(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
2016 年 5 月 19 日(19.05.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/076359 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 31/7048 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/081741

(22) 国際出願日: 2015 年 11 月 11 日(11.11.2015)

(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 2014-228901 2014 年 11 月 11 日(11.11.2014) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目３番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 新家　一男(SHINYA Kazuo); 〒1350064 東京都江東区青海２－３－２６　国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Tokyo (JP). 鈴木　聡(SUZUKI Akira); 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目１０番１号　国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 西尾　美希(NISHIO Miki); 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目１０番１号　国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 日笠　弘基(HIKASA Hiroki); 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目１０番１号　国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 関戸　好孝(SEKIDO Yoshitaka); 〒4648681 愛知県名古屋市千種区鹿子殿１番１号　愛知県がんセンター内 Aichi (JP).

(74) 代理人: 平木　祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕２丁目５番１号　愛宕グリーンヒルズＭＯＲＩタワー３２階 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, 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, KN, KP, KR, 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.

[続葉有]

(54) **Title**: ANTICANCER AGENT CONTAINING IVERMECTIN OR MILBEMYCIN D AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 発明の名称 : イベルメクチン又はミルベマイシンＤを有効成分として含む抗癌剤

[図3]

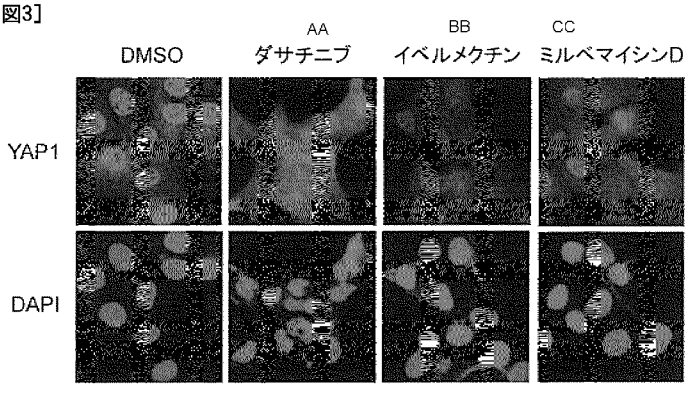


FIG. 3
AA Dasatinib
BB Ivermectin
CC Milbemycin D

(57) **Abstract**: Provided is an anticancer agent that acts on the Hippo pathway. This agent is for treating or preventing a cancer involving an abnormality in the Hippo pathway, and includes ivermectin or milbemycin D as an active ingredient.

(57) 要約:　Hippo 経路に作用する抗癌剤の提供。　イベルメクチン又はミルベマイシンＤを有効成分とする、Hippo 経路に異常を有する癌の予防又は治療剤。

WO 2016/076359 A1

(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)）

明　細　書

発明の名称 ：

イベルメクチン又はミルベマイシンＤを有効成分として含む抗癌剤

技術分野

[0001] 本発明は、Hippo経路に異常を有する癌の予防剤又は治療剤に関する。

背景技術

[0002] Hippo経路は、器官サイズや癌の発症・進展制御に関わるキナーゼ経路である。Hippo経路の非活性化状態では、下流の転写共役因子YAP1（YES関連タンパク質１）／TAZ（YAP1のパラログであるPDZ結合モチーフを有する転写共役因子）が主に転写因子TEAD（TEAドメインファミリー）と結合し、細胞増殖や細胞分裂に係わる標的遺伝子の発現を誘導することにより細胞増殖を促進する。一方、細胞接着やストレス刺激によりHippo経路が活性化されると、MSTキナーゼ（哺乳類Ste20様キナーゼ）とLATSキナーゼ（大腫瘍抑制キナーゼ）の二つのキナーゼカスケードを介して、YAP1/TAZをリン酸化することにより、これを核外に排除するとともに、タンパク質崩壊に導き、細胞増殖を負に制御する。

[0003] Hippo経路の遺伝子改変マウスはがんを発症し、ヒトがん患者では高頻度にHippo経路分子の発現低下や遺伝子変異を認め、がんの悪性度と相関することが知られている（非特許文献１、非特許文献２）。

[0004] 例えば、マウスの肝細胞でYAP1を過剰発現させると肝細胞や未熟胆管細胞の過形成によって肝臓が腫大し、肝癌を発症する。一方、肝細胞特異的なYAP1の欠損は、肝細胞や胆管細胞の減少と肝癌の発症が抑制される。また、マウスの角化細胞でYAP1を過剰発現させると表皮幹細胞・前駆細胞数及び角化細胞の増加や分化障害を呈し、扁平上皮癌を発症する。さらに、本発明者らは、LATSキナーゼのアダプター分子でありHippo経路のコアコンポーネントMOB1（Mps1バインダー１）の全身完全欠損マウスが胎生致死となり、MOB1の全身部分欠損マウスが全例に皮膚外毛根鞘癌を発症すること、ヒト皮膚外毛根鞘

癌においてもMOB1の発現消失やYAP1の活性化を認めることを報告した（非特許文献３）。

[0005] すなわち、Hippo経路は新しい癌抑制経路として注目されている。しかしながら、Hippo経路に作用する抗癌剤はこれまで得られていなかった。

[0006] イベルメクチンは、放線菌Streptomyces avermitilisが産生する16員環マクロライドであるアベルメクチンの化学誘導体であり、イベルメクチンB1a（22,23-ジヒドロアベルメクチンB1a）及びイベルメクチンB1b（22,23-ジヒドロアベルメクチンB1b）の混合物から成る（特許文献１）。イベルメクチンはヒト腸管糞線虫症の駆虫剤「ストロメクトール（登録商標）」として臨床使用されている。

[0007] ミルベマイシンＤは、放線菌Streptomyces hygroscopicus subsp. aureola crimosusが産生する16員環マクロライド類であり、駆虫剤として使用できることが知られている（特許文献２）。

[0008] イベルメクチン及びミルベマイシンＤは、無脊椎動物の神経及び筋細胞に存在するグルタミン酸作動性クロライドチャネルやγ-アミノ酪酸受容体と相互作用することが知られている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開昭54-61198号公報

特許文献2：特開昭56-32481号公報

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Nature Reviews Cancer、（米国）、2013年、第13巻、第4号、P.246-257

