

201332017A

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（がん関係研究分野）

「我が国で新しく発明された概念に基づく抗がん剤  
アルクチゲニン臨床第Ⅱ相試験による膵がん克服」  
に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 江角 浩安

平成 26 (2014) 年 5 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

我が国で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臨床第Ⅱ相試験による膵がん克服 江角 浩安	1
---	---

### 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	7
2. 臨床試験の計画、解析・臨床試験実施支援 佐藤 暁洋 試験統計デザイン・データ解析 野村 尚吾 薬事業務 渡邊 協孝	10
3. 臨床試験の実施 池田 公史 上野 秀樹 石井 浩	12
4. TRの実施 三牧 幸代	14
5. 画像診断によるPOC取得と患者層別化 藤井 博史	16
6. 適応決定のためのスクリーニング技術の開発 佐竹 光夫	19
7. PKとファーマコゲノミクスの実施 岸野 吏志	21
8. 病理学的検討 小嶋 基寛	24

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# I .総括研究報告

我が国で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臨床第II相試験による膵がん克服

研究代表者 江角浩安 学校法人東京理科大学 教授

#### 研究要旨

平成25年3月第II相試験登録を開始し、平成25年11月予定症例数37例のところ39症例登録を完了した。臨床病期は局所進行が3例、遠隔転移が36例であった。遠隔転移臓器は肝29例、腹腔リンパ節10例、腹膜7例、肺8例であった。発生した重篤な有害事象は5件で、そのうち、治療との因果関係が否定できない有害事象は脳梗塞の1例のみであった。臨床第I相試験の薬力学的解析の結果、アルクチゲニンは腸管吸収後速やかにグルクロン酸抱合されたが、ヒト組換え体UGTを用いた解析から、UGT1A1および9が主要な責任酵素であることが分かった。また、抱合に関する遺伝的多型の影響はあったとしてもまれでありこれが有害事象や効果規定因子になる可能性は低いと考えられた。再活性化するβグルクロニダーゼが規定因子になる可能性を検討中。アルクチゲニンのがん幹細胞様細胞に対する効果を利用した根治的化学療法開発のためのPOC取得試験の為にプロトコール改訂を行い準備中である。

#### 分担研究者氏名及び所属施設

江角浩安	東京理科大学
佐藤暁洋	国立がん研究センター東病院
野村尚吾	国立がん研究センター東病院
渡邊協孝	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
上野秀樹	国立がん研究センター中央病院
石井 浩	がん研究会 有明病院
三牧幸代	国立がん研究センター東病院
藤井博史	国立がん研究センター東病院
佐竹光夫	国立がん研究センター東病院
岸野吏志	明治薬科大学
小嶋基寛	国立がん研究センター東病院

#### A. 研究目的

本研究は、極度に治療に抵抗する膵臓がん等乏血性腫瘍に対する画期的薬物療法の開発を目的とする。膵がんに対しては手術療法だけが救命的治療法であるがその適応は膵がん患者の2-30%程度である。しかし5年生存率は20%程度である。放射線療法、薬物療法、ワクチン療法などの治療効果も限定的で、標準的薬物療法でも生存の延長はきわめて芳しくない。膵がん組織に見られるような強い低酸素と低栄養条件では既存の抗がん剤は効果を失う。膵がんはじめ乏血管性腫瘍では、酸素、栄養素ともに供給不足であり特殊な微小環境を標的とした治療薬の開発に取り組んできた。その結果、アルクチゲニンを見出し同定した。この化合物は、低栄養下で選択的毒性を示し低酸素の影響を受けない独創的なものである。アルクチゲニンは「日局」収載生薬の牛蒡子に含まれ、

クラシエ製薬(株)・富山大学との共同研究によりアルクチゲニン高含有牛蒡子エキスの製法特許を取得し(特願2010-505497)、(PCT/JP2010/051701)及び追加特許出願(特願2010-215118)を行った。この製法によりGMP適合施設で、顆粒剤(GBS-01)を製造し前臨床試験の後、GEM不応膵癌患者を対象とした第I/II相試験(UMIN000005787)を平成23年6月より開始した。GBS-01による有害事象はほとんど無く、用量レベル2でGEM・S-1不応患者1名にPR(4ヶ月継続)が得られた。この結果、本研究では医師主導治験として臨床第II相試験を行うことを目的とする。

#### B. 研究方法

国立がん研究センター東病院・中央病院、癌研有明病院を参加施設とし、早期・探索的臨床試験拠点整備事業により整備されている東病院臨床試験支援室がGCPに従った医師主導治験のデータセンター/モニタリングを担う。また、薬事専門家および生物統計家が関与する。具体的には分担研究者佐藤暁洋が室長を務める、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がデータセンター/モニタリング/統計解析などの支援を担当し、分担研究者野村尚吾が同臨床試験支援室の生物統計家として、試験の統計デザイン及びデータ解析を担当する。分担研究者の渡邊協孝が、薬事担当者として薬事戦略立案の支援及び薬事戦略相談の支援を行う。

薬物動態解析は明治薬科大学、付随したマーカー探索・分子イメージングなどのトランスレーシ

ヨナルリサーチについては東病院臨床開発センターの各部門が担う。治験に使用する GBS-01 は、国立がん研究センター東病院とクラシエ製薬(株)、富山大学により共同開発された製法特許に基づきクラシエ製薬(株)により GMP グレードで調製された製剤を用いる。

平成 24 年度より薬事戦略相談を実施した上で医師主導治験を開始し、並行してトランスレーションリサーチを実施し平成 25-6 年までに終了する。

Phase I 部分は、ゲムシタビン不応の進行膵癌患者を対象として、アルクチゲニンを多く含む牛蒡子エキス製剤「GBS01」の第 I 相試験を行い、GBS-01 の投与量規制毒性、有害事象を検討し、臨床第 II 相試験での推奨用量を決定することを目的とした。また、副次的に有効性も検討した。対象患者は、病理組織学的に診断された進行膵癌で、ゲムシタビン不応の患者を対象とした。GBS-01 は、レベルを 3 段階に設定し、各レベル 3 名の用量漸増試験を行った。レベル 1: 2 包 (牛蒡子エキスとして 1.0g) / 回、レベル 2: 5 包 (同 2.5g) / 回、レベル 3: 8 包 (同 4.0g) / 回とし、GBS-01 を 1 日 1 回連日経口投与することとした。投与量規制毒性は GBS-01 投与後 28 日までの Grade 4 の血液毒性、Grade 3 以上の非血液毒性とした。有害事象は CTC AE ver 4.0、抗腫瘍効果は RECIST1.1 にて判定した。その結果、容量規定毒性は認められずレベル 2 において PR 症例、Long SD 症例も認められた。これらの結果から、至適投与量を 4 g と決定し Phase II ではこの投与量を採用することにした。

