

・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(早期・探索的臨床試験分野))
 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	独)国立がん研究センター東病院臨床開発センター	新薬開発分野	分野長
研究分担者	安永 正浩	独)国立がん研究センター東病院臨床開発センター	新薬開発分野	ユニット長
研究分担者	土井 俊彦	独)国立がん研究センター東病院	消化内科	科長
研究分担者	佐藤 暁洋	独)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	室長
研究分担者	大津 敦	独)国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター		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の内、抗 Tissue Factor (TF)抗体をミセルに付加し第 2 世代の DDS を創製した。また抗 TF に MMAE を付加した抗体抗がん剤複合体を作製した。抗体付加ミセルに関しては GMP 製剤作製のためのオプティマイゼーションを開始する

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 製剤を創製する。また、抗 TF 抗体に強力な抗がん剤 MMAE を付加した、抗体抗がん剤複合体 (ADC) を作製した。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) 作製とその特性評価
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。遺伝子配列、CDR およびエピトープの同定を行った。
- 2) 抗 TF 抗体の抗凝固作用、ELISA 活性および Internalization 能につき評価した。
- 3) 抗 TF 抗体 1849 へのチュブリン阻害剤 MMAE 付加
- 4) エピルピシン内包ミセル表面への抗 TF 抗体の

付加体の in vitro、in vivo 抗腫瘍効果の評価

(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) 抗ヒト TF 抗体クローン 1849、600、1006、1084、1859、444 をえることができた。このうち抗凝固作用があり、ELISA 活性および Internalization 能力が高い 1849 につき可変部の H 鎖および L 鎖の遺伝子配列、CDR を決定した。この情報をもとに現在ヒトキメラ化を行なっている。
- 2) それぞれの抗体クローンの特性として、抗凝固作用をもつのが 1849、1084、444 であり、他は有意に弱かった。ELISA 活性はほぼ同等であった。Internalization 能は 1849 と 1084 と 1859 が高かった、1006 は認められ無かった。
- 3) MMAE 付加 1849 の抗腫瘍効果をヒト膀胱がん BxPC3 皮下腫瘍において著しい抗腫瘍効果を発揮することが判明した。また抗マウス TF 抗体 1157 の MMAE-ADC においても抗腫瘍効果を発揮した。1849 抗体は腫瘍塊に集積しており、1157 抗体は腫瘍血管の周囲すなわち間質に特異的に分布していた。また 1157 抗体治療群の腫瘍内の血管は有意に減弱していた。

4) 抗TF抗体1849付加エピルピシン内包ミセルはヒト胃がん44As3Lucおよびヒト膵がんBxPC3のin vitro実験において、抗体付加体が有意に早く有意に高濃度にinternalizationをおこし、勝殺細胞効果も高かった。また同細胞の皮下腫瘍モデルにおいて、抗体複合体ミセルのほうがミセル体のみ比べて有意な抗腫瘍効果を示すことを証明した。体重減少においては抗体付加の有無に差がなかったが、フリーのエピルピシンは両ミセル体に比べて有意な体重減少を認めた。

D. 考察

抗TFにMMAEを付加したADCにおいては抗マウスTF抗体ADCはマウスxenograft内のマウス由来腫瘍血管にダメージを与え、抗ヒトTF抗体ADCはxenograftそのものへの抗腫瘍効果を確認したことにより、臨床における抗TF抗体ADCはがん腫瘍血管の両方をターゲットとするdual targeting機能を有することが推察される。抗TF付加ミセルは抗体付加無しミセルに比較して有意にinternalization能力が高く、殺細胞効果も有意に高いことが判明し、その機序により、マウスモデルにおいても抗体付加ミセルの高い抗腫瘍効果がしめされた。

E. 結論

TFをターゲットにした抗TFのADCも抗TF付加抗がん剤内包ミセルも有意な抗腫瘍効果を示した。作用機序についても明らかにしたことによりGMP製剤作製のためのPOCが得られたと判断した。キメラ抗体ができ次第GMP製剤のためのoptimizationを行なう。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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, Y Matsumura. NC-6300, an epirubicin-incorporating micelle, exerts higher antitumor activity and the least cardiotoxicity as compared to conventional epirubicin. *Cancer Sci.* 104(7), 920-927, 2013.
2. N Yamazaki, Y Koga, S Yamamoto, Y Kakugawa, Y Otake, R Hayashi, N Saito, Y Matsumura. Application of the fecal micro RNA test to the residuum from the fecal occult blood test. *Jpn J Clin Oncol*, 43(7), 726-33, 2013.
3. Y Hisada, M Yasunaga, S Hanaoka, S Saijou, T Sugino A, Tsuji, T Saga, K Tsumoto, S Manabe, J Kuroda, J Kuratsu, Y Matsumura. Discovery of an uncovered

region in fibrin clots and its clinical significance. *Sci. Rep.* 3, 2604, 2013.

4. Y Matsumura, M Yasunaga, S Manabe. Cancer stromal targeting (CAST) therapy and tailored antibody drug conjugate therapy depending on the nature of tumor stroma. *In Cancer Targeted Drug Delivery, An Elusive Dream* (eds. Bae YH, Mrsny RJ, and Park K) Springer New York Heidelberg Dordrecht London, p.161-181, 2013
5. Y Koga, S Katayose, N Onoda, T Kasamatsu, T Kato, S Ikeda, M Ishikawa, K Ishitani, Y Hirai, H Matsui, Y Matsumura. Usefulness of immuno-magnetic beads conjugated with anti-EpCAM antibody for detecting endometrial cancer cells. *J Cancer Therapy* 4:1273-1282, 2013.
6. Y Koga, N Yamazaki, Y Yamamoto, S Yamamoto, N Saito, Y Kakugawa, Y Otake, M Matsumoto, Y Matsumura. Fecal miR-106a is a useful marker for colorectal cancer patients with false-negative results in immunochemical fecal occult blood test. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 22(10):1844-1852, 2013.
7. 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.
8. Y Koga, N Yamazaki, S Takizawa, J Kawachi, O Nomura, S Yamamoto, N Saito, Y Kakugawa, Y Otake, M Matsumoto, Y Matsumura. Gene expression analysis using a highly sensitive DNA microarray for colorectal cancer screening. *Anticancer Research* 34:169-176, 2014.
9. Y Koga, N Yamazaki, Y Matsumura. New molecular diagnosis and screening methods for colorectal cancer using fecal protein, DNA, and RNA. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 14:107-120, 2014.
- 10 Y Yamamoto, I Hyodo, M Takigahira, Y Koga, M Yasunaga, M Harada, T Hayashi, Y Kato, Y Matsumura 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* (2014 in press).

