(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7058604号
(P7058604)

(45)発行日　令和4年4月22日(2022.4.22)

(24)登録日　令和4年4月14日(2022.4.14)

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ　38/48　(2006.01)	Ａ６１Ｋ	38/48	１００	
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	
Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
Ａ６１Ｐ　35/04　(2006.01)	Ａ６１Ｐ	35/00		ＺＮＡ
Ｃ１２Ｎ　5/095(2010.01)	Ａ６１Ｐ	35/04		

ＦＩ

請求項の数　10　（全46頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-539864(P2018-539864)
(86)(22)出願日　平成29年1月27日(2017.1.27)
(65)公表番号　特表2019-507129(P2019-507129A)
(43)公表日　平成31年3月14日(2019.3.14)
(86)国際出願番号　PCT/AU2017/050065
(87)国際公開番号　WO2017/127892
(87)国際公開日　平成29年8月3日(2017.8.3)
審査請求日　令和1年12月18日(2019.12.18)
(31)優先権主張番号　P201630112
(32)優先日　平成28年1月29日(2016.1.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
スペイン(ES)
(31)優先権主張番号　P201631662
(32)優先日　平成28年12月22日(2016.12.22)
最終頁に続く

(73)特許権者　512104834
プロパンク・ピーティーワイ・リミテッド
オーストラリア・ヴィクトリア・３１２４・キャンバーウェル・バトラー・ストリート・３０２／６
(74)代理人　100108453
弁理士　村山 靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広 信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部 達彦
(72)発明者　マカレナ・ペラン
オーストラリア・ヴィクトリア・３１２４・キャンバーウェル・バトラー・スト
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　癌治療

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
癌の治療を受けた対象における癌の進行を最小化する際の使用のための組成物であって、前記対象が癌幹細胞を有すると判定されており、治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを含み、前記キモトリプシノーゲン：トリプシノーゲンの重量比が、４：１～８：１の範囲である、組成物。
【請求項２】
前記対象が、部分または完全寛解である、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
癌の治療を受けた対象における微小残存病変を治療するための組成物であって、前記対象が癌幹細胞を有すると判定されており、治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを含み、前記キモトリプシノーゲン：トリプシノーゲンの重量比が、４：１～８：１の範囲である、組成物。
【請求項４】
癌の治療を受けた対象における癌の再発を予防するための組成物であって、前記対象が癌幹細胞を有すると判定されており、治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを含み、前記キモトリプシノーゲン：トリプシノーゲンの重量比が、４：１～８：１の範囲である、組成物。
【請求項５】
前記癌の治療が、腫瘍の外科的摘出、放射線療法、化学療法、免疫療法またはそれらの組

合せからなる群から選択される、請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項６】
前記キモトリプシノーゲン：トリプシノーゲンの重量比が、５：１～７：１の範囲である、請求項１～５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７】
前記キモトリプシノーゲン：トリプシノーゲンの重量比が、６：１である、請求項６に記載の組成物。
【請求項８】
１つ以上の癌幹細胞マーカーを発現する細胞を同定することにより、前記対象における癌幹細胞の存在を判定する、請求項１～７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９】
前記癌幹細胞マーカーが、
（ａ）ＣＤ３４＋、ＣＤ３８－、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ７１－、ＣＤ９０－、ＣＤ１１７－、およびＣＤ１２３＋；
（ｂ）ＥＳＡ＋ＣＤ４４＋ＣＤ２４－／ｌｏｗＬｉｎｅａｇｅ－、およびＡＬＤＨ－１ｈｉｇｈ；
（ｃ）ＣＤ１３３＋、ＣＤ４９ｆ＋、およびＣＤ９０＋；
（ｄ）ＣＤ１３３＋、ＢＣＲＰ１＋、Ａ２Ｂ５＋、およびＳＳＥＡ－１＋；
（ｅ）ＣＤ１３３＋、およびＡＢＣＧ２ｈｉｇｈ；
（ｆ）ＣＤ１３３＋、ＣＤ４４＋、ＣＤ１６６＋、ＥｐＣＡＭ＋、ＣＤ２４＋またはＣＤ３２６＋、およびＣＤ４４＋；
（ｇ）ＣＤ１３８－；
（ｈ）ＣＤ４４＋、α２β１ｈｉｇｈ、およびＣＤ１３３＋；ならびに
（ｉ）ＣＤ１３３＋、ＣＤ４４＋、ＥｐＣＡＭ＋、ＣＤ２４＋またはＣＤ３２６＋、ＣＤ４４＋、およびＣｘＣＲ４＋
の１つ以上から選択される、請求項８に記載の組成物。
【請求項１０】
前記癌が、膵臓癌、結腸癌、神経芽細胞腫、卵巣癌、非小細胞肺癌、皮膚癌、食道癌、肺癌および乳癌からなる群から選択される、請求項１～９のいずれか一項に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、癌を治療するための組成物、方法、使用およびキットに関する。
【０００２】
出願の相互参照
本出願は、全内容が全体として本明細書に組み込まれるスペイン国特許出願第Ｐ２０１６３０１１２号明細書および同第Ｐ２０１６３１６６２号明細書からの優先権を主張する。
【背景技術】
【０００３】
癌の治療のための治療法の改善にかかわらず、世界的な癌の死亡率は依然として高く、癌再発を予防するための方針が依然として必要とされている。癌に対する現在の治療方針は治療不成功をもたらす頻度が高く、これは複数の悪性腫瘍の発症ならびに／または化学療法および放射線療法に対する耐性に起因することが多い。
【０００４】
癌幹細胞（ＣＳＣ）は、自己再生する能力を有し、多能性能力を有する不死腫瘍開始細胞である（非特許文献１）。ＣＳＣは、複数の悪性腫瘍、例として、白血病および多くの固形腫瘍中で見出されており、それらの幹細胞様特性を考慮すると、腫瘍開始、発症、転移および再発の基礎であると考えられる（非特許文献２）。
【０００５】
ＣＳＣは、腫瘍内の癌細胞のわずかな率に相当し、長期間休止したままであり得、それに

より、高度に増殖可能な細胞を標的化する慣用の治療法（例えば、化学療法および放射線療法）を回避する（非特許文献３）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００６】

【文献】Ｒｅｙａ ｅｔ ａｌ．，（２００１）．Ｎａｔｕｒｅ ４１４：１０５－１１１
Ｔａｎｇ ＤＧ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ ２０１２；２２：４５７－７２
Ｃｈｉｋａｍａｔｓｕ ｅｔ ａｌ．，（２０１１）Ｈｅａｄ Ｎｅｃｋ．３４（３）：３３６－４３

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

結果的に、癌治療を改善し、癌再燃のリスクを低減させる優先性は、ＣＳＣ根絶を選択的に標的とする一方、正常幹細胞を妨害しない新たな方針を開発することである。

【０００８】

本明細書における任意の従来技術への言及は、いかなる管轄においてもこの従来技術が共通一般知識の一部を形成するという認識でも示唆でもなく、またはこの従来技術が当業者により理解され、関連するとみなされ、および／もしくは他の従来技術の一部と組み合わされることが妥当に予測され得るという認識でも示唆でもない。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

第１の態様において、本発明は、癌のための治療を受けた対象における癌の進行を最小化する方法であって、対象に治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与することを含み、それにより対象における癌の進行を最小化する方法に関する。

【００１０】

さらなる態様において、本発明は、癌のための治療を受けた対象における微小残存病変を治療する方法であって、対象に治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与することを含み、それにより対象における微小残存病変を治療する方法に関する。

【００１１】

さらなる態様において、本発明は、癌のための治療を受けている対象における微小残存病変を予防する方法であって、対象に治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与することを含み、それにより対象における微小残存病変を予防する方法に関する。

【００１２】

さらなる態様において、本発明は、癌のための治療を受けた対象における癌の再発を予防する方法であって、対象に治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与することを含み、それにより対象における癌の再発を予防する方法に関する。

【００１３】

さらなる態様において、本発明は、対象における癌の転移を予防または阻害する方法であって、対象に治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与することを含み、それにより対象における癌の転移を予防する方法に関する。

【００１４】

いっそうさらなる態様において、本発明は、後続の癌のための治療に対象を感作させる方法であって、対象が癌のための治療を受ける前に治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを対象に投与することを含み、それにより後続の癌のための治療に対象を感作させる方法に関する。

【００１５】

いっそうさらなる態様において、本発明は、対象における癌を予防する方法であって、治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを対象に投与することを含み、対象は、癌の発症のリスクがあるとみなされている方法に関する。

【００１６】
本発明はまた、対象における癌の発症を遅延させる方法であって、治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与し、それにより対象における癌の発症を遅延させることを含む方法に関する。
【００１７】
本発明の任意の方法または使用において、対象における癌幹細胞数を低減させ、またはその数の増加を予防することができる。あるいは、癌幹細胞を分化させることができる。癌幹細胞の同定または分化の程度は、本明細書、特に表１に記載のマーカーを使用して本明細書に記載の任意の方法により決定することができる。
【００１８】
キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを含む、癌のための治療を受けた対象における癌の進行を最小化するための組成物がさらに提供される。
【００１９】
別の態様において、本発明は、キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを含む、癌のための治療を受けた対象における微小残存病変を治療するための組成物を提供する。
【００２０】
いっそうさらなる態様において、本発明は、キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを含む、対象における癌の転移を予防するための組成物を提供する。
【００２１】
本発明はまた、対象における癌の進行を最小化するための医薬品の製造におけるキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンの使用であって、対象は、癌のための治療を既に受けた使用を企図する。
【００２２】
さらに、本発明は、癌のための治療を受けた対象における微小残存病変を治療するための医薬品の製造におけるキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンの使用を企図する。
【００２３】
本明細書に記載の本発明の任意の方法において、本方法は、対象における癌幹細胞の存在を同定するステップをさらに含み得る。
【００２４】
本明細書に記載の本発明の任意の方法において、本方法は、癌のための治療を受けた対象を提供するステップをさらに含み得る。さらに、対象は、キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与する時点において検出可能な癌を有さなくてよく、例えば、癌は、キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを対象に投与する時点において前治療の結果として実質的に縮小したサイズ、質量または他の物理的尺度を有してよい。
【００２５】
本発明はまた、対象における癌を治療する方法であって、
－　対象における癌幹細胞の存在を同定するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における癌を治療する方法に関する。
【００２６】
本発明はまた、対象における癌を予防する方法であって、
－　癌を有すると診断されていない対象における癌幹細胞の存在を同定するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における癌を予防する方法に関する。
【００２７】
本発明はまた、対象における癌を予防する方法であって、
－　癌を発症するリスクがあると同定されたが、癌を有すると診断されていない対象を提

供するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における癌を予防する方法に関する。
【００２８】
本発明はまた、対象における癌の発症を遅延させる方法であって、
－　癌のリスクがあるが、癌を有すると診断されていない対象を提供するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における癌の発症を遅延させる方法に関する。
【００２９】
本発明の任意の実施形態において、癌のリスクがあるとみなされている対象または個体は、癌の家族歴を有する個体であり得、癌と関連する１つ以上のバイオマーカーを有し得、例として、癌幹細胞を有し得る。
【００３０】
したがって、本発明はまた、対象における癌を予防する方法であって、
－　癌を有すると診断されていない対象における癌幹細胞の存在を同定するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における癌を予防する方法に関する。
【００３１】
本発明はまた、対象における癌を予防する方法であって、
－　癌を発症するリスクがあるが、癌を有すると診断されていない対象における癌幹細胞の存在を同定するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における癌を予防する方法に関する。
【００３２】
本発明はまた、対象における癌の発症を遅延させる方法であって、
－　癌を発症するリスクがあるが、癌を有すると診断されていない対象における癌幹細胞の存在を同定するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における癌の発症を遅延させる方法に関する。
【００３３】
さらなる実施形態において、本発明は、対象における癌の再発を予防する方法であって、
－　癌のための治療を受けた個体を提供するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における癌の再発を予防する方法に関する。
【００３４】
さらなる実施形態において、本発明は、対象における癌の転移を予防する方法であって、
－　癌のための治療を受けるべき、癌の治療を受けている、または癌のための治療を受けた個体を提供するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における癌の転移を予防する方法に関する。
【００３５】

さらに、本発明は、対象における癌の再発を遅延させる方法であって、
－　癌のための治療を受けた個体を提供するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における癌の再発を遅延させる方法に関する。
【００３６】
さらに、本発明は、対象における癌の発症を遅延させる方法であって、
－　癌の発症のリスクがある個体を提供するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における癌の発症を遅延させる方法に関する。
【００３７】
好ましくは、癌幹細胞の存在の同定は、既存腫瘍の部位において、または治療介入の部位において行う。典型的には、治療介入は、外科的摘出、化学療法または放射線療法である。
【００３８】
好ましくは、癌幹細胞は、本明細書、例えば、表１に記載の任意の１つ以上のマーカーを使用して同定する。例えば、膵臓特異的ＣＳＣマーカーとしてはＣＤ３２６、ＣＤ４４およびＣｘＣＲ４が挙げられ、結腸特異的ＣＳＣマーカーとしてはＣＤ３２６およびＣＤ４４が挙げられ、免疫蛍光またはフローサイトメトリーにより分析する。
【００３９】
本発明はまた、対象における癌を治療する方法であって、
－　表１の細胞表面マーカーのいずれか１つ以上の存在を判定することにより、対象における癌幹細胞の存在を同定するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における癌を治療する方法に関する。
【００４０】
本発明はまた、対象における結腸癌を治療する方法であって、
－　細胞表面マーカーＣＤ３２６およびＣＤ４４のいずれか１つ以上の存在を判定することにより、対象における結腸癌幹細胞の存在を同定するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における結腸癌を治療する方法に関する。
【００４１】
本発明はまた、対象における結腸癌を予防する方法であって、
－　細胞表面マーカーＣＤ３２６およびＣＤ４４のいずれか１つ以上の存在を判定することにより、対象における結腸癌幹細胞の存在を同定するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における結腸癌を予防する方法に関する。
【００４２】
本発明はまた、対象における結腸癌の発症を遅延させる方法であって、
－　細胞表面マーカーＣＤ３２６およびＣＤ４４のいずれか１つ以上の存在を判定することにより、対象における結腸癌幹細胞の存在を同定するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における結腸癌の発症を遅延させる方法に関する。
【００４３】
本発明はまた、対象における結腸癌の再発を予防する方法であって、
－　結腸癌のための治療を受けた対象を提供するステップ；ならびに

－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における結腸癌の再発を予防する方法に関する。
【００４４】
本発明はまた、結腸癌のための治療に対象を感作させる方法であって、
－　結腸癌のための治療を受けるべき対象を提供するステップ、ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより結腸癌のための治療に対象を感作させる方法に関する。
【００４５】
本発明はまた、対象における膵臓癌を治療する方法であって、
－　細胞表面マーカーＣＤ３２６、ＣＤ４４およびＣｘＣＲ４のいずれか１つ以上の存在を判定することにより、対象における膵臓癌幹細胞の存在を同定するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における膵臓癌を治療する方法に関する。
【００４６】
本発明はまた、対象における膵臓癌を予防する方法であって、
－　細胞表面マーカーＣＤ３２６、ＣＤ４４およびＣｘＣＲ４のいずれか１つ以上の存在を判定することにより、対象における膵臓癌幹細胞の存在を同定するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における膵臓癌を予防する方法に関する。
【００４７】
本発明はまた、対象における膵臓癌の発症を遅延させる方法であって、
－　細胞表面マーカーＣＤ３２６、ＣＤ４４およびＣｘＣＲ４のいずれか１つ以上の存在を判定することにより、対象における膵臓癌幹細胞の存在を同定するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における膵臓癌の発症を遅延させる方法に関する。
【００４８】
本発明はまた、対象における膵臓癌の再発を予防する方法であって、
－　膵臓癌のための治療を受けた対象を提供するステップ；ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより対象における膵臓癌の再発を予防する方法に関する。
【００４９】
本発明はまた、膵臓癌のための治療に対象を感作させる方法であって、
－　膵臓癌のための治療を受けるべき対象を提供するステップ、ならびに
－　治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与するステップ
を含み、
それにより膵臓癌のための治療に対象を感作させる方法に関する。
【００５０】
本発明はまた、（ａ）癌のための治療を受けた対象における癌の進行の最小化、（ｂ）癌のための治療を受けた対象における微小残存病変の治療、または（ｃ）後続の癌のための治療への対象の感作において使用されるキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを含み、またはそれらからなる組成物に関する。典型的には、組成物は、薬学的に許容可能な希釈剤、賦形剤または担体をさらに含む。
【００５１】
本発明はまた、癌のための治療を受けた対象における癌の進行を最小化するキットであっ

て、少なくとも１つの投薬単位を含み、投薬単位は、キモトリプシノーゲン、トリプシノーゲンおよび薬学的に許容可能な希釈剤、賦形剤または担体を含むキットを提供する。場合により、キットは、使用者に本明細書に記載の本発明の方法によるキモトリプシノーゲンの投薬単位の投与を指示する説明書も含む。

【００５２】

本発明はまた、本発明の方法において使用される本発明のキットを提供する。

【００５３】

本発明の任意の態様において、キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンは、１：１もしくは約１：１～１０：１もしくは約１０：１、４：１もしくは約４：１～８：１もしくは約８：１、５：１もしくは約５：１～７：１もしくは約７：１の範囲内、または約６：１の重量比で投与する。さらに、上記の任意の組成物は、キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを、１：１もしくは約１：１～１０：１もしくは約１０：１、４：１もしくは約４：１～８：１もしくは約８：１、５：１もしくは約５：１～７：１もしくは約７：１の範囲、または約６：１の重量比で有する。

【００５４】

本発明の任意の態様において、キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンは、静脈内、皮下または筋肉内投与する。

【００５５】

本発明の任意の態様において、キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンは、同時または連続投与することができる。

【００５６】

本発明の方法または使用の任意の態様において、方法または使用は、癌を有し、またはその発症リスクがある対象を同定するステップをさらに含む。好ましくは、癌は、本明細書に記載のいずれかのものである。

【００５７】

本発明の任意の態様において、組成物は、アミラーゼを含有せず、または方法もしくは使用は、アミラーゼを投与しない。

【００５８】

本明細書に記載の本発明の任意の態様、実施形態または形態において、投与されるキモトリプシノーゲンの量は、１ｍｇ／ｋｇ、１．５ｍｇ／ｋｇ、２ｍｇ／ｋｇ、３．５ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ、１５ｍｇ／ｋｇ、２０ｍｇ／ｋｇ、４０ｍｇ／ｋｇ、４５ｍｇ／ｋｇ、１３５ｍｇ／ｋｇ、２５０ｍｇ／ｋｇまたは５００ｍｇ／ｋｇ以上であり得る。

【００５９】

本明細書に記載の本発明の任意の態様、実施形態または形態において、投与されるトリプシノーゲンの量は、０．２ｍｇ／ｋｇ、０．２５ｍｇ／ｋｇ、０．４ｍｇ／ｋｇ、０．６ｍｇ／ｋｇ、０．８ｍｇ／ｋｇ、２ｍｇ／ｋｇ、２．５ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ、７ｍｇ／ｋｇ、８ｍｇ／ｋｇ、２０ｍｇ／ｋｇ、４０ｍｇ／ｋｇまたは８０ｍｇ／ｋｇ以上であり得る。

