

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6452954号
(P6452954)

(45) 発行日 平成31年1月16日 (2019. 1. 16)

(24) 登録日 平成30年12月21日 (2018. 12. 21)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 31/55 (2006. 01)

A 6 1 K 31/55 Z N A

A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 35/04 (2006. 01)

A 6 1 P 35/04

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 P 43/00 1 2 1

C 1 2 N 15/00 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00

請求項の数 7 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-102285 (P2014-102285)
 (22) 出願日 平成26年5月16日 (2014. 5. 16)
 (65) 公開番号 特開2014-240383 (P2014-240383A)
 (43) 公開日 平成26年12月25日 (2014. 12. 25)
 審査請求日 平成29年5月15日 (2017. 5. 15)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-104409 (P2013-104409)
 (32) 優先日 平成25年5月16日 (2013. 5. 16)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 304021831
 国立大学法人千葉大学
 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号
 (74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆
 (74) 代理人 100124453
 弁理士 資延 由利子
 (74) 代理人 100135208
 弁理士 大杉 卓也
 (74) 代理人 100152319
 弁理士 曾我 亜紀
 (72) 発明者 丹沢 秀樹
 千葉県千葉市中央区本町3-3-16-1
 審査官 岩下 直人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌転移抑制剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ミルタザピン若しくはその薬理学的に許容される塩またはそれらの溶媒和物からなる癌転移抑制剤。

【請求項 2】

癌疾患であると判定された対象由来の癌細胞試料を用い、該試料における L i n 7 C - C A S K - カテニン ネットワークに関与するタンパク質の発現を測定し、該タンパク質の発現が、対応する正常細胞試料における発現と比較して低下していると判定されたことにより選択された対象に投与される、ミルタザピン若しくはその薬理学的に許容される塩またはそれらの溶媒和物からなる転移抑制剤。

【請求項 3】

癌疾患であると判定された対象由来の癌細胞試料を用い、該試料における L i n 7 C の発現を測定し、該 L i n 7 C の発現が、対応する正常細胞試料における発現と比較して低下していると判定されたことにより選択された対象に投与される、ミルタザピン若しくはその薬理学的に許容される塩またはそれらの溶媒和物からなる転移抑制剤。

【請求項 4】

癌疾患であると判定された対象にミルタザピン若しくはその薬理学的に許容される塩またはそれらの溶媒和物を投与する前に、該対象由来の癌細胞試料を用いてミルタザピンで処理し、ミルタザピンで処理しないときと比較して、L i n 7 C - C A S K - カテニン ネットワークに関与するタンパク質の発現が増強すると判定されたことにより選択された

対象に投与される、ミルタザピン若しくはその薬理学的に許容される塩またはそれらの溶媒和物からなる転移抑制剤。

【請求項 5】

癌疾患であると判定された対象にミルタザピン若しくはその薬理学的に許容される塩またはそれらの溶媒和物を投与する前に、該対象由来の癌細胞試料を用いてミルタザピンで処理し、ミルタザピンで処理しないときと比較して、L i n 7 C の発現が増強すると判定されたことにより選択された対象に投与される、ミルタザピン若しくはその薬理学的に許容される塩またはそれらの溶媒和物からなる転移抑制剤。

【請求項 6】

ミルタザピン若しくはその薬理学的に許容される塩またはそれらの溶媒和物からなる癌転移抑制剤に、さらに付加的な抗癌活性成分を含む癌治療用組成物。

10

【請求項 7】

ミルタザピン若しくはその薬理学的に許容される塩またはそれらの溶媒和物からなる癌転移抑制剤と付加的な抗癌活性成分を含む製剤とを組み合わせたことを特徴とする併用投与用癌治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ミルタザピン若しくはその薬理学的に許容される塩またはそれらの溶媒和物からなる癌転移抑制剤、該癌転移抑制剤を含む癌治療用組成物、および該癌転移抑制剤と付加的な抗癌活性成分とを組み合わせたことを特徴とする併用投与用癌治療剤に関する。また本発明は、癌転移抑制および癌治療におけるミルタザピン若しくはその薬理学的に許容される塩またはそれらの溶媒和物の使用に関する。さらに本発明は、ミルタザピン若しくはその薬理学的に許容される塩またはそれらの溶媒和物を、癌転移抑制に有効な量で投与することを含む癌転移抑制方法および癌治療方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

癌の転移とは、癌細胞が原発巣から離れて血管やリンパ系を介して移動し、身体の一部に到達する過程であり、癌における死亡原因の大半を占めると言われている。従来より、癌転移の分子機構の解明は癌の制御につながると期待され多くの研究がされている。しかし、そのメカニズムの解明は未だ完全ではなく、臨床応用にまで至った例はない。

30

【0003】

本発明者らは、癌の浸潤や転移の抑制に働く細胞接着因子 カテニンを含む L i n 7 C - カルシウム / カルモジュリン依存性セリンプロテインキナーゼ (C A S K) - カテニン ネットワークを報告している (非特許文献 1) 。具体的には、口腔癌細胞と正常口腔粘膜上皮細胞の多数のタンパク質の発現をプロテオミクス解析により網羅的に検索し、発現変動が認められる分子の中から L i n 7 C 遺伝子を同定した。そして、L i n 7 C の発現上昇が癌の浸潤や転移を抑制すること、また L i n 7 C が癌の浸潤や転移の抑制に働く細胞接着因子 カテニンを含む L i n 7 C - C A S K - カテニン ネットワークを形成していることを見出した。また、ヌードマウスを用いた癌細胞移植実験において、ヒト L i n 7 C の完全長 c D N A を搭載した発現ベクターを導入して癌細胞に L i n 7 C を強制発現させると、コントロール (通常の癌細胞株を使用した群) に比較して、顎下腺、肺、肝臓への転移が抑制されることを証明した。

40

【0004】

その他にも、癌の転移や浸潤に関連する遺伝子や因子を標的とした実験が報告されている (非特許文献 2 - 3) 。しかしながら、標的遺伝子を同定しても、そのインヒビターやエンハンサーとしての化学物質 (薬剤) を発見した報告はごく少ない (非特許文献 4) 。また、同定された標的遺伝子を利用して遺伝子治療を行うには、高価で手続きも煩雑であり、特別な施設でしか行うことができないため、現状では実用化可能な治療法にまで至った研究はない。

50

【0005】

ミルタザピンは、四環系抗うつ剤としてうつ病やうつ状態に適用される化合物である。ミルタザピンは、シナプス前₂自己受容体およびヘテロ受容体にアンタゴニストとして作用し、脳内ノルアドレナリンおよびセロトニン(5-hydroxytryptamine)の遊離を増大させることが知られている。また、セロトニン受容体(5-hydroxytryptamine(serotonin) receptor; HTR)ファミリーである5-HT₂受容体(HTR₂)および5-HT₃受容体を遮断する作用があり、そのため選択的に5-HT₁受容体を活性化する。また、ミルタザピンはヒト骨肉腫で細胞毒性剤として作用することが報告されており、腫瘍生育を阻害するその能力は免疫反応の活性化とセロトニン作動性システムの回復を必要とすることが大腸癌細胞において報告されている(非特許文献5)。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Onda T, Uzawa K, Nakashima D, Saito K, Iwadata Y, Seki N, Shibahara T, Tanzawa H. Lin-7C/VELI3/MALS-3: an essential component in metastasis of human squamous cell carcinoma. Cancer Res. 2007;67:9643-8.

【非特許文献2】Li Y, Zhu CL, Nie CJ, Li JC, Zeng TT, Zhou J, Chen J, Chen K, Fu L, Liu H, Qin Y, Guan XY. Investigation of Tumor Suppressing Function of CACNA2D3 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. PLoS One 2013;8(4):e60027.

20

【非特許文献3】Fan CD, Lum MA, Xu C, Black JD, Wang X. Ubiquitin-dependent regulation of phospho-AKT dynamics by the ubiquitin E3 ligase, NEDD4-1, in the insulin-like growth factor-1 response. J Biol Chem. 2013 Jan 18;288(3):1674-84.

【非特許文献4】Zhang X, Yue P, Page BD, Li T, Zhao W, Namanja AT, Paladino D, Zhao J, Chen Y, Gunning PT, Turkson J. Orally bioavailable small-molecule inhibitor of transcription factor Stat3 regresses human breast and lung cancer xenografts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:9623-8.

【非特許文献5】Fang, C.K. et al. Mirtazapine inhibits tumor growth via immune response and serotonergic system. PLoS One 2012;7:e38886.