11. 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: 129-138, 2014.

2. 学会発表

1. Yasuhiro Matsumura. Nanomicelles DDS technology combined with active targeting. 18th JFCR ISCC 4th December 2014 Tokyo
2. Masahiro Yasunaga, Shino Manabe, David Tarin, Yasuhiro Matsumura. Development of CAST (Cancer Stromal Targeting) Therapy. 4th International Conference on Tumor Progression and Therapeutic Resistance. March 2014 Boston.

G . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特願2014-18586 抗Tissue Factorモノクローナル抗体 (抗組織因子抗体付加抗がん剤内包ミセル)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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2：TAS102に関する研究

研究分担者	土井 俊彦	独)国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター	先端医療科	科長
研究分担者	安井 博史	静岡県立静岡がんセンター	消化器内科	科長
研究分担者	室 圭	愛知県がんセンター中央病院	薬物療法部	部長
研究分担者	仁科 智裕	独)四国がんセンター	内科	医長
研究分担者	土原 一哉	独)国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター	T R 分野	分野長
研究分担者	山口 研成	埼玉県立がんセンター	消化器内科	科長兼部長
研究分担者	高橋 俊二	公益財団法人がん研究会有明病院	総合腫瘍科	部長
研究分担者	落合 淳志	独)国立がん研究センター東病院臨床開発センター	臨床腫瘍病理部	部長
研究分担者	朴 成和	聖マリアンナ医科大学	臨床腫瘍学講座	教授
研究分担者	廣中 秀一	千葉県がんセンター	臨床試験推進部	部長

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を実施した。平成 24 年 2 月 14 日に治験届けを行い、国立がん研究センター東病院、国立四国がんセンター、愛知県がんセンター中央病院、静岡県立静岡がんセンター、埼玉県立がんセンター、癌研究所有明病院で実施した。Primary endpoint である PPS8W の disease control が 29 例中 19 例 (65.5%) であり、本薬剤は有望な薬剤であると考えられる。現時点で、安全性については、既報と差はなく、また試験としてのモニタリング、監査にても特に問題を認めていない。今後、最終解析を実施、報告する予定である。

A. 研究目的

未承認薬である新規抗がん剤 TAS102 を用いた医師主導治験体制を確立し実施する。

B. 研究方法

前治療で増悪した進行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 Ⅲ 相臨床試験を計画し実施する。本試験は第 1 ステージと第 2 ステージの 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。

(倫理面への配慮)

本試験は、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。

C. 研究結果

大鵬薬品株式会社との共同研究契約締結後、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、愛知県がんセンター中央病院、静岡県立静岡がんセンター、埼玉県立がんセンター、癌研究所有明病院にて実施した。試験の進捗においては、webでの定期的カンファを実施し、参加施設との情報共有を行うとともに、適格性および安全性などの確認も行うことで未承認薬での医師主導治験においても安全性に十分に配

慮した。平成25年1月19日に全29症例の登録を終了した。第1ステージ、第2ステージを合わせた29症例のPPS8Wのdisease controlが29例中19例(65.5%)と期待するdisease control rateの50%を上回っていた。施設へのモニタリング、監査も実施し、現時点でGCPについて重要な逸脱は認めていない。すでに平成26年2月にデータカットオフを行っており、今後最終結果を報告する予定である。また、高用量でのさらなる有効性が期待できるため探索的コフォートを設定し、6例の症例を登録し、その安全性、薬物動態についても検討を行った。

D. 考察

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。登録の進捗、安全性、試験の質的についても極めて良好であり、本試験の試験体制およびインフラ整備により継続して、未承認薬を用いた試験の体制が可能と考えられる。

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実施し、登録症例の試験治療を完遂した。試験全体の安全性、監査・モニタリング実施による重大な逸脱も認めていない。今後、最終解析を実施、報告する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表
安井 博史

1) Watanabe A, Yamazaki K, Kinugasa Y, Ts

ukamoto 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*. 2014 Feb 15.

山口 研成

- 1) Koizumi W, Yamaguchi K et al. 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) 2079-86 2013
- 2) Shirao K, Yamaguchi K, et al. Gastrointestinal Oncology Study Group of the Japan Clinical Oncology Group. Randomized Phase III Study of 5-Fluorouracil Continuous Infusion vs. Sequential Methotrexate and 5-Fluorouracil Therapy in Far Advanced Gastric Cancer with Peritoneal Metastasis (JCOG0106). *Jpn J Clin Oncol*. 43 (10) 972-80 2013
- 3) Takahari D, Yamaguchi K et al. Determination of Prognostic Factors in Japanese Patients With Advanced Gastric Cancer Using the Data From a Randomized Controlled Trial, Japan Clinical Oncology Group 9912. *Oncologist* 2014

室 圭

- 1) Yamamoto N, Murakami H, Nishina T, 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 trial in advanced solid tumors. *Annals of Oncology* 24; 1653-1659 2013
- 2) 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

仁科 智裕

- 1) 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 T, Ohtsu A. 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); 175-82, 2013

土原 一哉

- 1) Bando H, Yoshino T, Shinozaki E, Nishina T, Yamazaki K, Yamaguchi K, Yuki S, Kajiura S, Fujii S, Yamanaka T, Tsuchihara K, Ohtsu A. 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
- 2) 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.

