

C. 研究結果

【リード化合物誘導体の合成展開】

一昨年度は、V-103 シリーズの LCB-604 の誘導体を合成し、LCB-631 が有望であることを報告した。昨年度は、LCB-631 の誘導体を合成し、LCB-477 が臨床開発候補物質の候補として最も有望であることを見出した。今年度は、LCB-477 の臨床応用を視野に入れた薬効試験、および、作用機序の研究を実施した。合成は、韓国の LegoChem Biosciences (LCB) 社が担当し、薬効試験や PK 試験に必要な LCB-477 の大量合成を行った。

【リード化合物誘導体の薬理学的・薬物動態学的評価】

我々は、臨床開発候補物質の定量目標を表 2 に示すように設定し、この目標を達成できる化合物の選抜を実施してきた。

表 2 臨床開発候補物質の定量目標

経口VEGF阻害薬の定量目標					
定量目標	作用機序(MOA) 証明	In vitro 活性(IC50値)	In vitro 選択性(IC50値)	In vivo 薬効と安全性	薬物動態 (初期評価)
医薬候補化合物	・完全な共結晶 ² → 取換 ・SPR ³ データ取得 ・SureFire ⁴ データ取得 ・キナーゼパネル	・数十nM～一桁 nM(ナノモル)	・100倍以上が理 想的	・数十mg/kgの 経口投与で先 行抗体医薬と 同等以上の薬 効確認 ・安全性確認	・25%以上の経 口吸収(BA(F)) ・血中濃度で薬 効説明可能 ・初期毒性試験 で安全域確認

昨年度は、最終的に LCB-477 を有望化合物として選び出し、詳細な検討を行い、以下に示す LCB-477 の生物学的活性を報告した。① LCB-477 の VEGF 刺激ヒト臍帯血静脈内皮細胞 (HUVEC) 増殖抑制作用、および LS174T ヒト大腸癌腫瘍細胞の増殖抑制作用の IC₅₀ 値はそれぞれ 72 nM および >16000 nM であり、in vitro の選択性は >222 倍となり、定量目標を達成した。② LCB-477 の 40 mg/kg 経口投与により、アバスチン 5 mg/kg 腹腔内投与と同等の in vivo 腫瘍増殖抑制作用を示したことから、定量目標を達成した。③ LCB-477 は 10 μM の濃度においても、VEGFR2 (KDR) を含む様々な受容体型チロシンキナーゼに対する直接的な阻害活性を示さないことから、MOA の面で定量目標の 1 つを達成した。以上の結果から、LCB-477 は、リード化合物の候補化合物として有望であると考えられた。

今年度は、LCB-477 について、さらに詳細な検討を実施した。

LCB-477 について、in vivo PK 試験を実施した。

その結果、表3に示すように、LCB-477を腹腔内投与した場合には、ほぼ100%血中へ移行し (BA (F) = 127%)、経口投与した場合にも、約70%が血中へ移行 (BA (F) = 69.5%)することが判明した。

表3 LCB-477のin vivo PK試験結果

Route	Dosing (mg/kg)	t _{1/2} (h)	t _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-∞} (h*ng/mL)	AUC ₀₋₂₄ (h*ng/mL)	AUC ₀₋₂₄ /D (h*mg/mL)	F (%)
IV	5	2.71	11A	7175	4115	4458	823	11A
IP	20	8.11	0.5	6507	20821	22703	1041	127
PO	20	6.51	0.5	3717	11769	12396	588	69.5

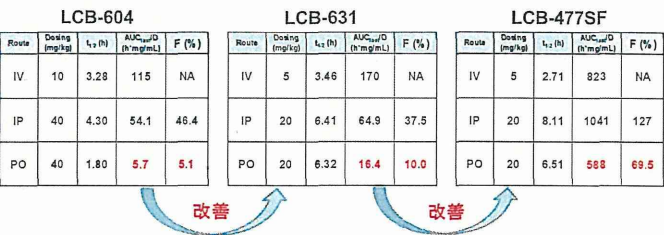


図5 LCB-604, -631, -477の経口投与時のBAの比較

図5に要約したように、LCB-631の経口投与時のBAが10%であったのに対し、LCB-477のそれは69.5%で、BAが7倍に増加した。しかも、AUC_{last}/Dの値は、16.4から588と約35倍に増加していることから、血中へ移行した化合物の絶対量が大幅に増加したことが判明した。

LCB-477SFの血中濃度の推移

20 mg/kg 腹腔内投与					
20 mg/kg IP Time (h)	Conc. (ng/mL)			Mean	SD
	Group 1	Group 2	Group 3	(ng/mL)	(ng/mL)
0.5	5930	6770	6820	6507	500
1	5750	5010	4350	5037	700
2	3520	2750	2930	3067	403
4	1400	632	1020	1017	384
8	399	496	560	485	81
24	181	172	129	161	28

20 mg/kg 経口投与					
20 mg/kg PO Time (h)	Conc. (ng/mL)			Mean	SD
	Group 1	Group 2	Group 3	(ng/mL)	(ng/mL)
0.5	3950	3570	3630	3717	204
1	3230	2970	2970	3057	150
2	2220	1590	1650	1820	348
4	794	661	729	728	67
8	159	158	334	217	101
24	62.7	85.5	51.8	66.7	17.2

図6 LCB-477の腹腔内投与および経口投与時の血中濃度の推移

LCB-477 20 mg/kg 腹腔内 (IP)投与および経口 (PO)投与時の血中濃度の経時的変化を図6に示す。

LCB-477 は、500 nM で VEGF 刺激 HUVEC のみならず EGM2 刺激 HUVEC の増殖をほぼ完全に抑制し、1000 nM では、完全に抑制した。LCB-477 の分子量は約 379 であることから、500 nM は 189.5 ng/mL、1000 nM は 379 ng/mL に相当する。

図6に示すように、腹腔内投与時は8時間後においても、また、経口投与時は4時間後においても1000 nMに相当する濃度以上の血中濃度が観察されたことから、20 mg/kg以上の用量の腹腔内および経口投与により腫瘍増殖抑制作用が期待できると考えられた。

そこで、LCB-477の40 mg/kg経口投与による腫瘍増殖抑制作用を検討したところ、図7に示すように、LCB-477は、アバスタチンとほぼ同等の腫瘍増殖抑制作用を示すことが明らかとなった。

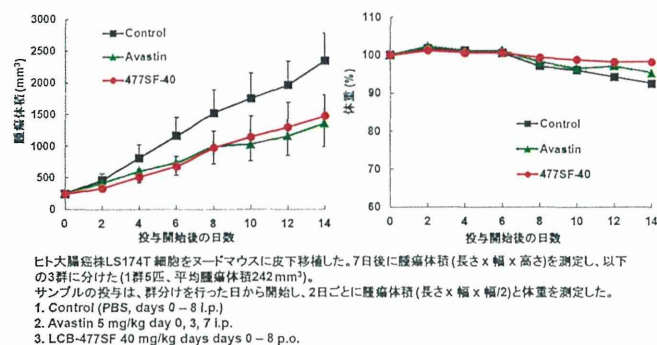


図7 LCB-477 40 mg/kg経口投与時の腫瘍増殖抑制作用]

