

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6090836号
(P6090836)

(45) 発行日 平成29年3月8日(2017.3.8)

(24) 登録日 平成29年2月17日(2017.2.17)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 31/198 (2006.01)	A 6 1 K 31/198	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 31/513 (2006.01)	A 6 1 K 31/513	
請求項の数 13 (全 29 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-558030 (P2012-558030)	(73) 特許権者	513001606 E A ファーマ株式会社 東京都中央区入船二丁目1番1号
(86) (22) 出願日	平成24年2月17日(2012.2.17)	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(86) 国際出願番号	PCT/JP2012/053757	(74) 代理人	100125070 弁理士 土井 京子
(87) 国際公開番号	W02012/111790	(74) 代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宜
(87) 国際公開日	平成24年8月23日(2012.8.23)	(74) 代理人	100121212 弁理士 田村 弥栄子
審査請求日	平成27年2月17日(2015.2.17)	(74) 代理人	100163658 弁理士 小池 順造
(31) 優先権主張番号	特願2011-32511 (P2011-32511)	(74) 代理人	100174296 弁理士 當麻 博文
(32) 優先日	平成23年2月17日(2011.2.17)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2011-215605 (P2011-215605)		
(32) 優先日	平成23年9月29日(2011.9.29)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 化学療法剤の抗腫瘍活性増強剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

化学療法剤の抗腫瘍活性を増強する量のイソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含む、癌幹細胞を含む癌に対する、化学療法剤の抗腫瘍活性を増強するための剤であって、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩の遊離体換算重量比が、1 : 1.5 ~ 2.5 : 0.8 ~ 1.5 である、剤。

【請求項2】

癌幹細胞を含む癌に罹患している哺乳動物、または癌幹細胞を含む癌の罹患歴を有する哺乳動物に対して、化学療法剤と組み合わせて投与される、請求項1記載の剤。

【請求項3】

化学療法剤の抗腫瘍活性を増強する量のイソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩と、有効量の化学療法剤とを組み合わせる、癌幹細胞を含む癌を治療するための剤であって、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩の遊離体換算重量比が、1 : 1.5 ~ 2.5 : 0.8 ~ 1.5 である、剤。

【請求項4】

化学療法剤の抗腫瘍活性を増強する量のイソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩と、有効量の化学療法剤とを組み合わせる、癌幹細胞を含む癌の転移または再発を予防するための剤であって、イソロイシンまたはその塩、

ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩の遊離体換算重量比が、1 : 1.5 ~ 2.5 : 0.8 ~ 1.5である、剤。

【請求項5】

化学療法剤が、代謝拮抗剤、アルキル化剤、抗癌性抗生物質、植物アルカロイド、または分子標的治療剤である、請求項1~4のいずれか1項記載の剤。

【請求項6】

化学療法剤が5FUである、請求項1~5のいずれか1項記載の剤。

【請求項7】

癌幹細胞を含む癌が化学療法剤抵抗性の癌である、請求項1~6のいずれか1項記載の剤。

10

【請求項8】

癌幹細胞を含む癌が胃癌、肝癌、乳癌または大腸癌である、請求項1~7のいずれか1項記載の剤。

【請求項9】

(1) イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩、ならびに化学療法剤を同時に単回または複数回投与すること、

(2) 第一段階として、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を単回または複数回投与し、第二段階として化学療法剤を単回または複数回投与すること、

(3) 第一段階として、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を単回または複数回投与し、第二段階として、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩、ならびに化学療法剤を同時期に単回または複数回投与すること、または

20

(4) (2)または(3)の工程を複数回繰り返すことを特徴とする、請求項1~8のいずれか1項記載の剤。

【請求項10】

癌幹細胞の分化を誘導する量のイソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含む、癌幹細胞の分化を誘導するための剤であって、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩の遊離体換算重量比が、1 : 1.5 ~ 2.5 : 0.8 ~ 1.5である、剤。

30

【請求項11】

癌幹細胞が胃癌幹細胞、肝癌幹細胞または大腸癌幹細胞である、請求項10記載の剤。

【請求項12】

イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩の遊離体換算重量比が、1 : 1.9 ~ 2.2 : 1.1 ~ 1.3である、請求項1~11のいずれか1項記載の剤。

【請求項13】

イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩の遊離体換算重量比が、1 : 2 : 1.2である、請求項12項記載の剤。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、分岐鎖アミノ酸を含む、癌幹細胞を含む癌に対する化学療法剤の抗腫瘍活性を増強するための剤、分岐鎖アミノ酸を含む、癌幹細胞の分化を誘導するための剤、分岐鎖アミノ酸と化学療法剤を組み合わせる癌幹細胞を含む癌の転移・再発抑制または治療剤等に関する。

【背景技術】

【0002】

癌幹細胞は、腫瘍に含まれる癌細胞のサブポピュレーションの1つであり、自己複製能および多分化能を有しており、同所性の移入を行ったときに、癌惹起能力を有している（

50

非特許文献1)。

【0003】

種々の癌において、癌幹細胞に特異的に発現するマーカーの存在が知られており、これらのマーカーの発現に基づいて、癌細胞が癌幹細胞であるか否かを評価することができる。肝臓癌幹細胞のマーカーとしてはE p C A M、A F P等が知られている(非特許文献2)。大腸癌幹細胞のマーカーとしてはC D 4 4、C D 2 4等が知られている(非特許文献3)。乳癌幹細胞のマーカーとしては、C D 4 4、C D 2 4、E p C A M等が知られている(非特許文献1)。

【0004】

癌幹細胞は一般的に増殖のスピードが遅いため、化学療法剤に対して抵抗性を示す。これに対して、分化した癌細胞(癌非幹細胞)は、増殖のスピードが速いため、化学療法剤に対する感受性が高い。化学療法剤の多くは、癌細胞の増殖メカニズムを標的とするので、化学療法剤による治療では、癌非幹細胞だけを標的としており、癌幹細胞を効果的に殺傷できない可能性がある。そのため、化学療法剤による治療によって大部分の癌細胞が退縮しても、ごく少数の癌幹細胞が残っていれば、再発が起こり得ることになり、これが癌においてしばしば転移・再発が生じる原因だと考えられている。従って、癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を促進し、化学療法剤への感受性を高めることができれば、癌幹細胞を含む癌全体を効率的に治療または予防することができると期待されている。

【0005】

分岐鎖アミノ酸(BCAA)は、これまでに肝癌の発生や進展を抑制することが報告されている(特許文献1~4)。更に、分岐鎖アミノ酸の長期投与により、肝細胞癌の再発が抑制されることが報告されている(非特許文献4)。また、分岐鎖アミノ酸がAktの活性化を抑制することによって、高インスリン血症をしめすかまたは高インスリン血症の危険性のある患者における癌の発生や進展を抑制することが報告されている(特許文献5)。また、分岐鎖アミノ酸がIFN作用物質の抗C型肝炎ウイルス活性を増強することが報告されている(特許文献6)。

【0006】

しかしながら、分岐鎖アミノ酸の、癌幹細胞の癌非幹細胞への分化に対する効果については、これまで明らかにされていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】W02003/16208

【特許文献2】W02004/058243

【特許文献3】W02007/018278

【特許文献4】W02006/06729

【特許文献5】W02007/018281

【特許文献6】W02007/013677

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】PNAS, vol. 100, No. 7, pages 3983-3988, 2003

【非特許文献2】Cancer Research, vol. 65, No. 8, pages 1451-1461, 2008

【非特許文献3】PNAS, vol. 171, No. 8, pages 3722-3727, 2010

【非特許文献4】日消誌, vol. 105, pages 808-816, 2008

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を促進し、化学療法剤への感受性を高める技術を開発し、これに基づき、効果的に癌幹細胞を含む癌を治療し、癌の再発を予防する手段を提供することである。

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、特定のBCAAが癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を促進し、化学療法剤への感受性を高めることを見出し、本発明を完成した。

【0011】

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩を含む、癌幹細胞を含む癌に対する、化学療法剤の抗腫瘍活性を増強するための剤。

10

[2] 癌幹細胞を含む癌に罹患している哺乳動物、または癌幹細胞を含む癌の罹患歴を有する哺乳動物に対して、化学療法剤と組み合わせて投与される、[1]の剤。

[3] イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含む、[1]の剤。

[4] 化学療法剤が、代謝拮抗剤、アルキル化剤、抗癌性抗生物質、植物アルカロイド、または分子標的治療剤である、[1]の剤。

[5] 化学療法剤が5FUである、[1]の剤。

[6] 癌幹細胞を含む癌が化学療法剤抵抗性の癌である、[1]の剤。

[7] 癌幹細胞を含む癌が胃癌、肝癌、乳癌または大腸癌である、[1]の剤。

[8] イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩と、化学療法剤とを組み合わせる、癌幹細胞を含む癌を治療するための剤。

20

[9] イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含む、[8]の剤。

[10] 化学療法剤が、代謝拮抗剤、アルキル化剤、抗癌性抗生物質、植物アルカロイド、または分子標的治療剤である、[8]の剤。

[11] 化学療法剤が5FUである、[8]の剤。

[12] 癌幹細胞を含む癌が化学療法剤抵抗性の癌である、[8]の剤。

[13] 癌幹細胞を含む癌が胃癌、肝癌、乳癌または大腸癌である、[8]の剤。

[14] イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩と、化学療法剤とを組み合わせる、癌幹細胞を含む癌の転移または再発を予防するための剤。

30

[15] イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含む、[14]の剤。

[16] 化学療法剤が、代謝拮抗剤、アルキル化剤、抗癌性抗生物質、植物アルカロイド、または分子標的治療剤である、[14]の剤。

[17] 化学療法剤が5FUである、[14]の剤。

[18] 癌幹細胞を含む癌が化学療法剤抵抗性の癌である、[14]の剤。

[19] 癌幹細胞を含む癌が胃癌、肝癌、乳癌または大腸癌である、[14]の剤。

[20] イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩を含む、癌幹細胞の分化を誘導するための剤。

40

[21] イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含む、[20]の剤。

[22] 癌幹細胞が胃癌幹細胞、肝癌幹細胞または大腸癌幹細胞である、[20]の剤。

[23] イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩を含む、癌幹細胞を含む癌の転移を抑制するための剤。

[24] イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含む、[23]の剤。

[25] 癌幹細胞を含む癌が胃癌、肝癌、乳癌または大腸癌である、[23]の剤。

[26] 化学療法剤の抗腫瘍活性の増強において使用するための、イソロイシン、ロイシ

50

ンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩。

[27] 癌幹細胞を含む癌の治療において使用するための、イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩、及び化学療法剤を含む組み合わせ物。

[28] 癌幹細胞を含む癌の転移または再発の予防において使用するための、イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩、及び化学療法剤を含む組み合わせ物。

[29] 癌幹細胞の分化誘導において使用するための、イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩。

