

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6023709号
(P6023709)

(45) 発行日 平成28年11月9日(2016.11.9)

(24) 登録日 平成28年10月14日(2016.10.14)

(51) Int.Cl.		F I
A 6 1 K 45/06	(2006.01)	A 6 1 K 45/06
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 31/713	(2006.01)	A 6 1 K 31/713
A 6 1 K 31/7088	(2006.01)	A 6 1 K 31/7088

請求項の数 8 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-521361 (P2013-521361)
 (86) (22) 出願日 平成23年6月21日(2011.6.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2011/064163
 (87) 国際公開番号 W02012/176282
 (87) 国際公開日 平成24年12月27日(2012.12.27)
 審査請求日 平成26年6月17日(2014.6.17)

特許法第30条第1項適用 発行者：第15回日本がん分子標的治療学会学術集會事務局 発行日：2011年5月31日 刊行物名：日本がん分子標的治療学会 第15回学術集會 がん分子標的治療薬の實力と未来 プログラム・抄録集、64頁

(73) 特許権者 000003964
 日東電工株式会社
 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号
 (74) 代理人 100135943
 弁理士 三橋 規樹
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (72) 発明者 新津 洋司郎
 北海道札幌市中央区北3条西30丁目2-1-901
 (72) 発明者 西野 裕樹
 北海道札幌市中央区北5条西18丁目9番地13 ジェルソミーナ北円山402号室

審査官 春田 由香

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アポトーシス誘導剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

G S T - を抑制する薬物と、オートファジーを抑制する薬物とを活性成分として含む、アポトーシスを誘導するための剤。

【請求項2】

オートファジーを抑制する薬物を活性成分として含む、G S T - が抑制された G S T - 発現細胞においてアポトーシスを誘導するための剤。

【請求項3】

変異型 K R A S を有する細胞においてアポトーシスを誘導するための、請求項1または2に記載の剤。

【請求項4】

活性成分が、RNA i 分子、リボザイム、アンチセンス核酸、DNA/RNA キメラポリヌクレオチドおよびこれらを発現するベクターからなる群から選択される、請求項1~3のいずれか一項に記載の剤。

【請求項5】

請求項1~4のいずれか一項に記載の剤を含む、医薬組成物。

【請求項6】

細胞の異常増殖に起因する疾患の治療用である、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項7】

K R A S の変異に起因する疾患の治療用である、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

がんの治療用である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、G S T - およびその抑制剤の新規な用途、新規なアポトーシス誘導剤、該アポトーシス誘導剤を含む医薬組成物およびアポトーシスの異常に伴う疾患の新規な治療方法に関する。

【背景技術】

【0002】

がんは人類が直面している最も重要かつ厄介な疾患の 1 つであり、その治療のために多大な研究努力がなされている。がんは、遺伝子の突然変異やエピジェネティックな異常などにより、細胞が無制御に増殖する疾患である。がんにおける遺伝子異常としてはすでに数多くのものが報告されており（例えば、Futreal et al., Nat Rev Cancer. 2004;4(3):177-83など）、その多くが、細胞の増殖、分化、生存に関するシグナル伝達に何らかの関連を有していると考えられている。また、かかる遺伝子異常により、正常な分子で構成される細胞内のシグナル伝達が異常を来し、これが特定のシグナルカスケードの活性化や不活性化をもたらし、最終的に細胞の異常増殖を引き起す一因となることもある。初期のがん治療は、細胞増殖自体の抑制に主眼がおかれていたが、かかる治療は生理的に正常に増殖する細胞の増殖をも抑制してしまうため、脱毛、消化器障害、骨髄抑制などの副作用を伴っていた。そこで、かかる副作用を抑えるため、がん特有の遺伝子異常や、シグナル伝達の異常を標的とした分子標的薬などの新たな発想に基づくがん治療薬の開発が進められている。

【0003】

がん特有の遺伝子異常として、K R A S (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral onco gene homolog) の異常がよく知られている。K R A S は、E G F R、P D G F R などのチロシンキナーゼ型受容体の下流に位置する低分子量 G T P 結合タンパク質（低分子量 G タンパク質ともいう）であり、これら受容体からの増殖や分化に関するシグナルを、下流の M A P K カスケードに伝える役割を担っている。正常な K R A S は、リガンドの結合により活性化された受容体のチロシンキナーゼ活性により G r b 2 および S O S を介して活性化され、R a f などの M A P K をリン酸化して M A P K カスケードを駆動させるが、変異型 K R A S は、受容体からの刺激がなくとも恒常的に活性化しており、増殖シグナルを伝達し続ける。このため、異常な細胞増殖が生じると考えられている。

【0004】

一方で、グルタチオン包含を触媒する酵素の 1 つであるグルタチオン - S - トランスフェラーゼ (G S T)、特に G S T - (glutathione S-transferase pi、G S T P 1 とともいう) の発現が、種々のがん細胞において増大しており、これが一部の抗がん剤に対する耐性の一因となっている可能性が指摘されている。実際、G S T - を過剰発現しており、薬物耐性を示すがん細胞系に、G S T - に対するアンチセンス D N A や G S T - 阻害剤を作用させると、薬剤耐性が抑制されることが知られている (Takahashi and Niitsu, Gan To Kagaku Ryoho. 1994;21(7):945-51、Ban et al., Cancer Res. 1996;56(15):3577-82、Nakajima et al., J Pharmacol Exp Ther. 2003;306(3):861-9)。さらに、最近の報告では、G S T - を過剰発現するアンドロゲン非依存性前立腺がん細胞系に G S T - に対する s i R N A を作用させるとその増殖が抑制され、アポトーシスが増大することが報告されている (Hokaiwado et al., Carcinogenesis. 2008;29(6):1134-8)。また、ヒト大腸がんにおいて、K R A S の変異が A P - 1 の活性化を介して G S T - の過剰発現を誘導すると考えられることも示唆されている (Miyaniishi et al., Gastroenterology. 2001;121(4):865-74)。

【0005】

しかしながら、G S T - と細胞増殖やアポトーシスとの関係、G S T - の分子機構

10

20

30

40

50

、種々の細胞内シグナル伝達におけるG S T - の役割などについては未だ殆ど明らかにされていない。細胞内のシグナル伝達は極めて複雑であり、1つの分子が複数の分子の作用に影響を与えたり、逆に1つの分子が複数の分子から影響を受けたりすることがあるうえ、ある分子の作用を抑えても、他のシグナルカスケードが活性化され、期待どおりの効果が得られないことがままある。したがって、より優れた分子標的薬の開発には、複雑に絡み合った細胞のシグナル伝達機構の解明が必要だが、長年の研究によってもそのごく一部が解明されているに過ぎず、さらなる研究努力が求められている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、G S T - またはその抑制剤の新たな用途、ならびに、細胞において効果的にアポトーシスを誘導するための組成物およびそれを用いる方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、G S T - の分子機構を解明すべく鋭意研究を続ける中で、G S T - の発現を阻害するとR a f - 1、M E KおよびE R Kの活性化が著しく阻害されることや、同様にGタンパク共役型受容体やチロシンキナーゼ型受容体の活性化により活性化されるP I 3 K (Phosphoinositide 3-kinase) シグナルカスケードにおいてもシグナル伝達の抑制が起こることを見出すとともに、G S T - の発現阻害によりアポトーシスが生じるが、これよりも急速にオートファジーが誘導されることも明らかにした。そして、さらに研究を続けた結果、G S T - を阻害すると同時にオートファジーを抑制することにより、細胞を高効率でアポトーシスへと誘導できることをさらに見出し、本発明を完成させるに至った。

【0008】

すなわち本発明は、以下に関する。

(1) G S T - を抑制する薬物と、オートファジーを抑制する薬物とを活性成分として含む、アポトーシスを誘導するための剤。

(2) オートファジーを抑制する薬物を活性成分として含む、G S T - が抑制された細胞においてアポトーシスを誘導するための剤。

(3) 変異型K R A Sを有する細胞においてアポトーシスを誘導するための、上記(1)または(2)に記載の剤。

(4) 活性成分が、R N A i分子、リボザイム、アンチセンス核酸、D N A / R N A キメラポリヌクレオチドおよびこれらを発現するベクターからなる群から選択される、上記(1)～(3)のいずれかに記載の剤。

【0009】

(5) 上記(1)～(4)のいずれかに記載の剤を含む、医薬組成物。

(6) 細胞の異常増殖に起因する疾患の治療用である、上記(5)に記載の医薬組成物。

(7) K R A Sの変異に起因する疾患の治療用である、上記(5)に記載の医薬組成物。

(8) がんの治療用である、上記(5)に記載の医薬組成物。

【0010】

(9) G S T - および/またはその機能的変異体を活性成分として含む、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードおよび/またはR A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードを促進するための剤。

(10) G S T - を抑制する薬物を活性成分として含む、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードおよび/またはR A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードを抑制するための剤。

【0011】

(11) G S T - および/またはその機能的変異体を活性成分として含む、ユビキチン化を抑制するための剤。

10

20

30

40

50

(12) GST- を抑制する薬物を活性成分として含む、ユビキチン化を促進するための剤。

(13) GST- および/またはその機能的変異体を活性成分として含む、オートファジーを抑制するための剤。

(14) GST- を抑制する薬物を活性成分として含む、オートファジーを促進するための剤。

【発明の効果】

【0012】

本発明のアポトーシス誘導剤は、従来のものと比較してより効果的にアポトーシスを誘導することができるため、医薬組成物としても効果が高い。特にがんの治療においては、がん細胞をアポトーシスにより死滅させることができるため、がんの進行を阻止するばかりでなく、がんを退縮させる効果も期待できる。また、従来の製剤よりも低い用量で、従来と同等の効果を発揮できるため、副作用の軽減も可能となる。

また、本発明により GST- の分子機構が明らかとなり、GST- やその抑制剤の新たな用途が見出された。これは、疾患の処置や、実験手法などに対する新たな選択肢を提供するものであり、医療、獣医療のみならず、生物学、生化学、分子生物学などにおける多大な貢献が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1のa)は、GST- siRNAによりGST- の発現が特異的に抑制されている様子を表すウェスタンブロットティングの結果である。図1のb)は、GST- siRNAのトランスフェクション後1~4日目における細胞数およびGST- の発現量の変化を示す図である。

【0014】

【図2】図2は、GST- siRNAトランスフェクション後2日目における、RAS/Raf/MAPKシグナルカスケードに關与するタンパク質の発現の様子を表すウェスタンブロットティングの結果である。GST- の発現抑制に伴い、Rafタンパク質の発現量が減少し、さらにMEKやERKなどのMAPKのリン酸化が抑制されているのがわかる。

【0015】

【図3】図3は、Rafタンパク質の免疫沈降実験の結果を示す。GST- siRNA処理群において、Rafタンパク質およびSer621リン酸化Rafタンパク質(p-Raf-1(S621))の発現が若干減少しており、逆にユビキチン化されたRafタンパク質が増加していることがわかる。

【0016】

【図4】図4は、GST- siRNAトランスフェクタントおよびScramble siRNAトランスフェクタントを、プロテアソーム阻害剤MG132およびネガティブコントロールであるDMSOで処理した際のRafタンパク質の存在量を比較した図である。GST- siRNAトランスフェクタントにおいて、プロテアソーム阻害剤で処理することにより、リン酸化Rafタンパク質(p-Raf-1(S338))の存在量の増加が観察されたが、Scramble siRNAにおいては変化が見られなかった。これはすなわちGST- の発現抑制により、リン酸化Rafタンパク質がプロテアソームによる分解を受けていることを示唆しており、図3におけるユビキチン化Rafタンパク質の増加とも整合する。

【0017】

【図5】図5は、Rafタンパク質とGST- との共免疫沈降実験の結果を表す。抗p-Raf-1抗体で沈降したタンパク質において抗GST- 抗体に対する反応が示されたことから、p-Raf-1とGST- が複合体を形成していることが示唆される。

【0018】

【図6】図6は、GST- ノックダウン細胞の免疫蛍光染色像を表す。上段は抗LC3

10

20

30

40

50

抗体による染色像であり、下段はD A P I染色像である。上段左からそれぞれトランスフェクション後1日目、2日目、3日目、下段左からそれぞれトランスフェクション後4日目、5日目の染色像である。図中矢印で示されている細胞においてオートファゴソームと考えられる点状シグナルが観察され、オートファジーが誘導されていると推測される。

【0019】

【図7】図7は、G S T - s i R N Aトランスフェクション後2日経過時点でのG S T - ノックダウン細胞の電子顕微鏡像を表す。左図において、Nは核を表し、四角で囲まれたAの部分の拡大像が右図である。右図においてMはミトコンドリアを表し、Lはリソソームを表す。矢印で示した部分において、ミトコンドリアを取り囲むようにオートファゴソームが形成されているのが観察される。

10

【0020】

【図8】図8は、抗L C 3抗体を用いた、G S T - ノックダウン(K D)細胞抽出液のウェスタンブロットの結果を表す。G S T - K D細胞(G S T - s i R N A)において、コントロール(Scramble s i R N A)と比較して顕著にL C 3の発現が増大しているのが観察される。特にI I型のL C 3(L C 3 - I I)が大きく増大していることから、オートファゴソームの誘導が推測される。

【0021】

【図9】図9は、T U N E L染色の結果を示す。上段はコントロール群の像であり、下段はG S T - K D細胞群の像である。左からそれぞれトランスフェクション後3日目、4日目、5日目の染色像を表す。G S T - K D細胞群においてT U N E L陽性細胞が観察された。

20

【0022】

【図10】図10は、G S T - K D細胞群とコントロール細胞群における、s i R N Aトランスフェクション後1~4日経過時点での、オートファジー陽性細胞およびアポトーシス陽性細胞の割合の経時変化を示したグラフ(上)および、G S T - K D細胞におけるG S T - の発現量を表す図(下)である。コントロール群ではオートファジーもアポトーシスも殆ど観察されていないのに対し、G S T - K D群では、2日目をピークとしてオートファジー陽性細胞がまず急増し、その後アポトーシスが誘導されていることが示されている。

【0023】

【図11】図11は、G S T - K D細胞における、E G F R / P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルに関与するタンパク質のウェスタンブロットの結果を示す。G S T - K D細胞群において、E G F R、P I 3 KおよびA k tのリン酸化が顕著に抑制されていることがわかる。

