

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6898848号  
(P6898848)

(45) 発行日 令和3年7月7日 (2021.7.7)

(24) 登録日 令和3年6月15日 (2021.6.15)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 31/353 (2006.01)

A 6 1 K 31/353

A 6 1 K 31/196 (2006.01)

A 6 1 K 31/196

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 Z N A

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 78 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-515756 (P2017-515756)  
 (86) (22) 出願日 平成27年9月18日 (2015.9.18)  
 (65) 公表番号 特表2017-534583 (P2017-534583A)  
 (43) 公表日 平成29年11月24日 (2017.11.24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/051057  
 (87) 国際公開番号 W02016/044790  
 (87) 国際公開日 平成28年3月24日 (2016.3.24)  
 審査請求日 平成30年9月12日 (2018.9.12)  
 (31) 優先権主張番号 62/052,966  
 (32) 優先日 平成26年9月19日 (2014.9.19)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(73) 特許権者 500213834  
 メモリアル スローン ケタリング キャ  
 ンサー センター  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1006  
 5, ニューヨーク, ヨーク アベニュー  
 1275  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (72) 発明者 マッサージ, ジョアン  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1006  
 5, ニューヨーク, イースト 72エ  
 スディー ストリート 515, アパー  
 トメント 34ビー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳転移を治療するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

がんを有する被験体の脳における前記がんの転移性進行を阻害するための、ギャップジ  
 ャンクション阻害剤を含む組成物であって、前記ギャップジャンクション阻害剤が、トナ  
 ベルサット、メクロフェナメート、プロトカドヘリン 7 阻害剤およびそれらの組み合わせ  
 からなる群から選択される、前記プロトカドヘリン 7 阻害剤が干渉 RNA である、組成物  
 。

【請求項 2】

前記ギャップジャンクション阻害剤がトナベルサットである、請求項 1 に記載の組成物  
 。

【請求項 3】

前記ギャップジャンクション阻害剤がメクロフェナメートである、請求項 1 に記載の組  
 成物。

【請求項 4】

前記ギャップジャンクション阻害剤がプロトカドヘリン 7 阻害剤である、請求項 1 に記  
 載の組成物。

【請求項 5】

前記がんが乳がんである、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 6】

前記がんが肺がんである、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 7】

前記組成物が、治療有効量の抗がん剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 8】

前記抗がん剤がカルボプラチンである、請求項 7 に記載の組成物。

## 【請求項 9】

治療前に前記被験体が 1 つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 10】

治療前に前記被験体が脳転移を有することが分かっていた、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の組成物。 10

## 【請求項 11】

前記被験体のがん細胞がコネキシン 43 および / またはプロトカドヘリン 7 を発現する、請求項 1 から 10 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 12】

被験体の脳において転移がん細胞の成長および / または生存を阻害するための、治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を含む組成物であって、前記ギャップジャンクション阻害剤が、トナベルサット、メクロフェナメート、プロトカドヘリン 7 阻害剤およびそれらの組み合わせからなる群から選択され、前記プロトカドヘリン 7 阻害剤が干渉 RNA である、組成物。 20

## 【請求項 13】

前記ギャップジャンクション阻害剤がトナベルサットである、請求項 12 に記載の組成物。

## 【請求項 14】

前記ギャップジャンクション阻害剤がメクロフェナメートである、請求項 12 に記載の組成物。

## 【請求項 15】

前記ギャップジャンクション阻害剤がプロトカドヘリン 7 阻害剤である、請求項 12 に記載の組成物。

## 【請求項 16】

前記がんが乳がんである、請求項 12 から 15 のいずれかに記載の組成物。 30

## 【請求項 17】

前記がんが肺がんである、請求項 12 から 15 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 18】

前記組成物が、治療有効量の抗がん剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項 12 から 17 までのいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 19】

前記抗がん剤がカルボプラチンである、請求項 18 に記載の組成物。

## 【請求項 20】

治療前に前記被験体が 1 つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた、請求項 12 から 19 のいずれかに記載の組成物。 40

## 【請求項 21】

治療前に前記被験体が脳転移を有することが分かっていた、請求項 12 から 19 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 22】

前記被験体のがん細胞がコネキシン 43 および / またはプロトカドヘリン 7 を発現する、請求項 12 から 21 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 23】

がんを有する被験体において脳転移を治療するための、治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を含む組成物であって、前記ギャップジャンクション阻害剤が、トナベルサ 50

ット、メクロフェナメート、プロトカドヘリン 7 阻害剤およびそれらの組み合わせからなる群から選択され、前記プロトカドヘリン 7 阻害剤が干渉 R N A である、組成物。

【請求項 2 4】

前記ギャップジャンクション阻害剤がトナベルサットである、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記ギャップジャンクション阻害剤がメクロフェナメートである、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

前記ギャップジャンクション阻害剤がプロトカドヘリン 7 阻害剤である、請求項 2 3 に記載の組成物。 10

【請求項 2 7】

前記がんが乳がんである、請求項 2 3 から 2 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 2 8】

前記がんが肺がんである、請求項 2 3 から 2 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 2 9】

前記組成物が、治療有効量の抗がん剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項 2 3 か 2 8 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 3 0】

前記抗がん剤がカルボプラチンである、請求項 2 9 に記載の組成物。 20

【請求項 3 1】

治療前に前記被験体が 1 つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた、請求項 2 3 から 3 0 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 3 2】

治療前に前記被験体が脳転移を有することが分かっていなかった、請求項 2 3 から 3 0 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記被験体のがん細胞がコネキシン 4 3 および / またはプロトカドヘリン 7 を発現する、請求項 2 3 から 3 2 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 3 4】

がんを有する被験体において前記がんの脳への転移を予防するための、治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を含む組成物であって、前記ギャップジャンクション阻害剤が、トナベルサット、メクロフェナメート、プロトカドヘリン 7 阻害剤およびそれらの組み合わせからなる群から選択され、前記プロトカドヘリン 7 阻害剤が干渉 R N A である、組成物。 30

【請求項 3 5】

前記ギャップジャンクション阻害剤がトナベルサットである、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記ギャップジャンクション阻害剤がメクロフェナメートである、請求項 3 4 に記載の組成物。 40

【請求項 3 7】

前記ギャップジャンクション阻害剤がプロトカドヘリン 7 阻害剤である、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

前記がんが乳がんである、請求項 3 4 から 3 7 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記がんが肺がんである、請求項 3 4 から 3 7 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記組成物が、治療有効量の抗がん剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、請 50

求項 3 4 から 3 9 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 4 1】

前記抗がん剤がカルボプラチンである、請求項 4 0 に記載の組成物。

【請求項 4 2】

治療前に前記被験体が 1 つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた、請求項 3 4 から 4 1 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 4 3】

治療前に前記被験体が脳転移を有することが分かっていなかった、請求項 3 4 から 4 1 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 4 4】

前記被験体のがん細胞がコネキシン 4 3 および / またはプロトカドヘリン 7 を発現する、請求項 3 4 から 4 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 4 5】

がんの脳への検出可能な転移のリスクを低減するための、治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を含む組成物であって、前記ギャップジャンクション阻害剤が、トナベルサット、メクロフェナメート、プロトカドヘリン 7 阻害剤およびそれらの組み合わせからなる群から選択され、前記プロトカドヘリン 7 阻害剤が干渉 RNA である、組成物。

【請求項 4 6】

前記ギャップジャンクション阻害剤がトナベルサットである、請求項 4 5 に記載の組成物。

【請求項 4 7】

前記ギャップジャンクション阻害剤がメクロフェナメートである、請求項 4 5 に記載の組成物。

【請求項 4 8】

前記ギャップジャンクション阻害剤がプロトカドヘリン 7 阻害剤である、請求項 4 5 に記載の組成物。

【請求項 4 9】

前記がんが乳がんである、請求項 4 5 から 4 8 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 5 0】

前記がんが肺がんである、請求項 4 5 から 4 8 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 5 1】

前記組成物が、治療有効量の抗がん剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項 4 5 から 5 0 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 5 2】

前記抗がん剤がカルボプラチンである、請求項 5 1 に記載の組成物。

【請求項 5 3】

治療前に前記被験体が 1 つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた、請求項 4 5 から 5 2 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 5 4】

治療前に前記被験体が脳転移を有することが分かっていなかった、請求項 4 5 から 5 2 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 5 5】

前記被験体のがん細胞がコネキシン 4 3 および / またはプロトカドヘリン 7 を発現する、請求項 4 5 から 5 4 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 5 6】

がんを有する被験体において前記がんの脳への検出可能な転移のリスクを低減するための、治療有効量のプロトカドヘリン 7 阻害剤を含む組成物であって、前記プロトカドヘリン 7 阻害剤が干渉 RNA である、組成物。

【請求項 5 7】

前記がんが乳がんである、請求項 5 6 のいずれかに記載の組成物。

10

20

30

40

50



## 【請求項 5 8】

前記がんが肺がんである、請求項 5 6 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 5 9】

前記組成物が、治療有効量の抗がん剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項 5 6 から 5 8 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 6 0】

前記抗がん剤がカルボプラチンである、請求項 5 9 に記載の組成物。

## 【請求項 6 1】

治療前に前記被験体が 1 つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた、請求項 5 6 から 6 0 のいずれかに記載の組成物。

10

## 【請求項 6 2】

治療前に前記被験体が脳転移を有することが分かっていた、請求項 5 6 から 6 0 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 6 3】

前記被験体のがん細胞がコネキシン 4 3 および / またはプロトカドヘリン 7 を発現する、請求項 5 6 から 6 2 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 6 4】

1 つまたは複数の脳転移を有する被験体の生存期間を延長するための、有効量のギャップジャンクション阻害剤を含む組成物であって、前記ギャップジャンクション阻害剤が、トナベルサット、メクロフェナメート、プロトカドヘリン 7 阻害剤およびそれらの組み合わせからなる群から選択され、前記プロトカドヘリン 7 阻害剤が干渉 RNA である、組成物。

20

## 【請求項 6 5】

前記ギャップジャンクション阻害剤がトナベルサットである、請求項 6 4 に記載の組成物。

## 【請求項 6 6】

前記ギャップジャンクション阻害剤がメクロフェナメートである、請求項 6 4 に記載の組成物。

## 【請求項 6 7】

前記ギャップジャンクション阻害剤がプロトカドヘリン 7 阻害剤である、請求項 6 4 に記載の組成物。

30

## 【請求項 6 8】

前記がんが乳がんである、請求項 6 4 から 6 7 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 6 9】

前記がんが肺がんである、請求項 6 4 から 6 7 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 7 0】

前記組成物が、治療有効量の抗がん剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項 6 4 から 6 9 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 7 1】

前記抗がん剤がカルボプラチンである、請求項 7 0 に記載の組成物。

40

## 【請求項 7 2】

治療前に前記被験体が 1 つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた、請求項 6 4 から 7 1 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 7 3】

治療前に前記被験体が脳転移を有することが分かっていた、請求項 6 4 から 7 1 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 7 4】

前記被験体のがん細胞がコネキシン 4 3 および / またはプロトカドヘリン 7 を発現する、請求項 6 4 から 7 3 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 7 5】

50

被験体の脳において転移がん細胞の成長および／または生存を阻害するための、治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を含む組成物であって、当該治療有効量のギャップジャンクション阻害剤が、その量のギャップジャンクション阻害剤の非存在下でのc G A M Pのレベルと比較してc G A M Pの低下をもたらすものであり、前記ギャップジャンクション阻害剤が、トナベルサット、メクロフェナメート、プロトカドヘリン7阻害剤およびそれらの組み合わせからなる群から選択され、前記プロトカドヘリン7阻害剤が干渉RNAである、組成物。

【請求項76】

c G A M Pの低下を、被験体における脳腫瘍または転移性脳腫瘍がギャップジャンクション阻害剤を用いた治療から治療的利益を受けるかどうかの指標とする方法であって、前記腫瘍に由来する試料において、ギャップジャンクション阻害剤への曝露によりc G A M Pの低下が導かれるかどうかを決定するステップを含み、c G A M Pの低下が、治療的利益を示し、前記ギャップジャンクション阻害剤が、トナベルサット、メクロフェナメート、コネキシン43阻害剤、プロトカドヘリン7阻害剤およびそれらの組み合わせからなる群から選択され、前記コネキシン43阻害剤および前記プロトカドヘリン7阻害剤が干渉RNAである、方法。

【請求項77】

被験体の脳において転移がん細胞の成長および／または生存を阻害するための、ギャップジャンクション阻害剤を含む組成物であって、前記被験体は、前記被験体が、ギャップジャンクション阻害剤を用いた治療から治療的利益を受けるかどうかを決定するステップであり、前記被験体のがん細胞（脳転移、原発腫瘍、または前記脳の外の転移性腫瘍から得ることができる）が、ギャップジャンクション阻害剤に曝露させた場合に、前記阻害剤の非存在下でのc G A M Pレベルと比較してc G A M Pの低下を示すかどうかを決定することを含み、ここでc G A M Pの低下が、治療的利益を示す、ステップを含む方法によって決定され、c G A M Pの低下が観察された場合には、前記被験体が前記組成物を用いて治療されるか、または、c G A M Pの低下が観察されなかった場合には、別のギャップジャンクション阻害剤が腫瘍細胞におけるc G A M Pを低下させるその能力についてアッセイされるかもしくは前記被験体が別のモダリティを用いて治療されることを特徴とし、前記ギャップジャンクション阻害剤が、トナベルサット、メクロフェナメート、コネキシン43阻害剤、プロトカドヘリン7阻害剤およびそれらの組み合わせからなる群から選択され、前記コネキシン43阻害剤および前記プロトカドヘリン7阻害剤が干渉RNAである、組成物。

【請求項78】

被験体において脳腫瘍の成長を阻害するための、ギャップジャンクション阻害剤を含む組成物であって、前記被験体は、前記被験体が、ギャップジャンクション阻害剤を用いた治療から治療的利益を受けるかどうかを決定するステップであり、前記被験体の腫瘍細胞が、ギャップジャンクション阻害剤に曝露させた場合に、前記阻害剤の非存在下でのc G A M Pレベルと比較してc G A M Pの低下を示すかどうかを決定することを含むステップであり、ここでc G A M Pの低下が、治療的利益を示す、ステップを含む方法によって決定され、c G A M Pの低下が観察された場合には、前記被験体が前記組成物を用いて治療されるか、または、c G A M Pの低下が観察されなかった場合には、別のギャップジャンクション阻害剤が前記腫瘍細胞におけるc G A M Pを低下させるその能力についてアッセイされるかもしくは前記被験体が別のモダリティを用いて治療されることを特徴とし、前記ギャップジャンクション阻害剤が、トナベルサット、メクロフェナメート、コネキシン43阻害剤、プロトカドヘリン7阻害剤およびそれらの組み合わせからなる群から選択され、前記コネキシン43阻害剤および前記プロトカドヘリン7阻害剤が干渉RNAである、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

#### 優先権主張

この出願は、2014年9月19日に提出された米国仮出願第62/052,966号（この内容は、その全体が参考として本明細書に援用される）に対する優先権を主張する。

#### 【0002】

##### 助成金の情報

この発明は、National Institutes of Healthによって付与された助成金番号P01-CA129243およびP30-CA008748ならびにDepartment of Defense (DoD)によって付与された助成金番号W81XWH-12-0074の下、政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明に

10

#### 【0003】

##### 1. 導入

本発明は、脳転移の治療において使用するためのギャップジャンクション阻害剤に関する。これらの阻害剤は、そのようなものとして、がん患者を治療する方法において使用することができる。

#### 【背景技術】

#### 【0004】

##### 2. 発明の背景

脳転移は、進行期がんの20～40%で生じ、成人において最も蔓延している頭蓋内悪性疾患を表す（GavrilovicおよびPosner、2005年；Maherら、2009年）。最も一般的な供給源は肺がんおよび乳がんである。他の転移部位における治療は進歩しているにもかかわらず、脳転移に関する現行の臨床管理では、限られた疾患制御しかもたらされず、大多数の患者が診断後12カ月未満に腫瘍の進行により死亡する（GavrilovicおよびPosner、2005年；Stelzer、2013年）。したがって、この疾患プロセスの基礎をなす機構を、合理的な治療戦略に活用することができるよう理解しなければならない。

20

#### 【0005】

脳の独特の微小環境により、転移がん細胞にとって厄介な関門がもたらされる。最近の進歩により、脳転移の開始に関与する複雑な細胞間相互作用および分子間相互作用が解明され始めている。脳毛細血管中に機械的に留まる循環がん細胞は、まず、血液脳関門（BBB）を構成する強化血管壁を横断しなければならない（Eichlerら、2011年）。実験モデルにおいてがん細胞のBBBを通じた血管外遊出を媒介する遺伝子および診療所において脳転移を予測する遺伝子が同定されている（Bosら、2009年；Liら、2013年）。転移細胞は、いちど脳実質の内側に入れば、微小血管系に付随したまま残る（Kienastら、2010年；LorgerおよびFelding-Habermann、2010年）。がん細胞において細胞接着分子L1CAMが発現することにより、転移性増生（metastatic outgrowth）開始に必要である、がん細胞の反管腔側毛細血管基底板上への密接な接着が媒介される（Valienteら、2014年）。Wntは増生を支持するシグナル伝達経路の1つである（Nguyenら、2009年）。しかし、脳に浸潤するがん細胞の大部分は消滅し（Chambersら、2002年；Heynら、2006年；Kienastら、2010年）、また、それらは脳において最も豊富な細胞型であるアストロサイトによって拒絶される（Valienteら、2014年）。

30

40

#### 【0006】

機能的に多面的なアストロサイトは、BBBを維持し、神経血管カップリングを調整し、ストリンジェントな代謝的要求の下で組織の恒常性を持続させ（Oberheimら、2012年）、また、傷害または浸潤細胞のような妨害に対して急性に反応する（PeknyおよびNilsson、2005年）。反応性アストロサイトは、プラスミンを生成し、それにより、アポトーシス促進性サイトカインであるFasLが動員されて浸潤がん

50

細胞を死滅させる (Valienteら、2014年)。プラスミンは、さらに、がん細胞の細胞表面 L1CAM を切断して、がん細胞が脈管構造を利用する能力を抑制する (Valienteら、2014年)。アストロサイトによる攻撃から逃れるために、乳がんおよび肺がん由来の脳転移細胞は、プラスミノゲン活性化因子 (PA) のセルピン阻害剤を発現する (Valienteら、2014年)。これらの観察結果から、アストロサイトにより脳が転移性浸潤から保護されていることが示されるが、転移におけるアストロサイトの役割は、均一にアンタゴニスト性ではない場合があるという証拠も存在する。in vitro では、アストロサイト共培養物により、メラノーマ細胞株が化学療法薬から保護され (Kimら、2011年)、また、in vivo では、アストロサイトによりがん細胞における Notch シグナル伝達が活性化され得る (Xingら、2013年)。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Valienteら、Cell (2014) 156、1002～1016

【非特許文献2】Kimら、Neoplasia (2011) 13、286～298

【非特許文献3】Xingら、EMBO Mol Med (2013) 5、384～396

【発明の概要】

20

【課題を解決するための手段】

【0008】

### 3. 発明の要約

本発明は、ギャップジャンクション機能性を阻害することによって脳転移を治療するための方法に関する。これは、少なくとも一部において、プロトカドヘリン7およびコネキシン43を発現するがん細胞が、脳転移の成長を促進する、アストロサイトとのギャップジャンクションを形成するという発見、およびがん細胞におけるプロトカドヘリン7および/またはコネキシン43の発現を阻害することにより脳転移の進行が低減するという発見に基づく。これは、さらに、ギャップジャンクション阻害剤であるトナベルサット (tonabersat) およびメクロフェナメート (meclofenamate) を用いた治療により、脳転移病変の進行が阻害され、また、従来の化学療法剤であるカルボプラチンの抗がん活性が増強されたという発見に基づく。

30

【0009】

特定の非限定的な実施形態は、がんを有する被験体を治療するための方法であって、被験体に、脳のがんの転移性進行を阻害する量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。特定の非限定的な例では、ギャップジャンクション阻害剤は、コネキシン43阻害剤またはプロトカドヘリン7阻害剤、またはこれらの組合せである。特定の非限定的な例では、阻害剤は、トナベルサットまたはメクロフェナメートまたはこれらの組合せである。特定の非限定的な例では、がんは、乳がんまたは肺がんであり、かつ/または、被験体のがん細胞はコネキシン43および/またはプロトカドヘリン7を発現する。特定の非限定的な例では、方法は、被験体に、治療有効量の抗がん剤、例えば、これだけに限定されないが、カルボプラチンなどを投与するステップをさらに含む。本発明の方法を適用する時に、被験体は、1つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた場合もあり、あるいは、治療前に脳転移を有することが分かっていた。ない。

40

【0010】

特定の非限定的な実施形態は、被験体の脳において転移がん細胞の成長および/または生存を阻害するための方法であって、被験体を治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を用いて治療するステップを含む方法を提供する。

【0011】

特定の非限定的な例では、ギャップジャンクション阻害剤は、コネキシン43阻害剤ま

50

たはプロトカドヘリン / 阻害剤、またはこれらの組合せである。特定の非限定的な例では、阻害剤は、トナベルサットまたはメクロフェナメートまたはこれらの組合せである。特定の非限定的な例では、がんは、乳がんまたは肺がんであり、かつ / または、被験体のがん細胞はコネキシン 43 および / またはプロトカドヘリン 7 を発現する。特定の非限定的な例では、方法は、被験体に、治療有効量の抗がん剤、例えば、これだけに限定されないが、カルボプラチンなどを投与するステップをさらに含む。本発明の方法を適用する時に、被験体は、1 つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた場合もあり、あるいは、治療前に脳転移を有することが分かっていなかった。

【 0 0 1 2 】

特定の非限定的な実施形態は、がんを有する被験体において脳転移を治療するための方法であって、被験体に治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。特定の非限定的な例では、ギャップジャンクション阻害剤は、コネキシン４３阻害剤またはプロトカドヘリン７阻害剤、またはこれらの組合せである。特定の非限定的な例では、阻害剤は、トナベルサットまたはメクロフェナメートまたはこれらの組合せである。特定の非限定的な例では、がんは、乳がんまたは肺がんであり、かつ／または、被験体のがん細胞はコネキシン４３および／またはプロトカドヘリン７を発現する。特定の非限定的な例では、方法は、被験体に、治療有効量の抗がん剤、例えば、これだけに限定されないが、カルボプラチンなどを投与するステップをさらに含む。本発明の方法を適用する時に、被験体は、１つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた場合もあり、あるいは、治療前に脳転移を有することが分かっていたいなかった。

**【 0 0 1 3 】**

特定の非限定的な実施形態は、がんを有する被験体においてがんの脳への転移を予防する方法であって、被験体に治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。特定の非限定的な例では、ギャップジャンクション阻害剤は、コネキシン 43 阻害剤またはプロトカドヘリン 7 阻害剤、またはこれらの組合せである。特定の非限定的な例では、阻害剤は、トナベルサットまたはメクロフェナメートまたはこれらの組合せである。特定の非限定的な例では、がんは、乳がんまたは肺がんであり、かつ/または、被験体のがん細胞はコネキシン 43 および/またはプロトカドヘリン 7 を発現する。特定の非限定的な例では、方法は、被験体に、治療有効量の抗がん剤、例えば、これだけに限定されないが、カルボプラチンなどを投与するステップをさらに含む。本発明の方法を適用する時に、被験体は、1 つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた場合もあり、あるいは、治療前に脳転移を有することが分かっていたいなかった。

【 0 0 1 4 】

特定の非限定的な実施形態は、がんを有する被験体においてがんの脳への検出可能な転移のリスクを低減する方法であって、被験体に治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。特定の非限定的な例では、ギャップジャンクション阻害剤は、コネキシン 43 阻害剤またはプロトカドヘリン 7 阻害剤、またはこれらの組合せである。特定の非限定的な例では、阻害剤は、トナベルサットまたはメクロフェナメートまたはこれらの組合せである。特定の非限定的な例では、がんは、乳がんまたは肺がんであり、かつ / または、被験体のがん細胞はコネキシン 43 および / またはプロトカドヘリン 7 を発現する。特定の非限定的な例では、方法は、被験体に、脳において治療レベルを実現することができる治療有効量の抗がん剤、例えば、これだけに限定されないが、カルボプラチンなどを投与するステップをさらに含む。本発明の方法を適用する時に、被験体は、1 つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた場合もあり、あるいは、治療前に脳転移を有することが分かっていたいなかった。

【 0 0 1 5 】

特定の非限定的な実施形態は、がんを有する被験体においてがんの脳への検出可能な転移のリスクを低減する方法であって、被験体に治療有効量のプロトカドヘリン7阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。特定の非限定的な例では、プロトカドヘリン7阻害剤は、干渉RNAである。特定の非限定的な例では、がんは、乳がんまたは肺がんである。

