

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Ⅱ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 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ナル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、ゲムシタピ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、ゲムシタピ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其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、C_{min}、C_{max} 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 II 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。

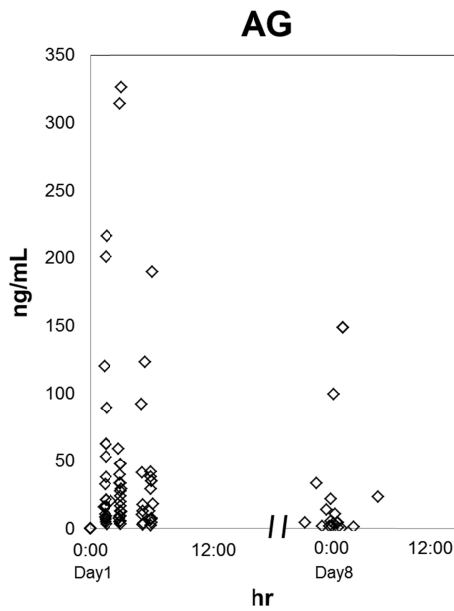


図1 第 相試験における血漿中 AG 濃度

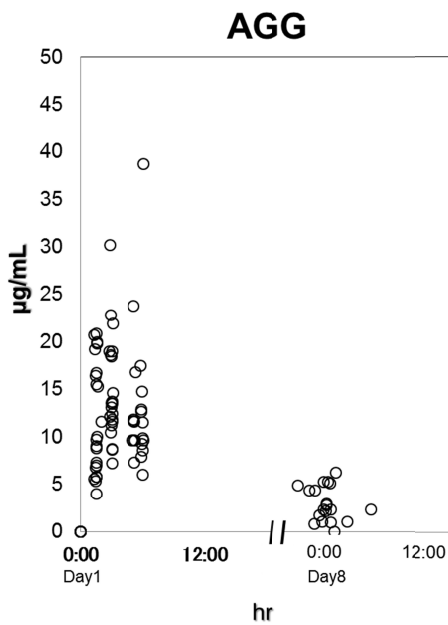


図2 第 相試験における血漿中 AGG 濃度

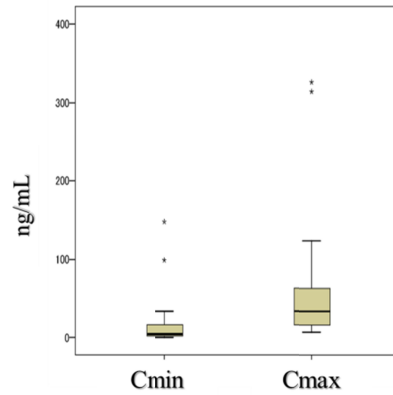


図3 第 相試験における血漿中 AG 濃度(Cmin, Cmax)

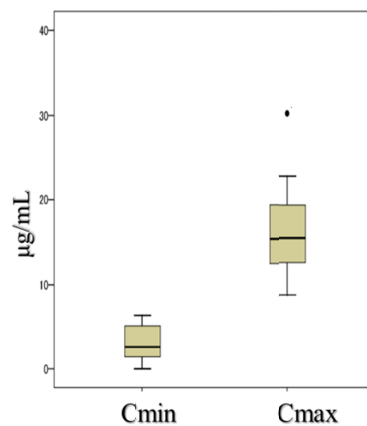


図4 第 相試験における血漿中 AGG 濃度(Cmin, Cmax)

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

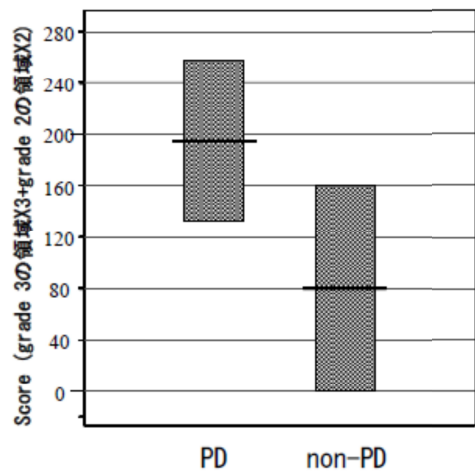
果、Cmax でも、AUC でも、AG との相関は見られなかった。AGG との相関も見られなかった。これらのことは、AG が活性体であるが、どこでグルクロン酸抱合されているのかという問題と、乳酸の上昇はどの臓器或いは細胞で起こっているのかの問題に直接つながる重要な情報である。また、AGG として血中では大部分が存在するが、腫瘍でどのような決定因子で効果が決まるのかという点に関しても重要な示唆を与える。AGG を再活性化するグルクロニダーゼは炎症や腫瘍で強く発現されるという報告がある。そこで以下の検討を行った。

Phase I 部分の組織検体を用いた グルクロニダーゼの検討

臨床の有効性は 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 に有意な差を認めしたが、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、 β -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 MIAPaCa2 細胞で検討すると、アルクチゲニンは顕著な抑制をし 6 μ M 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、1-2 μ M 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 4.0 g 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顕著な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 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はゲムシタピ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