【００６０】

本明細書に記載の本発明の任意の態様、実施形態または形態において、ヒトに投与されるキモトリプシノーゲンの量は、０．１ｍｇ／ｋｇ、０．１５ｍｇ／ｋｇ、０．２５ｍｇ／ｋｇ、０．４ｍｇ／ｋｇ、１．２ｍｇ／ｋｇ、３．５ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ、２０ｍｇ／ｋｇまたは４０ｍｇ／ｋｇ以上であり得る。

【００６１】

本明細書に記載の本発明の任意の態様、実施形態または形態において、ヒトに投与されるトリプシノーゲンの量は、０．０２ｍｇ／ｋｇ、０．０３ｍｇ／ｋｇ、０．０５ｍｇ／ｋｇ、０．０６ｍｇ／ｋｇ、０．２ｍｇ／ｋｇ、０．６ｍｇ／ｋｇ、１．５ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇまたは６ｍｇ／ｋｇ以上であり得る。

【００６２】

好ましくは、本明細書に記載の本発明の任意の態様、実施形態または形態において、投与

されるキモトリプシノーゲンの量は、１ｍｇ／ｋｇ～４１ｍｇ／ｋｇ、１．５ｍｇ／ｋｇ～５００ｍｇ／ｋｇ、２ｍｇ／ｋｇ～２５０ｍｇ／ｋｇ、３．５ｍｇ／ｋｇ～１３５ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇまたは１５ｍｇ／ｋｇ～４５ｍｇ／ｋｇの範囲内であり得る。

【００６３】

好ましくは、本明細書に記載の本発明の任意の態様、実施形態または形態において、投与されるトリプシノーゲンの量は、０．２ｍｇ／ｋｇ～７ｍｇ／ｋｇ、０．２５ｍｇ／ｋｇ～８０ｍｇ／ｋｇ、０．４ｍｇ／ｋｇ～４０ｍｇ／ｋｇ、０．６ｍｇ／ｋｇ～２０ｍｇ／ｋｇ、０．８ｍｇ／ｋｇ～８ｍｇ／ｋｇ、または２．５ｍｇ／ｋｇ～８ｍｇ／ｋｇ超であり得る。

【００６４】

上記の本発明の任意の組成物において、組成物は、関連するｍｇ、またはｍｇ／ｋｇのキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを対象に投与するために適合させることができる。

【００６５】

文脈がそうでないことを要求する場合を除き、本明細書において使用される用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」およびその用語の変形語、例えば、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」および「含んだ（ｃｏｍｐｒｉｓｅｄ）」は、さらなる添加剤も、構成成分も、整数も、ステップも排除するものではない。

【００６６】

本発明のさらなる態様および上記段落に記載の態様のさらなる実施形態は実施例として挙げられ、添付の図面を参照して以下の詳細な説明から明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【００６７】

【図１】トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンについてのＩＣ５０を測定するためのＭＴＴアッセイ。処理濃度に対する細胞増殖率を、変動濃度のトリプシノーゲン／キモトリプシノーゲン（１：６）またはインターフェロンアルファ（ＩＦＮ）により処理された結腸ＨＣＴ－１１６ＣＳＣおよび膵臓ＢｘＰＣ３ＣＳＣについて示す。

【図２】ヒト膵臓癌細胞系ＢｘＰＣ３についての細胞周期アッセイ。パネルａおよびｂは、膵臓非ＣＳＣについてのアッセイ結果を示し；パネルｃおよびｄは、膵臓ＣＳＣについてのアッセイ結果を示す。

【図３】ヒト結腸癌細胞系ＨＣＴ－１１６についての細胞周期アッセイ。パネルａおよびｂは、結腸非ＣＳＣについてのアッセイ結果を示し；パネルｃおよびｄは、結腸ＣＳＣについてのアッセイ結果を示す。

【図４】ヒト膵臓細胞系ＢｘＰＣ３についてのアルデヒドデヒドロゲナーゼアッセイ。対照、ＰＲＰ、ＰＲＰ＋ＩＦＮまたはＩＦＮによる細胞の処理後の膵臓非ＣＳＣおよびＣＳＣ中のＡＬＤＨ陽性細胞の割合を示す。

【図５－１】ＰＲＰ、ＰＲＰ＋ＩＦＮまたはＩＦＮによる細胞の処理後のマーカーＣＤ３２６、ＣＤ４４およびＣｘＣＲ４の細胞表面発現に基づく膵臓ＣＳＣのフローサイトメトリーソーティングのドットプロット結果。

【図５－２】図５の続きを示す。

【図５－３】図５の続きを示す。

【図５－４】図５の続きを示す。

【図５－５】図５の続きを示す。

【図５－６】図５の続きを示す。

【図５－７】図５の続きを示す。

【図５－８】図５の続きを示す。

【図６】膵臓ＣＳＣ中のＣＳＣマーカーの発現を示すヒストグラム：３つのマーカーＣＤ３２６、ＣＤ４４、ＣｘＣＲ４を有する細胞の割合を、ＰＲＰ、ＰＲＰ＋ＩＦＮまたはＩＦＮにより処理されたＣＳＣおよび非ＣＳＣについて示す。２つの別個のアッセイの結果を示す。

【図７】結腸ＣＳＣのフローサイトメトリーソーティングの結果を示すヒストグラム。ＡＬＤＨ陽性であり、ＣＤ４４およびＣＤ３２６マーカーを発現するＨＣＴ－１１６ＣＳＣの割合を、ＰＲＰ、ＩＦＮまたはＰＲＰ＋ＩＦＮによる処理後の細胞について示す。
【図８】ＰＲＰによる処理後のマーカーＣＤ４４またはＣＤ３２６を発現するＡＬＤＨ陽性ＨＣＴ－１１６ＣＳＣの割合を示すヒストグラム。
【図９】ＰＲＰ、ＩＮＦまたはＰＲＰ＋ＩＦＮによる処理後２および５日目における膵臓ＢｘＰＣ３ＣＳＣのスフェア形成を示す代表的な光学顕微鏡観察画像。
【図１０】ＰＲＰ、ＩＮＦまたはＰＲＰ＋ＩＦＮによる処理後２および５日目における結腸ＨＣＴ－１６６ＣＳＣによる球状形成の代表的な光学顕微鏡観察画像。
【図１１－１】ＳＫ－Ｎ－ＳＨ細胞をＣＳＣ条件下で培養した場合に形成された神経芽細胞腫スフェアの代表的な光学顕微鏡観察画像（パネルＡおよびＣ）。培地へのＰＲＰの添加は、神経芽細胞腫スフェアの形成を妨害する（パネルＢおよびＤ）。元の倍率：パネルＡおよびＢについて１０倍；パネルＣおよびＤについて２０倍。
【図１１－２】ＥおよびＦ：未処理およびＰＲＰ処理されたＢｘＰＣ３およびＳＫ－Ｎ－ＳＨ細胞中の一次（Ｅ）および二次（Ｆ）スフェアの数。
【図１２】ＰＲＰによる処理後のＥＭＴ関連遺伝子の発現についてのｑＲＴ－ＰＣＲ分析の結果（淡灰色）。データを内部対照としてのＧＡＰＤＨを使用する未処理ＣＳＣについて１に正規化し、平均±ＳＥＭ（ｎ＝３）としてグラフ化する。
【図１３】ＰＲＰによる処理後のＣＳＣ関連遺伝子の発現についてのｑＲＴ－ＰＣＲ分析の結果（淡灰色）。データを内部対照としてのＧＡＰＤＨを使用する未処理ＣＳＣについて１に正規化し、平均±ＳＥＭ（ｎ＝３）としてグラフ化する。
【図１４－１】Ａ．ＣＳＣに対するＰＲＰの抗腫瘍活性を評価するためのインビボ試験設計。垂直バーは、ＰＲＰボーラス注射を表す。Ｂ．膵臓ＣＳＣの腫瘍開始能を阻害するＰＲＰの能力を評価するためのインビボ試験設計。
【図１４－２】Ｃ．インビボでのＣＳＣの転移潜在性を評価するためのインビボ試験設計。垂直バーは、ＰＲＰボーラス注射を意味する。
【図１５】ＣＳＣの接種９．５週間後のマウスから摘出された腫瘍の画像。対照群、ｎ＝１０；予防群、ｎ＝８；予防＋治療群ｎ＝６。
【図１６】ＣＳＣの接種後のマウスにおける腫瘍発生の割合。腫瘍発生は、接種９．５週間後に計測した。予防および予防＋治療群における発生の割合を、対照マウス（予防も治療もなし）において観察される発生の比率として示す。Ｐ＝０．０３９
【図１７】処理終了時（接種９．５週間後）におけるマウスにおける平均腫瘍容積（ｍｍ２）±ＳＥ。対照群と予防＋治療群との間の腫瘍重量の差は、統計的に有意であった、ｐ＜０．０５。
【図１８】Ａ．ＣＳＣ接種後２日毎に計測されたそれぞれの実験群（対照、予防群および予防＋治療群）における腫瘍容積を示すグラフ。Ｘ軸は、腫瘍の発症からの日数を示す。０日目は、ＣＳＣ接種から３０日目に対応する。Ｂ．ＣＳＣ接種後２日毎（率ベースＴ／Ｃ）に計測されたそれぞれの実験群における腫瘍容積を示すグラフ（対照、予防群および予防＋治療群）。Ｘ軸は、腫瘍の発症からの日数を示す。０日目は、ＣＳＣ接種からの３０日目に対応する。アスタリスクは、統計的有意性、ｐ＜０．０５を示す。
【図１９】ＣＳＣ接種９．５週間後の対照、予防および予防＋治療群における腫瘍形成指数（ＴＩｎ）±ＳＥ。ＴＩｎは、腫瘍発生および腫瘍重量の尺度である。対照と、予防および予防＋治療群の両方との間のＴＩｎの差は、統計的に有意であった、ｐ＜０．０１。
【図２０】Ｈ＆Ｅ染色を示す代表的な画像。皮下ゼノグラフトモデルにおいて、対照、予防および予防＋治療群におけるマウスからの腫瘍を摘出し、固定した。ＢｘＰＣ３腫瘍組織をパラフィン中で包埋し、５μｍの厚さに切片化し、Ｈ＆Ｅにより染色した（左側：倍率２０倍；中央：倍率１０倍；右側：倍率４０倍）。
【図２１】皮下ゼノグラフトモデルにおけるＢｘＰＣ３腫瘍のマッソントリコム（Ｍａｓｓｏｎ－ｔｒｉｃｈｏｍｅ）染色を示す代表的な画像。対照、予防および予防＋治療群におけるマウスからの腫瘍の染色を示す。

【図２２】ＰＲＰ処理後のＣＳＣ中のＥＭＴ関連遺伝子の発現レベル。Ａ：ＥＭＴの間に通常は下方調節されるが、ＰＲＰ処理後に上方調節される遺伝子の発現。Ｂ：ＥＭＴの間に通常は上方調節されるが、ＰＲＰ処理後に下方調節される遺伝子の発現。
【図２３】ＣＳＣ中の細胞分化と関連する遺伝子の発現レベルに対するＰＲＰ処理の効果。
【図２４】ＣＳＣ中の腫瘍抑制因子遺伝子の発現レベルに対するＰＲＰ処理の効果。
【図２５】転移および侵入（Ａ）ならびに細胞接着（Ｂ）と関連する遺伝子のＣＳＣ中の発現レベルに対するＰＲＰ処理の効果。
【図２６】サイトカインをコードする遺伝子のＣＳＣ中の発現レベルに対するＰＲＰ処理の効果。
【図２７】ＣＳＣマーカー遺伝子の発現に対するＰＲＰ処理の効果。
【図２８】ＣＳＣ中のＭＡＰＫ関連遺伝子の発現に対するＰＲＰ処理の効果。
【発明を実施するための形態】
【００６８】
本明細書に開示および定義される本発明は、本文または図面に挙げられ、またはそれらから明らかな個々の特徴部の２つ以上の全ての代替組合せに及ぶことが理解される。これらの異なる組合せの全ては、本発明の種々の代替態様を構成する。
【００６９】
目下、本発明のある実施形態が詳細に参照される。本発明は実施形態とともに記載される一方、本発明は、本発明をそれらの実施形態に限定するものでないことが理解される。対照的に、本発明は、特許請求の範囲により定義される本発明の範囲内に含まれ得る全ての代替物、改変、および均等物をカバーするものとする。
【００７０】
当業者は、本発明の実施において使用することができる、本明細書に記載のものと類似または同等の多くの方法および材料を認識する。本発明は、記載される方法および材料に決して限定されない。本明細書に開示および定義される発明は、本文または図面に挙げられ、またはそれらから明らかな個々の特徴部の２つ以上の全ての代替組合せに及ぶことが理解される。これらの異なる組合せの全ては、本発明の種々の代替態様を構成する。
【００７１】
本明細書に言及される特許および刊行物の全ては、参照により全体として組み込まれる。
【００７２】
本明細書を解釈する目的のため、単数形で使用される用語は複数形も含み、その逆も同様である。
【００７３】
癌に対する現在の治療方針は、治療不成功をもたらす頻度が高い厳しい制限を有する。蓄積された証拠は、これらの不成功についての基盤がＣＳＣを排除不能である現在の治療法に起因することを示唆しており、患者は再発および転移のリスクがあることを意味する。さらに、ＣＳＣ集団が、非ＣＳＣ集団よりも慣用の癌療法に耐性であることを示唆する証拠が存在する。したがって、ＣＳＣの排除は悪性腫瘍疾患の治療において重要である。
【００７４】
本発明は、膵臓（前）酵素キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンの組合せを提供することにより、ＣＳＣの増殖を低減させ、癌細胞集団中のＣＳＣの集団を低減させ、スフェア形成を阻害し、上皮から間葉への表現型の移行と関連するＣＳＣ中の遺伝子の発現を低減させることが可能であるという驚くべき知見に基づく。したがって、本発明者らは、癌細胞集団中のＣＳＣを標的化する新規方法を同定した。この知見は、特に、慣用の癌療法が標的ＣＳＣを根絶し得ないことが多く、見かけ上の癌の治療の成功にかかわらず癌再発の高い見込みが存在することを考慮すると、癌のための治療を既に受けた個体の治療に重要な用途を有する。
【００７５】
したがって、第１の態様において、本発明は、癌のための治療を受けた対象における癌の進行を最小化する方法であって、対象に治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプ

シノーゲンを投与することを含む方法を提供する。
【００７６】
キモトリプシノーゲン（本明細書において「Ｃ」と略記することができる）は、タンパク質を以下のアミノ酸：チロシン、トリプトファン、フェニルアラニンおよびロイシンにおいて優先的に開裂する酵素キモトリプシンの前酵素形態である。キモトリプシンは、キモトリプシンＡ、キモトリプシンＢ（例として、Ｂ１およびＢ２形態を）、キモトリプシンＣ、ａ－キマロフト（ｃｈｙｍａｒｏｐｈｔｈ）、アバザイム（ａｖａｚｙｍｅ）、キマール（ｃｈｙｍａｒ）、キモテスト（ｃｈｙｍｏｔｅｓｔ）、エンゼオン（ｅｎｚｅｏｎ）、クイマール（ｑｕｉｍａｒ）、クイモトラーゼ（ｑｕｉｍｏｔｒａｓｅ）、α－キマール、α－キモトリプシンＡ、α－キモトリプシンと称することができ、またはそれらを含む。キモトリプシンＣは、ブタキモトリプシノーゲンＣから、またはプロカルボキシペプチダーゼＡのウシサブユニットＩＩから形成され得、タンパク質を以下のアミノ酸：チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、ロイシン、メチオニン、グルタミン、およびアスパラギンにおいて優先的に開裂する。キモトリプシノーゲンとしては、キモトリプシノーゲンＡ、キモトリプシノーゲンＢ１およびキモトリプシノーゲンＢ２が挙げられる。
【００７７】
トリプシノーゲン（本明細書において「Ｔ」と略記することができる）は、タンパク質をアルギニンおよびリジンにおいて優先的に開裂するトリプシンの前酵素形態である。トリプシンは、α－トリプシン、β－トリプシン、コクナーゼ、パレンザイム（ｐａｒｅｎｚｙｍｅ）、パレンジモール（ｐａｒｅｎｚｙｍｏｌ）、トリプタール（ｔｒｙｐｔａｒ）、トリピュア（ｔｒｙｐｕｒｅ）、疑似トリプシン、トリプターゼ、トリプセリム（ｔｒｉｐｃｅｌｌｉｍ）、精子受容体ヒドロラーゼβ－トリプシンと称することができ、またはそれらを含み、トリプシノーゲンから１つのペプチド結合の開裂により形成され得る。さらなるペプチド結合開裂は、αおよび他のアイソフォームを産生する。複数のカチオン性およびアニオン性トリプシンは、多くの脊椎動物の膵臓から、および下等種、例として、ザリガニ、昆虫（コクナーゼ）および微生物（ストレプトマイシン生産菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｇｒｉｓｅｕｓ）から単離することができる。消化の間の正常のプロセスにおいて、不活性トリプシノーゲンは腸内粘膜中に存在するエンテロペプチダーゼにより活性化され、セリンプロテアーゼであり、次いで塩基性アミノ酸／タンパク質のカルボキシル側上でペプチド結合を開裂するように作用する酵素トリプシンを形成する。
【００７８】
上記のとおり、前酵素形態は、本質的に、（例えば、インビボまたはインビトロ活性化により）インサイチューで活性化状態になる酵素の不活性化形態を提供する。例えば、前酵素の活性化（前酵素の活性酵素への変換）は、ＣＳＣとの接触時に生じ得る。前酵素トリプシノーゲンおよびキモトリプシノーゲンは、癌細胞との接触時で、および健常細胞との非接触時に酵素トリプシンおよびキモトリプシンに選択的に活性されることが考えられている。前酵素の使用は、活性酵素のインサイチューでの提供に伴う課題、例えば、目的とする癌細胞標的への到達前の不所望な反応または酵素の不活性化を低減させる。
【００７９】
理論により拘束されるものではないが、本発明者らは、前酵素キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンの組合せが、腫瘍ニッチに寄与する成長因子および血管新生刺激因子の産生を阻害するように作用し、結果的に腫瘍生着についての潜在性を低減させると考える。さらに、プロテアーゼ前酵素はＣＳＣの分化を誘導し、それにより、ＣＳＣの全集団を低減させ、腫瘍の再発または転移の見込みを低減させる。例えば、本発明者らは、キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンが、適切な条件下でＣＳＣに提供される場合、ＣＳＣの増殖を低減させ、癌細胞集団中のＣＳＣの集団を低減させ、スフェア形成を阻害し、上皮から間葉への表現型の移行と関連するＣＳＣ中の遺伝子の発現を低減させることを示した。これを考慮すると、キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンの使用は、特に、慣用の癌治療が典型的にはＣＳＣを標的化も最小化もしないことを考慮すると、癌のための治療を受けた対象における癌の進行、再発または転移の最小化において特に有用

