

**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**

**「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 相試験による膵がん克服」
に関する研究**

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 江角 浩安

平成 27 (2015) 年 5 月

目 次

・ 総括研究報告

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 相試験による膵がん克服 江角 浩安	1
---	---

・ 分担研究報告

1. 臨床導入の統括とTRの実施及び統括 江角 浩安	9
2. 臨床試験の計画、解析・臨床試験実施支援 佐藤 暁洋 試験統計デザイン・データ解析 野村 尚吾 薬事業務 渡邊 協孝 尾崎 雅彦	13
3. 臨床試験の実施 池田 公史 上野 秀樹 石井 浩	15
4. TRの実施 三牧 幸代	17
5. 画像診断によるPOC取得と患者層別化 藤井 博史	19
6. 膵がん化学療法のための画像診断に関する研究 佐竹 光夫	23
7. PKとファーマコゲノミクスの実施 岸野 吏志	25
8. 膵癌におけるアルクチゲニン効果予測の検討 小嶋 基寛	28

・ 研究成果の刊行に関する一覧表

・ 研究成果の刊行物・別刷

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）
総括研究報告書

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

研究代表者 江角浩安 学校法人東京理科大学 教授

研究要旨

平成 25 年 3 月第Ⅱ相試験登録を開始し、平成 25 年 11 月予定症例数 37 例のところ 39 症例登録 38 例が評価可能であった。主要評価項目の病勢制御割合は 34.2%であり、当初設定した数値(37.8%)には及ばなかった。無増悪生存期間(中央値)は 4.4 週であったが、6 例は、15 週以上の無増悪生存期間が認められた。GBS-01 の忍容性は良好であった。発生した重篤な有害事象は 5 件、治療との因果関係が否定できないものは脳梗塞の 1 例であった。アルクチゲニンは吸収後速やかにグルクロン酸抱合されたが、UGT1A1 および 9 が主要な責任酵素であった。アルクチゲニンのがん幹細胞様細胞に対する効果を利用した根治的化学療法開発のための POC 取得試験の為にプロトコル改訂を行い 2013 年 6 月 24 日から症例登録を開始し終了し現在解析中である。ゼノグラフトでは、抗がん剤との明確な相乗効果見られ、腫瘍血管網の Normalization 作用が観察されメカニズムの 1 つと考えられた。後期第Ⅱ相試験に向け準備中である。

分担研究者氏名及び所属施設

江角浩安	東京理科大学
佐藤暁洋	国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター
野村尚吾	国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター
渡邊協孝	国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター
尾崎雅彦	国立がん研究センター 東病院
池田公史	国立がん研究センター 東病院
上野秀樹	国立がん研究センター 中央病院
石井 浩	がん研究会 有明病院
三牧幸代	国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター
藤井博史	国立がん研究センター 東病院
佐竹光夫	国立がん研究センター 東病院
岸野吏志	明治薬科大学
小嶋基寛	国立がん研究センター 東病院

じめ乏血管性腫瘍では、酸素、栄養素ともに供給不足であり、特殊な微小環境を標的とした治療薬の開発に取り組んできた。その結果、アルクチゲニンを見出し同定した。この化合物は、低栄養下で選択的毒性を示し低酸素の影響を受けない独創的なものである。アルクチゲニンは「日局」収載生薬の牛蒡子に含まれ、クラシエ製薬(株)・富山大学との共同研究によりアルクチゲニン高含有牛蒡子エキスの製法特許を取得し(特願 2010-505497)、(PCT/JP2010/051701)及び追加特許出願(特願 2010-215118)を行った。この製法により GMP 適合施設で、顆粒剤(GBS-01)を製造し前臨床試験の後、GEM 不応膵癌患者を対象とした第Ⅰ/Ⅱ相試験(UMIN000005787)を平成 23 年 6 月より開始した。GBS-01 による有害事象はほとんど無く、用量レベル 2 で GEM・S-1 不応患者 1 名に PR(4 ヶ月継続)が得られた。この結果、本研究では医師主導治験として臨床第Ⅱ相試験を行うことを目的とする。

A. 研究目的

本研究は、極度に治療に抵抗する膵臓がん等乏血管性腫瘍に対する画期的薬物療法の開発を目的とする。膵がんに対しては手術療法だけが救命的治療法であるがその適応は膵がん患者の 2-30%程度である。しかし 5 年生存率は 20%程度である。放射線療法、薬物療法、ワクチン療法などの治療効果も限定的で、標準的薬物療法でも生存の延長はきわめて芳しくない。膵がん組織に見られるような強い低酸素と低栄養条件では既存の抗がん剤は効果を失う。膵がんは

B. 研究方法

国立がん研究センター東病院・中央病院、癌研有明病院を参加施設とし、早期・探索的臨床試験拠点整備事業により整備されている東病院臨床試験支援室が GCP に従った医師主導治験のデータセンター/モニタリングを担う。また、薬事専門家および生物統計家が関与する。具体的には分担研究者 佐藤暁洋が室長を務める、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がデータセンター/モニタリング/統計解析などの支援を

担当し、分担研究者 野村尚吾が同臨床試験支援室の生物統計家として、試験の統計デザイン及びデータ解析を担当する。分担研究者の渡邊協孝が、薬事担当者として薬事戦略立案の支援及び薬事戦略相談の支援を行う。

薬物動態解析は明治薬科大学、付随したマーカー探索・分子イメージングなどのトランスレーショナルリサーチについては東病院臨床開発センターの各部門が担う。治験に使用する GBS-01 は、国立がん研究センター東病院とクラシエ製薬(株)、富山大学により共同開発された製法特許に基づきクラシエ製薬(株)により GMP グレードで調製された製剤を用いた。

Phase II 部分は「ゲムシタピ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た GBS-01 の前期第 Ⅰ 相試験」の題名のもと医師主導治験として取り組んだ。予定登録数：37 名（治験実施計画適合集団（Per Protocol Set：PPS）として）治験実施予定期間：2013 年 1 月～2014 年 6 月である。

Primary endpoint：8 週の病勢制御割合（Disease Control Rate：DCR）

Secondary endpoints：有害事象

奏効割合（response rate：RR）

無増悪生存期間（Progression free survival：PFS）

全生存期間（Overall survival：OS）

薬物動態学的パラメー

Exploratory endpoint：バイオマーカー

付随研究として、アルクチゲニンの作用機序の解明に基づくバイオマーカーの開発、特にゲノム、メタボローム、プロテオーム解析を臨床資料についても可能な限り行う。更に、画像技術を臨床的基礎的に駆使して POC の取得に関し努力することとした。

またゼノグラフトモデルで明確ながん幹細胞様細胞に対する選択毒性を持つことが明らかになった。この選択毒性を明らかにするために、GBS-01 の投与前後に採血、腫瘍生検を行い、がん幹細胞様細胞の減少が認められるか否かを確認する拡大コホートを計画し[Proof of concept(POC)試験] POC の検討が可能な症例を 10 例、追加することとして、参加施設でのプロトコル改訂審査および PMDA へのプロトコル改訂届け出を行い、2013 年 6 月 24 日から症例登録を行った。

（倫理面への配慮）

当該臨床試験は、ヘルシンキ宣言、医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令、薬事法および薬事法施行規則とその関連通知などを準拠して実施される。参加各施設の IRB にプロトコルを提出し審査・承認を受けた。GCP に準拠して治験を行

った。

C. 研究結果

Phase II の症例登録状況

国立がん研究センター東病院、中央病院、がん研有明病院の 3 施設で行った。平成 25 年 1 月 17 日初回治験届を提出し、平成 25 年 3 月 11 日から登録を開始した。平成 25 年 11 月 5 日までに 39 例の登録を終了した。患者背景(全 39 例)は、年齢(中央値)は 64 (範囲：38-81) 歳、男性 27 例、PS は 0 が 28 例、1 が 11 例であった。全例で腺癌が確認され、臨床病期は局所進行が 3 例、遠隔転移が 36 例であった。遠隔転移臓器は肝 29 例、腹腔リンパ節 10 例、腹膜 7 例、肺 8 例であった。前切除歴は 24 例に認め、前化学療法歴は、Gemcitabine 29 例、S-1 34 例、Gemcitabine+S-1 5 例、FOLFIRINOX 2 例であった。

