

# 大腸癌に対するアルテスネイト治療の無作為化二重盲検プラセボ

## パイロット研究

EBioMedicine 2 (2015) 82–90 Sanjeev Krishna, et al.,

### ■抄録

背景：アルテスネイトは抗マラリア薬であるが、*in vitro*、動物実験、ヒト臨床試験の広い癌スペクトルで抗がん作用を示すことは知られている。

試験目的：本試験は大腸がんに対するアルテスネイト薬の抗癌作用と忍容性を確認する。

試験施設：George University (ロンドン)

(プラセボ：有効成分は入っていない偽物の薬)

試験方法：本試験は、単施設無作為化 二重盲検プラセボ対照試験である。

生検で転移がない単発性大腸がんと診断され、治療的切除を施行予定の患者 (n=23) を無作為に二群に割り付け、手術施行前 14 日間 アルテスネイト投与、プラセボを投与 (n=11) した。

試験：アルテスネイトは以下の結果から 大腸がんに対して抗増殖効果があり、高い忍容性が示された。無作為化された両群は臨床的、がん特異性において比較可能であった。

**20名の患者 (アルテスネイト群 9名、プラセボ群 11名) 試験を完了した。**

**結果：5年後、アルテスネイト群 1名、プラセボ群 6名に大腸がんの再発を見た。**

**アルテスネイト群は、死亡例はなかったが、プラセボ群は 3名の死亡例があった。**

**アルテスネイトは、大腸がんに再発防止(転移能力喪失)と抗腫瘍効果が認められた。**

### ■序

- 転移のない大腸がんの根治療法は手術であるが、症状を進行させないためには、手術施行前のネオアジュバント化学療法 又は放射線治療が併用される。
- 最善の治療法における予後は診断後、5年間の無病生存期間、又は全生存期間を~60%以上増加すること。
- アルテスネイトは、薬用植物成分アルテミシニンの化学修飾体で、経口、直腸、非経口投与が可能な抗マラリア薬として古くから汎用されているが、その後アルテミシニンの抗がん作用について、*in vitro* 及び動物モデルの研究で幅広い抗癌作用が確認された。
- アルテミシニンはがん細胞増殖及び血管新生を抑制し、アポトーシスを引き起こすことが報告されている。
- ヒトに対するアルテミシニン、アルテスネイトの抗がん作用については、個々の症例報告、盲検パイロット試験で幾つかの報告がある。
- 本試験は初めて厳格な試験計画の下で、アルテスネイトを単剤で使用したときの抗大腸がん効果、及び忍容性をプラセボ対照試験で、検討したものである。

## ■2.試験方法

### ①試験デザイン等：

-本試験は適切な倫理基準の下で実施した単施設無作為化二重盲検プラセボ対照比較試験であり、無作為化はアルテスネイト群及びプラセボ群患者を 1:1 の割合で実施した。

-試験施設は英国 St George's University of London 病院医学校で、St. George's Healthcare NHS Trust が支援した。

### ②対象の組み入れ基準：

-対象患者は生検で単発性 CRC と診断され、年齢 21～90 歳、手術可能なステージで、ネオアジュバント化学治療を必要としない治癒的切除を施行予定の患者。

### ③除外基準：

-過敏症、妊娠、聴力又は平衡感覚障害、免疫抑制剤又はアルテスネイトと相互作用のある薬剤の服用、体重 50kg 以下又は 100kg 以上、重度の貧血（ヘモグロビン値 < 8 g/dL）、標準治療以外の介入を予定、同意書未提出、効果的な避妊を行っていない女性、NKF D/QOFI ステージ 3 又はそれ以上の慢性腎臓病（eGFR < 60 mL/min）、溶血反応が無くビリルビンが正常値の上限 > 2、又は慢性肝疾患患者。

### ④患者の組み入れ期間：

-2009 年 3 月 9 日～2012 年 10 月 15 日。

### ⑤試験薬剤の製造&投与期間

-アルテスネイト（Arinate®100mg）は Famar Italia S.p.A、社で、プラセボは MPF（オランダ）で、EU の cGMP 製造基準に準拠して製造した。

