

週、生存期間(中央値) 16.6 週であり、期待した有効性は示せなかった。主な有害事象は γ GTP 上昇、高血糖、T-Bil、AST、ALT、ALP の上昇、貧血であり、忍容性は良好と判断された。

アルクチゲニンは Mitochondrial complex I を阻害することや癌幹細胞様細胞に対する効果も確認され、アルクチゲニンによる抗腫瘍活性の機序も明らかにされており、本薬剤の有効性が期待できるものと考えた。したがって、GBS-01 の癌幹細胞に対する効果を確認する目的にて、拡大コホートを Open し、治療前と 1 か月後に腫瘍生検を行い、POC (Proof of Concept)を確認することとした。2014/06/24-2015/01/23 までに 16 例が登録された。現在、拡大コホートで POC を確認している段階であり、POC が確認できればゲムシタビンとの併用療法などでの有効性を検討する予定である。

E. 結論

ゲムシタビンとフッ化ピリミジン系抗癌剤不応膵癌患者を対象として、GBS-01 の有効性と安全性を検討するために GBS-01 の多施設共同の前期第 II 相試験を医師主導治験として行ったが、主要評価項目は満たせなかった。現在、GBS-01 の癌幹細胞に対する効果の POC を確認するための、拡大コホートも登録を終了し、現在、解析中である。第 II 相試験の結果のみならず、拡大コホートの結果を勘案して、今後の開発方針を検討する予定である。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

1. 論文発表

(研究の刊行に関する一覧表に記載)

2. 学会発表

1. 藤岡ルミ、大和田賢、川島孝則、与茂田敏、土原一哉、望月のぶお、池田公史、佐藤暁洋、豊崎佳代、江角浩安。 栄養飢餓耐性制御抗腫瘍薬アルクチゲニンの作用点と臨床薬動学的マーカー(Poster Session) 第 73 回日本癌学会学術集会 2014/9/27 横浜市

H. 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]

抗癌剤及び副作用軽減剤

[出願人]

学校法人東京理科大学

クラシエ製薬株式会社

独立行政法人国立がん研究センター

国立大学法人富山大学

[発明者・所属機関]

江角 浩安 (東京理科大学)

池田 公史、土原 一哉 (国立がん研究センター東病院)

千葉 殖幹、与茂田 敏、川島 孝則、大窪 敏樹 (クラシエ製薬株式会社)

手塚 康弘 (富山大学)

[出願番号]

特願 2014 - 080895

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（革新的がん医療実用化研究事業）
分担研究報告書

我が国で新しく発明された概念に基づく抗がん剤アルクチゲニン臨床第Ⅱ相試験による膵がん克服

TR の実施

研究分担者 三牧幸代

独立行政法人国立がん研究センター 東病院 臨床開発センタートランスレーショナルリサーチ分野

研究要旨

アルクチゲニン臨床試験において収集される治療前後の膵がん生検材料を用いた超並列シーケンスによる網羅的遺伝子変異解析に必要な技術の開発を行った。ホルマリン固定を行った組織検体から抽出したゲノム DNA を用い、全エクソンシーケンスを行い、体細胞性変異候補を抽出した。体細胞性変異候補より、真の体細胞性変異を簡易的かつ迅速に抽出するためのパラメータ変数の探索を行い、高精度に真の体細胞性変異を抽出できるパラメータ変数とその条件を決定した。

A. 研究目的

アルクチゲニン臨床試験において収集される治療前後の膵がん生検材料より検出される体細胞性変異候補より、真の体細胞性変異を簡易的かつ迅速に抽出する手法の開発

B. 研究方法

一症例の手術材料ホルマリン固定がん部、非がん部組織からゲノム DNA を抽出し、全エクソンシーケンスを行い、得られたリードデータを Burrows-Wheeler Aligner (BWA) ソフトウェアを用い、ヒト参照ゲノム UCSC hg19 上に整列させ、Genome Analysis Toolkit (GATK) ソフトウェアを用いて体細胞性変異候補を抽出した。体細胞性変異候補より、真の体細胞性変異を抽出するため、ROC (Receiver Operating Characteristic) 解析により、感度、特異度が 1 に近似するパラメータ変数を探索した。

(倫理面への配慮)

ゲノム DNA のシーケンス解析はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に則り、国立がん研究センター倫理審査委員会の承認を得て行った。(2011-201)

C. 研究結果

小細胞肺がん一症例のホルマリン固定組織の全エクソンシーケンスの結果、25,455 の variant を検出した。公的 SNP データベース (dbSNP build 131, 1000 Genomes Project)、in-house SNP データベース (148 人分の非がん部データ)、本人非がん部データを用い、生殖細胞系列 variant を除し、1,046

variant を体細胞性変異候補として抽出した。ゲノムビューワを用い、1,046 の体細胞性変異候補の目視確認を行ったところ、真の体細胞性変異は 91 であり、955 は偽変異であった。真の体細胞性変異を抽出するパラメータ変数を探索するため、まず各 variant に付加される信頼スコア (confidence score) 0、10、30、50、100 以上で抽出した際の陽性率 (感度)、偽陽性率 (1-特異度) を算出し、ROC 曲線を描出したところ、信頼スコア 50 以上の条件で、感度 0.97、特異度 0.94 で抽出できることがわかった。しかしながら、偽陽性数は 56 と未だ少なくないため、信頼スコア 50 以上で抽出後の variant に対し、変異アレル頻度 (variant allele frequency) と順読み、逆読み変異リード本数をパラメータ変数として取り入れ、ROC 曲線を描出した。その結果、変異アレル頻度 10% 以上かつ変異リード本数順読み逆読み各 1 本以上の条件で、感度 0.97、特異度 0.75 で抽出できることがわかった。偽陽性数も 56 から 14 へと減じることができ、実用可能な条件であると判断した。以上の結果より、信頼スコア 50 以上、変異アレル頻度 10% 以上、変異リード本数順読み逆読み各 1 本以上のパラメータ条件により、真の体細胞性変異 91 のうち 85 (93.4%) を拾い、偽変異 955 のうち 941 (98.5%) を落とすことができ、実用的なパラメータ条件を見出すことができた。

D. 考察

現行の網羅的体細胞変異検出に使用されている変異検出ソフトウェアはおおむね精度良く変異の検出を行うことができるが、高精度の変異抽出においては未だ人的な微調整が必要である。今回の検討で複数のパラメータ変数を組み合わせること

で、簡易的かつ迅速に真の体細胞性変異を抽出できることがわかった。

E. 結論

アルクチゲニン臨床試験における膵がん生検組織材料による網羅的体細胞変異解析技術基盤が確立した。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

1. 論文発表

(研究の刊行に関する一覧表に記載)

2. 学会発表

日本癌学会学術総会 (2014)

