(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 6 月 29 日(29.06.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/110830 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/68 (2006.01)	*A61K 45/00* (2006.01)
A61K 31/351 (2006.01)	*A61P 15/00* (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)	*A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)	*A61P 35/02* (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)	*A61P 43/00* (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)	*C12N 15/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/087989

(22) 国際出願日: 2016 年 12 月 20 日(20.12.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2015-250112 2015 年 12 月 22 日(22.12.2015) JP

(71) 出願人: 国立大学法人東京医科歯科大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 高橋　寛吉 (TAKAHASHI, Hiroyoshi); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 井上　純 (INOUE, Jun); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号　国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 稲澤　譲治 (INAZAWA, Johji); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 志村　光春 (SHIMURA Mitsuharu); 〒1510051 東京都渋谷区千駄ヶ谷５－８－２ Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

(54) **Title**: METHOD FOR PREDICTING EFFECT OF COMBINATION THERAPY ON CANCER USING L-ASPARAGINASE AGENT AND AUTOPHAGY INHIBITOR, AND CANCER THERAPEUTIC AGENT

(54) 発明の名称 : がんに対するＬ－アスパラギナーゼ剤とオートファジー阻害剤の併用療法の効果の予測方法、及び、がん治療剤

(57) **Abstract**: The present invention addresses the problem of finding an index of whether or not a combination therapy using L-asparaginase and an autophagy inhibitor is effective, and providing a cancer therapeutic agent for which the index can be used, and provides: a method for obtaining data on prediction of the effect of a pharmaceutical agent, wherein, when the functional deletion of p53 due to gene mutation is identified in a cancer specimen, the data is determined to be negative in terms of the effect of a combination therapy using L-asparaginase and an autophagy inhibitor on cancer; and a therapeutic agent which is for a cancer showing resistance to sole administration of an L-asparaginase agent, and which is characterized by containing L-asparaginase and an autophagy inhibitor.

(57) 要約: 本発明は、Ｌ－アスパラギナーゼとオートファジー阻害薬の併用療法が奏功するか否かの指標を見出し、かつ、当該指標を活用し得るがん治療剤を提供することを課題し、がん検体における遺伝子変異によるｐ５３の機能欠失を認めた場合に、当該がんにおけるＬ－アスパラギナーゼ、及び、オートファジー阻害剤の併用療法の効果の否定的データとする薬剤の効果の予測データの取得方法、及び、Ｌ－アスパラギナーゼ、及び、オートファジー阻害剤を含有することを特徴とする、Ｌ－アスパラギナーゼの剤の単独投与に対して抵抗性を有するがんの治療剤、を提供する。

WO 2017/110830 A1

明　細　書

発明の名称 ：

がんに対するＬ－アスパラギナーゼ剤とオートファジー阻害剤の併用療法の効果の予測方法、及び、がん治療剤

関連出願

[0001] 本出願は、２０１５年１２月２２日に出願された日本国特許出願２０１５－２５０１１２号に基づく優先権を主張し、その開示の全てが参照によりここに取り込まれる。

技術分野

[0002] 本発明は、がんに対する薬剤療法の効果の予測手段に関する発明、及び、がん治療剤に関する発明である。

背景技術

[0003] がん細胞が増殖するには、様々な物質が必要であり、蛋白質を構成するアミノ酸の一つであるアスパラギン（Ａｓｐ）もその一つである。アスパラギンは、アスパラギン合成酵素によって生成され、Ｌ－アスパラギナーゼ(L-asparaginase（Ｌ－ａｓｐ）)によって分解される。

[0004] がんの中には、細胞中のアスパラギン合成酵素が不足しており、アスパラギン不足になっているものがあり、さらにＬ－ａｓｐを与えると当該がん細胞の増殖が阻害されることが知られており（非特許文献１）、Ｌ－ａｓｐを用いた抗がん剤（Ｌ－ａｓｐ剤）が、白血病や悪性リンパ腫等を対象として実用化されている。

[0005] Ｌ－ａｓｐ剤がキードラッグとなるがんの一つとして、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）が知られている。治療手段の進歩により、治療成績は向上しているものの、小児ＡＬＬの２０％、成人ＡＬＬの４０％は治療不応性となり、依然として予後不良である（非特許文献２、３）。

[0006] その中にあって、Ｌ－ａｓｐ剤は単剤で６０％のＡＬＬに完全寛解をもたらすことが可能であり、さらにＬ－ａｓｐの投与量や投与頻度を工夫するこ

とで、ＡＬＬに対する無病生存率を向上させることが可能になっている（非特許文献４）。

[0007] しかしながら、ＡＬＬ細胞のＬ－ａｓｐに対する感受性の低下により再発率の上昇や治療不応につながることも知られている（非特許文献５）。

[0008] ところで、オートファジーはリソソームによる細胞内の分解系の一つであり、長く存在した蛋白質、細胞内小器官、及び、蛋白質凝集態がオートファゴソーム内に捕捉され、その後リソソームと融合して分解されるという、高度に制御されたプロセスである。特に、アミノ酸欠乏や酸化ストレスといった各種ストレスの悪条件下で細胞の生存を可能にするためのアミノ酸供給源となるものである。近年、卵巣がん細胞とＡＬＬにおいて、Ｌ－ａｓｐがオートファジーを誘導することが報告されている（非特許文献６、７）。また慢性骨髄性白血病においては、Ｌ－ａｓｐにより誘導されるオートファジーががん細胞の生存に有利に働き、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害薬を併用することで、Ｌ－ａｓｐの殺細胞効果が増強されることが報告された（非特許文献８）。

先行技術文献

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Oettgen, H. F.et al., Cancer research 27, 2619-2631(1967).

非特許文献2：Curran, E. & Stock, Blood 125, 3702-3710, doi:10.1182/blood-2014-11-551481(2015).

非特許文献3：Locatelli, F., Schrappe, M., Bernardo, M.E. & Rutella, Blood 120, 2807-2816, doi:10.1182/blood-2012-02-265884(2012).

非特許文献4：Pieters, R. et al., Cancer 117, 238-249, doi:10.1002/cncr.25489(2011)

非特許文献5：Hongo, T., Yajima, S., Sakurai, M., Horikoshi, Y. & Hanada, R. Blood 89, 2959-2965(1997).

非特許文献6：Yu, M. et al., Journal of cellular and molecular medicin

e 16, 2369-2378, doi:10.1111/j.1582-4934.2012.01547x(2012).

非特許文献7：Hermanova, I. et al., Leukemia, doi:10.1038/leu.2015.213 (2015).

非特許文献8：Song, P. et al., Oncotarget 6, 3861-3873(2015)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0010] しかしながら、上記のＬ－ａｓｐとオートファジー阻害薬の併用療法においても、奏功する場合と、抵抗性を示す場合が認められる。本発明は、このＬ－ａｓｐとオートファジー阻害薬の組合せのがん細胞における作用機序を明らかにし、当該併用療法が奏功するか否かの指標を見出し、かつ、当該指標を活用し得るがん治療剤を提供することを課題としてなされた発明である。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、今般下記（１）～（６）を見出し、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害薬の併用療法を行う上で、ｐ５３遺伝子が決定的な役割を果たしていることを見出した。

（１） ＡＬＬ細胞においてＬ－ａｓｐがオートファジーを惹起すること、

（２） Ｌ－ａｓｐ誘導性オートファジーはミトコンドリアの質の維持に重要であり、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害薬の併用によりＡＬＬ細胞内の酸化ストレスが蓄積すること、

（３） 過剰に蓄積した活性酸素（ＲＯＳ）によるＤＮＡダメージがｐ５３遺伝子を介して更なる酸化ストレスを誘導し、ＡＬＬ細胞のアポトーシス細胞死を惹起すること、

（４） ｐ５３遺伝子のノックダウンＡＬＬ株と変異ｐ５３遺伝子を有するＡＬＬ臨床検体においては、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤の併用療法の効果が乏しいこと、

（５） 機能が欠失した変異ｐ５３遺伝子を有するＡＬＬ臨床検体に対して正常ｐ５３遺伝子の導入処理を行うことにより、Ｌ－ａｓｐとオートファジ

一阻害剤の併用療法の効果が回復すること、

（６）　アスパラギン合成酵素の発現上昇を示すＬ－ａｓｐ耐性ＡＬＬにおいてもＬ－ａｓｐとオートファジー阻害剤の併用療法による効果が認められること。

[0012]　上記（１）～（６）の事項は、第１に、被験者のｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異の有無を指標にすることにより、がん患者におけるＬ－ａｓｐとオートファジー阻害薬の併用療法の有効性を判断することが可能であることを示すものである。

[0013]　すなわち、本発明は、がん検体における遺伝子変異によるｐ５３の機能欠失を認めた場合に、当該がんにおけるＬ－ａｓｐ（Ｌ－アスパラギナーゼ）若しくはその誘導体の剤、及び、オートファジー阻害剤の併用療法の効果の否定的データとする、薬剤の効果の予測データの取得方法（以下、本発明のデータ取得方法ともいう）を提供する。本発明のデータ取得方法は、がん検体におけるｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異を認めた場合に、当該がんにおけるＬ－ａｓｐ若しくはその誘導体の剤、及び、オートファジー阻害剤の併用療法の効果の否定的予測を行う、薬剤の効果の予測方法、として表現することも可能である。

[0014]　本発明において「Ｌ－ａｓｐ又はＬ－アスパラギナーゼ」は、Ｌ－アスパラギナーゼそのものを意味するものである。また、「Ｌ－ａｓｐ誘導体又はＬ－アスパラギナーゼ誘導体」としては、ポリエチレングリコール化アスパラギナーゼ等が例示される。「Ｌ－ａｓｐ又はその誘導体の剤」とは、抗がん用途を有する剤であり、有効成分であるＬ－ａｓｐ又はＬ－ａｓｐ誘導体そのもの、及び、これに何らかの製剤手段を施したもの（医薬組成物）を含む概念である。さらに、以下「Ｌ－ａｓｐ若しくはその誘導体の剤」を、「Ｌ－ａｓｐ類」ともいう。

[0015]　また「オートファジー阻害剤」は、その有効成分であるオートファジー阻害成分と、これに何らかの製剤手段を施したもの（医薬組成物）を含む概念である。

[0016] 本発明のデータ取得方法の対象となるがん検体は、基礎的にＬ－ａｓｐ類の投与の有効可能性が認められる、すなわち、当該がん治療の選択肢として、Ｌ－ａｓｐ類の投与が選択され得るがんの検体である。この選択は、がん治療の過程として通常的に認められる場合のみならず、それ以外のチャレンジ的な選択も含まれる。具体的には、白血病、悪性リンパ腫、卵巣がん等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。上述のようにＬ－ａｓｐ類は、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）の第１選択薬として用いられており、本発明のデータ取得方法を行う対象として典型的ながんである。

[0017] 本発明のデータ取得方法において用いられるがん検体は、当該検体中のがん細胞のｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異を検出する必要性から、直接的にがん細胞が含まれるものである必要がある。よって、白血病等の血液がんであれば白血病細胞が含まれる血液検体及び／又は骨髄検体が、固形がんの場合には、当該がんの生検検体又は当該がんが含まれる体液検体が、本発明のデータ取得方法において用いられるがん検体として挙げられる。

[0018] 上記（１）～（６）の事項は、Ｌ－ａｓｐ類単独投与に対して抵抗性を有するがんに対しても、Ｌ－ａｓｐ類とオートファジー阻害剤の併用投与が有効であることを示している。

[0019] よって本発明は、第２に、Ｌ－ａｓｐ類とオートファジー阻害剤を含有することを特徴とする、Ｌ－ａｓｐ類単独投与に対して抵抗性を有するがんの治療剤（以下、本発明のがん治療剤ともいう）を提供する。

[0020] オートファジー阻害剤は特に限定されず、例えば、クロロキン（クロロキノリン）、ハイドロオキシクロロキン等のクロロキン類、３－メチルアデニン、バフィロマイシンＡ、ウォルトマニン等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0021] 本発明のがん治療剤は、（ａ）Ｌ－ａｓｐ類とオートファジー阻害剤を含有する医薬用組成物であっても、（ｂ）Ｌ－ａｓｐ類、及び、オートファジー阻害剤を別個の構成薬剤として含む薬剤のセットであってもよい。

[0022] 本発明のがん治療剤は、さらにＬ－アスパラギン合成酵素阻害剤（sulfoxi

mine-based inhibitor、Bioorganic & Medicinal Chemistry 20 (2012) 5915-5927等）が含有されていてもよい。このＬ－アスパラギン合成酵素阻害剤の含有形態は、上記と同様に（ａ）医薬用組成物中に含有されていても、（ｂ）Ｌ－ａｓｐ類、及び、オートファジー阻害剤とは別個の構成薬剤として含有されていてもよい。

[0023] 本発明のがん治療剤の投与対象は、Ｌ－ａｓｐ類単独投与に対して抵抗性を有し、かつ、ｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異が認められない、Ｌ－ａｓｐ類の投与の有効可能性が認められるがんであり、具体的ながんの種類は、本発明のデータ取得方法の対象と同じく、白血病、悪性リンパ腫、卵巣がん等、好適には急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、ＮＫ／Ｔ細胞リンパ腫が挙げられるが、チャレンジ的なものも含み、これらに限定されるものではない。また、元々はｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異が認められたものであっても、事後的に当該遺伝子の修復がなされたがんであれば、本発明のがん治療剤の投与対象となる。ｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異の修復は、いわゆる遺伝子治療によって行うことができる。

[0024] ｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異の有無を指標とした、本発明のがん治療剤の投与の適否については、本発明のデータ取得方法によって得られたデータに基づいて判断することが可能である。すなわち、本発明のデータ取得方法によって得られたデータが、機能欠失となるｐ５３遺伝子の変異の存在を示していれば、本発明のがん治療剤の即時の投与は適当とはいえず、他の治療手段を選択するか、又は、ｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異の修復を行った後に改めて本発明のがん治療剤の投与を行うスケジュールが選択され得る。なお、Ｌ－ａｓｐ類投与による治療前に本発明のデータ取得方法が行われた場合には、まずはＬ－ａｓｐ類投与による治療も選択され得る。逆に、当該データにおいてｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異が認められない場合には、本発明のがん治療剤の投与の対象となり得る。なお、Ｌ－ａｓｐ類投与による治療前に本発明のデータ取得方法が行われた場合には、まずはＬ－ａｓｐ類投与による治療も選択され得る。

[0025] 本発明のがん治療剤の投与対象は、少なくとも「Ｌ－ａｓｐ類単独投与に対して抵抗性を有するがん」であり、当該抵抗性のがんは、事前のＬ－ａｓｐ類の体内投与による当該がんに対する否定的な抗がん効果データ、又は、事前の当該がん細胞の体外におけるＬ－ａｓｐ類との接触による否定的な抗がん効果データ、に基づいて規定することができる。

発明の効果

[0026] 本発明により、Ｌ－ａｓｐ若しくはその誘導体の剤、及び、オートファジー阻害剤の併用療法の効果の予測手段が提供され、さらに当該予測結果を活かすことが可能ながん治療剤が提供される。

図面の簡単な説明

[0027] [図1]本発明のデータ取得方法におけるｐ５３遺伝子の機能欠失変異の検出工程の一態様をフロー化した図面である。

[図2-A]３種のＡＬＬ細胞株に対してＬ－ａｓｐとオートファジー阻害剤を、単独又は組み合わせて作用させた場合、あるいは両者共に作用させない場合のオートファジー誘導を、ＬＣ３Ｂ－IIを指標として電気泳動で検討した結果を示した図面である。

[図2-B]ＡＬＬ細胞株であるＲＥＨ細胞に対して、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）を、単独又は組み合わせて作用させた場合のオートファジー誘導を、ＬＣ３Ｂ－IIを指標として検討した組織免疫染色像を示した図面である。

[図2-C]ＡＬＬ細胞株であるＲＥＨ細胞に対して、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）を、単独又は組み合わせて作用させた場合、あるいは両者共に作用させない場合のオートファジー誘導について、電子顕微鏡像により示した図面である。

[図2-D]図２－Ｃの電気顕微鏡像における１細胞当たりのオートファジー小胞の個数と面積を示した図面である。

[図2-E]ＡＬＬ細胞株であるＲＥＨ細胞に対して、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）を単独又は組み合わせて作

用させた場合の、障害性ミトコンドリア数を蛍光色素染色に基づいて計数した結果を示した図面である。

[図2-F]ＡＬＬ細胞株であるＲＥＨ細胞に対して、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）を単独又は組み合わせて作用させた場合の、細胞内ミトコンドリアの膜電位を、ＴＭＲＥ（ｔｅｔｒａｍｅｔｈｌｒｈｏｄａｍｉｎｅ　ｍｅｔｈｙｌ　ｅｓｔｅｒ）を用いて検討した結果を示した図面である。

[図2-G]ＡＬＬ細胞株であるＲＥＨ細胞に対して、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）を単独又は組み合わせて作用させた場合の、ＤＣＦＤＡ（５－（ａｎｄ－６）－ｃａｒｂｏｘｙ－２′，７′－ｄｉｃｈｌｏｒｏｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ　ｄｉａｃｅｔａｔｅ）を用いた細胞内活性酸素種（ＲＯＳ）（左図）と、ＭｉｔｏＳｏｘ（登録商標）－Ｒｅｄを用いたミトコンドリアＲＯＳの評価を行った結果を示した図面である。

[図3-A]３種のＡＬＬ細胞株に対してＬ－ａｓｐとオートファジー阻害剤を、単独又は組み合わせて作用させた場合の細胞死の度合いを、フローサイトメトリーとウェスタンブロッティング解析で検討した結果を示した図面である。

[図3-B]ＡＬＬ細胞株であるＲＥＨ細胞に対して、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）を作用させることにより惹起される細胞死に対する、汎アポトーシス関連分子阻害薬であるｚ－ＶＡＤによる抑制作用を検討した結果を示した図面である。

[図3-C]Ｌ－ａｓｐ耐性株６９７－Ｒの、Ｌ－ａｓｐ添加量増加に対する生細胞率を検討した結果を示す図面である。

[図3-D]Ｌ－ａｓｐ耐性株６９７－Ｒにおける、Ｌ－ａｓｐと、オートファジー阻害剤ＣＱの組合せ添加の生細胞率に与える影響を検討した結果を示す図面である。

[図3-E]Ｌ－ａｓｐ耐性株６９７－Ｒにおけるアスパラギン合成酵素（ＡＳＮ

Ｓ）の蛋白発現レベルを、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）を単独又は組み合わせて作用させた場合、あるいは両者共に作用させない場合について、ウェスタンブロッティング解析を行った結果を示す図面である。

[図3-F]ＡＬＬ細胞株であるＲＥＨ細胞のＡＳＮＳ遺伝子を異なる部位においてノックダウンを行った「ｓｈ-ＡＳＮＳ１」と「ｓｈ-ＡＳＮＳ２」における、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）を単独又は組み合わせて作用させた場合、あるいは両者共に作用させない場合について検討した結果を示す図面である。

