

# . 分担研究報告書

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1. 抗体DDS製剤開発に関する研究

研究分担者	安永 正浩	国立がん研究センター東病院	臨床開発センター	がん治療開発部	室長
	土井 俊彦	国立がん研究センター東病院	臨床開発センター	消化管内科	副科長
	佐藤 暁洋	国立がん研究センター東病院	臨床開発センター	臨床試験支援室	室長
	大津 敦	国立がん研究センター東病院	臨床開発センター	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 を創製して、胃がん・膵臓がんモデルで有効性を確認した。さらに、抗 TF 抗体のキメラ化を行い、GMP 製剤作製のためのオプティマイゼーションの最終段階に移行した。

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 治験および引き続き 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 およびエピソードの同定を行った。
- 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膵臓がん 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

認めた。

- 5) 抗TF抗体の可変部H鎖、L鎖の遺伝子及びCDRの決定を行った。さらに、抗体キメラ化を行った。GMP製剤作製のためのオプティマイゼーションを開始して、最終段階に到達した。

#### 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 はがんと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見られた。

#### 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。キメラ抗体も作製できて、GMP 製剤のためのオプティマイゼーション最終段階に移行した

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yamamoto Y, Hyodo I, Koga Y, Tsumura R, Sato R, Obonai T, Fuchigami H, Furuya F, Yasunaga M, Harada M, Kato Y, Ohtsu A, Matsumura Y. Enhanced antitumor effect of anti-tissue factor (TF) antibody-conjugated epirubicin-incorporating micelles in xenograft models. *Cancer Sci.* 2015.
2. Koga Y, Manabe S, Aihara Y, Sato R, Tsumura R, Iwafuji H, Furuya F, Fuchigami H, Fujiwara Y, Hisada Y, Yamamoto Y, Yasunaga M, Matsumura Y. Antitumor effect of antitissue factor antibody-MMAE conjugate in human pancreatic tumor xenografts. *Int J Cancer.* 2015.
3. Ahn J, Miura Y, Yamada N, Chida T, Liu X, Kim A, Sato R, Tsumura R, Koga Y, Yasunaga M, Nishiyama N, Matsumura Y, Cabral H, Kataoka K. Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic

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、フリーのエピルビシンは両ミセル体比べて有意な体重減少を

cancer. *Biomaterials.* 2014, 23-30.

4. Sato R, Obonai T, Tsumura R, Tsumoto K, Koga Y, Yasunaga M, Matsumura Y. Preparation and characterization of anti-tissue factor single-chain variable fragment antibody for cancer diagnosis. *Cancer Sci.* 2014. 105, 1631-7.

##### 2. 学会発表

1. Yasunaga M, Manabe M, Tarin D, Matsumura Y. Development of CAST (Cancer stromal targeting) therapy. 4th International Conference on Tumor Progression and Therapeutic Resistance. 2014-3/9-3/10, USA・Boston.
2. Yasunaga M, Manabe S, Tarin D, Matsumura Y. Tailored antibody drug conjugate (ADC) therapy depending on a quantity of tumor stroma AACR Annual Meeting. 2014-4/7, USA・San Diego.
3. Yasunaga M, Manabe S, Tarin D, Matsumura Y. Development of CAST (Cancer stromal targeting) therapy. 25<sup>th</sup> Antibody Engineering & Therapeutics. 2014-12/8-12/10, USA・Huntington Beach.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

発明の名称：抗 Tissue Factor モノクローナル抗体

発明人：松村保広、安永正浩、古賀宣勝、山本祥之、佐藤隆太、津村遼、片岡一則、西山伸宏、三浦裕、眞鍋史乃、加藤泰己 出願人：独立行政法人国立がん研究センター 国立大学法人 東京大学 独立業際法人理化学研究所 ナノキャリア株式会社

特願 2014-18586 (出願日：2014年2月5日)

##### 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  
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2. TAS102に関する研究

研究分担者	土井 俊彦	国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター	先端医療科長
研究分担者	安井 博史	静岡県立静岡がんセンター	消化管内科 副院長兼部長
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	四国がんセンター	内科 医長
研究分担者	土原 一哉	国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター	TR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	癌研究所有明病院	総合腫瘍科 部長
研究分担者	桑田 健	国立がん研究センター東病院	病理検査科 医員
研究分担者	朴 成和	聖マリアンナ医科大学病院	腫瘍内科 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**

進行性胃癌患者を対象に未承認薬である TAS102 を用いた非盲検 single-arm の第 相の医師主導治験の登録（35 mg/m<sup>2</sup> bid:29 例, 40mg/m<sup>2</sup> bid:6 例）は終了（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、Primary endpoint である 35 mg/m<sup>2</sup> bid コホートの PPS8W の disease control が 29 例中 19 例（65.5%）であった。さらに高用量の 40mg/m<sup>2</sup> bid での安全性についても 6 例で検証された。PK は用量依存性に増加したが安全性は同様の傾向であった。切除不能進行胃癌に対するスルファサラジンでも POC 取得を目的とした医師主導試験（第 相試験）をおこない、POC および安全性を評価した。CDDP との併用試験について臨床試験を開始した

**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。また、がん幹細胞理論に基づく切除不能進行胃癌に対するスルファサラジンのPOC臨床試験を実施する。

**B. 研究方法**

平成23年度に開始した進行性胃癌患者を対象に未承認薬であるTAS102を用いた非盲検single-armの第 相の医師主導治験のプロトコル改訂を行い、高容量の40mg/m<sup>2</sup> bid doseでの安全性を検証した。

さらに切除不能進行胃癌に対するスルファサラジンでの医師主導試験（第 相試験）でのPOCおよび安全性の評価に基づき、化学療法との併用試験について医師主導研究をおこなった。

**（倫理面への配慮）**

医師主導治験については、薬事法の下で行う。国立がん研究センターにて運用している受託研究審査委員会および倫理審査委員会の審査に基づきヘルシンキ宣言、臨床研究に関する倫理指針、GCPなどの臨床研究に関する各指針に従って臨床研究・治験を実施する。

**C. 研究結果**

TAS102を用いた医師受動治験は大鵬薬品株式会社との共同研究契約締結後、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てきた。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。医師主導治験では35 mg/m<sup>2</sup> bid コホートとして全29例が登録され、DCRは65.5%（95%信頼区間、45.7-82.1%）が得られ、閾値DCRの30%は大きく超え、主要評価項目を満たした。その他、RRは3.4%、PFS中央値2.9ヶ月、OS中央値8.7ヶ月であった。Grade3/4の好中球減少69.0%、白血球減少 41.4%、貧血20.7%、食欲不振10.3%に認めた。86.2%が増悪（PD）まで治療を行えた。また、高用量である40mg/m<sup>2</sup> bid doseに6名を投与したが、PKは用量依存性に増加するも許容できない毒性は認めなかった。スルファサラジンの医師主導研究においては、11例の登録を経て次相に進むためのoptimal doseを8g/dayと決定した。CD44v陽性の8例のうち4例に発現低下を認め、mode of actionを確認し、CDDPとスルファラサジンの併用を検討する試験に移行している。

