

with subretinal implantation of
Okayama-University-type retinal
Prosthesis. Journal of Artificial Organs
2013;16:343-351.

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(国際水準臨床研究分野))

分担研究報告書

分担研究3) 進行・再発乳癌に対するドセタキセル 100mg/m²の第I相試験

研究分担者 平田 泰三 呉医療センター腫瘍内科・医長
(岡山大学病院・非常勤講師)

研究要旨

本研究では乳癌に対するドセタキセル100 mg/m²の適応拡大を取得することを目的とする研究である。日本人患者における本剤100 mg/m²投与時の情報が不十分であるため、日本人患者での100 mg/m²投与時の薬物動態、忍容性及び安全性を評価するための医師主導治験を実施する。

本治験で上記のエンドポイントが適切な評価が出来るデザインとなるよう生物統計家、薬物動態専門家、薬事担当と共同で試験を作成した。また、治験結果を適切にデータ収集するためのEDCシステムの構築、データの信頼性を担保するためにQA, QCの体制を構築した。本試験の結果を以て、承認用量の拡大を目標とする。

A. 研究目的

本研究では乳癌に対するドセタキセル100mg/m²の適応拡大を取得することを目的とする研究である。現在、ドセタキセルは乳癌に対しては日本では75mg/m²という承認用量であり、海外では検証試験の結果を元に、最大100mg/m²が認められているとともに、国内外のガイドラインでも100mg/m²の推奨の記載がなされている。この乖離の原因として国内第I相試験では、日本人患者における本剤の3～4週間隔投与の薬物動態、忍容性、安全性は90 mg/m²までの検討にとどまっていることがあげられる。そのため、現時点では薬物動態を含めた情報が不十分であり、今後、日本人患者での薬物動態、忍容性、安全性について評価可能な臨床試験成績、エビデンスなどがさらに蓄積

される必要があると考えられている。また現在、日本の臨床の現場においても同用量の投与が求められている。このような現状を踏まえ、日本人患者での100 mg/m²投与時の薬物動態、忍容性及び安全性を評価するための医師主導治験を実施して、それらの結果により適応拡大を目標とする。

B. 研究方法

進行・再発乳癌患者を対象に総予定症例数6症例として、エンドポイントを100 mg/m²投与時の薬物動態、忍容性及び安全性と設定した。

また、ドセタキセルの有効性及び安全性、並びに薬物動態に影響を及ぼす可能性のあるバイオマーカーを評価する予定である。

主な選択基準は以下の通りとして、被験

者の安全性に慎重に対応する。

選択基準

以下のすべての選択基準を満たす患者を選択する。

- (1) 同意取得時の年齢が 20 歳以上の患者
- (2) 病理組織学的に乳癌と確定診断されている患者
- (3) 手術不能又は放射線療法が不適な再発乳癌患者もしくはステージ IV 期の乳癌患者（測定可能病変の有無は問わない）
- (4) スクリーニング検査時の Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (PS) が 0～1 の患者
- (5) スクリーニング検査時の臨床検査で、以下に示す臓器機能を有する患者
 - ・ ヘモグロビン：8.0 g/dL 以上
 - ・ 好中球数：1,500/mm³ 以上
 - ・ 血小板数：100,000/mm³ 以上
 - ・ AST (GOT)、ALT (GPT)：施設基準値上限の 2.0 倍以下
 - ・ 総ビリルビン：1.5 mg/dL 以下
 - ・ 血中アルカリホスファターゼ：施設基準値上限の 2.5 倍以下
 - ・ 血清クレアチニン：1.0 mg/dL 以下
- (6) 手術後 2 週間以上経過している患者又は前治療が化学療法又はホルモン療法の場合には最終投与日から 4 週間以上、放射線療法の場合は最終照射日から 2 週間以上経過している患者
- (7) 3 ヶ月以上の生存が可能と判断される患者
- (8) HER2 過剰発現を認めない患者（ただ

し、HER2 過剰発現を認めるが、抗 HER2 療法が適応とならない患者は参加可能とする）

- (9) 前治療として行われた癌に対する治療（手術、放射線治療、抗癌剤など）に関連するすべての臨床的に重要な毒性が、有害事象共通用語規準 [Common Terminology Criteria for Adverse Events Ver 4.0 日本語訳 JCOG 版 (CTCAE v4.0)] グレード 1 以下まで回復している患者
- (10) 被験者本人から文書で本試験への参加同意が得られた患者

除外基準

以下の除外基準のいずれかに抵触する患者は除外する。

- (1) ドセタキセル、アルコール又はポリソルベート 80 含有製剤のいずれかに対し過敏症の既往歴のある患者
- (2) 精神病を有する患者又は精神症状を有しており本試験への参加が困難と思われる患者
- (3) コントロールが困難な感染症（真菌、ウイルス、細菌など）のある患者
- (4) 不安定又は未治療の中樞神経系転移を有する患者
- (5) コントロールされていない心疾患を有する患者 [心筋症、ニューヨーク心臓協会 (New York Heart Association: NYHA) 分類 III 又は IV 度の心疾患、不整脈、不安定狭心症、心筋梗塞を含む]
- (6) 進行・再発乳癌として、ドセタキセルの投与歴を有する患者（ただし、術前・術後の補助化学療法としてドセ