アバスタチンは、化学療法剤 (オキサリプラチンとカペシタビンとの併用療法、XELOX療法)との併用で、進行・転移性の結腸・直腸癌にファーストライン治療として承認・使用されている。そこで、LS174T細胞をヌードマウスに皮下移植したxenograftモデルを用いて、LCB-477とオキサリプラチンの併用療法とアバスタチンとオキサリプラチンの併用療法の腫瘍増殖抑制作用を比較した。

LCB-477を経口投与すると、体重には全く影響を与えずに、明らかな腫瘍増殖抑制作用が観察された。オキサリプラチンの投与により、LCB-477と同等の腫瘍増殖抑制作用が観察されたが、明らかな体重減少が認められた。オキサリプラチンとLCB-477の併用では、併用により各薬剤単独に比べて、若干強い腫瘍増殖抑制作用が観察されたが、相加効果とは言えない程度の増強であった。興味深いことに、併用により、オキサリプラチン投与に起因する体重減少

が抑制された (図8)。

アバスタチンの投与では、体重には全く影響を与えずに、LCB-477より若干強い腫瘍増殖抑制作用が観察された。オキサリプラチンとアバスタチンを併用した場合には、各薬剤単独に比べて、若干強い腫瘍増殖抑制作用が観察されたが、オキサリプラチン投与に起因する体重減少は抑制しなかった (図9)。

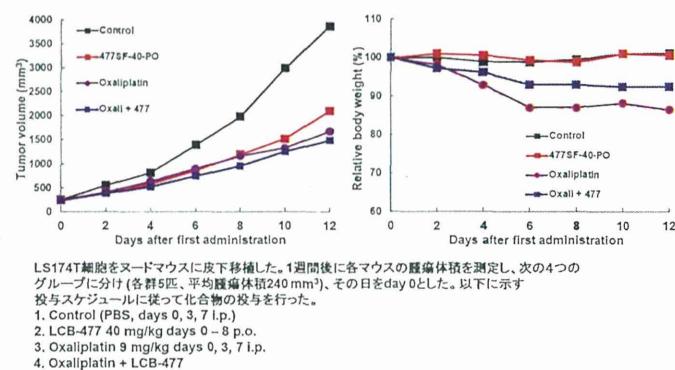


図8 LCB-477SFとオキサリプラチンの併用療法

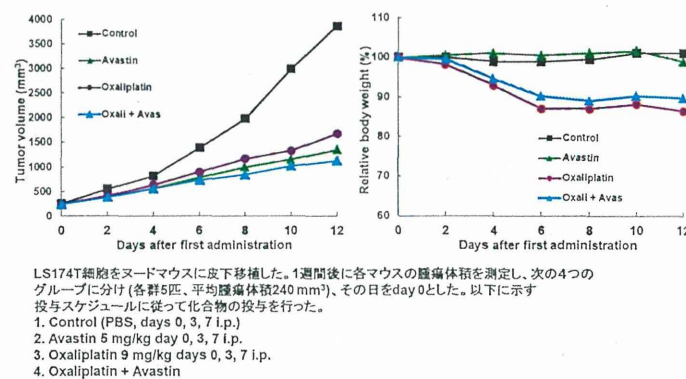
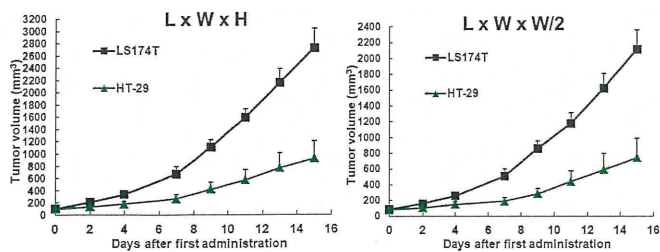


図9 アバスタチンとオキサリプラチンの併用療法

今回用いたxenograft modelと投与スケジュールでは、両併用療法で明らかな併用効果を見出すことができなかった。そこで、文献調査を行ったところ、HT-29 (ヒト結腸腺癌)細胞を用いたxenograft modelで、オキサリプラチンとアバスタチンの併用において、併用効果が観察されるという文献 (Mol Pharmacol 2008; 74:246-254)を見出した。

そこで、ヌードマウスに 4×10^6 cells/mouseのLS174T細胞あるいはHT-29細胞を皮下移植し、腫瘍の成長を比較した。その結果、HT-29は、ヌードマウスの皮下に生着し、腫瘍塊は順調に成長するが、その成長速度は、LS174T腫瘍塊に比べて、格段に遅いことが明らかとなった (図10)。

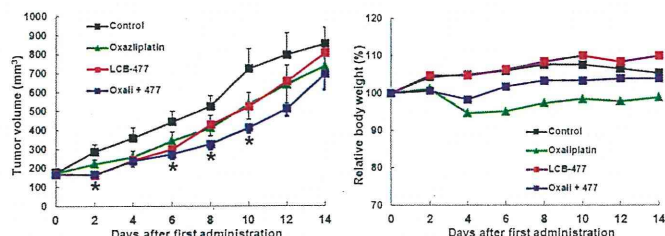


LS174T細胞あるいはHT-29細胞をヌードマウスに皮下移植し、1週間後から各マウスの腫瘍体積を経時的に測定した。腫瘍体積は、LxWxH、あるいはLxWxW/2で表した。L:長径、W:短径、H:高さ

図10 LS174T腫瘍とHT-29腫瘍の増殖

そこで、HT-29を皮下移植したxenograft modelを用いて、LCB-477 (40 mg/kg)経口投与とオキサリプラチンの併用効果およびアバスタチンとオキサリプラチンの併用効果を検討した。

その結果、図11に示すように、LCB-477単独は、体重に全く影響を与えずに、オキサリプラチンと同等の腫瘍増殖抑制作用を示した。そして、オキサリプラチンと併用することにより、オキサリプラチンに起因する体重減少を抑制し、さらに、腫瘍増殖に対して併用効果を示す傾向が観察された。

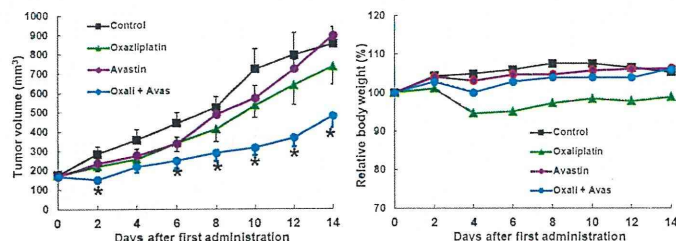


HT-29細胞をヌードマウスに皮下移植した。1週間後に各マウスの腫瘍体積を測定し、次の4つのグループに分け(各群5匹、平均腫瘍体積170 mm³)、その日をday 0とした。以下に示す投与スケジュールに従って化合物の投与を行った。

1. Control
2. Oxaliplatin 10 mg/kg days 0, 7 i.p.
3. LCB-477 40 mg/kg days 0-8 p.o.
4. Oxaliplatin + LCB-477

*p < 0.05 vs Control

図11 LCB-477とオキサリプラチンの併用療法



HT-29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170 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行った。

