

図4 研究方法

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(INTEND D-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(図4)。

※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。

C. 研究結果

【リード化合物誘導体の合成展開】

昨年度は、V-103 シリーズの LCB-451, LCB-337 シリーズの LCB-540, V-119 シリーズの V-119-8 が有望であることを報告した。今年度は、この 3 種類の骨格から医薬候補化合物の絞り込みを行い、以降の合成展開方針を決定することを目標として、韓国の LegoChem Biosciences (LCB) 社が、各化合物の誘導体の合成（有望化合物の大量合成を含む）を行い、平成 24 年 4 月 1 日から平成 25 年 3 月 31 日までの 12 ヶ月間に、107 種類の化合物を合成した。合成は、医薬候補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学的・薬物動態学的評価】

今年度上期は、上記の 3 種類の化合物の誘導体を合成し、in vitro、in vivo の生物学的評価および作用機序の検討を行い、最終的に V-103 シリーズの LCB-604 と V-119 シリーズの V-119-24 を有望化合物として選び出し、詳細な検討を行った。

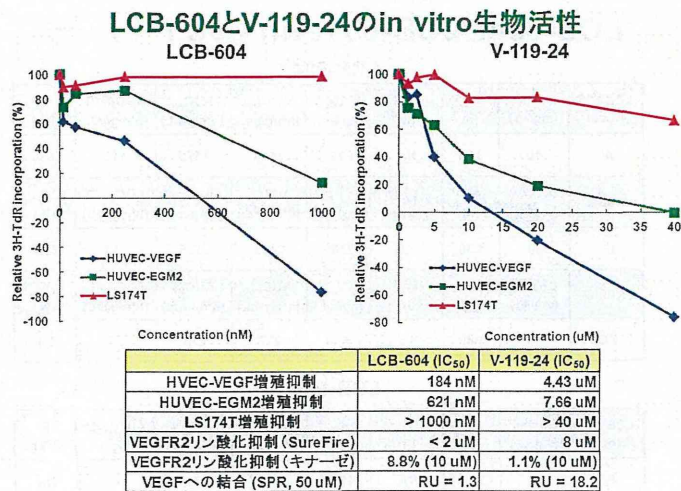


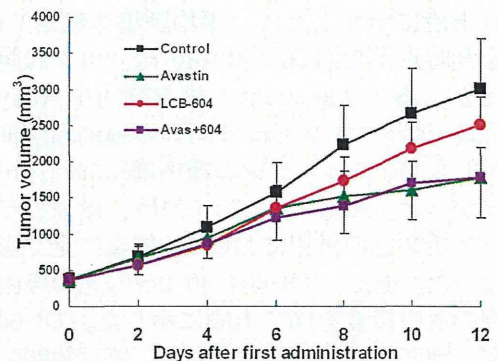
図5 LCB-603 と V-119-24 の in vitro 生物活性

図5に示すように、V-119-24は、直接的にVEGFR2チロシンキナーゼを抑制することなく、VEGF₁₆₅により誘発されるHUVEC（ヒト臍帯静脈内皮細胞）上のVEGFR2の1175番目のチロシンのリン酸化を抑制すること、および、その結果としてVEGF刺激HUVECの増殖を抑制すること（IC₅₀値 = 4.43 uM）が判明した。さらに、SPR法によりVEGF蛋白質に結合することも判明した。これらの結果は、V-119-24は、提案者の想定する作用機序により、VEGFシグナルを抑制している可能性が高いことを示唆する。

一方、LCB-604は、VEGF刺激HUVECの増殖を抑制し、そのIC₅₀値は、0.182 uMとV-119-24のそれに比べて20倍以上良好であった。また、LCB-604は、キナーゼ阻害作用を介さずにVEGF₁₆₅によるVEGFR2のチロシンのリン酸化を抑制することが判明しことから、生物活性の面では、V-119-24より優れていることが示唆された。しかし、SPR法および共結晶法により、LCB-604がVEGF蛋白質に結合するという証拠を得ることができなかった。

有望と考えられるV-119-24およびLCB-604の特徴について上述したが、それぞれに一長一短があることから、これらの知見のみからは、開発候補をどちらか一方に絞り込むことは困難であった。そこで、候補化合物の絞り込みを行うために、両化合物のin vivo腫瘍増殖抑制作用の検討およびin vivo PK (pharmacokinetic)試験を実施した。

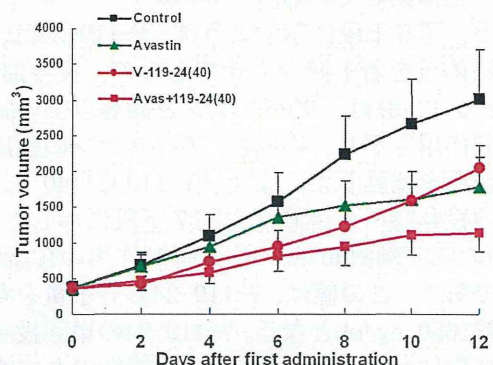
LCB-604の腫瘍増殖抑制作用 (Avastinとの併用)



LS174T細胞をヌードマウスに皮下移植した。1週間後に各マウスの腫瘍体積を測定し、次の4つのグループに分け(各群5匹、平均腫瘍体積、370mm³)、その日をday 0とした。以下に示す投与スケジュールに従って化合物の投与を行った。

1. Control (vehicle, days 0 - 8 i.p.)
2. Avastin 5 mg/kg day 0, 3, 7 i.p.
3. LCB-604 40 mg/kg days 0 - 8 i.p.
4. Avastin + LCB-604

V-119-24の腫瘍増殖抑制作用 (Avastinとの併用)



LS174T細胞をヌードマウスに皮下移植した。1週間後に各マウスの腫瘍体積を測定し、次の4つのグループに分け(各群5匹、平均腫瘍体積、370mm³)、その日をday 0とした。以下に示す投与スケジュールに従って化合物の投与を行った。

1. Control (vehicle, days 0 - 8 i.p.)
2. Avastin 5 mg/kg day 0, 3, 7 i.p.
3. V-119-24 40 mg/kg days 0 - 8 i.p.
4. Avastin + V-119-24

図6 LCB-604 と V-119-24 の腫瘍増殖抑制作用

LCB-604とV-119-24の血中濃度

LCB-604 40 mg/kg IP

Time (h)	Conc. (ng/mL)			Mean	SD
	Group 1	Group 2	Group 3	(ng/mL)	(ng/mL)
0.5	2740	2720	2730	2730	10
1	358	228	647	411	214
2	284	72.1	98.5	152	115
4	48.8	58.3	57.2	54.8	5.2
8	7.68	8.59	10.1	8.8	1.2
24	1.51	1.53	1.36	1.47	0.09

V-119-24 40 mg/kg IP

Time (h)	Conc. (ng/mL)			Mean	SD
	Mouse1	Mouse2	Mouse3	(ng/mL)	(ng/mL)
0.5	266	256	355	292	55
1	136	221	229	195	52
2	133	188	127	149	34
4	38.3	34.5	23.9	32.2	7.5
8	27.0	27.2	47.7	34.0	11.9
24	15.4	21.2	9.77	15.5	5.7

図7 LCB-604およびV-119-24のin vivo PKデータ

図6上段に示すように、平均腫瘍体積が370 mm³に達した時点から、LCB-604 (40 mg/kg)を腹腔内投与したところ、LCB-604は、投与期間中 (days 0 - 8)は、アバスチンとほぼ同等の腫瘍増殖抑制作用を示したが、アバスチンの腫瘍増殖抑制作用を増強しなかった。そして、LCB-604は、単独投与およびアバスチンとの併用において、体重に全く影響を与えなかった。また、LCB-604 40 mg/kgを腹腔内投与した際の血中濃度を図7上段に示した。LCB-604のVEGF刺激HUVCECの増殖抑制作用のIC₅₀値は約200 nMであったが、この数値は、分子量を考慮すると約76 ng/mLとなる。LCB-604の蛋白結合率は測定していないが、単回投与における経時的な血中濃度、および、LCB-604は9日間連続投与していることを考え併せると、LCB-604の腫瘍増殖抑制作用をLCB-604の未変化体の血中濃度に基づいて説明することが可能であろうと推察している。