タキセルを投与し、最終投与から 6 ヶ月以上経過して再発した場合は参加可能とする)

- (7) ステロイドが臨床的に禁忌であることにより、デキサメタゾンの前投薬ができない患者
- (8) 同意文書への署名前 5 年以内に乳癌以外の悪性腫瘍の既往歴を有する患者又は乳癌以外の悪性腫瘍の現病歴を有する患者(ただし、基底細胞癌、上皮内癌又は表在性膀胱癌を発症し、適切に治療された場合は参加可能とする)
- (9) ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 抗体陽性の患者、又は慢性活動期の B 型肝炎、C 型肝炎感染 (HBS 抗原陽性又は HCV 抗体陽性) を認める患者 (適格性を確認するための検査は必須とはしないが、治験責任・分担医師が必要と判断した場合には実施する)
- (10) CTCAE v 4.0 のグレード 2 以上の末梢性ニューロパチーを合併している患者
- (11) 妊婦あるいは妊娠している可能性のある患者、及び授乳中の患者

(倫理面への配慮)

本治験では、ヘルシンキ宣言に基づく倫理原則及びGCP省令を遵守し、以下のように人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除や説明と同意への徹底した対応を行う。

- ・ 治験を実施する前に被験者及び社会にとって期待される利益と予想される危険及び不利益とを比較考量し、期待される利益によって危険を冒すことが正当化される場合に限り本治験を開始・継続する。

- ・ 被験者の人権の保護、安全の保持及び福祉の向上に対する配慮を最も大事とし、科学と社会のための利益よりもこれを優先する。

- ・ また、本治験では、実施にあたり十分な非臨床試験及び臨床試験に関する情報を得て、試験内容も科学的に妥当であることを確認する。また、治験審査委員会にて、本試験の倫理性、科学性、社会性の審査を行い、承認された治験実施計画書を遵守して本治験を実施する。

- ・ すべての被験者から治験に参加する前に、本治験の詳細(期待される効果と副作用等)、従来の治療法、同意撤回の自由などを十分説明し、自由意思によるインフォームド・コンセントを得る。被験者の身元を明らかにする可能性のある記録は被験者のプライバシーと秘密保全に配慮して保護を行う。

- ・ 治験に関連して被験者に健康被害が生じた場合には、過失によるものがあるか否かを問わず、被験者の損失を適切に補償し、その際、因果関係の証明等について被験者に負担を課することがないようにする。

C. 研究結果

平成 26 年度では本治験で上記のエンドポイントが適切な評価が出来るデザインとなるよう生物統計家、薬物動態専門家、薬事担当と共同で治験実施計画書を作成した。また、治験結果を適切にデータ収集するための EDC システムの構築、データの信頼性を担保するために QA, QC の体制を構築した。

症例集積を加速させるために、呉医療セ

ンター・中国がんセンターを治験実施施設として追加する予定である。

D. 考察

本研究では乳癌に対するドセタキセル100 mg/m²の適応拡大を取得することを目的とする研究である。それらが達成されることにより日本人患者においても標準治療が日常臨床で可能となること、ドセタキセル100mg/m²は標準治療であるためこれを対照群あるいはドセタキセルをベースに併用する臨床試験及び治験には、承認がないことを理由にこれまで日本が参加できなかった試験にも参加が可能となり、医薬品・医療機器の開発の推進につながる可能性が期待される。

E. 結論

進行・再発乳癌患者を対象としたドセタキセル 100mg/m² の第 I 相試験の症例集積を加速させるために、呉医療センター・中国がんセンターを治験実施施設として追加する予定である。

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

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

(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(国際水準臨床研究分野))

分担研究報告書

分担研究 4) 再発非小細胞肺癌における発癌遺伝子の網羅的検索同定と特定遺伝子異常 (HER2) を有する患者への個別化治療確立を目指した基礎臨床橋渡し研究 (第Ⅱ相試験)

研究分担者 木浦 勝行 岡山大学病院呼吸器・アレルギー内科・教授

研究要旨

本研究にて治療標的となりうる分子異常を有する肺癌をスクリーニングするために、中国四国地方の基幹施設合同の患者登録システムを構築する。このシステムにて、1000 例のヒト肺癌検体をスクリーニングし、HER2 遺伝子異常、タンパク過剰発現を有する肺癌を同定する。

また、それら HER2 異常を有する 30 例の肺癌に対し、HER2 を標的とした新規分子標的薬であるトラスツズマブ エムタンシンの効果を検討する医師主導治験を実施する。

A. 研究目的

トラスツズマブ エムタンシン (遺伝子組み換え) (以下、T-DM1) は、HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2: ヒト上皮増殖因子受容体 2 型) 陽性の悪性腫瘍の治療を目的としてデザインされた新規の抗体薬物複合体であり、HER2 を標的とするヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブとチューブリン重合阻害作用を有するメイタンシン誘導体 (以下、DM1) とを安定性の高いリンカー試薬である SMCC (N-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate) を用いて結合した構造を有している。

T-DM1 の臨床開発は 2006 年に開始され、抗 HER2 療法及び化学療法既治療の HER2 陽性進行・再発乳癌を対象とした海外第Ⅱ相臨床試験 (TDM4258g 試験、TDM4374g 試

