

(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
2014 年 1 月 16 日(16.01.2014)



(10) 国際公開番号

WO 2014/010742 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/7068 (2006.01) A61P 1/18 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/7004 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/069220
- (22) 国際出願日: 2013 年 7 月 12 日(12.07.2013)
- (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 2012-157018 2012 年 7 月 13 日(13.07.2012) JP
- (71) 出願人: 学校法人神戸学院(KOBE GAKUIN UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6512180 兵庫県神戸市西区伊川谷町有瀬 5 1 8 Hyogo (JP). 国立大学法人 神戸大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 番 1 号 Hyogo (JP).
- (72) 発明者: 水品 善之(MIZUSHINA, Yoshiyuki); 〒6512180 兵庫県神戸市西区伊川谷町有瀬 5 1 8 神戸学院大学内 Hyogo (JP). 吉田 弘美(YOSHIDA, Hiromi); 〒6512180 兵庫県神戸市西区伊川谷町有瀬 5 1 8 神戸学院大学内 Hyogo (JP). 佐々木 良平(SASAKI, Ryohei); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 - 1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 庄司 隆, 外(SHOJI, Takashi et al.); 〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島五丁目 6 番 1 3 号 御幸ビル 3 0 7 号 Osaka (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, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (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))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION OR FOOD PRODUCT COMPOSITION COMPRISING MONOGALACTO-SYLDIACYLGLYCEROL OR PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE SALT THEREOF AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 発明の名称: モノガラクトシルジアシルグリセロール又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含む医薬組成物又は食品組成物

(57) Abstract: The goal of the present invention is to provide a new anticancer agent, a new method for treating cancer using a combination of anticancer agents, a new method for treating cancer using a combination of new anticancer agents and radiation therapy, as well as a new DNA polymerase inhibitor. The present invention was accomplished upon confirming that MGDG administered in combination with GEM and MGDG administered in combination with radiation therapy each have cancer cell proliferation-inhibiting activity and antitumor activity, and further, upon confirming that MGDG administered in combination with phosphorylated GEM interferes with DNA polymerase enzyme activity.

(57) 要約: 新たな抗癌剤、抗癌剤の組み合わせによる新たな癌の治療方法及び新たな抗癌剤と放射線療法の組み合わせによる新たな癌の治療方法、並びに新たな DNA ポリメラーゼ阻害剤を提供することを解決すべき課題とした。GEM と組み合わせて併用投与される MGDG、放射線療法と組み合わせて投与される MGDG が癌細胞増殖抑制活性及び抗腫瘍活性を有することを確認し、さらに、リン酸化 GEM と組み合わせて併用投与される MGDG が DNA ポリメラーゼ酵素活性阻害を有することを確認して、本発明を完成した。

WO 2014/010742 A1

明 細 書

発明の名称：

モノガラクトシルジアシルグリセロール又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含む医薬組成物又は食品組成物

技術分野

[0001] 本発明は、抗腫瘍剤であるゲムシタビン（GEM）と、抗腫瘍効果を有するDNAポリメラーゼ阻害剤であるリン酸化GEMと、抗腫瘍効果を有する放射線療法とのいずれかと組み合わせて併用投与されることを特徴とする、モノガラクトシルジアシルグリセロール（MGDG）を有効成分として含む医薬組成物又は食品組成物。

なお、本出願は、参照によりここに援用されるところの、日本国特許出願の特願2012-157018からの優先権を請求する。

背景技術

[0002] (MGDG)

高等植物の葉緑体のチラコイド膜は、MGDG、ジガラクトシルジアシルグリセロール（DGDG）、スルホキノボシルジアシルグリセロール（SQDG）等の主要なグリセロ糖脂質を含んでいる。また、グリセロ糖脂質は、野菜、果実及び果物に含まれていることが知られている。本発明者らの1人は、野菜の中ではホウレン草（Spinacia oleracea L.）に多量のMGDGが含まれていることを確認している（非特許文献1）。

また、本発明者らの1人は、MGDGを含む糖脂質には癌細胞増殖抑制活性を有することを確認している（特許文献1）。

[0003] (GEM)

シチジンアナログであるGEM（2',2'-ジフルオロデオキシシチジン）は、様々な癌の治療に広く使用されている。また、GEMは、膵臓癌の標準的な治療剤である。しかし、膵臓癌患者の1年後の生存率はわずか18%であり（非特許文献2）、GEMの単独での使用効果には限界がある。

[0004] (抗癌剤の併用投与)

上記の低い生存率の改善のための抗癌剤の併用投与治療又は抗癌剤と放射線療法の組み合わせた併用治療は、単独抗癌剤の多量使用の限界を解消して、治療効果を上げるものである。特定の癌の治療剤又は治療法を組合せることにより、腫瘍細胞の死滅効果が大幅に上昇することが報告されている。

[0005] 以上により、新たな抗癌剤の組み合わせによる癌の治療方法及び新たな抗癌剤と放射線療法の組み合わせによる癌の治療方法の開発が望まれている。

[0006] (DNAポリメラーゼ)

真核生物のDNA合成酵素 (DNAポリメラーゼ) は、これまで α 、 β 、 γ 、 δ 、 ε 、 ζ 、 η 、 θ 、 ι 、 κ 、 λ 、 μ 、 σ 、TdT (ターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ) 及びRev1の15種類の分子種が知られている。

これらのDNAポリメラーゼは、細胞の増殖、分裂、分化等に関与している。例えば、 α 型はDNA複製、 β 型、 λ 型及びTdTは修復と組換え、 δ 型及び ε 型は複製と修復の双方、 $\zeta \sim \kappa$ 型は修復を担っている。

[0007] (DNAポリメラーゼ酵素活性阻害を有する化合物)

本発明者らの1人は、DNA複製型のDNAポリメラーゼ α 、 δ 、 ε 阻害剤には、ヒト由来癌細胞増殖抑制活性があることを報告している (参照：非特許文献3)。

また、本発明者らの1人は、DNA修復・組換え型のDNAポリメラーゼ λ 阻害活性と起炎剤TPAで誘導したマウス耳抗炎症活性やLPSで炎症刺激を与えたマクロファージのTNF- α 産生抑制活性には正の相関があることを報告している (参照：非特許文献4)。

[0008] (DNAポリメラーゼ阻害剤)

DNAポリメラーゼの酵素活性を阻害するDNAポリメラーゼ阻害剤は、例えば、癌に対して癌細胞の増殖抑制活性を示し、エイズに対してHIV由来逆転写酵素に対する阻害活性を示し、また、免疫疾患に対して抗原に対する特異的抗体産生を抑制する免疫抑制活性を示すことが知られている。

DNAポリメラーゼ阻害活性を有する糖脂質が、制癌剤、HIV由来逆転写酵素阻害剤、免疫抑制剤として有用であることが報告されている（参照：特許文献2）。

現在、DNAポリメラーゼ阻害剤として、ジデオキシTTP（ddTTP）、N-メチルマレイミド、ブチルフェニル-dGTPなどが知られている。また植物由来の糖脂質であるスルホキノボシルアシルグリセリドにもDNAポリメラーゼ阻害作用が見出されている（参照：特許文献2）。

[0009] 以上により、DNAポリメラーゼ阻害活性を有する化合物は、癌、エイズ等のウイルス疾患、免疫疾患の予防・治療に期待されているので、新たなDNAポリメラーゼ阻害剤の開発が望まれている。

先行技術文献

非特許文献

- [0010] 非特許文献1：I. Kuriyama et al (2005) J. Nutr. Biochem. 16 594-601
非特許文献2：M.J. Moore et al (2007) J. Clin. Oncol. 25 1960-1966
非特許文献3：Y. Mizushina (2009) Biosci. Biotechnol. Biochem. 73, 1239-1251
非特許文献4：Y. Mizushina (2011) 日本栄養・食糧学会誌. 64, 377-384

特許文献

- [0011] 特許文献1：W02005/027937
特許文献2：特平11-106395

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0012] 本発明は、新たな抗癌剤、抗癌剤の組み合わせによる新たな癌の治療方法及び新たな抗癌剤と放射線療法との組み合わせによる新たな癌の治療方法、新たなDNAポリメラーゼ阻害剤、並びにアポトーシス誘導剤を提供することを解決すべき課題とした。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、上記の課題を解決するために、GEMと組み合わせて併用投与されるMGDG、放射線療法と組み合わせて投与されるMGDGが癌細胞増殖抑制活性及び抗腫瘍活性を有することを確認し、さらに、リン酸化GEMと組み合わせて併用投与されるMGDGがDNAポリメラーゼ酵素活性阻害を有することを確認して、本発明を完成した。

[0014] すなわち、本発明は以下の通りである。

1. 抗腫瘍剤であるゲムシタビン（GEM）と、抗腫瘍効果を有するDNAポリメラーゼ阻害剤であるリン酸化GEMと、抗腫瘍効果を有する放射線療法とのいずれかと組み合わせて併用投与されることを特徴とする、モノガラクトシルジアシルグリセロール（MGDG）又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含む医薬組成物又は食品組成物。