30

【0024】

【図12】図12は、G S T - K D細胞をプロテアソーム阻害剤M G 1 3 2で処理した場合のリン酸化E G F R(p - E G F R)の発現量の変化を表すウェスタンブロットの結果を表す。G S T - K D細胞におけるp - E G F Rの発現量低下がプロテアソーム阻害剤処理で回復したことから、p - E G F Rの発現量低下はプロテアソームによる分解に起因していることが推測された。

40

【0025】

【図13】図13は、抗p - E G F Rを用いて共免疫沈降したタンパク質をウェスタンブロットした結果である。抗G S T - 抗体においてシグナルが観察されたことから、p - E G F RとG S T - とが相互作用していることが推測された。

【0026】

【図14】図14は、G S T - 阻害剤C 1 6 C 2を用いた場合のR a fタンパク質およびE G F Rの発現レベルの変化を、阻害剤濃度に依存して観察した結果である。G S T - 阻害剤を用いた場合も、G S T - ノックダウンの場合と同じように、E G F RやR a fタンパク質のリン酸化が抑制されているのが観察された。

【0027】

50

【図15】図15は、GST- 阻害剤C16C2を添加した場合における、細胞数の変化を表すグラフである。GST- 阻害剤を添加した場合、細胞数が殆ど増加していないことがわかる。

【図16】図16は、Scramble siRNA処理群、GST- KD群およびGST- KD+3MA群における、オートファジー陽性細胞の割合を示すグラフである。GST- のノックダウンにより増大したオートファジーが、3-M Aによって抑制されていることがわかる。

【0028】

【図17】図17は、GST- KD細胞に3-M Aを添加した場合のTUNEL染色像を表す。上段が3-M Aを1mM添加した場合であり、下段が3-M Aを5mM添加した場合である。左からそれぞれトランスフェクション後2日目、3日目、4日目の染色像を表す。3-M Aの添加量が多い方が、アポトーシス細胞が多く観察された。

10

【0029】

【図18】図18は、コントロール細胞群(Scramble siRNA)、GST- KD細胞群(GST- siRNA)、GST- KD細胞+1mM 3-M A群(GST- siRNA+1mM 3-MA)およびGST- KD細胞+5mM 3-M A群(GST- siRNA+5mM 3-MA)における、アポトーシスの割合を経時的に観察した結果を表すグラフである。3-M Aの用量依存的にアポトーシスがさらに誘導されることがわかった。

【発明を実施するための形態】

【0030】

20

本発明は、GST- を抑制する薬物と、オートファジーを抑制する薬物とを活性成分として含む、アポトーシスを誘導するための剤または組成物(以下、「アポトーシス誘導剤」または「アポトーシス誘導組成物」ともいう)に関する。

本明細書で用いる場合、GST- は、GSTP1遺伝子によりコードされる、グルタチオン抱合を触媒する酵素を指す。GST- はヒトを含む種々の動物に存在し、その配列情報も公知である(例えば、ヒト:NP_000843(NM_000852)、ラット:NP_036709(NM_012577)、マウス:NP_038569(NM_013541)など。番号はNCBIデータベースのアクセッション番号を示し、括弧外はアミノ酸配列、括弧内は塩基配列の番号である)。

【0031】

生物個体間には、タンパク質の生理学的機能を損なわない遺伝子配列やアミノ酸配列の変異が生じる可能性があるため、本発明におけるGST- またはGSTP1遺伝子は、上記の公知配列と同一の配列を有するタンパク質や核酸に限定されず、同配列に対し1個または2個以上、典型的には1個または数個、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個または10個のアミノ酸または塩基が相違する配列を有するが、なお上記の公知のGST- と同等の機能を有するものを含み得る。GST- の具体的機能については、後述のとおりである。

30

【0032】

なお、本明細書において、「本明細書で用いる場合」、「本明細書で用いる」、「本明細書において」、「本明細書に記載される」等の句は、特に別記しない限り、これに引続く記載が本明細書に記載された全ての発明に適用されることを意味するものとする。また、他に定義されない限り、本明細書で用いる全ての技術用語および科学用語は、当業者が通常理解しているものと同じ意味を有する。本明細書中で参照する全ての特許、公報および他の出版物は、その全体を本明細書に援用する。

40

【0033】

本明細書で用いる「GST- を抑制する薬物」には、限定されずに、例えば、GST- の産生および/または活性を抑制する薬物や、GST- の分解および/または不活性化を促進する薬物などが含まれる。GST- の産生を抑制する薬物としては、これに限定するものではないが、例えばGST- をコードするDNAに対するRNAi分子、リボザイム、アンチセンス核酸、DNA/RNAキメラポリヌクレオチドおよびこれらを発現するベクター等が挙げられる。

50

【 0 0 3 4 】

G S T - の活性を抑制する薬物としては、これに限定するものではないが、例えば、G S T - に結合する物質、例えば、グルタチオン、グルタチオンアナログ（例えば、WO 95/08563、WO 96/40205、WO 99/54346、上記Nakajima et al.,2003等に記載のもの）、ケトプロフェン（上記Takahashi and Niitsu, 1994）、インドメタシン（Hall et al., Cancer Res. 1989;49(22):6265-8）、エタクリン酸、ピロプロスト（Tew et al., Cancer Res. 1988;48(13):3622-5）、抗G S T - 抗体、G S T - のドミナントネガティブ変異体等が挙げられる。これらの薬物は市販されているか、公知の技術に基づいて適宜製造することができる。

【 0 0 3 5 】

G S T - の産生または活性を抑制する薬物としては、特異性の高さや、副作用の可能性の低さから、G S T - をコードするDNAに対するRNA i分子、リボザイム、アンチセンス核酸、DNA/RNAキメラポリヌクレオチドおよびこれらを発現するベクターが好ましい。

【 0 0 3 6 】

G S T - の抑制は、G S T - 抑制剤を作用させなかった場合に比べ、細胞においてG S T - の発現や活性が抑制されていることにより決定することができる。G S T - の発現は、既知の任意の手法、限定されずに、例えば、抗G S T - 抗体を利用した免疫沈降法、E I A、E L I S A、I R A、I R M A、ウェスタンブロッティング法、免疫組織化学法、免疫細胞化学法、フローサイトメトリー法、G S T - をコードする核酸もしくはそのユニークな断片または該核酸の転写産物（例えば、mRNA）もしくはスプライシング産物に特異的にハイブリダイズする核酸を利用した、種々のハイブリダイゼーション法、ノーザンブロット法、サザンブロット法、種々のPCR法などにより評価することができる。

【 0 0 3 7 】

また、G S T - の活性は、G S T - の既知の活性、限定されずに、例えば、R a f - 1（特にリン酸化R a f - 1）や、E G F R（特にリン酸化E G F R）などのタンパク質との結合性を、既知の任意の方法、例えば、免疫沈降法、ウェスタンブロッティング法、質量分析法、プルダウン法、表面プラズモン共鳴（S P R）法などにより解析することによって評価することができる。

【 0 0 3 8 】

本明細書で用いる場合、RNA i分子は、RNA干渉をもたらす任意の分子を指し、限定されずに、s i R N A（small interfering RNA）、m i R N A（micro RNA）、s h R N A（short hairpin RNA）、d d R N A（DNA-directed RNA）、p i R N A（Piwi-interacting RNA）、r a s i R N A（repeat associated siRNA）などの二重鎖RNAおよびこれらの改変体などを含む。これらのRNA i分子は市販されているか、公知の配列情報などに基づいて設計、作製することが可能である。

また、本明細書で用いる場合、アンチセンス核酸は、RNA、DNA、PNA、またはこれらの複合物を含む。

本明細書で用いる場合、DNA/RNAキメラポリヌクレオチドは、限定されずに、例えば、特開2003-219893に記載の、標的遺伝子の発現を阻害するDNAとRNAとからなる2本鎖ポリヌクレオチドを含む。

【 0 0 3 9 】

本明細書で用いる場合、オートファジーは、マクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジー等を含み得るが、典型的にはマクロオートファジーを意味する。したがって、本発明における「オートファジー」なる用語は、特に別記しない限り「マクロオートファジー」を指すものとする。

オートファジーは「自食」とも呼ばれる細胞内タンパク質分解機構の一つであり、細胞内におけるタンパク質の分解、リサイクルを担っている。オートファジーは、酵母や哺乳動物を含む広範な生物種でみられ、概ね（a）PAS（phagophore assembly site）の形

10

20

30

40

50

成、(b) 分解すべきタンパク質を取り囲むファゴフォア(隔離膜)の伸長および拡大と、これによる、分解すべきタンパク質を内包するオートファゴソームの形成、(c) オートファゴソームとリソソームとの融合によるオートリソソームの形成、(d) オートリソソーム内でのタンパク質の分解を含む一連のプロセスを伴う。

【0040】

上記(a)~(c)のプロセスには特有のオートファジー関連因子が関与している。オートファジー関連因子は、当初酵母において研究がなされ、これまでにAtg1~27を始め数多くのものが同定されているが(Klionsky et al., Dev Cell. 2003;5(4):539-45)、哺乳動物における研究も進み、ホモログが複数同定され、オートファジーのコア分子機構も明らかになりつつある(Yang and Klionsky, Curr Opin Cell Biol. 2010;22(2):124-31)。

10

【0041】

哺乳動物におけるオートファジーのコア分子機構に関与するオートファジー関連因子としては、例えば、PASの形成に関与するVMP1、TP53INP2、mAtg9、ULK複合体(ULK1、ULK2、mAtg13、FIP200から構成)、PI3K複合体(Beclin1、hVps34、p150、Ambra1、Atg14Lから構成されるAtg14L複合体、および、Beclin1、hVps34、p150、Bif-1、UVRAGから構成されるUVRAG複合体)、ファゴフォアの伸長に関与するLC3-II、Atg12-Atg5-Atg16L複合体などが挙げられる。

【0042】

20

したがって、オートファジーを抑制する薬物としては、限定されずに、例えば、上記のものを含むオートファジー関連因子の産生および/または活性を抑制する薬物や、オートファジー関連因子の分解および/または不活性化を促進する薬物等が挙げられる。オートファジー関連因子の産生を抑制する薬物としては、オートファジー関連因子をコードするDNAに対するRNAi分子、リボザイム、アンチセンス核酸、DNA/RNAキメラポリヌクレオチドおよびこれらを発現するベクター等が挙げられる。

【0043】

オートファジー関連因子の活性を抑制する薬物としては、これに限定するものではないが、例えば、PI3Kの阻害剤(例えば、ワートマニン等)、特にクラスIIIP13Kの阻害剤(例えば、3-MA(3-メチルアデニン)等)、オートファゴソームとリソソームとの融合を阻害する物質(例えば、バフィロマイシンA1等)、オートリソソームにおけるタンパク質分解を阻害する物質(例えば、クロロキン、ロイペプチン等)、オートファジー関連因子に結合する物質(例えば、オートファジー関連因子に対する抗体など)、オートファジー関連因子のドミナントネガティブ変異体などが挙げられる。これらの薬物は市販されているか、公知の技術に基づいて適宜製造することができる。本発明の一態様において、オートファジーを抑制する薬物は、GST- および/またはその機能的変異体を含まない。

30

【0044】

オートファジーを抑制する薬物としては、特異性の高さや、副作用の低さから、オートファジー関連因子をコードするDNAに対するRNAi分子、リボザイム、アンチセンス核酸、DNA/RNAキメラポリヌクレオチドおよびこれらを発現するベクターが好ましい。

40

【0045】

オートファジーの抑制は、本発明のオートファジー抑制剤を作用させなかった場合に比べ、細胞においてオートファジーが抑制されていることにより決定することができる。オートファジーの抑制は、既知の任意の手法、限定されずに、例えば、電子顕微鏡法によるオートファゴソームの検出、オートファジーマーカー(例えば、Atg5、Atg12、LC3、特にLC3-IIなど)の検出などに基づいて評価することができる。LC3-IIは、限定されずに、例えば、LC3-IIに対する特異的抗体で検出してもよいし、試料を電気泳動などで分離した後、LC3-Iとは異なるバンドに分れたLC3-IIを

50

、LC3-I IまたはLC3-IとLC3-I Iの両方に反応する抗体を用いてウェスタンブロット法などにより検出することもできる。また、LC3-Iは細胞質内に散在する一方、LC3-I Iは隔離膜、オートファゴソーム、オートリソソームなどのオートファジー特有の構造に局在するため、LC3-I Iに反応する抗体(LC3-IとLC3-I Iの両方に反応する抗体を含む)による免疫染色等で顕在化する、これらの構造を示す点状シグナルの存在や数をオートファジーの指標としてもよい。

【0046】

GST- を抑制する薬物とオートファジーを抑制する薬物とは、単一の製剤に含まれていてもよいし、2個以上の製剤に別々に含まれていてもよい。後者の場合、各製剤は同時に投与されてもよいし、時間間隔をあけて投与されてもよい。時間間隔をあけて投与される場合、GST- を抑制する薬物を含む製剤を、オートファジーを抑制する薬物を含む製剤の前に投与してもよいし、後に投与してもよい。

10

【0047】

本発明はまた、オートファジーを抑制する薬物を活性成分として含む、GST- が抑制された細胞においてアポトーシスを誘導するための剤または組成物(以下、「アポトーシス誘導剤」または「アポトーシス誘導組成物」ともいう)に関する。

本明細書で用いる場合、「GST- が抑制された」とは、例えば、GST- が発現している細胞において、GST- が抑制されている状態を含む。かかる状態としては、例えば、GST- が発現している細胞に、GST- を抑制する薬物(例えば、上述のものなど)を投与した状態などが挙げられる。

20

ある細胞においてGST- が発現しているか否かは、文献学的に知られているか、または、細胞におけるGST- の発現を実際に検出することにより決定することができる。GST- の発現は、既に上述したものを含む、既知の任意の手法を用いて検出することができる。

【0048】

本発明の剤または組成物は、変異型KRASを有する細胞においてアポトーシスを誘導するためのものであってもよい。

本明細書で用いる場合、変異型KRASとしては、限定されずに、例えば、KRASの恒常的な活性化をもたらす変異を有するもの、例えば、内因性GTPaseを阻害する変異や、グアニンヌクレオチド交換速度を増大させる変異などを有するものが挙げられる。かかる変異の具体例としては、限定されずに、例えば、ヒトKRASにおける第12、13および/または61アミノ酸における変異(内因性GTPaseを阻害)や、ヒトKRASにおける第116および/または119アミノ酸における変異(グアニンヌクレオチド交換速度を増大)等が挙げられる(Bos, Cancer Res. 1989;49(17):4682-9, Levi et al., Cancer Res. 1991;51(13):3497-502)。したがって、本発明の一態様において、変異型KRASは、ヒトKRASにおける第12、13、61、116、119アミノ酸の少なくとも1つに変異を有するKRASが挙げられる。本発明の一態様において、変異型KRASは、ヒトKRASにおける第12アミノ酸に変異を有する。また、本発明の一態様において、変異型KRASは、GST- の過剰発現を誘導するものであってもよい。したがって、変異型KRASを有する細胞は、GST- の過剰発現を示してもよい。