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

癌の転移は癌における死亡原因の大半を占めるため、癌の転移を制御することは癌治療におけるキーポイントであり、早期に実現させるべき課題である。

【0008】

本発明の課題は、癌転移の制御に効果を有する化合物を提供し、該化合物を含む癌治療用組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは上記課題を解決すべく、癌転移の制御に効果を有する化合物に関する探索的研究を進めた。その結果、四環系抗うつ剤と知られているミルタザピンが、癌の浸潤や転移の抑制に働く細胞接着因子 カテニンを含む Lin7C-CASK- カテニン ネットワークに關与するタンパク質の発現を増強すること、高浸潤性ヒト培養口腔扁平上皮癌細胞株 SAS-H1 (以下、SAS-H1細胞と称する) および高浸潤性ヒト培養悪性黒色腫細胞株 G-361 (以下、G-361細胞と称する) を移植したヌードマウスにおいてそれらの臓器転移をミルタザピンが抑制したこと、およびミルタザピンによる癌転移の抑制効果はミルタザピンによる Lin7C-CASK- カテニン ネットワークに關与するタンパク質の発現が増強された癌細胞株で認められたことを見出した。本発明者らは、ミルタザピンの投与により癌の転移が抑制され、ミルタザピンの単独投与あるいは既存の抗癌剤との併用投与が、癌患者に対する有用かつ新規の治療法となる可能性が高いと

40

50

考え、本発明を完成した。

【0010】

すなわち、本発明は以下に関する：

1．ミルタザピン若しくはその薬理的に許容される塩またはそれらの溶媒和物からなる癌転移抑制剤、

2．癌疾患であると判定された対象由来の癌細胞試料を用い、該試料におけるLin7C-CASK-カテニンネットワークに關与するタンパク質の発現を測定し、該タンパク質の発現が、対応する正常細胞試料における発現と比較して低下していると判定されたことにより選択された対象に投与される、ミルタザピン若しくはその薬理的に許容される塩またはそれらの溶媒和物からなる転移抑制剤、

10

3．癌疾患であると判定された対象にミルタザピン若しくはその薬理的に許容される塩またはそれらの溶媒和物を投与する前に、該対象由来の癌細胞試料を用いてミルタザピンで処理し、ミルタザピンで処理しないときと比較して、Lin7C-CASK-カテニンネットワークに關与するタンパク質の発現が増強すると判定されたことにより選択された対象に投与される、ミルタザピン若しくはその薬理的に許容される塩またはそれらの溶媒和物からなる転移抑制剤、

4．前記Lin7C-CASK-カテニンネットワークに關与するタンパク質が、Lin7Cである、前記2．または3．の転移抑制剤、

5．前記1．の癌転移抑制剤を含む癌治療用組成物、

6．ミルタザピン若しくはその薬理的に許容される塩またはそれらの溶媒和物からなる癌転移抑制剤に、さらに付加的な抗癌活性成分を含む癌治療用組成物、

20

7．ミルタザピン若しくはその薬理的に許容される塩またはそれらの溶媒和物からなる癌転移抑制剤と付加的な抗癌活性成分を含む製剤とを組み合わせたことを特徴とする併用投与用癌治療剤、

8．ミルタザピン若しくはその薬理的に許容される塩またはそれらの溶媒和物の癌転移抑制における使用、

9．ミルタザピン若しくはその薬理的に許容される塩またはそれらの溶媒和物の癌治療における使用。

【発明の効果】

【0011】

30

本発明によれば、ミルタザピン若しくはその薬理的に許容される塩またはそれらの溶媒和物からなる癌転移抑制剤、該癌転移抑制剤を含む癌治療用組成物、および該癌転移抑制剤と付加的な抗癌活性成分とを組み合わせたことを特徴とする併用投与用癌治療剤を提供できる。

【0012】

ミルタザピン若しくはその薬理的に許容される塩またはそれらの溶媒和物を癌転移抑制に有効な量で投与することにより癌転移抑制および癌治療が可能になる。また、ミルタザピン処理による副作用はほとんど認められなかったことから、本発明に係る癌転移抑制剤は、この点においても癌転移抑制および癌治療に有用である。

【0013】

40

このように、本発明により、薬剤の服用という非常に簡便な方法のみで癌の転移および浸潤を抑制することができる。そのため、癌治療において、手術範囲の軽減による機能温存、放射線療法および化学療法などの治療内容の軽減、並びに生命予後の改善を見込むことができる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1-A】四環系抗うつ剤であるミルタザピン(Mirtazapine)処理により、SAS-H1細胞におけるLin7C、CASK、およびカテニン(catenin)のmRNA発現が、著しく上昇したことを説明する図である。別の四環系抗うつ剤であるアポモルフィン(Apomorphine)、カフェイン(Caffeine)、リ

50

スベリドン (R i s p e r i d o n e)、クエチアピン (Q u e t i a p i n e)、およびブスピロン (B u s p i r o n e)、並びに溶媒コントロールであるジメチルスルホキシド (D M S O) はいずれも、上記 mRNA の発現に影響を示さなかった。上記 mRNA の発現量は、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸脱水素酵素 (G A P D H) の mRNA 発現量に対する相対的発現 (R e l a t i v e e x p r e s s i o n) で表した。(実施例 1)

【図 1 - B】ミルタザピン処理による S A S - H 1 細胞における L i n 7 C、C A S K、および カテニン (- c a t e n i n) の発現増加がタンパク質レベルでも証明されたことを説明する図である。図中、M i r (-) はミルタザピン非処理癌細胞を、M i r (+) はミルタザピン処理癌細胞を示す。 - アクチン (- a c t i n) の発現は、内部標準として測定した。H T R 2 C は、L i n 7 C - C A S K - カテニン ネットワークの上流に位置するセロトニン受容体ファミリータンパク質である。(実施例 1)

10

【図 2】ミルタザピンが $10 \mu\text{M}$ で、S A S - H 1 細胞における L i n 7 C、C A S K、および カテニンの mRNA 発現を効果的に増強したことを説明する図である。上記 mRNA の発現量は、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸脱水素酵素 (G A P D H) の mRNA 発現量に対する相対的発現 (R e l a t i v e e x p r e s s i o n) で表した。(実施例 1)

【図 3】癌細胞株における L i n 7 C 遺伝子の発現を定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (以下、q R T - P C R と略称する) により解析した結果を示す図である。ミルタザピンは S A S - H 1 細胞で L i n 7 C 発現の上方制御に効果を示した (パネル A) が、S A S 細胞には何ら影響を示さなかった (パネル B)。また、他の H T R 2 C リガンド候補物質は S A S - H 1 細胞における L i n 7 C 発現に期待した影響を示さなかった (パネル C - F)。結果は、トリプリケートアッセイで得られた値の平均値 \pm 該平均値の標準誤差 (以下、m e a n s \pm S E M と略称する) で表示する。(実施例 2)

20

【図 4】L i n 7 C、C A S K、および カテニン (C T N N B 1) の各 mRNA 発現レベルに対するミルタザピンの効果を検討した結果を示す図である。ミルタザピン $10 \mu\text{M}$ による処理で、S A S - H 1 細胞および G - 3 6 1 細胞におけるこれら遺伝子の上方制御が認められた (パネル B および パネル C) が、S A S 細胞では認められなかった (パネル A)。結果は、トリプリケートアッセイで得られた値の m e a n s \pm S E M で表示する。図中、M i r (-) はミルタザピン非処理、M i r (+) はミルタザピン処理を表す。(実施例 2)

30

【図 5】S A S 細胞および S A S - H 1 細胞、並びに G - 3 6 1 細胞における L i n 7 C 遺伝子の機能解析を行った結果を示す図である。パネル A は、q R T - P C R で解析した結果、S A S - H 1 細胞および G - 3 6 1 細胞における L i n 7 C mRNA 発現レベルが、S A S 細胞のものと比較して有意 ($P < 0.05$ 、マン - ホイットニー U 検定) に低かったことを示す。パネル B は、ミルタザピンの有無における S A S 細胞、S A S - H 1 細胞、および G - 3 6 1 細胞の H T R 2 C、L i n 7 C、C A S K、および カテニン (C T N N B 1) タンパク質発現レベルを、ウエスタンブロット解析した結果を示す。各プロットは、 - アクチンタンパク質レベルに対して標準化した。これらプロットは、全長プロット (図 8 に示す) をトリミングしたものである。図中、M i r (-) はミルタザピン非処理、M i r (+) はミルタザピン処理を表す。(実施例 2)

40

【図 6】図 5 に示したイムノブロットングの結果を全長サイズで示した図である。(実施例 2)

【図 7】細胞増殖の比較をコントロール群 (ミルタザピン非処理) およびミルタザピン処理群で行った結果を示す図である。細胞増殖へのミルタザピンの効果を測定するために、S A S 細胞 (パネル A)、S A S - H 1 細胞 (パネル B)、および G - 3 6 1 細胞 (パネル C) の細胞増殖を 7 日間に亘って測定した。結果はトリプリケートアッセイで得られた値の m e a n s \pm S E M で表示する。図中、M i r (-) はミルタザピン非処理、M i r (+) はミルタザピン処理を表す。また、図中、h は時間を表す。(実施例 3)

【図 8】ヒト転移性癌細胞における抗転移能に関するミルタザピンの機能的効果を検討し

50

た結果を示す図である。パネルAおよびパネルBは、それぞれSAS-H1細胞およびG-361細胞についての浸潤アッセイの典型的な結果を示す。孔を通過するミルタザピン処理細胞数はコントロール細胞と比較して有意 ($P < 0.05$ 、マン-ホイットニー U 検定) に減少した。元倍率は100倍であり、スケールバーは100 μm である。パネルCおよびパネルDは、それぞれSAS-H1細胞およびG-361細胞についての遊走アッセイの結果を示す。元倍率は100倍であり、スケールバーは100 μm である。図中、Mir(-)はミルタザピン非処理、Mir(+)はミルタザピン処理を表す。また、図中、No. cellは細胞数を意味し、hは時間を意味し、Area(% of 0h)は面積(培養0時の面積に対する割合)を意味する。(実施例3)