非特許文献2：Cancer Science、2013年、第104巻、第10号、P.1271-1277

非特許文献3：The Journal of Clinical Investigation、（米国）、2012年、第122巻、第12号、p.4505-4518

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、Hippo経路に作用する抗癌剤を提供することに関する。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、鋭意研究した結果、駆虫剤として知られているイベルメクチン及びミルベマイシンＤが、Hippo経路に異常を有する癌に対して優れた抗癌効果を示すことを見出した。

[0013] すなわち、本発明は以下のとおりである。

〔１〕イベルメクチン又はミルベマイシンＤを有効成分として含む、Hippo経路に異常を有する癌の予防又は治療剤。

〔２〕ミルベマイシンＤを有効成分として含む、〔１〕のHippo経路に異常を有する癌の予防又は治療剤。

〔３〕Hippo経路に作用し、YAP1/TAZの活性を抑制する、上記〔１〕又は〔２〕に記載の癌の予防又は治療剤。

〔４〕Hippo経路に異常を有する癌が、肝癌、胆管癌、悪性中皮腫、唾液腺癌、食道癌、口腔癌、胃癌、膵癌、子宮頚癌、子宮体癌、子宮肉腫、膀胱癌、脳腫瘍、悪性骨腫瘍、筋線維肉腫、横紋筋肉腫、非メラノーマ皮膚癌又は外毛根鞘癌である、上記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の癌の予防又は治療剤。

[0014] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2014-228901号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、新しい癌抑制作用に基づく抗癌剤を提供することができ、単剤療法及び既存の抗癌剤との併用療法による抗癌効果のみならず、既存の抗癌剤で十分な治療効果が得られなかった症例に対する抗癌効果も期待できる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]イベルメクチン(イベルメクチンB_{1a}及びイベルメクチンB_{1b}) 及びミルベ

マイシンＤの化学式を示す図である。

[図2]イベルメクチン又はミルベマイシンＤで処理したH1299細胞株におけるYAP1タンパク質（YAP1）及びリン酸化YAP1タンパク質（pYAP1）をウェスタンブロッティングによって検出した結果を示す図である。

[図3]イベルメクチン又はミルベマイシンＤで処理したH1299細胞株におけるYAP1タンパク質全量（YAP1）を免疫蛍光染色によって検出した結果を示す図である。

[図4]イベルメクチン（図４A)又はミルベマイシンＤ（図４B)で処理したH1299細胞株におけるYAP1標的遺伝子（CTGF）の発現量を定量的RT-PCRによって検出した結果を示す図である。

[図5]Hippo経路に異常を有する細胞株をイベルメクチン（図５A)又はミルベマイシンＤ（図５B)で処理し、細胞数をカウントした結果を示す図である。

[図6]Hippo経路に異常を有する癌モデルマウスにイベルメクチンを投与し、肝臓の肉眼的解析（Ａ）、組織学的解析（Ｂ）及び重量測定（Ｃ）の結果を示す図である。

[図7]ヒト混合型肝癌(cHC-CC）及び肝内胆管癌（ICC）におけるYAP1活性化を示す図である。図７Aのヒストグラムは、cHC-CC、ICC、肝細胞癌（HCC）、非腫瘍健常人胆管細胞（NT-Chol）及び肝細胞（NT-Hep）におけるYAP1活性化のグレード（％）を示す。図７Bは各グレードの典型例を示す。図７Cは混合型肝癌(cHC-CC）（グレード３）、肝内胆管癌（ICC）（グレード３）、肝細胞癌（HCC）（グレード２）及び非腫瘍部分（グレードＯ）のYAP1染色及びHE（ヘマトキシリン・エオジン）染色の典型例を示す。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0018] 本発明はイベルメクチン又はミルベマイシンＤを有効成分として含む癌の予防又は治療剤である。

[0019] イベルメクチンは、放線菌Streptomyces avermitilisが産生する１６員環マクロライドであるアベルメクチンの化学誘導体であり、イベルメクチンB_{1a}

（22,23-ジヒドロアベルメクチンB_{1a}、$C_{48}H_{74}O_{14}$）及びイベルメクチンB_{1b}（22,23-ジヒドロアベルメクチンB_{1b}、$C_{47}H_{72}O_{14}$）の混合物からなる。

[0020] ミルベマイシンＤ（$C_{33}H_{48}O_7$)は、放線菌Streptomyces hygroscopicus subsp. aureolacrimosusが産生する１６員環マクロライド類である。

[0021] イベルメクチン(イベルメクチンB_{1a}及びイベルメクチンB_{1b}）及びミルベマイシンＤの化学式を図１に示す。

[0022] 本発明において、イベルメクチン及びミルベマイシンＤは、イベルメクチン及びミルベマイシンＤの塩又は溶媒和物も含む。塩としては、好ましくは医薬として使用され得る医薬として許容される塩が挙げられ、塩水和物も塩無水物も含まれ、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アルミニウム等の無機塩基との塩；メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミン等の有機塩基との塩；リジン、オルニチン等の塩基性アミノ酸との塩及びアンモニウム塩が挙げられる。当該塩は、酸付加塩であってもよく、このような塩としては、具体的には、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の鉱酸；ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸等の有機酸；アスパラギン酸、グルタミン酸等の酸性アミノ酸との酸付加塩が挙げられる。

[0023] さらに、本発明において、イベルメクチン及びミルベマイシンＤは、イベルメクチン及びミルベマイシンＤの水和物等の医薬として許容し得る各種溶媒和物や結晶多形等も含む。

[0024] 哺乳類Hippo経路に関わる分子の具体例としては、Hippo経路のコアコンポーネントであるMST1/2(mammalian STE20-like protein 1/2)キナーゼ、LATS1/2(large tumor suppressor homolog 1/2)キナーゼ及びそれらのアダプター分子であるSAV1(Salvador Homolog 1)、MOB1(Mps One Binder Kinase Activator 1)、当該コアコンポーネント上流の分子であるFAT4 (FAT tumor suppressor homolog 4) 、DCHS1/2 (Dachsous1/2) 、NF2 (neurofibromin-2)、FRMD6 (FERM domain-containing 6) 、 WWC1 (WW and C2 domain-containing 1;