30

40

【0049】

変異型KRASの検出は、既知の任意の手法を用いて行うことができる。かかる手法としては、限定されずに、例えば、既知の変異配列に特異的な核酸プローブによる選択的ハイブリダイゼーション、酵素ミスマッチ切断法、シーケンシング(上記Bos, 1989)、PCR-RFLP法(上記Miyaniishi et al., 2001)等が挙げられる。

また、GST- 発現の検出は、上述のものを含む既知の任意の手法を用いて行うことができる。GST- が過剰発現しているか否かは、例えば、変異型KRASを有する細胞におけるGST- の発現の程度と、正常なKRASを有する同種の細胞におけるGST- の発現の程度とを比較することなどにより評価することができる。この場合、変異型KRASを有する細胞におけるGST- の発現の程度が正常なKRASを有する同種

50

の細胞におけるG S T - の発現の程度を上回っていれば、G S T - が過剰発現しているということができる。

【 0 0 5 0 】

本発明の剤または組成物における活性成分の配合量は、剤または組成物が投与された場合に、アポトーシスが誘導される量であってもよい。また、投与による利益を超える悪影響が生じない量が好ましい。かかる量は公知であるか、培養細胞などを用いたin vitro試験や、マウス、ラット、イヌまたはブタなどのモデル動物における試験により適宜決定することができる。このような試験法は当業者によく知られている。アポトーシスの誘導は、種々の既知の手法、例えば、DNA断片化、アネキシンVの細胞膜への結合、ミトコンドリア膜電位の変化、カスパーゼの活性化などのアポトーシス特有の現象の検出や、TUNEL染色などにより評価することができる。活性成分の配合量は、剤や組成物の投薬態様によって変化し得る。例えば、1回の投与に複数の単位の組成物を用いる場合、組成物1単位に配合する有効成分の量は、1回の投与に必要な有効成分の量の複数分の1とすることができる。かかる配合量の調整は当業者が適宜行うことができる。

10

【 0 0 5 1 】

本発明はまた、G S T - を抑制する薬物と、オートファジーを抑制する薬物とを活性成分として配合することを含む、アポトーシスを誘導するための剤または組成物を製造する方法、G S T - を抑制する薬物およびオートファジーを抑制する薬物の、アポトーシスを誘導するための剤または組成物の製造への使用、アポトーシスの誘導に用いる、G S T - を抑制する薬物およびオートファジーを抑制する薬物の組み合わせ、ならびに、有効量のG S T - を抑制する薬物およびオートファジーを抑制する薬物を投与することを含む、アポトーシスを誘導する方法に関する。

20

【 0 0 5 2 】

本発明はまた、オートファジーを抑制する薬物を活性成分として配合することを含む、G S T - が抑制された細胞においてアポトーシスを誘導するための剤または組成物を製造する方法、オートファジーを抑制する薬物の、G S T - が抑制された細胞においてアポトーシスを誘導するための剤または組成物の製造への使用、G S T - が抑制された細胞におけるアポトーシスの誘導に用いるオートファジーを抑制する薬物、ならびに、有効量のオートファジーを抑制する薬物を投与することを含む、G S T - が抑制された細胞においてアポトーシスを誘導する方法に関する。

30

【 0 0 5 3 】

上記製造方法または使用における薬物やその配合量については、既に上述したとおりである。各薬物の配合は、既知の任意の手法に従って行うことができる。

上記アポトーシス誘導方法はいずれも、in vitroの方法であっても、in vivoの方法であってもよい。また、当該方法における薬物については既に上述したとおりであり、薬物の有効量は、投与した細胞においてアポトーシスが誘導される量であってもよい。また、投与による利益を超える悪影響が生じない量が好ましい。かかる量は公知であるか、培養細胞などを用いたin vitro試験などにより適宜決定することができる。このような試験法は当業者によく知られている。アポトーシスの誘導は、上述のものを含む種々の既知の手法により評価することができる。上記有効量は、薬物のある細胞集団に投与した場合に、必ずしも同細胞集団の全ての細胞にアポトーシスを誘導するものでなくともよい。例えば、上記有効量は、細胞集団における細胞の1%以上、2%以上、3%以上、4%以上、5%以上、6%以上、8%以上、10%以上、12%以上、15%以上、20%以上、さらには25%以上などにアポトーシスを誘導する量であってもよい。

40

【 0 0 5 4 】

本発明のアポトーシス誘導剤は、細胞増殖に異常がある細胞などにおいても効果的にアポトーシスを誘導できるものであり、医薬組成物の成分として有効である。したがって本発明の一つの側面には、本発明のアポトーシス誘導剤を含む医薬組成物が含まれる。

【 0 0 5 5 】

本発明の医薬組成物は、特にアポトーシスに異常を有する疾患を処置するのに有効であ

50

る。したがって、本発明の一態様は、上記アポトーシス誘導剤を含む、アポトーシスに異常を有する疾患を処置するための医薬組成物に関する。本明細書で用いる場合、アポトーシスに異常を有する疾患は、これに限定するものではないが、例えば細胞の異常増殖に起因する疾患、K R A Sの変異に起因する疾患、G S T - の過剰発現に起因する疾患などが含まれる。細胞の異常増殖に起因する疾患としては、限定されずに、例えば、良性または悪性腫瘍、過形成症、ケロイド、クッシング症候群、原発性アルドステロン症、紅板症、真性多血症、白板症、過形成癍痕、扁平苔癬および黒子症などを含む。K R A Sの変異に起因する疾患としては、限定されずに、例えば、良性または悪性腫瘍（がん、悪性新生物ともいう）などを含む。G S T - の過剰発現に起因する疾患としては、限定されずに、例えば、良性または悪性腫瘍、特に薬剤耐性（例えば、メルファラン、シクロホスファミドなどのアルキル化剤、アドリアマイシンなどのアントラサイクリン系抗腫瘍性抗生物質、シスプラチンなどの白金錯体、エトポシドなどに対して耐性）の悪性腫瘍などを含む。本発明の一態様において、アポトーシスに異常を有する疾患はがんである。

10

【0056】

本発明におけるがんとしては、限定されずに、例えば、線維肉腫、悪性線維性組織球腫、脂肪肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、血管肉腫、カポジ肉腫、リンパ管肉腫、滑膜肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫などの肉腫、脳腫瘍、頭頸部癌、乳癌、肺癌、食道癌、胃癌、十二指腸癌、虫垂癌、大腸癌、直腸癌、肝癌、膵癌、胆嚢癌、胆管癌、肛門癌、腎癌、尿管癌、膀胱癌、前立腺癌、陰茎癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、外陰癌、膣癌、皮膚癌などの癌腫、さらには白血病や悪性リンパ腫などが挙げられる。なお、本発明では、「がん」は、上皮性悪性腫瘍および非上皮性悪性腫瘍を含む。本発明におけるがんは、身体の任意の部位、例えば、脳、頭頸部、胸部、四肢、肺、心臓、胸腺、食道、胃、小腸（十二指腸、空腸、回腸）、大腸（結腸、盲腸、虫垂、直腸）、肝臓、膵臓、胆嚢、肛門、腎、尿管、膀胱、前立腺、陰茎、精巣、子宮、卵巣、外陰、膣、皮膚、横紋筋、平滑筋、滑膜、軟骨、骨、甲状腺、副腎、腹膜、腸間膜、骨髄、血液、血管系、リンパ節等のリンパ系、リンパ液などに存在し得る。

20

【0057】

本発明の一態様において、がんは、上記で定義した変異型K R A Sを有するがん細胞を含む。本発明の一態様において、がんは、ホルモンまたは成長因子非依存性の増殖を示すがん細胞を含む。本発明の一態様において、がんは、G S T - の過剰発現を示すがん細胞を含む。本発明の一態様において、がんは、薬剤耐性である。本発明の一態様において、がんは、メルファラン、シクロホスファミドなどのアルキル化剤、アドリアマイシンなどのアントラサイクリン系抗腫瘍性抗生物質、シスプラチンなどの白金錯体、エトポシドからなる群から選択される薬剤に対して耐性を有する。本発明の一態様において、がんは、メルファラン、シクロホスファミド、アドリアマイシン、シスプラチン、エトポシドからなる群から選択される薬剤に対して耐性を有する。

30

【0058】

本発明はまた、G S T - を抑制する薬物およびオートファジーを抑制する薬物とを活性成分としてを含む、アポトーシスに異常を有する疾患を処置する医薬組成物、G S T - を抑制する薬物およびオートファジーを抑制する薬物とを活性成分として配合することを含む、アポトーシスに異常を有する疾患を処置する医薬組成物の製造方法、G S T - を抑制する薬物およびオートファジーを抑制する薬物の、アポトーシスに異常を有する疾患を処置する医薬組成物を製造するための使用、アポトーシスに異常を有する疾患の処置に用いる、G S T - を抑制する薬物とオートファジーを抑制する薬物との組合せ、ならびに、前記医薬組成物の有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む、アポトーシスに異常を有する疾患を処置するための方法に関する。

40

上記製造方法または使用における薬物や配合量、アポトーシスに異常を有する疾患については、既に上述したとおりである。また、各薬物の配合は、既知の任意の手法に従って行うことができる。

【0059】

50

本発明者らは今回、G S T - が、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードの上流にあるチロシンキナーゼ型受容体、特にそのリン酸化形態、ならびに、R A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードの構成分子であるR a f、特にそのリン酸化形態とそれぞれ結合し、これらの分子のユビキチン化を阻止することにより、これらのシグナルカスケードを促進することを明らかにした。したがって、本発明はまた、G S T - および/またはその機能的変異体を活性成分として含む、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードおよび/またはR A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードを促進するための剤または組成物（「シグナルカスケード促進剤」または「シグナルカスケード促進組成物」ともいう）に関する。本発明の剤または組成物は特に、P I 3 K / A k t / m T O RシグナルカスケードおよびR A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードの両方を同時に促進することができる。

10

【 0 0 6 0 】

本明細書で用いる「G S T - の機能的変異体」としては、限定されることなく、例えば、(i) G S T - のアミノ酸配列に1個または2個以上、典型的には1個または数個の変異を有するが、なおG S T - と同等の機能を有する変異体、(i i) G S T - をコードする遺伝子の塩基配列を有する核酸もしくは同核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸の塩基配列に1個または2個以上、典型的には1個または数個の変異を有する核酸によりコードされ、かつG S T - と同等の機能を有する変異体、(i i i) G S T - をコードする遺伝子の塩基配列を有する核酸、同核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸もしくは(i i) の変異体をコードする核酸の相補鎖、またはその断片にストリン

ジェントな条件でハイブリダイズする核酸によりコードされ、かつ、G S T - と同等の機能を有する変異体、(i v) G S T - のアミノ酸配列と60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつ、G S T - と同等の機能を有する変異体、(v) G S T - をコードする遺伝子の塩基配列と60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の相同性を有する核酸によりコードされ、かつ、G S T - と同等の機能を有する変異体等が挙げられる。

20

【 0 0 6 1 】

G S T - のアミノ酸配列およびG S T - をコードする遺伝子の塩基配列は、上述のとおり各種動物において知られており、当業者はこれらの配列情報をもとに、上記機能的変異体を、既知の任意の手法、例えば、化学合成、制限酵素による核酸の切断または挿入、部位特異的変異導入、放射線もしくは紫外線の照射などにより適宜作製することができる。

30

【 0 0 6 2 】

ある変異体がG S T - と同等の機能を有するか否かは、G S T - の既知の機能、限定されずに、例えば、R a f - 1（特にリン酸化R a f - 1）や、E G F R（特にリン酸化E G F R）などのタンパク質との結合性などを、既知の任意の方法、例えば、免疫沈降法、ウェスタンブロットティング法、質量分析法、プルダウン法、表面プラズモン共鳴（S P R）法などにより解析し、適切な陰性対照や、陽性対照としてのG S T - と比較することによって評価することができる。例えば、ある変異体において、上記機能が陰性対照より優れている場合、例えば、10%以上、25%以上、50%以上、75%以上、さらには100%以上優れている場合、および/または、同機能がG S T - の1/100以上、1/50以上、1/25以上、1/10以上、1/5以上、さらには1/2以上である場合、この変異体をG S T - の機能的変異体に含める。

40

【 0 0 6 3 】

本明細書で用いる「ストリンジェントな条件」という用語は、当該技術分野において周知のパラメータであり、標準的なプロトコル集、例えばSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Press (2001)や、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992

50

)等に記載されている。

【0064】

本発明におけるストリンジェントな条件は、例えば、 65°C での、 $3.5 \times \text{SSC}$ (0.15 M 塩化ナトリウム/ 0.15 M クエン酸ナトリウム、 $\text{pH} 7$)、フィコール 0.02% 、ポリビニルピロリドン 0.02% 、ウシ血清アルブミン 0.02% 、 NaH_2PO_4 25 mM ($\text{pH} 7$)、 SDS 0.05% 、 EDTA 2 mM からなるハイブリダイゼーションバッファーによるハイブリダイゼーションを指す。ハイブリダイゼーション後、 DNA が移された膜は、 $2 \times \text{SSC}$ にて室温において、次いで $0.1 \sim 0.5 \times \text{SSC}$ / $0.1 \times \text{SDS}$ にて 68°C までの温度において洗浄する。あるいは、ストリンジェントなハイブリダイゼーションは、ExpressHyb^(R)Hybridization Solution (Clontech社)等の市販のハイブリダイゼーションバッファーを用いて、製造者によって記載されたハイブリダイゼーションおよび洗浄条件で行ってもよい。

10

【0065】

同程度のストリンジェンシーを生じる結果となる使用可能な他の条件、試薬等が存在するが、当業者はかかる条件に通じていると思われるため、これらについては、本明細書中に特段記載はしていない。しかしながら、 GST の変異体をコードしている核酸の明確な同定ができるよう、条件を操作することが可能である。