【図9】SAS-H1細胞およびG-361細胞を舌部に移植したヌードマウスでは、ミルタザピン投与によりその臓器転移が有意に抑制されたことを説明する図である。細胞の各臓器への転移の測定は、各臓器についてヒト特異的反復配列AluをqRT-PCRで解析することにより実施した。転移の程度は、マウスGAPDHに対して標準化した転移量を、舌中のヒト細胞の実数の数に対する相対値で表した(Relative amount of metastasis)。非投与群(図中、NTと表示)およびコントロール群(図中、Tween80と表示)では、顎下腺(Submandibular gland)、肺(Lung)、肝臓(Liver)、および腎臓(Kidney)に自発転移が認められたが、ミルタザピン投与群ではこれらの臓器への転移は認められなかった。アステリスクは、コントロール群とミルタザピン投与群との間に有意差 ($P < 0.05$ 、マン-ホイットニー U 検定) が認められたことを示す。図中、N.C.はヒトゲノムDNAのない陰性コントロールを示す。(実施例4)

【図10】非投与群、コントロール群(Tween80投与)、およびミルタザピン投与群の体重(Body weight)を比較した結果を示す図である。体重は、処置期間の4週間(4 Weeks)に亘って測定した。値はmeans \pm SEM(各群n=5)で表した。図中、NTはミルタザピンもその溶媒であるTween80も投与しなかった非投与群を意味する。(実施例4)

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、ミルタザピン若しくはその薬理学的に許容される塩またはそれらの溶媒和物からなる癌転移抑制剤、該癌転移抑制剤を含む癌治療用組成物、および該癌転移抑制剤と付加的な抗癌活性成分とを組み合わせたことを特徴とする併用投与用癌治療剤に関する。

【0016】

用語「癌」は、正常細胞が遺伝子レベルの変化により安定した形質として異常増殖能を獲得した細胞であって、その形態およびその配列が種々の点で正常細胞と異なり、転移性や浸潤性を有する細胞で構成される腫瘍をいい、悪性腫瘍ということもある。用語「癌」は、悪性腫瘍全般、すなわち癌腫および肉腫を含むが、主に癌腫を指す。癌腫は、消化管や呼吸器粘膜、肝臓、腎臓などの実質臓器に発生する上皮性悪性腫瘍をいう。これに対し、肉腫は運動器や軟部組織などの非上皮性(間葉性)悪性腫瘍をいう。

【0017】

用語「癌転移」とは、癌細胞が原発巣から分離して、別の組織や臓器、例えばリンパ節、肝臓、肺などに移動して定着し、そこで再び増殖して腫瘍(転移性腫瘍)を形成することを意味する。原発巣とは、癌細胞が最初に発生した病変部位をいう。癌転移は、その経路により主に3種類、すなわちリンパ行性転移、血行性転移、および播種性転移に分類できる。リンパ行性転移は、原発巣の癌細胞が周囲にあるリンパ管に侵入し、リンパ流によってリンパ節に運ばれ、そこで転移性腫瘍を形成することをいう。血行性転移は、原発巣の近くにある毛細血管や細い静脈に癌細胞が侵入し、血流を介して原発巣の存在する部位とは別の臓器に転移することをいう。播種性転移は、胸腔や腹腔に面した臓器に発生した癌細胞が、腹腔や胸腔の別の部位に転移性腫瘍を形成することをいう。癌転移における最初のステップであるリンパ管や血管への癌細胞の移行には、癌の浸潤の過程が必要である。用語「浸潤」とは、原発巣の癌細胞が直接に周囲の組織や臓器に広がっていくことを意

味する。

【0018】

用語「癌転移抑制」は、癌細胞の原発巣からの分離と浸潤、別の組織や臓器への移動、および移動先における定着と増殖を低減させることを意味する。

【0019】

用語「癌転移抑制剤」は、癌細胞の原発巣からの分離と浸潤、別の組織や臓器への移動、および移動先における定着と増殖を低減させる薬剤を意味する。

【0020】

ミルタザピンは四環系抗うつ剤としてうつ病やうつ状態に適用されている化合物であり、その化学名は1, 2, 3, 4, 10, 14b-ヘキサヒドロ-2-メチルピラジノ[2, 1-a]ピリド[2, 3-c][2]ベンゾアゼピン(1, 2, 3, 4, 10, 14b-hexahydro-2-methylpyrazino[2, 1-a]pyrido[2, 3-c][2]benzazepine)である。ミルタザピンは、シナプス前₂自己受容体およびヘテロ受容体にアンタゴニストとして作用し、脳内ノルアドレナリンおよびセロトニンの遊離を増大させることが知られている。また、5-HT₂受容体および5-HT₃受容体を遮断する作用があり、そのため選択的に5-HT₁受容体を活性化する。

【0021】

本発明において、ミルタザピンが癌の浸潤や転移の抑制に働く細胞接着因子 カテニンを含むLin7C-CASK-カテニンネットワークに關与するタンパク質の発現を増強すること、高浸潤性ヒト培養口腔扁平上皮癌細胞株SAS-H1および高浸潤性ヒト培養悪性黒色腫細胞株G-361を移植したヌードマウスにおいてそれらの臓器転移をミルタザピンが抑制したこと、およびミルタザピンによる癌転移の抑制効果がミルタザピンによりLin7C-CASK-カテニンネットワークに關与するタンパク質の発現が増強された癌細胞株で認められたことを見出した。このようにミルタザピンは癌転移の抑制に効果を有するため、癌浸潤抑制剤および癌転移抑制剤として有用である。

【0022】

ミルタザピンは、遊離体のままでもよく、薬理学的に許容される塩であってもよい。薬理学的に許容される塩として、酸付加塩および塩基付加塩を挙げることができる。酸付加塩として、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、またはリン酸塩などの無機酸塩、およびクエン酸塩、シュウ酸塩、酢酸塩、ギ酸塩、プロピオン酸塩、安息香酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、またはパラトルエンスルホン酸塩などの有機酸塩を例示できる。塩基付加塩として、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、またはアンモニウム塩などの無機塩基塩、およびトリエチルアンモニウム塩、トリエタノールアンモニウム塩、ピリジニウム塩、ジイソプロピルアンモニウム塩などの有機塩基塩を例示できる。また、ミルタザピンは、遊離体および塩のほか、これらの溶媒和物であってもよい。溶媒和物として、水和物やエタノール和物などを例示できるが、医薬品として許容される他の溶媒との溶媒和物であればいずれの溶媒和物であってもよい。

【0023】

本発明に係る癌転移抑制剤は、必要に応じて、医薬用に許容される担体(医薬用担体)を含む医薬組成物として製造できる。本発明に係る医薬組成物は癌治療用組成物として有用である。

【0024】

医薬用担体は、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、滑沢剤、希釈剤および賦形剤を例示できる。これらは得られる製剤の投与形態に応じて適宜選択して使用される。より具体的には、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン

10

20

30

40

50

、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトースを例示できる。これらは、目的とする薬剤の剤形に応じて適宜1種類または2種類以上を組み合わせて使用される。そのほか、安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、界面活性剤、およびpH調整剤などを適宜使用することもできる。安定化剤は、例えばヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体を例示できる。L-アミノ酸は、特に限定はなく、例えばグリシン、システイン、グルタミン酸などのいずれでもよい。糖類も特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖などの単糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトールなどの糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖などの二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターチ、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸などの多糖類などおよびそれらの誘導体などのいずれでもよい。セルロース誘導体も特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどのいずれでもよい。界面活性剤も特に限定はなく、イオン性界面活性剤および非イオン性界面活性剤のいずれも使用できる。界面活性剤には、例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系などが包含される。緩衝剤は、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 α -アミノカプロン酸、グルタミン酸および/またはそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）を例示できる。等張化剤は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリンを例示できる。キレート剤は、例えばエデト酸ナトリウム、クエン酸を例示できる。

【0025】

本発明に係る癌転移抑制剤の用量範囲は特に限定されず、投与形態、投与経路、疾患の種類、対象の性質（体重、年齢、病状および他の医薬の使用の有無など）、および担当医師の判断などに応じて適宜選択される。適当な用量は、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いて決定することができるが、一般的には例えば対象の体重1kgあたり0.01 μ g乃至1000mg程度、好ましくは約0.1 μ g乃至100mg程度の範囲である。上記投与量は1日1回乃至数回に分けて投与することができる。

【0026】

本発明に係る癌転移抑制剤の好ましい用量は、マウスにおける癌転移抑制効果が10mg/kg/日投与で認められている（後述する実施例4および図9参照）ことを基準にすると、1日に1mg/kg乃至100mg/kg、より好ましくは5mg/kg乃至50mg/kg、さらに好ましくは10mg/kg乃至20mg/kgである。

【0027】

本発明に係る癌治療用組成物に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択される。通常約0.00001 - 70重量%、好ましくは0.0001 - 5重量%程度の範囲である。

【0028】

投与経路は、全身投与または局所投与のいずれも選択することができる。この場合、疾患、症状などに応じた適当な投与経路を選択する。本発明に係る薬剤は、経口経路および非経口経路のいずれによっても投与できるが、経口投与がより好ましい。非経口経路としては、通常の静脈内投与、動脈内投与のほか、皮下、皮内、筋肉内などへの投与を挙げることができる。あるいは、本発明に係る薬剤は、腫瘍内投与することができる。

【0029】

剤形は、特に限定されず、種々の剤形とすることができる。例えば、溶液製剤として使用できるほかに、これを凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時、水や生理的食塩水などを含む緩衝液などで溶解して適当な濃度に調製した後に使用することもできる。また持続性剤形または徐放性剤形であってもよい。