[30] 癌幹細胞を含む癌の転移の抑制において使用するための、イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩。

10

[31] イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを含む、当該哺乳動物における化学療法剤の抗腫瘍活性増強方法。

[32] イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩、及び化学療法剤の有効量を哺乳動物に投与することを含む、該哺乳動物における癌幹細胞を含む癌の治療方法。

[33] イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩、及び化学療法剤の有効量を哺乳動物に投与することを含む、該哺乳動物における癌幹細胞を含む癌の転移または再発の予防方法。

20

[34] イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを含む、該哺乳動物における癌幹細胞の分化誘導方法。

[35] イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを含む、該哺乳動物における癌幹細胞を含む癌の転移の抑制方法。

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

分岐鎖アミノ酸は、癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を促進し、化学療法剤への感受性を高めるので、これを化学療法剤と組み合わせて、癌幹細胞を含む癌に罹患している患者に投与することにより、効果的に癌を治療することが可能である。

30

また、分岐鎖アミノ酸を化学療法剤と組み合わせて、癌幹細胞を含む癌の罹患歴がある患者に投与することにより、効果的に癌の転移や再発を予防することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【図1】 H A K 4 細胞における E p C A M 1、A F P および C Y P 3 A 4 の m R N A 発現に対する B C A A の効果を示す。縦軸は、L C 2 . 5 % 処理時における発現を 1 とした場合の各遺伝子の相対的な m R N A 発現量を示す。T-test, n=6, *p<0.05, 平均値 + S E。

【図2】 5 F U と B C A A の併用による H A K 4 細胞のアポトーシス誘導を示す。縦軸は Annexin V 陽性細胞のパーセンテージを示す。T-test, n=7, *p<0.05, 平均値 + S E。

40

【図3】 H A K 1 B 細胞における E p C A M 1、A F P および C Y P 3 A 4 の m R N A 発現に対する B C A A の効果を示す。縦軸は、L C 2 . 5 % 処理時における発現を 1 とした場合の各遺伝子の相対的な m R N A 発現量を示す。T-test, n=6, *p<0.05, 平均値 + S E。

【図4】 H A K 1 B 細胞を移植した B a l b / c ノードマウスにおける腫瘍体積の経時的変化を示す。1 群 : v e h i c l e + カゼイン混餌食 (コントロール群)、2 群 : 5 F U + カゼイン混餌食、3 群 : v e h i c l e + B C A A 混餌食、4 群 : 5 F U + B C A A 混餌食。

【図5】 15 日目における、腫瘍体積を示す。Dunnet test, n=6, *p<0.05, ***p<0.001, 平均値 + S E。

50

【図6】15日目における、腫瘍重量を示す。Dunnet test, n=6, *p<0.05, ***p<0.001, 平均値 + S E。

【図7】HCT116細胞のCD44発現に対するBCAAの効果を示す。縦軸は、CD44陽性細胞のパーセンテージを示す。T-test, n=7, *p<0.05, 平均値 + S E。

【図8】5FUとBCAAの併用によるHCT116細胞のアポトーシス誘導を示す。縦軸はAnnexin V陽性細胞のパーセンテージを示す。T-test, n=14, *p<0.05, 平均値 + S E。

【図9】HCT116細胞の肝臓転移に対するBCAAの効果を示す。縦軸は、マウス1匹あたりの肝臓転移数を示す。

【図10】5FUとBCAAの併用によるMKN45細胞の細胞死誘導を示す。縦軸はOD450nmの相対値を示す。T-test, *p<0.05, n=8。

【図11】5FUとBCAAの併用によるMKN45細胞のアポトーシス誘導を示す。縦軸はアポトーシス細胞のパーセンテージを示す。T-test, *p<0.05, n=8。

【図12】MKN45細胞のCD44発現に対するBCAAの効果を示す。縦軸は、CD44陽性細胞のパーセンテージを示す。T-test, *p<0.01, n=8。

【図13】6週間後における、腫瘍体積を示す。Dunnet test, n=6, **p<0.01, 平均値 + S E。

【図14】5FUとBCAAの併用によるMDA-MB231細胞の増殖抑制を示す。Student test vs 5FU, ***p<0.001, 平均値 + S E。

【図15】MDA-MB231細胞のCD44発現に対するBCAAの効果を示す。縦軸は、CD44陽性細胞のパーセンテージを示す。Student test vs RPMI-10%, 平均値 + S E。

【図16】インビボにおける、BCAAのHAK1B細胞のEpCAM mRNA発現に対する効果を示す。T-test, n=6, *p<0.05。

【図17】インビボにおける、BCAAのMKN45細胞のCD44、nanog、及びABC5のmRNA発現に対する効果を示す。Dunnet test, n=8, *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.005 v.s. control。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は、イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩）を含む、癌幹細胞を含む癌に対する、化学療法剤の抗腫瘍活性を増強するための剤（または組成物）および/または癌幹細胞の分化を誘導するための剤（または組成物）（以下、これらの製剤を本発明の剤または組成物とも称する）を提供するものである。

【0015】

更なる態様において、本発明の剤（または組成物）は、癌幹細胞を含む癌の転移を抑制するための剤（または組成物）であり得る。

【0016】

本発明の剤または組成物は、イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含む組み合わせ）が、癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を促進し、この効果により癌幹細胞を含む癌に対する化学療法剤の抗腫瘍活性を増強することを見出したことに基づき完成したものである。一般に、癌幹細胞は増殖のスピードが遅いために、化学療法剤に対して抵抗性を示す。これに対して、分化した癌細胞（癌非幹細胞）は、一般に増殖のスピードが速いために、化学療法剤に対する感受性が高い。従って、イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含む組み合わせ）を、癌幹細胞を含む癌に適用し、癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を促進することにより、当該癌の化学療法剤に対する感受性

10

20

30

40

50

が高まり、その結果、当該癌に対する化学療法剤の抗腫瘍活性が増強される。

【0017】

更なる態様において、本発明の剤または組成物は、イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含む組み合わせ）が、癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を促進し、この効果により癌幹細胞を含む癌の転移能を抑制することを見出したことに基づき完成したものである。

【0018】

本発明において、癌幹細胞とは、自己複製能および多分化能を有しており、同所性の移入を行ったときに、腫瘍惹起能力を有している（ここで形成される腫瘍は、癌幹細胞が由来する起源の腫瘍のフェノコピーである）癌細胞をいう（*Nat Rev Cancer*, vol.5, pages 425-436, 2006）。

【0019】

種々の癌において、癌幹細胞に特異的に発現するマーカーの存在が知られているので、これらのマーカーの発現に基づいて、癌細胞が癌幹細胞であるか否か、あるいは癌に癌幹細胞が含まれるかを評価することができる。一態様において、肝臓癌幹細胞は E p C A M⁺ A F P⁺ である（*Cancer Research*, vol. 65, No. 8, pages 1451-1461, 2008）。一態様において、大腸癌幹細胞は C D 4 4⁺ C D 2 4⁺ である（*PNAS*, vol. 171, No. 8, pages 3722-3727, 2010）。一態様において、乳癌幹細胞は C D 4 4⁺ C D 2 4^{low} E p C A M⁺ である（*PNAS*, vol. 100, No. 7, pages 3982-3988, 2003）。一態様において、膵臓癌幹細胞は C D 4 4⁺ である。ここで、これらのマーカーの発現は、これらのマーカータンパク質に対する特異的抗体を用いたフローサイトメトリーまたは免疫組織学的染色によって評価し、少なくともいずれか一方の方法によって特異的染色が認められた場合に当該マーカー発現陽性（+）と決定する。フローサイトメトリーまたは免疫組織学的染色に有用なこれらのマーカータンパク質に対する特異的抗体は広く市販されているので、当業者であればこれらの抗体を用いて容易に癌細胞が癌幹細胞であるか否か、あるいは癌に癌幹細胞が含まれるかを評価することができる。

【0020】

更なる態様において、胃癌幹細胞は C D 4 4⁺ である。

【0021】

また、これらの癌幹細胞のマーカー発現の減少を指標に、癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を評価することができる。特定条件下での処理前と比較して当該処理後に癌における癌幹細胞のマーカーの発現が減少した場合、当該処理により癌幹細胞の癌非幹細胞への分化が誘導されたとすることができる。ここで、癌細胞全体における癌幹細胞のマーカータンパク質を発現している細胞数の比率、または癌全体における癌幹細胞のマーカータンパク質量のいずれか一方が減少した場合に、癌幹細胞のマーカーの発現が減少したと判断される。

【0022】

本発明において、癌にはあらゆる組織由来の癌が包含される。癌としては、例えば、肝癌、大腸癌、腎臓癌、黒色腫、膵癌、甲状腺癌、胃癌、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌）、脳腫瘍、子宮癌、乳癌、多発性骨肉腫、卵巣癌、慢性白血病、前立腺癌、急性リンパ性白血病、胚細胞腫、急性骨髄性白血病、悪性リンパ腫、織毛癌、小児悪性腫瘍、胆嚢・胆管癌等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0023】

一態様において、本発明の剤が適用される、癌幹細胞を含む癌は、化学療法剤抵抗性である。「化学療法剤抵抗性」とは、ヒトへの適用が認められている最大用量の化学療法剤の投与時において、有意に検出可能な応答を示さない性質をいう。上述のように、癌幹細胞は増殖のスピードが遅いため、化学療法剤に対して抵抗性を示すため、化学療法剤抵抗性の癌には、多くの癌幹細胞が含まれている可能性がある。そこで、特定の化学療法剤に抵抗性を有する癌に対して、本発明の剤または組成物を適用することにより、癌幹細胞

10

20

30

40

50

から癌非幹細胞への分化が促進され、癌の当該化学療法剤に対する感受性が高くなることが期待される。

【0024】

上述の癌のうち、肝癌、大腸癌、腎臓癌、黒色腫、膵癌、甲状腺癌、胃癌、肺癌、乳癌および非小細胞肺癌は、一般的に化学療法剤に対する感受性が低く、化学療法剤が効きにくいことが知られている。従って、本発明の剤または組成物をこれらの癌（好ましくは胃癌、肝癌、乳癌または大腸癌）に適用し、これらの癌に含まれる癌幹細胞の分化を促進することにより、これらの癌の化学療法剤への感受性が高くなることが期待される。

【0025】

本発明において、化学療法剤とは、癌細胞に直接作用し、その分裂を抑制し、殺傷する能力を有する化合物をいう。化学療法剤としては、代謝拮抗剤、白金製剤、アルキル化剤、抗癌性抗生物質、植物アルカロイド、分子標的治療剤等を挙げることができる。