**D. 考察**

進行性胃癌患者を対象に未承認薬であるTAS102を用いた非盲検single-armの第 相の医師主導治験は、登録の進捗、安全性、試験の質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た。また、がん幹細胞理論に基づくスルファサラジンの医師主導研究は、POCを確立し、CDDPの併用試験を開始可能であった。

#### 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、スルファサラジンを用いたがん幹細胞理論に基づくPOC試験により早期臨床試験体制を確立し、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、論文文化、報告する予定である

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 朴 成和

1. 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
2. Takahari D, Boku 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
3. Takashima A, Boku N, Kato K, Nakamura K, Mizusawa J, Fukuda H, Shirao 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

###### 安井 博史

1. Yamada Y, Higuchi K, Nishikawa K, Gotoh M, Fuse N, Sugimoto N, Nishina T, Amagai K, Chin K, Niwa Y, Tsuji A, Imamura H, Tsuda 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*. 2015 Jan;26(1):141-8. doi: 10.1093/annonc/mdu472. Epub 2014 Oct 14.
2. Yasui H, Muro K, Shimada Y, Tsuji A, Sameshima S, Baba H, Satoh T, Denda T, Ina K, Nishina T, Yamaguchi K, Esaki T, Tokunaga S, Kuwano H, Boku N, Komatsu Y, Watanabe M, Hyodo I, Morita S, Sugihara K. A phase 3 non-inferiority study of

5-FU/l-leucovorin/irinotecan (FOLFIRI) versus irinotecan/S-1 (IRIS) as second-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer: updated results of the FIRIS study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014 Aug 9.

3. Funakoshi T, Yasui H, Boku N, Fukutomi A, Yamazaki K, Machida N, Todaka A, Tsushima 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*. 2014 Jul 23. pii: hyu091.
4. Sasaki Y, Nishina T, Yasui H, Goto M, Muro K, Tsuji A, Koizumi W, Toh 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*. 2014 Jul;105(7):812-7. doi: 10.1111/cas.12419. Epub 2014 Jul 7.

###### 桑田 健

1. Sasaki T, Fuse N, Kuwata T, Nomura S, Kaneko K, Doi T, Yoshino T, Asano H, Ochiai A, Komatsu Y, Sakamoto N, Ohtsu A; Serum HER2 levels and HER2 status in tumor cells in advanced gastric cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 45(1):43-8.2015
2. 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
3. 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

###### 高橋 俊二

1. 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-resist

ant prostate cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 201;73(4):703-10.

2. Nishio M, Horiike A, Nokihara H, Horinouchi H, Nakamichi S, Wakui H, Ohyanagi F, Kudo 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. 2015 Mar 18.

#### 山口 研成

1. Kadowaki S, Yamaguchi K, et al. Prognostic value of KRAS and BRAF mutations in curatively resected colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2015 Jan 28;21(4):1275-83
2. Ooki A, Yamaguchi K et al. Combined microsatellite instability and BRAF gene status as biomarkers for adjuvant chemotherapy in stage III colorectal cancer. J Surg Oncol. 2014 Dec;110(8):982-8.
3. Ooki A, Yamaguchi K et al. Inverse effect of mucinous component on survival in stage III colorectal cancer. J Surg Oncol. 2014 Dec;110(7):851-7.

#### 土原 一哉

1. 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.
2. 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

#### 2. 学会発表

##### 土井 俊彦

1. Shitara K, Takahashi S, Nakajima T, Hironaka S, Nagano O, Imamura C, Mushiroda T, Einaga Y, Fukunani M, Sato A, Ohtsu A, Saito H, Doi T. Sulfasalazine (SSZ) works cancer stem-like cells (CSCs) via inhibiting xCT signal pathway: Phase 1 study in patients with gastric cancer (EPOC 1205), AACR 2014
2. 土井俊彦. 分子標的治療薬の現状: 胃癌を中心に. 第103回日本病理学会総会 広島市 2014

##### 朴 成和

1. Izawa N, Boku N, et al. Predictive signature of response to EGFR tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer cells by tyrosine kinase activity profiling. AACR 2014
2. Nagase M, Boku N, et al. The impact of early tumor shrinkage on survival in WJOG4407G trial, a randomized phase III trial of mFOLFOX6 plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab in first-line treatment for metastatic colorectal cancer. ASCO-GI, 2015

#### 安井 博史

1. 町田 望、安井博史ら。「消化管・肝胆膵原発の進行神経内分泌癌(NEC)を対象とした全身化学療法の後方視的解析」第86回日本胃癌学会総会 2014年3月22日
2. 島田安博、山口研成、畝川芳彦、小室泰司、田村孝雄、土井俊彦、行澤斉悟、安井博史、長島文夫、後藤昌弘、江崎泰斗、前田開治郎、Chandrawansa Kumari、Wilke Hansjochen、大津敦「進行胃癌におけるRAM/PTX併用第三相試験(RAINBOW):日本人及び欧米人の部分集団解析」第52回日本癌治療学会学術集会 2014年8月29日

#### 桑田 健

1. 分子標的治療のための病理スクリーニングシステム 第103回日本病理学会総会 2014年4月26日(広島)
2. 胃癌に対する新規薬剤開発を支援する研究基盤としてのPDXモデルならびに新規細胞株の確立 第87回日本胃癌学会総会 2014年3月6日(広島)

#### 仁科 智裕

1. 町田望、土井俊彦、坂東英明、室圭、仁科智裕、山口研成、高橋俊二、設楽紘平、佐藤暁洋、大津敦. Multicenter Phase II Study of TAS-102 Monotherapy in Patients with Pretreated Advanced Gastric Cancer. 前治療で増悪した進行胃癌患者を対象としたTAS-102の第 相臨床試験. 第12回日本臨床腫瘍学会学術集会 福岡市 2014.

#### 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  
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 3. RPN2 標的核酸医薬に関する研究

研究分担者 藤原 康弘 （独）国立がん研究センター企画戦略局 局長  
 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、機能解析部門 部門長  
 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 遺伝子に対し、その発現をノックダウンする RPN2siRNA を導入することで、標準治療に抵抗性の乳癌の治療が期待できる。siRNA のキャリアとして合成ペプチド 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たところ、無毒性量を十分に下回る投与量において腫瘍縮小効果の有効性を見出した。このことから、本複合体製剤を臨床適用するベネフィットはリスクを十分に上回ると判断し、PMDA 薬事戦略相談対面助言に基づき、本被験薬の腫瘍内投与法についての First in human 医師主導治験プロトコールを作成した。PMDA に治験届を提出し、Triple Negative 乳癌を初めとする、標準治療に抵抗性の乳癌症例に対して、被験者の組み入れを開始した。

A. 研究目的

分担研究者らは、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、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、標準治療に抵抗性の乳癌症例に対して、First in human の医師主導治験を行い、安全性および忍容性の検証と、探索的試験による POC の取得を目標とする。スリー・ディー・マトリックス社は、開発・試験を共同で行っており、治験薬の提供および本治験後の継続開発も担う予定である。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