J-2061 印刷工胆管癌の全エクソンシーケンス解析

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記なし

我が国で新しく発明された概念に基づく抗がん剤アルクチゲニン臨床第Ⅱ相試験による腫瘍がん克服

画像診断による POC 取得と患者層別化

研究分担者 藤井 博史

独立行政法人国立がん研究センター 東病院 機能診断開発分野 分野長

研究要旨

アルクチゲニンに対する感受性の予測等に有用と考えられる腫瘍内低酸素領域イメージングプローブの開発を行った。主に、SPECT 核種 ^{99m}Tc 標識分子プローブおよび低酸素環境で発現する hypoxia inducible factor (HIF) 1 α の活性を評価する分子プローブに関する検討を進めた。

^{99m}Tc 標識 SPECT プローブである ^{99m}Tc 標識 SD-128 は、SPECT 撮像に適した体内動態を示し、腫瘍内低酸素イメージング製剤としての臨床応用を検討する意義があるものと考えられた。

HIF-1 α 活性評価用の ^{111}In 標識 POH プローブは、ハロタグとハロタグリガンドの強い結合を反映して良好な安定性を示したため、前臨床研究でのがん病巣内の HIF-1 α 活性の評価に応用することが期待できる。

また、アルクチゲニンの治療に伴う腫瘍内血流状態の変化を観察するため、腫瘍移植モデルの腫瘍内血流を dynamic contrast-enhanced MRI (DCE-MRI)により、評価する技術の確立を目指した。

ヒト由来の腫瘍細胞を移植した齧歯類モデルにおいて、DCE-MRI は実施可能であり、治療に伴う腫瘍内部の血液灌流の状態を経時的に観察できる可能性が示された。

A. 研究目的

腫瘍内の低酸素低栄養領域に対して治療効果を発揮することが期待されるアルクチゲニン治療に対する感受性を評価するために、前年度に引き続き、腫瘍内低酸素領域を *in vivo* で可視化するための分子プローブに関する検討を進めた。具体的には、SPECT 核種 ^{99m}Tc で標識した分子プローブおよび低酸素環境で発現する hypoxia inducible factor (HIF)-1 α の活性を評価する分子プローブに関する検討を進めた。

また、アルクチゲニンが腫瘍内の低酸素低栄養領域に対して治療効果を発揮した場合、腫瘍内血流状態が変化することが予想されるため、腫瘍移植齧歯類モデルの腫瘍内血流状態を dynamic contrast-enhanced MRI (DCE-MRI)により、評価する技術の確立を目指した検討を行った。

B. 研究方法

1. ^{99m}Tc 標識低酸素イメージング SPECT プローブの開発

低酸素環境下で亢進している還元代謝活性により分解されることで、低脂溶性の脱離基を細胞内に停滞させ、脱離基に結合させた ^{99m}Tc からの γ 線により、腫瘍内低酸素領域を可視化するという

分子設計に基づいて低酸素イメージング SPECT プローブの開発を進めている。

これまでの検討結果から最も良好な腫瘍血液比が期待できる ^{99m}Tc 標識 SD-128 に関して、臨床応用を目指した検討を進めるために、その体内動態を評価した。

EMT-6 腫瘍細胞 5×10^5 個を皮下移植した balb/c nu/nu マウス(メス、8 週齢)に、 ^{99m}Tc 標識 SD-128 50kBq/100 μl を経静脈的に投与し、3 時間後までの主要臓器への分布を経時的に観察した。

また、投与 3 時間後および 6 時間後までの尿中および糞便中への排泄量についても計測した。

2. 腫瘍内の HIF-1 α の活性を評価する分子プローブに関する検討

腫瘍内の HIF-1 α の活性を評価するために、HIF-1 α の酸素依存的分解 (ODD) ドメインを組み込んだ分子プローブの開発を進めている。これまで、分子プローブの放射性核種標識にアビジン-ビオチン反応を利用した POS プローブを用いた検討を進めてきたが、今回は、放射性核種標識に、アビジン-ビオチン反応よりもより強固な結合を形成するハロタグ-ハロタグリガンドを用いた POH プローブを合成し、その有用性を検証した。

POH プローブは、細胞膜透過性配列ドメインと ODD ドメインの結合体に、ハロタグを結合させた

ものと、キレート剤 BnDOTA-NCS にハロタグリガンドを結合させたものを反応させて作成した。

^{111}In で標識した新規 HIF-1 α 活性評価用プローブ(POH プローブ)を FM3A 移植 C3H/He マウス(メス、8 週齢)に投与し、その体内分布を評価した。SPECT/CT 撮像により、POH プローブの腫瘍移行性を確認し、POH プローブの腫瘍内分布をオートラジオグラフィと病理組織学的検討により評価した。

3. DCE-MRI による腫瘍内血流状態の評価法の開発

Severe combined immunodeficiency マウス (CB17/Icr-scid/scid Jcl, n=4) の左側背部皮下に、ヒト膵臓癌細胞株 PANC-1 (CRL-1469, American Type Culture Collection [ATCC]) を、反対側にヒト大腸癌細胞株 HT-29 (HTB-38, ATCC) を移植し、腫瘍生着後 9.4 tesla 小動物専用 MRI 装置 (BioSpec 94/20, BrukerBiospin) を用い、DCE-MRI 検査を実施した。造影剤として gadopentetate dimeglumine (Magnevist, Bayer, 0.63 mmol/kg BW, 0.2 mL) をマウスの尾静脈より急速静注した。造影剤投与前約 20 秒間、投与中、投与後約 3 分まで、連続して腫瘍の T₁ 強調画像を撮影した。パルスシークエンスは、fast low angle shot (FLASH) を用い、繰り返し時間 37.9 ms、エコー時間 2.3 ms、フリップ角 60° とした。また、field-of-view は、40 × 40 mm、マトリックスは 256 × 256、スライス厚は 1 mm とし、パラレルイメージング法を併用し、時間分解能 5.3 秒にて合計 40 画像の連続撮影を行った。

(倫理面への配慮)

動物を対象とした実験的研究は、国立がん研究センター動物実験倫理委員会の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

1. ^{99m}Tc 標識低酸素イメージング SPECT プローブの開発

^{99m}Tc 標識 SD-128 血液中の放射能濃度は、投与後から速やかに低下した。

投与された ^{99m}Tc 標識 SD-128 の多くは、腎臓に移行し、投与 5 分後に投与量の 60% 以上が分布した。それらは速やかに尿中に移行し、3 時間後までに尿中に 60% 近くが排泄された(図 1)。

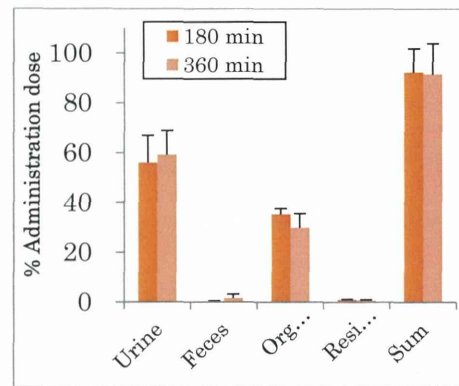


図 1 ^{99m}Tc 標識 SD-128 の体内量および排泄量

肝臓への分布量は比較的少なかったが、胃への分布が 3% 程度認められ、経時的に腸管の放射能が増加したことから、 ^{99m}Tc の一部は、SD-128 から脱離し、胃から消化管内に分泌され、消化管内を移動している可能性が示された。