10

【0026】

代謝拮抗剤とは、癌細胞が分裂・増殖する際に、核酸の材料となる物質と化学的構造が近似している物質でDNAの合成を妨げ、癌細胞の代謝を阻害して、増殖を抑制する化学療法剤をいう。代謝拮抗剤としては、5-フルオロウラシル(5FU)、テガフル、カルモフル、ドキシフルリジン、プロクスウリジン、シタラピン、エノシタピン、ヒドロキシフルリジン、ヒドロキシカルバミド、メトトレキサート、リン酸フルダラピン等のピリミジン代謝拮抗剤；6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、チオイノシン、塩酸ゲムシタピン等のプリン代謝拮抗剤等が挙げられる。一態様において、代謝拮抗剤は好ましくはピリミジン代謝拮抗剤であり、より好ましくは5-フルオロウラシルまたはテガフルである。

20

【0027】

白金製剤とは、DNAの構成塩基であるグアニン、アデニンのN-7位に、2つの塩素原子部位で結合し、DNA鎖内に架橋を形成し、DNA合成を阻害することによって癌細胞の増殖を抑制する効果を発揮する化学療法剤をいう。白金製剤としては、シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン等が挙げられる。

【0028】

アルキル化剤とは、DNAをアルキル化することにより切断して癌細胞の増殖を抑制する効果を発揮する化学療法剤をいう。アルキル化剤としては、ナイトロジェンマスタード、ナイトロジェンマスタードN-オキシド、クロラムブシル等のナイトロジェンマスタード系アルキル化剤；カルボコン、チオテパ等のエチレンイミン誘導体；プスルファン、トシル酸インプロスルファン等のスルホン酸エステル類；塩酸ニムスチン等のニトロソレア誘導体等が挙げられる。

30

【0029】

抗癌性抗生物質としては、マイトマイシンC、ブレオマイシン、ペプロマイシン、ダウノルピシン、アクラルピシン、ドキシソルピシン、ピラルピシン、THP-アドリアマイシン、4'-エピドキシソルピシン、エピルピシン等のアントラサイクリン系抗生物質抗腫瘍剤；クロモマイシンA₃、アクチノマイシンD等が挙げられる。

【0030】

植物アルカロイドとしては、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン等のピンカアルカロイド類；エトポシド、テニポシド等のエピポドフィロトキシン類；パクリタキセル、ドタキセル等のタキサン系アルカロイド等が挙げられる。

40

【0031】

分子標的治療剤とは、癌細胞の増殖に関わる分子を標的にして、その分子を阻害することにより癌細胞を殺傷する活性を有する化合物をいう。分子標的治療剤としては、イマチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、パンデタニブ、スニチニブ、ソラフェニブ、リツキシマブ、セツキシマブ、インフリキシマブ、トラスツズマブ、ベバシツマブ等を挙げることができる。

【0032】

50

一態様において、本発明の剤または組成物は、肝臓癌幹細胞を含む肝臓癌に対する、代謝拮抗剤（好ましくはピリミジン代謝拮抗剤、より好ましくは5-フルオロウラシルまたはテガフル）の抗腫瘍活性を増強するためのものである。

【0033】

一態様において、本発明の剤または組成物は、大腸癌幹細胞を含む大腸癌に対する、代謝拮抗剤（好ましくはピリミジン代謝拮抗剤、より好ましくは5-フルオロウラシルまたはテガフル）の抗腫瘍活性を増強するためのものである。

【0034】

一態様において、本発明の剤または組成物は、胃癌幹細胞を含む胃癌、結腸癌幹細胞を含む結腸癌、子宮頸癌幹細胞を含む子宮頸癌、子宮体癌幹細胞を含む子宮体癌、消化器癌幹細胞を含む消化器癌、膵癌幹細胞を含む膵癌、直腸癌幹細胞を含む直腸癌、乳癌幹細胞を含む乳癌、又は卵巣癌幹細胞を含む卵巣癌に対する、代謝拮抗剤（好ましくはピリミジン代謝拮抗剤、より好ましくは5-フルオロウラシルまたはテガフル）の抗腫瘍活性を増強するためのものである。

10

【0035】

本発明の剤または組成物における有効成分（分岐鎖アミノ酸）である、イソロイシン、ロイシンおよびバリンはそれぞれL-体、D-体、DL-体いずれも使用可能であるが、好ましくはL-体、DL-体であり、さらに好ましくはL-体である。

【0036】

イソロイシン、ロイシンおよびバリンは、それぞれ、遊離体のみならず、塩の形態でも使用することができる。塩の形態としては、酸付加塩や塩基付加塩等を挙げることができるが、化学的に許容されうる塩であればいずれの形態を採ることもできる。本発明の剤または組成物が通常は医療目的で用いられる観点から、塩の形態としては、医薬として許容される塩が好ましい。

20

【0037】

医薬として許容される塩としては、例えば酸との塩、塩基との塩が挙げられる。イソロイシン、ロイシンまたはバリンにそれぞれ付加して医薬として許容される塩を形成する酸としては、例えば、塩化水素、臭化水素酸、硫酸、リン酸等の無機酸や、酢酸、乳酸、クエン酸、酒石酸、マレイン酸、フマル酸またはモノメチル硫酸等の有機酸が挙げられる。イソロイシン、ロイシン、またはバリンにそれぞれ付加して医薬として許容される塩を形成する塩基としては、例えば、ナトリウム、カリウムなどの金属の水酸化物や、カルシウム等の金属の炭酸化物、アンモニア等の無機塩基、エチレンジアミン、プロピレンジアミン、エタノールアミン、モノアルキルエタノールアミン、ジアルキルエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン等の有機塩基が挙げられる。

30

【0038】

本発明の剤または組成物は、イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはそれらの塩が含有されていれば良く、以下の態様が発明に包含される：

イソロイシンまたはその塩のみを分岐鎖アミノ酸として含有する態様；

ロイシンまたはその塩のみを分岐鎖アミノ酸として含有する態様；

バリンまたはその塩のみを分岐鎖アミノ酸として含有する態様；

イソロイシンまたはその塩およびロイシンまたはその塩を分岐鎖アミノ酸として含有する態様；

40

イソロイシンまたはその塩およびバリンまたはその塩を分岐鎖アミノ酸として含有する態様；

ロイシンまたはその塩およびバリンまたはその塩を分岐鎖アミノ酸として含有する態様；
並びに

イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を分岐鎖アミノ酸として含有する態様。

本発明の剤または組成物は、好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたは

50

その塩、およびバリンまたはその塩を含有する。

【0039】

本発明の剤または組成物に含まれる分岐鎖アミノ酸の配合比（重量比）は、当業者であれば、本発明の剤が所望の活性（例えば、癌幹細胞の分化を誘導する活性、或いは癌幹細胞を含む癌に対する、化学療法剤の抗腫瘍活性を増強する活性）を有する範囲で、適宜調整することが可能であるが、例えばイソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含有する態様においては、かかる3種のアミノ酸の配合比（イソロイシン：ロイシン：バリン）は、重量比として、通常1：1～3：0.5～2.0であり、好ましくは1：1.5～2.5：0.8～1.5であり、より好ましくは1：1.9～2.2：1.1～1.3であり、最も好ましくは1：2：1.2である。尚、本発明の剤が、イソロイシンの塩、ロイシンの塩、またはバリンの塩を含有する場合、重量比の計算は、各分岐鎖アミノ酸の塩を、全て遊離体に換算した上で行うものとする。

10

【0040】

本発明の剤および組成物は、動物（好ましくは、ヒト等の哺乳動物）に投与することができる。

【0041】

本発明の剤または組成物を、癌幹細胞を含む癌に対する、化学療法剤の抗腫瘍活性を増強するための剤（または組成物）、或いは癌幹細胞の分化を誘導するための剤（または組成物）として使用する場合、その投与形態・剤型は、経口投与、非経口投与のいずれでもよく、経口投与剤としては、散剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤、チュアブル剤などの固形剤、溶液剤、シロップ剤などの液剤が、また、非経口投与剤としては、注射剤、輸液剤、経鼻・経肺用スプレー剤などが挙げられる。本発明の剤または組成物は、通常の方法によって、これらの剤型の医薬に製剤化することができる。

20

【0042】

患者への負担を軽減する観点からは、分岐鎖アミノ酸は対象者に対して経口投与することが好ましい。一方、経口投与が困難な患者に対しては、分岐鎖アミノ酸をアミノ酸輸液として経静脈・動脈投与することができる。

【0043】

また、本発明の剤は、製剤上の必要に応じて、適宜の薬学的に許容される担体、例えば、賦形剤、結合剤、滑沢剤、溶剤、崩壊剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、等張化剤、安定化剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤、矯味矯臭剤、着色剤などを配合して製剤化される。さらに本発明の組成物は、上記担体と共に調製することができる。

30

【0044】

賦形剤としては、乳糖、ブドウ糖、D-マンニトールなどの糖類、でんぷん類、結晶セルロースなどのセルロース類などの有機系賦形剤、炭酸カルシウム、カオリンなどの無機系賦形剤などが、結合剤としては、化デンプン、ゼラチン、アラビアゴム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、結晶セルロース、D-マンニトール、トレハロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールなどが、滑沢剤としては、ステアリン酸、ステアリン酸塩などの脂肪酸塩、タルク、珪酸塩類などが、溶剤としては、精製水、生理的食塩水などが、崩壊剤としては、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、化学修飾されたセルロースやデンプン類などが、溶解補助剤としては、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、トレハロース、安息香酸ベンジル、エタノール、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなどが、懸濁化剤あるいは乳化剤としては、ラウリル硫酸ナトリウム、アラビアゴム、ゼラチン、レシチン、モノステアリン酸グリセリン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース類、ポリソルベート類、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などが、等張化剤としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン、尿素などが、安定化剤としては、ポリエチレングリコール、デキストラン硫酸ナトリウム、その他のアミノ酸類などが、無痛化剤としては、ブ

40

50

ドウ糖、グルコン酸カルシウム、塩酸プロカインなどが、防腐剤としては、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが、抗酸化剤としては、亜硫酸塩、アスコルビン酸などが、矯味矯臭剤としては、医薬および食品分野において通常に使用される甘味料、香料などが、着色剤としては、医薬および食品分野において通常に使用される着色料が挙げられる。

【0045】

本発明の剤または組成物における有効成分がアミノ酸であり、安全性に優れているため、一態様において、本発明の剤または組成物は飲食品として提供することが可能である。本発明の剤または組成物を飲食品として提供する場合には、特に困難はなく、例えば、有効成分である分岐鎖アミノ酸（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩）を、ジュース、牛乳、菓子、ゼリー等の飲食品と混合することにより調製することができる。ビタミン類や他のサプリメント類を添加してもよい。得られた飲食品は保健機能食品として提供することも可能である。

10

【0046】

保健機能食品とは、身体の生理学的機能や生物学的活動に影響を与える保健機能成分を含み、食生活において特定の保健の目的で摂取をするものに対し、その摂取により当該保健の目的が期待できる食品である。