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）および、医薬品戦略相談対面助言に基づいて設定した GLP 安全性試験、GMP 核酸製剤の製造、安全性薬理試験を実施する。国立がん研究センター中央病院 乳腺・腫瘍内科にて、RPN2siRNA/A6K 複合体製剤の First in human 医師主導治験を実施すべく、プロトコールを作成する。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する。主要評価項目として、用量制限毒性を検証する。また、副次的評価項目として、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を検証し、さらに探索的試験として、局所の腫瘍縮小割合、投与後組織の RPN2 ノックダウンを検証して、POC の取得を目指す。

治験では、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、連続投与評価期として毎週投与のスケジュールにて 3 回の投与を実施する。

また、FIH 医師主導試験の開始に当たり、必須となる試験薬(RPN2siRNA および A6K)の安定性試験、品質試験は実施済みであるが、想定される試験期間を担保するために、試験薬の安定性試験を継続実施する。

以上に基づき、PMDA に試験届を提出し、医師主導試験を開始する。

#### (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

非臨床における 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アポトーシスの惹起および腫瘍縮小効果が得られた。また、非臨床安全性試験の結果、被験薬に起因する毒性は発現せず、全身への影響に対する無毒量( 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。安全性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ところ、First in human 試験開始に十分な安全性を確認しているとの評価を得た。

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、最大 30 症例に対する First in human 医師主導試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。国立がん研究センターの倫理審査委員会にて承認され、平成 27 年 2 月に PMDA に試験届を提出した。

RPN2siRNA および A6K の試験薬の GMP 製造を完了した。また、試験期間を担保する安定性試験、品質試験について実施し、試験開始に十分な安定性を確認した。さらに、試験終了後に再度安定性を確認する予定である。

平成 27 年 3 月より、Triple Negative 乳癌を初めとする、標準治療に抵抗性の乳癌症例に対して、被験者の組み入れを開始した。

#### D . 考察

治療抵抗性を示す乳癌においては、がん幹細胞画分が多く存在し、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、がん幹細胞が有する足場非依存的な細胞増殖形成能を著しく低下させ、さらにがん細胞のアポトーシスを惹起する。本試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、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。

非臨床における RPN2siRNA/A6K 複合体製剤の腫瘍縮小効果に対する有効性と、想定投与量に対する NOAEL に鑑みて、RPN2siRNA/A6K 複合体製剤を臨床適用するベネフィットはリスクを十分に上回ると判断した。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、本試験薬は医師主導試験を実施するのに十分な安全性があると判断された。

RPN2siRNA/A6K 複合体製剤の臨床での使用は、本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い。本試験において、安全性、薬力学を全ての投与群の被験者で評価する。本試験薬により、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 を損なうことなく、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。

試験において、ヒトでの効果と安全性が明らかになることで、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を決定できる。これにより、次相の試験実施だけでなく、siRNA 医薬および核酸医薬全般のさらなる開発への橋渡しが可能となり、日本発の核酸医薬の推進役として期待される。

#### E . 結論

RPN2siRNA/A6K 複合体製剤の乳癌に対する有効性と安全性から、本試験薬を臨床適用するベネフィットはリスクを十分に上回ることを見出した。PMDA 薬事戦略相談対面助言に基づき、本試験薬の腫瘍内投与法についての First in human 医師主導

治験プロトコールを作成した。平成 27 年 2 月に PMDA に治験届を提出し、平成 27 年 3 月より、Triple Negative 乳癌を初めとする、標準治療に抵抗性の乳癌症例に対して、被験者の組み入れを開始した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 【落谷孝広】

- 1) 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
- 2) Takahashi RU, Ochiya T. RPN2: a promising therapeutic target for breast cancer? J Stem Cells Res, Rev & Rep, 1:2, 2014
- 3) Tominaga N, Hagiwara 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

#### 【落谷孝広、竹下文隆、小野麻紀子】

- 4) Takahashi RU, Miyazaki H, Takeshita F, Yamamoto Y, Minoura K, Ono M, Kodaira M, Tamura K, Mori M and Ochiya T. Loss of microRNA-27b contributes to breast cancer stem cell generation by activating ectonucleotide pyrophosphatase 1. Nature Communications, in press

### 2. 学会発表

#### 【落谷孝広】

- 1) マイクロ RNA 制御システムがもたらす先制医療の実現，ヘルシーパス講演会，2014.10.27，静岡
- 2) 我が国の革新的がん診断・治療技術の最前線，For the Better Forum 2014，2014.11.12，東京
- 3) がん制圧に向けて～予防、診断、治療，にいかわ政経懇話会 12 月例会，2014.12.11，富山
- 4) 【miRNA】の機能解明で実現する新たな医薬品・医療機器，Life Nanotechnology 特別シンポジウム，2015.1.28，東京

## G. 知的財産権の出願・登録状況

( 予定を含む。)

### 1. 特許取得

#### 【落谷孝広】

- 1) 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) 国際出願 PCT/IB2012/002626, 発明者: 落谷孝広、藤原智洋: MicroRNA-Based Methods and

Assays for Osteosarcoma (PCT 出願済み)

### 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  
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）

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4. VEGF阻害薬

研究分担者	藤原 康弘	国立がん研究センター中央病院	執行役員	企画戦略局長
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

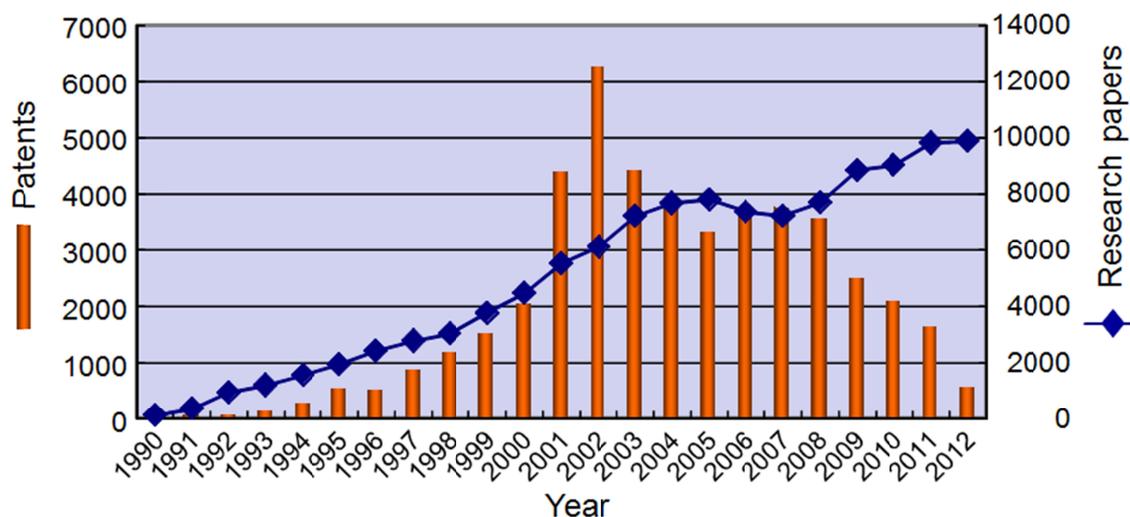
腫瘍の分子生物学的な研究の進展に伴い、がん治療に有用な標的分子が次々に明らかにされ、抗体やキナーゼ阻害剤などの様々な分子標的薬が開発され、従来の化学療法剤をはるかに凌ぐ臨床成績を実現したグリーベックなどの薬剤が開発された。このように、現在は、抗体医薬品やキナーゼ阻害剤などの分子標的薬が抗がん剤開発の主流であるが、それぞれに長所と短所があることから、新しい分子標的薬開発の標的として、蛋白質間相互作用（protein-protein interaction; PPI）を制御できる低分子化合物が注目され、その研究が着実に増加している（図1）。このような流れの中で、図2に示すように、いわゆるG蛋白質共役型の受容体とそのリガンドとの相互作用を制御するタイプの低分子PPI制御薬（広義のPPI制御薬に含まれる）については、既に上市にまで至っている。一方、G蛋白質共役型受容体とそのリガンドとの相互作用を除くPPI（狭義のPPI）をを制御する低分子化合物についても、臨床試験が行われているプロジェクトならびに前臨床段階もしくはそれ以前のプロジェクトが多数存在する（表1）。