これまでに発生した重篤な有害事象は 5 件で、そのうち、治療との因果関係が否定できない有害事象は脳梗塞の 1 例のみであった

臨床的効果

2013 年 11 月までに 39 例の登録を終了した。うち一例は不適格例となったので解析は 38 例で行った。なお、国立がん研究センター東病院、中央病院、がん研有明病院の 3 施設で登録を行ったが、偶然ではあるが各施設 13 例の登録であった。主要評価項目の病勢制御割合は 34.2%であり、当初設定した数値(37.8%)には及ばなかった。無増悪生存期間(中央値)は 4.4 週であったが、6 例においては、15 週以上の無増悪生存期間が認められた。また、GBS-01 の忍容性は良好であった。

アルクチゲニンのがん幹細胞様細胞に対する効果

昨年度から引き続きがん幹細胞に対する効果を検討した。がん幹細胞は幹細胞ニッチと呼ばれる特別な部位に存在すると考えられている。このニッチの特徴の 1 つが、低酸素環境と低栄養環境である。アルクチゲニンは元々、がん細胞が低酸素・低栄養で生存する場合の適応反応を阻害する効果を指標としてスクリーニングされたものであるため、がん幹細胞様細胞に対し生体内では強い効果を示すのではないかと考えてきた。昨年度までの研究でヒト膵がん細胞株 PANC 1 細胞を用い低グルコース条件で、CD24、CD44、ESA 陽性細胞への影響をゲムシタピンと比較しアルクチゲニンは顕著ながん幹細胞抑制を持つことを見出した。また、Oct3/4、Nanog、SOX2 の発現を検討すると、1-2 μM でほぼ完全に抑制した。ヌードマウスに MiaPaCa2 細胞を移植し、5 週間アルクチゲニン投与の後、がん幹細胞様細胞の比率をゲムシタピン

処理群と比較した。CD24+, CD44+, ESA+, 細胞の割合を PI-, H-2kd-の細胞における比率で幹細胞様細胞を検出した場合およびCD133+, CD44+の細胞で検出した場合の無処置、ゲムシタビン単剤投与、アルクチゲニン単剤およびアルクチゲニンとゲムシタビン併用投与の場合の比較をした。その結果、アルクチゲニンは、ゼノグラフトモデルで明確ながん幹細胞様細胞に対する選択毒性を持つことが明らかになった。この選択毒性がヒトの体内でも観察されるか否かを明らかにするために、GBS-01の投与前後に採血、腫瘍生検を行い、がん幹細胞様細胞の減少が認められるか否かを確認する拡大コホートを計画した[Proof of concept (POC)試験]。POCの検討が可能な症例を10例、追加することとして、プロトコル改訂を行った。各施設での倫理審査とPMDAへのプロトコル改訂を届けた後、2013年6月24日から症例登録を開始した。症例集積は順調で、拡大コホートの登録終了し現在その試料に関する解析を行っている。

GBS-01 と化学療法には顕著な併用効果が認められる

先に述べたごとく、GBS-01にはがん幹細胞様細胞に対する効果があるために、従来の抗がん剤との併用効果が認められるのではないかと考えた。

大腸癌細胞株 LS174T 細胞ゼノグラフトモデルではアバスタチンとの併用効果が認められた(図1)。

図 1A

大腸がん細胞 LS174T ゼノグラフトを用いた牛蒡子エキスとアバスタチンの併用実験

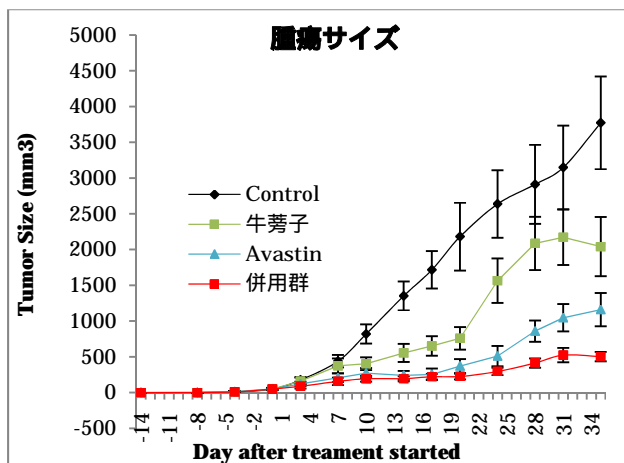
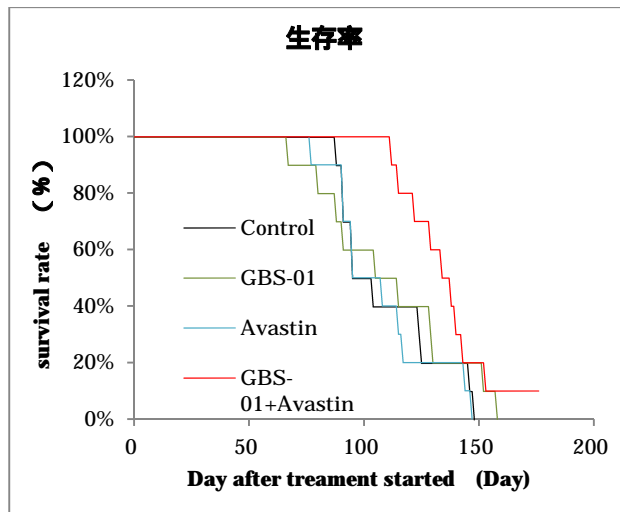


図 1B



ヒト膵がん細胞株 MiaPaca2 を用いたゼノグラフトではオキサリプラチン、塩酸イリノテカンなどで顕著な併用効果が見られた。

図 2A

ヒト膵がん細胞 Miapaca2 を用いた併用実験

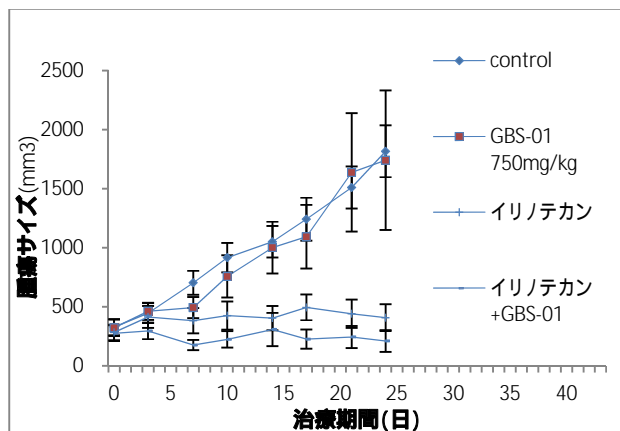
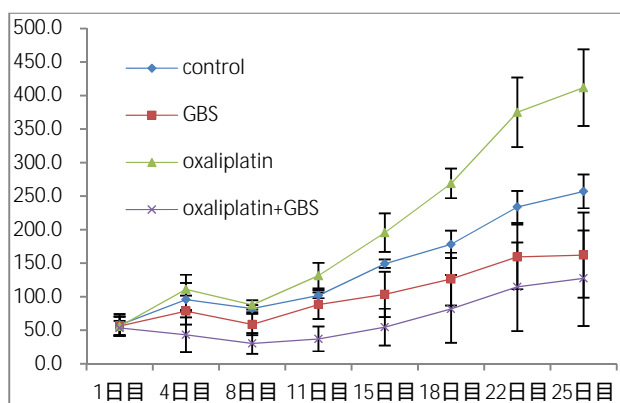


図 2B



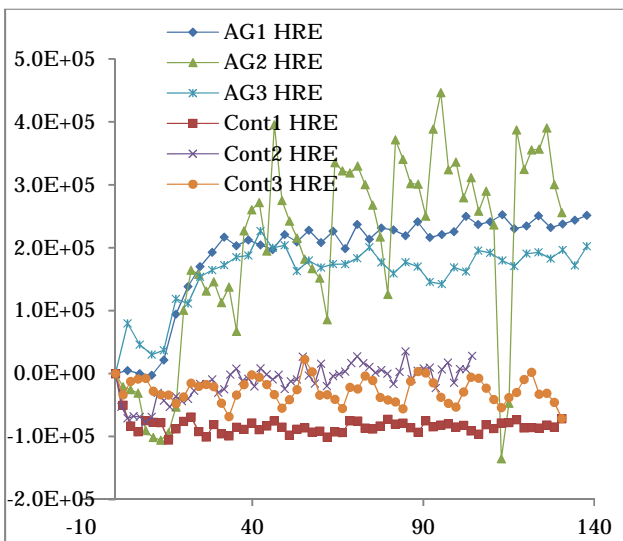
これらの併用効果のメカニズムに関しては現在も検討中であるが、既に述べたアルクチゲニンによるがん幹細胞様細胞に対する毒性もその1つで