【0047】

保健機能食品は、場合によっては機能性食品、健康食品（栄養サプリメントを含む）などと称されることもある。機能性食品とは食品中に含まれる生体調節成分の機能を生かして作られる食品であり、健康食品とは一般的には健康増進に役立つとされている食品群のことをいう。その中には特定の栄養素を主成分にした栄養サプリメントも含まれる。

20

【0048】

保健機能食品には、特定保健用食品および栄養機能食品を含み、化学療法剤の投与を受けている、癌幹細胞を含む癌に罹患している患者、または癌幹細胞を含む癌に罹患歴を有する患者における日常の栄養補助食品として摂取させることによって、癌の当該化学療法剤に対する感受性を高めることができる。

【0049】

このような保健機能食品には、癌幹細胞を含む癌に対する化学療法剤の抗腫瘍活性を増強するために用いるものであることの表示を付すことができる。

30

【0050】

本発明の剤または組成物に含まれる分岐鎖アミノ酸（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩）の含有量は、製剤の形態等によって相違するが、通常、製剤全体に対して通常1～100重量%、好ましくは10～100重量%、より好ましくは30～100重量%、更に好ましくは50～100重量%である。

【0051】

本発明の剤および組成物の好適な例としては、イソロイシン、ロイシンおよびバリンを、1：2：1.2（イソロイシン：0.952g、ロイシン：1.904g、バリン：1.144g）の重量比で含有する分岐鎖アミノ酸製剤リーバクト（登録商標）顆粒（味の素株式会社）（経口投与剤）を挙げることができる。

40

【0052】

また、好適な非経口投与剤としては、高濃度アミノ酸輸液類のアミニック（（登録商標）点滴静注（味の素製薬株式会社））、モリヘパミン（（登録商標）点滴静注（味の素製薬株式会社））を挙げることができる。

【0053】

本発明の剤または組成物の投与量は、対象患者の年齢・体重・病態、投与方法などによっても異なるが、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含有する態様においては、一般の成人の場合、通常1日量として、イソロイシン0.5～30.0g、ロイシン1.0～60.0g、バリン0.5～30.0gを目安

50

とする。好ましくは、一日量として、イソロイシン2.0～10.0g、ロイシン3.0～20.0g、バリン2.0～10.0g、より好ましくは、イソロイシン2.5～3.5g、ロイシン5.0～7.0g、バリン3.0～4.0gであり、3種の分岐鎖アミノ酸の全体量としては1日当たり2.0g～50.0g程度が好ましく、これを必要に応じて1～6回、好ましくは1～3回に分割して投与する。尚、本発明の剤または組成物が、分岐鎖アミノ酸の塩を含有する場合、投与量の計算は、各分岐鎖アミノ酸の塩を、全て遊離体に換算した上で行うものとする。

【0054】

上記本発明で使用する有効成分である分岐鎖アミノ酸の投与量（摂取量）について算出する際、本発明で目的とする疾患の治療、予防等の目的で使用される薬剤の有効成分として前記の算定範囲が決められているので、これとは別目的で、例えば通常の食生活の必要から、あるいは別の疾患の治療目的で、摂取または投与される分岐鎖アミノ酸についてはこれを前記算定に含める必要はない。例えば、通常の食生活から摂取される一日あたりの分岐鎖アミノ酸の量を前記本発明における有効成分の一日あたりの投与量から控除して算定する必要はない。

10

【0055】

本発明の剤が、イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる二種または三種の分岐鎖アミノ酸またはその塩を含む態様である場合、本発明の有効成分であるイソロイシン、ロイシンおよびバリンまたはそれらの塩は、それぞれが単独で、若しくは任意の組み合わせで製剤に含有されていてもよく、または全てが1種の製剤中に含有されていてもよい。別途製剤化して投与する場合、それらの投与経路、投与剤形は同一であっても、異なってもよく、また各々を投与するタイミングも、同時であっても別々であってもよい。併用する薬剤の種類や効果によって適宜決定する。即ち、本発明の剤は、複数の分岐鎖アミノ酸またはそれらの塩を同時に含有する製剤であってもよく、又、それぞれを別途製剤化して併用するような併用剤であってもよい。これらの形態全てを包含するものである。特に、同一製剤中に全ての分岐鎖アミノ酸またはそれらの塩を含有する態様（例えば、同一製剤中に、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含有する態様）が、簡便に投与できて好ましい。

20

【0056】

本発明において、「重量比」とは、本発明の剤および組成物中のそれぞれのアミノ酸成分の重量の比を示す。例えば、イソロイシン、ロイシンおよびバリンの各有効成分を1つの製剤中に含めた場合には個々の含有量の比であり、各有効成分のそれぞれを単独でまたは任意の組み合わせで複数製剤中に含めた場合には、各製剤に含められる各有効成分の重量の比である。

30

【0057】

また本発明において、実際の投与量の比は、投与対象（即ち患者）あたりの各有効成分1回投与量あるいは1日投与量の比である。例えば、イソロイシン、ロイシンおよびバリンの各有効成分を1つの製剤中に含め、それを投与対象に投与する場合には、重量比が投与量比に相当する。各有効成分を単独でまたは任意の組み合わせで複数の製剤中に含めて投与する場合には、1回あるいは1日投与した各製剤中の各有効成分の合計量の比が重量比に相当する。

40

【0058】

イソロイシン、ロイシン、およびバリンは既に、医薬・食品分野において広く用いられていて、安全性は確立しており、例えば、これらの分岐鎖アミノ酸を1:2:1.2の比で含有する本発明の剤および組成物における急性毒性（LD50）は、マウスの経口投与において10g/Kg以上である。

【0059】

上述の通り、イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含む組み合わせ）が、癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を

50

促進し、この効果により癌幹細胞を含む癌に対する、化学療法剤の抗腫瘍活性を増強する。従って、一態様において、本発明の剤または組成物は、癌幹細胞を含む癌を罹患している哺乳動物（例、ヒト）に対して投与される。該哺乳動物が保持している癌に含まれる癌幹細胞に、イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含む組み合わせ）が作用することにより、癌幹細胞の癌非幹細胞への分化が促進され、該癌に対する化学療法剤の抗腫瘍活性が増強される。

【0060】

更なる態様において、イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含む組み合わせ）が、癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を促進し、CD44等の癌の転移に関与する接着分子の発現を抑制し、この効果により癌幹細胞を含む癌の転移能が抑制される。従って、一態様において、本発明の剤または組成物は、癌幹細胞を含む癌を罹患している哺乳動物（例、ヒト）に対して投与される。該哺乳動物が保持している癌に含まれる癌幹細胞に、イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含む組み合わせ）が作用することにより、癌幹細胞の癌非幹細胞への分化が促進され、化学療法剤の併用を要することなく、該癌の転移が抑制される。

【0061】

別の態様において、本発明の剤または組成物は、癌幹細胞を含む癌の罹患歴を有する哺乳動物（例、ヒト）に対して投与される。癌幹細胞は、一般に細胞増殖がおそく、化学療法剤に対して抵抗性であるため、いったん癌幹細胞を含む癌を発症した場合、化学療法剤等による治療の結果、見かけ上は癌が寛解し、癌の症状が消失した場合であっても、体内に癌幹細胞が残存していて、これが癌の転移や再発の原因となっていると考えられている。癌の再発とは、治療により癌の症状が完全にまたは一部寛解した後に、再び癌細胞が増殖し、癌の症状が再び現れるかまたは悪化することを意味する。従って、本発明の剤または組成物を、癌幹細胞を含む癌の罹患歴を有する哺乳動物（例、ヒト）に対して投与することにより、その哺乳動物の体内に残存している可能性がある癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を促進し、化学療法剤に対する感受性を増強する。

【0062】

従って、好ましい態様において、本発明の剤または組成物は、化学療法剤と組み合わせ、哺乳動物に投与される。本発明の剤または組成物を、化学療法剤と組み合わせ、癌幹細胞を含む癌を罹患している哺乳動物に投与することにより、該癌を効率的に治療することができる。また、本発明の剤または組成物を、化学療法剤と組み合わせ、癌幹細胞を含む癌の罹患歴を有する哺乳動物に投与することにより、該癌の転移や再発を効率的に予防することができる。

【0063】

従って、本発明は、イソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩）（以下これらを単に分岐鎖アミノ酸と呼ぶことがある）と、化学療法剤とを組み合わせる、癌幹細胞を含む癌を治療するための剤（または組成物）および/または癌幹細胞を含む癌の転移または再発を予防するための剤（または組成物）（以下、これらの製剤を本発明の予防または治療剤とも称する）をも提供するものである。

【0064】

本発明の予防または治療剤に係る各用語の定義は、特に断りのない限り、上述の本発明の剤または組成物に係る各用語の定義と同一である。

【0065】

本発明の予防または治療剤を適用することが可能な癌は、上記本発明の剤または組成物

10

20

30

40

50

が適用可能な癌と同一である。一態様において、本発明の剤が適用される、癌幹細胞を含む癌は、化学療法剤抵抗性である。

【0066】

癌のうち、肝癌、大腸癌、腎臓癌、黒色腫、膵癌、甲状腺癌、胃癌、肺癌、乳癌および非小細胞肺癌は、一般的に化学療法剤に対する感受性が低く、化学療法剤が効きにくいことが知られている。従って、本発明の予防または治療剤をこれらの癌（好ましくは胃癌、肝癌、乳癌または大腸癌）に適用すると、本発明の予防または治療剤に含まれる分岐鎖アミノ酸（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩）が癌に含まれる癌幹細胞の分化を促進し、これらの癌の化学療法剤への感受性が高くなり、そこへ本発明の予防または治療剤に含まれる化学療法剤が作用することにより、結果的に癌幹細胞の効果的な殺傷が期待される。

10

【0067】

一態様において、本発明の予防または治療剤は、化学療法剤として代謝拮抗剤（好ましくはピリミジン代謝拮抗剤、より好ましくは5-フルオロウラシルまたはテガフル）を含み、肝臓癌幹細胞を含む肝臓癌を予防または治療するためのものである。

【0068】

一態様において、本発明の予防または治療剤は、化学療法剤として代謝拮抗剤（好ましくはピリミジン代謝拮抗剤、より好ましくは5-フルオロウラシルまたはテガフル）を含み、大腸癌幹細胞を含む大腸癌を予防または治療するためのものである。

20

【0069】

更なる態様において、本発明の予防または治療剤は、化学療法剤として代謝拮抗剤（好ましくはピリミジン代謝拮抗剤、より好ましくは5-フルオロウラシルまたはテガフル）を含み、胃癌幹細胞を含む胃癌を予防または治療するためのものである。

【0070】

一態様において、本発明の予防または治療剤は、化学療法剤として代謝拮抗剤（好ましくはピリミジン代謝拮抗剤、より好ましくは5-フルオロウラシルまたはテガフル）を含み、胃癌幹細胞を含む胃癌、結腸癌幹細胞を含む結腸癌、子宮頸癌幹細胞を含む子宮頸癌、子宮体癌幹細胞を含む子宮体癌、消化器癌幹細胞を含む消化器癌、膵癌幹細胞を含む膵癌、直腸癌幹細胞を含む直腸癌、乳癌幹細胞を含む乳癌、又は卵巣癌幹細胞を含む卵巣癌を予防または治療するためのものである。