腫瘍血液比、腫瘍筋肉比は、投与後 1 時間でほぼプラトーに達し、3 時間後まで維持された(図 2)。

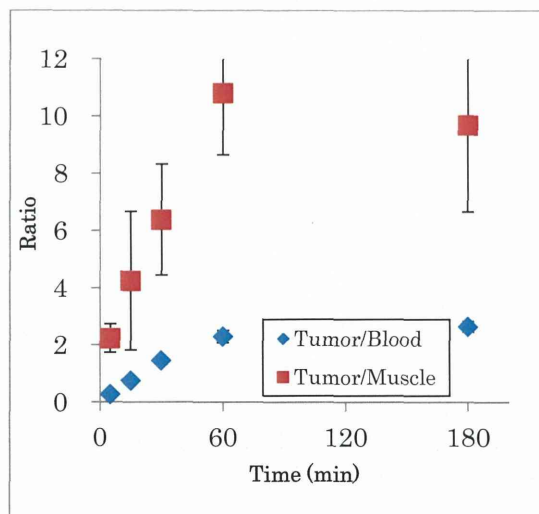


図 2 ^{99m}Tc 標識 SD-128 の腫瘍血液比および腫瘍筋肉比

2. 腫瘍内の HIF-1 α の活性を評価する分子プローブに関する検討

作成した ^{111}In 標識 POH プローブは、ハロタグとハロタグリガンドの強固な結合を反映して、血清中で安定であった。

FM3A 移植 C3H/He マウスに投与した ^{111}In 標識 POH プローブは、SPECT/CT 画像で、移植腫瘍に分布していることが確認された(図 3)。



図3 ^{111}In 標識 POH プローブを投与した FM3A 移植 C3H/He マウスの SPECT/CT 画像

^{111}In 標識 POH プローブ投与後に摘出した FM3A 移植のオートラジオグラフィにより、プローブの分布と HIF-1 α 免疫染色の結果との間には相関が示された(図 4)。



図4 ^{111}In 標識 POH プローブを投与した FM3A 移植腫瘍のオートラジオグラフィ(左)および HIF-1 α 免疫染色(右)

3. DCE-MRI による腫瘍内血流状態の評価法の開発

4 例全てで、DCE-MRI の取得に成功した。平均腫瘍サイズは、PANC-1 では 239 ± 90 、HT-29 では $311 \pm 152 \text{ mm}^3$ であり、それぞれ 3 病変では、腫瘍の辺縁部において造影剤投与後早期より信号が増加したのに対し、中心部では信号増加に乏しかった(図 5)。またそれぞれ 1 病変では腫瘍全体が投与後早期より高信号化した。PANC-1 と HT-29 の比較では、MR 信号の変化に差は認められなかった。

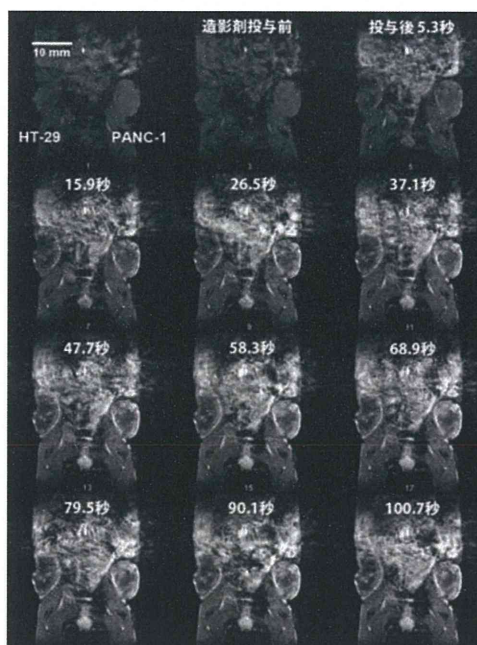


図5 マウス腫瘍モデルの DCE-MRI

D. 考察

1. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識低酸素イメージング SPECT プローブの開発

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識 SD-128 は、投与後 1 時間~3 時間にかけて、安定した腫瘍血液比および腫瘍筋肉比を示したが、この時間は、現在、実地診療で最も多くの件数が実施されている核医学検査である骨シンチグラフィや、現時点で低酸素イメージング検査として臨床研究が進められている ^{18}F -fluoromisonidazole (FMISO) の撮像タイミングよりも早い。このため、今後、腫瘍内低酸素イメージング製剤としての開発を検討する意義はあるものと考えられる。

体内動態に関する検討でも、速やかな腎排泄が観察されており、肝臓への移行が少ないため、これまで観察が難しかった腹部腫瘍(膵癌など)の低酸素イメージングへの応用も期待されるが、体内で分解されて生じたと考えられる $^{99\text{m}}\text{Tc}$ の移行によると考えられる胃へ集積および胃から腸への移行が認められるため、これに対する対策の検討が必要である。

2. 腫瘍内の HIF-1 α の活性を評価する分子プローブに関する検討

^{111}In 標識 POH プローブは、H24 年度に検討した ^{125}I 標識 POS プローブと同様に、SPECT 検査により、がん病巣内の HIF-1 α 活性の評価に用いることができる可能性が示された。現在用いている ODD ドメインを組み込んだプローブは、人に

対する抗原性の問題から、臨床応用に向けては克服すべき課題が多く残されているが、前臨床研究でのがん病巣内の HIF-1 α 活性の評価に応用することで、アルクチゲニンのような低酸素環境で抗腫瘍効果を発揮する製剤の抗腫瘍効果の機序の解明等に役立てることが期待できる。

3. DCE-MRI による腫瘍内血流状態の評価法の開発

ヒト膵臓癌及び大腸癌細胞を皮下移植したマウスモデルにおいて、DCE-MRI は実施可能であった。また、腫瘍内部の血液灌流の状態を観測可能であった。この撮影技術を利用し、ヒト膵臓癌モデルマウスにアルクチゲニン治療を実施し、治療前後に血液灌流の状態を非侵襲的に評価可能と考えられ、膵臓がん病変のアルクチゲニンに対する反応の評価や、アルクチゲニンの抗腫瘍メカニズムを腫瘍内血管再構築の観点から評価することに役立つ可能性がある。

E. 結論

^{99m}Tc 標識低酸素イメージング SPECT プローブ SD-128 は、その体内動態などから、今後、アルクチゲニン治療に対する感受性の評価等の臨床応用を視野に入れた検討を進めていく価値があるものと考えられた。

ハロタグ-ハロタグリガンドの強固な結合を利用した ¹¹¹In 標識 POH プローブは、前臨床研究での、がん病巣内の HIF-1 α 活性の評価に用いることが期待できる。