-アルテスネイト（200mg/日、経口）或いはプラセボは 14 日間連投し、手術 48～72 時間前に投与を完了した。

### ⑥主要評価項目及び副次的評価項目

□主要評価項目：腫瘍標本の上皮細胞における有意なアポトーシス（アポトーシスの兆候を示す細胞 > 7%と定義）の有無。

□副次的評価項目：

(1) 上皮細胞及び線維芽細胞で定量化した 7 つの免疫組織化学染色；VEGF（血管内皮細胞増殖因子）、EGFR、c-MYC、CD31 タンパク質量を決定する微小血管密度、Ki67 及び p53 腫瘍抑制タンパク発現で評価する増殖活性。

(2) CEA（癌胎児性抗原）は、ベースライン時及び無作為化後に見られた患者に対してモニタリングを実施。

(3) 抗癌作用（上記のマーカーで判定）を群間で比較評価。

(4) 安全性と忍容性は、ベースラインと治療中（投薬 1 週間後）又は治療後（2 週間の投薬終了後（手術前）の血液検査、臨床的に評価。

### ⑦患者数の設計

-本試験は先駆的な研究のため、試験開始前のサンプル数（患者数）の計算では、主要評価項目において CRC 患者の未治療例では有意なアポトーシスは起こらないとの仮定に基づき計算した。即ち、プラセボ群患者の多く（95%以上）はアポトーシスの兆候を示す細胞 ≤ 7%と予測し、一方アルテスネイト群の過半数の患者（60%以上）は有意なアポトーシス（>7%）を示すと予測して患者数を設計した。

-この大きな差異はベースライン時のアポトーシスインデックスとして報告されている幾つかの報告から予測、算出した。

### ⑧無作為化

-対象患者は厳格に無作為化され、アルテスネイト群又はプラセボ群へ同数に割り付けられた。データの収集が終了し、組織学的結果が解析され、データセットが固定されるまで割り付けコードは秘匿された。

### ⑨盲検化〔有害事象を見た患者の非盲検化〕

-試験中に有害事象の報告を受けた患者 2 名に対して、MHRA（英国医薬品規制庁）の規定に準拠して、割り付けコードはスポンサーのオフィス（SGUL）から MHRA に秘匿下に提供され非盲検化されたが、それ以外の全ての研究実施者等に対して盲検化は継続的に適用、維持した。

#### ⑩データの収集と癌細胞数の推定

-免疫組織病理学データは腫瘍サイズによってスライド数が異なるため、患者毎に複数の測定値を作成した。スライド上で染色された癌細胞数から算出した推定値であり、0（1 個の染色も見られない）、レベル 1、レベル 2 と階層構造となる。3 名の患者（試験薬剤を受け取らなかった等）を除き統計解析に必要な記録に不足はなかった。

#### ⑪探索的統計解析

-全てのデータ変数の特徴は図表を用いて評価し、連続データ又はバイナリデータの割合に対する標準偏差（平均/中央値）に従ってまとめた。相関性はスピアマン係数で求めた。

#### ⑫免疫学的分析結果及び推計的データ解析

-変量効果モデル（random effect model）、分散成分モデル（variance components model）は断層構造のため、正しく変異度を求めるため免疫化学的データに用いた。

-患者は 6 ヶ月毎に CEA 測定、1 年毎に CT スキャンで再発確認の追跡調査を実施した。手術から最初の再発までの期間は生存分析でモデル化した。

-患者 CRC06 は免疫化学分析に必要なサンプルは得られなかったが生存の確認が取れたため、生存分析に含めた。患者 CRC13 は当初アルテスネイト群に割り付けられたが、薬剤を（試験計画に従って）受け取らなかったため、プラセボ群として生存分析に含めた。患者 CRC21 は欠員（欠損値）として扱い、アルテスネイト又はプラセボ群に含めて感度分析を行った。

-Cox 比例ハザードモデルを用いてアルテスネイト群に対するプラセボ群の CRC 再発ハザード比を比較した。95%信頼区間は各群に適用した。

#### ⑬統計的推定

--ベイズ法及び古典確率論を基にしたモデルを用いた。確率論の統計学的有意性は  $P$  値  $\leq 0.05$ 、95%信頼区間とした。

-ベイズ推定において推測されるパラメータは事後平均及び対応する 95%確信区間でまとめられる。

-試験前は治療効果を定量化するパラメータに関する事前知識は仮定されず（例：免疫学的測定値に関する各群の差及び推測）、この証拠を基にどのようにパラメータが変化するかを評価することが適切である。