である。
【００８０】
本明細書において使用される「癌の進行を最小化すること」は、腫瘍の再発または転移を予防し、または遅延させるように対象を治療することを意味する。癌の進行の最小化は、癌の治療後に癌の再発を予防し、または遅延させることを含む。予防される再発としては、例えば、外科的摘出後の腫瘍床中の再発が挙げられる。あるいは、再発としては、身体の別の部分における癌の転移が挙げられる。本明細書において使用される用語「再発を予防すること」および「再燃を予防すること」は、互換可能である。
【００８１】
本発明はまた、個体における癌の発症を予防する方法を含む。例えば、癌の予防が要求される個体は、癌を発症するリスクがあるが、依然として検出可能な癌を有さないとみなすことができる。癌の発症のリスクがある個体は、癌の家族歴を有する個体、および／または遺伝子試験もしくは他の試験が癌の発症の高いリスクもしくは高い見込みを示す個体であり得る。個体は、癌幹細胞を有し得るが、依然としていかなる検出可能な腫瘍も有さない。癌の発症を予防する方法は、対象における癌の発症を遅延させる方法を含むことが理解される。
【００８２】
対象が既に受けた治療は、任意の慣用の癌治療、例として、化学療法、放射線療法、免疫療法および／または腫瘍の外科的摘出であり得る。一実施形態において、対象が既に受けた治療は、腫瘍の外科的摘出である。別の実施形態において、例えば、非固形腫瘍の治療において、対象は、化学療法、放射線療法または免疫療法、またはそれらの組合せを受けている。いっそうさらなる実施形態において、対象は、本発明の方法に従ってキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンが投与される前に外科的、化学療法的および放射線療法的介入を受けている。腫瘍のバルクまたは質量を低減させるための任意の方法が、対象が既に受けた治療として企図される。
【００８３】
癌のための治療を受けた対象は、部分または完全寛解であり得る。換言すると、上記の癌のための治療を受けた対象は、身体検査、放射線試験時に、場合により、血液または尿検査からのバイオマーカーレベルにより見出すことができる腫瘍増殖の計測可能なパラメータの５０％以上の低減を有し得る。あるいは、対象が完全寛解である場合、対象がいかなる検出可能な癌の徴候も有さないような疾患の全ての検出可能な兆候が完全に消散している。対象は、実質的に検出不可能な癌の徴候を有し得る。「実質的に検出不可能な」癌は、一般に、治療法が癌のサイズ、容積または他の物理的尺度を枯渇させ、その結果、関連標準検出技術、例えば、インビボイメージングを使用して、その治療法の結果として癌が完全に検出可能でない状況を指す。
【００８４】
慣用の癌療法のキーとなる制限は、腫瘍の外科的摘出、およびアジュバント療法（例えば、化学療法）後でも、微小残存病変が存在する可能性が高いことである。微小残存病変（ＭＲＤ）は、治療後に患者において残存する少数の癌細胞を指す。典型的には、これらの細胞は検出困難であり、または全く検出することができず、その結果、患者は、いかなる検出可能な癌も有さないと言われる。しかしながら、ＭＲＤは、癌再燃の主因であり、集中治療後にもＣＳＣが存在することは、ＭＲＤへのキーとなる寄与因子であると考えられる。
【００８５】
したがって、本発明は、癌のための治療を受けた対象における微小残存病変を治療または予防する方法であって、対象に治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを投与することを含む方法を提供する。
【００８６】
キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンによる治療の目的またはアウトカムは、癌細胞の数を低減させ；一次腫瘍サイズを低減させ；末梢器官中への癌細胞浸潤を阻害し（

すなわち、ある程度減速させ、好ましくは、停止させ）；腫瘍転移を阻害し（すなわち、ある程度減速させ、好ましくは、停止させ）；腫瘍増殖をある程度阻害し；および／または疾患に伴う症状の１つ以上をある程度緩和させることであり得る。

【００８７】

治療の効力は、生存の持続期間、疾患進行までの時間、奏功率（ＲＲ）、応答の持続期間、および／または生活の質を評価することにより計測することができる。

【００８８】

一実施形態において、本方法は、疾患進行の遅延に特に有用である。

【００８９】

一実施形態において、本方法は、対象の生存、例として、全生存期間および無増悪生存期間の延長に特に有用である。

【００９０】

一実施形態において、本方法は、治療に応答して癌の全ての徴候が消散した治療法に対する完全応答の提供に特に有用である。これは必ずしも癌が治癒されたことを意味するものではない。

【００９１】

一実施形態において、本方法は、治療に応答して１つ以上の腫瘍もしくは病変のサイズの、または体内の癌の程度が減少した治療法に対する部分応答の提供に特に有用である。

【００９２】

本発明の方法はまた、対象が慣用の癌のための治療を受ける前のＣＳＣの標的治療を含む。当業者は、このアプローチが腫瘍を外科的に摘出することが可能でない血液癌のための特定の用途を有することを認識する。したがって、本発明は、癌のための治療の前に対象を感作させる方法であって、対象が癌のための治療を受ける前に、治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを対象に投与することを含む方法を提供する。

【００９３】

さらに、本発明の方法はまた、対象が慣用の癌のための治療を受けると同時のＣＳＣの標的治療を含む。したがって、本発明は、対象を癌についてさらに治療する、例として、治療の完了時の微小残存病変の見込みを予防し、または癌の再発を遅延させ、もしくは予防する方法であって、治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを、慣用の癌のための治療と同時に対象に投与することを含む方法を提供する。

【００９４】

癌幹細胞の同定は、１つ以上のマーカーの検出によるものであり得る。例示的なマーカーを以下の表１に示す。

【００９５】

【表１】

腫瘍タイプ	CSC マーカーの表現型
白血病	$CD34^{+}CD38^{-}$HLA-DR-$CD71^{-}CD90^{-}CD117^{-}CD123^{+}$
乳癌	$ESA^{+}CD44^{+}CD24^{-/low}Lineage^{-}$, ALDH-$1^{high}$
肝臓癌	$CD133^{+}$, $CD49f^{+}$, $CD90^{+}$
脳腫瘍	$CD133^{+}$, $BCRP1^{+}$, $A2B5^{+}$, SSEA-1^{+}
肺癌	$CD133^{+}$, $ABCG2^{high}$
結腸癌	$CD133^{+}$, $CD44^{+}$, $CD166^{+}$, $EpCAM^{+}$, $CD24^{+}$または $CD326^{+}$および $CD44^{+}$
多発性骨髄腫	$CD138^{-}$
前立腺癌	$CD44^{+}$,$\alpha2\beta1^{high}$, $CD133^{+}$
膵臓	$CD133^{+}$, $CD44^{+}$, $EpCAM^{+}$, $CD24^{+}$または $CD326^{+}$, $CD44^{+}$および $CxCR4^{+}$
黒色腫	$CD20^{+}$
頭頸部癌	$CD44^{+}$

【００９６】
癌幹細胞は、本明細書に記載の任意の方法を使用して組織または試料から単離することができる。腫瘍または腫瘍間質の試料からの癌幹細胞は、試料の少なくとも一部を切片化することにより同定し、任意の１つ以上の癌幹細胞マーカーについて標識（好ましくは、免疫標識）し、免疫蛍光により分析することができる。
【００９７】
「対象」は、哺乳動物を含む。哺乳動物は、ヒトであり得、または家畜、動物園用動物、もしくはコンパニオンアニマルであり得る。特に、本発明の方法は、ヒトの医学的治療に好適である一方、それらは、獣医的治療、例として、コンパニオンアニマル、例えば、イヌおよびネコ、ならびに家畜、例えば、ウマ、ウシおよびヒツジ、または動物園用動物、例えば、ネコ科、イヌ科、ウシ科、および有蹄動物の治療にも適用可能であることが特に企図される。対象は、癌または他の障害に罹患していてもよく、癌にも他の障害にも罹患していなくてもよい（すなわち、検出可能な疾患を有さない）。
【００９８】
ヒト対象の典型的な体重は、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５または１１０ｋｇ以上であり得る。
【００９９】
用語「治療有効量」は、癌またはその拡散（転移）の進行を最小化し、治療し、その再発を予防し、または改善し得る組成物、または組成物中の薬剤もしくは化合物の量を指す。治療有効量は、癌の治療に関して実験的および定型的に決定することができ、平均余命の増加をもたらす。
【０１００】
本明細書に記載のとおり、本発明の方法は、新生物および関連病態に伴う微小残存病変、癌、腫瘍、悪性腫瘍ならびに転移病態の進行を最小化すること、その再発を予防することまたは治療することを含む。本発明の方法または医薬組成物により治療することができる

固形腫瘍および転移に関連する組織および器官としては、限定されるものではないが、胆管、膀胱、血液、脳、乳房、子宮頸部、結腸、子宮内膜、食道、頭部、頸部、腎臓、咽頭、肝臓、肺、髄質、メラニン、卵巣、膵臓、前立腺、直腸、腎、網膜、皮膚、胃、精巣、甲状腺、尿路、および子宮が挙げられる。

【０１０１】

本発明の方法および医薬組成物は、以下のタイプの癌および転移性癌腫：膵臓癌、食道癌、結腸癌、腸癌、前立腺癌、卵巣癌、胃癌、乳癌、悪性黒色腫、神経芽細胞腫または肺癌の再発の予防を含めた進行の最小化に有用である。好ましくは、癌は、膵臓癌、結腸癌または卵巣癌である。より好ましくは、癌は、膵臓癌である。

【０１０２】

本発明の方法および医薬組成物は、例えば、腫瘍細胞におけるアポトーシス、細胞間接着、分化および免疫原性（免疫系による標的化および除去）を増加させることにより癌を治療する多重効果アプローチを提供し得る。したがって、免疫系を抑制し、または損傷させ得るいかなる他の治療も不存在下で治療を実施することが有益である。

【０１０３】

治療の方法の提供に加え、本発明は、癌のための治療を受けた対象における癌の進行を最小化するための医薬品の製造における治療有効量のキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンの使用を含むことが認識される。

【０１０４】

さらなる実施形態において、使用は、対象における微小残存病変を治療するための医薬品の製造における、または対象が癌のための治療を受ける前に対象を感作させるためのキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンの使用を含む。

【０１０５】

本発明の方法は、キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンの、それが必要とされる対象への投与を含む。

【０１０６】

本発明の任意の態様において使用されるトリプシノーゲンおよびキモトリプシノーゲンは、単離され、精製され、実質的に精製された組換え体または合成物であり得る。

【０１０７】

前酵素トリプシノーゲンおよびキモトリプシノーゲンは、キモトリプシンクラス３．４．２１．１もしくは３．４．２１．２またはクラス３．４．２１．４からのトリプシンから選択され、または任意の他の好適な資源（国際生化学・分子生物学連合の命名法委員会（Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｕｎｉｏｎ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）の分類に従ってグループ化されたクラス）から選択される酵素の前駆体であり得る。これらの酵素は市販されており、ヒト、ウシまたはブタ起源のものであり得る。

【０１０８】

本発明のある態様において、キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンは、同時または連続投与することができる。同時投与の場合、キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンは、同一の医薬組成物中に含めることができる。同一の医薬配合物中で組み合わせる場合、キモトリプシノーゲン：トリプシノーゲンの重量比は、１：１～１０：１もしくは約１０：１、４：１もしくは約４：１～８：１もしくは約８：１、５：１もしくは約５：１～７：１もしくは約７：１の範囲、または約６：１であり得る。一実施形態において、キモトリプシノーゲン：トリプシノーゲンの重量比は、５：１～７：１の範囲、好ましくは、６：１である。

【０１０９】

一態様において、本発明の医薬配合物は、活性剤としてキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンのみを含む。代替的な実施形態において、追加の活性剤を組成物中に含める。例えば、膵臓前酵素キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンに加え、組成物は、他の公知の癌治療のための治療剤を含み得る。

【０１１０】
本発明の医薬組成物は、例えば、慣用の固体または液体ビヒクルまたは希釈剤、ならびに所望の投与方式に適切なタイプの医薬添加剤（例えば、賦形剤、結合剤、保存剤、安定剤、着香剤など）を技術、例えば、医薬配合物の分野において周知のものに従って用いることにより配合することができる。
【０１１１】
本発明の医薬組成物、およびその製剤または配合物は、キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを含む組成物の構成成分を一緒に混合することにより調製することができる。混合は、連続的または同時に実施することができる。
【０１１２】
本発明の医薬組成物は、単位剤形で利便的に提供することができ、薬学の分野において周知の方法のいずれかにより調製することができる。全ての方法は、活性剤および／またはプロテアーゼ前酵素を、１つ以上のアクセサリー成分を構成する担体と会合させるステップを含む。一般に、医薬組成物は、活性剤および／またはプロテアーゼ前酵素を液体担体または微粉固体担体またはその両方と均等および緊密に会合させ、次いで必要な場合、生成物を所望の配合物に成形することにより調製される。活性剤および／またはプロテアーゼ前酵素は、単回または反復投与後に疾患のプロセスまたは状態に対する所望の効果を産生するために十分な量の単位剤形で提供される。
【０１１３】
本発明の医薬組成物は、例えば、錠剤、トローチ剤、ロゼンジ剤、水性もしくは油性懸濁液、分散性散剤または顆粒剤、エマルション、硬もしくは軟カプセル剤、またはシロップ剤もしくはエリキシル剤としての経口使用に好適な形態であり得る。経口使用が意図される組成物は、医薬組成物の製造の分野に公知の任意の方法に従って調製することができ、そのような組成物は、薬学的に洗練され、口当たりが良い製剤を提供するために甘味剤、着香剤、着色剤および保存剤からなる群から選択される１つ以上の薬剤を含有し得る。錠剤は、第１および第２の態様のプロテアーゼ前酵素および活性剤を、錠剤の製造に好適な非毒性の薬学的に許容可能な賦形剤との混合物で含有する。これらの賦形剤は、例えば、不活性希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウムまたはリン酸ナトリウム；顆粒および崩壊剤、例えば、コーンスターチ、またはアルギン酸；結合剤、例えば、デンプン、ゼラチンまたはアカシア、および滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクであり得る。錠剤は、未被覆であり得、またはそれらは、胃腸管中での崩壊および吸収を遅延させ、それにより長期間にわたる持続作用を提供するための公知の技術により被覆されていてよい。例えば、時間遅延材料、例えば、グリセリルモノステアレートまたはグリセリルジアステアレートを用いることができる。これらは、制御放出のための浸透圧治療錠剤を形成するために被覆されていてもよい。
【０１１４】
経口使用のための配合物は、第１および第２の態様のプロテアーゼ前酵素および活性剤が不活性固体希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムもしくはカオリンと混合される硬ゼラチンカプセル剤として、または第１および第２の態様のプロテアーゼ前酵素および活性剤が水もしくは油性媒体、例えば、ピーナッツ油、流動パラフィン、もしくはオリーブ油と混合される軟ゼラチンカプセル剤として提供することもできる。
【０１１５】
水性懸濁液は、活性剤およびプロテアーゼ前酵素を、水性懸濁液の製造に好適な賦形剤との混合物で含有する。このような賦形剤は、懸濁化剤、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシ－プロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニル－ピロリドン、トラガカントゴムおよびアカシアゴムであり、分散剤または湿潤剤は、天然存在ホスファチド、例えば、レシチン、またはアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物、例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレン、またはエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物、例えば、ヘプタデカエチレンオキ

シセタノール、またはエチレンオキシドと、脂肪酸およびヘキシトールに由来する部分エステルとの縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート、またはエチレンオキシドと、脂肪酸および無水ヘキシトールに由来する部分エステルとの縮合生成物、例えば、ポリエチレンソルビタンモノオレエートであり得る。水性懸濁液は、１つ以上の保存剤、例えば、エチル、またはｎ－プロピル、ｐ－ヒドロキシベンゾエート、１つ以上の着色剤、１つ以上の着香剤、および１つ以上の甘味剤、例えば、スクロースまたはサッカリンも含有し得る。

【０１１６】

油性懸濁液は、活性剤およびプロテアーゼ前酵素を植物油、例えば、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油もしくはヤシ油中で、または鉱油、例えば、流動パラフィン中で懸濁させることにより配合することができる。油性懸濁液は、増粘剤、例えば、蜜蝋、硬パラフィンまたはセチルアルコールを含有し得る。甘味剤、例えば、上記のもの、および着香剤を添加して口当たりが良い経口製剤を提供することができる。これらは、酸化防止剤、例えば、アスコルビン酸の添加により保存することができる。

【０１１７】

水の添加による水性懸濁液の調製に好適な分散性散剤および顆粒剤は、第１および第２の態様のプロテアーゼ前酵素および活性剤を、分散剤または湿潤剤、懸濁化剤および１つ以上の保存剤との混合物で提供する。好適な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤は、既に上記のものにより例示される。追加の賦形剤、例えば、甘味剤、着香剤および着色剤も存在し得る。

【０１１８】

本発明の医薬組成物は、水中油型エマルションの形態でもあり得る。油相は、植物油、例えば、オリーブ油もしくはラッカセイ油、または鉱油、例えば、流動パラフィンまたはそれらの混合物であり得る。好適な乳化剤は、天然存在ゴム、例えば、アカシアゴムまたはトラガカントゴム、天然存在ホスファチド、例えば、ダイズ、レシチン、および脂肪酸および無水ヘキシトールに由来するエステルまたは部分エステル、例えば、ソルビタンモノオレエート、および前記部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートであり得る。エマルションは、甘味剤および着香剤も含有し得る。

【０１１９】

シロップ剤およびエリキシル剤は、甘味剤、例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ソルビトールおよびスクロースと配合することができる。これらは、粘滑剤、保存剤ならびに着香剤および着色剤も含有し得る。

【０１２０】

本発明の医薬組成物は、無菌注射水性または油性懸濁液の形態であり得る。この懸濁液は、上記の好適な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を使用して公知の技術に従って配合することができる。第１および第２の態様の医薬組成物は、非毒性の非経口的に許容可能な希釈剤または溶媒中の滅菌注射溶液または懸濁液であり得、例えば、１，３－ブタンジオール中溶液としてもよい。用いることができる許容可能なビヒクルおよび溶媒には、水、リンガー液および等張塩化ナトリウム溶液がある。さらに、滅菌固定油が、溶媒または懸濁化媒体として慣用的に用いられる。この目的のため、任意の無刺激固定油、例として、合成モノまたはジグリセリドを用いることができる。さらに、脂肪酸、例えば、オレイン酸が注射剤の調製において使用される。

【０１２１】

特定の実施形態において、本発明の医薬組成物は、薬物の直腸投与のための坐剤として配合される。これらの配合物は、第１および第２の態様のプロテアーゼ前酵素および活性剤を、常温において固体であるが、直腸温度において液体であり、したがって、直腸中で融解して薬物を放出する好適な無刺激賦形剤と混合することにより調製することができる。このような材料としては、ココアバターおよびポリエチレングリコールが挙げられる。直腸投与は、酵素の経口投与に関連する胃腸管中での腸内肝臓ファーストパス効果を排除す

