**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対照パイロット研究**

EBioMedicine 2 (2015) 82–90

Sanjeev Krishna, Senthil Ganapathi, Irina Chis Ster, Mohamed E.M. Saeed, Matt Cowand,, Caroline Finlayson, Hajnalka Kovacsevics, Herwig Jansene, Peter G. Kremsner, , Thomas Efferth, Devinder Kumar

**抄録**

背景：アルテスネイトはin vitro、動物実験、症例発表などにおいて幅広い抗癌作用が示されている抗マラリア薬である。アルテスネイトの抗癌作用に対する厳密な臨床試験は行われてこなかった。

目的：本試験の目的は大腸癌（colorectal cancer 、CRC）に対する経口アルテスネイトの抗癌作用と忍容性を確認することであった。

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った。生検で単発性CRCと診断され、治癒的切除を実施する予定の患者（n=23）にコンピューター生成コードを不透明な封筒に入れて手術前に配布し、14日間アルテスネイト経口投与群（200mg、n＝12）またはプラセボ群（n=11）に割り付けた。主要評価項目はアポトーシスを起こした癌細胞の割合（＞7％がTUNEL染色を示した場合有意とした）。二次的免疫組織化学的アウトカムでは以下の腫瘍マーカーを評価した：VEGF、EGFR、c-MYC、CD31、Ki67、p53および臨床反応。

結果：20名の患者（アルテスネイト群9名、プラセボ群11名）がプロトコルに従って試験を終了した。ランダム化された群は臨床的に、そして癌特異性の比較が可能であった。アルテスネイト群とプラセボ群のそれぞれ67％、55％の患者において細胞の＞7％にアポトーシスが見られた。ベイズ法により、Ki67発現を減少、そしてCD31発現を増加させ、アルテスネイトの治療効果の可能性はそれぞれ0.89と0.79であることが分かった。追跡期間中央値42カ月に、アルテスネイト群1名、プラセボ群6名にCRCの再発が見られた。

解釈：アルテスネイトはCRCに対する抗増殖効果があり、高い忍容性が示された。

1. **序論**

大腸癌（Colorectal cancer、CRC）は男性（746,000例）、女性（614,000例）両方において世界中で人口の9～10％に発生している（Ferlayら2012）。英国では毎日新たに110例がCRCの診断を受け、高齢者は特に死亡リスクが高く（UK CR, 2014）、新たに診断された＞50％の患者は局所進行性疾患である（T3/T4）。転移の見られないCRCの唯一の根治的治療法は手術であるが、これ以上症状を進行させないためには手術を実施する際にネオアジュバント化学療法およびまたは放射線治療の併用が必要である。

為し得る最善の治療法の予後は、診断5年後の無病生存期間または全生存期間を～60％以上に増加させないことである。多くの患者にとって高度な治療法は受けにくく、広く普及するには高価すぎ、副作用をもたらす可能性もあり、患者の生存率をさらに損なう可能性がある。そのためCRCに対する新しく安価、効果的で安全な経口薬の開発が至急求められている。1つの方法は実験的にいくつかの抗癌作用を示す既存薬を研究し、in vivo試験で安全性および有効性を評価することである。

アルテスネイトはカワラニンジンから抽出されるアルテミシニンに由来し、経口、直腸、非経口投与が可能な抗マラリア薬で、広く普及している（Gomes et al., 2009;

Kremsner and Krishna, 2004; Kremsner et al., 2012; Nealon et al., 2002; Hien et al., 1994, 1992; Jiang et al., 1982）。中国政府の政策によりアルテミシニンの分離が行われた直後に、初めてアルテミシニンの抗癌作用について報告された（Efferth et al., 2007; Krishna et al., 2008）。その後、in vitroおよび動物モデルを用いた多くのアルテミシニンの研究で幅広い抗癌作用が確認された（Efferth et al., 2007）。アルテミシニンは細胞増殖および血管新生を抑制し、アポトーシスを引き起こす（Anfosso et al., 2006; Efferth et al., 2001, 1996）。

ヒトに対するアルテミシニンの抗癌作用については、個々の症例報告しか存在しない（Krishna et al., 2008）。これらの報告には転移性ぶどう膜黒色腫（Berger et al., 2005）、喉頭扁平上皮癌（Singh and Verma, 2002）、巨大下垂体腫瘍（Singh and Panwar, 2006）などがある。中国で行われた非小細胞性肺癌患者の非盲検試験は、アルテミシニンが従来の治療薬に上乗せされた際に、対照群と比較して癌進行までの期間が延長されたことを示した（Zhang et al., 2008）が、死亡率には影響を与えなかった。進行性子宮頸癌に対しアルテスネイトの投与を行った患者の非盲検パイロット研究では、忍容性と症状の改善が見られた（Jansen et al., 2011)。イヌの切除不能な腫瘍に対するアルテスネイト（Rutteman et al., 2013）、および獣医学的肉腫5例におけるカワラニンジン抽出物の効果（Breuer and Efferth, 2014）に関する第II相試験が行われている。本試験は厳密な試験デザインのもとで、アルテミシニンを単剤で使用した際の抗CRC効果および忍容性を検討した。

**2.方法**

2.1倫理

本試験はWandsworth Ethics Committee (WandsworthUK, Ref: 08/H0803/3)により承認され、登録済みである（ISCRTN05203252）。

2.2試験デザイン

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り、無作為化は1:1の割合でおこなった。試験は英国St George's University of LondonおよびSt. George's Healthcare NHS Trustで行った。

2.3組み入れ基準

対象患者は生検で単発性CRCと診断され、年齢は21～90歳、手術が可能なステージで、ネオアジュバント治療を必要としない治癒的切除を実施する予定の同意書を提出した患者であった。

2.4除外基準

除外基準は、過敏症、妊娠、聴力または平衡感覚障害、免疫抑制剤またはアルテスネイトと相互作用のある薬剤（以下参照）の服用、体重50kg以下または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、同意書が未提出、妊娠可能な年齢の女性が効果的な避妊方法を行っていない場合、NKF D/QOFI ステージ3またはそれ以上の慢性腎臓病（eGFR ＜60 mL/min）、溶血反応が無くビルビリンが正常値の上限＞2、または慢性肝臓病の患者。

2.5リクルートメント

リクルートメントはロンドンのSt George's Healthcare NHS Trustで2009年3月9日から2012年10月15日に行った。

2.6介入

患者に対し、手術および標準治療開始2週間前にアルテスネイトまたはプラセボの実験的投与を行った。アルテスネイト（Arinate®100mg）はFamar Italia社によって製造され、プラセボはMPF（オランダ）で製造された。これらの製造はEUの新しいcGMP基準に準拠して、Dafra Pharma（ベルギー）の承認の下で許可され製造された。試験薬は包装され、ラベル付けされ、B&C CliniPack（ベルギー）によって承認を受け、パックサイズは30 × 100 mgで、St George's Healthcare NHS Trustの薬剤部で受け取り、保管、配布した。

試験に用いたアルテスネイトの用量は200mg/日（経口）を14日間、手術48～72時間前に投与を中止した。

試験薬剤はプラスチック包装され、1つの箱に試験期間中に必要な14回分の用量が入っていた。

この試験に参加することで患者の手術が延期されることはなく、臨床管理にも変更はなかった。62日間ルール（診断後この期間内の治療開始が定められている）にも厳格に従った。

2.7アウトカム

試験の主要エンドポイントは腫瘍標本の上皮細胞における有意な（アポトーシスの兆候を示す細胞が＞7%と定義される）アポトーシスの有無であった。

二次アウトカムはパラフィン包埋腫瘍標本に適用し、上皮細胞および線維芽細胞両方で定量化した7つの免疫組織化学染色、内皮増殖因子（endothelial growth factor、VEGF）、c-MYCおよびEGF受容体ステータス、CD31タンパク質量を決定する微小血管密度、Ki67染色およびp53腫瘍抑制タンパク質発現で評価する増殖活性であった。各患者のそれぞれの染色は半自動方式で6つの顕微境領域において評価された（数例では7または8領域で評価を行った。特に線維芽細胞では6以下または0の領域で評価が行われた）。