本発明における GST および/またはその機能的変異体は、タンパク質としての GST やその機能的変異体のほか、 GST をコードする核酸や、 GST の機能的変異体をコードする核酸をも含む。

20

【0066】

本明細書で用いる場合、「シグナルカスケード」は、複数のシグナル伝達分子が順々にシグナルを伝えていくシグナル伝達を意味する。例えば「 $\text{PI3K}/\text{Akt}/\text{mTOR}$ シグナルカスケード」の場合、まず PI3K が活性化され、それに起因して次に Akt が活性化され、さらにそれに起因して mTOR が活性化されるという具合にシグナルが伝達される。これは他のシグナルカスケードの表記においても同様である。シグナルの上流と下流の関係において、活性化の連鎖は直接的に起こっても間接的に起こってもよい。例えば PI3K に起因する Akt の活性化には、 PIP_3 (Phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate) や PDK1 (Phosphoinositide dependent protein kinase 1、 PDK1 ともいう) といった分子が介在していることが知られている。

30

【0067】

$\text{PI3K}/\text{Akt}/\text{mTOR}$ シグナルカスケードは、 PI3K の活性化により駆動するシグナルカスケードであり、細胞の生存などに関与するシグナルとして知られている。 PI3K の活性化は、これに限定するものではないが例えば G タンパク質共役型受容体やチロシンキナーゼ型受容体にリガンドが結合することにより起こり、活性化された PI3K はイノシトールリン脂質をリン酸化することで、例えば PIP_3 などのホスファチジルイノシトールを産生する。これが PH ドメインにおいて PDK1 や Akt と結合することで、これらのタンパク質の膜への局在化を促す。 PDK1 は PIP_3 と結合することで膜において活性化し、活性化された PDK1 は、 Akt の 308 番目の T をリン酸化する。 Akt の 473 番目のセリンは、 mTOR の複合体の一つである mTORC2 によってリン酸化され、この2箇所のアミノ酸のリン酸化により Akt は完全に活性化する。

40

【0068】

Akt が mTOR を活性化する経路についてはまだ完全に解明されたわけではないが、 PRAS40 (proline-rich Akt/PKB substrate 40 kDa) が関与していると考えられている。 PRAS40 はその名のとおり Akt の基質であり、 mTOR 複合体に結合してその活性化を抑制していると考えられている分子であり、 Akt が活性化されると PRAS40 がリン酸化され、それにより PRAS40 は mTOR 複合体から脱離して mTOR が活性化すると考えられている。そして mTOR が活性化すると、 ULK1 および ULK2 (unc-51-like kinase) ならびに mAtg13 (mammalian autophagy-related 13) をリン酸化し、オートファジーシグナルの始動を阻害することでオートファジーを抑制する。

50

【0069】

一方、RAS/Raf/MAPKシグナルカスケードは、細胞増殖などに関係するシグナルカスケードである。Gタンパク質共役型受容体やチロシンキナーゼ型受容体に、例えば成長因子などのリガンドが結合すると、低分子Gタンパク質であるKRASが活性化され、活性化されたKRASはRaf(MAPKKKの一種)をリン酸化して活性化する。活性化されたRafはMEK(MAPK/ERK kinase、MAP2Kの一種)を活性化し、活性化されたMEKはERK(Extracellular signal-regulated kinase、MAPKの一種)を活性化する。活性化されたERKは核内へと移行し、様々なmRNAの転写を促進することで細胞増殖の引き金となる。

【0070】

本発明において、シグナルカスケードを促進するとは、シグナルカスケードの活性化を高めることのみならず、シグナルカスケードの不活性化を抑制することも意味する。シグナルカスケードが促進されたか否かは、本発明の剤または組成物を作用させなかった場合に比べ、シグナルカスケードが活性化されていることにより決定することができる。シグナルカスケードの活性化は、限定されずに、例えば、シグナルカスケード構成分子の活性化(例えば、リン酸化など)や、シグナルカスケードの活性化によりもたらされる細胞現象、例えば、PI3K/Akt/mTORシグナルカスケードであれば、オートファジーの抑制など、RAS/Raf/MAPKシグナルカスケードであれば、細胞の増殖などを検出することにより評価することができる。

【0071】

本発明はまた、GST- および/またはその機能的変異体を配合する工程を含む、PI3K/Akt/mTORシグナルカスケードおよび/またはRAS/Raf/MAPKシグナルカスケードを促進するための剤または組成物の製造方法、GST- および/またはその機能的変異体の、PI3K/Akt/mTORシグナルカスケードおよび/またはRAS/Raf/MAPKシグナルカスケードを促進するための剤または組成物の製造への使用、PI3K/Akt/mTORシグナルカスケードおよび/またはRAS/Raf/MAPKシグナルカスケードの促進に用いる、GST- および/またはその機能的変異体、ならびに、有効量のGST- および/またはその機能的変異体を投与することを含む、PI3K/Akt/mTORシグナルカスケードおよび/またはRAS/Raf/MAPKシグナルカスケードを促進する方法にも関する。

【0072】

本発明のシグナルカスケードを促進するための剤または組成物は、PI3K/Akt/mTORシグナルカスケードおよび/またはRAS/Raf/MAPKシグナルカスケードの異常、特にこれらのシグナルカスケードの抑制に伴う疾患の処置に有用である。かかる疾患としては、限定されずに、例えば、これらのシグナルカスケードの構成分子の発現や活性の抑制および/または分解や不活性化の増大を伴う疾患(例えば、これらの分子の遺伝子異常や、GST- の発現や活性の抑制などによるもの)等が挙げられる。

【0073】

したがって、本発明はまた、GST- および/またはその機能的変異体を活性成分として含む、PI3K/Akt/mTORシグナルカスケードおよび/またはRAS/Raf/MAPKシグナルカスケードの抑制に伴う疾患の処置のための医薬組成物、GST- および/またはその機能的変異体を配合する工程を含む、PI3K/Akt/mTORシグナルカスケードおよび/またはRAS/Raf/MAPKシグナルカスケードの抑制に伴う疾患の処置のための医薬組成物の製造方法、GST- および/またはその機能的変異体の、PI3K/Akt/mTORシグナルカスケードおよび/またはRAS/Raf/MAPKシグナルカスケードの抑制に伴う疾患の処置のための医薬組成物の製造への使用、PI3K/Akt/mTORシグナルカスケードおよび/またはRAS/Raf/MAPKシグナルカスケードの抑制に伴う疾患の処置に用いる、GST- および/またはその機能的変異体、ならびに、有効量のGST- および/またはその機能的変異体を投与することを含む、PI3K/Akt/mTORシグナルカスケードおよび/またはRAS

10

20

30

40

50

S / R a f / M A P Kシグナルカスケードの抑制に伴う疾患を処置する方法にも関する。

【0074】

本発明はまた、G S T - を抑制する薬物を活性成分として含む、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードおよび/またはR A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードを抑制するための剤または組成物（「シグナルカスケード抑制剤」または「シグナルカスケード抑制組成物」ともいう）に関する。

本発明において、シグナルカスケードを抑制するとは、シグナルカスケードの不活性化を誘導することのみならず、シグナルカスケードの活性化を抑制することも意味する。シグナルカスケードが抑制されたか否かは、本発明の剤または組成物を作用させなかった場合に比べ、シグナルカスケードが抑制されていることにより決定することができる。シグナルカスケードの抑制は、限定されずに、例えば、シグナルカスケード構成分子の活性化（例えば、リン酸化など）の低減や、シグナルカスケードの抑制によりもたらされる細胞現象、例えば、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードであれば、オートファジーの増大など、R A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードであれば、細胞増殖の抑制などを検出することにより評価することができる。

10

【0075】

本発明はまた、G S T - を抑制する薬物を配合する工程を含む、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードおよび/またはR A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードを抑制するための剤または組成物の製造方法、G S T - を抑制する薬物の、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードおよび/またはR A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードを抑制するための剤または組成物の製造への使用、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードおよび/またはR A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードの抑制に用いる、G S T - を抑制する薬物、ならびに、有効量のG S T - を抑制する薬物を投与することを含む、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードおよび/またはR A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードを抑制する方法にも関する。

20

【0076】

本発明のシグナルカスケードを抑制するための剤または組成物は、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードおよび/またはR A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードの異常、特にこれらのシグナルカスケードの活性化に伴う疾患の処置に有用である。かかる疾患としては、限定されずに、例えば、これらのシグナルカスケードの構成分子の発現や活性の増大および/または分解や不活性化の抑制に伴う疾患（例えば、これらの分子の遺伝子異常や、G S T - の発現や活性の増大によるもの）、これらのシグナルカスケードの構成分子以外の因子（例えば、受容体型チロシンキナーゼの活性化など）によるシグナルカスケードの活性化に伴う疾患等が挙げられる。

30

【0077】

したがって、本発明はさらに、G S T - を抑制する薬物を活性成分として含む、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードおよび/またはR A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードの活性化に伴う疾患の処置のための医薬組成物、G S T - を抑制する薬物を配合する工程を含む、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードおよび/またはR A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードの活性化に伴う疾患の処置のための医薬組成物の製造方法、G S T - を抑制する薬物の、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードおよび/またはR A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードの活性化に伴う疾患の処置のための医薬組成物の製造への使用、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードおよび/またはR A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードの活性化に伴う疾患の処置に用いる、G S T - を抑制する薬物、ならびに、有効量のG S T - を抑制する薬物を投与することを含む、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードおよび/またはR A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードの活性化に伴う疾患を処置する方法にも関する。

40

【0078】

本発明はまた、G S T - および/またはその機能的変異体を活性成分として含む、ユ

50

ビキチン化を抑制するための剤または組成物（「ユビキチン化抑制剤」または「ユビキチン化抑制組成物」ともいう）に関する。

ユビキチン化は、タンパク質にユビキチンが結合されることを指し、細胞内で不要となったタンパク質を処理する過程に参与している。ユビキチン化されたタンパク質はプロテアソームにて分解される。

本発明の一態様において、ユビキチン化が抑制されるタンパク質は、G S T - が結合し得るタンパク質である。また、本発明の一態様において、ユビキチン化が抑制されるタンパク質は、R A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードを構成するタンパク質、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードを構成するタンパク質、および、チロシンキナーゼ型受容体からなる群から選択される。本発明の好ましい態様において、ユビキチン化が抑制されるタンパク質は、E G F RおよびR a f - 1、特にこれらのリン酸化形態からなる群から選択される。

10

【0079】

本発明において、ユビキチン化の抑制は、本発明の剤または組成物を作用させなかった場合に比べ、ユビキチン化が抑制されていることにより決定することができる。ユビキチン化の抑制は、既知の任意の手法、限定されずに、例えば、免疫沈降法、ウェスタンブロットティング法、質量分析法、ブルダウン法などにより評価することができる。

【0080】

本発明はまた、G S T - および/またはその機能的変異体を配合する工程を含む、ユビキチン化を抑制するための剤または組成物の製造方法、G S T - および/またはその機能的変異体の、ユビキチン化を抑制するための剤または組成物の製造への使用、ユビキチン化抑制に用いる、G S T - および/またはその機能的変異体、ならびに、有効量のG S T - および/またはその機能的変異体を投与することを含む、ユビキチン化を抑制する方法にも関する。

20

【0081】

本発明のユビキチン化を抑制するための剤または組成物は、ユビキチン化亢進に伴う疾患の処置に有用である。かかる疾患としては、限定されずに、例えば、ユビキチンリガーゼの発現や活性の増大および/または分解や不活性化の抑制を伴う疾患（例えば、ユビキチンリガーゼの遺伝子異常や、G S T - の発現や活性の抑制などによるもの）等が挙げられる。

30

【0082】

したがって、本発明はさらに、G S T - および/またはその機能的変異体を活性成分として含む、ユビキチン化亢進に伴う疾患の処置のための医薬組成物、G S T - および/またはその機能的変異体を配合する工程を含む、ユビキチン化亢進に伴う疾患の処置のための医薬組成物の製造方法、G S T - および/またはその機能的変異体の、ユビキチン化亢進に伴う疾患の処置のための医薬組成物の製造への使用、ユビキチン化亢進に伴う疾患の処置に用いるG S T - および/またはその機能的変異体、ならびに、有効量のG S T - および/またはその機能的変異体を投与することを含む、ユビキチン化亢進に伴う疾患を処置する方法にも関する。

【0083】

本発明はまた、G S T - を抑制する薬物を活性成分として含む、ユビキチン化を促進するための剤または組成物（「ユビキチン化促進剤」または「ユビキチン化促進組成物」ともいう）に関する。

40

本発明の一態様において、ユビキチン化が促進されるタンパク質は、G S T - が結合し得るタンパク質である。また、本発明の一態様において、ユビキチン化が促進されるタンパク質は、R A S / R a f / M A P Kシグナルカスケードを構成するタンパク質、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードを構成するタンパク質、および、チロシンキナーゼ型受容体からなる群から選択される。本発明の好ましい態様において、ユビキチン化が促進されるタンパク質は、E G F RおよびR a f - 1、特にこれらのリン酸化形態からなる群から選択される。

50

【0084】

本発明において、ユビキチン化の促進は、本発明の剤または組成物を作用させなかった場合に比べ、ユビキチン化が促進されていることにより決定することができる。ユビキチン化の促進は、既知の任意の手法、限定されずに、例えば、免疫沈降法、ウェスタンブロットティング法、質量分析法、ブルダウン法などにより評価することができる。

【0085】

本発明はまた、GST- を抑制する薬物を配合する工程を含む、ユビキチン化を促進するための剤または組成物の製造方法、GST- を抑制する薬物の、ユビキチン化を促進するための剤または組成物の製造への使用、ユビキチン化促進に用いるGST- を抑制する薬物、ならびに、有効量のGST- を抑制する薬物を投与することを含む、ユビキチン化を促進する方法にも関する。

10

【0086】

本発明のユビキチン化を促進するための剤または組成物は、ユビキチン化抑制に伴う疾患の処置に有用である。かかる疾患としては、限定されずに、例えば、ユビキチンリガーゼの発現や活性の抑制および/または分解や不活性化の増大に伴う疾患（例えば、ユビキチンリガーゼの遺伝子異常や、GST- の発現や活性の増大などによるもの）等が挙げられる。