Phase II 部分は「ゲムシタビンとフッ化ピリミジン系抗癌剤不応膵癌患者を対象とした GBS-01 の前期第 II 相試験」の題名のもと医師主導治験として取り組んだ。予定登録数: 37 名 (治験実施計画適合集団 (Per Protocol Set: PPS) として) 治験実施予定期間: 2013 年 1 月~2014 年 6 月である。

Primary endpoint: 8 週の病勢制御割合 (Disease Control Rate: DCR)

Secondary endpoints: 有害事象  
奏効割合 (response rate: RR)

無増悪生存期間 (Progression free survival: PFS)

全生存期間 (Overall survival: OS)

薬物動態学的パラメー

Exploratory endpoint: バイオマーカー

付随研究として、アルクチゲニンの作用機序の解明に基づくバイオマーカーの開発、特にゲノム、メタボローム、プロテオーム解析を臨床資料についても可能な限り行う。更に、画像技術を臨床的基礎的に駆使して POC の取得に関し努力すること

とした。

#### (倫理面への配慮)

当該臨床試験は、ヘルシンキ宣言、医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令、薬事法および薬事法施行規則とその関連通知などを準拠して実施される。参加各施設の IRB にプロトコルを提出し審査・承認を受けた。GCP に準拠して治験を行った。

### C. 研究結果

#### Phase II の症例登録状況

国立がん研究センター東病院、中央病院、がん研有明病院の 3 施設で行った。平成 25 年 1 月 17 日初回治験届を提出し、平成 25 年 3 月 11 日から登録を開始した。平成 25 年 11 月 5 日までに 39 例の登録を終了した。患者背景(全 39 例)は、年齢(中央値)は 64 (範囲: 38-81) 歳、男性 27 例、PS は 0 が 28 例、1 が 11 例であった。全例で腺癌が確認され、臨床病期は局所進行が 3 例、遠隔転移が 36 例であった。遠隔転移臓器は肝 29 例、腹腔リンパ節 10 例、腹膜 7 例、肺 8 例であった。前切除歴は 24 例に認め、前化学療法歴は、Gemcitabine 29 例、S-1 34 例、Gemcitabine+S-1 5 例、FOLFIRINOX 2 例であった。

これまでに発生した重篤な有害事象は 5 件で、そのうち、治療との因果関係が否定できない有害事象は脳梗塞の 1 例のみであった

#### Phase II での薬力学的解析の結果

Phase I でのアルクチゲニン (AG) およびそのグルクロン酸抱合体 (AGG) の血中濃度には患者間で顕著な差が認められた。第 II 相臨床試験における血中 AG、AGG 濃度の分布を図 1, 2 に、Cmin、Cmax の箱ひげ図を図 3, 4 に示す。GBS-01 は、服用後速やかに AG あるいは AGG として血漿中に検出されたが、第 I 相試験での結果と同様、血漿中 AG 濃度は患者間で異なる傾向が認められた。一方、血漿中 AGG 濃度は血漿中 AG 濃度ほど患者間での違いは認められなかった。

#### グルクロン酸抱合に関する検討

グルクロン酸抱合を司る酵素は、UDP-グルクロン酸転位酵素 (UGT) である。ヒトでは、19 種類のアイソザイムが知られているが、その構造から 3 群に分類されている。UGT1A, UGT2A, UGT2B であり、選択的エクソン利用によりさらに多様性が創り出され 19 種となっている。

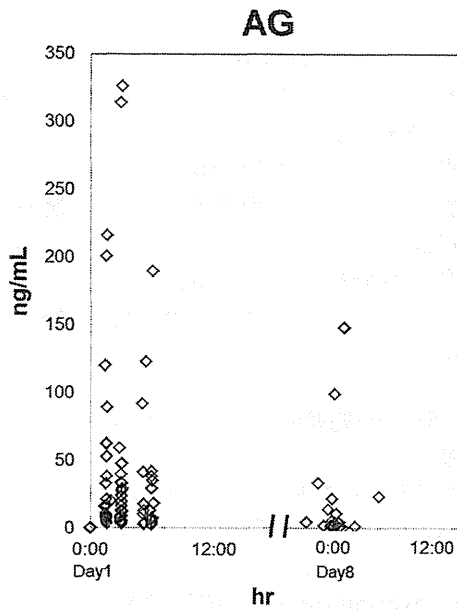


図1 第II相試験における血漿中 AG 濃度

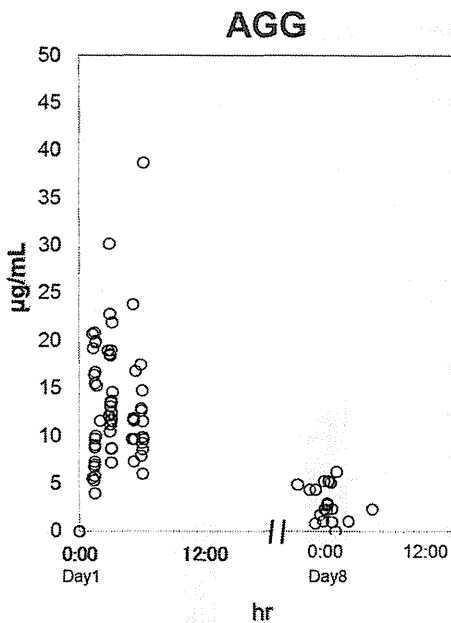


図2 第II相試験における血漿中 AGG 濃度

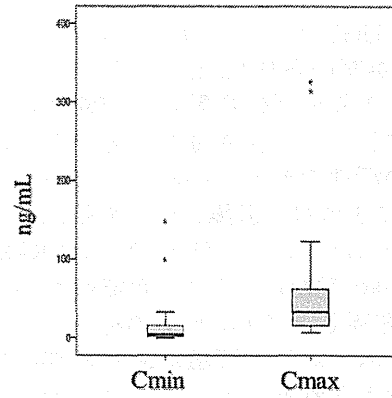


図3 第II相試験における血漿中 AG 濃度 (Cmin, Cmax)

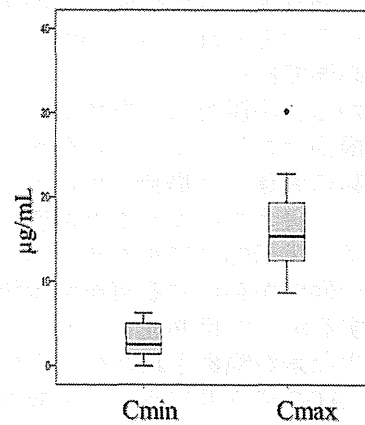


図4 第II相試験における血漿中 AGG 濃度 (Cmin, Cmax)