ある。

一方、アルクチゲニンによる治療を行った腫瘍では潰瘍が起こりにくいという所見に基づき、アルクチゲニン治療による組織の Perfusion に対する影響の検討を行った。ガドリニウム DTPA を用いた MRI 画像による Perfusion 測定を動物用 9.4T MRI を用いて行った。その結果を図 3 に示す。

5XHRE をプロモーターに持った Luciferase 遺伝子を組み込んだヒト膵がん細胞株のゼノグラフトモデルでも腫瘍の中に占めるルシフェラーゼ陽性の低酸素領域の現象が観察された。一方、組織を免疫染色し CD41 陽性の腫瘍血管の密度を調べると有意の差は見られなかった。それらのことから、アルクチゲニンの投与により腫瘍血管網、組織の再構築が起こり、より機能的な血管網に再構築が起こっていることが考えられた。

図 3
ガドリニウム DTPA を用いた MRI による Perfusion の検討



これらの結果、GBS-01 には、ベバシズマブで見られるような腫瘍血管網の Normalization 作用も確認された。他の抗癌剤との併用効果のメカニズムの 1 つであると考えられた。ゼノグラフトモデルでは腫瘍の消失例も認められた。今後、GBS-01 の開発は、他の抗癌剤との併用で進めるか、単剤で進めるか第 II 相試験の結果も考慮し、検討中である。

GBS-01 投与と血中乳酸

昨年度、一昨年度の研究でアルクチゲニンがミトコンドリアの複合体 I を阻害すること、ヒトへの投与の結果乳酸血中濃度の上昇が、毒性や効果の指標になる可能性を検討した。尚、この研究は

念のためにプロトコルの軽微な変更であるが倫理審査委員会の審査を受けた。Phase I に登録された 15 名の患者の血漿を用い、乳酸を測定し、血漿乳酸濃度は GBS-01 の投与量に応じて高くなった。全体の約半数の患者で上昇が見られたが、残り半数および健常ボランティアでは上昇は見られなかった。一例では最高値 7 mM と明らかな上昇が見られたが、一時的で数時間で正常値に復していた。軽微な上昇を来した患者でも同様で上昇は一時的であった。最高値の 7 mM は、健常人がやや激しい運動を行った時の乳酸上昇に相当する。臨床的に乳酸アシドーシスの症状を呈した患者は認められなかった臨床の報告と一致する。

乳酸値の上昇が血中のアルクチゲニン或いは AGG の上昇と一致するの否かを調べた。その結果、Cmax でも、AUC でも、AG との相関は見られなかった。AGG との相関も見られなかった。これらのことは、AG が活性体であるが、どこでグルクロン酸抱合されているのかという問題と、乳酸の上昇はどの臓器或いは細胞で起こっているのかの問題に直接つながる重要な情報である。最近アルクチゲニンだけではなくメトフォルミンやフェンフォルミンなど複合体 1 に対する阻害効果をもつ薬剤のがん治療への応用が広く検討されている。

そこでマウスを用いて、どのような要因が乳酸値の上昇を決めるのかを明らかにすることを試みた。マウスにアルクチゲニンを経口投与すると 5 分後から既に血中にアルクチゲニンおよびそのグルクロン酸抱合体が検出された。さらに 30 分後までアルクチゲニン、および抱合体の血中濃度は上昇したが乳酸の上昇はほとんど見られなかった。経口投与されたアルクチゲニンは速やかにグルクロン酸抱合されるために乳酸の上昇は見られない可能性も有り、小腸や胃のパウチに投与し門脈血中のアルクチゲニンと組織中の乳酸濃度を検討したが、アルクチゲニンは充分の濃度門脈血に検出されるにも関わらず小腸や胃の粘膜に乳酸は検出されず軽度の上昇を見たのは肝臓と腎臓であった。どのようなメカニズムでこの様なことが起こるのか解析が必要であるが、ヒトの場合でも肝機能と乳酸濃度が相関する。血漿中乳酸濃度は、産生速度よりはクリアランスが大きな因子であるヒトでの可能性と矛盾しない。アルクチゲニンはグルクロン酸抱合体のままでは活性が極めて低い。肝臓で抱合された後末梢組織での再活性化、或いはアルクチゲニンとしての極めて素早い組織分布の可能性が示唆された。マウスで静脈内投与した後の各臓器のアルクチゲニン含量を見ると血中から臓器への分布も大きな因子であることが示唆された。

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。

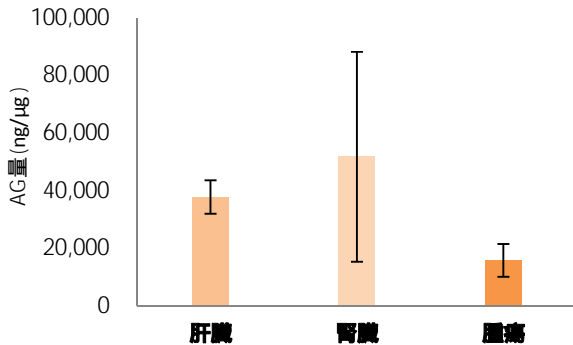


図6 各組織中 AG 量

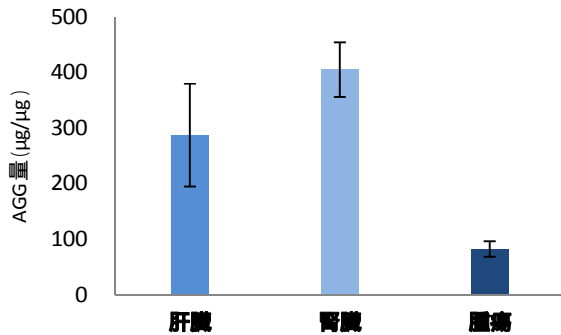


図7 組織中 AGG 量

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。

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)

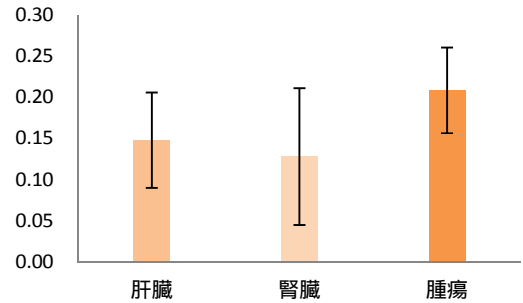


図8 ヌードマウスにおける組織中 AG/AGG 比 (ng/μg)

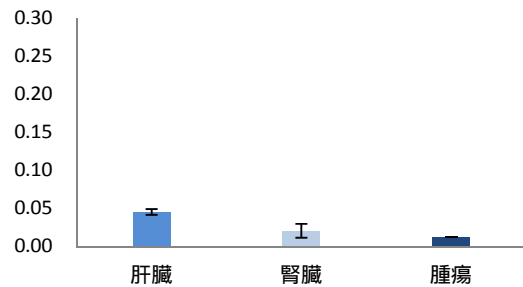


図9 Nod Scid マウスにおける組織中 AG/AGG 比 (ng/μg)

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。

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。

病理試料を用いたTR研究の実施

GBS01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。

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。

今回検討したマーカーは、PFS、OS の予測マーカーとしての有用性は認められなかった。

病理標本を用いたゲノム解析の可能性の検討

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。

症例選択に役立つ画像情報の探索

国立がん研究センター東病院で GBS-01 の前期相試験を行った 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、初回は脾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。

原発巣と転移巣の存在については、脾に評価病変のあるものは 10 症例で、脾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。CT による脾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。

医師主導治験を支える体制に関する検討

平成 25 年度に、薬事相談・プロトコール・各種 SOP の作成、治験届け、EDC の構築等を実施し、平成 25 年 3 月 11 日より患者登録を開始した。同日に 1 例目を登録し 11 月 5 日までに 39 名の患者登録を行い、予定登録数に達したために登録を終了した。登録ペースは予定登録数を上回り順調な登録が行われた。