るために使用することができる。
【０１２２】
本発明の医薬組成物は、リポソーム中で配合することもできる。当分野において公知のとおり、リポソームは、一般に、リン脂質または他の脂質物質に由来する。リポソームは、水性媒体中で分散される単層または多層水和液晶により形成される。リポソームを形成し得る任意の非毒性の生理学的に許容可能で代謝可能な脂質を使用することができる。リポソーム配合物は、安定剤、保存剤、賦形剤などを含有し得る。好ましい脂質は、リン脂質およびホスファチジルコリン、天然物および合成物の両方である。リポソームを形成する方法は、当分野において公知である。
【０１２３】
本発明の医薬組成物は、投与についての説明書と一緒に容器、パック、または分注器中に含めることができる。医薬組成物のプロテアーゼ前酵素および活性剤、ならびに場合により、追加の活性剤は、本明細書に記載の本発明の使用または方法において同時または異なる時間において別個にまたは一緒に摂取すべき容器、パック、または分注器中で離隔された構成成分として提供することができる。
【０１２４】
本発明の医薬組成物に適切な投薬量レベルは、一般に、１日当たり患者体重１ｋｇ当たり約０．０１～５００ｍｇであり、単回または複数回用量で投与することができる。これは、１日当たり約０．１～約２５０ｍｇ／ｋｇ；または１日当たり約０．５～約１００ｍｇ／ｋｇであり得る。好適な投薬量レベルは、１日当たり約０．０１～２５０ｍｇ／ｋｇ、１日当たり約０．０５～１００ｍｇ／ｋｇ、または１日当たり約０．１～５０ｍｇ／ｋｇであり得る。この範囲内で、投薬量は、１日当たり０．０５～０．５、０．５～５または５～５０ｍｇ／ｋｇであり得る。
【０１２５】
経口投与のため、医薬組成物は、１．０～４０００ミリグラムのプロテアーゼ前酵素、特に、１．０、５．０、１０．０、１５．０、２０．０、２５．０、５０．０、７５．０、１００．０、１５０．０、２００．０、２５０．０、３００．０、４００．０、５００．０、７５０．０、１０００、１５００、２０００、２５００、３０００、３５００、および４０００ミリグラムのプロテアーゼ前酵素を、治療すべき患者への投薬量の対症的調整のために含有する錠剤の形態で提供することができる。本明細書に記載の医薬組成物は、１日当たり１～４回、１日当たり１もしくは２回、または１日１回のレジメンに基づき投与することができ、投与の要求の低減は、一般に、より大きいコンプライアンスをもたらす。
【０１２６】
投薬量は、組成物の単回投与形態を与えるか否かに応じて広く変動し得る。本明細書に記載の医薬組成物の実施形態に好適な単回投与は、
・１～１００ｍｇ、特に、２～５０ｍｇ、より特定すると（ｍｇで）１．０、２．５、５．０、７．５、１０．０、１５．０、２０．０、２５．０、３０．０、４０．０、５０．０の量のトリプシノーゲン；および
・１～１００ｍｇ、特に、２～５０ｍｇ、より特定すると（ｍｇで）１．０、２．５、５．０、７．５、１０．０、１５．０、２０．０、２５．０、３０．０、４０．０，５０．０の量のキモトリプシノーゲン
を含み得る。
【０１２７】
しかしながら、任意の特定の患者についての規定の用量レベルおよび投薬量の頻度は変えることができ、種々の因子、例として、用いられる規定化合物の活性、その化合物の代謝安定性および作用の長さ、年齢、体重、全身健康状態、性別、食事、投与方式および時間、排泄速度、薬物組合せ、特定の病態の重症度、ならびに宿主が受ける治療法に依存することが理解される。
【０１２８】

本明細書に記載の医薬組成物の一実施形態の種々の構成成分（存在する場合）についての好適な投薬量レベルは、
・少なくとも０．２ｍｇ／ｋｇの、または０．２～５ｍｇ／ｋｇの範囲の、０．５～２．０ｍｇ／ｋｇの範囲の、または約０．８ｍｇ／ｋｇの量のキモトリプシノーゲン；
・０．５ｍｇ／ｋｇ未満の、または０．０１～０．４ｍｇ／ｋｇの範囲、もしくは０．０５～０．２０ｍｇ／ｋｇの範囲の、または約０．１ｍｇ／ｋｇの量のトリプシノーゲン
を含み得る。
【０１２９】
腫瘍細胞の表面またはその付近に存在する場合に特に有効であり得る、本明細書に記載の医薬組成物の種々の構成成分（存在する場合）に好適な濃度は、
・少なくとも０．５ｍｇ／ｍｌ、または１～２ｍｇ／ｍｌの範囲の濃度のキモトリプシノーゲン；
・０．２５ｍｇ／ｍｌ未満、または０．１～０．２ｍｇ／ｍｌの範囲の濃度のトリプシノーゲン
を含み得る。
【０１３０】
本発明の医薬組成物は、任意の好適な手段により、例えば、経口投与で、例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤もしくは散剤の形態で；舌下投与で；バッカル投与で；非経口投与で、例えば、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、もしくは嚢内注射もしくは注入技術（例えば、滅菌注射水または非水性液剤もしくは懸濁液として）により；経鼻投与で、例えば、吸入スプレーにより；局所投与で、例えば、クリーム剤もしくは軟膏剤の形態で；または直腸投与で、例えば、坐剤の形態で；非毒性の薬学的に許容可能なビヒクルまたは希釈剤を含有する投薬単位配合物で投与することができる。これらは、例えば、即時放出または徐放に好適な形態で、例えば、デバイス、例えば、皮下インプラント、カプセル化スフェロイドまたは浸透圧ポンプの使用により投与することができる。
【０１３１】
ある実施形態において、例えば、腫瘍塊の摘出後にキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを腫瘍床または周囲組織に直接投与することが好ましいことがある。代替的な実施形態において、キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンは、血液癌により好適であり得る全身用量として提供する。
【０１３２】
上記開示は、一般に、本発明を説明する。より完全な理解は、説明目的のためだけに本明細書に提供され、本発明の範囲を限定するものではない以下の具体的な実施例を参照して得ることができる。
【実施例】
【０１３３】
実施例１
一連のインビトロ試験を実施してＣＳＣの増殖および分化に対する膵臓前酵素の効果を試験した。
【０１３４】
Ａ．材料および方法
処理溶液および対照
６ｍｇ／ｍｌのキモトリプシノーゲンＡおよび１ｍｇ／ｍｌのトリプシノーゲンの原液をＰＢＳ中で調製し、要求されるまで－２０℃において貯蔵した。それぞれの実験のため、原液を培養培地中でさらに希釈して所望の濃度を得た（表２参照）。
【０１３５】
抗増殖剤インターフェロンアルファ（ＩＦＮ）を１００００ＵＩ／ｍｌ（ＩＮＴＲＯＮ（登録商標）Ａインターフェロンアルファ－２ｂ）の濃度において陽性対照として使用した。
【０１３６】
キモトリプシノーゲンＡ／トリプシノーゲンおよびＩＦＮを含む溶液も使用してこれらの

試薬の組合せ結果を評価した。

【０１３７】

細胞系

ヒト膵臓癌細胞系ＢｘＰＣ３およびヒト結腸癌細胞系ＨＣＴ－１１６をＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）から入手し、１０％のＦＢＳが補給されたＲＰＭＩ１６４０培地（ＢｘＰＣ３用）およびダルベッコ改変イーグル培地（ＨＣＴ－１１６用）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）中で維持した。

【０１３８】

神経芽細胞腫細胞系ＳＫ－Ｎ－ＳＨ（転移部位、骨髄における神経芽細胞腫に由来するＡＴＣＣ（登録商標）ＨＴＢ－１１（商標））をＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）から入手し、１０％のＦＢＳが補給されたイーグル最小必須培地中で維持した。

【０１３９】

トリプシン代替試薬ＴｒｙｐＬＥ（商標）（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して細胞継代を実施した。

【０１４０】

ＣＳＣの単離

ＢｘＰＣ３膵臓およびＨＣＴ－１１６結腸癌細胞系を、超低接着プレート中で、スフェア形成培地中で増殖させた。１週間後、細胞はスフェアを形成し、蛍光活性化細胞ソーティング（ＦＡＣＳ）によりＡＬＤＥＦＬＵＯＲアッセイ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）および以下のマーカー：ＣＤ３２６、ＣＤ４４およびＣｘＣＲ４（ＢｘＰＣ３）ならびにＣＤ３２６およびＣＤ４４（ＨＣＴ－１１６用）を使用して癌幹様細胞を単離した。ＣＳＣの濃縮下位集団を、Ｃｈａｒａｆｅ－Ｊａｕｆｆｒｅｔ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１６（１）：４５－５５に既に記載のとおり、超低接着プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）中で規定のスフェア形成培地により増殖させた。類似の方法は、Ｒａｍｉｒｅｚ ｅｔ ａｌ．（２０１４）Ｏｎｃｏｔａｒｇｅｔ，５（１１）：３５９０－３６０６に記載されている。

【０１４１】

下流アッセイにおいて使用するためのトリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンの最適濃度の決定

ＭＴＴ（３－（４，５－ジメチルチアゾリル－２）－２，５－ジフェニルテトラゾリウムブロミド）アッセイ（Ｓｉｇｍａ）を使用して細胞生存度および増殖を評価した。手短に述べると、細胞（２×１０^{3}個の細胞／ウェル）を９６ウェルプレート上に播種し、２４時間インキュベートし、次いでトリプシノーゲン／キモトリプシノーゲン（表２参照）、ＩＦＮ（対照）およびトリプシノーゲン／キモトリプシノーゲン＋ＩＦＮの異なる溶液により処理した。

【０１４２】

３日後、処理を繰り返し、細胞をさらに３日間維持した。細胞を６日間の処理により維持した。その後、細胞を以下のとおり処理し、１０μＬの２ｍＭのＭＴＴ試薬をそれぞれのウェルに添加し、細胞を３７℃において４時間インキュベートした。次いで、１００μＬの洗浄剤試薬を添加し、細胞を暗所で室温において２時間放置した。吸光度を５７０ｎｍにおいて記録した。

【０１４３】

Ｓｉｇｍａ Ｐｌｏｔソフトウェアを使用して線形補間により４パラメータロジスティック曲線からＩＣ$_{50}$値を計算した。実験の全てをトリプリケートウェル中でプレーティングし、少なくとも２回実施した。

【０１４４】

ＭＴＴ（３－（４，５－ジメチルチアゾリル－２）－２，５－ジフェニルテトラゾリウムブロミド）アッセイ（Ｓｉｇｍａ）を使用して細胞生存度および増殖に対する抗癌薬の効果を評価した。

【０１４５】
【表２】

表 2.処理溶液の組成および濃度

	処理溶液組成(mg/ml)					
試薬	1	2	3	4	5	6
キモトリプシノーゲン	0.03	0.06	0.18	0.3	0.42	0.6
トリプシノーゲン	0.005	0.01	0.03	0.05	0.07	0.1

【０１４６】
細胞周期アッセイ
細胞周期分布を対照および処理細胞において計測した。処理後、細胞を１５ｍｌのチューブ中で回収し、低温５ｍｌのＰＢＳ中で１回洗浄した。細胞を固定するため、細胞を穏やかにボルテックスに供した一方、２００μｌの７０％エタノールを滴加し、暗所で４℃において少なくとも２０分間インキュベートした。固定後、エタノールを遠心分離により廃棄し、ＰＩおよびＲＮアーゼを含有する溶液の添加により細胞を染色し、暗所で４５分間インキュベートした。Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔａｌ Ｃｅｎｔｅｒ（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｇｒａｎａｄａ）からのＦＡＣＳＡｒｉａ ＩＩＩフローサイトメーター（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅｓ，ＮＪ，ＵＳＡ）を使用して試料を直ちに処理した。少なくとも１０，０００のイベントをそれぞれの最終ゲートヒストグラムで回収した。ＤｅａｎおよびＪｅｔｔアルゴリズム（Ｍｕｌｔｉｃｙｃｌｅ，Ｐｈｏｅｎｉｘ Ｆｌｏｗ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を使用して細胞周期分析を実施した。
【０１４７】
フローサイトメトリーにおけるＣＳＣマーカー分析
ＡＬＤＥＦＬＵＯＲソートされたＢｘＰＣ３膵臓およびＨＣＴ－１１６結腸癌細胞を培養物中で６日間維持し、キモトリプシノーゲン：０．４２ｍｇ／ｍｌ－トリプシノーゲン：０．０７ｍｇ／ｍｌにより２回処理した（２日目および５日目）。
【０１４８】
Ｔｒｙｐｌｅを使用して処理および未処理ＣＳＣを解離させ、１％のウシ血清アルブミン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）が補給されたＰＢＳ中で２回洗浄した。ＩｇＧ（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ，ＣＡ）を氷上で１５分間使用して細胞表面Ｆｃ受容体を遮断した。細胞を抗ＣＤ４４－ＰＥおよび抗ＣＤ３２６ＦＩＴＣおよびＣｘＣＲ４－ＡＰＣモノクローナル抗体（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅｓ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ）により４℃において３０分間染色した。洗浄後、Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔａｌ Ｃｅｎｔｅｒ（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｇｒａｎａｄａ）からのＦＡＣＳＡｒｉａ ＩＩＩフローサイトメーター（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅｓ，ＮＪ，ＵＳＡ）を使用して細胞を分析した。
【０１４９】
トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンの存在下でのＣＳＣスフェア形成
ＳＫ－Ｎ－ＳＨ細胞を培養フラスコから剥離し、トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲン（０．０７：０．４２ｍｇ／ｍｌ）の存在下でＣＳＣ濃縮馴化培地中で培養した。スフェア形成を光学顕微鏡観察下で毎日モニタリングし、６日目に写真を撮影した。
【０１５０】
ＢｘＰＣ３膵臓およびＨＣＴ－１１６結腸癌細胞系を培養フラスコから剥離し、ＣＳＣ濃縮馴化培地中で、

１．トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲン（０．０７ｍｇ／ｍｌ：０．４２ｍｇ／ｍｌ）
２．トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲン（０．０７ｍｇ／ｍｌ：０．４２ｍｇ／ｍｌ）とＩＦＮ（１００００ＵＩ／ｍｌ）；または
３．ＩＦＮ（１００００ＵＩ／ｍｌ）
のいずれかの存在下で培養した。

【０１５１】

スフェア形成を光学顕微鏡観察下で毎日モニタリングし、２日目および５日目に写真を撮影した。

【０１５２】

二次スフェア形成アッセイのため、一次スフェアからの細胞を遠心分離により回収し、次いでＴｒｙｐｌｅにより解離させ、ピペットにより機械的に破壊した。10^3個の単一細胞をプレーティングし、超低接着２４ウェルプレート中で、スフェア培養培地中で再懸濁させた。６日後に光学顕微鏡観察により＞７５μＭ直径のスフェアをカウントした。

【０１５３】

定量的リアルタイムＲＴ－ＰＣＲ
ＴＲＩＺＯＬ試薬を製造業者（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）の説明書に従って使用して異なる細胞系からの全ＲＮＡをデュプリケート８０％コンフルエント培養物から抽出した。Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して全ＲＮＡの逆転写によりｃＤＮＡを合成し、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ｐｒｏｍｅｇａ）およびランダムプライマーを使用してｑＲＴ－ＰＣＲアッセイを行った。それぞれの反応は、２つのｃＤＮＡ希釈物からのトリプリケートで実施した。比較閾値サイクル（ｃｏｍｐａｒａｔｉｖｅ　ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ　ｃｙｃｌｅ）（Ｃｔ）法を使用して製造業者により規定されるとおり増幅係数を計算した。ヒトＧＡＤＰＨを内部標準として使用してインプットｃＤＮＡの量におけるＲＮＡ品質の変動を正規化した。上皮間葉移行（ＥＭＴ）と関連する遺伝子の発現を測定するためのプライマー配列を、表３に列記する。

【０１５４】

【表３】

表3:上皮間葉移行(EMT)と関連する遺伝子の発現レベルを測定するために使用される

プライマー配列

遺伝子	プライマー配列	
SNAIL	フォワード	5′ ACCCCACATCCTTCTCACTG 3′ (配列番号 1)
	リバース	5′ TACAAAAACCCACGCAGACA 3′ (配列番号 2)
SLUG	フォワード	5′ TGCGATGCCCAGTCTAGAAA 3′ (配列番号 3)
	リバース	5′ TTCTCCCCCGTGTGAGTTC 3′ (配列番号 4)
E-CADHERIN	フォワード	5′ AATTCCTGCCATTCTGGGGA 3′ (配列番号 5)
	リバース	5′ TCTTCTCCGCCTCCTTCTTC 3′ (配列番号 6)
N-CADHERIN	フォワード	5′ TGAGCCTGAAGCCAACCTTA 3′ (配列番号 7)
	リバース	5′ AGGTCCCCTGGAGTTTTCTG 3′ (配列番号 8)
VIMENTIN	フォワード	5′ AGCTAACCAACGACAAAGCC 3′ (配列番号 9)
	リバース	5′ TCCACTTTGCGTTCAAGGTC 3′ (配列番号 10)
OCT4	フォワード	5′ CACCATCTGTCGCTTCGAGG 3′ (配列番号 11)
	リバース	5′ AGGGTCTCCGATTTGCATATCT 3′ (配列番号 12)

【０１５５】

【表４】

表4:多能性と関連する遺伝子の発現レベルを測定するために使用されるプライマー配列

遺伝子	プライマー配列	
KLF4	フォワード	5′ CGAACCCACACAGGTGAGAA 3′ (配列番号 13)
	リバース	5′ TACGGTAGTGCCTGGTCAGTTC 3′ (配列番号 14)
SOX 2	フォワード	5′ CAAGATGCACAACTCGCAGA 3′ (配列番号 15)
	リバース	5′ CATGAGCGTCTTGGTTTTCC 3′ (配列番号 16)
NANOG	フォワード	5′ TCCTGAACCTCAGCTACAAAC 3′ (配列番号 17)
	リバース	5′ GCGTCACACCATTGCTATTC 3′ (配列番号 18)
C-MYC	フォワード	5′ GAGTCTGGATCACCTTCTGCTG 3′ (配列番号 19)
	リバース	5′ AGGATAGTCCTTCCGAGTGGAG 3′ (配列番号 20)
CD133	フォワード	5′ CAGAATAATAAACAGCAGCCC 3′ (配列番号 21)
	リバース	5′ GATTATGACAAGCCAGAAACT 3′ (配列番号 22)

【０１５６】

マイクロアレイ試験

上皮間葉移行（ＥＭＴ）に関与し、またはＣＳＣ発現に関連する遺伝子の発現を、製造業

者の説明書に従って処理されたＲＴ２Ｐｒｏｆｉｌｅｒ（商標）ＰＣＲアレイ（Ｑｉａｇｅｎ）により分析した。

【０１５７】

それぞれのアレイ上に存在する対照のセットにより、逆転写性能、ゲノムＤＮＡ汚染、およびＰＣＲ性能の相対的定量および評価のΔΔＣＴ法を使用するデータ分析が可能となった。

【０１５８】

使用されるＲＴ２Ｐｒｏｆｉｌｅｒ（商標）ＰＣＲアレイは、以下であった：

１．ＥＭＴの間に発現を変化させ、またはＥＭＴの間に遺伝子発現変化を調節する８４個のキーとなる遺伝子の発現をプロファイリングするヒト上皮間葉移行（ＥＭＴ）ＲＴ２Ｐｒｏｆｉｌｅｒ（商標）ＰＣＲアレイ。このアレイは、細胞表面受容体、細胞外マトリックス、ならびに細胞接着、遊走、運動、および形態形成を媒介する細胞骨格遺伝子；細胞分化、発生、成長、および増殖を制御する遺伝子；ならびにＥＭＴおよびその関連プロセスの全てを引き起こすシグナル伝達および転写因子遺伝子を含む。

【０１５９】

２．ヒト癌幹細胞ＲＴ２Ｐｒｏｆｉｌｅｒ　ＰＣＲアレイは、癌幹細胞（ＣＳＣ）に結びつく８４個の遺伝子の発現をプロファイリングする。このアレイによりプロファイリングされる遺伝子としては、ＣＳＣ分子マーカーならびに培養物中でＣＳＣ単離株の安定性を確保するのに役立つＣＳＣ増殖、自己再生、および多能性を調節する遺伝子が挙げられる。ＣＳＣ非対称細胞分裂、遊走および転移、ならびに関連シグナル伝達経路に関与する遺伝子も挙げられる。