[図3-G]Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤の併用により誘導されるアポトーシス細胞死の原因となる機構を検討したウェスタンブロッティング解析の結果を示す図面である。

[図3-H]図３－Ｇの細胞培養系にＲＯＳの阻害薬であるアセチルシステイン（ＮＡＣ）を添加した場合の殺細胞効果に対する影響を検討した結果を示す図面である。

[図3-I]Ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ　Ｉｏｄｉｄｅ染色を用いたフローサイトメトリーにより、細胞周期評価を行った結果を示す図面である。

[図3-J]日単位の継続的薬剤接触による影響を、生細胞数をカウントすることにより検討した結果を示す図面である。

[図3-K]in vivoでの治療評価を行うため、ルシフェラーゼ遺伝子を導入したＲＥＨ／Ｌｕｃ２細胞を、免疫不全マウスに対して経尾静脈移植を行い、その経過を蛍光分布検出により検討した結果を示す図面である。

[図3-L]in vivoでの治療評価を行うため、ルシフェラーゼ遺伝子を導入したＲＥＨ／Ｌｕｃ２細胞を、免疫不全マウスに対して経尾静脈移植を行い、その経過を蛍光の光子フラックス率を基に検討した結果を示す図面である。

[図3-M]図３－Ｋと図３－ＬにおけるＲＥＨ／Ｌｕｃ２細胞を移植した免疫不全マウスの経時的な生存率を日単位で検討した全生存解析結果を示す図面である。

[図4-A]ＡＬＬ細胞株であるＲＥＨ細胞に対して、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）を単独又は組み合わせて作用させた場合の経時的なＤＮＡダメージをウェスタンブロッティング解析により検討した結果を示す図面である。

[図4-B]ＡＬＬ細胞株であるＲＥＨ細胞に対して、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）を単独又は組み合わせて作用させ、さらにこれにＲＯＳ抑制薬であるアセチルシステイン（ＮＡＣ）を作用させた場合の、ＤＮＡダメージの指標であるγＨ２ＡＸと共に、ｐ５３蛋白の増減をウェスタンブロッティング解析により検討した結果を示す図面である。

[図4-C]ｓｈ（ｓｈｏｒｔ　ｈａｉｒｐｉｎ）ＲＮＡによりｐ５３遺伝子をノックダウンしたＲＥＨ細胞株（ｓｈ-ｐ５３）における、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）を組み合わせて作用させた場合のＤＮＡダメージを、ウェスタンブロッティング解析により検討した結果を示す図面である。

[図4-D]図４－Ｃと同じくｐ５３ノックダウンＲＥＨ細胞株（ｓｈ-ｐ５３）における、細胞内ＲＯＳの蓄積を検討した結果を示す図面である。

[図4-E]図４－Ｃと同じくｐ５３ノックダウンＲＥＨ細胞株（ｓｈ-ｐ５３）における細胞死の抑制について、Ａｎｎｅｘｉｎ　Ｖの取り込み（左のグラフ）と、ウェスタンブロッティング解析（右の電気泳動図）により検討した結果を示す図面である。

[図5-A]ＡＬＬの臨床血液検体（初発例１２例と再発例２例の計１４例）における、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）の組み合わせ投与の効果を、ｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異の有無と併せて検討した結果を示した図面である。

[図5-B]図５－Ａにおいて、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）の組み合わせ投与の効果が認められたＡＬＬの臨床血液検体３例におけるオートファジー活性評価の結果をウェスタンブロッ

ティング解析により示した図面である。

[図5-C]図５－Ａにおいて、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）の組み合わせ投与の効果が認められなかった、遺伝子変異によりｐ５３が機能欠失したＡＬＬの臨床血液検体（症例１４）に対して、アデノウイルスによる正常ｐ５３遺伝子の導入を行った場合の効果を、ウェスタンブロッティング解析により示した図面である。

[図5-D]図５－Ａにおいて、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）の組み合わせ投与の効果が認められなかった、遺伝子変異によりｐ５３が機能欠失したＡＬＬの臨床血液検体（症例１４）に対して、アデノウイルスによる正常ｐ５３遺伝子の導入を行った場合の効果を、生細胞数で検討した結果を示した図面である。

[図5-E]ｓｈ(short hairpin)ＲＮＡによりｐ５３遺伝子をノックダウンしたＲＥＨ細胞株（ｓｈ-ｐ５３）を、免疫不全マウスに経尾静脈移植した場合の投薬の効果を検討した結果を示した図面である。

[図5-F]Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）の組み合わせ投与による、ＡＬＬ細胞のアポトーシス誘導の仕組みをチャート化して示した図面である。

発明を実施するための形態

[0028] １．本発明のデータ取得方法

本発明のデータ取得方法の基礎データは、ｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異の検出データであり、がん検体におけるｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異の検出を行うことが前提となる。

[0029] ｐ５３遺伝子は進化的に保存されており、ヒト以外の種にも認められる。ヒトｐ５３遺伝子は、第１７番染色体短腕上（１７ｐ１３．１）に存在する。ｐ５３遺伝子は、がん抑制遺伝子として知られており、細胞内の恒常性の維持や代謝調節、細胞内ＲＯＳ産生の調節、アポトーシスの誘導等の細胞増殖を制御する働きを担っていることが知られている。ｐ５３の機能欠失となる変異は、染色体上の両アレルにおけるｐ５３遺伝子が失活するものである

。この機能欠失変異の基本的類型として下記４種が挙げられる。

（１）　一方のアレルにｐ５３遺伝子の機能欠失型の変異があり、他方のアレルで第１７染色体短腕のｐ５３遺伝子存在領域のＬＯＨ(loss of heterozygosity)が認められる類型（以下、第１類型ともいう）。がん細胞に生じる第１類型の機能欠失型変異は、ｐ５３遺伝子のＬＯＨに先だって機能欠失型のミスセンス変異（Ｒ１７５ＨやＲ２４８Ｑ等）、ナンセンス変異、フレームシフト変異等が生じたものである。

（２）　一方のアレルのｐ５３遺伝子に上記のような機能欠失型の変異が生じ、他方のアレルのｐ５３遺伝子にも同じく機能欠失型の変異が生じ、ホモ変異、又は、コンパウンドヘテロ変異となっている類型（以下、第２類型ともいう）。

（３）　第１７番染色体短腕の欠失変異、若しくは、第１７番染色体の欠失変異（以下、第３類型ともいう）

（４）　一方のアレルにｐ５３遺伝子の機能欠失型変異のみが認められ、他方のアレルのｐ５３遺伝子には変異は認められないが、ドミナント・ネガティブ作用によって、四量体構造を取るｐ５３分子のサブユニットとして、変異ｐ５３サブユニットがランダムに組み合わされて機能阻害を及ぼし、全体としてのがん抑制作用（アポトーシス誘導作用）の効率を低下させる類型（以下、第４類型ともいう）。

[0030]　これらの４種類のｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異の類型のうち、第１類型が最も高頻度である。第１類型のｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異は、高度にｐ５３遺伝子の変異が進行したがん細胞におけるものであるから、ＬＯＨのみを検出することによって、併せて存在する他アレルの機能欠失型変異を含めての検出とすることができる。無論のこと、例えば、ＬＯＨの検出とダイレクトシークエンス解析を併せて行うことも可能である。

[0031]　第１類型のＬＯＨの検出は、例えば、マイクロサテライトマーカーを用いたゲノム不安定性試験（マイクロサテライト不安定性検査）、ＦＩＳＨ法、特開２０００－９３１８５号に記載の方法、サザンブロット法等が挙げられ

る。

[0032] マイクロサテライト不安定性検査においては、標的がん細胞の遺伝子における「ゲノムの不安定状態」を、マイクロサテライト（ゲノム中における（Ａ）n、（ＣＡ）n等の単塩基から数塩基単位の反復配列（数回から数十回の反復）であって、１０^{4}～１０^{5}個存在する）のうち、特定のものをマーカーとして用いて、第１類型のＬＯＨの検出を行うことができる(Vita Vol.15 NO.3 1998 / 7.8.9)。

[0033] ＦＩＳＨ法［蛍光in situ ハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ：Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ｉｎ ｓｉｔｕ ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ）:Yasui, K., Imoto,I., Fukuda,Y., Pimkhaokham,A., Yang,Z.Q., Naruto,T., Shimada,Y., Nakamura,Y., and Inazawa,J: Identification of target genes within an amplicon at 14q12-q13 in esophageal squamous cell carcinoma. Genes Chromosomes Cancer, 32, 112-118, 2001］では、核酸のハイブリダイゼーションによるシグナルを基に、第１類型のＬＯＨを検出することができる。この場合、ｐ５３遺伝子領域のＦＩＳＨプローブを作成し、がん検体における染色体とハイブリダイゼーションを行い、シグナル数の変化を観察することで、ｐ５３遺伝子のＬＯＨを検出することができる。

[0034] 特開２０００－９３１８５号に記載の方法は、がん検体の遺伝子のｐ５３遺伝子の下流域に存在する、Ｎａ／Ｋ－ＡＴＰａｓｅ ｂｅｔａ２ ｓｕｂｕｎｉｔ遺伝子内の遺伝子多型マーカーにおけるヘテロ接合性の消失を特定する方法であり、この方法によってもｐ５３遺伝子のＬＯＨを検出することができる。

[0035] サザンブロット法を用いる場合、がん検体から得られるゲノムＤＮＡを制限酵素消化し、それをゲル電気泳動後、ニトロセルロース膜上に固定し、これと、標識したｐ５３遺伝子領域のＤＮＡとハイブリダイゼーションを行い検出することにより、検体中のｐ５３遺伝子のＬＯＨの存在を検出する。正常由来の検体から得られる検出量（バンドの濃さ）に対し、がん検体から得られる検出量が少ないことと共に、異なるバンドの出現が認められることに

より、検体中のｐ５３遺伝子のＬＯＨの存在を検出することができる。

[0036] 第２類型の機能欠失型のｐ５３遺伝子変異は、例えば、ダイレクトシークエンス解析により検出することができる。さらに具体的には、サンガー法や、いわゆる次世代シークエンス法により検出することができる。後述する実施例で検出されたｐ５３遺伝子変異は、この第２類型である。ただし、第２類型は、上述の第１類型に比べると低頻度である。

[0037] サンガー法は、ｉ）ｐ５３遺伝子の一本鎖ＤＮＡに相補的なオリゴヌクレオチドをアニールさせ、これをプライマーとして相補鎖をＤＮＡポリメラーゼによって合成させ、ii）基質として４種のデオキシヌクレオチド三リン酸およびジデオキシヌクレオチド三リン酸を加え、相補鎖を合成させ、iii）さらに化学発光物質で標識したプライマーやdＮＴＰを加えることにより、合成されるＤＮＡを標識し、塩基配列を決定する。この配列とリファレンス配列を比較することで第２類型のｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異を検出することが可能である。

[0038] 次世代シークエンス法では、ランダムに切断された数千万のＤＮＡ断片の塩基配列を同時並行的に決定することができる。ＰＣＲ産物のプールシークエンスにより、高効率にｐ５３の遺伝子領域のディープシークエンスを行うことができる。これにより低頻度でも第２類型のｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異を検出することができる。

[0039] 第３類型の第１７番染色体短腕の欠失変異、又は、第１７番染色体の欠失変異は、上記のＦＩＳＨ法又は染色体検査で検出することができる。染色体検査は、典型的にはＧ分染法等の染色体検査である。とはギムザ（Ｇｉｅｍｓａ）の略で、トリプシン処理後ギムザ染色を行うものである。これにより、ｐ５３遺伝子が座位する第１７番染色体短腕の欠失や、第１７番染色体そのものの欠失（モノソミー）の有無を確認することができる。

[0040] 第４類型のｐ５３蛋白のサブユニットの立体構造による機能欠失型のｐ５３遺伝子変異は、上記のサンガーシークエンス法の他、変異を有するｐ５３蛋白については半減期が延長して細胞内（特に核内）に蓄積することを利用

したｐ５３蛋白の免疫組織化学染色、さらに変異を有するｐ５３蛋白に対する、ＥＬＩＳＡキットによる自己抗体の検出等を行うことができる。

[0041] 上記のように、ｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異についてのがん検体からのデータを取得することができる。上記の検出手法を組み合わせて、第１類型、第２類型、第３類型、及び、第４類型、全てのｐ５３遺伝子の機能欠失となる遺伝子変異についての検出を行うことができるが、これらを類型毎に個別の検出を行うことも可能である。この場合、頻度の高い第１類型を優先させて行うことが好ましい。

[0042] 図１は、本発明のデータ取得方法におけるｐ５３遺伝子の機能欠失変異の検出工程の一態様をフロー化した図面である。

[0043] ボックスＡ１は、がん検体が「固形がんの組織検体」である場合の検出工程開始を示す。組織検体とは、内臓組織、骨組織、筋肉組織、皮膚組織、神経組織等である。ボックスＡ２は、がん検体が「固形がんの液性検体」である場合の検出工程開始を示す。液性検体とは、胸水、腹水、尿残渣等である。ボックスＡ３は、がん検体が「白血病又は悪性リンパ腫」である場合の検出工程開始を示す。

[0044] 固形がんの組織検体（Ａ１）の検出工程の第１段階は、「マイクロサテライトマーカーによるＬＯＨ解析」である（ボックスＢ１）。固形がんの液性検体（Ａ２）の検出工程の第１段階は、「マイクロサテライトマーカーによるＬＯＨ解析」（Ｂ１）又は「ＦＩＳＨ解析」（ボックスＢ２）である。また、白血病又は悪性リンパ腫のがん検体（Ａ３）の検出工程の第１段階は、「マイクロサテライトマーカーによるＬＯＨ解析」（Ｂ１）、「ＦＩＳＨ解析」（Ｂ２）又は「染色体検査」である。

[0045] マイクロサテライトマーカーによるＬＯＨ解析（Ｂ１）の結果、「ＬＯＨ陽性」（Ｒ１／１）である場合は、がん検体の種類によらず「機能欠失変異陽性」（Ｊ１／１）として検出が行われる。当該ＬＯＨ解析（Ｂ１）の結果、「正常」（Ｒ１／０）である場合は、第２段階の検出工程である「ダイレクトシークエンス解析」（ボックスＣ１）がさらに行われる。ダイレクトシ

ークエンス解析は、サンガー法又はＮＧＳ法等が用いられる。

[0046] 「ＦＩＳＨ解析」（Ｂ２）又は「染色体検査」（Ｂ３）の結果、「正常」（Ｒ２／０）である場合には、初発のがん検体の種類によらずに前記「ダイレクトシークエンス解析」（Ｃ１）がさらに行われる。「ＦＩＳＨ解析」（Ｂ２）又は「染色体検査」（Ｂ３）の結果、「第１７番染色体短腕の欠失（１７ｐ－）又は第１７番染色体そのものの欠失（－１７）」（Ｒ２／０）である場合には、初発のがん検体の種類によらずに「機能欠失変異陽性」（Ｊ１／２）として検出が行われる。

[0047] ダイレクトシークエンス解析（Ｃ１）の結果、既知のホモ又はコンパウンドヘテロの機能欠失変異（Ｒ３／１）が認められた場合には、初発のがん検体の種類によらずに「機能欠失変異陽性」（Ｊ１／１）として検出が行われる。ダイレクトシークエンス解析（Ｃ１）の結果、「正常」（Ｒ３／０）と認められた場合には、初発のがん検体の種類によらずに「機能欠失変異陰性」（Ｊ０）として検出が行われる。ダイレクトシークエンス解析（Ｃ１）の結果、「未知のミスセンス変異」（Ｒ３／２）が検出された場合には、初発のがん検体の種類によらずに、第３段階の検出工程である「免疫組織化学染色」（ボックスＤ１）が行われ、その結果「核淡染」（Ｒ４／０）の場合には。「「機能欠失変異陰性」（Ｊ０）として検出が行われ、「核濃染」（Ｒ４／１）の場合には、「機能欠失変異陽性」（Ｊ１／２）として検出が行われる。

[0048] また、ｐ５３遺伝子の機能欠失変異の検出手段として、ファンクショナルアッセイ（Kato, Ishioka et al., PNAS, vol. 100, no. 13, pp. 8424-8429 (2003)、Shimada, Kato, Ishioka et al., Cancer Res. 59, 2781-2786 (1999)、Ishioka et al., NATURE GENETICS (Oct;5(2): 124-129) (1993)）を行うことも可能である。この方法によれば、新規のｐ５３遺伝子の変異が認められた場合においても、その機能欠失評価を行うことが可能である。

[0049] なお、上記の機能欠失型ｐ５３遺伝子変異を検出する際に行われるがん検体核酸の精製は、バックグランドノイズの低減、ハイブリダイゼーション性

能の確保、効率の良い標識等を行う上で好ましい場合が多い。「精製」とは、抽出、分離、分取と同義語の意味で使用される。また、そのための手段として、シリカやセルロース誘導体などの核酸吸着性膜を担持したカートリッジを用いた方法、エタノール沈殿やイソプロパノール沈殿、フェノール－クロロホルム抽出、イオン交換樹脂やオクタデシル基などの疎水性置換基を結合したシリカ担体やサイズ排除効果を示す樹脂を使用した固相抽出カートリッジ、クロマトグラフィーなどによる方法を含むことができる。さらに、電気泳動法による精製も含めることができる。また、溶媒置換も広い意味で精製である。精製工程は、単回又は複数回を必要に応じて行うことができる。

[0050] 上記の検出工程により特定された、がん検体におけるｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異の有無は、本発明のデータ取得方法の基礎データとなる。すなわち、がん検体におけるｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異が認められる場合（陽性）は、Ｌ－ａｓｐ類とオートファジー阻害剤の併用療法に対して抵抗性を有することが予測されるために、当該併用療法を、少なくとも当初のがん治療のスケジュールから除外することが好ましいと判断することができる。この場合は、当該併用療法以外の治療手段を選択することの他に、事前にｐ５３遺伝子の修復治療を行ってから当該併用療法を行うスケジュールとすることも可能である。

[0051] ｐ５３遺伝子の修復治療は、いわゆる遺伝子治療であり、正常のｐ５３遺伝子を少なくともがん細胞に導入することにより行われる。例えば、マウス白血病ウイルスベクター、レンチウイルスベクター等のレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、単純ヘルペスＩ型ベクター、ＨＶＪ－リポソーム等の改変ウイルス性ベクターを用いて正常のｐ５３遺伝子をがん細胞に導入することができる。

[0052] 例としてアデノウイルスベクターによる導入を説明する。ｐ５３遺伝子の組み込まれたアデノウイルスベクターを腫瘍内注射すると、腫瘍細胞上のレセプターと結合し、アデノウイルスベクターは腫瘍細胞内に取り込まれエンコードされた外来性ｐ５３遺伝子が発現される。そののちにＬ－ａｓｐ類と

オートファジー阻害剤の併用療法の効果が有効となることが予想される。

[0053] 本発明のデータ取得方法において、がん検体におけるｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異が認められない場合（陰性）は、Ｌ－ａｓｐ類とオートファジー阻害剤の併用療法が有効であることが予測されるために、当該療法を積極的に治療スケジュールに組み込むことが可能となる。

