

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名：(日本語) 低酸素誘導転写因子が活性化した悪性がんの根治に向けた新薬開発
(英語) Development of novel drug for eradicating HIF-active malignant cancers

研究開発担当者 (日本語) 生命理工学院 教授 近藤 科江
所属 役職 氏名：(英語) School of Life Science and Technology, Professor, Shinae Kondoh

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

研究開発分担者 (日本語) 生命理工学院 助教 門之園哲哉
所属 役職 氏名：(英語) School of Life Science and Technology, Assistant Professor, Tetsuya Kadonosono

研究開発分担者 (日本語) 生命理工学院 助教 口丸高弘
所属 役職 氏名：(英語) School of Life Science and Technology, Assistant Professor, Takahiro Kuchimaru

II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究は、東京工業大学と国立がん研究センターが協働して、低酸素誘導因子(hypoxia-inducible factor、HIF)の活性が高い低酸素がんを標的にした融合タンパク質製剤 TOP3 の実用化をめざしている。本年度は、GMP 製造の実行性を示すために大量製造プロトコルの作成、および、前臨床を実施するための非臨床 POC の取得を行った。

東京工業大学では、本年度、主に以下の様な 3 つの研究を計画通りに実施し、十分な成果を得ている。

(1) GMP 製造が可能な企業と協働で、純度の高い融合タンパク質を大量に製造するためのプロトコ

ールの作成を行い、TOP3 が 3 g/L で発現する培養条件と、菌体から高純度に TOP3 タンパク質を精製する方法を決定し、最終的に 100 g の TOP3 が製造でき、薬剤として製造可能なことが示された。また、製剤化に向けて検討すべき課題が明確になった。

- (2) 高純度の融合タンパク質 TOP3 の温度・pH・凍結融解・血清との培養による安定性評価、エンドトキシン除去プロトコールの効果検証、TOP3 活性の非細胞系アッセイ法の確立を行い、TOP3 が活性を保持した状態で、比較的高い安定性を保持していることが確認できた。
- (3) 薬効薬理評価のためにすい臓がん細胞を用いた同所移植マウスモデルで、膵臓がんの標準治療薬として使用されているゲムシタビンや TS-1 と併用療法を行い、単剤治療よりも有意な延命効果を示すことが判った。更に、急性毒性評価のため、単回および複数回反復大量投与実験を皮下腫瘍モデルマウスで実施し、100 mg/Kg の投与でも、体重減少や下痢など、外観から分かるような副作用は一切見られず、急性毒性の可能性が極めて低い事が示された。実験に使用したマウスの主な臓器を回収し、それらの病理解析を国立がん研究センターにて次年度に行うことで、より詳細な副作用の有無を判断することとした。

国立がん研究センターでは、大きく下記 2 つの研究を実施した。

- (1) TOP3 の非臨床試験に向けた薬物動態の予備的解析および非臨床 POC 取得:
TOP3 の非臨床試験項目のうち、最終 GMP レベルと等価と考えられる非 GMP 製造 TOP3 を用いて、小動物を用いた薬物動態試験と薬理試験（非臨床 POC 取得）を開始した。さらに、非臨床 POC 取得のために、TOP3 が集積した標的組織における病理組織学的変化を免疫組織学的な検討を含めて、詳細に検討するための試料収集と低酸素マーカーの解析を行った。POC 研究とリンクして、用量や投与経路、投与回数等による薬効・薬理の変化を検討するための試料収集を行った。同時に TOP3 の正常臓器への集積の検索を行うための試料収集も行った。
- (2) 治験プロトコール作成に向けた準備:
集積された症例において免疫染色を施行し HIF1 高発現な進行膵癌患者の臨床像を明らかにし、疫学情報を取得した。また、治験プロトコール作成に向けた準備として、治験開始に向け、国立がん研究センター東病院、臨床研究支援部門とのヒアリングを設定し、目標達成のために取り組むべき課題を明確化した。

This study aims at developing a novel fusion protein drug TOP3 for clinical use and has been carried out by researchers of Tokyo Institute of Technology (Tokyo Tech) and National Cancer Center Hospital East (NCCHE). TOP3 specifically targets hypoxia-inducible factor (HIF)-positive hypoxic tumors. This year, we have established the protocol to prepare large amounts of TOP3 in collaboration with a company, which is able to carry out Good Manufacturing Practices (GMP) for drugs, and have acquired a non-clinical Proof of Concept (POC).

In Tokyo Tech, the following three researches have been done and results were obtained as planned.