一方、図6下段に示すように、V-119-24は、投与初期に体重を若干減少させてものの、投与期間中 (days 0 - 8)は、アバスチンと同等以上の腫瘍増殖抑制作用を示し、しかも、アバスチンの腫瘍増殖抑制作用を増強した。また、V-119-24 40 mg/kgの腹腔内投与時の血中濃度を図7下段に示した。V-119-24のVEGF刺激HUVCECの増殖抑制作用のIC₅₀値が4.4 uMであり、この値は、V-119-24の分子量を考慮すると約1650 ng/mLとなる。V-119-24の単回投与によるPK試験においては、投与0.5時間後の血中濃度でさえ、4.4 uMの1/5程度であり、4時間後においては、1/50程度の血中濃度になってしまうことが判明した。この結果は、V-119-24を9日間連続投与していることを考慮に入れても、V-119-24の腫瘍増殖抑制作用をV-119-24の未変化体の血中濃度に基づいて説明することは非常に困難であることを示している。さらに、アバスチンとの併用において、アバ

スチンの腫瘍増殖抑制作用を増強したことを考慮すると、V-119-24のin vivoにおける活性本体は、未変化体と異なる可能性が高いと推察された。

次年度半ばに臨床候補化合物を選定するという目標を達成するためには、2種類の骨格の異なる化合物の誘導体の合成、評価を同時並行的に進める方法では時間的に無理である。上述のようにV-119-24のin vivoの活性本体は元の化合物と異なる可能性が高く、しかも、経口投与時のBA (bioavailability; 生物学的利用能)が非常に低い (0.6%)ことを総合的に判断して、LCB-604の誘導体を合成し、その中から、臨床開発候補物質を選抜することを決断した。

LCB-604の改善すべき主な点は、①経口投与時のBAを改善すること、および②VEGF刺激HUVCEC増殖抑制活性を増強することである。

LCB社は代表的なV-103シリーズ化合物 (20 mg/kg)を経口投与し、血中濃度を経時的に測定するin vivo PK試験を実施し、経口投与後の体内動態の構造活性相関に関する知見を蓄積していた。そしてこの知見に基づき、LCB-604の体内動態を改善する方法として、benzimidazole環をbenzothiazole環に変換する方向が示唆されたことから、この方向に従って、LCB-451およびLCB-604のbenzothiazole型誘導体であるLCB-630およびLCB-631を合成した。

LCB-604とLCB-631のin vivo PKデータ

LCB-604

LCB-604 Route	Dosing (mg/kg)	t _{1/2} (h)	t _{max} (h)	C ₀ (ng/mL)	AUC _{last} (h*ng/mL)	AUC _{inf} (h*ng/mL)	AUC _{last} /D (h*mg/mL)	F (%)
IV	10	3.28	NA	9054	1146	1173	115	NA
Route	Dosing (mg/kg)	t _{1/2} (h)	t _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} (h*ng/mL)	AUC _{inf} (h*ng/mL)	AUC _{last} /D (h*mg/mL)	F (%)
IP	40	4.30	0.5	2730	2165	2175	54.1	46.4
Route	Dosing (mg/kg)	t _{1/2} (h)	t _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} (h*ng/mL)	AUC _{inf} (h*ng/mL)	AUC _{last} /D (h*mg/mL)	F (%)
PO	40	1.80	0.5	92.0	227	239	5.7	5.1

LCB-631

LCB-631 Route	Dosing (mg/kg)	t _{1/2} (h)	t _{max} (h)	C ₀ (ng/mL)	AUC _{last} (h*ng/mL)	AUC _{inf} (h*ng/mL)	AUC _{last} /D (h*mg/mL)	F (%)
IV	5	3.46	NA	4195	848	879	170	NA
Route	Dosing (mg/kg)	t _{1/2} (h)	t _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} (h*ng/mL)	AUC _{inf} (h*ng/mL)	AUC _{last} /D (h*mg/mL)	F (%)
IP	20	6.41	0.5	1250	1298	1318	64.9	37.5
Route	Dosing (mg/kg)	t _{1/2} (h)	t _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} (h*ng/mL)	AUC _{inf} (h*ng/mL)	AUC _{last} /D (h*mg/mL)	F (%)
PO	20	6.32	0.5	61.7	327	352	16.4	10.0

図8 LCB-631のin vivo PKデータ

図8に、LCB-604とLCB-631のin vivo PKデータを示す。

図8に示すように、LCB-631の経口投与時のBA (F)およびAUC_{last}/D値は、LCB-604のそれぞれ約2倍および約3倍となったことから、予想通りに体内

動態が改善されたと考えられる。

次いで、LCB-604とLCB-631とについて、VEGF刺激HUVEC、EGM2刺激HUVEC、ヒト大腸がん細胞株LS174T細胞、およびヒト皮膚由来繊維芽細胞の増殖に対する作用を比較した。

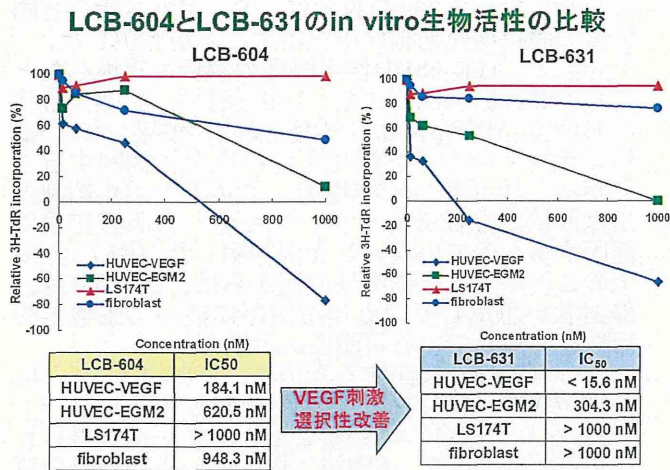


図9 LCB-603とLCB-631のin vitro生物活性

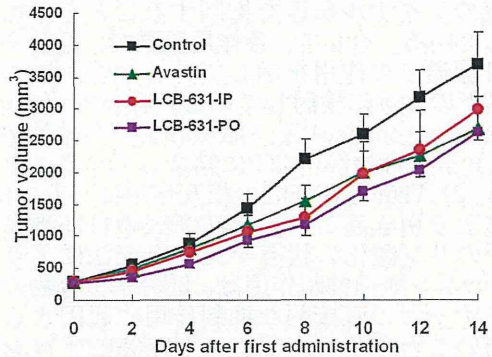
図9に示すように、VEGF刺激HUVECの増殖に対するLCB-631のIC₅₀値は、LCB-604のそれの10倍以上良好な値であった。その後、LCB-631のIC₅₀値を確定するため、4回検討を行い、IC₅₀値は、約34 nMであると結論付けたことから、LCB-604のそれに比べ約5倍改善されたことになる。一方、LS174T腫瘍細胞や繊維芽細胞に対するLCB-631のIC₅₀値は、LCB-604のそれと同程度であることから、LCB-631は、VEGF刺激HUVECに対して選択性が向上したと考えられた。