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）。

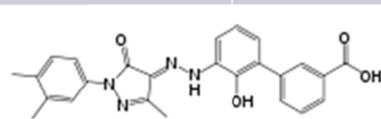
## Changes in numbers of PPI-related papers and patents



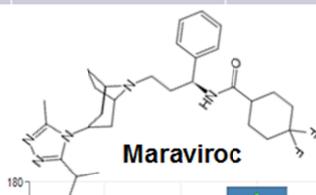
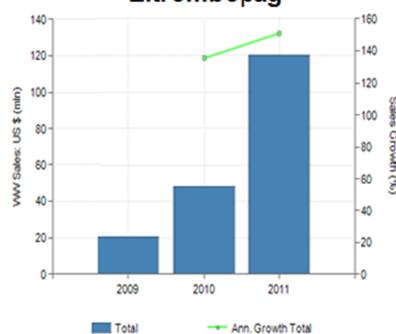
Note:

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 and "FreePatentsOnline.com", respectively, on December 21, 2012.
2. An outstanding number of patent in 2002 seems to be relevant to increased application of patents of PPI-detecting methodologies mainly by US companies.
3. Numbers in 2012 are in a limited period of January 1 to December 21.

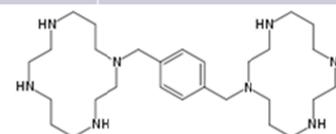
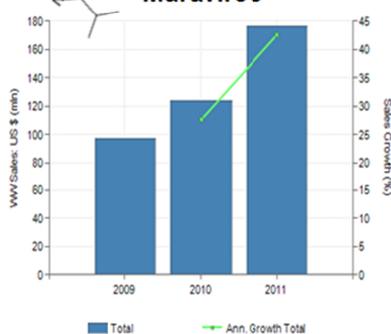
INN (M.W.; route)	Trade name	Company	Mechanism	Indication
Eltrombopag (443; p.o.)	Promacta Revolade	Ligand GSK	TPO-R agonist (induction of TPO-R-mediated signal)	Chronic ITP
Maraviroc (514; p.o.)	Selzentry	Pfizer	CCR5 antagonist (inhibition of gp120/CCR5 binding)	HIV infection
Plerixafor (503; s.c.)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



Eltrombopag



Maraviroc



Plerixafor

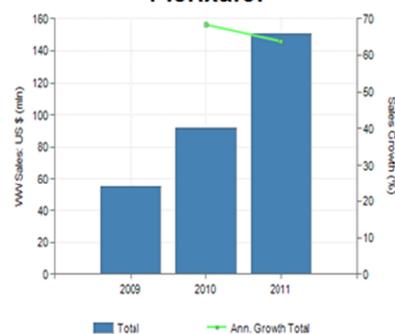


図2 市販されている低分子 PPI 制御薬 (G 蛋白質共役型受容体とそのリガンドとの相互作用を制御する薬剤)

表1 低分子PPI 阻害薬の開発状況（G 蛋白質共役型受容体およびそのリガンド関連を除く）

In clinical development

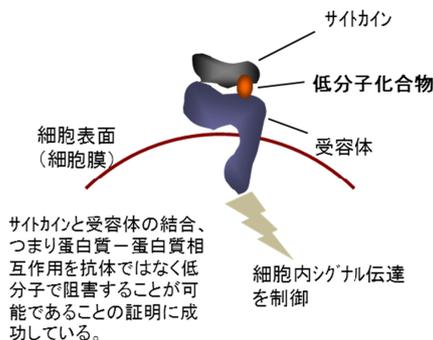
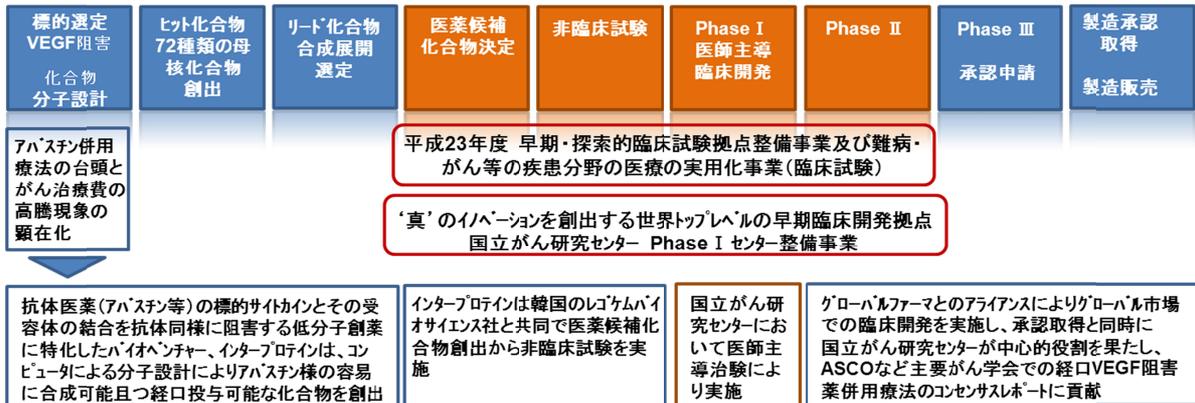
Comp.	Target	Indication	Stage	Route	M.W.	LogP	HBD	HBA	PSA
SAR1118	LFA1/ICAM1	Dry eye	P-3	Eye drop	637.5	4.23	1	7	131
17-AAG	Hsp90/HIF1α	Solid tumor	P-2/3	i.v.	569.7	2.86	4	8	157
Navitoclax	Bcl2/BAK	CLL	P-2	Oral	976.6	8.62	2	13	170
LCL161	SMAC/XIAP	Solid tumor	P-2	Oral	500.6	3.44	2	6	120
RG7112	P53/MDM2	Solid & hemato.	P-1	Oral	727.8	7.38	0	6	91
RG7388	P53/MDM2	Solid & hemato.	P-1	Oral	616.5	7.16	3	8	111