[0054] ２．本発明のがん治療剤

本発明のがん治療剤は、Ｌ－ａｓｐ類とオートファジー阻害剤を有効成分とするものである。

[0055] （１）Ｌ－ａｓｐ類（Ｌ－アスパラギナーゼ類）

上述のようにＬ－ａｓｐは、蛋白質を構成するアミノ酸の一つであるアスパラギン（Ａｓｎ）を分解する酵素であり、アスパラギン合成酵素の不足により慢性的なアスパラギン不足となっているがんに対して投与を行うことにより、当該がんの増殖を阻害するがん治療剤として既に急性リンパ性白血病等に対して用いられている。

[0056] がん細胞が増殖するには、様々な物質が必要であり、蛋白質を構成するアミノ酸の一つであるアスパラギン（Ａｓｎ）もその一つである。アスパラギンは、アスパラギン合成酵素によって生成され、Ｌ－アスパラギナーゼ（Ｌ－ａｓｐａｒａｇｉｎａｓｅ（Ｌ－ａｓｐ））によって分解される。

[0057] がんの中には、細胞中のアスパラギン合成酵素が不足しており、アスパラギン不足になっているものがあり、さらにＬ－ａｓｐを与えると当該がん細胞の増殖が阻害されることが知られており（非特許文献１）、Ｌ－ａｓｐを用いた抗がん剤が、白血病や悪性リンパ腫等を対象として実用化されている。Ｌ－ａｓｐ自体は、Ｌ－ａｓｐをコードする遺伝子で形質転換を行った微生物（大腸菌やジャガイモ黒あし病菌において実用化）を宿主として、公知の方法により製造することが可能であり、市販品を用いることも可能である。また上述したように、Ｌ－ａｓｐに化学的な修飾を施したＬ－ａｓｐの誘導体も、上記のような抗がん効果が認められる限りにおいて、Ｌ－ａｓｐ類に含まれる。当該誘導体としては、例えば、ポリエチレングリコール化アス

パラギナーゼ等が挙げられる。またＬ－ａｓｐ類は、何らかの製剤処理を施した形態であっても良く、例えば、赤血球内封入アスパラギナーゼ等が挙げられる。

[0058] 本発明のがん治療剤によるＬ－ａｓｐ類（有効成分）の投与量は、１日成人1人当たり５０～２００単位／体重ｋｇ程度であり、効果に応じて増減することが可能である。投与間隔は、１日１回、さらに連日ないし数日おきに行うことも可能である。

[0059] （２）オートファジー阻害剤

前述の通りにオートファジーは、リソソームによる細胞内の分解系の一つであり、長く存在した蛋白質、細胞内小器官、及び、蛋白質凝集態がオートファゴソーム内に捕捉され、その後リソソームと融合して分解されるという、高度に制御されたプロセスであり、特に、酸化ストレスなどの種々のストレスの悪条件下で細胞の生存を可能にすることが知られている。この現象により、Ｌ－ａｓｐ類によって障害を受けたミトコンドリアが産生する細胞内ＲＯＳが貯留したがんが、その生存を確保しているものと考えられている。

[0060] オートファジー阻害剤の有効成分は、このオートファジーを阻害する機能を有する成分であり、具体的には、クロロキン（クロロキノリン）、ハイドロオキシクロロキン等のクロロキン類、３－メチルアデニン、バフィロマイシンＡ等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらのオートファジー阻害成分は、公知の方法により製造が可能であり、市販品を用いることが可能である。

[0061] 本発明のがん治療剤によるオートファジー阻害剤の投与量（有効成分）は、当該薬剤の種類や投与間隔によっても異なるが、例えば、クロロキン類の場合は１日成人1人当たり２００～４００ｍｇ程度であり、効果に応じて増減することが可能である。投与間隔は、１日１回、さらに連日ないし数日おきに行うことも可能である。

[0062] （３）がん治療剤の効果

本発明のがん治療剤を投与することにより、Ｌ－ａｓｐ類の作用により、

標的のがん細胞はＬ－アスパラギンが枯渇状態となると同時に、緊急的生命維持のためにオートファジーが誘導される。特に、本発明のがん治療剤の標的のがん細胞である「Ｌ－ａｓｐ類単独投与に対して抵抗性を有するがん」においては、アスパラギン合成酵素の増強が認められる。しかしながら、本発明のがん治療剤におけるオートファジー阻害剤により、上記のオートファジーが阻害されて、その際にがん細胞内に多量の活性酸素が蓄積し、次いでｐ５３蛋白質の作用により当該がん細胞はアポトーシスへと誘導される。このがん細胞内における活性酸素の蓄積とアポトーシスのサイクルの繰り返しにより、本発明のがん治療剤においては非常に優れたがん治療効果が発揮される。これは、上記の「Ｌ－ａｓｐ類単独投与に対する抵抗性」の有無に係わらない有効性である。しかしながら、ｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異が認められるがん細胞に対しては、上記のアポトーシスに至る過程が損なわれてしまい、本発明のがん治療剤をそのまま投与してもがん治療効果を期待することはできない。

[0063] （４）がん治療剤の態様

本発明のがん治療剤は、（ａ）Ｌ－ａｓｐ類とオートファジー阻害剤が単一の医薬組成物中に含有されている形態、（ｂ）Ｌ－ａｓｐ類とオートファジー阻害剤が、互いに別個の医薬組成物として組み合わさったセットの形態、の２通りの形態に大別される。

[0064] 単一形態（ａ）は、投与が一剤で済むという利点があるが、その反面で性質の異なる薬剤を組み合わせるために、薬剤量と投与間隔の細かな調節が難しい欠点がある。

[0065] セット形態（ｂ）は、二剤投与になるものの、薬剤量と投与間隔等の細かな調節が容易である。

[0066] 前述のように、本発明のがん治療剤には、Ｌ－ａｓｐ類とオートファジー阻害剤に加えて、さらにＬ－アスパラギン合成酵素阻害剤を含有させることができる。これは、「Ｌ－ａｓｐ類単独投与に対して抵抗性を有するがん」において増強されるＬ－アスパラギン合成酵素を阻害することで、当該がん

細胞におけるＬ－アスパラギンの枯渇を促進させること

とで、がん治療効果を向上させることが可能であることに基づいている。

[0067] Ｌ－アスパラギン合成酵素阻害剤は、上記の（ａ）単剤型、（ｂ）セット型、いずれの態様においても、本発明のがん治療剤に含有させることが可能である。セット型の場合は、３剤共に異なる組成物である場合以外に、いずれか２剤が組み合わさった医薬組成物である場合も有り得る形態である。特に、Ｌ－ａｓｐ類とＬ－アスパラギン合成酵素阻害剤の組合せ組成物は、その作用機序から好ましい組合せである。

[0068] 本発明のがん治療剤は、両者とも「医薬組成物」として人体に投与される。当該がん治療剤の有効成分の直接投与の場合も、例えば、注射剤等を用時混合することになるので、これも医薬組成物に含められる。

[0069] 本発明のがん治療剤として用いられる医薬組成物は、上記の有効成分と共に適切な医薬製剤担体を配合して製剤組成物の形態に調製される。当該製剤担体としては、使用形態に応じた担体を選択することが可能であり、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、界面活性剤等の賦形剤ないし希釈剤を使用することができる。組成物の形態は、本発明のがん治療剤を効果的に含有可能な形態であれば特に限定されるものではなく、錠剤、粉末剤、顆粒剤、丸剤等の固剤であってもよいが、通常は、液剤、懸濁剤、乳剤等の注射剤形態とするのが好適である。また、本発明のがん治療剤を適切な担体の添加によって使用時に液状となし得る乾燥品とすることも可能である。さらに本発明の医薬品組成物において、シクロデキストリン含有ポリマーで構成されたナノ粒子、高分子ミセル、赤血球、安定核酸脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）、多機能エンベロープ型ナノ構造体（ＭＥＮＤ）等のドラッグデリバリーシステムを活用して、本発明のがん治療剤の効果をより向上させることが可能である。

[0070] 得られた医薬品組成物は、その形態に応じた適切な投与経路、例えば、注射剤形態の医薬品組成物は、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内投与等により、固剤形態の医薬品組成物は、経口ないし経腸にて投与される。医薬品

組成物中の本発明のがん治療剤の量は、当該組成物の投与方法、投与形態、使用目的、患者の症状等に応じて適宜選択され一定ではないが、通常、本発明のがん治療剤を、０．１～９５質量%程度含有する組成物形態に調製して、上述した投与形態にて投与を行うことが好ましい。

実施例

[0071] 以下、本発明の実施例を開示する。

[0072] １．Ｌ－ａｓｐによって誘導されるオートファジーの検討

遺伝的な背景の異なる３種のＡＬＬ細胞株である、（ａ）ＲＥＨ（ＥＴＶ６－ＲＵＮＸ１転座陽性）（Venuat, A. M., Testu, M. J., and Rosenfeld, C. (1981). Cytogenetic abnormalities in a human null cell leukemia line (REH). Cancer Genet Cytogenet 3, 327-334.）、（ｂ）６９７（ＴＣＦ３－ＰＢＸ１転座陽性）（Findley, H. W., Jr., Cooper, M. D., Kim, T. H., Alvarado, C., and Ragab, A. H. (1982). Two new acute lymphoblastic leukemia cell lines with early B-cell phenotypes. Blood 60, 1305-1309.）、（ｃ）ＴＳ２（ＭＥＦ２Ｄ－ＤＡＺＡＰ１転座陽性）（Yoshinari, M., Imaizumi, M., Eguchi, M., Ogasawara, M., Saito, T., Suzuki, H., Koizumi, Y., Cui, Y., Sato, A., Saisho, T., et al. (1998). Establishment of a novel cell line (TS-2) of pre-B acute lymphoblastic leukemia with a t(1;19) not involving the E2A gene. Cancer Genet Cytogenet 101, 95-102.）において、Ｌ－ａｓｐ（大腸菌由来Ｌ－ａｓｐロイナーゼ（登録商標）、協和発酵キリン社）のオートファジー活性の検討を行った。オートファジーの評価のためにオートファジー阻害剤であるクロロキノン（Ｃｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）：Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｏ., カタログ番号Ｃ６６２８）及びバフィロマイシン（Ｂａｆｉｌｏｍｙｃｉｎ Ａ（Ｂａｆ）：Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｏ., カタログ番号Ｂ１７９３）を用いた。培地はＲＰＭＩ１６４０（和光純薬工業社、カタログ番号１８９－０２０２５）５００ｍｌに胎児ウシ血清（和光純薬工業社、カタログ番号３５－０１０－ＣＶ、添加濃度１０%）と抗生物質Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－

Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｃ．，カタログ番号１５１４０－１２２、添加濃度０．５％）を加えたものを用いた。

[0073] ６ウェルプレートの１ウェルにそれぞれ１×１０^{6}個／上記培地２ｍｌの細胞を播種した。Ｌ－ａｓｐ １Ｕ／ｍｌを添加し、４５時間後にさらにＣＱ１０μＭないしＢａｆｉｌｏｍｙｃｉｎ Ａ１ １００ｎＭを添加し、その３時間後に細胞を回収したのちにウェスタンブロッティング法、蛍光免疫染色、電子顕微鏡による解析を行った。

[0074] ウェスタンブロッティング法では細胞溶解液を用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）膜に転写した。スキムミルクを用いてブロッキングを行った後に一次抗体としてＬＣ３Ｂ抗体、β-ａｃｔｉｎ抗体（いずれもＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社）を反応させ、その後二次抗体としてＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ Ｗｅｓｔ Ｄｕｒａ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｃ．）を反応させた。その後ＬＡＳ－３０００（ＧＥヘルスケア社）にて検出を行った。

[0075] 蛍光免疫染色による解析では、細胞を回収後ＣｙｔｏＳｐｉｎ３（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｃ．）でスライドグラスに密着させ、メタノールで固定後胎児ウシ血清１％とＴｒｉｔｏｎ Ｘ－１００ ０．０１％を含んだリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）でブロッキングを行った。その後ＬＣ３Ｂ抗体（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社）およびＶＥＣＴＡＳＨＩＥＬＤ ｗｉｔｈ ＤＡＰＩ（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社）を反応させ、蛍光顕微鏡で観察を行った。

[0076] 電子顕微鏡解析ではパラホルムアルデヒドで固定後、エタノールによる脱水および乾燥を行う。エポキシ樹脂に包埋しミクロトームで薄切して試料台に貼付後、酢酸ウランおよびクエン酸鉛で電子染色を行い透過型電子顕微鏡で観察を行った。

[0077] 図２－Ａは、上記３種のＡＬＬ細胞株に対してＬ－ａｓｐとオートファジー阻害剤を、単独又は組み合わせて作用させた場合、あるいは両者共に作用

させない場合のオートファジー誘導を、オートファゴソームの存在を示すＬＣ３Ｂ－IIを指標として電気泳動で検討した結果を示している。これにより３株いずれにおいても、ＣＱもしくはＢａｆ単剤投与時に比べ、Ｌ－ａｓｐとＣＱもしくはＢａｆの併用投与時において、ＬＣ３Ｂ－IIの発現が上昇していた。このことは、定常状態に比べＬ－ａｓｐがオートファジーを誘導していることを示している。

[0078] 図２－Ｂは、上記３種のうち、ＲＥＨ細胞に対して、Ｌ－ａｓｐとＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）を単独又は組み合わせて作用させた場合のオートファジー誘導を、ＬＣ３Ｂ－IIを指標として、上記図２－Ａの場合と同条件下で検討した組織免疫染色像である。これにより、ＣＱ単剤投与、Ｌ－ａｓｐ単剤投与に比べ、Ｌ－ａｓｐとＣＱの併用投与においてＬＣ３Ｂの蛋白発現が上昇していることが確認され、Ｌ－ａｓｐによりオートファジーが誘導されていることが示された。

[0079] 図２－Ｃは、上記図２－Ｂの系におけるオートファジー誘導についての電子顕微鏡像であり、図２－Ｄは、当該電気顕微鏡像における１細胞当たりのオートファジー小胞の個数と面積を示している。Ｌ－ａｓｐとＣＱの併用時には多数のオートリソソーム（図２－Ｃ矢頭）に交じってミトコンドリアを含むオートファゴソームも観察された（図２－Ｃ　三角）。１細胞あたりのオートファジー小胞の個数および面積において、いずれもＬ－ａｓｐとＣＱの併用時に有意に多く観察された。

[0080] 図２－Ｅは、上記図２－Ｂの系、すなわちＡＬＬ細胞株であるＲＥＨ細胞に対して、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるChloroquine（ＣＱ）を単独又は組み合わせて作用させた場合の、障害性ミトコンドリア数をミトコンドリア用の染色蛍光色素であるＭｉｔｏＴｒａｃｋｅｒ（登録商標）Ｒｅｄの発色に基づいて計数した結果を示している。ここに示すように、Ｌ－ａｓｐとＣＱの併用時にピークが右に移行しており障害性ミトコンドリアが顕著に観察された。

[0081] 図２－Ｆは、上記図２－Ｅの系において、細胞内ミトコンドリアの膜電位

を、ＴＭＲＥ（ｔｅｔｒａｍｅｔｈｌｒｈｏｄａｍｉｎｅ　ｍｅｔｈｙｌ　ｅｓｔｅｒ）を用いて検討した結果を示している。ここに示すように、Ｌ－ａｓｐとＣＱの併用時に、膜電位の低下したミトコンドリア、すなわち障害性ミトコンドリアを有する細胞の割合が有意に増えていた。

[0082] 図２－Ｇは、上記図２－Ｅの系において、ＤＣＦＤＡを用いた細胞内活性酸素種（ＲＯＳ）（左図）と、ＭｉｔｏＳｏｘ（登録商標）－Ｒｅｄを用いたミトコンドリアＲＯＳの評価を行った結果を示している。ここに示すように、Ｌ－ａｓｐとＣＱの併用時に有意にＲＯＳが蓄積していることが明らかになった。

[0083] この図２－Ａ～Ｇにより、ＡＬＬ細胞株に対するＬ－ａｓｐ投与により、オートファジーの誘導が促進され、かつこのオートファジーはがん細胞において障害性ミトコンドリアと活性酸素種の除去において非常に重要であることが明らかになった。

[0084] ２．Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤の併用による細胞死誘導の検討

６ウェルプレートの１ウェルにＲＥＨ細胞１×１０^{6}個／培地２ｍｌの細胞を播種した。同時にＬ－ａｓｐおよびＣＱを図に示す濃度（記載がない場合はＬ－ａｓｐ　１Ｕ／ｍｌ、ＣＱ　１０μＭ）で添加し、４８時間後に細胞を回収した。

[0085] ウェスタンブロッティング法は図２と同様に行い、一次抗体はｃＰＡＲＰ抗体、ｃＣＡＳＰ３抗体、ＣＡＳＰ３抗体、ＣＨＯＰ抗体はｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ社，ＡＳＮＳはＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社、ＡＴＦ４抗体はＳａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社のものを用いた。

[0086] 死細胞数はＭＥＢＣＹＴＯ－Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ　Ｋｉｔ（ＭＢＬ社）によるＡｎｎｅｘｉｎ　Ｖ染色後にフローサイトメーターＡｃｃｕｒｉ　Ｃ６（Ｂｅｃｔｏｎ，Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ）を用いて解析した。

[0087] 汎アポトーシス因子阻害薬ｚＶＡＤ－ｆｍｖ（ペプチド株式会社）による

死細胞数評価は、Ｌ－ａｓｐおよびＣＱを添加した後２４時間目で培地に添加し、さらに２４時間後に死細胞数を評価した。コントロールとして、ｚＶＡＤ－ｆｍｖの溶媒であるジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を用いた。

[0088] Ｌ－ａｓｐに対する耐性株（６９７－Ｒ）の樹立にあたっては、既報（Hutson RG, et al. Am J Physiol 1997;272:c1691-1699）のとおり行った。すなわち６９７細胞において培地中にＬ－ａｓｐを加えて培養し、Ｌ－ａｓｐに対する耐性を獲得して増殖する細胞を回収した。加えるＬ－ａｓｐは０．１Ｕ／ｍｌから開始し、６か月以上かけて徐々に増やしつつ最終的に１Ｕ／ｍｌまで増加した。

[0089] 抗ＲＯＳ薬ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社）は、２ｍＭをＬ－ａｓｐおよびＣＱと同時に投与し、４８時間後にＡｎｎｅｘｉｎ Ｖ染色を用いた死細胞数をフローサイトメーターで評価した。

[0090] 細胞周期解析は、Ｌ－ａｓｐおよびＣＱを添加し４８時間後に細胞を回収し、ＰＢＳで洗浄後７０％エタノール・－２０℃で固定した。８時間後、ＰＢＳで洗浄しＲＮａｓｅを加えて３８度、３０分静置し、ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ ｉｏｄｉｄｅ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）で染色した後にＡｃｃｕｒｉ Ｃ６フローサイトメーターで測定した。