1. Control
2. Oxaliplatin 10 mg/kg days 0, 7 i.p.
3. Avastin 5 mg/kg days 0, 3, 7 i.p.
4. Oxaliplatin + LCB-477

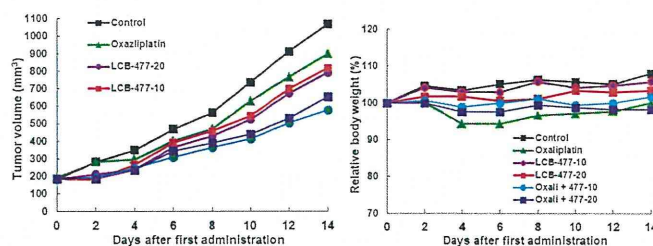
*p < 0.05 vs Control

図12 アバスタチンとオキサリプラチンの併用療法

一方、アバスタチンとオキサリプラチンを併用した場合には、オキサリプラチン投与により引き起こさ

れる体重減少をほぼ完全に抑制し、さらに、腫瘍増殖に対して明らかな併用効果が観察された。以上の結果より、HT-29を用いたxenograft modelの方が、併用効果が得られやすいことが判明した。さらに、アバスタチンとオキサリプラチンの併用の方が、LCB-477とオキサリプラチンの併用よりも、顕著な併用効果を示すことが明らかになった。

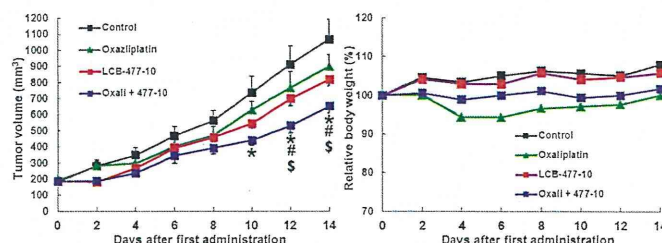
次いで、HT-29を用いたxenograft modelにおけるLCB-477の用量依存性を検討したところ、10 mg/kgの用量でも、オキサリプラチンと同等の腫瘍増殖抑制作用が観察された(図13)。そして、興味深いことに、LCB-477 (10 mg/kg)とオキサリプラチンと併用した場合は、day 12およびday 14において、併用は、各薬剤単独に比べて有意に強い腫瘍増殖抑制作用を示した(図14)。



HT-29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(LWW/2)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185 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行った。

1. Control
2. Oxaliplatin 10 mg/kg day 0, 7 i.p.
3. LCB-477 10 mg/kg days 0-8 p.o.
4. LCB-477 20 mg/kg days 0-8 p.o.
5. Oxaliplatin + LCB-477-10
6. Oxaliplatin + LCB-477-20

図13 LCB-477とオキサリプラチンの併用療法(用量依存性)



HT-29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(LWW/2)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185 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行った。

1. Control
2. Oxaliplatin 10 mg/kg day 0, 7 i.p.
3. LCB-477 10 mg/kg days 0-8 p.o.
5. Oxaliplatin + LCB-477-10

*p < 0.05 vs Control

#p < 0.05 vs 477-10

\$p < 0.05 vs Oxaliplatin

図14 LCB-477 10 mg/kgとオキサリプラチンの併用療法

そこで、HT-29を移植したxenograft modelを用いて、LCB-477 (10 mg/kg)経口投与とオキサリプラチンとの併用効果、アバスタチンとオキサリプラチンとの併用効果、およびLCB-477とアバスタチンの併用効果について比較した。

図15に示すように、今回の実験では、オキサリプラチンは、非常に弱い腫瘍増殖抑制作用しか示さなかったため、LCB-477は10 mg/kgの用量でも、オキサリプラチンよりも強い腫瘍増殖抑制作用を示した。そして、両者の併用においては、併用効果を示した。

アバスタチンとオキサリプラチンとの併用では、図16に示すように、アバスタチンは有意な腫瘍増殖抑制作用を示し、両者の併用で併用効果を示す傾向が観察された。

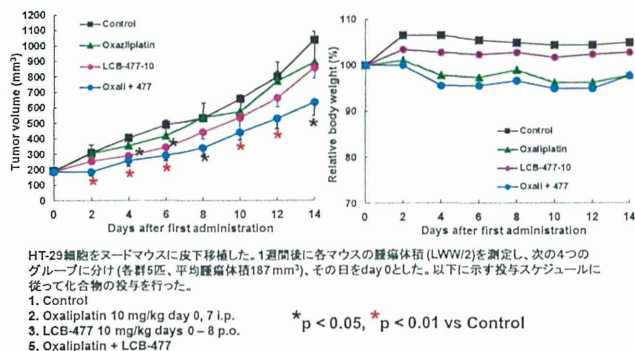


図15 LCB-477とオキサリプラチンの併用療法

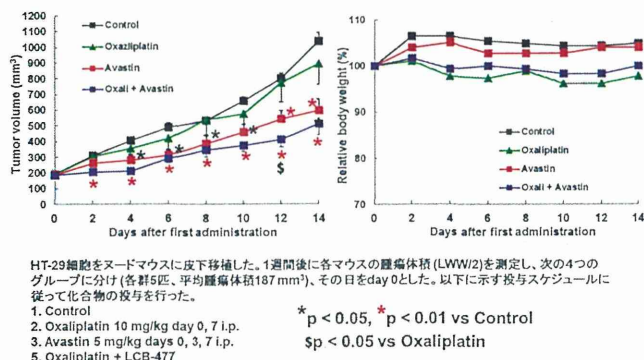


図16 アバスタチンとオキサリプラチンの併用療法

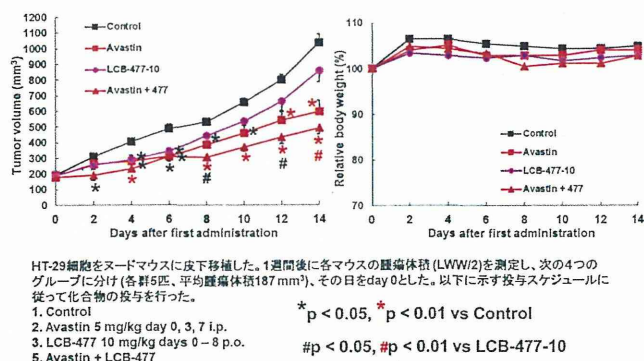


図17 LCB-477とアバスタチンの併用療法

図17に示すように、LCB-477とアバスタチンとの併用では、LCB-477は、投与期間中は、アバスタチン

とほぼ同等の腫瘍増殖抑制作用を示すことが明らかになった。そして、両者を併用した場合は、併用効果を示す傾向が観察され、その強さは、アバスタチンとオキサリプラチンとの併用と同等であった。

アバスタチンとオキサリプラチンの併用では、体重減少傾向が観察されたが、LCB-477とアバスタチンの併用では、体重に対して全く影響を与えなかった。両併用の腫瘍増殖抑制効果がほぼ同等であることを考え併せると、LCB-477とアバスタチンとの併用の方が、アバスタチンと化学療法剤との併用よりも優れていると考えられた。