験) で、T-DM1 の有効性と安全性が示された。また、2009 年に開始されたハーセプチン及びタキサン系薬剤既治療の HER2 陽性進行・再発乳癌を対象とした海外第Ⅲ相臨床試験 [EMILIA 試験 (TDM4370g 試験)] では、対照群に対し無増悪生存期間及び全生存期間の有意な延長が示され、米国では 2013 年 2 月に HER2 陽性転移・再発乳癌の治療薬として承認された。国内では、国内第Ⅰ相臨床試験、国内第Ⅱ相臨床試験 (J022997 試験) と EMILIA 試験を含む海外臨床試験データに基づき製造販売承認申請を行い、2013 年 9 月、「HER2 陽性の手術不能又は再発乳癌」の効能・効果にて承認された。

非小細胞肺癌では、発癌の直接的な原因となる driver mutations として EGFR 遺伝子変異が 40%~50% 程度と高頻度に認められ、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬が標準

治療となっている。しかし非小細胞肺癌では、低頻度の driver mutations の正確な頻度や臨床的背景は前向きに十分調べられていない。これらを今回臨床研究として明らかにすることで、非小細胞肺癌に対する病態のさらなる理解が深まり、ひいては創薬あるいは個別化治療開発がさらに推進されることが考えられる。

個別化治療につながる治療標的候補として HER2 異常は非小細胞肺癌においても検討されている。非小細胞肺癌の検体を用いて HER2 異常に関する後方視的な検討が行われている。HER2 蛋白過剰発現の状態が免疫染色法により、強陽性 (3+) はおよそ 10% に認め、同時に HER2 遺伝子増幅の状態も Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法にて評価され、HER2/Chromosome17 比 ≥ 2 は 2% であったという報告がある。また、非小細胞肺癌において HER2 遺伝子 exon20 領域の挿入型変異が 1.7%~3.6% に存在する。以上より、約 10% の非小細胞肺癌患者で HER2 陽性であり、これらの HER2 陽性腫瘍を持つ患者選択を行うことで、非小細胞肺癌においても T-DM1 の有効性が期待できる。T-DM1 の HER2 陽性再発非小細胞肺癌患者に対する適応拡大を視野に入れ、同患者へ T-DM1 の有効性・安全性を評価する医師主導治験 (第 2 相試験) を計画した。

B. 研究方法

非小細胞肺癌と診断が得られた 1000 例を対象とする。同意取得後、日常診療において採取された腫瘍検体の残余分を用いて、HER2 ステータス (蛋白過剰発現、遺伝子増幅、遺伝子変異) を外部委託業者 (株式会社

エスアールエルおよび株式会社ジェネティックラボ) に解析を依頼する。同時に

上記に加えて、病理学的情報、予後を含めた臨床情報、および既知の癌細胞の分子異常に関するデータを診療録から抽出の上、それぞれの関連性についての包括的検討を行う。

それに加え下記に該当する患者 30 名に T-DM1 として体重あたり 1 回 3.6 mg/kg

(前回投与算出に用いた算出体重から ± 5 投与当日の体重が $\pm 10\%$ 以上変動した場合は投与量を再算出すること) を 3 週間間隔 (直近の投与日から 22 日目以降に投与すること) で点滴静注し、その奏効率を検討する。

選択基準

(1) 本治験内容について十分な説明を受け、被験者本人から文書による同意が得られている患者。

(2) 同意取得時の年齢が 20 歳以上の患者

(3) 病理組織学的に非小細胞肺癌と確定診断されている患者

(4) 原発巣または転移・再発病変の肺癌組織において、HER2 陽性※ (① IHC 法 3+、または② IHC 法 2+ でかつ FISH 法陽性、または、③ ダイレクトシーケンス法による HER2 遺伝子 exon 20 領域の変異陽性) のいずれか 1 つが確認された患者

※ 治験実施施設において上記の HER2 陽性を確認できる記録があれば本治験への組み入れを可とする

※ 遺伝子変異の種類は、少なくとも既存研究でドライバー遺伝子変異であることが示唆され、HER2 阻害薬の有効性が報告されているものとする

(5) 術後再発もしくは根治手術不能及び根

治放射線療法が不適な IIIB/IV 期の患者

(6) 非小細胞肺癌に対する前治療として、白金製剤を用いた化学療法歴*を有する有し、不応または増悪した患者（術前なお術前あるいは術後補助化学療法については、最終投与日から 1 年以内の再発患者の場合これを 1 レジメンとして扱う）。但、75 歳以上の場合は白金製剤を用いた化学療法に加え、標準的単剤化学療法歴療法でも可とする。

(7) EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の場合は、上記(6)に加えて、1 レジメン以上の EGFR チロシンリン酸化酵素阻害薬（EGFR-TKI）治療歴*を有する患者

(8) ALK 融合遺伝子陽性肺癌の場合は、上記(6)に加えて、1 レジメン以上の ALK 阻害薬治療歴*を有する患者

(9) RECIST v1.1 で規定される測定可能病変を有する患者（8. 有効性評価の項を参照）

(10) スクリーニング検査時の ECOG performance status (PS) が 0~2 の患者

(11) スクリーニング検査時の臨床検査で、以下に示す臓器機能を有する患者

- ・ヘモグロビン：8.0 g/dL 以上
- ・好中球数：1,000/mm³ 以上
- ・血小板数：75,000/mm³ 以上
- ・AST (GOT)、ALT (GPT)：施設基準値上限の 2.5 倍以下
- ・総ビリルビン：施設基準値上限の 1.5 倍以下
- ・血清クレアチニン：施設基準値上限の 1.5 倍以下
- ・プロトロンビン (PT-INR)：施設基準値上限の 2.5 倍以下