In pre-clinical development/discovery

Comp.	Target	M.W.	LogP	HBD	HBA	PSA	Remark
PKF115-584	TCF4/β-catenin	790.8	4.03	3	14	194	Binding inhi., IC50, 3.2 μM
UNC1215	L3MBTL3/BCLAF1	529.7	2.55	1	5	59	Kd, 120 nM
MM-102	WDR5/MLL1	669.8	3.69	7	9	178	Binding inhi., IC50, 2.4 nM
FOBISIN101	14-3-3/Raf-1	461.2	3.22	1	11	156	Binding inhi., IC50, 5.9 μM
JQ1	BRD4/histon H4	457.0	3.42	0	6	98	Kd, 50 nM; F value (p.o.), 49%

Red-colored letters: in violation of the Lipinski's rule of five

研究事業4. 抗サイトカイン抗体医薬 アバスタチン(抗VEGF抗体医薬)を置き換える 経口VEGF阻害薬の研究開発計画



サイトカインを標的にした抗体医薬		
標的サイトカイン	抗体医薬	適応疾患 ( )内は、将来の適応拡大
VEGF	アバスタチン	大腸がん、非小細胞肺がん等固形がん
IL-6	アクトムラ	慢性関節リウマチ、キャスルマン病、(がん等の悪液質)
TNFα	レミケド、ヒューミラ	慢性関節リウマチ、(がん等の悪液質)
IL-1β	イラリス	クワイオリン関連周期性症候群

抗サイトカイン抗体医薬は、遺伝子組み換えにより製造され、薬効に優れる。しかし、いずれも高額医療の対象であり、使用できる患者は、限定的であり、一日も早く安価に合成可能な経口薬の開発が世界で望まれている。インタープロテイン社は、抗サイトカイン抗体医薬をはじめとする抗体医薬の標的蛋白質をターゲットに経口可能な低分子医薬の創薬に注力している。

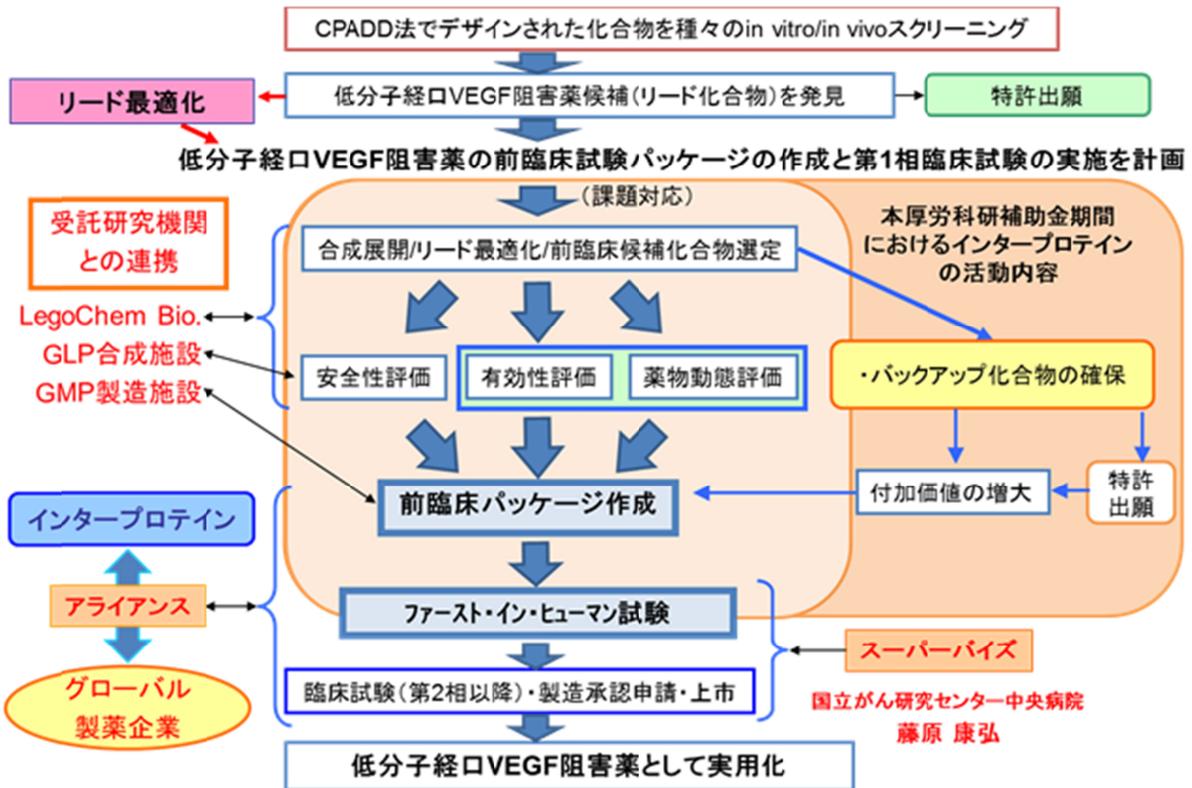


図4 研究方法

## 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(INTENDD-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】

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

定量目標	作用機序(MOA) 証明	経口VEGF阻害薬の定量目標			薬物動態 (初期評価)
		in vitro 活性(IC50値)	in vitro 選択性(IC50値)	in vivo 薬効と安全性	
医薬候補化合物	<ul style="list-style-type: none"> <li>完全な共結晶ゲル 取器</li> <li>SPRゲル取得</li> <li>SureFireゲル取得</li> <li>キナーゼパネル</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>数十nM~一桁 数nM(ナノモル)</li> <li>一桁ナノモルが 望ましい</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>100倍以上が理 想的</li> <li>数十倍でも臨 床上適用可</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>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</li> <li>安全性確認</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>25%以上の経 口吸収(BA(F))</li> <li>血中濃度で薬 効説明可能</li> <li>初期毒性試験 で安全確認</li> </ul>

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。 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 IC<sub>50</sub> 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。 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。 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は、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 <sub>1/2</sub> (h)	t <sub>max</sub> (h)	C <sub>0</sub> (ng/mL)	AUC <sub>0-∞</sub> (h*ng/mL)	AUC <sub>0-12h</sub> (h*ng/mL)	AUC <sub>0-12h</sub> /D (h*ng/mL)	F (%)
IV	5	2.71	NA	7175	4115	4458	823	NA
IP	20	8.11	0.5	6507	20821	22703	1041	127
PO	20	6.51	0.5	3717	11769	12396	588	69.5

LCB-604					LCB-631					LCB-477SF				
Route	Dosing (mg/kg)	t <sub>1/2</sub> (h)	AUC <sub>0-12h</sub> /D (h*ng/mL)	F (%)	Route	Dosing (mg/kg)	t <sub>1/2</sub> (h)	AUC <sub>0-12h</sub> /D (h*ng/mL)	F (%)	Route	Dosing (mg/kg)	t <sub>1/2</sub> (h)	AUC <sub>0-12h</sub> /D (h*ng/mL)	F (%)
IV	10	3.28	115	NA	IV	5	3.46	170	NA	IV	5	2.71	823	NA
IP	40	4.30	54.1	46.4	IP	20	6.41	64.9	37.5	IP	20	8.11	1041	127
PO	40	1.80	5.7	5.1	PO	20	6.32	16.4	10.0	PO	20	6.51	588	69.5