2. GEMと組み合わせて併用投与されることを特徴とする、MGDG又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含む前項1に記載の抗腫瘍剤。

3. 前記MGDGは、GEM投与前に、投与されることを特徴とする前項2に記載の抗腫瘍剤。

4. 前記抗腫瘍剤は、膵臓癌又は大腸癌治療用抗腫瘍剤である前項2又は3に記載の抗腫瘍剤。

5. リン酸化GEM又はGEMと組み合わせて併用投与されることを特徴とする、MGDG又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含む前項1に記載のDNAポリメラーゼ阻害剤。

6. GEM又はリン酸化GEMと組み合わせて併用投与されることを特徴とする、MGDG又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含む前項1に記載のアポトーシス誘導剤。

7. 放射線療法と組み合わせて投与されることを特徴とする、MGDG又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含む前項1に記載の膵臓癌治療用抗腫瘍剤。

8. 抗腫瘍剤であるGEM投与と、抗腫瘍効果を有するDNAポリメラー

ゼ阻害剤であるリン酸化GEM投与と、抗腫瘍効果を有する放射線療法とのいずれか1以上と組み合わせてMGDG又はその薬学的に許容し得る塩を投与することを特徴とする、癌の治療方法。

9. GEMとMGDG又はその薬学的に許容し得る塩を併用投与することを特徴とする前項8に記載の癌の治療方法。

10. 前記MGDGは、GEM投与前に、投与されることを特徴とする前項9に記載の癌の治療方法。

11. 前記治療方法は、膵臓癌又は大腸癌治療方法であることを特徴とする前項8～10のいずれか1に記載の癌の治療方法。

発明の効果

[0015] 本発明のMGDG又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含む医薬組成物又は食品組成物は、癌細胞増殖抑制活性、DNAポリメラーゼ酵素活性阻害、及び／又は抗腫瘍活性を有することを確認した。より詳しくは、以下の通りである。

本発明のGEMと組み合わせて併用投与されるMGDGを有効成分として含む抗腫瘍剤は、癌細胞増殖抑制活性及び抗腫瘍活性を有することを確認した。

本発明のリン酸化GEMと組み合わせて併用投与されるMGDGを有効成分として含むDNAポリメラーゼ阻害剤は、DNAポリメラーゼ酵素活性阻害を有することを確認した。

本発明の放射線療法と組み合わせて投与されるMGDGを有効成分として含む膵臓癌治療用抗腫瘍剤は、抗腫瘍活性を有することを確認した。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]MGDGの化学構造を示す図。

[図2]MGDGを高含有する糖脂質画分の精製方法。

[図3]リン酸化GEMによるDNAポリメラーゼ酵素活性阻害効果の確認。化合物を含まない場合のDNAポリメラーゼ酵素活性を100%とした。データは、3回の独立実験による平均値±標準誤差により示した。

[図4]リン酸化GEMとの併用によるMGDGのDNAポリメラーゼ酵素活性阻害効果の確認。データは、3回の独立実験による平均値±標準誤差により示した。

[図5]GEMとの併用によるMGDGの癌細胞増殖抑制活性の確認。データは、3回の独立実験による平均値±標準誤差により示した。

[図6]GEMとの併用によるMGDGの癌細胞におけるアポトーシス誘導の確認。データは、3回の独立実験による平均値±標準誤差により示した。

[図7]MGDG投与及び放射線照射のタイムスケジュール。

[図8]放射線照射後の各マウスの腫瘍増殖曲線。

[図9]放射線照射1月後の各マウスの腫瘍。

[図10]MGDG投与及びGEM投与のタイムスケジュール。

[図11]MGDG投与及びGEM投与後の各マウスの腫瘍増殖曲線。

発明を実施するための形態

[0017] (MGDG)

MGDGの化学構造を図1に記載する。図中、 $R_1 \sim R_2$ は互いに独立した脂肪酸であり、好ましくは炭素数14～22の飽和脂肪酸または一価もしくは多価の不飽和脂肪酸である。飽和脂肪酸としては、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸等を例示でき、不飽和脂肪酸としては、パルミトオレイン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸($\omega 3$)、ジホモガンマリノレン酸、オクタデカテトラエン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸等を例示できる。なお、各糖脂質におけるグリセロール骨格の1位と2位の構成脂肪酸の種類は特に限定されるものではなく、ジアシルグルセロールタイプの糖脂質においては、両脂肪酸は同じものであっても、異なるものであってもよい。

[0018] (MGDGの薬学的に許容し得る塩)

本発明の「MGDGの薬学的に許容し得る塩」は、フッ化水素酸塩、塩酸塩などのハロゲン化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩などの無機酸塩、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、スルホン酸塩、有機酸塩、およびア

ミノ酸塩が挙げられ、好適には塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、ナトリウム塩、カリウム塩を挙げることができる。

[0019] (MGDGの抽出方法)

MGDGの抽出方法の詳細は、W02005/027937に記載の方法を参照することができる。

また、下記のMGDGの抽出方法は、一例であり特に限定されない。

例えば、以下の方法によりハウレン草から抽出・精製することができる。

まず、原料には市販のハウレン草を使用し、図2に示すように、その乾燥物100gを細断した後、水溶性成分をできるだけ除去するために、60℃の温水1Lで2回洗浄する。次に、濾紙を使用して濾過後、水分を除去し、得られた固形物(残渣)に1Lのエタノールを加え、攪拌しながら60℃で還流抽出を2回行う。抽出液は濾過後、減圧下で濃縮を行うことで、ハウレン草のオイル状抽出物が得られる。

前記抽出物を70%エタノール溶液(エタノールと水の体積比が70:30の溶液。以下同様。)に溶解した後、逆相クロマトグラフィーにより糖脂質画分を精製し、本発明の第1の糖脂質含有組成物を得る。上記抽出物を70%エタノール溶液に溶解した後、これを疎水クロマトグラフィー用樹脂500g(ダイヤイオンHP-20、三菱化学社製)に注入し、その後、70%エタノールで未吸着物質を洗浄・溶出した画分I(水溶性画分)、95%エタノールで溶出される画分II(糖脂質画分すなわちMGDG、DGDG、SQDGを含む糖脂質含有組成物)、クロロホルムで溶出される画分III{クロロフィル(葉緑素)を含む色素画分}の3つに分画する。

最後に、クロマトグラフィー等により上記画分II(MGDG、DGDG、SQDGを含む糖脂質含有組成物)からMGDGを抽出する。

[0020] (リン酸化GEM)

本発明のリン酸化GEMとは、一リン酸化体(GEM-MP)、二リン酸化体(GEM-DP)、三リン酸化体(GEM-TP)を含む。なお、リン酸化GEMは、公知の方法により、市販のGEMをリン酸化することにより

合成することができる。

[0021] (本発明の医薬組成物又は食品組成物)

本発明の医薬組成物又は食品組成物は、抗腫瘍剤であるGEMと、抗腫瘍効果を有するDNAポリメラーゼ阻害剤であるリン酸化GEMと、抗腫瘍効果を有する放射線療法とのいずれかと組み合わせて併用投与されることを特徴とする、MGDG又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含む。

本発明の医薬組成物又は食品組成物は、DNAポリメラーゼ酵素活性阻害効果、癌細胞増殖抑制活性、抗腫瘍活性といった有用な生理活性を有することから、DNAポリメラーゼ阻害剤、抗腫瘍剤（抗癌剤、制癌剤）として利用可能であり、さらに、サプリメント、機能性食品、健康食品、健康補助食品、特定保健用食品、栄養機能食品等にも利用可能である。特に機能性食品に好適に用いることができ、例えば抗癌作用又は癌予防効果をもつ機能性食品として利用可能である。

さらに、本発明の医薬組成物又は食品組成物は、DNAポリメラーゼ酵素活性阻害効果を有することから、抗腫瘍剤以外の医薬（医薬用組成物）への利用、機能性食品以外の食用組成物（食品または食品添加物）としての利用も可能であり、癌のほかエイズの発症、進行を予防する作用あるいは治療効果、また臓器移植時等の免疫抑制作用をねらいとして利用することができ、とりわけエイズ治療剤、抗ウイルス剤、免疫抑制剤、アポトーシス誘導剤等として利用可能である。

[0022] (本発明のMGDGを有効成分とする抗腫瘍剤又はDNAポリメラーゼ阻害剤の組成)

本発明のMGDGを有効成分とする抗腫瘍剤又はDNAポリメラーゼ阻害剤は、抽出したMGDGを必要に応じてさらに精製した後、そのまま、あるいは慣用の医薬製剤担体とともに医薬用組成物となし、動物およびヒトに投与することができる。医薬用組成物の剤形としては特に制限されるものではなく必要に応じて適宜選択すればよい。例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤等の経口剤、注射剤、坐剤等の非経口剤が挙げられる。投与

量は、通常、成人で糖脂質の重量として1日当たり20mg～600mg以下を数回に分けて服用するのが適当である。

[0023] 本発明において錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤としての経口剤は、例えば、デンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を用いて常法に従って製造される。これらの製剤中のMGDGの配合量は特に限定されるものではなく適宜設計できる。この種の製剤には、MGDG含有組成物の他に、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を適宜に使用することができる。