ここで、LCB-477とアバスタチンが同様の作用機序を介して抗腫瘍効果を発揮すると仮定すると、理論的には両者の併用で併用効果を得ることは難しいと考えられる。以上のことから、LCB-477は、アバスタチンと異なる作用機序により、抗腫瘍作用を発揮している可能性が示唆された。

【LCB-477の作用機序】

LCB-477の想定作用機序と確認方法

我々の設計した低分子VEGFシグナル阻害化合物の想定される作用機構とその確認方法について、図18に模式的に示した。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, KDR) との相互作用を減弱させ、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。

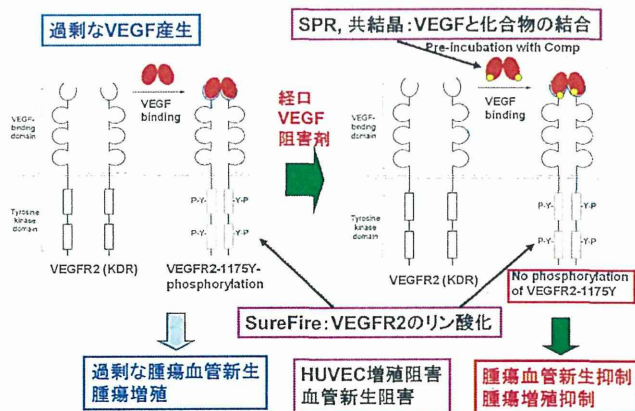


図18 VEGF阻害剤の想定作用機序

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)法および共結晶により、低分子化合物が、VEGFに結合していることを確認する。

- 2) VEGFとVEGFR2の相互作用の抑制については、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Sure Fire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へ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HUVECの増殖に対する効果として確認している。

LCB-477のHUVEC増殖抑制作用はキナーゼ阻害作用に起因しない

LCB-477はVEGF刺激HUVECの増殖を用量依存的に抑制し、そのIC₅₀値は、72 nMであることが明らかになった。

次いで、ヒトVEGF₁₆₅により誘導されるHUVEC上のVEGFR2の1175番目のリン酸化が、LCB-477とVEGF₁₆₅の前処理により抑制されるか否かを検討した。LCB-477SF 2, 10, 50 uMの3種類の濃度で検討した結果、抑制率は、それぞれ、23%, 74%, 74%であり、おおよそそのIC₅₀値は、8 uMであった。

さらに、LCB-477のVEGFR2 (KDR)、EGF受容体 (EGFR)、FGF受容体 1 (FGFR1)およびIGF受容体1 (IGFR1)のチロシンキナーゼに対する直接的なキナーゼ活性抑制作用を検討した。その結果、LCB-477は10 uMの濃度において、細胞内のATP濃度に近い1 mMのATP存在下のみならず、Km値付近のATP濃度においても、これらの4種類のチロシンキナーゼに対して直接的なキナーゼ活性阻害作用を示さなかった。以上の結果から、LCB-477の内皮細胞増殖抑制作用はキナーゼ阻害活性に基づくものではないことが明らかになり、想定した作用機序に従って、VEGF刺激HUVEC増殖抑制作用を発揮する可能性が示唆された。

そこで、作用機序の第一作用点に関する確証を得るために、LCB-477のVEGF蛋白質に対する結合能をSPR (surface plasmon resonance)法により検討したところ、LCB-477がVEGF蛋白質に結合する証拠を得ることができなかった。

さらに、LCB-477とVEGF蛋白質の共結晶を作製し、回折実験を行い、2.3 Åの分解能で得られたデータの解析を実施した。その結果、化合物に起因すると考えられる電子密度を観察することに成功しものの、さらなる詳細な解析により、LCB-477とVEGF蛋白質の結合を示す明確な証拠を得ることができなかった。

以上の結果を総合すると、LCB-477は、VEGFR2のリン酸化を抑制してVEGF刺激HUVECの増殖を抑制することは支持するが、第一作用点であるVEGF蛋白質への結合は支持しない、という結果が得られたと考えられた。この考えは、in vivo併用試験の結果から導き出された、LCB-477は、アバスチンと異なる作用機序により、抗腫瘍作用を発揮している可能性があるという考えを支持するものである。

そこで、第一作用点に関するヒントを得るために、LCB-477のin vitro血管新生に対する詳細な解析を実施した。

LCB-477のin vitro血管新生に対する作用

Fibrin-gel assay法により、LCB-477のin vitro血管新生に対する作用を検討した。

Fibrin-gel assayは、HUVECでコートしたビーズをFibrin-gelで包埋し、Fibrin-gelの上にVEGFなどの血管新生促進因子を産生するヒト線維芽細胞を播種して、培養する方法である。培地は、4種類の成長因子を含むEGM-2培地を用いる。EGM-2培地に含有される、あるいは、ヒト線維芽細胞が産生する血管新生促進因子により、HUVEC上にコートした内皮細胞から出芽が起こり、遊走、増殖、管腔形成という一連の血管新生過程がin vitroで再現される。

アバスチンは、血管新生を抑制することにより、固形癌の増殖抑制作用を発揮する。一方、DLL-4/Notch1シグナル阻害による非機能的な血管新生の促進が固形癌の増殖抑制作用につながることで、および、Notchシグナルを阻害するγ-セクレターゼ阻害剤、DAPTは、非機能的な血管新生を促進することが知られている。

構築したFibrin-gel assay法の有用性を検証するために、アバスチンおよびDAPTの血管新生に対する作用を検討した。その結果、図19に示すように、コントロールの0.5% DMSO処理では、管腔内が空洞となっている、すなわち、血液が流れる空間がある、機能的管腔構造 (inter-lumen様構造)が形成され、機能的な血管が形成される様子が観察された。アバスチン 10 ug/mL添加では、この管腔形成を含む血管新生が完全に抑制された。一方、DAPTを添加した場合には、管腔内が密に詰まっている、すなわち、血液が流れる空間が無い、非機能的管腔構造 (intra-lumen様構造)が形成され、非機能的な血管

が形成される様子が観察された。これらの結果は、構築したFibrin-gel assayにより、各薬剤の特性を検出できることを示している。

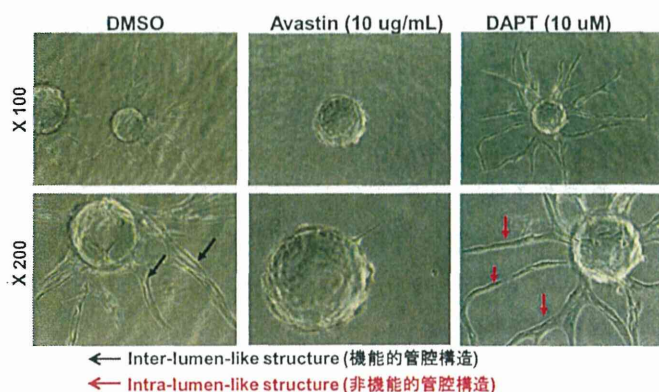


図19 アバスチンとDAPTのin vitro血管新生に対する作用

そこで、LCB-477のin vitro血管新生に対する作用を検討した。その結果、図20、21に示すように、コントロールの0.5% DMSO添加では、機能的な血管のネットワーク形成が観察された。LCB-477 100 nM添加では、ビーズ当たりの新生血管数はコントロールと差異はないが、形成される管腔が細く、短くなっていた。LCB-477 1 uMでは、血管は新生されるものの、機能的な血管の形成には至っていないことが明らかになった。そして、LCB-477 10 uMでは、アバスチンの場合と同様に、血管新生が完全に抑制された。