あり、かつ／または、被験体のがん細胞はコネキシン４３および／またはプロトカドヘリン７を発現する。特定の非限定的な例では、方法は、被験体に、治療有効量の抗がん剤、例えば、これだけに限定されないが、カルボプラチンなどを投与するステップをさらに含む。本発明の方法を適用する時に、被験体は、１つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた場合もあり、あるいは、治療前に脳転移を有することが分かっていたいなかった。

【００１６】

特定の非限定的な実施形態は、がんを有する被験体の生存期間を延長する方法であって、被験体に有効量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む方法であり、例えば、ギャップジャンクション阻害剤を投与が、脳のがんの転移性進行を阻害する方法を提供する。特定の非限定的な例では、ギャップジャンクション阻害剤は、コネキシン４３阻害剤またはプロトカドヘリン７阻害剤、またはこれらの組合せである。特定の非限定的な例では、阻害剤は、トナベルサットまたはメクロフェナメートまたはこれらの組合せである。特定の非限定的な例では、がんは、乳がんまたは肺がんであり、かつ／または、被験体のがん細胞はコネキシン４３および／またはプロトカドヘリン７を発現する。特定の非限定的な例では、方法は、被験体に、治療有効量の抗がん剤、例えば、これだけに限定されないが、カルボプラチンなどを投与するステップをさらに含む。本発明の方法を適用する時に、被験体は、１つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた場合もあり、あるいは、治療前に脳転移を有することが分かっていたいなかった。

【００１７】

特定の非限定的な実施形態は、ギャップジャンクション活性を評価するため、例えば、c G A M P の低下がギャップジャンクション阻害と相関する場合に、c G A M P のレベルを測定することによって阻害を評価するためのアッセイを提供する。特定の非限定的な実施形態は、被験体の脳において転移がん細胞の成長および／または生存を阻害するための方法であって、被験体を治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を用いて治療するステップであり、当該治療有効量のギャップジャンクション阻害剤が、その量のギャップジャンクション阻害剤の非存在下でのc G A M P のレベルと比較してc G A M P の低下をもたらすものであるステップを含む方法を提供する。さらなる非限定的な実施形態は、被験体において脳腫瘍または転移性脳腫瘍がギャップジャンクション阻害剤を用いた治療から治療的利益を受けるかどうかを決定する方法であって、前記腫瘍に由来する試料において、ギャップジャンクション阻害剤への曝露によりc G A M P の低下が導かれるかどうかを決定するステップを含み、c G A M P の低下が、治療的利益を示す、方法を提供する。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目１)

がんを有する被験体を治療するための方法であって、前記被験体に、脳における前記がんの転移性進行を阻害する量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む、方法。

(項目２)

前記ギャップジャンクション阻害剤がトナベルサットである、項目１に記載の方法。

(項目３)

前記ギャップジャンクション阻害剤がメクロフェナメートである、項目１に記載の方法

。

(項目４)

前記ギャップジャンクション阻害剤がコネキシン４３阻害剤である、項目１に記載の方法。

(項目５)

前記ギャップジャンクション阻害剤がプロトカドヘリン７阻害剤である、項目１に記載の方法。

(項目６)

前記がんが乳がんである、項目１から５のいずれかに記載の方法。

(項目７)

前記がんが肺がんである、項目 1 から 5 のいずれかに記載の方法。	
(項目 8)	
前記被験体に治療有効量の抗がん剤を投与するステップをさらに含む、項目 1 から 7 のいずれかに記載の方法。	
(項目 9)	
前記抗がん剤がカルボプラチンである、項目 8 に記載の方法。	
(項目 10)	
治療前に前記被験体が 1 つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた、項目 1 から 9 のいずれかに記載の方法。	
(項目 11)	10
治療前に前記被験体が脳転移を有することが分かっていなかった、項目 1 から 9 のいずれかに記載の方法。	
(項目 12)	
前記被験体のがん細胞がコネキシン 43 および / またはプロトカドヘリン 7 を発現する、項目 1 から 11 のいずれかに記載の方法。	
(項目 13)	
被験体の脳において転移がん細胞の成長および / または生存を阻害するための方法であって、前記被験体を治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を用いて治療するステップを含む、方法。	
(項目 14)	20
前記ギャップジャンクション阻害剤がトナベルサットである、項目 13 に記載の方法。	
(項目 15)	
前記ギャップジャンクション阻害剤がメクロフェナメートである、項目 13 に記載の方法。	
(項目 16)	
前記ギャップジャンクション阻害剤がコネキシン 43 阻害剤である、項目 13 に記載の方法。	
(項目 17)	
前記ギャップジャンクション阻害剤がプロトカドヘリン 7 阻害剤である、項目 13 に記載の方法。	30
(項目 18)	
前記がんが乳がんである、項目 13 から 17 のいずれかに記載の方法。	
(項目 19)	
前記がんが肺がんである、項目 13 から 17 のいずれかに記載の方法。	
(項目 20)	
前記被験体に治療有効量の抗がん剤を投与するステップをさらに含む、項目 13 から 19 までのいずれかに記載の方法。	
(項目 21)	
前記抗がん剤がカルボプラチンである、項目 20 に記載の方法。	
(項目 22)	40
治療前に前記被験体が 1 つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた、項目 13 から 21 のいずれかに記載の方法。	
(項目 23)	
治療前に前記被験体が脳転移を有することが分かっていなかった、項目 13 から 21 のいずれかに記載の方法。	
(項目 24)	
前記被験体のがん細胞がコネキシン 43 および / またはプロトカドヘリン 7 を発現する、項目 13 から 23 のいずれかに記載の方法。	
(項目 25)	
がんを有する被験体において脳転移を治療するための方法であって、前記被験体に治療	50

有効量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む、方法。

(項目 2 6 )

前記ギャップジャンクション阻害剤がトナベルサットである、項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 7 )

前記ギャップジャンクション阻害剤がメクロフェナメートである、項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 8 )

前記ギャップジャンクション阻害剤がコネキシン 4 3 阻害剤である、項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 9 )

前記ギャップジャンクション阻害剤がプロトカドヘリン 7 阻害剤である、項目 2 5 に記載の方法。

(項目 3 0 )

前記がんが乳がんである、項目 2 5 から 2 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 3 1 )

前記がんが肺がんである、項目 2 5 から 2 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 3 2 )

前記被験体に治療有効量の抗がん剤を投与するステップをさらに含む、項目 2 5 から 3 1 のいずれかに記載の方法。

(項目 3 3 )

前記抗がん剤がカルボプラチンである、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4 )

治療前に前記被験体が 1 つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた、項目 2 5 から 3 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 3 5 )

治療前に前記被験体が脳転移を有することが分かっていなかった、項目 2 5 から 3 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 3 6 )

前記被験体のがん細胞がコネキシン 4 3 および / またはプロトカドヘリン 7 を発現する、項目 2 5 から 3 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 3 7 )

がんを有する被験体において前記がんの脳への転移を予防する方法であって、前記被験体に治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む、方法。

(項目 3 8 )

前記ギャップジャンクション阻害剤がトナベルサットである、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 3 9 )

前記ギャップジャンクション阻害剤がメクロフェナメートである、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 4 0 )

前記ギャップジャンクション阻害剤がコネキシン 4 3 阻害剤である、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 4 1 )

前記ギャップジャンクション阻害剤がプロトカドヘリン 7 阻害剤である、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 4 2 )

前記がんが乳がんである、項目 3 7 から 4 1 のいずれかに記載の方法。

(項目 4 3 )

前記がんが肺がんである、項目 3 7 から 4 1 のいずれかに記載の方法。

(項目 4 4 )

前記被験体に治療有効量の抗がん剤を投与するステップをさらに含む、項目 3 7 から 4

10

20

30

40

50



3 のいずれかに記載の方法。

(項目 4 5 )

前記抗がん剤がカルボプラチンである、項目 4 4 に記載の方法。

(項目 4 6 )

治療前に前記被験体が 1 つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた、項目 3 7 から 4 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 4 7 )

治療前に前記被験体が脳転移を有することが分かっていなかった、項目 3 7 から 4 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 4 8 )

前記被験体のがん細胞がコネキシン 4 3 および / またはプロトカドヘリン 7 を発現する、項目 3 7 から 4 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 4 9 )

がんの脳への検出可能な転移のリスクを低減する方法であって、前記がんを有する被験体に治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む、方法。

(項目 5 0 )

前記ギャップジャンクション阻害剤がトナベルサットである、項目 4 9 に記載の方法。

(項目 5 1 )

前記ギャップジャンクション阻害剤がメクロフェナメートである、項目 4 9 に記載の方法。

(項目 5 2 )

前記ギャップジャンクション阻害剤がコネキシン 4 3 阻害剤である、項目 4 9 に記載の方法。

(項目 5 3 )

前記ギャップジャンクション阻害剤がプロトカドヘリン 7 阻害剤である、項目 4 9 に記載の方法。

(項目 5 4 )

前記がんが乳がんである、項目 4 9 から 5 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 5 5 )

前記がんが肺がんである、項目 4 9 から 5 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 5 6 )

前記被験体に治療有効量の抗がん剤を投与するステップをさらに含む、項目 4 9 から 5 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 5 7 )

前記抗がん剤がカルボプラチンである、項目 5 6 に記載の方法。

(項目 5 8 )

治療前に前記被験体が 1 つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた、項目 4 9 から 5 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 5 9 )

治療前に前記被験体が脳転移を有することが分かっていなかった、項目 4 9 から 5 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 0 )

前記被験体のがん細胞がコネキシン 4 3 および / またはプロトカドヘリン 7 を発現する、項目 4 9 から 5 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 1 )

がんを有する被験体において前記がんの脳への検出可能な転移のリスクを低減する方法であって、前記被験体に治療有効量のプロトカドヘリン 7 阻害剤を投与するステップを含む、方法。

(項目 6 2 )

前記プロトカドヘリン 7 阻害剤が干渉 RNA である、項目 6 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 6 3)前記がんが乳がんである、項目 6 1 または 6 2 のいずれかに記載の方法。(項目 6 4)前記がんが肺がんである、項目 6 1 または 6 2 のいずれかに記載の方法。(項目 6 5)前記被験体に治療有効量の抗がん剤を投与するステップをさらに含む、項目 6 1 から 6 4 のいずれかに記載の方法。(項目 6 6)前記抗がん剤がカルボプラチンである、項目 6 5 に記載の方法。(項目 6 7)治療前に前記被験体が 1 つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた、項目 6 1 から 6 6 のいずれかに記載の方法。(項目 6 8)治療前に前記被験体が脳転移を有することが分かっていなかった、項目 6 1 から 6 6 のいずれかに記載の方法。(項目 6 9)前記被験体のがん細胞がコネキシン 4 3 および / またはプロトカドヘリン 7 を発現する、項目 6 1 から 6 8 のいずれかに記載の方法。(項目 7 0)がんを有する被験体の生存期間を延長するための方法であって、前記被験体に、有効量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む、方法。(項目 7 1)前記ギャップジャンクション阻害剤を投与することにより、脳における前記がんの転移性進行が阻害される、項目 7 0 に記載の方法。(項目 7 2)前記ギャップジャンクション阻害剤がトナベルサットである、項目 7 0 または 7 1 に記載の方法。(項目 7 3)前記ギャップジャンクション阻害剤がメクロフェナメートである、項目 7 0 または 7 1 に記載の方法。(項目 7 4)前記ギャップジャンクション阻害剤がコネキシン 4 3 阻害剤である、項目 7 0 または 7 1 に記載の方法。(項目 7 5)前記ギャップジャンクション阻害剤がプロトカドヘリン 7 阻害剤である、項目 7 0 または 7 1 に記載の方法。(項目 7 6)前記がんが乳がんである、項目 7 0 から 7 5 のいずれかに記載の方法。(項目 7 7)前記がんが肺がんである、項目 7 0 から 7 5 のいずれかに記載の方法。(項目 7 8)前記被験体に治療有効量の抗がん剤を投与するステップをさらに含む、項目 7 0 から 7 7 のいずれかに記載の方法。(項目 7 9)前記抗がん剤がカルボプラチンである、項目 7 8 に記載の方法。(項目 8 0)治療前に前記被験体が 1 つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた、項目 7 0 から 7 9 のいずれかに記載の方法。(項目 8 1)治療前に前記被験体が脳転移を有することが分かっていなかった、項目 7 0 から 7 9 の

10

20

30

40

50

いずれかに記載の方法。

(項目 8 2)

前記被験体のがん細胞がコネキシン 4 3 および / またはプロトカドヘリン 7 を発現する、項目 7 0 から 8 1 のいずれかに記載の方法。

(項目 8 3)

がんを有する被験体を治療するための方法において使用するためのギャップジャンクション阻害剤であって、前記ギャップジャンクション阻害剤の投与が、脳における前記がんの転移性進行を阻害する、ギャップジャンクション阻害剤。

(項目 8 4)

トナベルサットである、項目 8 3 に記載のギャップジャンクション阻害剤。

(項目 8 5)

メクロフェナメートである、項目 8 3 に記載のギャップジャンクション阻害剤。

(項目 8 6)

コネキシン 4 3 阻害剤である、項目 8 3 に記載のギャップジャンクション阻害剤。

(項目 8 7)

プロトカドヘリン 7 阻害剤である、項目 8 3 に記載のギャップジャンクション阻害剤。

(項目 8 8)

被験体の脳において転移がん細胞の成長および / または生存を阻害するための方法であって、前記被験体を治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を用いて治療するステップを含み、当該治療有効量のギャップジャンクション阻害剤が、その量のギャップジャンクション阻害剤の非存在下での c G A M P のレベルと比較して c G A M P の低下をもたらすものである、方法。

(項目 8 9)

被験体における脳腫瘍または転移性脳腫瘍がギャップジャンクション阻害剤を用いた治療から治療的利益を受けるかどうかを決定する方法であって、前記腫瘍に由来する試料において、ギャップジャンクション阻害剤への曝露により c G A M P の低下が導かれるかどうかを決定するステップを含み、c G A M P の低下が、治療的利益を示す、方法。

(項目 9 0)

被験体の脳において転移がん細胞の成長および / または生存を阻害する方法であって、( i ) 前記被験体が、ギャップジャンクション阻害剤を用いた治療から治療的利益を受けるかどうかを決定するステップであり、前記被験体のがん細胞 ( 脳転移、原発腫瘍、または前記脳の外の転移性腫瘍から得ることができる ) が、ギャップジャンクション阻害剤に曝露させた場合に、前記阻害剤の非存在下での c G A M P レベルと比較して c G A M P の低下を示すかどうかを決定することを含み、ここで c G A M P の低下が、治療的利益を示す、ステップと、( i i ) c G A M P の低下が観察された場合には前記ギャップジャンクション阻害剤を用いて前記被験体を治療するか、または、c G A M P の低下が観察されなかった場合には別のギャップジャンクション阻害剤を腫瘍細胞における c G A M P を低下させるその能力についてアッセイするかもしくは別のモダリティを用いて前記被験体を治療するステップとを含む、方法。

(項目 9 1)

被験体において脳腫瘍の成長を阻害する方法であって、( i ) 前記被験体が、ギャップジャンクション阻害剤を用いた治療から治療的利益を受けるかどうかを決定するステップであり、前記被験体の腫瘍細胞が、ギャップジャンクション阻害剤に曝露させた場合に、前記阻害剤の非存在下での c G A M P レベルと比較して c G A M P の低下を示すかどうかを決定することを含むステップであり、ここで c G A M P の低下が、治療的利益を示す、ステップと、( i i ) c G A M P の低下が観察された場合には前記ギャップジャンクション阻害剤を用いて前記被験体を治療するか、または、c G A M P の低下が観察されなかった場合には別のギャップジャンクション阻害剤を前記腫瘍細胞における c G A M P を低下させるその能力についてアッセイするかもしくは別のモダリティを用いて前記被験体を治療するステップとを含む、方法。

10

20

30

40

50

## ( 項 目 9 2 )

項目 8 8 から 9 1 に従って c G A M P を測定するためのキットであって、少なくとも 1 つの c G A M P 標準物質、および脳腫瘍におけるギャップジャンクション阻害を用いた c G A M P の低下に関する情報を含む、キット。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 1 8 】

【図 1】図 1 A ~ K、脳転移との C x 4 3 および P C D H 7 の関連。( A ) マウスにおける心臓内接種後の初期 ( 7 日目 ) および後期 ( 2 1 日目 ) の時点で、脳実質内で G F P + H 2 0 3 0 - B r M 3 細胞 ( 緑色 ) が G F A P + 活性化アストロサイト ( 赤色 ) で囲まれている。青色は、血管における I V 型コラーゲン ( C o l I V ) 染色である。スケールバーは 1 0 μ m である。( B ) G F P + H 2 0 3 0 - B r M 3 ( 緑色 ) と G F A P + アストロサイト ( 青色 ) の界面における C x 4 3 染色 ( 矢じり )。スケールバーは 1 0 μ m である。( C ) トリプルネガティブ乳がんおよび非小細胞肺癌由来のヒト脳転移試料における C x 4 3 染色の代表的な画像。原発性 ( 1 r y ) 腫瘍、脳転移、および正常な肺組織における C x 4 3 陽性試料の割合を定量化した。スケールバーは 1 0 0 μ m である。( D ) 非小細胞肺癌患者由来の対応する原発性および脳転移試料における C x 4 3 免疫染色の代表的な画像および定量化。スケールバーは 1 0 0 μ m である。( E ) 色素移行アッセイの概略図。( F ) アストロサイトからがん細胞への色素移行の定量化。ヒストグラムは、親細胞 ( P a r ) および B r M 細胞における赤色蛍光シグナルを示す。全ての値は平均 ± S . E . M . ( n = 3 の生物学的反復 )。n = 3 の独立した実験。( G ~ I ) 示されている親および脳転移派生物 ( ( G ) n = 3 の独立した実験 )、脳細胞型と比較した脳転移細胞 ( ( H ) n = 2 の独立した実験 )、ならびに脳、肺 ( L M ) または骨 ( B o M ) に転移した M D A 2 3 1 派生物 ( ( I ) n = 2 の独立した実験 ) における C x 4 3 および P C D H 7 のウエスタン免疫プロットティング。( J ~ K ) 1 8 9 症例のトリプルネガティブ乳がん ( J ) および 1 2 9 症例 ( M S K C C s e t 2 ) および 5 8 症例 ( G S E 3 1 4 1 ) の肺腺癌 ( K ) における、原発性腫瘍における C x 4 3 / P C D H 7 発現に基づく脳転移のない累積的な生存期間のカプラン・マイヤープロット。

## 【 0 0 1 9 】

【図 2】図 2 A ~ G、C x 4 3 / P C D H 7 癌腫 - アストロサイトギャップジャンクションにより脳転移が媒介される。( A ) アストロサイトから対照および C x 4 3 枯渇または P C D H 7 枯渇脳転移細胞への色素移行のヒストグラム ( 上 ) および定量化 ( 下 )。値は平均 ± S . E . M . である ( n = 3 の生物学的反復 )。n = 3 の独立した実験。( B ) C x 4 3 - P C D H 7 相互作用を検出するためのルシフェラーゼ補完アッセイ。N L u c および C L u c はホタルルシフェラーゼの N 末端側半分および C 末端側半分である。表 ( 上 ) は、アッセイ ( 下 )、および代表的なプレートの生物発光イメージング ( B L I ) において使用した細胞株組合せを数字で同定する。対照、C x 4 3 枯渇、または P C D H 7 枯渇脳転移細胞によって形成された脳転移病変の B L I ( C ) および定量化 ( D )。n = 3 の独立した実験。( E、F ) 野生型 ( W T ) C x 4 3 または T 1 5 4 A 変異体 ( M u t ) C x 4 3 を C x 4 3 枯渇 M D A 2 3 1 - B r M 2 細胞 ( C x 4 3 s h 2 ) において再発現させた。この細胞を、アストロサイト色素移行分析 ( ( E ) n = 3 の独立した実験 )、または脳転移アッセイおよび B L I 定量化 ( ( F ) n = 2 の独立した実験 ) に供した。( G ) 脳転移におけるがん細胞とアストロサイトの間の C x 4 3 媒介性相互作用および P C D H 7 媒介性相互作用の概略図。

## 【 0 0 2 0 】

【図 3】図 3 A ~ I、ギャップジャンクションによりがん細胞における S T A T 1 および N F - B 経路が活性化される。( A ) アストロサイトと共培養した後の M D A 2 3 1 - B r M 2 細胞からの T R A P - S e q データのシグナル伝達経路分析。L 1 0 a - G F P リボソームタンパク質融合物を発現する対照 ( C t r l ) または C x 4 3 枯渇 M D A 2 3 1 - B r M 2 細胞をアストロサイトと 2 4 時間にわたって共培養した後、ポリソーム免疫沈降および m R N A 配列決定を行った。ヒートマップは、青色 ( 下方制御された ) 経路お

よび赤色（上方制御された）経路を示す。n = 2の生物学的反復。（B、C）アストロサイト共培養からの馴化培地（CM）と一緒に2時間インキュベートした後のMDA231 - BrM2細胞におけるSTAT1およびNF- $\kappa$ B p65リン酸化。CMを、アストロサイトを対照またはC x 43 枯渴MDA231 - BrM2細胞と24時間共培養した後に回収したか（B）、または、野生型C x 43（WT）もしくはC x 43（T154A）変異体（Mut）を形質導入したC x 43 枯渴MDA231 - BrM2細胞から回収した（C）。n = 3の独立した実験。（D）アストロサイトと、示されているMDA231 - BrM2細胞との共培養からのCMにおけるIFN $\gamma$  およびTNF $\alpha$  のELISA。全ての値は平均 $\pm$  S.E.M.である（n = 4の技術的反復）。n = 2の独立した実験。（E）MDA231 - BrM2がん細胞と共培養した後に再単離したアストロサイトにおけるIFN $\alpha$ およびTNF $\alpha$ の相対的なmRNAレベル。全ての値は平均 $\pm$  S.E.M.である（n = 3の生物学的反復）。n = 2の独立した実験。（F）10ユニット/ml（39ユニット/ng）のIFN $\alpha$ または10pg/mlのTNF $\alpha$ の存在下または非存在下で様々な濃度のカルボプラチン（Carbo）を用いて処理したMDA231 - BrM2細胞における切断カスパーゼ3の相対的なレベル。全ての値は平均 $\pm$  S.E.M.である（n = 5の技術的反復）。n = 3の独立した実験。（G）対照およびSTAT1ノックダウンMDA231 - BrM2細胞におけるSTAT1レベル。（H）対照pBABEまたはSR - I B ベクターを発現するMDA231 - BrM細胞におけるNF- $\kappa$ B ウミシタケルシフェラーゼレポーターアッセイ。全ての値は平均 $\pm$  S.E.M.である（n = 3の技術的反復）。（I）対照、STAT1ノックダウン、およびSR - I B MDA231 - BrM2細胞によって形成された脳転移からのBLIシグナルの定量化。n = 2の独立した実験。

#### 【0021】

【図4】図4A～H、ギャップジャンクションによりアストロサイトにおける細胞質dsDNA応答が媒介される。（A）対照shRNA（Ctrl sh）またはC x 43を標的とするshRNAを発現するMDA231 - BrM2細胞を、アストロサイトを伴ってまたは伴わずに18時間にわたって培養し、リン酸化TBK1およびIRF3の免疫プロテイング分析に供した（n = 3の独立した実験）。（B）MDA231 - BrM2単独、アストロサイト単独、または18時間共培養物を試料の調製およびLC - MS/MSによるcGAMP分析のために採取した。ヒストグラム（右）は、（左）の正規化されたcGAMPピークに対応し、5つの生物学的反復を表す。n = 3の独立した実験。図16も参照されたい。（C）IRF3およびGFPの二重免疫蛍光染色の代表的な画像。DAPIは核染色である。共培養において、白色の矢印はアストロサイトにおけるIRF3の核内蓄積であり、緑色の矢印は、GFP + MDA231 - BrM2細胞におけるIRF3の均一な分布である。スケールバーは20 $\mu$ mである。n = 2の独立した実験。（D）2 $\times$ 10<sup>7</sup>個の細胞からの示されている細胞画分におけるdsDNAの定量化。値は平均 $\pm$  S.E.M.である（n = 3の生物学的反復）。n = 2の独立した実験。（E）MDA231 - BrM2細胞におけるdsDNA、GFP、およびCox IV（ミトコンドリアのマーカー）の免疫蛍光染色の代表的な画像。DAPIは核染色である。スケールバーは10 $\mu$ mである。n = 2の独立した実験。（F、G）EdU標識したMDA231 - BrM2細胞をアストロサイトと6時間にわたって共培養した。EdU標識されたDNAのがん細胞からアストロサイトへの移行を、共焦点顕微鏡を使用して可視化したか（F）、またはフローサイトメトリーによって定量化した（G）。がん細胞およびアストロサイトはそれぞれ緑色の点線および白色の点線で描写されている。スケールバーは10 $\mu$ mである。値は平均 $\pm$  S.E.M.である（n = 3の生物学的反復、n = 2の独立した実験）。（H）脳転移を支持するための、ギャップジャンクション媒介性抗dsDNA応答、アストロサイトにおけるIFN $\gamma$  およびTNF $\alpha$  の産生、および結果としてのがん細胞におけるSTAT1およびNF- $\kappa$ B 経路の活性化の概略図。