【０１６０】

Ｂ．結果

ＭＴＴアッセイによるＩＣ５０測定

ＭＴＴアッセイは、代謝活性細胞によるＭＴＴ（３－（４，５－ジメチルチアゾリル－２）－２，５－ジフェニルテトラゾリウムブロミド）の低減に基づく。得られる細胞内の紫色のホルマザンを可溶化し、分光光度的手段により定量することができる。

【０１６１】

図１は、種々の濃度のトリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲン／キモトリプシノーゲン＋ＩＦＮにおける応答曲線を示す。

【０１６２】

データは、トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンＡの最適濃度がトリプシノーゲン０．０７ｍｇ／ｍｌおよびキモトリプシノーゲンＡ０．４２ｍｇ／ｍｌ（１：６の比）であることを示すが、１：１～約１：１０のトリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンの比も細胞代謝活性を低減させ、細胞増殖を阻害することが予測される。トリプシノーゲン０．０７ｍｇ／ｍｌおよびキモトリプシノーゲンＡ０．４２ｍｇ／ｍｌのこれらの濃度を後続の実験において使用し、後続の実験において「ＰＲＰ」と称する。データは、ＩＦＮおよびトリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンの組合せが、トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンの抗増殖効果を有意に向上させることも示す。

【０１６３】

細胞周期アッセイ

スフェア形成条件下で増殖させた細胞（ＣＳＣ）および接着細胞（非ＣＳＣ）に対して細胞周期アッセイを実施した。細胞を、ＩＦＮ（１００００ＵＩ／ｍｌ）、ＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲン０．０７ｍｇ／ｍｌ：０．４２ｍｇ／ｍｌ）およびＰＲＰ＋ＩＦＮ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲン０．０７ｍｇ／ｍｌ：０．４２ｍｇ／ｍｌとＩＦＮ１００００ＵＩ／ｍｌ）により１回処理し、４日後に細胞周期アッセイのために処理した。

【０１６４】

Ｇ１／Ｇ０期の細胞数は、膵臓ＣＳＣおよび非ＣＳＣ中（７２．８％対８２．４％）で、ならびに結腸ＣＳＣおよび非ＣＳＣ中（７７．１％対７９．９％）で類似であった。ＰＲ

Ｐによる処理は、膵臓ＣＳＣ中（８２．４％対８９．４％）でも、結腸ＣＳＣ中（７９．９％対７８．８％）でもＧ１／Ｇ０の細胞数を変化させるとは考えられなかった（図２ａ～ｃ；図３ａ～ｃ）。

【０１６５】

ＰＲＰ処理は、対照と比較してＳ期の細胞数のわずかな減少をもたらし（３．２５％対７．９５％）、ＩＦＮ（２．２５％）の添加により強化された効果である（図２ｄ）。ＰＲＰによる処理後の結腸ＣＳＣにおいて細胞周期の顕著な差は存在しなかった（図３ｄ）。

【０１６６】

これらの結果は、トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンが、膵臓ＣＳＣの増殖能を減少させ、膵臓ＣＳＣのＳ期を低減させることを示唆する。

【０１６７】

ＡＬＤＥＦＬＵＯＲアッセイ

生存のためのＣＳＣ機序としては、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）を介する代謝活性の増加が挙げられる。この理由のため、ＡＬＤＨは、癌幹細胞の同定のためのマーカーとして記載されている（Ｈｕａｎｇ ｅｔ ａｌ．（２００９）．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ Ｖｏｌ．６９（Ｎｏ．８）：３３８２－３３８９）。ＡＬＤＨ陽性細胞は、ＡＬＤＥＦＬＵＯＲ試薬により、フローサイトメトリーを使用することにより検出することができる。Ａｌｄｅｆｌｕｏｒアッセイは、ＡＬＤＨ基質についての蛍光非毒性基質の、蛍光反応産物への変換に基づく。ＡＬＤＨについての非毒性基質は、インタクトな生存細胞中に自由に拡散し得る。ＢＯＤＩＰＹアミノアセトアルデヒドは、ＡＬＤＨ活性により蛍光産物ＢＯＤＩＰＹアミノアセテートに変換される。ＡＬＤＨ陽性細胞は、種々の癌組織、例として、乳癌、肝臓癌、結腸癌、膵臓癌、前立腺癌、肺癌、卵巣癌および急性骨髄性白血病において見出されており、癌化学耐性に関連する（Ｓｉｃｌａｒｉ ａｎｄ Ｑｉｎ（２０１０）Ｊ Ｏｒｔｈｏｐ Ｓｕｒｇ Ｒｅｓ ５（７８））。

【０１６８】

図４は、膵臓ＣＳＣおよび非ＣＳＣに対するＡＬＤＨアッセイの結果を示す。

【０１６９】

非ＣＳＣ試料中のＡＬＤＨ陽性細胞の割合は、約１２％であった。スフェア形成条件下で培養された細胞について、細胞の約５０％がＡＬＤＨ陽性であった。ＰＲＰによる細胞の処理は、膵臓ＣＳＣ中のＡＬＤＨ陽性細胞の集団を有意に低減させた（４７．２％から１７．５％）。ＩＦＮの添加は、ＰＲＰの効果をさらに増加させた（１３．８％）。これらの結果は、トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンが膵臓癌におけるＣＳＣ集団を低減させることを示す。

【０１７０】

トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲン処理細胞中でのＣＳＣマーカーの発現

膵臓癌細胞をスフェア形成条件下で増殖させてＣＳＣの下位集団を濃縮した。次いで、膵臓ＣＳＣをＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲン０．０７ｍｇ／ｍｌ：０．４２ｍｇ／ｍｌ）、ＰＲＰ＋ＩＦＮおよびＩＦＮにより処理し、膵臓特異的ＣＳＣマーカーＣＤ３２６、ＣＤ４４およびＣｘＣＲ４をフローサイトメトリーにより計測した。

【０１７１】

フローサイトメトリー結果は、これらの３つのＣＳＣマーカーを発現する細胞の割合が、ＰＲＰによる処理後に有意に減少することを実証する（５６．６％から８．８％）。ＰＲＰ＋ＩＦＮによる処理は、それらのマーカーを発現する細胞の集団を４．３％に低減させた（図５および６）。これらの結果は、ＰＲＰによる処理が膵臓癌におけるＣＳＣ集団を低減させることを示唆する。

【０１７２】

結腸癌細胞をスフェア形成条件下で増殖させてＣＳＣの下位集団を濃縮した。次いで、結腸ＣＳＣをＰＲＰ、ＰＲＰ＋ＩＦＮおよびＩＦＮにより処理した。細胞を結腸特異的ＣＳＣマーカー：ＣＤ３２６およびＣＤ４４と一緒にＡＬＤＨにより標識し、フローサイトメトリーにより分析した。

【０１７３】
フローサイトメトリー結果（図７および８）は、ＡＬＤＨ陽性であり、両方の結腸特異的ＣＳＣマーカーを発現した細胞の割合がＰＲＰ処理後に有意に減少したことを実証する（６４．８％から３１．０５％）。ＰＲＰ＋ＩＮＦによる処理は、それらのマーカーを発現する細胞の集団を４０．８％に低減させた（図７）。ＡＬＤＨ＋であり、ＣＤ４４またはＣＤ３２６マーカーのいずれかを発現する細胞の割合はＰＲＰ処理後に有意に減少した（ＡＬＤＨ＋ＣＤ４４＋細胞について３５．５％から８．１％、ＡＬＤＨ＋ＣＤ３２６＋細胞について４３．９から７．１％－図８）。
【０１７４】
トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンの存在下でのＣＳＣスフェア形成
スフェア形成を抑制するＰＲＰの能力を試験した。癌細胞をスフェア条件下（馴化培地および低接着培養ウェル）で培養した０日目に、ＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲン０．０７ｍｇ／ｍｌ：０．４２ｍｇ／ｍｌ）、ＩＦＮ（１００００ＵＩ／ｍｌ）およびＰＲＰ＋ＩＦＮを培地に添加した。
【０１７５】
図９は、２日目および６日目の膵臓細胞培養物の画像を示す。２日目の画像は、培地へのＰＲＰの添加が膵臓ＣＳＣスフェアの数およびサイズを有意に低減させることを示す。さらに、形成されたスフェアの形態は、顕著に異なる（対照未処理細胞においては規則的である一方、ＰＲＰ処理細胞においては不規則である）。
【０１７６】
５日目の画像は、トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンＡ処理細胞と対照細胞との間のキーとなる差を示す。ＰＲＰおよびＰＲＰ＋ＩＦＮ処理細胞は、スフェアを形成しない。細胞は、解離および破裂していると考えられる。
【０１７７】
結腸癌細胞を用いる結果は、異なるものであった。図１０は、ＰＲＰの添加が２日目でさえスフェアの形成を阻害したことを示す。細胞は分散するが、死滅していないと考えられる。５日目、スフェアは依然として形成されず、細胞は凝集しなかった。
【０１７８】
これらの結果は、トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンがＣＳＣによるスフェロイド形成を顕著に阻害することを示す。
【０１７９】
ＰＲＰの存在下での神経芽細胞腫ＣＳＣスフェア形成
癌細胞をスフェア条件下（馴化培地および低接着培養ウェル）で培養した２日目および４日目に、ＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲン０．０７ｍｇ／ｍｌ：０．４２ｍｇ／ｍｌ）を細胞培地に添加した。
【０１８０】
図１１は、６日目の細胞培養物の画像を示す。ＰＲＰにより処理された神経芽細胞腫はＣＳＣスフェアを形成せず：細胞は懸濁液中で増殖したが、細胞集塊を形成しない（図１１ＢおよびＤ）。細胞を対照条件下でＰＲＰの不存在下で維持した場合の神経芽細胞腫スフェアＣＳＣをパネルＡおよびＣに示す。
【０１８１】
二次スフェア形成
二次スフェア形成アッセイは、ＰＲＰ処理細胞により形成された一次スフェアを解離させ、対照未処理細胞と比較することにより実施した。図１１Ｅは、癌細胞系ＢｘＰＣ３およびＳＫ－Ｎ－ＳＨについて、ＰＲＰ処理後に二次スフェアをカウントすることができなかったことを示す。対照的に、未処理対照細胞は、細胞集塊を形成する能力を回復し得た。
【０１８２】
ＰＲＰは、一次スフェアを破壊し、二次スフェアを形成するＣＳＣの能力も抑制する。腫瘍スフェアは、単一腫瘍幹細胞に由来する細胞のクローン的に由来する非接着コロニーとして定義されるため、得られた結果は、ＰＲＰ処理が癌幹細胞集団に対する直接的な効果

を有することを実証する。
【０１８３】
ＥＭＴおよび多能性関連遺伝子発現
ＥＭＴプロセスおよび／または多能性と関連する遺伝子の発現を、ＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンＡ０．０７ｍｇ／ｍｌ：０．４２ｍｇ／ｍｌ）により処理された膵臓ＣＳＣ中で分析し、未処理ＣＳＣと比較した。ｑＲＴ－ＰＣＲ結果は、ＥＭＴに関連する遺伝子、例えば、ＳＮＡＩＬ、ＳＬＵＧ、ＶＩＭＥＮＴＩＮおよびＮ－ＣＡＤＨＥＲＩＮが、処理後に減少した発現を有したことを示す（図１２）。Ｅ－ＣＡＤＨＥＲＩＮ発現は、処理後に増加した。これらの結果は、ＰＲＰ処理が上皮から間葉への表現型の転換を低減させ得ることを示唆する。
【０１８４】
ＰＲＰ処理がＣＳＣマーカーの発現を変更するか否かを判定するため、いくつかの多能性の遺伝子をｑＲＴ－ＰＣＲ（使用されるプライマーは、表４に記載される）により分析した。結果は、ＯＣＴ４、ＣＭＹＣおよびＫＬＦ４遺伝子発現が、未処理ＣＳＣと比較してトリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンＡによる処理後にわずかに減少したことを示す。対照的に、ＮＡＮＯＧおよびＣＤ１３３の発現は処理後に増加し、ＰＲＰの効果がこれら２つの遺伝子に介在しないことを示した（図１３）。
【０１８５】
マイクロアレイ試験
以下の結果は、ＰＲＰ処理後のＣＳＣ中の遺伝子発現の変化に関する。
【０１８６】
ａ）ＥＭＴと関連する遺伝子の発現
ＥＭＴプロセスに対するＰＲＰの効果を試験するため、ＥＭＴに関与するいくつかのキーとなる遺伝子の発現を処理ＣＳＣ中で分析し、対照未処理ＣＳＣの遺伝子発現プロファイルと比較した。結果を、対照細胞と比較した（上方または下方）調節倍率として示す。
【０１８７】
図２２Ａは、ＥＭＴプロセスの間に通常は下方調節される選択遺伝子の遺伝子発現の変化を示す。図２２Ａは、ＰＲＰ処理後、Ｅ－カドヘリンの発現が４．２８倍増加したことを示し、ＰＲＰ処理がこの遺伝子の発現を誘導することを示す。さらに、クルッペル様因子１７（ＫＬＦ１７）もＰＲＰ処理により上方調節され、５．９の上方調節倍率に達した。ＫＬＦ１７は、ＥＭＴ、血管新生、侵入および転移を直接抑制することが既に報告されている。他の遺伝子の発現もＰＲＰ処理後に増加し（例えば、ＭＳＴ１Ｒ：１．６９２８倍；ＴＦＰＩ２：４．４２７２倍およびＮＵＤＴ１３：２．３６９２倍）、ＰＲＰが抗ＥＭＴ効果を有することを示唆した。
【０１８８】
ＥＭＴの間に通常は上方調節される遺伝子を分析し、結果を図２２Ｂにまとめる。ＥＭＴを誘導すると記載された１３個の遺伝子が、ＰＲＰによる処理後に下方調節された。例えば、典型的には、ＥＭＴを受けている転移細胞中で上方調節される転写因子Ｓｎａｉｌは、ＰＲＰ処理後に下方調節された（ＳＮＡＩ１：－１．９６７８およびＳＮＡＩ２：－１．８６０４）。セリンプロテアーゼインヒビターＳＥＲＰＩＮＥ１は、ＰＲＰ処理後に有意に下方調節された（４．６倍の下方調節）。インテグリンＩＴＧＡ５およびＩＴＧＡＶの発現も下方調節された（それぞれ、２．５６９７および１．０１９３、下方調節）。ＩＴＧＡ５は、腫瘍侵入を促進することが報告されており、この遺伝子のより高度の発現は、癌患者のより短い生存時間と既に相関している。ＩＴＧＡＶは、血管新生の調節および癌進行にも関与する。
【０１８９】
まとめると、ＰＲＰ処理は、ＥＭＴの間に通常は下方調節される遺伝子の発現を誘導し、ＥＭＴの間に通常は上方調節される遺伝子の発現を低減させることにより、ＥＭＴプロセスに関与する遺伝子の発現に対する有意な効果を有する。これらの結果は、ＣＳＣ集団の抑制に加え、腫瘍進行および転移の低減におけるＰＲＰについての治療潜在性を示す。

【０１９０】
ｂ）幹細胞分化に関与する遺伝子の発現
膵臓分化に関与するキーとなる遺伝子の発現を、膵臓ＣＳＣ中で分析した。ＰＲＰにより処理されたＣＳＣ中の遺伝子の発現を、対照未処理ＣＳＣ中の遺伝子の発現と比較した。結果を、対照細胞と比較した（上方または下方）調節倍率として示す。
【０１９１】
得られた結果を図２３にまとめ、試験と一致し、ＰＲＰ処理が細胞分化を誘導することを示した。分化に関連する７つの遺伝子はＰＲＰ処理後に上方調節され、例としては、対照細胞と比較して８．９倍増加した上皮成長因子（ＥＧＦ）の発現が挙げられる。
【０１９２】
ｃ）腫瘍抑制因子遺伝子の発現
図２４は、腫瘍抑制因子の役割が既に報告された１１個の遺伝子の、ＰＲＰ処理後の上方調節を示す。
【０１９３】
転写因子ＦＯＸＰ１の発現は、ＰＲＰ処理後に６．０４倍増加した。さらに、ＴＷＩＳＴ２の発現は、ＰＲＰ処理後に上方調節された（５．２７３７倍）。ＰＲＰ処理後の結果として上方調節された別の腫瘍抑制因子遺伝子は、ＴＨＹ１であった（３．６２２倍増加）。
【０１９４】
ＳＰＡＲＣは、多くの腫瘍タイプにおいて下方調節される細胞外マトリックスの堆積およびモデリングに関与する細胞外タンパク質であり、ＰＲＰ処理後に上方調節（３．６１１倍）されることが見出された。ＳＩＲＴ１発現も処理細胞において２倍増加した。ＳＩＲＴ１は、タンパク質のサーチュインファミリーのメンバーをコードし、膵臓腺癌上方調節因子（ＰＡＵＦ）を発現する膵臓癌細胞の増殖を阻害することが報告されている。
【０１９５】
ｄ）転移および侵入に関連する遺伝子の発現
転移および細胞侵入に関与する９つの遺伝子の発現レベルを、ＰＲＰ処理後に測定した（図２５Ａ）。結果は、ＰＲＰ処理がそれらの遺伝子の有意な下方調節をもたらしたことを示す。例えば、オステオポンチン（ＳＰＰ１）の発現は、１０倍低減した。ＳＰＰ１は、種々の癌の転移潜在性の決定において重要な役割を担うことが報告されているケモカイン様石灰化ＥＣＭ関連タンパク質である。
【０１９６】
血小板由来成長因子受容体（ＰＤＧＦＲ）を介するシグナリングは、複数の腫瘍関連プロセスに関与する。ＰＤＧＦＲの発現は多くの腫瘍において上方調節され、例えば、同所的に増殖させた膵臓癌腫のモデルにおける転移性腫瘍の内皮細胞は、ＰＤＧＦＲの高い発現を示した。ＰＲＰ処理後、ＰＤＧＦＲＢの発現は３．１０９３倍低減し、ＰＲＰが抗転移効果を有することを示した。さらに、フィブロネクチンをコードする遺伝子ＦＮ１の発現も、ＰＲＰ処理後に有意に低減した（３．２倍下方調節）。フィブロネクチンは、細胞接着および遊走プロセス、例として、転移に関与する。
【０１９７】
ｅ）細胞接着に関連する遺伝子の発現
図２５Ｂは、細胞接着に関与する遺伝子の上方調節を示す。ＰＲＰ処理後にＥ－カドヘリンおよびβ－カテニンの発現が増加し（それぞれ４．３および４倍）、事前の試験と一致した。Ｅ－カドヘリンおよびβ－カテニンは、ＥＭＴにおいて公知の役割を有する。結果は、ＰＲＰが、ＣＳＣ中のＥ－カドヘリンの発現およびβ－カテニン発現を直接向上させることによりＥＭＴを阻害することを示す。
【０１９８】
ｆ）サイトカインをコードする遺伝子の発現
膵臓ＣＳＣ中のサイトカインをコードする遺伝子の発現に対するＰＲＰ処理の影響を調査した。図２６は、癌における細胞増殖、遊走および侵入と関連するサイトカインをコードする遺伝子の下方調節を示す。