Dynamic contrast-enhanced MRI (DCE-MRI) は、腫瘍移植齧歯類モデルの腫瘍内血流状態の評価に利用できる技術であることが示されたため、アルクチゲニンの治療効果の判定への応用が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

(研究の刊行に関する一覧表に記載)

2. 学会発表

1) 梅田泉, 木村禎亮, 藤井博史: ニトロイミダゾール類とは異なる集積機序を持つ ^{99m}Tc 標識低酸素イメージングプローブの開発. 日本分子イメージング学会第 9 回総会・学術集会, 豊中, 2014/5/23

2) Umeda IO, Kimura S, Fujii H: New ^{99m}Tc-labeled hypoxia imaging probes with a novel retention mechanism. SNMMI 2014 Annual Meeting, St. Louis, MO, USA, 2014/6/9

3) 梅田泉, 石川龍太郎, 口丸高弘, 門之園哲也, 近藤科江, 藤井博史: 腫瘍内 HIF-1 活性を可視化するイメージングプローブの開発. 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2014/9/26

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

厚生労働科学研究費補助金（革新的がん医療実用化研究事業）
分担研究報告書

我が国で新しく発明された概念に基づく抗がん剤アルクチゲニン臨床第Ⅱ相試験による膵がん克服

膵がん化学療法のための画像診断に関する研究
研究分担者 佐竹 光夫
独立行政法人国立がん研究センター東病院 放射線診断医長

研究要旨

膵臓がんの診断は原発巣と転移巣の検索が重要で、さまざまな検査の中で 経時的な変化を患者負担が少なく、客観的に行える検査である必要がある。CT 検査は機種間の多様性が少なく、検査時間が短く、全身検索には優れた検査といえる。

A. 研究目的

膵臓がんは原発巣の評価とともに、転移巣の評価が予後推測のために重要である。FDG-PET/CT は悪性腫瘍の治療後の経過観察において、他の検査に比べ優位性は確立しているが、定期的な全身検索には医療経済的に現実的ではない。また MRI 検査は肝転移に関しては微細な病変まで検出可能で、骨転移の検出能も優れているが、肺転移や腹膜播種に関して撮影条件に依存している。CT 検査は再現性が高く、高速化に伴い、検査時間の短縮も図られ、全身検索として本研究の進行膵がんを対象とした治療評価に適していると考えられた。以上から CT 検査を用いて原発巣の評価および多彩な転移巣の評価を行った。

B. 研究方法

国立がん研究センター東病院で GBS-01 の前期Ⅱ相試験を行った 13 症例を Aquilion 64（東芝メディカルシステム株式会社）を使用し、原発巣および転移巣（肝臓、肺、リンパ節、その他）の経時的評価を行った。13 症例の内訳は、男性 10 例、女性 3 例（平均 60 歳）で、前治療として 7 例が化学療法で 6 例が術後であった。CT の撮影方法は、初回は膵臓を中心に上腹部を単純・動脈相・門脈相を撮影し、平衡相では頸部から骨盤までを撮影した。経過観察では、初回の平衡相と同様に頸部から骨盤までを撮影し、これを経時的に比較した。また CT の病変と腫瘍マーカー（CEA と CA19/9）の

経時的変化も比較した。

（倫理面への配慮）

本研究はヘルシンキ宣言に従い臨床研究を実施している。患者に対しては説明文書を用いて十分な説明を行い、患者自身による同意を本人より文書で取得した。また、患者のプライバシー保護に最大の努力を払っている。

患者データの利用に関しては直接個人を識別できる情報を用いず、解析を行う時は患者の個人情報保護を遵守した状態で研究を行っている。

C. 研究結果

原発巣と転移巣の存在については表 1 に示す。膵に評価病変のあるものは 10 症例で、膵に評価病変のない症例は全て切除術後症例であった。肝転移のあった症例は 11 例で、肺転移とリンパ節転移はそれぞれ 1 例のみであった。その他の転移巣としては、4 例に腹膜播種が存在し、腹壁、傍脊椎、脾臓、後腹膜転移がみられた。原発巣および転移巣の増大に従い、腫瘍マーカーも増加していた。

（表 1）

症例	膵	肝	肺	リンパ節	その他
1	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
2	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
4	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
5	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)

6	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
7	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
8	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
9	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
10	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
11	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
12	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
13	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)

D. 考察

膵臓がんは原発巣の評価が難しい悪性腫瘍の一つである。また、転移も多く、その評価に難渋することも少なくない。FDG-PET/CT は悪性腫瘍の全身検索において診断能が高く、優れた検査であるが、定期的な全身検索には医療経済的に制約が多く、本研究のような定期的経時的観察を要する場合、評価手段としては不相当と考える。MRI 検査は造影剤の EOB を用いた場合、肝転移に対し、経動脈性門脈造影 CT と感度・特異度ともに同等の評価が可能であり、侵襲性と反復性を考慮すると、最も優れた検査であると考えられる。さらに、骨転移の評価は骨シンチ以上の診断能を有している。しかし、肺転移に関しては感度が低く、また、腹膜播種では消化管の蠕動と腸間ガスの影響を受けやすく、診断に苦慮することも少なくない。従来 MRI 検査による全身検索では時間的な制約がかかる。一方、全身検索に対し、拡散強調画像を用いた研究では、FDG-PET/CT と同等の診断能を有するという報告がみられるが、機種による多様性があり、他施設を対象とした研究には現時点では対応できない。現在用いられている CT 装置は、高速化が実現され、膵臓がんの原発巣の評価はもとより、肺・肝臓・リンパ節・腹膜播種等の転移巣の検索に対し、検査時間の時間制約が少なく、反復性にも優れている。今回検討した 13 症例では、膵に原発巣が認められたものは 10 症例で、そのうち 4 症例に急激な増大が認められた。膵病変がみられなかった 3 症例はいずれも術後症例で、経過観察中に局所再発は認められなかった。11 症例では肝転移がみられ、6 例では急激な増大を認めた。肺転移とリンパ節転移はそれぞれ 1 症例ずつ認められたが、予後に影響する変化は認められなかった。肝転移の急激な増大を認めた症例のうち、3 症例では腹膜播種を認めた。これらの症例の場合、予後に腹膜播種が関わっており、全身検索の重要性が示唆される。今回の検討では、肺転移の症例

は 1 症例だったが、膵臓がんの肺転移は微小な結節である場合が多く、この検索には CT が優れていると考える。

全経過中では腫瘍マーカーの低下も認められたが、本研究中の腫瘍マーカーの推移は全症例上昇を示していた。腫瘍マーカーの上昇は画像による経過観察の契機としては重要である。

E. 結論

CT による膵臓がんの経過観察は原発巣および転移巣の観察に優れ、腫瘍マーカーの増加した場合、画像による検索が有用である。

G. 研究発表

1. 論文発表
(研究の刊行に関する一覧表に記載)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

我が国で新しく発明された概念に基づく抗がん剤アルクチゲニン臨床第Ⅱ相試験による膵がん克服

PK とファーマコゲノミクスの実施

研究分担者 岸野 吏志

明治薬科大学 薬剤情報解析学教室

研究要旨

アルクチゲニンは、栄養飢餓状態で有効性を示すという独創的なコンセプトを持つ画期的抗がん剤であり、非臨床試験のみならず、臨床試験結果からも高い安全性と有効性が期待される。また、アルクチゲニンを含有する牛蒡子は、原材料も安価であり医療経済性にも優れる。