#### 【0022】

【図5】図5A～I、ギャップジャンクション活性の阻害により脳転移増生が制御される

。(A)示されている濃度のトナベルサットまたはメクロフェナメートの存在下でのアストロサイトからMDA231-BrM2細胞への色素移行。n 3の独立した実験。(B)示されている濃度のトナベルサット(Tona)またはメクロフェナメート(Meclo)の存在下で共培養されたMDA231-BrM2細胞とアストロサイトからの馴化培地におけるIFN およびTNF のELISA。示されているグラフは全て平均±S.E.M.である(n=4の技術的反復)。n=2の独立した実験。(C)トナベルサットまたはメクロフェナメートを、マウスへのがん細胞接種の1日後に開始して毎日投与した。脳転移病変をBLIに基づいて定量化した。n=2の独立した実験。(D)14日目の脳転移病変のGFP染色。代表的な画像は、大きな進行性病変を示す。DAPIは核染色である。スケールバーは40μmである。n=10の実験マウス。(E)スキームに例示されている通り、誘導性対照、CX43またはPCDH7 shRNAを形質導入したMDA231-BrM2細胞を接種した14日後にマウスをドキシサイクリンおよびカルボプラチンを用いて処置した。脳転移病変をBLIに基づいて定量化した。(F、G)対応するex vivo脳BLIおよび赤色蛍光イメージングの代表的な画像。n=2の独立した実験。(H)MDA231-BrM2細胞を接種した14日後にマウスをトナベルサット、メクロフェナメート、およびカルボプラチンを用いて処置した。示されているレジメンに従って、脳転移病変をBLIに基づいて定量化した。n=2の独立した実験(I)

10

#### 【0023】

【図6】図6A~D、がん細胞-アストロサイト相互作用。(A)この研究において使用したがん細胞。(B)アストロサイト共培養によりがん細胞が保護される。模式図(左)において例示されている通り、sFasL処理または化学的処理後の切断カスパーゼ3+/GFP+アポトーシス性BrM細胞を定量化した。n=3の独立した実験。(C、D)アストロサイトとBrM細胞との間のギャップジャンクションコミュニケーション。MDA231-BrM2細胞からアストロサイトへの色素移行の微速度撮影画像(C)。スケールバーは100μmである。アストロサイトからMDA231-BrM2細胞への色素移行の、時間をわたってのフローサイトメトリーによる定量化(D)。n=3の独立した実験。

20

#### 【0024】

【図7】図7、脳転移がん細胞およびアストロサイトにおけるCx43およびPCDH7の発現の上昇。(A)親細胞(Par)およびBrM細胞におけるCx43 mRNAおよびPCDH7 mRNA。値は平均±S.E.M.である(n=3の技術的反復)。n=3の独立した実験。(B)Erbb2親細胞および脳細胞、ならびにKras/p53細胞株におけるCx43およびPCDH7のウエスタンブロッティング。n=3の独立した実験。(C)脳細胞と比較した、BrM細胞におけるCx43 mRNAおよびPCDH7 mRNA。n=3の独立した実験。(D)MDA231親細胞(Par)ならびに脳(BrM2)、肺(LM)および骨(BoM)の転移派生物におけるCx26 mRNAおよびCx30 mRNA。(E)原発性腫瘍におけるCx43/PCDH7発現に基づく、63症例(GSE8893)の肺腺癌における累積的な無転移生存の確率を例示する Kaplan-Meierプロット。(F、G)RT-PCR(F)およびウエスタンブロッティング(G)によって評価される、低分子ヘアピン型RNA(shRNA)を用いたCx43およびPCDH7のノックダウン。Ctrlは対照である。値は平均±S.E.M.である(n=3の技術的反復)。n=3の独立した実験。

30

40

#### 【0025】

【図8】図8A~H、PCDH7によりギャップジャンクションコミュニケーションが容易になる。(A、B)カルベノキソロン(50μM)処理と比較した、アストロサイトから対照およびCx43枯渇またはPCDH7枯渇Kras/p53-393N1細胞への色素移行(A)、ならびにアストロサイトから対照またはCx43枯渇MDA231-BrM2細胞への色素移行(B)のヒストグラムおよび定量化。(C、D)アストロサイト内のPCDH7によりギャップジャンクションが容易になる。対照またはPCDH7枯渇

50

アストロサイトにおけるPCDH7のウエスタンブロッティング(C)。MDA231-BrM2細胞からPCDH7枯渴アストロサイトへの色素移行の定量化(D)。(E)ヒト脳微小血管内皮細胞(HBMEC)から対照、Cx43枯渴またはPCDH7枯渴MDA231-BrM2細胞への色素移行の定量化。(F)MDA231-BrM2細胞からアストロサイトとHBMECの混合集団への色素移行。(G)対照またはCx43枯渴MDA231-BrM2細胞からヒトミクログリアへの色素移行の定量化。(H)模式図において例示されている通り、MDA231-BrM2細胞(左)またはアストロサイト(右)におけるCx43 mRNAを、トランスウェルによって分離されたミクログリア、アストロサイトまたはがん細胞を用いた24時間の共培養後に検出した。色素移行アッセイに関して、値は平均±S.E.M.である(n=3の生物学的反復)。n=2の独立した実験。hでは、値は平均±S.E.M.である(n=4の生物学的反復)。

10

#### 【0026】

【図9】図9A~D、Cx43はPCDH7とは直接相互作用するが、EカドヘリンまたはNカドヘリンとは直接相互作用しない。(A)融合タンパク質を過剰発現するがん細胞におけるCx43およびPCDH7のウエスタン免疫ブロッティング。(B)Cx43-CLuc/PCDH7-NLuc(+)がん細胞とアストロサイトを15分にわたって共培養した後のBLIの定量化。c~e、Cx43-EカドヘリンまたはCx43-Nカドヘリン相互作用を検出するためのルシフェラーゼスプリットアッセイ。NLucおよびCLucは、ホタルルシフェラーゼのN末端側半分およびC末端側半分である。表(C)は、アッセイ、融合タンパク質を過剰発現するがん細胞におけるEカドヘリン発現またはNカドヘリン発現を示すウエスタン免疫ブロッティング(D)、および代表的なプレートの生物発光イメージング(BLI)(e)において使用した細胞株組合せを数字で同定するものである。n=2の独立した実験。

20

#### 【0027】

【図10】図10A~E、ギャップジャンクション活性の阻害により脳転移増生が予防される。(A)対照(Ctrl)、Cx43枯渴またはPCDH7枯渴Kras/p53-393N1細胞によって形成された脳転移病変の生物発光イメージング(BLI)定量化。n=2の独立した実験。(B)対照、Cx43枯渴またはPCDH7枯渴MDA231-BrM2細胞によって形成されたGFP+脳転移病変の代表的な画像。脳切片または脳転移病変がそれぞれ白色の点線または赤色の点線で描写されている。スケールバーは1000μmである。(C)MDA231-BrM2細胞によって形成された肺転移病変のBLI(画像)および定量化(棒グラフ)。値は平均±S.E.M.である(各群n=5のマウス)。n=2の独立した実験。(D、E)ギャップジャンクション媒介性脳転移にはCx43のチャネル機能が必要である。野生型(WT)Cx43またはT154A変異体(Mut)Cx43をCx43枯渴MDA231-BrM2細胞(CX43sh2)において再発現させた。ウエスタンブロッティングによってCx43発現を検出し(D)、これらの細胞によって形成された脳転移をBLIによって定量化した(E)。n=2の独立した実験。

30

#### 【0028】

【図11】図11A~D、脳転移におけるCx43およびPCDH7の役割。(A)Cx43およびPCDH7により、BBBを越える遊走は媒介されない。7日目の脳病変における対照(Ctrl)、Cx43枯渴またはPCDH7枯渴MDA231-BrM2細胞の定量化。値は平均±S.E.M.である(各群n=5の脳)。(B)14日目の脳病変において、Cx43およびPCDH7によりがん細胞コロニー形成が媒介される。代表的な画像は、GFP染色(緑色)およびKi67染色(赤色)である。DAPIは核染色である。スケールバーは20μmである。棒グラフは、Ki67+がん細胞の割合である。値は平均±S.E.M.である(各群n=5の脳)。(C)Cx43およびPCDH7により、がん細胞生存が媒介される。脳スライスアッセイ。代表的な画像は、GFP染色(緑色)および切断カスパーゼ3(Casp3)染色(赤色)である。スケールバーは30μmである。ヒストグラムは、カスパーゼ3+アポトーシス性がん細胞の割合である。値

40

50

は平均 $\pm$ S.E.M.である(各群 $n=5$ の脳スライス)。スケールバーは $30\mu\text{m}$ である。(D)14日目の脳病変において、 $Cx43$ およびPCDH7はがん細胞による血管の利用には影響を及ぼさない。代表的な画像は、GFP染色(緑色)であり、血管構造はTRITCデキストランで満たされた(赤色)。スケールバーは $20\mu\text{m}$ である。 $n=2$ の独立した実験。

#### 【0029】

【図12】図12A~D、翻訳リボソームアフィニティー精製(translating ribosome affinity purification)(TRAP)およびサイトカインアレイ。(A)3つの条件(#1、#2、#3)の下でMDA231-BrM2細胞から翻訳mRNAを単離するためのTRAP実験設定の概略図。(B)TRAP mRNA配列決定の主成分(PC)分析。(C)アストロサイト、およびBrM細胞とアストロサイトとの間のギャップジャンクションコミュニケーションによって調節されるlog2倍率変化の散布図。(D)アストロサイト共培養からの馴化培地(CM)と一緒に2時間インキュベートした後のH2030-BrM3細胞におけるSTAT1およびNF- $\kappa$ B p65リン酸化。アストロサイトを対照または $Cx43$ 枯渇H2030-BrM3細胞と24時間共培養した後にCMを回収した。 $n=3$ の独立した実験。

10

#### 【0030】

【図13】図13A~F、ギャップジャンクションにより生じるシグナル伝達によってがん細胞におけるIFNおよびNF- $\kappa$ B経路が活性化される。(A)アストロサイトを対照または $Cx43$ 枯渇MDA231-BrM2細胞と24時間共培養した後に回収した馴化培地のサイトカインアレイ分析。Log2倍率変化をプロットした。(B)アストロサイトと示されているH2030-BrM3細胞との共培養物からのCMにおけるIFNおよびTNFのELISA。示されている全ての値は平均 $\pm$ S.E.M.である( $n=4$ の技術的反復)。 $n=2$ の独立した実験。(C)10ユニット/ml(39ユニット/ng)の組換えIFN-Aまたは10pg/mlの組換えTNFの存在下または非存在下で様々な濃度のタキソールを用いて処理したH2030-BrM3細胞における切断カスパーゼ3の相対的なレベル。全ての値は平均 $\pm$ S.E.M.である( $n=5$ の技術的反復)。 $n=3$ の独立した実験。(D、E)対照およびSTAT1ノックダウンH2030-BrM3細胞におけるSTAT1レベル。(F)対照、STAT1ノックダウン細胞によって形成された脳転移からのBLIシグナルの定量化。 $n=2$ の独立した実験。

20

30

#### 【0031】

【図14】図14A~G、ギャップジャンクションにより、アストロサイトにおける細胞質DNA応答が開始されることを示す図である。(A)対照または $Cx43$ 枯渇H2030-BrM3細胞を、アストロサイトを伴ってまたは伴わずに18時間にわたって共培養し、リン酸化TBK1およびIRF3の免疫ブロッティング分析に供した( $n=3$ の独立した実験)。(B)cGAMP同定。4.47分におけるピークは、cGAMPに特異的な3つのSRMトランジション全てを含有する。RT:保持時間、AA:自動的に積分されたピーク面積。(C) $2\times 10^7$ 個のH2030-BrM3細胞からの示されている細胞画分におけるdsDNAの定量化。値は平均 $\pm$ S.E.M.である( $n=3$ の生物学的反復)。 $n=2$ の独立した実験。(D)示されているがん細胞および非新生物細胞における細胞質dsDNAと核dsDNAの比。(E)H2030-BrM3細胞におけるdsDNA、GFP、Cox IV(ミトコンドリアマーカー)の免疫蛍光染色の代表的な画像。DAPIは核染色である。スケールバーは $10\mu\text{m}$ である。(F)アストロサイトにおけるdsDNA、Cox IV(ミトコンドリアマーカー)の免疫蛍光染色の代表的な画像。DAPIは核染色である。ファロイジンは細胞骨格染色である。スケールバーは $10\mu\text{m}$ である。(G)EdU標識したH2030-BrM3細胞をアストロサイトと6時間にわたって共培養した。EdU標識されたDNAのがん細胞からアストロサイトへの移行を、共焦点顕微鏡を使用して可視化した。がん細胞またはアストロサイトをそれぞれ緑色または白色の点線で描写した。スケールバーは $10\mu\text{m}$ である。 $n=2$ の独立した実験。

40

50



## 【0032】

【図15】図15、ギャップジャンクション活性の阻害により脳転移増生が予防される。(A~D) トナベルサット (Tona) またはメクロフェナメート (Meclo) を用いた処理後 (A)、脳転移 (B)、乳房脂肪パッドにおける原発性腫瘍成長 (C)、または肺転移 (D) をBLIによって定量化した。値は平均  $\pm$  S.E.M. である (各群  $n = 5$  のマウス)。  $n = 2$  の独立した実験。(E、F) *in vitro* におけるドキシサイクリン処理後のRT-PCR (E) およびウエスタン免疫ブロッティング (F) によって評価される、tet-on誘導性低分子ヘアピン型RNA (shRNA) を用いたMDA231-BrM2細胞におけるCx43およびPCDH7のノックダウン。  $n = 2$  の独立した実験。(G) MDA231-BrM2細胞を接種した14日後の脳ex vivo生物発光イメージング (BLI)。

10

## 【0033】

【図16】図16、cGAMP同定の確認。LC-MS/MSによって分析した、図4bに示されている全ての実験条件からのプールした試料。4.47分におけるピークのみがcGAMPに特異的な3つのSRMトランジションを全て含有する。4.47分におけるピークは、プールした試料に40nMの環状[G(2', 5')pA(3', 5')p] (cGAMP) 5  $\mu$ Lを添加することによって増大する。内部対照および陰性対照として、c-di-GMPは、4.97分のピークにおいて2つのSRMトランジションの全てを含有し、このピークは標準cGAMPを添加することによって変化しない。dRT: 保持時間、AA: 自動的に積分されたピーク面積。

20

## 【発明を実施するための形態】

## 【0034】

## 5. 詳細な説明

明確にするために、また、限定するものではなく、本発明の詳細な説明を以下の小節に分ける：

- (i) ギャップジャンクション阻害剤；
  - (a) コネキシン43阻害剤；および
  - (b) プロトカドヘリン7阻害剤；
  - (c) ギャップジャンクション活性/阻害についてのアッセイ；
- (ii) がん標的；
- (iii) 医薬製剤；ならびに
- (iv) 治療方法

30

## 【0035】

## 5.1 ギャップジャンクション阻害剤

本発明は、開示されている方法において使用するための、ギャップジャンクションの阻害剤 (例えば、ギャップジャンクションアンタゴニスト) を提供する。ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤は、ギャップジャンクション構成成分の発現および/もしくは活性を阻害および/もしくは低減する、または、ギャップジャンクションの形成、開通性、シグナル伝達および/または活性を阻害および/または低減する化合物、小分子、化学物質、ポリペプチド、核酸およびタンパク質を含み得る。

40

## 【0036】

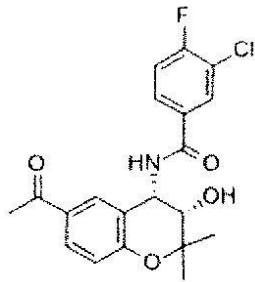
ある特定の非限定的な実施形態では、小分子であるギャップジャンクション阻害剤としては、カルベノキシロン、グリチルレチン酸、キニーネ、キニジン、メフロキン、ヘプタノール、オクタノール、アナンダミド、フェナメート、2-アミノエトキシジフェニルボレート (2-APB)、レチノイン酸、オレアミド、スベルミン、アミノスルホネート、プロピオン酸ナトリウム、トナベルサットおよびメクロフェナメート (meclofenamate) (メクロフェナム酸) が挙げられる。ギャップジャンクション阻害剤のさらなる非限定的な例は、米国特許第5,843,989号；同第6,211,211号；同第7,632,866号；同第6,251,931号；同第7,704,946号；およびPCT特許出願第WO1999/026584号に開示されている。

50

## 【 0 0 3 7 】

ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤は、以下の構造：

## 【 化 1 】



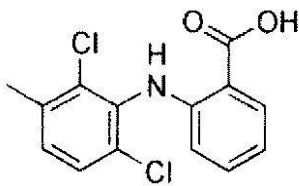
10

を有する式 I の化合物を含む。

## 【 0 0 3 8 】

ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤は、以下の構造：

## 【 化 2 】



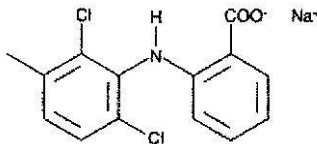
20

を有する式 I I の化合物を含む。

## 【 0 0 3 9 】

ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤は、以下の構造：

## 【 化 3 】



30

を有する式 I I I の化合物を含む。

## 【 0 0 4 0 】

ある特定の非限定的な実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤は、式 I ~ I I I の化合物の塩、立体異性体、類似体または誘導体の形態であってよい。限定するものではなく、例として、ギャップジャンクション阻害剤は、式 I I のナトリウム塩の形態を含んでよい。

## 【 0 0 4 1 】

ある特定の非限定的な実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤は、細胞間のギャップジャンクションの形成および/またはギャップジャンクションの開通性、ギャップジャンクションシグナル伝達および/または活性を部分的に、または完全に遮断することができる抗体または抗体断片であってよい。例えば、Ernesto Oviedo-Ortaら、The FASEB Journal、15巻：768~774頁(2001年)を参照されたい。ある特定の非限定的な実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤は、抗コネキシン化合物および/またはコネキシン模倣ペプチドであってよい。例えば、EvansおよびBoitano, Biochem. Soc. Trans., 29巻(4号)：606~612頁(2001年)；Dahl, Biophys. J., 67巻(5号)：1816~1822頁(1994年)；欧州特許出願第EP2510939号および同第EP2252320号；ならびに米国特許出願第2009/0142295号を参照されたい。

40

## 【 0 0 4 2 】

50

ギャップジャンクション阻害剤のさらなる非限定的な例としては、ギャップジャンクション構成成分の発現または活性を特異的に阻害および/または低減するリボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子ヘアピン型RNA (shRNA) 分子およびsiRNA分子が挙げられる。「リボザイム」とは、特定の核酸配列を切断することができる核酸を指す。ある特定の非限定的な実施形態では、リボザイムとは、特異的認識のためのアンチセンス配列、およびRNA切断酵素活性を含有するRNA分子を指す。例えば、米国特許第6,770,633号を参照されたい。対照的に、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、一般に、遺伝子の発現に影響を及ぼすための、その遺伝子の一部と相補的な小さなオリゴヌクレオチドである。遺伝子発現は、特定の遺伝子またはそのメッセンジャーRNA (mRNA) にオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせることによって阻害することができる。配列が分かっている遺伝子の遺伝子発現を特異的に阻害するためにアンチセンス技法を使用する方法は当技術分野で周知である(例えば、米国特許第6,566,135号;同第6,566,131号;同第6,365,354号;同第6,410,323号;同第6,107,091号;同第6,046,321号;および同第5,981,732号を参照されたい)。「低分子(small)干渉RNA」もしくは「低分子(short)干渉RNA」または「siRNA」もしくは「低分子ヘアピン型RNA」もしくは「shRNA」とは、RNA干渉(RNAi)の形態である。干渉RNAは、標的核酸配列と相補的な二本鎖RNAまたは部分的に二本鎖のRNA分子であってよい。マイクロRNA(miRNA)もこのカテゴリーに入れることができる。本発明のオリゴヌクレオチド、例えば、アンチセンス、shRNAまたはsiRNA分子に、細胞内での安定性および半減期を増大させる手段として種々の修飾を導入することができる。そのような修飾の非限定的な例としては、分子の5'末端および/もしくは3'末端に、リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドの隣接配列を付加すること、またはオリゴヌクレオチド骨格内にホスホジエステラーゼ連結ではなくホスホロチオエートもしくは2'-O-メチルなどの非定型的なもしくは天然に存在しない残基を使用することが挙げられる。

#### 【0043】

本発明のRNA分子は、ベクターから発現させることもでき、化学的にまたは合成により作製することもできる。適切なdsRNAまたはdsRNAをコードするベクターを選択するための方法は、配列が分かっている遺伝子に関して当技術分野で周知である(例えば、Tuschl, T.ら(1999年);Elbashir, S. M.ら(2001年);Hannon, G. J.(2002年);McManus, M. T.ら(2002年);Brummelkamp, T. R.ら(2002年);米国特許第6,573,099号および同第6,506,559号;ならびにPCT特許出願第WO2001/036646号、同第WO1999/032619号および同第WO2001/068836号を参照されたい)。

#### 【0044】

##### 5.1.1 コネキシン43阻害剤

ある特定の非限定的な実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤は、ギャップジャンクション構成成分に特異的であり得る。限定するものではなく、例として、ギャップジャンクション構成成分としては、タンパク質のコネキシンファミリーが挙げられる。コネキシンタンパク質の非限定的な例は、ギャップジャンクションタンパク質、1(gja1)という遺伝子によりコードされるコネキシン43(Cx43)である。Cx43核酸またはタンパク質は、NCBIデータベース受託番号NM\_000165、NG\_008308もしくはM65188に記載されている配列を有するヒトCx43核酸、または、NCBIデータベース受託番号NP\_000156に記載されているアミノ酸を有するヒトCx43タンパク質分子をコードする核酸であってよい。本発明によると、そのようなCx43核酸および/またはタンパク質の発現および/または機能の阻害剤をギャップジャンクション阻害剤として使用することができる。限定するものではなく、例として、ギャップジャンクション阻害剤としては、これだけに限定されないが、イオキシニ

ルまたはオクタン酸イオキシニルなどのC x 4 3 阻害剤を挙げることができる。ある特定の  
の実施形態では、C x 4 3 阻害剤としては、C x 4 3 抗体、抗体断片または模倣ペプチド  
を挙げることができる(Danesh-Meyerら、Brain、135巻:506~  
520頁(2012年)を参照されたい)。

#### 【0045】

ギャップジャンクション阻害剤の1つの非限定的な例は、上に開示されているC x 4 3  
核酸配列の少なくとも一部分と相同なアンチセンス、shRNAまたはsiRNA核酸配  
列を含み、C x 4 3 配列に対する部分の相同性は、少なくとも約75パーセントまたは少  
なくとも約80パーセントまたは少なくとも約85パーセントまたは少なくとも約90パ  
ーセントまたは少なくとも約95パーセントまたは少なくとも約98パーセントであり、  
パーセント相同性は、例えば、BLASTまたはFASTAソフトウェアによって決定す  
ることができる。ある特定の非限定的な実施形態では、相補的な部分は、少なくとも10  
ヌクレオチドまたは少なくとも15ヌクレオチドまたは少なくとも20ヌクレオチドまた  
は少なくとも25ヌクレオチドまたは少なくとも30ヌクレオチドを構成してよく、アン  
チセンス核酸、shRNAまたはsiRNA分子の長さは15ヌクレオチドまで、または  
20ヌクレオチドまで、または25ヌクレオチドまで、または30ヌクレオチドまで、ま  
たは35ヌクレオチドまで、または40ヌクレオチドまで、または45ヌクレオチドまで  
、または50ヌクレオチドまで、または75ヌクレオチドまで、または100ヌクレオチ  
ドまでであってよい。C x 4 3 を阻害するshRNAの非限定的な例は、下の実施例に記  
載されている。非限定的な実施形態では、核酸であるC x 4 3 阻害剤を、C x 4 3 を発現  
するがん細胞において、前記がん細胞に選択的にターゲティングすることができるベク  
ター、例えばレンチウイルスによってもたすことができ、かつ/または、C x 4 3 阻害剤  
核酸の発現を、腫瘍細胞において選択的に活性化プロモーターによって導くことができ  
る。