-Ki67 及び CD31 は存在する抗 CRC 情報における唯一の染色であった。Ki67 の感度分析を行った。

### ■3.試験結果

#### ①患者の分布：

-アルテスネイト群 12 名に、プラセボ群 11 名に無作為に割り付けた。

-アルテスネイト群 2 名はアルテスネイトを受け取らなかった（1 名は英国外で手術を受け追跡不能、もう 1 名は来院したとき、予め決めた薬剤の使用期限が過ぎていた）。

-プラセボ群 1 名は手術後の組織診で CRC を確認できず、主要評価項目（アポトーシス細胞  $> 7\%$ ）を評価できなかった。

#### ②ベースラインデータ：

-ベースライン時、両群の患者属性及び臨床的特性は、CRC デュークスステージ分類を含め両群間で比較可能であった。

#### ③主要評価項目：

-主要評価項目である、アポトーシス細胞  $> 7\%$  の患者比率の比較は、アルテスネイト群 67%、プラセボ群 55%

の成績であった。本試験のデザイン段階で、ベースライン時にアポトーシスを示す (>7%) 患者比率は、試験計画時にプラセボ群 1/11 (9%) 以下と仮定して患者数を設計したが、プラセボ群のアポトーシスを示す患者の比率が予期しない高値となり、アルテスネイトの効果の検証 (事務局注:統計学的有意差) が困難となった。連続変数としての TUNEL 染色の結果は、表 2 に示す。

#### ④副次的評価項目：

##### 1) 免疫組織化学分析

-注目すべきことは、各群における Ki67 の差に関する無情報事前分布を用いて計算すると、アルテスネイト治療後の Ki67 染色における減少の確率は 89~92% (表 2、Ki67 は下方制御されるため結果は 1~0.11) であり、治療の posterior difference は -16 (-42,10) の結果となった。

-両群間の差に対する様々な事前情報の感度分析をするとき、アルテスネイトの楽観的な無情報事前分布で、アルテスネイトの効果の確率は 97% に上昇した (1~0.03)。

-本分析を完了させるため、パラメータ (N(0, 10)) に懐疑的な無情報事前分布を追加した。それにも関わらず、アルテスネイトの効果の確率は 0.77 を維持した (平均値の推測 -16 (-22,10))。

-CD31 も同様に治療効果の可能性は高かった (0.79)。

##### 2) 生存分析

-追跡期間の中央値 42 カ月 (3.5 年) 間で、プラセボ群 6 例、アルテスネイト群 1 例で再発が見られた。

-図 4 は Cox 比例ハザードモデルの結果を示す。プラセボ群と比較したアルテスネイト群の最初の再発のハザード比は 0.16 (95%CI (0.02, 1.3)) で、再発リスクを大きく減少させた。

-アルテスネイト群において 2 年を超える生存率は 91% (95% CI (54%, 98%)) と推定されたのに対し、プラセボ群での生存率は僅か 57% (95% CI (28%, 78%)) に留まった。

##### 3) CEA レベル

-アルテスネイト群 6 名、プラセボ群 4 名が投薬前及び投与後 (手術前) に CEA の測定をした。CEA レベルは、減少、安定又は上昇に 3 分類した。

-アルテスネイト群の患者に CEA レベルの上昇は見られなかったが、プラセボ群 3 名で CEA の上昇が見られた (P=0.03、フィッシャー直接確率法)。

##### 4) 有害事象

-6 名の患者 (ITT 解析で 26%) に有害事象が見られた。内 2 名は重症であった。(表 3)。

-試験薬アルテスネイトに関連する可能性のある 2 つの有害事象の詳細は以下に示す (#)。

-残り 4 例のうち、2 例の合併症 (手術後の吻合部漏出) はアルテスネイトに関連する可能性は低いと考えられ、もう 1 例の鉄欠乏性貧血 (好中球減少はなし) は基礎疾患に起因するものと考えられた。吐気の報告が 1 例あった。

=好中球減少症の 2 例の詳細は以下を参照。

-#患者 CRC04 : 81 歳、女性、体重 51kg。アルテスネイト投与群。貧血及び排便習慣に変化をきたした。大腸内視鏡検査で閉塞のない環状上行結腸に、ポリープ状の大きな癌を認めたが転移はなかった (CEA = 3 µg/L)。腹腔鏡下結腸右側半切除術を受けたあと、貧血及び好中球減少を呈し輸血を行ったため、CTCAE 基準でグレード 3 の有害事象とした。好中球減少は翌日回復した。