【0087】

したがって、本発明はさらに、GST- を抑制する薬物を活性成分として含む、ユビキチン化抑制に伴う疾患の処置のための医薬組成物、GST- を抑制する薬物を配合する工程を含む、ユビキチン化抑制に伴う疾患の処置のための医薬組成物の製造方法、GST- を抑制する薬物の、ユビキチン化抑制に伴う疾患の処置のための医薬組成物の製造への使用、ユビキチン化抑制に伴う疾患の処置に用いる、GST- を抑制する薬物、ならびに、有効量のGST- を抑制する薬物を投与することを含む、ユビキチン化抑制に伴う疾患を処置する方法にも関する。

20

【0088】

本発明はまた、GST- および/またはその機能的変異体を活性成分として含む、オートファジーを抑制するための剤または組成物（「オートファジー抑制剤」または「オートファジー抑制組成物」ともいう）に関する。本発明者らは今回、GST- が、PI3K/Akt/mTORシグナルカスケードの上流にあるチロシンキナーゼ型受容体、特にそのリン酸化形態に結合し、そのユビキチン化を阻止することにより、同シグナルカスケードを促進することを明らかにしたが、PI3K/Akt/mTORシグナルカスケードの活性化は、オートファジーを抑制することが知られている（例えば、上記Yang and Klionsky, 2010）。

30

本発明において、オートファジーの抑制は、本発明の剤または組成物を作用させなかった場合に比べ、細胞においてオートファジーが抑制されていることにより決定することができる。オートファジーの評価手法については、上述のとおりである。

【0089】

本発明はさらに、GST- および/またはその機能的変異体を配合する工程を含む、オートファジーを抑制するための剤または組成物の製造方法、GST- および/またはその機能的変異体の、オートファジーを抑制するための剤または組成物の製造への使用、オートファジー抑制に用いるGST- および/またはその機能的変異体、ならびに、有効量のGST- および/またはその機能的変異体を投与することを含む、オートファジーを抑制する方法にも関する。

40

【0090】

本発明のオートファジーを抑制するための剤または組成物は、オートファジーの亢進に伴う疾患などの処置に有用である。かかる疾患としては、限定されずに、例えば、PI3K/Akt/mTORシグナルカスケードの抑制に伴う疾患（例えば、PI3K/Akt/mTORシグナルカスケード構成分子および/またはその上流にある分子の遺伝子異常や、GST- の発現や活性の抑制などによるもの）、ミオパシー、肝障害、再灌流障害

50

等が挙げられる。

【0091】

したがって、本発明はまた、G S T - および/またはその機能的変異体を活性成分として含む、オートファジーの亢進に伴う疾患を処置するための医薬組成物、G S T - および/またはその機能的変異体を配合する工程を含む、オートファジーの亢進に伴う疾患を処置するための医薬組成物の製造方法、G S T - および/またはその機能的変異体の、オートファジーの亢進に伴う疾患を処置するための医薬組成物の製造への使用、オートファジーの亢進に伴う疾患の処置に用いるG S T - および/またはその機能的変異体、ならびに、有効量のG S T - および/またはその機能的変異体を、それを必要とする対象に投与することを含む、オートファジーの亢進に伴う疾患を処置する方法にも関する。

10

【0092】

本発明者らはまた、G S T - を抑制することによりオートファジーが促進されることを今回明らかにした。したがって、本発明はまた、G S T - を抑制する薬物を活性成分として含む、オートファジーを促進するための剤または組成物(「オートファジー促進剤」または「オートファジー促進組成物」ともいう)に関する。本発明はさらに、G S T - を抑制する薬物を配合する工程を含む、オートファジーを促進するための剤または組成物の製造方法、G S T - を抑制する薬物の、オートファジーを促進するための剤または組成物の製造への使用、オートファジー促進に用いるG S T - を抑制する薬物ならびに、有効量のG S T - を抑制する薬物を投与することを含む、オートファジーを促進する方法にも関する。

20

【0093】

本発明のオートファジーを促進するための剤または組成物は、オートファジーの抑制に伴う疾患などの処置に有用である。かかる疾患としては、限定されずに、例えば、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケードの活性化に伴う疾患(例えば、P I 3 K / A k t / m T O Rシグナルカスケード構成分子および/またはその上流にある分子の遺伝子異常や、G S T - の発現や活性の増大などによるもの)、エイジング、虚血性疾患等が挙げられる。

【0094】

したがって、本発明はまた、G S T - を抑制する薬物を活性成分として含む、オートファジーの抑制に伴う疾患を処置するための医薬組成物、G S T - を抑制する薬物を配合する工程を含む、オートファジーの抑制に伴う疾患を処置するための医薬組成物の製造方法、G S T - を抑制する薬物の、オートファジーの抑制に伴う疾患を処置するための医薬組成物の製造への使用、オートファジーの抑制に伴う疾患の処置に用いるG S T - を抑制する薬物、ならびに、有効量のG S T - を抑制する薬物を、それを必要とする対象に投与することを含む、オートファジーの抑制に伴う疾患を処置する方法にも関する。

30

【0095】

シグナルカスケード、ユビキチン化またはオートファジーの抑制/促進に係る本発明の上記各種剤または組成物における活性成分の配合量は、当該剤または組成物が投与された場合に、所望の効果(すなわち、シグナルカスケード、ユビキチン化またはオートファジーの抑制/促進)を達成する量であってもよい。また、投与による利益を超える悪影響が生じない量が好ましい。かかる量は公知であるか、培養細胞などを用いたin vitro試験や、マウス、ラット、イヌまたはブタなどのモデル動物における試験により適宜決定することができ、このような試験法は当業者によく知られている。シグナルカスケード、ユビキチン化またはオートファジーの阻害/促進は、上述のものを含む、種々の既知の手法により評価することができる。活性成分の配合量は、剤や組成物の投薬態様によって変化し得る。例えば、1回の投与に複数の単位の組成物を用いる場合、組成物1単位に配合する有効成分の量は、1回の投与に必要な有効成分の量の複数分の1とすることができる。かかる配合量の調整は当業者が適宜行うことができる。

40

【0096】

シグナルカスケード、ユビキチン化またはオートファジーの抑制/促進に係る上記各種

50

剤または組成物の製造方法または使用における薬物やその配合量については、既に上述したとおりである。各薬物の配合は、既知の任意の手法に従って行うことができる。

【0097】

シグナルカスケード、ユビキチン化またはオートファジーの抑制/促進に係る上記各種方法はいずれも、*in vitro*の方法であっても、*in vivo*の方法であってもよい。また、上記方法における薬物の有効量は、投与した細胞において所望の効果（すなわち、シグナルカスケード、ユビキチン化またはオートファジーの抑制/促進）が達成される量であってもよい。また、投与による利益を超える悪影響が生じない量が好ましい。かかる量は公知であるか、培養細胞などを用いた*in vitro*試験などにより適宜決定することができ、このような試験法は当業者によく知られている。所望の効果の達成は、上述のものを含む種々の既知の手法により評価することができる。上記有効量は、薬物のある細胞集団に投与した場合に、必ずしも同細胞集団の全ての細胞に所望の効果を誘導するものでなくともよい。例えば、上記有効量は、細胞集団における細胞の1%以上、2%以上、3%以上、4%以上、5%以上、6%以上、8%以上、10%以上、12%以上、15%以上、20%以上、さらには25%以上などに所望の効果を誘導する量であってもよい。

10

【0098】

本明細書に記載される本発明の各種の剤や組成物、処置方法等における活性成分が核酸、例えば、RNA分子、リボザイム、アンチセンス核酸、DNA/RNAキメラポリヌクレオチドなどである場合、これらは、裸の核酸としてそのまま利用することもできるが、種々のベクターに担持させることもできる。ベクターとしては、プラスミドベクター、ファージベクター、ファージミドベクター、コスミドベクター、ウイルスベクター等の公知の任意のものを利用することができる。ベクターは、担持する核酸の発現を増強するプロモーターを少なくとも含んでいることが好ましく、この場合、該核酸は、かかるプロモーターと作動可能に連結されていることが好ましい。核酸がプロモーターに作動可能に連結されているとは、プロモーターの作用により、該核酸のコードするタンパク質が適切に産生されるように、該核酸とプロモーターとが配置されていることを意味する。ベクターは、宿主細胞内で複製可能であってもなくてもよく、また、遺伝子の転写は宿主細胞の核外で行われても、核内で行われてもよい。後者の場合、核酸は宿主細胞のゲノムに組み込まれてもよい。

20

【0099】

また、有効成分は、種々の非ウイルス性脂質またはタンパク質担体に担持させることもできる。かかる担体としては、限定されずに、例えば、コレステロール、リポソーム、抗体プロトマー、シクロデキストリンナノ粒子、融合ペプチド、アプタマー、生分解性ポリ乳酸コポリマー、ポリマーなどが挙げられ、細胞内への取込み効率を高めることができる（例えば、Pirollo and Chang, *Cancer Res.* 2008;68(5):1247-50などを参照）。特に、カチオン性リポソームやポリマー（例えば、ポリエチレンイミンなど）が有用である。かかる担体として有用なポリマーのさらなる例としては、例えば、US 2008/0207553、US 2008/0312174等に記載のものなどが挙げられる。

30

【0100】

本明細書に記載される本発明の各種医薬組成物においては、活性成分の効果を妨げない限り、活性成分を他の任意成分と組み合わせてもよい。そのような任意成分としては、例えば、他の化学治療剤、薬理的に許容される担体、賦形剤、希釈剤等が挙げられる。また、投与経路や薬物放出様式などに応じて、上記組成物を、適切な材料、例えば、腸溶性のコーティングや、時限崩壊性の材料で被覆してもよく、また、適切な薬物放出システムに組み込んでよい。

40

【0101】

本明細書に記載される本発明の各種剤および組成物（各種医薬組成物を含む）は、経口および非経口の両方を包含する種々の経路、例えば、限定することなく、経口、静脈内、筋肉内、皮下、局所、腫瘍内、直腸、動脈内、門脈内、心室内、経粘膜、経皮、鼻内、腹腔内、肺内および子宮内等の経路で投与してもよく、各投与経路に適した剤形に製剤して

50

もよい。かかる剤形および製剤方法は任意の公知のものを適宜採用することができる（例えば、標準薬剤学、渡辺喜照ら編、南江堂、2003年などを参照）。

例えば、経口投与に適した剤形としては、限定することなく、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、液剤、懸濁剤、乳剤、ゲル剤、シロップ剤などが挙げられ、また非経口投与に適した剤形としては、溶液性注射剤、懸濁性注射剤、乳濁性注射剤、用時調製型注射剤などの注射剤が挙げられる。非経口投与用製剤は、水性または非水性の等張性無菌溶液または懸濁液の形態であることができる。

【0102】

本明細書に記載される本発明の各種剤または組成物（各種医薬組成物を含む）は、特定の組織や細胞に標的化されていてもよい。標的化は、既知の任意の手法により達成することができる。がんへの送達を企図する場合は、限定されずに、例えば、製剤をEPR（enhanced permeability and retention）効果の発現に好適な直径50～200 μ m、特に75～150 μ mなどのサイズにすることによるパッシブターゲティングや、CD19、HER2、トランスフェリン受容体、葉酸受容体、VIP受容体、EGFR（Torchilin, AAPS J. 2007;9(2):E128-47）、RAAG10（特表2005-532050）、PIPA（特表2006-506071）、KID3（特表2007-529197）などのリガンドや、RGDモチーフやNGRモチーフを有するペプチド、F3、LyP-1（Ruoslahti et al., J Cell Biol. 2010;188(6):759-68）などを標的化剤として利用するアクティブターゲティングなどの手法を用いることができる。また、レチノイドががん細胞への標的化剤として有用であることも知られているため（WO 2008/120815）、レチノイドを標的化剤として含む担体を利用することもできる。かかる担体は、上記文献のほか、WO 2009/036368、WO 2010/014117などに記載されている。

【0103】

本明細書に記載される本発明の各種剤または組成物（各種医薬組成物を含む）はいずれの形態で供給されてもよいが、保存安定性の観点から、用時調製可能な形態、例えば、医療の現場あるいはその近傍において、医師および/または薬剤師、看護師、もしくはその他のパラメディカルなどによって調製され得る形態で提供してもよい。かかる形態は、本発明の剤または組成物が、脂質やタンパク質、核酸などの安定した保存が難しい成分を含むときに特に有用である。この場合、本発明の剤または組成物は、これらに必須の構成要素の少なくとも1つを含む1個または2個以上の容器として提供され、使用前、例えば、24時間前以内、好ましくは3時間前以内、そしてより好ましくは使用の直前に調製される。調製に際しては、調製する場所において通常入手可能な試薬、溶媒、調剤器具などを適宜使用することができる。

【0104】

したがって、本発明は、本発明の各種剤または組成物に含まれ得る活性成分を、単独でもしくは組み合わせて含む1個または2個以上の容器を含む組成物の調製キット、ならびに、そのようなキットの形で提供される各種剤または組成物の必要構成要素にも関する。本発明のキットは、上記のほか、本発明の各種剤または組成物の調製方法や投与方法などが記載された指示、例えば説明書や、CD、DVD等の電子記録媒体等を含んでいてもよい。また、本発明のキットは、本発明の各種剤または組成物を完成するための構成要素の全てを含んでいてもよいが、必ずしも全ての構成要素を含んでいなくてもよい。したがって、本発明のキットは、医療現場や、実験施設などで通常入手可能な試薬や溶媒、例えば、無菌水や、生理食塩水、ブドウ糖溶液などを含んでいなくてもよい。

【0105】

本明細書に記載される本発明の各種処置方法における有効量とは、例えば、疾患の症状を低減し、または疾患の進行を遅延もしくは停止する量であり、好ましくは、疾患を抑制し、または治癒する量である。また、投与による利益を超える悪影響が生じない量が好ましい。かかる量は、培養細胞などを用いたin vitro試験や、マウス、ラット、イヌまたはブタなどのモデル動物における試験により適宜決定することができ、このような試験法は当業者によく知られている。また、本発明の処置方法に用いる薬物の用量は当業者に公知

10

20

30

40

50

であるか、または、上記の試験等により適宜決定することができる。

【0106】

本明細書に記載される本発明の処置方法において投与する活性成分の具体的な用量は、処置を要する対象に関する種々の条件、例えば、症状の重篤度、対象の一般健康状態、年齢、体重、対象の性別、食事、投与の時期および頻度、併用している医薬、治療への反応性、剤形、および治療に対するコンプライアンスなどを考慮して決定され得る。