朴 成和

- 1) Boku N HER2-positive gastric cancer; *Gastric Cancer*; 17(1) 1-12; 2014
- 2) Boku N, 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
- 3) Kang YK, Muro K, Ryu MH, Yasui H, Nishina T, Ryoo BY, Kamiya Y, Akinaga S, Boku N 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
- 4) Hironaka S, Ueda S, Yasui H, Nishina T, Tsuda M, Tsumura T, Sugimoto N, Shimodaira H, Tokunaga S, Moriwaki T, Esaki T, Nagase M, Fujitani K, Yamaguchi K, Ura T, Hamamoto Y, Morita S, Okamoto I, Boku N, Hyodo I. 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
- 5) Paoletti X, Oba K, Bang YJ, Bleiberg H, Boku N, Bouché O, Catalano P, Fuse N, Michiels S, Moehler M, Morita S, Ohashi Y, Ohtsu A, Roth A, Rougier P, Sakamoto J, Sargent D, Sasako M, Shitara K, Thuss-Patience P, Van Cutsem E, Burzykowski T, Buyse M; on behalf of the GASTRIC group 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
- 6) Okamoto W, Yoshino T, Takahashi T, Okamoto I, Ueda S, Tsuya A, Boku N, 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
- 7) Niwakawa M, Yamaguchi R, Onozawa Y, Yasui H, Taku K, Naito T, Akinaga S, Boku N, 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
- 8) Fujisaka Y, Onozawa Y, Kurata T, Yasui H

ui H, Goto I, Yamazaki K, Machida N, Watanabe J, Shimada H, Shi X, Boku N First report of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of the Src kinase inhibitor saracatinib (AZ D0530) in Japanese patients with advanced solid tumours. Invest New Drugs; 31(1) 108-14;2013

9) Yamamoto N, Murakami H, Nishina T, Hirashima 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. Ann Oncol. 24(6) 1653-9;2013

10) Yoshino T, Yamazaki K, Yamaguchi K, Doi T, Boku N, Machida N, Onozawa Y, Asayama M, Fujino T, Ohtsu A. 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

落合 淳志

1) Kawano Nagatsuma A, Aizawa M, Kuwata T, Doi T, Ohtsu A, Fujii H, Ochiai A. Expression profiles of HER2, EGFR, MET and FGFR2 in a large cohort of patients with gastric adenocarcinoma.; Gastric Cancer[Epub ahead of print]

2. 学会発表

土井 俊彦

1) Toshihiko Doi. Current Status of New Agent for Advanced Gastric Cancer. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference 2013 12/16-18 千葉

2) K. Muro, T Doi, H Bando, H Yasui, T Nishina, K Yamaguchi, S Takahashi, N Suzuki, S Nomura, K Shitara, A Sato, A Ohtsu. Multicenter Phase II Study of TAS-102 Monotherapy in Patients with Pretreated Advanced Gastric Cancer: EPOC1201; ECCO-ESMO-ESTRO2013 9/27-10/1 Amsterdam

3) 土井 俊彦 胃癌幹細胞を標的とした進行胃癌治療の現状 第86回日本胃癌学会総会 2014.3/20-22

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(早期・探索的臨床試験分野))
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 田村 研治	独) 国立がん研究センター中央病院、乳腺科・腫瘍内科	科長
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 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	特別研究員
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	チーフエンジニア
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	チーフエンジニア

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をキャリアとした複合体製剤について、非臨床安全性試験、自然発症乳癌に対する非臨床試験を実施し、Triple Negative乳癌を初めとする治療抵抗性乳癌患者を対象としたFirst in humanの医師主導治験の開始を目標とする。本年度は、薬効薬理試験を完了し、十分な有効性を確認した。非臨床安全性試験、薬物動態試験、安全性薬理試験を終了、医薬品薬事戦略相談対面助言を終了し、治験プロトコルの作成を行った。GMPでの核酸製剤の製造検討を完了し、平成26年度中のFIHを視野に入れて進行中である。

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との複合体製剤を作製、有効性試験および非臨床安全性試験を実施し、投与量の設定と安全性を検証する。Triple Negative乳癌を初めとする、通常の治療法が効を奏しにくい乳癌症例に対して、本複合体製剤を用いた治験プロトコルを作成し、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。

B . 研究方法

昨年度までに、イヌ自然発症乳腺腫瘍症例において、RPN2発現レベルと乳癌の悪性度の相関を確認している。本年度は、イヌの自然発症乳腺腫瘍症例(悪性例: 乳腺癌および腺管状乳癌N=5頭、良性例: 乳腺腫瘍、腺房状/腺管状乳腺腫N=12頭)に対し、RPN2siRNA/A6K複合体(RPN2siRNA 0.5

mg/mLとA6K 5 mg/mLの混合液)を腫瘍内へ0.1~4.0 mL(RPN2siRNAとして0.005~0.41 mg/kg)局所投与し、腫瘍細胞の増殖抑制効果について検討した。コントロールとして、悪性乳腺癌腫瘍に対し、生食を局所投与した。1頭において腫瘍が複数個所ある症例に対しては、最大3か所に同時投与を行った。被験薬の投与から2~11日目(症例による)に腫瘍体積を計測した。

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)を参考に、表1に示す非臨床安全性試験、安全性薬理試験をGLP施設での委託試験にて実施した。試験項目および結果について、PMDA薬事戦略相談の対面助言を受けた。

表1 非臨床安全性試験

試験の種類	動物	被験物質	用量 mg/kg
単回全身投与試験	マウス	RPN2siRNA	5.0
単回全身投与試験	雌性サル	RPN2siRNA	0.025
単回皮下投与試験	ラット	A6K	1.3-39
単回全身投与試験	ラット	A6K	0.4-40
4週間反復皮下投与、 4週間回復毒性試験	雌性サル	RPN2siRNA /A6K 複合体	0.13-3.9 / 1.3-39
7週間反復皮下投与、 7週間回復毒性試験	雌性ラット	RPN2siRNA /A6K 複合体	3.9 / 39
哺乳類染色体異常試験	In vitro	A6K	
細菌復帰突然変異試験	In vitro	A6K	
安全性薬理試験 (心血管・呼吸機能)	雌性カニ クイザル	RPN2siRNA 複 合体	0.13-3.9

RPN2siRNA/A6K複合体の腫瘍内投与について、安全性および忍容性を評価、今後の臨床評価に用いる腫瘍内投与法における推奨用量と至適投与スケジュールを推定することを目的とした、First in Human医師主導治験プロトコルを作成した。プロトコル内容について、PMDA薬事戦略相談の対面助言を受けた。

(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。

C. 研究結果

1. 自然発症乳癌に対する有効性試験

イヌの自然発症乳腺腫瘍症例に対する、RPN2siRNA/A6K複合体の腫瘍内局所投与における、投与2～11日目の腫瘍体積変化を図1に示す。悪性腫瘍に対してRPN2siRNA/A6K複合体を投与した部位においては、投与前に比べて腫瘍体積の縮小がみられた。一方、生食を投与した部位および良性腫瘍にRPN2siRNA/A6K複合体を投与した部位においては、腫瘍体積の縮小は見られなかった。なお、悪性乳腺腫瘍へのRPN2siRNA/A6Kの部位あたり平均投与量は 2.15 ± 0.92 mLであり、RPN2siRNAとしての体重あたり平均投与量は 0.18 ± 0.04 mg/kgであった。