各アイソザイムは発現している臓器細胞に特異性があることが知られている。今回の我々の研究結果から、アルクチゲニンは極めて速やかにグルクロン酸抱合されることが分かった。アルクチゲニンが消化管で吸収された後門脈で肝臓に運ばれると考えれば 90%以上が First pass でグルクロン酸抱合されていることになるし、ヒトによりややばらつきがあるとは言え、50%以上が尿中に回収されることを考えればグルクロン酸抱合された後胆汁中だけでなく血中にも流れ出ると考えられる。また、腸肝循環が存在する可能性も Phase I での PK 解析の結果から示唆される。しかし、血中の AGG 濃度が AG の濃度の 100 倍近くあることを考えれば、大部分の AGG は吸収された消化管か肝臓で作られると考えるのが合理的である。

そこでヒト小腸と肝臓のマイクロゾーム分画を用いて試験管内グルクロン酸抱合活性を調べた。その結果、両マイクロゾームにも強い活性が存在することが分かった。さらにどのアイソザイムが活性を担っているのかを明らかにするために、既にクローニングされバキュロウイルス発現系でカイコ細胞に発現された 13 種類の組換え体を用い活性

を検討した。

その結果、UGT1A1, 1A3, 1A7, 1A9, 2B7, 2B15, 2B17 に活性が認められた。1A のアイソザイムは、タンパク質あたりの活性を計算が可能であるのでこれを検討すると、1A9 が他のアイソザイムに比し極めて高い活性を持っていることが分かった。1A9 は文献によれば、肝臓、腎、大腸に発言していることが知られている。我々の初歩的組織発現の検討では小腸で発現している可能性もある。1A1 は肝臓で発現し、ビリルビンの抱合を担う主要なアイソザイムである。肝臓における存在量は極めて多いと考えられるので、アルクチゲニンが肝臓に到達した場合には大きな働きをすると考えられるが、この酵素は、肝臓以外でも胃や大腸でも発現することが知られている。2B7 は小腸での発現が報告されており或いは消化管での抱合に大きな働きをしているかもしれない。いずれにしろ今一層の解析が必要である。

以上の結果から、小腸でも、胃でも吸収されればグルクロン酸抱合されることが分かった。勿論門脈から肝臓に到達した場合にはいろいろなアイソザイムにより縫合されることが明らかになった。この事は、遺伝的にアルクチゲニンを極めて抱合しにくい個体が存在する可能性は極めて低いことを示唆するが、なぜ Phase I では、AGG の血中濃度の大きな差が観察されたのかを説明できない。むしろ、AGG のクリアランスの差が血中濃度の差を生んでいる可能性を考えるべきかもしれない。

### GBS-01 投与と血中乳酸

昨年度の研究でアルクチゲニンがミトコンドリアの複合体 I を阻害することが分かったが、ヒトへの投与でその結果乳酸血中濃度の上昇が、毒性や効果の指標になる可能性を PK 試験の残余献体を用いて検討した。尚、この研究は念のためにプロトコルの軽微な変更であるが倫理審査委員会の審査を受けた。Phase I に登録された 15 名の患者の血漿を用い、乳酸を測定した。その結果、血漿乳酸濃度は GBS-01 の投与量に応じて高くなった。全体の約半数の患者で上昇が見られたが、残り半数および健常ボランティアでは上昇は見られなかった。一例では最高値 7 mM と明らかな上昇が見られたが、一時的で数時間で正常値に復していた。軽微な上昇を来した患者でも同様に上昇は一時的であった。最高値の 7 mM は、健常人がやや激しい運動を行った時の乳酸上昇に相当する。臨床的に乳酸アシドーシスの症状を呈した患者は認められなかった臨床の報告と一致する。

乳酸値の上昇が血中のアルクチゲニン或いは AGG の上昇と一致するの否かを調べた。その結

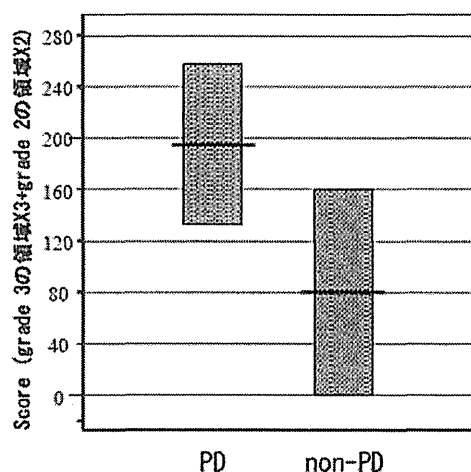
果、Cmax でも、AUC でも、AG との相関は見られなかった。AGG との相関も見られなかった。これらのことは、AG が活性体であるが、どこでグルクロン酸抱合されているのかと言う問題と、乳酸の上昇はどの臓器或いは細胞で起こっているのかの問題に直接つながる重要な情報である。また、AGG として血中では大部分が存在するが、腫瘍でどのような決定因子で効果が決まるのかという点についても重要な示唆を与える。AGG を再活性化する  $\beta$  グルクロニダーゼは炎症や腫瘍で強く発現されるという報告がある。そこで以下の検討を行った。

### Phase I 部分の組織検体を用いた $\beta$ グルクロニダーゼの検討

臨床的有効性は PD 群とそれ以外 (non-PD 群) の二群に分けて検討を行った。両群間で progression free survival に有意な差を認めたが、性別、年齢、over-all survival、腫瘍部位、組織分化度、腫瘍最大径、胆管浸潤など腫瘍進展度との相関を認めなかった。実験的に観察される上皮間葉系移行との関連性が報告されている budding や低分化胞巣の検討も行ったが、両群間に差を認めなかった。

免疫組織学的な検討としては、 $\beta$ -グルクロニダーゼ発現は PD 群、non-PD 群の間に差を認めなかった。GRP78 においては non-PD 群の発現スコアが平均 80.0、PD 群の発現スコアが平均 195 であり、統計学的な有意差は示されなかったが ( $P=0.08$ )、non-PD 群で低い傾向があった(下図)。

### GRP78 発現スコア



$P=0.08$

## 医師主導治験を支える体制に関する検討

平成 25 年度に、薬事相談・プロトコール・各種 SOP の作成、治験届け、EDC の構築等を実施し、平成 25 年 3 月 11 日より患者登録を開始した。同日に 1 例目を登録し 11 月 5 日までに 39 名の患者登録を行い、予定登録数に達したために登録を終了した。登録ペースは予定登録数を上回り順調な登録が行われた。

平成 25 年度は、施設訪問モニタリングを 36 回実施し、進捗・背景因子の集計・安全性情報などを記載した定期報告レポートを 7 回発行した。また、データマネジメントに関連して EDC システムのコンピューターシステムバリデーションを実施した。

重篤な有害事象に関する当局報告を 2 報、研究報告を 1 報、治験変更届けを 1 回それぞれ PMDA に報告している。中間解析を 1 回実施した。

監査についても、治験調整事務局に対する監査を 1 回、参加施設に対する監査を 2 回、外注先の CRO が実施、概ね問題がないとの監査結果を得ている。

総括報告書作成に向けて、外注先の CRO と打合せを開始したが、プロトコール改訂をした後に登録を追加することとなったため、一度作業を中止し、プロトコール改訂作業を実施している。