2.8血液サンプル

3つの血液サンプルを採取した。1）ベースライン時、2）投薬1週間後（安全性モニタリングのため改訂されたプロトコルに従う）、3）2週間の投薬後（手術直前）。各サンプルではカリウム、ナトリウム、クレアチニン、尿素、アルブミン、アルカリホスファターゼ、ALT、ビリルビン、ヘモグロビン、血小板数、白血球数で安全性を確認した。癌胎児抗原はベースライン時及び無作為化後に患者に見られた場合にモニタリングを行った。

2.9二次アウトカム

ベースラインと治療中または後の血液試験の結果、そして抗癌作用（上記のマーカーで判断）を比較する従来の基準に従った、安全性および忍容性（臨床的および血液検査）を評価した。

2.9.1アウトカムの変更

前述のエンドポイントに変更はなかった。

2.10サンプルサイズ

本パイロット研究の先駆的な特徴のため、サンプルサイズ計算では試験開始前に一次アウトカムに対して大腸癌は未治療の場合有意なアポトーシスは起こらないとの仮定を基に行った。プラセボ群の患者の多く（95％以上）で、アポトーシスの兆候を示す細胞は7％以下と予測された。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を示すことが予測された。この大きな差はベースライン時のアポトーシスインデックスの予測から算出された（Yamamoto et al., 1998; Ikenaga et al., 1996; Bendardaf et al., 2003）。多くのパイロット研究の目的は仮定を重点的に検討するのではなく、実証実験を行うことであることを踏まえ、サンプルサイズ2\*11 が80％の検出力、タイプ1のエラー5％であった。

2.11無作為化

対象者はアルテスネイト群またはプラセボ群へ同数に割り付けた。無作為化はコンピューター生成コードを不透明な封筒に入れ手術前にDafra Pharmaにより配布した。症例の組み入れおよび割り付け後、参加者は薬剤師より無作為化パックを受け取った。無作為化コードへのカギのコピーは臨床試験薬剤師のみが保管し、割り付け及びその隠匿はベルギーで行われた。研究実施者、患者、データ管理者へはデータの収集が終了し、組織学的結果が分析され、データセットが固定された後まで開示されなかった。

2.12順番の作成および割り付けの隠匿方法

試験薬は透明なパックに包装され、無作為化スケジュールに従って各患者に対し通し番号を割り振った。各参加者は同意書を提出し適格かどうかの確認後番号が与えられ、それに対応した無作為化された番号の書かれている薬剤パックを受け取った。

2.13盲検化

試験中に有害事象の報告を受け取った後MHRA（英国医薬品規制庁）からの要求事項に従って、2名の患者に対して割り付けの非盲検化を行った。盲検化は全ての研究実施者に対して適用し、コードはスポンサーのオフィス（SGUL）からMHRAへと提供された。

2.14データの収集と構造

免疫組織病理学データは　腫瘍の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生成した。各寸法はスライド上で見られた癌細胞の染色の推定値であり、0はそのセクションに1つの染色も見られないことを表す。そのためデータセットは患者がレベル1、各測定値がレベル2となる階層構造となっている。3名の患者を除き（図1）、統計解析に対して記録の不足はなかった。

2.15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、連続データまた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。

2.16免疫学的分析結果および推計データ解析

Random effect（分散要素）モデルは、断層構造のため、正しく変異度を求めるために免疫化学的データに用いた。

患者は6か月毎に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（プロトコルに従って）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は欠員として扱い、アルテスネイトまたはプラセボ群に含めたものとし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とプラセボを比較した際の再発のハザード比を求め、95％信頼区間は各群に対し求めた。

2.17統計的推定

ベイズ法および伝統的な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　95％信頼区間で評価されたパラメータの不確実性とP値0.05以下とした。ベイズ推定において推測されるパラメータは事後平均および対応する95％確信区間でまとめられる。初め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ておらず（例：免疫学的測定値に関する各群の差および推測）、この証拠を基に以下にパラメータ値が変化するかを評価することが適切である。Ki67およびCD31は存在する抗CRC情報における唯一の染色であった（Li et al., 2007; Jansen et al., 2011）。Ki67の感度分析を行った。統計ソフトはOpenBUGS（Thomas et al., 2006）、STATA（StataCorp. 2013. Stata Statistical Software: Release 13. College Station, TX: StataCorp LP）、R（Team RDC, 2011）を使用した。

**3.結果**

3.1患者フロー

図1は患者フローを示す。12名の患者はアルテスネイト群、11名の患者はプラセボ群、2名の患者は無作為化を行ったが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た為追跡不可能であった。もう1名の患者は来院した際にはすでに薬剤の使用期限が過ぎていた）。プラセボ群の1名は手術後の組織診断で腫瘍を確認することができなかったため、主要エンドポイントに関して評価を行うことができなかった。リクルートメントは計画されていた患者数が無作為化された時点で終了した。

3.2ベースラインデータ

ベースライン時の患者属性および臨床的特性は表１に示す。デュークスステージを含めた各群間で比較可能であった。

3.3一次アウトカム

プラセボ群の55％およびアルテスネイト群の67％は一次アウトカムを達成した（アポトーシス細胞の割合が＞7％であった患者）。本試験のデザイン段階で、アポトーシスを示す癌細胞が＞7％はプラセボ群の≦1/11の患者のみと仮定した。プラセボ群でのベースライン時の予期しなかった高値により、一次アウトカムにおけるアルテスネイトの効果の検出が困難となった。連続変数としてのTUNEL染色の結果は、表2に示す。

3.4

3.4.1免疫組織化学分析

表2は免疫組織化学分析の結果を示す。直線にメモリをつけた変量効果モデルは各群の平均値の事後分布、95％信頼区間、各群の推測される差を示す。各治療群の差の推測される事後分布は両側の0に位置し、各群は分析したマーカーにおいて大きな差が無かったことを示唆する。

興味深いことに、各群でのKi67の差に関する無情報事前分布を用いて、アルテスネイト治療後のKi67染色の減少の確率は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）という結果となった。図2aに示される様にパラメータ値の信頼度が上がると、同様の結果が認められる。図2bでまとめられた通りパラメータ分布を変化させることにより、-15（N (−15,10)）の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％に上昇する（1～0.03、表2）。

本分析を完了させるため、このパラメータ（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、表2）。CD31も同様に治療効果の可能性は高かった（0.79）。代表的な免疫染色は図3に示す。

3.4.2生存分析

追跡期間の中央値42カ月間で、プラセボ群で6例、アルテスネイト群で1例の再発があった。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際の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)）であった。アルテスネイト群における2年を超える生存率は91％（95% CI (54%, 98%)）であったのに対し、プラセボ群が最初の再発からの生存率は57％（95% CI(28%, 78%) ）に留まった。付録表1に示すCRC21に対する感度分析は、この患者がアルテスネイト群に割り付けられ3年間再発が無かった場合、生存に対するアルテスネイトのp値がp=0.07（95% CI 0.02, 1.21）であったことを示す。

3.4.3CEAレベル

アルテスネイト群の6名、プラセボ群の4名が本試験の投薬前後（および手術前。減少、安定または上昇に分類）にCEAレベル測定を受けた。アルテスネイト群にはCEAレベルの上昇は見られなかったが、プラセボ群は3名の患者でその上昇が見られた（P=0.03、フィッシャー直接確率法）。

3.5有害事象

6名の患者（ITTで26％）に有害事象が見られた（内2名は重症であった。表3、付録表1）。試験薬に関連する可能性のある2つの有害事象は詳細を示す、残りの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（好中球減少症はなし）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例の詳細は以下と図5を参照。

CRC04：81歳51kgの女性患者は貧血および排便習慣の変化を示し、大腸内視鏡検査で閉塞が見られなかった環状上行結腸にポリープ状の大きな癌が見つかった。患者はアルテスネイト群に割り付けられていた。ステージングスキャンでは転移性の広がりは見られなかった（CEA = 3 μg/L）。彼女の治療中間レビューは注意をひくものではなかった。その後手術を受け、貧血および好中球減少症であることが分かった（図４a）。その後輸血を行ったため、CTCAE基準（v4.0; http://　evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE\_4.03\_2010-06-14\_QuickReference\_5x7.pdf）に従ってグレード3の有害事象とした。好中球減少症は翌日回復した。