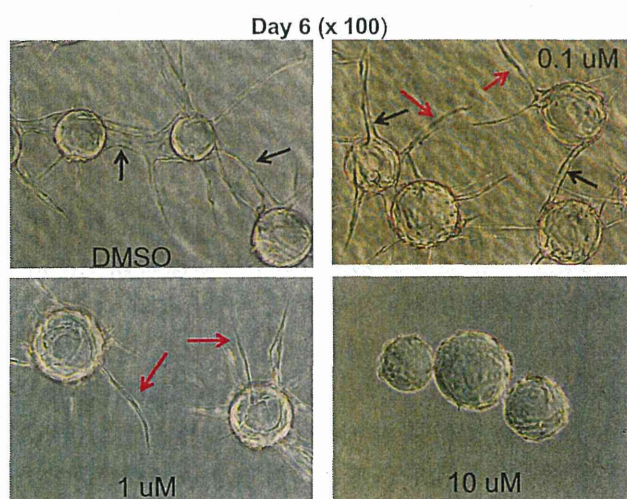


図20 LCB-477SFのin vitro血管新生に対する作用 (100倍で観察)

ここで、抗neuropilin-1 (NRP-1)抗体が、fibrin-gel assayにおいて、in vitro血管形成を抑制

することが報告されている (Cancer Cell 2007; 11:53-67)。そこで、文献的に抗NRP-1抗体の作用を精査した結果、LCB-477と同様の血管形成抑制作用を示すことが判明した。さらに、xenograft modelを用いて、抗NRP-1抗体とアバスチンを併用すると、相加的な生存期間延長作用が得られることも明らかとなった。

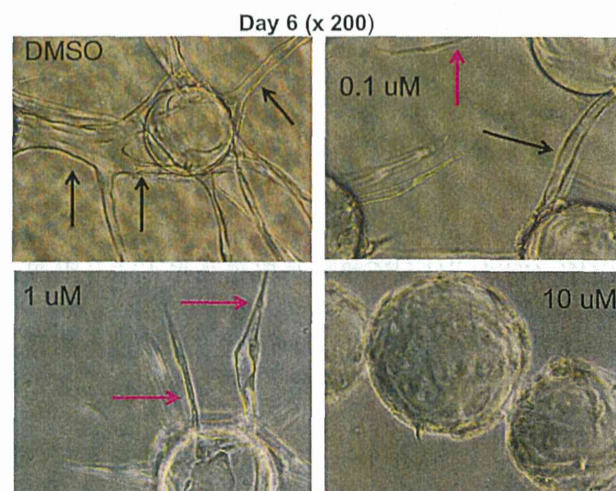


図21 LCB-477SFのin vitro血管新生に対する作用 (200倍で観察)

以上のことから、LCB-477の第一作用点は、NRP-1である可能性が示唆された。そこで、NRP-1とVEGFの相互作用を阻害する低分子化合物について、文献的に精査した結果、Compound-1に関する文献 (Cancer Letters 2014; 349:120-127)を見出した。そして、このCompound-1とLCB-477の化学構造式を比較したところ、興味深いことに、共通の部分構造を有することが判明した。

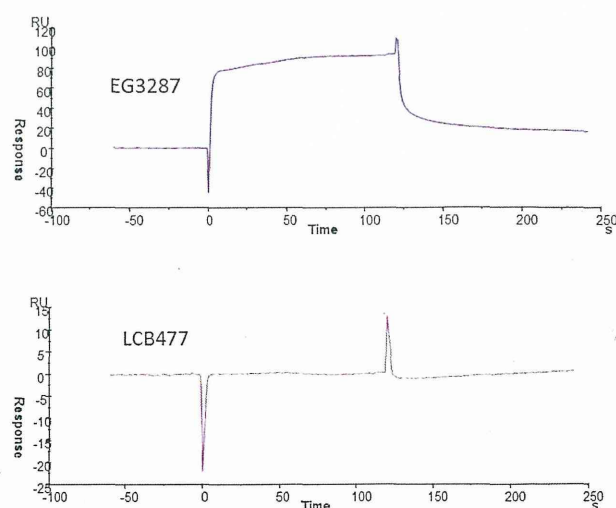


図22 EG3287とLCB-477のNRP-1に対する結合能 (SPR法)

そこで、LCB-477の作用機序の第一作用点がNRP-1であるか否かを検証するために、VEGFのNRP1 b1 domainへの結合を選択的に阻害するbicyclic peptideであるEG3287 (Br J Cancer 2010; 102:541-52)およびLCB-477がNRP-1蛋白質に結合するか否かをSPR法により検討した。

その結果、図22に示すように、EG3287は、NRP-1に結合することが明らかになったが、LCB-477の明らかな結合は確認できなかった。SPRの評価系構築上、NRP-1の蛋白質の構造上の特性がチップへの固定化を難しくしており、再度、系の構築の工夫を凝らし、真の結果を得る必要がある。

次いで、EG3287およびLCB-477のVEGF₁₆₅とNRP-1の結合に対する阻害活性を検討したところ、図23に示すように、EG3287は全く阻害活性を示さなかったが、LCB-477は若干の阻害作用を示した。EG3287のVEGFとNRP1の結合阻害をうまく検出できなかったことから、評価系の改善が必要と考えられるが、現時点では、LCB-477が、NRP-1へ結合し、その結果として、VEGF₁₆₅とNRP-1の相互作用を弱めるという証拠は得られていない。

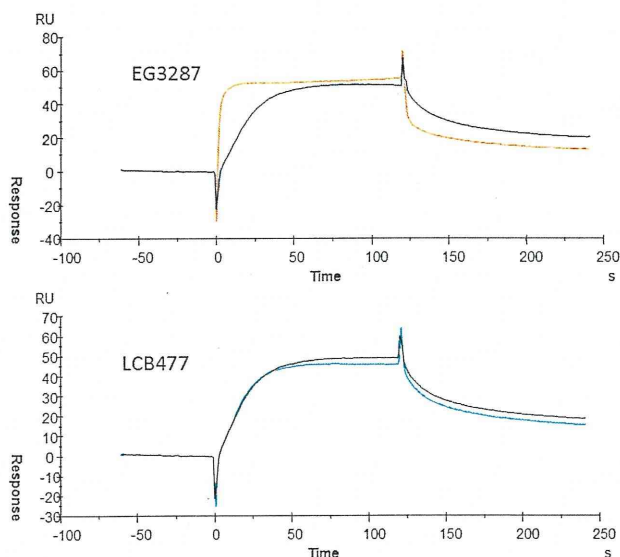


図23 EG3287とLCB-477のNRP-1とVEGFの結合阻害能 (SPR法)