LCB-631のVEGF刺激HUVECの増殖に対するIC₅₀値が改善され、LCB-631のIC₅₀値の34 nMは、LCB-631の分子量を考慮すると13.5 ng/mLとなる。LCB-631の蛋白結合率は測定していないが、LCB-631の単回投与における血中濃度の経時的変化、LCB-631は9日間連続投与する予定であること、および、LCB-604の血中濃度と腫瘍増殖抑制作用の関係を考慮に入れると、少なくとも、LCB-631 20 mg/kgの腹腔内投与においては、明らかな腫瘍増殖抑制作用が観察される可能性が高いと推察された。さらに、LCB-631 40 mg/kgを経口投与すれば、腫瘍増殖抑制作用が観察される可能性があることも推察された。そこで、LS174Tをヌードマウスに皮下移植したxenograftモデルを用いて、平均腫瘍体積が276 mm³に達した時点から、LCB-631の投与を開始した。

図10に示すように、LCB-631 20 mg/kgを腹腔内投与した場合には、アバスタチンと同程度の腫瘍増殖抑制作用が観察された。そして、興味深いことに、LCB-631 40 mg/kgを経口投与した場合にも、アバスタチンと同等以上の腫瘍増殖抑制作用が観察された。さらに、LCB-631を5, 15, 45 mg/kg経口投与した際

に、用量依存的な腫瘍増殖抑制作用が観察された(データ未掲載)。これら結果は、“「アバスタチン」と同等以上の薬効を有する、経口投与可能な安価に製造することができる低分子医薬品を開発する”という目標に向けて大きく前進したことを示す。

LCB-631とAvastinの腫瘍増殖抑制作用



LS174T細胞をヌードマウスに皮下移植した。1週間後に各マウスの腫瘍体積を測定し、次の4つのグループに分け(各群5匹、平均腫瘍体積、276 mm³)、その日をday 0とした。以下に示す投与スケジュールに従って化合物の投与を実施した。
 1. Control (PBS, days 0 - 8 i.p.)
 2. Avastin 5 mg/kg day 0, 3, 7 i.p.
 3. LCB-631 20 mg/kg days 0 - 8 i.p.
 4. LCB-631 40 mg/kg days 0 - 8 p.o.

図10 LCB-631の腫瘍増殖抑制作用

LCB-630 & LCB-631のキナーゼパネル

Kinase	% Inhibition				
	L-451 10μM	L-604 10μM	L-630 10μM	L-631 10μM	L-633 10μM
EGFR	43.7	63.7	2.5	5.5	4.5
EGFR_1mM	-7.4	-2.8	-1.6	-4.3	-2.5
FGFR1	26.0	15.1	7.2	1.6	-1.4
FGFR1_1mM	3.5	4.0	0.9	2.3	-0.6
IGF1R	2.9	-9.1	-12.1	-9.4	-12.6
IGF1R_1mM	-3.9	-4.8	-3.8	-3.8	-3.6
KDR	58.9	45.5	1.4	6.2	3.3
KDR_1mM	16.6	8.8	-2.0	-2.1	-3.4
TRKA	99.3	96.5	9.0	20.7	19.7
TRKA_1mM	93.1	85.7	0.3	1.9	0.5
TRKB	106.7	102.4	8.7	17.3	11.4
TRKB_1mM	90.5	75.6	6.3	11.5	4.5
TRKC	99.2	96.0	4.9	12.8	8.9
TRKC_1mM	83.7	66.5	-0.8	-1.4	-2.9

図11 LCB-604とLCB-631のキナーゼ活性抑制作用

さらに、骨格にbenzimidazole環を有するLCB-451、LCB-604とそれぞれのbenzothiazole環誘導体であるLCB-630、LCB-631、およびbenzothiazole環に他の置換基が導入されているLCB-633について、7種類のチロシンキナーゼに対する直接的な作用を検討した。その結果、図11に示すように、benzimidazole環をbenzothiazole環に変更することによって10 μMの濃度における直接的なキナーゼ阻害活性が減弱することが判明した。ある種のキナーゼを抑制することにより予期せぬ副作用が発生する可能性があることを考慮すると、今回の結果は予期せぬ副作用の低減につながると考えられるため、非常に興味深いと考えている。

【リード化合物誘導体の作用機序の解析】

図12に、提案者が目指す低分子VEGF阻害薬の作用機序とその証明法の模式図を示す。

すなわち、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)との相互作用を減弱することにより、VEGFR2の1175番目のチロシン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法および共結晶法により、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的な抑制作用に起因するものではないことをリコンビナントVEGFR2チロシンキナーゼに対する直接的な抑制作用を検討することにより、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HUVECの増殖に対する効果として確認している。

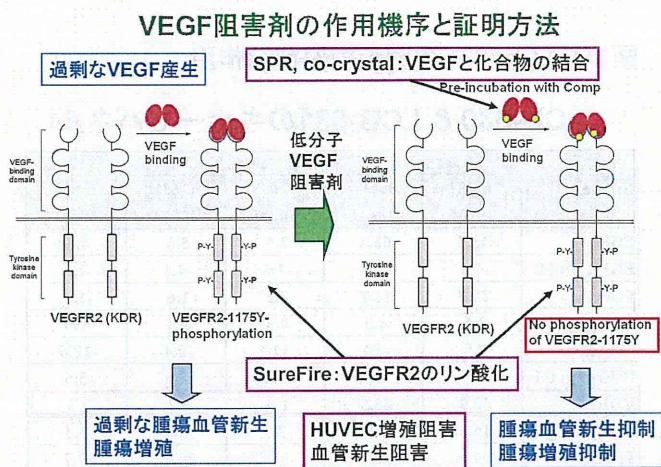


図12 VEGF阻害剤の作用機序とその証明法の模式図

上述のように、V-119-24は、弱いながらVEGF刺激HUVECの増殖を抑制し、VEGF₁₆₅により誘発されるHUVEC上のVEGFR2の1175番目のチロシンのリン酸化を直接的なチロシンキナーゼ抑制作用を介さず抑制する。そして、SPR法によりVEGF蛋白質に結合することが明らかになったことから、提案者の想定する作用機序により、VEGFシグナルを抑制している可能性が高い有望なリード化合物であると考えられた。しかし、in vivoの薬理的・薬物動態学的検討により、in vivoの活性本体がV-119-24自身ではなく代謝産物である可能性が極めて高いと考えられたことから、V-119シリーズ化合物のリード骨格としての追及を中止した。

一方、V-103シリーズのLCB-604は、in vivoの活性本体が未変化体である可能性が高いことが明らかになったことから、リード骨格として追及する決断を下した。そして、薬物動態の改善を目標として、benzimidazole環をbenzothiazole環に変更した誘

導体LCB-631を合成したところ、LCB-631は、LCB-604に比べて、in vivo PKプロファイルのみならず、in vitro活性、腫瘍増殖抑制作用も改善されていることが判明した。すなわち、LCB-631は、VEGF刺激HUVECおよびLS174T細胞の増殖に対するIC₅₀値がそれぞれ34 nMおよび1000 nM以上 (別の実験で14.2 uMと判明)であり、LS174Tを皮下移植したxenograftモデルに対して、経口投与により、アバスチンと同程度の腫瘍増殖抑制作用を示すことが判明した。

そこで、LCB-631の作用機序の解析を実施したところ、SureFire法により、LCB-631は、2 uMの濃度において、VEGF₁₆₅により誘発されるVEGFR2の1175番目のチロシンのリン酸化をほぼ完全に抑制することが示され (データ未掲載)、このリン酸化抑制作用は直接的なVEGFR2チロシンキナーゼ阻害作用に起因するものではないことが判明した (図7)。以上のことから、生物活性の面からは、LCB-631は、提案者が想定している作用機序に従って生物学的活性を発揮している可能性が示唆された。