【０１９９】
ＩＬ－８およびＩＬ－８受容体は、膵臓癌において過剰発現するが、正常膵臓組織中では抑制されることが示されており、ＩＬ－８がヒト膵臓癌の侵入性において重要な役割を担うことを示唆している。さらに、ＩＬ－８は、腫瘍微小環境のモジュレーションによりＥＭＴを促進することも報告されている。ここで提示される結果は、ＰＲＰ処理後にＩＬ－８の発現が下方調節（４．５倍）されたことを示す。ＰＲＰ処理後に検出されたＩＬ－８遺伝子発現の減少は、ＰＲＰが抗ＣＳＣ効果を付与する観察をさらに支持する。
【０２００】
ＰＲＰによるＣＳＣの処理は、分泌型リン酸化タンパク質－１（ＳＰＰ１、１０倍の下方調節）の発現を大幅に減少させた。ＳＰＰ１は、癌細胞生存を促進し、腫瘍関連血管新生および炎症を調節することが報告されている。さらに、ＰＲＰ処理は、多くの腫瘍細胞上で、例えば、ヒト脳神経膠腫、子宮の癌腫、肺癌、および乳癌で見出されているタンパク質である膜糖タンパク質ＣＤ３１／ＰＥＣＡＭ－１の下方調節を誘導した。
【０２０１】
ｇ）ＣＳＣマーカー遺伝子の発現
膵臓ＣＳＣのＰＲＰ処理は、ＣＳＣマーカーとして認識される６つの遺伝子、例として、ＣＤ３８、ＣＤ４５、Ｏｃｔ－０４およびＫＬＦ４の下方調節を誘導した（図２７）。
【０２０２】
ｈ）ＭＡＰＫ／ＥＲＫ経路と関連する遺伝子の発現
膵臓ＣＳＣのＰＲＰ処理は、いくつかのＭＡＰＫ関連遺伝子の下方調節を誘導した。結果を図２８に示す。
【０２０３】
結論
上記インビトロ試験の結果は、以下を示す：
１．ＰＲＰ処理は、一次スフェアを破壊し、二次スフェアを形成するＣＳＣの能力を抑制し、それにより癌幹細胞集団に対する直接的効果を有し；
２．ＰＲＰは、ＣＳＣ中で強力な抗ＥＭＴ効果を有し；
３．ＰＲＰは、細胞接着を促進する因子の発現を向上させ、ＣＳＣ中で遊走プロセスと関連する因子の発現を低減させる抗転移効果を有し；
４．ＰＲＰは、ＣＳＣ中の関連腫瘍抑制因子遺伝子の発現を向上させ；
５．ＰＲＰは、ＣＳＣマーカー遺伝子の発現をモジュレートし；
６．ＰＲＰは、ＣＳＣの分化を誘導し；および
７．ＰＲＰは、癌における細胞増殖、遊走および侵入と関連するサイトカインの発現を下方調節する。
【０２０４】
これらの結果は、抗ＣＳＣ、抗ＥＭＴ、抗転移、および抗腫瘍薬としてのＰＲＰの治療潜在性を補強する。
【０２０５】
実施例２
第１相－ＣＳＣに対するＰＲＰの抗腫瘍活性のインビボ試験
Ａ．実験設計：
１－対照群（ｎ＝１０）：未処理マウス（生理食塩溶液を接種）
２－予防群：マウスを、ＣＳＣの接種前にＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンＡ）により処理する（ｎ＝１０）。ＰＲＰを生理食塩溶液中で溶解させ、単回静脈内ボーラス注射で３週間、１日おきに投与する。
３－予防＋治療群：マウスを、ＣＳＣ接種前および後にＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンＡ）により処理する（ｎ＝１０）。生理食塩溶液中に溶解させたＰＲＰを単回静脈内ボーラス注射で３週間、１日おきに投与する。処理を３～４ヵ月間維持する。
４－治療群：マウスを、ＣＳＣ接種後にのみＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンＡ）により処理する。生理食塩溶液中に溶解させたＰＲＰを単回静脈内ボーラス注

射で３～４ヵ月間、１日おきに投与する。
【０２０６】
第２相－膵臓ＣＳＣの腫瘍開始能を阻害するＰＲＰの能力の試験
ＰＲＰ処理が膵臓ＣＳＣの腫瘍開始能を低減させ得るか否かを判定するため、以下の実験セットを実施する。事前にＰＲＰによりインビトロ処理された膵臓ＣＳＣの注射により腫瘍形成を誘導するゼノグラフト実験を実施する。腫瘍形成の評価、および腫瘍特徴の試験を実施する。
【０２０７】
Ａ．実験設計：
１－対照群（ｎ＝８）。ＮＳＧマウスに、未処理膵臓ＣＳＣを注射する。
２－ＩＣ５０　ＰＲＰ群（ｎ＝８）。マウスに、ＩＣ５０のＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンＡ）により処理された膵臓ＣＳＣを３～６日間にわたり注射する。
３－２×ＩＣ５０　ＰＲＰ群（ｎ＝８）。マウスに、２×ＩＣ５０のＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンＡ）により処理された膵臓ＣＳＣを３～６日間にわたり注射する。
４－５×ＩＣ５０　ＰＲＰ群（ｎ＝８）。マウスに、５×ＩＣ５０のＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンＡ）により処理された膵臓ＣＳＣを３～６日間にわたり注射する。
【０２０８】
第３相－実験的転移インビボアッセイ
ＰＲＰを抗転移剤として使用することができるか否かを判定するため、免疫欠損マウスを使用して実験的転移アッセイを実施する。インビボ転移モデルは、ＮＳＧマウス（ＮＯＤ　ｓｃｉｄガンママウス）の循環中にその尾静脈を介して直接注射されるＣＳＣ－Ｌ２Ｔ（ルシフェラーゼおよび赤色蛍光タンパク質ｔｄ－Ｔｏｍａｔｏとインビトロで形質移入させたＢｘＰＣ３から得られた濃縮下位集団）を使用する。転移進行は、ＩＶＩＳ（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｉｎ　Ｖｉｖｏ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ）によりモニタリングする。マウスを、以下の実験設計に従ってＣＳＣ－Ｌ２Ｔの注射前および後にＰＲＰにより処理する。
【０２０９】
Ａ．実験設計：
１－対照群（ｎ＝８）：未処理マウスに、生理食塩溶液を接種する。
２－予防群：マウスを、ＣＳＣ－Ｌ２Ｔの接種前にＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンＡ）により処理する。生理食塩溶液中で溶解させたＰＲＰを単回静脈内ボーラス注射で３週間、１日おきに投与する。
３－予防＋治療群：マウスを、ＣＳＣ－Ｌ２Ｔ接種前および後にＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンＡ）により処理する。生理食塩溶液中に溶解させたＰＲＰを単回静脈内ボーラス注射で３週間、１日おきに投与する。処理を３～４ヵ月間維持する。
４－治療群：マウスを、ＣＳＣ－Ｌ２Ｔの接種後にのみＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンＡ）により処理する。生理食塩溶液中に溶解させたＰＲＰを単回静脈内ボーラス注射で３～４ヵ月間、１日おきに投与する。
【０２１０】
材料および方法
第１相および第２相
ＣＳＣの単離
蛍光活性化細胞ソーティング（ＦＡＣＳ）によりＡＬＤＥＦＬＵＯＲアッセイ（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用してＢｘＰＣ３膵臓癌（腺癌）細胞系からの癌幹様細胞を単離し、ＣＳＣの濃縮下位集団を、超低接着プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）中で本発明者らの規定のスフェア形成培地（ＰＣＴ／ＥＳ２０１５／０７０６０６号明細書）により増殖させる。
【０２１１】

インビボ抗腫瘍ゼノグラフト試験
ゼノグラフト腫瘍を樹立するため、６～８週齢ＮＳＧ免疫欠損マウスを使用した。全ての手順は、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ ＧｒａｎａｄａのＩｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅにより承認された。マウスを、２０℃～２４℃、５０％ＲＨ、１４時間から１０時間への明暗サイクルにおいて、食料および水を不断給餌で飼育および維持した。
【０２１２】
第２相のため、膵臓ＣＳＣをＩＣ５０、２×ＩＣ５０および５×ＩＣ５０のＰＲＰにより３および６日間処理する。細胞生存度を、ＮＳＧマウスモデル中へのＰＲＰ処理ＣＳＣの接種前に測定する。
【０２１３】
ＢｘＰＣ３膵臓癌細胞系腫瘍を、２６ゲージ針を使用する１００～５００個の生存細胞／マウス＊の皮下注射により生成させた。次いで、動物（１群当たりｎ＝１０）を、対照および処理群（第１群～第４群）として無作為に割り当て、既に記載された実験手順に従って処理する（図１４ＡおよびＢ）。
【０２１４】
式：ＴＷ（ｍｇ）＝腫瘍容積（mm^3）＝ｄ２×Ｄ／２（式中、ｄおよびＤは、それぞれ、最短および最長直径である）に従って、腫瘍重量を計算した。全ての腫瘍のパラフィン包埋ブロックを５μｍにおいて切片化する。それぞれの試料を、組織学的分析のためにヘマトキシリンおよびエオシン（Ｈ＆Ｅ）により染色した。
【０２１５】
インビボＰＲＰ処理
生理食塩溶液中で溶解させたＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンＡ）を、単回静脈内ボーラス注射で処理期間の間、１日おきに投与した。第２群および第３群に投与される用量は、８３．３ｍｇ／ｋｇのトリプシノーゲンおよび５００ｍｇ／ｋｇのキモトリプシノーゲンＡであった。トリプシノーゲンおよびキモトリプシノーゲンＡを組合せで提供し、単回注射で投与した。投薬容量は１０ｍＬ／ｋｇであった。それぞれの動物に投与される投薬溶液の容量は、投薬直前に計測された個々の体重に基づき計算し、調整した。
【０２１６】
処理を、腫瘍誘導前の３週間（予防群）、または腫瘍誘導前の３週間および誘導後少なくとも４週間（好ましくは、最大９．５週間）（予防＋治療群）施した。
【０２１７】
予備転移アッセイ
マウスを致死用量のペントバルビタールナトリウム（１００ｍｇ／ｋｇ体重）により　殺した。胸郭器官を取り出し、肺を低温ＰＢＳ中で洗浄し、秤量する。他の内臓器官を取り出し、転移の存在について調査する。肺をホルマリン中で固定し、パラフィン中で包埋する。ヘマトキシリンおよびエオシン（Ｈ＆Ｅ）染色された肺切片を、転移結節の存在について分析する。
【０２１８】
腫瘍増殖に対するＰＲＰの効果の計測
腫瘍増殖阻害比、Ｔ／Ｃを計算することにより、腫瘍増殖に対するＰＲＰの効果を測定した。２つの異なる方法を使用してＴ／Ｃを測定した：第１の方法は、処理の終了時における腫瘍容積を計測し、第２の方法は、処理過程にわたる腫瘍増殖の率を計測する。
【０２１９】
第１の方法において、処理の最終日における対照腫瘍（Ｃ）の平均容積と、処理腫瘍（Ｔ）の平均容積との比を計算した。Ｔ／Ｃ≦０．４５は、所与の処理の効力を示すためのコンセンサスカットオフである。
【０２２０】
第２の方法において、Ｈａｔｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，（２０１４）により記載された率ベー

ＳＴ／Ｃを使用した。この方法は、それぞれの腫瘍の増殖曲線の、指数モデルへのフィッティングに基づく。率ベースＴ／Ｃは、全ての利用可能なデータを使用し、したがって、初回容積のランダムな差を説明し得る。さらに、全てのデータのフィッティングは、計測ノイズの効果を低減させ、率ベースＴ／Ｃの推定値がより正確になる。推定腫瘍増殖率に適用される不等分散で両側ｔ検定を使用してｐ値も計算する。ｐ値の計算は、推定腫瘍増殖率がそれぞれの処理群内で正規分布することを仮定する。０．４の閾値を選択した。それというのも、それは抗腫瘍活性が実用的に有意であるために十分か否か判定するための一般的なカットオフであるためである。したがって、腫瘍増殖の進化を、腫瘍容積を３６日間にわたり２日毎に計測することにより評価し、率ベースＴ／Ｃを計算するＥｘｃｅｌスプレッドシートを使用してデータを分析した（図１８）。率ベースＴ／Ｃは、前治療群について０．５４であり（ｐ＝０．１７）、前治療および治療群について０．１３（ｐ＝０．００１）であった。ＰＲＰによるフォローアップ処理が腫瘍増殖を有意に阻害することを示す。

【０２２１】

腫瘍発生および重量に対するＰＲＰの効果

腫瘍形成指数（ＴＩｎ）は、対象における相対腫瘍発生および腫瘍重量を反映する指数である。ＴＩｎを使用して悪性度または腫瘍侵襲性を計測することができる。

【０２２２】

第３相

レンチウイルス形質移入

２９３Ｔ細胞に、ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ形質移入試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用してホタルルシフェラーゼおよび赤色蛍光タンパク質ｔｄ－Ｔｏｍａｔｏ（Ｌ２Ｔ）２６をコードするレンチウイルスベクター、パッケージングベクター（ｐｓＰＡＸ２）およびエンベロープベクター（ｐＣＭＶ－ＶＳＶＧ）を同時形質移入する。２９３Ｔ細胞から産生されたウイルス粒子を回収し、それを使用してＢｘＰＣ３細胞に感染させた。手短に述べると、４８時間後に２９３Ｔ形質移入細胞から上清を回収し、０．４５μｍ細孔膜により濾過し、４μｇ／ｍＬのポリブレン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）が補給されたＢｘＰＣ３プレーティング細胞に添加する。ウイルス感染後、形質移入体の安定的な統合のためにＦＡＣＳによりｔｄ－Ｔｏｍａｔｏ＋細胞を選択する。

【０２２３】

実験的肺転移インビボアッセイ

ＢｘＰＣ３　ＣＳＣ－Ｌ２Ｔを、４～６週齢雌ＮＳＧマウス（１群当たりｎ＝８）の尾静脈中に注射する。生物発光をＩＶＩＳにより、１５０ｍｇ／ｋｇのＤ－ルシフェリン（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を腹腔内注射することにより０日目および週１回モニタリングする。４週間後、マウスを安楽死させ、肺を摘出し、ｔｄ－Ｔｏｍａｔｏ発現について写真撮影し、肺をＰＢＳ中で希釈された１５０μｇ／ｍＬのＤ－ルシフェリンにより洗浄してルシフェラーゼ活性についてアッセイする。摘出された肺を、ヘマトキシリンおよびエオシン染色ならびに共焦点顕微鏡観察分析にも使用する。

【０２２４】

インビボＰＲＰ処理

生理食塩溶液中で溶解させたＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンＡ）を、単回静脈内ボーラス注射で３～４ヵ月間、１日おきに投与する。

【０２２５】

組織学的分析

肺を０．１ＭのＰＢＳ中４％のパラホルムアルデヒド中で４℃において４時間浸漬させ、０．１ＭのＰＢＳ中で洗浄し、自動組織プロセッサ（ＴＰ１０２０，Ｌｅｉｃａ，Ｇｅｒｍａｎｙ）においてパラフィン中で包埋する。染色のためにパラフィンブロックを４ｍｍの切片に切断する。切片をキシレンにより脱パラフィン化し、減少アルコール濃度（絶対～７０％）により水和させ、ヘマトキシリン－エオシンにより染色する。次いで、切片を増加アルコール濃度（９５％～絶対）により脱水し、キシレンにより澄明化し、封入剤に

より封入する。光学顕微鏡観察下での観察およびデジタル画像取得を倒立顕微鏡（Ｎｉｋｏｎ　Ｈ５５０ｓ）により実施する。

【０２２６】

免疫組織化学的分析

肺を１０％のホルマリン中で室温において一晩浸漬させ、０．１ＭのＰＢＳ中で洗浄し、ＰＢＳ中３０％のスクロース中で２４時間保存する。次いで、材料をＯＣＴコンパウンド（Ｓａｋｕｒａ　Ｆｉｎｉｔｅｋ　Ｅｕｒｏｐｅ　Ｂ．Ｖ．，Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）中で浸し、液体窒素中で凍結させ、ブロックを使用まで－４０℃において貯蔵する。ＯＣＴブロックを８mm切片に切断し、ＳｕｐｅｒＦｒｏｓｔスライド（Ｍｅｎｚｅｌ－Ｇｌａｓｓｅｒ，Ｇｅｒｍａｎｙ）上で回収する。切片をＰＢＳにより水和させ、ＤＡＰＩを有する封入剤により封入する。蛍光顕微鏡観察下での観察およびデジタル画像取得を共焦点顕微鏡（Ｎｉｋｏｎ　Ａ１）により実施する。

【０２２７】

結果

第１相実験についての予備結果を、ＣＳＣ接種４週間および９．５週間後に得た。結果は、ヒト膵臓ＣＳＣ中でＢｘＰＣ３により誘導された腫瘍に対するＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンＡ）の抗腫瘍効力を実証する。

【０２２８】

図１５～１９は、試験開始９．５週間後（すなわち、ＣＳＣ接種６７日後）の第１相試験についての結果を示す。

【０２２９】

図１５は、第１群、第２群および第３群におけるマウスから摘出された腫瘍の画像を提供する。

【０２３０】

図１６は、第１群、第２群および第３群における％腫瘍発生を示し：１０匹の対照マウスの９匹が膵臓ＢｘＰＣ３のＣＳＣ濃縮集団の皮下注射後に腫瘍を発症した（この値を１００％の腫瘍発生率として解釈した）。第２群および第３群の両方（すなわち、予防および予防＋治療）において、マウスの５０％未満が腫瘍を発症した（第２群において４１％；第３群において５０％）。これらの結果は、ＣＳＣ接種前のＰＲＰ（トリプシノーゲン／キモトリプシノーゲンＡ）による予防的治療が膵臓ＣＳＣ腫瘍生着に対する明確な抑制効果を有することを示す。

【０２３１】

腫瘍増殖の低減におけるＰＲＰ処理の効果を評価し、結果を図１７および１８に示す。図１７は、第２群および第３群の両方のマウスについての、処理の最終日におけるそれぞれの腫瘍の容積をＴ／Ｃ値（方法１を使用して計算）と一緒に示す。これらの結果は、ＰＲＰによる予防的処理（第２群）および予防＋治療（第３群）が対照未処理動物と比較して腫瘍取り込みを減少させ、腫瘍増殖を損傷させることを示す（第２群においてＴ／Ｃ＝０．６４、および第３群においてＴ／Ｃ＝０．４０）。

【０２３２】

これら２つの実験群についての率ベースＴ／Ｃを図１８に示す。率ベースＴ／Ｃは、予防群（第２群）については０．５４（ｐ＝０．１７）であり、予防＋治療群（第３群）については０．１３（ｐ＝０．００１）であった。これらの結果は、この処理群における腫瘍の容積の低減により証明されるとおり、ＰＲＰによるフォローアップ処理が腫瘍増殖を有意に阻害することを示す。具体的には、第２群マウスについて、腫瘍容積は、対照マウスの腫瘍で見られた容積の５４％にすぎなかった。第３群マウスにおいて、腫瘍容積は、対照マウスにおける腫瘍の１３％にすぎなかった。