組織診でデュークスステージ B の中分化 pT3 腺癌を考慮して術後化学療法を推奨したが患者は辞退した。入院期間の延長はなかったため、この事例は非重症有害事象とした。

-#患者 CRC07 : 79 歳、女性、体重 50kg。アルテスネイト投与群。過去数カ月間に貧血、直腸出血、排便習慣に変化をきたした。子宮内膜癌の既往歴があり、11 年前に腹式子宮全摘術、両側卵管卵巣摘除術、その後放射線治療を施行した。

大腸内視鏡検査では脾彎曲部に腺癌と狭窄を見た。胸部、腹部及び骨盤の CT スキャンで再発は認めなかった。CEA は 212 µg/L であったが、アルテスネイト投与後 (他の治療は無し) CEA は大幅に低下 (nadir 値 56 µg/L) した。

患者は長期間血小板増加症を患っていたが、貧血と白血球減少は手術予定日に記録された。手術 5 日前に術前

スクリーニングが行われ、貧血と白血球減少症を呈したため、手術は延期された。専門医の診察及び骨髄検査後、貧血は輸血で、継続的な好中球減少症は G-CSF 投与で治療した。そのため CTCAE 基準に準じてグレード 3 の有害事象とした。

骨髄穿刺では正常な赤血球生成を確認したが、形成異常の顆粒球生成と成熟抑制が見られた。アミロイド前駆体タンパク質は核原形質非同期性で空砲化していたが、過剰な骨髄芽球は見られなかった。巨核球は豊富であった。形質細胞の僅かな増加が見られた。

これらの結果は薬剤誘発性骨髄抑制と一致した。

好中球数は G-CSF 投与後 2 日間で増加が見られ、その後停止した。

患者はアルテスネイト投与終了後 11 日目に、関与する小腸の一部と原発性結腸を一括して左側半結腸切除術で摘除、そして小腸との吻合術を受けた。術後合併症はなかった。その後血小板数減少が見られた。

腺癌はデュークス分類 C1 及び T4abN2M0 であった。腫瘍は低分化印環タイプの腺癌で、血管壁外侵入が見られた。患者は再発リスクが～50%であったため補助化学療法を推奨されたが辞退し、経過観察を選択した。追跡期間 3 年後、彼女は無病状態で独立した生活を送っている。

#### ■4.考察

① 本試験は経口アルテスネイト単剤の抗 CRC 特性を試験した初めての無作為化二重盲検プラセボ対照試験である。

② 主要評価項目：

-癌細胞にとってアポトーシスから逃れることは重要であることが知られている。

-主要評価項目において、アルテスネイト治療後にアポトーシスをきたした（癌細胞の TUNEL 染色>7%）患者の割合がプラセボ群に比して有意差をもって検証できなかったが、これはプラセボ群の予期せぬアポトーシスの高い割合（55%）が予め仮定した閾値を超えたことが理由と思われた。

③ 副次的評価項目：幾つかは症例数の少なさや定量化した免疫組織化学マーカーにおける固有変動性があるにも拘らず、有望な結果を示唆した。

1) Ki67 等：

-癌細胞の Ki67 染色に対するアルテスネイトの効果は非常に高い確率（0.97、ベイズ法における事前情報で計算）で予見された。これは線維芽細胞の Ki67 染色に対するアルテスネイトの効果と一致する（0.84、表 2）。

Ki67 は癌細胞増殖のマーカーで、その上方制御が大腸癌では不良な予後と関連する。

-その他の腫瘍生物学的マーカーはアルテスネイトの投与で影響を受けたが、その割合は低かった（例：CD31 発現増加の確率 0.79）。1 つの例ではアルテスネイトの単剤治療 2 週間後に循環 CEA 値が～75%低下した。

2) 生存率：

-無再発生存率もプラセボ群と比較し、アルテスネイト群でより高かった（3 年目でプラセボ群 0.5、アルテスネイト群 0.89）が、本試験の患者数及びイベント数が少なかったためこれらの推定値の信頼区間は重複し有意差はなかったが、有望な値を示唆した（HR 0.16, p=0.091,）。

-本試験で解析までの死亡例数は、アルテスネイト群 0、プラセボ群 3 例であった。

3) 有害事象

-本試験の患者組み入れ基準における体重下限値（有効量はアルテスネイト 4mg/kg/日であることから 50kg が体重下限値）の患者 2 名（#）は白血球減少症を発症した。