別名KIBRA）及びRASSF1/5（Ras association family member 1/5）、並びに当該コンポーネント下流の分子であるYAP1(Yes-Associated Protein 1)/TAZ(transcriptional co-activator with PDZ binding motif)及びTEAD1-4（TEA domain family 1-4）等が挙げられる。

[0025] 癌がHippo経路に異常を有する癌であるか否かは、癌細胞において上記のMST1/2キナーゼ、LATS1/2キナーゼ及びそれらのアダプター分子であるSAV1、MOB1、並びに当該コアコンポーネント上流の分子であるFAT4、DCHS1/2、NF2、FRMD6、WWC1及びRASSF1/5等に異常があるか否かを確認することにより決定することができる。これらの分子の異常の確認は、これらの分子の発現量や活性を測定することにより行うことができる。例えば、ELISA等の方法により発現タンパク質を定量したり、ウエスタン法でリン酸化を定量したり、PCR法により遺伝子の転写量を測定すればよい。

[0026] Hippo経路に異常を有する癌として、肝癌、胆管癌、悪性中皮腫、唾液腺癌、食道癌、口腔癌、胃癌、膵癌、子宮頚癌、子宮体癌、子宮肉腫、膀胱癌、脳腫瘍、悪性骨腫瘍、筋線維肉腫、横紋筋肉腫、非メラノーマ皮膚癌及び外毛根鞘癌等が挙げられ、イベルメクチン又はミルベマイシンＤを有効成分として含む癌の予防又は治療剤は、これらの癌の予防又は治療剤として用いることができる。本発明のイベルメクチン又はミルベマイシンＤを有効成分として含む癌の予防又は治療剤が予防又は治療対象とする癌からは、大腸癌、直腸癌、肺癌、膠芽腫、メラノーマ、尿路上皮癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、NF2異常神経鞘腫は除かれる。

[0027] 本発明のイベルメクチン又はミルベマイシンＤを有効成分として含む癌の予防又は治療剤は、製薬上許容される担体や希釈剤等を含んでいてもよい。担体としては、限定されないが、生理的食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、及び緩衝生理食塩水等が上げられる。

[0028] 投与経路は、経口投与、又は口腔内、気道内、胸腔内、直腸内、腹腔内、皮下、筋肉内及び静脈内などの非経口投与が挙げられる。望ましくは経口投与である。投与形態としては、種々の形態で投与することができ、それらの

形態としては、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、細粒剤、噴霧剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等が挙げられる。

[0029] 乳剤及びシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖などの糖類；ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類；ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類；ｐ－ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤；ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造できる。

[0030] カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、細粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトールなどの賦形剤；デンプン、アルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤；ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤；脂肪酸エステルなどの界面活性剤；グリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造できる。

[0031] 注射剤は、水、ショ糖、ソルビトール、キシロース、トレハロース、果糖などの糖類；マンニトール、キシリトール、ソルビトールなどの糖アルコール；リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、グルタミン酸緩衝液などの緩衝液；脂肪酸エステルなどの界面活性剤などを添加剤として用いることができる。

[0032] 本発明の癌の予防又は治療剤は、さらにpH調整剤、抗酸化剤、安定化剤、保存剤、増粘剤、キレート化剤、保湿剤、着色剤、等張剤等を含んでいてもよい。

[0033] 本発明の癌の予防又は治療剤の投与量は、限定されないが、含有される成分の有効性、投与形態、投与経路、疾患の種類、投与する患者の体重、年齢、病状等の特性、あるいは医師の判断等に応じて適宜選択される。例えば患者の体重１kgあたり約0.01μｇ～約100mg、好ましくは約0.1μｇ～約１mg程度の範囲である。投与量は１日１～数回に分けて投与することができ、数日又は数週間に１回の割合で間欠的に投与してもよい。

実施例

[0034] 本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実

施例によって限定されるものではない。

[0035] 実施例１：Hippo経路の転写活性を阻害する化合物のハイスループット・スクリーニング

Hippo経路の破綻による発癌は、下流の転写共役因子YAP1/TAZの活性が増大し、YAP1/TAZが結合する転写因子TEADの標的遺伝子の転写が活性化することによって引き起こされる。そこで、YAP1/TAZの阻害剤をハイスループット・スクリーニングにより選別した。

[0036] Hippo経路の転写活性を高感度に検出できるレポーター遺伝子として、YAP1/TAZが結合する転写因子TEADの標的遺伝子である結合組織増殖因子（CTGF）のTEAD結合配列に反復・塩基付加を施し、ルシフェラーゼを連結させたレポーター遺伝子を構築した。当該レポーター遺伝子をヒト非小細胞肺癌細胞株H1299及びヒト乳腺上皮細胞株MCF10Aに導入したヒト安定細胞株を樹立し、384ウェルマイクロプレートに１ウェル当たり1,000細胞を播き、CO_2インキュベーターで一晩培養した。次に、独立行政法人産業技術総合研究所が保有する1,282種の単離天然化合物ライブラリ及び10,240種の合成化合物ライブラリの化合物を最終濃度が各々10μＭ及び25μＭとなるように当該マイクロプレートに分注し、２４時間処理した後、ピッカジーン（登録商標）ブリリアンスターLT発光試薬キット（メーカーコード：207-15373、東洋ビーネット株式会社）及びCell Counting Kit－8（メーカーコード：CK04、株式会社同人化学研究所）を用いて、レポーター遺伝子導入細胞のルシフェラーゼ活性及び細胞生存率／細胞毒性を各々測定した。レポーター遺伝子導入細胞のルシフェラーゼ活性を顕著に抑制し、細胞毒性を示さない化合物をハイスループット・スクリーニングのヒット化合物とした。