腹腔鏡下結腸右半切除術を受け、回復も滞りなかった。彼女は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されたが、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定義された。

CRC07：79歳50kgの女性患者は過去数カ月間に貧血、直腸出血、排便習慣の変化を示した。彼女には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してその後放射線治療を行った。

大腸内視鏡検査では脾弯曲部に腺癌と狭窄が見られた。胸部、腹部および骨盤のCTスキャンで再発は見られなかった。彼女はアルテスネイト群に割り付けられた。CEAは212 μg/Lであったが、アルテスネイト投与（他の治療無し）後大幅に低下した（56 μg/L,に低下、図4b）。彼女は血小板増加症を長期間患っていたが、貧血と白血球減少症は手術予定日に記録された（図4c）。術前スクリーニングは手術5日前に行われ、貧血と白血球減少症が見られた。手術は延期され、専門家の診察および骨髄検査後、貧血に対しては輸血で、継続的な好中球減少症に対してはG-CSFで治療を行った。そのためCTCAE基準に従ってグレード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および成熟抑制も見られた。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11日後に左側半結腸切除術、関与する小腸の小断片の一括切除、原発性結腸および小腸の吻合を受け、術後の合併症はなかった。その後血小板数の減少が見られた（図4c）。腺癌はデュークス分類C1およびT4abN2M0であった。腫瘍は低分化印環タイプの腺癌で、壁外血管侵入が見られた。彼女は再発リスクが～50％であったため、補助化学療法が推奨された。彼女は辞退し、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**

本試験は経口アルテスネイトの抗CRC特性を試験したこれまでで初めての無作為化二重盲検試験である。アポトーシスから逃れることは癌細胞にとって重要であり（Fiandalo and Kyprianou, 2012）、高アポトーシスインデックスはより悪性度の高いCRCと関連性がある（Alcaide et al., 2013）。アルテスネイト治療後の予め決められた主要エンドポイント（癌細胞のTUNEL染色が＞7％の患者の割合）は有意ではなかったが、これは恐らくプラセボ群の予期せぬ高い割合の患者（55％）が予め決められた閾値を超えたことが理由と思われる。しかしながら二次エンドポイントのいくつかは、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にもかかわらず、有望な結果を示唆した。

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、図2b）であった。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ある、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に影響を受けたが、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（図4b）、2週間のアルテスネイト単剤治療後に循環CEA値が～75％低下した。

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はより高かった（3年目でプラセボ群0.5、アルテスネイト群0.89、図3）が、本試験の患者数およ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する（HR 0.16, p=0.091、付録表1）。本分析までの死亡例は、アルテスネイト群で0（比較的不良な予後を迎えた患者もいた）、プラセボ群では3例であった。

本試験の組み入れ基準における体重下限値の患者2名（アルテスネイト有効量は4mg/kg/日であることから50kgが体重下限値であった）は白血球減少症を発症した（図4）。1例ではアルテスネイト投与を中止後、症状は回復したが、G-CSFが回復を早めた可能性もある。骨髄検査では、アルテスネイトの毒性の作用を示唆した。これらの結果はマラリアに対してアルテスネイトを使用した用量依存的好中球減少症（＞4 mg/kg）に関する近年の知見と一致するが、骨髄検査はこれまでには行われてこなかった。マラリアにおける知見後、我々は好中球減少症に関する治療中期モニタリングを設けたが、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が観察されているが（Rolling et al.,

2014, 2012）、我々の参加者の中にはこの合併症は見られなかった。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の用量を＜4 mg/kg/日に制限する方が安全である可能性がある。最近発表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日に200 mgを3週間までの用量に忍容性がある可能性を示した（Ericsson et al., 2014）。

我々の患者では肝での再発が最もよく見られ、次に腹膜、卵巣と続くが、これは播種が主に血行性および経腹膜性であることを示す。患者は手術時に周縁がクリアで、無作為化時点では検出可能な転移はなかったため、血管侵入（VI）性の微小転移が再発を引き起こした可能性がある。これまでの経験でVIによりCRCにおける生存率の低下が予期できることが示唆されてきた（Ganapathi et al., 2011; Liang et al., 2007; Talbot et al., 1980; Betge et al., 2012）。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、手術を延期させることは殆どないことからアルテスネイトは特に最適である可能性がある。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（Li et al., 2007）。

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と一致したが（Jansen et al., 2011）、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。増殖（Efferth et al., 2007, 2003; Yeung et al., 2013）や癌細胞マーカーの発現（血管新生に対するものも含む）（Konkimalla et al., 2009; Efferth et al., 2004; Konkimalla and Efferth, 2010）など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す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。それにより現在は存在しない現在の治療法との相乗効果が見込まれる治療法が提供される可能性がある。