[0024] 非経口剤として本発明の所望の効果を発現するには、患者の年齢、体重、疾患の程度により異なるが、通常、成人で糖脂質の重量として1日当たり1～60mgの静注、点滴静注、皮下注射、筋肉注射が適当である。この非経口投与剤は常法に従って製造され、希釈剤として一般に注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、大豆油、トウモロコシ油、プロピレングリコール等を用いることができる。さらに必要に応じて、殺菌剤、防腐剤、安定剤を加えてもよい。また、この非経口剤は安定性の点から、バイアル等に充填後冷凍し、通常の凍結乾燥処理により水分を除き、使用直前に凍結乾燥物から液剤を再調製することもできる。さらに必要に応じて、等張化剤、安定剤、防腐剤、無痛化剤を加えてもよい。これら製剤中のMGDGの配合量は特に限定されるものではなく任意に設定できる。その他の非経口剤の例として、外用液剤、軟膏等の塗布剤、直腸内投与のための坐剤等が挙げられ、これらも常法に従って製造される。

[0025] (リン酸化GEMを有効成分として含むDNAポリメラーゼ阻害剤の組成)

本発明のリン酸化GEMを有効成分とするDNAポリメラーゼ阻害剤は、リン酸化した後に、これをそのまま、あるいは慣用の医薬製剤担体とともに医薬用組成物となし、動物およびヒトに投与することができる。医薬用組成物の剤形としては特に制限されるものではなく必要に応じて適宜選択すればよい。投与量は、通常、成人1日当たり10mg～2500mgを点滴静注する。

[0026] (G E Mの用法・容量)

G E Mの一般的な投与方法は、以下の通りである。

(1) 非小細胞肺癌、膵癌、胆道癌、尿路上皮癌、がん化学療法後に増悪した卵巣癌

通常、成人にはG E Mとして1回1000mg/m²を30分かけて点滴静注し、週1回投与を3週連続し、4週目は休薬する。これを1コースとして投与を繰り返す。なお、患者の状態により適宜減量する。

(2) 手術不能又は再発乳癌の場合

通常、成人にはG E Mとして1回1250mg/m²を30分かけて点滴静注し、週1回投与を2週連続し、3週目は休薬する。これを1コースとして投与を繰り返す。なお、患者の状態により適宜減量する。

[0027] (放射線療法)

本発明の放射線療法とは、自体公知の方法を意味し、当業者に知られているプロトコルに従って実施することができる。X線が主たる線源であるが、その他にも陽子線や炭素イオン線等の荷電粒子線、小線源治療に用いられるイリジウム、ヨード、セシウム、又はコバルト照射などが前記の放射線療法に含まれる。

放射線療法は、全身照射（急性白血病、悪性リンパ腫）に用いられることもあるが、原則的には腫瘍そのものと、周囲の微小浸潤の範囲の局所的に照射するのが好ましい。一般的には、放射線療法に要する時間は1日2～3分で、週5回、合計25～30回（約5～6週間）に分割して照射することが多い。

[0028] (G E Mと組み合わせて併用投与されるM G D Gを有効成分として含む抗腫瘍剤)

本発明のG E Mと組み合わせて併用投与されるM G D G又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含む抗腫瘍剤の適用癌腫は特に限定されないが、好ましくは、膵臓癌、大腸癌であり、さらに好ましくは膵臓癌である。

また、該抗腫瘍剤とG E Mの併用投与方法は、特に限定されない。上記記載したG E Mの投与期間前、中、後のいずれの間に、M G D Gを含む抗腫瘍

剤を経口又は非経口により患者に投与する。好ましくは、MGDGは、GEM投与前の数日、1日前、又は数時間前に、投与されることが好ましい。

[0029] (GEMと組み合わせて併用投与されるMGDGを用いた癌の治療方法)

本発明では、GEMと組み合わせて併用投与されるMGDGを用いた癌の治療方法も対象とする。併用投与方法は、特に限定されず、上記記載したGEMの投与期間前、中、後のいずれの間に、MGDGを経口又は非経口により患者に投与する。好ましくは、MGDGは、GEM投与前の数日、1日前、又は数時間前に、投与されることが好ましい。

[0030] (リン酸化GEMと組み合わせて併用投与されるMGDGを有効成分として含むDNAポリメラーゼ阻害剤)

本発明のリン酸化GEMと組み合わせて併用投与されるMGDG又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含むDNAポリメラーゼ阻害剤は、DNAポリメラーゼ α 、 β 、 γ 、 κ の酵素活性阻害を示す。

なお、DNAを合成する酵素であるDNAポリメラーゼは、DNA合成を伴う細胞増殖が活発な癌細胞や腫瘍組織では発現量が多く高活性である。よって、DNAポリメラーゼ阻害剤は、DNA合成を阻害して、癌細胞や腫瘍組織における細胞増殖を停止させる。従って、DNAポリメラーゼ阻害剤は抗腫瘍剤になると考えられる。すなわち、本発明のリン酸化GEMと組み合わせて併用投与されるMGDGを有効成分として含むDNAポリメラーゼ阻害剤は、抗腫瘍剤でもある。

[0031] (リン酸化GEMと組み合わせて併用投与されるMGDGを用いた癌の治療方法)

本発明では、リン酸化GEMと組み合わせて併用投与されるDNAポリメラーゼ阻害活性を有するMGDGを用いた癌の治療方法も対象とする。併用投与方法は、特に限定されず、上記記載したGEMと同様に、リン酸化GEM投与前、中、後のいずれの間に、MGDGを経口又は非経口により患者に投与する。好ましくは、MGDGは、リン酸化GEM投与前の数日、1日前、又は数時間前に、投与されることが好ましい。

[0032] (リン酸化GEMを有効成分として含むDNAポリメラーゼ阻害剤)

本発明のリン酸化GEM (GEMも含む) を有効成分として含むDNAポリメラーゼ阻害剤は、DNAポリメラーゼ α 、 β 、 γ 、 κ の酵素活性阻害だけでなく、DNAポリメラーゼ δ 、 ε 、 λ 、 μ 、 η 、 ι の酵素活性阻害も有する。さらに、DNAポリメラーゼ酵素活性阻害効果強度は、GEM-T P、GEM-D P、GEM-M Pの順である。

また、前記同様に、本発明のリン酸化GEMを有効成分として含むDNAポリメラーゼ阻害剤は、抗腫瘍剤でもある。

[0033] (リン酸化GEMを用いた癌の治療方法)

本発明では、DNAポリメラーゼ阻害活性を有するリン酸化GEMを用いた癌の治療方法も対象とする。リン酸化GEMを用いた癌の治療方法は、特に限定されず、上記記載したGEMの用法・容量を参考にして実施できる。

[0034] (放射線療法と組み合わせて投与されるMGDGを有効成分として含む膵臓癌治療用抗腫瘍剤)

本発明の放射線療法と組み合わせて投与されるMGDG又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含む膵臓癌治療用抗腫瘍剤と放射線療法の併用治療方法は、特に限定されず、上記記載した放射線療法期間前、中、後のいずれの間に、MGDGを有効成分として含む膵臓癌治療用抗腫瘍剤を経口又は非経口により患者に投与する。

[0035] (放射線療法と組み合わせて併用投与されるMGDGを用いた膵臓癌の治療方法)

本発明では、放射線療法と組み合わせて併用投与されるMGDGを用いた膵臓癌の治療方法も対象とする。併用投与方法は、特に限定されず、上記記載した放射線療法の期間前、中、後のいずれの間に、MGDGを経口又は非経口により膵臓癌患者に投与する。

[0036] (GEMと組み合わせて併用投与されるMGDGを有効成分として含むアポトーシス誘導剤)

本発明のGEM (リン酸化GEMも含む) と組み合わせて併用投与される

MGDG又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含むアポトーシス誘導剤は、GEM単独、MGDG単独と比較して、細胞、特に癌細胞のアポトーシスを非常に強く誘導する。

[0037] 以下、実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明は該実施例により何ら限定されるものではない。

実施例 1

[0038] リン酸化GEMによるDNAポリメラーゼ酵素活性阻害効果の確認、リン酸化GEMとの併用によるMGDGのDNAポリメラーゼ酵素活性阻害効果の確認、並びにGEMとの併用によるMGDGの癌細胞増殖抑制活性の確認を本実施例で行った。詳細は、以下の通りである。

[0039] (材料)

GEMは、日本イーライリリーから購入した。乾燥ハウレン草は、こだま食品株式会社から購入した。仔ウシ胸腺DNAは、Sigma Aldrichから購入した。4つの2'-デオキシヌクレオチド-5'-三リン酸であるdATP、dCTP、dGTP及びdTTPは、GE Healthcare Life Sciencesから購入した。放射性ヌクレオチド $[^3\text{H}]$ -dTTP (43 Ci/mmol)は、MP Biomedicals LLCから購入した。その他の試薬は、ナカライテスクから購入した。

[0040] (リン酸化GEMの化学合成)