これまでの GBS-01 第Ⅰ相臨床試験より、血漿中アルクチゲニン濃度及びその主代謝物であるアルクチゲニン-グルクロン酸抱合体濃度は患者間で顕著に異なることが明らかになった。

本研究では、ヌードマウスを用いてこれらが異なる要因について検討し、アルクチゲニンは主に小腸より吸収され、顕著に肝初回通過効果を受ける事が明らかになった。また、Nod Scid マウスに比べヌードマウスの AG/AGG 比は、肝臓、腎臓、腫瘍において著しく高い事から、臓器中 AG 濃度の違いは β -グルクロニダーゼによる脱抱合の関与が示唆された。

A. 研究目的

ゲムシタピン不応膵がん患者を対象とした GBS-01 の第Ⅰ相臨床試験の結果より、膵がん患者のアルクチゲニン (AG) 及び主代謝物であるアルクチゲニン-グルクロン酸抱合体 (AGG) の薬物動態は、患者間で著しく異なる傾向が認められた。本研究では、これらの要因を明らかにする目的でマウスを用いて AG の吸収部位、肝初回通過の有無、投与経路の違いによる血中動態を検討する。

また、GBS-01 を経口投与した時の臓器及び腫瘍組織移行性について検討する。

B. 研究方法

1. 対象試料

マウス (BALB/cAJcl-nu/nu又はNod Scid) 血漿・臓器 (肝臓、腎臓) ・腫瘍組織

2. 血漿中及び組織中濃度の測定法

血漿中AG濃度及びAGG濃度は、質量分析器付き高速液体クロマトグラフィー (LC-MS) 法にて測定した。また、組織中AG濃度及びAGG濃度は、常法により各組織をホモジネートした後、血漿と同様な方法で測定した。尚、本定量法の真度及び精度は、全て基準の範囲内 (真度 : 85~115%、精度 : 15%

以内) であった。

C. 研究結果

1. マウスにおける AG 及び AGG の血中動態とその変動要因

(1) AG の主な吸収部位の確認

経口投与時における AG の吸収部位を確認するために、ヌードマウス (各 n=3) を用い、胃の下部を結紮した後 AG エキスを胃内投与 (25 mg/kg) し、15 分後の血中 AG 濃度を測定した。また、十二指腸投与では、同様により十二指腸下部 5 cm を結紮後に AG エキスを注入し、同様に 15 分後の血中 AG 濃度を測定した。(図 1)

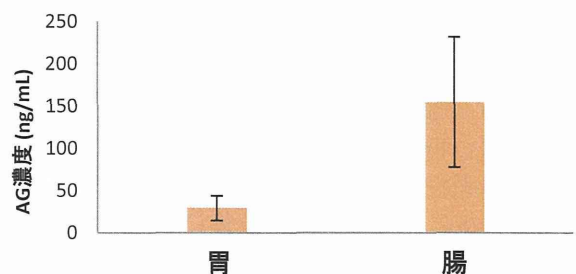


図1 胃内及び腸内投与15分後の血中AG濃度(空腹時、単回投与時)

投与15分後の血中AG濃度は、胃内投与に比べ腸内投与の方が顕著に高いことから、AGは主に小腸から吸収されることが明らかとなった。

(2) 肝初回通過効果について

まず、AGが肝臓でグルクロン酸抱合を受けることを確認する目的で、ヌードマウス(n=4)にAGエキス100 mg/kgを1日1回空腹時に単回経口投与し、投与15分後の門脈中及び末梢血中AG及びAGG濃度を測定した。(図2、3)

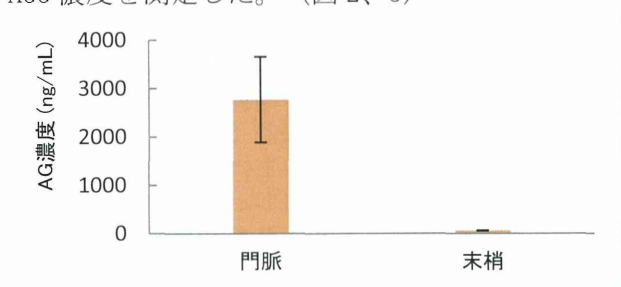


図2 門脈中及び末梢血中AG平均濃度(空腹時、単回経口投与15分後)

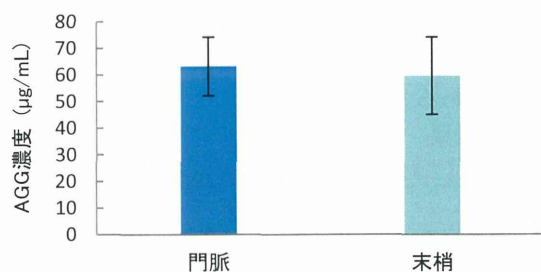


図3 門脈中及び末梢血中AGG平均濃度(空腹時、単回経口投与15分後)

投与15分後のAG平均濃度は、門脈血で高値を示したのに対し、末梢血ではほとんど検出されなかったことから、AGは肝臓で著しい初回通過効果を受ける事が明らかとなった。

また、門脈及び末梢血中AGGは高濃度であったことから、AGは肝臓で主にグルクロン酸抱合を受ける事が明らかになった。

次に、ヌードマウスに尾静脈投与及び経口投与した時の血漿中AG及びAGG濃度の時間推移を検討した。経口投与時の投与量はAGエキス2.5 mg/匹、尾静脈投与はAG 0.05 mg/匹とした。採血は投与5分後に眼窩より、30分後に心臓より行った。血漿中AG濃度の時間推移を図4に、AGG濃度の時間推移を図5に示す。

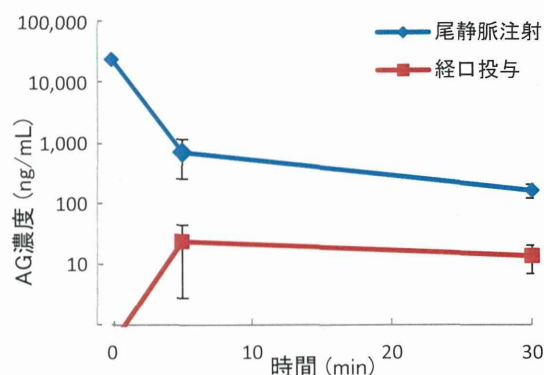


図4 尾静脈及び経口投与時の血中AG濃度推移(0~30分)

経口投与後の血中AG濃度は、投与量が尾静脈投与時の50倍であるのにも関わらず、尾静脈投与時の1/10~1/30と低濃度を示した。

また、尾静脈投与時の血中AG濃度は投与0~5分間に著しい減少が認められる事から、臓器への速やかな分布が示唆された。一方、5~30分間は尾静脈投与、経口投与共に穏やかな減少が認められ、両者間で顕著な違いは認められなかった。