-#1 例はアルテスネイトの投与中止後、症状は回復したが、G-CSF 投与が好中球の回復を早めたと思われる。

骨髄検査では、アルテスネイトの毒性を示唆した。これらの結果はマラリア患者にアルテスネイトを投与する

時、用量依存的（>4 mg/kg）に好中球減少症をきたす知見と一致するが、骨髄検査はこれまで行われてこなかった。我々は好中球減少症に関する治療中期の検査を設けたが、他の患者にこの合併症は見られなかった。アルテスネイト関連白血球減少症はマラリアと同様に癌患者でも用量依存的である可能性がある。アルテミシン使用後に遅発性溶血は見られなかった。

-今後の研究では、血液学的合併症をモニタリングするためにもアルテスネイト用量を 4 mg/kg/日〔ex.体重

50kg の患者で 200mg/日] に制限する方がより安全と考えられる。

-最近報告された転移性乳癌におけるアルテスネイトの用量設定試験では、1 日 200 mg、3 週間までの用量で忍容性がある可能性が報告されている。

-今回の試験で、患者は手術時に癌巣部周縁がクリアで、無作為化時点で検出可能な転移は認めなかったため、再発は血行性転移の可能性がある。

4) アルテスネイトは血行性転移の減少を示唆

-これまでの経験では血行性転移により CRC の生存率を低下させる幾つか報告がある。CRC の潜在性播種には全身性ネオアジュバント治療が有効であり、特にアルテスネイトは手術時期を延期させることは殆どないことから最適な薬剤と思われる。アルテスネイトは動物モデルでも肝臓転移を減少させたとの報告がある。

5) まとめ

-これらの観察は今後の試験のデザインにおいて重要な情報となる。アルテスネイトのネオアジュバント的特性を評価することで、我々はヒト CRC におけるアルテスネイトの作用機序も確認した。アルテスネイトは我々の試験では癌細胞においてアポトーシスを回復させず、Ki67 発現を減少させた。Ki67 は Cd31 とは異なり、CRC における予後の重要なマーカーであり、発現の際に増加する。これらの結果は減少した Ki67 染色が観察された子宮頸癌における非対照試験の報告と一致したが、その試験における血管の CD31 染色の減少は我々の観察とは対照的であった。

-癌細胞の増殖や癌細胞マーカーの発現（血管新生に対するものも含む）等に対するアルテスネイトの抗癌機序に関する詳細な実験的観察の報告は、今や *in vivo* 観察の視点から解釈が可能となった。

-忍容性が高く使いやすい癌治療法を探索することを目的としたアルテスネイトのより大規模な臨床試験が今後必要である。その知見から現在の治療法との相乗効果が見込まれる新しい治療法が提供される可能性がある。

表 2 免疫組織化学検査結果の予測「総平均」。単一測定値及びクラスターの各個人間の変異性を考慮にいたったベイズ法後に各治療群による等分目盛により 95%CI と共に示した。効果の確率は各群（アルテスネイト、プラセボ）における総平均の差が 0 より大きい（また P 値ではない）可能性がある。Ki67\*は事前情報に対応する全ての予測は感度分析後に示した。懐疑的な情報を先に、事前情報を後に示した。上皮染色に関する結果はプラセボ患者（EGFR and c-MYC; r = 0.664; 0.026）、アルテスネイト患者（EGFR and p53, r = 0.68; p = 0.04, and Tunel and p53 r = 0.87; p = 0.0025）においてそれぞれ相関性があつた。