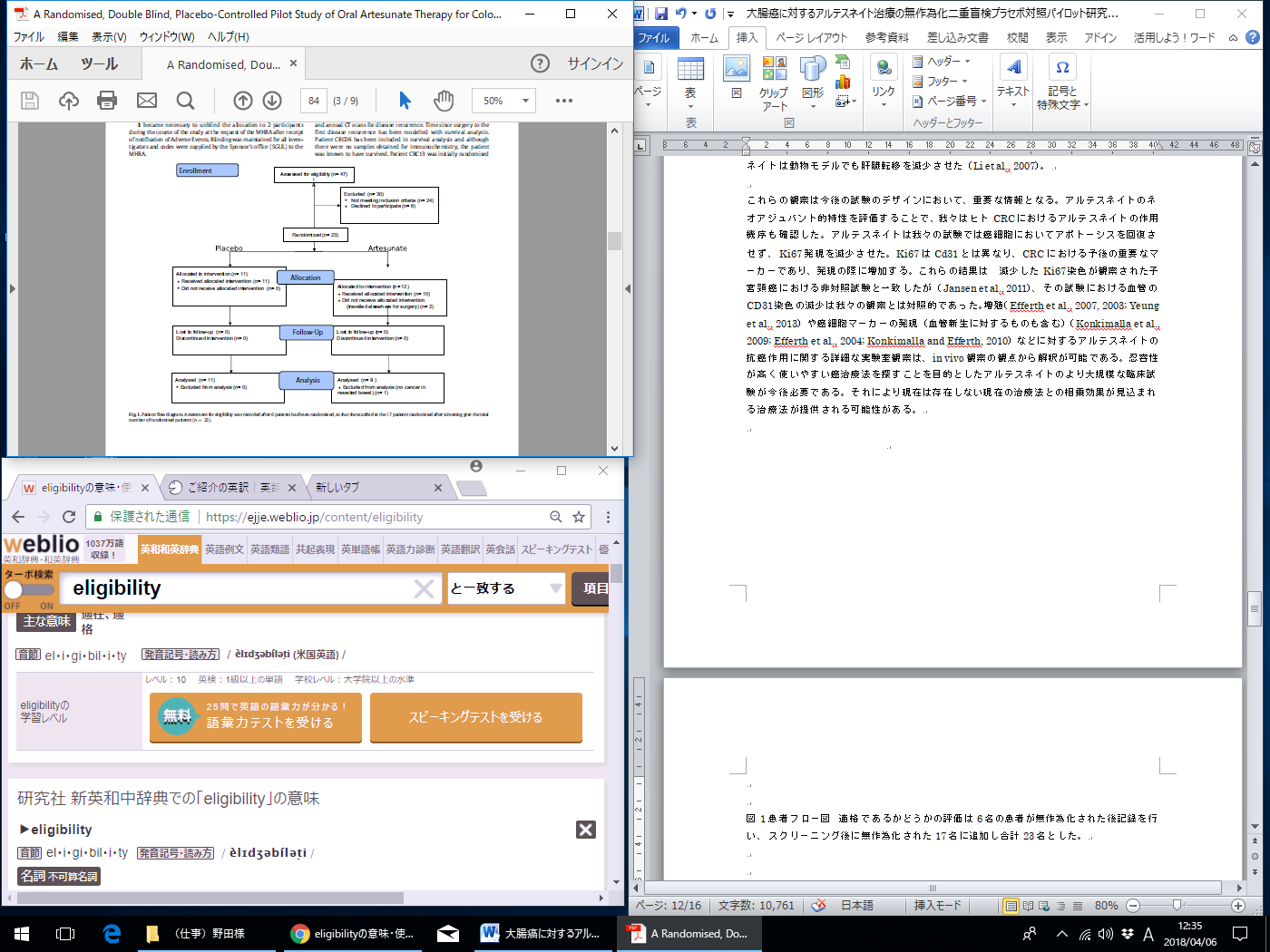


図1患者フロー図　適格であるかどうかの評価は6名の患者が無作為化された後記録を行い、スクリーニング後に無作為化された17名に追加し合計23名とした。

表1ベースライン時の人口統計学、臨床、研究室における特徴

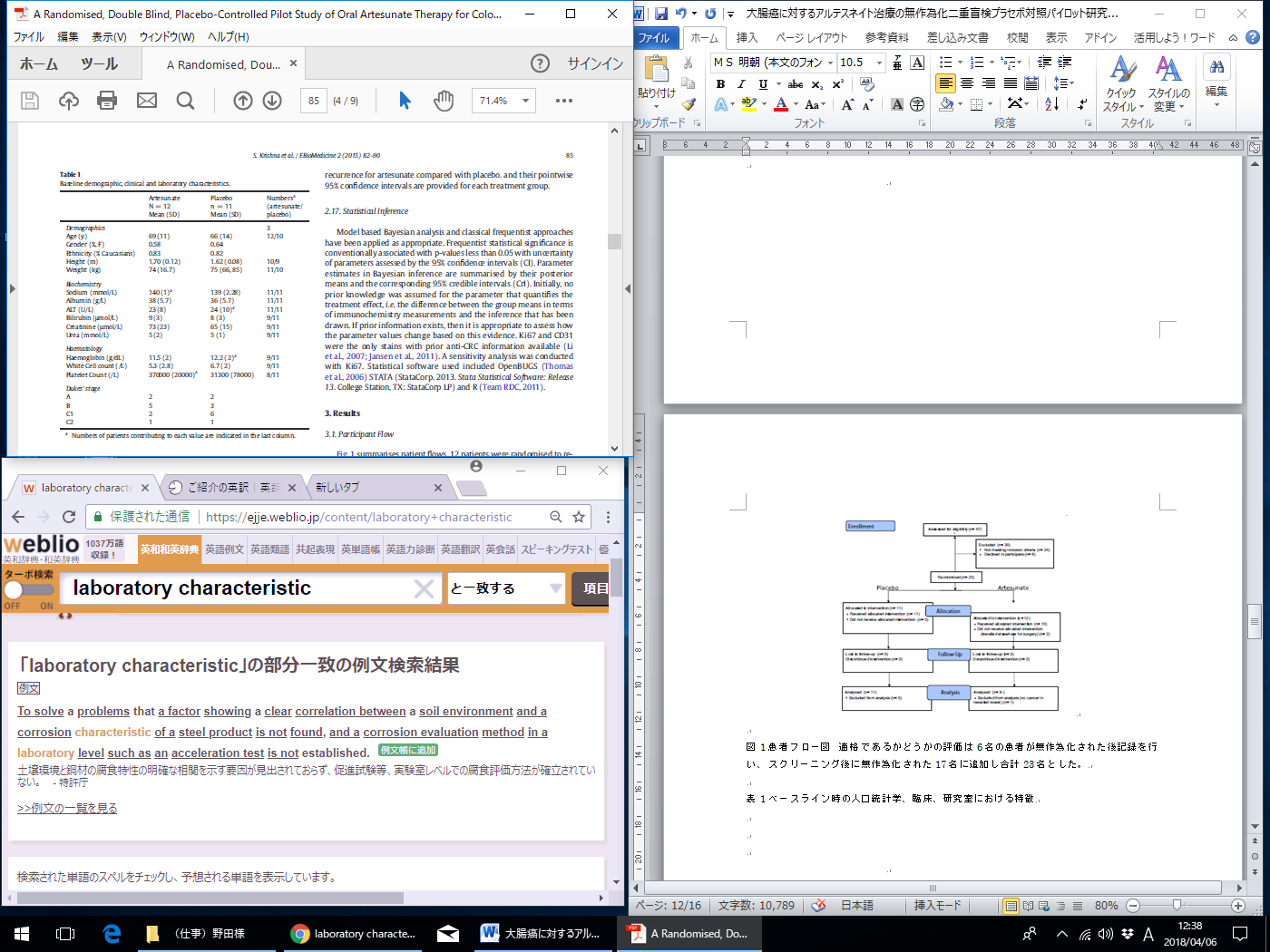
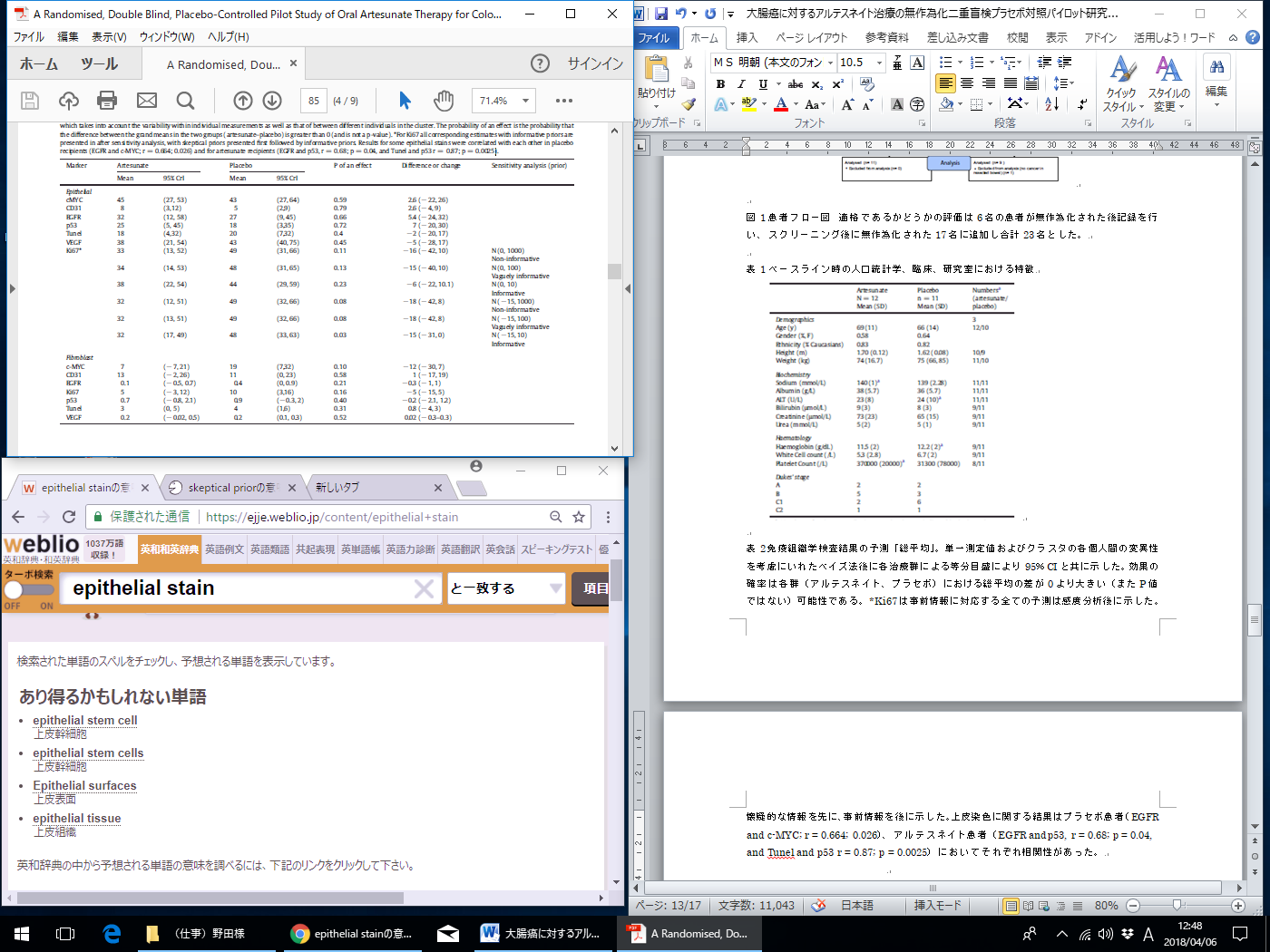