【 0 0 3 0 】

具体的には、経口投与のためには、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、丸剤、液剤、乳剤、懸濁液、溶液剤、酒精剤、シロップ剤、エキス剤、エリキシル剤とすることができる。非経口剤としては、例えば、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤などの注射剤、経皮投与または貼付剤、軟膏またはローション、口腔内投与のための舌下剤、口腔貼付剤、ならびに経鼻投与のためのエアゾール剤、坐剤とすることができるが、これらには限定されない。これらの製剤は、製剤工程において通常用いられる公知の方法により製造することができる。

【 0 0 3 1 】

経口用固形製剤を調製する場合は、上記有効成分に賦形剤、必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、矯臭剤などを加えた後、常法により錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤などを製造することができる。そのような添加剤としては、当該分野で一般的に使用されるものでよく、例えば、賦形剤としては、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、微結晶セルロース、珪酸などを、結合剤としては、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン液、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、メチルセルロース、エチルセルロース、シェラック、リン酸カルシウム、ポリビニルピロリドンなどを、崩壊剤としては乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、乳糖などを、滑沢剤としては精製タルク、ステアリン酸塩、
20
ホウ砂、ポリエチレングリコールなどを、矯味剤としては白糖、橙皮、クエン酸、酒石酸などを例示できる。

【 0 0 3 2 】

経口用液体製剤を調製する場合は、上記化合物に矯味剤、緩衝剤、安定化剤、矯臭剤などを加えて常法により内服液剤、シロップ剤、エリキシル剤などを製造することができる。この場合矯味剤としては上記に挙げられたもので良く、緩衝剤としてはクエン酸ナトリウムなどが、安定化剤としてはトラガント、アラビアゴム、ゼラチンなどを挙げることができる。

【 0 0 3 3 】

注射剤を調製する場合は、上記化合物にpH調節剤、緩衝剤、安定化剤、等張化剤、局所麻酔剤などを添加し、常法により皮下、筋肉内および静脈内用注射剤を製造することができる。この場合のpH調節剤および緩衝剤としてはクエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウムなどを挙げることができる。安定化剤としてはピロ亜硫酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、チオグリコール酸、チオ乳酸などを挙げることができる。局所麻酔剤としては塩酸プロカイン、塩酸リドカインなどを挙げることができる。等張化剤としては、塩化ナトリウム、ブドウ糖などを例示できる。

【 0 0 3 4 】

本発明に係る癌治療用医薬組成物は、上記癌転移抑制剤に加え、癌の治療に有効な付加的な活性成分を含む癌治療用医薬組成物であり得る。本発明において活性成分とは、腫瘍細胞、例えば癌細胞に対し、増殖抑制効果、細胞傷害効果、および転移抑制効果のうちの
40
いずれか1以上の効果を示す化合物をいう。また、本明細書において、癌の治療に有効な付加的な活性成分を抗癌活性成分とも称する。

【 0 0 3 5 】

癌の治療に有効な付加的な活性成分は特に限定されず、癌細胞に対し増殖抑制効果、細胞傷害効果、および転移抑制効果のうちのいずれか1以上の効果を示す化合物であればいずれを用いることもできる。癌の治療に有効な付加的な活性成分として、既に臨床的に癌治療に使用されている薬剤の有効成分、例えば化学療法剤、生物学的応答修飾剤、化学的感作剤などに含まれる活性成分を例示できる。

【 0 0 3 6 】

化学療法剤とは、癌細胞を死滅させるまたはそれらの増殖を遅らせるために用いる薬剤

10

20

30

40

50

を意味する。したがって、細胞傷害性薬と細胞増殖抑制剤の双方が化学療法薬であるとみなされる。化学療法剤の例は、従来タキサン類（例えば、パクリタキセル、ドキセタキセル、RPR109881A、SB-T-1213、SB-T-1250、SB-T-101187、BMS-275183、BRT216、DJ-927、MAC-321、IDN5109、およびIDN5390）、ピンカルカロイド類（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ピンフルニン、ビノレルビン、およびヒドロビンブラスチン）、ドラスタチン類（ドラスタチン-10、ドラスタチン-15、ILX651、TZT-1027、シンプロスタチン1、シンプロスタチン3、およびLU103793）、クリプトフィシン類（例えば、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン52）、エポチロン類（例えば、エポチロンA、エポチロンB、デオキシエポチロンB、およびエポチロンBラクタム）、エレウテロピン、ディスコデルモリド、2-エピ-ディスコデルモリド、2-デス-メチルディスコデルモリド、5-ヒドロキシメチルディスコデルモリド、19-デス-アミノカルボニルディスコデルモリド、9(13)-シクロディスコデルモリド、またはラウリマリドである。

【0037】

具体的には、単剤である化学療法剤として、ニトロソウレア系薬剤(Nitrosoureas)、窒素マスタード系薬剤(Nitrogen mustard)、トリアジン系薬剤(Triazines)、アンスラサイクリン系薬剤(Anthracycline)、ピンカルカロイド系薬剤(Vincalikaloids)、エピポドフィロトキシシン系薬剤(Epipodophyllotoxins)、タキサン系薬剤(Taxanes)、ホルモン類似体(Hormonal analogs)および白金製剤(Platinum drugs)などを例示できる。ニトロソウレア系薬剤として、カルムスチン(Carmustine、BCNU)、ロムスチン(Lomustine、CCNU)、セムスチン(Semustine)、フォテムスチン(Fotemustine、FTM)およびニムスチン(Nimustine、ACNU)などを例示できる。窒素マスタード系薬剤として、シクロホスファミド(Cyclophosphamide、CPA)を例示できる。トリアジン系薬剤として、ダカルバジン(Dacarbazine、DTIC)およびテモゾロミド(Temozolomide、TMZ)などが例示される。アンスラサイクリン系薬剤として、ドキシソルビシン(Doxorubicin、DXR)およびブレオマイシン(Bleomycin、BLM)を例示できる。ピンカルカロイド系薬剤として、ビンクリスチン(Vincristine、VCR)、ビンデシン(Vindesine、VDS)およびビンブラスチン(Vinblastine、VLB)などを例示できる。エピポドフィロトキシシン系薬剤として、エトポシド(Etoposide)を例示できる。タキサン系薬剤として、パクリタキセル(Paclitaxel、PTX)、ドセタキセル(Docetaxel、TXT)を例示できる。ホルモン類似体として、抗エストロゲン剤(Antiestrogen)、タモキシフェン(Tamoxifen、TAM)を例示できる。白金製剤として、シスプラチン(Cisplatin、CDDP)、カルボプラチン(Carboplatin、CBDCA)を例示できる。好ましくは、トリアジン系薬剤を例示できる。

【0038】

生物学的応答修飾薬とは、疾病と闘う免疫系の能力を刺激するまたは回復させる薬剤を意味する。すべてではないがいくつかの生物学的応答修飾薬は、癌細胞の増殖を遅らせることができ、したがって化学療法剤であるともみなされる。生物学的応答修飾薬として、インターフェロン(、 、)、インターロイキン-2、リツキシマブ、およびトラスツズマブなどを例示できる。

【0039】

化学感作剤とは、化学療法剤の効果に対する癌細胞の感受性をより高くさせる薬剤を意味する。

【0040】

本発明に係る癌転移抑制剤はまた、癌の治療に有効な付加的な活性成分、例えば上記抗

10

20

30

40

50

癌活性成分と組み合わせて、併用投与用癌治療剤として提供できる。本発明に係る癌転移抑制剤と、癌の治療に有効な付加的な活性成分との併用は、同時に行っても良いし、または分離して行うことができる。具体的には、本発明に係る癌転移抑制剤と付加的な抗癌活性成分との併用は、これらを別々に製剤化して得られる２種類の製剤を同時に投与する方法、当該２種類の製剤を別々に時間差をおいて投与する方法のいずれによっても実施できる。当該２種類の製剤の投与経路は同一経路であっても良いし、それぞれの製剤に適した別々の経路であっても良い。好ましくは、本発明に係る癌転移抑制剤と付加的な抗癌活性成分とは、それらを別々に製剤化して得られる２種の製剤をそれぞれに適する投与経路および投与頻度で、同時に、または時間差をおいて投与する。

【００４１】

本発明に係る癌転移抑制剤と付加的な抗癌活性成分とを組み合わせ併用することにより、該抗癌活性成分の投与による癌の増殖抑制効果や縮小効果に加え、本発明に係る癌転移抑制剤による癌転移抑制効果を得ることができる。そのため、かかる併用投与は、該抗癌活性成分の単独投与による治療効果と比較して、癌治療においてより高い治療効果を与える。

【００４２】

本発明において使用される付加的な抗癌活性成分として、既に臨床的に癌治療に使用されている薬剤の有効成分、具体的には上記化学療法剤、生物学的応答修飾剤、化学的感作剤などに含まれる活性成分を例示できるが、これらの投与経路、投与頻度、および投与量は当業者に明らかである。好適な用法および用量は、癌の種類や症状によって異なり、各薬剤の添付文書の記載を参照にして決定することができる。あるいは、好適な用法および用量に関する情報は、医薬品に関する各種情報データベース、例えば日本の医薬品医薬機器情報提供ホームページ (<http://www.info.pmda.go.jp>) や、米国食品医薬品局 (FDA) 提供のオレンジブック (<http://www.fda.gov/cder/orange/default.htm>) などのデータベースから容易に入手可能である。

【００４３】

本発明はまた、癌転移抑制におけるミルタザピン若しくはその薬理学的に許容される塩またはそれらの溶媒和物の使用に関する。さらに本発明は、癌治療におけるミルタザピン若しくはその薬理学的に許容される塩またはそれらの溶媒和物の使用に関する。