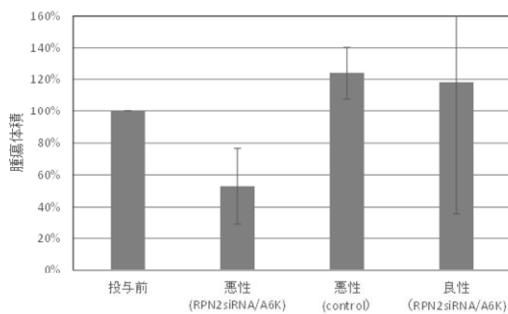


図1 イヌの自然発症乳腺腫瘍症例への局所単回投与による腫瘍体積変化

悪性または良性の乳腺腫瘍への被験物質局所単回投与後、投与後2～11日目の腫瘍体積(長径x短径x短径x0.5)の投与前に対する相対値

2. GLP非臨床安全性試験

RPN2siRNA/A6K複合体の投与による全身性の反応は、イヌへの薬効薬理試験における投与時に嘔吐、食欲不振(いずれも1日以内に回復)が見られ

た以外は特記すべき所見は現れず、毒性学的に意義のある全身毒性は認められなかった。また、雌性カニクイザルを用いた皮下局所投与による安全性薬理試験の結果、心血管および呼吸機能に対する特記すべき変動は認められなかった。

局所投与部においては、雌性カニクイザルへの皮下間歇反復投与によって投与部にA6Kの貯留が起因したと考えられる局所的な変化が認められたが、休薬により回復した。結論として、RPN2siRNA/A6K複合体において、全身への影響に対するNOAELはRPN2siRNA 3.9 mg/kg・A6K 39 mg/kg、投与部局所に対するNOAELはRPN2siRNA 0.13 mg/kg・A6K 1.3 mg/kgと考えられた。また、A6K単体において、全身への影響に対するNOAELは39 mg/kg、投与部局所に対するNOAELは39 mg/kg未満と考えられた。

核酸医薬では遺伝毒性を無視し得るため、A6K単体に関して遺伝毒性試験を行った。細菌復帰突然変異試験の結果からA6Kに遺伝子突然変異誘発作用はなく、哺乳類染色体異常試験の結果から染色体異常誘発作用を有さないと考えられた。

3. First in Human治験プロトコル

非臨床有効性試験および安全性試験の結果をふまえて、RPN2siRNA/A6K複合体の腫瘍内投与についての治験プロトコルを作成した。対象は、標準的な薬物療法に抵抗性の乳癌で、RPN2siRNA/A6K複合体の腫瘍内投与が可能と判断される体表から触知できる局所病変を有する患者とした。評価項目として、以下の項目を設定した。

主要評価項目:用量制限毒性

副次的評価項目: 最大耐用量、推奨用量、推奨スケジュールの推定、有害事象の発現割合、腫瘍縮小割合、各種抗がん剤との併用における安全性

探索的評価項目: 局所の腫瘍縮小割合、投与後組織のRPN2ノックダウン

本臨床試験では、RPN2siRNA(最終濃度0.5mg/ml)およびA6K(最終濃度5.0mg/ml)からなる複合体製剤として、各用量群に定められた用量を腫瘍内投与する。各々の患者は最初に安全性評価期として、試験薬を単回投与される。次に28日間の休薬期間後、投与前の有害事象・血液検査値を確認後に、各被験者にDLTに相当する毒性が無い場合には、連続投与と評価期として毎週投与のスケジュールにて3回(1サイクル3週毎)の投与を実施する。

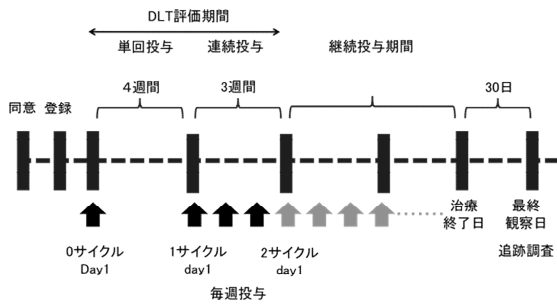


図2 First in Human試験スケジュール

D. 考察

RPN2siRNA/A6K複合体製剤の局所投与により、自然発症悪性乳腺腫瘍に対する縮小効果が得られたことから、本製剤の有効性が確認された。治療抵抗性を示す乳癌においては、がん幹細胞(CSC)画分が多く存在し、RPN2遺伝子の発現が高いことが知られている。RPN2遺伝子の発現量をRPN2siRNAによって抑制することで、CSCが有する足場非依存的な細胞増殖(MS)形成能を著しく低下させ、さらにはがん細胞のアポトーシスを惹起する。本被験薬を治療抵抗性乳癌の腫瘍に局所注射することにより、腫瘍の縮小および増殖抑制効果が期待できる。また、RPN2は胎盤以外の正常組織ではほとんど発現されていないことが知られている。従って、RPN2阻害剤(RPN2siRNA)は、妊婦以外の対象におけるがん細胞以外の細胞には実質的に作用せず、副作用のない特異的ながん治療薬として有用であると期待される。

非臨床安全性試験の結果をふまえ、PMDA薬事戦略相談対面助言を受けたところ、抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドラインに鑑みて、本被験薬は医師主導試験を実施するのに十分な安全性が確認された。ただし、げっ歯類での被験薬の反復投与毒性試験は実施していないため、平成26年度に当該試験を実施、安全性上の懸念すべき事項が確認された場合、速やかに治験責任医師へその情報を提供し、被験者の安全性を担保するように進める。

RPN2siRNA/A6K複合体製剤の臨床での使用は、現在実施を計画している腫瘍内投与法による医師主導試験が初めてであり、現時点で利用可能な有害事象等の重要な臨床に関する情報はなく、当該臨床試験で適切に収集する。本試験は、単施設で実施する非盲検の試験を予定しており、安全性、薬力学を全ての投与群の被験者で評価する。体表付近の局所病変を有する乳癌患者に対して、副作用の面からのQOLを損なうこと無く、局所制御を可能にして局所の症状による低下したQOLを改善できる可能性がある。