D. 考察

【リード化合物誘導体の薬理学的・薬物動態学的評価】

【in vitro活性】

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-477SのIC₅₀値は72 nMである。LCB-477の作

用機序が明らかになった時点で、あと数倍の活性の増強を目指して、LCB-477の誘導体を合成するか否かを判断したい。

【選択性】

LS174T細胞の増殖に対するIC₅₀値とVEGF刺激HUVECのIC₅₀値との比を選択性の指標として用いると、LCB-477の場合は、222倍以上となり、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】

LS174Tヒト腫瘍細胞をヌードマウスに皮下移植したモデルを用いて、化合物投与開始時期の腫瘍体積を200 mm³超にすることにより、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-477 40 mg/kgの経口投与は、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。しかし、オキサリプラチンとの併用では、明らかな併用効果が観察されなかった。

そこで、LS174T細胞に比べて増殖速度が格段に遅いHT-29腫瘍細胞をヌードマウスに皮下移植したxenograft modelを構築し、化合物投与開始時期の腫瘍体積を150 mm³超にすることによりかなり厳しい条件での評価を実施した。その結果、この系においても、LCB-477は、40 mg/kg経口投与のみならず、10 mg/kgの経口投与においても、投与期間中は、アバスチンと同等の腫瘍増殖抑制作用を示すことを見出した。そして、オキサリプラチンの併用療法で、併用効果が観察されたのは、大きな成果であると考えている。

さらに、LCB-477とアバスチンの併用は、体重に影響を与えずに、アバスチンと化学療法剤との併用（体重減少が起こる）と同等の腫瘍増殖抑制作用がかんさつされたことは、特筆すべき点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LCB-477は、種々のキナーゼ活性に対する直接的な抑制作用が極めて弱いことから、ある種のキナーゼ阻害による予期せぬ副作用が出現する可能性が低いと考えている。これらの結果から、非臨床試験、さらにはFIH (first in human)に向かうにあたり自信を深めている。

【PKプロファイル】

LCB-477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った。さらに、経口投与によるBAは、70%と、目標を大きく凌駕する数値に到達している。この化合物の経口投与時の血中半減期は約6時間であることから、1日に複数回服用することにより、さらに強力な抗腫瘍作用が実現できると考えている。

【リード化合物誘導体の作用機序の解析】

LCB-477に関しては、生物学的な面からは想定通り、直接的なキナーゼ阻害とは別の機序で、VEGF R2の1175番目のチロシンのリン酸化を阻害することにより、VEGFシグナルを抑制している可能性が示唆されている。しかし、作用機序の第一作用点に関しては、VEGFに結合すること、あるいはNRP-1に結合するという証拠を得ることができていない。

そこで産総研の創薬分子プロファイリング研究センター（夏目研）に網羅的な探索を「血管内皮細胞増殖阻害化合物の作用機序に関する研究」と題して依頼した。

血管内皮細胞の増殖阻害化合物の作用機序を明らかにするために、化合物処理した際のリン酸化タンパク質の変動解析とパスイ解析を実施した。血管内皮細胞として HUVEC 細胞を用いて未処理（コントロール）および VEGF 処理群（DMSO 処理：DMSO_VEGF、化合物処理：化合物_VEGF）の 3 群調製した。化合物および VEGF による処理条件は化合物と VEGF を 37℃で 30 分間プレインキュベーションした後に、化合物濃度は 10 μM および VEGF 濃度は 25ng/ml となるよう調製し細胞に加え 37℃で 5 分間インキュベートし PBS による洗浄後細胞を回収した。回収した細胞を 7M Urea/ 2% SDS により変性・可溶化後、メタノール・クロロホルム抽出法によりタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質は還元アルキル化処理を行いプロテアーゼ処理によりペプチド断片化を行った。得られたペプチドは C18 カートリッジにより部分精製後、TiO2 カラムによりリン酸化ペプチドを濃縮精製した。得られたリン酸化ペプチドは LC-MS/MS 測定を実施した。クロマトグラフ条件は A: H₂O/0.1% ギ酸、B: アセトニトリル/0.1% ギ酸を用い B:0-25% 120min. のリニアグラジェントで分析を行った。MS/MS 測定は IDA 法により測定を行い、測定は AbSciex 社製 TripleTOF5600 質量分析装置で実施した。また、測定結果は AbSciex 社製の PloteinPilot ソフトウェアを用いてデータベース検索することにより、ペプチドの同定と各ペプチドのイオン強度を抽出し定量解析を行った。さらに、得られた各ペプチドのイオン強度からサンプル間の変動を解析し、その情報をもとにパスイ解析を実施した。

すべての解析から total で 7503 リン酸化ペプチドを同定した。そのうち VEGF 処理群中 DMSO と化合物処理サンプル間で変化のあったペプチドが 984 ペプチド認められた（ratio:0.5>=973、2.0<=11）。これらのうちコントロールと DMSO_VEGF 間で変動があったものは 116 ペプチドであった。さらにそのうち VEGF 処理で変化があり且つ DMSO 処理と化合物処理間で変化が認められたものは 101 ペプチドであった。これらのペプチドを含むタンパク質のパスイ解析を実施し 17 個のパスイが抽出され、これらのパスイが化合物処理により影響を受けている可能性があることが示唆された。

【今後の予定】

今年度は、産総研の結果の詳細な解析をインタープロテインにて実施し、早期に作用機序を明らかにし、臨床価値の判断を行い、非臨床試験を視野に本プロジェクトを遂行する。

【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 (protein-protein interaction) 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“今年度末に臨床開発候補物質の最終的な絞り込みを行う”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-447SFに到達することができた。今後の予定に示した計画通りに行動し、一刻も早く臨床開発候補物質を確定させたい。

実際に低分子性の臨床開発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。一方、ペプチド性候補化合物の場合も、世界初のユニークなペプチド性医薬品となり得る。以上のことから、これらの成果のインパクトは計り知れないと考えられる。臨床開発を成功させるために、欧州のファーマとアライアンス締結に向けて着実に課題を遂行してゆく。

E. 結論

‘真’のイノベーションによる低分子性およびペプ

チド性PPI阻害薬の創薬の実現に向けて、医薬候補化合物の決定への最終段階に至っている。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

2013年1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
医療技術実用化総合研究事業（早期探索的・国際水準臨床研究事業）
分担 研究報告書