[0091] 下記ＡＳＮＳに対するｓｈ（ｓｈｏｒｔ ｈａｉｒｐｉｎ）－ＡＳＮＳ１（標的配列：5’-GCTGTATGTTCAGAAGCTAAA-3’（配列番号１））あるいはｓｈ－ＡＳＮＳ２（標的配列：5’-CGTCAAGTCTTTGAACGCCAT-3’（配列番号２））を発現するレンチウイルスを作成した。まずＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ（ＴＯＹＯＢＯ ＣＯ．，ＬＴＤ．）を用いてプロトコールに従いＩｎｖｅｒｓｅ ＰＣＲ法を行った。すなわち環状ＤＮＡ（プラスミド）を鋳型として下記のプライマーを用いてＰＣＲを行い、プラスミド全周の増幅を行った。次にレンチウイルスベクターｐＧｒｅｅｎＰｕｒｏ ｓｈＲＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｌｅｎｔｉｖｅｃｔｏｒ（Ｓｙｓｔｅｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）のＢａｍＨＩ－ＥｃｏＲＩ領域にＰＣＲ産物をクローニングし、組み換えベクターを作成した。

その後直鎖状プラスミドであるＰＣＲ産物をライゲーションすることにより環状化した。次に大腸菌への形質転換を行い、プラスミドを抽出後ＨＥＫ２９３ＴＮ細胞に導入し、ｓｈ－ＡＳＮＳ１発現レンチウイルス、ｓｈ－ＡＳＮＳ２発現レンチウイルスを作成した。こうして得られた各組換えレンチウイルスについて、Ｇｌｏｂａｌ　ＵｌｔｒａＲａｐｉｄ　Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ　Ｔｉｔｅｒ　Ｋｉｔ（Ｓｙｓｔｅｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いてタイターを測定した。ＭＯＩ（ｍｕｌｔｉｐｌｉｃｉｔｙ　ｏｆ　ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ）を添付マニュアルに従って決定し、５ＭＯＩとなるようウイルス量を調節しＲＥＨ細胞にトランスフェクトした。

[0092] ｓｈ－ＡＳＮＳ１－ｓｅｎｓｅ：

5'-GATCCGCTGTATGTTCAGAAGCTAAACTTCCTGTCAGATTTAGCTTCTGAACATACAGCTTTTTG-3'（配列番号３）

ｓｈ－ＡＳＮＳ１－ａｎｔｉｓｅｎｓｅ：

5'-AATTCAAAAAGCTGTATGTTCAGAAGCTAAATCTGACAGGAAGTTTAGCTTCTGAACATACAGCG-3'（配列番号４）

ｓｈ－ＡＳＮＳ２－ｓｅｎｓｅ：

5'-GATCCCGTCAAGTCTTTGAACGCCATCTTCCTGTCAGAATGGCGTTCAAAGACTTGACGTTTTTG-3'（配列番号５）

ｓｈ－ＡＳＮＳ２－ａｎｔｉｓｅｎｓｅ：

5'-AATTCAAAAACGTCAAGTCTTTGAACGCCATTCTGACAGGAAGATGGCGTTCAAAGACTTGACGG-3'（配列番号６）

[0093] ＲＥＨ／Ｌｕｃ２細胞は、ルシフェラーゼ遺伝子Ｌｕｃ２を組み込んだレンチウイルスベクターで大腸菌を形質転換し、当該組み換え大腸菌を増幅後、プラスミドを生成した。このプラスミドをＨＥＫ２９３ＴＮ細胞に導入し、Ｌｕｃ２発現レンチウイルスを作成した。こうして得られた各組換えレンチウイルスについて、Ｇｌｏｂａｌ　ＵｌｔｒａＲａｐｉｄ　Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ　Ｔｉｔｅｒ　Ｋｉｔ（Ｓｙｓｔｅｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）を用いてタイターを測定した。ＭＯＩを添付マニュアルに従って決定し、

５ＭＯＩとなるようウイルス量を調節しＲＥＨ細胞にトランスフェクトし、ＲＥＨ／Ｌｕｃ２細胞を樹立した。このＲＥＨ／Ｌｕｃ２細胞を５×１０^{6}／ＰＢＳ１００μＩの濃度および量で免疫不全マウス（ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウス）の尾静脈から注入した。注入7日後よりＬ－ａｓｐ　６０００Ｕ／マウス体重ｋｇおよびＣＱ　５０ｍｇ／マウス体重ｋｇを１日１回、毎日腹腔内投与し生体内白血病増殖量および生存期間を解析した。マウス生体内腫瘍増殖量の測定にあたってはＤ－ルシフェリン(Ｓｙｎｃｈｅｍ社）１５０ｍｇ／マウス体重ｋｇを腹腔内投与し、Ｐｈｏｔｏｎ　Ｉｍａｇｅｒ（Ｂｉｏｓｐａｃｅ　Ｌａｂ社）を用いて生物発光イメージング解析を行った。図３－Ａは、上記３種のＡＬＬ細胞株に対してＬ－ａｓｐとオートファジー阻害剤を、単独又は組み合わせて作用させた場合の細胞死の度合いを、フローサイトメトリーとウェスタンブロッティング解析で検討した結果を示している。Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害薬ＣＱの併用群（Ｌ－ａｓｐ＋ＣＱ群、いずれも４８時間投与）は、ＣＱ単剤投与群（ＣＱ群）およびＬ－ａｓｐ単剤投与群（Ｌ－ａｓｐ群）に比べ有意に細胞死を誘導した。

[0094] フローサイトメトリーによる死細胞の評価は、Ａｎｎｅｘｉｎ　Ｖ染色陽性細胞の割合で明らかにした。またウェスタンブロッティング解析により、Ｌ－ａｓｐ群に比較し、Ｌ－ａｓｐ＋ＣＱ群において、アポトーシス関連蛋白であるｃＣＡＳＰ３やｃＰＡＲＰの発現の増加が認められた。

[0095] 図３－Ｂは、上記３種のうちＲＥＨ細胞に対して、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）を作用させることにより惹起される細胞死に対する、汎アポトーシス関連分子阻害薬であるｚ－ＶＡＤによる抑制作用を検討した結果を示している。ここに示すように、ｚ－ＶＡＤは当該細胞死を抑制した。

[0096] 図３－Ａと図３－Ｂにより、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤の併用により誘導される細胞死は、アポトーシスを介すことが示された。

[0097] 図３－Ｃは、確立されたＬ－ａｓｐ耐性株６９７－Ｒの、Ｌ－ａｓｐ添加量増加に対する生細胞率を検討した結果を示している。当該耐性株は、Ｌ－

ａｓｐに対する一定の耐性を有していることが確認できる。

[0098] 図３－Ｄは、上記Ｌ－ａｓｐ耐性株６９７－Ｒにおける、Ｌ－ａｓｐと、オートファジー阻害剤（ＣＱ）の組合せ添加の生細胞率に与える影響を検討した結果を示している。ここに示すように、Ｌ－ａｓｐ耐性株であってもＬ－ａｓｐと、オートファジー阻害剤の組合せ添加により、用量依存的に死細胞率が上昇した。

[0099] 図３－Ｅは、同じくＬ－ａｓｐ耐性株６９７－Ｒにおけるアスパラギン合成酵素（ＡＳＮＳ）の蛋白発現レベルを、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤を単独又は組み合わせて作用させた場合、あるいは両者共に作用させない場合について、ウェスタンブロッティング解析を行った結果を示している。ここに示すように、当該耐性株においては、いずれの薬剤投与環境においても、ＡＳＮＳ発現レベルが６９７株に比べて増加していた。上記の図３－Ｃに示す結果は、このようなＡＳＮＳレベルの増加にも係わらず、Ｌ－ａｓｐと、オートファジー阻害剤の組合せ添加により、用量依存的にＬ－ａｓｐ耐性株の死細胞率が上昇したことになる。

[0100] 図３－Ｆは、ＡＬＬ細胞株であるＲＥＨ細胞のＡＳＮＳ遺伝子を異なる部位においてノックダウンを行った「ｓｈ-ＡＳＮＳ１」と「ｓｈ-ＡＳＮＳ２」における、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）を単独又は組み合わせて作用させた場合、あるいは両者共に作用させない場合について検討した結果を示している。ここに示すように、ＡＳＮＳ遺伝子のノックダウンにより、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤の組合せ添加による殺細胞効果が増強されることが明らかになった。

[0101] 上記図３－Ａ～図３－Ｆに示す結果から、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤の併用療法はＬ－ａｓｐ耐性ＡＬＬ細胞においても有効であることが示された。また、ＡＳＮＳ阻害薬、Ｌ－ａｓｐ、オートファジー阻害剤の３剤併用は、ＡＬＬ治療において非常に有用であることが示された。

[0102] 図３－Ｇのウェスタンブロッティング解析結果は、ＲＥＨ細胞株に対するＬ－ａｓｐとオートファジー阻害剤の併用により誘導されるアポトーシス細

胞死の原因となる機構を検討した結果を示している。Ｌ－ａｓｐにおいてはＡＴＦ４－ＣＨＯＰ　ｐａｔｈｗａｙによりアポトーシス細胞死が誘導されることが報告されているが(Ye, J. et al., The EMBO journal 29, 2082-2096, doi:10.1038/emboj.2010.81 (2010))、Ｌ－ａｓｐ群とＬ－ａｓｐ＋ＣＱ群ではＡＴＦ４およびＣＨＯＰの発現に明らかな差を認めず、Ｌ－ａｓｐ＋ＣＱ群では他の原因によるアポトーシス細胞死が誘導されていることが示唆された。またＡＴＦ４の下流にあるＡＳＮＳの発現もＬ－ａｓｐ群とＬ－ａｓｐ＋ＣＱ群で明らかな差を認めなかった。

[0103] 図３－Ｈでは、図３－Ｇの細胞培養系にＲＯＳの阻害薬であるアセチルシステイン（ＮＡＣ）を添加した場合の殺細胞効果に対する影響を検討した結果を示している。ここに示したように、NACの添加によりＬ－ａｓｐ＋ＣＱ群における殺細胞効果は減弱した。このことからＬ－ａｓｐとオートファジー阻害剤の併用効果の発揮には、標的細胞におけるＲＯＳの蓄積が重要な要素であることが明らかになった。

[0104] 図３－Ｉは、Ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ　Ｉｏｄｉｄｅ染色によるフローサイトメトリーを用いた細胞周期の評価を、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤を、単独又は組み合わせて作用させた場合、あるいは両者共に作用させない場合において行った結果を示している。ここに示すように、Ｌ－ａｓｐ単独群ではＧ０／Ｇ１期が増加したが、Ｌ－ａｓｐ＋ＣＱ群では逆にＧ０／Ｇ１期が減少し、ｓｕｂ－Ｇ１期が増加していた。このことから、Ｌ－ａｓｐ単剤添加時には細胞周期をＧ０／Ｇ１期で停止させ細胞死から逃れているが、これに抗オートファジー阻害薬を併用することにより、細胞周期を停止することが困難になり、細胞死を逃れられずアポトーシスが誘導されることが示された。

[0105] 図３－Ｊは、９日間の継続的薬剤接触による影響を、生細胞数をカウントすることにより検討したものである。このカウントは、Ｔｒｙｐａｎ　ｂｌｕｅ染色を用いたＴＣ２０自動細胞カウンターにより調べた。細胞培地を72時間毎に交換する際に各薬剤を添加し、生細胞数を測定した。その結果、Ｃ

Ｑ群およびＬ－ａｓｐ群では緩やかな細胞増加を認めたが、Ｌ－ａｓｐ＋ＣＱ群では時間経過とともに生細胞数の割合が減少していた。

[0106] 図３－Ｋと図３－Ｌは、in vivoでの治療評価を行うため、ルシフェラーゼ遺伝子を導入したＲＥＨ／Ｌｕｃ２細胞を樹立し、免疫不全マウス（ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウス（Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｊａｐａｎ社））に対して経尾静脈移植を行い、その経過を検討した結果を示した。図３－Ｋは、その増殖度合いをＲＥＨ／ＬＵＣ２細胞の移植７、１６、２２日後の蛍光分布により検討した結果を示し、図３－Ｌでは、経時的なＲＥＨ／Ｌｕｃ２細胞の増殖度合いを蛍光の光子フラックス率により検討した。両図共に、移植されたＲＥＨ／Ｌｕｃ２細胞はｃｏｎｔｒｏｌ群および単独投与群のマウス体内で速やかに増殖したが、Ｌ－ａｓｐ＋ＣＱ群では増殖が有意に抑制されたことを示している。

[0107] 図３－Ｍは、上記のＲＥＨ／Ｌｕｃ２細胞を移植した免疫不全マウスの経時的な生存率を日単位で検討した全生存解析結果である。ここに示すように、ｃｏｎｔｒｏｌ群、ＣＱ群、Ｌ－ａｓｐ群に比較し、Ｌ－ａｓｐ＋ＣＱ群で有意な生存期間の延長を認めた。

[0108] このように、ＡＬＬにおけるＬ－ａｓｐと抗オートファジー阻害薬との併用療法はin vitroおよびin vivoで有効であることが示された。

[0109] ３．<u>Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤の併用と活性酸素種の関係</u>

６ウェルプレートに、１ウェルあたりＲＥＨ細胞１×１０^{6}個／培地２ｍｌを播種した。Ｌ－ａｓｐ　１Ｕ／ｍｌおよびＣＱ　１０μＭを添加し、継時的もしくは４８時間後に観察した。

[0110] ウェスタンブロッティング法は図２と同様に行い、一次抗体は、γＨ$_{2}$ＡＸ抗体はＡｂｃａｍ社から、ＰＵＭＡ抗体はＳａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社から購入した。

[0111] ｓｈ（ｓｈｏｒｔ ｈａｉｒｐｉｎ）ＲＮＡによるｐ５３のノックダウンは、上記図３と同様に行いｓｈ-ｐ５３（標的配列：5’-GACTCCAGTGGTAATCTAC-3’（配列番号７））を発現するレンチウイルスを作成した。下記のプライマ

ーを用いて組み換えベクターを作成し、大腸菌を形質転換した。当該組み換え大腸菌を増幅後、プラスミドを生成した。このプラスミドをＨＥＫ２９３ＴＮ細胞に導入し、Ｌｕｃ２発現レンチウイルスを作成した。こうして得られた各組換えレンチウイルスについて、Ｇｌｏｂａｌ　ＵｌｔｒａＲａｐｉｄ　Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ　Ｔｉｔｅｒ　Ｋｉｔ（Ｓｙｓｔｅｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）を用いてタイターを測定した。ＭＯＩを添付マニュアルに従って決定し、５ＭＯＩとなるようウイルス量を調節しＲＥＨ細胞にトランスフェクトした。

[0112] ｓｈ－ｐ５３－ｓｅｎｓｅ：

5'- GATCCGACTCCAGTGGTAATCTACCTTCCTGTCAGAGTAGATTACCACTGGAGTCTTTTTG-3'

（配列番号８）

ｓｈ－ｐ５３－ａｎｔｉｓｅｎｓｅ：

5'-AATTCAAAAAGACTCCAGTGGTAATCTACTCTGACACAGGAAGGTAGATTACCACTGGAGTCG-3'

（配列番号９）

[0113] 図４－Ａは、ＡＬＬ細胞株であるＲＥＨ細胞株に対して、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤を単独又は組み合わせて作用させた場合の、経時的なＤＮＡダメージをウェスタンブロッティング解析により検討した結果を示している。ＲＯＳの蓄積はＤＮＡダメージを惹起することが知られている(Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F. & Vousden, Nature reviews. Molecular cell biology 16, 393-405, doi:10.1038/nrm4007 (2015))。ここに示すように、ＲＥＨ細胞株において、Ｌ－ａｓｐ＋ＣＱ群ではＤＮＡダメージの指標であるγＨ２ＡＸの蛋白発現が上昇し、それとともにＰ５３およびＰＵＭＡ (P53 upregulated modulator of apoptosis)も上昇した。

[0114] 図４－Ｂは、図４－Ａの試験系において、さらにこれにＲＯＳ抑制薬であるアセチルシステイン（ＮＡＣ）を作用させた場合の、ＤＮＡダメージの指標であるγＨ２ＡＸと共に、ｐ５３蛋白の増減をウェスタンブロッティング解析により検討した結果を示している。ここに示すように、ＲＯＳ抑制薬を添加すると、ＤＮＡダメージおよびＰ５３活性が抑制された。

[0115] 図４－Ａと図４－Ｂから、ＡＬＬ細胞において、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤の併用により、過剰なＲＯＳが当該細胞内に蓄積することによるＤＮＡダメージにより、Ｐ５３誘導性アポトーシスが惹起されることが示された。

[0116] 図４－Ｃは、ｓｈ(short hairpin)ＲＮＡによりｐ５３遺伝子をノックダウンしたＡＬＬ細胞株であるＲＥＨ細胞株（ｓｈ-ｐ５３）における、Ｌ－ａｓｐとＣＱを組み合わせて作用させた場合のＤＮＡダメージを、ウェスタンブロッティング解析により検討した結果である。ここに示すように、ｓｈ-ｐ５３では、ｐ５３遺伝子の下流にあるＰＵＭＡのみならず、ＤＮＡダメージも誘導されていなかった。

[0117] 図４－Ｄは、ｓｈ-ｐ５３における、細胞内ＲＯＣの蓄積を検討した結果である。ここに示すようにｓｈ-ｐ５３では、Ｌ－ａｓｐ＋ＣＱ群における細胞内ＲＯＳの蓄積が、有意に抑制されていた。

[0118] 図４－Ｅは、ｓｈ-ｐ５３における細胞死の抑制について、Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖの取り込み（左のグラフ）と、ウェスタンブロッティング解析（右の電気泳動図）により検討した結果である。ここに示すようにｓｈ-ｐ５３では、Ｌ－ａｓｐ＋ＣＱ群における細胞死が有意に抑制され、ｐ５３の発現も強く抑制されていた。

[0119] 図４－Ａ～図４－Ｅに示した結果により、Ｌ－ａｓｐと抗オートファジー阻害薬の併用療法は、（ａ）ＲＯＳの蓄積、（ｂ）ＤＮＡへのダメージ、（ｃ）ｐ５３の活性化、（ｄ）更なる過剰なＲＯＳの蓄積、という「ＲＯＳ－ＤＮＡダメージ－ｐ５３ループ」を形成し、細胞死を誘導すること、及び、ｐ５３のノックダウン株ではこのループが絶たれるために、細胞死が抑制されることが示された。

[0120] ４．臨床検体とマウス生体を用いた検討

臨床検体は、９割以上がＡＬＬ白血病細胞で占められる患者の骨髄検体から、Ｆｉｃｏｌｌによる密度勾配遠心分離法を用いて分離した白血病細胞を使用した。採取に当たっては倫理委員会の承認ののち両親から書面にて同意

を得た。　生細胞数の解析にあたっては、Ｌ－ａｓｐ　１Ｕ／ｍｌおよびＣＱ　１０μＭを加え、４８時間後にトリパンブルー染色を用い自動細胞カウンターＴＣ２０（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）を使って調べた。