30

【0071】

分岐鎖アミノ酸と化学療法剤の併用に際しては、分岐鎖アミノ酸と化学療法剤の投与時期は限定されず、分岐鎖アミノ酸と化学療法剤とを、投与対象に対し、同時に投与してもよいし、時間差をおいて投与してもよい。分岐鎖アミノ酸および化学療法剤の投与量は、目的とする効果（癌幹細胞を含む癌を治療する効果、癌幹細胞を含む癌の転移または再発を予防する効果）を達成し得る範囲で特に限定されず、投与対象、投与ルート、症状、組み合わせ等により適宜選択することが出来る。分岐鎖アミノ酸は、好ましくは、癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を促進する量が投与され、化学療法剤は、当該癌非幹細胞を殺傷する量が投与される。

【0072】

分岐鎖アミノ酸と化学療法剤の投与形態は、特に限定されず、投与時に、分岐鎖アミノ酸と化学療法剤とが組み合わせられていればよい。このような投与形態としては、例えば、（1）分岐鎖アミノ酸と化学療法剤とを同時に製剤化して得られる単一の製剤の投与、（2）分岐鎖アミノ酸と化学療法剤とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路での同時投与、（3）分岐鎖アミノ酸と化学療法剤とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路での時間差をおいての投与、（4）分岐鎖アミノ酸と化学療法剤とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の異なる投与経路での同時投与、（5）分岐鎖アミノ酸と化学療法剤とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の異なる投与経路での時間差をおいての投与（例えば、分岐鎖アミノ酸 化学療法剤の順序での投与、あるいは逆の順序での投与）等が挙げられる。

40

50

【0073】

本発明の予防または治療剤の投与形態・剤型は、経口投与、非経口投与のいずれでもよく、経口投与剤としては、散剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤、チュアブル剤などの固形剤、溶液剤、シロップ剤などの液剤が、また、非経口投与剤としては、注射剤、輸液剤、経鼻・経肺用スプレー剤などが挙げられる。本発明の剤または組成物は、通常の方法によって、これらの剤型の医薬に製剤化することができる。

【0074】

また、本発明の予防または治療剤は、製剤上の必要に応じて、適宜の薬学的に許容される担体、例えば、賦形剤、結合剤、滑沢剤、溶剤、崩壊剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、等張化剤、安定化剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤、矯味矯臭剤、着色剤などを配合して製剤化される。

10

【0075】

分岐鎖アミノ酸と化学療法剤とを別々に製剤化する場合、分岐鎖アミノ酸を含む製剤中の分岐鎖アミノ酸の含有量は、上述の本発明の剤または組成物と同一である。

【0076】

また、分岐鎖アミノ酸と化学療法剤とを別々に製剤化する場合、化学療法剤を含む製剤中の化学療法剤の含有量は、分岐鎖アミノ酸との併用により、癌幹細胞を含む癌を治療し、または癌幹細胞を含む癌の転移または再発を予防し得る限り特に限定されず、製剤の形態や化学療法剤の種類によって相違するが、通常、製剤全体に対して約0.1~99.9重量%、好ましくは約1~99重量%、さらに好ましくは約10~90重量%程度である。

20

【0077】

分岐鎖アミノ酸および化学療法剤を同時に製剤化して単一の製剤として使用する場合も、上記に準じた含有量でよい。この場合、分岐鎖アミノ酸と化学療法剤との配合比は、投与対象、投与ルート、症状、化学療法剤の種類等により適宜選択することができる。

【0078】

分岐鎖アミノ酸の投与量は、上述の本発明の剤または組成物における分岐鎖アミノ酸の投与量と同一であり、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩を含有する態様においては、一般の成人の場合、通常1日量として、イソロイシン0.5~30.0g、ロイシン1.0~60.0g、バリン0.5~30.0gを目安とする。好ましくは、一日量として、イソロイシン2.0~10.0g、ロイシン3.0~20.0g、バリン2.0~10.0g、より好ましくは、イソロイシン2.5~3.5g、ロイシン5.0~7.0g、バリン3.0~4.0gであり、3種の分岐鎖アミノ酸の全体量としては1日当たり2.0g~50.0g程度が好ましく、これを必要に応じて1~6回、好ましくは1~3回に分割して投与する。

30

【0079】

化学療法剤の投与量は、分岐鎖アミノ酸との併用により、癌幹細胞を含む癌を治療し、または癌幹細胞を含む癌の転移または再発を予防し得る限り特に限定されず、投与対象、症状、投与ルート、抗腫瘍剤の種類等により適宜設定することができる。

【0080】

分岐鎖アミノ酸および/または化学療法剤の投与頻度は、投与対象、症状、投与ルート、抗腫瘍剤の種類などによっても異なるが、例えば1~7日に1回の頻度、好ましくは1~3日に1回の頻度である。分岐鎖アミノ酸および/または化学療法剤の投与回数は、投与対象、症状、投与ルート、抗腫瘍剤の種類などによっても異なるが、通常1~15回、好ましくは2~10回程度である。

40

【0081】

上述の分岐鎖アミノ酸と化学療法剤をそれぞれ別々に製剤化して併用投与するに際しては、分岐鎖アミノ酸を含有する製剤と化学療法剤を含有する製剤とを同時期に投与してもよいが、化学療法剤を含有する製剤を先に投与した後、分岐鎖アミノ酸を含有する製剤を投与してもよいし、分岐鎖アミノ酸を含有する製剤を先に投与し、その後で化学療法剤を

50

含有する製剤を投与してもよい。時間差を置いて投与する場合、時間差は投与する有効成分、剤形、投与方法により異なるが、例えば、分岐鎖アミノ酸を含有する製剤を先に投与する場合、分岐鎖アミノ酸を含有する製剤を投与した後、1分～14日以内に化学療法剤を含有する製剤を投与する方法が挙げられる。化学療法剤を含有する製剤を先に投与する場合、化学療法剤を投与した後1分～14日以内に分岐鎖アミノ酸を含有する製剤を投与する方法が挙げられる。

【0082】

上述の通り、癌幹細胞は、増殖のスピードが遅いために、化学療法剤に対して抵抗性を有する。これに対して、分化した癌細胞（癌非幹細胞）は、一般に増殖のスピードが速いために、化学療法剤に対する感受性が高い。そこで、癌幹細胞にイソロイシン、ロイシンおよびバリンから選ばれる少なくとも一種の分岐鎖アミノ酸またはその塩（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩）を適用し、癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を促進することにより、癌幹細胞を含む癌の化学療法剤への感受性が高まり、結果として、高い効率で癌幹細胞を含む癌を殺傷することが可能になる。

10

【0083】

このような理論に基づけば、化学療法剤の投与は、上述の分岐鎖アミノ酸（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩）の投与と同時または上述の分岐鎖アミノ酸（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩）の投与から一定期間後であることが好ましい。即ち、本発明の治療または予防剤の投与態様には、好ましくは上述の分岐鎖アミノ酸（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩）と化学療法剤とを同時に投与する工程、または上述の分岐鎖アミノ酸（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩）を投与し、その後化学療法剤を投与する工程が含まれる。

20

【0084】

従って、本発明の予防または治療剤の投与プロトコールには、好ましくは、
 (1) 上述の分岐鎖アミノ酸（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩）および化学療法剤を同時に単回または複数回投与すること、
 (2) 第一段階として上述の分岐鎖アミノ酸（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩）を単回または複数回投与し、第二段階として化学療法剤を単回または複数回投与すること、
 (3) 第一段階として上述の分岐鎖アミノ酸（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩）を単回または複数回投与し、第二段階として上述の分岐鎖アミノ酸（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩）および化学療法剤を同時期に単回または複数回投与すること、
 (4) (2) または (3) の工程を複数回繰り返すこと
 等の工程が含まれる。

30

40

【0085】

(1) の具体的な態様としては、例えば、肝臓癌幹細胞を含む肝臓癌を予防または治療する場合に、上述の分岐鎖アミノ酸（好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩）を含有する輸液剤を、肝動脈注入化学療法施行時に化学療法剤とともに動脈内に注入することを挙げることができる。更に、インターフェロンを上記輸液剤及び化学療法剤とともに動脈内に注入してもよい。

【0086】

(2)～(4)において、第一段階の最後の投与と第二段階の最後の投与との間隔は、投与対象、症状、投与ルート、化学療法剤の種類などによっても異なるが、通常1分～14日以内である。

50

【0087】

(2)～(4)において、第一段階における上述の分岐鎖アミノ酸(好ましくは、イソロイシンまたはその塩、ロイシンまたはその塩、およびバリンまたはその塩)の投与の後に、癌幹細胞が癌非幹細胞へ分化したか否かを確認してもよい。当該確認は、例えば上述したように、癌幹細胞のマーカーの発現を、当該マーカータンパク質を特異的に認識する抗体を用いた免疫学的手法により、測定することにより実施することができる。上述の分岐鎖アミノ酸の投与前と比較して当該投与後において癌における癌幹細胞のマーカーの発現が減少した場合に、当該投与により癌幹細胞の癌非幹細胞への分化が誘導されたとすることができる。そして、癌幹細胞の癌非幹細胞への分化の誘導を確認した後で、第二段階である化学療法剤の投与を実施することができる。

10

【0088】

更なる態様において、本発明の剤または組成物を、癌幹細胞を含む癌の罹患歴を有する哺乳動物(例、ヒト)に対して投与することにより、その哺乳動物の体内に残存している可能性がある癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を促進し、癌幹細胞の癌非幹細胞への分化が促進され、CD44等の癌の転移に關与する接着分子の発現を抑制し、この効果により癌幹細胞を含む癌の転移能が抑制される。従って、本発明の剤または組成物を、癌幹細胞を含む癌の罹患歴を有する哺乳動物に投与することにより、化学療法剤の併用を要することなく、該癌の転移や再発を効率的に予防することができる。

【実施例】

【0089】

次に、実施例により本発明をさらに詳細に述べる。なお、以下の実施例は、本発明の一例について具体的に説明するものであって、本発明をこれに限定するものではない。

20

【0090】

実施例1：ヒト肝臓癌細胞株HAK4における幹細胞マーカーおよび分化マーカーの発現に対するBCAAの効果

ヒト肝臓癌細胞株HAK4を12000個/wellの濃度でプレートに播種し、2mM BCAAまたはLC2.5%培地中で72時間培養した。BCAAはイソロイシン、ロイシンおよびバリンからなる混合物(重量比：イソロイシン：ロイシン：バリン=1：2：1.2)である。BCAAの濃度「2mM」は、イソロイシン、ロイシンおよびバリンの全アミノ酸の濃度の合計である。