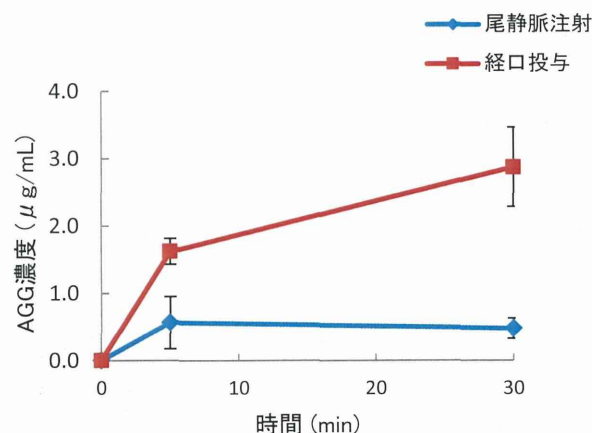


図5 尾静脈及び経口投与時の血中AGG濃度推移(0~30分)

また、血漿中AGG濃度は、経口投与では時間の経過と共に増加する傾向が見られたが、尾静脈投与では顕著な上昇が認められなかった。

2. マウスにおける臓器及び腫瘍組織への移行性

AGの臓器及び主要組織への移行性を確認するために、腫瘍を移植したヌードマウスにAGエキス25 mg/匹を空腹時経口投与し、15分後に血液、臓器及び腫瘍組織を採取しAG及びAGG量を測定した。組織中AG及びAGG量を図6、7に示す。尚、組織中AG及びAGG量は、各組織中タンパク濃度で補正した。

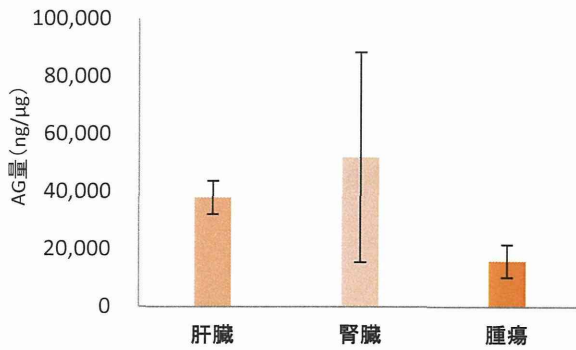


図6 各組織中 AG 量

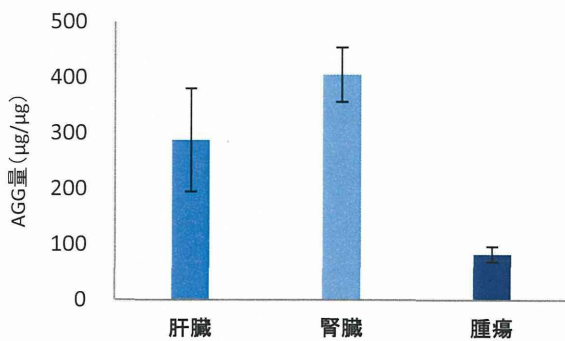


図7 組織中 AGG 量

臓器（肝、腎）及び腫瘍中 AG 量は、血漿中 AG 濃度に比べ、著しく高い事が明らかとなった。

3. β-グルクロニダーゼ活性の影響

臓器中の AG 濃度の異同性は、β-グルクロニダーゼ活性の影響によるものか否かを確認するために、ヌードマウスと Nod Scid マウスに腫瘍を移植後、AG エキス 100 mg/kg を経口投与した。投与 15 分後及び 30 分後に採血、臓器採取を行い、AG 及び AGG 濃度を測定した。尚、組織中 AG 及び AGG 濃度は、各組織中タンパク濃度で補正した。（図 8、9）

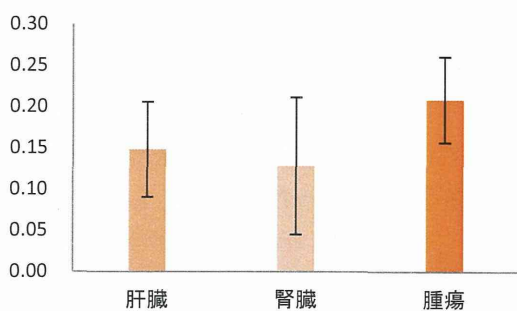


図8 ヌードマウスにおける組織中 AG/AGG 比 (ng/μg)

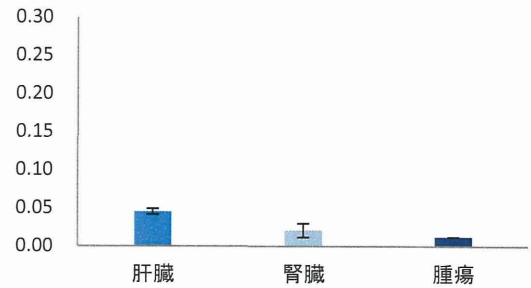


図9 Nod Scid マウスにおける組織中 AG/AGG 比 (ng/μg)

Nod Scid マウスに比べヌードマウスの AG/AGG 比は、いずれの組織においても高いことが明らかとなった。

D. 考察

AG は主に小腸から吸収されることが明らかとなったが、投与 15 分後の吸収率は胃内投与、腸内投与共に低値であったことから AG の吸収は緩徐であることが示唆された。

また、マウスに AG を尾静脈投与及び経口投与した際、血漿中 AGG 濃度は、経口投与では時間の経過と共に増加する傾向が見られたが、尾静脈投与では顕著な変化が認められなかったことより、AG は肝での初回通過効果の影響を大きく受ける事が明らかとなった。

マウスにおける臓器（肝、腎）及び腫瘍中 AG 濃度は、血漿中 AG 濃度に比べ著しく高い事が明らかとなったが、臓器中 AG 濃度の違いは β-グルクロニダーゼによる脱抱合の関与が示唆された。また、腫瘍組織では、ヌードマウスの AG/AGG 比が著しく高い事から、腫瘍においては β-グルクロニダーゼの活性が亢進している可能性が示唆された。

E. 結論

AG は主に小腸より吸収され、肝臓で主にグルクロン酸抱合され、顕著に肝初回通過効果を受ける事が明らかになった。また、臓器（肝、腎）及び腫瘍中 AG 濃度は、血漿中 AG 濃度に比べ、著しく高いことが明らかとなり、さらに臓器中 AG 濃度の違いは、β-グルクロニダーゼによる脱抱合の関与が示唆された。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録