E. 結論

RPN2siRNA/A6K複合体製剤の乳癌に対する有効性を見出した。GLP非臨床安全性試験の結果をふまえ、PMDA薬事戦略相談対面助言を受けたところ、抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドラインに鑑みて、本被験薬は医師主導試験を実施するのに十分な安全性が確認された。RPN2siRNA/A6K複合体製剤の腫瘍内投与法についてのFirst in Human医師主導試験プロトコルを作成した。平成26年度中の試験開始を予定しており、非盲検試験での安全性、薬力学を全ての投与群の被験者で評価する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. *Sci Rep*, 3:2474, 2013
2. 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*, 288:10849-10859, 2013
3. 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
4. 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
5. Uchino K, Ochiya T, Takeshita F. RNAi therapeutics and applications of microRNAs in cancer treatment. *Jpn J Clin Oncol*, 43:596-607, 2013
6. Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, Fujita K, Mizutani T, Ohgi T, Ochiya T, Gotoh N, Kuroda M. Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells. *Mol Ther*. 21: 185-191, 2013.
7. Asano J, Hirakawa A, Hamada C, Yonemori K, Hirata T, Shimizu C, Tamura K, Fujiwara Y. Use of Cox's Cure Model to Establish Clinical Determinants of Long-Term Disease-Free Survival in Neoadjuvant-Chemotherapy-Treated Breast Cancer Patients without Pathologic Complete Response. *Int J Breast Cancer*. Epub, 2013
8. Shimma S, Takashima Y, Hashimoto J, Yonemori K, Hirakawa A, Tamura K, Fujiwara Y, Asano J, Hirakawa A, Hamada C, Yonemori K, Hirata T, Shimizu C, Tamura K, Fujiwara Y. Use of Cox's Cure Model to Establish Clinical Determinants of Long-Term Disease-Free Survival in Neoadjuvant-Chemotherapy-Treated Breast Cancer Patients without Pathologic Complete Response. *Int J Breast Cancer*. Epub, 2013

- emori K, Tamura K, 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
9. Harano K, Ando M, Sasajima Y, Yunokawa M, Yonemori K, Shimizu C, Tamura K, Katsumata N, Tsuda H, and Fujiwara Y: Primary yolk sac tumor of the omentum: a case report and literature review. *Case Rep Oncol.* 5(3):671-5, 2013
10. Ono M, Tsuda H, Yunokawa M, Yonemori K, Shimizu C, Tamura K, Kinoshita T, Fujiwara Y: Prognostic impact of Ki-67 labeling indices with 3 different cutoff values, histological grade, and nuclear grade in hormone-receptor-positive, HER2-negative, node-negative invasive breast cancers. *Breast Cancer.* Epub, 2013
11. Yunokawa M, Katsumata N, Yamamoto H, Kodaira M, Yonemori K, Shimizu C, Ando M, Tamura K, Fujiwara Y: 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
12. Kondo S, Ueno H, Hosoi H, Hashimoto J, Morizane C, Koizumi F, Tamura K, Okusaka T: Clinical impact of pentraxin family expression on prognosis of pancreatic carcinoma. *Br J Cancer.* 109(3):739-746, 2013
13. Tamura K, Kurihara H, Yonemori K, Tsuda H, Suzuki J, Kono Y, Honda N, Kodaira M, Yamamoto H, Yunokawa M, Shimizu C, Hasegawa K, Kanayama Y, Nozaki S, Kinoshita T, Wada Y, Tazawa S, Takahashi K, Watanabe Y, Fujiwara Y. ⁶⁴Cu-DOTA-trastuzumab PET imaging in patients with HER2-positive breast cancer. *J Nucl Med.* 54:1869-1875, 2013

2. 書籍

1. Kosaka N, Yoshioka Y, Hagiwara K, Tomioka N, Ochiya T. Functional analysis of exosomal microRNA in cell-cell communication research. In: Ochiya T (ed), *Methods Mol Biol*, volume 1024. Germany, Springer, pp 1-10, 2013

G . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許出願

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 (PCT出願済み、日本国、米国、欧州、中国、韓国に移行済み)
2. 出願番号 : 国際出願 PCT/IB2012/002626,

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(早期・探索的臨床試験分野))
 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	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	細田 雅人	インタープロテイン株式会社	代表取締役	
研究分担者	小松 弘嗣	インタープロテイン株式会社	事業開発本部長	
研究分担者	肥塚 靖彦	インタープロテイン株式会社	研究開発部長	
研究分担者	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

腫瘍の分子生物学的な研究の進展に伴い、がん治療に有用な標的分子が次々に明らかにされ、抗体やキナーゼ阻害剤などの様々な分子標的薬が開発され、従来の化学療法剤をはるかに凌ぐ臨床成績を実現したグリーベックなどの薬剤が開発された。このように、現在は、抗体医薬品やキナーゼ阻害剤などの分子標的薬が抗がん剤開発の主流であるが、それぞれに長所と短所があることから、新しい分子標的薬開発の標的として、蛋白質間相互作用(protetein-protein interaction; PPI)を制御できる低分子化合物が注目され、その研究が着実に増加している(図1)。このような流れの中で、表1に示すように、様々な標的に対するPPIを制御する低分子化合物が見いだされ、その中のいくつかの化合物は、臨床試験が行われている。そして、数種類のPPI制御低分子化合物が医薬品として販売されるに至っている(図2)。

インタープロテインは、PPI制御薬の開発に際して、抗体医薬により標的の有用性と市場ポテンシャルがvalidateされた標的をターゲットとして、抗体医薬と同じプロファイルを有する低分子化合物を創出することにより、医薬品創出の成功確度の向上を目指している。この目的に適合する標的としては、サイトカインとその受容体の相互作用の制御がそのメカニズムの面および有効性