国立がん研究センターPhase Iセンター早期開発研究

研究事業5 PARP阻害剤 医師主導治験

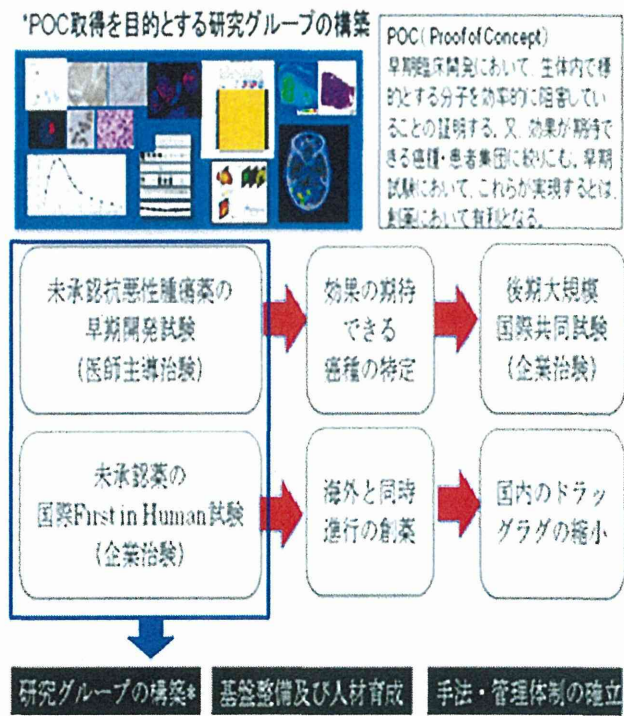
研究分担者 藤原 康弘 国立がん研究センター 戦略企画局 局長
研究分担者 田村 研治 国立がん研究センター中央病院 乳腺・腫瘍内科 科長
研究分担者 米盛 勸 国立がん研究センター中央病院 乳腺・腫瘍内科 医長

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、 $1.4\text{mg}/\text{m}^2$ 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 $1.4\text{mg}/\text{m}^2$ Day1, 8 + オラパリブ 25mg 1 日 2 回 ($50\text{mg}/\text{day}$)
Level 2	エリブリン $1.4\text{mg}/\text{m}^2$ Day1, 8 + オラパリブ 50mg 1 日 2 回 ($100\text{mg}/\text{day}$)
Level 3	エリブリン $1.4\text{mg}/\text{m}^2$ Day1, 8 + オラパリブ 75mg 1 日 2 回 ($150\text{mg}/\text{day}$)
Level 4	エリブリン $1.4\text{mg}/\text{m}^2$ Day1, 8 + オラパリブ 100mg 1 日 2 回 ($200\text{mg}/\text{day}$)
Level 5	エリブリン $1.4\text{mg}/\text{m}^2$ Day1, 8 + オラパリブ 150mg 1 日 2 回 ($200\text{mg}/\text{day}$)

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

（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めた。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。

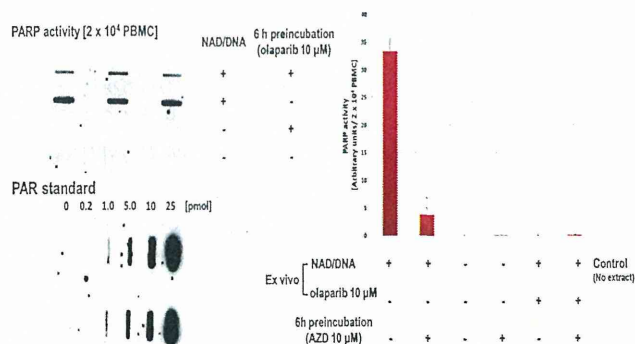


図 1 オラパリブ暴露時の PBMC 中の PARP 活性のドットプロット法による測定

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 AZD1208 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、脾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定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。

2. 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（平成26年5月28日効果安全性評価委員会）。

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。

3. 平成26年6月12日第II相部分の登録が全国10施設で開始となる（24例予定）。
4. 平成26年8月8日に第I相部分のデータカットオフを実施し解析開始した。
5. 平成26年12月16日第II相部分の登録が終了した。
6. 平成27年3月30日現在、継続投与は7例となっている。

【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。

3. その他
なし

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】

第I相部分及び第II相部分の症例登録を完了した。現在、試験治療を継続してデータの収集がつづいている。第 I 相部分での奏効割合も高く、第 I I 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
るが、この枠組みは今後に繋がる。

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、オラパリブとエリブリンの併用療法による Phase I/II 試験を施行した。第 I 相及び第 II 相部分の登録を完了した。

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 : なし

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
Nagatsuma AK, 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.	18(2)	227-38	2015
Doi T, Onozawa Y, Fuse N, Yoshino T, Yamazaki K, Watanabe J, Akimov M, Robson M, Bokku N, Ohtsu A.	Phase I dose-escalation study of the HSP90 inhibitor AUY922 in Japanese patients with advanced solid tumors.	Cancer Chemotherapy and Immunopharmacology.	74(3)	629-36	2014
Yano T, Ono H, Doi T, Hasegawa H, Honda M, Oono Y, Ikematsu H, Tanaka M, Kakushima N, Kaneko K, Sato A, Ohtsu A.	Endoscopic submucosal dissection using a new scissors-type electrosurgical knife: a first-in-human feasibility study.	Endoscopy.	46(9)	754-7	2014
Doi T, Ma Y, Donta, H, Haktanir A, Nippgen C, Nippgen J, Ohtsu A.	Phase I study of olaratumab in Japanese patients with advanced solid tumors.	Cancer Science.	105(7)	862-9	2014
Ando Y, Inada-Inoue M, Mitsunuma A, Yoshino T, Ohtsu A, Suganaga 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 Science.	105(3)	347-53	2014
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.	Investigational New Drugs.	32(2)	261-70,	2014

Takahari D, Bokku N, Mizusawa J, Takashima A, Yamada Y, Yoshino T, Yamazaki K, Koizumi W, Fukase K, Yamaguchi K, Goto M, Nishina T, Tamura T, Tsuji A, Ohtsu A.	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	19(4)	358-66	2014
Takashima A, Bokku N, Kato K, Nakamura K, Mizusawa J, Fukuda H, Shira K, Shimada Y, Ohtsu A	Survival prolongation after treatment failure of first-line chemotherapy in patients with advanced gastric cancer: combined analysis of the Japan Clinical Oncology Group Trials JCOG9205 and JCOG9912	Gastric Cancer	17(3)	522-8	2014
Yamada Y, Higuchi K, Nishikawa K, Gotoh M, Fuse N, Sugimoto N, Nishina T, Amagai K, Chin K, Niwano Y, Tsuji A, Imamura H, Tsukada M, Yasui H, Fujii H, Yamaguchi K, Yasui H, Hironaka S, Shimada K, Miwa H, Hamada C, Hyodo I.	Phase III study comparing oxaliplatin plus S-1 with cisplatin plus S-1 in chemotherapy-naïve patients with advanced gastric cancer.	Ann Oncol	26(1)	141-8	2015
Yasui H, Muro K, Shimada Y, Tsuji A, Sameshima S, Baba H, Satoh T, Deno T, Ina K, Nishina T, Yamaguchi K, Esaki T, Tokunaga S, Kuwano H, Bokku N, Komatsu Y, Watanabe M, Hyodo I, Morita S, Sugihara K.	A phase 3 non-inferiority study of 5-FU/leucovorin/irinotecan (FOLFIRI) versus irinotecan/S-1 (IRIS) as second-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer: updated results of the FOLFIRI study.	J Cancer Res Clin Oncol	141(1)	153-60	2015