改善

改善

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<sub>last</sub>/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 (ng/mL)	SD (ng/mL)
	Group 1	Group 2	Group 3		
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 (ng/mL)	SD (ng/mL)
	Group 1	Group 2	Group 3		
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

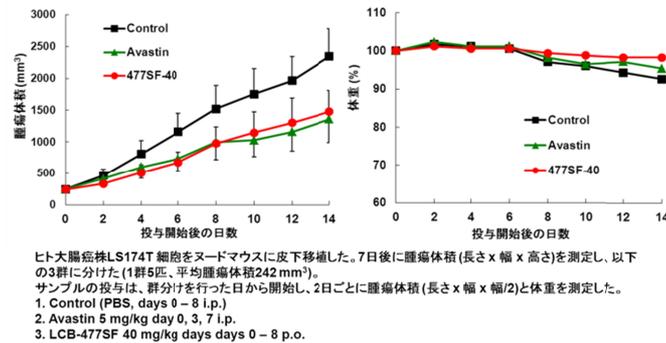
LCB-477 20 mg/kg 腹腔内 (IP)投与および経口

(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。



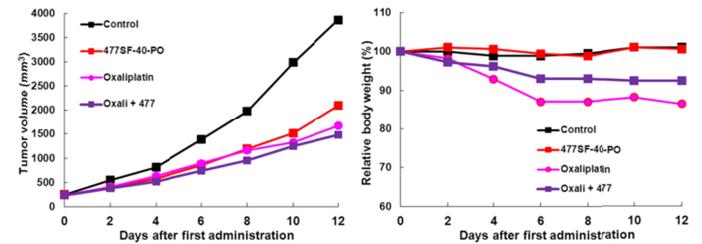
**図7 LCB-477 40 mg/kg経口投与時の腫瘍増殖抑制作用**

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ピンとの併用療法、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

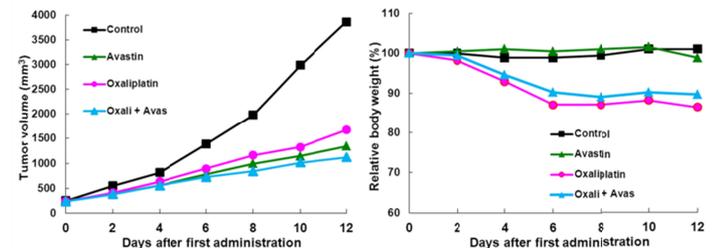
えない程度の増強であった。興味深いことに、併用により、オキサリプラチン投与に起因する体重減少が抑制された（図8）。

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）。



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240 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 (PBS, days 0, 3, 7 i.p.)  
2. LCB-477 40 mg/kg days 0 - 8 p.o.  
3. Oxaliplatin 9 mg/kg days 0, 3, 7 i.p.  
4. Oxaliplatin + LCB-477

**図8 LCB-477SFとオキサリプラチンの併用療法**



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240 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 (PBS, days 0, 3, 7 i.p.)  
2. Avastin 5 mg/kg day 0, 3, 7 i.p.  
3. Oxaliplatin 9 mg/kg days 0, 3, 7 i.p.  
4. Oxaliplatin + Avastin

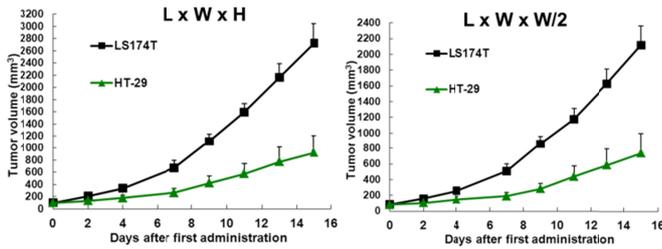
**図9 アバスタチンとオキサリプラチンの併用療法**

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 x 10<sup>6</sup> 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

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 mm<sup>3</sup>)、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

遅いことが明らかとなった (図10)。

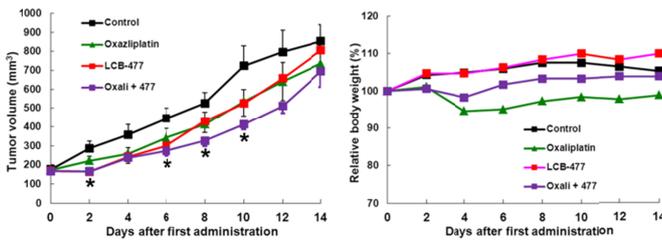


LS174T細胞あるいはHT-29細胞をヌードマウスに皮下移植し、1週間後から各マウスの腫瘍体積を経時的に測定した。腫瘍体積は、LxWxH、あるいはLxWxW/2で表した。L:長径、W:短径、H:高さ

### 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 mm<sup>3</sup>)、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。

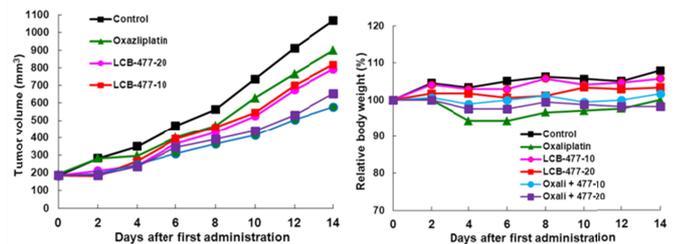
1. Control
  2. Oxaliplatin 10 mg/kg days 0, 7 i.p.
  3. LCB-477 40 mg/kg days 0 - 8 p.o.
  4. Oxaliplatin + LCB-477
- \*p < 0.05 vs Control

### 図11 LCB-477とオキサリプラチンの併用療法

### 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。

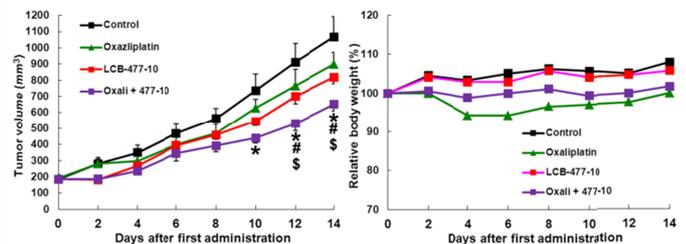
次いで、HT-29を用いたxenograft modelにおけるLCB-477の用量依存性を検討したところ、10 mg/kgの用量でも、オキサリプラチンと同等の腫瘍増殖抑制作用が観察された (図13)。そして、興味深いことに、LCB-477 (10 mg/kg)とオキサリプラチンと併用した場合は、day 12およびday 14において、併用は、各薬剤単独に比べて有意に強い腫瘍増殖抑制作用を示した (図14)。



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 mm<sup>3</sup>)、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