30

LC2.5%培地の組成を以下の表に示す。尚、LC2.5%の「2.5%」は牛血清の含有量を示している。

【0091】

【表 1】

	組成 (nmol/ml)
Glycine	280
L-Alanine	307
L-Serine	151
L-Threonine	138
L-Cystine 2HCl	67
L-Methionine	75
L-Glutamine	689
L-Asparagine	64
L-Glutamic Acid	53
L-Aspartic Acid	4
L-Valine	175
L-Leucine	100
L-Isoleucine	53
L-Phenylalanine	99
L-Tyrosine	133
L-Tryptophan	45
L-Lysine-HCl	184
L-Arginine-HCl	92
L-Histidine HCl-H ₂ O	85
L-Proline	176
Fischer' s ratio	1.42

10

20

【 0 0 9 2 】

なお、Fischer' s ratioは、Valine + Leucine + Isoleucine/ Tyrosine + Phenylalanineを意味する。

【 0 0 9 3 】

72時間培養後に細胞を回収し、細胞のペレットに1mlのISOGEN(ニッポン・ジーン)を加えることにより細胞を溶解し、5分間室温に静置した。得られた溶解物に0.2mlのクロロホルムを加え、15秒間激しく振り、2~3分間室温に静置し、12000×g、4にて15分間遠心分離した。有機相および中間相を除去し、得られた水相に0.5mlのイソプロパノールを加え、5~10分間室温に静置し、12000×g、4にて10分間遠心分離した。上清を除き、沈殿物に少なくとも1mlの75(v/v)%エタノールを加え、ボルテックスをし、7500×g、4にて5分間遠心分離した。上清を除き、沈殿物を短時間乾燥し、蒸留水を加え、溶解することにより、全RNA溶液を得た。

30

【 0 0 9 4 】

RT-PCR 7500を用いたRT-PCRにより、EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule; 肝臓癌幹細胞のマーカー)、AFP(-feto protein; 肝臓癌マーカーおよび肝臓癌幹細胞のマーカー)およびCYP3A4(cytochrome P450 3A4; 分化マーカー)のmRNAの発現を定量した。RT-PCRに用いたプライマーを以下の表に示す。

40

【 0 0 9 5 】

【表 2】

EpCAM F (human)	GCTGGTGTGTGAACACTGCT	(配列番号 1)
EpCAM R (human)	ACGCGTTGTGATCTCCTTCT	(配列番号 2)
AFP F (human)	AAATGCGTTTCTCGTTGCTT	(配列番号 3)
AFP R (human)	GCCACAGGCCAATAGTTTGT	(配列番号 4)
CYP3A4 F (human)	AAGGTCGCCTCAAAGAGACA	(配列番号 5)
CYP3A4 R (human)	TGCACTTTCTGCTGGACATC	(配列番号 6)

10

【0096】

結果を図 1 に示す。BCAA により、HAK4 細胞において、肝臓癌幹細胞のマーカーである EpCAM および AFP の発現が低下し、分化マーカーである CYP3A4 の発現が上昇した。

【0097】

実施例 2：ヒト肝臓癌細胞株 HAK4 に対する 5FU (5-fluorouracil) と BCAA との併用の効果 (in vitro 試験)

ヒト肝臓癌細胞株 HAK4 を 3000 個 / well の濃度でプレートに播種し、以下の条件下で 72 時間培養した：

20

- ・ LC 2.5% 培地
- ・ BCAA (2 mM)
- ・ 5FU (2.5 μg / ml)
- ・ BCAA (2 mM) + 5FU (2.5 μg / ml)

【0098】

72 時間後に、ApoAlert Annexin V-FITC Apoptosis kit (Clontech) を用いて細胞を annexin V で染色および固定し、Array Scan (Thermo Fisher) でアポトーシス細胞 (%) を検出した。

即ち、96 穴プレート中の細胞を 1X Binding Buffer でリンスし、各ウェルに annexin V (1 μl) を含有する 1X Binding Buffer を 40 μl 加え、暗室、室温にて 5 ~ 15 分間、インキュベートした。細胞を洗浄し、2%ホルムアルデヒド中で固定した。ヘキスト 33258 溶液を含む PBS を 100 μl 加え、暗室 5 分間インキュベートした後、Array Scan でアポトーシス細胞 (%) を検出した。

30

【0099】

結果を図 2 に示す。BCAA 単独処理では、アポトーシス細胞数に有意な変化は認められなかった。5FU 単独処理によりアポトーシス細胞が増加し、BCAA を併用すると、5FU によるアポトーシス誘導を増強した。以上の結果から、BCAA は、5FU の抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

【0100】

実施例 3：ヒト肝臓癌細胞株 HAK1B における幹細胞マーカーおよび分化マーカーの発現に対する BCAA の効果

40

実施例 1 と同様に、ヒト肝臓癌細胞株 HAK1B を 4000 個 / well の濃度でプレートに播種し、2 mM BCAA または LC 2.5% 培地中で 72 時間培養した。72 時間培養後に細胞を回収し、ISOGEN (ニッポン・ジーン) により全 RNA を精製した。RT-PCR により、EpCAM、AFP および CYP3A4 の mRNA の発現を定量した。

【0101】

結果を図 3 に示す。BCAA により、HAK4 細胞と同様に、HAK1B 細胞においても、肝臓癌幹細胞のマーカーである EpCAM および AFP の発現が低下し、分化マーカー

50

ーであるCYP3A4の発現が上昇した。以上の結果から、BCAAが肝臓癌の癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を誘導し、癌幹細胞を減少させることが示唆された。

【0102】

実施例4：ヒト肝臓癌細胞株HAK1Bに対する5FU(5-fluorouracil)とBCAAとの併用の効果(in vivo試験)

7週齢の雌のBALB/cヌードマウス(日本チャールスリバーより購入)にHAK1B細胞を700万個/個体皮下移植した。1週間後に腫瘍面積に基づき群分けを実施した。5FU 250 µg/tumor(vehicle 10% DMSO/DW)を腫瘍内に投与すると共に(Cancer Research, 70(11), 4687-4697, 2010参照)、3(w/w)% BCAA混餌食または3(w/w)% カゼイン混餌食を2週間供与した。即ち、4つの群における処置は以下の通りである：

1群：vehicle + カゼイン混餌食(コントロール群)

2群：5FU + カゼイン混餌食

3群：vehicle + BCAA混餌食

4群：5FU + BCAA混餌食

ノギスを用いて腫瘍外側から腫瘍体積(長径×短径×高さ(mm³))を測定することにより、経時的な腫瘍体積変化をモニターした。43日目に剖検をし、腫瘍の重量および体積を計測した。

【0103】

結果を図4～6に示す。BCAA単独処理群(3群)では、コントロール群(1群)と比較して、腫瘍重量および腫瘍体積における有意な変化は認められなかった。5FU単独処理により腫瘍重量および腫瘍体積が有意に減少し(2群)、BCAAを併用すると、5FUによる腫瘍重量および腫瘍体積の減少効果が増強された。以上の結果から、BCAAは、インビボにおいても5FUの抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

【0104】

実施例5：ヒト大腸癌細胞株HCT116における幹細胞マーカーの発現に対するBCAAの効果

HCT116細胞(ヒト大腸癌細胞株)を4000個/wellでプレートに播種し、2mM BCAAまたはLC 2.5%培地中で72時間培養した。72時間培養後に細胞を回収し、抗CD44抗体(一次抗体)と1時間室温にてインキュベートし、更にCy5をコンジュゲートした二次抗体と1時間室温にてインキュベートした。細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、ヘキスト33258溶液で染色し(5分間室温にてインキュベーション)、染色液をPBSで置換し、Array ScanによりCD44陽性細胞の割合を解析した。CD44は大腸癌幹細胞マーカーである。

【0105】

結果を図7に示す。BCAAにより、HCT116細胞において、大腸癌幹細胞のマーカーであるCD44の発現が有意に低下した。以上の結果から、BCAAが肝臓癌幹細胞のみならず、大腸癌幹細胞の非幹細胞への分化を誘導することが示唆された。

【0106】

実施例6：ヒト大腸癌細胞株HCT116に対する5FUとBCAAとの併用の効果(in vitro試験)

HCT116細胞(ヒト大腸癌細胞株)を4000個/wellの濃度でプレートに播種し、以下の条件下で72時間培養した：

- ・ LC 2.5%培地
- ・ BCAA(2mM)
- ・ 5FU(2 µg/ml)
- ・ BCAA(2mM) + 5FU(2 µg/ml)

【0107】

72時間後に、ApoAlert Annexin V-FITC Apoptosis kit(Clontech)を用いて細胞をannexin Vで染色および固定し、Array Scan(Thermo Fisher)でアポトーシス細胞(%)を

10

20

30

40

50

検出した。

【0108】

結果を図8に示す。5FU単独処理によりアポトーシス細胞が増加し、BCAAを併用すると、5FUによるアポトーシス誘導が増強された。以上の結果から、BCAAは、肝臓癌のみならず大腸癌においても、5FUの抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

【0109】

実施例7：ヒト大腸癌細胞株HCT116の転移に対するBCAAの効果(in vivo試験)

ヒト大腸癌細胞HCT116を、BALB/cヌードマウス(雌、6週齢、各群5匹)に 1×10^5 個/匹移植した。HCT116細胞は、予め7日間、4mM BCAAで処理をした。コントロール群は、HCT116細胞を4mM BCAAで処理していない。細胞の移植は、マウスの筋層を切開後、脾臓を露出し、脾臓の両端血管を緩く糸で縛り、脾臓へ注射針でゆっくりHCT116細胞を移入し(100 μ l)、両端の糸を縛って止血後、脾臓を摘出し、筋層を縫合し、皮膚をホッチキスで止めることにより行った。3週間、マウスを通常飼育した後に、マウスを安楽死させ、肝臓表面の転移癌の個数を測定した。

【0110】

その結果、コントロール群では、5匹全てのマウスにおいて肝臓表面に転移癌の形成が認められたが、BCAA処理群では、1匹のみにおいて、転移癌の形成が認められた。また、1匹あたりの転移癌の個数も、BCAA処理により有意に抑制された(図9)。以上の結果から、BCAAは大腸癌の転移能を減少させることが示された。また、実施例5の結果と併せると、このBCAAによる大腸癌の転移抑制効果は、CD44の発現低下による可能性が示唆された。

【0111】

実施例8：ヒト胃癌細胞株MKN45に対する5FUとBCAAとの併用の効果(in vitro試験)

MKN45細胞(ヒト胃癌細胞株)を4000個/100 μ l/wellで96穴プレートに播種し、以下の条件で72時間培養した：

- ・LC培地(10% FBS)
- ・LC培地+BCAA(2mM又は4mM)
- ・LC培地+5FU(0.05 μ g/ml、0.1 μ g/ml、0.5 μ g/ml又は1 μ g/ml)
- ・LC培地+BCAA(2mM又は4mM)+5FU(0.05 μ g/ml、0.1 μ g/ml、0.5 μ g/ml又は1 μ g/ml)