表2免疫組織学検査結果の予測「総平均」。単一測定値およびクラスタの各個人間の変異性を考慮にいれたベイズ法後に各治療群による等分目盛により95％CIと共に示した。効果の確率は各群（アルテスネイト、プラセボ）における総平均の差が0より大きい（またP値ではない）可能性である。\*Ki67は事前情報に対応する全ての予測は感度分析後に示した。懐疑的な情報を先に、事前情報を後に示した。上皮染色に関する結果はプラセボ患者（EGFR and c-MYC; r = 0.664; 0.026）、アルテスネイト患者（EGFR and p53, r = 0.68; p = 0.04, and Tunel and p53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



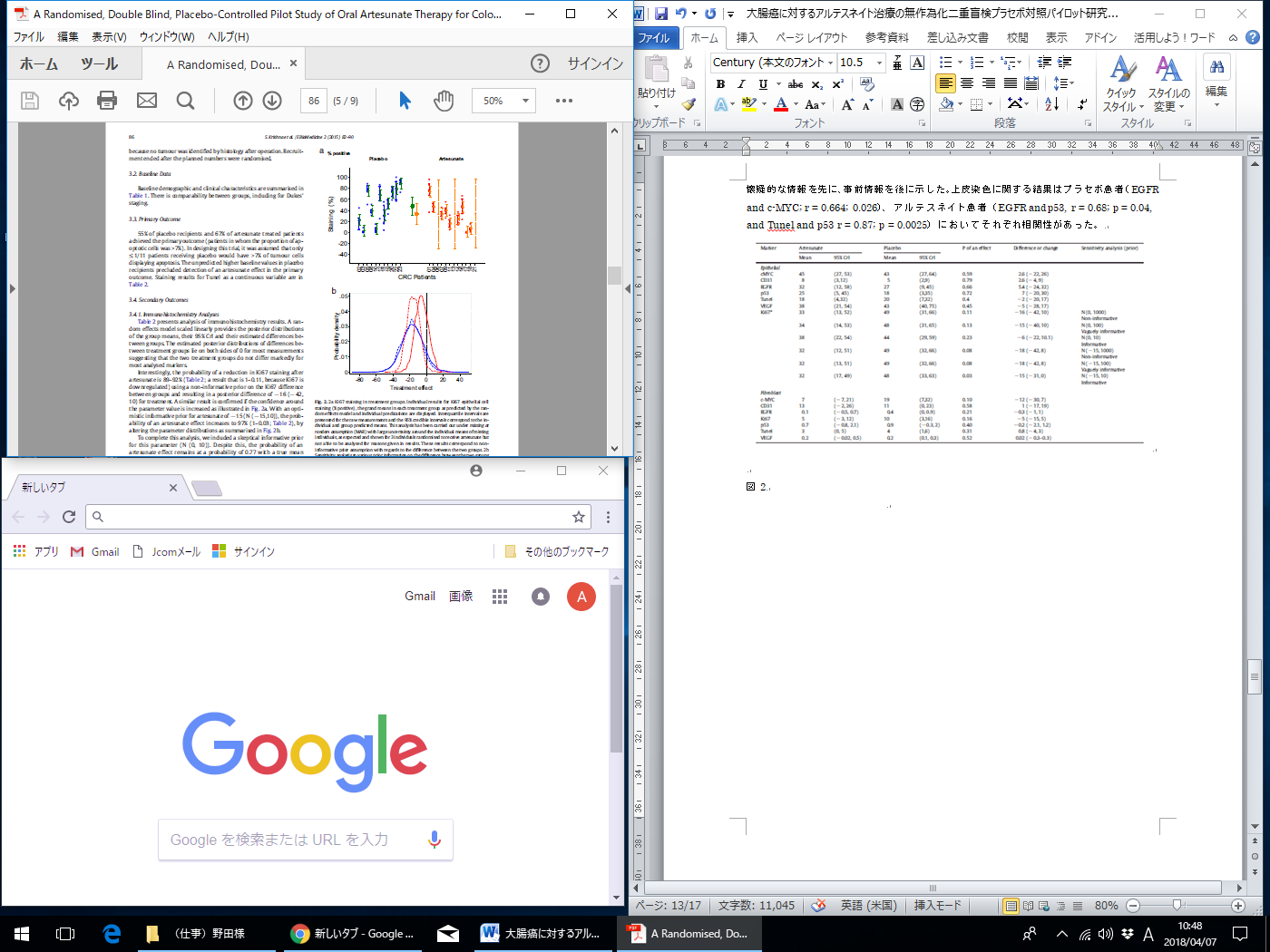


図2　2a　各治療群のKi67染色。上皮細胞Ki67染色（％陽性）の結果、変量効果モデルにより推測された各治療群の総平均、各予測値を示す。生観測データ、各群の予測平均値に関連する95％CIの四分位範囲を示す。本分析は結果で示された理由で分析不可能であったアルテスネイト群に割り付けられた3名の患者の個別の平均の不確実性を用いて、missing at Random assumption（MAR）によって行った。これらの結果は2つの群の差における非事前情報に関連する。

2b　Ki67に関する2つの群の間の差に対する様々な事前情報の感度分析。本分析は発表されている実験結果によって正当性が示されている。アルテスネイトとプラセボの間の差がネガティブであるという確率は効果なしの懐疑的な情報（0.77）の下でも高い。