PK 解析に関しても、PK 解析に必要な EDC の改修及びシステムバリデーションを実施した。(添付資料 1)

参加施設側としての支援として、国立がん研究センター東病院として 13 名を登録し、CRC 業務を実施している。

## アルクチゲニンのがん幹細胞様細胞に対する効果

がん幹細胞に対するアルクチゲニンの効果を検討した。がん幹細胞は幹細胞ニッチと呼ばれる特別な部位に存在すると考えられている。このニッチの特徴の 1 つが、低酸素環境と低栄養環境である。アルクチゲニンは元々、がん細胞が低酸素・低栄養で生存する場合の適応反応を阻害する効果を指標に照してスクリーニングされたものであるため、がん幹細胞様細胞に対しては特に生体内では強い効果を示すのではないかと考えてきた。そこでヒト膵がん細胞株 PANC 1 細胞を低グルコース条件にし、CD24, CD44, ESA 陽性細胞への影響をゲムシタピンと比較した。低グルコース条件でグルコース存在条件より約 1.5 倍に増加するが、ゲムシタピンでは減少しなかった。しかしアルクチゲニンではこの割合が約 5 分の一へと減少した。スフェロイド形成を MIAPPaCa2 細胞で検討すると、アルクチゲニンは顕著な抑制をし 6  $\mu$ M ではほぼ完全に抑制した。また、Oct3/4, Nanog, SOX2 の

発現を検討すると、1-2  $\mu$ M ではほぼ完全に抑制した。これらの結果より生体内でもがん幹細胞様細胞を抑制する可能性が高いと考え、ヌードマウスに MiaPaCa2 細胞を移植した後 5 週間アルクチゲニン投与の後、腫瘍を取り出しがん幹細胞様細胞の比率をゲムシタピン処理群と比較した。CD24+, CD44+, ESA+, 細胞の割合を PI-, H-2 k d- の細胞における比率で幹細胞様細胞を検出した場合および CD133+, CD44+ の細胞で検出した場合の無処置、ゲムシタピン単剤投与、アルクチゲニン単剤およびアルクチゲニンとゲムシタピン併用投与の場合の比較をした。その結果、無処置腫瘍では、前者の検出法では 1.8% であったものがゲムシタピンでは 2.5% に、アルクチゲニン単剤で、1.5% 併用で 0.6% に減少した。後者の検出法では、無処置が、2.3%、ゲムシタピン単剤が、3.5% アルクチゲニン単剤で 1.7%、併用で 0.7% と併用群で特に顕著な現象を観察した。抗腫瘍効果でも、併用では特に顕著な効果があることは昨年度から各種のモデルで繰り返し確認している。

## 症例選択に役立つ画像やバイオマーカーの検討

低酸素のイメージングや、CT を用いたパフォーマンスの画像化など将来の臨床婦用に関して検討を続けている。また、現在までの集積したフォルマリン固定パラフィンブロックの組織標本で十分な遺伝子解析ができるか否かの検討と、技術的諸問題につき次世代シーケンサーを用いて検討し、ほぼ 10 年以内の多くの資料で解析可能であることを確認した。

## D. 考察

Phase I 部分での結果より、栄養飢餓耐性を標的とした GBS-01 は第 I 相試験の結果、レベル 3 (牛蒡子エキスとして 4.0g) の忍容性が確認され、推奨用量は牛蒡子エキスとして 4.0g と判断された。また、第 I 相試験で PR 例も認められており、有効性も確認された。そこで、第 II 相試験では推奨容量 4.0g で投与することを決定した。第 II 相の医師主導治験は症例登録が極めて順調で予定よりも早く症例登録を終えることができた。重篤な有害事象も 1 例では薬剤との関連を否定できなかったが、概ね第 1 相での結果と同じく高い忍容性を確認できた。臨床効果に関しては現在集計中である。

薬力学的解析に関しては、GBS-01 第 I 相臨床試験においては、患者間のアルクチゲニン濃度および、そのグルクロン酸抱合体の血中濃度に比較的高いばらつきが認められたが、第 II 相部分ではばらつきは少なかった。その原因および、どの臓器でグルクロン酸抱合を受けるのか、その場合には 95% 位を占める AGG が効果を示すのは  $\beta$



グルクロニダーゼの活性に依存するのかなどの解決すべきことは残っているが、極めて速やかなグルクロン酸抱合が安全性の根拠の1つであることは明らかにできた。

今回の医師主導治験への歩みを振り返ってみる。臨床試験支援室による支援（佐藤）、生物統計家による支援（野村）、薬事専門家による支援（渡邊）によって、研究費が採択されてから、登録開始まで約9ヶ月という短期間で、GCP 準拠の医師主導治験が効果的に準備・開始することが可能となった。医師主導治験としては極めて順調であり、今の支援体制がとても効率よく働いていることを示している。第II相部分でも約半年で予定以上の症例登録ができたことは研究組織の研究能力を如実に示している。

今後、がん幹細胞様細胞の減少を指標とした拡大第II相試験を追加することにより併用療法開発や、次の段階へのステップアップに必要なPOCを取得することは極めて意義深い。倫理審査委員会の承認後できるだけ速やかに開始をする予定である。

#### E. 結論

Phase Iの結果から、GBS-01はゲムシタビン不応の進行膵癌患者に対して、忍容性は良好で、腫瘍縮小効果も確認された。第II相試験も患者登録は予想以上に順調であった。今後の発展のための、がん幹細胞を減少させると言うPOC取得が次の段階への大きな展望を開く。

#### 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. 特許取得

##### 1) 江角 浩安

[発明の名称]

抗癌剤及び副作用軽減剤

[出願人]

学校法人東京理科大学

クラシエ製薬株式会社

独立行政法人国立がん研究センター

国立大学法人富山大学

[発明者・所属機関]

江角 浩安（東京理科大学）

池田 公史、土原 一哉（国立がん研究セン

ター東病院）

千葉 殖幹、与茂田 敏、川島 孝則、大窪 敏樹（クラシエ製薬株式会社）

手塚 康弘（富山大学）

[出願番号]

特願 2014 - 080895

池田 公史

抗癌幹細胞剤（申請中）

小嶋基寛

特願 2013 - 252528

膵癌血清診断マーカー

特願 2014 - 015878

胆道癌血清マーカー

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## II. 分担研究報告

我が国で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臨床第Ⅱ相試験による膵がん克服  
臨床導入の統括とTRの実施及び統括

研究分担者 江角 浩安 学校法人東京理科大学 教授

フェーズⅠで明らかになったAGのグルクロン酸抱合は、腸管や肝臓に発現するUGT1A1、3、9、やUGT2B7によって起こる事が明らかになった。培養ヒト膵がん細胞や、ヌードマウスのゼノグラフト、アルクチゲニンはがん幹細胞様細胞に対して強い効果を示し、ゲムシタピンでは減少しないこれらの細胞を効率よく減少させること、ゲムシタピンとの併用で血により効率よく減少させることが分かった。がん根治を目指す治療レジメン開発の根拠となる。アルクチゲニンの投与による血中乳酸濃度への影響を明らかにした。