#### 【0046】

##### 5.1.2 プロトカドヘリン7 阻害剤

本発明は、開示されている方法において使用するためのプロトカドヘリン7(PCDH7)  
阻害剤を提供する。PCDH7 阻害剤の非限定的な例としては、PCDH7 の発現お  
よび/または活性を阻害および/または低減する化合物、分子、化学物質、ポリペプチド  
、タンパク質が挙げられる。PCDH7 核酸またはタンパク質は、NCBI データベース  
受託番号NM\_\_001173523、NM\_\_032457、NM\_\_032456もしくは  
NM\_\_002589に記載されている配列を有するヒトPCDH7 核酸、またはNCBI  
データベース受託番号NP\_\_001166994、NP\_\_115832、NP\_\_1158  
33もしくはNP\_\_002580に記載されているアミノ酸を有するヒトPCDH7 タン  
パク質分子をコードする核酸であってよい。

#### 【0047】

ある特定の非限定的な実施形態では、PCDH7 阻害剤として、PCDH7 の発現また  
は活性を特異的に阻害および/または低減するリボザイム、アンチセンスオリゴヌクレ  
オチド、shRNA分子およびsiRNA分子を挙げることができる。PCDH7 阻害剤の  
1つの非限定的な例は、PCDH7 核酸配列の少なくとも一部分と相同なアンチセンス、  
shRNAまたはsiRNA核酸配列を含み、PCDH7 配列に対する部分の相同性は、  
少なくとも約75パーセントまたは少なくとも約80パーセントまたは少なくとも約85  
パーセントまたは少なくとも約90パーセントまたは少なくとも約95パーセントまたは  
少なくとも約98パーセントであり、パーセント相同性は、例えば、BLASTまたはF  
ASTAソフトウェアによって決定することができる。ある特定の非限定的な実施形態で  
は、相補的な部分は、少なくとも10ヌクレオチドまたは少なくとも15ヌクレオチドま  
たは少なくとも20ヌクレオチドまたは少なくとも25ヌクレオチドまたは少なくとも3  
0ヌクレオチドを構成してよく、アンチセンス核酸、shRNAまたはsiRNA分子の  
長さは、15ヌクレオチドまで、または20ヌクレオチドまで、または25ヌクレオチ  
ドまで、または30ヌクレオチドまで、または35ヌクレオチドまで、または40ヌクレ  
オ

チドまで、または45ヌクレオチドまで、または50ヌクレオチドまで、または75ヌクレオチドまで、または100ヌクレオチドまでであってよい。ある特定の実施形態では、本発明のアンチセンス、shRNAまたはsiRNA分子は、DNA、または、上に開示されている非定型的なもしくは天然に存在しない残基、例えば、これだけに限定されないが、ホスホロチオエート残基を含んでよい。PCDH7を阻害するshRNAの非限定的な例は下の実施例に記載されている。非限定的な実施形態では、核酸であるPCDH7阻害剤を、PCDH7を発現するがん細胞において、前記がん細胞に選択的にターゲティングすることができるベクター、例えばレンチウイルスによってもたすことができ、かつ/または、PCDH7阻害剤核酸の発現を、腫瘍細胞において選択的に活性なプロモーターによって導くことができる。

10

#### 【0048】

非限定的な実施形態では、PCDH7阻害剤は、PCDH7に特異的に結合する抗体もしくは抗体断片または単鎖抗体であってよい。そのような抗体の非限定的な例としては、ab55506 (Abcam Inc.) およびHPA011866 (Sigma-Aldrich) が挙げられる。ある特定の非限定的な実施形態では、抗PCDH7抗体または抗体断片を使用して、本発明に従って使用するための、PCDH7に対して特異的なヒト、ヒト化またはその他のキメラ抗体を調製することができる。

#### 【0049】

##### 5.1.3 ギャップジャンクション活性/阻害についてのアッセイ

本発明の特定の非限定的な実施形態は、ギャップジャンクション活性を評価するため、例えば、環状グアノシンーリン酸 - アデノシンーリン酸、例えば、[G(2', 5') pA(3', 5') p] (「cGAMP」) の低減がギャップジャンクション阻害と関連する場合、cGAMPのレベルを測定することによって阻害を評価するためのアッセイを提供する。本発明のこの態様は、少なくとも一部において、アストロサイトと脳に転移したがん細胞との間でギャップジャンクションが形成されるとcGAMPが増加するという発見、および、前記cGAMPの上昇はコネキシン43の阻害により低下するという発見に基づく(例えば、図4Bおよび14Bを参照されたい)。

20

#### 【0050】

特定の非限定的な実施形態は、被験体の脳において転移がん細胞の成長および/または生存を阻害するための方法であって、被験体を治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を用いて治療するステップであり、当該治療有効量のギャップジャンクション阻害剤が、その量のギャップジャンクション阻害剤の非存在下でのcGAMPのレベルと比較してcGAMPの低下をもたらすものであるステップを含む方法を提供する。

30

#### 【0051】

特定の非限定的な実施形態は、被験体において脳腫瘍または転移性脳腫瘍がギャップジャンクション阻害剤を用いた治療から治療的利益を受けるかどうかを決定する方法であって、前記腫瘍に由来する試料において、ギャップジャンクション阻害剤への曝露によりcGAMPの低下が導かれるかどうかを決定するステップを含み、cGAMPの低下が、治療的利益を示す方法を提供する。

#### 【0052】

さらなる非限定的な本発明の実施形態は、被験体の脳において転移がん細胞の成長および/または生存を阻害する方法であって、(i)被験体が、ギャップジャンクション阻害剤を用いた治療から治療的利益を受けるかどうかを決定するステップであり、被験体のがん細胞(脳転移、原発腫瘍、または脳の外の転移性腫瘍から得ることができる)をギャップジャンクション阻害剤に曝露させた場合に、阻害剤の非存在下でのcGAMPレベルと比較してcGAMPの低下が示されるかどうかを決定することを含み、cGAMPの低下により治療的利益が示されるステップと、(ii)cGAMPの低下が観察された場合にはギャップジャンクション阻害剤を用いて被験体を治療するか、または、cGAMPの低下が観察されなかった場合には別のギャップジャンクション阻害剤を腫瘍細胞におけるcGAMPを低下させるその能力についてアッセイするかもしくは化学療法、免疫療法、放

40

50

射線療法などの別のモダリティを用いて被験体を治療するステップとを含む方法などを提供する。前記決定は、例えば、以下の実際に機能する実施例に記載の *in vitro* アッセイ、または当技術分野で公知の同等の *c G A M P* 測定システムを使用して行うことができる。

【 0 0 5 3 】

さらなる非限定的な本発明の実施形態は、被験体において脳腫瘍の成長を阻害する方法であって、( i ) 被験体が、ギャップジャンクション阻害剤を用いた治療から治療的利益を受けるかどうかを決定するステップであり、被験体の腫瘍細胞をギャップジャンクション阻害剤に曝露させた場合に、阻害剤の非存在下での *c G A M P* レベルと比較して *c G A M P* の低下が示されるかどうかを決定することを含むステップであり、ここで *c G A M P* の低下が、治療的利益を示す、ステップと、( i i ) *c G A M P* の低下が観察された場合にはギャップジャンクション阻害剤を用いて被験体を治療するか、または、*c G A M P* の低下が観察されなかった場合には別のギャップジャンクション阻害剤を腫瘍細胞における *c G A M P* を低下させる能力についてアッセイするかもしくは化学療法、免疫療法、放射線療法などの別のモダリティを用いて被験体を治療するステップとを含む方法などを提供する。前記決定は、例えば、以下の実際に機能する実施例に記載の *in vitro* アッセイ、または当技術分野で公知の同等の *c G A M P* 測定システムを使用して行うことができる。

【 0 0 5 4 】

*c G A M P* は、当技術分野で公知の任意の方法によって測定することができる。本発明のある特定の非限定的な実施形態では、液体クロマトグラフィー質量分析/質量分析(「*L C - M S / M S*」)によって *c G A M P* レベルを決定する。*L C - M S / M S* は、内部標準に対して正規化することができる(例えば、精製ステップにおけるあらゆる損失を説明するために)。特定の非限定的な一例として、あるアッセイを、この発明の詳細な説明に参照により組み込まれる以下の実際に機能する実施例「*L C - M S / M S* による *c G A M P* 定量化」の節に記載する。図 1 6 も参照されたい。

【 0 0 5 5 】

ある特定の非限定的な実施形態では、本発明は、前記アッセイにおいて使用するためのキットであって、少なくとも 1 つの *c G A M P* 標準物質、および脳腫瘍におけるギャップジャンクション阻害剤を用いた *c G A M P* の低下に関する情報を含むキットを提供する。

【 0 0 5 6 】

ある特定の非限定的な実施形態では、本発明は、試料中に存在する *c G A M P* の量を検出するためのキットを提供する。ある特定の実施形態では、キットは、同位体標識された *c G A M P* を含んでよい。限定するものではなく、例として、同位体標識された *c G A M P* を、分析化学技法、例えば質量分析(*M S*)および液体クロマトグラフィー(*L C*) - *M S / M S* における内部対照として使用することができる。ある特定の実施形態では、同位体標識された *c G A M P* は、存在量の少ない安定な同位元素、例えば、これだけに限定されないが、 $2 H$  (重水素)、 $13 C$  (炭素 - 13)、 $15 N$  (窒素 - 15) または  $18 O$  (酸素 - 18) などが富化されたものであってよい。

【 0 0 5 7 】

ある特定の非限定的な実施形態では、本発明のキットは、試料中の *c G A M P* の量を検出するためにキットを使用するための指示をさらに含んでよい。限定するものではなく、例として、指示には、分析前に試料に添加する同位体標識された *c G A M P* の量を記載することができる。ある特定の実施形態では、指示には、さらに、試料に添加した同位体標識された *c G A M P* の量からどのように試料中の *c G A M P* の量を算出するかを記載することができる。ある特定の非限定的な実施形態では、指示には、ギャップジャンクション阻害剤に応答して被験体由来の試料中の *c G A M P* の量またはレベルが参照対照レベルと比較して低減することにより、ギャップジャンクション阻害剤の使用の治療的利益が示されることを記載することができる。

【 0 0 5 8 】

## 5.2 がん標的

ある特定の実施形態では、本発明は、脳転移を治療するための方法を提供する。「転移」とは、本明細書で使用される場合、がんの元の位置（例えば、原発がん）と物理的に連続していない位置に1つまたは複数のがん細胞が存在することを指す。限定するものではなく、例として、がんとしては、肺がん、乳がん、黒色腫、結腸がん、腎がん、腎細胞癌、中皮腫、卵巣がん、膵がん、肉腫、白血病、リンパ腫、尿路上皮がん、頭頸部がん、骨肉腫および膀胱がんを挙げることができる。ある特定の実施形態では、がんとして、神経膠芽腫および星状細胞腫を挙げることができる。

### 【0059】

「検出可能な」転移とは、磁気共鳴画像法、コンピュータ化断層撮影法または陽電子放出断層撮影法によって同定可能であり得る細胞のクラスターである。ある特定の非限定的な実施形態では、転移細胞のクラスターは、少なくとも約  $1 \times 10^7$  個の細胞を含み得る。ある特定の実施形態では、検出可能な転移は、サイズが約 5 mm または約 10 mm を超える細胞のクラスターを含み得る。

### 【0060】

## 5.3 医薬製剤

ある特定の非限定的な実施形態では、本発明は、治療に使用するための、上の節 5.1 に開示されているギャップジャンクション阻害剤の医薬製剤を提供する。ある特定の実施形態では、医薬製剤は、ギャップジャンクション阻害剤および薬学的に許容される担体を含む。

### 【0061】

「薬学的に許容される」とは、本明細書で使用される場合、活性成分、例えば阻害剤の生物活性の有効性に干渉せず、かつ、投与される患者に対して有毒でない任意の担体を含む。適切な医薬担体の非限定的な例としては、リン酸緩衝食塩溶液、水、油/水エマルションなどのエマルション、種々の型の湿潤剤および滅菌溶液が挙げられる。薬学的に許容される担体のさらなる非限定的な例としては、阻害剤および/または任意の他の適切なビヒクル、送達または分散手段または材料を含有するゲル、生体吸収性 (bioabsorbable) マトリックス材料、埋め込み要素を挙げることができる。そのような担体は、従来の方法によって製剤化することができ、被験体に投与することができる。

### 【0062】

ある特定の非限定的な実施形態では、本発明の医薬製剤は、経口投与に適した当技術分野で周知の薬学的に許容される担体を使用して製剤化することができる。そのような担体により、医薬組成物を、治療される患者による経口または経鼻摂取用の錠剤、丸剤、カプセル剤、液体、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとして製剤化することが可能になる。ある特定の実施形態では、医薬製剤は固体剤形であってよい。ある特定の実施形態では、錠剤は、即時放出錠剤であってよい。その代わりにまたはそれに加えて、錠剤は、持続放出または制御放出錠剤であってよい。ある特定の実施形態では、固体剤形は、即時放出部分と持続放出または制御放出部分の両方を含んでよい。ある特定の実施形態では、本発明の医薬製剤は、非経口投与に適した当技術分野で周知の薬学的に許容される担体を使用して製剤化することができる。

### 【0063】

ある特定の実施形態では、本発明において使用するために適した医薬製剤は、活性成分、例えばギャップジャンクション阻害剤が治療有効量で含有される製剤を含み得る。「治療有効量」とは、抗がん効果、生存の延長および/または再発までの期間の延長のうちの1つまたは複数を達成することができる量を指す。活性成分の治療有効量は、活性成分、例えばギャップジャンクション阻害剤、使用される製剤、がんおよびその重症度、ならびに治療される被験体の年齢、体重などに応じて変動し得る。ある特定の実施形態では、患者は、治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を1つまたは複数の製剤の単回投与または複数回投与で受けることができ、これは、患者により要求および耐容される投与量および頻度に左右され得る。

## 【0064】

「抗がん効果」または「治療的利益」とは、本明細書で使用される場合、凝集したがん細胞塊の縮小、がん細胞成長速度の低減、がん細胞増殖の低減、腫瘍塊の縮小、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞増殖の低減、腫瘍成長速度の低減および／または腫瘍転移の減少のうちの1つまたは複数を目指す。ある特定の実施形態では、抗がん効果とは、がんの診断を受けた患者における完全奏効、部分奏効、安定病態（進行も再発も伴わない）および／または後の再発もしくは無増悪生存を伴う応答を指し得る。ある特定の実施形態では、抗がん効果は、被験体において原発がんの転移を予防および／または減少すること、例えば、被験体においてがんの脳への転移を予防および／または減少することを指し得る。

## 【0065】

ある特定の非限定的な実施形態では、上記のギャップジャンクション阻害剤は、単独で、または1種または複数種の抗がん剤と組み合わせて使用することができる。「抗がん剤」とは、本明細書で使用される場合、抗がん効果を有する任意の分子、化合物、化学物質または組成物であってよい。抗がん剤としては、これだけに限定されないが、化学療法剤、放射線療法剤（radiotherapeutic agent）、サイトカイン、抗血管新生剤、アポトーシス誘導剤、抗がん抗体、抗サイクリン依存性キナーゼ剤、ならびに／または、これだけに限定されないが、サイトカイン、例えば、これだけに限定されないが、インターロイキン2、インターフェロンなど、抗CTLA4抗体および／もしくは抗PD-1抗体を含めた、免疫系の活性を促進する薬剤が挙げられる。抗がん剤の非限定的な例としては、パクリタキセル、テモゾロミド、ビノレリピン、プロカルバジン、ロムスチン、ビンクリスチン、sFasLおよびカルボプラチンが挙げられる。例えば、限定するものではないが、ギャップジャンクション阻害剤、例えば、メクロフェナメートおよび／またはトナベルサットをカルボプラチンと組み合わせて使用することができる。「と組み合わせて」とは、本明細書で使用される場合、ギャップジャンクション阻害剤および1種または複数種の抗がん剤を治療レジメンまたは計画の一部として被験体に投与することを意味する。ある特定の実施形態では、組み合わせて使用することとは、阻害剤および1種または複数種の抗がん剤を投与する前に物理的に併せること、または同じ時間枠にわたってそれらを投与することを必要としない。

## 【0066】

ある特定の実施形態では、阻害剤を抗がん剤と組み合わせて使用する場合、それぞれの量は、いくつかの場合には、その薬剤を単独で摂取することについては治療有効量未満であり得るが、両方を使用すると治療の有効性が達成される。

## 【0067】

## 5.4 治療方法

本発明は、ギャップジャンクション機能性を阻害することによって脳転移を治療するための方法に関する。以下の実際に機能する実施例の節において詳細に記載されている通り、本出願において示されている研究により、がん細胞とアストロサイトとの間のギャップジャンクションシグナル伝達および／または形成の阻害を使用して脳転移を治療することができることが示される。これは、少なくとも一部において、プロトカドヘリン7およびコネキシン43を発現するがん細胞がアストロサイトとギャップジャンクションを形成し、それにより脳転移の成長が促進されるという発見、ならびにがん細胞におけるプロトカドヘリン7および／またはコネキシン43の発現を阻害することにより脳転移の進行を低減するという発見に基づく。これは、さらに、ギャップジャンクション阻害剤であるトナベルサットおよびメクロフェナメートを用いた治療により、脳転移病変の進行が阻害され、また、従来の化学療法剤であるカルボプラチンの抗がん活性が増強されるという発見に基づく。

## 【0068】

したがって、本発明は、上に開示されているギャップジャンクション阻害剤を投与することによってギャップジャンクションシグナル伝達および／または形成を阻害することにより脳転移を治療する方法を提供する。ギャップジャンクション阻害剤、およびその医薬



製剤の非限定的な例は、上の節 5 . 1 および 5 . 3 において開示されている。本発明の方法を用いて治療することができるがんは上の節 5 . 2 において開示されている。そのように、本発明は、被験体において抗がん効果を生じさせるギャップジャンクション機能性を阻害するための方法に関する。

【 0 0 6 9 】

「被験体」または「患者」とは、本明細書では互換的に使用され、ヒトまたは非ヒト被験体を指す。非ヒト被験体の非限定的な例としては、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ブタ、家禽、ウマ、ウシ、ヤギおよびヒツジが挙げられる。

【 0 0 7 0 】

ある特定の非限定的な実施形態では、本発明は、がんを有する被験体を治療する方法であって、被験体に、脳のがんの転移性進行を阻害する量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤は、メクロフェナメート、トナベルサット、C x 4 3 阻害剤および/またはPCDH7 阻害剤であってよい。ある特定の実施形態では、がんは、乳がんであってよい。ある特定の実施形態では、がんは、肺がんであってよい。ある特定の非限定的な実施形態では、被験体のがんの1つまたは複数の細胞は、コネキシン43および/またはプロトカドヘリン7を発現する。ある特定の実施形態では、治療前に被験体が1つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた。本発明のある特定の非限定的な実施形態では、治療前に被験体が脳転移を有することが分かっていた。

【 0 0 7 1 】

ある特定の実施形態では、がんを有する被験体を治療する方法は、被験体に、脳のがんの転移性進行を阻害する量のトナベルサットを投与するステップを含む。

【 0 0 7 2 】

ある特定の実施形態では、がんを有する被験体を治療する方法は、被験体に、脳のがんの転移性進行を阻害する量のメクロフェナメートを投与するステップを含む。

【 0 0 7 3 】

ある特定の実施形態では、がんを有する被験体を治療する方法は、被験体に、脳のがんの転移性進行を阻害する量のC x 4 3 阻害剤を投与するステップを含む。

【 0 0 7 4 】

ある特定の実施形態では、がんを有する被験体を治療する方法は、被験体に、脳のがんの転移性進行を阻害する量のPCDH7 阻害剤を投与するステップを含む。

【 0 0 7 5 】

ある特定の非限定的な実施形態では、本発明は、被験体の脳において転移がん細胞の成長および/または生存を阻害するための方法であって、被験体に、治療有効量の上に開示されているギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む方法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤は、メクロフェナメート、トナベルサット、C x 4 3 阻害剤および/またはPCDH7 阻害剤であってよい。ある特定の実施形態では、がんは、肺がんおよび/または乳がんである。ある特定の非限定的な実施形態では、被験体のがんの1つまたは複数の細胞は、コネキシン43および/またはプロトカドヘリン7を発現する。ある特定の実施形態では、治療前に被験体が1つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた。本発明のある特定の非限定的な実施形態では、治療前に被験体が脳転移を有することが分かっていた。

【 0 0 7 6 】

ある特定の実施形態では、被験体の脳において転移がん細胞の成長および/または生存を阻害するための方法は、被験体に、治療有効量のトナベルサットを投与するステップを含む。

【 0 0 7 7 】

ある特定の実施形態では、被験体の脳において転移がん細胞の成長および/または生存を阻害するための方法は、被験体に、治療有効量のメクロフェナメートを投与するステッ

10

20

30

40

50

プを含む。

【0078】

ある特定の実施形態では、被験体の脳において転移がん細胞の成長および／または生存を阻害するための方法は、被験体に、治療有効量のC×43阻害剤を投与するステップを含む。

【0079】

ある特定の実施形態では、被験体の脳において転移がん細胞の成長および／または生存を阻害するための方法は、被験体に、治療有効量のPCDH7阻害剤を投与するステップを含む。

【0080】

ある特定の非限定的な実施形態では、本発明は、被験体において脳転移を治療する方法であって、被験体に、上に開示されている、治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。ある特定の非限定的な実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤は、メクロフェナメート、トナベルサット、C×43阻害剤および／またはPCDH7阻害剤であってよい。ある特定の実施形態では、がんは、肺がんおよび／または乳がんである。ある特定の非限定的な実施形態では、被験体のがんの1つまたは複数の細胞は、コネキシン43および／またはプロトカドヘリン7を発現する。ある特定の実施形態では、脳転移は、検出可能な転移である。

【0081】

ある特定の実施形態では、被験体において脳転移を治療する方法は、被験体に、治療有効量のトナベルサットを投与するステップを含む。

【0082】

ある特定の実施形態では、被験体において脳転移を治療する方法は、被験体に、治療有効量のメクロフェナメートを投与するステップを含む。

【0083】

ある特定の実施形態では、被験体において脳転移を治療する方法は、被験体に、治療有効量のC×43阻害剤を投与するステップを含む。

【0084】

ある特定の実施形態では、被験体において脳転移を治療する方法は、被験体に、治療有効量のPCDH7阻害剤を投与するステップを含む。

【0085】

ある特定の非限定的な実施形態では、本発明は、被験体においてがんの脳への転移を予防する方法であって、被験体に、上に開示されている、治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤は、メクロフェナメート、トナベルサット、C×43阻害剤および／またはPCDH7阻害剤であってよい。ある特定の実施形態では、がんは、肺がんおよび／または乳がんである。ある特定の非限定的な実施形態では、被験体のがんの1つまたは複数の細胞は、コネキシン43および／またはプロトカドヘリン7を発現する。本発明のある特定の非限定的な実施形態では、治療前に被験体が脳転移を有することが分かっていた。

【0086】

ある特定の実施形態では、被験体においてがんの脳への転移を予防する方法は、被験体に、治療有効量のトナベルサットを投与するステップを含む。

【0087】

ある特定の実施形態では、被験体においてがんの脳への転移を予防する方法は、被験体に、治療有効量のメクロフェナメートを投与するステップを含む。

【0088】

ある特定の実施形態では、被験体においてがんの脳への転移を予防する方法は、被験体に、治療有効量のC×43阻害剤を投与するステップを含む。

【0089】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態では、被験体においてがんの脳への転移を予防する方法は、被験体に、治療有効量のPCDH7阻害剤を投与するステップを含む。

【0090】

ある特定の非限定的な実施形態では、本発明は、がんを有する被験体においてがんの脳への検出可能な転移のリスクを低減する方法であって、被験体に、上に開示されている、治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤は、メクロフェナメート、トナベルサット、Cx43阻害剤および/またはPCDH7阻害剤であってよい。ある特定の実施形態では、がんは、肺がんおよび/または乳がんである。ある特定の非限定的な実施形態では、被験体のがんの1つまたは複数の細胞は、コネキシン43および/またはプロト

10

トカドヘリン7を発現する。ある特定の実施形態では、治療前に被験体が1つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた。本発明のある特定の非限定的な実施形態では、治療前に被験体が脳転移を有することが分かっていた。

【0091】

ある特定の実施形態では、がんを有する被験体においてがんの脳への検出可能な転移のリスクを低減する方法は、被験体に、治療有効量のトナベルサットを投与するステップを含む。

【0092】

ある特定の実施形態では、がんを有する被験体においてがんの脳への検出可能な転移のリスクを低減する方法は、被験体に、治療有効量のメクロフェナメートを投与するステップを含む。

20

【0093】

ある特定の実施形態では、がんを有する被験体においてがんの脳への検出可能な転移のリスクを低減する方法は、被験体に、治療有効量のCx43阻害剤を投与するステップを含む。

【0094】

ある特定の実施形態では、がんを有する被験体においてがんの脳への検出可能な転移のリスクを低減する方法は、被験体に、治療有効量のPCDH7阻害剤を投与するステップを含む。