1. We determined the optimized culture conditions of high level TOP3 expression (3g/L) in *E. coli* and purification methods of highly purified TOP3, and eventually obtained 100 g highly purified TOP3. The results indicate that TOP3 is able to be manufactured in large scale and clarified some concerns that we should deal with in future for manufacturing of TOP3 as a drug.
2. We examined the stability of highly purified TOP3 by treating it with various temperature and pH, and frequent freeze-thaw, and by incubation with the serum. We have also established a method for effectively removing endotoxin from TOP3 preparation and a cell-free assay system to determine the TOP3 activity, confirming that TOP3 has relatively high stability in the state that maintained activity.
3. We have evaluated drug efficacy of TOP3 in combination with standard therapeutic agents for pancreatic cancers by using an orthotopic mouse model with a human pancreatic cancer cell line, confirming the efficacy of TOP3 on increasing the survival rate. Furthermore, we injected a large amount (up to 100 mg/Kg) TOP3 once or repeatedly to mice carrying subcutaneous tumors, and examined the anti-tumor effects and side effects of TOP3. We observed significant suppressive effects on tumor growth, but no apparent side effects, such as weight loss and diarrhea, suggesting that TOP3 has very low toxicity. We collected the major organs from the mice and sent them to NCCHE for pathological examination to determine if the toxicity of TOP3 is very low.

In NCCHE, the following two studies have mainly been done.

1. Preliminary analysis of the pharmacokinetics for the non-clinical trial of TOP3 and the non-clinical POC acquisition: For the non-clinical POC acquisition, we started pharmacokinetics and pharmacological examinations by using the small animal with non-GMP TOP3 prepared by the method equivalent to GMP production. Furthermore, we stocked tissue samples of the mice treated with TOP3 for immune-pathological analysis to examine histopathological changes in the samples and started to analyze for a hypoxic marker. As a part of non-clinical POC acquisition, we got tissue samples from the mice treated with TOP3 with different doses, administration, and frequency in order to examine histopathological changes in them. The samples to examine the accumulation of TOP3 in normal tissues were collected at the same time.
2. Preparations for creation of clinical trial protocols: By immunostaining of accumulated clinical samples, we have clarified the clinical image of advanced pancreatic cancers with high HIF expression, and acquired epidemiological information. In addition, as preparations for the clinical trial protocol, we had meetings with the clinical study support section of NCCHE and clarified the issues that need to be addressed to achieve the goal.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 3 件）

1. Hoang, N.T., Kadonosono T, Kuchimaru T, Kizaka-Kondoh S, Hypoxia-inducible factor-targeting prodrug TOP3 combined with gemcitabine or TS-1 improves pancreatic cancer survival in an orthotopic model. *Cancer Sci*, 2016, 107, 1151-8.
2. Kuchimaru T, Suka T, Hirota K, Kadonosono T, Kizaka-Kondoh S. A novel injectable BRET-based in vivo imaging probe for detecting the activity of hypoxia-inducible factor regulated by the ubiquitin-proteasome system. *Sci Rep*. 2016, 6, 34311.
3. Kimura S., Kakishima Y., Kuchimaru T., Kizaka-Kondoh S., Yoshimoto M., Fujii H., Umeda I. Application of Halotag technology to in vivo molecular imaging using protein probes labeled by metallic radionuclides. *RADIOISOTOPES* 2016, 65, 247-255.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. HIF が活性化したがんを標的にした融合タンパク質製剤を用いた難治がん治療法の開発、口頭発表、近藤 科江、門之園 哲哉、Hoang Thi Hong Ngoc、伊藤雄大、口丸高弘、日本がん分子標的治療学会（別府国際コンベンションセンター）、2016/5/31、国内
2. In vivo imaging of HIF activity、口頭発表、Shinae Kondoh, Takahiro Kuchimaru, Tetsuya Kadonosono、The 39th Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan (Pacifco Yokohama)、2016/11/30、国内
3. Imaging of HIF-active tumors: Exploration tool for malignancy、口頭発表、Shinae Kondoh, Tetsuya Kadonosono, Takahiro Kuchimaru. The 11th JSMI Meeting (Kobe Convention Center), 2016/5/28, 国内
4. Physical properties of recombinant fusion protein drug targeting HIF-active cancers、ポスター発表、Takehiro Ito, Tetsuya Kadonosono, Hoang Thi Hong Ngoc, Takahiro Kuchimaru, Shinae Kondoh、The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Pacifco Yokohama)、2016/10/6-8、国内
5. Physical property and drug efficacy of recombinant fusion protein drug targeting HIF-active cancers、ポスター発表、Takehiro Ito, Tetsuya Kadonosono., Hoang Thi Hong Ngoc, Takahiro Kuchimaru, Shinae Kondoh、The 39th Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan (Pacifco Yokohama)、2016/11/30、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. In vivo 光イメージングを用いた病態解析と創薬研究、近藤科江、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科セミナー室、2017/2/17、国内