投与経路としては、経口および非経口の両方を包含する種々の経路、例えば、経口、静脈内、筋肉内、皮下、局所、腫瘍内、直腸、動脈内、門脈内、心室内、経粘膜、経皮、鼻内、腹腔内、肺内および子宮内等の経路が含まれる。

投与頻度は、用いる剤や組成物の性状や、上記のものを含む対象の条件によって異なるが、例えば、1日多数回（すなわち1日2、3、4回または5回以上）、1日1回、数日毎（すなわち2、3、4、5、6、7日毎など）、1週間毎、数週間毎（すなわち2、3、4週間毎など）であってよい。

10

【0107】

本明細書で用いる場合、用語「対象」は、任意の生物個体を意味し、好ましくは動物、さらに好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはヒトの個体である。本発明において、対象は健常であっても、何らかの疾患に罹患していてもよいものとするが、特定の疾患の処置が企図される場合には、典型的にはかかる疾患に罹患しているか、罹患するリスクを有する対象を意味する。

また、用語「処置」は、本明細書で用いる場合、疾患の治癒、一時的寛解または予防などを目的とする医学的に許容される全ての種類の予防的および/または治療的介入を包含するものとする。例えば、「処置」の用語は、疾患の進行の遅延または停止、病変の退縮または消失、発症の予防または再発の防止などを含む、種々の目的の医学的に許容される介入を包含する。

20

【実施例】

【0108】

以下に、本発明を例に基づいてさらに説明するが、かかる例は本発明の例示であり、本発明を限定するものではない。

【0109】

例1：GST - ノックアウトによるRAS/Raf/MAPKシグナルカスケードへの影響

30

(1)細胞培養

K-RAS変異陽性大腸癌細胞株M7609は、10%ウシ胎仔血清(FBS)を含むRPMI-1640培地で、37℃で5%CO₂を含む大気下で培養を行った。また、培地には抗生物質として100U/mLのペニシリン、100μg/mLのストレプトマイシンを加えた。

【0110】

(2)GST - siRNAのトランスフェクション

トランスフェクションの前日、M7609細胞を1×10⁶個/10mLとなるように抗生物質不含の10%FBS入りRPMI-1640培地を用いて100mm組織培養プラスチックディッシュに播種した。1mLのOpti-MEM I Reduced Serum Medium(GIBCO社)中にGST - siRNA(配列番号1:GGGAGCAAGACCUCAUUTT、siRNA ID#2385、Ambion社)を600pmol加え、穏やかに混合した。次に、Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen社)を1mLのOpti-MEM I Reduced Serum Medium中に35μLを希釈し、穏やかに混合した。希釈したGST - siRNAと希釈したLipofectamine RNAiMAXを合わせ、穏やかに混合した後、室温で10分間インキュベートした。この間、培地を10mLのOpti-MEM I Reduced Serum Mediumに交換した。10分間のインキュベーション後、GST - siRNAとLipofectamine RNAiMAXとの複合体を細胞に加え、37℃で5%CO₂を含む大気下でインキュベートした。5時間のインキュベーション後、10mLの抗生物質不含の10%FBS入りRPMI-1640培地に交換した。また、コントロ

40

50

ール実験として *Scramble siRNA* (配列番号 2 : CGAUUCGCUAGACCGGCUUCAUUG CAG、北海道システムサイエンス社) を用いて同様の操作を行った。GST-*siRNA* のトランスフェクション後それぞれ 1、2、3、4 日目において、細胞数を計測するとともに GST- のノックダウンを観察した。GST- のノックダウンは下記のようにウェスタンブロット法により解析した。

【0111】

(3) GST- ノックダウンのウェスタンブロット解析

GST-*siRNA* のトランスフェクション後の上記各時点において採取した細胞を用いて GST- ノックダウンのウェスタンブロット解析を行った。採取した細胞は血清不含培地で 16 時間培養した。細胞を冷 PBS で洗った後、冷 lysis buffer (1% NP-40、50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1 mM EDTA、complete Mini EDTA-free (Roche社)、PhosSTOP (Roche社)、pH 7.5) を加えて、氷冷、30 分間インキュベートして可溶化した。4、15000 rpm で 15 分間遠心分離を行い、細胞抽出液を得た。得られた細胞抽出液に対し、Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo SCIENTIFIC社) を用いてタンパク質の定量を行った GST-*siRNA* トランスフェクタント: 4.35 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、*Scramble siRNA* トランスフェクタント: 4.56 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。次に、20 μg の細胞抽出液を還元条件下で変性させ、マルチゲル I I ミニ 4/20 (13W) (コスモ・バイオ社) を用いて SDS-PAGE を行い、タンパク質を分離した。SDS-PAGE 終了後、タンク式ブロッティング装置を用いて、PVDF 膜に電氣的に転写した。転写膜を 5% スキムミルク/0.05% Tween20 添加 PBS (PBS-T と略す) で 4、16 時間でインキュベートしてブロッティングを行った。続いて、PBS-T で希釈した抗 GST- 抗体 (MBL社) と 4 で 16 時間反応させた。二次抗体反応は西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識したウサギ抗体を用いて室温で 1 時間行った。そして、化学発光基質と室温で 1 分間反応させた後、X 線フィルムを用いて化学発光を検出した。各操作の間の洗浄は、PBS-T を用いて 5 分間の振盪を 3 回行った。また、*siRNA* のトランスフェクション後、 1.0×10^5 個/5 mL になるように 60 mm 組織培養プラスチックディッシュに播種し、ディッシュ中の総細胞数を、ヘモサイトメーターを用いて 4 日目まで計測した。

【0112】

(4) RAS/Raf/MAPK シグナルカスケードに關与するタンパク質のウェスタンブロット解析

GST-*siRNA* のトランスフェクション後 2 日目に採取した細胞を用いて、RAS/Raf/MAPK シグナルカスケードに關与する主要タンパク質について、上記 (3) と同様にウェスタンブロット解析を行った。抗体として抗 GST- 抗体に加えて、抗 p-Raf-1 (Ser 338) 抗体 (MILLIPORE社)、抗 Raf-1 抗体 (Santa Cruz社)、抗 p-MEK1/2 (Ser 217/221) 抗体 (Cell Signaling社)、抗 MEK1/2 抗体 (Cell Signaling社)、抗 p-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204) 抗体 (Cell Signaling社)、抗 ERK 抗体 (Cell Signaling社)、抗 GAPDH 抗体 (Abcam社) を用いた。

【0113】

結果を図 1 および 2 に示す。図 1 a) では、GST- の発現が GST-*siRNA* によって抑制されるが、*Scramble siRNA* では抑制されないことが観察された。図 1 b) では、トランスフェクション後 4 日経過時点でも、依然として GST-*siRNA* によって安定的に GST- の発現が抑制されていたこと、さらには、GST- の発現を抑制した場合、抑制しない場合と比較して、4 日間培養後の細胞数が顕著に少ないことがわかった。また、図 2 から、GST-*siRNA* 処理群において、RAS/Raf/MAPK シグナルカスケードに關与するタンパク質のリン酸化が、いずれも、*Scramble siRNA* 処理群と比べて低下していることが明らかとなった。したがって、GST- の発現抑制によって、RAS/Raf/MAPK シグナルカスケードおよび細胞増殖異常が抑制されていることがわかる。

【0114】

例2：GST - ノックアウトによるユビキチン化への影響

(1) GST - ノックダウンによるRaf - 1のユビキチン化への影響

M7609細胞の培養およびGST - siRNAのトランスフェクションを、例1(1)~(2)の手順に従って行った。

例1(3)と同様に、siRNAのトランスフェクション後2日目から血清不含培地で16時間培養し、細胞抽出液を回収した。得られた細胞抽出液に対し、Micro BCA Protein Assay Kitを用いてタンパク質の定量を行った(Scramble siRNA: 8.88 µg/µL、GST - siRNA: 7.18 µg/mL)。0.5 µgの細胞抽出液をDynabeads Protein G (Invitrogen社)に結合した抗Raf - 1抗体と混合し、振とう機で穏やかに混合しながら4、2時間インキュベートしてRaf - 1タンパクを単離した後、抗ユビキチン抗体(Santa Cruz社)を用いて、例1(3)と同様にウェスタンブロット解析を行った。Raf - 1のプロテアソーム分解の阻害に参与するSer621のリン酸化修飾は、抗p - Raf - 1 (Ser621)抗体(MILLIPORE社)を用いて同様に調べた。

10

【0115】

(2) GST - ノックダウン下でのRaf - 1発現へのプロテアソーム阻害剤の影響

M7609細胞の培養およびGST - siRNAのトランスフェクションを、例1(1)~(2)の手順に従って行った。GST - siRNAのトランスフェクション後2日目から細胞を血清不含培地で16時間培養した。5 µM MG132で4時間処理した後、細胞抽出液を回収した。MG132処理のコントロールとして、0.05% DMSO処理を同様に行った。得られた細胞抽出液に対し、Micro BCA Protein Assay Kitを用いてタンパク質の定量を行った(Scramble siRNA - DMSO処理群: 3.36 µg/µL、Scramble siRNA - MG132処理群: 3.16 µg/µL、GST - siRNA - DMSO処理群: 3.12 µg/µL、GST - siRNA - MG132処理群: 3.16 µg/µL)。20 µgの細胞抽出液をSDS - PAGEに供した後、抗p - Raf - 1 (Ser338)抗体および抗Raf - 1抗体を用いて、例1(3)と同様にウェスタンブロット解析を行った。

20

【0116】

(3) p - Raf - 1とGST - の共免疫沈降

M7609細胞の培養を、例1(1)の手順に従って行った。続いて例1(2)の手順で得たGST - ノックダウン細胞を冷PBSで洗った後、冷共免疫沈降バッファ(0.5% NP - 40、50 mM HEPES、150 mM NaCl、1 mM EGTA、1.5 mM MgCl₂、complete Mini EDTA-free、PhosSTOP、pH 7.5)を加えて、氷冷、30分間インキュベートして可溶化した。4、15000 rpmで15分間遠心分離を行い、細胞抽出液を得た。得られた細胞抽出液に対し、Micro BCA Protein Assay Kitを用いてタンパク質の定量を行った(12.1 µg/µL)。1 mgの細胞抽出液をDynabeads Protein Gに結合した抗p - Raf - 1 (Ser338)抗体(US Biological社)と混合し、振とう機で穏やかに混合しながら4、16時間インキュベートして共免疫沈降した。続いて、抗GST - 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。

30

40

【0117】

結果を図3~5に示す。図3から、GST - siRNA処理群において、Raf - 1と共沈降したユビキチン量がScramble siRNA処理群と比べて多く、Raf - 1のユビキチン化が増強されていることが明らかとなった。また、図4から、GST - siRNAによるp - Raf - 1の発現低下に、プロテアソームが関与していること、図5から、GST - がp - Raf - 1と結合していることがそれぞれ示された。以上の結果は、GST - がp - Raf - 1と結合し、そのユビキチン化を阻害しており、GST - の抑制により、p - Raf - 1のユビキチン化が促進され、p - Raf - 1の存在量が減少することを示唆するものである。

【0118】

50

例3：GST - ノックダウンによるオートファジーおよびアポトーシス誘導の解析

(1) 免疫蛍光染色によるオートファジー誘導の解析

GST - ノックダウンによるオートファジーの誘導を、オートファジー特異的マーカータンパク質であるLC3の免疫蛍光染色により解析した。例1(2)の手順で得たGST - ノックダウン細胞を 1×10^5 個/2mLになるように35mm組織培養プラスチックディッシュに入れたカバースリップに播種した。培地をアスピレート後、4%パラフォルムアルデヒド添加PBSを加え、室温で10分間インキュベートして、細胞を固定した。細胞の浸透化は0.5%TritonX-100添加PBSを用いて氷上で5分間行った。冷PBSで10分間洗浄した後、1%BSA添加PBSで希釈した抗LC3B抗体(Invitrogen社)と湿式チャンバー内で37℃、1時間反応させた。二次抗体反応はAlexa Fluor488標識したウサギ抗体(Invitrogen社)を用いて37℃、1時間行った。ProlongGold antifade reagent with DAPIを用いてスライドガラス上にマウントし、4℃で16時間インキュベートした。抗体反応後の洗浄は、PBSを用いて37℃、5分間を3回行った。蛍光顕微鏡観察時におけるオートファジー陽性細胞は、細胞質に存在する点状のLC3シグナルを有する細胞とした。

10

【0119】

(2) ウェスタンブロットによるオートファジー誘導の解析

GST - ノックダウン細胞におけるオートファジーの誘導を、さらにLC3のウェスタンブロット解析により解析した。例1(2)の手順で得たGST - ノックダウン細胞を 1×10^5 個/2mLになるように35mm組織培養プラスチックディッシュに入れたカバースリップに播種した。所定の時間インキュベートした後、細胞抽出液を回収し、ウェスタンブロット解析に供した。一次抗体として、抗LC3B抗体(SIGMA社)を用いて、転写膜と4℃、16時間反応させた。LC3分子の検出は、HRP標識二次抗体と反応させた後、化学発光試薬を用いて行った。オートファジーが誘導されているかどうかは、LC3のI型(18kDa)とII型(16kDa)への移行で評価した。

20

【0120】

(3) 電子顕微鏡観察によるオートファジー誘導の解析

例1(2)におけるsiRNAトランスフェクション後1日目に細胞を 0.4×10^5 個/0.5mLになるように8ウェル組織培養用カルチャースライドに播種した。2.5%グルタルアルデヒドを含む0.1Mカコジル酸バッファ(pH7.4)で1時間固定し、0.1Mカコジル酸バッファでリンスした後、1%OsO₄と1.5%フェロシアン化カリウムで2時間、後固定した。エタノールで10分間、3回脱水した後、エポキシ樹脂(TAAB Laboratories Equipment社)で包埋した。超薄切片はダイヤモンドナイフで作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色を行い、切片を電子顕微鏡(日立透過電子顕微鏡H-7500、日立ハイテクノロジーズ社)で観察した。