この可能性を検証するために、SPR法により、LCB-631のVEGF蛋白質への結合を検討したところ、RU_k5となり、結合していることを示す証拠は得られなかった。ここで、SPR法に用いているVEGF蛋白質は、VEGF₁₆₅に比べて短いVEGF₈₋₁₀₉である。この2種類の蛋白質は、立体構造が異なる可能性があることから、LCB-631やLCB-604のVEGF蛋白質への結合を証明するためには、VEGF₁₆₅蛋白質を用いたSPR試験を実施することが必要であると考えている。現在、VEGF蛋白質とLCB-631の共結晶を作成し、電子密度の解析も行っている。共結晶解析によりLCB-631とVEGF蛋白質の結合様式の詳細が明らかになれば、医薬候補化合物の設計に、インタープロテインの独自の分子設計法を最大限活用する予定である。作用機序を明らかにすることは、医薬候補化合物の開発には必須であることから、作用機序の解明には、今後さらに注力する予定である。

D. 考察

【リード化合物誘導体の薬理的・薬物動態学的評価】

【in vitro活性】

細胞評価系であるVEGF刺激HUVECの増殖阻害活性に関しては、IC₅₀値が一桁 nMの活性を目指している。現在、LCB-631で30 nM前後の活性に到達していることから、かなり目標に近づいたと考えている。あと数倍の活性の増強を目指して、LCB-631の誘導体を合成し、構造活性相関を検討中である。

【選択性】

LS174T細胞の増殖に対するIC₅₀値とVEGF刺激HUVECのそれとの比を選択性の指標として用いると、LCB-631の場合は、約400倍となり、ほぼ満足ができる値であると考えている。

【Xenograftモデルを用いた腫瘍増殖抑制作用】

化合物投与開始時期の腫瘍体積を200 - 400 mm³にすることにより、かなり厳しい条件での評価を実施してきた。この条件で、LCB-631の経口投与は、用量依存的な腫瘍増殖抑制作用を示し、40 mg/kg

投与では、アバスタチン 5 mg/kgの腹腔内投与と同等の腫瘍増殖抑制を示すことが判明したことは大きな成果であると考えている。

【安全性】

これまでに設計、合成を重ねてきた化合物群は、細胞毒性が極めて低く、細胞傷害性を示す抗がん剤のような毒性の懸念は現時点ではない。特に103シリーズ化合物については、一部の化合物で14日間の毒性試験を100 mg/kgまで実施した経緯があり、毒性を示唆する所見は見られなかった。さらに、LCB-631については、9日間の連日投与においても、体重減少などの副作用は観察されなかった。これらの結果から、平成26年1月からの開始を計画している非臨床試験、さらにはFIH (first in human)に向かうあたり自信を深めている。

【PKプロファイル】

有望化合物については、in vivo 腫瘍増殖抑制作用とin vivo PK試験を並行して実施した結果、V-119-24のin vivoの活性本体が代謝産物である可能性が示唆され、リード化合物の絞り込みの際に有益な情報となった。一方、LCB-604やLCB-631などのV-103シリーズ化合物については、in vitroのVEGF刺激HUVEC増殖抑制活性とin vivo PKデータから、腫瘍増殖抑制作用のおおまかな予測ができることが明らかになりつつある。さらに、現在、経口投与によるBAが31.7%と、目標とする数値に到達しているLCB-631の誘導体も見出している。そのため、次年度は、これらの知見をうまく活用して、PKプロファイルの改善とin vitro活性の向上を両立できる化合物をデザインすることにより、より早期の非臨床試験候補化合物の最終的な選定につなげたいと考えている。

【リード化合物誘導体の作用機序の解析】

本補助金を活用することにより、作用機序の解析の手段として、SPR法に加え、SureFire法およびNMR法の系を立ち上げることができた。V-103シリーズ化合物、特に、LCB-631に関しては、生物学的な面からは想定通りの作用機序に従って、VEGFシグナルを抑制している可能性が示唆されていることから、VEGF蛋白質に直接結合しているという証拠を得るために、SPE法、NMR法、共結晶法を総動員して、実験を実施している。

【総括】

インタープロテインは世界のフロントランナーとして、2018年には癌分野で最大の売上高となると予測されている抗VEGF抗体医薬品を同じ作用機序を有する低分子医薬品への置き換えを目指して、低分子PPI阻害薬の開発に挑戦している。当初の計画は、“平成23年度から平成24年度中に医薬候補化合物を確定し、GLPによる非臨床試験の主項目を終了

し、平成25年度に医師主導臨床試験を開始する”ことであったが、今年度は“今年度末にリード骨格の絞り込みと以降の合成展開方針を決定する”という修正計画に沿って実験を実施し、ほぼ予定通りに、LCB-631に到達することができた。このように、当初の計画に比べて遅れてはいるものの、医薬候補化合物に大きく近づく成果が得られたと考えている。実際に医薬候補化合物が特定できれば、高額医療のやり玉にあがるアバスタチンの経口薬化により、より多くの患者に福音をもたらすと同時に、抗体医薬品の経口薬化の世界競争の最初の成功例となることから、その成果のインパクトは計り知れないと考えられるため、出来る限り短時間で医薬候補化合物を決定したいと考えている。さらに、欧州のファーマとアライアンス締結に向けて課題遂行を進める。

E. 結論

‘真’のイノベーションによる低分子PPI阻害薬の創薬の実現に向けて、複数の母核の化合物からリード最適化を進め、医薬候補化合物の決定への合成展開方針を決定することができた。開発体制は本補助金により強化されており、最終の医薬候補化合物を短時間で決定すべく研究開発を進めていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2011年10月に特許出願
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 (早期・探索的臨床試験分野))
 分担 研究報告書

研究事業5：PARP阻害剤 医師主導治験

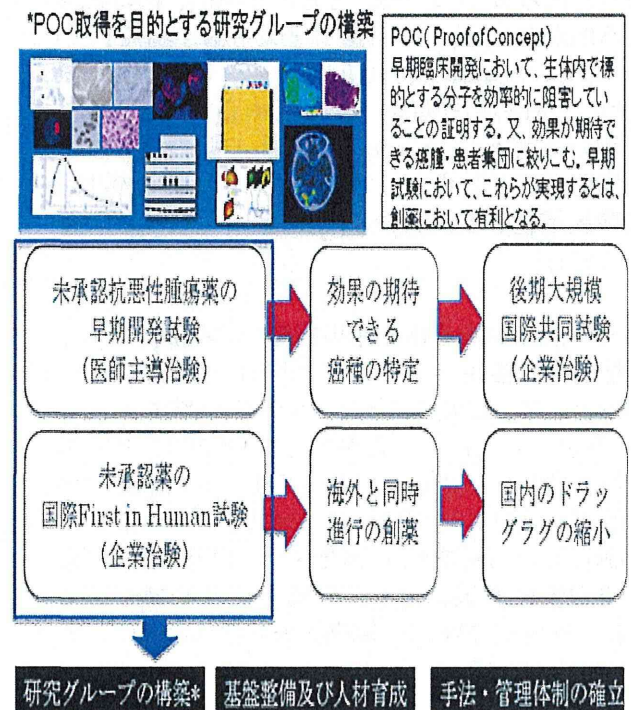
研究分担者 藤原 康弘 独)国立がん研究センター中央病院 戦略企画室 室長
 研究分担者 田村 研治 独)国立がん研究センター中央病院 乳腺・腫瘍内科 科長
 研究分担者 米盛 勸 独)国立がん研究センター中央病院 乳腺・腫瘍内科 医長

研究要旨

DNA修復に関与するPARP阻害剤であるオラパリブ（国内外未承認薬、アストラゼネカ社）を用いて、トリプルネガティブ乳癌を対象に、新たな抗がん剤との併用レジメンを開発する第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。又、サイトカインレセプターやBcr-Ablの下流に位置する、セリン・スレオニンキナーゼであるPIMの阻害剤を用いたGlobal First in Human試験を、アストラゼネカ社の治験として実施する。未承認薬の早期臨床試験を医師主導治験として行う体制の確立、および、国内でのドラッグ・ラグの縮小を目標とした、海外と同時進行のFirst in Human早期臨床試験を行う体制を確立する。