[0121]　ウェスタンブロッティング法は図２と同様に行った。

[0122]　ｐ５３の機能欠失となる変異の検出は、Ｓａｎｇｅｒ法によるダイレクトシークエンス解析を行った。回収した細胞にＰＵＲＥＧＥＮＥ　Ｃｅｌｌ　Ｌｙｓｉｓ　ＳｏｌｕｔｉｏｎおよびＰｒｏｔｅｉｎ　Ｐｒｅｃｉｐｉｔａｔｉｏｎ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（いずれもＱＩＡＧＥＮ社）を添加後、ＤＮＡをエタノールで沈殿させＴｒｉｓ－ＥＤＴＡ　Ｂｕｆｆｅｒで溶解した。エキソン部（ｅｘｏｎ　２－１１）を下記のプライマーを用いて逆転写ポリメラーゼ連鎖反応で増幅した。この増幅産物についてダイレクトシークエンス（両鎖解析）をＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　３１３０ｘｌ　Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（サーモフィッシャー社）により行った。得られた解析波形チャートからソフトウェアＧＥＮＥＴＹＸ（ゼネティックス株式会社）を用いて変異解析を行った。

[0123] ｅｘｏｎ２－３　ｓｅｎｓｅ：　5’-tctcatgctggatccccact-3’（配列番号１０）

ｅｘｏｎ２－３　ａｎｔｉｓｅｎｓｅ：　5’-agtcagaggaccaggtcctc-3’（配列番号１１）

ｅｘｏｎ４　ｓｅｎｓｅ：　5’-tgaggacctggtcctctgac-3’（配列番号１２）

ｅｘｏｎ４　ａｎｔｉｓｅｎｓｅ：　5’-agaggaatcccaaagttcca-3’（配列番号１３）

ｅｘｏｎ５－６　ｓｅｎｓｅ：　5’-tgttcacttgtgccctgact-3’（配列番号１４）

ｅｘｏｎ５－６　ａｎｔｉｓｅｎｓｅ：　5’-ttaacccctcctcccagaga-3’（配列番号１５）

ｅｘｏｎ７　ｓｅｎｓｅ：　5’-cttgccacaggtctccccaa-3’（配列番号１６）

ｅｘｏｎ７　ａｎｔｉｓｅｎｓｅ：　5’-aggggtcagaggcaagcaga-3’（配列番

号１７）

ｅｘｏｎ８－９　ｓｅｎｓｅ：　5’-ttgggagtagatggagcct-3’（配列番号１８）

ｅｘｏｎ８－９　ａｎｔｉｓｅｎｓｅ：　5’-agtgttagactggaaacttt-3’（配列番号１９）

ｅｘｏｎ１０　ｓｅｎｓｅ：　5’-caattgtaacttgaaccatc-3’（配列番号２０）

ｅｘｏｎ１０　ａｎｔｉｓｅｎｓｅ：　5’-ggatgagaatggaatcctat-3’（配列番号２１）

ｅｘｏｎ１１　ｓｅｎｓｅ：　5’-agaccctctcactcatgtga-3’（配列番号２２）

ｅｘｏｎ１１　ａｎｔｉｓｅｎｓｅ：　5’-tgacgcacacctattgcaag-3’（配列番号２３）

[0124] ｐ５３の遺伝子導入は組み換えアデノウイルスを用いた。組み換えアデノウイルスはAdenovirus Expression Vector Kit (Takara社)を用いて作成した。具体的には野生型ｐ５３を挿入したコスミドベクター（ｐＡｘＣＡｗｔｉｔ－ｐ５３）を作成し、ｐ５３遺伝子を含む組み換えアデノウイルスゲノムを切り出してＨＥＫ２９３ＴＮ細胞に導入し、ｐ５３組み換えアデノウイルスを作成した。こうして得られた各組換えアデノウイルスについて、Ｇｌｏｂａｌ　ＵｌｔｒａＲａｐｉｄ　Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ　Ｔｉｔｅｒ　Ｋｉｔ（Ｓｙｓｔｅｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）を用いてタイターを測定した。ＭＯＩを添付マニュアルに従って決定し、５ＭＯＩとなるようウイルス量を調節し目的細胞にトランスフェクトした。

[0125] ｐ５３のノックダウンは図４と同様の方法でｓｈＲＮＡ（ｓｈ－ｐ５３）を用いてＲＥＨ細胞に対し行った。このｐ５３ノックダウンＲＥＨ細胞を５×１０^{6}／ＰＢＳ１００μｌの濃度および量で免疫不全マウス（ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウス）の尾静脈から注入した。注入7日後より、Ｌ－ａｓｐ　６０００Ｕ／マウス体重ｋｇおよびＣＱ　５０ｍｇ／マウス体重ｋｇを１日１回、毎

日腹腔内投与し生存期間を解析した。

[0126] 図５－Ａは、ＡＬＬの臨床血液検体（初発例１２例と再発例２例の計１４例）における、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）の組み合わせ投与の効果を、ｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異の有無と併せて検討した結果を示している。これらの検体１４例のうち、保存検体量が十分であった７例でＳａｎｇｅｒ法によるｐ５３解析を行い、１例（症例１４）でｐ５３遺伝子のホモ変異（Ｒ２４８Ｑ）を認めた。Ｌ－ａｓｐ群とＬ－ａｓｐ＋ＣＱ群の比較では、ｐ５３の機能欠失となる変異を有さない１３例においてＬ－ａｓｐ＋ＣＱ群で有意に生存細胞数が低下していたが、ｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異を有する１例（症例１４）では、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤の併用効果を認めなかった。

[0127] 図５－Ｂは、前記した１４症例のうち、Ｌ－ａｓｐとＣＱの組み合わせ投与の効果が認められたＡＬＬの臨床血液検体３例（症例４、５、７）におけるオートファジー活性評価の結果を、ウェスタンブロッティング解析により示した。図の最下段の数字は、ＬＣ３Ｂ－II／ＡＣＴＢについて、コントロールを1とした場合の相対比を示す。いずれの症例の検体も、L-aspとCQの併用時にＬＣ３Ｂ－IIの蛋白発現が上昇していた。これはＬ－ａｓｐ投与時にオートファジー活性が亢進することを示しており、これは前述したｉｎ ｖｉｔｒｏにおける知見と一致している。

[0128] 図５－Ｃと図５－Ｄでは、前記した１４症例のうち、Ｌ－ａｓｐとＣＱの組み合わせ投与の効果が認められなかったＡＬＬの臨床血液検体（症例１４）に対して、アデノウイルスによる正常ｐ５３遺伝子の導入を行った場合の効果を、ウェスタンブロッティング解析（図５－Ｃ）と生細胞数（図５－Ｄ）により示した。これらに示したように、アデノウイルスによる正常ｐ５３遺伝子の導入を行うと、Ｌ－ａｓｐ＋ＣＱ群においてｐ５３の蛋白発現が亢進し細胞死が惹起された。

[0129] 図５－Ｅは、前述したｐ５３遺伝子をノックダウンしたＲＥＨ細胞株（ｓｈ-ｐ５３）を、免疫不全マウスに経尾静脈移植した場合の投薬の効果を検討

した結果を示している。具体的には、ｓｈＲＮＡによるｐ５３ノックダウンＲＥＨ細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスに経尾静脈移植して治療実験を行った。その結果、本図に示したように、ｐ５３ノックダウン株であるｓｈ-ｐ５３では、Ｌ－ａｓｐとＣＱの併用でも生存期間の延長を認めなかった。

[0130] 本実施例により、ｐ５３遺伝子は、Ｌ－ａｓｐと抗オートファジー阻害薬の併用療法において本質的な役割を果たしており、ＡＬＬ等の治療の層別化を行う上で極めて重要であることが示された。図５－Ｆにおいて、Ｌ－ａｓｐとオートファジー阻害剤であるＣｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ（ＣＱ）の組み合わせ投与による、ＡＬＬ細胞のアポトーシス誘導の仕組みをチャート化して示した。

請求の範囲

[請求項1] がん検体におけるｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異を認めた場合に、当該がんにおけるＬ－アスパラギナーゼ若しくはその誘導体の剤、及び、オートファジー阻害剤の併用療法の効果の否定的データとする、薬剤の効果の予測データの取得方法。

[請求項2] ｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異は、

（１）一方のアレルにｐ５３遺伝子の機能欠失型の変異があり、他方のアレルで第１７染色体短腕のｐ５３遺伝子存在領域のＬＯＨ(loss of heterozygosity)が認められる変異、（２）双方のアレルにおけるｐ５３遺伝子の機能欠失型のホモ変異もしくはコンパウンドヘテロ変異、（３）第１７番染色体短腕の欠失変異、若しくは、第１７番染色体の欠失変異、及び、（４）一方のアレルにｐ５３遺伝子の機能欠失型変異のみが認められ、他方のアレルのｐ５３遺伝子には変異は認められないが、四量体構造を取るｐ５３分子のサブユニットとして、変異ｐ５３サブユニットがランダムに組み合わされて機能阻害が認められる変異、から選ばれる１種以上の変異である、請求項１に記載の予測データの取得方法。

[請求項3] 一方のアレルにｐ５３遺伝子の機能欠失型の変異があり、他方のアレルで第１７染色体短腕のｐ５３遺伝子存在領域のＬＯＨ(loss of heterozygosity)が認められる変異、の検出は、ＬＯＨの検出によって行われる、請求項２に記載の予測データの取得方法。

[請求項4] がんの種類は、基礎的にＬ－アスパラギナーゼ又はその誘導体の剤の投与の有効可能性が認められるがんである、請求項１～３のいずれか１項に記載の予測データの取得方法。

[請求項5] がんの種類は、白血病、悪性リンパ腫、又は、卵巣がんである、請求項１～４のいずれか１項に記載の予測データの取得方法。

[請求項6] Ｌ－アスパラギナーゼ若しくはその誘導体の剤、及び、オートファジー阻害剤を含有することを特徴とする、Ｌ－アスパラギナーゼ又は

その誘導体の剤の単独投与に対して抵抗性を有するがんの治療剤。

[請求項7] Ｌ－アスパラギナーゼ若しくはその誘導体の剤の単独投与に対するがんの抵抗性は、事前のＬ－アスパラギナーゼ若しくはその誘導体の剤の体内投与による当該がんに対する否定的な抗がん効果データ、又は、事前の当該がん細胞の体外におけるＬ－アスパラギナーゼ若しくはその誘導体の剤との接触による否定的な抗がん効果データ、に基づいて規定されることを特徴とする、請求項６に記載のがんの治療剤。

[請求項8] オートファジー阻害剤は、クロロキン類、３－メチルアデニン、バフィロマイシンＡ、又は、ウォルトマニンである、請求項６又は７に記載のがんの治療剤。

[請求項9] クロロキン類は、クロロキン（クロロキノリン）、又は、ハイドロオキシクロロキンである、請求項８に記載のがんの治療剤。

[請求項10] Ｌ－アスパラギナーゼ若しくはその誘導体の剤、及び、オートファジー阻害剤を含有する医薬用組成物である、請求項６～９のいずれか１項に記載のがんの治療剤。

[請求項11] Ｌ－アスパラギナーゼ若しくはその誘導体の剤、及び、オートファジー阻害剤を別個の構成薬剤として含む薬剤のセットである、請求項６～９のいずれか１項に記載のがんの治療剤。

[請求項12] さらにＬ－アスパラギン合成酵素阻害薬を含有する、請求項６～１１のいずれか１項に記載のがんの治療剤。

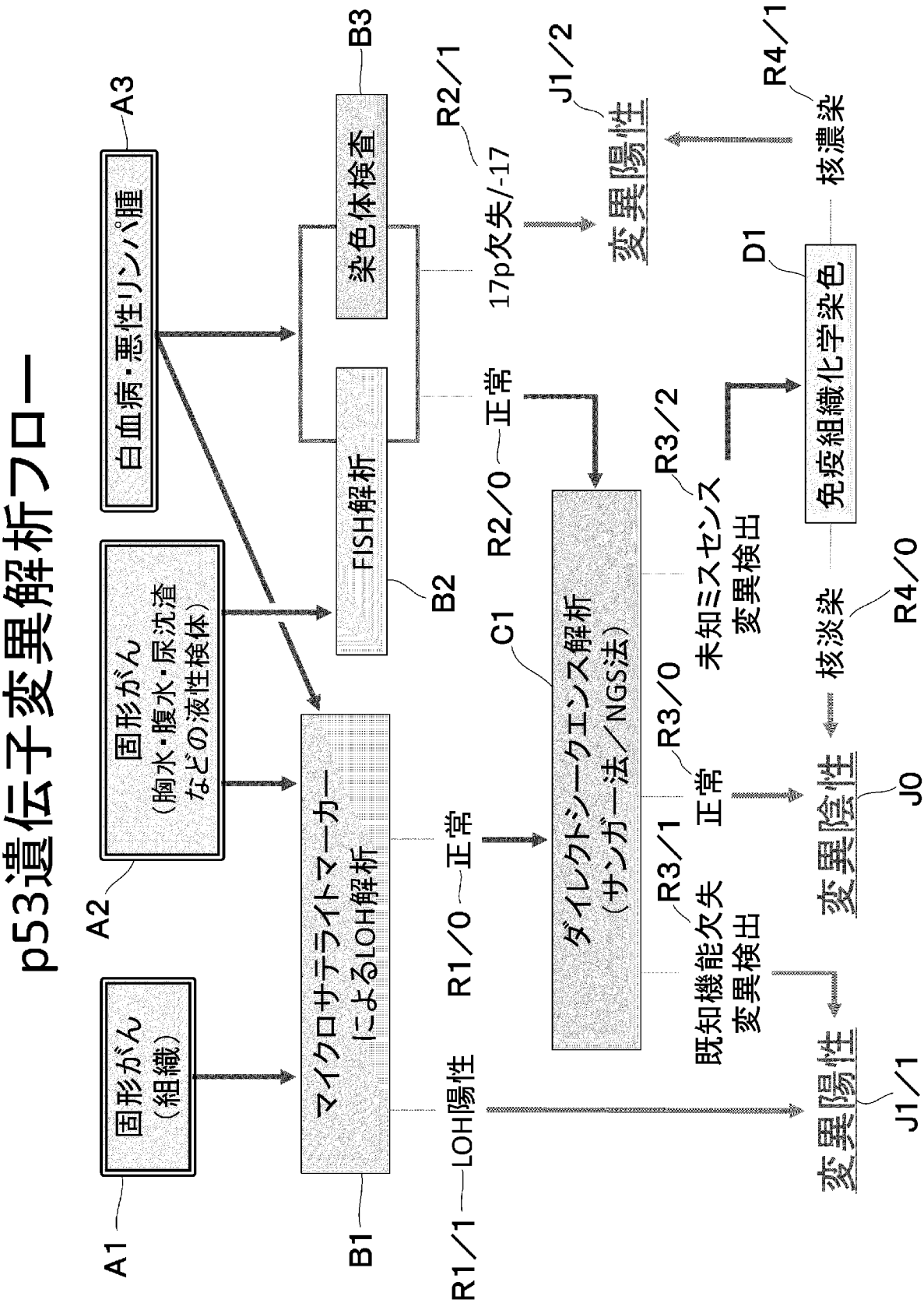
[請求項13] Ｌ－アスパラギナーゼ若しくはその誘導体の剤の単独投与に対して抵抗性を有するがんの種類は、ｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異が認められないがん、又は、事後的にｐ５３遺伝子の機能欠失となる変異の修復がなされたがんである、請求項６～１２のいずれか１項に記載のがんの治療剤。

[請求項14] Ｌ－アスパラギナーゼ若しくはその誘導体の剤の単独投与に対して抵抗性を有するがんの種類は、基礎的にＬ－アスパラギナーゼ若しくはその誘導体の剤の投与の有効可能性が認められるがんである、請求

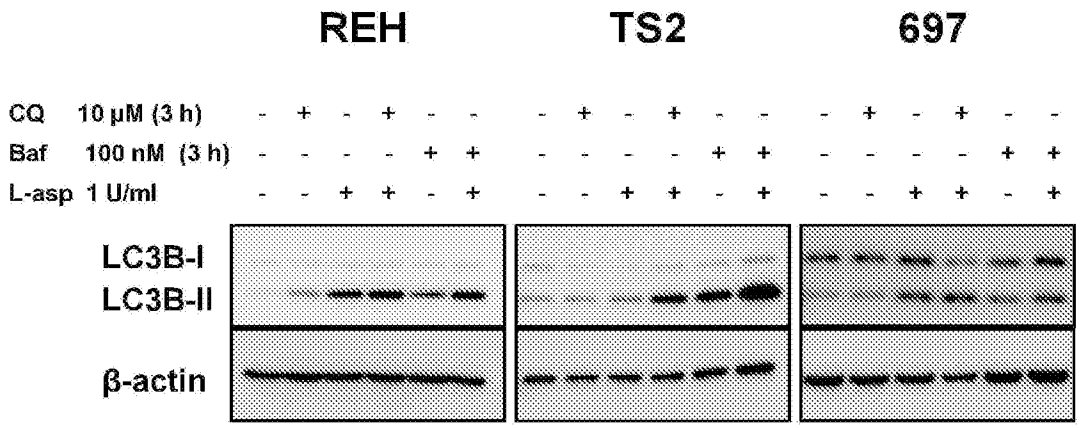
項１３に記載のがんの治療剤。

[請求項15] Ｌ－アスパラギナーゼ若しくはその誘導体の剤の単独投与に対して抵抗性を有するがんの種類は、白血病、悪性リンパ腫、又は、卵巣がんである、請求項１３又は１４に記載のがんの治療剤。

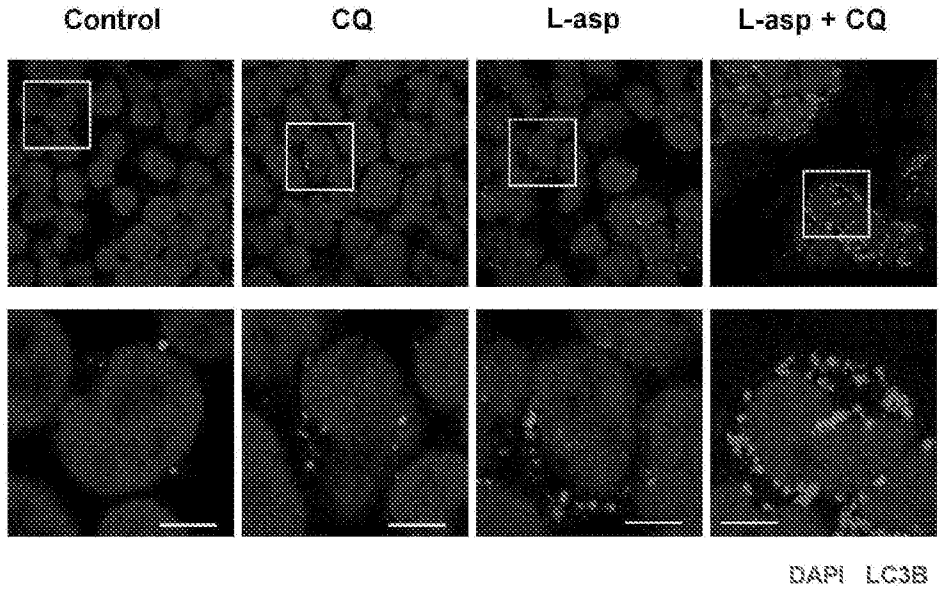
[図1]


p53遺伝子変異解析フロー
A3
白血病・悪性リンパ腫
A2
固形がん
（胸水・腹水・尿沈渣
などの液性検体）
A1
固形がん
（組織）
B3
染色体検査
B2
FISH解析
B1
マイクロサテライトマーカー
によるLOH解析
R2／1
17p欠失/-17
R2／0
正常
R1／1
LOH陽性
R1／0
正常
C1
ダイレクトシークエンス解析
（サンガー法／NGS法）
R3／2
未知ミスセンス
変異検出
R3／0
正常
R3／1
既知機能欠失
変異検出
J1／2
変異陽性
R4／1
核濃染
D1
免疫組織化学染色
核淡染
R4／0
変異陰性
J0
変異陽性
J1／1