#### A. 研究目的

アルクチゲニンの作用点を明らかにすることおよび薬動学的マーカーの開発、および新しい開発レジメン開発の根拠となるメカニズムの解明を目的とする。

#### B. 研究方法

臨床第Ⅰ/Ⅱ相試験の残余検体、第Ⅱ相試験の検体などを用いたバイオマーカーの開発。培養ヒト膵がん細胞を用いた作用メカニズムの研究と、がん幹細胞様細胞への効果の検討ではゼノグラフトモデルを用い単クローン抗体を用いたFACSによる解析にて幹細胞様細胞への影響を解析する。

#### （倫理面への配慮）

臨床検体を用いた研究は全て倫理審査委員会に申請し承認を得た後に行った。個人情報に関してはプロトコルどおり。実験動物を用いた研究は、国立がん研究センター動物倫理審査委員会の承認の下に研究を行った。

#### C. 研究結果

##### グルクロン酸抱合に関する検討

グルクロン酸抱合を司る酵素は、UDP-グルクロン酸転位酵素 (UGT) である。ヒトでは、19種類のアイソザイムが知られているが、その構造から3群に分類されている。UGT1A、UGT2A、UGT2Bであり、選択的エクソン利用によりさらに多様性が創り出され19種となっている。各アイソザイムは発現している臓器細胞に特異性があることが知られている。今回の我々の研究結果から、アルクチゲニンは極めて速やかにグルクロン酸抱合されることが分かった。アルクチゲニンが消化管で吸収され

た後門脈で肝臓に運ばれると考えれば90%以上がFirst passでグルクロン酸抱合されていることになるし、ヒトによりややばらつきがあるとは言え、50%以上が尿中に回収されることを考えればグルクロン酸抱合された後胆汁中だけでなく血中にも流れ出ると考えられる。また、腸肝循環が存在する可能性もPhaseⅠでのPK解析の結果から示唆される。しかし、血中のAGG濃度がAGの濃度の100倍近くあることを考えれば、大部分のAGGは吸収された消化管か肝臓で作られると考えるのが合理的である。

そこでヒト小腸と肝臓のマイクロゾーム分画を用いて試験管内グルクロン酸抱合活性を調べた。その結果、両マイクロゾームにも強い活性が存在することが分かった。さらにどのアイソザイムが活性を担っているのかを明らかにするために、既にクローニングされバキュロウイルス発現系でカイコ細胞に発現された13種類の組換え体を用い活性を検討した。

その結果、UGT1A1、1A3、1A7、1A9、2B7、2B15、2B17に活性が認められた。1Aのアイソザイムは、タンパク質あたりの活性を計算が可能であるのでこれを検討すると、1A9が他のアイソザイムに比し極めて高い活性を持っていることが分かった。1A9は文献によれば、肝臓、腎、大腸に発現していることが知られている。我々の初歩的組織発現の検討では小腸で発現している可能性もある。1A1は肝臓で発現し、ビリルビンの抱合を担う主要なアイソザイムである。肝臓における存在量は極めて多いと考えられるので、アルクチゲニンが肝臓に到達した場合には大きな働きをされると考えられるが、この酵素は、肝臓以外でも胃や大腸でも

発現することが知られている。2B7は小腸での発現が報告されており或いは消化管での抱合に大きな働きをしているかもしれない。いずれにしても一層の解析が必要である。

以上の結果から、小腸でも、胃でも吸収されればグルクロン酸抱合されることが分かった。勿論門脈から肝臓に到達した場合にはいろいろなアイソザイムにより縫合されることが明らかになった。この事は、遺伝的にアルクチゲニンを極めて抱合しにくい個体が存在する可能性は極めて低いことを示唆するが、なぜPhase Iでは、AGGの血中濃度の大きな差が観察されたのかを説明できない。むしろ、AGGのクリアランスの差が血中濃度の差を生んでいる可能性を考えるべきかもしれない。

### GBS-01 投与と血中乳酸

昨年度の研究でアルクチゲニンがミトコンドリアの複合体Iを阻害することが分かったが、ヒトへの投与でその結果乳酸血中濃度の上昇が、毒性や効果の指標になる可能性をPK試験の残余献体を用いて検討した。尚、この研究は念のためにプロトコルの軽微な変更であるが倫理審査委員会の審査を受けた。Phase Iに登録された15名の患者の血漿を用い、乳酸を測定した。その結果、血漿乳酸濃度はGBS-01の投与量に応じて高くなった。全体の約半数の患者で上昇が見られたが、残り半数および健常ボランティアでは上昇は見られなかった。一例では最高値7mMと明らかな上昇が見られたが、一時的で数時間で正常値に復していた。軽微な上昇を来した患者でも同様で上昇は一時的であった。最高値の7mMは、健常人がやや激しい運動を行った時の乳酸上昇に相当する。臨床的に乳酸アシドーシスの症状を呈した患者は認められなかった臨床の報告と一致する。

乳酸値の上昇が血中のアルクチゲニン或いはAGGの上昇と一致するのかが調べた。その結果、Cmaxでも、AUCでも、AGとの相関は見られなかった。AGGとの相関も見られなかった。これらのことは、AGが活性体であるが、どこでグルクロン酸抱合されているのかと言う問題と、乳酸の上昇はどの臓器或いは細胞で起こっているのかの問題に直接つながる重要な情報である。また、AGGとして血中では大部分が存在するが、腫瘍でどの様な決定因子で効果が決まるのかという点に関しても重要な示唆を与える。AGGを再活性化するβグルクロニダーゼは炎症や腫瘍で強く発現されるという報告がある。