(12) 過去に T-DM1 による治療を受けていな

い患者

除外基準

(1) 治験薬の成分または添加物のいずれかに対し過敏症の既往歴のある患者

(2) 妊婦あるいは妊娠している可能性のある患者、及び授乳中の患者

(3) 妊娠の可能性のある閉経前の女性患者又は妊娠能力を有する男性患者の場合、治験薬投与開始 2 週間前から治験薬投与終了 180 日後までの間、医学的に承認された方法により避妊することに同意しない患者

(4) 画像上で明らかな間活動性間質性肺疾患（間質性肺炎、肺臓炎、放射線肺炎、器質化性肺炎を伴う閉塞性細気管支炎、肺線維症、急性呼吸窮迫症候群、肺浸潤、胞隔炎等）を合併している、又はその既往を有する患者。ただし、照射野内の放射線肺炎の既往（線維化）は許容する。

(5) 登録前 28 日以内の心エコーによる測定で左室駆出率（LVEF）45%未満の患者

(6) 胸部への放射線治療に伴う毒性が登録前 2 週間以内に Grade1 まで回復していない患者

(7) 以下の疾患を含む臨床的に重要な心疾患を有する患者

(ア) NYHA 分類クラス II 以上、または Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) ver. 4.03 に規定された Grade3 以上に該当する心機能障害を有する患者（別紙 「心機能評価」 参照）

(イ) 登録前 6 ヶ月以内にうっ血性心不全、または薬物療法を要する心室性不整脈と診断されている患者

(8) 登録前 6 ヶ月以内に臨床的に重要な冠動脈疾患（不安定狭心症、心筋梗塞等）と

診断されている患者

(9) 登録時にコントロール不良の高血圧

(収縮期 160mmHg 以下および拡張期 100mmHg 以下にコントロールできない) あるいは、コントロール不良の糖尿病 (HbA1c>12%) を持つ患者

(10) 未治療、症候性、または症状コントロールが困難な中枢神経系への転移を有している患者 (中枢神経系転移病変があっても、同部に対して局所療法を実施しており、且つし、その後 2 週間以上の病勢コントロール可能となったを確認し得た患者は登録可とする。また、局所療法後に抗けいれん剤を予防的に内服している患者は登録可とするが、中枢神経系転移に対してステロイドの継続投与が必要な患者は不可とする)

(11) CTCAE ver. 4.03 に規定された Grade3 以上の末梢神経障害を有する患者

(12) 前治療 (肺癌に対する化学療法、免疫療法、または生物学的療法) による本試験の主要評価に著しく影響を与える毒性が持続している患者、または前治療から適切な期間*が空いていない患者 (*前治療レジメンの 1 サイクル分の期間 [サイクルの規定がない場合は 3 週間])

(13) 投与前 4 週間以内に他の試験薬を投与された患者

(14) 投与前 4 週間以内に外科的処置または著しい外傷を受け回復していない患者、または試験期間中に外科的処置の必要な患者

(15) コントロールが困難な活動性のある全身性感染症 (HBV、HCV を含む) のある患者、または HIV 感染が明らかな患者

(16) 無病期間が 5 年未満の重複癌を有する患者 (完全切除した皮膚基底細胞癌と子宮

頸部上皮内癌、又は内視鏡的粘膜切除により完全切除した消化器癌を除く)

(17) 第 1 サイクルの試験薬投与開始日から

少なくとも 8 日間入院治療ができない患者

(18) その他試験責任医師または試験分担医師により本試験への参加が不適切であると判断した患者

(倫理面への配慮)

本試験は、ヘルシンキ宣言、試験実施計画書、薬事法第 14 条第 3 項及び第 80 条の 2 に規定する基準、並びに「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」(GCP) を遵守して実施する。

C. 研究結果

平成 26 年 4 月と平成 27 年 1 月に中国四国地方の 30 を超える基幹施設と協力体制を構築するために合同会議を開催した。また SRL メディサーチへ外部委託し中国四国地方の基幹施設と協力して 1000 例の試験候補者から 30 例の試験対象者をスクリーニングするプラットフォームを創成した。

平成 27 年 2 月より試験対象者のスクリーニングが開始され、患者登録、HER2 検索が行われている。TDM1 の医師主導試験に関しては、平成 27 年 5 月から開始予定である。

D. 考察

本研究は TDM1 の肺癌に対する適応拡大を念頭に、HER2 陽性肺癌におけるその効果を探索することを目的とした研究である。この結果を踏まえて、TDM1 の奏効が期待できる HER2 陽性が定義されることが期待される。

また、この医師主導治験を通して中国四国の基幹施設の患者登録システムが構築され、今後の治療開発を加速させるプラットフォームとなることが期待される。

E. 結論

中国四国地方の 30 を超える基幹施設と協力体制を構築した。また SRL メディサーチへ外部委託し患者登録システムを構築した。平成 27 年 2 月より患者登録が始動し、同 5 月より治験が開始予定である。

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

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

(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(国際水準臨床研究分野))