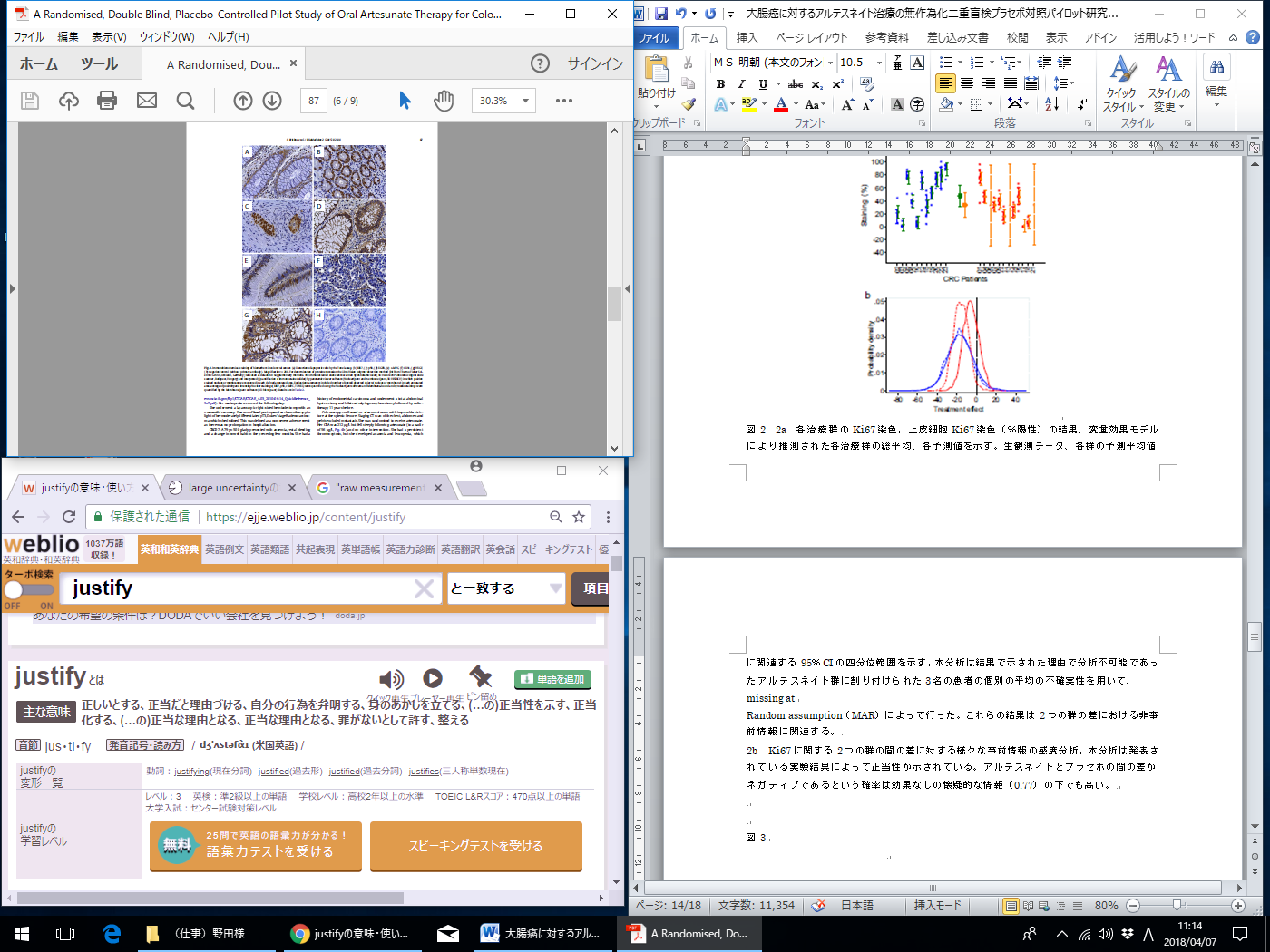


図3大腸癌におけるバイオマーカーの免疫組織学染色。(a)TUNEL分析によるアポトーシス細胞の検出、(b)Ki67、(c)p53、(d) EGFR、(e) c-MYC、(f) CD31、(g) VEGF、(h)負の対照（一次抗体なし）。倍率×250．タンパク質発現の検出には、付録の方法で詳細を示した通り、UltraVision polymer検出法（Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, ドイツ）を使用した。免疫染色スライドはPanoramic Desk（3D Histotech Pannoramic digital slide

scanner, Budapest,Hungary) でスキャンし、panoramic viewer software（NuclearQuant andmembraneQuant, 3DHISTECH）で解釈を行った。染色された核または膜はannotatedエリアでカウントした。評価パラメータは各annotatedエリアで検出されたもの（核または膜）の総数、陽性または強度の平均であった。核染色（Ki67、p53, c-MYC, TUNEL）はNuclear Qant softwareおよびMembrane-boundを使用し定量化し、サイトゾル染色はMembraneQuant softwareで定量化した。結果は表2に示す。

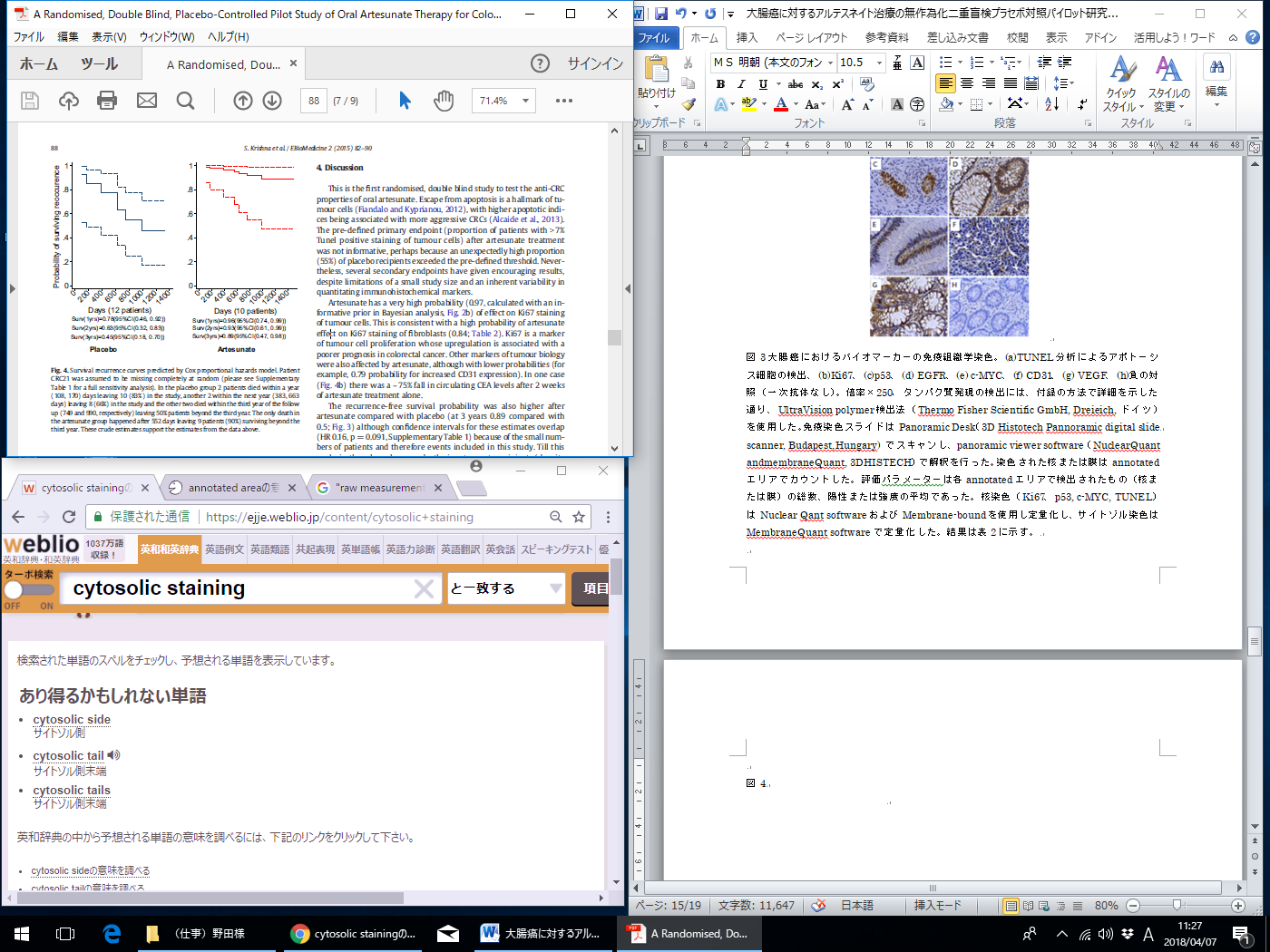
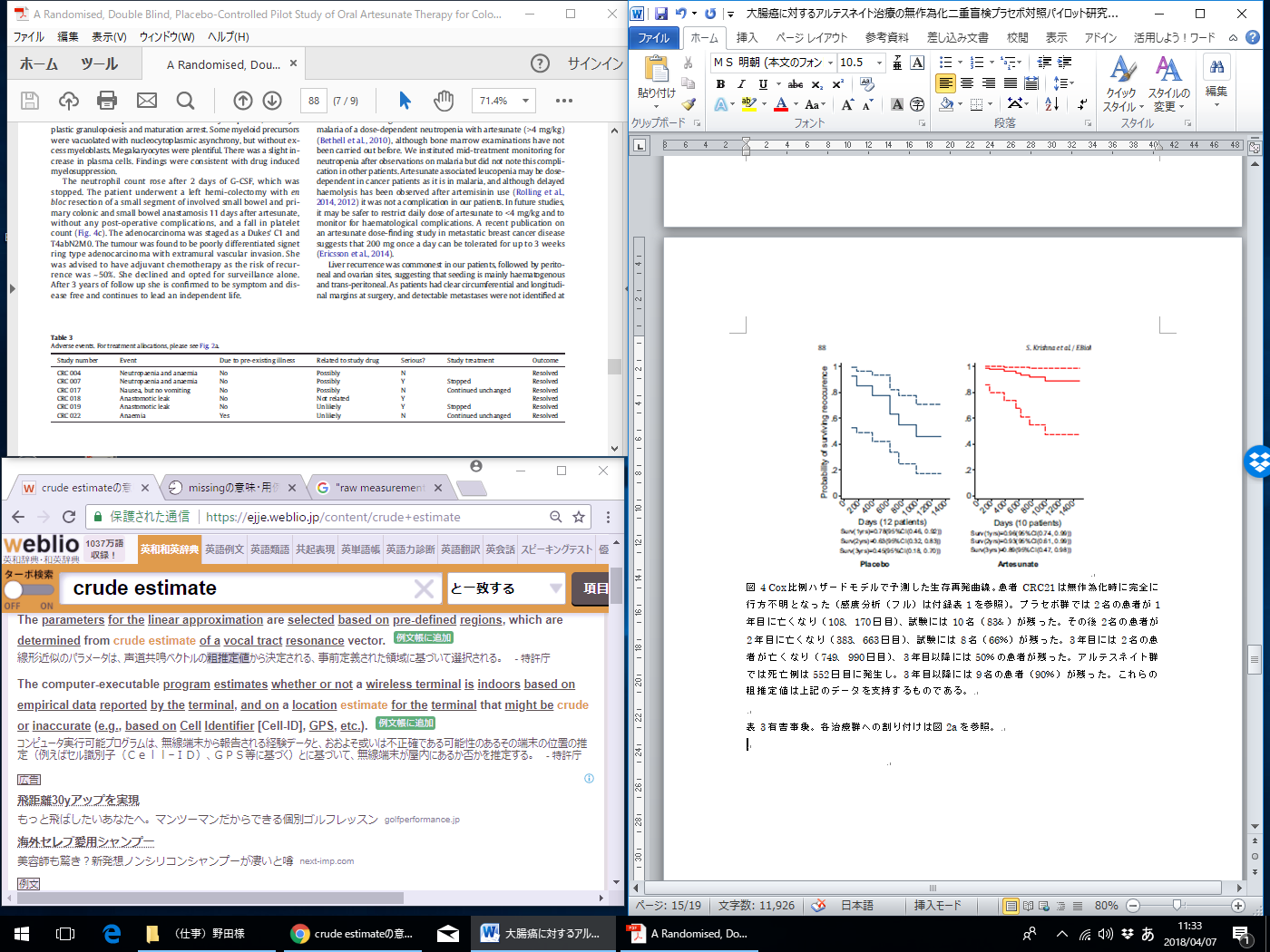