A. 研究目的

国内外未承認の新規薬剤の早期開発試験についてPOC (Proof of Concept) 取得を目的とする医師主導治験として実施することは新たな治療法を開発し、後期大規模開発（国際共同試験）への橋渡しへとつながる。さらに、医師主導治験で未承認薬の早期開発の経験を通じて、その手法・管理体制の国内確立を目指す。また、Global First in Human 試験に参画することは、海外と同時進行の創薬を目指し、国内でのドラッグ・ラグの縮小を目標とすると同時に、Global First in Human 試験の経験を積むことができる。各種試験を遂行すべく基盤整備を進めるとともに人材育成を行い、今後の国内のGlobal First in Human 試験を促進する。



B. 研究方法

研究班（分担研究者）は、治験薬提供者（アストラゼネカ社）の実施したオラパリブを用いた非臨床試験と PARP 阻害薬の開発状況をもとに、研究開発計画の戦略設定、医師主導治験の治験実施計画書の作成と研究実施の体制整備を行う。早期探索目的医師主導治験であり、治験対象患者に対する薬物動態研究（Pharmacokinetics; PK）・薬力学研究（Pharmacodynamics; PD）・バイオマーカー研究（Pharmacogenomics: PDx、及び Proof of Concept; POC 研究）等が必要であるということから、基礎研究グループと広く連携し、それらの研究計画を立案する。

【Olaparib/Eribulin併用医師主導治験】

1. 研究デザイン

生体における PARP の機序、乳がんにおける PARP 阻害薬を用いた臨床試験を検討し、開発状況、治験実施計画書のコンセプト、毒性等の検討を行った。基本的な臨床試験のコンセプトについて以下に示す。

（第 I 相試験部分）

Eribulin は、1.4mg/m² を day 1, 8, に静脈投与、オラパリブはレベルに合わせて 1 日 2 回経口投与とし、21 日間を 1 コースとする。第 I 相試験部分は、Level 1 より 3 例ずつ登録を行い、1 コースの有害事象により用量規制毒性（DLT）を評価する。DLT の発現症例数にて最大耐用量（MTD）を確認し、第 II 相試験での推奨用量を推定する。

Level	投与量
Level 1	エリブリン 1.4mg/m ² Day1, 8 + オラパリブ 25mg 1 日 2 回 (50mg/day)
Level 2	エリブリン 1.4mg/m ² Day1, 8 + オラパリブ 50mg 1 日 2 回 (100mg/day)
Level 3	エリブリン 1.4mg/m ² Day1, 8 + オラパリブ 75mg 1 日 2 回 (150mg/day)
Level 4	エリブリン 1.4mg/m ² Day1, 8 + オラパリブ 100mg 1 日 2 回 (200mg/day)
Level 5	エリブリン 1.4mg/m ² Day1, 8 + オラパリブ 150mg 1 日 2 回 (200mg/day)

Level 6	エリブリン 1.4mg/m ² Day1, 8 + オラパリブ 200mg 1 日 2 回 (200mg/day)
Level 7	エリブリン 1.4mg/m ² Day1, 8 + オラパリブ 300mg 1 日 2 回 (200mg/day)

（第 II 相試験部分）

第 II 相試験は、I 相試験において推定された推奨用量を I 相試験と同じスケジュールで投与する。疾患の増悪または有害事象により治療が継続できない場合まで、治験を継続できる。

2. 研究実施計画書案の作成

研究実施計画書案を検討し作成する。研究実施計画書案（和文）を英文に翻訳する。研究実施計画書案（英文）を治験薬提供者（英国アストラゼネカ社）へ提出し、研究実施計画書案の第一次レビューを受ける。研究実施計画書案に基づき、説明・同意文書案の作成をする。

3. 薬物動態研究

第 I 相開発治験において、日本人におけるオラパリブの薬物動態検討が必要と判断されたことから、薬物動態解析の実施について検討を行った。既に行われたオラパリブ単剤療法との薬物動態検討結果との比較検討が行えるように、治験で使用した測定系である英国 Covance Laboratories での測定検査が必要と判断した。英国 Covance Laboratories との薬物動態測定の交渉をした。また、検体の国内・国際搬送に関して Covance Japan との交渉をする。

4. 国内規制当局との開発計画検討

未承認の薬剤を用いた早期探索目的の開発計画であることから、国内規制当局経験者医師と、今後の規制当局への治験届・手続きに関する事、治験薬提供者の行う企業治験の進捗状況に合わせた本研究の開発進捗管理に関して検討を行った。本治験で使用するオラパリブ錠剤単剤の国内第 I 相治験実施後に医師主導治験を開始する進捗計画が適切であると判断する。

5. Olaparib と抗がん剤の併用効果の検討

乳がん細胞株を用いて、オラパリブと他の抗がん剤（パクリタキセル、エリブリン、イリノテカン等）の併用効果の関係（相乗効果・相加効果）を検討した。研究からは、オラパリブとエリブリンとの併用は相加効果を示し、併用による治療開発候補薬剤として

妥当であると判断した。

6. 治験に付随する臨床研究の体制整備

国立がん研究センター研究所と連携し、以下の通り医師主導治験におけるバイオマーカー研究のための研究計画案と実施体制の整備を実施した。

薬物動態研究に関しては、エリブリン単剤、オラパリブ単剤、オラパリブおよびエリブリン併用時のそれぞれの薬剤の薬物動態について評価することとし、エリブリン単剤 9 ポイント、オラパリブ単剤 6 ポイント、併用時のエリブリン 9 ポイント、併用時のオラパリブ 6 ポイントの検体採取ポイントを決定した。血漿中エリブリン及びオラパリブの測定は、熊本大学薬学部大学院（浜田哲暢教授研究室）において、液体クロマトグラフィー—タンデム型質量分析法（LC-MS/MS）を用いて実施することとし、その測定系を完成させた。

薬力学研究については、オラパリブ投与時の末梢血単核球（PBMC）における PARP 阻害活性は国立がん研究センターもしくは委託分析機関（三菱化学メディエンス株式会社）において実施することとした。Plummer らの方法（Plummer ER. *et al.*, Clin. Cancer Res. 2005, 11:3402-3409）を改変し、ジギトニン処理により細胞膜を破壊し得た粗抽出液を用いて *ex vivo* で PARP 活性をブロット法にて測定する測定系を構築した。（図 1）オラパリブ投与時の尿検体、血漿検体中の PAR 代謝物の測定は、国立がん研究センター研究所もしくは委託分析機関（神奈川工科大学高村岳樹教授研究室）において実施することとした。PARP 代謝物である ribosyladenosine および rinosylinosine 等を高速液体クロマトグラフィー—質量分析法（HPLC-MS/MS）を用いて定量することとした。

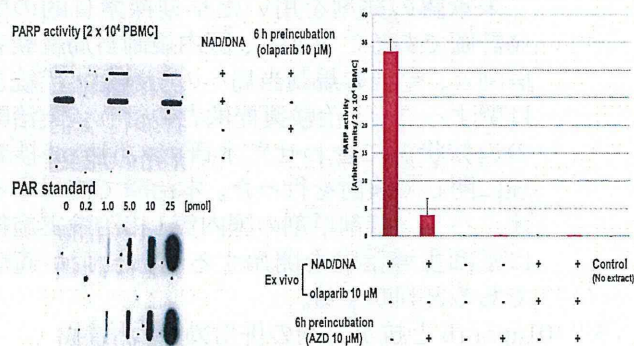


図 1 オラパリブ暴露時の PBMC 中の PARP 活性のドットブロット法による測定

Pharmacogenomics (PGx) 研究については、免疫組織学的染色法（IHC）を用いて、

腫瘍検体における複数のがん関連タンパク質の発現量を測定する。

具体的には、Twist, Snail, ERCC1 (Excision repair cross-complementing 1), XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1), EGFR (Epidermal growth factor receptor), Cytokeratin 5/6, Cytokeratin 14, Cytokeratin 17, Nucleostemin (NS), TRRT (Telomerase reverse transcriptase), STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) などの発現量を調べる。又、治療効果を予測するバイオマーカーの候補として、BRCA1 遺伝子変異、BRCA1 メチル化、PIK3CA 遺伝子変異を測定した。