Marker	Attesunate		Placebo		P of an effect	Difference or change	Sensitivity analysis (prior)
	Mean	95% CrI	Mean	95% CrI			
<b>Epithelial</b>							
c-MYC	45	(27, 53)	43	(27, 64)	0.59	2.6 (-22, 26)	
CD31	8	(3, 12)	5	(2, 9)	0.79	2.6 (-4, 9)	
EGFR	32	(12, 58)	27	(9, 45)	0.66	5.4 (-24, 32)	
p53	25	(5, 45)	18	(3, 35)	0.72	7 (-20, 30)	
Tunel	18	(4, 32)	20	(7, 32)	0.4	-2 (-20, 17)	
VEGF	38	(21, 54)	43	(40, 75)	0.45	-5 (-28, 17)	
Ki67*	33	(13, 52)	49	(31, 66)	0.11	-16 (-42, 10)	N(0, 1000)
	34	(14, 53)	48	(31, 65)	0.13	-15 (-40, 10)	Non-informative
	38	(22, 54)	44	(29, 59)	0.23	-6 (-22, 10.1)	N(0, 100)
	32	(12, 51)	49	(32, 66)	0.08	-18 (-42, 8)	Vaguely informative
	32	(13, 51)	49	(32, 66)	0.08	-18 (-42, 8)	N(0, 10)
	32	(17, 49)	48	(33, 63)	0.03	-15 (-31, 0)	Informative
							N(-15, 1000)
							Non-informative
							N(-15, 100)
							Vaguely informative
							N(-15, 10)
							Informative
<b>Fibroblast</b>							
c-MYC	7	(-7, 21)	19	(7, 32)	0.10	-12 (-30, 7)	
CD31	13	(-2, 26)	11	(0, 23)	0.58	1 (-17, 19)	
EGFR	0.1	(-0.5, 0.7)	0.4	(0, 0.9)	0.21	-0.3 (-1, 1)	
Ki67	5	(-3, 12)	10	(3, 16)	0.16	-5 (-15, 5)	
p53	0.7	(-0.8, 2.1)	0.9	(-0.3, 2)	0.40	-0.2 (-2.1, 1.2)	
Tunel	3	(0, 5)	4	(1, 6)	0.31	0.8 (-4, 3)	
VEGF	0.2	(-0.02, 0.5)	0.2	(0.1, 0.3)	0.52	0.02 (-0.3-0.3)	

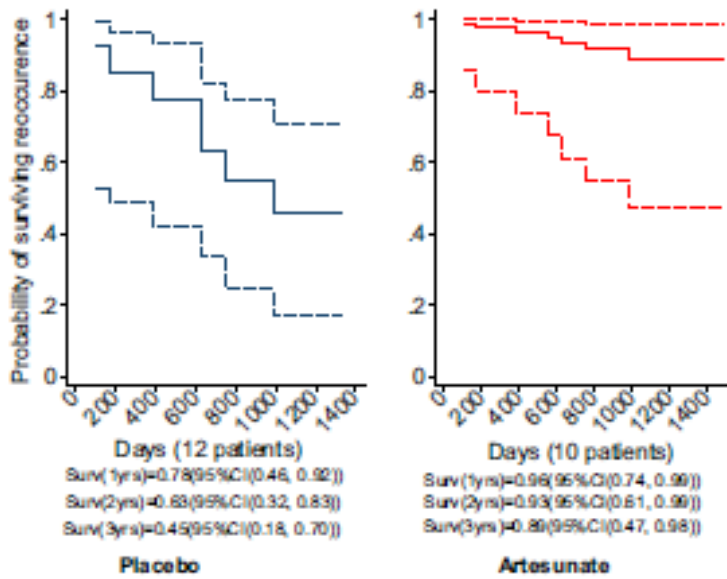


図 4 Cox 比例ハザードモデルで予測した生存再発曲線。患者 CRC21 は無作為化時に完全に行方不明となった（感度分析（フル）は付録表 1 を参照）。プラセボ群では患者 2 名が 1 年目に亡くなり（108、170 日目）、試験には 10 名（83%）が残った。その後 2 名の患者が 2 年目に亡くなり（383、663 日目）、試験には 8 名（66%）が残った。3 年目には 2 名の患者が亡くなり（749、990 日目）、3 年目以降には 50%の患者が残った。アルテスネイト群では死亡例は 552 日目に発生し、3 年目以降には 9 名の患者（90%）が残った。これらの粗推定値は上記のデータを支持するものである。

表 3 有害事象。各治療群への割り付けは図 2a を参照。

Study number	Event	Due to pre-existing illness	Related to study drug	Serious?	Study treatment	Outcome
CRC 004	Neutropenia and anaemia	No	Possibly	N		Resolved
CRC 007	Neutropenia and anaemia	No	Possibly	Y	Stopped	Resolved
CRC 017	Nausea, but no vomiting	No	Possibly	N	Continued unchanged	Resolved
CRC 018	Anastomotic leak	No	Not related	Y		Resolved
CRC 019	Anastomotic leak	No	Unlikely	Y	Stopped	Resolved
CRC 022	Anaemia	Yes	Unlikely	N	Continued unchanged	Resolved