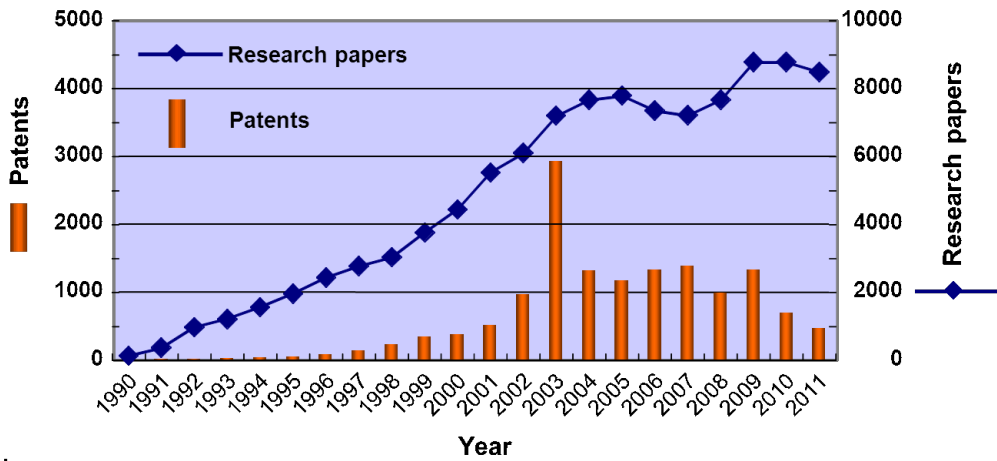
の面から有望であると考えている。そして、市場性の面からは、抗VEGF抗体、アバスチンが2018年には、世界最高の売上が期待され、その年間売上高は全世界で7556億円(1 USD = 100円)であることが、EvaluatePharma社により予測されている。

すなわち、本研究事業の目的は、VEGFを標的として、アバスチンと同じ作用機序を有する世界初の低分子PPI経口阻害剤を開発し、世界トップレベルの早期臨床開発拠点である国立がん研究センターにおいてphase 1臨床試験を実施することにより、'真'のイノベーションの創出を実現することである(図3)。

MDM2	RG7112/RO5045337 (Roche)	P-1	sarcoma etc.	oral
	JNJ-26854165 (E3) (J&J)	P-1	solid tumors	oral
	MI-219 (Michigan Univ.)	P-1	prostate	oral
Bcl-2	ABT-263/Navitoclax (Abbott)	P-1/2a	CLL etc.	oral
LFA-1	SAR1118 (SARcode)	P-3	dry eye	eye dr

Trend in PPI-related Researches

Changes in numbers of PPI-related papers and patents

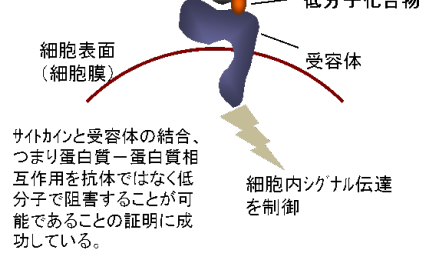


Note:

1. Research papers and patents were searched with a keyword "protein-protein-interaction (within title, abstract and keywords)" in a database "SCOPUS" provided by Elsevier on December 13, 2011.
2. An outstanding number of patent in 2003 seems to be relevant to increased application of patents of PPI-detecting methodologies mainly by US companies.
3. Numbers in 2011 are in a limited period of January 1 to December 13.

図1 PPI関連研究数の推移

表1 低分子PPI阻害剤の開発状況



VEGF	アバスタ
IL-6	アクテムラ
TNFアルファ	レミケード、ヒムリ
IL-1ヘータ	イリリス

抗サイトカイン抗体医薬は、遺伝子組換え技術により高価な経静脈投与薬であり、使用頻度の高い経口薬の開発が世界で望まれている。抗体医薬の標的蛋白質

図3 低分子VEGF阻害剤の研究開発計画

Launched small molecule PPI modulators

INN (M.W.; route)	Trade name	Company	Mechanism	Indication
Eltrombopag (443; p.o.)	Promacta Revolade	Ligand GSK	TPO-R agonist (induction of TPO-R-mediated signal)	Chronic ITP
Maraviroc (514; p.o.)	Selzentry	Pfizer	CCR5 antagonist (inhibition of gp120/CCR5 binding)	HIV infection
Plerixafor (503; s.c.)	Mozobil	Genzyme	CXCR4 antagonist (inhibition of SDF/CXCR4 binding)	Malignant lymphoma Multiple myeloma