分担研究報告書

分担研究5) 抗マラリア薬、抗C型肝炎薬のFirst in Manの実施とPhaseIIIへ向けた 剤型改善に関する研究

研究分担者 土居 弘幸 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

徐放性化が可能で肝臓初回通過効果を回避することができる経皮投与に着目し、N-251の溶液状態での経皮投与を試みた。その結果、経口投与時より投与回数を軽減してもマラリア感染マウスが完治できる体内動態解析結果を得た。また、低コストと低用量をベースにN-251の欠点を補う次世代の化合物の探索を行い、N-251と同様の抗マラリア活性を示すN-89に焦点をあて、N-89の製造工程を確立した。N-89のGMP/GLP 規格に対応可能な合成工程の検討を行い、純度99%以上のN-89 (non-GLP) を60g/バッチで得ることができた。このN-89を用いてN-251と同様の経皮投与における体内動態解析と抗マラリア薬効の再現性を検討した結果、優れた抗マラリア活性を示した。

ORL8細胞を使用することで、今年度初めて当該化合物に抵抗性(約20倍)を示す細胞を作出することに成功した。この抵抗性細胞と親細胞のORL8を丹念に比較することにより、抵抗性の原因がウイルス側に依るものなのか宿主側に依るものなのかを今後、明らかにすることができると期待される。これにより抗HCV標的を明らかにすることができれば、当該化合物の抗HCV活性の作用機序解明につながることを期待される。

A. 研究目的

本研究は新規抗マラリア化合物N-251を経皮吸収型製剤として最適化をはかり、マラリア流行地でPhaseIからシームレスにPhaseIIIを実施できるよう準備するとともに、難治性C型肝炎患者に対する医師主導治験を、平成28年度を目途に実施することを目的とする。

B. 研究方法

《抗マラリア薬》

本研究では種々の基剤と溶媒、既存の素材を用いてN-251製剤を作製し、マウスマラリアモデルにおいて抗マラリア効果を評価する。また、各種基剤を用いたN-251製剤を投与したマウスの薬物体内動態解析を行い、経皮吸収率並びに生物学的利用能BAを調べ、最適な投与スケジュールを計画する。以上の研究から治療効果の高い経皮吸収型製剤を見出し、抗マラリア治療効果、予防効果を調べる。

各種基剤及び溶媒を検討することでN-

251の経皮吸収率を改善出来ると考える。有望なN-251製剤に関しては薬物放出調節（制御）膜、薬物基剤を保持させる高分子マトリックスの検討を行い、薬物の皮膚移行性を調節可能な貼付剤もしくはテープ剤とし、ラットの皮膚を用いた皮膚透過性試験を実施してその有効性を検討する。上記の研究成果を、新規抗マラリア化合物N-251の経皮吸収型製剤に応用し、マラリア流行地（熱帯の発展途上国）で臨床使用できる貼付剤もしくはテープ剤の開発を目指す。

《抗C型肝炎薬》

N-251 に抵抗性を示すヒト細胞評価系の作出のために、全長 HCV-RNA 複製細胞である OR6 細胞（ヒト肝癌細胞株 HuH-7 由来）や ORL8 細胞（ヒト肝癌細胞株 Li23 由来）に N-251 を連続的に添加して、G418 (0.3 mg/ml)存在下でも増殖できる（N-251 添加で HCV-RNA 量が低下すると G418 感受性となり細胞は死滅するようにアレンジされている）細胞コロニーを得ることを試みた。使用した N-251 の濃度や添加方法については、適時変化させて行った（詳細は研究結果の項目に記載した）。

抗 HCV 活性の評価は、24 ウェルプレートにそれぞれ 2×10^4 個の細胞を播き、N-251 或いは N-89（各種濃度）を添加して 72 時間後にレニラルシフェラーゼ活性を測定することにより行った。得られた測定値から添加化合物の 50% 阻害濃度（EC₅₀）を算出した。

細胞毒性については、別途 96 ウェルプレートにそれぞれ 1×10^3 個の細胞を播き、N-251 或いは N-89（各種濃度）を添加して 72 時間後に WST-1 アッセイを行った。得られた測定値から 50% 細胞毒性濃度（CC₅₀）

を算出した。選択性指数（SI）は CC₅₀/EC₅₀ にて算出した。

（倫理面への配慮）

《抗マラリア薬》

本研究ではネズミマラリア原虫

(*Plasmodium berghei*) を用い、マウスに感染させて抗マラリア薬効試験を行う。薬物体内動態解析研究にはマウスを使用する。経皮吸収型製剤の皮膚透過性試験には、腹部由来の皮膚、あるいは、背部を剃毛したマウスを使用する。本研究で行うすべての動物実験は岡山大学の動物実験関係規則に基づき、動物実験委員会の申請・承認を得て進める。

また、感染性廃棄物処理や実験場所に関しては、関係法令・指針、及び研究施設の設けた基準を遵守して研究を行う。

《抗C型肝炎薬》

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものである。本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

C. 研究結果

《抗マラリア薬》

昨年度に用いた白色ワセリンとオイル（4 : 1 の配合比）の配合剤を用いて N-251 経皮吸収型製剤の結果をもとに今年度は界面活性剤（特許申請の関係で詳細は省略）を主とする溶液状態の経皮投与剤の体内動態解析を行なった。N-251 が 2% 以上となるよ