アルクチゲニンのがん幹細胞様細胞に対する効果

がん幹細胞に対するアルクチゲニンの効果を検討した。がん幹細胞は幹細胞ニッチと呼ばれる特別な部位に存在すると考えられている。このニッチの特徴の1つが、低酸素環境と低栄養環境である。アルクチゲニンは元々、がん細胞が低酸素・低栄養で生存する場合の適応反応を阻害する効果を指標に照してスクリーニングされたものであるため、がん幹細胞様細胞に対しては特に生体内では強い効果を示すのではないかと考えてきた。そこでヒト膵がん細胞株PANC1細胞を低グルコース条件にし、CD24, CD44, ESA陽性細胞への影響をゲムシタビンと比較した。低グルコース条件でグルコース存在条件より約1.5倍に増加するが、ゲムシタビンでは減少しなかった。しかしアルクチゲニンではこの割合が約5分の1へと減少した。スフェロイド形成をMIAPPaCa2細胞で検討すると、アルクチゲニンは顕著に抑制をし6μMでほぼ完全に抑制した。また、Oct3/4, Nanog, SOX2の発現を検討すると、1-2μMでほぼ完全に抑制した。これらの結果より生体内でもがん幹細胞様細胞を抑制する可能性が高いと考え、ヌードマウスにMiaPaCa2細胞を移植した後5週間アルクチゲニン投与の後、腫瘍を取り出しがん幹細胞様細胞の比率をゲムシタビン処理群と比較した。CD24+, CD44+, ESA+, 細胞の割合をPI-, H-2kd-の細胞における比率で幹細胞様細胞を検出した場合およびCD133+, CD44+の細胞で検出した場合の無処置、ゲムシタビン単剤投与、アルクチゲニン単剤およびアルクチゲニンとゲムシタビン併用投与の場合の比較をした。その結果、無処置腫瘍では、前者の検出法では1.8%であったものがゲムシタビンでは2.5%に、アルクチゲニン単剤で、1.5%併用で0.6%に減少した。後者の検出法では、無処置が、2.3%、ゲムシタビン単剤が、3.5%アルクチゲニン単剤で1.7%、併用で0.7%と併用群で特に顕著な現象を観察した。抗腫瘍効果でも、併用では特に顕著な効果があることは昨年度から各種のモデルで繰り返し確認している。

### D. 考察

アルクチゲニンの体内代謝を規定する、グルクロン酸抱合に関し生体内での大きな規定因子を同定した。この結果は、アルクチゲニンの安全性と、効果規定因子の解明に大きな一歩となる。

がん幹細胞様細胞に対する培養条件および動物個体での効果が確認できたことは、今後のアルクチゲニン臨床開発の大きな曲がり角となる。奇しくもミトコンドリア複合体Iの阻害効果をもつ、2型糖尿病の治療薬メトフォルミンが世界的に大変に注目されている。がん発生に対する抑制効果、がん治療効果、特にがん幹細胞様細胞に対する抑

制効果である。これらの効果はアルクチゲニンと全く同じである。アルクチゲニンは生薬であるが故の安全性がある。その生化学的根拠は今回明らかにしたグルクロン酸抱合であるが、これらがあることによりよい安全な薬剤として今後の開発が大いに期待される。

#### **E. 結論**

アルクチゲニンの臨床的有効性、安全性の根拠を明らかにした。今後の臨床開発への大きな一歩となった。

#### **F. 健康危険情報**

(総括研究報告書に記載)

#### **G. 研究発表**

##### 1. 論文発表

(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**

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

特願 2014 - 080895 抗癌剤および副作用軽減剤

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

分担研究報告書

我が国で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臨床第Ⅱ相試験による膵がん克服  
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 国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター 臨床試験支援室  
試験統計デザイン・データ解析

研究分担者 野村尚吾 国立がん研究センター 生物統計部門  
薬事業務

研究分担者 渡邊協孝 国立がん研究センター東病院 治験事務局

研究要旨

「ゲムシタピンとフッ化ピリミジン系抗癌剤不応膵癌患者を対象とした GBS-01 の前期第Ⅱ相試」に関して、国立がん研究センター臨床試験支援室によるデータセンター/モニタリング/治験調整事務局の支援（佐藤）、生物統計家による試験デザイン・症例数設計（野村）、薬事専門家による薬事戦略立案、薬事戦略相談の支援（渡邊）を行い、当該試験を開始し当初の予定登録を達成した。モニタリング・治験調整事務局業務・データマネジメント・CRC 業務・監査・総括報告書の作成なども問題なく実施されている。

A. 研究目的

「ゲムシタピンとフッ化ピリミジン系抗癌剤不応膵癌患者を対象とした GBS-01 の前期第Ⅱ相試」に関して、臨床試験の計画、試験統計デザイン、開発薬事戦略の立案及び薬事戦略相談の実施、および臨床試験の実施支援を行う。

B. 研究方法

分担研究者 佐藤暁洋が室長を務める、国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター臨床試験支援室がデータセンター/モニタリング/統計解析などの支援を担当し、分担研究者 野村尚吾が生物統計家として、試験の統計デザイン及びデータ解析を担当する。分担研究者の渡邊協孝が、薬事担当者として薬事戦略立案の支援及び薬事戦略相談の支援を行う。

（倫理面への配慮）

当該臨床試験は、ヘルシンキ宣言、医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令、薬事法および薬事法施行規則とその関連通知などを準拠して実施される。

C. 研究結果

平成 25 年度に、薬事相談・プロトコール・各種 SOP の作成、治験届け、EDC の構築等を実施し、平成 25 年 3 月 11 日より患者登録を開始した。同日に 1 例目を登録し 11 月 5 日までに 39 名の患者登録を行い、予定登録数に達したために登録を終了した。登録ペースは予定登録数を上回り順調な登録が行われた。

平成 25 年度は、施設訪問モニタリングを 36 回実施し、進捗・背景因子の集計・安全性情報などを記載した定期報告レポートを 7 回発行した。

また、データマネジメントに関連して EDC システムのコンピューターシステムバリデーションを実施した。

重篤な有害事象に関する当局報告を 2 報、研究報告を 1 報、治験変更届けを 1 回それぞれ PMDA に報告している。中間解析を 1 回実施した。

監査についても、治験調整事務局に対する監査を 1 回、参加施設に対する監査を 2 回、外注先の CRO が実施、概ね問題がないとの監査結果を得ている。

総括報告書作成に向けて、外注先の CRO と打合せを開始したが、プロトコール改訂をした後に登録を追加することとなったため、一度作業を中止し、プロトコール改訂作業を実施している。

PK 解析に関しても、PK 解析に必要な EDC の改修及びシステムバリデーションを実施した。（添付資料 1）

参加施設側としての支援として、国立がん研究センター東病院として 13 名を登録し、CRC 業務を実施している。

D. 考察

臨床試験支援室による支援（佐藤）、生物統計家による支援（野村）、薬事専門家による支援（渡邊）によって、登録開始から 8 ヶ月で予定登録数の登録を達成した。また、モニタリング・データマネジメント・CRC 業務を臨床試験支援室が実施

し、監査・総括報告書の作成については外注先が担当しているが、いずれの業務も大きな問題なく順調に業務が遂行されている。

#### E. 結論

臨床試験の支援部門（佐藤）および生物統計家（野村）、薬事専門家（渡邊）の支援によって、アカデミア発の医師主導治験を円滑かつ効率的に準備し、平成 25 年度は登録を開始し当初予定された登録を終了した。医師主導治験としての管理・運営に関しても臨床試験の方法論および関連法規に則った倫理的・科学的に実施されている。