特記事項なし

我が国で新しく発明された概念に基づく抗がん剤アルクチゲニン臨床第II相試験による膵がん克服

病理試料を用いた TR 研究の実施

研究分担者 小嶋 基寛

国立がん研究センター 東病院 臨床開発センター 臨床腫瘍病理分野

研究要旨

切除不能もしくは再発膵がん症例の標準的治療が複数承認され、実臨床においても治療効果予測マーカーの必要性が高まってくると考えられる。今回我々は、臨床試験に参加した症例の切除材料において、低酸素マーカーと、いわゆるがん幹細胞マーカーの発現を病理学的に検討し、GBS-01 の治療効果予測マーカーとしての有用性を検討した。論文などから抽出したそれらのマーカーには治療効果との相関が高い分子と低い分子が存在した。また、外科材料における発現と Tissue microarray を用いた発現が一致するマーカーとしないマーカーが存在し、マーカーによっては TMA や生検などの小さな検体における発現が腫瘍全体の分子発現を反映しない可能性があると考えられた。今回検討したマーカーの中では HIF-1 低発現が治療効果及び PFS の予測に有用であると考えられた。

A. 研究目的

GBS-01 の抗腫瘍効果を予測するバイオマーカーの検索をヒト腫瘍組織切片で行う。またバイオマーカー発現を手術材料と手術材料から小片を採取して作製した TMA で比較することで、将来的に生検材料などの小さな標本でも安定した評価が可能であるかを検討した。

B. 研究方法

GBS-01 の Phase I 試験に参加した患者のうち国立がん研究センター東病院に 外科切除された FFPE 腫瘍組織が存在する 8 症例の代表切片と Phase II 試験に参加した患者のうち、参加施設で外科的切除が施行され、FFPE 腫瘍組織が存在する 17 症例から採取された TMA 切片を用いた。TMA 切片は径 2mm のコアを FFPE 腫瘍組織から打ち抜き、採取した。上記検体において低酸素マーカーと報告されている HIF-1, CA-IX、がん幹細胞のマーカーと報告されている、CD133, CD44, ALDH1 の発現

を検討することで、まず、Phase I と II における再現性を検討した。Phase II 症例における上記マーカー発現と治療効果、PFS、OS との相関を検討することでマーカーとしての有用性を検討した。

（倫理面への配慮）

ヘルシンキ宣言および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に従って本研究を実施した。研究について国立がん研究センター研究倫理審査委員会に申請し理事長より承認を得た（研究課題番号 共同 K22-9）。

C. 研究結果

HIF-1: Phase I 症例の 62.5%(5/8)、Phase II 症例の 47.0%(8/17)が HIF-1 高発現と判定され、発現に差を認めなかった。Phase I, II のいずれにおいても治療効果 (non-PD) 症例に HIF-1 陰性症例が多く見られた。HIF-1 陽性症例は陰性症例と比較して PFS, OS が短い傾向が見られたが、有意差は認めなかった ($P = 0.09$ PFS, $P = 0.23$ OS)。

CA-IX: Phase I 症例における陽性割合は 50.0%(4/8)である一方、Phase II 症例は全例陰性であり (0/17)、Phase II 症例で有意に発現が低く、再現性に乏しかった ($P < 0.05$)。

CD133: Phase I 症例における陽性割合は 37.8% (3/8)、Phase II 症例の 35.3% (6/17)で発現に差を認めなかった。CD133 発現と治療効果及び PFS, OS との相関は認めなかった。

CD44: Phase I 症例における陽性割合は 50.0% (4/8)、Phase II 症例の 58.8% (10/17)であり、発現に差を認めなかった。CD44 発現と治療効果及び PFS, OS との相関は認めなかった。

ALDH1: Phase I 症例における陽性割合は 37.8% (3/8)、Phase II 症例の 17.6% (3/17)であり、Phase II 症例の発現が低い、有意差は認めなかった。ALDH1 発現と治療効果及び PFS, OS との相関は認めなかった。

E. 結論

今回検討したマーカーの中では HIF1 が治療効果予測マーカー候補になりうると考えられた。CA-IX は Phase I, II 症例において発現頻度が異なり、発現の不均一性に影響されていると考えられた。治療効果が予測可能でかつ再現性のあるマーカーが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

(研究の刊行に関する一覧表に記載)

2. 学会発表

1. Kawano S, Kojima M, Sugimoto S, Takahashi S, Saito N, Ochiai A. Correlation between the elastic modules of colorectal cancer tissue and clinicopathological and histological findings. 104th Annual Meeting of USCAP 2015. Modern Pathol 2015. 28 suppl(2):168 A.

2. Kojima M, Puppa G, Kirsch R, Basturk O, Frankel W, Vieth M, Lugli A, Sheahan K, Yeh M, Lauwers G, Risio M, Shimazaki H, Iwaya K, Kage M, Akiba J, Ohkura Y, Horiguchi S, Shomori K, Kushima R, Nomura S, Ajioka Y, Adsay V, Ochiai A. Construction of an objective pathological diagnostic system o

f blood and lymphatic vessel invasion. 104th Annual Meeting of USCAP 2015. Modern Pathol 2015. 28 suppl(2):171A.

3. 小嶋基寛 落合淳志. アンケート報告 新しいWHO分類に基づいた内分泌腫瘍の診断と治療方針 第80回大腸癌研究会 2013. 第80回大腸癌研究会抄録集

4. 小嶋基寛 落合淳志. 膵臓における腫瘍類似病変 腫瘍と鑑別を要する膵病変 overview 第103回日本病理学会総会 2014. 日本病理学会会誌 103(1):415, 2014.

5. 小嶋基寛. 漿膜弾性板を越えて浸潤する大腸癌に生じる形態変化と形成される微小環境の解明 第60回日本病理学会秋季特別総会 2014. 日本病理学会会誌 103(2):27, 2014.

6. Kojima M, Shimazaki H, Iwaya K, Kage M, Akiba J, Ohkura Y, Horiguchi S, Shomori K, Kushima R, Ajioka Y, Nomura S, Ochiai A. Pathological diagnostic criterion of blood and lymphatic vessel invasion in colorectal cancer: a framework for developing an objective pathological diagnostic system using Delphi method, from the Pathology Working Group of the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. 26th European Congress of Pathology 2014. Virchows Arch 2014. 165 supplement(1):S1.

7. Kojima M, Sudo H, Kawauchi J, Kondou S, Nobumasa H, Takizawa S, Ochiai A. MicroRNA markers for the diagnosis of pancreatic and bile duct cancers. 第73回日本癌学会学術総会 2014. 第73回日本癌学会学術総会プログラム p155.