うに含有された N-251 溶液を 150mg/kg、となるように調整した N-251 溶液を切断したカーゼに乗せ、除毛したマウスの背中に乗せ、外れないようにフィルムと伸縮テープで覆って経皮投与した。薬剤投与 0、4、8、12、16、20、24 時間後の血漿中 N-251 濃度を測定した。これら実験は数回に分けて行なった。採血した血液は遠心後、血漿のみを集め、アセトニトリルを加えて除タンパク質した後に、N-251 を濃縮し、LC-MS/MS を用いて測定した。その結果、N-251 は界面活性剤に溶解した溶液状態での経皮投与で投与 4 時間目から 40ng/ml 付近で N-251 を維持し、16 時間目まで同様の血漿中濃度を維持した。それから約半分程度の 20ng/ml の濃度を 24 時間まで維持した。

この結果より、単回の経皮投与で抗マラリア薬効を示す十分な血中濃度を維持することが判った。年度途中のヒアリングで N-251 を臨床開発する為には合成ステップが多く、実際の臨床試験に持って行くためには低コストで提供可能な化合物が必要となった。そこで、N-251 の親化合物である、N-89 を用いて再度検討することになった。N-89 は N-251 と同様な抗マラリア活性を有することが以前に判っている。まず、N-89 の GMP/GLP 規格に対応可能な合成工程の検討を行い、純度 99%以上の N-89 (non-GLP) を 60g/バッチで得ることができた。この N-89 を用いて N-251 と同様の経皮投与における体内動態解析と抗マラリア薬効の再現性を検討した。N-89 を 2%含む溶液を調製し、N-251 と同様の経皮投与に体内動態解析の結果、37mg/kg 及び 55mg/kg 投与では 28 時間目まで 4ng/ml の N-89 を維持し、最高血漿中濃度も 6ng/ml であった。これは N-251

の投与量に比例して N-89 の血漿中濃度が低いことが判る。次に、新たに合成した N-89 を用いて 4-day suppressive test を行い、抗マラリア薬効の再現性を調べた結果、iv, ip, sc, po の 4 経路で優れた抗マラリア活性を示し、従来の古いロット間の違いは見られなかった。

《抗 C 型肝炎薬》

これまでの解析から、N-251 や N-89 の抗 HCV 活性機序は既知の抗 HCV 機構とは異なることが予想された。この抗 HCV 活性の作用機序を解明する方法として、当該化合物に抵抗性を示す全長 HCV-RNA 複製細胞を作出できれば、当該化合物に感受性を示す親細胞と比較することにより作用機序を解明できると考えた。そこで、まず、長期継代培養により HCV の遺伝的多様性を獲得した HCV レプリコン複製細胞や全長 HCV-RNA 複製細胞に N-251 を数日ごとに投与しながら濃度を徐々に上げていく方法(1 μ M から 5 μ M)を試みた。しかしながら、いずれも治癒細胞となり目的の抵抗性細胞を得ることができなかった。これらの結果から、HCV の遺伝的多様性より細胞クローンの特異性が重要ではないかと考え、次に抗 HCV 活性の評価細胞系である OR6 細胞や ORL8 細胞への N-251 の添加実験を行った。OR6 細胞へは N-251 の濃度を 4 μ M から 8 μ M に徐々に上げて行く方法で行ったが、N-251 に抵抗性を示す細胞を得ることは出来なかった。しかし、ORL8 細胞については、4 日ごとに 1 μ M の N-251 を 10 回投与後、3 μ M まで徐々に濃度を上げていくことにより、N-251 に抵抗性を示す細胞コロニーが多数得

られた。これらの細胞コロニーをプールして増殖させ、ORL8 N-251r 細胞と命名した。ORL8 N-251r 細胞における N-251 の EC₅₀ 値は 2 μ M となり、親細胞である ORL8 と比較して 20 倍抵抗性であることが分かった。N-89 の EC₅₀ 値も 1.9 μ M となり、ORL8 細胞と比較して 21 倍抵抗性であった。

D. 考察

《抗マalaria薬》

N-251 の薬効を最大限に引き出し、臨床での応用を目指した投与設計を行った。今年度の成果として経皮投与における N-251 の体内動態を解析し、高濃度で N-251 が持続することが判った。単回、あるいは 1 日 1 回の投与で抗マalaria活性を示す新しいタイプの抗マalaria剤形を見出すことができた。一方、投与量において臨床に適用するための低コストにフォーカスを絞り、N-251 周辺の化合物を再度評価し、N-251 の母化合物である N-89 を用いた臨床開発を試みることにした。N-89 の抗マalaria活性は N-251 と同様で合成工程が極めて短い。そのため、低コストでの臨床開発が可能となると期待できる。Non-GLP での合成工程の確立と N-89 の体内動態解析、抗マalaria薬効の評価を終え、本格的に N-89 の剤形の改善に向け、製薬企業の専門家の知見を取り入れ研究を進めて行く予定である。