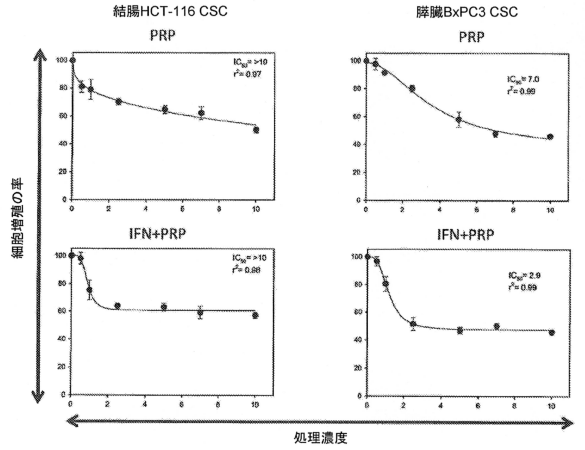
【０２３３】

まとめると、図１７および１８に提示される結果は、有意に低減した腫瘍発症の発生率および予防としてＰＲＰを受けるマウスならびに予防およびＣＳＣ接種後（治療）ＰＲＰの両方を受けるマウスにおいて発症する任意の腫瘍の低減した容積を示す。

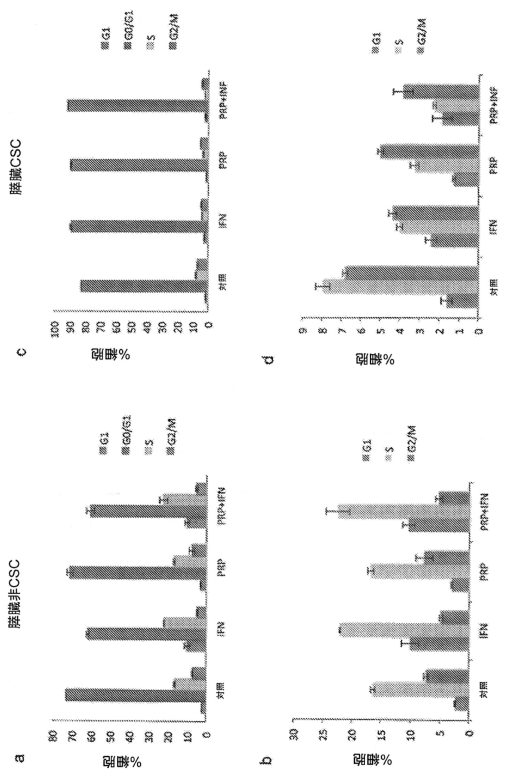
【０２３４】
図１９は、マウスが予防的ＰＲＰを受けた場合、またはマウスが予防的ＰＲＰおよびＣＳＣ接種後のＰＲＰの両方を受けた場合、ＴＩｎの有意差（ｐ＜０．０１）が観察されたことを示し、ＰＲＰの抗腫瘍形成効果を示す。
【０２３５】
図２０および２１は、それぞれ、対照、予防および予防＋治療群におけるマウスから摘出された腫瘍からの切片のＨ＆Ｅ染色およびマッソントリコム（Ｍａｓｓｏｎ－ｔｒｉｃｈｏｍｅ）染色を示す。代表的な画像は、腫瘍の顕著な密度差を示し、予防および予防＋治療群の両方からの腫瘍中で観察される細胞間の密度が有意に低減し、間隙が増加する。さらに、ＰＲＰを受けたマウス（予防および予防＋治療群の両方）からの腫瘍中の線維組織の存在は、対照マウスと比較して有意に低減した。
【０２３６】
まとめると、データは、予防および治療としてのＰＲＰの抗腫瘍効果を実証する。ＰＲＰは、マウスにおけるＣＳＣ腫瘍の生着を損傷させ、ＣＳＣ接種後に開始したそれらの腫瘍についての進行を有意に低減させた。
【０２３７】
実施例３
本発明を使用する癌の治療は、以下に従って実行することができる。
【０２３８】
結腸癌を有すると診断された個体は、手術（腹腔鏡または慣用）により腫瘍塊のバルクが切除されていることがある。腫瘍塊の摘出後、個体にキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを、場合により、化学療法または放射線療法との組合せで投与する。投与前、結腸癌幹細胞に特徴的なマーカーを発現する個体中の、または摘出部位付近の細胞を同定することにより結腸癌幹細胞の存在を判定することができる。例示的なマーカーは、ＣＤ３２６およびＣＤ４４、または本明細書（表１参照）に記載の任意の他のマーカーであり得る。次いで、個体を、元の腫瘍部位における再発および公知の結腸癌転移の部位における転移の出現についてモニタリングする。結果は、再発または転移の予防または遅延である。
【０２３９】
膵臓癌を有すると診断された個体は、手術（腹腔鏡または慣用）により腫瘍塊のバルクが切除されていることがある。腫瘍塊の摘出後、個体にキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンを、場合により、化学療法または放射線療法との組合せで投与する。投与前、膵臓癌幹細胞に特徴的なマーカーを発現する個体中の、または摘出部位付近の細胞を同定することにより膵臓癌幹細胞の存在を判定することができる。例示的なマーカーは、ＣＤ３２６、ＣＤ４４およびＣｘＣＲ４または本明細書（表１参照）に記載の任意の他のマーカーであり得る。次いで、個体を、元の腫瘍部位における再発および公知の膵臓癌転移の部位における転移の出現についてモニタリングする。結果は、再発または転移の予防または遅延である。
【０２４０】
類似の方法を他の癌、好ましくは、固形腫瘍、例えば、前立腺癌、乳癌、卵巣癌または本明細書に記載の任意の他の癌に適用することができる。