8. 小嶋基寛: がん検査の最前線 病理検査から体液中マイクロRNAまで. 第73回日本癌学会学術総会 2014. 第73回日本癌学会学術総会プログラム p27.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

Ⅲ.研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 (外国語)

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌 (外国語)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Minchenko OH, Tsuchihara K, <u>Esumi H</u> , et. al.	Mechanisms of regulation of PFKFB expression in pancreatic and gastric cancer cells.	World J Gastroenterol	20(38)	13705-17	2014
Suzuki A, Makinoshima H, Wakabayashi H, <u>Esumi H</u> , et. al.	Aberrant transcriptional regulations in cancers: genome, transcriptome and epigenome analysis of lung adenocarcinoma cell lines.	Nucleic Acids Research	42(22)	13557-72	2014
Obata Y, Toyoshima S, Wakamatsu E, <u>Esumi H</u> , et. al.	Oncogenic Kit signals on endolysosomes and endoplasmic reticulum are essential for neoplastic mast cell proliferation.	Nat Commun.	5	5715	2014
Makinoshima H, Takita M, Matsumoto S, <u>Esumi H</u> , et. al.	Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling regulates global metabolic pathways in EGFR-mutated lung adenocarcinoma.	J Biol Chem	289(30)	20813-23	2014
Okusaka T, <u>Ikegawa M</u> , Fukutomi A, Ioka T, et. al.	Phase II study of FOLFIRINOX for chemotherapy-naïve Japanese patients with metastatic pancreatic cancer.	Cancer Sci.	105	1321-6	2014

Sugimoto M, Mitsunaga S, Yoshikawa K, <u>Ikeda M</u> , et. al.	Prognostic impact of M2 macrophages at neural invasion in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas.	Eur J Cance	50	1900-8	2014
Okusaka T, <u>Ikeda M</u> , Fukutomi A, Kobayashi Y, et. al.	Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Antitumor Activity of Ganitumab, an Investigational Fully Human Monoclonal Antibody to Insulin-like Growth Factor Type 1 Receptor, Combined with Gemcitabine as First-line Therapy in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer: A Phase 1b Study.	Jpn J Clin Oncol	44	442-7	2014
Shinohara A, <u>Ikeda M</u> , Okuyama H, Kobayashi M, et. al.	Efficacy of Prophylactic Minocycline Treatment for Skin Toxicities Induced by Erlotinib Plus Gemcitabine in Patients with Advanced Pancreatic Cancer: A Retrospective Study.	Am J Clin Dermatol	in press	PMID: 25687689	2015
Umemura S, <u>Mimaki S</u> , Makinoshima H, Tada S, et. al.	Therapeutic priority of the PI3K/AKT/mTOR pathway in small cell lung cancers as revealed by a comprehensive genomic analysis.	Journal of Thoracic Oncology	9	1324-31	2014
H. Kuno, H. Onaya, S. Fujii, H. Ojiri, <u>M. Satake</u> , et. al.	Primary staging of laryngeal and hypopharyngeal cancer: CT, MR imaging and dual-energy CT.	European Journal of Radiology	83(1)	e23-e35	2014
M. Ikeda, S. Mitsunaga, S. Shimizu, <u>M.Satake</u> , et. al.	Efficacy of sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma refractory to transcatheter arterial chemoembolization.	J Gastroenterol	49	932-940	2014

T. Ishihara, T. Kobayashi, N. Ikeno, <u>M. Satake</u> , et. al.	Evaluation of a Near-Infrared-Type Contrast Medium Extravasation Detection System Using a Swine Model.	J Comput Assist Tomogr	38(2)	285-292	2014
M. Sugimoto, S. Takahashi, T. Kobayashi, <u>M. Satake</u> , et. al.	Pancreatic perfusion data and post-pancreaticoduodenectomy outcomes.	Journal of Surgical Research	192(2)	441-9	2015
S. Murata, S. Onozawa, T. Mine, <u>M. Satake</u> , et. al.	Retrograde-outflow percutaneous isolated hepatic perfusion using cisplatin: A pilot study on pharmacokinetics and feasibility.	Eur Radiol	In Press	DOI 10.1007/s00330-014-3558-2	2015
<u>Kojima M</u> , Sudo H, Kawauchi J, Takizawa S, et. al.	MicroRNA Markers for the Diagnosis of Pancreatic and Biliary-Tract Cancers.	PLoS One	10	e0118220	2015
Yokota M, <u>Kojima M</u> , Higuchi Y, Nishizawa Y, et. al.	Spread of tumor microenvironment contributes to colonic obstruction through subperitoneal fibroblast activation in colon cancer.	Cancer Sci	In press.	doi:10.1111/cas.12615.	2015
Ueno H, Shirouzu K, Shimazaki H, Kawachi H, <u>Kojima M</u> , et. al.	Histogenesis and prognostic value of myenteric spread in colorectal cancer: a Japanese multi-institutional study.	J Gastroenterol.	49(3)	400-7	2014
Yamada E, Ishii G, Aramaki N, Aokage K, <u>Kojima M</u> , et. al.	Tumor-size-based morphological features of metastatic lymph node tumors from primary lung adenocarcinoma.	Pathol Int.	64(12)	591-600	2014
Saito N, Ito M, Kobayashi A, <u>Kojima M</u> , et. al.	Long-term outcomes after intersphincteric resection for low-lying rectal cancer.	Ann Surg Oncol	21(11)	3608-15	2014
Kaneko K, Yamaguchi H, Saito T, <u>Kojima M</u> , et. al.	Hypoxia imaging endoscopy equipped with laser light source from preclinical live animal study to first-in-human subject research.	PLoS One	9(6)	e99055	2014

Yokota M, <u>Kojima M</u> , Nomura S, Nishizawa Y, et. al.	Clinical impact of elastic laminal invasion in colon cancer: elastic laminal invasion-positive stage II colon cancer is a high-risk equivalent to stage III.	Dis Colon Rectum	57(7)	830-8.	2014
Sato M, <u>Kojima M</u> , Nagatsuma AK, Nakamura, et. al.	Optimal fixation for total preanalytic phase evaluation in pathology laboratories. A comprehensive study including immunohistochemistry, DNA, and mRNA assays.	Pathol Int.	64(5)	209-16	2014
Sugimoto M, Mitsunaga S, Yoshikawa K, <u>Kojima M</u> , et. al.	Prognostic impact of M2 macrophages at neural invasion in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas.	Eur J Cancer.	50(11)	1900-8	2014
Sugimoto M, Takahashi S, <u>Kojima M</u> , Gotohda N, et. al.	What is the nature of pancreatic consistency? Assessment of the elastic modulus of the pancreas and comparison with tactile sensation, histology, and occurrence of postoperative pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy.	Surgery	156(5)	1204-1117	2014

書籍（日本語）

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>小嶋基寛</u>	腫瘍類似病変	青笹克之	癌診療指針のための病理診断 プラクティス 肝・胆・膵腫瘍	中山書店	東京	2014	287-293

雑誌（日本語）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
池田公史、江角浩 安	何故、牛蒡子か？	胆と膵	36	105-8	2015
藤井博史	III 分子イメージング の臨床への展開 2. がんの分子イメージ ングの現状と展望	Innervision	29 (7)	63-66	2014
梅田泉、木村禎亮、 藤井博史	ニトロイミダゾール類 とは異なる集積機序を もつ ^{99m} Tc標識低酸素イメ ージングプローブの開 発	JSMI report	8 (1)	66-69	2014
佐藤正明、小嶋基 寛、永妻晶子、他	パラフィンブロックの 長期保存と採取試料の 固定までの時間が与え るKi-67免疫染色、DNA とRNAへの影響	診断病理	32(1)	12-17	2015