【0095】

ある特定の実施形態では、本発明は、がんを有する被験体の生存期間を延長する方法であって、被験体に、上に開示されている、治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤は、メクロフェナメート、トナベルサット、Cx43阻害剤および/またはPCDH7阻害剤であってよい。ある特定の実施形態では、がんは、肺がんおよび/または乳がんである。ある特定の非限定的な実施形態では、被験体のがんの1つまたは複数の細胞は、コネキシン43および/またはプロトカドヘリン7を発現する。ある特定の実施形態では、治療前に被験体が1つまたは複数の脳転移を有することが分かっていた。本発明のある特定の非限定的な実施形態では、治療前に被験体が脳転移を有することが分かっていた。

30

40

【0096】

ある特定の実施形態では、がんを有する被験体の生存期間を延長する方法は、被験体に、治療有効量のトナベルサットを投与するステップを含む。

【0097】

ある特定の実施形態では、がんを有する被験体の生存期間を延長する方法は、被験体に、治療有効量のメクロフェナメートを投与するステップを含む。

【0098】

ある特定の実施形態では、がんを有する被験体の生存期間を延長する方法は、被験体に、治療有効量のCx43阻害剤を投与するステップを含む。

【0099】

50

ある特定の実施形態では、がんを有する被験体の生存期間を延長する方法は、被験体に、治療有効量のPCDH7阻害剤を投与するステップを含む。

【0100】

ある特定の実施形態では、本発明の方法により、がんを有する被験体の生存期間を約1カ月、約2カ月、約3カ月、約4カ月、約6カ月、約8カ月、約10カ月、約12カ月、約14カ月、約18カ月、約20カ月、約2年、約3年、約4年、約5年、約6年またはそれを超えて延長することができる。

【0101】

ある特定の実施形態では、そのような治療を必要とする被験体においてがん細胞転移を治療するための方法は、がん細胞-アストロサイトギャップジャンクション機能性を阻害するために、被験体に、上に開示されている、治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む。

10

【0102】

ある特定の実施形態では、本発明は、がんを有する被験体において抗がん効果を生じさせる方法であって、被験体に、上に開示されている、治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。

【0103】

ある特定の実施形態では、本発明は、がんを有する被験体において抗がん効果を生じさせる方法であって、がん細胞-アストロサイトギャップジャンクション機能性を阻害するために、被験体に、上に開示されている、治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。

20

【0104】

ある特定の実施形態では、本発明は、がんを有する被験体において抗がん効果を生じさせる方法であって、ギャップジャンクション機能性を阻害するために被験体に治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。

【0105】

ある特定の実施形態では、本発明は、がんを有する被験体を治療するため、がん細胞の成長および/または生存を阻害するため、がんの再発を予防するおよび/または遅延させるため、がん細胞の浸潤を阻害するため、ならびにがんを有する被験体の生存期間を延長するための方法であって、被験体に、上に開示されている、治療有効量のギャップジャンクション阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。ある特定の実施形態では、がんは、神経膠芽腫および/または星状細胞腫である。

30

【0106】

ある特定の実施形態では、本発明の方法は、被験体に上記の抗がん剤を投与するステップをさらに含み得る。限定するものではなく、例として、本発明の方法は、被験体に治療有効量のギャップジャンクション阻害剤、および、例えば、これだけに限定されないが、ACNU、BCNU、CCNU、ヒドロキシウレア、トポテカン、テモゾロミド、ダカルバジン、メトトレキサート、Ara-C、カベシタピン、シスプラチン、ビノレルビン、カルボプラチン、またはこれらの組合せなどの、血液脳関門を透過して治療レベルを達成することができる、治療有効量の抗がん剤を投与するステップを含む。

40

【0107】

ある特定の実施形態では、本発明の方法は、被験体に、治療有効量のメクロフェナメートおよび治療有効量のカルボプラチンを投与するステップを含む。

【0108】

ある特定の実施形態では、本発明の方法は、被験体に、治療有効量のトナベルサットおよび治療有効量のカルボプラチンを投与するステップを含む。

【0109】

ある特定の実施形態では、本発明の方法は、被験体に、治療有効量のCx43阻害剤および治療有効量のカルボプラチンを投与するステップを含む。

【0110】

50

ある特定の実施形態では、本発明の方法は、被験体に、治療有効量のPCDH7阻害剤および治療有効量のカルボプラチンを投与するステップを含む。

【0111】

特定の非限定的な実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤を約1 mg/kg ~ 約30 mg/kgの量で投与することができる。限定するものではなく、例として、ギャップジャンクション阻害剤を約1 mg/kg ~ 約25 mg/kg、約1 mg/kg ~ 約20 mg/kg、約1 mg/kg ~ 約15 mg/kg、約1 mg/kg ~ 約10 mg/kg、約1 mg/kg ~ 約5 mg/kg、約5 mg/kg ~ 約30 mg/kg、約10 mg/kg ~ 約30 mg/kg、約15 mg/kg ~ 約30 mg/kg、約20 mg/kg ~ 約30 mg/kgまたは約25 mg/kg ~ 約30 mg/kgの量で投与することができる。ある特定の非限定的な実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤を約0.08 mg/kg ~ 約3.6 mg/kgの量で投与することができる(Reagan-Shawら、The FASEB J.、22巻:659~661頁(2008年)を参照されたい)。ある特定の非限定的な実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤を約0.15 mg/kg ~ 約18 mg/kgの量で投与することができる。

10

【0112】

ある特定の非限定的な実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤を約1 mg ~ 約200 mgの量で投与することができる。限定するものではなく、例として、ギャップジャンクション阻害剤を約1 mg ~ 約200 mg、約10 mg ~ 約200 mg、約20 mg ~ 約200 mg、約30 mg ~ 約200 mg、約40 mg ~ 約200 mg、約50 mg ~ 約200 mg、約60 mg ~ 約200 mg、約70 mg ~ 約200 mg、約80 mg ~ 約200 mg、約90 mg ~ 約200 mg、約100 mg ~ 約200 mg、約110 mg ~ 約200 mg、約120 mg ~ 約200 mg、約130 mg ~ 約200 mg、約140 mg ~ 約200 mg、約150 mg ~ 約200 mg、約160 mg ~ 約200 mg、約170 mg ~ 約200 mg、約180 mg ~ 約200 mg、約190 mg ~ 約200 mg、約1 mg ~ 約190 mg、約1 mg ~ 約180 mg、約1 mg ~ 約170 mg、約1 mg ~ 約160 mg、約1 mg ~ 約150 mg、約1 mg ~ 約140 mg、約1 mg ~ 約130 mg、約1 mg ~ 約120 mg、約1 mg ~ 約110 mg、約1 mg ~ 約100 mg、約1 mg ~ 約90 mg、約1 mg ~ 約80 mg、約1 mg ~ 約70 mg、約1 mg ~ 約60 mg、約1 mg ~ 約50 mg、約1 mg ~ 約40 mg、約1 mg ~ 約30 mg、約1 mg ~ 約20 mg、約1 mg ~ 約10 mgまたは約1 mg ~ 約5 mgの量で投与することができる。

20

30

【0113】

ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤であるトナベルサットを約10 mg/kgの量で投与することができる。ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤であるトナベルサットを約0.8 mg/kg ~ 約1.2 mg/kgの量で投与することができる。ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤であるトナベルサットを約0.01 mg/kg ~ 約9 mg/kgの量で投与することができる。ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤であるメクロフェナメートを約20 mg/kgの量で投与することができる。ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤であるメクロフェナメートを約1.6 mg/kg ~ 約2.4 mg/kgの量で投与することができる。ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤であるメクロフェナメートを約0.1 mg/kg ~ 約19 mg/kgの量で投与することができる。ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤であるメクロフェナメートを毎日約100 mg ~ 約400 mgの間の量で投与することができる。ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤であるメクロフェナメートを1日2回、約100 mgの量で投与することができる。ある特定の実施形態では、被験体を、プロトンポンプ阻害剤およびメクロフェナメートを同時に用いて治療する。ある特定の実施形態では、ギャップジャンクション阻害剤であるメクロフェナメートを1日2回、約100 mgの量で投与することができ、被験体をプロトンポンプ阻害剤およびメクロフェナメートを同時

40

50

に用いて治療することができ、また、治療期間は少なくとも約2カ月、少なくとも約4カ月、または少なくとも約6カ月であってよい。

【0114】

特定の非限定的な実施形態では、抗がん剤を約1 nM～約1 μMおよび/または約10 mg/kg～約100 mg/kgの量で投与することができる。特定の非限定的な実施形態では、抗がん剤を約0.8 mg/kg～約8 mg/kgの量で投与することができる。特定の非限定的な実施形態では、抗がん剤を約1.2 mg/kg～約60 mg/kgの量で投与することができる。限定するものではなく、例として、抗がん剤であるカルボプラチンを約500 nMおよび/または約50 mg/kgの量で投与することができる。ある特定の実施形態では、抗がん剤であるカルボプラチンを約4～約6 mg/kgの量で投与

10

【0115】

ある特定の実施形態では、本発明のギャップジャンクション阻害剤を1週間あたり1回、2回、3回、4回、5回もしくは6回または毎日投与することができる。ある特定の実施形態では、本発明の抗がん剤を1週間あたり1回、2回、3回、4回、5回もしくは6回または毎日投与することができる。ある特定の実施形態では、本開示の主題の阻害剤および/または抗がん剤を1日あたり1回または複数回投与することができる。限定するものではなく、例として、本発明のギャップジャンクション阻害剤および/または抗がん剤を1日に1回、2回、3回、4回、5回またはそれより多い回数投与することができる。

20

【0116】

本明細書に開示されている阻害剤および/または抗がん剤は、標準の投与方法を使用して被験体に投与することができる。ある特定の実施形態では、阻害剤は、被験体に経口的にまたは非経口的に投与することができる。限定するものではなく、例として、投与経路は、静脈内、動脈内、髄腔内、腹腔内、筋肉内、皮下、局所 (topical)、皮内、局部 (locally) またはこれらの組合せであってよい。ある特定の実施形態では、阻害剤は、患者に埋め込まれた供給源から患者に投与することができる。ある特定の実施形態では、阻害剤の投与は、選択された期間にわたって持続注入することによって行うことができる。

【0117】

30

以下の実施例は、ただ単に本開示の発明を例示するものであり、いかなる形でも限定するものとはみなされるべきでない。

【実施例】

【0118】

6. 実施例1: プロトカドヘリン7およびコネキシン43により、癌腫-アストロサイトギャップジャンクションおよび脳転移が媒介される

6.1 材料および方法

細胞培養。ヒトMDA-MB-231 (MDA231)、マウスMMTV-neu、それらの転移派生物、およびマウス373N1、393N1、482N1、2691N1細胞株を、10%ウシ胎仔血清 (FBS) および2 mMのL-グルタミンを伴うDMEM中で培養した。ヒトH2030細胞および転移派生物を、10% FBSおよび2 mMのL-グルタミンを補充したRPMI 1640培地中で培養した。レンチウイルス産生のために、293T細胞を、10%ウシ胎仔血清および2 mMのL-グルタミンを補充したDMEM培地中で培養した。ヒト初代アストロサイト、脳微小血管内皮細胞 (HBMEC)、成人皮膚線維芽細胞、およびミクログリアを供給者 (Sciencell) による指定培地中で培養し、継代2～6の間で使用した。全ての試験した細胞がマイコプラズマ (mycoplasma) 検査陰性であった。

40

【0119】

動物研究。動物を使用する実験は全て、MSKCC Institutional Animal Care and Use Committeeにより承認されたプロトコ

50

ールに従って行った。胸腺欠損NCR nu/nuマウス(NCI-Frederick)、Cr:NIH bg-nu-xidマウス(NCI-Frederick)およびB6129SF1/Jマウス(Jackson Laboratory)を5~6週齢時に使用した。長期間脳転移アッセイに関しては、以前に記載された手順(Bos, Nguyenら、2010年)に従った。簡単に述べると、PBS100μlに懸濁させた、MDA231-BrM2細胞 $10^4$ 個、H2030-BrM3細胞 $5 \times 10^4$ 個、または393N1細胞 $10^5$ 個を左心室に注射した。実験のエンドポイントにおいて、麻酔したマウス(100mg/kgのケタミン、10mg/kgのキシラジン)にD-ルシフェリン(150mg/kg)を後眼窩に注射し、脳コロニー形成をex vivo生物発光イメージング(BLI)によって定量化した。短期(7日および14日)脳転移実験に関しては、 $5 \times 10^5$ 個の細胞を注射した。TRITCデキストラン(70KD)(Life Technologies)を静脈内注射して血管構造を染色した。誘導性ノックダウン実験に関しては、マウスに、がん細胞を注射した14日後にドキシサイクリンハイクラート(doxycycline hyclate)(Sigma-Aldrich)を飲料水(2mg/mL)および食餌(Harlan)において与えた。肺コロニー形成アッセイに関しては、PBS100μL中 $2 \times 10^5$ 個のMDA231-BrM2細胞を外側尾静脈に注射した。同所性腫瘍移植に関しては、PBS/増殖因子低減マトリゲル(growth factor reduced matrigel)(BD Biosciences)の1:1混合物50μL中 $5 \times 10^3$ 個の細胞を雌マウスの第4の右乳房脂肪パッドに注射した。薬物処置実験に関しては、マウスに、カルボプラチン(Hospira)(50mg/kg/5日)、トナベルサット(MedChem Express)(1日あたり10mg/kg)、またはメクロフェナム酸ナトリウム塩(Sigma-Aldrich)(1日あたり20mg/kg)を腹腔内注射した。対照マウスにはビヒクル(ポリエチレングリコール400中10%DMSO)を使用した。IVIS Spectrum Xenogen instrument(Caliper Life Sciences)を使用してBLIを実施し、Living Image software、v.2.50を使用して分析した。脳転移アッセイに関しては、各群8~10匹のマウスを使用した。薬物処置実験に関しては、マウスにがん細胞を接種し、処置群にランダムに割り当てた。MSKCC Antitumour Assessment Coreにおいて、ギャップジャンクションモジュレーターおよび化学療法剤を盲検で投与した。

#### 【0120】

ノックダウンおよび過剰発現構築物。Cx43およびPCDH7を安定にノックダウンするために、レンチウイルスベクターにおけるshRNAを使用した。誘導性ノックダウンのために、TRIPZレンチウイルスベクターにおけるshRNAを使用した。1μg/mLのドキシサイクリンハイクラート(Sigma-Aldrich)を添加してshRNAの発現を誘導した。shRNAの標的化された配列を下の表1に列挙する。SR-IkBを安定発現させるためにpBabe-Puro-IKβα-mut(Addgene)を使用した。野生型Cx43(Origene)、またはCx43(T154A)変異体(ACCからGCCへ)を発現させるために、本発明者らは、pLVXベクターを使用した。

#### 【0121】

mRNAおよびタンパク質検出。PrepEase RNA spin kit(USB)を使用して全RNAを抽出した。cDNAを調製するために、全RNA1μgをTranscriptor First Strand cDNA synthesis kit(Roche)を使用して処理した。Cx43、Cx30およびCx26の発現をTaqqman遺伝子発現アッセイプライマー:(Cx43:Hs00748445\_s1、Mm00439105\_m1;Cx30:Hs00922742\_s1、Mm00433661\_s1;Cx26:Hs00269615\_s1、Mm00433643\_s1;Applied Biosystems)によって定量化した。相対的な遺伝子発現を2-ミクログロブリン(Hs99999907\_m1、Mm00437762\_m1)に

10

20

30

40

50

対して正規化した。全てのPCDH7アイソフォームを検出するためにPCDH7プライマー対を設計した：5'-agttcaacgtgggtcatcgtg-3'（センス）、5'-acaatcaggaggttggtgctc-3'（アンチセンス）。SYBR Green I Master Mix（Applied Biosystems）を使用して反応を行った。ABI Prism 7900HT Sequence Detection System（Applied Biosystems）を使用して定量的発現データを分析した。ウエスタン免疫ブロッティングのために、RIPA緩衝液を用いて細胞ペレットを溶解させ、タンパク質濃度をBCA Protein Assay Kit（Pierce）によって決定した。初代ヒトアストロサイト、ニューロン、ミクログリアおよびHBMECのタンパク質溶解物はSciencellから購入した。タンパク質をSDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロースメンブレン（BioRad）に転写した。ウエスタンブロッティングのために使用した抗体を下の表2に列挙する。

10

#### 【0122】

色素移行およびEdU移行アッセイ。単層のがん細胞またはアストロサイトを2.5 μg/mlのカルセインRed-Orange AM dye（Life Technologies）を用いて37℃で30分にわたって標識した。単一細胞懸濁物を、標識細胞：非標識細胞2：1の比で6時間にわたって混合した。ある特定の試験では、3種の細胞集団、MDA231-BrM2（GFP+）、HBMEC（Cell Proliferating Dye Fluor@670、eBioscienceを用いて予め標識したもの）、および非標識アストロサイトの混合物を使用した。異なる時点において、色素移行をZeiss LSM 5 Live共焦点顕微鏡（20分の微速度撮影）によって可視化したか、またはFACSCaliburフローサイトメトリー（BD Biosciences）によって定量化した。DNA移行アッセイのために、がん細胞を、EdU（10 μM、Molecular Probes）を用いて一晩にわたって標識し、培養物中でさらに3日間維持した。標識されたがん細胞およびアストロサイトの単一細胞懸濁物を6時間にわたって2：1の比で混合した。EdU移行を、製造者（Molecular Probes）の指示に従って、Zeiss LSM 5 Live共焦点顕微鏡を使用して可視化したか、またはFACSCaliburフローサイトメトリー（BD Biosciences）によって定量化した。

20

30

#### 【0123】

がん細胞およびアストロサイト共培養実験。アストロサイトとがん細胞を1：1の比で混合した。アポトーシスアッセイのために、一晩共培養物を、無血清培地中500 ng/mlのsFasL（Peprotech）、500 nMのカルボプラチン（Sigma-Aldrich）または25 nMのパクリタキセル（Sigma-Aldrich）を用いて24時間にわたって処理した。単一細胞懸濁物を、APCとコンジュゲートした切断カスパーゼ3抗体（Cell Signaling）を用いて染色し、アポトーシス性GFP+がん細胞をフローサイトメトリーによって検出した。翻訳リボソームアフィニティー精製（TRAP）のために、EGFP-L10a発現がん細胞をアストロサイトと24時間にわたって共培養した。以前公開されたプロトコール（Heiman, Schaeferら、2008年、Zhang, Jinら、2013年）に従って、がん細胞から精製したmRNAを、TruSeq RNA Sample Prep Kit v2（Illumina）を製造者の指示に従って用いたライブラリー構築のために使用した。試料をバーコード化し、HiSeq 2000プラットフォームにおいて、TruSeq SBS Kit v3（Illumina）を使用して、50 bp / 50 bpペアエンド実行で実行した。試料あたり平均5千万の、対になったリードを生成した。馴化培地分析のために、培地を24時間後に回収し、馴化培地中のサイトカインを、Human Cytokine Array（R&D Systems）を使用して同定したか、またはIFNもしくはTNF ELISAキット（R&D Systems）によって測定した。回収した馴化培地中のIFN またはTNF の活性を検出するために、回収した

40

50



馴化培地を用いてがん細胞を2時間にわたって処理し、STAT1またはNF- $\kappa$ B p65のリン酸化の状態をウエスタンブロッティングによって決定した。cGAMPおよびTBI-IRF3活性化実験のために、がん細胞とアストロサイトを18時間にわたって共培養した。TBK1、IRF3のリン酸化の状態をウエスタン免疫ブロッティングによって決定した。IRF3の核移行をZeiss LSM 5 Live共焦点顕微鏡を用いた免疫蛍光染色によって決定した。cGAMPレベルをLC-MS/MSによって決定した。

#### 【0124】

サイトカイン処理および経路レポーターアッセイ。がん細胞を、10ユニット/ml (390 ng) の組換えIFN- $\alpha$  (R&D Systems) または10 pg/ml の組換えTNF (R&D Systems) をカルボプラチンまたはタキソール (Sigma-Aldrich) と組み合わせて用いて24時間にわたって処理した。アポトーシスをカスパーゼ-3/7アッセイ (Promega) によって定量化した。NF- $\kappa$ B レポーターアッセイのために、pHAGE NF- $\kappa$ B-TA-LUC-UBC-dTomato-W構築物 (Addgene) 由来のNF- $\kappa$ B 応答性配列 (Wilson, Kwokら、2013年) をpGL4.82ウミシイタケルシフェラーゼレポーター (Promega) にクローニングした。がん細胞にこのベクターとLeGO-C2 mCherryベクター (Addgene) を同時トランスフェクトした。ウミシイタケルシフェラーゼ活性をRenillaLuciferase system (Promega) を使用して決定した。赤色蛍光シグナルを使用してトランスフェクション効率を正規化した。

#### 【0125】

免疫組織化学染色。マウスの脳を、4%パラホルムアルデヒドを用いて固定し、ビブラトーム (Leica) またはクライオスタット (Leica) によって切片作製し、確立されたプロトコールに従って染色した (Valiente, Obenausら、2014年)。脳スライスアッセイ (Valiente, Obenausら、2014年) のために、成体マウスの脳の250  $\mu$ m厚のスライスをビブラトーム (Leica) を用いて調製し、脳スライス培養培地 (DMEM、完全HBSS、5% FBS、1 mMのL-グルタミン、100 IU/mlのペニシリン、100  $\mu$ g/mlのストレプトマイシン) 中の0.8  $\mu$ m孔のメンブレン (Millipore) の上部に置いた。3  $\times$  10<sup>5</sup> 個のがん細胞をスライスの表面上に置いた。48時間インキュベートした後、脳スライスを4%パラホルムアルデヒドを用いて固定し、染色した。チャンバースライド培養物中での免疫染色のために、細胞を4%パラホルムアルデヒドを用いて固定し、染色した。免疫化学染色のために使用した抗体を表2に列挙する。Zeiss Axio Imager.Z1顕微鏡またはLeica SP5直立共焦点顕微鏡を用いて画像を取得し、ImageJ、ImarisおよびMetamorphソフトウェアを用いて分析した。免疫染色のために使用した抗体を表2に列挙する。

#### 【0126】

スプリットルシフェラーゼアッセイ。ヒトCx43 (Origene)、PCDH7 (Origene)、E-カドヘリン (Addgene) またはN-カドヘリン (Addgene) のcDNAにおいて終止コドンに欠失させ、ホタルルシフェラーゼのN末端またはC末端断片をスプライシングすることによって融合cDNAを生成した (Luker, Smithら、2004年)。(Addgene)。構築物をpLVXレンチウイルス発現ベクターにクローニングし、非GFP-ルシフェラーゼ標識した親MDA-MB-231またはH2030細胞に形質導入した。ルシフェラーゼ活性を検出するために、7.5 mg/mlのD-ルシフェリンカリウム塩を培養培地に添加した。Living Image software v.2.50を使用してIVIS Spectrum Xenogen instrumentによるBLIを実施した。

#### 【0127】

細胞質dsDNA検出。dsDNAを可視化するために、細胞を抗dsDNA抗体で免

10

20

30

40

50

疫染色した。がん細胞体を描出するために抗GFP染色を使用し、核を識別するためにDAPIを使用し、ミトコンドリアを識別するために抗CoxIV抗体（ミトコンドリアのマーカー）を使用した。アストロサイト細胞体を描出するためにファロイジン染色（Molecular Probe）を使用した。dsDNAを定量化するために、ミトコンドリア単離キット（Thermo Scientific）を使用して核画分、細胞質画分およびミトコンドリア画分を調製した。全ての細胞内画分からのDNAをQIAamp DNA mini kit（Qiagen）によって精製し、QuantoFluor dsDNA system（Promega）によって定量化した。

#### 【0128】

バイオインフォマティクスおよび統計分析。バイオインフォマティクス分析は、特に断りのない限り、R（ver. 3.1.2）で実施した。TopHat2-HTSeq-DESeq2パイプライン（Anders, McCarthyら、2013年、Kim, Perteaら、2013年、Love, Huberら、2014年）を使用してデータを分析した。示差的な遺伝子発現をcookscutoffと比較し、independentfilteringをオフにした。ggplot2パッケージを使用して、倍率変化を示す散布図を作成した。prcompを使用して主成分分析（PCA）を実施した。以前に記載されている通り（Nguyen, Chiangら、2009年、Gatza, Lucasら、2010年）、経路遺伝子応答シグネチャを分析し、zスコア法（Zhang, Jinら、2013年）の合計によってスコア化した。Benjamini & Hochberg 偽陽性率法（false-discovery-rate method）を使用して多重仮説検定を調整した。GraphPad software（Prism）およびスチューデントのt検定（両側）を使用して統計分析を実施した。P値<0.05を統計的に有意とみなした。値は、平均±平均値の標準誤差（S.E.M.）である。