【0112】

72時間後に、WST-8試薬を添加し(10 μ l/well)、1時間発色後、OD450nmの吸光度を測定した。無刺激群の吸光度を100%としたときの相対値で各群の吸光度を表した。尚、WST-8は細胞内脱水素酵素により還元され、水溶性のホルマザンを生成し、このホルマザンの450nmの吸光度を直接測定することにより、容易に生細胞数を計測することができる。細胞数と生成するホルマザンの量は直線的な比例関係にある。

【0113】

結果を図10に示す。5FU単独処理により生細胞数が減少し、BCAAを併用すると、5FUによる生細胞数の減少が増強された。以上の結果から、BCAAは、胃癌においても、5FUの抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

【0114】

実施例9：ヒト胃癌細胞株MKN45に対する5FUとBCAAとの併用の効果(in vitro試験)

MKN45細胞(ヒト胃癌細胞株)を4000個/100 μ l/wellで96穴プレートに播種し、以下の条件下で72時間培養した：

- ・ LC 培地 (10% FBS)
- ・ LC 培地 + BCAA (2 mM 又は 4 mM)
- ・ LC 培地 + 5FU (0.05 μ g / ml 又は 0.1 μ g / ml)
- ・ LC 培地 + BCAA (2 mM 又は 4 mM) + 5FU (0.05 μ g / ml 又は 0.1 μ g / ml)

【 0 1 1 5 】

72 時間後に、上清を除去し、パラホルムアルデヒドで細胞を固定後、Hoechst 試薬で核染色し、アレイスキャンの cell cycle モードでアポトーシス細胞の割合を解析した。

【 0 1 1 6 】

結果を図 11 に示す。5FU と BCAA との併用により、アポトーシス細胞数が有意に増加した。以上の結果から、BCAA による、5FU の胃癌に対する抗腫瘍効果の増強は、アポトーシスの増強による可能性が示唆された。

10

【 0 1 1 7 】

実施例 10 : ヒト胃癌細胞株 MKN45 における幹細胞マーカーの発現に対する BCAA の効果

MKN45 細胞 (ヒト胃癌細胞株) を 4000 個 / 100 μ l / well で 96 穴プレートに播種し、RPMI 1640 培地 (10% FBS) 或いは BCAA (2 mM 又は 4 mM) 含有 RPMI 1640 培地 (10% FBS) 中で 72 時間培養した。72 時間後に上清を除去し、パラホルムアルデヒドで固定後、抗 CD44 抗体 (一次抗体) と 1 時間室温にてインキュベートし、更に Texas Red をコンジュゲートした二次抗体と 1 時間インキュベートした。上清を除去し、Hoechst 試薬で核染色後、Array Scan の target activation モードで CD44 陽性細胞の割合を解析した。

20

【 0 1 1 8 】

結果を図 12 に示す。BCAA により、MKN45 細胞において、胃癌幹細胞のマーカーである CD44 の発現が有意に低下した。以上の結果から、BCAA が胃癌幹細胞の非幹細胞への分化を誘導することが示唆された。

【 0 1 1 9 】

実施例 11 : ヒト胃癌細胞株 MKN45 に対する TS-1 と BCAA との併用の効果 (in vivo 試験)

6 週齢の雌の BALB / c ノドマウスに MKN45 細胞を 1×10^6 個 / マウス 皮下移植した。1 週間後に腫瘍体積に基づき群分けを実施した。TS-1 10 mg / kg (vehicle 0.5% CMC)、TS-1 10 mg / kg + BCAA 0.75 g / kg、又は BCAA 0.75 g / kg を土日を除く毎日、6 週間経口投与した。即ち、4 つの群における処置は以下の通りである：

30

1 群 : CMC (vehicle)

2 群 : TS-1

3 群 : TS-1 + BCAA

4 群 : BCAA

【 0 1 2 0 】

尚、TS-1 は、テガフル、ギメラシル、及びオテラシルカリウムを以下の組成で含有する抗癌剤である。

40

TS-1 0.2 g 中

テガフル 20 mg

ギメラシル 5.8 mg

オテラシルカリウム 19.6 mg

【 0 1 2 1 】

ノギスを用いて腫瘍外側から腫瘍体積 (長径 \times 短径 \times 高さ (mm^3)) を測定することにより、経時的な腫瘍体積変化をモニターした。43 日目に剖検をし、腫瘍の重量および体積を計測した。

【 0 1 2 2 】

50

結果を図13に示す。TS-1又はBCAA単独処理群では、CMC群と比較して、腫瘍体積の減少傾向は認められるものの、有意な変化は認められなかった。TS-1とBCAAの併用により、腫瘍体積が有意に減少した。以上の結果から、BCAAは、インビボにおいてTS-1の抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

【0123】

実施例12：ヒト乳癌細胞株MDA-MB231の増殖及び幹細胞マーカー発現に対する5FU及びBCAAの効果

MDA-MB231細胞をRPMI-10% (10% FBSを含有するRPMI培地) に懸濁し、2000個/wellでプレートに播種した。次の日に、培地を、以下の通りに交換し、更に5日間培養した。

1群：RPMI-10%

2群：BCAA (4mM) を含有するRPMI-10%

3群：5-FU (0.25 µg/ml) を含有するRPMI-10%

4群：5-FU (0.25 µg/ml) を含有するRPMI-10%

【0124】

5日後に細胞核をヘキスト試薬により染色し、細胞数をカウントした。また、1群及び2群については、抗CD44抗体により染色し、蛍光顕微鏡定量装置 (Thermo Fisher) を用いたArray ScanによりCD44陽性細胞の割合を解析した。

【0125】

結果を図14及び15に示す。5FU単独処理により生細胞数が減少し、BCAAを併用すると、5FUによる生細胞数の減少が増強された。以上の結果から、BCAAは、乳癌において、5FUの抗腫瘍効果を増強することが示唆された。また、BCAAにより、MDA-MB231細胞において、乳癌幹細胞のマーカーであるCD44の発現が低下する傾向が認められた。以上の結果から、BCAAが乳癌幹細胞の非幹細胞への分化を誘導する可能性が示唆された。

【0126】

実施例13：ヒト肝臓癌細胞株HAK1Bの幹細胞マーカー発現に対するBCAAの効果 (in vivo試験)

7週齢の雌のBALB/cヌードマウス (日本チャールスリバーより購入) にHAK1B細胞を700万個/個体皮下移植した。1週間後に腫瘍面積に基づき群分けを実施した。5FU 250 µg/tumor (vehicle 10% DMSO/DW) を腫瘍内に投与すると共に (Cancer Research, 70(11), 4687-4697, 2010参照)、3 (w/w) % BCAA混餌食または3 (w/w) % カゼイン混餌食を2週間供与した。即ち、4つの群における処置は以下の通りである：

1群：vehicle + カゼイン混餌食 (コントロール群)

2群：5FU + カゼイン混餌食

3群：vehicle + BCAA混餌食

4群：5FU + BCAA混餌食

【0127】

15日目に、腫瘍組織を摘出し、TriPure Isolation Reagent (Roche) を用いてRNAを抽出した。High Capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems) を用いてcDNAを合成した。RT-PCRにより、EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule; 肝臓癌幹細胞のマーカー) のmRNAの発現を定量した。RT-PCRに用いたプライマーは実施例1と同一である。

【0128】

結果を図16に示す。BCAAにより、HAK1B細胞における肝臓癌幹細胞のマーカーであるEpCAMが低下した。以上の結果から、BCAAが、インビボにおいても、肝臓癌の癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を誘導し、癌幹細胞を減少させることにより、腫瘍の5FUへの感受性を増大させることが示唆された。

【0129】

実施例14：ヒト胃癌細胞株MKN45の幹細胞マーカー発現に対するBCAAの併用の

10

20

30

40

50

効果 (in vivo試験)

6週齢の雌のBALB/cヌードマウスにMKN45細胞を 1×10^6 個/マウス皮下移植した。1週間後に腫瘍体積に基づき群分けを実施した。TS-1 10mg/kg (vehicle 0.5% CMC)、TS-1 10mg/kg + BCAA 0.75g/kg、又はBCAA 0.75g/kgを土日を除く毎日、6週間経口投与した。即ち、4つの群における処置は以下の通りである：

1群：CMC (vehicle)

2群：TS-1

3群：TS-1 + BCAA

4群：BCAA

10

【0130】

43日後に、腫瘍組織を摘出し、TriPure Isolation Reagent (Roche)を用いてRNAを抽出した。High Capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems)を用いてcDNAを合成した。RT-PCRにより、CD44 (癌幹細胞のマーカ)、nanog (未分化マーカ)及びABC5 (ABCトランスポーター、癌幹細胞に発現していることが報告されている)のmRNAの発現を定量した。RT-PCRに用いたプライマーは以下の通りである。

【0131】

【表3】

CD44:	5' -AAGGTGGAGCAAACACAACC-3'	(配列番号7)	
	5' -AGCTTTTCTTCTGCCACA-3'	(配列番号8)	20
Nanog:	5' -TTCCTCCTCCATGGATCTG-3'	(配列番号9)	
	5' -TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT-3'	(配列番号10)	
ABC5:	5' -ATGTACAGTGGCTCCGTTCC-3'	(配列番号11)	
	5' -ACACGGCTGTTGTCACCATA-3'	(配列番号12)	
β actin:	5' -GATGAGATTGGCATGGCTTT-3'	(配列番号13)	
	5' -CACCTTCACCGTCCAGTTT-3'	(配列番号14)	

【0132】

結果を図17に示す。BCAAにより、MKN45細胞におけるCD44、nanog及びABC5の発現が低下した。以上の結果から、BCAAが、インビボにおいても、胃癌の癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を誘導し、癌幹細胞を減少させることにより、腫瘍のTS-1への感受性を増大させることが示唆された。

30

【産業上の利用可能性】

【0133】

分岐鎖アミノ酸は、癌幹細胞の癌非幹細胞への分化を促進し、化学療法剤への感受性を高めるので、これを化学療法剤と組み合わせて、癌幹細胞を含む癌に罹患している患者に投与することにより、効果的に癌を治療することが可能である。

