫瘍増殖の増殖を抑制することができるのか否かについて、ヒト大腸がんLS174T細胞をヌードマウスの皮下に移植した異種移植モデルを用いて検討を行った(図7)。



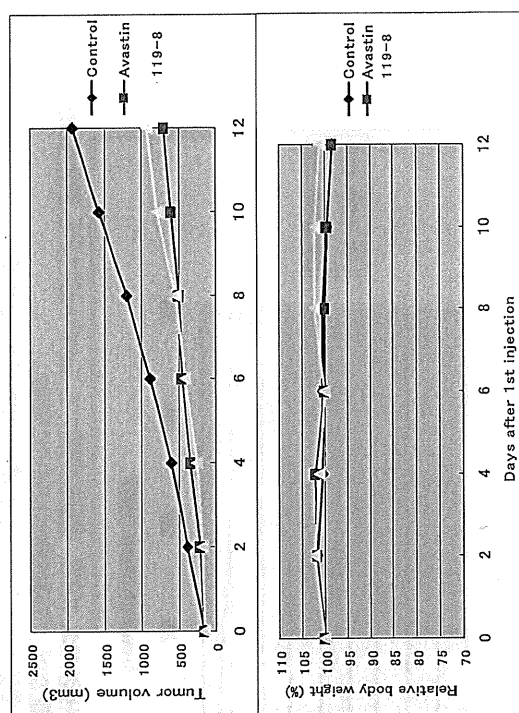
方法
ヒト大腸がんLS174T細胞をヌードマウスに皮下移植した。移植7日後に、各マウスの腫瘍体積(長さ×短径×短径²/2)を測定し、以下の4群に分けた。各群の腫瘍体積の平均は、140 mm³で、各化合物の投与を開始した(day 0)。

1. Control
 2. Avastin 5 mg/kg day 0, 3, 7 i.p.
 3. LCB-451 40 mg/kg days 0-8 i.p.
 4. LCB-540 40 mg/kg days 0-8 i.p.
- グラフに示した日に、腫瘍体積と体重を測定した。

図7 LCB-451 および LCB-540 の腫瘍増殖抑制作用

図7に示すように、LCB-451とLCB-540は、体重には全く影響を与えずに、投与開始6日目までは、抗体医薬品アバスタチンとほぼ同等の腫瘍増殖抑制作用を示した。また、LCB-451とLCB-540は、投与を中止すると、腫瘍増殖速度が増加し、その速度は、アバスタチンの投与中止時に比べ、速かった。これは、各化合物の血中半減期を反映していると考えられる。アバスタチンの投与を中止すると血管新生のリバウンドが起こり腫瘍の増殖が急激に進む現象が基礎的な検討から示唆されていることと上述のLCB-451とLCB-540の作用機構に関する結果を考え合わせれば、LCB-451とLCB-540は、目標とする作用機構により、腫瘍増殖抑制効果を発揮した可能性が高いと考えられる。

さらに、SPRおよび共結晶により、VEGFとの結合が確認されているV-119-8についても、ヒト大腸がんLS174T細胞をヌードマウスの皮下に移植した異種移植モデルを用いて、腫瘍増殖抑制作用の検討を行った(図8)。



方法
ヒト大腸がんLS174T細胞をヌードマウスに皮下移植した。移植7日後に、各マウスの腫瘍体積(長さ×短径×短径²/2)を測定し、以下の3群に分けた。各群の腫瘍体積の平均は、161 mm³で、各化合物の投与を開始した(day 0)。

1. Control
 2. Avastin 5 mg/kg day 0, 3, 7 i.p.
 3. V-119-8 40 mg/kg days 0-8 i.p.
- グラフに示した日に、腫瘍体積と体重を測定した。

図8 V-119-8 の腫瘍増殖抑制作用

図8に示すように、V-119-8は、投与期間中(8日目まで)は、体重に全く影響を及ぼすことなく、アバスタチンとほぼ同等の腫瘍増殖抑制作用を示した。V-119-8の投与を中止すると、腫瘍増殖速度が増加し、その速度は、アバスタチンの投与中止時に比べ、速かった。これは、両化合物の血中半減期を反映していると考えられる。

ここで、V-119-8のVEGF刺激HUVECの増殖に対するIC₅₀値は約80 μMであり、VEGFによるVEGFR2のリン酸化抑制作用のIC₅₀値が約50 μMであることから、V-119-8は、LCB-451やLCB-540に比べ、VEGFR2の阻害を介したHUVECの増殖抑制作用が非常に弱いと考えられる。しかし、異種移植モデルを用いた検討では、V-119-8は、LCB-451やLCB-540と同等以上の腫瘍増殖抑制作用を示すことが判明したことから、V-119-8の腫瘍増殖抑制の作用機構