2. in vivo 光イメージングを用いた抗がん剤の開発研究、近藤科江、愛知県がんセンター研究所セミナー室、2017/3/17、国内
3. 神奈川県ヘルスケア・ニューフロンティア講座「光が開くがん治療への道」、近藤科江、東工大 大岡山キャンパス、2016/12/13、国内

(4) 特許出願
無し

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control
- 研究開発課題名： (日本語) 低酸素誘導転写因子が活性化した悪性がんの根治に向けた新薬開発
(英語) Development of novel drug for eradicating HIF-active malignant cancers
- 研究開発担当者 (日本語) 東京工業大学 生命理工学院 教授 近藤 科江
所属 役職 氏名： (英語) School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology,
Professor, Shinae Kondoh
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) TOP3 の臨床導入に向けた検討
開発課題名： (英語) Investigation for the clinical induction of TOP3.
- 研究開発分担者 (日本語) 国立がん研究センター 先端医療開発センター 臨床腫瘍病理分野
ユニット長 小嶋 基寛
所属 役職 氏名： (英語) NCC-EPOC, Pathology Division, Head, Motohiro Kojima
- 研究開発分担者 (日本語) 国立がん研究センター 先端医療開発センター 機能診断開発分野
ユニット長 梅田 泉
所属 役職 氏名： (英語) NCC-EPOC, Division of Function Imaging, Head, Izumi O. Umeda
- 研究開発分担者 (日本語) 国立がん研究センター東病院肝胆膵内科 医長 光永修一
所属 役職 氏名： (英語) Department of Hepatobiliary and Pancreatic Oncology, National Cancer
Center Hospital East. Head. Shuichi Mitsunaga

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者： 東京工業大学・生命理工学院・近藤 科江
総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2 件、国際誌 21 件）

1. Mimaki S, Totsuka Y, Suzuki Y, Nakai C, Goto M, Kojima M, Arakawa H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Kinoshita M, Matsuda T, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Kubo S, Nakamori S, Esumi H, Tsuchihara K. Hypermutation and unique mutational signatures of occupational cholangiocarcinoma in printing workers exposed to haloalkanes. *Carcinogenesis*. 2016 Aug;37(8):817-26.
2. 光永 修一, 小嶋 基寛, 池田 公史, 落合 淳志. 膵癌早期診断を目指した血清マイクロ RNA 検査の研究開発. *膵臓*(0913-0071)32 巻 1 号 Page56-61(2017.02)
3. Kimura S, Kakishima Y, Kuchimaru T, Kizaka-Kondoh S, Yoshimoto M, Fujii H and Umeda IO. Application of HaloTag® technology to in vivo molecular imaging using protein probes labeled by metallic radionuclides. *Radioisotopes*,2016;65: 247-255
4. Mitsunaga S, Okusaka T, Ikeda M, Ozaka M, Ohkawa S, Ioka T, Shimura T, Sato K, Terao K, Ochiai A, Furuse J. Multicenter, Open-Label, Phase I/II Study of Tocilizumab, an Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal Antibody, Combined with Gemcitabine in Patients with Advanced Pancreatic Cancer. *J Med Diagn Meth* 6(1): 234, 2017. doi:10.4172/2168-9784.1000234
5. Mitsunaga S, Ikeda M, Shimizu S, Ohno I, Takahashi H, Okuyama H, Ueno H, Morizane C, Kondo S, Sakamoto Y, Okusaka T, Ochiai A. C-Reactive Protein Level Is an Indicator of the Aggressiveness of Advanced Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2016 Jan;45(1):110-6.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 血清マイクロ RNA での大腸癌におけるリキッドバイオプシーの検証高丸 博之, 斎藤 豊, 加藤 健, 河内 淳平, 滝澤 聡子, 坂本 裕美, 中島 健, 小嶋 基寛, 落合 淳志, 落谷 孝広, 松田 尚久. 日本癌学会総会 2016/10/6, 国内.
2. Podoplanin 陽性がん幹/始原細胞の、単細胞レベルにおける細胞運命の解明, 宮下 知之, 樋口 洋一, 小嶋 基寛, 落合 淳志, 石井 源一郎. 日本癌学会総会 2016/10/6, 国内.
3. 胆道癌切除患者において原発巣の浸潤先進部低分化は予後不良因子である. 大久保 悟志, 光永 修一, 小嶋 基寛, 加藤 祐一郎, 後藤田 直人, 高橋 進一郎, 小西 大. 日本肝胆膵外科学会, 2016.06.2. 国内