【PIM阻害剤/国際First in Human治験】

PIM 阻害剤を用いた国際 First in Human 臨床試験を、国立がん研究センター中央病院と英国の Christie Hospital, Royal Marsden Hospital 3 施設で、共通のプロトコル同一の治験として実施することを計画し、実施に必要な体制を整備する。

治験名「進行固形悪性腫瘍患者及び悪性リンパ腫患者を対象とした AZ1208 の安全性、忍容性、薬物動態、及び抗腫瘍効果を検討する非盲検用量漸増多施設共同第 I 相試験」

1. 治験のコンセプト

PIM キナーゼは、細胞周期チェックポイント、及び細胞代謝を介したアポトーシス、及び正常な細胞の増殖を制御するリン酸化基質によってプログラム細胞死を調節する、セリン/スレオニンキナーゼである。非臨床試験から、これらのタンパク質が機能的且つ機械的に細胞生存及び細胞増殖に関与していることが確認された。また、これらのタンパク質の過剰発現が、急性骨髄性白血病（AML）、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌を含む多くのヒトの癌において認められている。AZD1208 は、PIM1、PIM2、PIM3 の 3 種類の PIM キナーゼ阻害剤である。

2. 治験の主要評価項目

進行固形悪性腫瘍患者及び悪性リンパ腫患者に AZD1208 を経口投与したときの安全性及び忍容性を最大耐用量（MTD）に達するまで検討し、今後の臨床評価に用いる用量を決定する。

3. 治験の副次評価項目

AZD1208 を経口投与したときの単回投与後及び反復投与後の定常状態での AZD1208 の薬物

動態 (PK) を検討する。又、AZD1208 の抗腫瘍効果を検討する

4. 治験の探索的評価項目

血管新生、細胞死、細胞浸潤、並びに抗腫瘍効果及び毒性との関連性が考えられる循環血中のバイオマーカーに対する AZD1208 の作用を検討する。AZD1208 に対する薬物動態、忍容性及び有効性に影響する可能性のある遺伝子／遺伝子変異を探索する。AZD1208 投与後の薬力学的バイオマーカーの変化量を測定する。AZD1208 投与後の循環血中腫瘍細胞数 (CTC 数) の変化、並びにその変化と抗腫瘍活性との関連性を検討する。

5. 海外共同研究者との情報共有

英国 2 施設と、アストラゼネカ社 (英国本社、米国支社) と国立がん研究センター中央病院間の SRC (Safety Review Committee) を、隔週の木曜日 (1 回 1 時間) 行うことを計画した。

(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」を遵守して行う。臨床研究はすべて「ヘルシンキ宣言」、「臨床研究に関する倫理指針」、「疫学研究に関する倫理指針」などに基づいて実施する。倫理委員会 (IRB) での審査・承認を受けた後に実施する。各患者より文書による説明と同意を得た上で行われる。各患者の人権、プライバシーに充分配慮し、個人情報の保護を厳守した形で行われる。臨床検体の解析においては、研究に直接かかわらない「遺伝子情報管理者」を特定し「連結可能匿名化」を行う。外部への解析依頼も匿名化された番号のみを用い個人の特が不可である形で行う。データの発表に関しても、個人を特定できるような形での発表は行わない。

C. 研究結果

【Olaparib/Eribulin併用医師主導治験】

1. 平成25年1月より、当該医師主導治験を開始した。第 I 相試験部分においてレベル 1 からレベル 7 まで、順次、用量増加した。第 I 相

試験部分においては、国立がん研究センター中央病院、大阪医療センター、四国がんセンター、北海道がんセンターの 4 施設にて行った。各レベルにおいて DLT をみとめなかったため、レベル 1 からレベル 6 まで、各コホート 3 症例を組み入れた。最高レベルであるレベル 7 においては、認容性の検討を重視し 6 症例を組み入れた。

平成25年4月時点 (第 I 相試験開始より 15 カ月) にて、計 24 症例を組み入れた。

推奨投与量 (RD) は、エリブリン 1.4mg/m² Day1, 8 + オラパリブ 300mg 1 日 2 回 (200mg/day) と推定された。

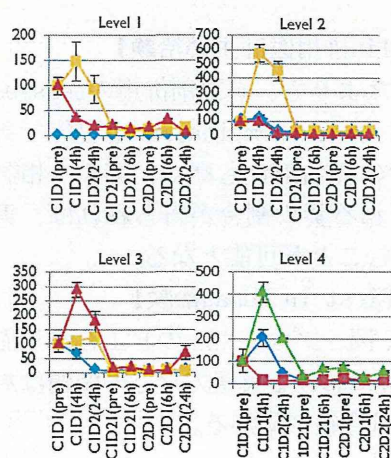
用量規制毒性 (DLT) には至らなかった。

最頻有害事象は好中球減少症で、重篤な有害事象としては発熱性好中球減少症、感染症であった。

- 今後、第 I 相試験の推奨投与量 (RD) にて、奏効割合を主要評価項目として、第 I 相試験を行う予定である。予定症例登録数は 28 例国内 10 施設にて行う予定である。
- 単核球 (以下 PBMCs) を用いた生体内で PARP の阻害活性の評価

レベル 1 からレベル 4 まで Eribulin と Olaparib の投与を受けた TNB 患者の血液検体を用いた。オラパリブ 50mg bid 以上で生体内の有意な PARP 活性の低下をみとめた。

このことにより、低用量から、オラパリブの生体内での PARP 活性阻害を確認した。



【PIM阻害剤/国際First in Human治験】

1. 治験の進捗

平成24年8月より登録を開始した。国立がん研究センター中央病院と英国のChristie Hospital、Royal Marsden Hospital 3施設で、共通のプロトコル同一の治験として実施した。

現時点で3施設より29症例が組み入れられている。国立がん研究センター中央病院としては16症例が組み入れられている。

Level	Dose (mg)	No.
1	120	3
2	240	6
3	360	3
4	540	4
5	800	6
6	700	8
Total		29

現在のところ、連続投与の最大耐用量 (MTD) が700mg 又は、800mg を決定すべく有害事象について精査中である。

今後、間欠コホートに移行予定。用量規制毒性 (DLT) は、多型紅斑、倦怠感、薬剤性肺臓炎。

2. 海外共同研究者との情報共有

英国2施設と、アストラゼネカ社（英国本社、米国支社）と国立がん研究センター中央病院間のSRC (Safety Review Committee)を、隔週の木曜日（1回1時間）行った。平成25年4月までに23回施行した。

D. 考察

【Olaparib/Eribulin併用医師主導治験】

当初予定していたよりも、両薬剤併用のfeasibilityは高く、full doseのcombinationが可能である。第I相部分での奏効割合も高く、第II相試験において期待される奏効割合が得られれば、第III相試験へ進むことが可能となる。

【PIM阻害剤/国際First in Human治験】

海外と同時進行、同一プロトコルのFIHが可能であった。情報共有における英語力などの問題はあがるが、この枠組みは今後につながる。

E. 結論

治療抵抗性再発・転移性のトリプルネガティブ乳癌に対する医師主導治験として、オラパリブとエリブリンの併用療法によるPhase I/II試験を施行した。第I相試験部分は無事終了し、第II相試験（国内多施設共同研究）に移行する。