【００４４】

本発明はさらに、ミルタザピン若しくはその薬理学的に許容される塩またはそれらの溶媒和物を、癌疾患であると判定された対象に、癌転移抑制に有効な量で投与することを含む癌転移抑制方法に関する。また本発明は、ミルタザピン若しくはその薬理学的に許容される塩またはそれらの溶媒和物を、癌疾患であると判定された対象に、癌転移抑制に有効な量で投与することを含む癌治療方法に関する。

【００４５】

本発明は、いずれの癌疾患にも適用できるが、好ましくは高浸潤性あるいは高転移性の癌、さらに好ましくは口腔扁平上皮癌などの頭頸部扁平上皮癌や、悪性黒色腫に適用される。より好ましくは、癌細胞において、対応する正常細胞と比較して、Lin7C-CASK-カテニンネットワークに関与するタンパク質の発現の低下、好ましくはLin7C、CASK、カテニンの発現の低下、さらに好ましくはLin7Cの発現の低下が認められる癌細胞を含む癌に適用される。癌細胞における各種タンパク質発現は、対象に由来する癌細胞試料を用いて、公知の遺伝子発現検出方法やタンパク質発現検出方法により測定することができる。癌細胞試料として、生検などで得られた組織試料を好ましく使用することができる。

【００４６】

本発明はまた、対象に由来する癌細胞試料を用いてミルタザピンに対する感受性を評価し、該癌細胞試料中にミルタザピンに対する感受性を有する癌細胞が含まれると判定された対象を選択して適用することができる。「ミルタザピンに対する感受性を有する癌細胞

10

20

30

40

50

」とは、ミルタザピン処理により、非処理のときと比較して、遺伝子発現、機能、形態などの変化が観察される癌細胞をいう。例えば、ミルタザピン処理により、非処理のときと比較して、Lin7C-CASK-カテニンネットワークに關与するタンパク質の発現が増強する癌細胞を、ミルタザピンに対する感受性を有する癌細胞として挙げるができる。具体的には、本発明を適用する前に、対象由来の癌細胞試料を用いてミルタザピンで処理し、ミルタザピンで処理しないときと比較して、Lin7C-CASK-カテニンネットワークに關与するタンパク質の発現が増強すると判定された対象を選択し、本発明を適用することが好ましい。Lin7C-CASK-カテニンネットワークに關与するタンパク質として、Lin7C、CASK、およびカテニンを、好ましくはLin7CおよびCASKを例示できる。ミルタザピン処理により癌細胞試料でこれらタンパク質のうちいずれか1以上の発現が増強した場合に、該癌細胞試料はミルタザピンに対する感受性を有する癌細胞を含むと判定できる。Lin7C、CASK、およびカテニンを含め、Lin7C-CASK-カテニンネットワークに關与するタンパク質はよく知られており、それらタンパク質の発現増強の測定は、自体公知の遺伝子検出法またはタンパク質検出法により実施できる。遺伝子検出法として具体的には、ブランクハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、サザンブロット法、ノザンブロット法、NASBA(Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)法、または逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を例示できる。また、in situ RT-PCRやin situ ハイブリダイゼーションなどを利用した細胞レベルでの遺伝子発現検出法を例示できる。タンパク質検出法として具体的には、ウエスタンブロッティングを例示できる。

【0047】

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明する。本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

【0048】

実施例ではヒト培養口腔扁平上皮癌細胞株SAS、高浸潤性ヒト培養口腔扁平上皮癌細胞株SAS-H1、およびヒト培養悪性黒色腫細胞株G-361を使用した。G-361細胞は浸潤性を有することが知られている。SAS細胞およびSAS-H1細胞は、10%牛胎児血清(以下、FBSと略称する)および抗生物質を補充したダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle's Medium; DMEM; Sigma-Aldrich社製)中で維持した。G-361細胞は、10%牛胎児血清および抗生物質を補充したマッコイ5A改変培地(Sigma-Aldrich社製)中で生育させた。すべての細胞株は5%の二酸化炭素と95%の空気の下で湿度が維持された雰囲気の下で、37℃にて培養した。

【0049】

実施例では、ヤギ抗ヒトLin7Cポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology社製)、ヤギ抗ヒトHTR2Cポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology社製)、ウサギ抗ヒトCASKポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology社製)、ウサギ抗ヒトカテニン(CTNNB1)ポリクローナル抗体(Acris Antibodies社製)、およびマウス抗ヒト-アクチンモノクローナル抗体(Abcam社製)を使用した。HTR2Cアゴニストであるアボモルフィン、並びにHTR2Cアンタゴニストであるミルタザピン、カフェイン、リスペリドン、およびクエチアピンは、Sigma-Aldrich社より購入した。

【実施例1】

【0050】

癌の浸潤や転移の抑制に働く細胞接着因子カテニンを含むLin7C-CASK-カテニンネットワークに關与するタンパク質の発現を調節する作用を有する化合物の探索を行った。化合物の探索は、該ネットワークの上流に位置する遺伝子であるHTR2C遺伝子(5-hydroxytryptamine(serotonin) recep

10

20

30

40

50

tor 2 C gene) の作用薬剤を対象に実施した。

【0051】

具体的には、Lin7Cに着目した標的遺伝子をIPAソフトウェア(<http://www.ingenuity.com>)の細胞経路マップ上に重ね合わせた。また、IPAを使用して、Lin7Cおよび/またはそれと相互作用する分子を調節し得る候補化合物を同定を行った。

【0052】

IPAソフトウェアにより、HTR2CがLin-7Cと結合できることが明らかに示され、さらに、アポモルフィン、カフェイン、リスペリドン、クエチアピン、およびミルタザピンが、HTR2Cのリガンドとしての特性を示した。このことから、これらはLin-7C発現に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。

【0053】

そこで、被検薬剤としては、ミルタザピン、アポモルフィン、カフェイン、リスペリドン、およびクエチアピン、並びにブスピロンの6種を選択し、また、コントロールとしてジメチルスルホキシド(DMSO)を用いた。

【0054】

具体的には、SAS-H1細胞を、37℃に維持したインキュベーター内で、5%の二酸化炭素と95%の空気で湿度が維持された雰囲気の下で、100×20mm ディッシュ(Corning Life Sciences社製)に、10% 牛胎児血清(Sigma-Aldrich社製)と50単位/mlのペニシリンとストレプトマイシン(Sigma-Aldrich社製)を含むDMEM(Sigma-Aldrich社製)にて培養した。細胞が80% コンフルエントになった状態で被検薬剤をそれぞれ10μMの濃度で作用させ、24時間後に細胞を回収した。回収した細胞におけるLin7C、CASK、およびカテニンの発現を、mRNAレベルおよびタンパク質レベルで測定した。mRNAレベルの発現の測定に際し、トータルRNAを抽出した。トータルRNAはメーカーのプロトコルに従って、回収した細胞からトリゾール試薬(Trizol(登録商標) Reagent; Invitrogen社製)を使って抽出した。トータルRNAからcDNAへの逆転写には、レディ-トゥ-ゴー ユー-プライム ファースト-ストランド ビーズ(Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads; GE Healthcare社製)と、オリゴ(dT)プライマー(oligo(dT) primer; 北海道システムサイエンス社製)を用いた。タンパク質の抽出は、培養細胞を7Mの尿素、2Mのチオ尿素、4%(w/v) CHAPS、10mM Tris pH8.0を含む溶解バッファーによって処理し、超音波処理を氷上で3×10sパルスで行うことにより溶解した。サンプルは20分間、13,000rpmで遠心分離し、タンパク質を含んでいる上清を採取した。タンパク質濃度はプロテイン アッセイ キット(Protein Assay Kit; Bio-Rad Laboratories社製)によって測定し、溶解バッファーによって1mg/mlに調節した。タンパク質サンプルは30mM Tris-HClでpH8.5に調整した。

【0055】

mRNAの発現レベルを測定するための定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)は以下の方法で行った。Lin7C遺伝子のmRNA発現を確認するためのプライマーとして、5'-TTC CAT TCC TAG AGA CAA ACC AG-3'(配列番号1)及び5'-TTT TCC TTC TTT GCT TCA GCT AC-3'(配列番号2)を設計した。CASK遺伝子のプライマーは、5'-GGC TGC TAG AGA CAG CCA GT-3'(配列番号3)及び5'-GAT CAA AGG CTG TAA AAA GGT AAC A-3'(配列番号4)を、カテニンのプライマーは、5'-GCT TTC AGT TGA GCT GAC CA-3'(配列番号5)及び5'-CAA GTC CAA GAT CAG CAG TCT C-3'(配列番号6)を設計した。内在性コントロールとして用いたグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)のプライマーは、5

10

20

30

40

50

’ - G C C C A A T A C G A C C A A A T C C - 3 ’ (配列番号 7) 及び 5
’ - A G C C A C A T C G C T C A G A C A C - 3 ’ (配列番号 8) を設計
した。R T - P C R の試薬は、ライトサイクラー (登録商標) ファーストスタート D N
A マスター S Y B R グリーン I キット (L i g h t C y c l e r ^(R) F a s t
S t a r t D N A M a s t e r S Y B R G r e e n I k i t ; R o c h e
D i a g n o s t i c s 社製) を用いて行った。L i g h t C y c l e r (R o c h e 社
製) を使用した P C R 反応は、通常の方法に従い 1 0 μ l の F i r s t S t a r t D N
A M a s t e r S Y B R G r e e n I m i x 、 3 m M の M g C l ₂ 、 0 . 2 μ l
のプライマーを含む最終反応容量 2 0 μ l の混合液を使用した。反応条件として、初期変
性は 9 5 3 分、増幅のためのサイクル数は 4 5 回で、変性 9 5 3 0 秒、アニーリング
6 3 3 0 秒、伸長反応 7 2 3 0 秒とした。目的遺伝子の m R N A 量は、コントロール
として用いた G A P D H の発現量に対する相対値として表現した。