平成 25 年度は、施設訪問モニタリングを 36 回実施し、進捗・背景因子の集計・安全性情報などを記載した定期報告レポートを 7 回発行した。また、データマネジメントに関連して EDC システムのコンピューターシステムバリデーションを実施した。

重篤な有害事象に関する当局報告を 2 報、研究報告を 1 報、治験変更届けを 1 回それぞれ PMDA に報告している。中間解析を 1 回実施した。

監査についても、治験調整事務局に対する監査を 1 回、参加施設に対する監査を 2 回、外注先の CRO が実施、概ね問題がないとの監査結果を得ている。

総括報告書作成に向けて、外注先の CRO と打合せを開始したが、プロトコール改訂をした後に登録を追加することとなったため、一度作業を中止し、プロトコール改訂作業を実施している。

PK 解析に関しても、PK 解析に必要な EDC の改修及びシステムバリデーションを実施した。(添付資料 1)

参加施設側としての支援として、国立がん研究センター東病院として 13 名を登録し、CRC 業務を実施している。

D. 考察

Phase IIA 部分での結果はこれから最終解析を行うが、予備的解析では、15 週以上の SD 症例は観察されたが、明確な抗腫瘍効果を示した症例は観察されなかった。主要評価項目の病勢制御割合は 34.2%であり、当初設定した数値(37.8%)には及ばなかった。無増悪生存期間(中央値)は 4.4 週であったが、6 例においては、15 週以上の無増悪生存期間が認められた。現在、15 週以上の無増悪生存例についてはメタボローム、ゲノムの解析などのバイオマーカー検討を行っている。しかし、当初設定した Primary endpoint は達成できなかったと考えられる。いっぽう、GBS-01 の忍容性は Phase I で観察されたごとく良好であった。

アルクチゲニンは、ゼノグラフトモデルで明確ながん幹細胞様細胞に対する選択毒性を持つことが明らかになった。また、GBS-01 には、ペバシズ

マブで見られるような腫瘍血管網の Normalization 作用も確認された。他の抗癌剤との併用効果を調べると、培養細胞レベルでは併用効果は認められなかったが、ゼノグラフトモデルでは腫瘍の消失例も認められた。アルクチゲニンが組織レベルの微小環境饒辺かを通じて併用効果を表していることを強く示唆する。今後、GBS-01 の開発は、他の抗癌剤との併用で進めるか、単剤で進めるか第 II 相試験の結果と共に、これらの研究結果も考慮し、検討する予定である。また、がん幹細胞様細胞の減少を指標とした拡大第 II 相試験を追加し併用療法開発や、次の段階へのステップアップに必要な POC を取得することを目指し、解析を待っている段階である。これらの結果を待って次の段階への方針が決まるものと考えられる。

今回の医師主導治験への歩みを振り返ってみる。臨床試験支援室による支援(佐藤)、生物統計家による支援(野村)、薬事専門家による支援(渡邊)によって、研究費が採択されてから、登録開始まで約 9 ヶ月という短期間で、GCP 準拠の医師主導治験が効果的に準備・開始することが可能となった。医師主導治験としては極めて順調であり、今の支援体制がとても効率よく働いていることを示している。第 II 相部分でも約半年で予定以上の症例登録ができたことは研究組織の研究能力を如実に示している。

E. 結論

Phase I の結果から、GBS-01 はゲムシタピン不応の進行膵癌患者に対して、忍容性は良好で、腫瘍縮小効果も確認された。第 II 相試験も患者登録は予想以上に順調であった。残念ながら当初設定した病勢制御率 37%は達成できなかったが、今後の発展のための、がん幹細胞を減少させると言う POC 取得が次の段階への大きな展望を開くと考えられるし、非臨床試験でのこれを支持する結果、および vascular normalization と呼ばれる作用は今後併用試験の合理性を指し示している。

F. 健康危険情報

GBS-01 の重篤な有害事象として、脳梗塞と拡張型心筋症の報告があった。(既に医薬品医療機器総合機構にも報告済み。)

G. 研究発表

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

1. 特許出願

1) 江角 浩安

[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

特許登録

1) 発明の名称：抗癌剤

出願人（権利者）：国立がんセンター、クラシエ製薬、富山大学

出願番号：2012-069964

登録日：2015年3月2日

2) 抗癌幹細胞剤

出願人（権利者）：国立がんセンター、クラシエ製薬、富山大学

出願番号：PCT/JP2014/061396

登録日：2015年1月22日

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
臨床導入の統括とTRの実施及び統括

研究分担者 江角 浩安 学校法人東京理科大学 教授

研究要旨

昨年度までの研究で、アルクチゲニンのグルクロン酸抱合、その再活性化、血中乳酸の上昇など Phase I 試験の結果に絡むことを明らかにしてきたが、さらに、がん幹細胞様細胞に対する効果も明らかにしてきた。今後の開発の方向を決めるために直接に関わる、がん幹細胞への作用の解析、アルクチゲニンの体内での解毒と再活性化などを中心に解明してきた。また、ゼノグラフトでは、抗がん剤との明確な相乗効果見られ、腫瘍血管網のNormalization作用が観察されメカニズムの1つと考えられた。後期第Ⅱ相試験をどのようなデザインにするのか、特に既存の抗がん剤との併用に関する基本的コンセプトを得ることが出来た。

A. 研究目的

アルクチゲニンの作用点を明らかにすることおよび薬動学的マーカーの開発、および新しい開発レジメン開発の根拠となるメカニズムの解明を目的とする。

B. 研究方法

臨床第Ⅰ/Ⅱ相試験の残余検体、第Ⅱ相試験の検体などを用いたバイオマーカーの開発。培養ヒト膵がん細胞を用いた作用メカニズムの研究と、がん幹細胞様細胞への効果の検討ではゼノグラフトモデルを用い単クローン抗体を用いた FACS による解析にて幹細胞様細胞への影響を解析する。また、組織レベルでの微小環境に対する影響の検討では、藤井班員と共に、MRI, SPECT, CT などを用いた解析、および低酸素に反応しルシフェラーゼを発現する遺伝子 HRE-luciferase を導入したヒト膵がん細胞や大腸がん細胞を用いたゼノグラフトも用いた治療実験を行った。

（倫理面への配慮）

臨床検体を用いた研究は全て倫理審査委員会に申請し承認を得た後に行った。個人情報の扱いに関してはプロトコルどおり。実験動物を用いた研究は、国立がん研究センター動物倫理審査委員会の承認の下に研究を行った。

C. 研究結果

アルクチゲニンのがん幹細胞様細胞に対する効果

昨年度から引き続きがん幹細胞に対する効果を検討した。がん幹細胞は幹細胞ニッチと呼ばれる特別な部位に存在すると考えられている。このニ

ッチの特徴の1つが、低酸素環境と低栄養環境である。アルクチゲニンは元々、がん細胞が低酸素・低栄養で生存する場合の適応反応を阻害する効果を指標としてスクリーニングされたものであるため、がん幹細胞様細胞に対し生体内では強い効果を示すのではないかと考えてきた。昨年度までの研究でヒト膵がん細胞株 PANC 1 細胞を用い低グルコース条件で、CD24, CD44, ESA 陽性細胞への影響をゲムシタピンと比較しアルクチゲニンは顕著ながん幹細胞抑制を持つことを見出した。また、Oct3/4, Nanog, SOX2 の発現を検討すると、1-2 μM でほぼ完全に抑制した。ヌードマウスに MiaPaCa2 細胞を移植し、5 週間アルクチゲニン投与の後、がん幹細胞様細胞の比率をゲムシタピン処理群と比較した。CD24+, CD44+, ESA+, 細胞の割合を PI-, H-2kd- の細胞における比率で幹細胞様細胞を検出した場合および CD133+, CD44+ の細胞で検出した場合の無処置、ゲムシタピン単剤投与、アルクチゲニン単剤およびアルクチゲニンとゲムシタピン併用投与の場合の比較をした。その結果、アルクチゲニンは、ゼノグラフトモデルで明確ながん幹細胞様細胞に対する選択毒性を持つことが明らかになった。この選択毒性がヒトの体内でも観察されるか否かを明らかにするために、GBS-01 の投与前後に採血、腫瘍生検を行い、がん幹細胞様細胞の減少が認められるか否かを確認する拡大コホートを計画した[Proof of concept (POC) 試験]。POC の検討が可能な症例を 10 例、追加することとして、プロトコル改訂を行った。各施設での倫理審査と PMDA へのプロトコル改訂を届けた後、2013 年 6 月 24 日から症例登録を開始した。症例集積は順調で、拡大コホートの登録終了し現在そ