《抗 C 型肝炎薬》

これまで N-251 や N-89 の抗 HCV 活性の作用機序は不明で、薬剤耐性が生じにくいところを標的にしていると考えられてい

た。事実、N-251 に耐性を示す HCV-RNA 複製細胞の作出は困難であった。しかし、ORL8 細胞を使用することで、今年度初めて当該化合物に抵抗性（約 20 倍）を示す細胞を作出することに成功した。この抵抗性細胞と親細胞の ORL8 を丹念に比較することにより、抵抗性の原因がウイルス側に依るものなのか宿主側に依るものなのかを今後、明らかにすることができると期待される。これにより抗 HCV 標的を明らかにすることができれば、当該化合物の抗 HCV 活性の作用機序解明につながることを期待される。

E. 結論

《抗マalaria薬》

徐放性化が可能で肝臓初回通過効果を回避することができる経皮投与に着目し、N-251 の溶液状態での経皮投与を試みた。その結果、経口投与時より投与回数を軽減してもマalaria感染マウスが完治できる体内動態解析結果を得た。また、低コストと低用量をベースに N-251 の欠点を補う次世代の化合物の探索を行い、N-251 と同様の抗マalaria活性を示す N-89 に焦点をあて、N-89 の製造工程を確立した。また、抗マalaria活性の再現性を確認し、N-89 の経皮投与における体内動態解析結果より、臨床での薬剤量の軽減が期待できる予備結果を得た。

《抗 C 型肝炎薬》

N-251 や N-89 に抵抗性を示す全長 HCV-RNA 複製細胞の作出に成功した。これにより当該化合物の抗 HCV 活性作用機序の解明に向けた研究基盤を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Imada, C., Takahashi, T., Kuramoto, M., Masuda, K., Ogawara, K., Sato, A., Wataya, Y., Kim, H.-S. and Higaki, K. Improvement of oral bioavailability of N-251, a novel antimalarial drug, by long-chain fatty acid-based self-microemulsifying drug delivery system. *Pharmaceutical Research* (in press).
2. Morita, M., Koyama, T., Sanai, H., Sato, K., hiramoto, A., Masuyama, A., Nojima, M., Wataya, Y. and Kim, H.-S. Stage specific activity of synthetic antimalarial endoperoxides, N-89 and N-251, against *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Int.*, 64, 113-117, 2015.
3. Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets. *Virology*, 462-463:166-174 (2014).
4. Kato N, Sejima H, Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M. Genetic characterization of hepatitis C virus in long-term RNA replication using Li23 cell culture systems. *PLoS ONE*, 9(3):e91156 (2014).

2. 学会発表

1. 抗マラリア候補・環状過酸化物の開発現況。金 惠淑。第84回日本寄生虫学会大会、東京、2015年3月21-22日。
2. Antimalarial drug development of synthetic endoperoxides as new drug.

Hye-Sook Kim, Yuka Nakamura, Risa Komoto, Kaoru Kanai, Akira Sato, Yuji Kurosaki, Kazutaka Higaki and Yusuke Wataya.大韓寄生虫学・熱帯医学会。第56回総会及び学術大会。釜山（韓国）、2014年10月30日-31日。

3. Antimalarial drug development of synthetic N-251 compound as new drug.

Hye-Sook Kim, Yuka Nakamura, Risa Komoto, Akira Sato, Yusuke Wataya, Daniel Adjei Boakye. 13th International congress of parasitology, Mexico City, August 10th-15, 2014.

4. 上田 優輝、金 惠淑、團迫 浩方、佐藤 伸哉、池田 正徳、土居 弘幸、綿矢 有佑、加藤 宣之。抗マラリア薬候補で強い抗HCV活性を示す N-251 の臨床応用に向けた研究と DAA との併用効果。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月。

5. 上田 優輝、團迫 浩方、佐藤 伸哉、池田 正徳、加藤 宣之。臨床応用に向けた抗マラリア薬候補 N-251 の抗HCV活性作用機序の解析。第18回日本肝臓学会大会(JDDW)。神戸、2014年10月。

6. Ueda Y, Kim HS, Hiromichi Dansako H, Satoh S, Ikeda M, Doi H, Wataya Y, Kato N. Characterization of anti-HCV activity of N-251, a preclinical antimalarial drug, and its combination effect with DAA. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff Canada, 2014年9月。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特許出願

3-1 抗マラリア剤。金 惠淑、綿矢
有佑、佐藤 聡、土居 弘幸。特
願 2014-214605。

3-2 抗マラリア剤。金 惠淑、綿矢
有佑、佐藤 聡、土居 弘幸。特
願 2014-214606。

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(国際水準臨床研究分野))

分担研究報告書

分担研究 6) 悪性胸膜中皮腫に対する Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター(Ad-REIC)を用いた遺伝子治療臨床研究

研究分担者 豊岡 伸一 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

本臨床研究は、悪性胸膜中皮腫に対し Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (以下、REIC/Dkk-3) 遺伝子発現アデノウイルスベクターを単独で投与した場合、安全性の検討(最大耐量の推定)を行うことを主目的とする。

A. 研究目的

悪性胸膜中皮腫症例に対して、REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターを単独で胸水または局所病巣内に直接投与する。

その際の質的、量的安全性を確認し、治療効果の判定を行うとともに、腫瘍退縮や腫瘍マーカーの低下を期待する際の根拠となる、組織学的、分子生物学的効果、ベクターの感染、mRNA レベル及びたんぱく質レベルでの REIC/Dkk-3 遺伝子の発現について総合的に解析することを目的とした第 I / II 相試験とする。