10

【 0 0 5 6 】

L i n 7 C 、 C A S K 、および カテニンのタンパク質レベルでの測定はウエスタンブ
ロットティング法を用いた。タンパク質抽出溶液を 1 0 % ポリアクリルアミドゲルにて電気
泳動を行い、ニトロセルロース膜 (I n v i t r o g e n 社製) へ転写した。0 . 1 % T
w e e n - 2 0 含有 T B S (T B S T) で洗浄後、ブロッキングワシ (ナカライテスク社
製) でブロッキングを 3 0 分を行い、L i n 7 C 抗体、C A S K 抗体、 カテニン抗体を 4
にて 1 6 時間インキュベーションした。T B S T で洗浄後、ホースラディッシュペルオキ
シダーゼ (H R P) 結合 2 次抗体 (P r o m e g a 社製) を室温で 1 時間インキュベ
ーションし、スーパー シグナル ウェスト ピコ ケミルミネッセント サブストレート (S
u p e r S i g n a l W e s t P i c o C h e m i l u m i n e s c e n t
s u b s t r a t e ; T h e r m o F i s h e r s c i e n t i f i c 社製) で発光
し可視化させた。シグナル強度は、C S アナライザー (C S a n a l y z e r ; A T
T O 社製) にて定量化し、コントロールとして測定した G A P D H のタンパク質レベルと
の相対値で表現した。

20

【 0 0 5 7 】

図 1 - A および図 1 - B に結果を示す。6 種の被検薬剤の中で、ミルタザピンが最も効
果的に S A S - H 1 細胞における L i n 7 C 、 C A S K 、および カテニンの m R N A 発
現を上昇させた (図 1 - A) 。ミルタザピン処理による S A S - H 1 細胞での L i n 7 C
、 C A S K 、および カテニンの発現増加は、ウエスタンブロットティングによりタンパク
質レベルでも証明された (図 1 - B) 。

30

【 0 0 5 8 】

また、図 2 に示すように、ミルタザピンは 1 0 μ M で最も効果的に L i n 7 C 、 C A S
K 、および カテニン (C T N N B 1) の m R N A 発現を増強した。

【 実施例 2 】

【 0 0 5 9 】

実施例 1 で、被検薬剤 6 種の中で、ミルタザピンが最も効果的に S A S - H 1 細胞にお
ける L i n 7 C 、 C A S K 、および カテニンの m R N A 発現を上昇させること、並びに
、ミルタザピンは 1 0 μ M で最も効果的に L i n 7 C 、 C A S K 、および カテニン (C
T N N B 1) の m R N A 発現を増強することを明らかにした。

40

【 0 0 6 0 】

そこで、高転移性癌細胞株である S A S - H 1 細胞における L i n 7 C の発現への、ミ
ルタザピン、アポモルフィン、カフェイン、リスペリドン、およびクエチアピンの効果を
、各薬剤のさまざまな濃度で検討した。ミルタザピンについては、転移性の低い癌細胞株
である S A S 細胞における L i n - 7 C の発現への効果も検討した。

【 0 0 6 1 】

細胞は、各薬剤で処理し、C O ₂ インキュベーター内で 2 4 時間インキュベーションし
た。コントロール細胞は薬剤の代わりに D M S O で処理した。L i n 7 C の発現は、定量
的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (q R T - P C R) による m R N A 発現

50

レベルの測定、および、イムノブロットィングによるタンパク質レベルの測定により行った。

【0062】

まず、上記のように処理した細胞を使用してmRNA発現レベルの測定を行った。処理後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水（以下、PBSと略称する）で2回洗浄し、トータルRNAの抽出を行った。トータルRNAの抽出は、Trizol（登録商標）試薬（Invitrogen社製）を使って製造者仕様書に従って行った。相補的DNAは、5μgのトータルRNAから、Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads（GE Healthcare, Buckinghamshire, UK）と、oligo(dT) primer（北海道システムサイエンス社製）を用い、製造者仕様書に従って作製した。Lin7C、HTR2C、CASK、および カテニン（CTNNB1）のmRNA発現レベルの評価は、qRT-PCRを行って実施した。qRT-PCR解析は、ユニバーサルプロープライブラリー（Roche Diagnostics社製）により設計されたプライマーとプローブを使用して行った。データの値はコントロール細胞について標準化した。Lin7C mRNAの増幅用に、配列番号1に記載の塩基配列からなるプライマー、配列番号2に記載の塩基配列からなるプライマー、およびユニバーサルプローブ#77を使用した。HTR2C mRNAの増幅用に、配列番号13に記載の塩基配列からなるプライマー、配列番号14に記載の塩基配列からなるプライマー、およびユニバーサルプローブ#27を使用した。CASK mRNAの増幅用に、配列番号15に記載の塩基配列からなるプライマー、配列番号16に記載の塩基配列からなるプライマー、およびユニバーサルプローブ#2を使用した。カテニン（CTNNB1）mRNAの増幅用に、配列番号17に記載の塩基配列からなるプライマー、配列番号18に記載の塩基配列からなるプライマー、およびユニバーサルプローブ#17を使用した。qRT-PCRの全工程は、ライトサイクラー（登録商標）480 PCR システム（Roche社製）を使用して実施した。増幅は、95 での10分間の予備インキュベーションにより開始し、次いで、鋳型変性のために95 10秒およびプライマーのアニーリング/伸長のために55 30秒を45サイクル行い、そして冷却工程を40 30秒行った。転写量は、各標準曲線から推定し、対応する試料で測定したグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（GAPDH）の転写物に対して標準化した。GAPDHのmRNAの増幅は、配列番号19に記載の塩基配列からなるプライマー、配列番号20に記載の塩基配列からなるプライマー、およびユニバーサルプローブ#60を使用した。

【0063】

次に、上記のように処理した細胞を使用して、イムノブロットィングを行った。まず、細胞を冷却PBSで2回洗浄して遠心処理を行った。細胞沈査を、プロテイナーゼ阻害剤カクテル（Roche社製）と共に、溶解緩衝液（7M 尿素、2M チオ尿素、4%（重量/容量）CHAPS、および10mM トリス（pH7.4））中で4 にて30分間インキュベーションした。タンパク質濃度はバイオラッド プロテイン アッセイ（Bio-Rad Protein Assay; Bio-Rad Laboratories社製）を使用して測定した。タンパク質抽出物（20μg）はドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により4-12%のゲル中で分離し、ニトロセルロース メンブレンに転写し、ブロッキング ワン（Blocking One; ナカライテスク社製）中で室温にて1時間ブロッキングした。当該メンブレンは、第1抗体で室温にて4時間インキュベーションした。メンブレンは0.1% ツイーン20を含むトリス緩衝生理食塩水で洗浄し、第2抗体と共に室温で1時間インキュベーションして、ホースラディッシュ パーオキシダーゼを結合させた、抗ウサギIgG、抗ヤギIgG、または抗マウスIgG（Promega社製）と結合させた。タンパク質の検出は、スーパーシグナル ケミルミネッセント サブストレート（SuperSignal Chemiluminescent substrate; Thermo社製）により行った。最後に、イムノブロットィング解析の結果を、上記メンブレンを、冷却したCC

10

20

30

40

50

Dカメラシステム（ＡＴＴＯ社製）に曝すことにより可視化した。シグナル強度は、ＣＳアナライザー ソフトウェア バージョン３．０（ＡＴＴＯ社製）を使用して定量化した。

【００６４】

検討した薬剤のうち、ミルタザピン（１０μＭ）で処理したＳＡＳ－Ｈ１細胞ではＬｉｎ７Ｃ ｍＲＮＡレベルが有意に上昇（約４倍増加）し、一方、ＳＡＳ細胞ではミルタザピンによる明らかな影響は認められなかった（図３のパネルＡおよびパネルＢ）。これに対し、アポモルフィン、カフェイン、およびクエチアピンで処理したＳＡＳ－Ｈ１細胞では、Ｌｉｎ７Ｃ ｍＲＮＡ発現に関する感受性の著しい増加は、ミルタザピン処理細胞と比較して認められなかった（図３のパネルＣ－Ｆ）。

10

【００６５】

また、Ｌｉｎ－７Ｃ、ＣＡＳＫ、および カテニン（ＣＴＮＮＢ１）の発現レベルは、ＳＡＳ細胞ではミルタザピン処理の有無に拘らず変化がなかった（図４のパネルＡ）。これに対し、ＳＡＳ－Ｈ１細胞では、ミルタザピン処理により未処理のものと比較して、これら３つの遺伝子すべての高発現が認められた（図４のパネルＢ）。ミルタザピン処理したＧ－３６１細胞では、ミルタザピン処理により、ＣＡＳＫ発現は意外にも変化しなかったが、Ｌｉｎ－７ＣおよびＣＡＳＫの発現上昇が検出された（図４のパネルＣ）。