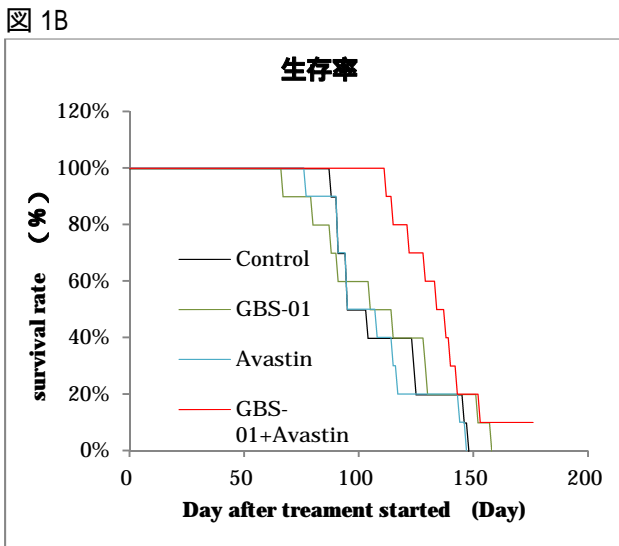
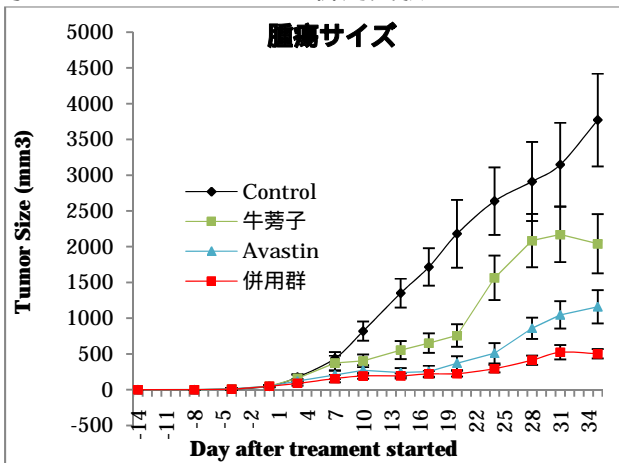
の試料に関する解析を行っている。

GBS-01 と化学療法には顕著な併用効果が認められる

先に述べたごとく、GBS-01 にはがん幹細胞様細胞に対する効果があるために、従来の抗がん剤との併用効果が認められるのではないかと考えた。

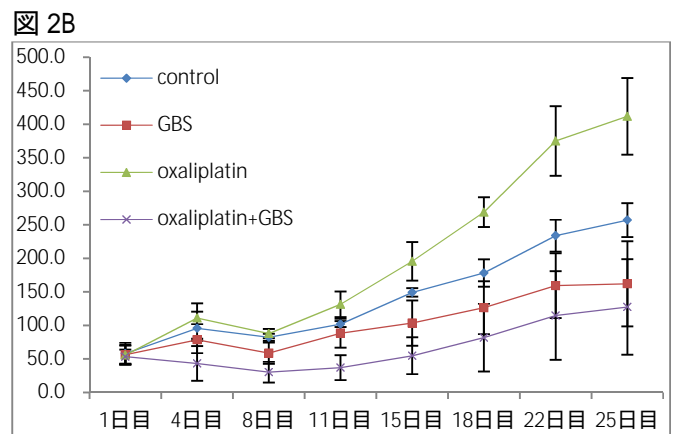
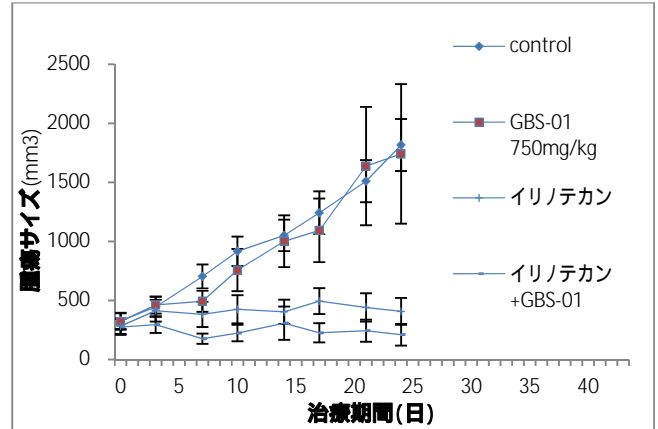
大腸癌細胞株 LS174T 細胞ゼノグラフトモデルではアバスタチンとの併用効果が認められた(図1)。

図 1A
大腸がん細胞 LS174T ゼノグラフトを用いた牛蒡子エキスとアバスタチンの併用実験



ヒト膵がん細胞株 MiaPaca2 を用いたゼノグラフトではオキザリプラチン、塩酸イリノテカンなどで顕著な併用効果が見られた。

図 2A
ヒト膵がん細胞 Miapaca2 を用いた併用実験



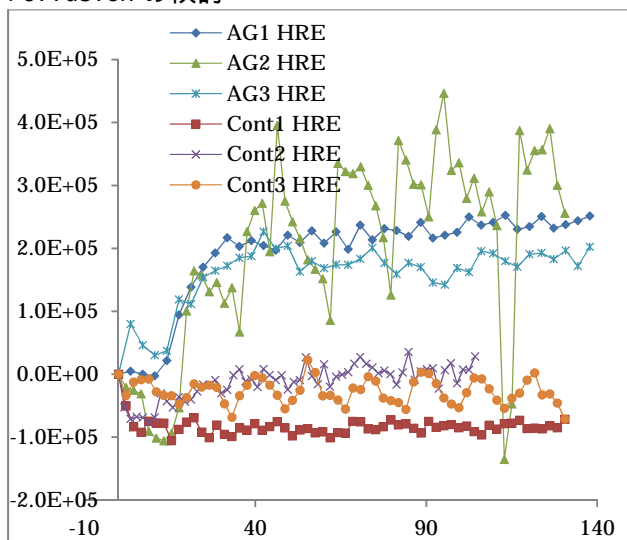
これらの併用効果のメカニズムに関しては現在も検討中であるが、既に述べたアルクチゲニンによるがん幹細胞様細胞に対する毒性もその1つである。

一方、アルクチゲニンによる治療を行った腫瘍では潰瘍が起こりにくいという所見に基づき、アルクチゲニン治療による組織の Perfusion に対する影響の検討を行った。ガドリニウム DTPA を用いた MRI 画像による Perfusion 測定を動物用 9.4T MRI を用いて行った。その結果を図3に示す。

5XHRE をプロモーターを持った Luciferase 遺伝子を組み込んだヒト膵がん細胞株のゼノグラフトモデルでも腫瘍の中に占めるルシフェラーゼ陽性の低酸素領域の現象が観察された。一方、組織を免疫染色し CD41 陽性の腫瘍血管の密度を調べると有意の差は見られなかった。それらのことから、アルクチゲニンの投与により腫瘍血管網、組織の再構築が起こり、より機能的な血管網に再構築が起こっていることが考えられた。

図 3
ガドリニウム-DTPA を用いた MRI による

Perfusion の検討



これらの結果、GBS-01 には、ベバシズマブで見られるような腫瘍血管網の Normalization 作用も確認された。他の抗癌剤との併用効果のメカニズムの 1 つであると考えられた。ゼノグラフトモデルでは腫瘍の消失例も認められた。今後、GBS-01 の開発は、他の抗癌剤との併用で進めるか、単剤で進めるか第 II 相試験の結果も考慮し、検討中である。