#### 【0129】

臨床試料分析。原発性乳がんのマイクロアレイデータ（EMC-MSK）および腺癌データセット（MSKCC set 2、GSE3141およびGSE8893）においてCX43およびPCDH7の転写物レベルを分析した。同じ遺伝子にマッピングされる複数のプローブを、試料にわたって最大の分散を有するプローブを選択することによって組み合わせた。データセットの臨床的アノテーションに基づいて、またはESR1およびERBB2の転写物レベルに基づいて、トリプルネガティブ乳がん亜型を同定した。CX43とPCDH7の値のハザード比を、Rの「coxph」コマンドによって実行されるコックス比例ハザードモデルに基づいて計算した。CX43発現およびPCDH7発現を連続変数として扱って、コックス比例ハザードモデルからP値を算出した。Cx43免疫組織化学のために、正常な肺組織アレイ（75症例）、原発性トリプルネガティブ乳がん組織アレイ（98症例）および原発性非小細胞肺癌組織アレイ（138症例）をUS BioMaxから購入した。脳転移由来のパラフィン包埋組織マイクロアレイ（トリプルネガティブ乳がん117症例、非小細胞肺癌91症例）をMSKCC Department of PathologyからMSKCC Institutional Review Boardに従って入手した。被験体全員からインフォームドコンセントを得た。Cx43についての免疫組織化学染色を、MSKCC Pathology Core Facilityによって、標準化された自動プロトコールを使用して実施した。対応する原発性-脳転移病変について、Cx43染色画像を陽性染色面積によって定量化した（Metamorph software）。

#### 【0130】

LC-MS/MSによるcGAMP定量化。細胞（240万個のMDA231-BRM2またはヒトアストロサイト単独、240万個のヒトアストロサイト+240万個のMDA231-BRM2共培養物）を10cmのディッシュに播いた。18時間後に培養培地を吸引し、4nMのc-di-GMP内部標準を含有する80:20メタノール:水2mLで置き換えた。ディッシュを-80℃で一晩インキュベートしてタンパク質沈殿を促進

10

20

30

40

50

し、こすり取って2 mLの遠心管に移した。試料を2回のボルテックス、液体窒素での凍結/解凍サイクルに供し、氷水浴中、最大出力で5分にわたって超音波処理し、4、21,000×gで20分にわたって遠心分離することによって清澄化した。卓上エバポレーター(Genevac)を使用して抽出物を乾燥させ、水中0.1%ギ酸100 µL中に再構成した。Shimadzu HPLC、Accela Openオートサンプラー(Thermo)およびCortecs C18+カラム(Waters、150 mm×2.1 mm、2.7 µm)を使用して液体クロマトグラフィー分離を実施した。試料は4で維持し、注射体積は15 µLとした。水性移動相(A)は水中0.1%ギ酸であり、有機移動相(B)はアセトニトリル中0.1%ギ酸であった。最初の条件は0% B、勾配プログラム: 1.0分: 0% B; 7分: 20% B; 7.1分: 90% B; 9.0分: 90% Bおよび5分の再平衡化時間であった。流量は毎分400 µLであり、90:10アセトン:DMSOであるカラム後溶媒を、デッドボリュームのないT継手(zero-dead volume tee)を使用して毎分120 µLでLC流に添加して検出感度を増強した。SRMおよび陽イオン化モードで作動するTSQ Vantage質量分析計(Thermo)を使用して環状ヌクレオチドを検出した。ソースパラメータは、スプレー電圧: 4000 V; 気化器温度: 200、シースガス圧: 70 psi; 補助ガス圧: 20 psi、キャピラリー温度: 400であった。化合物特異的Sレンズ値は164 V(cGAMP)および190 V(c-di-GMP)であった。個々の反応をモニターし、衝突エネルギーは、cGAMP m/z 675.1 m/z 512.1 (CE: 19 V)、m/z 312.0 (CE: 40 V)、m/z 136.0 (CE: 39 V)\* および c-di-GMP m/z 675.1 m/z 540.1 (CE: 19 V)、m/z 248.0 V (CE: 27 V)、m/z 152.0 (CE: 31 V)\* であり、\* は、各環状ヌクレオチドを定量化するために使用した一次ランジションを示す。保持時間およびランジションを環状[G(2', 5')] pA(3', 5') p] および c-di-GMP 代謝産物標準物質(BioLog)と比較して確認した。Xcalibur software(Thermo)およびPrism(GraphPad)を使用してデータ分析を行った。

#### 【0131】

##### 6.2 結果

脳転移は、Cx43ギャップジャンクション形成と関連した 肺がんおよび乳がんは最も一般的な脳転移の供給源である(GavrilovicおよびPosner 2005年)。ヒトまたはマウス起源の乳房(MDA231-BrM2、ErbB2-BrM)または肺腺癌(H2030-BrM3、Kras/p53-BrM)に由来する4つの脳転移モデルを用いた(図6a)(Bos, Zhangら、2009年、Nguyen, Chiangら、2009年、Winslow, Daytonら、2011年、Valiente, Obenaufら、2014年)。これらの細胞は、同所性腫瘍として移植するかまたはマウスの動脈循環中に接種すると、顕著なアストロサイト増加を含めた脳転移の重要な病理組織学的特徴を再現する病変を形成する(図1a)(Bos, Zhangら、2009年、Nguyen, Chiangら、2009年、Valiente, Obenaufら、2014年)。これらのモデルの全てにおいて、脳転移細胞は、反応性アストロサイトによる致死性プラスミンの生成を妨げるために抗PAセルピンを産生する(Valiente, Obenaufら、2014年)。しかし、アストロサイトと共培養することにより、がん細胞が化学療法およびアポトーシス促進性サイトカインであるFasLから保護され(図6b)、これは、以前のin vitroにおける所見と一致する(Kim, Kimら、2011年)。これらの結果から、脳転移におけるアストロサイトの可能性のある二重の役割が示唆される。

#### 【0132】

アストロサイトは、巨大なギャップジャンクションネットワークの中で相互作用する(TheisおよびGiaume 2012年、HaydonおよびNedergaard 2015年)。コネキシン43(Cx43)は、アストロサイト内の主要なギャップジ

ヤンクシオンタンパク質の1つである。本発明者らの脳転移マウスモデルにおいて、がん細胞と周囲のアストロサイトの界面においてC x 4 3発現が観察された(図1 b)。C x 4 3によりがん細胞と内皮細胞との間の相互作用が媒介され得(C a i, J i a n g ら、1998年)、また、アストロサイト(Z h a n g, I w a k u m a ら、2009年)は転移促進性(P o l l m a n n, S h a o ら、2005年)または抗転移性(S h a r m a, A b r a h a m ら、2010年)であることが提唱された。C x 4 3と脳転移の臨床的関連性を決定するために、本発明者らは、患者の組織試料をアッセイした。トリプルネガティブ乳がんおよび非小細胞肺癌(N S C L C)において、本発明者らは、C x 4 3染色のレベルが脳転移では原発性腫瘍または正常組織よりも高いことが見いだされた(図1 c ~ d)。

10

#### 【0133】

ギャップジャンクションは、六量体コネキシンヘミチャネルによって形成される。隣接する細胞上のヘミチャネル間の対になった相互作用により、細胞質分子の輸送のためのポアが形成される(B e n n e t t および G o o d e n o u g h 1978年、O s h i m a 2014年)。全てのギャップジャンクションが機能的なポアを形成するとは限らない(S t o l e t o v, S t r n a d e l ら、2013年)、(S h a r m a, A b r a h a m ら、2010年)。しかし、微速度撮影蛍光顕微鏡によって示される通り、脳転移細胞からアストロサイトへのカルセインの時間依存的な移行(図1 e ; 図6 c)、およびフローサイトメトリーによって示される通り、アストロサイトから転移細胞へのカルセインの時間依存的な移行(図6 d)が観察された。

20

#### 【0134】

脳転移はプロトカドヘリン7を上方制御する。アストロサイトカルセイン移行は、脳転移細胞でそれらの親対応物よりも容易に起こった(図1 f)。この表現型は、脳転移派生物ではC x 4 3発現がより高いことによって十分に説明できなかった(図1 g、図7 a、b)。さらに、転移細胞におけるC x 4 3発現は、アストロサイト、ニューロン、または脳微小血管内皮細胞におけるC x 4 3発現よりも低いか、またはそれと同様であった(図1 h、図7 c)。脳転移細胞における他のアストロサイトコネキシン(C x 2 6、C x 3 0)の発現レベルは、親細胞での発現レベルと同様であった(図7 d)。これらの知見から、転移細胞がどのようにして常在アストロサイトとギャップジャンクション形成について競合し得るのかという疑問が生じた。

30

#### 【0135】

がん細胞がアストロサイトと会合するためにC x 4 3に加えて別の構成成分を使用するに違いないと推論して、本発明者らは、乳房腫瘍由来の脳転移細胞および肺腫瘍由来の脳転移細胞にどちらにおいても上方制御される小さな遺伝子群のうちの1つであるプロトカドヘリン7(P C D H 7)について調査した(B o s, Z h a n g ら、2009年、N g u y e n, C h i a n g ら、2009年、V a l i e n t e, O b e n a u f ら、2014年)。プロトカドヘリンは、同種親和性相互作用(h o m o p h i l i c i n t e r a c t i o n)による細胞間接触を導くカドヘリンリピートを7つ有する内在性膜タンパク質である。P C D H 7(カドヘリン関連ニューロン受容体としても公知である)は、主に脳において発現する唯一のプロトカドヘリンであり(Y o s h i d a, Y o s h i t o m o - N a k a g a w a ら、1998年、K i m, C h u n g ら、2007年)、その機能は分かっていない。P C D H 7レベルは、脳転移派生物において、親細胞株(図1 g、図7 a、b)または骨もしくは肺には高転移性であるが脳には高転移性ではない対応する派生物(図1 i ; 図6 a 参照)におけるものよりも高かった。脳転移細胞におけるP C D H 7レベルは、アストロサイト、ニューロン、ミクログリアまたは内皮細胞におけるものよりも高かった(図1 h、図7 c)。

40

#### 【0136】

再発部位のアノテーションを伴うトリプルネガティブ乳がんの臨床コホートでは、原発性腫瘍におけるP C D H 7とC x 4 3の組合せ発現が脳転移には関連したが、骨転移にも肺転移にも関連しなかった(図1 j)。大多数のN S C L C データセットは部位特異的転

50

移情報がアノテートされていないが、これらの患者における再発は高い割合（70%まで）で脳転移を含む（Gaspar, Chanskyら、2005年）。脳転移に関連する罹患率および死亡率は極めて高いので（Gaspar, Scottら、2000年）、これらは、無転移生存期間に対して不均衡に寄与する。実際に、Cx43発現およびPCDH7発現は、3つのコホートにおけるNSCLC患者の無転移生存期間の低下に関連した（図1k、図7e）。これらの結果は全て、PCDH7およびCx43が脳転移に関連するという仮説を裏付けるものである。

#### 【0137】

PCDH7により癌腫 - アストロサイトギャップジャンクションが導かれる。PCDH7またはCx43のいずれかを低分子ヘアピン型RNA（shRNA）によって枯渇させた脳転移細胞（図7f、g）では、対照と比較してアストロサイトへの色素移行の能力の低減が示された（図2a、図8a）。Cx43枯渇後の色素移行の阻害の程度は、汎コネクシン阻害剤であるカルベノキソロン（carbenoxone）を用いて得られるものと同等であった（図8b）。隣接する細胞上の分子間の同種親和性結合を確立するカドヘリンの能力を考慮して（YagiおよびTakeichi、2000年）、本発明者らは、がん細胞とのギャップジャンクションの形成にアストロサイトPCDH7が関与する可能性があるという仮説を立てた。実際に、アストロサイトにおけるPCDH7枯渇（図8c）によっても、MDA231 - BrM2細胞からの色素移行が阻害された（図8d）。

#### 【0138】

ヒト脳微小血管内皮細胞（HBMEC）は、アストロサイトよりもはるかに低レベルのCx43を発現し、また、PCDH7発現は検出可能でない（図1h、図7c）。がん細胞とHBMECとの間ではPCDH7に依存しないギャップジャンクションコミュニケーションが低レベルで起こった（図8e）。競合実験において、がん細胞とアストロサイトとの間での色素移行は、がん細胞と内皮細胞との間での色素移行よりも有利であった（図8f）。初代ミクログリア細胞はCx43およびPCDH7を非常に低レベルで発現し、がん細胞からカルセインを受容しなかった（図8g）。アストロサイトおよびがん細胞におけるCx43レベルは、ミクログリアと共培養した後も一定のままであった（図8h）。したがって、PCDH7により、がん細胞が優先的にアストロサイトとCx43ギャップジャンクションを形成するよう導かれる。

#### 【0139】

本発明者らは、スプリットルシフェラーゼ補完アッセイ（Luker, Smithら、2004年）を用いて、生細胞におけるPCDH7のCx43との相互作用を検出した。ホタルルシフェラーゼのN末端側半分（NLuc）およびC末端側半分（CLuc）に融合したPCDH7およびCx43をコードする構築物を、非GFP - ルシフェラーゼ標識した親細胞において関連する組合せで発現させた（図2b）。NLucとCLucが近傍になると、ルシフェラーゼ活性が再構成される。Cx43は細胞膜において六量体セミチャネルに自己組織化するので、Cx43 - NLucベクターおよびCx43 - CLucベクターを用いた細胞への形質導入が陽性対照としての機能を果たした（図2b）。本発明者らは、Cx43 - CLucとPCDH7 - NLucの両方を発現する細胞において特異的なルシフェラーゼ活性を検出した（図2b）。PCDH7およびCx43の発現レベルは、親細胞における内在性レベルよりも高かったが、脳転移細胞におけるレベルよりは低いかまたはそれと同等であった（図9a）。さらに、アストロサイトとの共培養により、がん細胞におけるルシフェラーゼシグナルが上昇し（図9b）、これにより、アストロサイトのCx43およびPCDH7により、がん細胞のCx43 - CLucおよびPCDH7 - NLucのさらなるクラスター化が誘導されることが示唆される。N - カドヘリンまたはE - カドヘリンをNLucと融合し、Cx43 - CLucと同時発現させた場合には活性は検出されなかった（図9c ~ e）。

#### 【0140】

Cx43およびPCDH7により脳転移コロニー形成が媒介される。異種移植モデル（

10

20

30

40

50

図 2 c ~ d ) および免疫適格性モデル ( 図 1 0 a ) において、C x 4 3 または P C D H 7 のいずれかの s h R N A 媒介性枯渇により、乳がん細胞および肺がん細胞による脳転移の形成が阻害された。脳切片における G F P についての免疫組織化学染色により、この結果が確認され、C x 4 3 または P C D H 7 枯渇の結果として病変サイズの顕著な縮小が実証された ( 図 1 0 b ) 。 C x 4 3 または P C D H 7 の枯渇は、尾静脈注射後の M D A 2 3 1 - B r M 2 細胞による肺病変の形成には影響を及ぼさなかった ( 図 1 0 c ) 。

#### 【 0 1 4 1 】

コネキシンは、チャネル機能とは独立して細胞間相互作用を媒介することができるので、本発明者らは、チャネル機能を欠くがそれでもヘミチャネルを組み立てる C x 4 3 ( T 1 5 4 A ) 変異体を用いた ( 図 2 e ) ( B e a h m , O s h i m a ら、2 0 0 6 年 ) 。野生型または T 1 5 4 A 変異体のいずれかの C x 4 3 を C x 4 3 枯渇脳転移がん細胞において再発現させた ( 図 1 0 d ) 。変異体 C x 4 3 はアストロサイトから M D A 2 3 1 - B r M 細胞へのカルセイン移行を媒介することができなかった ( 図 2 e ) 。野生型 C x 4 3 は C x 4 3 枯渇 M D A 2 3 1 - B r M および H 2 0 3 0 - B r M 細胞における脳転移活性をレスキューしたが、C x 4 3 ( T 1 5 4 A ) はレスキューしなかった ( 図 2 f 、図 1 0 e ) 。まとめると、これらの知見により、P C D H 7 が直接かつ特異的に C x 4 3 と相互作用してがん細胞とアストロサイトとの間の機能的なギャップジャンクション形成を選択的に促進するモデルが支持される ( 図 2 g ) 。

#### 【 0 1 4 2 】

P C D H 7 および C x 4 3 が脳転移の形成に寄与する段階を定義するために、本発明者らは、M D A 2 3 1 - B r M 2 細胞を用いた短期転移アッセイを実施した。このモデルでは、B B B を横切る血管外遊出が接種後 7 日で完了し、血管の利用および顕性の増生が 1 4 日目までに起こる ( V a l i e n t e , O b e n a u f ら、2 0 1 4 年 ) 。がん細胞における C x 4 3 または P C D H 7 枯渇により、接種の 7 日後の脳実質内の G F P + がん細胞の数は有意には減少しなかった ( 図 1 1 a ) 。接種の 1 4 日後に、C x 4 3 または P C D H 7 を枯渇させた細胞に起因する微小転移では、K i 6 7 染色によって決定された通り、増殖の低下が示された ( 図 1 1 b ) 。脳転移細胞のアポトーシスを e x - v i v o 脳スライスアッセイにおいて決定した ( V a l i e n t e , O b e n a u f ら、2 0 1 4 年 ) 。この手法を用いて、本発明者らは、アポトーシスの増加と一致して、C x 4 3 または P C D H 7 を枯渇させた細胞においてカスパーゼ 3 染色が増加することを見いだした ( 図 1 1 c ) 。注目すべきことに、C x 4 3 枯渇細胞または P C D H 7 枯渇細胞は、それでもなお毛細血管と密接に相互作用することができた ( 図 1 1 d ) 。したがって、がん細胞 - アストロサイトギャップジャンクションにより、最初の血管外遊出および血管の利用後の脳転移発生が支持される。

#### 【 0 1 4 3 】

がん細胞ギャップジャンクションにより、アストロサイトによるサイトカインの放出が誘発される。この C x 4 3 媒介性脳転移成長の背後の機構を決定するために、本発明者らは、翻訳リボソームアフィニティー精製 ( T R A P ) ( H e i m a n , S c h a e f e r ら、2 0 0 8 年 ) を使用して、混合共培養物におけるがん細胞遺伝子発現をアッセイした ( 図 1 2 a ) 。本発明者らは、e G F P タグを付けた L 1 0 a リボソームサブユニットを、基底の C x 4 3 発現を伴うかまたは C x 4 3 発現が低減した M D A 2 3 1 - B r M 2 細胞において発現させた。がん細胞とアストロサイトを 2 4 時間にわたって共培養した後、e G F P 免疫沈降およびがん細胞からのポリソーム関連 m R N A の採取を行い、その後、グローバルトランスクリプトーム配列決定 ( T R A P - R N A s e q ) を行った ( 図 1 2 b 、 c ) 。遺伝子シグネチャ分析により、インターフェロン ( I F N ) および N F - B 経路が、アストロサイトとの共培養後に脳転移細胞において最も活性化される経路であり、これらの効果は、C x 4 3 を必要とすることが明らかになった ( 図 3 a ) 。他の上方制御された経路には、H e r 2 / A K T および T G F が含まれた。アストロサイト - M D A 2 3 1 - B r M 2 共培養からの馴化培地は、S T A T 1 および N F - B p 6 5 のリン酸化の増加によって決定された通り、がん細胞における I F N および N F - B シグ

10

20

30

40

50

ナル伝達を活性化するために十分であった(図3b、図12d)。この効果は、アストロサイトとC×43枯渇またはC×43(T154A)再構成がん細胞との共培養からの馴化培地では観察されなかった(図3c)。

#### 【0144】

MDA231-BrM2-アストロサイト共培養において生成した馴化培地の分析(図3d)により、I型インターフェロン、IFN、およびTNFがギャップジャンクション依存的に蓄積されることが実証され(図3e、図13a~b)、II型インターフェロン、IFNは検出されなかった(データは示していない)。単独またはアストロサイトと共培養したMDA231-BrM2は、TRAP-RNAseqによって検出された通り、これらのサイトカインを発現しなかった(データは示していない)。共培養後に再単離したアストロサイトにおいてINF mRNAおよびTNF mRNAの上方制御が検出された(図3f)。これらの結果から、異種細胞ギャップジャンクションコミュニケーションにより、アストロサイトにおけるIFNおよびTNFの産生が引き出され、それにより、がん細胞におけるSTAT1およびNF- $\kappa$ B経路活性化が誘発されることが示唆された。in vitroにおいて、IFNおよびTNFの添加により、脳転移がん細胞の細胞傷害性化学療法に対するアポトーシス性応答が阻害された(図3g、図13c)。脳転移におけるこれらの経路の機能的な重要性を評価するために、本発明者らは、脳転移細胞において、STAT1をshRNAによってノックダウンしたか(図3h、図13d)、または、IB超抑制因子(super suppressor)(SR-IB)を過剰発現させることによってNF- $\kappa$ Bを阻害した(Boehm, Zhaoら、2007年)(図3i)。マウスに接種すると、これらの細胞では対照対応物よりも小さな脳転移が生じ(図3j、図13e)、これにより、STAT1およびNF- $\kappa$ B活性化因子により、脳における転移細胞に生存優位性がもたらされることが示唆される。

#### 【0145】

がん細胞ギャップジャンクションにより、アストロサイトにおける細胞質dsDNA応答が活性化される。IFNおよびTNFは、多様なインプットによって個別に誘導することができるが、両方のサイトカインの共同上方制御は細胞質二本鎖DNA(dsDNA)に対する細胞応答を想起させた(Cai, Chiuら、2014年)。細胞質dsDNAにより、環状GMP-AMPシンターゼ(cGAS)が細胞質dsDNAを感知し二次メッセンジャーである2'-3'-環状GMP-AMP(cGAMP)を合成するcGAS-STING経路が誘発される。cGAMPがSTINGと結合することにより、TBK1およびIRF3のリン酸化および活性化、IRF3の核内蓄積、およびIRF3の標的遺伝子であるIFNAおよびTNFAの転写活性化が誘発される(Wu, Sunら、2013年)。この経路は、古代抗ウイルス先天免疫応答である(Cai, Chiuら、2014年)。

#### 【0146】

MDA231-BrM2細胞とアストロサイトの共インキュベーションにより、C×43依存の様式でTBK1およびIRF3のリン酸化が誘発された(図4a、図14a)。IRF3の核内蓄積は共培養したアストロサイトにおいてのみ起こり、単独で培養したアストロサイトにおいてもがん細胞においても起こらなかった(図4b)。LC-MS/MSを使用して、本発明者らは、MDA231-BrM2細胞ではcGAMPを検出したが、単独で培養したアストロサイトではcGAMPは検出されなかった(図4c~d、図14b)。固定数のMDA231-BrM2細胞とアストロサイトの共培養により、cGAMPのレベルのC×43依存性の上昇が導かれた(図4c~d)。ミトコンドリアdsDNAが細胞質に放出されるストレス条件を使用して、本発明者らは、アストロサイトが、細胞質dsDNAに反応したcGAMPの産生に対してコンピテントであることを確認した(Rongvaux, Jacksonら、2014年)。

#### 【0147】

細胞成分分画により、これらの脳転移細胞および他のヒトのがん細胞株は細胞質dsD

10

20

30

40

50

NAを含有するが、アストロサイトおよび他の非新生物ヒト細胞は細胞質dsDNAを含有しないことが実証された(図4e、図14c、d)。免疫蛍光法により、本発明者らは、細胞質dsDNAを脳転移がん細胞では検出したが(図4f、図9e)、アストロサイトでは検出しなかった(図14f)。がん細胞DNAがCx43ギャップジャンクションを通じてアストロサイトまでわたるかどうかを決定するために、本発明者らは、がん細胞DNAを5-エチニル-2'-デオキシウリジン(EdU)で標識し、その細胞をアストロサイトと共培養し、標識したDNAの分布を顕微鏡(図4g、図14g)またはフローサイトメトリー(図4h)によって分析した。どちらの方法でも、がん細胞からアストロサイトへのDNAのCx43依存的様式での移行が実証された。

【0148】

10

総合すると、これらの結果により、脳転移がん細胞が細胞質dsDNAおよびcGAMPを含有し、Cx43に基づくギャップジャンクションにおいてアストロサイトと会合するためにPCDH7を用いるモデルが支持される。ギャップジャンクションにより、細胞質dsDNA(およびcGAMP)ががん細胞からアストロサイトまで通過して、さらなるcGAMPの生成、TBK1およびIRF3の活性化、ならびにIFNおよびTNFの産生が誘発される。これらのサイトカインは、パラクリン因子として作用して、がん細胞におけるSTAT1およびNF- $\kappa$ Bシグナル伝達を活性化し、それにより、微小環境および化学療法薬によるストレスに際したがん細胞の成長および生存を支持する(図4i)。