30

【0121】

(4) TUNEL染色によるアポトーシス誘導の解析

TUNEL法はIn Situ Cell Death Detection Kit, POD(Roche)を用いて以下のとおりに行った。例1(2)の手順で得たGST - ノックダウン細胞を 1×10^5 個/2mLになるように35mm組織培養プラスチックディッシュに入れたカバースリップに播種した。培地をアスピレート後、4%パラフォルムアルデヒド添加PBSを加え、室温で60分間インキュベートして細胞を固定した。内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行うため、3%H₂O₂添加メタノールで室温、10分間インキュベートした。続いて、0.1%TritonX-100添加0.1%クエン酸ナトリウムで氷上、2分間処理し、細胞の浸透化を行った。TUNEL反応は湿式チャンバー内で37℃、60分間で行った。TUNEL陽性細胞の検出は、ペルオキシターゼ標識抗フルオレセイン抗体を37℃で30分間反応させた後、DAB基質を用いた発色反応により行った。ヘマトキシリンでカウンター染色を行い、光学顕微鏡下で染色細胞を観察し、TUNEL陽性細胞をアポトーシス細胞と評価した。各操作の間の洗浄は、PBSによるリンスで行った。

40

【0122】

50

結果を図6～10に示す。図6は抗LC3抗体での免疫蛍光染色像であり、矢印で示した細胞において、LC3を示す点状のシグナルが観察された。このLC3の点状シグナルはオートファゴソームであると推測される。GST-ノックダウン細胞においてオートファジーが誘導されていることがわかる。

図7は、GST-siRNAトランスフェクション後2日経過時点での、GST-KD細胞の電子顕微鏡観察像である。左図において四角で囲まれたAの部分の拡大像が右図である。右図において、矢印で示された部分には、ミトコンドリアを取り囲むようにオートファゴソームが形成されているのが確認できる。

【0123】

図8は、LC3のウェスタンブロットの結果を示す。抗LC3抗体によって認識されるLC3タンパク質には2つの型が存在する。オートファジーが起こり、LC3が脂質二重膜に取り込まれると、LC3はI型からII型へと変化する。したがってLC3-II型の検出量の変化により、オートファジーが誘導されているかどうかを確認できる。図8の結果から、GST-siRNA処理群においてLC3がI型もII型ともに発現誘導され、特にII型の顕著な増加が確認される一方、Scramble siRNA処理群では、I型、II型ともに発現が低く、I型の方がII型に比べ発現量が低いことがわかる。

これらの結果から、GST-の発現を抑制することにより、オートファジーが誘導されていることがわかる。

【0124】

図9は、TUNEL染色の結果を示す。上段はScramble siRNA処理群の像であり、下段はGST-siRNA処理群の像であるが、GST-をノックダウンした細胞において、TUNEL陽性細胞、すなわちアポトーシスが観察された。

図10は、GST-siRNA処理群とScramble siRNA処理群におけるオートファジー陽性細胞およびアポトーシス陽性細胞の割合の経時変化を示したグラフである。なお、オートファジー陽性細胞の割合は、上記(1)の抗LC3抗体による免疫蛍光染色実験における、細胞500個に対する、点状のLC3シグナルを有する細胞の割合を、アポトーシス陽性細胞の割合は、上記(4)のTUNEL染色実験における、細胞1000個に対する、TUNEL陽性細胞の割合を、それぞれ示す。これによると、オートファジー陽性細胞の割合は処理後急激に増加し、2日目でピークをつけ、その後下降するのに対し、アポトーシス陽性細胞の割合は、4日目まで徐々にだが継続的に増加していることがわかる。

【0125】

例4：GST-ノックアウトによるEGFR/PI3K/Akt/mTORシグナルカスケードへの影響

(1) EGFR/PI3K/Akt/mTORシグナルのウェスタンブロット解析

一次抗体として抗p-EGFR(Tyr1068)抗体(Cell Signaling社)、抗EGFR抗体(Santa Cruz社)、抗p-PI3K p85(Tyr458)/p55(Tyr199)抗体(Cell Signaling社)、抗PI3K、p85抗体(MILLIPORE社)、抗p-Akt(Ser473)抗体(Cell Signaling社)、抗Akt抗体(Cell Signaling社)、抗p-p70S6K(Thr389)抗体(Cell Signaling社)、抗p-p70S6K(Thr421/Ser424)抗体(Cell Signaling社)、抗p70S6K抗体(Cell Signaling社)を用いた以外は、例1(1)、(2)、(4)と同様にして、EGFR/PI3K/Akt/mTORシグナルカスケードを構成する各タンパク質の発現を解析した。

【0126】

(2) GST-ノックアウト下でのp-EGFR発現へのプロテアソーム阻害剤の影響

M7609細胞の培養およびGST-siRNAのトランスフェクションを、例1(1)～(2)の手順に従って行った。GST-siRNAのトランスフェクション後2日目、細胞を血清不含培地で16時間培養した。5μM MG132で2時間処理し

10

20

30

40

50

た後、細胞抽出液を回収した。MG132処理のコントロールとして0.05% DMSO処理を同様に行った。得られた細胞抽出液に対し、Micro BCA Protein Assay Kitを用いてタンパク質の定量を行った(Scramble siRNA-DMSO処理群: 11.98 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、Scramble siRNA-MG132処理群: 12.29 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、GST-siRNA-DMSO処理群: 8.91 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、GST-siRNA-MG132処理群: 9.24 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。80 μg の細胞抽出液をSDS-PAGEに供した後、抗p-EGFR(Tyr1068)抗体および抗EGFR抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

【0127】

(3) p-EGFRとGST- の共免疫沈降

M7609細胞の培養を、例1(1)の手順に従って行った。続いて細胞を冷PBSで洗った後、冷共免疫沈降バッファ(1.0% Triton X-100、50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、complete Mini EDTA-free、PhosSTOP、pH 7.5)を加えて、氷冷、30分間インキュベートして可溶化した。4、12000 rpmで10分間遠心分離を行い、細胞抽出液を得た。得られた細胞抽出液に対し、Micro BCA Protein Assay Kitを用いてタンパク質の定量を行った(9.08 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。1 mgの細胞抽出液をDynabeads Protein Gに結合した抗p-EGFR(Tyr1068)抗体(Calbiochem社)と混合し、振とう機で穏やかに混合しながら4、16時間インキュベートして共免疫沈降を行った。続いて、抗GST- 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

【0128】

結果を図11~13に示す。図11から、GST-siRNA処理群において、EGFR/PI3K/Akt/mTORシグナルカスケードを構成する各タンパク質のリン酸化が、Scramble siRNA処理群と比べ減少していること、図12から、GST-siRNAによるp-EGFRの発現低下に、プロテアソームが関与していること、そして図13から、GST- がp-EGFRと結合していることがそれぞれ示された。以上の結果は、GST- がp-EGFRと結合し、その安定化に寄与しており、GST- の抑制により、p-EGFRのコピキチン化が促進され、p-EGFRの存在量が減少することを示唆するものである。

【0129】

例5: GST- 阻害剤による細胞増殖等への影響

(1) GST- 阻害剤によるEGFRおよびRaf-1のリン酸化への影響

M7609細胞の培養を、例1(1)の手順に従って行った。細胞を 4.0×10^5 個/5 mLとなるように60 mm組織培養プラスチックディッシュに播種した。GST-阻害剤C16C2(帝人ファーマ社に依頼して作製)を10、50、100 μM になるように加え、24時間後に細胞抽出液を回収した。得られた細胞抽出液に対し、Micro BCA Protein Assay Kitを用いてタンパク質の定量を行った(非処理: 8.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、10 μL : 8.49 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、50 μM : 7.68 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、100 μM : 6.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。50 μg の細胞抽出液をSDS-PAGEに供した後、各タンパク質の発現をウェスタンブロット法により解析した。

【0130】

(2) GST- 阻害剤による細胞増殖等への影響

M7609細胞の培養を、例1(1)の手順に従って行った。細胞を 1.0×10^5 個/5 mLとなるように60 mm組織培養プラスチックディッシュに播種した。16時間後、GST-阻害剤を50 μM になるように加えた。ディッシュ中の総細胞数はヘモサイトメーターを用いて2日目まで計測した。GST-阻害剤のコントロールとして、0.05% DMSO処理を行った。

【0131】

結果を図14および15に示す。これらの結果から、GST-阻害剤によってもGST-ノックダウンと同様に、EGFRおよびRaf-1のリン酸化(図14)ならびに

10

20

30

40

50

細胞増殖 (図 1 5) が抑制されることが明らかとなった。

【 0 1 3 2 】

例 6 : G S T - ノックダウン細胞のオートファジー阻害剤による影響

(1) 細胞培養

例 1 (2) の手順に従って G S T - s i R N A のトランスフェクションを行った後、抗生物質不含の培地に交換し、3 時間インキュベートした。細胞を 3 5 m m 組織培養プラスチックディッシュに入れたカバースリップに播種し、オートファジー阻害剤 3 - メチルアデニン (3 - M A 、 S I G M A 社) を 1 および 5 m M になるように培地に加えた後、所定の時間培養した。

(2) オートファジー陽性細胞の評価

例 3 (1) と同様に、(1) で培養した細胞を抗 L C 3 抗体で免疫蛍光染色した。

(3) T U N E L 染色

例 3 (4) と同様に、(1) で培養した細胞を T U N E L 染色した。

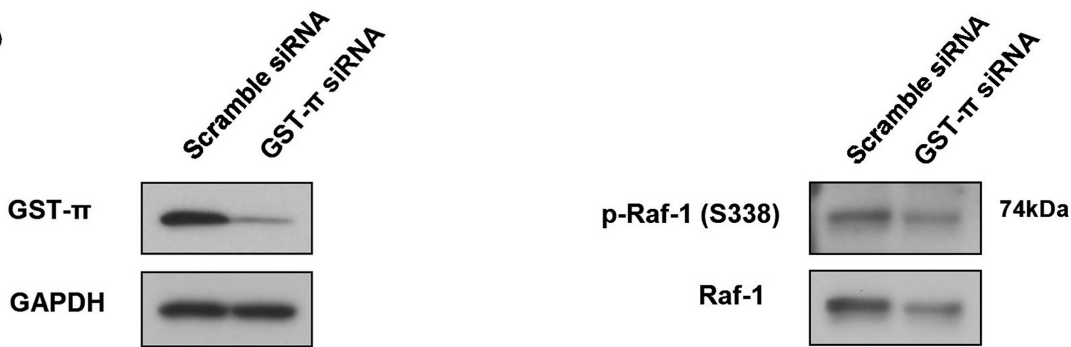
【 0 1 3 3 】

結果を図 1 6 ~ 1 8 に示す。図 1 6 は、各群における細胞 1 0 0 0 個に対するオートファジー陽性細胞の割合を示すが、オートファジー阻害剤によりオートファジー陽性細胞の割合が顕著に減少したことがわかる。図 1 7 は、上段が G S T - s i R N A + 1 m M 3 - M A 処理群、下段が G S T - s i R N A + 5 m M 3 - M A 処理群を示す。図 9 および図 1 7 から、オートファジー阻害剤の併用により、アポトーシス陽性細胞が顕著に増加することがわかる。図 1 8 は、オートファジー阻害剤の用量依存的にアポトーシスがさらに誘導されることを示すグラフである。G S T - s i R N A の添加によってアポトーシスが誘導されたが、オートファジー阻害剤である 3 - M A をさらに追加した場合、3 - M A の追加用量に依存してさらなるアポトーシスが誘導された。したがって、G S T - を抑制する薬物とオートファジーを抑制する薬物とを組み合わせることにより、より効率的にアポトーシスを誘導できることが明らかとなった。

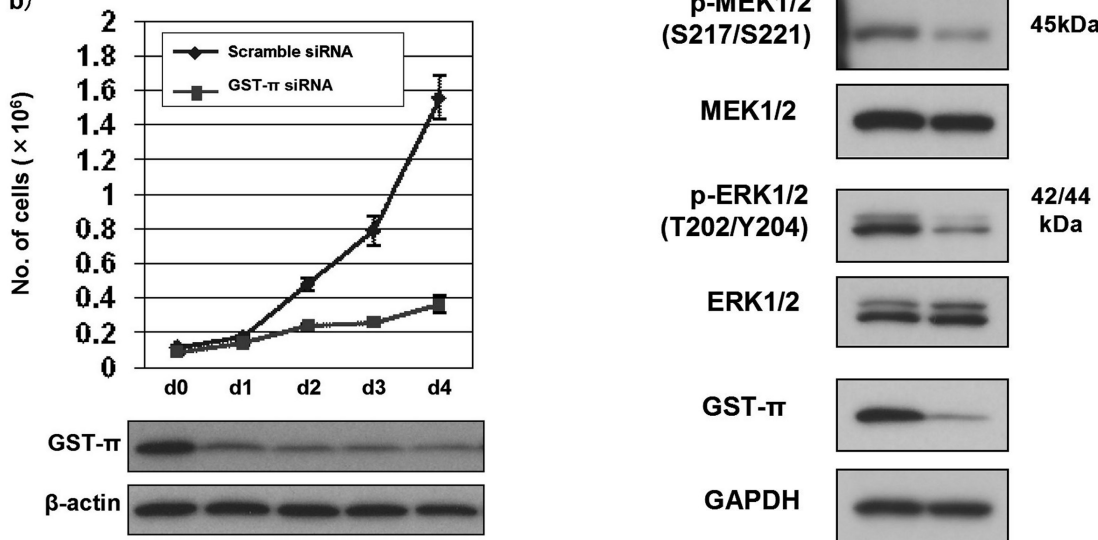
【 図 1 】

【 図 2 】

a)



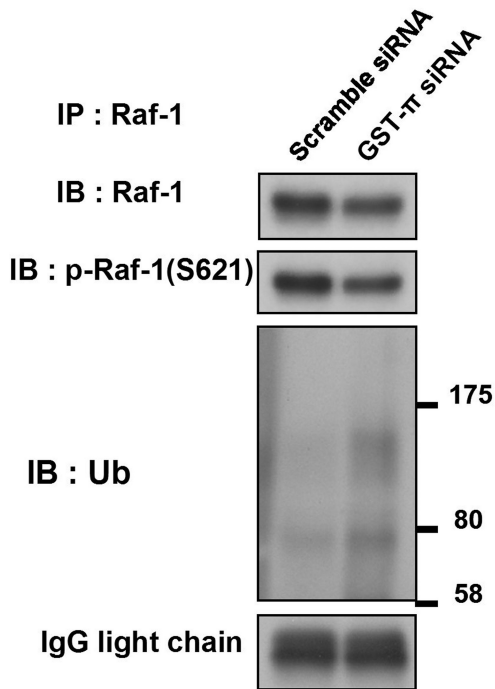
b)