【図面】

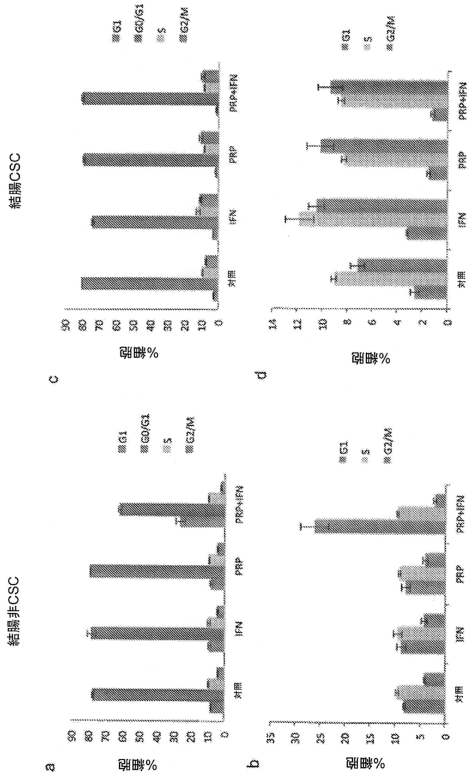
【図１】


結腸HCT-116 CSC
膵臓BxPC3 CSC
PRP
IFN+PRP
細胞増殖の率
処理濃度

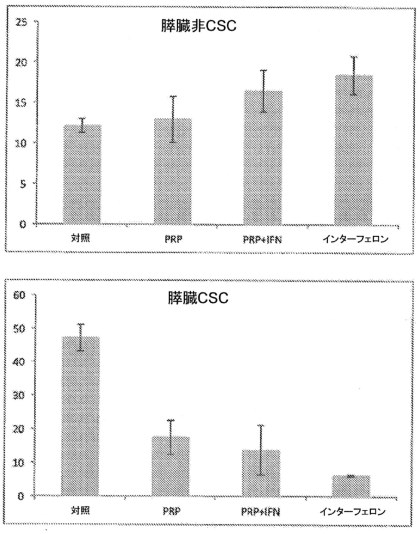
【図２】


膵臓CSC
膵臓非CSC
%細胞
対照
IFN
PRP
PRP+INF
PRP+IFN
G1
G0/G1
S
G2/M

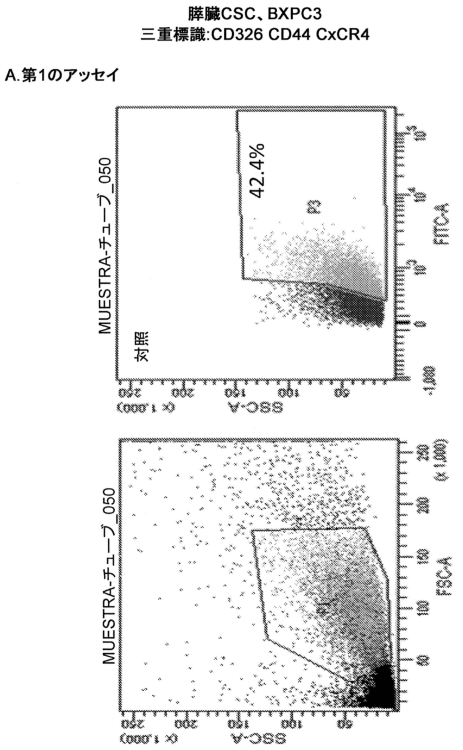
【図３】


結腸CSC
結腸非CSC
%細胞
対照
IFN
PRP
PRP+IFN
G1
G0/G1
S
G2/M

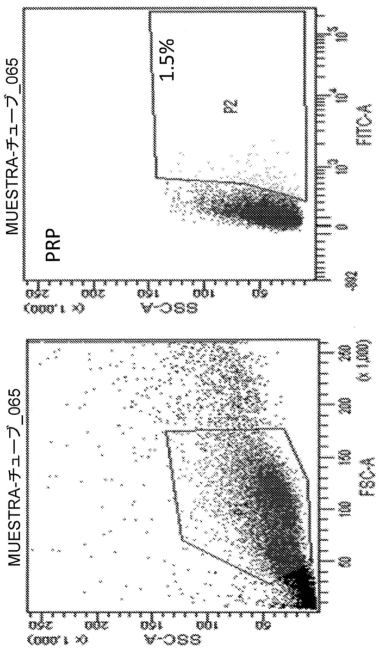
【図４】


膵臓非CSC
膵臓CSC
対照
PRP
PRP+IFN
インターフェロン

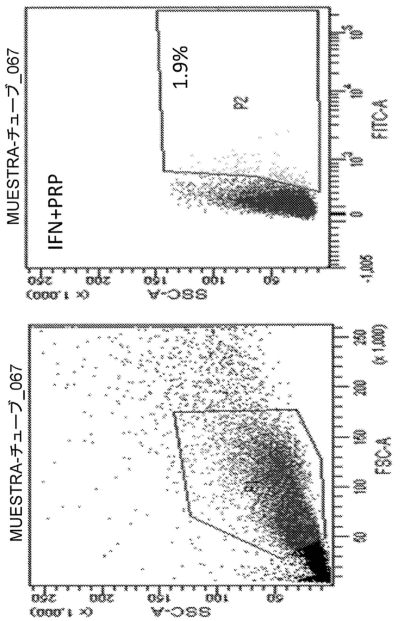
【図５－１】



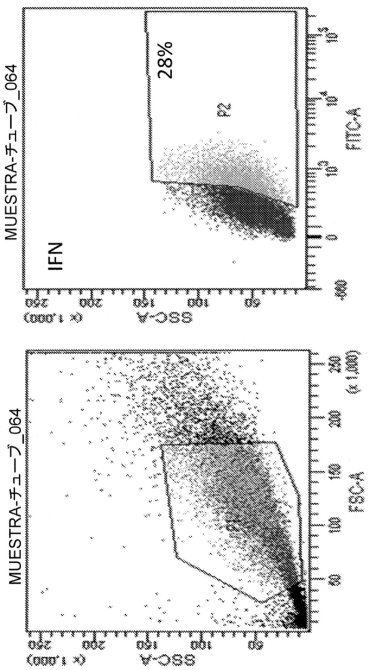
【図５－２】



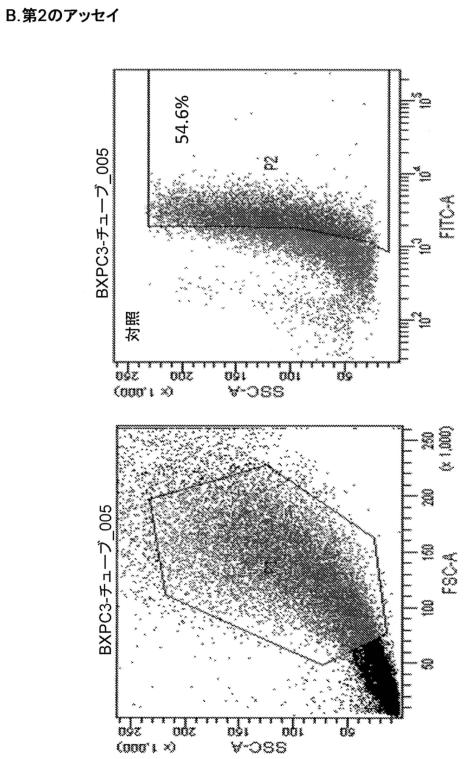
【図５－３】



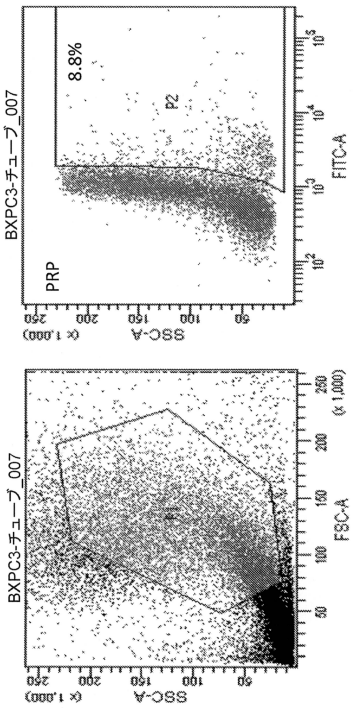
【図５－４】



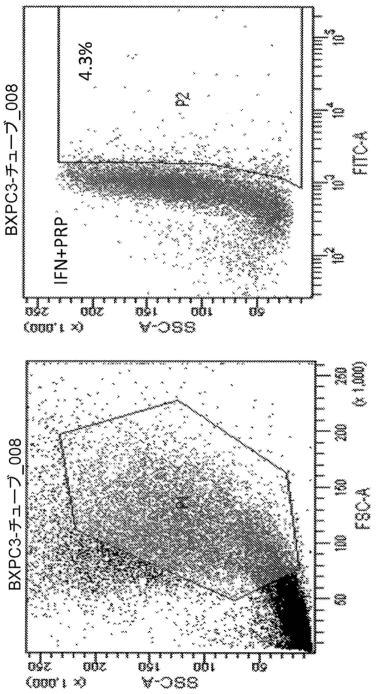
【図５－５】



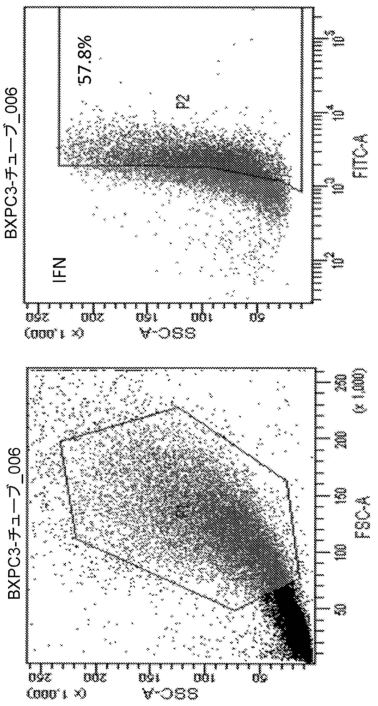
【図５－６】



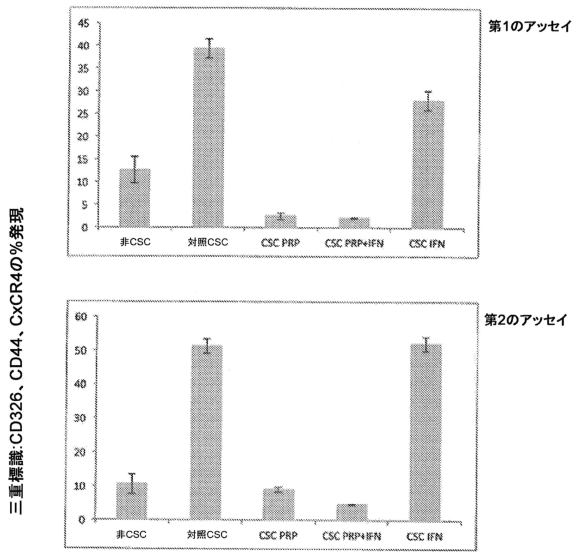
【図５－７】



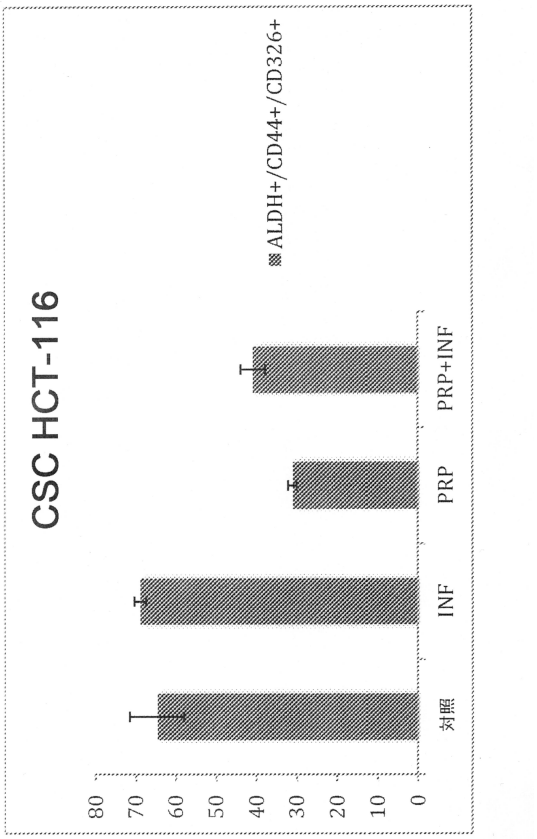
【図５－８】



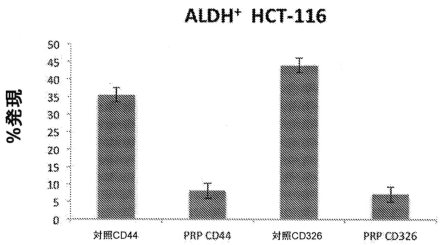
【図６】


三重標識:CD326、CD44、CxCR4の%発現
第1のアッセイ
第2のアッセイ
非CSC
対照CSC
CSC PRP
CSC PRP+IFN
CSC IFN

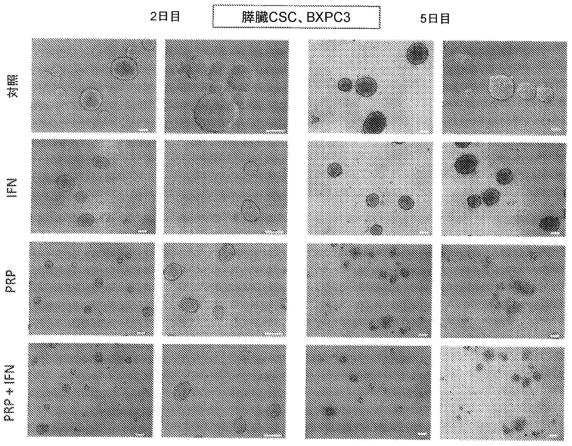
【図７】


CSC HCT-116
ALDH+/CD44+/CD326+
対照
INF
PRP
PRP+INF

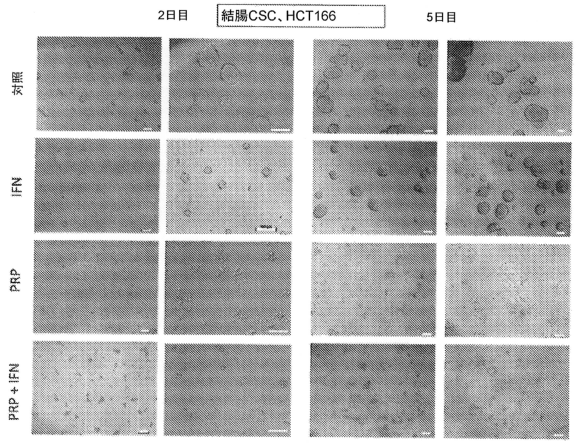
【図８】


ALDH+ HCT-116
%発現
対照CD44
PRP CD44
対照CD326
PRP CD326

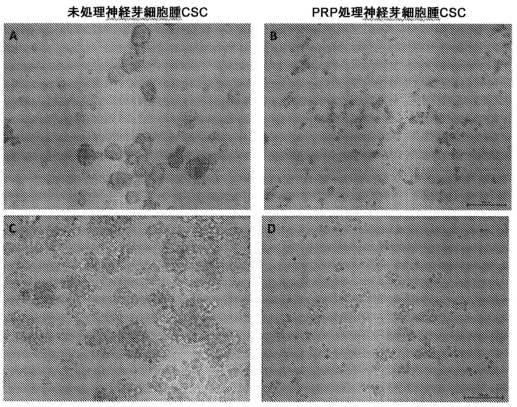
【図９】


2日目
膵臓CSC、BXPC3
5日目
対照
IFN
PRP
PRP + IFN

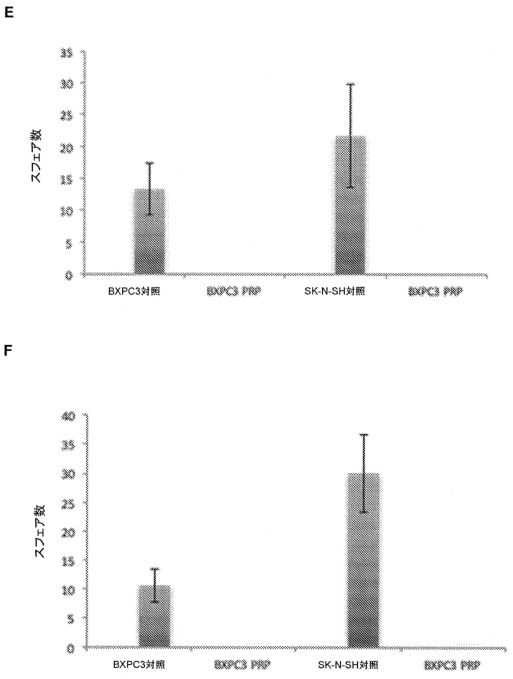
【図１０】



【図１１－１】

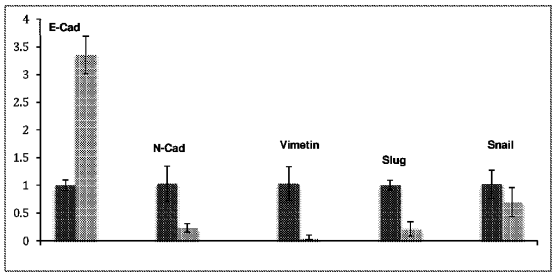


【図１１－２】

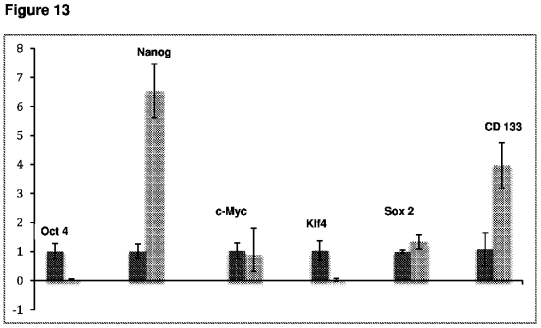


【図１２】

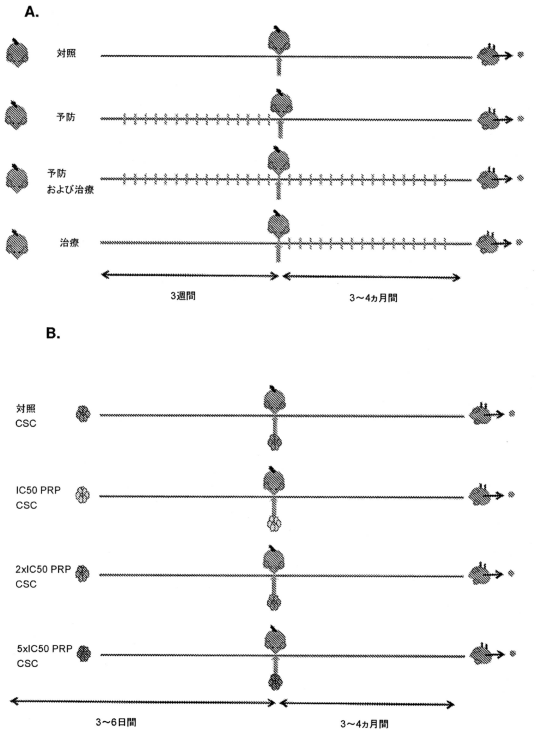
Figure 12



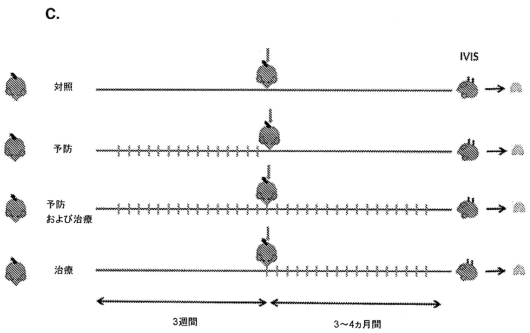
【図１３】



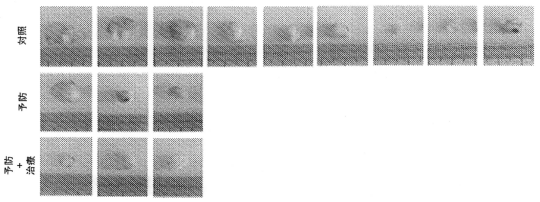
【図１４－１】



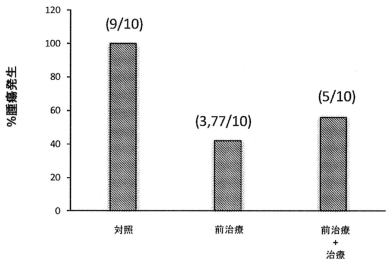
【図１４－２】



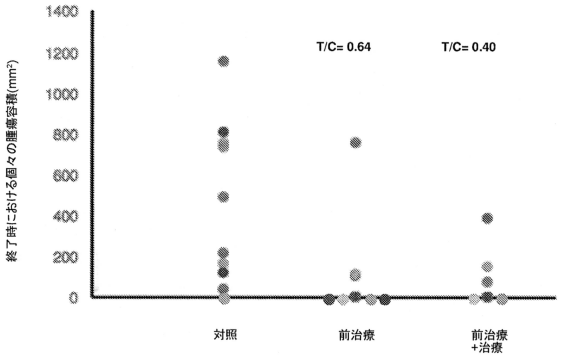
【図１５】



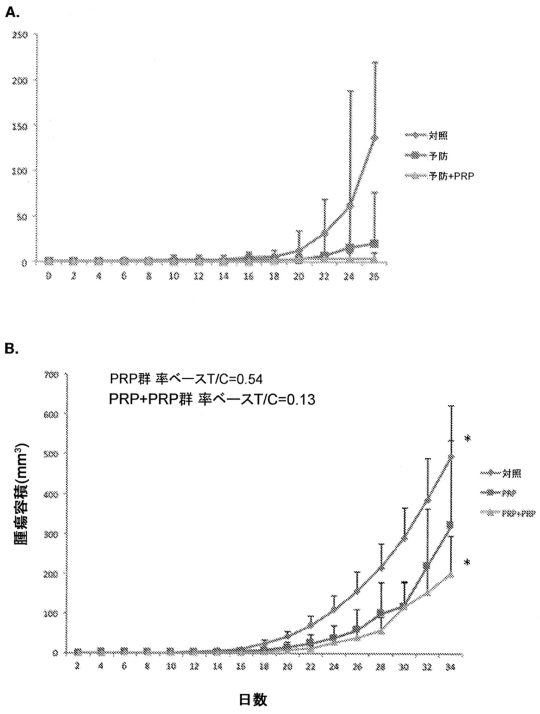
【図１６】



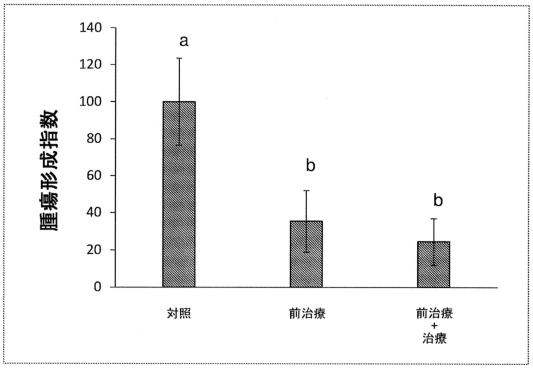
【図１７】



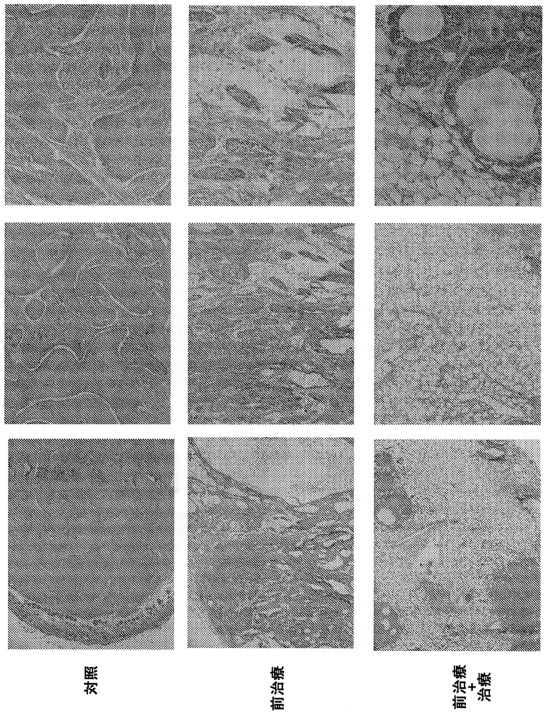
【図１８】



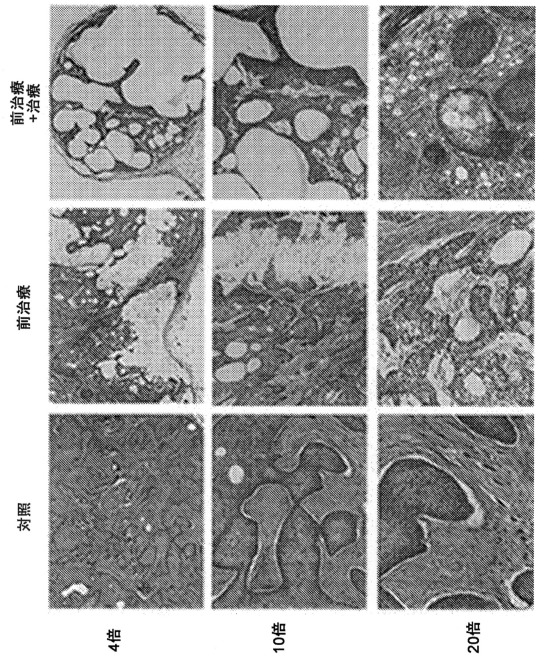
【図１９】



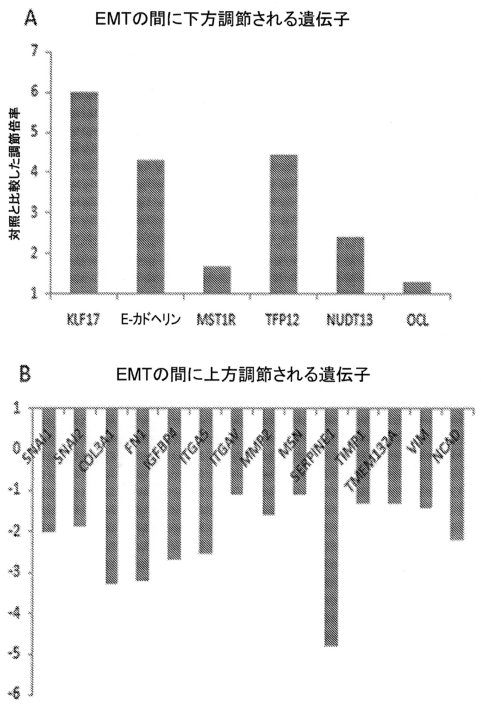
【図２０】



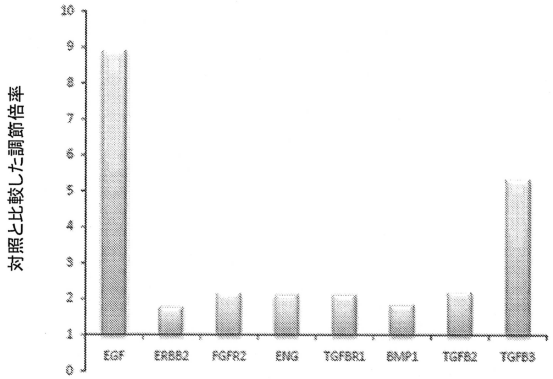
【図２１】



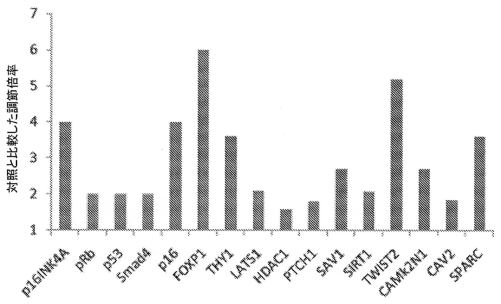
【図２２】



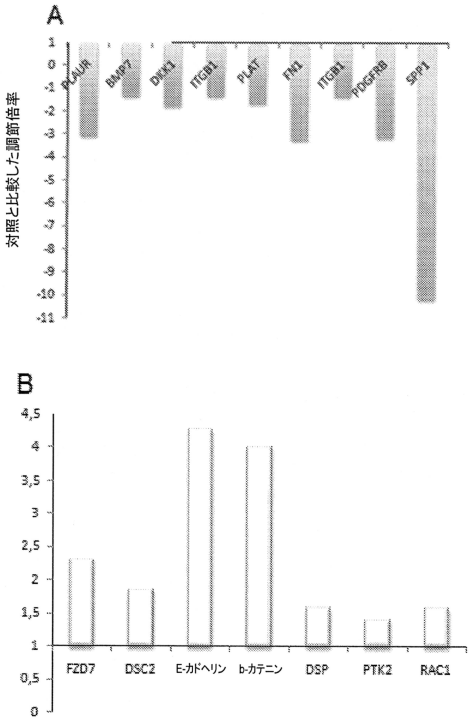
【図２３】



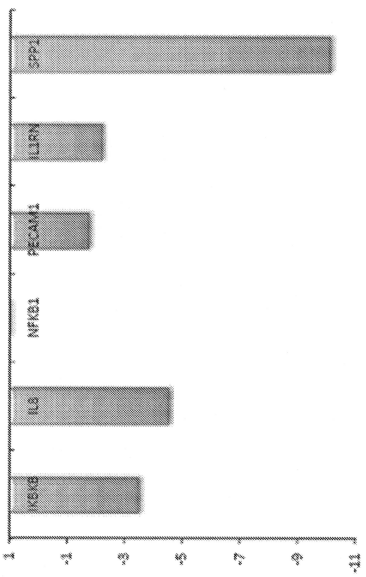
【図２４】



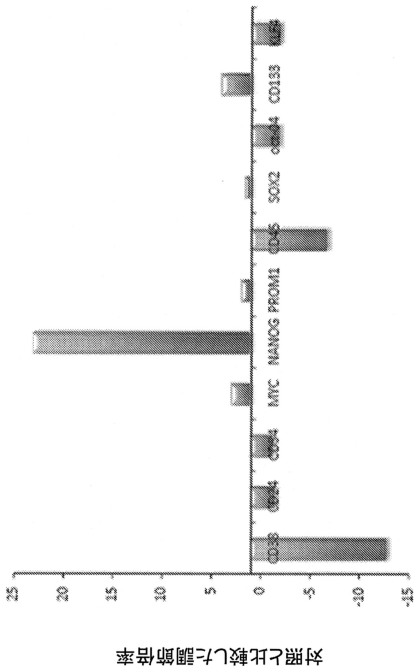
【図２５】



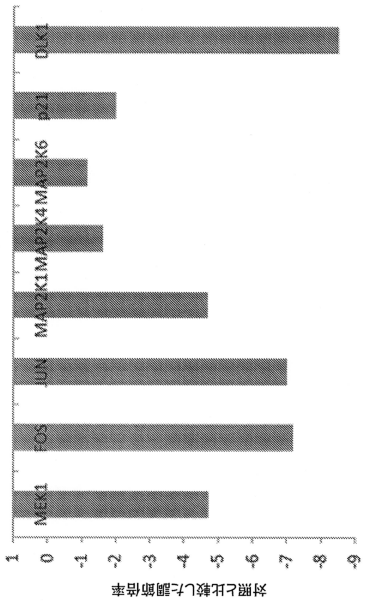
【図２６】



【図２７】



【図２８】



【配列表】

0007058604000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類
Ｃ１２Ｑ　1/6851(2018.01)
Ｃ１２Ｑ　1/686(2018.01)
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)

ＦＩ
Ａ６１Ｐ　43/00　１０５
Ｃ１２Ｎ　5/095
Ｃ１２Ｑ　1/6851　Ｚ
Ｃ１２Ｑ　1/686　Ｚ
Ｃ１２Ｎ　15/09　Ｚ

(33)優先権主張国・地域又は機関
スペイン(ES)

前置審査
リート・３０２／６内

(72)発明者　ジュリアン・ケニョン
オーストラリア・ヴィクトリア・３１２４・キャンバーウェル・バトラー・ストリート・３０２／６内
(72)発明者　ファン・アントニオ・マーシャル・コラレス
オーストラリア・ヴィクトリア・３１２４・キャンバーウェル・バトラー・ストリート・３０２／６内
(72)発明者　マリア・アンヘル・ガルシア・チャヴェス
オーストラリア・ヴィクトリア・３１２４・キャンバーウェル・バトラー・ストリート・３０２／６内

審査官　長谷川 茜

(56)参考文献　特表２０１３－５０８３０７（ＪＰ，Ａ）
Anticancer Research，2012年，Vol.32，pp.3847-3854
PLOS ONE，2014年，Vol.9, No.6，e99628, pp.1-11
Stem Cell Research，2014年，Vol.12，pp.86-100
British Journal of Cancer，2010年，Vol.103，pp.382-390
British Journal of Cancer，2014年，Vol.111，pp.365-374

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　３８／４８
Ａ６１Ｐ　３５／００－３５／０４
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）