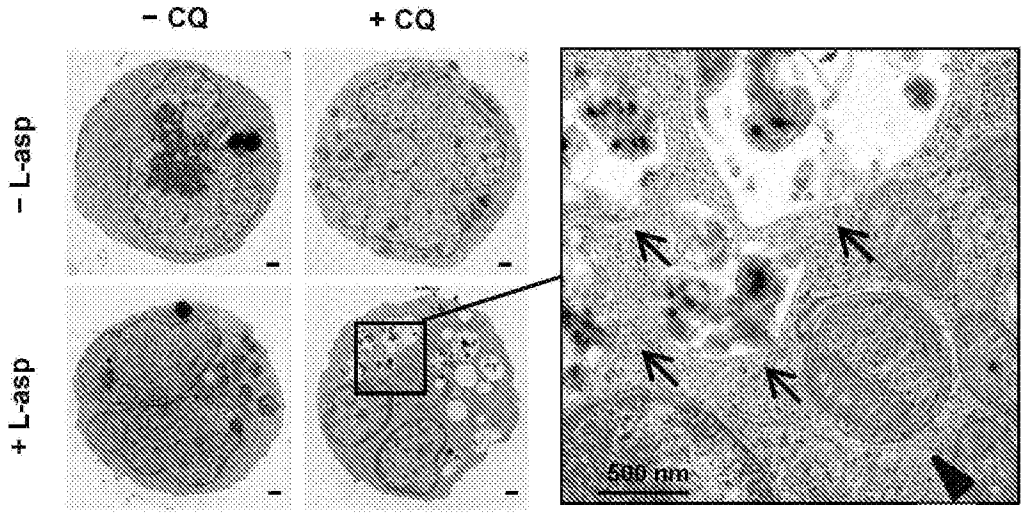
[図2-A]


REH
TS2
697
CQ 10 μM (3 h)
Baf 100 nM (3 h)
L-asp 1 U/ml
LC3B-I
LC3B-II
β-actin

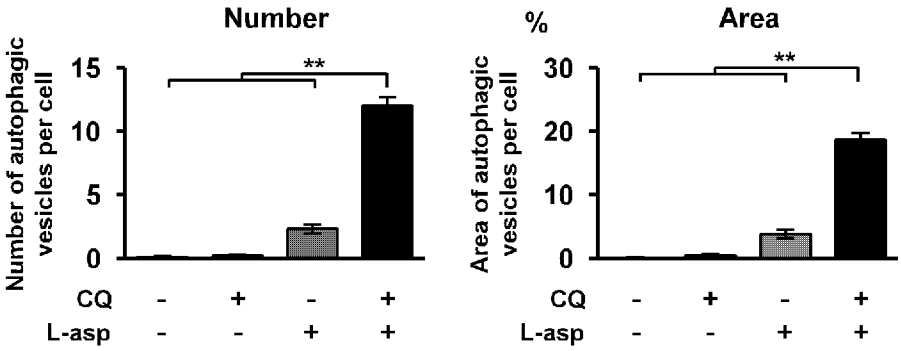
[図2-B]


Control
CQ
L-asp
L-asp + CQ
DAPI LC3B

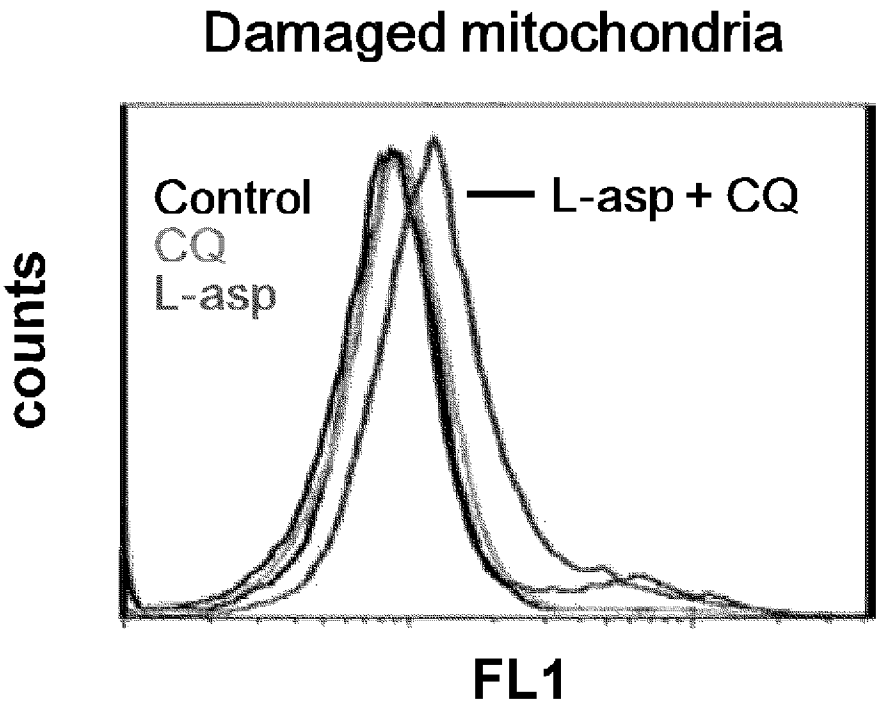
[図2-C]


- CQ
+ CQ
- L-asp
+ L-asp
500 nm

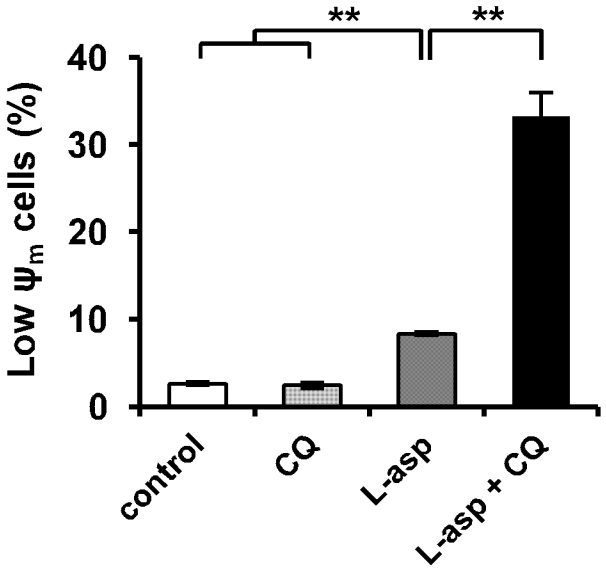
[図2-D]


Number
Number of autophagic vesicles per cell
15
10
5
0
**
CQ - + - +
L-asp - - + +
%
Area
Area of autophagic vesicles per cell
30
20
10
0
**
CQ - + - +
L-asp - - + +

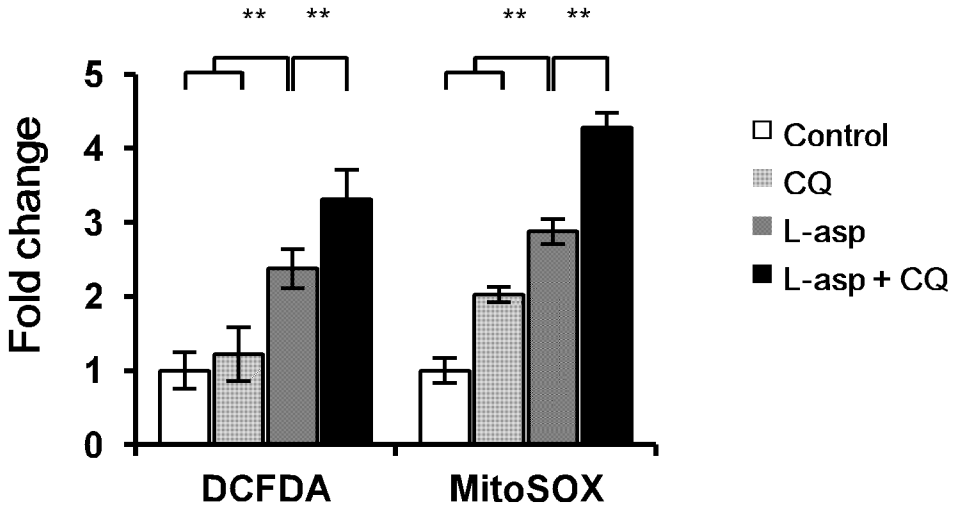
[図2-E]


Damaged mitochondria
counts
Control
CQ
L-asp
L-asp + CQ
FL1

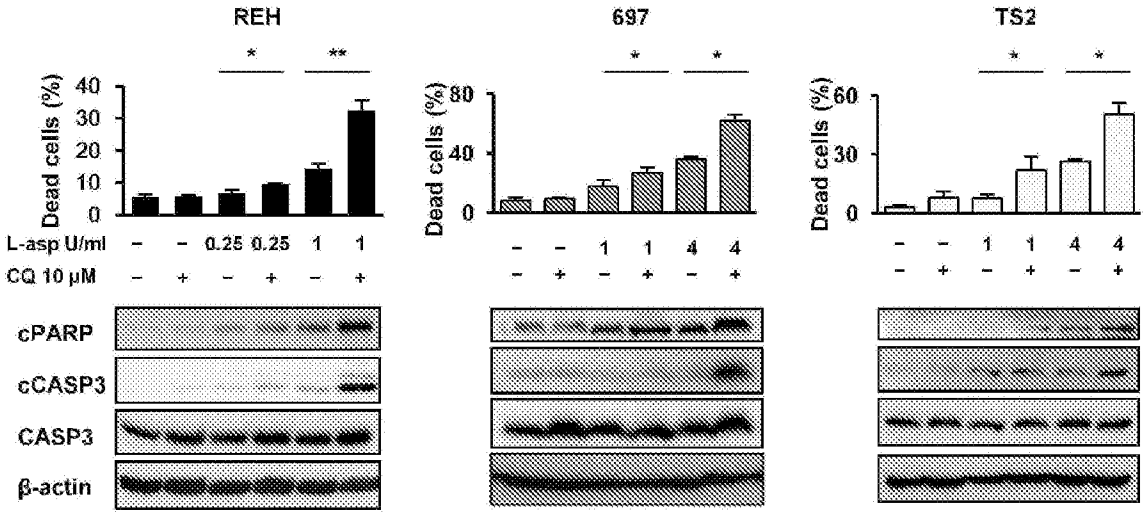
[図2-F]


**
**
40
30
20
10
0
Low ψm cells (%)
control
CQ
L-asp
L-asp + CQ

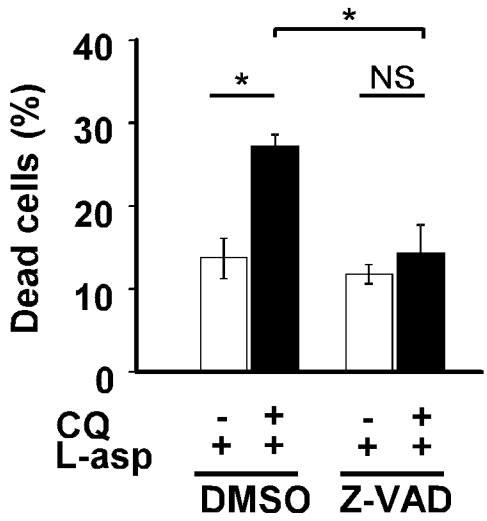
[図2-G]


** **
** **
5
4
3
2
1
0
Fold change
DCFDA
MitoSOX
Control
CQ
L-asp
L-asp + CQ

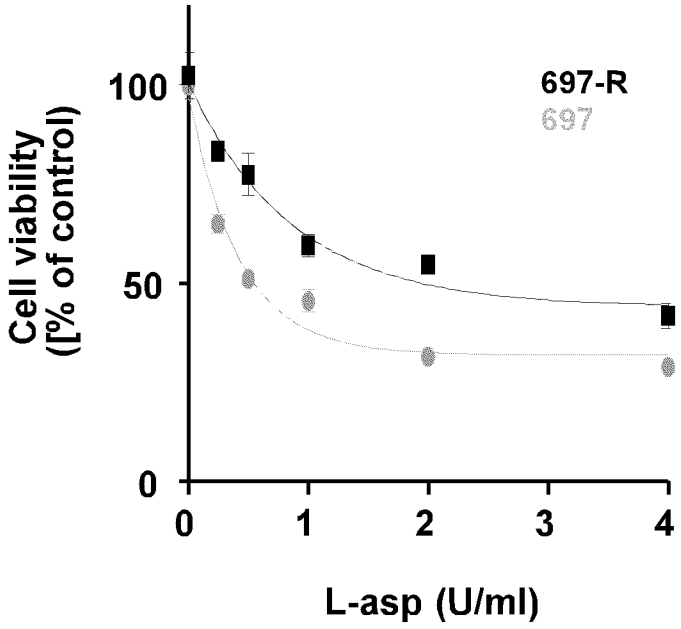
[図3-A]


REH
697
TS2
Dead cells (%)
L-asp U/ml
CQ 10 μM
cPARP
cCASP3
CASP3
β-actin

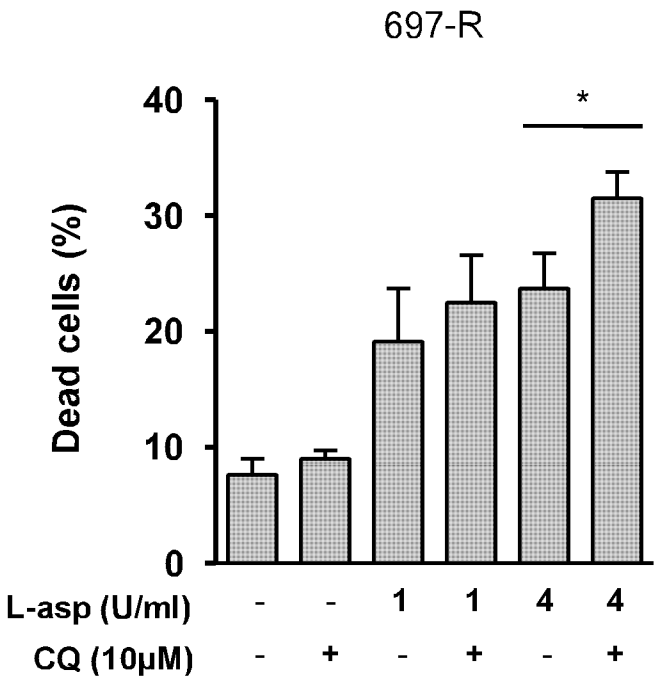
[図3-B]


*
*
NS
40
30
20
10
0
Dead cells (%)
CQ
L-asp
- +
+ +
- +
+ +
DMSO
Z-VAD

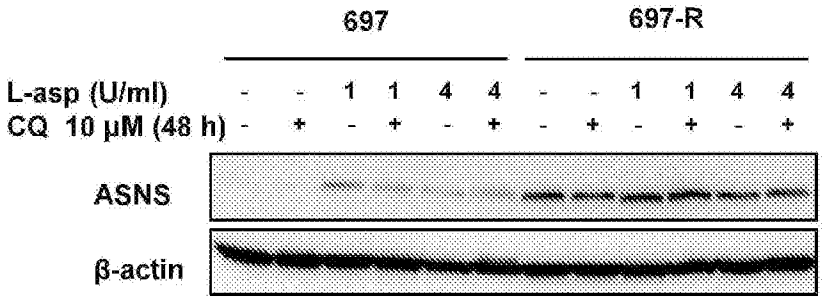
[図3-C]


100
50
0
Cell viability
([% of control)
697-R
697
0
1
2
3
4
L-asp (U/ml)

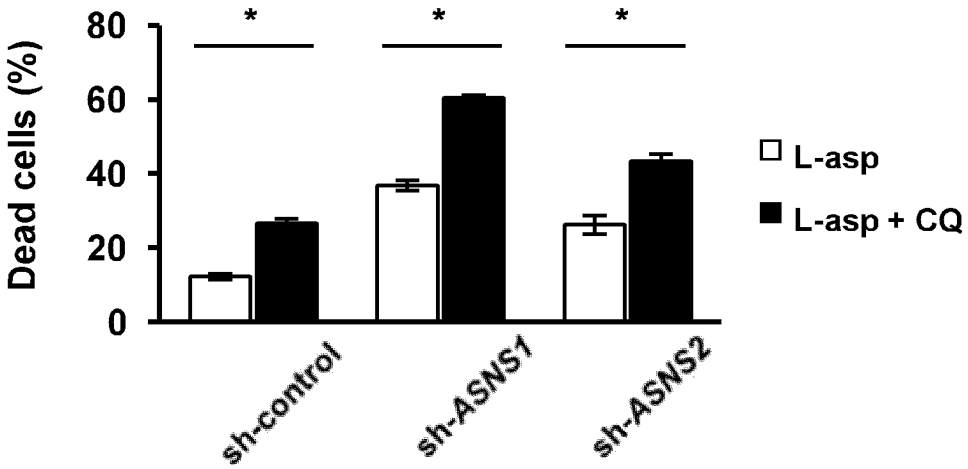
[図3-D]


697-R
Dead cells (%)
40
30
20
10
0
*
L-asp (U/ml) - - 1 1 4 4
CQ (10μM) - + - + - +