【００６６】

ミルタザピンは検討した細胞株のいずれにおいてもＨＴＲ２Ｃタンパク質発現に影響を及ぼさなかった（図５のパネルＢおよび図６）。しかしながら、ＨＴＲ２Ｃの下流の分子であるＬｉｎ－７Ｃ、ＣＡＳＫ、および カテニン（ＣＴＮＮＢ１）の有意な発現上昇が、ミルタザピン（１０μＭ）で２４時間処理した高転移性癌細胞（ＳＡＳ－Ｈ１細胞およびＧ－３６１細胞）でのみ検出された。これに対し、ＳＡＳ細胞ではＬｉｎ－７Ｃ発現上昇は検出されなかった（図５のパネルＡおよびパネルＢ、並びに図６）。

20

【実施例３】

【００６７】

癌細胞の増殖、浸潤能、および遊走能へのミルタザピンの作用を、高浸潤性癌細胞株であるＳＡＳ－Ｈ１細胞およびＧ－３６１細胞、並びに浸潤性の低い癌細胞株であるＳＡＳ細胞を用いて検証した。

【００６８】

30

〔細胞増殖アッセイ〕

細胞を６ウェルプレートに、生細胞１×１０^４／ウェルの密度で播種した。試験は７日間行い、２４時間ごとに細胞を計数した。細胞の計数は、細胞をトリプシン処理した後、ヘモサイトメーターを使用して行った。計数はトリプリケートサンプルについて行った。そして、ミルタザピン処理細胞とコントロール細胞との間で、細胞数の比較を行った。

【００６９】

〔浸潤アッセイ〕

総数２×１０^５個の各細胞株（ＳＡＳ、ＳＡＳ－Ｈ１、およびＧ－３６１）を、ミルタザピン（１０μＭ）または溶媒で２４時間処理した。次いで、細胞を無血清培地に再懸濁し、トランスウェル アパラス（Ｂecton Dickinson社製）中に設置した孔サイズ３μｍのポリエチレンテレフタレート メンブレンインサート（製品名：ＢＤセルカルチャーインサート；Ｂecton-Dickinson社製）上に播種した。下部チャンバーに、ミルタザピン（１０μＭ）または溶媒を含む２ｍｌの無血清培地を化学遊走物質として添加した。細胞を３７℃で７２時間インキュベーション後、該インサートをＰＢＳで洗浄し、該インサートの上部表面上の細胞を綿棒で除去した。該メンブレンの下部表面に接着している細胞をクリスタルバイオレット／メタノールで染色し、該孔を通過した細胞数を、光学顕微鏡１００倍の視野にて５か所のランダムな視野で計数した。

40

【００７０】

〔遊走アッセイ〕

ミルタザピンの抗遊走能を検討するために、細胞（ＳＡＳ、ＳＡＳ－Ｈ１、およびＧ－

50

361)を10% FBS/DMEMを加えた6ウエルプレートに播種し、コンフルエントな単層が形成されるまでインキュベーションした。マイクロピペットチップを使用して、各ウエルの中央に1つの傷口(wound)を作った。ミルタザピンで処理後に、培地を無血清培地に交換し、5% 二酸化炭素の雰囲気下で37℃にてインキュベーションした。結果は、細胞のない傷口の面積をレナラフ 220b ソフトウェア(Lenara f 220b software; Vector Japan社製)を使用して測定することにより可視化した。3つの別箇のチャンバーから得られたデータより平均値を算出した。

【0071】

ミルタザピンの細胞増殖への効果を検討するために、細胞の生育を7日間観察したところ、検討したすべての細胞株において、ミルタザピンで処理した細胞と処理しなかった細胞の差異は何ら認められなかった(図7)。

10

【0072】

次に、細胞の浸潤挙動へのミルタザピンの効果を検討したところ、ミルタザピンを含む培地中でインキュベーションしたSAS-H1細胞およびG-361細胞は、処理しなかった細胞と比較して、いずれも有意($P < 0.05$)な浸潤性の低減を示した(図8のパネルAおよびパネルB)。

【0073】

さらに、細胞の遊走能へのミルタザピンの効果を検討したところ、ミルタザピンを含む培地中でインキュベーションしたSAS-H1細胞およびG-361細胞は、処理しなかった細胞と比較して、いずれも有意($P < 0.05$)な遊走能の低減を示した(図8のパネルCおよびパネルD)。

20

【0074】

これら結果は、ミルタザピンが癌細胞の転移能を*in vitro*で有意に防止できることを示唆する。

【実施例4】

【0075】

生体内(*in vivo*)におけるミルタザピンの癌転移抑制効果を検討した。具体的には、ヒト培養口腔扁平上皮癌細胞株SAS、高浸潤性ヒト培養口腔扁平上皮癌細胞株SAS-H1、並びに浸潤性を有するヒト培養悪性黒色腫細胞株G-361を用いた異種移植モデルを作製し、検討を行った。

30

【0076】

細胞 2×10^5 個をヌードマウス(BALB/cAnNCrj-nu/nu mice; Charles River Japan社)の舌部分に直接的に注入し、ランダムに非投与群($n = 5$)、コントロール群($n = 5$)、およびミルタザピン投与群($n = 5$)の3群に分けた。ミルタザピンは1% Tween 80(Sigma社製)水溶液中に懸濁し、10mg/kgの用量で4週間に亘って毎日1回経口投与した。コントロール群には、全実験期間を通じて溶媒を投与した。実験動物の管理と使用は機関のガイドラインに従って実施した。

【0077】

40

移植4週間後に、舌、顎下腺、肺、肝臓、および腎臓の各臓器をマウスから採取した。体重は4週間の処置の期間を通して測定した。各ゲノムDNAを、それぞれのホモジネートから、ウィザード SV ゲノミック DNA ピューリフィケーション システムキット(Wizard SV Genomic DNA Purification System kit; Promega社製)を用いて直ちに抽出した。各組織における腫瘍細胞由来DNAを測定するために、20ngのDNAを対象としてqRT-PCRを行い、ヒトAlu配列の検出を行った。Alu PCRシグナル量(およびそれによるヒト腫瘍細胞転移量)を増幅されたゲノムDNA量(およびそれによるマウス組織量)と関連付けるため、マウスGAPDH遺伝子を内部コントロールとして使用した。

【0078】

50

ヒト特異的反復配列 A l u の解析に用いたプライマーは、配列番号 9 に記載のプライマーおよび配列番号 10 に記載のプライマーである。q R T - P C R は、S Y B R (登録商標) グリーン q R T - P C R マスター ミックス キットを使用して製造者の手順書 (R o c h e 社) に従って実施した。P C R の反応条件として、95 で 3 分のポリメラーゼ活性、次いで 95 30 秒、63 30 秒、および 72 30 秒のサイクルを 40 回行った。各アッセイは、陰性コントロール (R N A 分解酵素を含まない水)、陽性コントロール (ヒトゲノム D N A)、および実験サンプルについてトリPLICATEで行った。マウス D N A の定量測定は、マウス G A P D H D N A 配列を増幅することで実施した。G A P D H D N A 配列の増幅は、マウス G A P D H プライマー (配列番号 11 および配列番号 12) を使用して、A l u のための P C R 条件と同じ条件で行った。各サンプルの C t 値を、ライトサイクラー (登録商標) 480 P C R システム (R o c h e 社製) を使用して、サンプル中の P C R 産物量の定量尺度 (q u a n t i t a t i v e m e a s u r e) として記録した。A l u シグナルは、マウス G A P D H の相対量に対して標準化し、そして $C t = (C t_{A l u} - C t_{G A P D H})$ として表示した。マウスの総ゲノム D N A 量に相対的な A l u シグナルの変化は $C t = C t_{t r e a t m e n t} - C t_{c o n t r o l}$ として表示した。そして、転移の相対的变化を $2^{-C t}$ として算出した。

10

【0079】

統計解析は S P S S 17.0 ソフトウェア (S P S S 社製) またはマイクロソフトエクセル (マイクロソフト社製) を使用して実施した。単一群のデータはマン・ホイットニーの U 検定 (M a n n - W h i t n e y U t e s t) を使用して評価した。各組織の転移レベルの統計的有意差は、一元配置分散分析法 (o n e - w a y a n a l y s i s o f v a r i a n c e) と多重比較のための対比事後テューキー - クレーマー法 (p o s t h o c T u k e y - K r a m e r t e s t f o r m u l t i p l e c o m p a r i s o n s) とを使用して評価した。両側 P 値が < 0.05 であるとき、有意差があるとみなした。データは、平均 ± 標準誤差で表示した。

20

【0080】

可視転移病巣は遠隔臓器で観察されなかったが、A l u P C R の結果から、S A S - H 1 細胞を移植したマウスおよび G - 361 細胞を移植したマウスでは、顎下腺、肺、肝臓、および腎臓に、S A S 細胞を注入したマウスの組織と比較して、有意 (P < 0.05) に多くのヒトゲノム D N A が含まれていることが示された (図 9)。

30

【0081】

この結果から、ミルタザピンが i n v i v o における癌細胞転移を阻害する作用を有することが明らかになった。実施例 2 に示したように、S A S - H 1 細胞および G - 361 細胞では L i n - 7 C が低発現であること (図 5 のパネル A)、およびミルタザピン処理により L i n - 7 C の発現が増加したこと (図 5 のパネル B) から、ミルタザピンの癌細胞転移抑制作用は L i n - 7 C の発現増加を介すると考えることができる。したがって、ミルタザピンは特に L i n - 7 C の低発現が認められる癌細胞の転移の抑制に有用であると考える。