今後、プロトコール改訂を行い、症例を追加する予定であるが、来年度も引き続き支援を実施する。

#### F. 健康危険情報

（総括研究報告書に記載）

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

我が国で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臨床第Ⅱ相試験による膵がん克服

臨床試験の実施

研究分担者 池田 公史 国立がん研究センター東病院 肝胆膵内科

研究分担者 上野 秀樹 国立がん研究センター中央病院 肝胆膵内科

研究分担者 石井 浩 公益財団法人がん研究会有明病院 消化器内科

研究要旨

ゲムシタビン不応の進行膵癌患者を対象として、アルクチゲニンを多く含む牛蒡子エキス製剤 GBS-01 の第Ⅰ相試験を行い、GBS-01 4.0g が推奨用量となった。また、GBS-01 の忍容性は良好で1名に部分奏効も認め、有効性が期待できる結果であった。したがって、ゲムシタビンとフッ化ピリミジン系抗癌剤不応膵癌患者を対象として、GBS-01 の有効性と安全性を検討するために GBS-01 の多施設共同の前期第Ⅱ相試験を医師主導治験として行った。2013/03/11 から登録を開始し、2013/11/05 までに 39 例の登録を終了した。本試験の結果を勘案して、今後の開発方針を検討する予定である。

A. 研究目的

ゲムシタビンとフッ化ピリミジン系抗癌剤不応膵癌患者に対する GBS-01 の有効性と安全性を探索的に評価する。

Primary endpoint : 8 週の病勢制御割合

Secondary endpoints : 有害事象、奏効割合、無増悪生存期間、全生存期間、薬物動態学的パラメータ

B. 研究方法

病理組織学的に診断された進行膵癌で、ゲムシタビンとフッ化ピリミジン系抗癌剤を含む全身化学療法が行われ、両剤に不応と判断された患者を対象とした。GBS-01 は1日1回朝食後（食後2時間）に1回2包（牛蒡子エキスとして4.0g）を連日経口投与した。有害事象は CTC AE ver 4.0、抗腫瘍効果は RECIST1.1 にて判定した。本試験は、医師主導治験として行った。

（倫理面への配慮）

本試験に関係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に従って本試験を実施する。個人情報および診療情報等のプライバシーに関する情報は個人の人格尊重の理念の下、厳重に保護され慎重に取り扱われるべきものと認識し、万全な管理対策を講じ、プライバシー保護に努める。

C. 研究結果

国立がん研究センター東病院、中央病院、がん研有明病院の3施設で行った。

2013/01/17 初回治験届を提出し、2013/03/11 から登録を開始した。2013/11/05 までに 39 例の登録を終了した。患者背景(全 39 例)は、年齢(中央値)は 64 (範囲: 38-81) 歳、男性 27 例、PS は 0 が 28 例、1 が 11 例であった。全例で腺癌が確認され、臨床病期は局所進行が 3 例、遠隔転移が 36 例であった。遠隔転移臓器は肝 29 例、腹腔リンパ節 10 例、腹膜 7 例、肺 8 例であった。前切除歴は 24 例に認め、前化学療法歴は、Gemcitabine 29 例、S-1 34 例、Gemcitabine+S-1 5 例、FOLFIRINOX 2 例であった。

これまでに発生した重篤な有害事象は 5 件で、そのうち、治療との因果関係がある有害事象は脳梗塞の 1 例のみであった。

D. 考察

アルクチゲニンを多く含む牛蒡子エキス製剤である GBS-01 は低酸素、低栄養条件下で抗腫瘍活性を呈する薬剤として、開発された。最近の研究で、アルクチゲニンは Mitochondrial complex I を阻害することが判明した。また、がん幹細胞様細胞に対する効果も確認され、アルクチゲニンによる抗腫瘍活性の機序も徐々に明らかにされており、本臨床試験でも良好な結果が期待できるものと考えている。

E. 結論



ゲムシタビンとフッ化ピリミジン系抗癌剤不応膵癌患者を対象として、GBS-01の有効性と安全性を検討するために GBS-01 の多施設共同の前期第 II 相試験を医師主導試験として行った。本試験の結果を勘案して、今後の開発方針を検討する予定である。

#### F. 健康危険情報

GBS-01 の重篤な有害事象として、脳梗塞の報告があった。(既に医薬品医療機器総合機構にも報告済み。)

(総括研究報告書に記載)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(研究の刊行に関する一覧表に記載)

##### 2. 学会発表

1. Ikeda M, Sato A, Mochizuki N, Toyosaki K, Miyoshi C, Fujioka R, Mitsunaga S, Shimizu S, Ohno I, Takahashi H, Okuyama H, Hasegawa H, Nomura S, Ohkubo T, Yomoda S, Kishino S, Esumi H. A Phase I trial of GBS-01 for advanced pancreatic cancer refractory to gemcitabine. ASCO Annual Meeting 2013. May31-June04,2013. Chicago, IL, U.S.A. (Abstract 2559)
2. 池田公史、佐藤暁洋、望月伸夫、豊崎佳代、三好千夏、光永修一、清水怜、長谷川裕美、野村尚吾、大窪敏樹、与茂田敏、岸野吏志、江角浩安。ゲムシタビン不

応/不耐の膵癌患者に対する GBS-01 の第 I 相臨床試験 第 72 回日本癌学会学術総会 2013/10/05 横浜市 第 72 回日本癌学会学術総会 Program 誌 pp34,2013.

3. 池田公史、佐藤暁洋、望月伸夫、豊崎佳代、三好千香、光永修一、清水怜、長谷川裕美、野村尚吾、大窪敏樹、与茂田敏、岸野吏志、江角浩安。ゲムシタビンに不応の膵癌患者に対する GBS-01 の第 I 相臨床試験 第 51 回日本癌治療学会学術集会 2013/10/24 京都市 日本癌治療学会誌 48 (1) : pp983,2013.
4. Ikeda M, Sato A, Mochizuki N, Toyosaki K, Miyoshi C, Fujioka R, Mitsunaga S, Shimizu S, Ohno I, Takahashi H, Okuyama H, Hasegawa H, Nomura S, Ohkubo T, Yomoda S, Kishino S, Esumi H. A Phase I trial of GBS-01 for Advanced Pancreatic Cancer Refractory to Gemcitabine. The 18<sup>th</sup> JFCR-ISCC (第 18 回がん研究会—国際がん化学療法シンポジウム) 2013/12/4 東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

アルクチゲニンの製法特許を取得。抗癌幹細胞剤としての特許も申請。

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

我が国で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臨床第Ⅱ相試験による膵がん克服

TR の実施

研究分担者 三牧幸代

国立がん研究センター東病院臨床開発センタートランスレーショナルリサーチ分野

### 研究要旨

アルクチゲニン臨床試験において収集される治療前後の膵がん生検材料を用いた超並列シーケンスによる網羅的遺伝子変異解析の高成功率、高効率な技術の開発を行った。ホルマリン固定を行った手術、生検組織検体から抽出したゲノム DNA を用い、シーケンス施行前のサンプル調整工程において、至適な DNA 増幅条件の探索を行い、DNA の品質との関連を検討した。多様な質のホルマリン固定検体において、DNA の品質を指標とした、高成功率、高効率の全エクソンシーケンス法を確立できた。