N⁴-benzoylgemcitabineは、リン酸トリエチル中の塩化ホスホリルによる選択的リン酸化、さらにphosphorimidazolidate method {参照：Bull. Chem. Soc. Jpn. 42 (1969), p3505-3508} を用いたリン酸化により、N⁴-benzoylgemcitabine 5'-diphosphate及びN⁴-benzoylgemcitabine 5'-triphosphateに変換した。GEM-MP、GEM-DP及びGEM-TPは、それぞれ、1日間室温で、1M NH₄OH中の対応するN⁴-benzoatesで処理することにより得た。

最後に、GEM-MP、GEM-DP及びGEM-TPの純度は、それぞれ、HPLC分析により、99%、96%及び98%であることを確認した。

[0041] (ハウレン草よりMGDGの抽出)

乾燥ハウレン草をエタノールで抽出して、エタノール溶液を得た。該溶液

は、70%エタノールで希釈し、そしてDiaion HP-20 (Sigma-Aldrich) カラムクロマトグラフィーに通した。該カラムから溶出した95%エタノール (v/v) 溶液を蒸発させて乾燥させた。乾燥物をクロロホルムに再溶解し、さらにシリカゲル (PSQ60B, Fuji Silysia) カラムクロマトグラフィーに通した。該カラムクロマトグラフィーは、クロロホルム／酢酸エチル (1/1、v/v) で洗浄し、さらに、酢酸エチルで溶出した。溶出した画分は、メタノールを用いたSep-Pak C₁₈ (Waters Corp., Tokyo, Japan) カラムクロマトグラフィーで精製した。

最後に、MGDGを含む画分を蒸発させて乾燥させて、乾燥MGDGを得た。なお、該MGDGの純度が約98%であることを確認した。

[0042] (DNAポリメラーゼアッセイ)

哺乳類由来の高活性を有するDNAポリメラーゼは、文献「J. Nat. Prod. 75 (2012) p135-141」に記載の方法に準じて精製した。DNAポリメラーゼ α 、 β に対する標準DNAポリメラーゼ基質溶液は、文献「Biochim. Biophys. Acta 1308 (1996) p256-262」及び「Biochim. Biophys. Acta 1336 (1997) p509-521」に記載の方法に準じて作製した。DNAポリメラーゼ γ 、 δ に対する標準DNAポリメラーゼ基質溶液は、文献「Eur. J. Biochem. 267 (2000) p200-206」及び「Jpn. J. Cancer Res. 89 (1998) p1154-1159」に記載の方法に準じて作製した。DNAポリメラーゼ η 、 ι 及び κ は、DNAポリメラーゼ α と同じ方法により作製した。DNAポリメラーゼ λ は、DNAポリメラーゼ β と同じ方法により作製した。

DNAポリメラーゼ反応に関し、活性化DNA (例えば、ウシデオキシリボヌクレアーゼI処理済仔ウシ胸腺DNA) 及び4つのdNTPs ([³H]-dTTPを含む) は、それぞれ、DNA鋳型プライマー基質及びヌクレオチド基質に使用した。

MGDGは、様々な濃度のDMSOで溶解し、そして、30秒間超音波処理した。超音波処理後の4 μ Lサンプルを、pH7.5の50mM Tris-HCl {1mMジチオスレイトール、50%グリセロール (by vol) 及び1mM EDTAを含む} 中の各酵素 (0.05

units) と混合し、0℃、10分間保存した。GEM又はリン酸化GEMは、様々な濃度のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で溶解した。そして、MGDG溶液4 μ LをDNAポリメラーゼ酵素液16 μ Lと混合し、0℃、10分間保存した。本混合液 (MGDG-酵素液) の各8 μ L量を、20 μ LのGEM-DNAポリメラーゼ反応液 (DNA鋳型プライマー基質及びヌクレオチド基質を含む) に添加し、37℃、60分間保温した。

阻害物質を含まない活性を100%に設定し、各阻害物質濃度による相対的な活性を測定した。DNAポリメラーゼ活性の1単位は、37℃、60分間及び通常の反応条件下 {参照文献: Biochim. Biophys. Acta 1308 (1996) p256-262、Biochim. Biophys. Acta 1336 (1997) p509-521} において、1nmol dNTP (特に、dTTP) が合成DNA鋳型プライマーに触媒作用により取り込まれる酵素の量として設定した。

[0043] (細胞培養及び細胞生存率アッセイ)

ヒト膵臓癌細胞系であるBxPC-3、MIAPaCa2及びPANC-1は、American Type Culture Collectionから得た。これらの細胞は、RPMI1640培地 {10% FBS、penicillin (100 units/mL)、streptomycin (100 μ g/mL)及び1.6mg/mL NaHCO₃を含む} で培養した。GEM、リン酸化GEM及びMGDGの細胞毒性は、96穴マイクロタイタープレートに播種した細胞 ($\sim 1 \times 10^3$ 細胞/穴) に様々な濃度のこれらの化合物を含む溶液を添加することにより測定した。5%CO₂/95%airの湿潤環境下で37℃、72~96時間培養後において、MTT{3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide}溶液を最終濃度0.6mg/mLまで添加し、さらに該培地を破棄した後に、DMSOで該細胞を溶解した。各穴の吸光度 (A₅₄₀) をマイクロプレートリーダーにより測定した。

[0044] (アポトーシスを起こした細胞アッセイ)

アポトーシス誘導は、公知のキットであるAPO-Direct™ Assay Staining kit (BD Bioscience Pharmingen)を使用してDNAフラグメントアッセイにより評価した。APO-Direct™ Assayは、アポトーシスを起こしている細胞の断片化DNAをFITC-dUTPにより標識し、さらに蛍光フローサイトメトリーで測定

する方法である。

本実施例では、24時間、GEM (50nM) で処理したMIAPaCa2、MG DG (70 μ M) で処理したMIAPaCa2及びGEM-MG DGの両方で処理したMIAPaCa2を使用した。該処理済各細胞は、トリプシン処理を行い、さらにPBSで洗浄した。該洗浄済各細胞は、15分間の1%パラホルムアルデヒド、さらに、一晩の-20℃での70%エタノールによる固定処理を行った。該固定化した各細胞は、30分間、共役FITCを含むDNAラベリング溶液に混合して染色した。該染色した各細胞はPBSで再懸濁させ、さらにCellQuest ソフトウェア (Becton-Dickinson) によりサイトメトリーデータを得た。なお、CellQuest ソフトウェアを使用して、全細胞中の染色されたものをアポトーシス誘導細胞として測定した。

[0045] (リン酸化GEMによるDNAポリメラーゼ酵素活性阻害効果の確認)

哺乳類のDNAポリメラーゼ分子種は15種類が存在しており、アミノ酸配列の相同性や機能の類似性からA-、B-、X-、Y-の4つのファミリーに分類されている。本実施例では、各DNAポリメラーゼファミリーを代表してDNA複製型の子牛DNAポリメラーゼ α (B-ファミリーDNAポリメラーゼ)、ミトコンドリアDNA合成を担うヒトDNAポリメラーゼ γ (A-ファミリーDNAポリメラーゼ)、DNA修復型のヒトDNAポリメラーゼ κ (Y-ファミリーDNAポリメラーゼ)、DNA修復・組換え型のラットDNAポリメラーゼ β (X-ファミリーDNAポリメラーゼ) を用いた。

図3に示すように、GEM-TPは、哺乳類のDNAポリメラーゼ酵素活性を最も強力に阻害することを確認した。一方、GEMは、DNAポリメラーゼ酵素活性を阻害しないことを確認した。DNAポリメラーゼ酵素活性阻害強度は、GEM-TP、GEM-DP、GEM-MPの順であることも確認した。GEM-TPのDNAポリメラーゼ α 及び γ の酵素活性阻害は、DNAポリメラーゼ β 及び κ の酵素活性阻害よりも高かった。

下記表1の結果は、GEM-TPの哺乳類の11種類のDNAポリメラー

ゼに対する50%阻害濃度（ IC_{50} 値）を示す。GEM-TPは、DNAポリメラーゼ α 、 β 、 γ 、 κ の酵素活性阻害だけでなく、DNAポリメラーゼ δ 、 ε 、 λ 、 μ 、 η 、 ι の酵素活性阻害も有する。さらに、GEM-TPは、X及びYファミリーのDNAポリメラーゼに対する酵素活性阻害効果と比較して、BファミリーのDNAポリメラーゼに対する酵素活性阻害効果は約4倍であることを確認した。

以上により、リン酸化GEM、特にGEM-TPは、DNAポリメラーゼ α 、 δ 、 ε のようなDNA複製型のDNAポリメラーゼの酵素活性をより強力に阻害することを確認した。これにより、リン酸化GEMを有効成分として含むDNAポリメラーゼ阻害剤は、優れたDNAポリメラーゼ酵素活性阻害効果を有する。

[0046] [表1]

Mammalian pols	IC_{50} values (μ M)	
	GEM-TP	MGDG
[A-Family]		
Human pol γ	7.9 ± 0.5	35.1 ± 2.1
[B-Family]		
Calf pol α	3.7 ± 0.3	22.0 ± 1.4
Human pol δ	3.8 ± 0.3	19.9 ± 1.2
Human pol ε	3.4 ± 0.2	10.7 ± 0.7
[X-Family]		
Rat pol β	18.5 ± 1.1	>200
Human pol λ	18.9 ± 1.2	>200
Human pol μ	17.2 ± 1.0	>200
Calf TdT	20.1 ± 1.2	>200
[Y-Family]		
Human pol η	15.7 ± 0.9	>200
Mouse pol ι	17.1 ± 1.0	>200
Human pol κ	16.0 ± 1.6	>200

data, mean $\pm$ SE (n=3).