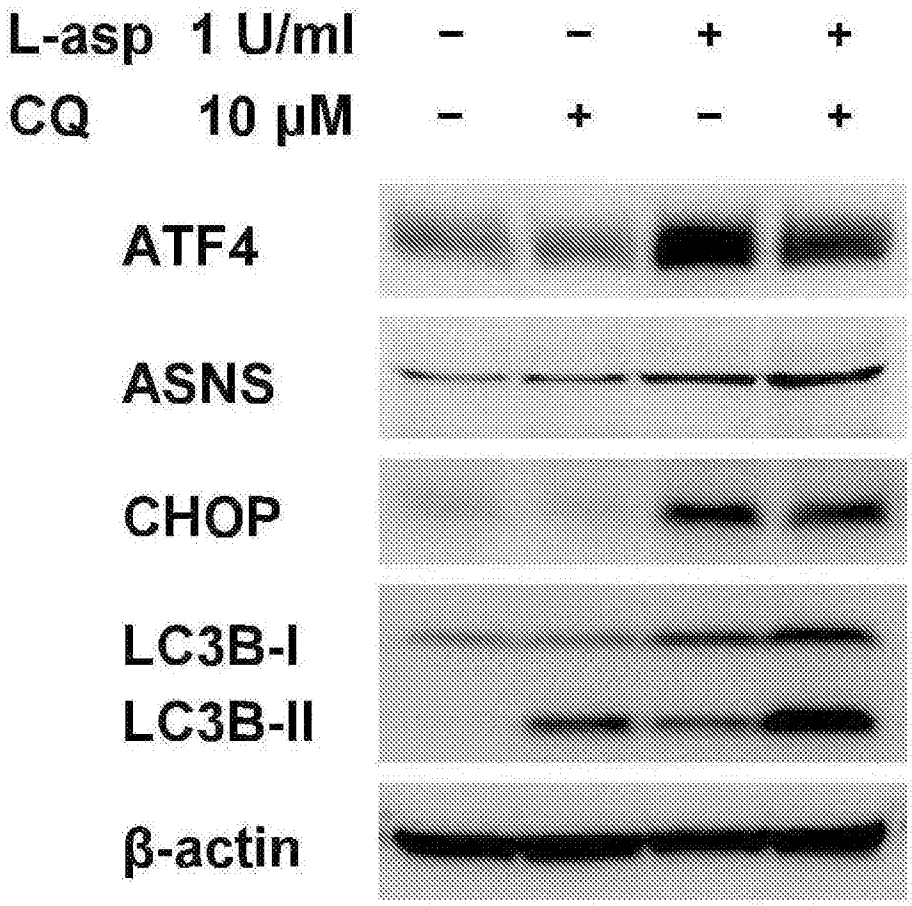
[図3-E]


697
697-R
L-asp (U/ml) - - 1 1 4 4 - - 1 1 4 4
CQ 10 μM (48 h) - + - + - + - + - + - +
ASNS
β-actin

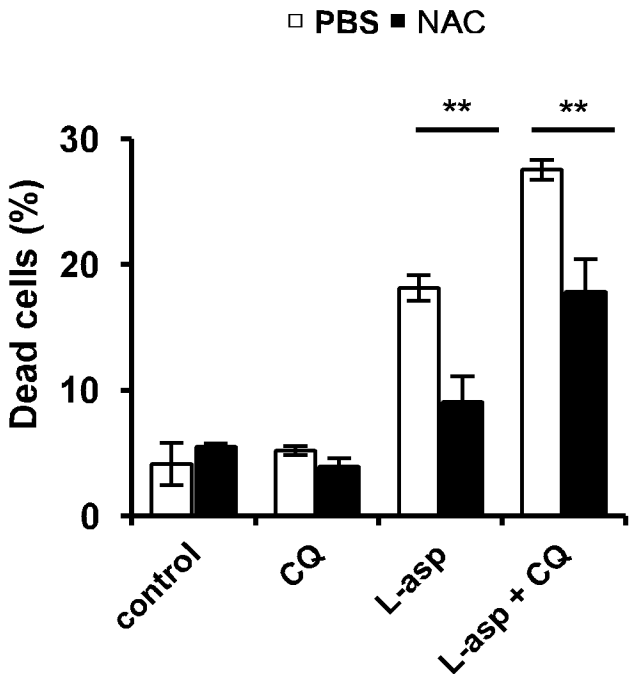
[図3-F]


Dead cells (%)
80
60
40
20
0
*
*
*
L-asp
L-asp + CQ
sh-control
sh-ASNS1
sh-ASNS2

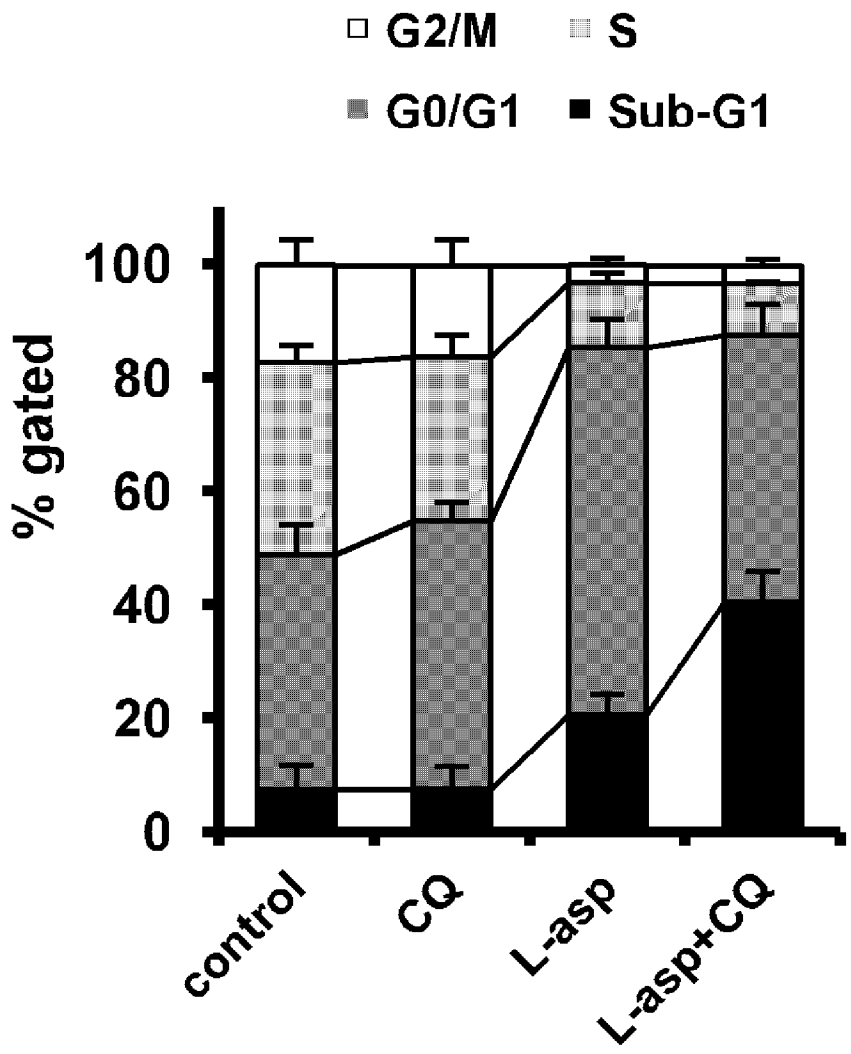
[図3-G]



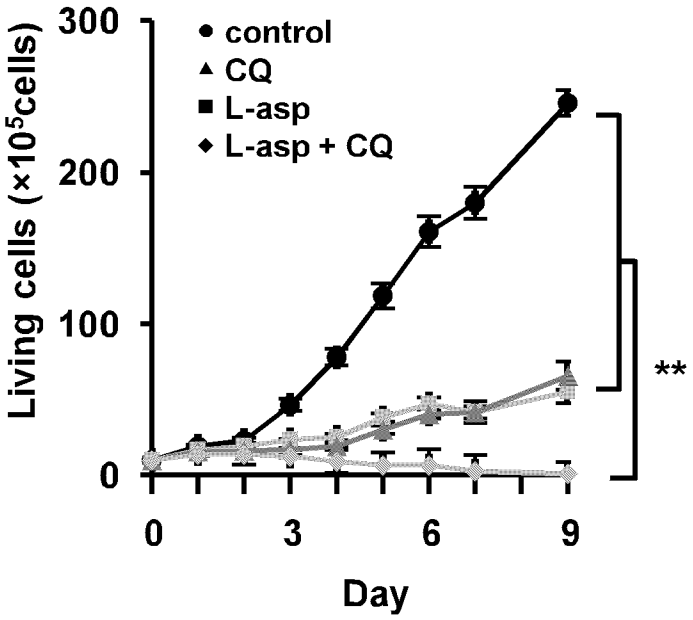
[図3-H]



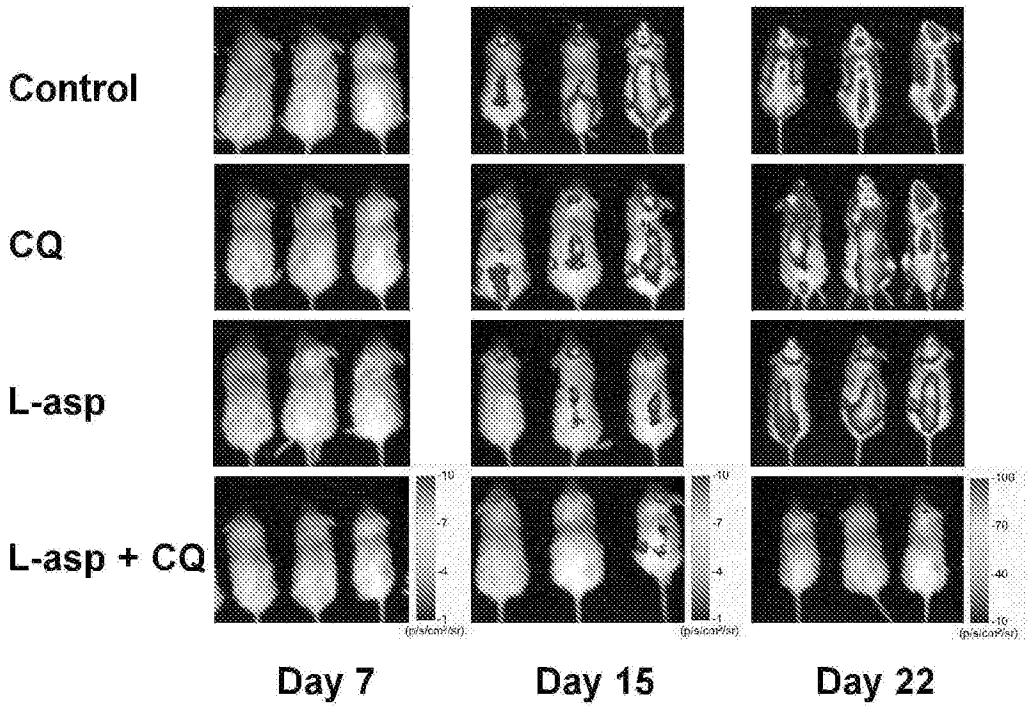
[図3-I]



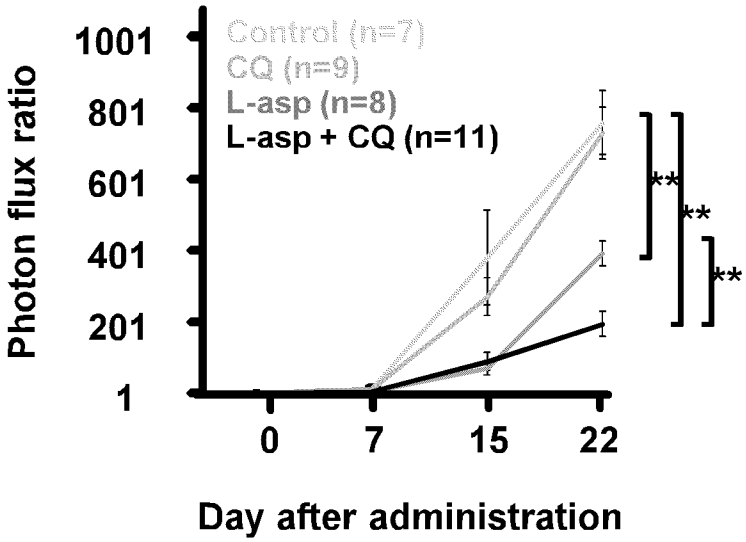
[図3-J]


300
200
100
0
Living cells (×10^5cells)
control
CQ
L-asp
L-asp + CQ
**
0
3
6
9
Day

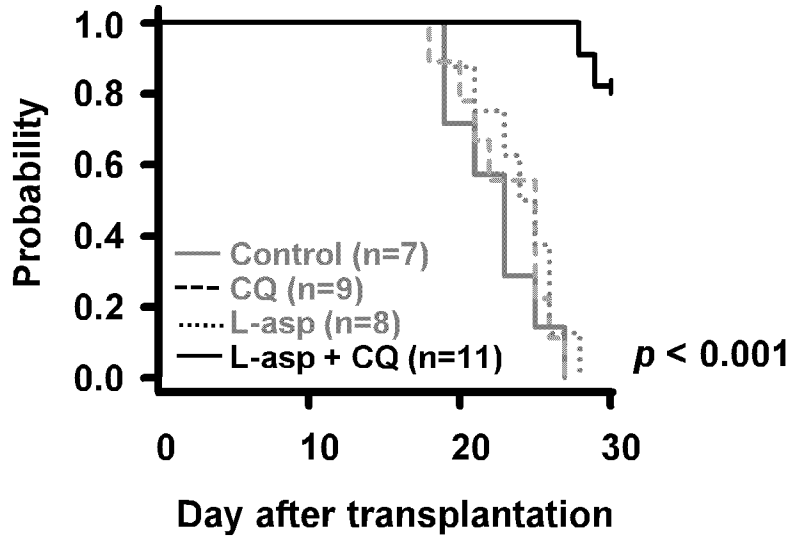
[図3-K]


Control
CQ
L-asp
L-asp + CQ
Day 7
Day 15
Day 22

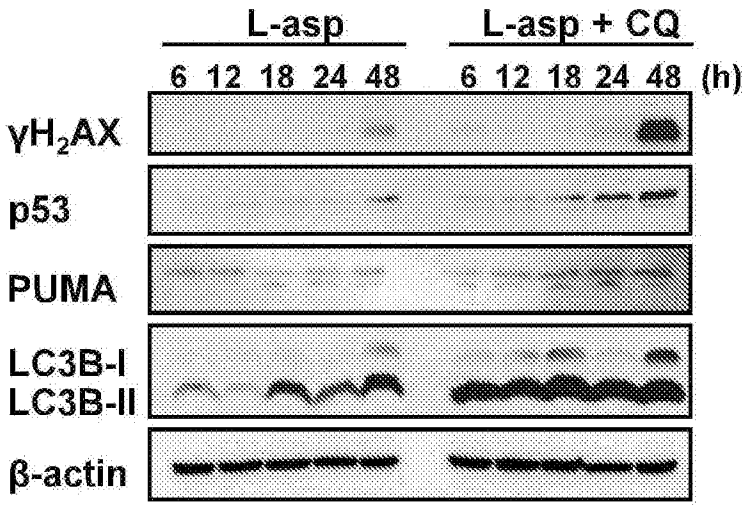
[図3-L]


Photon flux ratio
1001
801
601
401
201
1
Control (n=7)
CQ (n=9)
L-asp (n=8)
L-asp + CQ (n=11)
**
**
**
0
7
15
22
Day after administration

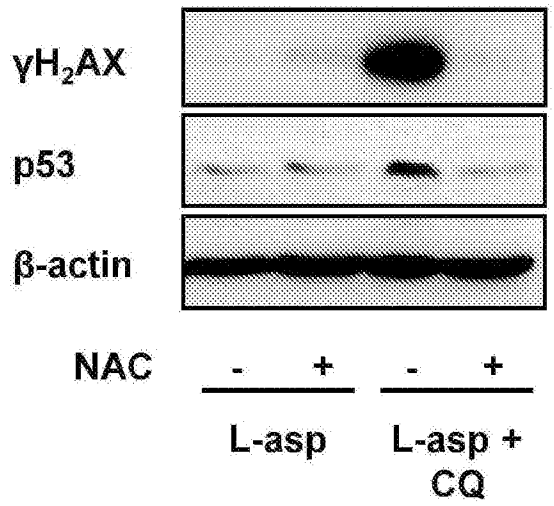
[図3-M]


Probability
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Control (n=7)
CQ (n=9)
L-asp (n=8)
L-asp + CQ (n=11)
p < 0.001
0
10
20
30
Day after transplantation

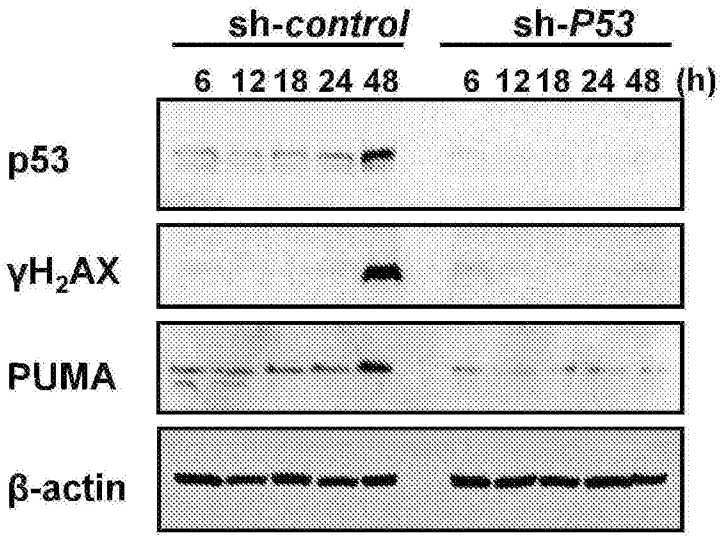
[図4-A]


L-asp
L-asp + CQ
6 12 18 24 48 6 12 18 24 48 (h)
γH2AX
p53
PUMA
LC3B-I
LC3B-II
β-actin

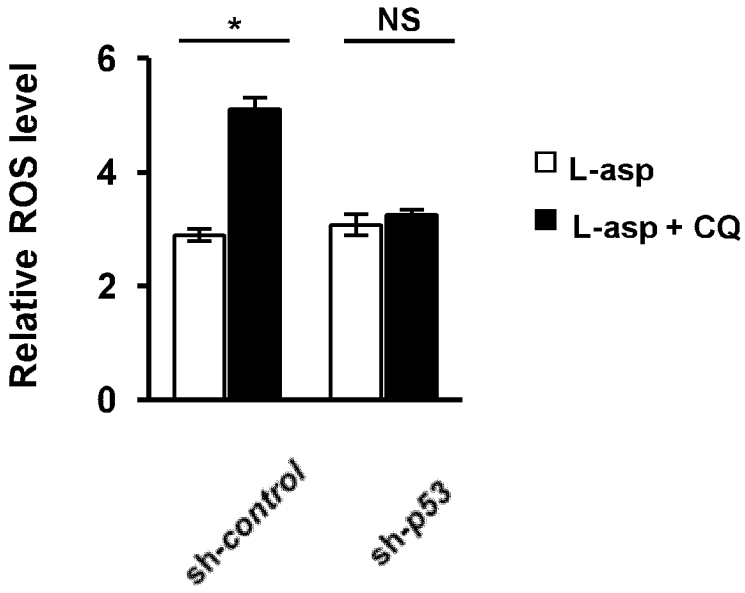
[図4-B]