図4 Cox比例ハザードモデルで予測した生存再発曲線。患者CRC21は無作為化時に完全に行方不明となった（感度分析（フル）は付録表1を参照）。プラセボ群では2名の患者が1年目に亡くなり（108、170日目）、試験には10名（83＆）が残った。その後2名の患者が2年目に亡くなり（383、663日目）、試験には8名（66％）が残った。3年目には2名の患者が亡くなり（749、990日目）、3年目以降には50％の患者が残った。アルテスネイト群では死亡例は552日目に発生し、3年目以降には9名の患者（90％）が残った。これらの粗推定値は上記のデータを支持するものである。

表3有害事象。各治療群への割り付けは図2aを参照。



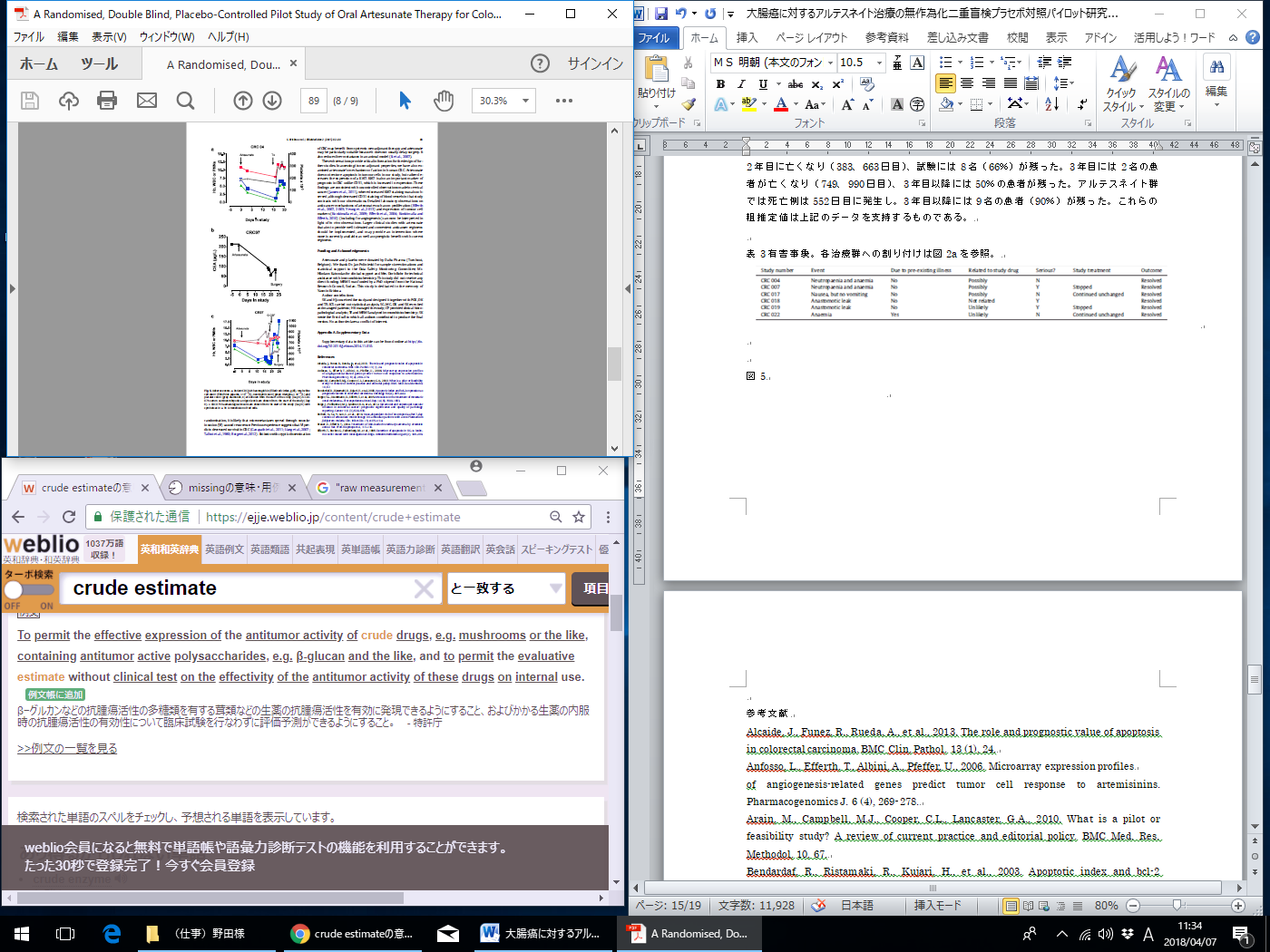


図5有害事象。a 患者CRC04のヘモグロビン（赤丸、g/dl）、総白血球数（緑四角、×10−9/L）、好中球数（緑三角、×10−9/L）、血小板数（灰色ひし形、x）を試験開始（0日目）から示す。b CRC07の血清癌胎児抗原レベルを試験開始（0日目）から示す。c　CRC07の血液検査結果をaと同様のシンボルで試験開始（0日目）から示す。Txは赤血球の輸血を示す。

**参考文献**

Alcaide, J., Funez, R., Rueda, A., et al., 2013. The role and prognostic value of apoptosis in colorectal carcinoma. BMC Clin. Pathol. 13 (1), 24.

Anfosso, L., Efferth, T., Albini, A., Pfeffer, U., 2006. Microarray expression profiles

of angiogenesis-related genes predict tumor cell response to artemisinins. Pharmacogenomics J. 6 (4), 269–278.

Arain, M., Campbell, M.J., Cooper, C.L., Lancaster, G.A., 2010. What is a pilot or feasibility study? A review of current practice and editorial policy. BMC Med. Res. Methodol. 10, 67.