[0047] (GEM-TPによるDNAポリメラーゼ α の阻害機構の確認)

GEM-TPによる選択的DNAポリメラーゼの酵素活性阻害（特に、D

NAポリメラーゼ α 、 δ 、 ε のようなDNA複製型の強力なDNAポリメラーゼの酵素活性阻害)のメカニズムを確認した。同様に、MGDGのDNAポリメラーゼの酵素活性阻害に対する阻害メカニズムも確認した。詳細は、以下の通りである。なお、活性化DNA及び4つのdNTPsは、それぞれ、酵素活性阻害の動態解析のために、DNA鋳型プライマー基質及びヌクレオチド基質に使用した。

下記表2で示したデータは逆数プロットで示している。GEM-T PのDNAポリメラーゼ α の酵素活性阻害効果は、DNA鋳型プライマー基質に対しては非拮抗阻害であることを確認した。なぜなら、 K_m 値は $7.80\mu\text{M}$ で一定であるが、一方、 V_{max} 値はGEM-T P濃度上昇と共に減少している。また、GEM-T PのDNAポリメラーゼ α の酵素活性阻害効果は、ヌクレオチド基質に対しては拮抗阻害であることを確認した。なぜなら、 V_{max} 値は 29.2pmol/h で一定であるが、 K_m 値はGEM-T P濃度上昇と共に上昇している。Dixonプロットから得られた K_i 値は、DNA鋳型プライマー基質では $1.35\mu\text{M}$ であり、ヌクレオチド基質では $0.67\mu\text{M}$ であった。すなわち、ヌクレオチド基質に対する K_i 値は、DNA鋳型プライマー基質に対する K_i 値と比較して、約2倍低いことを確認した。これにより、GEM-T Pは、DNAポリメラーゼ α のDNA鋳型プライマー基質の結合部位よりもヌクレオチド基質の結合部位に対して強い親和性を示した。

MGDGのDNAポリメラーゼ α の酵素活性阻害効果は、DNA鋳型プライマー基質及びヌクレオチド基質の両方に対しては非拮抗阻害であることを確認した。また、MGDGは、ヌクレオチド基質の結合部位よりもDNAポリメラーゼ α のDNA鋳型プライマー基質の結合部位に対して約1.3倍の強い親和性を示した。

以上により、dCTPアナログであるGEM-T Pは、dCTPと競合して、DNAポリメラーゼ α のヌクレオチド基質の結合部位と作用し、一方、MGDGはDNAポリメラーゼ α の他の部位に結合することを見出した。

[表2]

Compound	Conc. (μM)	Substrate	K_m ^{a)} (μM)	V_{max} ^{a)} (pmol/h)	K_i ^{b)} (μM)	Inhibitory mode
GEM-TP	0	DNA ^{c)} template- primer	7.80	55.6	1.35	Non-competitive
	1			27.8		
	2			18.5		
	3			13.9		
	0	Nucleotide ^{d)}	1.65	29.2	0.67	Competitive
	1					
	2					
	3					
MGDG	0	DNA ^{c)} template- primer	7.80	55.6	5.08	Non-competitive
	5			29.4		
	10			20.0		
	15			15.2		
	0	Nucleotide ^{d)}	1.65	29.2	6.44	Non-competitive
	5			12.5		
	10			8.00		
	15			5.88		

^{a)} These data were obtained from Lineweaver-Burk plot.

^{b)} These data were obtained from Dixon plot.

^{c)} That is, activated DNA.

^{d)} That is, four dNTPs.

[0049] (リン酸化GEMとの併用によるMGDGのDNAポリメラーゼ酵素活性阻害効果の確認)

上記により、GEM-TPによるDNAポリメラーゼ α の阻害機構は、MGDGによるDNAポリメラーゼ α の阻害機構とは異なることを確認した。そこで、GEMとの併用によるMGDGのDNAポリメラーゼ酵素活性阻害効果は、リン酸化GEM単独又はMGDG単独のDNAポリメラーゼ酵素活性阻害効果と比較して、高いことを確認した。詳細は、以下の通りである。

MGDG及びGEM-TPを含む溶液は、DNAポリメラーゼ酵素液及びDNA鋳型プライマー基質とヌクレオチド基質を含む標準DNAポリメラーゼ反応液と、それぞれ0℃、10分間前保温し、その後両者を混合して37℃、60分間保温してから、各DNAポリメラーゼの酵素活性を測定した。GEM-TP及びMGDGの濃度は、それぞれ、各DNAポリメラーゼに対してIC₅₀の半分及び20 μM とした。

GEM-TPによる各哺乳類のDNAポリメラーゼの酵素活性阻害効果で

ある IC_{50} の半分を、DNAポリメラーゼ相対活性割合の1として、MGDG単独の相対活性割合、並びにMGDG及びGEM-T P併用の相対活性割合を図4に示す。

MGDG及びGEM-T P併用によるDNAポリメラーゼ α 、 γ の酵素活性阻害効果は、MGDG単独及びGEM-T P単独によるDNAポリメラーゼ α 、 γ の酵素活性阻害効果と比較して、それぞれ、約3倍及び約2倍となった。これらの結果は、MGDG及びGEM-T P併用によるDNAポリメラーゼ α 、 γ の酵素活性阻害効果は、MGDG及びGEM-T Pがそれぞれ異なるDNAポリメラーゼ酵素活性阻害機構を有することによる相乗効果であることを確認した。

以上により、リン酸化GEMとの併用によるMGDGは、非常に優れたDNAポリメラーゼ酵素活性阻害効果を有することを確認した。これにより、リン酸化GEMと併用投与されるMGDGを有効成分として含むDNAポリメラーゼ阻害剤は、優れたDNAポリメラーゼ酵素活性阻害効果を有する。

[0050] (GEMとの併用によるMGDGの癌細胞増殖抑制活性の確認)

GEMとの併用によるMGDGの癌細胞増殖抑制活性の確認を行った。詳細は、以下の通りである。

3種類のヒト膵臓癌細胞系であるBxPC-3 cells、MIAPaCa2 cells及びPANC-1 cellsは、図5Aに示す通りのGEM及びMGDGの投与スケジュールに従って処理し、さらに24時間培養し、最後にMTTアッセイにより細胞毒性を測定した。GEM及びMGDGの濃度は、それぞれ、 LD_{50} の半分及び $20\mu M$ にした。

GEMによる各細胞に対する毒性の IC_{50} の半分を、1として、GEM単独の相対活性割合、MGDG単独の相対活性割合、並びにMGDG及びGEM併用の相対活性割合を図5Bに示す。

図5B(c)の結果から明らかなように、MGDGを、GEM投与前に、投与することにより、非常に高い膵臓癌細胞の毒性を示すことを確認した。MGDG及びGEM併用による癌細胞増殖抑制活性は、MGDG単独及びG

EM単独による癌細胞増殖抑制活性と比較して、少なくとも4倍以上の効果を示すことを見出した。

以上により、GEMと組み合わせて併用投与されるMGDGを有効成分として含む抗腫瘍剤は、優れた癌細胞増殖抑制活性を有する。

[0051] (GEMとの併用によるMGDGの癌細胞アポトーシス誘導の確認)

GEMとの併用によるMGDGの癌細胞増殖抑制は、アポトーシス誘導しているかどうかをヒト膵臓癌細胞系であるMIAPaCa2 cellsを用いて確認した。詳細は、以下の通りである。

MIAPaCa2 cellsは、70 μ M MGDGで処理し、続いて処理12時間後50nM GEMで処理して、さらに処理12時間後に、アポトーシスの細胞をAP0-Direct™ Assay Staining kit及びフローサイトメトリーを使用して測定した。なお、未処理のMIAPaCa2 cellsのアポトーシス細胞の割合を1とした。

図6に示すように、MGDG及びGEM併用投与によるアポトーシス細胞数の割合は、MGDG単独及びGEM単独によるアポトーシス細胞数の割合と比較して、少なくとも3倍以上のアポトーシスを誘導していることを確認した。

以上により、MGDG及びGEM併用投与は、癌細胞のアポトーシスを非常に強く誘導していることを見出した。

実施例 2

[0052] (放射線照射との併用によるMGDGの抗腫瘍活性の確認)

放射線照射との併用によるMGDGの抗腫瘍活性の確認を、ヒト膵臓癌細胞を移植したマウスを用いて確認した。詳細は、以下の通りである。

[0053] (材料)