GBS-01 投与と血中乳酸

昨年度、一昨年度の研究でアルクチゲニンがミトコンドリアの複合体 I を阻害すること、ヒトへの投与でその結果乳酸血中濃度の上昇が、毒性や効果の指標になる可能性を検討した。尚、この研究は念のためにプロトコルの軽微な変更であるが倫理審査委員会の審査を受けた。Phase I に登録された 15 名の患者の血漿を用い、乳酸を測定し、血漿乳酸濃度は GBS-01 の投与量に応じて高くなった。全体の約半数の患者で上昇が見られたが、残り半数および健常ボランティアでは上昇は見られなかった。一例では最高値 7 mM と明らかな上昇が見られたが、一時的で数時間で正常値に復していた。軽微な上昇を来した患者でも同様で上昇は一時的であった。最高値の 7 mM は、健常人がやや激しい運動を行った時の乳酸上昇に相当する。臨床的に乳酸アシドーシスの症状を呈した患者は認められなかった臨床の報告と一致する。

乳酸値の上昇が血中のアルクチゲニン或いは AGG の上昇と一致するのか否かを調べた。その結果、Cmax でも、AUC でも、AG との相関は見られなかった。AGG との相関も見られなかった。これらのことは、AG が活性体であるが、どこでグルクロン酸抱合されているのかと言う問題と、乳酸の上昇はどの臓器或いは細胞で起こっているのかの問題に直

接つながら重要な情報である。最近アルクチゲニンだけではなくメトフォルミンやフェンフォルミンなど複合体 1 に対する阻害効果をもつ薬剤のがん治療への応用が広く検討されている。

そこでマウスを用いて、どのような要因が乳酸値の上昇を決めるのかを明らかにすることを試みた。マウスにアルクチゲニンを経口投与すると 5 分後から既に血中にアルクチゲニンおよびそのグルクロン酸抱合体が検出された。さらに 30 分後までアルクチゲニン、および抱合体の血中濃度は上昇したが乳酸の上昇はほとんど見られなかった。経口投与されたアルクチゲニンは速やかにグルクロン酸抱合されるために乳酸の上昇は見られない可能性も有り、小腸や胃のパウチに投与し門脈血中のアルクチゲニンと組織中の乳酸濃度を検討したが、アルクチゲニンは充分の濃度門脈血に検出されるにも関わらず小腸や胃の粘膜に乳酸は検出されず軽度の上昇を見たのは肝臓と腎臓であった。どのようなメカニズムでこのようなことが起こるのか解析が必要であるが、ヒトの場合でも肝機能と乳酸濃度が相関する。血漿中乳酸濃度は、産生速度よりはクリアランスが大きな因子であるヒトでの可能性と矛盾しない。アルクチゲニンはグルクロン酸抱合体のままでは活性が極めて低い。肝臓で抱合された後末梢組織での再活性化、或いはアルクチゲニンとしての極めて素早い組織分布の可能性が示唆された。マウスで静脈内投与した後の各臓器のアルクチゲニン含量を見ると血中から臓器への分布も大きな因子であることが示唆された。

D. 考察

アルクチゲニンはミトコンドリア複合体 I を阻害する作用をもつ。偶々ではあるが現在がん幹細胞を阻害すると注目されているメトフォルミン、フェンフォルミンも同様の作用がその活性の本体ではないかと考えられている。我々は、がん細胞の栄養飢餓耐性を解除するという効果を指標にスクリーニングを行いこの化合物に到達した。我々が掲げた薬剤標的としての栄養飢餓耐性がコンセプトとして正鵠を得ていたことを強く示唆する。

一方、複合体 I の阻害活性はすなわち呼吸の抑制で有り重要臓器では深刻な副作用も来しかねない。呼吸の阻害により、乳酸産生が急増することにより全身性にこの反応が起これば、いわゆる乳酸アシドーシスも起こしかねない。アルクチゲニンを高濃度で含有する牛蒡子は、これまで伝統薬として数百年の使用経験があると考えられている。今回我々が見出したアルクチゲニンのグルクロン酸抱合は、いわばこの危険な化合物が以下にして薬剤として成り立っていたのかを説明する 1 つの

ヒントになる。生体の重要臓器にとってはアルクチゲニンが肝臓で速やかにグルクロン酸抱合されるために毒性が抑えられている。マウスでの研究をさらに進める必要があるが、それでもアルクチゲニンが血中の濃度からは説明できないほど各組織に分布することは、組織での再活性化を示唆する。薬動学的観点からの グルクロニダーゼの役割の解明が待たれる。

がん幹細胞様細胞に対する培養条件および動物個体での効果が確認できたことは、今後のアルクチゲニン臨床開発の大きな曲がり角となる。この所見を元に、既存の抗がん剤との併用実験を行い明確な併用効果を見出した。特に、オキサリプラチン、イリノテカンとの併用効果が明確であったことは、FORFIRINOX が治療の主役として登場しつつある膀胱がん治療にとっては、次の段階でのアルクチゲニン併用療法に希望を持たせる結果である。

本年度の研究で、アルクチゲニン投与を行うことにより腫瘍血管密度は大きく変わらないが機能的に Perfusion が増加すること、低酸素領域が減少することが明らかになり血管網や組織の再構築が起こることを示唆した。その結果、部橋妻部で観察される Vascular normalization がアルクチゲニンでも起こっていることが併用効果に寄与していることを示した。

E. 結論

アルクチゲニンの臨床的有効性、安全性の根拠を明らかにした。今後の臨床開発への大きな一歩となった。

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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

江角 浩安、池田公史など

[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

特許登録

1) 発明の名称: 抗癌剤

出願人(権利者): 国立がんセンター、クラシエ製薬、富山大学

出願番号: 2012-069964

登録日: 2015年3月2日

2) 抗癌幹細胞剤

出願人(権利者): 国立がんセンター、クラシエ製薬、富山大学

出願番号: PCT/JP2014/061396

登録日: 2015年1月22日

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 相試験による膵がん克服

臨床試験の計画、解析・臨床試験実施支援

研究分担者 佐藤暁洋 独立行政法人国立がん研究センター 研究支援センター 研究企画部

試験統計デザイン・データ解析

研究分担者 野村尚吾 独立行政法人国立がん研究センター 研究支援センター 生物統計部

薬事業務

研究分担者 尾崎雅彦 独立行政法人国立がん研究センター 東病院 治験事務局

研究分担者 渡邊協孝 独立行政法人国立がん研究センター 東病院 治験事務局

研究要旨

「ゲムシタピ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た GBS-01 の前期第 相試験」に関して、国立がん研究センター臨床試験支援室によるデータセンター/モニタリング/治験調整事務局の支援（佐藤）、生物統計家による試験デザイン・症例数設計（野村）、薬事専門家による薬事戦略立案、薬事戦略相談の支援（尾崎）を行い、当該試験を開始し当初の予定登録を達成し、拡大コホートの 16 名の登録を追加で行った。モニタリング・治験調整事務局業務・データマネジメント・CRC 業務・監査・総括報告書の作成なども問題なく実施されている。

A. 研究目的

「ゲムシタピ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た GBS-01 の前期第 相試験」に関して、臨床試験の計画、試験統計デザイン、開発薬事戦略の立案及び薬事戦略相談の実施、および臨床試験の実施支援を行う。

B. 研究方法

分担研究者 佐藤暁洋が部長を務める、国立がん研究センター 研究支援センター研究企画部（H26 年 7 月～）がデータセンター/モニタリング/統計解析などの支援を担当し。分担研究者 野村尚吾が生物統計家として、試験の統計デザイン及びデータ解析を担当する。分担研究者の尾崎雅彦が、薬事担当者として薬事戦略立案の支援及び薬事戦略相談の支援を行う。

（倫理面への配慮）

当該臨床試験は、ヘルシンキ宣言、医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令、薬事法および薬事法施行規則とその関連通知などを準拠して実施される。

C. 研究結果

平成 25 年度に、薬事相談・プロトコール・各種

SOP の作成、治験届け、EDC の構築等を実施し、平成 25 年 3 月 11 日より患者登録を開始した。同日に 1 例目を登録し 11 月 5 日までに 39 名の患者登録を行い、予定登録数に達したために登録を終了した。登録ペースは予定登録数を上回り順調な登録が行われた。

平成 26 年度は、POC 取得を目的として 6 月より拡大コホートの登録を行い平成 27 年 1 月に 16 名を登録（評価可能例 10 名）した。

平成 26 年度は定期報告レポートを拡大コホート分として 2 回発行し、施設訪問モニタリングを 9 回実施しレポートを提出している。また、定期安全性情報レポートを作成して医薬品医療機器総合機構に提出している。