γH2AX
p53
β-actin
NAC - + - +
L-asp
L-asp + CQ

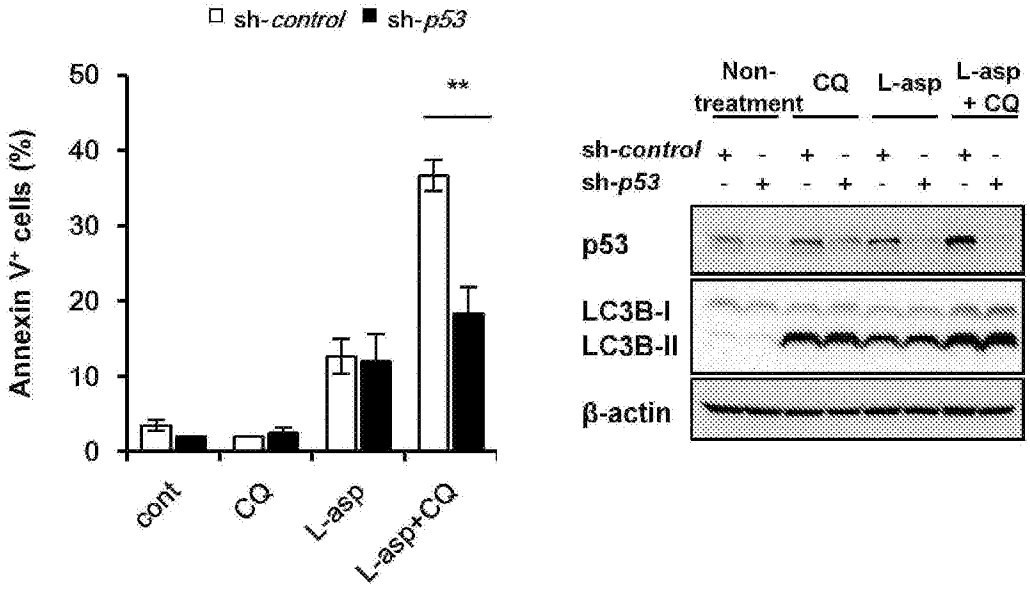
[図4-C]


sh-control
sh-P53
6 12 18 24 48 6 12 18 24 48 (h)
p53
γH2AX
PUMA
β-actin

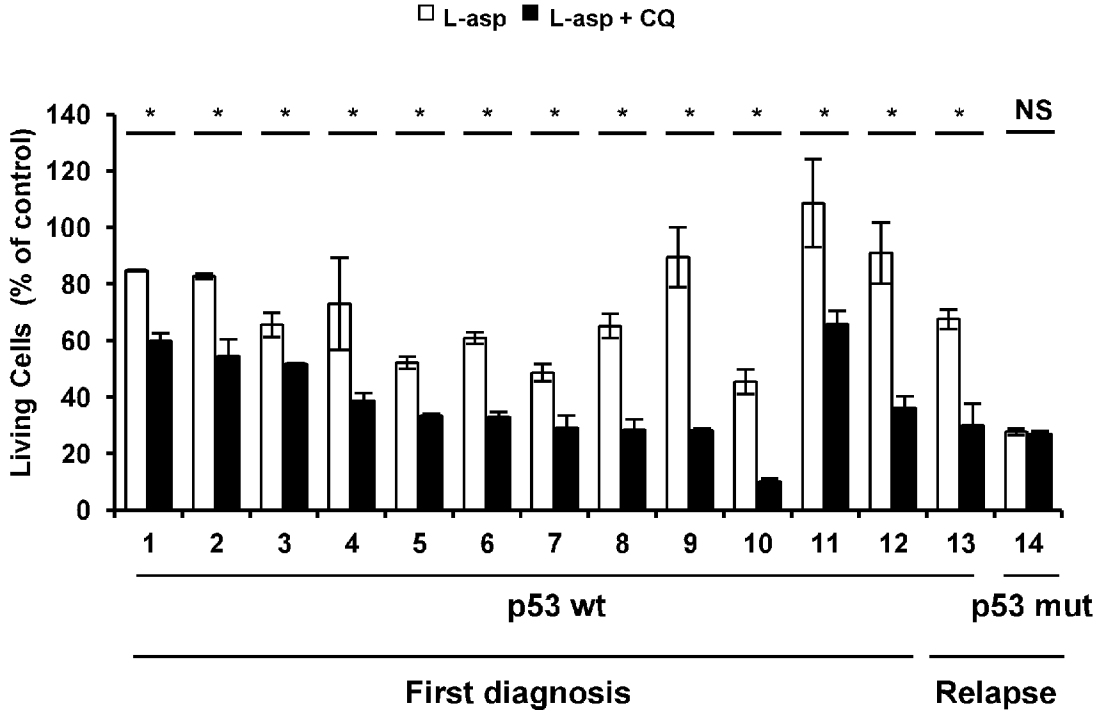
[図4-D]


*
NS
Relative ROS level
6
4
2
0
L-asp
L-asp + CQ
sh-control
sh-p53

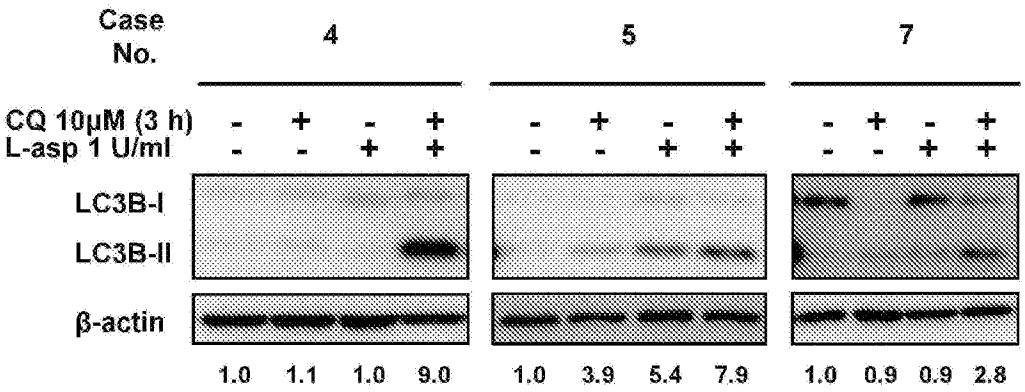
[図4-E]


sh-control
sh-p53
Annexin V+ cells (%)
50
40
30
20
10
0
**
cont
CQ
L-asp
L-asp+CQ
Non-treatment
CQ
L-asp
L-asp + CQ
sh-control + - + - + - + -
sh-p53 - + - + - + - +
p53
LC3B-I
LC3B-II
β-actin

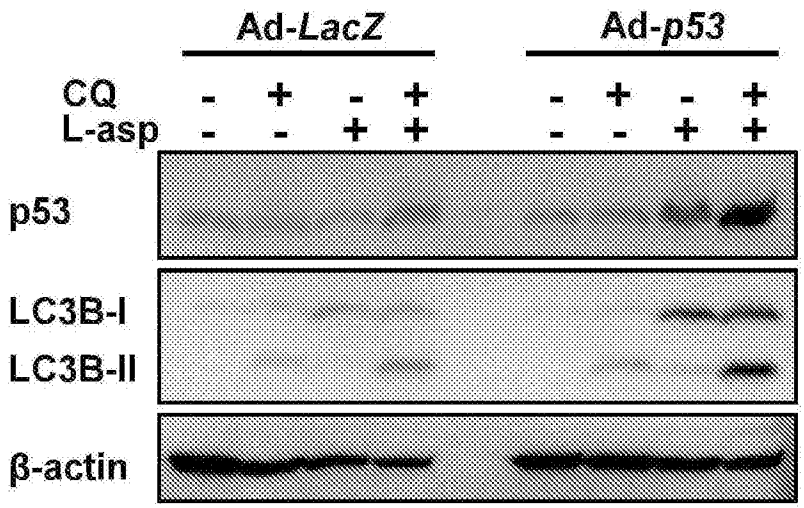
[図5-A]


L-asp
L-asp + CQ
Living Cells (% of control)
140
120
100
80
60
40
20
0
* * * * * * * * * * * * * NS
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
p53 wt
p53 mut
First diagnosis
Relapse

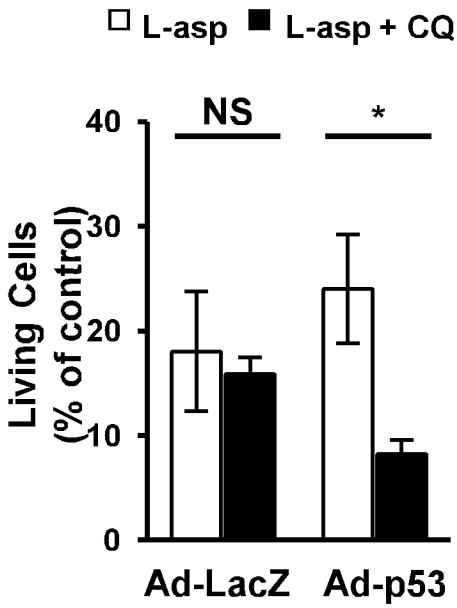
[図5-B]


Case No.
4
5
7
CQ 10μM (3 h)
L-asp 1 U/ml
LC3B-I
LC3B-II
β-actin
1.0 1.1 1.0 9.0
1.0 3.9 5.4 7.9
1.0 0.9 0.9 2.8

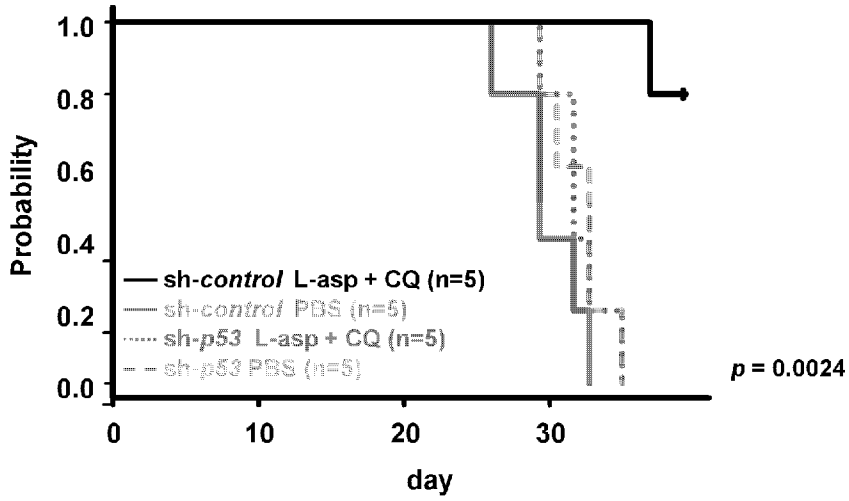
[図5-C]


Ad-LacZ
Ad-p53
CQ
L-asp
p53
LC3B-I
LC3B-II
β-actin

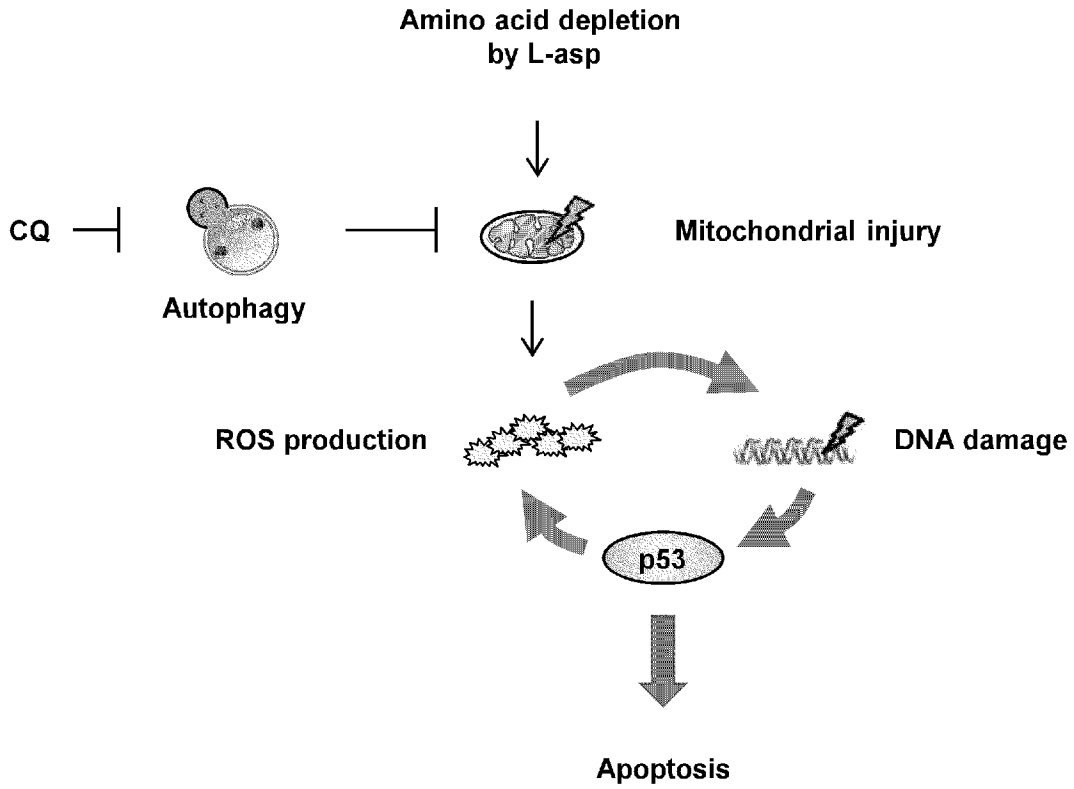
[図5-D]


L-asp
L-asp + CQ
NS
*
Living Cells (% of control)
40
30
20
10
0
Ad-LacZ
Ad-p53

[図5-E]


Probability
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
sh-control L-asp + CQ (n=5)
sh-control PBS (n=5)
sh-p53 L-asp + CQ (n=5)
sh-p53 PBS (n=5)
p = 0.0024
0
10
20
30
day

[図5-F]


Amino acid depletion
by L-asp
CQ
Autophagy
Mitochondrial injury
ROS production
DNA damage
p53
Apoptosis

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/087989

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/68(2006.01)i, *A61K31/351*(2006.01)i, *A61K31/47*(2006.01)i, *A61K31/52*(2006.01)i, *A61K31/5377*(2006.01)i, *A61K38/43*(2006.01)i, *A61K45/00*(2006.01)i, *A61P15/00*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i,
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q1/00-3/00, C12N15/00-15/90, A61K31/351, A61K31/47, A61K31/52, A61K31/5377, A61K38/43, A61K45/00, A61P15/00, A61P35/00, A61P35/02, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	SONG, Ping et al., Asparaginase induces apoptosis and cytoprotective autophagy in chronic myeloid leukemia cells, Oncotarget, 2015.01.08, Vol. 6, pp. 3861-3873, Abstract, page 3865, right column, line 1 to page 3867, left column, line 36, Figure 4	6-12 1-5,13-15
Y A	Hiroyoshi TAKAHASHI et al., "Kyusei Lymph-sei Hakketsubyo Saibo ni Oite Autophagy Sogai wa L-asparaginase ni yoru Apoptosis o Zokyo suru", the 60th Annual Meeting of the Japan Society of Human Genetics Program·Shorokushu, 14 October 2015 (14.10.2015), page 243, O-83, entire text	6-12 1-5,13-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 March 2017 (21.03.17)	28 March 2017 (28.03.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/087989

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	TAKAHASHI, Hiroyoshi et al., Autophagy Inhibition Sensitizes Acute Lymphoblastic Leukemia Cells to L-Asparaginase, Blood [online], 2015.12.03 [retrieved on 2017.03.17], Vol. 126, p. 3772, Retrieved from the Internet: <URL: http://www.bloodjournal.org/content/126/23/3772> entire text	6-12 1-5,13-15
Y A	WO 2013/051606 A1 (The University of Tokyo), 11 April 2013 (11.04.2013), paragraph [0049]; fig. 11 & US 2014/0322726 A1 paragraph [0093]; fig. 11 & EP 2772501 A1 & CN 104080810 A	6-12 1-5,13-15
Y A	HUTSON, Richard G. et al., Amino acid control of asparagine synthetase: relation to asparaginase resistance in human leukemia cells, Am. J. Physiol., 1997, Vol. 272, pp. C1691-C1699, page C1696, left column, line 10 to page C1697, left column, line 18, Fig. 5, Table 2	6-12 1-5,13-15
Y A	EHSANIPOUR, Ehsan A. et al., Adipocytes cause leukemia cell resistance to L-asparaginase via release of glutamine, Cancer Res., 2013, Vol. 73, pp. 2998-3006, page 3002, left column, lines 3 to 15, Fig. 3	6-12 1-5,13-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/087989

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

A61P35/02(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i, *C12N15/00*(2006.01)n

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０８７９８９

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/68(2006.01)i, A61K31/351(2006.01)i, A61K31/47(2006.01)i, A61K31/52(2006.01)i, A61K31/5377(2006.01)i, A61K38/43(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P15/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N15/00(2006.01)n

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/00-3/00, C12N15/00-15/90, A61K31/351, A61K31/47, A61K31/52, A61K31/5377, A61K38/43, A61K45/00, A61P15/00, A61P35/00, A61P35/02, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　１９７１－２０１７年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１７年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１７年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

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

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y A	SONG, Ping et al., Asparaginase induces apoptosis and cytoprotective autophagy in chronic myeloid leukemia cells, Oncotarget, 2015.01.08, Vol. 6, pp. 3861-3873 Ａｂｓｔｒａｃｔ、第３８６５頁右欄第１行－第３８６７頁左欄第３６行、Ｆｉｇｕｒｅ　４	6-12 1-5,13-15

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２１．０３．２０１７	２８．０３．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　５８０３
西　賢二
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y A	高橋寛吉　ほか，急性リンパ性白血病細胞においてオートファジー阻害はL-asparaginaseによるアポトーシスを増強する，日本人類遺伝学会第６０回大会　プログラム・抄録集，2015.10.14，p. 243；O-83 全文	6-12 1-5,13-15
Y A	TAKAHASHI, Hiroyoshi et al., Autophagy Inhibition Sensitizes Acute Lymphoblastic Leukemia Cells to L-Asparaginase, Blood [online], 2015.12.03 [retrieved on 2017.03.17], Vol. 126, p. 3772, Retrieved from the Internet: <URL: http://www.bloodjournal.org/content/126/23/3772> 全文	6-12 1-5,13-15
Y A	WO 2013/051606 A1（国立大学法人　東京大学）2013.04.11, 段落［００４９］、図１１ & US 2014/0322726 A1、段落［００９３］、Ｆｉｇｕｒｅ　１１ & EP 2772501 A1 & CN 104080810 A	6-12 1-5,13-15
Y A	HUTSON, Richard G. et al., Amino acid control of asparagine synthetase: relation to asparaginase resistance in human leukemia cells, Am. J. Physiol., 1997, Vol. 272, pp. C1691-C1699 第Ｃ１６９６頁左欄第１０頁－第Ｃ１６９７頁左欄第１８行、Ｆｉｇ．５、Ｔａｂｌｅ　２	6-12 1-5,13-15
Y A	EHSANIPOUR, Ehsan A. et al., Adipocytes cause leukemia cell resistance to L-asparaginase via release of glutamine, Cancer Res., 2013, Vol. 73, pp. 2998-3006 第３００２頁左欄第３－１５行、Ｆｉｇ．３	6-12 1-5,13-15