【0149】

20

ギャップジャンクション活性の薬理的阻害。

ギャップジャンクション構成成分の遺伝子阻害によって脳転移増生が低減するという証拠により、脳転移に対するギャップジャンクション活性の薬理的抑制因子を試験することについての理論的根拠がもたらされた。この目的のために、本発明者らは、経口的に生物が利用可能な化合物を2種、前臨床試験のために選択した。抗炎症活性に加えて、メクロフェナメートは、Cx43ギャップジャンクションゲーティングを阻害し(Harks, de Roosら、2001年)、動物モデルにおけるてんかん発生を阻害し(Jin, Daiら、2013年)、全身投与後にBBBを通過し(Harks, de Roosら、2001年)、全身的に耐受性がよく(Holmes、1966年)、また、現在FDAに認可されたNSAIDである。トナベルサットは、アストロサイトにおける独特の立体選択的結合部位に結合するベンゾピラン誘導体であり(Herdon, Jermanら、1997年、Chan, Evansら、1999年)、動物モデルにおける皮質拡張性抑制(Read, Smithら、2000年)および三叉神経節ニューロンサテライト細胞シグナル伝達(Damodaram, Thalakotiら、2009年)を含めた、ギャップジャンクション媒介性の病態生理学的プロセスを阻害し、そして片頭痛を有する患者において全身的に耐受性がよく、安全である(Dahlhof, Haugerら、2009年)。

【0150】

30

フローサイトメトリーによって測定された通り、トナベルサットとメクロフェナメートのどちらによっても、アストロサイトからがん細胞への色素移行(図5a)、および、これらの細胞の共培養におけるIFNおよびTNFの放出(図5b)が阻害され、Cx43またはPCDH7のノックダウンで見られる表現型が再現された。免疫不全マウスにおいてMDA231-BrM2細胞またはH2030-BrM3細胞を動脈接種したか、または免疫適格マウスにおいてKRas/p53-393N1細胞を動脈接種した後1日目から、マウスをビヒクルまたはこれらの化合物のいずれかを用いて処置した(図5c、図15a、b)。どちらの薬物によっても脳転移の出現が妨げられ、これは、ギャップジャンクション活性が転移性増生と関連するという本発明者らの証拠と一致した。しかし、この処置では、MDA231-BrM2細胞の肺転移病変または同所性腫瘍としての成長は制限されなかった(図15c、d)。

40

【0151】

50



ギャップジャンクションを対象とする療法。確立された転移におけるC×43またはPCDH7枯渇の影響を試験するために、本発明者らは、MDA231-BrM2細胞にTet誘導性shRNA発現ベクターを用いた形質導入を行った(図5e)。同じプロモーターの制御下にある赤色蛍光タンパク質(RFP)により、in vivoにおけるヘアピン発現のマーカーがもたらされた(図10e)。誘導性C×43またはPCDH7 shRNAベクターを用いて形質導入した細胞では、それぞれ、C×43またはPCDH7のドキシサイクリン依存性の枯渇が示された(図15f)。これらの細胞を心臓内に注射し、14日間にわたって脳転移を形成させた。この段階で、全てのマウスにおいてBLIにより脳病変が明らかであり(図15g)、浸潤性病変が微小血管系を巻き込み(図5d)、2~3週間のうちに動物は死亡に至る(Bos, Zhangら、2009年、Valiente, Obenausら、2014年)。ドキシサイクリン投与を14日目開始することにより、3週間後の脳転移負荷量が対照と比較して減少した(図5f、g)。

#### 【0152】

脳転移は、化学療法に対する著しい抵抗性によって識別される(Zhang, Priceら、1992年、DeekenおよびLoscher、2007年)。カルボプラチンはBBBを横断し(Pitz, Desaiら、2011年)、乳がん(LimおよびLin、2014年)または肺がん(TaimurおよびEdelman、2003年)からの脳転移を有する患者における全生存の改善はそれほど大きくない。カルボプラチンを単独で(50mg/kg/5日間)14日目に開始することにより、C×43またはPCDH7の枯渇と同程度まで脳転移が阻害され(図5f、g)、カルボプラチンとドキシサイクリンの組合せでは転移負荷量がさらに減少した(図5f、g)。したがって、本発明者らは、ギャップジャンクション調節療法と化学療法の組合せの有効性を評価した(図5h)。カルボプラチンを単独で用いた処置では、脳転移の成長が最小限しか阻害されなかった(図5i)。単一薬剤としてのトナベルサット(10mg/kg)またはメクロフェナメート(20mg/kg)のいずれか(図5i)では、35日の終点で転移病変の進行が有意に阻害された。カルボプラチンとトナベルサットまたはメクロフェナメートのいずれかとの組合せでは、脳転移が極めて大きく阻害された(図5i)。

#### 【0153】

##### 6.3 考察

脳は、アストロサイトが微小環境の優勢な特徴である、独特な難しい転移標的を表す。本発明者らは、がん細胞が、極めて重要なC×43ギャップジャンクションでアストロサイトと選択的に会合するためにPCDH7を用いるという証拠を示す。カドヘリンファミリーメンバーは、特に神経系における(Hirano, Suzukiら、2003年)、発生および組織恒常性における細胞間コミュニケーションの重要なメディエーターである(YagiおよびTakeichi、2000年)。脳転移細胞は、正常な発現が脳に大きく限定されるこのファミリーの特定のメンバーを用いることに注目すべきである(Yoshida, Yoshitomo-Nakagawaraら、1998年)。したがって、PCDH7は、乳癌および肺癌に由来する脳転移細胞が選択的に発現して脳にコロニー形成する、脳に限定される構成成分として、ST6GALNAC5(Bos, Zhangら、2009年)、およびニューロセルピン(Valiente, Obenausら、2014年)と結びつく。

#### 【0154】

PCDH7およびC×43は、脳転移コロニー形成および化学療法抵抗性に寄与する。がん細胞とアストロサイトとの間の機能的なC×43に基づくギャップジャンクションにより、がん細胞が細胞質dsDNAをアストロサイトネットワークに拡散することが可能になる。これにより、アストロサイトcGAS-STING経路が活性化し、結果的に、IFNおよびTNFを含めたサイトカインが放出される。これらのサイトカインにより、脳転移細胞に対して、生理的ストレス要因および化学療法によるストレス要因からの保護による成長利点がもたらされる。他の上方制御される経路には、Her2/AKTお

よび TGF が含まれる。したがって、本発明者らの結果から、以前に観察された *in vitro* におけるアストロサイトのがん細胞に対する化学的保護効果 (chemoprotective effect) についての *in vivo* における証拠および機構的な裏付けがもたらされる (Kim、Kimら、2011年)。本証拠により、以前の研究と合わせて、がん細胞が、アストロサイトによる攻撃から2つのやり方で自身を保護し、第1のやり方は、細胞傷害性プラスミン生成のセルピン阻害物質の産生によるものであり、第2のやり方は、ギャップジャンクションを通じてアストロサイトと会合し、dsDNA 応答を流用するものであることが示唆される。

【0155】

細胞質 dsDNA は、ウイルス感染に対する先天免疫の活性化因子として最初に定義された (Stetson および Medzhitov、2006年)。がん細胞では、ゲノムの不安定性、ミトコンドリアストレス、および DNA 損傷剤への曝露を含めた、dsDNA の可能性のある供給源がいくつも存在する。DNA により誘発される先天免疫応答、そして具体的には cGAMP は、ギャップジャンクションを通じて他の細胞にわたることができる (Patel、Kingら、2009年、Ablasser、Schmid-Burgkら、2013年)。これらの知見と一致して、本発明者らは、脳転移派生物を含めた悪性細胞が、アストロサイトおよび他の間質細胞と比較して高レベルの細胞質 dsDNA および cGAMP を含有することが見いだされた。重要なことに、脳転移では、dsDNA 応答は、がん細胞における内因性の細胞質 dsDNA から出現し、Cx43 依存性であり、また宿主組織アストロサイトが関与し、したがって、これは前例のない転移促進プロセスを表す。

【0156】

脳転移は、がん患者の罹患率および死亡率の主要な一因であり、利用可能な治療選択肢はわずかである。がん細胞の拡散および BBB を通じた血管外遊出を含めた脳転移カスケードの初期ステップは、療法に適したものではなかった (Maher、Mietzら、2009年、Eichler、Chungら、2011年)。しかし、がん細胞が転移病変を生存および増生させるために Cx43 / PCDH7 ギャップジャンクションに依存することは、治療の機会を示唆する。化学療法とギャップジャンクションモジュレーターの組合せを使用した本発明者らの前臨床結果から、脳転移に対するこれらの介入の治療的潜在性についての原理証明がもたらされる。

【0157】

10

20

30

【表 1】

表1. shRNAの標的配列(上から下に配列番号1~14)

## PLKO. 1レンチウイルスベクター-ヒト遺伝子

shの名称	カタログ番号	配列
Cx43 sh1	TRCN0000059773	GCCCAAACGTGATGGTGTCAA T
Cx43 sh2	TRCN0000059775	GCGACAGAAACAATTCTTCTT
PCDH7 sh1	TRCN0000055744	GCAGGAGACAACATTTCAAT
PCDH7 sh2	TRCN0000291663	GCTGGCATTATGACGGTGAT T
STAT1 sh1	TRCN0000280021	CTGGAAGATTTACAAGATGAA
STAT1 sh2	TRCN0000004265	CCCTGAAGTATCTGTATCCAA

## TRIPZ誘導性レンチウイルスベクター-ヒト遺伝子

shの名称	カタログ番号	配列
Cx43 sh1	V3THS_411733	TAAGGACAATCCTCTGTCT
Cx43 sh2	V3THS_411729	TGAGTGGAATCTTGATGCT
PCDH7 sh1	V3THS_338930	GAATCAACACTGCCATCGG
PCDH7 sh2	V3THS_152694	TTAAGATGATTAGAATCAC

## GIPZレンチウイルスベクター-マウス遺伝子

shの名称	カタログ番号	配列
Cx43 sh1	V3LHS_411730	TGAGTACCACCTCCACCGG
PCDH7 sh1	V3LMM_510718	TAACTTTAAACTCATACCT
PCDH7 sh2	V2LMM_11270	TAAACTTAGGGTCGTTGTC

## 対照sh

shの名称	カタログ番号	配列
Ctrl sh	SHC016	CCGGGCGCGATAGCGCTAAT AATTCTC

10

20

30

40

表2. 抗体

## ウエスタンブロッティング用抗体

抗体の対象	会社	カタログ番号
Cx43	Cell Signaling	3512
PCDH7	Sigma-Aldrich	HPA011866
$\alpha$ -チューブリン	Sigma-Aldrich	T6074
E- カドヘリン	Cell Signaling	3195
N-カドヘリン	Sigma-Aldrich	C3865
ホスホ -STAT1	Cell Signaling	9167
STAT1	Cell Signaling	9172
ホスホ -NF- $\kappa$ B p65	Cell Signaling	3033
NF- $\kappa$ B p65	Cell Signaling	8242
ホスホ -TBK1	Cell Signaling	5483
TBK1	Cell Signaling	3013
ホスホ -IRF3	Cell Signaling	4947
IRF3	Cell Signaling	11904
I $\kappa$ B $\alpha$	Cell Signaling	4812

## 免疫化学染色用抗体

抗体の対象	会社	カタログ番号
Cx43	Cell Signaling	3512
GFP	Aves Labs	GFP-1020
Ki67	Vector Laboratories	VP-K451
GFAP	Dako	Z0334
GFAP	EMD Millipore	MAB360
コラーゲン IV	EMD Millipore	AB756P
IRF3	Cell Signaling	9172
dsDNA	EMD Millipore	MAB1293
Cox IV	Cell Signaling	4850

## 【化 4】

## 7. 参考文献

- Axelsen, L.N., Calloe, K., Holstein-Rathlou, N.H., and Nielsen, M.S. (2013). Managing the complexity of communication: regulation of gap junctions by post-translational modification. *Front Pharmacol* 4, 130.
- Bartzatt, R. (2012). Anti-inflammatory drugs and prediction of new structures by comparative analysis. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 11, 151-160. 10
- Bennett, M.V., and Goodenough, D.A. (1978). Gap junctions, electrotonic coupling, and intercellular communication. *Neurosci Res Program Bull* 16, 1-486.
- Bos, P.D., Zhang, X.H., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R.R., Nguyen, D.X., Minn, A.J., van deVijver, M.J., Gerald, W.L., Foekens, J.A., et al. (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* 459, 1005-1009.
- Bradley, D.P., Smith, M.I., Netsiri, C., Smith, J.M., Bockhorst, K.H., Hall, L.D., Huang, C.L., Leslie, R.A., Parsons, A.A., and James, M.F. (2001). Diffusion-weighted MRI used to detect in vivo modulation of cortical spreading depression: comparison of sumatriptan and tonabersat. *Exp Neurol* 172, 342-353. 20
- Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2, 563-572.
- Chan, W.N., Evans, J.M., Hadley, M.S., Herdon, H.J., Jerman, J.C., Parsons, A.A., Read, S.J., Stean, T.O., Thompson, M., and Upton, N. (1999). Identification of (-)-cis-6-acetyl-4S-(3-chloro-4-fluoro-benzoylamino)-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-benzo[b]pyran-3S-ol as a potential antimigraine agent. *Bioorg Med Chem Lett* 9, 285-290. 30
- Dahlof, C.G., Hauge, A.W., and Olesen, J. (2009). Efficacy and safety of tonabersat, a gap junction modulator, in the acute treatment of migraine: a double-blind, parallel-group, randomized study. *Cephalalgia* 29 Suppl 2, 7-16.
- Damodaram, S., Thalakoti, S., Freeman, S.E., Garrett, F.G., and Durham, P.L. (2009). Tonabersat inhibits trigeminal ganglion neuronal-satellite glial cell signaling. *Headache* 49, 5-20. 40
- DeAngelis, L.M., and Posner, J.B. (2009). Intracranial Metastasis. In *Neurologic Complications of Cancer*, S. Gilman, ed. (Oxford University Press), pp. 141-274.
- Deeken, J.F., and Loscher, W. (2007). The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clin Cancer Res* 13, 1663-1674.

## 【化 5】

Eichler, A.F., Chung, E., Kodack, D.P., Loeffler, J.S., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2011). The biology of brain metastases-translation to new therapies. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 344-356.

Eugenin, E.A., Basilio, D., Saez, J.C., Orellana, J.A., Raine, C.S., Bukauskas, F., Bennett, M.V., and Berman, J.W. (2012). The role of gap junction channels during physiologic and pathologic conditions of the human central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 7, 499-518. 10

Gaspar, L.E., Gay, E.G., Crawford, J., Putnam, J.B., Herbst, R.S., and Bonner, J.A. (2005). Limited-stage small-cell lung cancer (stages I-III): observations from the National Cancer Data Base. *Clin Lung Cancer* 6, 355-360.

Gaspar, L.E., Scott, C., Murray, K., and Curran, W. (2000). Validation of the RTOG recursive partitioning analysis (RPA) classification for brain metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47, 1001-1006.

Gavrilovic, I.T., and Posner, J.B. (2005). Brain metastases: epidemiology and pathophysiology. *J Neurooncol* 75, 5-14. 20

Gilula, N.B., Reeves, O.R., and Steinbach, A. (1972). Metabolic coupling, ionic coupling and cell contacts. *Nature* 235, 262-265.

Goadsby, P.J., Ferrari, M.D., Csanyi, A., Olesen, J., Mills, J.G., and Tonabersat, T.O.N.S.G. (2009). Randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study of the cortical spreading depression inhibiting agent tonabersat in migraine prophylaxis. *Cephalalgia* 29, 742-750. 30

Goldberg, G.S., Lampe, P.D., and Nicholson, B.J. (1999). Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nat Cell Biol* 1, 457-459.

Gupta, G.P., Nguyen, D.X., Chiang, A.C., Bos, P.D., Kim, J.Y., Nadal, C., Gomis, R.R., Manova-Todorova, K., and Massague, J. (2007). Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature* 446, 765-770.

Harks, E.G., de Roos, A.D., Peters, P.H., de Haan, L.H., Brouwer, A., Ypey, D.L., van Zoelen, E.J., and Theuvsen, A.P. (2001). Fenamates: a novel class of reversible gap junction blockers. *J Pharmacol Exp Ther* 298, 1033-1041. 40

Herdon, H.J., Jerman, J.C., Stean, T.O., Middlemiss, D.N., Chan, W.N., Vong, A.K., Evans, J.M., Thompson, M., and Upton, N. (1997). Characterization of the binding of [3H]-SB-204269, a radiolabelled form of the new anticonvulsant SB-204269, to a novel binding site in rat brain membranes. *Br J Pharmacol* 121, 1687-

## 【化 6】

1691.

Heyn, C., Ronald, J.A., Ramadan, S.S., Snir, J.A., Barry, A.M., MacKenzie, L.T., Mikulis, D.J., Palmieri, D., Bronder, J.L., Steeg, P.S., et al. (2006). In vivo MRI of cancer cell fate at the single-cell level in a mouse model of breast cancer metastasis to the brain. *Magn Reson Med* 56, 1001-1010.

Hirano, S., Suzuki, S.T., and Redies, C. (2003). The cadherin superfamily in neural development: diversity, function and interaction with other molecules. *Front Biosci* 8, d306-355.

10

Holder, J.W., Elmore, E., and Barrett, J.C. (1993). Gap junction function and cancer. *Cancer Res* 53, 3475-3485.

Holmes, E.L. (1966). Experimental observations on flufenamic, mefenamic, and meclofenamic acids. IV. Toleration by normal human subjects. *Ann Phys Med Suppl*, 36-49.

Hsu, M., Andl, T., Li, G., Meinkoth, J.L., and Herlyn, M. (2000). Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci* 113 ( Pt 9), 1535-1542.

20

Jin, M., Dai, Y., Xu, C., Wang, Y., Wang, S., and Chen, Z. (2013). Effects of meclofenamic acid on limbic epileptogenesis in mice kindling models. *Neurosci Lett* 543, 110-114.

Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9, 239-252.

30

Juszczak, G.R., and Swiergiel, A.H. (2009). Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: animal and human studies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33, 181-198.

Juul, M.H., Rivedal, E., Stokke, T., and Sanner, T. (2000). Quantitative determination of gap junction intercellular communication using flow cytometric measurement of fluorescent dye transfer. *Cell Adhes Commun* 7, 501-512.

Kienast, Y., von Baumgarten, L., Fuhrmann, M., Klinkert, W.E., Goldbrunner, R., Herms, J., and Winkler, F. (2010). Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med* 16, 116-122.

40

Kim, S.J., Kim, J.S., Park, E.S., Lee, J.S., Lin, Q., Langley, R.R., Maya, M., He, J., Kim, S.W., Weihua, Z., et al. (2011). Astrocytes upregulate survival genes in tumor cells and induce protection from chemotherapy. *Neoplasia* 13, 286-298.

Kim, S.Y., Chung, H.S., Sun, W., and Kim, H. (2007). Spatiotemporal



## 【化7】

expression pattern of nonclustered protocadherin family members in the developing rat brain. *Neuroscience* 147, 996-1021.

Li, B., Wang, C., Zhang, Y., Zhao, X.Y., Huang, B., Wu, P.F., Li, Q., Li, H., Liu, Y.S., Cao, L.Y., et al. (2013). Elevated PLGF contributes to small-cell lung cancer brain metastasis. *Oncogene* 32, 2952-2962.

Lim, E., and Lin, N.U. (2014). Updates on the Management of Breast Cancer Brain Metastases. *Oncology (Williston Park)* 28(7).

10

Lorger, M., and Felding-Habermann, B. (2010). Capturing changes in the brain microenvironment during initial steps of breast cancer brain metastasis. *Am J Pathol* 176, 2958- 2971.

Loscher, W., and Potschka, H. (2005). Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci* 6, 591-602.

Luker, K.E., Smith, M.C., Luker, G.D., Gammon, S.T., Piwnica-Worms, H., and Piwnica-Worms, D. (2004). Kinetics of regulated protein-protein interactions revealed with firefly luciferase complementation imaging in cells and living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12288-12293.

20

MaassenVanDenBrink, A., van den Broek, R.W., de Vries, R., Upton, N., Parsons, A.A., and Saxena, P.R. (2000). The potential anti-migraine compound SB-220453 does not contract human isolated blood vessels or myocardium; a comparison with sumatriptan. *Cephalalgia* 20, 538-545.

Maher, E.A., Mietz, J., Arteaga, C.L., DePinho, R.A., and Mohla, S. (2009). Brain metastasis: opportunities in basic and translational research. *Cancer Res* 69, 6015-6020.

30

Miyamoto, S., Yagi, H., Yotsumoto, F., Kawarabayashi, T., and Mekada, E. (2006). Heparin binding epidermal growth factor-like growth factor as a novel targeting molecule for cancer therapy. *Cancer Sci* 97, 341-347.

Nguyen, D.X., Chiang, A.C., Zhang, X.H., Kim, J.Y., Kris, M.G., Ladanyi, M., Gerald, W.L., and Massague, J. (2009). WNT/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis. *Cell* 138, 51-62.

40

Nilsen, K.E., Kelso, A.R., and Cock, H.R. (2006). Antiepileptic effect of gap-junction blockers in a rat model of refractory focal cortical epilepsy. *Epilepsia* 47, 1169-1175.

Noy, R., and Pollard, J.W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 41, 49-61.



## 【化 8】

Oberheim, N.A., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol* 814, 23-45.

Oshima, A. (2014). Structure and closure of connexin gap junction channels. *FEBS Lett* 588, 1230-1237.

Pekny, M., and Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50, 427-434.

10

Pitz, M.W., Desai, A., Grossman, S.A., and Blakeley, J.O. (2011). Tissue concentration of systemically administered antineoplastic agents in human brain tumors. *J Neurooncol* 104, 629-638.

Read, S.J., Hirst, W.D., Upton, N., and Parsons, A.A. (2001). Cortical spreading depression produces increased cGMP levels in cortex and brain stem that is inhibited by tonabersat (SB-220453) but not sumatriptan. *Brain Res* 891, 69-77.

Read, S.J., Smith, M.I., Hunter, A.J., Upton, N., and Parsons, A.A. (2000). SB-220453, a potential novel antimigraine agent, inhibits nitric oxide release following induction of cortical spreading depression in the anaesthetized cat. *Cephalalgia* 20, 92-99.

20

Sarrouilhe, D., Dejean, C., and Mesnil, M. (2014). Involvement of gap junction channels in the pathophysiology of migraine with aura. *Front Physiol* 5, 78.

Silberstein, S.D., Schoenen, J., Gobel, H., Diener, H.C., Elkind, A.H., Klapper, J.A., and Howard, R.A. (2009). Tonabersat, a gap-junction modulator: efficacy and safety in two randomized, placebo-controlled, dose-ranging studies of acute migraine. *Cephalalgia* 29 Suppl 2, 17-27.

30

Smith, M.I., Read, S.J., Chan, W.N., Thompson, M., Hunter, A.J., Upton, N., and Parsons, A.A. (2000). Repetitive cortical spreading depression in a gyrencephalic feline brain: inhibition by the novel benzoylamino-benzopyran SB-220453. *Cephalalgia* 20, 546-553.

Solan, J.L., and Lampe, P.D. (2009). Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J* 419, 261-272.

40

Stelzer, K.J. (2013). Epidemiology and prognosis of brain metastases. *Surg Neurol Int* 4, S192-202.

Taimur, S., and Edelman, M.J. (2003). Treatment options for brain metastases in patients with non-small-cell lung cancer. *Curr Oncol Rep* 5, 342-346.

Theis, M., and Giaume, C. (2012). Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Res* 1487, 88-98.

## 【化 9】

Upton, N., Blackburn, T.P., Campbell, C.A., Cooper, D., Evans, M.L., Herdon, H.J., King, P.D., Ray, A.M., Stean, T.O., Chan, W.N., et al. (1997). Profile of SB-204269, a mechanistically novel anticonvulsant drug, in rat models of focal and generalized epileptic seizures. *Br J Pharmacol* 121, 1679-1686.

Valiente, M., Obenauf, A.C., Jin, X., Chen, Q., Zhang, X.H., Lee, D.J., Chافت, J.E., Kris, M.G., Huse, J.T., Brogi, E., et al. (2014). Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. *Cell* 156, 1002-1016.

10

Winslow, M.M., Dayton, T.L., Verhaak, R.G., Kim-Kiselak, C., Snyder, E.L., Feldser, D.M., Hubbard, D.D., DuPage, M.J., Whittaker, C.A., Hoersch, S., et al. (2011). Suppression of lung adenocarcinoma progression by Nkx2-1. *Nature* 473, 101-104.

Xing, F., Kobayashi, A., Okuda, H., Watabe, M., Pai, S.K., Pandey, P.R., Hirota, S., Wilber, A., Mo, Y.Y., Moore, B.E., et al. (2013). Reactive astrocytes promote the metastatic growth of breast cancer stem-like cells by activating Notch signalling in brain. *EMBO Mol Med* 5, 384-396.

20

Yagi, T., and Takeichi, M. (2000). Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev* 14, 1169-1180.