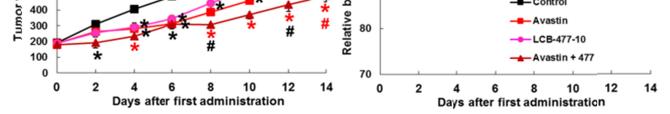
### 図13 LCB-477とオキサリプラチンの併用療法 (用量依存性)



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 mm<sup>3</sup>)、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



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187 mm<sup>3</sup>)、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. Avastin 5 mg/kg day 0, 3, 7 i.p.  
 3. LCB-477 10 mg/kg days 0 - 8 p.o.  
 5. Avastin + LCB-477  
 \* p < 0.05, \* p < 0.01 vs Control  
 # p < 0.05, # p < 0.01 vs LCB-477-10

### 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。

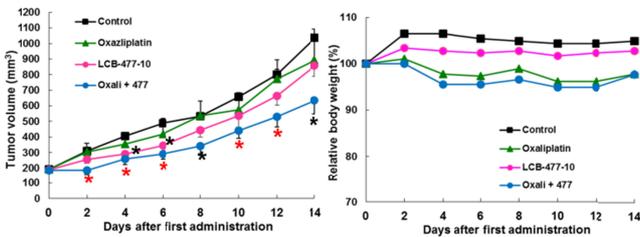
アバスタチンとオキサリプラチンの併用では、体重減少傾向が観察されたが、LCB-477とアバスタチンの併用では、体重に対して全く影響を与えなかった。両併用の腫瘍増殖抑制効果がほぼ同等であることを考え併せると、LCB-477とアバスタチンとの併用の方が、アバスタチンと化学療法剤との併用よりも優れていると考えられた。

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、抗腫瘍作用を發揮している可能性が示唆された。

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。

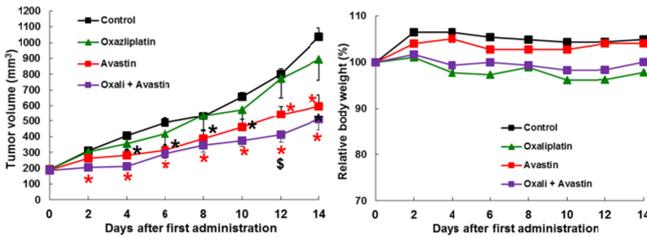
図15に示すように、今回の実験では、オキサリプラチンは、非常に弱い腫瘍増殖抑制作用しか示さなかったため、LCB-477は10 mg/kgの用量でも、オキサリプラチンよりも強い腫瘍増殖抑制作用を示した。そして、両者の併用においては、併用効果を示した。

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。



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187 mm<sup>3</sup>)、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  
 \* p < 0.05, \* p < 0.01 vs Control

### 図15 LCB-477とオキサリプラチンの併用療法



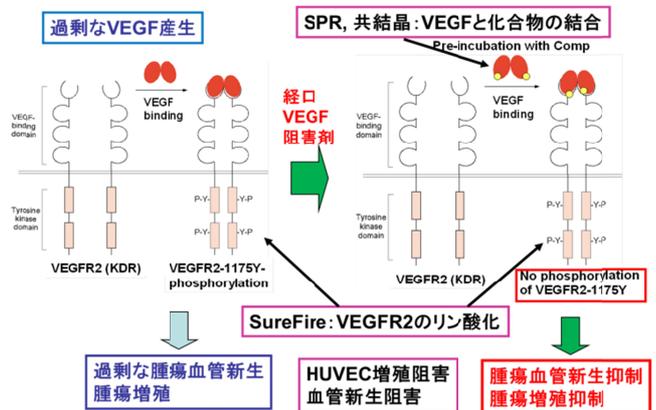
HT-29細胞をヌードマウスに皮下移植した。1週間後に各マウスの腫瘍体積 (LWW/2)を測定し、次の4つのグループに分け (各群5匹、平均腫瘍体積187 mm<sup>3</sup>)、その日をday 0とした。以下に示す投与スケジュールに従って化合物の投与を行った。  
 1. Control  
 2. Oxaliplatin 10 mg/kg day 0, 7 i.p.  
 3. Avastin 5 mg/kg days 0, 3, 7 i.p.  
 5. Oxaliplatin + LCB-477  
 \* p < 0.05, \* p < 0.01 vs Control  
 \$ p < 0.05 vs Oxaliplatin

### 図16 アバスタチンとオキサリプラチンの併用療法

### 【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、VEGF<sub>165</sub>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IC<sub>50</sub>値は、72 nMであることが明らかになった。

次いで、ヒトVEGF<sub>165</sub>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VEGF<sub>165</sub>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、おおよそのIC<sub>50</sub>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蛋白質の共結晶を製作し、回折実験を行い、2.3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

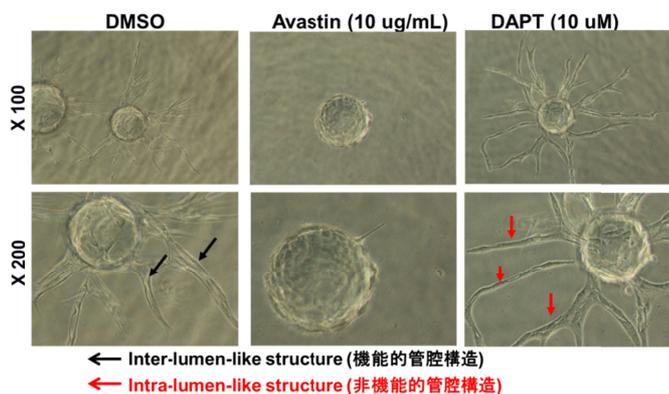
Fibrin-gel assay法により、LCB-477のin vitro血管新生に対する作用を検討した。

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。

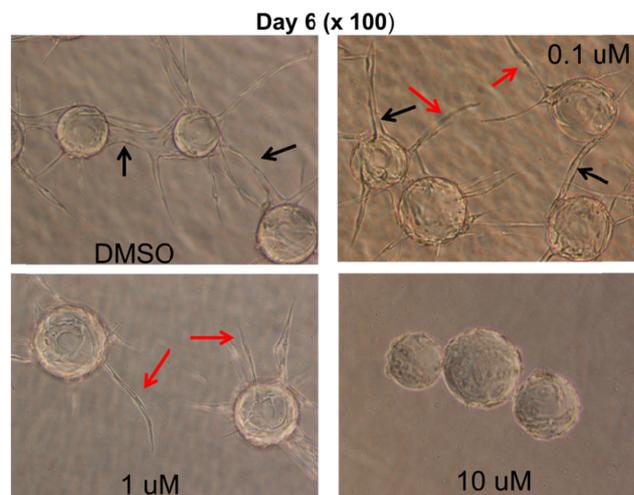
構築したFibrin-gel assay法の有用性を検証するために、アバスチンおよびDAPTの血管新生に対する作用を検討した。その結果、図19に示すように、