【0082】

また、ミルタザピン投与による副作用はほとんど認められず、ミルタザピン投与群のマウスの平均体重は、投与後のいずれの時点においても、コントロール群のものと比較して低下することはなかった (図 10)。

40

【産業上の利用可能性】

【0083】

本発明に係る癌転移抑制剤、癌治療用組成物、および併用投与用癌治療剤は、薬剤の服用という非常に簡便な方法のみで癌の転移および浸潤を抑制する効果を示す。このように、本発明は、癌に対する新規治療薬として極めて有用である。

【配列表フリーテキスト】

【0084】

50

配列番号 1 : ヒト *Lin7C* 遺伝子の増幅用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 2 : ヒト *Lin7C* 遺伝子の増幅用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 3 : ヒト *CASK* 遺伝子の増幅用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 4 : ヒト *CASK* 遺伝子の増幅用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 5 : ヒト *カテニン* 遺伝子の増幅用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

10

配列番号 6 : ヒト *カテニン* 遺伝子の増幅用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 7 : ヒト *GAPDH* 遺伝子の増幅用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 8 : ヒト *GAPDH* 遺伝子の増幅用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 9 : ヒト *Alu* 配列の解析用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 10 : ヒト *Alu* 配列の解析用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

20

配列番号 11 : マウス *GAPDH* 遺伝子の解析用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 12 : マウス *GAPDH* 遺伝子の解析用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 13 : ヒト *HTR2C* 遺伝子の増幅用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 14 : ヒト *HTR2C* 遺伝子の増幅用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 15 : ヒト *CASK* 遺伝子の増幅用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

30

配列番号 16 : ヒト *CASK* 遺伝子の増幅用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 17 : ヒト *カテニン* 遺伝子の増幅用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

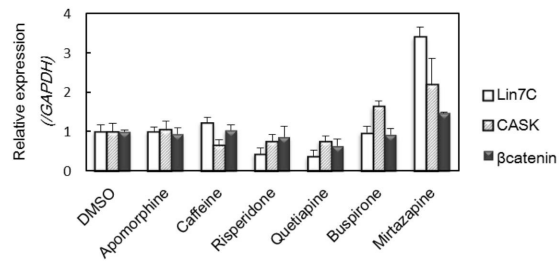
配列番号 18 : ヒト *カテニン* 遺伝子の増幅用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 19 : マウス *GAPDH* 遺伝子の解析用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

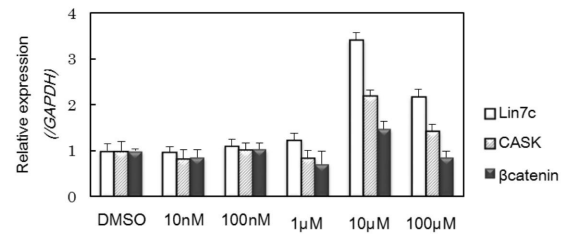
配列番号 20 : マウス *GAPDH* 遺伝子の解析用プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

40

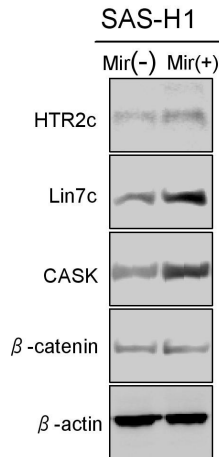
【 図 1 - A 】



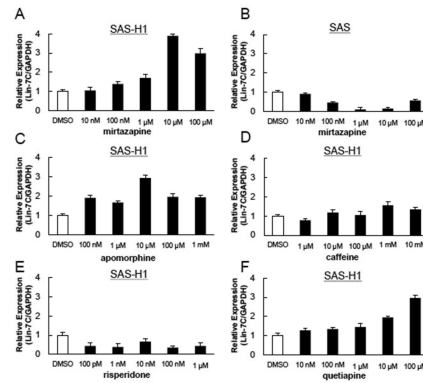
【 図 2 】



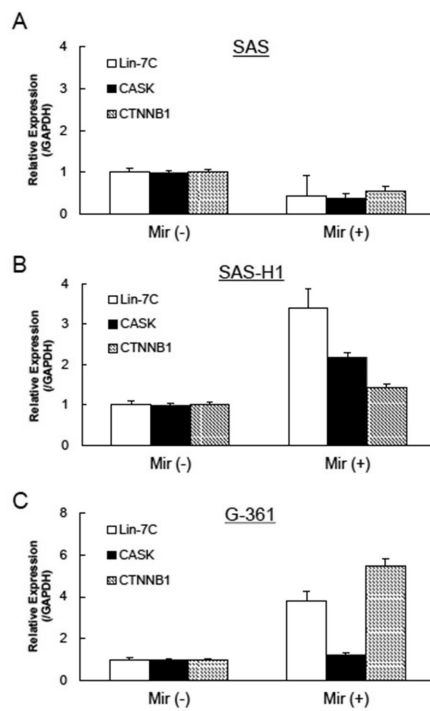
【 図 1 - B 】



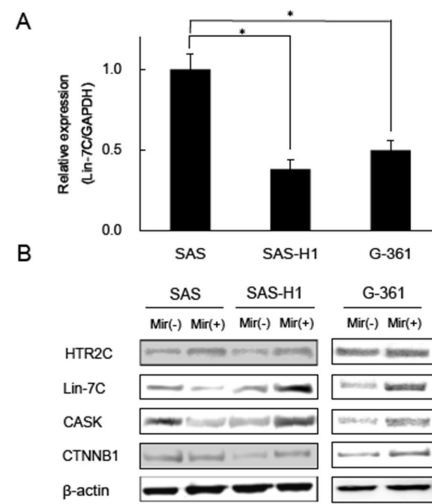
【 図 3 】



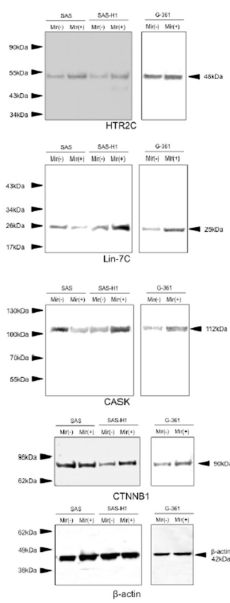
【 図 4 】



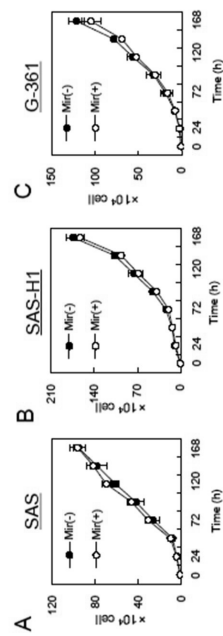
【 図 5 】



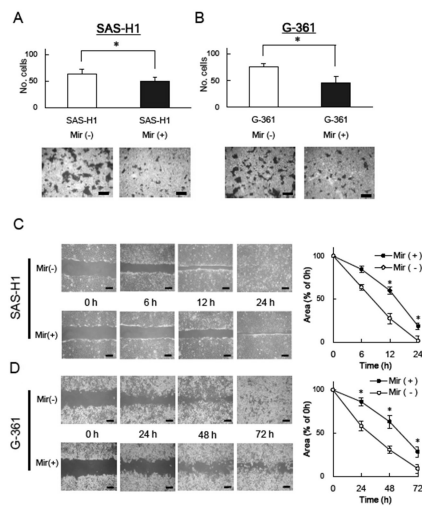
【図 6】



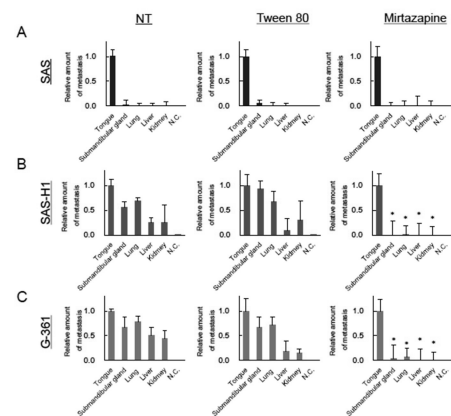
【図 7】



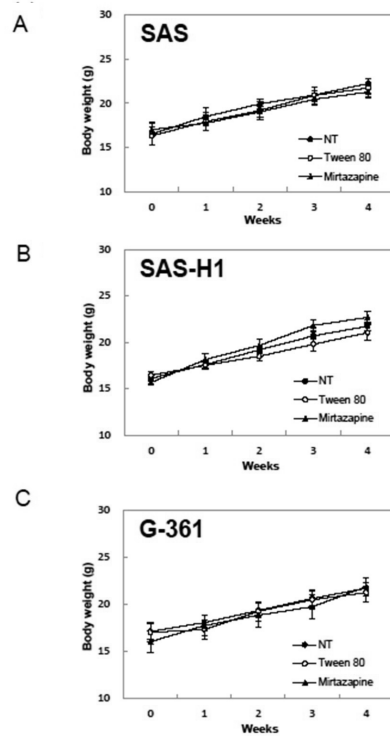
【図 8】



【図 9】



【 図 10 】



【 配列表 】

0006452954000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/68 (2018.01) C 1 2 Q 1/68

(56)参考文献 特表2009-537601(JP,A)
PLoS ONE, 2012年, Volume 7, Issue 7, e38886, page 1-12

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 5 5

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 4

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C 1 2 Q 1 / 6 8

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

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)