また、分岐鎖アミノ酸を化学療法剤と組み合わせて、癌幹細胞を含む癌の罹患歴がある患者に投与することにより、効果的に癌の転移や再発を予防することが可能である。

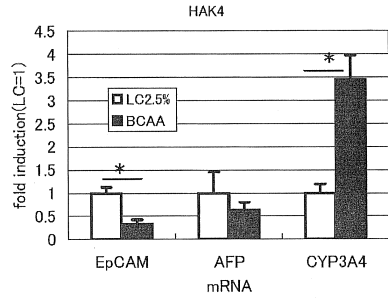
40

従って、本発明は癌の予防や治療のための医薬等として有用である。

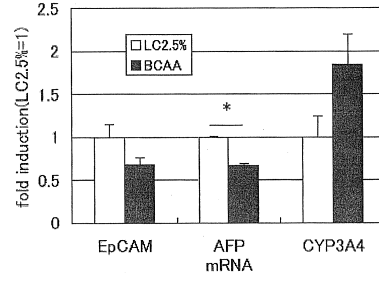
【0134】

本出願は、日本で出願された特願2011-32511 (出願日：2011年2月17日)及び特願2011-215605 (出願日：2011年9月29日)を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

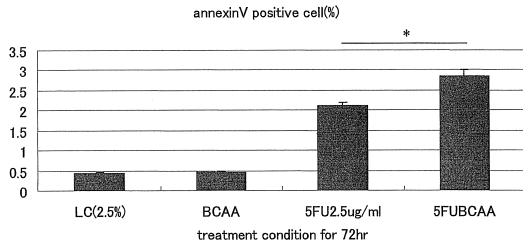
【 図 1 】



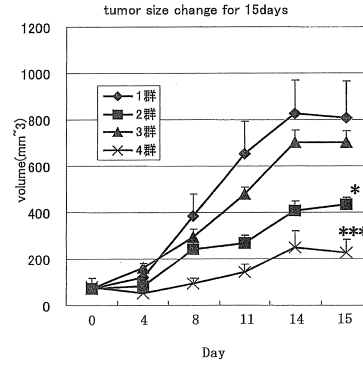
【 図 3 】



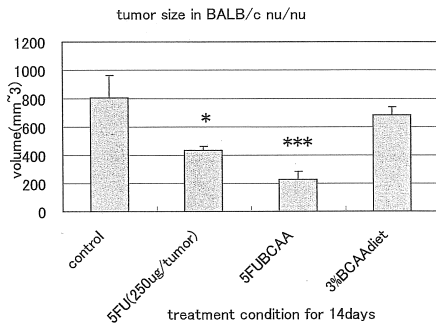
【 図 2 】



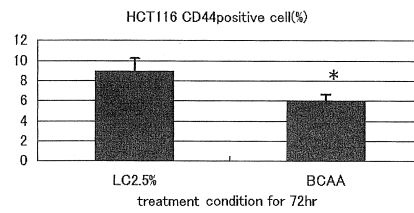
【 図 4 】



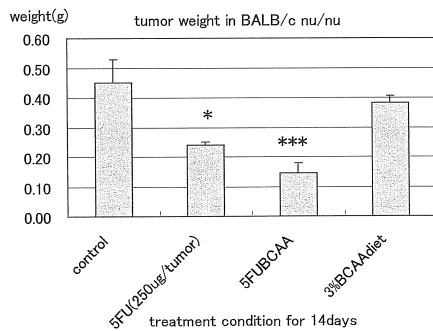
【 図 5 】



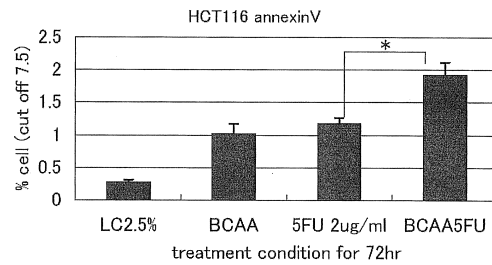
【 図 7 】



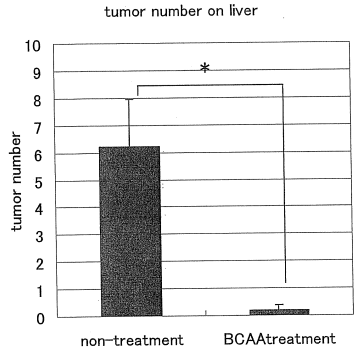
【 図 6 】



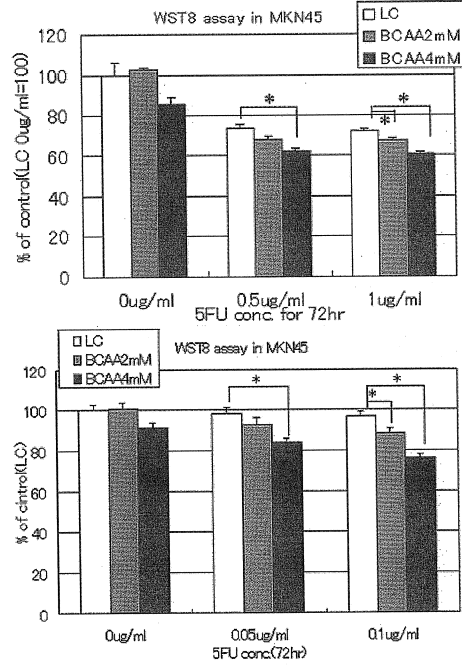
【 図 8 】



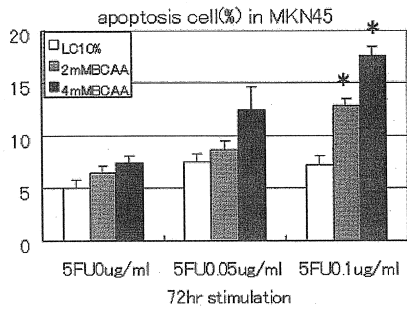
【 9 】



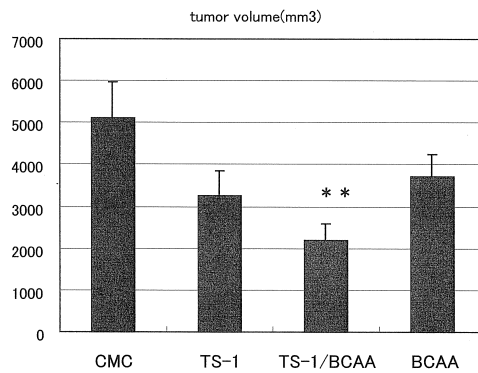
【 10 】



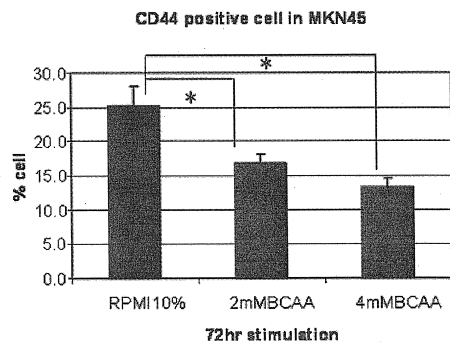
【 11 】



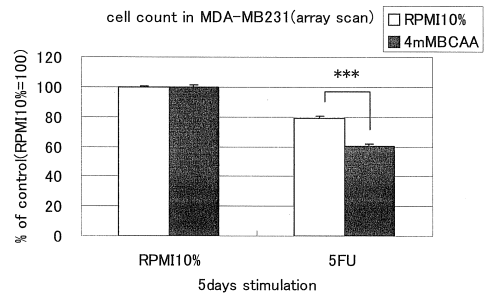
【 13 】



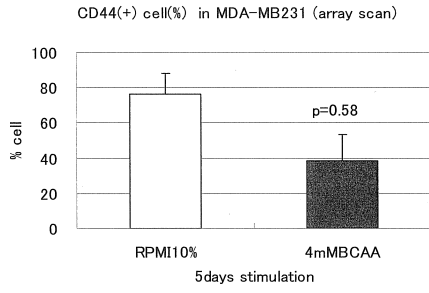
【 12 】



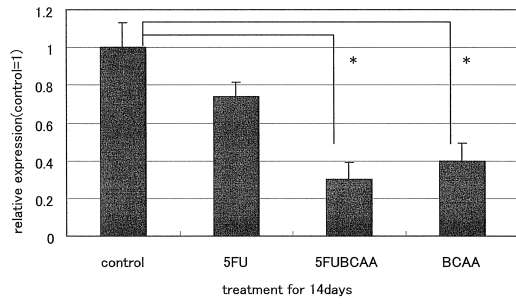
【 14 】



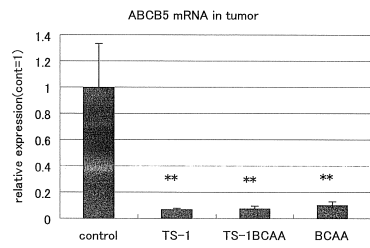
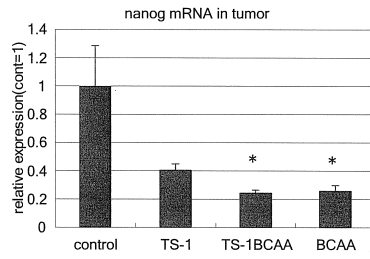
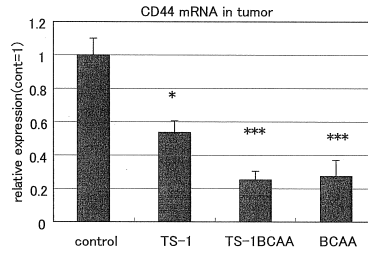
【 15 】



【 16 】



【 17 】



【 配列表 】

0006090836000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 43/00 1 0 5

- (74)代理人 100137729
弁理士 赤井 厚子
- (74)代理人 100151301
弁理士 戸崎 富哉
- (74)代理人 100079108
弁理士 稲葉 良幸
- (73)特許権者 599045903
学校法人 久留米大学
福岡県久留米市旭町 6 7 番地
- (74)代理人 100080791
弁理士 高島 一
- (74)代理人 100125070
弁理士 土井 京子
- (74)代理人 100136629
弁理士 鎌田 光宣
- (74)代理人 100121212
弁理士 田村 弥栄子
- (74)代理人 100122688
弁理士 山本 健二
- (74)代理人 100117743
弁理士 村田 美由紀
- (74)代理人 100163658
弁理士 小池 順造
- (74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文
- (72)発明者 西谷 しのぶ
神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素製薬株式会社内
- (72)発明者 矢野 博久
福岡県久留米市旭町 6 7 番地 久留米大学内

審査官 吉田 佳代子

- (56)参考文献 特表平 1 1 - 5 0 8 2 8 2 (J P , A)
特開 2 0 1 0 - 0 8 3 8 5 8 (J P , A)
特開平 0 3 - 0 6 8 5 1 4 (J P , A)
特開 2 0 0 4 - 3 3 9 1 5 1 (J P , A)
特表 2 0 0 5 - 5 1 8 3 6 1 (J P , A)
HEPATOLOGY RESEARCH , 2 0 1 0 年 , VOL.40 , P.574-584
アミノレバン (登録商標) E N 配合散 添付文書 , 大塚製薬株式会社 , 2 0 0 9 年 9 月

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 3 / 4 4
A 6 1 K 4 5 / 0 0
A 6 1 P 3 5 / 0 0
A 6 1 P 4 3 / 0 0

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)