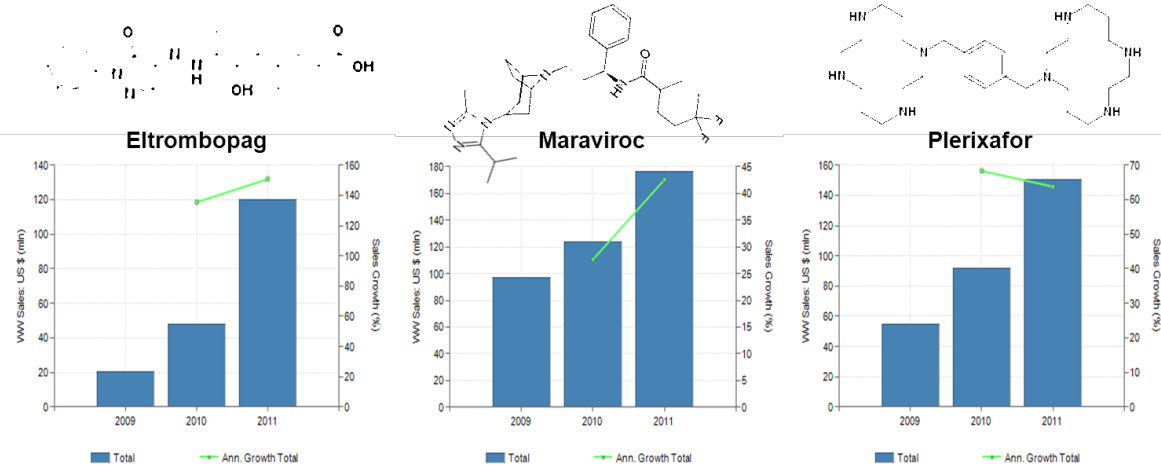


図2 市販されている低分子PPI制御薬

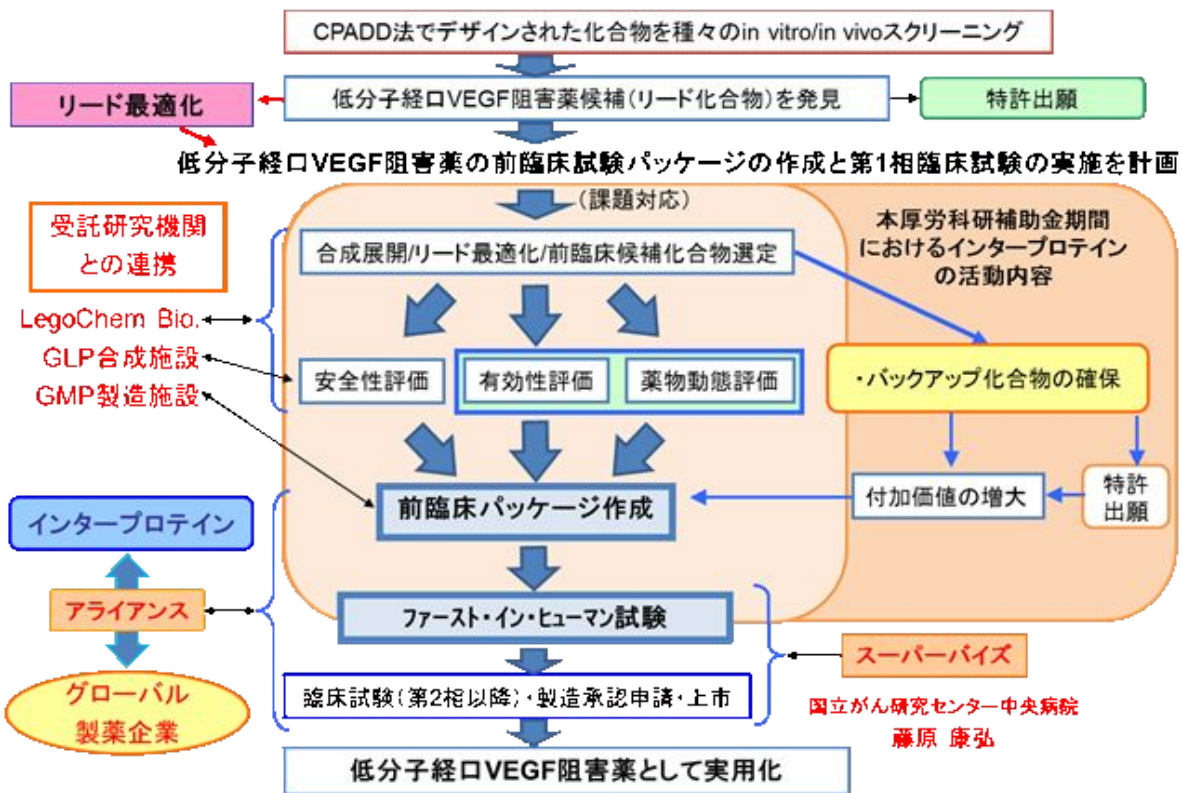


図4 研究方法

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。

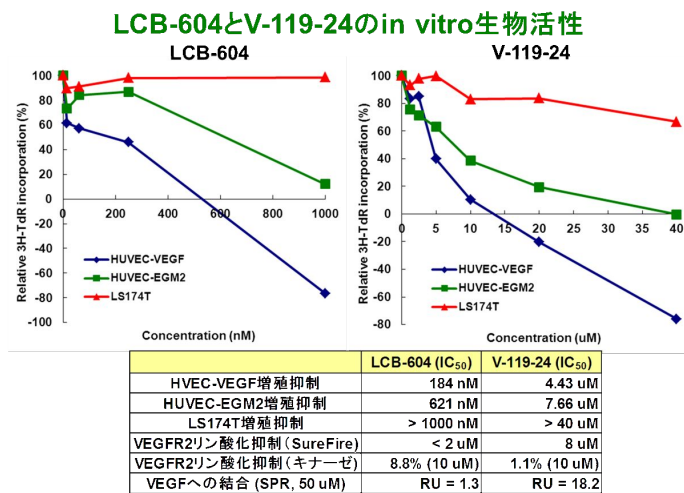


図5 LCB-603とV-119-24のin vitro生物活性

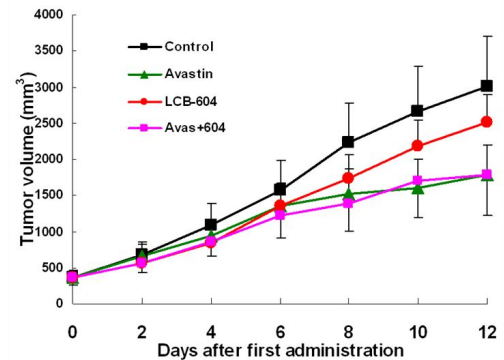
図5に示すように、V-119-24は、直接的にVEGFR2チロシンキナーゼを抑制することなく、VEGF₁₆₅により誘発されるHUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞)上のVEGFR2の1175番目のチロシンのリン酸化を抑制すること、および、その結果としてVEGF刺激HUVECの増殖を抑制すること (IC₅₀値 = 4.43 uM) が判明した。さらに、SPR法によりVEGF蛋白質に結合することも判明した。これらの結果は、V-119-24は、提案者の想定する作用機序により、VEGFシグナルを抑制

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。

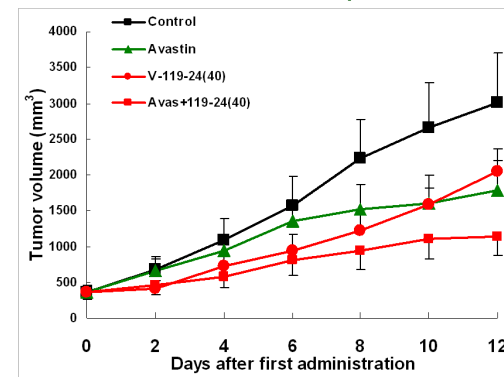
LCB-604の腫瘍増殖抑制作用 (Avastinとの併用)



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 (ng/mL)	SD (ng/mL)
	Group 1	Group 2	Group 3		
0.5	2740	2720	2730	2730	10
1	356	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 (ng/mL)	SD (ng/mL)
	Mouse1	Mouse2	Mouse3		
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HUVEC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HUVECの増殖抑制作用のIC₅₀値が4.4 μM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 μM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、経口投与時のBAを改善すること、および VEGF 刺激 HUVEC 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