使用したマウスは、搬入時4週齢のBALB/cAJcl-nu/nuヌードマウスを使用した。

使用したX線照射装置は、MBR-1505R2 (日立メディコ) X線照射装置を使用した。

[0054] (ヒト膵臓癌細胞を移植したマウスの準備)

ヒト膵臓癌細胞であるMIAPaCa2を 2×10^6 cells/100mLになるようにMatrigel中に混合して、MIAPaCa2を含むMatrigelを作製した。

前記MIAPaCa2を含むMatrigel 100 μ Lを、前記ヌードマウスの足の付け根に注入して、腫瘍が10mm大程度になるまで経過観測した。

[0055] (放射線照射との併用によるMGDGの投与方法)

PBSに溶かしたMGDG 100 μ L (投与するMGDGは2mg/kg) を、図7に記載のタイムスケジュールに沿って、腫瘍が10mm大程度になったヌードマウスの腫瘍局所に2回投与した。さらに、2回目投与から24時間後に、該マウスの腫瘍部以外を鉛でカバーして、腫瘍部にのみ5Gy (0.7Gy/min, 150kV) 照射して、経過観測した。

[0056] (放射線照射との併用によるMGDGの抗腫瘍活性の確認結果)

放射線照射後の各マウスの腫瘍増殖曲線及び放射線照射後1月の各マウスの腫瘍の写真を、それぞれ、図8及び図9に示す。

図8に示す腫瘍増殖曲線結果から明らかなように、放射線照射との併用によるMGDGの抗腫瘍活性効果は、MGDG単独及び放射線照射単独の抗腫瘍活性効果と比較して、約2.5倍の効果があることを確認した。また、図9に示す各マウスの腫瘍の写真から明らかなように、放射線照射との併用によるMGDGの投与されたマウスの腫瘍の大きさは、他のマウスと比較して、非常に小さいことを確認した。

以上により、放射線照射との併用によるMGDGの投与は、優れた抗膵臓腫瘍活性効果を示す。よって、放射線療法と組み合わせて投与されるMGDGを有効成分として含む膵臓癌治療用抗腫瘍剤は優れた抗膵臓腫瘍活性効果を有する。

実施例 3

[0057] (GEMとの併用によるMGDGの抗腫瘍活性の確認)

GEMとの併用によるMGDGの抗腫瘍活性の確認を、ヒト膵臓癌細胞を移植したマウスを用いて確認した。詳細は、以下の通りである。

[0058] (材料)

使用したマウスは、搬入時4週齢のBALB/cAJcl-nu/nuヌードマウスを使用した。

[0059] (ヒト膵臓癌細胞を移植したマウスの準備)

ヒト膵臓癌細胞であるMIAPaCa2を 2×10^6 cells/100mLになるようにMatrigel中に混合して、MIAPaCa2を含むMatrigelを作製した。

前記MIAPaCa2を含むMatrigel 100 μ Lを、前記ヌードマウスの足の付け根に注入して、腫瘍が10mm大程度になるまで経過観測した。

[0060] (GEMとの併用によるMGDGの投与方法)

PBSに溶かしたMGDG100 μ L (投与するMGDGは2mg/kg) 及びPBSに溶かしたGEM100 μ L (投与するGEMは2ng/kg) を、図10に記載のタイムスケジュールに沿って、腫瘍が10mm大程度になったヌードマウスの腫瘍局所に2回投与した。

[0061] (GEMとの併用によるMGDGの抗腫瘍活性の確認結果)

GEM及びMGDGの併用投与後の各マウスの腫瘍増殖曲線を図11に示す。

図11に示す腫瘍増殖曲線結果から明らかなように、GEMとの併用によるMGDGの抗腫瘍活性効果 (特に、MGDG投与した後にGEMを投与した場合) は、MGDG単独及び放射線照射単独の抗腫瘍活性効果と比較して、約6倍以上の効果があることを確認した。

以上により、GEMとの併用によるMGDGの投与は、優れた抗膵臓腫瘍活性効果を示す。よって、GEMと組み合わせて投与されるMGDGを有効成分として含む膵臓癌治療用抗腫瘍剤は優れた抗膵臓腫瘍活性効果を有する。

産業上の利用可能性

[0062] 新規なMGDGを有効成分として含む医薬組成物又は食品組成物を提供することができる。

請求の範囲

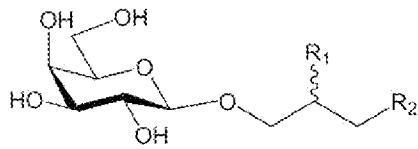
- [請求項1] 抗腫瘍剤であるゲムシタビン（GEM）と、抗腫瘍効果を有するDNAポリメラーゼ阻害剤であるリン酸化GEMと、抗腫瘍効果を有する放射線療法とのいずれかと組み合わせて併用投与されることを特徴とする、モノガラクトシルジアシルグリセロール（MGDG）又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含む医薬組成物又は食品組成物。
- [請求項2] GEMと組み合わせて併用投与されることを特徴とする、MGDG又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含む請求項1に記載の抗腫瘍剤。
- [請求項3] 前記MGDGは、GEM投与前に、投与されることを特徴とする請求項2に記載の抗腫瘍剤。
- [請求項4] 前記抗腫瘍剤は、膵臓癌又は大腸癌治療用抗腫瘍剤である請求項2又は3に記載の抗腫瘍剤。
- [請求項5] リン酸化GEM又はGEMと組み合わせて併用投与されることを特徴とする、MGDG又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含む請求項1に記載のDNAポリメラーゼ阻害剤。
- [請求項6] GEM又はリン酸化GEMと組み合わせて併用投与されることを特徴とする、MGDG又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含む請求項1に記載のアポトーシス誘導剤。
- [請求項7] 放射線療法と組み合わせて投与されることを特徴とする、MGDG又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含む請求項1に記載の膵臓癌治療用抗腫瘍剤。
- [請求項8] 抗腫瘍剤であるGEM投与と、抗腫瘍効果を有するDNAポリメラーゼ阻害剤であるリン酸化GEM投与と、抗腫瘍効果を有する放射線療法とのいずれか1以上と組み合わせてMGDG又はその薬学的に許容し得る塩を投与することを特徴とする、癌の治療方法。
- [請求項9] GEMとMGDG又はその薬学的に許容し得る塩を併用投与すること

を特徴とする請求項 8 に記載の癌の治療方法。

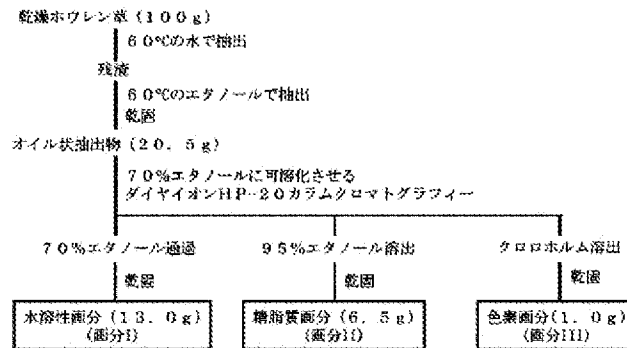
[請求項10] 前記MGDGは、GEM投与前に、投与されることを特徴とする請求項 9 に記載の癌の治療方法。

[請求項11] 前記治療方法は、膵臓癌又は大腸癌治療方法であることを特徴とする請求項 8 ～ 1 0 のいずれか 1 に記載の癌の治療方法。

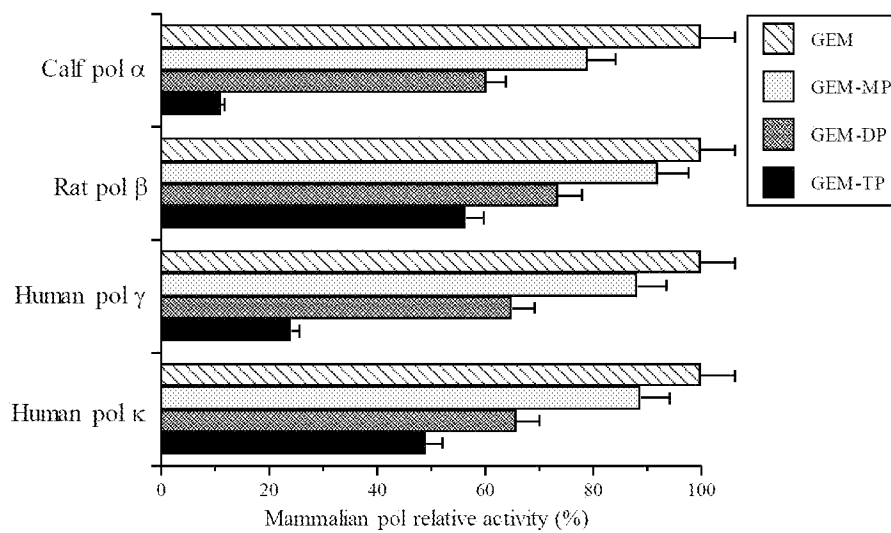
[図1]