### A. 研究目的

アルクチゲニン臨床試験において収集される治療前後の膵がん生検材料を用いた網羅的遺伝子変異解析を高成功率、高効率に行う技術の開発

### B. 研究方法

手術、生検ホルマリン固定組織からゲノム DNA を抽出し、総 DNA 量、二本鎖 DNA 量、定量 PCR による DNA の品質評価を行った。アジレント社 SureSelect Human All Exon キットによるエクソン領域の濃縮工程において、DNA の高成功、高効率増幅条件の探索を行い、上記の DNA 品質指標との関連を検討した。そののちに、イルミナ社 HiSeq2000 システムによる超並列シーケンスを行い、平均カバレッジを算出し、シーケンスの質の評価を行った。

#### （倫理面への配慮）

ゲノム DNA のシーケンス解析はヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に則り、国立がん研究センター倫理審査委員会の承認を得て行った。（2011-137）

### C. 研究結果

結腸直腸癌の手術切除、生検ホルマリン固定標本 173 検体から 10  $\mu$ m 厚薄切切片 10-20 枚の組織を剔出し DNA を抽出したところ、平均 44.4  $\mu$ g の総 DNA、5.2  $\mu$ g の二本鎖 DNA が回収された。二本鎖 DNA 含有率は平均 11.0 $\pm$ 4.4%であり、末梢血単核球及び細胞株由来 DNA の二本鎖 DNA 含有率（平均 96.4 $\pm$ 3.3%；n=28）と比して明らかな DNA 品質の低下が認められた。エクソン領域濃縮工程の PCR 成功率はこの二本鎖 DNA 含有率に依存し、完全長 DNA で推奨されている 3  $\mu$ g の二本

鎖 DNA よりも減じた 1  $\mu$ g での調整開始が高成功率であることがわかった。二本鎖 DNA 含有率 10% 未満の検体においてはさらに減じた 500ng での開始が適していることがわかった。また、定量 PCR による増幅効率の評価では、完全長 DNA との Cp 値の差は平均-1.9 $\pm$ 1.3 であり、増幅効率の低下と、検体間でのばらつきが認められた。そのため、一律の PCR サイクル数の設定は難しく、初回 PCR 増幅産物の定量評価後、必要に応じた追加 PCR の施行が高効率であることがわかった。この手法により 173 検体中 152 検体（88%）において平均カバレッジ 50 以上の高質の全エクソンシーケンスデータが得られた。

### D. 考察

生検で得られるような微量のホルマリン固定組織を用いた全エクソン解析においては、特に高成功率の解析が要求される。今回の検討で、多様な質のホルマリン固定組織においても、高成功率、高効率のエクソンシーケンスが可能であることが明らかとなった。

### E. 結論

アルクチゲニン臨床試験における膵がん生検組織材料による網羅的体細胞変異解析の高成功率、高効率技術基盤が確立した。

### F. 健康危険情報

（総括研究報告書に記載）

### G. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

日本癌学会学術総会（2013）

J-2073 ホルマリン固定標本由来 DNA を用いた全エクソン解析

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特記なし

我が国で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臨床第Ⅱ相試験による膵がん克服  
画像診断による POC 取得と患者層別化

研究分担者 藤井 博史 国立がん研究センター東病院・機能診断開発分野・分野長

研究要旨

アルクチゲニンに対する感受性の予測やアルクチゲニンの作用機序の検証のために有用と考えられる分子プローブの開発を行った。

アルクチゲニンに対する感受性の予測のために、がん低酸素環境の存在を *in vivo* で可視化できる分子プローブの開発を、<sup>99m</sup>Tc 標識 SPECT プローブを中心に進めた。その結果、前年までに開発したもののよりも、優れた血中安定性を示し、高い血液腫瘍比を示す新規 <sup>99m</sup>Tc 標識 SPECT プローブ(SD-128)を得た。担癌マウスを用いた *in vivo* SPECT イメージングにより、SD-128 の不均一な腫瘍内集積を確認することができた。さらに、オートラジオグラフィおよびピモニダゾール染色により、SD-128 が腫瘍内低酸素領域に親和性を示していることが示された。

アルクチゲニンの作用機序の解明のために、アルクチゲニン分子の一部を修飾した分子の合成を行った。アルクチゲニンの抗腫瘍効果に関連すると考えられる水酸基の付近の構造を修飾した化合物を複数合成した。今後、これらの化合物を用いたアルクチゲニンの作用機序の解明が期待される。

A. 研究目的

アルクチゲニン治療に対する感受性を評価するために、前年度に引き続き、腫瘍内低酸素領域を *in vivo* で可視化するための分子プローブの開発、特に、汎用性の高い SPECT 核種 <sup>99m</sup>Tc で標識した分子プローブの開発を進め、*in vivo* イメージングを試みた。また、アルクチゲニンの抗腫瘍効果の機序 (POC) を解明するために、アルクチゲニン分子の一部を修飾した分子の合成を行った。

B. 研究方法

1. <sup>99m</sup>Tc 標識低酸素イメージング SPECT プローブの開発

これまで開発してきた SPECT 用 <sup>99m</sup>Tc 標識低酸素イメージングプローブの改良を進め、腫瘍内低酸素環境の *in vivo* イメージングに適した体内動態を示す新規分子プローブの開発に取り組んだ。プローブの分子設計は、これまで通り、低酸素環境で亢進している還元代謝活性により分解され、脱離基が脂溶性を失い細胞内に停滞するようにした。そして、細胞内に停滞する脱離基部分を <sup>99m</sup>Tc で標識した。

この分子設計に基づいて複数の分子プローブを作成し、低酸素環境下の腫瘍細胞に対して良好な集積性を示し、さらに *in vivo* イメージングに適した体内動態を示す化合物を選択した。

それらを担がんマウスに投与し、*in vivo* イメージングを行い、腫瘍集積性を評価した。また、集積

が認められた分子プローブについては、オートラジオグラフィおよびピモニダゾール染色により、分子プローブが腫瘍内低酸素領域に親和性を示していることを確認した。

2. アルクチゲニンの抗腫瘍効果の機序解明のための修飾化合物の合成

アルクチゲニンの抗癌剤としての作用機序を解明するために、アルクチゲニンの抗腫瘍効果に関与している可能性がある OH 基 (図 1) およびその周囲構造を修飾した化合物を複数合成した。

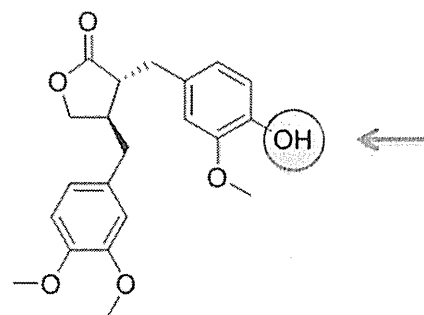


図 1 アルクチゲニンの分子構造

(倫理面への配慮)

動物を対象とした実験的研究は、国立がん研究センター動物実験倫理委員会の承認を受けて実施した。