D. 考察

臨床試験支援部門による支援（佐藤）、生物統計家による支援（野村）、薬事専門家による支援（尾崎）によって、追加コホート 16 名の登録を約 7 ヶ月で達成した。また、モニタリング・データマネジメント・CRC 業務を臨床試験支援部門が実施し、監査・総括報告書の作成については外注先が担当しているが、いずれの業務も大きな問題なく順調に業務が遂行されている。また、定期安全性情報

レポートも問題なく作成・提出している。

E. 結論

臨床試験の支援部門（佐藤）および生物統計家（野村）薬事専門家（尾崎）の支援によって、アカデミア発の医師主導治験を円滑かつ効率的に準備し、平成 26 年度は追加コホートを実施した。医師主導治験としての管理・運営に関しても臨床試験の方法論および関連法規に則った倫理的・科学的に実施されている。

研究班としては終了し、試験結果を基に今後の開発戦略を立案する。

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）

G. 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

臨床試験の実施

研究分担者 池田 公史 独立行政法人国立がん研究センター 東病院 肝胆膵内科
研究分担者 上野 秀樹 独立行政法人国立がん研究センター 中央病院 肝胆膵内科
研究分担者 石井 浩 公益財団法人がん研究会有明病院 消化器内科

研究要旨

ゲムシタピンとフッ化ピリミジン系抗癌剤不応膵癌患者に対する GBS-01 の有効性と安全性を探索的に評価した。解析対象 38 例の病勢制御割合 34.2% であり、主要評価項目は満たせなかった。奏効割合 0%、無増悪生存期間(中央値) 4.4 週、全生存期間(中央値) 16.6 週であり、期待した有効性も示せなかった。有害事象は軽度であり、忍容性は良好と判断された。現在、GBS-01 の癌幹細胞に対する効果が明らかにされ、それを確認するための拡大コホートを行った。拡大コホートの登録も終了し、現在、解析中である。第 II 相試験の結果、及び拡大コホートの結果を勘案して、今後の GBS-01 の開発方針を検討する予定である。

A. 研究目的

GBS-01 はアルクチゲニンを多く含む牛蒡子エキス製剤である。ゲムシタピンとフッ化ピリミジン系抗癌剤不応膵癌患者に対する GBS-01 の有効性と安全性を探索的に評価する。

主要評価項目：8 週の病勢制御割合(DCR)

副次評価項目：有害事象、奏効割合、無増悪生存期間、全生存期間、薬物動態学的パラメータ

B. 研究方法

病理組織学的に診断された進行膵癌で、ゲムシタピンとフッ化ピリミジン系抗癌剤を含む全身化学療法が行われ、両剤に不応と判断された患者を対象とした。

GBS-01 は 1 日 1 回朝食後(食後 2 時間)に 1 回 2 包(牛蒡子エキスとして 4.0 g)を連日経口投与した。有害事象は CTC AE ver 4.0、抗腫瘍効果は RECIST1.1 にて判定した。

本試験は、医師主導治験として行った。閾値 DCR を 25.9%、期待 DCR を 44.4%、ハザード比 0.60 と設定し、37 例の解析対象において 14 例以上の DCR 患者が確認された場合、最終解析において本剤が「有効」と判断されるとした。

(倫理面への配慮)

本試験に関係するすべての研究者は、ヘルシンキ宣言および臨床研究に関する倫理指針に従って本試験を実施した。個人情報および診療情報等のプライバシーに関する情報は個人の人格尊重の理念の下、厳重に保護され慎重に取り扱われるべ

きものと認識し、万全な管理対策を講じ、プライバシー保護に努めた。

C. 研究結果

国立がん研究センター東病院、中央病院、がん研有明病院の 3 施設で行った。2013/03/11 から 2013/11/05 までに 39 例が登録された。患者背景(全 39 例)は、年齢(中央値)は 64 (範囲：38-81) 歳、男性 27 例、PS は 0 が 28 例、1 が 11 例であった。臨床病期は切除後局所再発が 2 例、遠隔転移が 37 例であった。全例で治療は終了しており、治療中止理由は原病の増悪が 37 例、患者拒否が 2 例であった。登録基準を逸脱した 1 例を除く 38 例での抗腫瘍効果は、CR 0 例、PR 0 例、SD 13 例、PD 22 例、NE 3 例であり、奏効割合 0%、DCR 34.2% であり、主要評価項目は満たせなかった。無増悪生存期間(中央値) 4.4 週、生存期間(中央値) 16.6 週であった。10%以上に認めた Grade 3 以上の主な有害事象は GTP 上昇 33.3%、高血糖 25.6%、T-Bil, AST, ALT, ALP、貧血の上昇 10.3%であった。これまでに発生した重篤な有害事象は 8 件で、そのうち、治療との因果関係が否定できない重篤な有害事象は脳梗塞 2 例、拡張型心筋症 1 例であった。

D. 考察

アルクチゲニンを多く含む牛蒡子エキス製剤である GBS-01 は低酸素、低栄養条件下で抗腫瘍活性を呈する薬剤として、開発された。病勢制御割合 34.2% であり、主要評価項目は満たせなかった。また、奏効割合 0%、無増悪生存期間(中央値) 4.4

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 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ピ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

ゲムシタピ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

- 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 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 相試験による膵がん克服

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)。

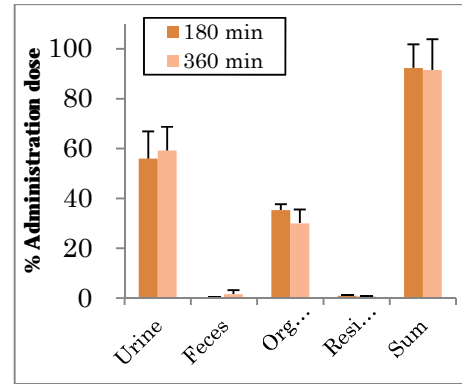


図 1 ^{99m}Tc 標識 SD-128 の体内量および排泄量

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 時間ではプラトーに達し、3 時間後まで維持された(図 2)。

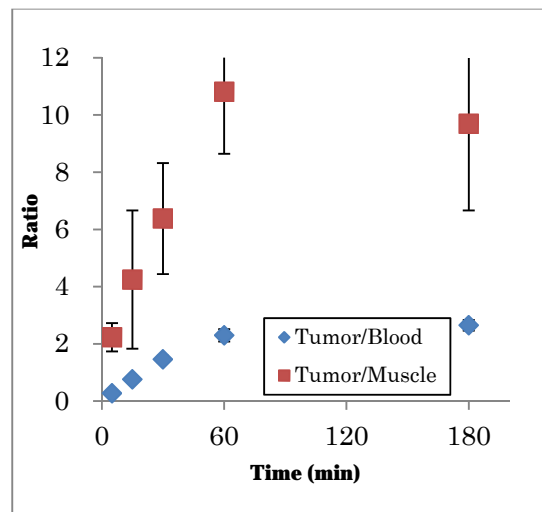


図 2 ^{99m}Tc 標識 SD-128 の腫瘍血液比および腫瘍筋肉比

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)。

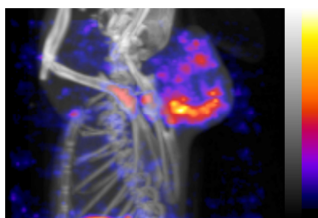


図3 ^{111}In 標識 POH プローブを投与した FM3A 移植 C3H/He マウスの SPECT/CT 画像

^{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)。

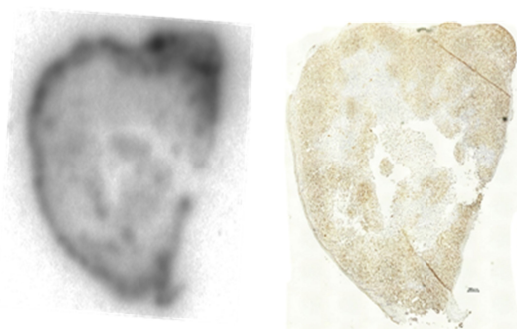


図4 ^{111}In 標識 POH プローブを投与した FM3A 移植腫瘍のオートラジオグラフィ(左)および HIF-1 α 免疫染色(右)