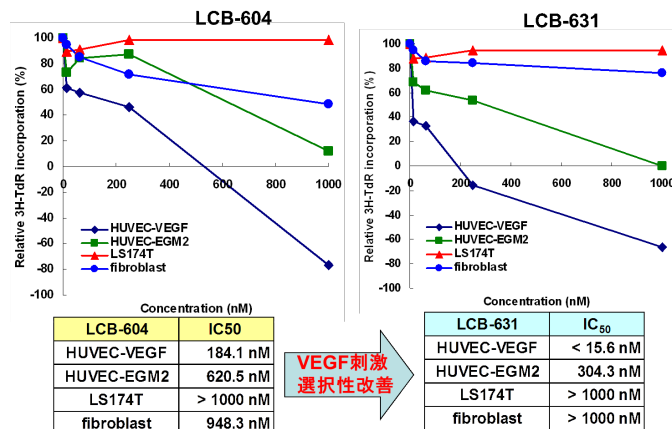
図8に、LCB-604とLCB-631のin vivo PKデータ

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。

LCB-604とLCB-631のin vitro生物活性の比較



VEGF刺激
選択性改善

図9 LCB-603とLCB-631のin vitro生物活性

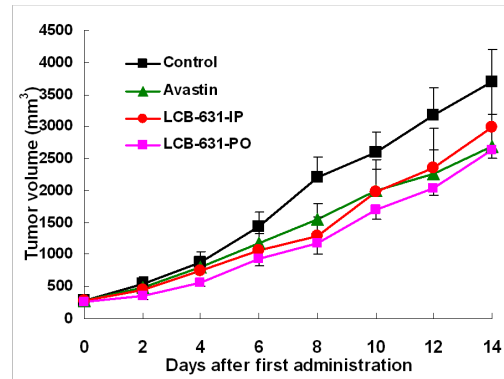
図9に示すように、VEGF刺激HUVECの増殖に対するLCB-631のIC₅₀値は、LCB-604のそれの10倍以上良好な値であった。その後、LCB-631のIC₅₀値を確定するため、4回検討を行い、IC₅₀値は、約34 nMであると結論付けたことから、LCB-604のそれに比べ約5倍改善されたことになる。一方、LS174T腫瘍細胞や繊維芽細胞に対するLCB-631のIC₅₀値は、LCB-604のそれと同程度であることから、LCB-631は、VEGF刺激HUVECに対して選択性が向上したと考えられた。

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。

VEGF阻害剤の作用機序と証明方法

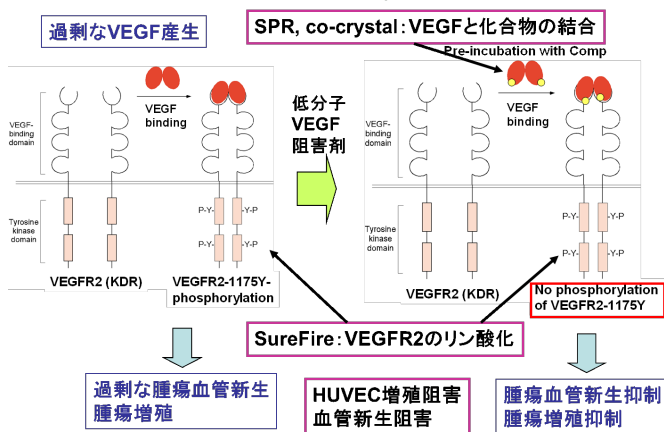


図12 VEGF阻害剤の作用機序とその証明法の模式図

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 μM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、アバスタ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 μM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 < 5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、医薬品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

C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。

【Xenograf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行きたい。

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

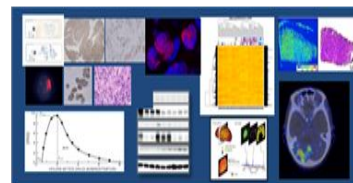
研究要旨

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。

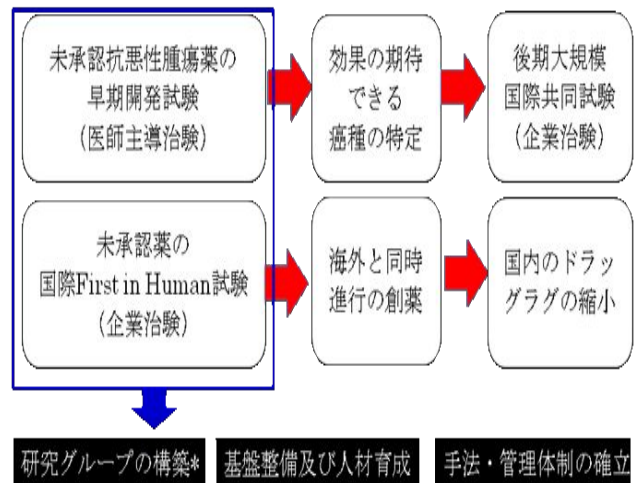
A. 研究目的

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。

POC取得を目的とする研究グループの構築



POC(Proof of Concept)
 早期臨床開発において、生体内で標的とする分子を効率的に阻害していることの証明する。又、効果が期待できる癌腫・患者集団に絞り込む。早期試験において、これらが実現するとは、創薬において有利となる。



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・手続きに関すること、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 活性をプ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。

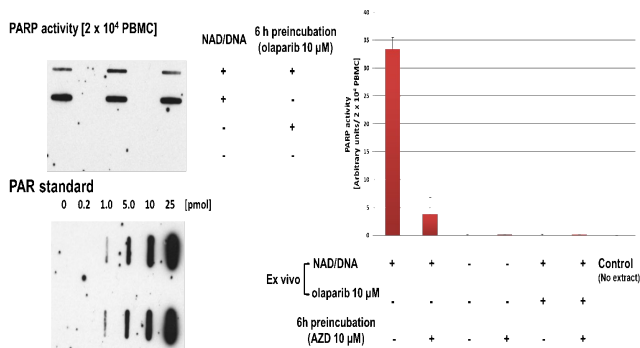


図 1 オラパリブ暴露時の PBMC 中の PARP 活性のドットプロット法による測定

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

ZD1208 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、研究に直接かわからない「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。

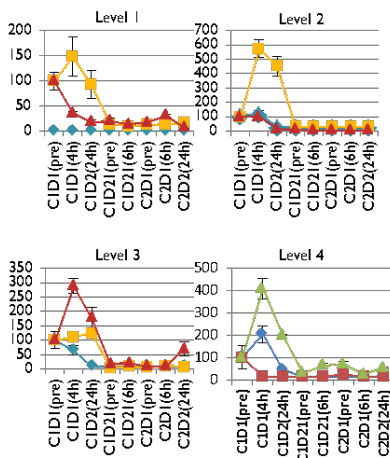
用量規制毒性 (DLT) には至らなかった。

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。

2. 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 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。
3. 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 F I H 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あるが、この枠組みは今後繋がる。

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、オラパリブとエリプ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 F I H 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