Funakoshi T, Yasui H, Boku N, Fukutomi A, Yamazaki K, Machida N, Toriyama T, Yokota T, Onozawa Y, Kenmotsu H, Endo M	Clinicopathological Features and Outcomes of Gastric Cancer Patients with Pulmonary Lymphangitis Carcinomatosa.	Jpn J Clin Oncol	44(9)	792-8	2014
Sasaki Y, Nishina T, Yasui H, Goto M, Muro K, Tsuji A, Konizumi W, Tohyama Y, Hara T, Miyata Y.	Phase II trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel as second-line chemotherapy for unresectable or recurrent gastric cancer.	Cancer Sci.	105(7)	812-7	2014
Sasaki T, Fuse N, Kuwata T, Nomura S, Kaneko K, Doi T, Yoshino T, Asano H, Ochiai A, Komatsu Y, Sakamoto N, Ohno A	Serum HER2 levels and HER2 status in tumor cells in advanced gastric cancer patients.	Jpn J Clin Oncol	45(1)	43-8	2015
Abe A, Kuwata T, Yamauchi C, Higuchi Y, Ochiai A	High Mobility Group Box1(HMGB1) released from cancer cells induces the expression of pro-inflammatory cytokines in peritoneal fibroblasts.	Pathol Int	64(6)	267-75	2014
Mukai, H; Takahashi, S; Nozawa, M; Onozawa, Y; Miyazaki, J; Ohno, K; Suzuki, K.	Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study (TED 11576) of cabazitaxel in Japanese patients with castration-resistant prostate cancer.	Cancer Chemother Pharmacol.	73(4)	703-10	2014
Nishio M, Horike A, Nokihara H, Horinouchi H, Nakamichi S, Wakui H, Ohyanagi F, Kudoh K, Yanagitani N, Takahashi S, Kuboki Y, Yamamoto N, Yamada Y, Abe M, Tahata T, Tamura T.	Phase I study of the anti-MET antibody onartuzumab in patients with solid tumors and MET-positive lung cancer.	Invest New Drugs.	Published on line		2015

Kadowaki S, Kakuta M, Takahashi S, Takahashi A, Arai Y, Nishimura Y, Yatsuoka T, Ooki A, Yamaguchi K, Matsuoka K, Muro K, Akagi K	Prognostic value of KRAS and BRAF mutations in curatively resected colorectal cancer.	World J Gastroenterol	21 (4)	1275-83	2015
Ooki A, Akagi K, Yatsuoka T, Asayama M, Hara H, Takahashi A, Kakuta M, Nishimura Y, Yamaguchi K	Combined microsatellite instability and BRAF gene status as biomarkers for adjuvant chemotherapy in stage III colorectal cancer.	J Surg Oncol	110(8)	982-8	2014
Ooki A, Akagi K, Yatsuoka T, Asayama M, Hara H, Yamamoto G, Nishimura Y, Yamaguchi K	Inverse effect of mucinous component on survival in stage III colorectal cancer.	J Surg Oncol	110(7)	851-7	2014
土原一哉	国内における臨床シークエンスの展開	医学の歩み	249	1133-1138	2014
土原一哉	生検材料の臨床シークエンスがもたらす新しいがん診療	病理と臨床	32	888-894	2014
Fujiwara T, Takahashi RU, Kosaka N, Nezu Y, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T.	RPN2 gene confers osteosarcoma cell malignant phenotypes and determines clinical prognosis	Mol Ther Nucleic Acids	3	e189	2014
Takahashi RU, Ochiya T.	RPN2: a promising therapeutic target for breast cancer?	J Stem Cell Res, Rev & Rep	1	2	2014
Tominaga N, Fujiwara K, Kosaka N, Honma K, Nakagama H, Ochiya T.	RPN2-mediated glycosylation of tetraspanin CD63 regulates breast cancer cell malignancy.	Mol Cancer	13	134	2014

Expression profiles of HER2, EGFR, MET and FGFR2 in a large cohort of patients with gastric adenocarcinoma

Akiko Kawano Nagatsuma · Masaki Aizawa ·
Takeshi Kuwata · Toshihiko Doi · Atsushi Ohtsu ·
Hirofumi Fujii · Atsushi Ochiai

Received: 5 February 2014 / Accepted: 8 February 2014 / Published online: 14 March 2014
© The International Gastric Cancer Association and The Japanese Gastric Cancer Association 2014

Abstract

Background Some tyrosine kinase receptors (RTKs) play critical roles in gastric cancer progression. Not only trastuzumab, but also several other agents targeting RTKs are being investigated for gastric cancer therapy. However, the simultaneous expression of multiple RTKs, which may interfere with the effectiveness of therapeutic agents, has not been evaluated in a large cohort with gastric adenocarcinoma (GAC).

Methods We performed a tissue microarray analysis in 950 patients with GAC who underwent a gastrectomy without preoperative chemotherapy. The protein expressions of HER2, EGFR, MET and FGFR2 were evaluated using immunohistochemistry, and the gene amplifications of HER2, EGFR and MET were examined using dual-color in situ hybridization.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10120-014-0360-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. K. Nagatsuma · T. Kuwata · A. Ochiai (✉)
Division of Pathology, Research Center for Innovative
Oncology, National Cancer Center Hospital East,
6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa-city, Chiba 277-8577, Japan
e-mail: aochiai@east.ncc.go.jp

A. K. Nagatsuma · H. Fujii
Division of Medical Oncology, Jichi University School
of Medicine, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke-city,
Tochigi 329-0498, Japan

M. Aizawa
Division of Surgery, Niigata Cancer Center Hospital,
2-15-3 Kawagishicho, Niigata-city, Niigata 951-8566, Japan

T. Doi · A. Ohtsu
Division of Gastroenterology, National Cancer Center Hospital
East, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa-city, Chiba 277-8577, Japan

Results The frequency of overexpression was 11.8 % for HER2, 23.5 % for EGFR, 24.9 % for MET and 31.1 % for FGFR2. Whereas strong staining for each of the RTKs was heterogeneous, tumors with homogeneously strong staining areas often exhibited gene amplification. Strong EGFR expression was significantly associated with a poor outcome, but no prognostic correlations were observed in other RTKs. The overexpression of single and multiple RTKs was observed in 40.4 and 22.7 % of the cases, respectively. HER2, EGFR, MET and FGFR2 predominance was observed in 10.1, 13.9, 16.1 and 22.9 % of the GACs, respectively.

Conclusions Approximately two-thirds of patients with GAC exhibited the expression of at least one RTK and would be candidates for targeted therapies. Moreover, one-third of at least one RTK overexpressing cases showed multiple RTKs expression. Our results may be useful for selecting the most suitable patients for each targeted therapy.

Keywords Receptor protein-tyrosine kinases · Immunohistochemistry · Gene amplification · Prognosis · Molecular targeted therapy

Introduction

Gastric cancer is one of the most common malignant tumors worldwide. Although its incidence is decreasing, gastric cancer is still the second most frequent cause of cancer-related death in Japan [1, 2]. The prognosis of patients with advanced gastric cancer remains poor, and the median survival time of patients with inoperable and/or gastric cancer is <1 year [3, 4].

Nowadays, the molecular mechanisms underlying tumorigenesis, proliferation, progression and drug resistance in