4. Newly developed ^{99m}Tc-labeled compact probes specifically accumulated in the tumor hypoxia region with unique retention mechanism differing from conventional nitroimidazole derivative. ポスター発表, Izumi O. Umeda, Sadaaki Kimura, Hirofumi Fujii, World Molecular Imaging Congress 2016 (New York, USA) , 2016/9/10, 国外.
5. 腫瘍内低酸素誘導転写因子活性の核医学画像診断の試み, 口頭発表, 梅田 泉 , 柿島 祐, 石川龍太郎, 濱道修生, 口丸高弘, 門之園哲哉, 近藤科江, 藤井博史, 第 75 回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜 (横浜市) , 2016/10/8, 国内.
6. Novel SPECT hypoxia imaging probes with unique retention mechanism. ポスター発表, Izumi O. Umeda, Sadaaki Kimura, Hirofumi Fujii. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine 2016 (Barcelona, Spain) , 2016/10/16, 国外.
7. 腫瘍内 Hypoxia Inducible Factor 1α (HIF1α) 発現領域をターゲットした TOP3 の体内動態の検討. ポスター発表, 濱道修生, 梅田泉, 門之園哲哉, 近藤科江, 藤井博史, 第 56 回日本核医学会学術総会 (名古屋市) , 2016/11/4, 国内
8. 腫瘍内低酸素誘導因子 (HIF1) 活性陽性領域を標的とする診断法の開発と治療への展望. 梅田泉, 藤井博史, 口頭発表, 7th バイオメディカルインタフェース・ワークショップ (宮古島市) , 2017/3/10, 国内
9. S. Mitsunaga, M. Ikeda. DETERIORATION OF CACHEXIA-RELATED FACTORS AFTER FIRST-LINE CHEMOTHERAPY FOR ADVANCED PANCREATIC CANCER (e-Poster eP-11) Multinational Association of Supportive Care in Cancer (MASCC2016) June 23-25 , 2016 Adelaide, Australia
10. N. Tatematsu , S. Mitsunaga , M. Ikeda. CHARACTERIZATION OF ADVANCED PANCREATIC CANCER PATIENTS SHOWING A DECREASE OF THE SKELETAL MUSCLE MASS WHILE RECEIVING FIRST-LINE CHEMOTHERAPY (e-Poster eP-11) Multinational Association of Supportive Care in Cancer (MASCC2016) June 23-25 , 2016 Adelaide, Australia
11. 立松典篤、光永修一、池田公史. 初回化学療法導入後に骨格筋量減少をきたした進行膵癌患者の臨床的特徴 (口演) 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2016/07/28-30 神戸市
12. 光永修一、池田公史. 初回化学療法中の進行膵癌患者で悪化する悪液質関連因子の検討 (ポスター) 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2016/07/28-30 神戸市
13. 渡邊一雄、橋本裕輔、高橋秀明、梅本久美子、佐々木満仁、今岡 大、大野泉、光永修一、篠原旭、竹野美沙樹、船崎秀樹、池田公史. 遠隔転移を有する進行膵がんに対する modified FFX と GEM+nab-PTX の治療成績の比較検討 (ワークショップ) 第 54 回日本癌治療学会学術集会 2016/10/20-22 横浜
14. Kazuo Watanabe, Yusuke Hashimoto, Kumiko Umemoto, Hideaki Takahashi, Mitsuhiro Sasaki, Hiroshi Imaoka, Izumi Ohno, Shuichi Mitsunaga, Masafumi Ikeda. Clinical outcome of modified FOLFIRINOX versus gemcitabine plus nab-paclitaxel as first line chemotherapy in metastatic pancreatic cancer. (Abstract 438) ASCO-GI2017 Gastrointestinal Cancers Symposium January 19-21 2017 San Francisco
15. Gen Kimura, Hideaki Takahashi, Kumiko Umemoto, Kazuo Watanabe, Mitsuhiro Sasaki, Yusuke Hashimoto, Hiroshi Imaoka, Izumi Ohno, Shuichi Mitsunaga, Masafumi Ikeda. Efficacy of S-1 compared to modified FOLFIRINOX as second-line chemotherapy regimens after gemcitabine plus

nab-paclitaxel for patients with metastatic pancreatic cancer. (Abstract 449) ASCO-GI2017
Gastrointestinal Cancers Symposium January 19-21 2017 San Francisco

16. Hidetaka Suzuki, Akira Shinohara, Izumi Ohno, Shuichi Mitsunaga, Misaki K Takeno, Hideki Funazaki, Gen Kimura, Kazuo Watanabe, Kumiko Umemoto, Mitsuhiro Sasaki, Hideaki Takahashi, Hiroshi Imaoka, Yusuke Hashimoto, Masafumi Ikeda, Masakazu Yamaguchi. The effect of duloxetine on chemotherapy-induced peripheral neuropathy in advanced pancreatic cancer patients receiving gemcitabine plus nab-paclitaxel treatment.. (Abstract 453) ASCO-GI2017 Gastrointestinal Cancers Symposium January 19-21 2017 San Francisco

(4) 特許出願