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。

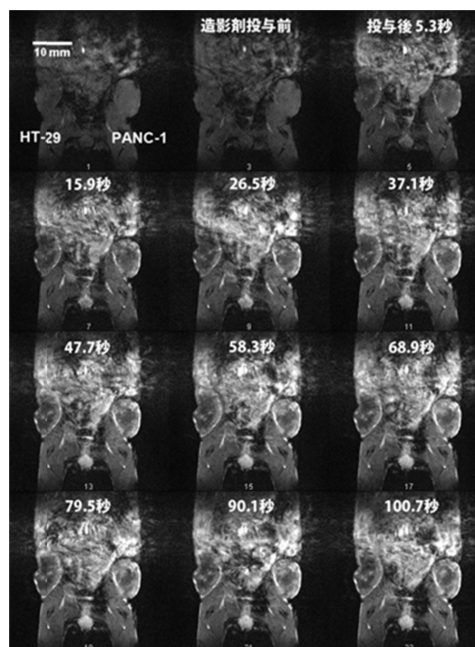


図5 マウス腫瘍モデルの DCE-MRI

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 -fluoro misonidazole (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、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 Ⅰ 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

- 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

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 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 岸野史志

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 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 -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 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/cAJc1-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）

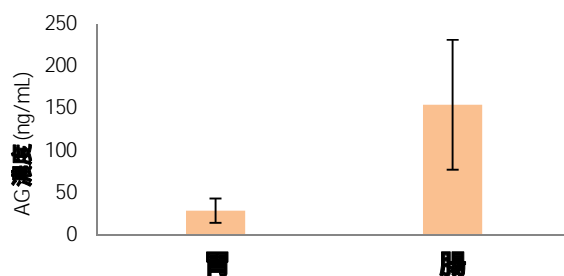


図1 胃内及び腸内投与 15 分後の血中 AG 濃度(空腹時、単回投与時)

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)

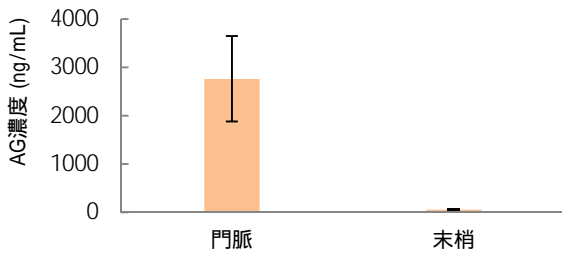


図2 門脈中及び末梢血中 AG 平均濃度 (空腹時、単回経口投与 15 分後)

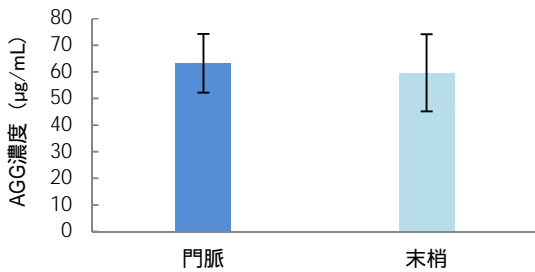


図3 門脈中及び末梢血中 AGG 平均濃度(空腹時、単回経口投与 15 分後)

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。

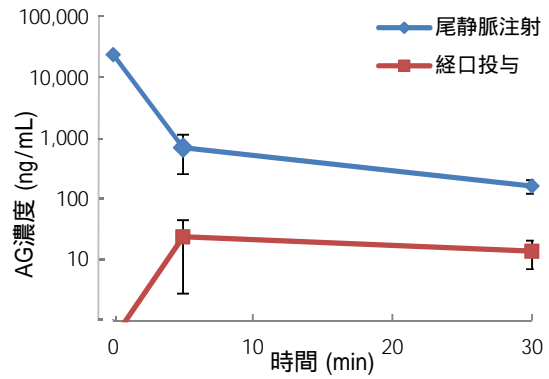


図4 尾静脈及び経口投与時の血中 AG 濃度推移(0 ~ 30 分)

経口投与後の血中 AG 濃度は、投与量が尾静脈投与時の 50 倍であるのにもかかわらず、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。

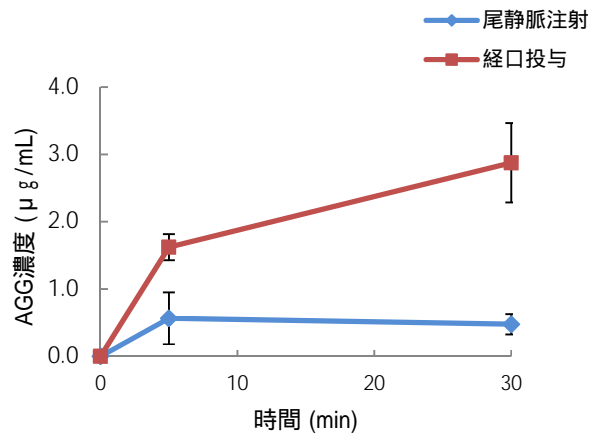


図5 尾静脈及び経口投与時の血中 AGG 濃度推移 (0 ~ 30 分)

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。

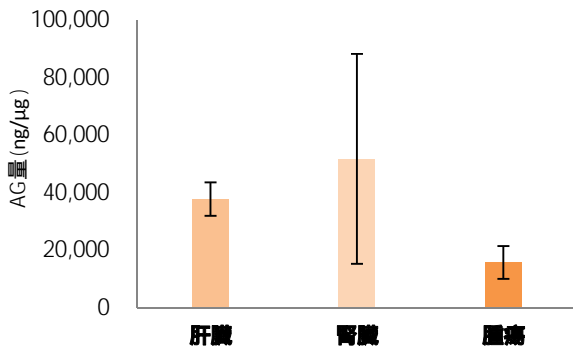


図6 各組織中 AG 量

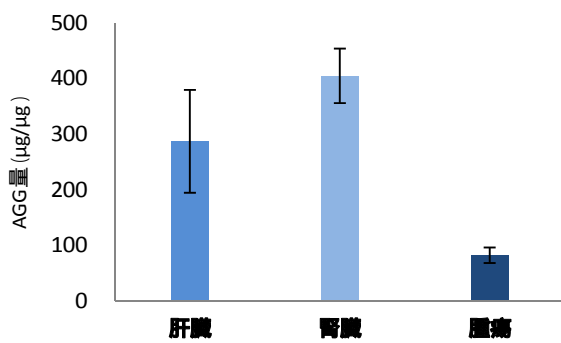


図7 組織中 AGG 量

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）

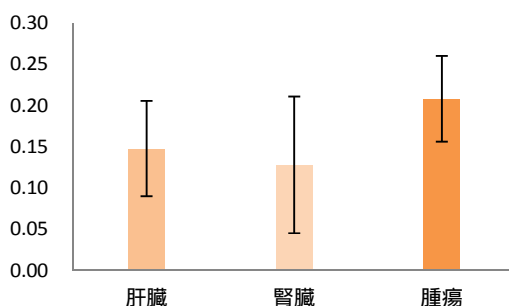


図8 ヌードマウスにおける組織中 AG/AGG 比 (ng/μg)

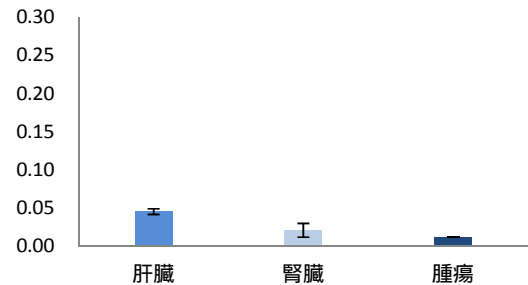


図9 Nod Scid マウスにおける組織中 AG/AGG 比 (ng/μg)

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

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 Ⅲ 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 症例の発現が低いが、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);168A.
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. Constr

uction of an objective pathological diagnostic system of 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 suppl(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

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 Res	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>Ikedo 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, Mitsuunaga 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
<u>池田公史</u> 、江角浩 安	何故、牛蒡子か？	胆と膵	36	105-8	2015
<u>藤井博史</u>	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、 <u>藤井博史</u>	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、 <u>小嶋基 寛</u> 、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