Bendardaf, R., Ristamaki, R., Kujari, H., et al., 2003. Apoptotic index and bcl-2 expression as prognostic factors in colorectal carcinoma. Oncology 64 (4), 435–442.

Berger, T.G., Dieckmann, D., Efferth, T., et al., 2005. Artesunate in the treatment of metastatic uveal melanoma—first experiences. Oncol. Rep. 14 (6), 1599–1603.

Betge, J., Pollheimer, M.J., Lindtner, R.A., et al., 2012. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology

reporting. Cancer 118 (3), 628–638.

Bethell, D., Se, Y., Lon, C., et al., 2010. Dose-dependent risk of neutropenia after 7-day

courses of artesunate monotherapy in Cambodian patients with acute Plasmodium falciparum malaria. Clin. Infect. Dis. 15, e105–e114.

Breuer, E., Efferth, T., 2014. Treatment of iron-loaded veterinary sarcoma by Artemisia

annua. Nat. Prod. Bioprospect. 4, 113–118.

Efferth, T., Rucker, G., Falkenberg, M., et al., 1996. Detection of apoptosis in KG-1a leukemic cells treated with investigational drugs. Arzneimittelforschung 46 (2), 196–200.

Efferth, T., Dunstan, H., Sauerbrey, A., Miyachi, H., Chitambar, C.R., 2001. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. Int. J. Oncol. 18 (4), 767–773.

Efferth, T., Sauerbrey, A., Olbrich, A., et al., 2003. Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines. Mol. Pharmacol. 64 (2), 382–394.

Efferth, T., Ramirez, T., Gebhart, E., Halatsch, M.E., 2004. Combination treatment of glioblastoma multiforme cell lines with the anti-malarial artesunate and the epidermal

growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor OSI-774. Biochem. Pharmacol. 67 (9), 1689–1700.

Efferth, T., Giaisi, M., Merling, A., Krammer, P.H., Li-Weber, M., 2007. Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells. PLoS One 2 (8), e693.

Ericsson, T., Blank, A., von Hagens, C., Ashton, M., Abelo, A., 2014. Population pharmacokinetics of artesunate and dihydroartemisinin during long-term oral administration of

artesunate to patients with metastatic breast cancer. Eur. J. Clin. Pharmacol. 70, 1453–1463.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik,M., et al., 2012. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet], (accessed 11 July 2014).

Fiandalo,M.V., Kyprianou, N., 2012. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. Exp. Oncol. 34 (3), 165–175.

Ganapathi, S., Kumar, D., Katsoulas, N., et al., 2011. Colorectal cancer in the young: trends, characteristics and outcome. Int. J. Color. Dis. 26 (7), 927–934.

Gomes, M.F., Faiz,M.A., Gyapong, J.O., et al., 2009. Pre-referral rectal artesunate to prevent death and disability in severe malaria: a placebo-controlled trial. Lancet 373 (9663), 557–566.

Hien, T.T., Arnold, K., Vinh, H., et al., 1992. Comparison of artemisinin suppositories with intravenous artesunate and intravenous quinine in the treatment of cerebralmalaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 86, 582–583.

Hien, T.T., Arnold, K., Hung, N.G., et al., 1994. Single dose artemisinin–mefloquine treatment for acute uncomplicated malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88, 688–691.

Ikenaga, M., Takano, Y., Saegusa,M., et al., 1996. Apoptosis of colon cancers assessed by in situ DNA nick end-labeling method. Pathol. Int. 46 (1), 33–37.

Jansen, F.H., Adoubi, I., Comoe, J.C., et al., 2011. First study of oral artenimol-R in advanced cervical cancer: clinical benefit, tolerability and tumor markers. Anticancer Res. 31 (12), 4417–4422.

Jiang, J.B., Li, G.Q., Guo, X.B., Kong, Y.C., Arnold, K., 1982. Antimalarial activity of mefloquine and qinghaosu. Lancet ii, 285–288.

Konkimalla, V.B., Efferth, T., 2010. Inhibition of epidermal growth factor receptor overexpressing cancer cells by the aphorphine-type isoquinoline alkaloid, dicentrine. Biochem. Pharmacol. 79 (8), 1092–1099.

Konkimalla, V.B., McCubrey, J.A., Efferth, T., 2009. The role of downstreamsignaling pathways of the epidermal growth factor receptor for artesunate's activity in cancer cells. Curr. Cancer Drug Targets 9 (1), 72–80.

Kremsner, P.G., Krishna, S., 2004. Antimalarial combinations. Lancet 364, 285–294.

Kremsner, P.G., Taylor, T., Issifou, S., et al., 2012. A simplified intravenous artesunate regimen for severe malaria. J. Infect. Dis. 205 (2), 312–319.

Krishna, S., Bustamante, L., Haynes, R.K., Staines, H.M., 2008. Artemisinins: their growing importance in medicine. Trends Pharmacol. Sci. 29 (10), 520–527.

Li, L.N., Zhang, H.D., Yuan, S.J., Tian, Z.Y., Wang, L., Sun, Z.X., 2007. Artesunate attenuates the growth of human colorectal carcinoma and inhibits hyperactive Wnt/betacatenin pathway. Int. J. Cancer 121 (6), 1360–1365.

Liang, P., Nakada, I., Hong, J.W., et al., 2007. Prognostic significance of immunohistochemically detected blood and lymphatic vessel invasion in colorectal carcinoma: its impact on prognosis. Ann. Surg.Oncol. 14 (2), 470–477.

Nealon, C., Dzeing, A., Muller-Romer, U., et al., 2002. Intramuscular bioavailability and

clinical efficacy of artesunate in gabonese children with severe malaria. Antimicrob. Agents Chemother. 46 (12), 3933–3939.

Rolling, T., Schmiedel, S., Wichmann, D., Wittkopf, D., Burchard, G.D., Cramer, J.P., 2012. Post-treatment haemolysis in severe imported malaria after intravenous artesunate: case report of three patients with hyperparasitaemia. Malar. J. 11, 169.

Rolling, T., Agbenyega, T., Issifou, S., et al., 2014. Delayed hemolysis after treatment with parenteral artesunate in African children with severe malaria—a double-center prospective study. J. Infect. Dis. 209 (12), 1921–1928.

Rutteman, G.R., Erich, S.A., Mol, J.A., et al., 2013. Safety and efficacy field study of

artesunate for dogswith non-resectable tumours. Anticancer Res. 33 (5), 1819–1827.

Singh, N.P., Panwar, V.K., 2006. Case report of a pituitary macroadenoma treated with

artemether. Integr. Cancer Ther. 5 (4), 391–394.

Singh, N., Verma, K., 2002. Case report of a laryngeal squamous cell carcinoma treated

with artesunate. Arch. Oncol. 2002, 279–280.

Talbot, I.C., Ritchie, S., Leighton, M.H., Hughes, A.O., Bussey, H.J., Morson, B.C., 1980. The clinical significance of invasion of veins by rectal cancer. Br. J. Surg. 67 (6), 439–442.

Team RDC, 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <http://www>. R-project.org/ (accessed 12 July 2014).

Thomas, A., O' Hara, R., Ligges, U., Sturtz, S., 2006. Making BUGS open. R News 6 (1),

12–17.

UK CR, 2014. Bowel Cancer Statistics. http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/

cancerstats/types/bowel/ (accessed 11 July 2014).

Yamamoto, T., Igarashi, N., Kato, Y., Kobayashi, M., Kawakami, M., 1998. Apoptosis in

adenoma and early adenocarcinoma of the colon. Histol. Histopathol. 13 (3), 743–749.

Yeung, T.M., Buskens, C., Wang, L.M., Mortensen, N.J., Bodmer, W.F., 2013. Myofibroblast activation in colorectal cancer lymph node metastases. Br. J. Cancer 108 (10), 2106–2115.

Zhang, Z.Y., Yu, S.Q., Miao, L.Y., et al., 2008. Artesunate combined with vinorelbine

plus cisplatin in treatment of advanced non-small cell lung cancer: a randomized

controlled trial. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao 6 (2), 134–138.