PIM阻害剤のFirst in Human早期臨床試験を海外と同一のプロトコルで施行した。このような例は国内でも非常に少ないが、海外の開発と同時のFIHが可能であることを経験した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Y Matsumura, M Yasunaga, S Manabe.	Cancer stromal targeting (CAST) therapy and tailored antibody drug conjugate therapy depending on the nature of tumor stroma.	YH Bae, RJ Mrsny, and K Park	In Cancer Targeted Drug Delivery, An Elusive Dream	Springer	New York Heidelberg Dordrecht London	2013	161-181
Kosaka N, Yoshioka Y, Hagiwara K, Tominaga N, Ochiya T	Functional analysis of exosomal microRNA in cell-cell communication research	Takahiro Ochiya	Methods Mol Biol Vol 1024 Circulating MicroRNAs Methods and Protocols	Springer	Germany	2013	1-10

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamada Y, Kiyota N, Fuse N, Kato K, Minami H, Hashizume K, Kuroki Y, Ito Y, Ohtsu A.	A phase I study of sorafenib in combination with S-1 plus cisplatin in patients with advanced gastric cancer.	Gastric Cancer	17(1)	161-172	2014
Takahashi H, Kaniwa N, Saito Y, Sai K, Hamaguchi T, Shimadzu Y, Matsumura Y, Ohtsu A, Yoshino T, Takahashi A, Odakami Y, Okuyama M, Sawada J, Sakamoto H, Yoshida T.	Identification of a candidate single-nucleotide polymorphism related to chemotherapeutic response through a combination of knowledge-based algorithm and hypothesis-free genomic data.	J Biosci Bioeng	116(6)	768-773	2013

Yamada Y, <u>Boku N, Nishina T, Yamaguchi K, Denda T, Tsuji A, Hamamoto Y, Konishi K, Tsuji Y, Amagai K, Ohkawa S, Fujita Y, Nishisaki H, Kawai H, Takashima A, Mizusawa J, Nakamura K, <u>Ohtsu A.</u></u>	Impact of excision repair cross-complementing gene 1 (ERCC1) on the outcomes of patients with advanced gastric cancer: cohort relative study in Japan Clinical Oncology Group Trial JCOG9912.	Ann Oncol.	24(10)	2560-2565	2013
Doi T, Muro K, Yoshino T, Fuse N, Ura T, Takahashi D, Feng HP, Shimamoto T, Noguchi K, <u>Ohtsu A.</u>	Phase 1 pharmacokinetic study of MK-0646 (dalotuzumab), an anti-insulin-like growth factor-1 receptor monoclonal antibody, in combination with cetuximab and irinotecan in Japanese patients with advanced colorectal cancer.	Cancer Chemother Pharmacol.	72(3)	643-652	2013
<u>Ohtsu A, Ajani JA, Bai YX, Bang YJ, Chung HC, Pan HM, Sahmoud T, Shen L, Yeh KH, Chin K, Muro K, Kim YH, Ferry D, Tebbutt NC, Al-Batran SE, Smith H, Costantini C, Rizvi S, Lebwohl D, Van Cutsem E.</u>	Everolimus for previously treated advanced gastric cancer: results of the randomized, double-blind, phase III GRANITE-1 study.	J Clin Oncol	31(31)	3935-3943	2013
Komatsu Y, Yoshino T, Yamazaki K, Yuki S, Machida N, Sasaki T, Hyodo I, Yachi Y, Onuma H, <u>Ohtsu A.</u>	Phase 1 study of efrotutazone, a novel oral peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, in combination with FOLFIRI as second-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer.	Invest New Drugs.		Epub ahead of print	2013

Ando Y, Inada Inoue M, Mitsuma A, Yoshino T, Ohtsu A, Suenaga N, Sato M, Kakizume T, Robson M, Quadt C, Doi T.	Phase I dose-escalation study of buparlisib (BKM120), an oral pan-class I PI3K inhibitor, in Japanese patients with advanced solid tumors.	Cancer Sci.	105(3)	347-53	2014
A Takahashi, Y Yamamoto, M Yasunaga, Y Koga, J Kuroda, M Takigahira, M Harada, H Saito, T Hayashi, Y Kato, T Kinoshita, N Ohkohchi, I Hyodo, <u>Y Matsumura.</u>	NC-6300, an epirubicin-incorporating micelle, exerts higher antitumor activity and the least cardiotoxicity as compared to conventional epirubicin.	Cancer Sci.	104	920-925	2013
Y Hisada, M Yasunaga, S Hanaoka, Saijou. T Sugino A, Tsuji, T Saga, K Tsumoto, S Manabe, J Kuroda, J Kuratsu, <u>Y Matsumura.</u>	Discovery of an uncovered region in fibrin clots and its clinical significance.	Sci. Rep.	3	2604	2013
Y Koga, S Katayose, N Onoda, T Kasamatsu, T Kato, S Ikeda, M Ishikawa, K Ishitani, Y Hirai, H Matsui, <u>Y Matsumura.</u>	Usefulness of immuno-magnetic beads conjugated with anti-EpCAM antibody for detecting endometrial cancer cells.	J Cancer Therapy	4	1273-1282	2013
M Yasunaga, M Furuta, K Ogata, Y Koga, Y Yamamoto, M Takigahira, Y Matsumura.	The significance of microscopic mass spectrometry with high resolution in the visualisation of drug distribution.	Sci. Rep.	3	3050	2013
Y Yamamoto, I Hyodo, M Takigahira, Y Koga, M Yasunaga, M Harada, T Hayashi, Y Kato, <u>Y Matsumura</u>	Effect of combined treatment with the epirubicin-incorporating micelles (NC-6300) and 1,2-diaminocyclohexane platinum (II)-incorporating micelles (NC-4016) on a human gastric cancer model.	Int J Cancer	135	214-223	2014

K Yanagihara, M Takigahira, T Kubo, T Ochiya, T Hamaguchi, Y Matsumura.	Marked antitumor effect of NK012, a SN-38-incorporating micelle formulation, in a newly developed mouse model of liver metastasis from gastric cancer.	Ther. Deliv.	5(2)	129-138	2014
Watanabe A, Yamazaki K, Kinugasa Y, Tsukamoto S, Yamaguchi T, Shiomi A, Tsushima T, Yokota T, Todaka A, Machida N, Fukutomi A, Onozawa Y, Yasui H.	Influence of primary tumor resection on survival in asymptomatic patients with incurable stage IV colorectal cancer.	Int J Clin Oncol.	Epub ahead of print	Epub ahead of print	2014
Koizumi W, Yamaguchi K, Hosaka H, Takinishi Y, Nakayama N, Hara T, Muro K, Baba H, Sasaki Y, Nishina T, Fuse N, Esaki T, Takagi M, Gotoh M, Sasaki T.	Randomised phase II study of S-1/cisplatin plus TSU-68 vs S-1/cisplatin in patients with advanced gastric cancer.	Br J Cancer	109 (8)	2079-2086	2013
Yamamoto N, Murakami H, Nishina T, Sugio K, Muro K, Takahashi T, Naito t, Yasui H, Akinaga S, Koh Y, Boku N	The effect of CYP2C19 polymorphism on the safety, tolerability, and pharmacokinetics of tivantinib (ARQ 197): results from a phase I trial in advanced solid tumors	Annals of Oncology	of 24	1653-1659	2013
Yamaguchi K, Sawaki A, Doi T, Satoh T, Yamada Y, Omuro Y, Nishina T, Boku N, Chin K, Hamamoto Y, Takiuchi H, Komatsu Y, Saji S, Koizumi W, Miyata Y, Sato A, Baba E, Tamura T, Abe	Efficacy and safety of capecitabine plus cisplatin in Japanese patients with advanced or metastatic gastric cancer: subset analyses of the AVAGAST study and the ToGA study	Gastric Cancer	16(2)	175-182	2013