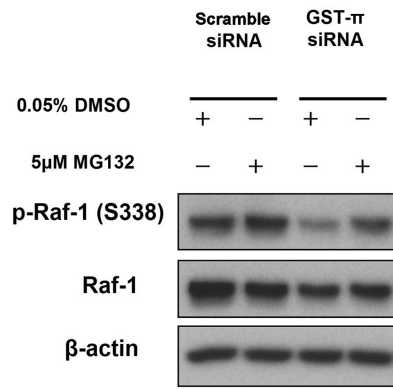
10

20

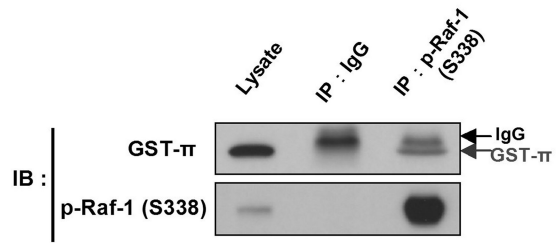
【 図 3 】



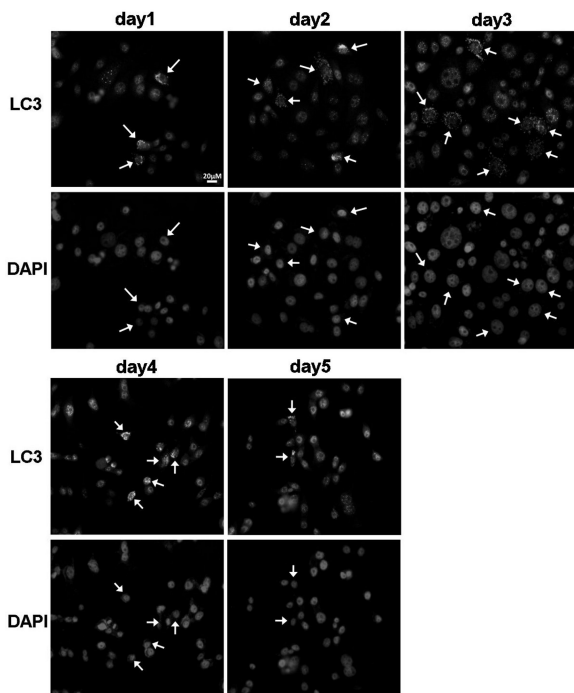
【 図 4 】



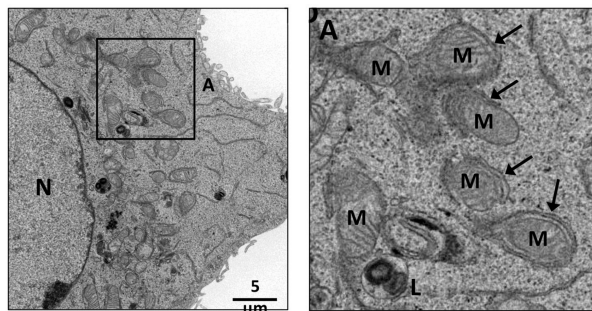
【 図 5 】



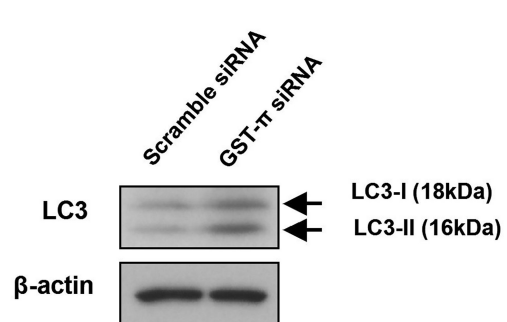
【 図 6 】



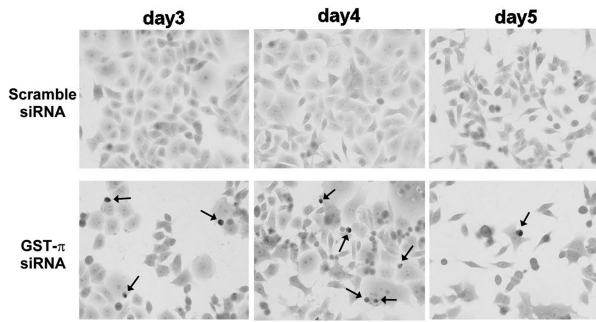
【 図 7 】



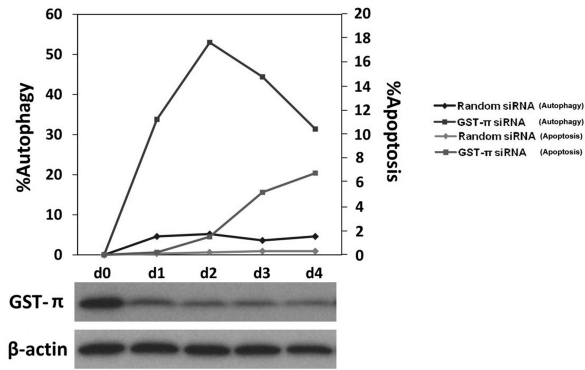
【 図 8 】



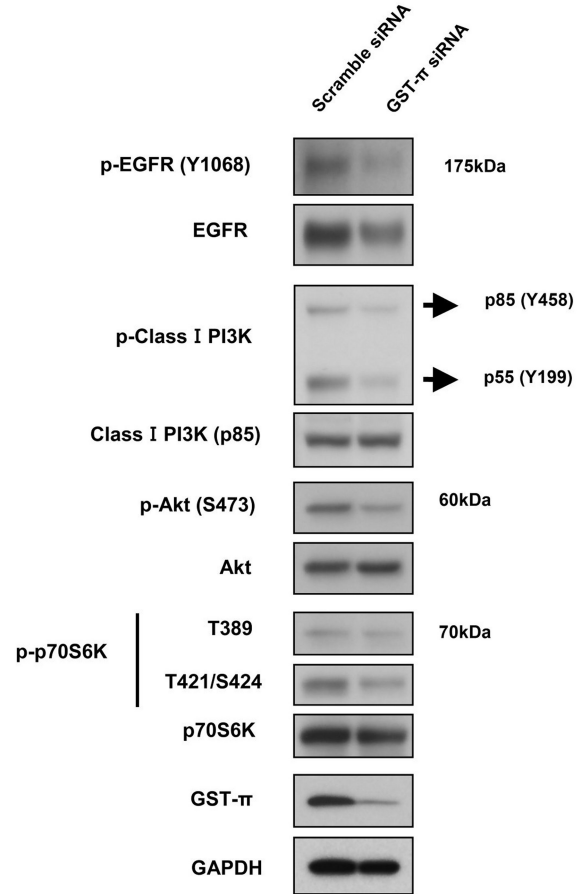
【 9 】



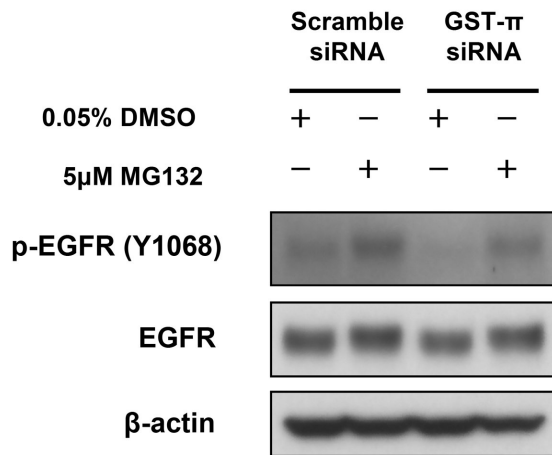
【 1 0 】



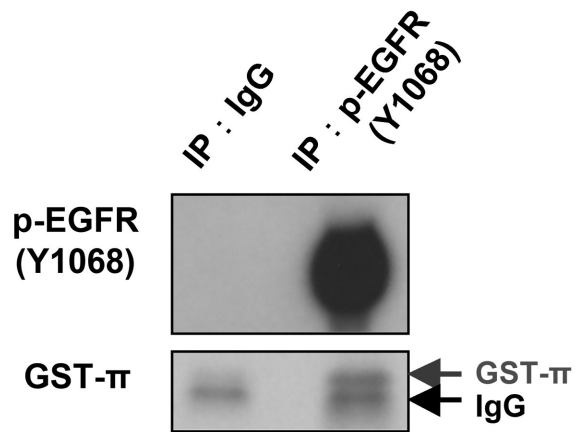
【 1 1 】



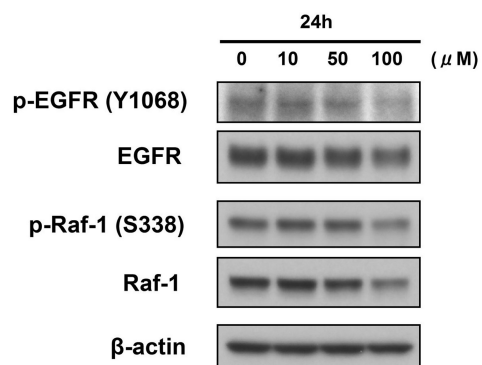
【 1 2 】



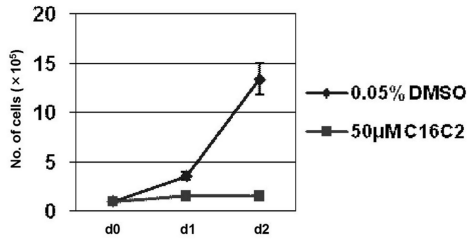
【 1 3 】



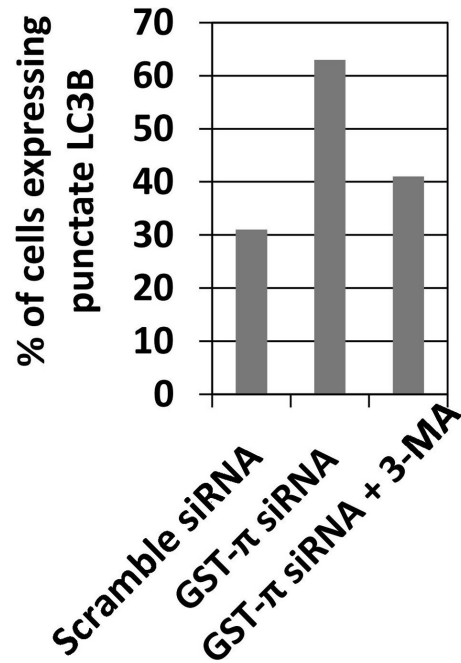
【 1 4 】



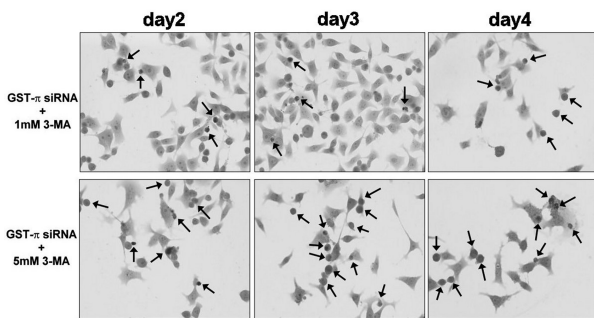
【 15 】



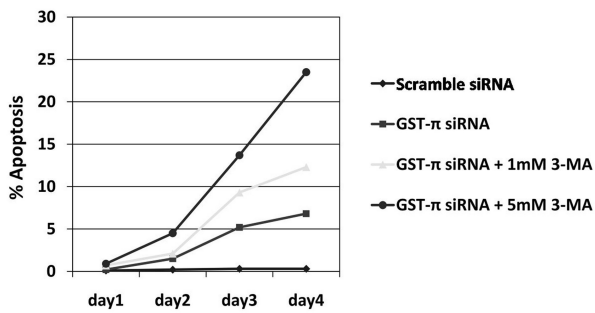
【 16 】



【 17 】



【 18 】



【配列表】

0006023709000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 5
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00

- (56)参考文献 高山哲治 外3名, GST- を標的とした大腸癌の化学予防, *Frontiers in Gastroenterology*, 2010年, 第15巻, 第1号, p. 11-17
- Nishita et al., 'Abstract 1065: Regulation of autophagy and MAPK signaling by glutathione S-transferase-pi in KRAS m, *Cancer Research*, April 15, 2011; Volume 71, Issue 8, S upp, AM2011-1065
- Nobuoka A, et al., Glutathione-S-transferase P1-1 protects aberrant crypt foci from apoptosis induced by deoxycholic acid, *Gastroenterology*, 2004年, Vol.127, No.2, p.428-443
- Payne CM, et al., Deoxycholate, an endogenous cytotoxin/genotoxin, induces the autophagic stress-survival pathway: implications for colon carcinogenesis, *Journal of Toxicology*, 2009年, Vol.2009, Article ID 785907, doi: 10.1155/2009/785907
- 西尋裕樹 外2名, GSTP1 enhances Raf-1/MEK/ERK pathway by preventing proteasomal degradation of Raf-1 in human colon cancer cells GSTP1はヒト大腸癌細胞においてRaf 1のプロテオソーム分解を阻害することでRaf 1/MEK/ERK経路を増強する, 第69回 日本癌学会学術総会記事, 2010年 8月23日, p. 211
- 高梨訓博 外5名, 大腸癌発癌過程におけるGSTpiのMAP kinase調節因子としての意義, 日本癌学会学術総会記事, 2007年, 66th巻, p. 181
- Hokaiwado N., et al., Glutathione S-transferase Pi mediates proliferation of androgen-independent prostate cancer cells, *Carcinogenesis*, 2008年, Vol.29, No.6, p.1134-1138
- Hyeonseok Ko, et al., Autophagy Inhibition Enhances Apoptosis Induced by Ginsenoside Rk1 in Hepatocellular Carcinoma Cells, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009年, Vol.73, No.10, p.2183-2189
- 宮澤啓介 外6名, ビタミンK2による白血病細胞のオートファジー/アポトーシス誘導, *臨床血液*, 2007年, 第48巻, 第9号, p. 1097, 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会合同総会プログラム・抄録集
- Ishii T, et al., A methylated oligonucleotide induced methylation of GSTP1 promoter and suppressed its expression in A549 lung adenocarcinoma cells, *Cancer Letters*, 2004年, Vol.212, No.2, p.211-223
- Xi G, et al., Autophagy inhibition promotes paclitaxel-induced apoptosis in cancer cells, *Cancer Letters*, 2011年 4月21日, Vol.307, No.2, p.141-148, doi: 10.1016/j.canlet.2011.03.026

(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 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0
A 6 1 K 4 8 / 0 0
A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
P u b M e d
S c i e n c e D i r e c t
C i N i i
医中誌WEB