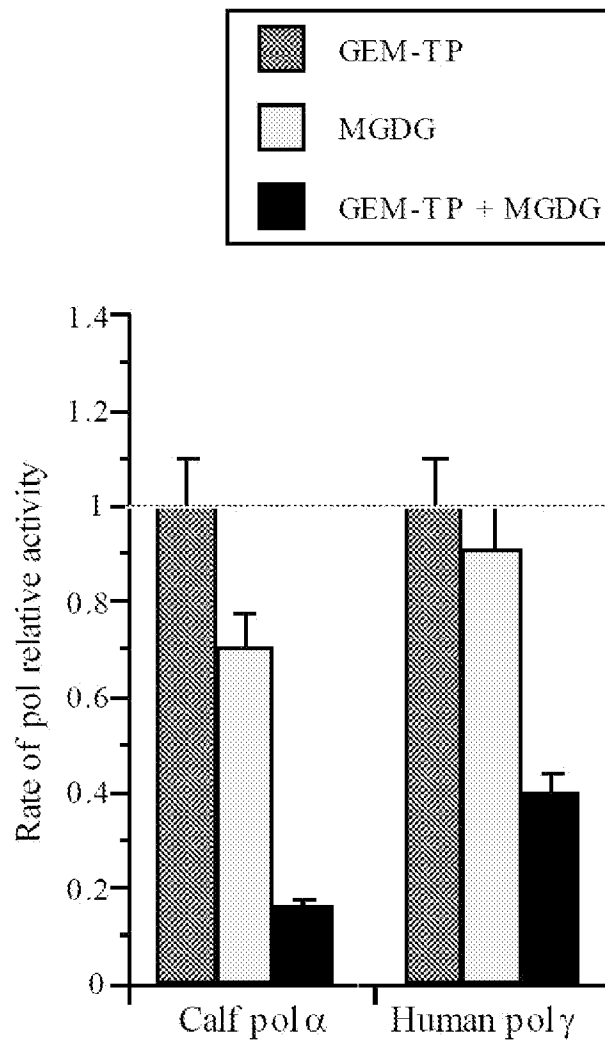
[図2]



[図3]

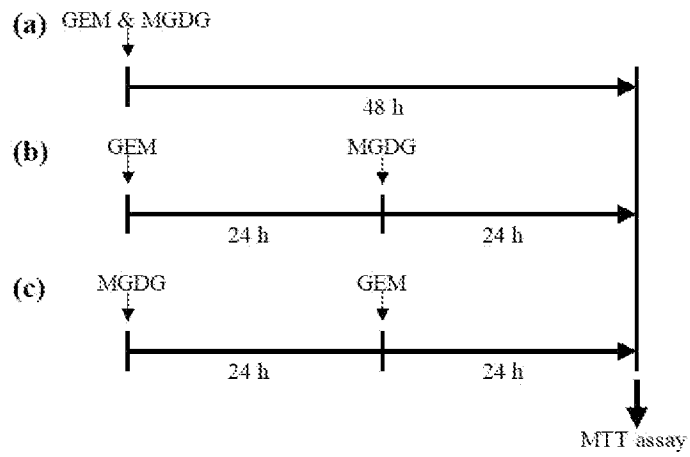


[図4]

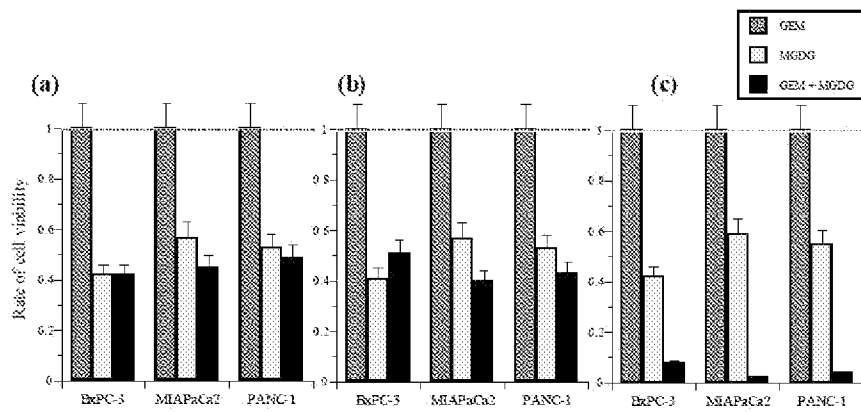


[図5]

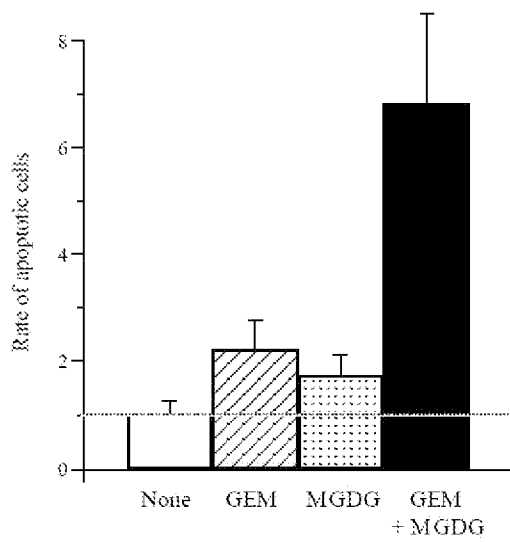
A



B

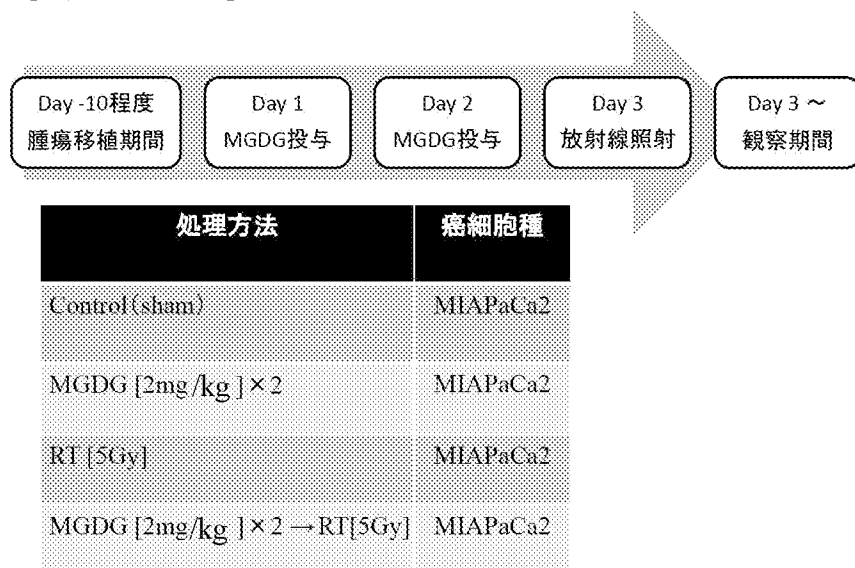


[図6]