Kawano Nagatsuma A, Aizawa M, Kuwata T, <u>Doi T</u> , <u>Ohtsu A</u> , <u>Fujii H</u> , <u>Ochiai A</u>	Expression profiles of HER2, EGFR, MET and FGFR2 in a large cohort of patients with gastric adenocarcinoma	Gastric Cancer	(Epub ahead of print)	(Epub ahead of print)	2014 Mar 14
Yoshino T, Yamazaki K, <u>Yamaguchi K</u> , <u>Doi T</u> , <u>Boku N</u> , Machida N, Onozawa Y, Asayana M, Fujino T, <u>Ohtsu A</u> .	HER2-positive gastric cancer	Gastric Cancer	17(1)	1-12	2014
<u>Boku N</u> , Muro K, Machida N, Hashigaki S, Kimura N, Suzuki M, Lechuga M, Miyata Y.	Phase I study of sunitinib plus S-1 and cisplatin in Japanese patients with advanced or metastatic gastric cancer	Invest New Drugs	32(2)	261-70	2014
<u>Kang YK</u> , <u>Muro K</u> , <u>Ryu MH</u> , <u>Yasui H</u> , <u>Nishina T</u> , <u>Ryoo BY</u> , <u>Kamiya Y</u> , <u>Akinaga S</u> , <u>Boku N</u>	A phase II trial of a selective c-Met inhibitor tivantinib (ARQ 197) monotherapy as a second- or third-line therapy in the patients with metastatic gastric cancer	Invest New Drugs.	32(2)	355-61	2014
<u>Hironaka S</u> , <u>Ueda S</u> , <u>Yasui H</u> , <u>Nishina T</u> , <u>Tsuda M</u> , <u>Tsumura T</u> , <u>Sugimoto N</u> , <u>Shimodaira H</u> , <u>Tokunaga S</u> , <u>Moriwaki T</u> , <u>Esaki T</u> , <u>Nagase M</u> , <u>Fujitani K</u> , <u>Yamaguchi K</u> , <u>Ura T</u> , <u>Hamamoto Y</u> , <u>Morita S</u> ,	Randomized, Open-Label, Phase III Study Comparing Irinotecan With Paclitaxel in Patients With Advanced Gastric Cancer Without Severe Peritoneal Metastasis After Failure of Prior Combination Chemotherapy Using Fluoropyrimidine Plus Platinum: WJOG 4007 Trial	J Clin Oncol.	31(35)	4438-4444	2013

Paoletti X, Oba K, Bang YJ, Bleiberg H, <u>Boku N</u> , Bouché O, Catalano P, Fuse N, Michiels S, Moehler M, Morita S, Ohashi Y, <u>Ohtsu A</u> , Roth A, Rougier P, Sakamoto J, Sargent D, Sasako M, Shitara K, Thuss-Patience P, Van Cutsem E, Burzykowski T, <u>Boku N</u>	Progression-Free Survival as a Surrogate for Overall Survival in Advanced/Recurrent Gastric Cancer Trials: A Meta-Analysis	J Natl Cancer Inst.	105 (21)	1667-70	2013
Okamoto W, Yoshino T, Takahashi T, Okamoto I, Ueda S, Tsuya A, <u>Boku N</u> , Nishio K, Fukuoka M, Yamamoto N, Nakagawa K.	A phase I, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of nimotuzumab in Japanese patients with advanced solid tumors	Cancer Chemother Pharmacol	72(5)	1063-71	2013
Niwakawa M, Yamaguchi R, Onozawa Y, Yasui H, Taku K, Naito T, Akinaga S, <u>Boku N</u> , Yamamoto N	Phase I study of highly selective inhibitor of VEGFR tyrosine kinase, tivozanib, in Japanese patients with solid tumors	Cancer Sci	104(8)	1039-44	2013
Fujisaka Y, Onozawa Y, Kurata T, Yasui H, Goto I, Yamazaki K, Machida N, Watanabe J, Shimada H, Shi X, <u>Boku N</u>	First report of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of the Src kinase inhibitor saracatinib (AZD0530) in Japanese patients with advanced solid tumours	Invest New Drugs	31(1)	108-14	2013
Yoshino T, <u>Yamazaki K</u> , <u>Yamaguchi K</u> , <u>Doi T</u> , <u>Boku N</u> , Machida N, Onozawa Y, Asayama M, Fujino T, <u>Ohtsu A</u>	A phase I study of intravenous aflibercept with FOLFIRI in Japanese patients with previously treated metastatic colorectal cancer	Invest New Drugs	31(4)	910-7	2013

Bando H, Yoshino T, Shinozaki E, Nishina T, Yamazaki K, Yamaguchi K, Yuki S, Kajiura S, Fujii S, Yamanaka T, Tanahara K	Simultaneous identification of 36 mutations in KRAS codons 61 and 146, BRAF, NRAS, and PIK3CA in a single reaction by multiplex assay kit.	BMC Cancer.	13	405	2013
門脇 重徳、室 圭	MET阻害薬の特徴と臨 床開発	腫瘍内科	12(3)	337-345	2013
土原一哉	次世代シーケンス技術 を応用したがん薬物療 法最適化への試み	癌と化学療法	41	1-6	2014
Takahashi RU, Takeshita F, Honma K, Ono M, Kato K, Ochiya T	Ribophorin II regulates breast tumor initiation and metastasis through the functional suppression of GSK3 β	Sci Rep	3	2474	2013
Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T	Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis	J Biol Chem	288	10849-1085 9	2013
Kosaka N, Takeshita F, Yoshioka Y, Hagiwara K, Katsuda T, Ono M, Ochiya T	Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy: "Exocure" is another choice for cancer treatment	Adv Drug Deliv Rev	65	376-382	2013
Suetsugu A, Honma K, Saji S, Moriwaki H, Ochiya T, Hoffman RM	Imaging exosome transfer from breast cancer cells to stroma at metastatic sites in orthotopic nude-mouse models	Adv Drug Deliv Rev	65	383-390	2013
Uchino K, Ochiya T, Takeshita F	RNAi therapeutics and applications of microRNAs in cancer treatment	Jpn J Clin Oncol	43	596-607	2013

Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, Fujita K, Mizutani T, Ohgi T, <u>Ochiya</u> <u>T. Gotoh N</u>	Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells	Mol Ther	21	185-191	2013
Asano J, Hirakawa A, Hamada C, Yonemori K, Hirata T, Shimizu C, Tamura K, <u>Fujiwara Y</u>	Use of Cox's Cure Model to Establish Clinical Determinants of Long-Term Disease-Free Survival in Neoadjuvant-Chemot herapy-Treated Breast Cancer Patients without Pathologic Complete	Int J Breast Cancer	2013	Epub	2013
Shimma S, Takashima Y, Hashimoto J, <u>Yonemori K,</u> <u>Tamura K,</u> Hamada A	Alternative two-step matrix application method for imaging mass spectrometry to avoid tissue shrinkage and improve ionization efficiency	J Mass Spectrom	48	1285-1290	2013
<u>Ono M,</u> Tsuda H, Yunokawa M, <u>Yonemori K,</u> Shimizu C, <u>Tamura K,</u> Kinoshita T, <u>Fujiwara Y</u>	Prognostic impact of Ki-67 labeling indices with 3 different cutoff values, histological grade, and nuclear grade in hormone-receptor-posi tive, HER2-negative, node-negative invasive breast cancers	Breast Cancer	-	Epub	2013
Yunokawa M, Katsumata N, Yamamoto H, Kodaira M, <u>Yonemori K,</u> Shimizu C, Ando M, <u>Tamura K,</u> <u>Fujiwara Y</u>	A pilot feasibility study for cisplatin plus S-1 for the treatment for advanced or recurrent cervical cancer	Cancer Chemother Pharmacol	71	1369-1374	2013
Kondo S, Ueno H, Hosoi H, Hashimoto J, Morizane C, Koizumi F, <u>Tamura K,</u> Okusaka T	Clinical impact of pentraxin family expression on prognosis of pancreatic carcinoma	Br J Cancer	109	739-746	2013