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。



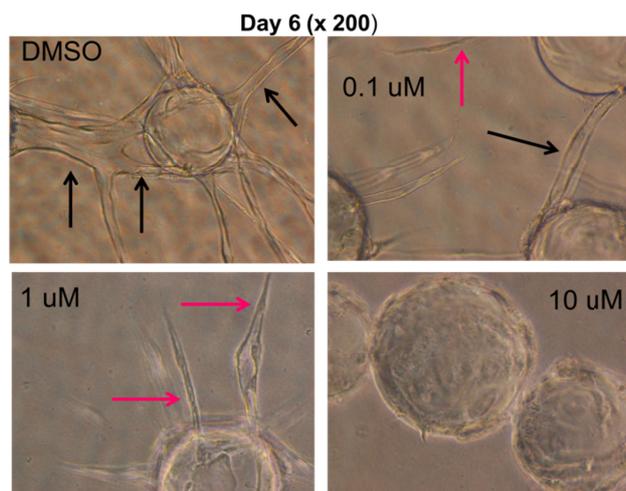
**図19 アバスチンとDAPTのin vitro血管新生に対する作用**

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)**

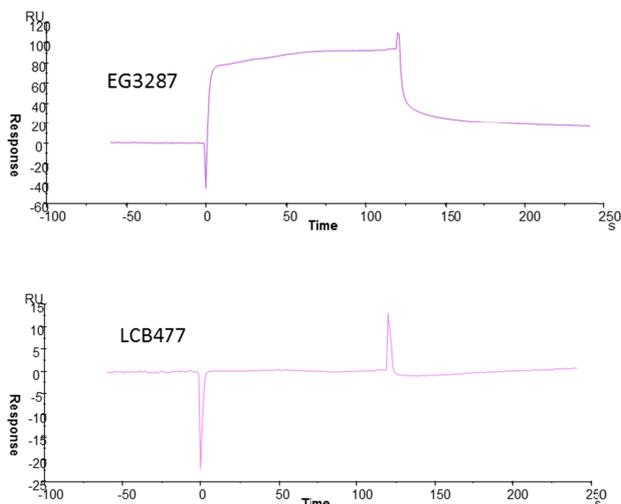
ここで、抗neuropilin-1 (NRP-1)抗体が、fibrin-gel assayにおいて、in vitro血管形成を抑制することが報告されている (Cancer Cell 2007; 11:53-67)。そこで、文献的に抗NRP-1抗体の作用を精査した結果、LCB-477と同様の血管形成抑制作用を示すことが判明した。さらに、xenograft modelを用いて、抗NRP-1抗体とアバスチンを併用すると、相加的な生存期間延長作用が得られることも明らかとなった。



**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。

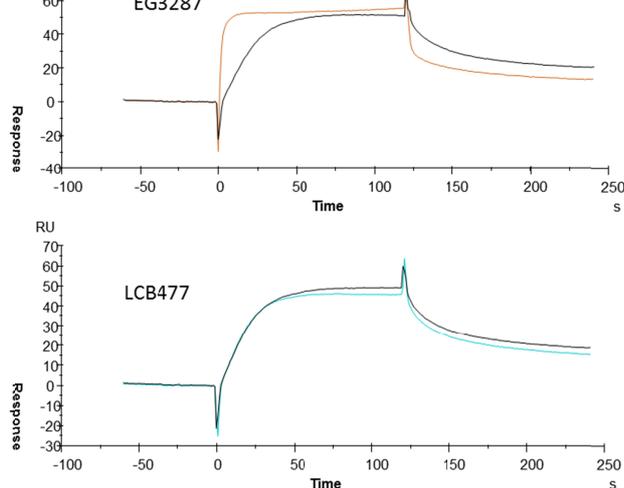


**図22 EG3287とLCB-477のNRP-1に対する結合能 (SPR法)**

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VEGF<sub>165</sub>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、VEGF<sub>165</sub>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、IC<sub>50</sub>値が一桁 nMの活性を目指している。現在、LCB-477SのIC<sub>50</sub>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IC<sub>50</sub>値とVEGF刺激HUVECのIC<sub>50</sub>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。

#### 【Xenograf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 mm<sup>3</sup>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 mm<sup>3</sup>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とするために、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ウェイ解析を実施した。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 分間ブレインキュベーションした後に、化合物濃度は 10  $\mu$ M 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、TiO<sub>2</sub> 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: H<sub>2</sub>O/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ウェイ解析を実施した。

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ウェイ解析を実施し 17 個のパスウェイが抽出され、これらのパスウェ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  
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

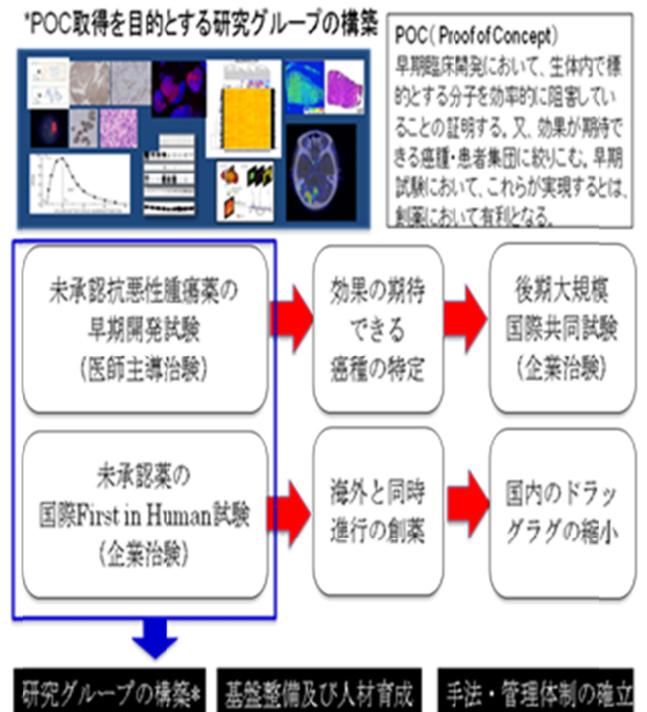
研究分担者 藤原 康弘 国立がん研究センター 戦略企画局 局長  
研究分担者 田村 研治 国立がん研究センター中央病院 乳腺・腫瘍内科 科長  
研究分担者 米盛 勸 国立がん研究センター中央病院 乳腺・腫瘍内科 医長

研究要旨

DNA修復に關与する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/m<sup>2</sup> 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 <sup>2</sup> Day1,8 + オラパリブ 25mg 1 日 2 回 (50mg/day)
Level 2	エリブリン 1.4mg/m <sup>2</sup> Day1,8 + オラパリブ 50mg 1 日 2 回 (100mg/day)
Level 3	エリブリン 1.4mg/m <sup>2</sup> Day1,8 + オラパリブ 75mg 1 日 2 回 (150mg/day)
Level 4	エリブリン 1.4mg/m <sup>2</sup> Day1,8 + オラパリブ 100mg 1 日 2 回 (200mg/day)
Level 5	エリブリン 1.4mg/m <sup>2</sup> Day1,8 + オラパリブ 150mg 1 日 2 回

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



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を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/m<sup>2</sup> Day 1, 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。

2. 実用新案登録  
なし

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