[0037] その結果、YAP1/TAZの機能を阻害する化合物として、イベルメクチン及びミルベマイシンＤを得た。

[0038] 実施例２：YAP1/TAZの活性抑制

実施例１で得られた化合物によるYAP1/TAZの活性抑制効果について、ウェスタンブロッティング、免疫蛍光染色及び定量的RT-PCRを用いて検討した。

[0039] ヒト非小細胞肺癌細胞株であるH1299細胞株をイベルメクチン（終濃度10μM）又はミルベマイシンD（終濃度10μM）で24時間処理し、一次抗体として抗YAP1タンパク質抗体及び抗リン酸化YAP1タンパク質抗体（CSTジャパン株式会社）を使用し、二次抗体として西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ（HRP）標識抗体を使用して、ウェスタンブロッティングによりYAP1タンパク質量（YAP1）及びリン酸化YAP1タンパク質量（pYAP1）を検出した（図２）。抗β-アクチン抗体（シグマアルドリッチ）によるβ－アクチンの検出をローディングコントロールとして使用した。図２に示すようにイベルメクチン又はミルベマイシンD処理によりYAP1タンパク質量の減少及び不活性化型であるリン酸化YAP1タンパク質量の増加が認められた。

[0040] 免疫蛍光染色は定法に従って行った。H1299細胞株をカバースリップに播き、イベルメクチン（終濃度10μM）又はミルベマイシンD（終濃度10μM）で24時間処理し、４％パラホルムアルデヒドを加え、室温において５分間固定した。一次抗体として抗YAP1抗体を使用し、蛍光標識二次抗体を用いて免疫染色を行って、YAP1タンパク質の全量を検出した（図３）。細胞核はDAPIを用いて染色した。図３に示すように、イベルメクチン又はミルベマイシンD処理によりYAP1タンパク質の発現量が減少した。

[0041] 定量的RT-PCRは定法に従って行った。H1299細胞株をイベルメクチン（終濃度10μM）又はミルベマイシンD（終濃度10μM）で24時間処理し、RNAiso（タカラバイオ株式会社）を用いて細胞から全量RNAを抽出・精製し、トランスクリプター ファーストストランドcDNA合成キット（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）を用いて全量RNA１μｇの逆転写反応を行った。表１に示すプライマーを用いて、定量的RT-PCR解析を行い、YAP1下流の標的遺伝子CTGF（connective tissue growth factor; 結合組織増殖因子）の発現量を検出した（図４）。図４に示すようにイベルメクチン又はミルベマイシンD処理によりCTGFの転写が抑制された。

[0042] ダサチニブ（終濃度５μM）はSRCファミリーキナーゼYESの阻害剤であり、リン酸化制御によってYAP1の活性を阻害することが知られていることから

、ポジティブコントロールとして用いた。

[0043] [表1]

プライマー	配列
Human GAPDH Fw	gtg aag gtc gga gtc aac g (配列番号１)
Human GAPDH Rv	tga ggt caa tga agg ggt c (配列番号２)
Human CTGF Fw	ttg gcc cag acc caa cta tg (配列番号３)
Human CTGF Rv	cag gag gcg ttg tca ttg gt (配列番号４)

[0044] イベルメクチン又はミルベマイシンＤで処理することにより、YAP1タンパク質量の減少及び不活性化型であるリン酸化YAP1タンパク質量の増加が見られ、YAP1タンパク質下流の標的遺伝子であるCTGFの転写が抑制された。

[0045] イベルメクチン及びミルベマイシンＤは、Hippo経路に作用して、YAP1/TAZの機能を阻害することが示唆された。

[0046] 実施例３：細胞増殖抑制

実施例１で得られた化合物の細胞増殖抑制効果について、細胞数をカウントして検討した。

[0047] MOB1はHippo経路のコアコンポーネントであり、LATSキナーゼのアダプターとしてLATSキナーゼの活性を強力に促進する。MOB1欠損マウスの解析から、MOB1の欠損によって癌を発症することが知られている。

[0048] Hippo経路に変異を有する細胞株として、タモキシフェン（Tamo）誘導性にMob1を欠損させた不死化肝細胞株（imMob1DKOLP）及びYAP1が定常的に活性化しているNF2欠損胸膜中皮腫細胞株（NCI-H290）を用いて、24ウェルプレートに１ウェル当たり1.5×10^4細胞を播き、各細胞をイベルメクチン又はミルベマイシンＤ（いずれも終濃度10μＭ）で３日間処理した後、24ウェルプレートに１ウェル当たり1.5×10^4細胞を播き、細胞数をカウントすることで細胞増殖を検討した。タモキシフェンはイベルメクチン又はミルベマイシンＤで処理する５日前に添加した。ダサチニブ（終濃度0.5μＭ）はポジティブコントロールとして用いた。結果を図５に示した。

[0049] 図５に示すように、Hippo経路に異常を有する細胞株をイベルメクチン又は

ミルベマイシンＤで処理することにより、当該細胞株の細胞増殖が抑制された。

[0050] 実施例４：In vivo投与による抗癌効果

実施例１で得られた化合物の抗癌効果について、Hippo経路に異常を有する癌モデルマウスを用いて検討した。

[0051] 肝臓特異的にMob1を欠損したマウス（LDKO）に２mg/kgのイベルメクチン又はコントロールとしてDMSOを５日間（生後４～８日）腹腔内投与し、生後10日目のマウスから肝臓を摘出し、肉眼的解析（図６Ａ）、ヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的解析（図６Ｂ）及び重量測定（図６Ｃ）を行った。イベルメクチンを投与したマウスにおいて、図６A及び図６Cに示すように肝臓の大きさ及び重量は減少し、図６Bに示すように未分化胆管細胞様細胞の門脈周囲及び内部への増殖が抑制された。重量は、マウスの体重に対する肝臓重量の割合として算出した。

[0052] Hippo経路に異常を有する癌モデルマウスにイベルメクチンを投与することにより、前癌病変である肝臓及び胆管の過形成が抑制された。

[0053] 参考例１

外科的に切除した混合型肝癌(cHC-CC)、肝内胆管癌（ICC）及び肝細胞癌（HCC）組織をホルマリンで固定し、抗YAP1抗体（Sigma社）を用いて常法で染色した。非腫瘍健常人胆管細胞(NT-Chol)及び肝細胞(NT-Hep)をコントロールとして用いた。YAP1の活性化のグレードは表２の基準により決定した。結果を図７に示す。

[0054] 図７Aに示すように、グレード２を超えるYAP1活性化は、混合型肝癌(cHC-CC)、肝内胆管癌（ICC）及び肝細胞癌（HCC）で、それぞれ、62%、51%及び26%であり、非腫瘍健常人胆管細胞及び肝細胞では、それぞれ、14%及び６%であった。すなわち、混合型肝癌(cHC-CC)、肝内胆管癌（ICC）において、YAP1が顕著に活性化していた。この結果は、Hippo経路の下流の転写共役因子であるYAP1/TAZの活性を抑制することにより混合型肝癌(cHC-CC)及び肝内胆管癌（ICC）の発症を抑制し得ることを示す。

[0055] [表2]

YAP1 活性グレードの決定

YAP1 活性のグレード 0-4 は 'Frequency Score' x 'Intensity Score' により決定した。

(i) 核中の染色細胞の%	Frequency Score
<5%	0
6-25%	1
26-50%	2
51-75%	3
>75%	4

(ii) 染色強度	Intensity Score
無染色	0
青白い	1
黄	2
褐色	3

'Frequency Score (i)' x 'Intensity Score (ii)'	グレード
0	0
1-3	1
4-6	2
7-9	3
10-12	4

[0056] 比較例１：他のミルベマイシン類によるHippo経路の転写阻害活性

ミルベマイシンＤの類縁体である他のミルベマイシン類（ミルベマイシンA_1、ミルベマイシンA_3及びネマデクチン）について、実施例１と同様の方法を用いて、レポーター遺伝子導入細胞のルシフェラーゼ活性を指標として、Hippo経路の転写阻害活性を検討した（表３）。

[0057] その結果、ミルベマイシンA_1、ミルベマイシンA_3及びネマデクチンは、本発明で得られたミルベマイシンＤのような強い阻害活性を示さなかった。驚くべきことに、類縁体であってもHippo経路に対する作用が異なり、ミルベマイシンＤが最も強い阻害活性を示すことが明らかとなった。

[0058]

[表3]

化合物名	ミルベマイシン A_1	ミルベマイシン A_3	ネマデクチン	ミルベマイシン D
Luc 活性 (%)	6.0	6.0	*	6.7

*:終濃度 10μMにおける阻害活性は認められなかった。

[0059] 以上の結果、イベルメクチン及びミルベマイシンＤは、Hippo経路に異常を有する癌に対する予防剤又は治療剤として有用である。

産業上の利用可能性

[0060] イベルメクチン及びミルベマイシンＤはHippo経路に異常を有する癌の予防又は治療剤として用い得る。

配列表フリーテキスト

[0061] １～４ プライマー

[0062] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

[請求項1] イベルメクチン又はミルベマイシンＤを有効成分として含む、Hippo経路に異常を有する癌の予防又は治療剤。

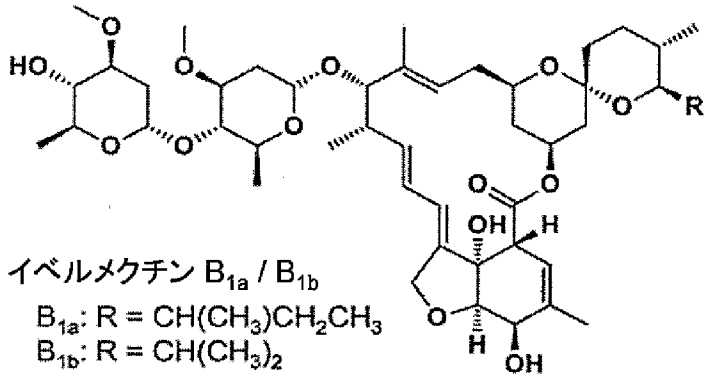
[請求項2] ミルベマイシンＤを有効成分として含む、請求項１記載のHippo経路に異常を有する癌の予防又は治療剤。

[請求項3] Hippo経路に作用し、YAP1/TAZの活性を抑制する、請求項１又は２に記載の癌の予防又は治療剤。

[請求項4] Hippo経路に異常を有する癌が、肝癌、胆管癌、悪性中皮腫、唾液腺癌、食道癌、口腔癌、胃癌、膵癌、子宮頚癌、子宮体癌、子宮肉腫、膀胱癌、脳腫瘍、悪性骨腫瘍、筋線維肉腫、横紋筋肉腫、非メラノーマ皮膚癌又は外毛根鞘癌である、請求項１～３のいずれか１項に記載の癌の予防又は治療剤。

[図1]

A

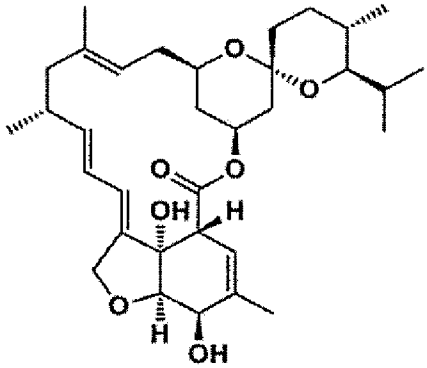


イベルメクチン B_{1a} / B_{1b}

B_{1a}: R = $CH(CH_3)CH_2CH_3$

B_{1b}: R = $CH(CH_3)_2$

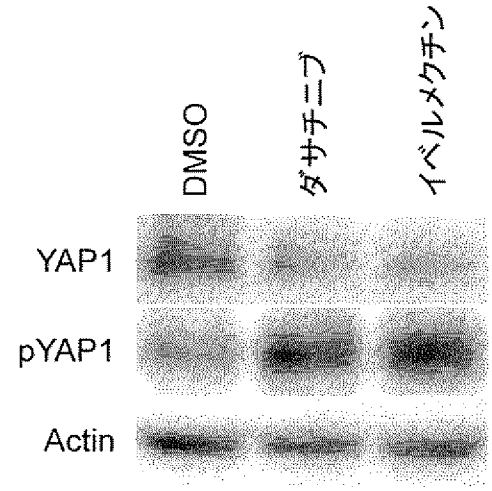
B



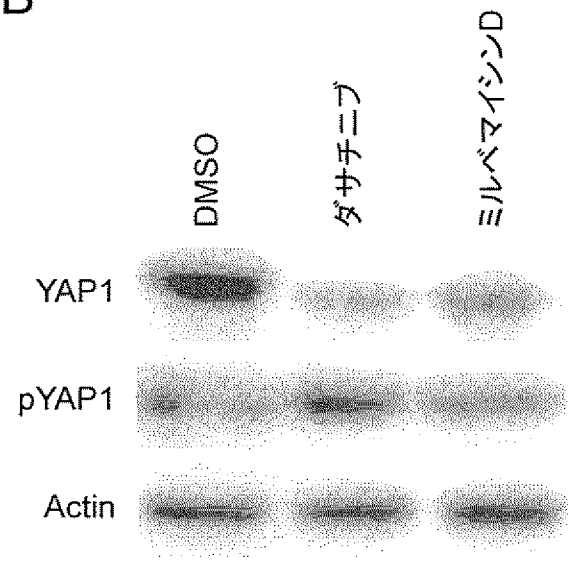
ミルベマイシンD

[図2]

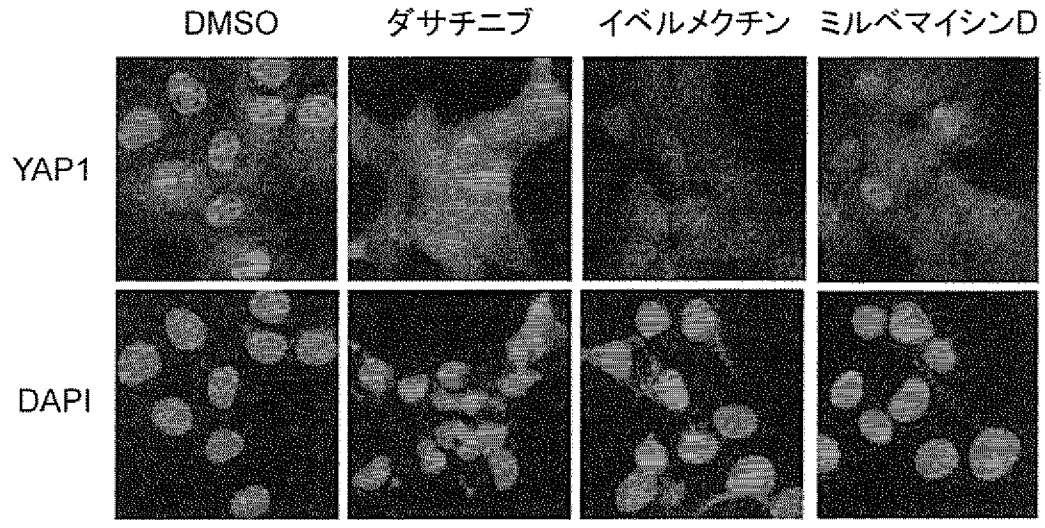
A



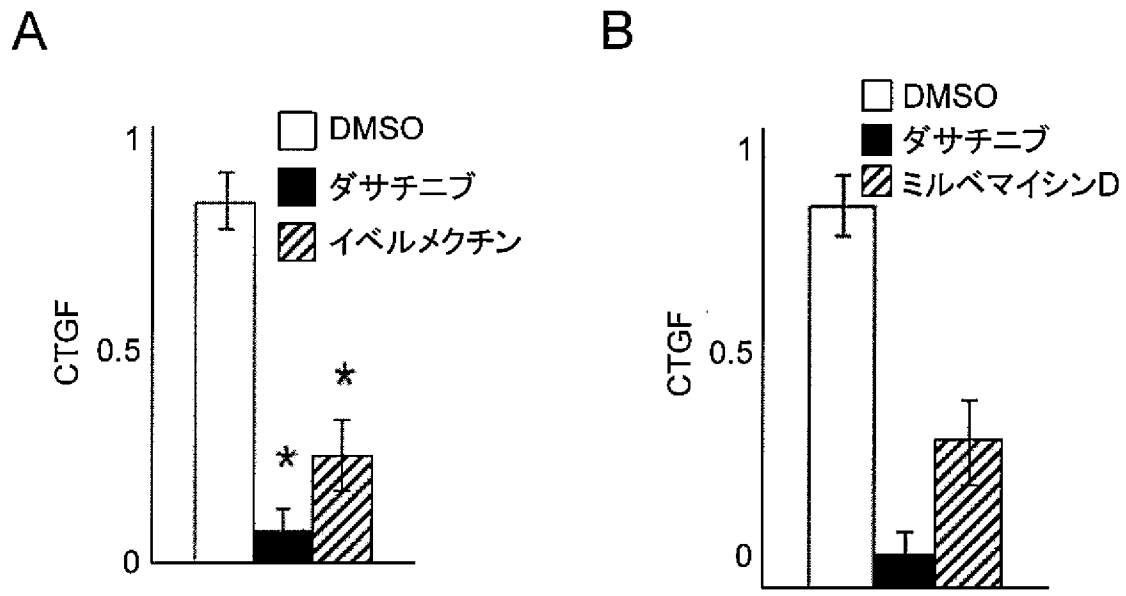
B



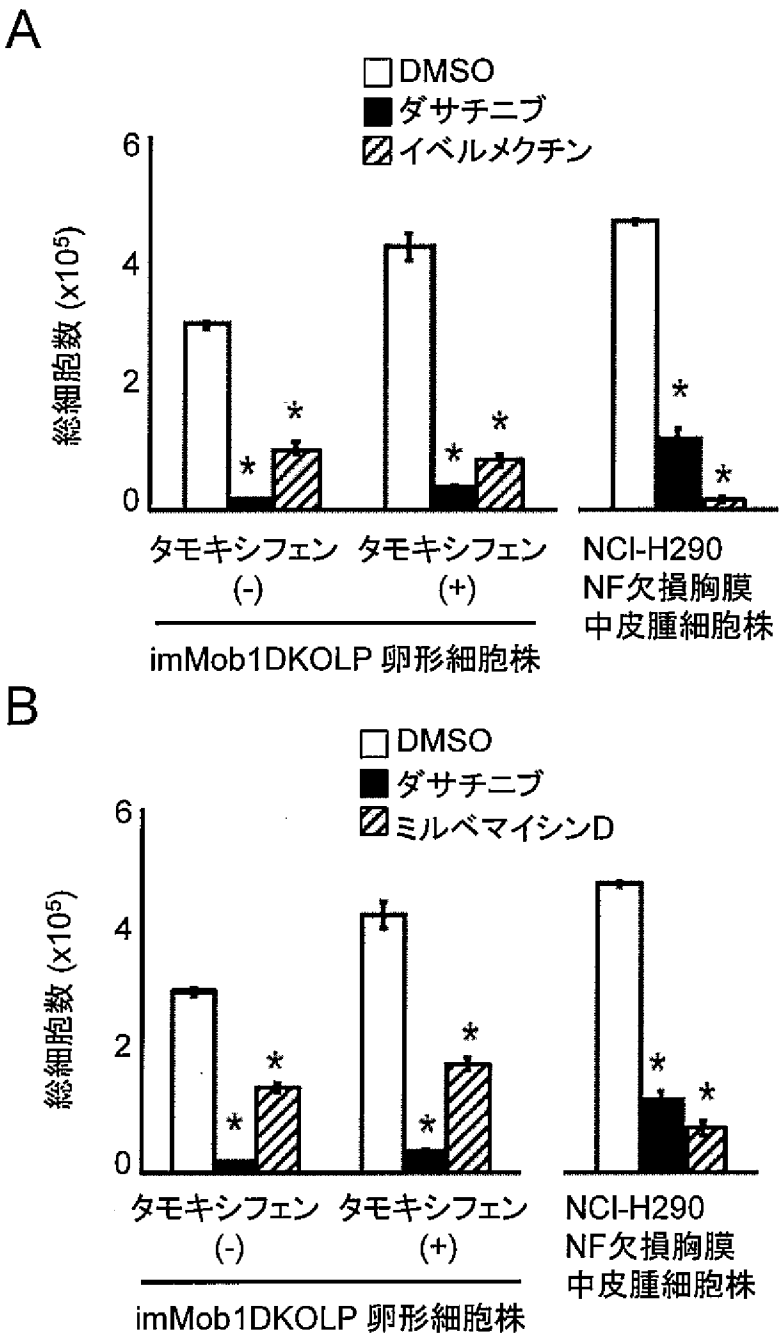
[図3]



[図4]

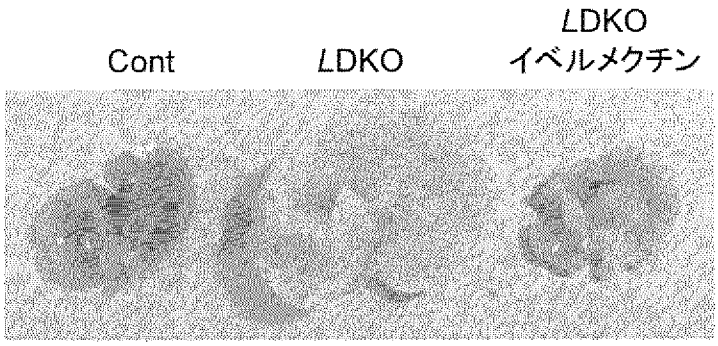


[図5]

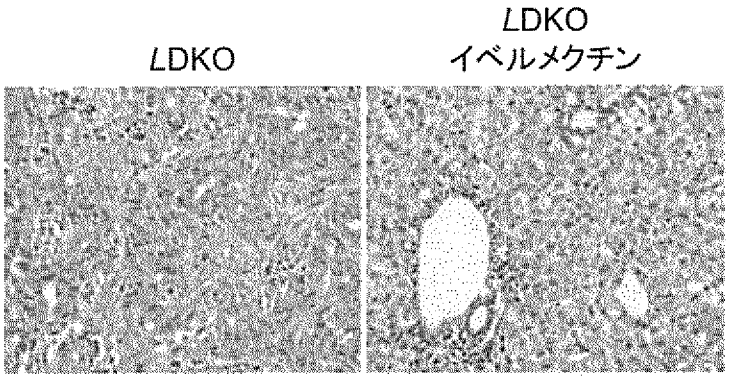

A
DMSO
ダサチニブ
イベルメクチン
総細胞数 (x10^5)
6
4
2
0
タモキシフェン (-)
タモキシフェン (+)
NCI-H290 NF欠損胸膜中皮腫細胞株
imMob1DKOLP 卵形細胞株
B
DMSO
ダサチニブ
ミルベマイシンD
総細胞数 (x10^5)
6
4
2
0
タモキシフェン (-)
タモキシフェン (+)
NCI-H290 NF欠損胸膜中皮腫細胞株
imMob1DKOLP 卵形細胞株

[図6]