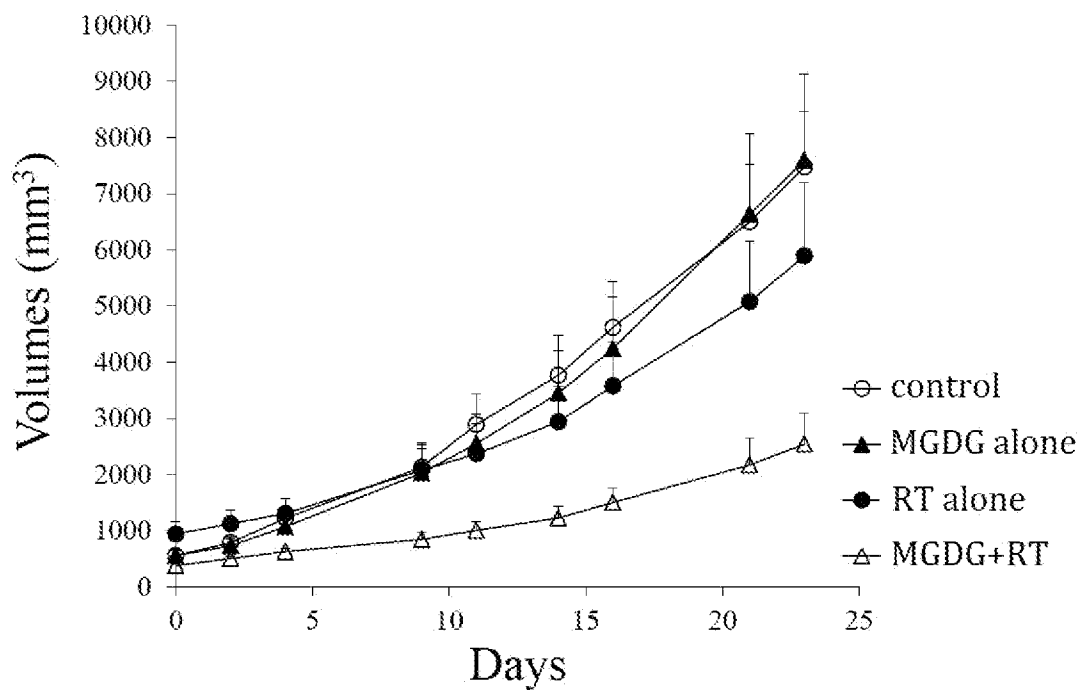


【図7】

【タイムスケジュール】

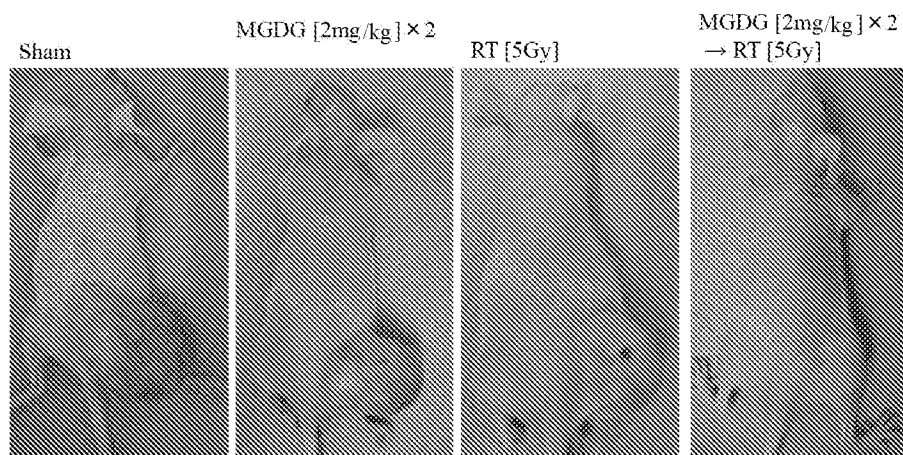


【図8】



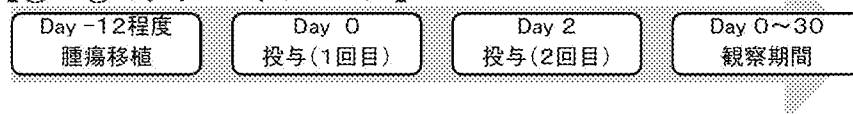
【図9】

(照射1ヶ月後の腫瘍の写真)



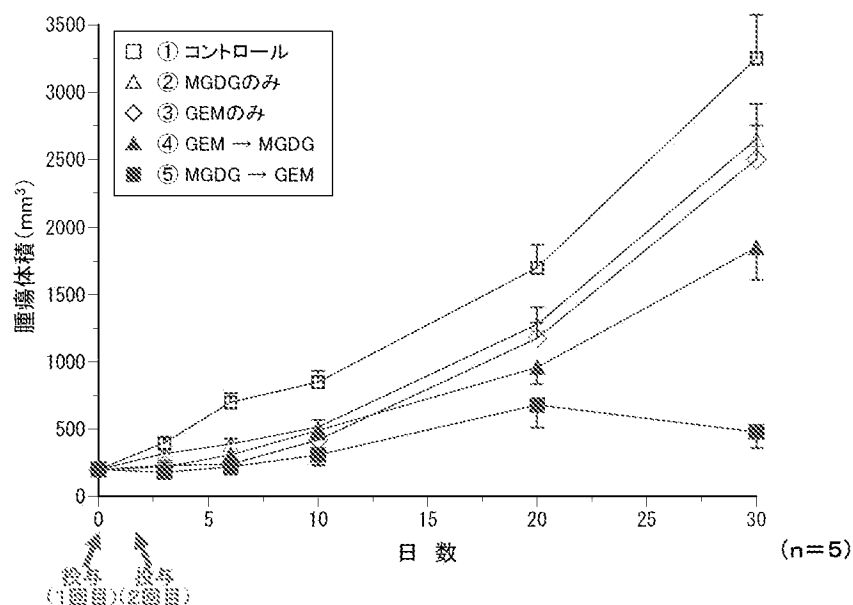
【図10】

【①～⑤のタイムスケジュール】



処 理	細胞株	細胞数
① コントロール 生理食塩水を投与	MIAPaCa2	2.0×10^6
② MGDG MGDG [2 mg /kg] を投与	MIAPaCa2	2.0×10^6
③ GEM GEM [2 ng /kg] を投与	MIAPaCa2	2.0×10^6
④ GEM → MGDG GEM [2ng/kg] を投与、12時間後にMGDG [2mg/kg]を投与	MIAPaCa2	2.0×10^6
⑤ MGDG → GEM MGDG [2mg/kg] を投与、12時間後にGEM [2ng/kg] を投与	MIAPaCa2	2.0×10^6

【図11】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069220

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/7068(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K31/7004(2006.01)i,
A61P1/04(2006.01)i, A61P1/18(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00
(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)

A61K31/7068, A23L1/30, A61K31/7004, A61P1/04, A61P1/18, A61P35/00,
A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Yukiya MATSUI et al., "Horenso Yurai Toshishitsu MGDG(monogalactosyl diacylglycerol) to Hoshasen Shosha no Heiyo ni yoru Daichogan Saibo ni Taisuru Zoshoku Yokusei Kassei", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry Kansai Shibu Koenkai Koen Yoshishu, 30 October 2009 (30.10.2009), vol. 2009, page 176	1, 7
Y	Akira YOKOYAMA, "The 12th Japan Society of Clinical Oncology. V. New anticancer drug, EBM, developed in 1990s and the Future Prospects. Current Status and Future Directions of Gemcitabine in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer and Pancreatic Cancer", Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy, 31 July 2000 (31.07.2000), vol.27, no.8, pages 1294 to 1300	1-6

☒ 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
08 August, 2013 (08.08.13)

Date of mailing of the international search report
20 August, 2013 (20.08.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069220

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2006-508184 A (Cyclacel Ltd.), 09 March 2006 (09.03.2006), claim 1; paragraph [0019] & US 2005/0267066 A1 & GB 225875 D & GB 300294 D & GB 225875 D0 & EP 1558289 A & WO 2004/041308 A1 & CA 2502979 A & BR 316004 A & CN 1708319 A & AU 2003276453 A & MX PA05004919 A	1-6
Y	JP 2011-513370 A (Pharma Mar, S.A.), 28 April 2011 (28.04.2011), claim 1; paragraph [0046] & US 2011/0015135 A1 & EP 2262522 A & WO 2009/109649 A1 & AU 2009221120 A & CA 2717117 A & MX 2010009782 A & CN 101965192 A & KR 10-2010-0126479 A & IL 208000 D & RU 2010140890 A	1-6
Y	Chikako Murakami et al, Effects of glycolipids from spinach on mammalian DNA polymerases, Biochemical Pharmacology, 2003, Vol.65, p.259- 267	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069220

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8-11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions of claims 8 to 11 pertain to methods for treatment of cancers.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. A61K31/7068(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K31/7004(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P1/18(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(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（I P C）） Int.Cl. A61K31/7068, A23L1/30, A61K31/7004, A61P1/04, A61P1/18, A61P35/00, A61P43/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 日本国公開実用新案公報 日本国実用新案登録公報 日本国登録実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 1 9 7 1 - 2 0 1 3 年 1 9 9 6 - 2 0 1 3 年 1 9 9 4 - 2 0 1 3 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)			
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	松井 由樹 他, ホウレンソウ由来糖脂質 MGDG(monogalactosyl diacylglycerol)と放射線照射の併用による大腸癌細胞に対する増殖抑制活性, 日本農芸化学会関西支部講演会講演要旨集, 2009.10.30, Vol.2009, P.176		1, 7
Y	横山 晶, 第12回日本臨床腫瘍研究会 V. 1990年代に開発された新規抗癌剤のEBMと将来への展望 Gemcitabineの現状と将来の展望, 癌と化学療法, 2000.07.31, Vol.27, No.8, P.1294-1300		1-6
☒ 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 0 8 . 0 8 . 2 0 1 3		国際調査報告の発送日 2 0 . 0 8 . 2 0 1 3	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 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） 原田 隆興 電話番号 03-3581-1101 内線 3439	4 U 9 1 6 7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2006-508184 A (サイクラセル・リミテッド) 2006.03.09, 請求項1、段落0019 & US 2005/0267066 A1 & GB 225875 D & GB 300294 D & GB 225875 D0 & EP 1558289 A & WO 2004/041308 A1 & CA 2502979 A & BR 316004 A & CN 1708319 A & AU 2003276453 A & MX PA05004919 A	1-6
Y	JP 2011-513370 A (ファルマ・マール・ソシエタード・アノニマ) 2011.04.28, 請求項1、段落0046 & US 2011/0015135 A1 & EP 2262522 A & WO 2009/109649 A1 & AU 2009221120 A & CA 2717117 A & MX 2010009782 A & CN 101965192 A & KR 10-2010-0126479 A & IL 208000 D & RU 2010140890 A	1-6
Y	Chikako Murakami et al, Effects of glycolipids from spinach on mammalian DNA polymerases, Biochemical Pharmacology, 2003, Vol.65, p.259-267	1-6

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 8-11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項8-11に係る発明は、癌の治療方法に係る発明である。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。