B. 研究方法

悪性胸膜中皮腫に対する、本遺伝子治療前検査にて選択基準に合致し、除外基準に抵触しないことを明らかにした上で、治療計画にしたがって遺伝子治療を施行する。REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターの局所投与による副作用の評価、治療

効果、及び REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターの最大耐量(定義: 最大の効果を認めかつ最小の副作用を示す用量)を推定するため、投与量を 1.0×10^{11} vp から開始し約 3 倍ずつ増量し、 3.0×10^{12} vp に至る 4 レベルの治療群を設定する。各用量レベルでそれぞれ 3 人の被験者を評価し、有害事象が発生しなければ逐次用量レベルの上昇を行う。ただし、有害事象が発生した場合はその重篤度を評価し、安全・効果評価・適応判定部会における検討結果に従い、症例数を追加して同一用量で検討するか、試験を中止するかを判断する。

最大耐量(Maximum Tolerated Dose, MTD)では 3 人に投与して問題なければさらに 3 人、計 6 人の被験者で評価する。つまり、各用量レベルでの安全性の検討(最大耐量の推定)を行った後、治療効果の観察も行うことを目的とする。遺伝子治療終了後、評価基準に従って安全性ならびに治療効果を評価する。

(倫理面への配慮)

REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた本遺伝子治療においては、CT ガイド下にながん病変部を直視しながらベクターを局所注入する手法、及び胸水貯留を認める胸腔中に注入する手法を用いており、導入された REIC/Dkk-3 遺伝子の過剰発現による腫瘍特異的アポトーシスを介して、一連の治療効果が誘導されることが期待される。REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター投与におけるヒトでの安全性をさらに確認、確保する目的で、種々の動物実験が実施されているが、動物実験レベルではいずれも有害事象は生じていない。

対象は前立腺がんであるが、すでに REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療が実施されており、平成 25 年 7 月現在までに計 20 症例（A 群 6 例及び B 群 14 例）で治療が実施され、主要エンドポイントである Ad-REIC を用いた遺伝子治療臨床研究の安全性については、現時点での確認が為された状況にある。したがって、これらの蓄積された情報より安全性に関して、重篤な副作用発現の可能性は低いと推測される。

被験者は本臨床研究について、文書に基づいて説明を受け、その内容と期待される治療効果及び危険性を十分に理解し、自主的に同意をした上で、同意書に署名するものとする。なお、同意後も被験者からの申し出により同意を撤回し、本臨床研究への参加をいつでも中止することができるものである。

C. 研究結果

現時点では REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデ

ノウイルスベクターの入手を完了し、ベクターを保管している。

D. 考察

臨床研究を始めるため準備を進めている。

E. 結論

現在は、臨床研究の準備段階である。

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

発明の名称：新規悪性中皮腫治療剤及び免疫賦活化剤

出願人：岡山大学 他

公開番号：WO 2010/013846

国内特許：特願 2010-522773
(特許査定通知)

特願 2014-106448

(分割出願)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	書籍名	出版社名	出版年	ページ
該当なし				

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	出版年	ページ
内田哲也, 松尾俊彦	色素固定薄膜型人工網膜（岡山大学方式人工網膜）の実用化に向けた医工連携の取り組み. 「特集 大学発！次世代を担うR&D特集」	機能材料	2014年5月	34(5):41-47
アラ木斯, 松尾俊彦, 細谷修, 筒井公子, 内田哲也	第51回日本人工臓器学会大会 Tominaga Award 2012 受賞レポート.	人工臓器	2014年6月	43(1):31-32
Tetsuhiro Kawata, Toshihiko Matsuo, Tetsuya Uchida	Glass transition temperature of dried lens tissue pretreated with trehalose, maltose, or cyclic tetrasaccharide.	SpringerPlus	2014年6月	3(317)
Toshihiko Matsuo, Tetsuya Uchida	Photoelectric dye-coupled thin film as a novel type of retinal prosthesis. "Intellectual Property and Enterprise"	Okayama Univ. e-Bulletin	2014年9月	8
松尾俊彦, 内田哲也	色素結合薄膜型の人工網膜 (OUREPTM) の医師主導治験を目指して. 「特集 人工臓器最近の進歩」	人工臓器	2014年12月	43(3):189-193
Alamusi, Toshihiko Matsuo, Osamu Hosoya, Kimiko M Tsutsui, Tetsuya Uchida	Vision maintenance and retinal apoptosis reduction in RCS rats with Okayama University-type retinal prosthesis (OUREPTM) implantation.	Journal of Artificial Organs	2015年2月	published online

機能材料

5

MAY 2014

2014年5月5日発行
(毎月5日発行)
第34巻 第5号 通巻393号
ISSN 0286-4835

大学発！次世代を担うR&D特集

ソフトコンタクトレンズ型バイオセンサを用いた
涙液糖計測と分泌動態評価

新奇クロロフィルを用いたエネルギー創生

高効率なRF-DC変換回路と無線LAN電波を利用した環境発電

高品質単結晶グラフェンの作製技術

安価で容易に作製できるフレキシブル透明導電膜

色素固定薄膜型人工網膜(岡山大学方式人工網膜)の実用化
に向けた医工連携の取り組み

半導体・絶縁体界面における電荷輸送の非接触定量測定技術

Market Data

太陽電池用ケミカルスの市場動向

タッチパネル工業の市場動向

シーエムシー出版