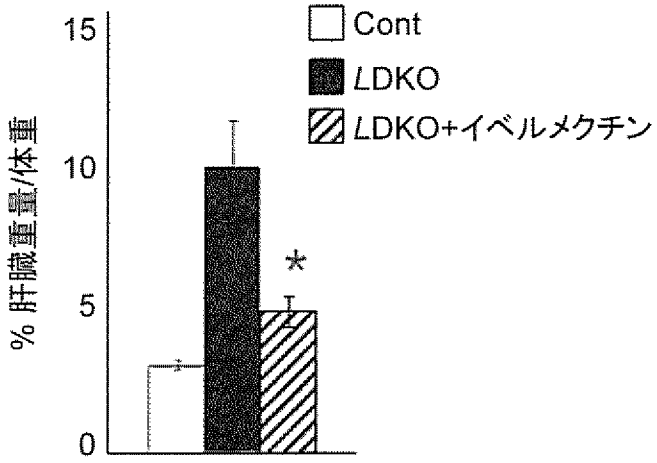
A


Cont
LDKO
LDKO
イベルメクチン

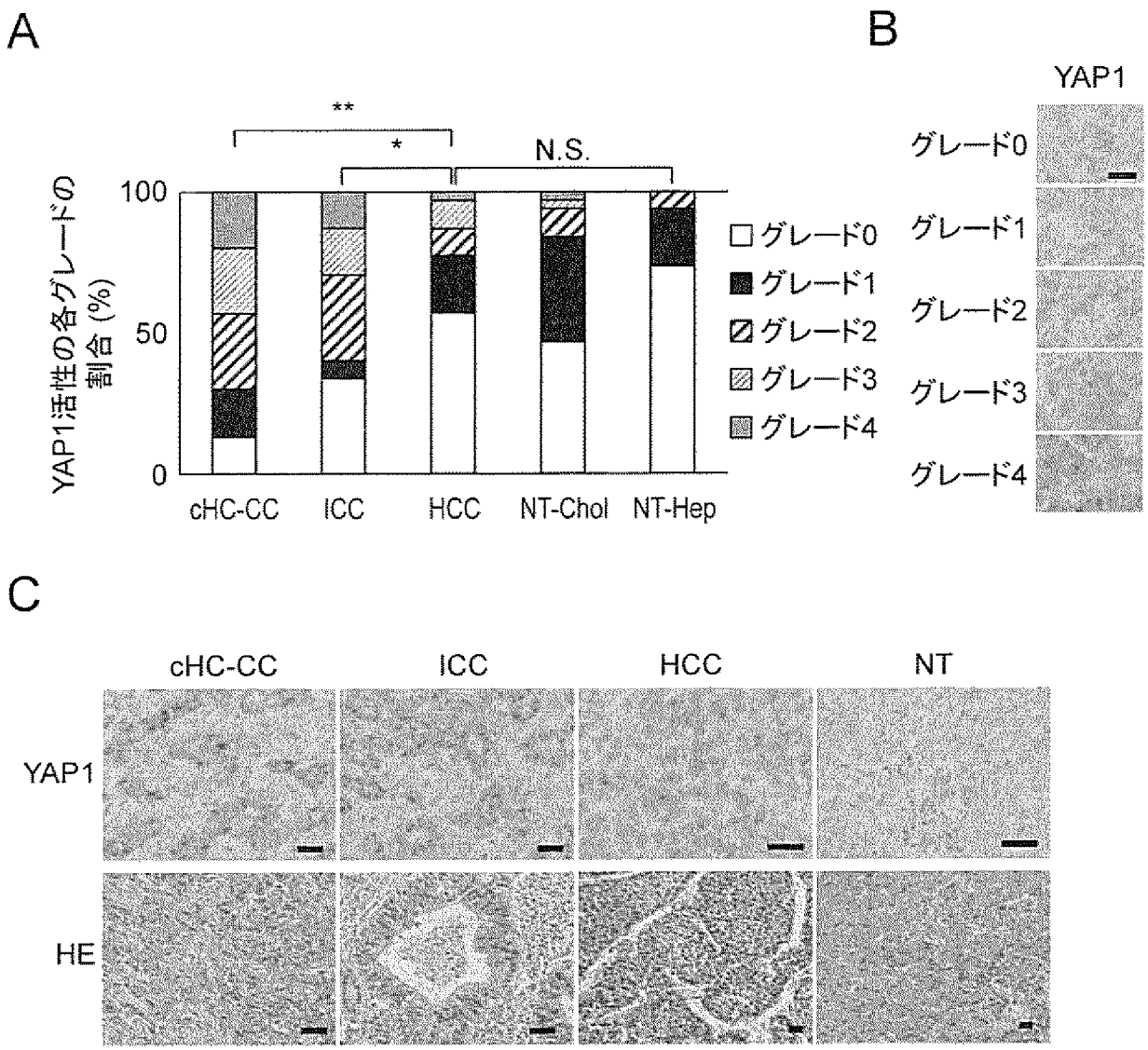
B


LDKO
LDKO
イベルメクチン

C


15
10
5
0
% 肝臓重量/体重
Cont
LDKO
LDKO+イベルメクチン
*

[図7]


A
B
C
YAP1
グレード0
グレード1
グレード2
グレード3
グレード4
YAP1活性の各グレードの割合 (%)
100
50
0
**
*
N.S.
cHC-CC
ICC
HCC
NT-Chol
NT-Hep
cHC-CC
ICC
HCC
NT
YAP1
HE

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/081741

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K31/7048(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)
A61K31/7048, A61P35/00

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 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/006906 A2 (COMBINATORX, INC.), 22 January 2004 (22.01.2004), claims 9, 20, 34, 35 (Family: none)	1-4
X	JP 2005-508312 A (Epidauros Biotechnologie AG.), 31 March 2005 (31.03.2005), claims 2, 18 to 20 & WO 2003/013535 A2 claims 2, 18 to 20 & CA 02454627 A claims 2, 18 to 20	1,3,4

☒ 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
02 December 2015 (02.12.15)	22 December 2015 (22.12.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/081741

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	HASHIMOTO,Hisashi et al., Ivermectin inactivates the kinase PAK1 and blocks the PAK1-dependent growth of human ovarian cancer and NF2 tumor cell lines, Drug Discoveries & Therapeutics, 2009, 3(6), p.243-246, ISSN: 1881-7831, particularly, Abstract, Figure1,2,3	1,3,4 1,3,4
Y	ROMANO, David et al., Protein interaction swithces coordinate Raf-1 and MST2/Hippo signalling, Nature Cell Biology, 2014.06.15, vol.16, no.7, p.673-684, ISSN: 1465-7392, entire text, particularly, Abstract, page 675, right column, line 28 to page 676, right column, line 5	1,3,4

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０８１７４１

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K31/7048(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i

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.　A61K31/7048, A61P35/00

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	１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１５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)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
PubMed

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
X	WO 2004/006906 A2 (COMBINATORX, INCORPORATED) 2004.01.22, 請求項 9, 20, 34, 35 （ファミリーなし）	1-4
X	JP 2005-508312 A (エピダウロス・バイオテクノロジー・アクチェンゲゼルシャフト) 2005.03.31, 請求項 2, 18～20 & WO 2003/013535 A2, 請求項 2, 18～20 & CA02454627 A, 請求項 2, 18～20	1, 3, 4

☑　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
０２．１２．２０１５	２２．１２．２０１５

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）　４Ｃ　６１１３
澤田　浩平
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２

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
X Y	HASHIMOTO,Hisashi et al., Ivermectin inactivates the kinase PAK1 and blocks the PAK1-dependent growth of human ovarian cancer and NF2 tumor cell lines, Drug Discoveries & Therapeutics, 2009, 3(6), p.243-246, ISSN: 1881-7831, 特に Abstract, Figure1，2，3	1，3，4 1，3，4
Y	ROMANO, David et al., Protein interaction swithces coordinate Raf-1 and MST2/Hippo signalling, Nature Cell Biology, 2014.06.15, vol.16, no.7, p.673-684, ISSN: 1465-7392, 全文，特に Abstract，第 675 頁右欄第 28 行～第 676 頁右欄第 5 行	1，3，4