Yoshida, K., Yoshitomo-Nakagawa, K., Seki, N., Sasaki, M., and Sugano, S. (1998). Cloning, expression analysis, and chromosomal localization of BH-protocadherin (PCDH7), a novel member of the cadherin superfamily. *Genomics* 49, 458-461.

30

Zhang, R.D., Price, J.E., Fujimaki, T., Bucana, C.D., and Fidler, I.J. (1992). Differential permeability of the blood-brain barrier in experimental brain metastases produced by human neoplasms implanted into nude mice. *Am J Pathol* 141, 1115-1124.

Ablasser, A., J. L. Schmid-Burgk, I. Hemmerling, G. L. Horvath, T. Schmidt, E. Latz and V. Hornung (2013). "Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP." *Nature* 503(7477): 530-534.

40

Anders, S., D. J. McCarthy, Y. Chen, M. Okoniewski, G. K. Smyth, W. Huber and M. D. Robinson (2013). "Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor." *Nat Protoc* 8(9): 1765-1786.

Beahm, D. L., A. Oshima, G. M. Gaietta, G. M. Hand, A. E. Smock, S. N. Zucker, M. M. Toloue, A. Chandrasekhar, B. J. Nicholson and G. E. Sosinsky (2006). "Mutation of a conserved threonine in the third transmembrane helix of alpha- and

【化 1 0】

beta-connexins creates a dominant-negative closed gap junction channel." J Biol Chem **281**(12): 7994-8009.

Boehm, J. S., J. J. Zhao, J. Yao, S. Y. Kim, R. Firestein, I. F. Dunn, S. K. Sjostrom, L. A. Garraway, S. Weremowicz, A. L. Richardson, H. Greulich, C. J. Stewart, L. A. Mulvey, R. R. Shen, L. Ambrogio, T. Hirozane-Kishikawa, D. E. Hill, M. Vidal, M. Meyerson, J. K. Grenier, G. Hinkle, D. E. Root, T. M. Roberts, E. S. Lander, K. Polyak and W. C. Hahn (2007). "Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene." Cell **129**(6): 1065-1079.

10

Bos, P. D., D. X. Nguyen and J. Massague (2010). "Modeling metastasis in the mouse." Curr Opin Pharmacol **10**(5): 571-577.

Cai, J., W. G. Jiang and R. E. Mansel (1998). "Gap junctional communication and the tyrosine phosphorylation of connexin 43 in interaction between breast cancer and endothelial cells." Int J Mol Med **1**(1): 273-278.

20

Cai, X., Y. H. Chiu and Z. J. Chen (2014). "The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling." Mol Cell **54**(2): 289-296.

Gaspar, L. E., K. Chansky, K. S. Albain, E. Vallieres, V. Rusch, J. J. Crowley, R. B. Livingston and D. R. Gandara (2005). "Time from treatment to subsequent diagnosis of brain metastases in stage III non-small-cell lung cancer: a retrospective review by the Southwest Oncology Group." J Clin Oncol **23**(13): 2955-2961.

Gatza, M. L., J. E. Lucas, W. T. Barry, J. W. Kim, Q. Wang, M. D. Crawford, M. B. Datto, M. Kelley, B. Mathey-Prevot, A. Potti and J. R. Nevins (2010). "A pathway-based classification of human breast cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(15): 6994-6999.

30

Haydon, P. G. and M. Nedergaard (2015). "How do astrocytes participate in neural plasticity?" Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(3): a020438.

Heiman, M., A. Schaefer, S. Gong, J. D. Peterson, M. Day, K. E. Ramsey, M. Suarez-Farinas, C. Schwarz, D. A. Stephan, D. J. Surmeier, P. Greengard and N. Heintz (2008). "A translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types." Cell **135**(4): 738-748.

40

Kim, D., G. Pertea, C. Trapnell, H. Pimentel, R. Kelley and S. L. Salzberg (2013). "TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions." Genome Biol **14**(4): R36.

Love, M. I., W. Huber and S. Anders (2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." Genome Biol **15**(12): 550.

【化 1 1】

Patel, S. J., K. R. King, M. Casali and M. L. Yarmush (2009). "DNA-triggered innate immune responses are propagated by gap junction communication." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(31): 12867-12872.

Pollmann, M. A., Q. Shao, D. W. Laird and M. Sandig (2005). "Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture." Breast Cancer Res **7**(4): R522-534.

10

Read, S. J., M. I. Smith, A. J. Hunter, N. Upton and A. A. Parsons (2000). "SB-220453, a potential novel antimigraine agent, inhibits nitric oxide release following induction of cortical spreading depression in the anaesthetized cat." Cephalalgia **20**(2): 92-99.

Rongvaux, A., R. Jackson, C. C. Harman, T. Li, A. P. West, M. R. de Zoete, Y. Wu, B. Yordy, S. A. Lakhani, C. Y. Kuan, T. Taniguchi, G. S. Shadel, Z. J. Chen, A. Iwasaki and R. A. Flavell (2014). "Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA." Cell **159**(7): 1563-1577.

20

Sharma, V., T. Abraham, A. So, M. F. Allard and J. H. McNeill (2010). "Functional effects of protein kinases and peroxynitrite on cardiac carnitine palmitoyltransferase-1 in isolated mitochondria." Mol Cell Biochem **337**(1-2): 223-237.

Stetson, D. B. and R. Medzhitov (2006). "Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response." Immunity **24**(1): 93-103.

Stoletov, K., J. Strnadel, E. Zardouzian, M. Momiyama, F. D. Park, J. A. Kelber, D. P. Pizzo, R. Hoffman, S. R. VandenBerg and R. L. Klemke (2013). "Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization." J Cell Sci **126**(Pt 4): 904-913.

30

Wilson, A. A., L. W. Kwok, E. L. Porter, J. G. Payne, G. S. McElroy, S. J. Ohle, S. R. Greenhill, M. T. Blahna, K. Yamamoto, J. C. Jean, J. P. Mizgerd and D. N. Kotton (2013). "Lentiviral delivery of RNAi for in vivo lineage-specific modulation of gene expression in mouse lung macrophages." Mol Ther **21**(4): 825-833.

40

Wu, J., L. Sun, X. Chen, F. Du, H. Shi, C. Chen and Z. J. Chen (2013). "Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA." Science **339**(6121): 826-830.

## 【化 1 2】

Zhang, Q., N. Iwakuma, P. Sharma, B. M. Moudgil, C. Wu, J. McNeill, H. Jiang and S. R. Grobmyer (2009). "Gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo tumor imaging with photoacoustic tomography." *Nanotechnology* **20**(39): 395102.

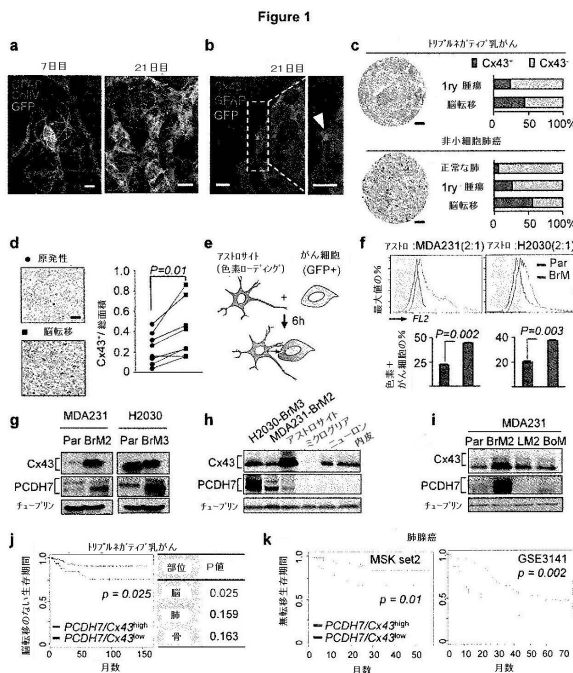
Zhang, X. H., X. Jin, S. Malladi, Y. Zou, Y. H. Wen, E. Brogi, M. Smid, J. A. Foekens and J. Massague (2013). "Selection of bone metastasis seeds by mesenchymal signals in the primary tumor stroma." *Cell* **154**(5): 1060-1073.

10

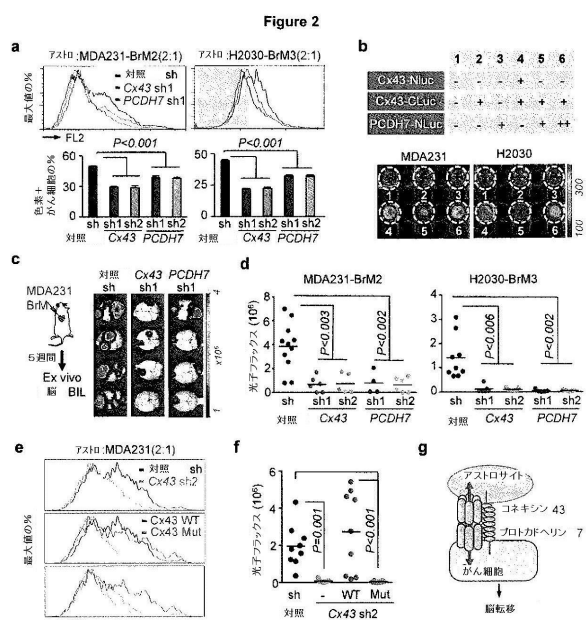
## 【 0 1 5 9】

本明細書では種々の参考文献が引用されており、その内容全体がこれによって参照により組み込まれる。本明細書では種々の核酸およびアミノ酸配列の受託番号が引用されており、それらの受託番号によって参照される完全な配列は、これによってそれらの全体が参照により組み込まれる。

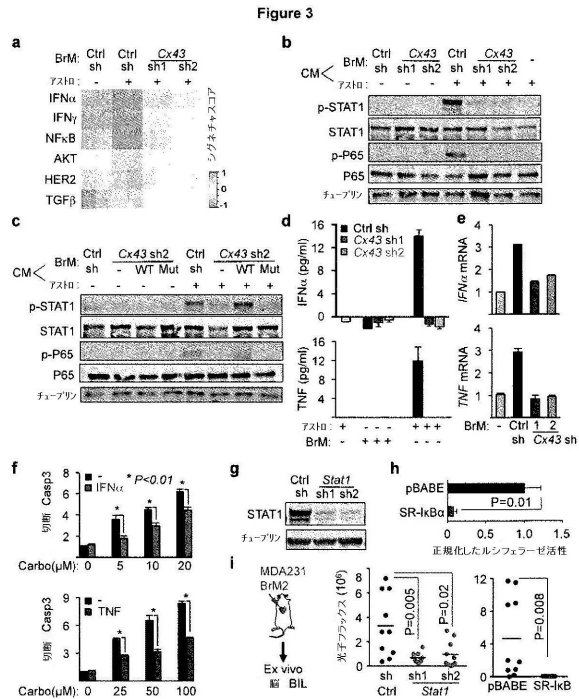
## 【図 1】



## 【図 2】

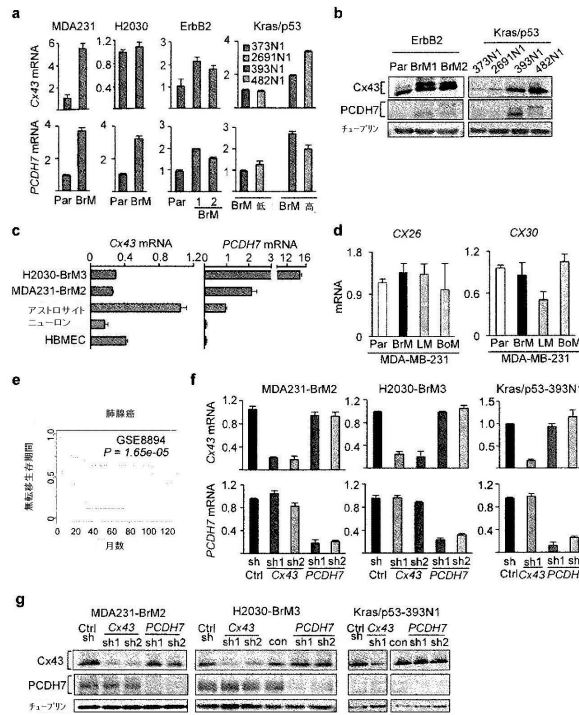


【図 3】



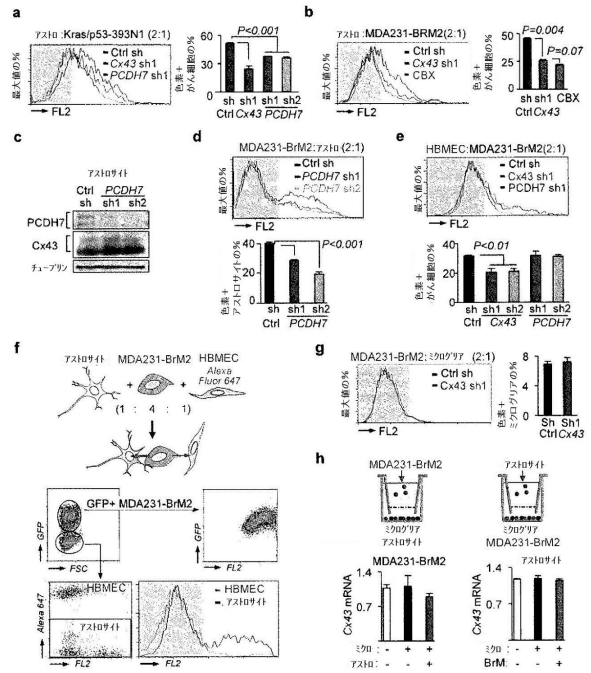
【図 7】

Figure 7



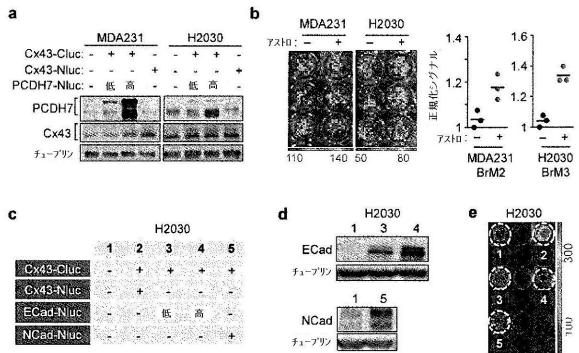
【図 8】

Figure 8



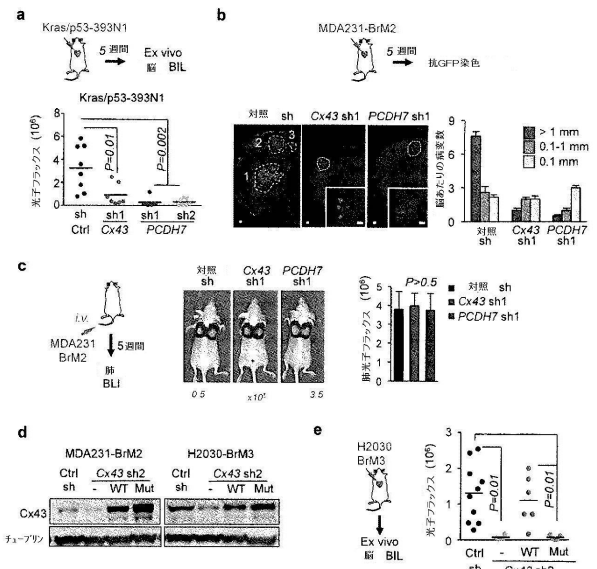
【図 9】

Figure 9



【図 10】

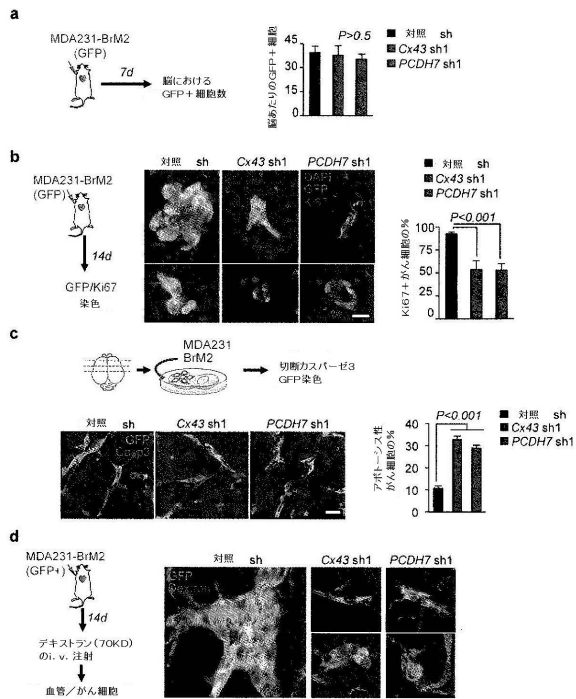
Figure 10





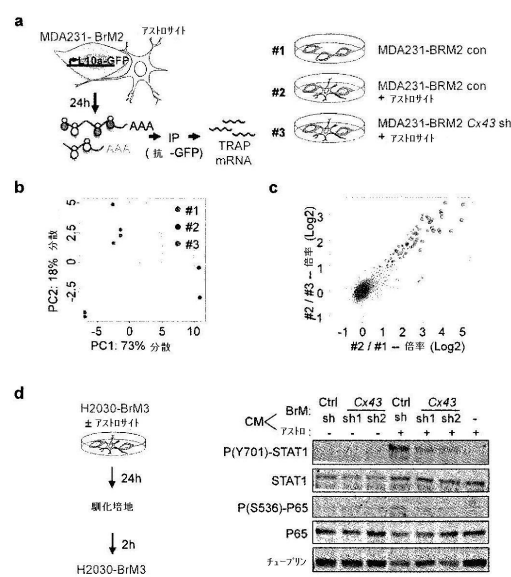
【図 1 1】

Figure 11



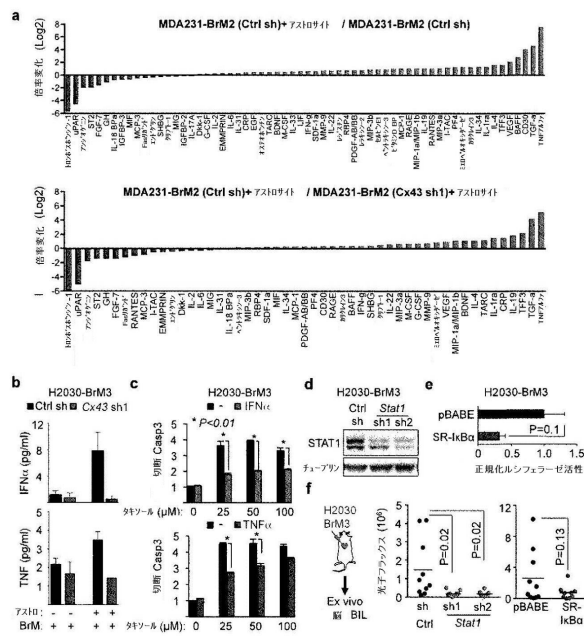
【図 1 2】

Figure 12



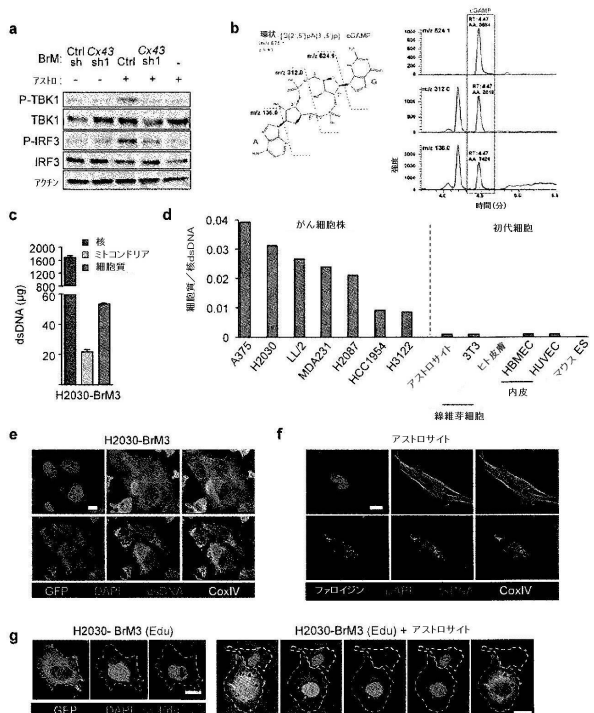
【図 1 3】

Figure 13



【図 1 4】

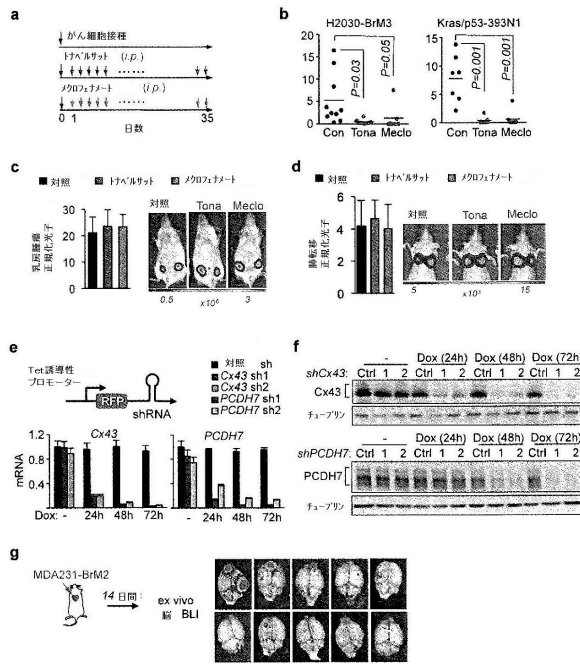
Figure 14





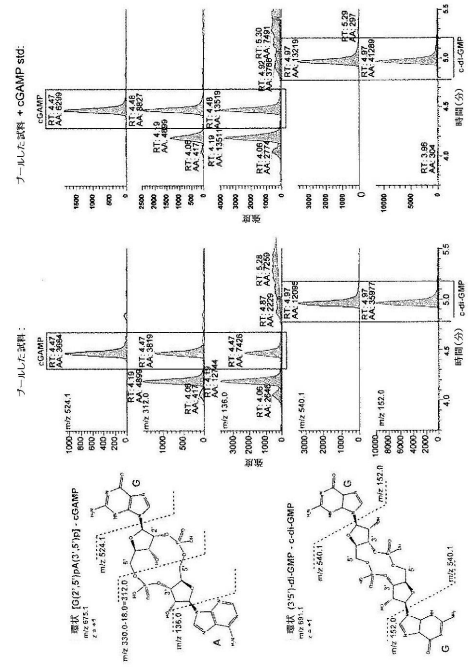
【図 15】

Figure 15



【図 16】

Figure 16



【配列表】

0006898848000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 35/04	(2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 31/282	(2006.01)	A 6 1 K 31/282	
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

(72)発明者 ボワール, エイドリアン  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 1 2 8, ニューヨーク, イースト 8 9 ティーエイチ  
 ストリート 4 0 1, アパートメント 9 ビー

(72)発明者 チェン, チン  
 アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 7 6 5 0, パラセイズ パーク, 1 0 ティーエイチ  
 ストリート 3 1 4

審査官 春田 由香

(56)参考文献 特表 2 0 1 3 - 5 1 2 8 8 7 ( J P , A )  
 特表 2 0 1 2 - 5 0 2 0 8 2 ( J P , A )  
 国際公開第 2 0 1 5 / 0 5 7 8 6 2 ( W O , A 1 )  
 Li AM et al., Protocadherin-7 induces bone metastasis of breast cancer, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2 0 1 3 年, Vol.436, No.3, p.486-490, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.131  
 光富 徹哉, 脳神経外科医に必要な肺がんの知識, 脳神経外科速報, 2 0 1 1 年 8 月, 第 2 1 巻, 第 8 号, p. 8 9 5 - 9 0 1  
 大堀 久詔 ほか, 転移性脳腫瘍に対する化学療法の役割, 脳神経外科ジャーナル, 2 0 0 7 年 1 1 月, 第 1 6 巻, 第 1 1 号, p. 8 4 0 - 8 4 8  
 成田 善孝, 転移性脳腫瘍に対する化学療法, 日本臨牀, 2 0 1 0 年, 第 6 8 巻, 増刊号 1 0, p. 5 9 3 - 5 9 7  
 Stoletov K et al., Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization, Journal of Cell Science, 2 0 1 3 年, Vol.126, No.4, p.904-913, doi: 10.1242/jcs.112748  
 前田 将司, ギャップ結合チャネルの構造とそのはたらき, 蛋白質・核酸・酵素, 2 0 0 9 年, 第 5 4 巻, 第 1 3 号, p. 1 7 6 0 - 1 7 6 6

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 4 5 / 0 0 - 4 5 / 0 8  
 A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8  
 A 6 1 K 4 8 / 0 0  
 A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0  
 A 6 1 K 3 3 / 0 0 - 3 3 / 4 4  
 P u b M e d  
 医中誌 W E B  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )