

(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 5 月 1 日(01.05.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/065375 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/078850
- (22) 国際出願日: 2013 年 10 月 24 日(24.10.2013)
- (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:
61/717,703 2012 年 10 月 24 日(24.10.2012) US
- (71) 出願人: 協和発酵キリン株式会社 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 笹川 綾(SASAKAWA Aya); 〒1008185 東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 住友 嘉樹(SUMITOMO Yoshiki); 〒1008185 東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 濱田 百合子, 外(HAMADA Yuriko et al.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁目 7 番 1 3 号 虎ノ門イーストビルディング 10 階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (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), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
 - 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR INHIBITING PROLIFERATION OF CELL BY OXIDATIVE STRESS

(54) 発明の名称: 酸化ストレスによる細胞増殖抑制方法

(57) Abstract: The present invention relates to an intracellular oxidative stress promoter comprising a monoclonal antibody having an activity of inhibiting the incorporation of a neutral amino acid into a cell or a fragment of the antibody as an active ingredient. The present invention also relates to a cell proliferation inhibitor characterized by comprising a monoclonal antibody having an activity of inhibiting the incorporation of a neutral amino acid into a cell or a fragment of the antibody as an active ingredient, and also characterized by capable of promoting oxidative stress in a cell.

(57) 要約: 本発明は、中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含む、細胞内酸化ストレス促進剤に関する。また、本発明は、中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含み、かつ細胞内の酸化ストレスを促進させることを特徴とする細胞増殖抑制剤に関する。



WO 2014/065375 A1

明 細 書

発明の名称：酸化ストレスによる細胞増殖抑制方法

技術分野

[0001] 本発明は、中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含む、細胞内酸化ストレス促進剤に関する。また、本発明は、中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含み、かつ細胞内の酸化ストレスを促進させることを特徴とする細胞増殖抑制剤に関する。

[0002] さらに本発明は、中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を投与することを含む、細胞内酸化ストレス促進方法に関する。また、本発明は、中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を投与し、かつ細胞内の酸化ストレスを促進させることを含む、細胞増殖抑制方法に関する。

背景技術

[0003] ASCT2ポリペプチドは全長541アミノ酸からなる10回膜貫通蛋白質であり、ナトリウムイオン依存的に細胞膜を介して中性アミノ酸を輸送するトランスポーターとして機能する。ASCT2の別の名称としては、Solute carrier family 1 (neutral amino acid transport), member 5、Solute carrier family 1 member 5、またはSLC1A5が用いられており、癌とASCT2またはSLC1A5の発現との関係に関しては、EST (expressed sequence tag) データベースを用いた検討でSLC1A5、SLC7A5およびSLC38A5の3つが癌組織で顕著に発現亢進していることが知られている（非特許文献1）。

[0004] また、正常の肝臓においてSLC1A5の発現は全く認められないのに対

して、肝細胞癌や肝芽腫の臨床組織において S L C 1 A 5 の発現が認められることが明らかにされている（非特許文献 2）。さらに、低分化星状細胞腫や多形性膠芽腫の臨床組織においても正常組織と比べて S L C 1 A 5 の発現が亢進していることが明らかにされている（非特許文献 3）。

[0005] また、大腸癌と前立腺癌の臨床組織において、A S C T 2 の発現が免疫組織染色やウェスタンブロッティングによって検出され、A S C T 2 の発現が高い患者では予後が悪いことが知られている（非特許文献 4）。

[0006] さらに、大腸癌、肝癌、乳癌、星状細胞腫および神経芽細胞腫の幾つかの細胞株において、グルタミンの取り込みが A S C T 2 により担われており（非特許文献 5、6、7、8）、A S C T 2 の基質であるアラニン-セリノスレオニン混合物を用いてグルタミンの細胞内取り込みを競合阻害させることにより、細胞の増殖が抑制されることが報告されている（非特許文献 9）。

[0007] また、抗 A S C T 2 抗体により細胞内へのアミノ酸取り込みが阻害されること、および細胞増殖が抑制されることは報告されているが（特許文献 1、2）、そのメカニズムについては明らかになっていない。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献 1：国際公開第 2010/008075 号

特許文献 2：国際公開第 2011/087091 号

非特許文献

[0009] 非特許文献 1：Seminars in Cancer Biology, 15, 254 (2005)

非特許文献 2：Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 283, G1062 (2002)

非特許文献 3：NeuroReport, 15, 575 (2004)

非特許文献 4：Anticancer Research, 22, 2555 (2002)、Anticancer Research, 23, 3413 (

2003)

非特許文献5: J. Surgical Research, 90, 149 (2000)

非特許文献6: J. Cellular Physiology, 176, 166 (1998)

非特許文献7: J. Neuroscience Research, 66, 959 (2001)

非特許文献8: Am. J. Physiol. Cell Physiol., 282, C1246 (2002)

非特許文献9: J. Surgical Research, 90, 149 (2000)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含む、細胞内酸化ストレス促進剤の提供を目的とする。また、本発明は、中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含む、かつ細胞内の酸化ストレスを促進させることを特徴とする細胞増殖抑制剤を提供することを目的とする。

[0011] さらに本発明は、中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を投与することを含む、細胞内酸化ストレス促進方法の提供を目的とする。また、本発明は、中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を投与し、かつ細胞内の酸化ストレスを促進させることを含む、細胞増殖抑制方法の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本願は(1)～(12)の発明に関する。

(1) 中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体

またはその抗体断片を有効成分として含む、細胞内酸化ストレス促進剤。

(2) 前記中性アミノ酸がグルタミンである(1)に記載の細胞内酸化ストレス促進剤。

(3) 前記モノクローナル抗体が中性アミノ酸トランスポーターの細胞外領域に結合する抗体である、(1)または(2)に記載の細胞内酸化ストレス促進剤。

(4) 前記モノクローナル抗体がシステムASCアミノ酸トランスポーター2(ASCT2)の細胞外領域に結合する抗体である、(1)または(2)に記載の細胞内酸化ストレス促進剤。

(5) 前記モノクローナル抗体が(A)～(C)から選ばれる1の抗体である、(1)～(4)のいずれか1に記載の細胞内酸化ストレス促進剤。

(A) 抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号26、27および28で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号29、30および31で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

(B) 抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号32、33および34で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号35、36および37で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

(C) 抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号49、50および51で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号52、53および54で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

(6) 前記細胞が癌細胞である、(1)～(5)のいずれか1に記載の細胞内酸化ストレス促進剤。

(7) 中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含む、かつ細胞内の酸化ストレスを促進させることを特徴とする細胞増殖抑制剤。

(8) 前記中性アミノ酸がグルタミンである(7)に記載の細胞増殖抑制剤。

(9) 前記モノクローナル抗体が中性アミノ酸トランスポーターの細胞外領域に結合する抗体である、(7)または(8)に記載の細胞増殖抑制剤。

(10) 前記モノクローナル抗体がA S C T 2の細胞外領域に結合する抗体である、(7)または(8)に記載の細胞増殖抑制剤。

(11) 前記モノクローナル抗体が(A)～(C)から選ばれる1の抗体である、(7)～(10)のいずれか1に記載の細胞増殖抑制剤。

(A) 抗体のV HのC D R 1、C D R 2およびC D R 3が、それぞれ配列番号26、27および28で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のV LのC D R 1、C D R 2およびC D R 3が、それぞれ配列番号29、30および31で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

(B) 抗体のV HのC D R 1、C D R 2およびC D R 3が、それぞれ配列番号32、33および34で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のV LのC D R 1、C D R 2およびC D R 3が、それぞれ配列番号35、36および37で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

(C) 抗体のV HのC D R 1、C D R 2およびC D R 3が、それぞれ配列番号49、50および51で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のV LのC D R 1、C D R 2およびC D R 3が、それぞれ配列番号52、53および54で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

(12) 前記細胞が癌細胞である、(7)～(11)のいずれか1に記載の細胞増殖抑制剤。

(13) 中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を投与することを含む、細胞内酸化ストレス促進方法。

(14) 前記中性アミノ酸がグルタミンである(13)に記載の方法。

(15) 前記モノクローナル抗体が中性アミノ酸トランスポーターの細胞外領域に結合する抗体である、(13)に記載の方法。

(16) 前記モノクローナル抗体がシステムASCアミノ酸トランスポーター2 (ASCT2) の細胞外領域に結合する抗体である、(13) に記載の方法。

(17) 前記モノクローナル抗体が(A) ~ (C) から選ばれる1の抗体である、(13) に記載の方法。

(A) 抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号26、27および28で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号29、30および31で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

(B) 抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号32、33および34で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号35、36および37で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

(C) 抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号49、50および51で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号52、53および54で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

(18) 前記細胞が癌細胞である、(13) に記載の方法。

(19) 中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を投与し、かつ細胞内の酸化ストレスを促進させることを含む、細胞増殖抑制方法。

(20) 前記中性アミノ酸がグルタミンである(19) に記載の方法。

(21) 前記モノクローナル抗体が中性アミノ酸トランスポーターの細胞外領域に結合する抗体である、(19) に記載の方法。

(22) 前記モノクローナル抗体がASCT2の細胞外領域に結合する抗体である、(19) に記載の方法。

(23) 前記モノクローナル抗体が(A) ~ (C) から選ばれる1の抗体である、(19) に記載の方法。

(A) 抗体のVHのCDR 1、CDR 2およびCDR 3が、それぞれ配列番号26、27および28で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR 1、CDR 2およびCDR 3が、それぞれ配列番号29、30および31で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

(B) 抗体のVHのCDR 1、CDR 2およびCDR 3が、それぞれ配列番号32、33および34で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR 1、CDR 2およびCDR 3が、それぞれ配列番号35、36および37で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

(C) 抗体のVHのCDR 1、CDR 2およびCDR 3が、それぞれ配列番号49、50および51で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR 1、CDR 2およびCDR 3が、それぞれ配列番号52、53および54で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

(24) 前記細胞が癌細胞である、(19)に記載の方法。

発明の効果

[0013] 本発明の細胞内酸化ストレス促進剤および細胞増殖抑制剤は、中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含むことにより、細胞内における酸化ストレスの促進、中性アミノ酸の取り込みを阻害することによるATP産生の抑制、DNAにおける二重鎖の損傷、またはG1期における細胞周期の停滞を生じさせ、細胞の増殖を抑制または細胞死を引き起こすことができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、SNU-16癌細胞株のKM4008HV2LV3に対する細胞内代謝応答の変化を示す図である。KM4008HV2LV3もしくは溶媒処理細胞におけるCE-TOFMSを用いたメタボローム解析結果のうち、抗体添加から2時間または8時間後のグルタチオン合成系およびTCA回路系の間代謝物質の相対面積値を示す。横軸は、KM4008HV2LV3または溶媒処理後の時間を示し、縦軸は相対面積値を示す。グラフは、溶媒処理群を黒色で、KM4008HV2LV3処理群を白色で示す。

[図2]図2は、酸化ストレスに関与する抗体アレイ結果を示す図である。SNU-16細胞に薬剤を添加後、24時間で細胞を破砕、Full Moon Biosystems社の抗体アレイにハイブリダイズし、シグナルの変動を検出した。溶媒または抗体添加から24時間後に、溶媒処理細胞に対するKM4008HV2LV3処理細胞のシグナル強度が2以上であった抗体のうち、酸化ストレスに関与する抗体の結果を示す。横軸に抗体添加後の培養期間（時間）、縦軸にKM4008HV2LV3処理細胞のシグナル値を溶媒処理細胞のシグナル値で割った値を示す。

[図3]図3は、二重鎖損傷応答に関与する抗体アレイ結果を示す図である。SNU-16細胞に薬剤を添加後、24時間で細胞を破砕、Full Moon Biosystems社の抗体アレイにハイブリダイズし、シグナルの変動を検出した。溶媒または抗体添加から24時間後に、溶媒処理細胞に対するKM4008HV2LV3処理細胞でのシグナル強度が2以上であった変化のあった抗体のうち、二重鎖損傷応答に関与する抗体の結果を示す。横軸に抗体添加後の培養期間（時間）、縦軸にKM4008HV2LV3処理細胞のシグナル値を溶媒処理細胞のシグナル値で割った値を示す。

[図4]図4は、KM4008HV2LV3による細胞周期変動を示す図である。SNU-16細胞に薬剤を添加し、24時間後に細胞を固定してpropidium iodideで染色後、フローサイトメーターにより蛍光強度を測定したヒストグラムを示す。横軸にDNA含量を表すFL2の蛍光強度を、縦軸に各処理群におけるピーク細胞数を100%とした相対的な細胞数を相対細胞数（%）として示す。NTは溶媒処理を、AbはKM4008HV2LV3（10 μ g/mL）処理を、H₂O₂はhydrogen peroxide（50 μ M）処理を示す。

[図5]図5は、KM4008HV2LV3による細胞死の解析を示す図である。SNU-16細胞に薬剤を添加し、72時間後にannexinV-FITCで染色し、フローサイトメーターを用いて蛍光強度を測定したヒストグラムを示す。横軸にannexinV-FITCの蛍光強度を表すFL1の

蛍光強度を、縦軸に各処理群におけるピーク細胞数を100%とした相対的な細胞数を相対細胞数(%)として示す。NTは溶媒処理を、KM4008HV2LV3はKM4008HV2LV3(10 μ g/mL)処理を、H₂O₂はhydrogen peroxide(50 μ M)処理を示す。

[図6]図6は、KM4008HV2LV3による細胞増殖抑制の抗酸化物質による回復を示す図である。SNU-16細胞に抗体およびN-acetylcysteine(NAC)を添加し、48あるいは72時間後にPI染色を行い、フローサイトメーターを用いて生細胞数を測定した結果を示す。横軸に抗体添加後の培養期間(時間)、縦軸に生細胞数(個/mL)を示す。n=3でエラーバーは標準偏差を示す。NTは溶媒処理を、AbはKM4008HV2LV3処理を、NACはNAC処理を示す。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明は、中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含む、細胞内酸化ストレス促進剤に関する。

[0016] また、本発明は、中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含む、かつ細胞内の酸化ストレスを促進させることを特徴とする細胞増殖抑制剤に関する。

[0017] 本発明は、中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含む、tricarboxylic acid(TCA)サイクル(クエン酸回路とも表記する)抑制剤を含む。

[0018] また、本発明は、中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含む、かつTCAサイクルを抑制することを特徴とする細胞増殖抑制剤を含む。

[0019] 本発明において、中性アミノ酸としては、例えば、グルタミン、アラニン、セリンおよびスレオニンが挙げられ、好ましくはグルタミンが挙げられる。

- [0020] 本発明において、中性アミノ酸の細胞内への取り込みの経路は特に限定されない。好ましくは中性アミノ酸トランスポーターを介して細胞内に取り込まれる経路であり、より好ましくはシステムASCアミノ酸トランスポーター（ASCT2）を介して細胞内に取り込まれる経路が挙げられる。
- [0021] 本発明におけるASCT2としては、特に種を限定するものではないが、好ましくは哺乳動物由来のASCT2が挙げられ、具体的にはヒト由来のASCT2が挙げられる。
- [0022] ASCT2のアミノ酸配列情報は、NCBI（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）などの公知のデータベースから取得することができ、例えば、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するヒトASCT2のアミノ酸配列（NCBIアクセッション番号：NP_005619）、または配列番号86で示されるマウスASCT2のアミノ酸配列（NCBIアクセッション番号：NP_033227）などが挙げられる。
- [0023] 本発明におけるASCT2としては、例えば、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは配列番号2で示されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が欠失、置換あるいは付加されたアミノ酸配列からなり、かつASCT2の機能を有するポリペプチドが挙げられる。配列番号2で示されるアミノ酸配列と60%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、最も好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつASCT2の機能を有するポリペプチドも本発明のASCT2に包含される。
- [0024] 配列番号2で示されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、部位特異的変異導入法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biolo

gy, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)]などを用いて、例えば、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより得ることができる。欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは1個～数十個、例えば、1～20個、より好ましくは1個～数個、例えば、1～5個のアミノ酸である。

[0025] ASC T2をコードする遺伝子としては、例えば、配列番号1で示される塩基配列からなるDNAを含む遺伝子が挙げられる。配列番号1で示される塩基配列において1以上の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列からなり、かつASC T2の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子、配列番号1で示される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有する塩基配列、好ましくは80%以上の相同性を有する塩基配列、さらに好ましくは95%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつASC T2の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子、ならびに配列番号1で示される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAからなり、かつASC T2の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子なども本発明のASC T2をコードする遺伝子に包含される。

[0026] ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、配列番号1で示される塩基配列を有するDNAをプローブに用いた、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロット・ハイブリダイゼーション法、またはDNAマイクロアレイ法などにより得られるハイブリダイズ可能なDNAを意味する。

[0027] 具体的には、例えば、ハイブリダイズしたコロニー若しくはプラーク由来のDNA、または該配列を有するPCR産物若しくはオリゴDNAを固定化したフィルターまたはスライドガラスを用いて、0.7~1.0mol/Lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーション [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University, (1995)] を行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/L塩化ナトリウム、15mmol/Lクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターまたはスライドガラスを洗浄することにより同定できるDNAを挙げることができる。

[0028] ハイブリダイズ可能なDNAとしては、配列番号1で示される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAを挙げることができる。

[0029] 真核生物の蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列には、しばしば遺伝子の多型が認められる。本発明において用いられる遺伝子に、このような多型によって塩基配列に小規模な変異を生じた遺伝子も、本発明のASCT2をコードする遺伝子に包含される。

[0030] 本発明における相同性の数値は、特に明示した場合を除き、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、塩基配列については、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値など、ア

ミノ酸配列については、BLAST2 [Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997)、Genome Res., 7, 649 (1997)、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>]においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値などが挙げられる。

[0031] デフォルトのパラメータとしては、G (Cost to open gap) が塩基配列の場合は5、アミノ酸配列の場合は11、-E (Cost to extend gap) が塩基配列の場合は2、アミノ酸配列の場合は1、-q (Penalty for nucleotide mismatch) が-3、-r (reward for nucleotide match) が1、-e (expect value) が10、-W (word size) が塩基配列の場合は11残基、アミノ酸配列の場合は3残基、-y [Dropoff (X) for blast extensions in bits] がblastnの場合は20、blastn以外のプログラムでは7、-X (X dropoff value for gapped alignment in bits) が15および-Z (final X dropoff value for gapped alignment in bits) がblastnの場合は50、blastn以外のプログラムでは25である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html>)。

[0032] 配列番号2で示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドは、当業者に公知の方法によって作製することができ、例えば、配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNAの一部を欠失させ、これを含む発現ベクターを導入した形質転換体を培養することにより作製することができる。また、上記の方法で作製されるポリペプチドまたはDNAに基づいて、上記と同様の方法により、配列番号2で示されるアミノ酸配列の部分配列にお

いて1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを得ることができる。

[0033] さらに、配列番号2で示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチド、または配列番号2で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換あるいは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 法、t-ブチルオキシカルボニル (tBoc) 法などの化学合成法によって製造することもできる。

[0034] 本発明におけるモノクローナル抗体としては、中性アミノ酸トランスポーターの細胞外領域に結合する抗体が挙げられ、好ましくはASCT2の細胞外領域に結合する抗体が挙げられる。

[0035] 本発明における中性アミノ酸トランスポーターの細胞外領域としては、該トランスポーターのアミノ酸配列を公知の膜貫通領域予測プログラムSOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/frame0.html>)、TMHMM ver. 2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) またはExPASy Proteomics Server (<http://Ca.expasy.org/>) などを用いて予測された領域などが挙げられる。

[0036] 具体的には、ASCT2の細胞外領域として、例えば、配列番号2で示される該ポリペプチドのアミノ酸配列を公知の膜貫通領域予測プログラムSOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/frame0.html>)、TMHMM ver. 2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) またはExPASy Proteomics Server (<http://Ca.expasy.org/>) などを用いて予測された領域などが挙げられる。

[0037] より具体的には、例えば、ExPASy Proteomics Ser

verにおいて予測される細胞外ドメインである74～98番目、154～224番目、287～305番目、357～376番目、および420～425番目の5つの領域が挙げられる。

[0038] または、例えば、文献 [J. Biol. Chemistry, 271, 18657 (1996)] もしくは [J. Virology, 73, 4470 (1999)] で予測されている細胞外ドメインである65～88番目、152～224番目、288～306番目、361～380番目、および447～451番目の5つの領域が挙げられる。

[0039] 本発明において、5つの細胞外領域をN末側から順にEL1領域、EL2領域、EL3領域、EL4領域およびEL5領域と表す。例えば、配列番号2で示されるASCT2ポリペプチドのアミノ酸配列におけるEL2領域は、154～224番目または152～224番目である。

[0040] 本発明における、中性アミノ酸トランスポーターの細胞外領域に結合するモノクローナル抗体としては、該細胞外領域のいずれの領域に結合してもよい。具体的にはASCT2の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体は、ASCT2の細胞外領域のいずれの領域に結合してもよいが、好ましくはASCT2の細胞外領域のうち、EL1～EL5領域から選ばれる少なくとも1つの領域に結合し、より好ましくはASCT2の細胞外領域のうち、少なくともEL2領域に結合する抗体が挙げられる。

[0041] 本発明においてアミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を評価する方法としては、細胞に抗体または該抗体断片を反応させ、放射性物質で標識したアラニンなどのアミノ酸の取り込みが阻害されることをシンチレーションカウンタなどの機器を用いて評価する方法 [J. Biol. Chem., 271, 14883 (1996)] などが挙げられる。

[0042] 本発明においてアミノ酸の細胞内取り込み阻害による細胞増殖抑制活性を評価する方法としては、細胞に抗体または該抗体断片を反応させ、中性アミノ酸依存的な細胞の増殖が阻害されることを生細胞数測定試薬などを用いて評価する方法 [J. Surgical Research, 90, 149 (

2000)] などが挙げられる。

[0043] 本発明における細胞は、該細胞の生存や増殖などに中性アミノ酸もしくは中性アミノ酸トランスポーターが関与していればいずれの細胞でもよく、例えば、ヒト体内に天然に存在する細胞、ヒト体内に天然に存在する細胞から樹立された細胞株、または遺伝子組換え技術により得られた細胞などが挙げられる。本発明における細胞は、中性アミノ酸トランスポーターを発現していることが好ましく、ASCT2を発現していることがより好ましい。

[0044] ヒト体内に天然に存在する細胞としては、具体的には、例えば、癌細胞が挙げられる。癌としては、例えば、血液癌、乳癌、子宮癌、大腸癌、食道癌、胃癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、直腸癌、甲状腺癌、子宮頸癌、小腸癌、前立腺癌および膵臓癌などが挙げられ、好ましくは血液癌、食道癌、胃癌、大腸癌、肝癌または前立腺癌が挙げられる。血液癌としては、例えば、骨髄性白血病、リンパ性白血病、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫などが挙げられる。

[0045] 本発明に用いられる抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれであってもよいが、好ましくは単一のエピトープに結合するモノクローナル抗体が挙げられる。

[0046] モノクローナル抗体は、ハイブリドーマから生産されるモノクローナル抗体であってもよいし、遺伝子組換え技術によって作製された遺伝子組換え抗体であってもいずれのモノクローナル抗体でもよいが、ヒトにおいて免疫原性を低下させるために、ヒト型キメラ抗体（以下、単にキメラ抗体ともいう）、ヒト化抗体〔ヒト型complementarity determining region; (CDR) 移植抗体ともいう〕およびヒト抗体を用いることが好ましい。

[0047] 本発明のモノクローナル抗体としては、具体的には、(A)～(C)から選ばれる抗体が挙げられる。

(A) 抗体の重鎖可変領域（VHと表記する）のCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号26、27および28で示されるアミノ酸配

列を含み、かつ、抗体の軽鎖可変領域（VLと表記する）のCDR 1、CDR 2およびCDR 3が、それぞれ配列番号29、30および31で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

（B）抗体のVHのCDR 1、CDR 2およびCDR 3が、それぞれ配列番号32、33および34で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR 1、CDR 2およびCDR 3が、それぞれ配列番号35、36および37で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

（C）抗体のVHのCDR 1、CDR 2およびCDR 3が、それぞれ配列番号49、50および51で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR 1、CDR 2およびCDR 3が、それぞれ配列番号52、53および54で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

[0048] 本発明における抗体のVHのCDR 1、CDR 2およびCDR 3が、それぞれ配列番号26、27および28で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR 1、CDR 2およびCDR 3が、それぞれ配列番号29、30および31で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体の一態様としては、抗ASCT2マウスモノクローナル抗体KM4008、抗ASCT2ヒト型キメラ抗体cKM4008、抗ASCT2ヒト化抗体KM4008HV2LV3およびKM4008HV10LV3（国際公開第2010/008075号、国際公開第2011/087091号）などが挙げられる。

[0049] 本発明における抗体のVHのCDR 1、CDR 2およびCDR 3が、それぞれ配列番号32、33および34で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR 1、CDR 2およびCDR 3が、それぞれ配列番号35、36および37で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体の一態様としては、抗ASCT2マウスモノクローナル抗体KM4012、抗ASCT2ヒト型キメラ抗体cKM4012（国際公開第2010/008075号、国際公開第2011/087091号）などが挙げられる。

[0050] 本発明における抗体のVHのCDR 1、CDR 2およびCDR 3が、それ

ぞれ配列番号49、50および51で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号52、53および54で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体の一態様としては、抗ASCT2ラットモノクローナル抗体KM4018、抗ASCT2ヒト型キメラ抗体cKM4018（国際公開第2010/008075号、国際公開第2011/087091号）などが挙げられる。

[0051] 本発明においてモノクローナル抗体とは、単クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体であり、ただ1つのエピトープ（抗原決定基ともいう）を認識し、モノクローナル抗体を構成するアミノ酸配列（1次構造）が均一である抗体をいう。

[0052] エピトープとは、モノクローナル抗体が認識し、結合する単一のアミノ酸配列、アミノ酸配列からなる立体構造、糖鎖、糖脂質、多糖脂質、アミノ基、カルボキシル基、リン酸、硫酸など修飾残基が結合したアミノ酸配列および該修飾残基が結合したアミノ酸配列からなる立体構造をいう。立体構造とは、天然に存在するタンパク質が有する3次元立体構造であり、細胞内または細胞膜上に発現しているタンパク質が構成する立体構造をいう。

[0053] 本発明において抗体分子はイムノグロブリン（以下、Igと表記する）とも称され、ヒト抗体は、分子構造の違いに応じて、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4およびIgMのアイソタイプに分類される。アミノ酸配列の相同性が比較的高いIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を総称してIgGとも称する。

[0054] 本発明において抗体分子は重鎖（heavy chain、以下H鎖と記す）および軽鎖（light chain、以下L鎖と記す）と呼ばれるポリペプチドより構成される。

[0055] また、H鎖はN末端側よりVHおよびH鎖定常領域（CHとも表記される）、L鎖はN末端側よりVLおよびL鎖定常領域（CLとも表記される）の各領域により、それぞれ構成される。

[0056] CHはさらに、N末端側よりCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ド

メインおよびCH3ドメインの各ドメインにより構成される。CH2ドメインおよびCH3ドメインを合わせてFc領域又は単にFcと呼ばれる。

[0057] 本発明におけるCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメインおよびFc領域は、EUインデックス [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] により、N末端からのアミノ酸残基の番号で特定することができる。

[0058] 具体的には、CH1はEUインデックス118～215番のアミノ酸配列、ヒンジはEUインデックス216～230番のアミノ酸配列、CH2はEUインデックス231～340番のアミノ酸配列、CH3はEUインデックス341～447番のアミノ酸配列とそれぞれ特定される。

[0059] キメラ抗体は、ヒト以外の動物由来の抗体のVHおよびVLと、ヒト抗体のCHおよびCLとからなる抗体である。可変領域について由来となる動物の種類は、マウスやラット、ハムスター、ウサギなどのハイブリドーマを作製しうる動物であれば特に限定されない。

[0060] ヒト型キメラ抗体はヒト以外の動物由来の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子を有する発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入して発現させることで作製できる。ヒト型キメラ抗体のCHは、ヒトイムノグロブリン（以下、hIgと略記する）のものであれば特に限定されないが、hIgGクラスのものが好ましい。ヒト型キメラ抗体のCLは、 κ 鎖および λ 鎖のいずれでもよい。

[0061] ヒト化抗体は、ヒト以外の動物由来の抗体のVHおよびVLのCDRをヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体（ヒト型CDR移植抗体）である。ヒト型CDR移植抗体は、中性アミノ酸トランスポーター、具体的にはASCT2に特異的に結合するヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRを任意のヒト抗体のVHおよびVLのフレームワーク（以下、

F Rと略記する)に移植したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のC HおよびC LをコードするDNAを有する発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入して発現させることで、作製されうる。ヒト抗体のV HおよびV LのF Rのアミノ酸配列は、ヒト抗体由来のアミノ酸配列であれば特に限定されない。

[0062] ヒト化抗体のC Hは、h I gであれば特に限定されないが、h I g Gクラスのもの好ましい。ヒト化抗体のC Lは、 κ 鎖および λ 鎖のいずれでもよい。

[0063] 本発明の抗体断片の種類は特に限定されず、例えば、F a b、F a b'、F (a b')₂、s c F v、d i a b o d y、d s F v、C D Rを含むペプチドなどが挙げられる。

[0064] F a bは、I g Gをパパイン(タンパク質分解酵素)で処理して得られる断片のうち、分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。F a bは、抗体をパパインで処理するか、F a bをコードするDNAを発現ベクターに挿入し、このベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。

[0065] F (a b')₂は、I g Gをペプシン(タンパク質分解酵素)で処理して得られる断片のうち、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。F (a b')₂は、抗体をペプシンで処理するか、F a b'(後述)をチオエーテル結合またはジスルフィド結合で結合させることで、作製されうる。

[0066] F (a b')は、F (a b')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。F a b'は、抗体のF (a b')₂をジチオスレイトールで処理するか、前記抗体のF a b'をコードするDNAを発現ベクターに挿入し、このベクターを原核生物または真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。

[0067] s c F vは、1本のV Hと1本のV Lとを適当なペプチドリinkerを用いて連結した抗原結合活性を有する抗体断片である。s c F vは、抗体のV HおよびV LをコードするcDNAを取得し、s c F vをコードするDNAを

構築し、このDNAを発現ベクターに挿入し、この発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。

[0068] *d i a b o d y*は、*s c F v*が二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である*d i a b o d y*は、抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、*d i a b o d y*をコードするDNAを構築し、このDNAを発現ベクターに挿入し、この発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。

[0069] *d s F v*は、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを、システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させた抗体断片である。*d s F v*は、抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、*d s F v*をコードするDNAを構築し、このDNAを発現ベクターに挿入し、この発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。

[0070] CDRを含むペプチドは、VHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含むペプチドである。抗体のCDRを含むペプチドは、抗体のVHまたはVLのCDRをコードするDNAを構築し、このDNAを発現ベクターに挿入し、この発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）などの化学合成法によっても作製することができる。

[0071] 本発明において酸化ストレスとは、薬物、放射線、虚血など様々な要因により、細胞において通常はほぼ一定に保たれている活性酸素産生系および活性酸素消去系のバランスが崩れ、活性酸素産生系が優位になった状態を指す。細胞内で酸化ストレスが促進されると、細胞傷害、DNA塩基の修飾による突然変異、DNAの損傷、アポトーシスの誘導などが起こる。

[0072] 本発明において酸化ストレスの促進とは、細胞内の活性酸素産生系が亢進したことによるものであっても、活性酸素消去系が抑制されたことによるものであってもよい。

[0073] 本発明において細胞内の活性酸素産生系が亢進しているとは、細胞内の活性酸素産生系に関わるアミノ酸もしくはアミノ酸代謝物の存在量が陰性対照と比較して低下していることをいい、細胞内の活性酸素消去系が抑制されているとは、細胞内の活性酸素消去系に関わるアミノ酸もしくはアミノ酸代謝物の存在量が陰性対照と比較して低下していることをいう。

[0074] 細胞内の活性酸素産生系に関わるアミノ酸もしくはアミノ酸代謝物の存在量が陰性対照と比較して低下していること、または細胞内の活性酸素消去系に関わるアミノ酸もしくはアミノ酸代謝物の存在量が陰性対照と比較して低下していることは、例えば、CE-TOFMSを用いたメタボローム解析で、活性酸素産生系に関わるアミノ酸もしくはアミノ酸代謝物または活性酸素消去系に関わるアミノ酸もしくはアミノ酸代謝物について、被検細胞における相対面積値が陰性対照における相対面積値と比較して低下していることによって確認することができる。

[0075] 本発明においてTCAサイクルとは、食物から細胞のエネルギーを取り出すしくみの一つである。糖、脂質、タンパク質の分解により生じたアセチルCoAのアセチル基を酸化し、ミトコンドリア内膜の電子伝達系と共役することで、最終的に水と二酸化炭素、アデノシン三リン酸（ATPと表記する）を生成する。

実施例

[0076] 以下に本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されない。

[0077] [実施例1]

細胞の入手と培養条件

胃がん細胞株SNU-16はAmerican Type Culture Collection (ATCC) より入手した。RPMI 1640 (Invitrogen社製 カタログNo. 11875-119) に10% Fetal Bovine Serum (PAA社製 カタログNo. A15-501) を添加した培地を用いて、週に2回、 1×10^5 個/mLに薄

めて継代し、インキュベータ（Forma社製 カタログNo. 3110）内で37℃にて5% CO₂条件下で培養し、以降の実験に使用した。

[0078] アッセイ時は特に記載がない限り、Dulbecco's Modified Eagle's Medium（Sigma社製 カタログNo. D5030）にSodium bicarbonate solution（Sigma社製 カタログNo. S8761）3.7g/L, D-(+)-glucose solution 45% in H₂O（Sigma社製 カタログNo. G8769）1.0g/L, sodium pyruvate solution（Sigma社製 カタログNo. S8636）1mM, L-glutamine（ナカライテスク社製 カタログNo. 1694804）0.2mM, およびdialyzed FBS（Invitrogen社製 カタログNo. 26400044）10%を添加した培地（以下アッセイ培地と表記する）を使用した。

[0079] [実施例2]

KM4008HV2LV3の培養がん細胞株の細胞内代謝系に対する作用

抗ASCT2ヒト化抗体KM4008HV2LV3は、ASCT2の細胞外領域に結合し、グルタミンの細胞内への取り込み阻害活性および細胞増殖抑制活性を示す（国際公開第2010/008075号、国際公開第2011/087091号）。上述した活性の分子メカニズムを明らかにするために、キャピラリー電気泳動－飛行時間型質量分析計（capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry、CE-TOFMS）を用いて、KM4008HV2LV3処理および溶媒処理細胞でのメタボローム解析を実施した。

[0080] 2-1) 培養細胞試料の調製

SNU-16がん細胞株をアッセイ培地で 2×10^4 個/mLになるように懸濁し、T175フラスコ（ファルコン社製 353028）に30mLずつ播種した。該細胞を24時間培養後、フラスコ内に500 μ g/mLのKM4008HV2LV3を含む600 μ Lの培地（KM4008HV2LV

3を300 μ g含む溶媒液[10mMクエン酸ナトリウム、262mM D-ソルビトール、0.05mg/mL Polysorbate 80 (pH 5.7)]をアッセイ培地で600 μ Lに希釈したもの)を添加して37 $^{\circ}$ Cにて培養した。

[0081] また陰性対照として、フラスコに抗体の溶媒液を等量のアッセイ培地で希釈した培地を600 μ L添加して37 $^{\circ}$ Cにて培養した溶媒処理細胞を調製した。抗体および抗体の溶媒液を添加してから2時間、8時間後に細胞を剥離し、1300rpmで3分間遠心分離した後、上清を除去して、沈殿画分を10mLのマニトール水溶液[終濃度が5%になるようにマニトールを添加した超純水]にて懸濁した。

[0082] 細胞懸濁液の一部を取り出し、細胞数をカウントした後、細胞懸濁液を遠心分離した。上清を除去した後、1mLのメタボライト抽出用メタノール溶液[Internal Standard Solution 1 (10mM, ヒューマンメタボロームテクノロジーズ社製)をメタノール(和光純薬社製LC/MS用 134-14523)にて1000倍希釈した溶液]を添加し、CE-TOFMSによるメタボローム解析に供した。

[0083] 2-2) CE-TOFMSによるメタボローム解析

CE-TOFMSによるメタボローム解析は、データ解析も含めてヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社(以下HMT社とも表記する)に委託した。データ解析の方法について以下に示す。CE-TOFMSにより検出された各ピークについて、自動積分ソフトウェアのMaster Hands ver. 2.9.0.9(慶應義塾大学開発)を用いて、ピーク情報(質量電荷比(m/z))、泳動時間(Migration time: MT)およびピーク面積値)を得た。得られた m/z とMTをもとにして、HMT社が保有する代謝物質データベースから、CE-TOFMSで検出された各ピークに相当するアミノ酸またはアミノ酸代謝物質を同定した。

[0084] 同定された各アミノ酸またはアミノ酸代謝物質について、(ピーク面積値)/(内部標準物質の面積値 $\times$ 測定に使用した細胞数)で表わされる相対面

積値を算出した。KM4008HV2LV3または溶媒添加から、2時間後、8時間後の該アミノ酸またはアミノ酸代謝物質の相対面積値を表1に、表1をグラフ化したものを図1に示す。

[0085] [表1]

CE-TOFMSによるメタボローム解析で得られた、KM4008HV2LV3または溶媒処理から2時間または8時間後の各アミノ酸またはアミノ酸代謝物質の相対面積値

化合物名	相対面積値			
	2時間		8時間	
	溶媒	KM4008HV2LV3	溶媒	KM4008HV2LV3
グルタチオン (GSH)	3.7E-01	1.0E-01	7.7E-01	6.1E-02
Gln	5.7E-03	2.2E-03	9.0E-03	2.9E-03
Glu	2.9E-01	1.2E-01	4.5E-01	1.3E-01
NADPH 二価	2.0E-03	9.1E-04	2.7E-03	1.6E-03
2-オキソグルタル酸	8.0E-04	N.D.	2.1E-03	N.D.
コハク酸	1.6E-03	5.8E-04	2.5E-03	9.9E-04
フマル酸	5.3E-03	2.1E-03	8.1E-03	1.4E-03
リンゴ酸	6.2E-02	2.0E-02	8.6E-02	1.7E-02
ATP	1.2E-01	5.2E-02	1.5E-01	1.0E-01

[0086] 得られた相対面積値は、各アミノ酸またはアミノ酸代謝物質の細胞内での濃度を反映している。そのため、抗体または溶媒処理から2時間または8時間それぞれの反応時間における、抗体処理と溶媒処理の相対面積値を比較することで、各反応時間における、抗体処理による該アミノ酸またはアミノ酸代謝物質の細胞内濃度の変化を評価することができる。

[0087] KM4008HV2LV3で処理した細胞では、グルタミン (Gln)、グルタミン酸 (Glu)、還元型グルタチオン (GSH)、およびニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate、NADPH) の相対面積値が、抗体処理から2時間後にいずれも溶媒処理群の相対面積値の2分の1以下に減少した。また、抗体処理から8時間後でも、上記アミノ酸またはアミノ酸代謝物の相対面積値はいずれも溶媒処理群の相対面積値の3分の2以下に減少していた (図1、表1)。

[0088] 上述したように、各アミノ酸またはアミノ酸代謝物質の相対面積値は、該

アミノ酸またはアミノ酸代謝物質の細胞内での濃度を反映している。そのため本結果は、細胞へのKM4008HV2LV3処理により、2時間または8時間のいずれの反応時間においても、細胞内でのグルタミン、グルタミン酸、還元型グルタチオン、およびNADPHの濃度が溶媒処理群と比較して低下していること、つまり抗体処理によって、該アミノ酸またはアミノ酸代謝物質の生合成が抑制されていることを示す。

[0089] 細胞内において、グルタミンはグルタミナーゼによりグルタミン酸に変換され、グルタミン酸は5-L-グルタミルシステインを経てグルタチオンシンターゼによって還元型グルタチオンが合成される。NADPHは、酸化型グルタチオンを還元するための水素供与体である。

[0090] 以上より、KM4008HV2LV3で処理したがん細胞では、細胞内へのグルタミン取り込みが阻害されることで細胞内のグルタミン酸が減少した結果、グルタチオンの合成が抑制されることが示された。さらに、グルタチオンは抗酸化物質であることから、KM4008HV2LV3は、がん細胞のレドックスホメオスタシス（活性酸素消去系）を抑制する、つまり酸化ストレスを促進させることが示された。

[0091] また、KM4008HV2LV3で処理した細胞では、2-オキソグルタル酸（2-Oxoglutaric acid）、コハク酸（Succinic acid）、フマル酸（Fumaric acid）、マレイン酸（Malic acid）、およびアデノシン三リン酸（Adenosine triphosphate、ATP）の相対面積値が、溶媒処理群と比べていずれも抗体処理から2時間後で2分の1以下に、8時間後では5分の4以下に減少した（図1、表1）。

[0092] 上述した代謝物質は、細胞のエネルギーであるATPの産生を担う経路の一部であるTCA回路を構成しており、細胞内においてグルタミン酸はグルタミン酸デヒドロゲナーゼにより2-オキソグルタル酸に酸化的に脱アミノ化されて、2-オキソグルタル酸は、TCA回路の反応に用いられる。

[0093] 以上より、KM4008HV2LV3で処理したがん細胞では、細胞内へ

のグルタミン取り込みが阻害されることで、グルタミン酸減少によるTCA回路の低下が起こり、その結果、細胞のエネルギーであるATPの産生が抑制されることが示された。

[0094] [実施例3]

KM4008HV2LV3添加時の抗体アレイ解析

KM4008HV2LV3による細胞増殖抑制活性の分子メカニズムをより詳細に明らかにするため、生体内での様々なシグナル伝達経路に関するリン酸化タンパク質に対する抗体が多数スポットされた抗体アレイを用いて、癌細胞におけるKM4008HV2LV3添加時の生体内でのシグナル変化を測定した。

[0095] SNU-16を 1×10^5 個/mLの密度で20mLのアッセイ培地に播種し、37℃にて5%CO₂条件下で24時間培養後、KM4008HV2LV3を含む培地（KM4008HV2LV3を含む溶媒液[10mM Sodium L-glutamate, 262mM D-Sorbitol, 0.05mg/mL PS80 (pH5.7)]をアッセイ培地に希釈したもの）を終濃度10μg/mLとなるように、あるいは抗体の溶媒液を同量添加し、2時間または24時間、37℃にて5%CO₂条件下で静置した。

[0096] 細胞の剥離、溶解、タンパク質の抽出、ビオチン化はAntibody Array Assay Kit (Full Moon Biosystems社製 カタログNo. KAS02)を用い、メーカーのプロトコールに従って実施した。ビオチンラベルした70μgのタンパク質を含む細胞抽出液を、メーカーのプロトコールに従ってPhospho Explorer Antibody Array (Full Moon Biosystems社製 カタログNo. PEX100)にハイブリダイズした。アレイ上に結合したビオチン化タンパク質をCy3 Streptavidin (GEヘルスケア社製 カタログNo. PA43001)と反応させ、マイクロアレイスキャナ (Agilent社製 カタログNo. G2565CA)を用いてスキャンし、得られたシグナルの数値化を行った。

[0097] アレイ上には1318種類の抗体が2スポットずつ塗布されており、検出限界を超えるシグナルが2つのスポットの両方で検出できたものを数えると、KM4008HV2LV3を添加して2時間後の細胞では390抗体、24時間後の細胞では419抗体であった。

[0098] その中で、溶媒添加細胞とKM4008HV2LV3添加細胞を比較して2倍以上のシグナル強度の変化が2つのスポットの両方で検出できた抗体は、2時間後で4抗体、24時間後で37抗体であった。KM4008HV2LV3処理から24時間後に溶媒添加細胞とKM4008HV2LV3添加細胞を比較して2倍以上のシグナル強度の変化が2つのスポットの両方で検出できた37抗体のうち、酸化ストレスに関わるcatalase Phospho-Tyr385, Casitas B-lineage Lymphoma (CBL) Phospho-Tyr700, murine double minute 2 (MDM2) Phospho-Ser166のシグナルの変化を図2に示す。

[0099] 上記のシグナルは酸化ストレス時に増加することが報告されており [J. Biol. Chem. 278:29667-29675, 2003、J. Biol. Chem. 282:2288-2296, 2007、Alexa Fluor (登録商標) 647 Mouse anti-c-Cbl (pY700) テクニカルデータシート]、図2の結果より、KM4008HV2LV3添加細胞で酸化ストレスが起きていることが示された。

[0100] また、forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) およびV-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 (Abl1) の発現量の増加もみられており (図2)、これらは酸化ストレスに応答して増加するという報告はないものの、FKHRはcatalaseなどの活性酸素を除去する酵素群の転写誘導を、Abl1はTyr385のリン酸化によるcatalaseの活性化をそれぞれ担っているタンパク質であり (Antioxid Redox Signal. 14 (4):593-605,

2011, J. Biol. Chem. 278:29667-29675, 2003)、これらの増加はKM4008HV2LV3による酸化ストレスの促進とその応答経路の活性化を示すものである。

[0101] 加えて、checkpoint kinase 2 (chk2) Phospho-Thr383, p53, H2A. X Phospho-Ser139, caspase9 Phospho-Tyr153のシグナルも、溶媒処理細胞と比較してKM4008HV2LV3処理細胞で2倍以上の上昇がみられた(図3)。これらはDNAの二重鎖損傷に応答して増加するシグナルであることが知られており(DNA repair 8:1047-1054, 2009, Leukemia 24:679-686, 2010, J. Biol. Chem. 280:11147-11151, 2005)、KM4008HV2LV3添加細胞でDNAの二重鎖損傷が起きていることが示された。

[0102] [実施例4]

KM4008HV2LV3添加時のwestern blotによるDNA損傷解析

実施例3で見られた、DNA二重鎖損傷を示唆するKM4008HV2LV3処理細胞でのH2A. X Phospho-Ser139のシグナル上昇を、western blotにより検出した。一次抗体としてanti-phospho-Histone H2A. X Ser139、clone JBW301 (Millipore カタログNo. 05-636)を、二次抗体としてAnti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (CST カタログNo. 7076)を使用した。

[0103] SNU-16を 2×10^4 個/mLの密度で10mLのアッセイ培地に播種し、37℃にて5% CO₂条件下で24時間培養後、KM4008HV2LV3(終濃度10μg/mL)、抗体の溶媒液、あるいはhydrogen peroxide (H₂O₂)(終濃度50μM)を添加した。細胞を37℃にて5% CO₂条件下で8時間静置した後、浮遊している細胞を培養上

清とともに回収した。

- [0104] 接着している細胞に関してはD-PBS (ー) (ナカライテスク社製 カタログNo. 14249-95) で洗浄後、TrypLE select (Invitrogen社製 カタログNo. 12563-011) を1.5 mL添加し37℃にて5% CO₂条件下で5分間静置することで剥離させ、最初に回収した浮遊細胞と混合して後の操作に用いた。
- [0105] 回収した細胞をD-PBSで洗浄して遠心分離した後、RIPA buffer (タカラバイオ社製 カタログNo. P75682) にprotease inhibitor cocktail (メルク社製 カタログNo. 535142) およびphosphatase inhibitor cocktail (ナカライテスク社製 カタログNo. 07574-61) を1/100量添加した溶液に懸濁して溶解させた。
- [0106] 得られた細胞溶解液を15分間氷上に静置した後15,000rpmで15分間遠心分離し、BCA protein assay kit (Pierce社製 カタログNo. 23225) を用いて得られた上清中のタンパク質濃度を測定した。該細胞溶解液をRIPA bufferで1.2 μg/μLに調製した後、1/5量の試料緩衝液 (SDS-PAGE用, 6倍濃縮, 還元剤含有) (ナカライテスク社製 カタログNo. 09499-14) を添加し100℃で5分間煮沸し、細胞抽出液とした。10 μgのタンパク質を含む細胞抽出液を5-20%のgradient gel (ATTO社製 ePAGE L カタログNo. 2331730) を用いて電気泳動することでタンパク質を分離し、EzBlot (ATTO社製 カタログNo. AE-1460) を用いてPVDFメンブレン (Millipore社製 カタログNo. IPVH304F0) に転写した後、ブロックエース (DSファーマバイオメディカル社製 カタログNo. UK-B40) によりブロッキングを行った。
- [0107] ブロッキング終了後、Can Get Signal (TOYOBO社製 カタログNo. NKB-101) にて調製した一次抗体を反応させ、0.

0.5% Tween-20を添加したTris Buffered Serine (TBS-T)で洗浄後、Can Get Signalで調製した二次抗体を反応させた。TBS-Tで洗浄後、Supersignal West Dura (Thermo Fisher社製 カタログNo. 34075)に浸し、化学発光をルミノイメージアナライザー (Fuji Film社製LAS-3000)を用いて検出した。

[0108] その結果、溶媒処理細胞と比較して、KM4008HV2LV3処理細胞およびH₂O₂処理細胞においてH2A.X Ser139のリン酸化シグナルが増加しており、実施例3と同様、KM4008HV2LV3処理細胞ではDNAの二重鎖損傷が生じていることが示された。

[0109] [実施例5]

KM4008HV2LV3による細胞周期変動

KM4008HV2LV3による細胞増殖抑制の原因としては、G1期での細胞周期の停滞や、細胞死が生じている可能性が考えられた。そのため、細胞をpropidium iodide (PI) 染色し、フローサイトメーターを用いて蛍光強度を測定することで、KM4008HV2LV3処理による細胞周期の変動を評価した。

[0110] SNU-16を 2×10^4 個/mLの密度で10mLのアッセイ培地に播種し37℃にて5% CO₂条件下で培養した。24時間培養後にKM4008HV2LV3を含む培地 (KM4008HV2LV3を含む溶媒液 (10mM Sodium L-glutamate, 262mM D-Sorbitol, 0.05mg/mL PS80 pH5.7) をアッセイ培地で希釈したもの) (終濃度10μg/mL)、同量の抗体の溶媒液、あるいはhydrogen peroxide (WAKO社製 カタログNo. 081-04215) (終濃度50μM) を添加した。

[0111] 24時間培養した後に浮遊している細胞を培養上清とともに回収した。接着している細胞に関してはD-PBS (-) (ナカライテスク社製 カタログNo. 14249-95) で洗浄後、TrypLE select (In

v i t r o g e n 社製 カタログ No. 12563-011) を 1.5 mL 添加し 37℃ にて 5% CO₂ 条件下で 5 分間静置することで回収し、最初に回収した浮遊細胞と混合して後の操作に用いた。

[0112] 細胞を遠心した後 D-PBS (−) で洗浄し、ペレットを 5% D-(+)-g l u c o s e に懸濁後、終濃度が 70% となるように 100% エタノール (ナカライテスク社製 カタログ No. 14713-95) を添加し、−30℃ で固定した。

[0113] 固定後の細胞を D-PBS (−) で 2 度洗浄し、ペレットを P I / R N a s e s t a i n i n g b u f f e r (B D B i o s c i e n c e 社製 カタログ No. 550825) で懸濁し、30 分間暗所に静置した後、フローサイトメーター (B D b i o s c i e n c e 社製、F A C S C a l i b u r) で蛍光強度を測定した。

[0114] 得られたデータを F l o w J o (T r e e S t a r I n c. 社製) で解析した結果を図 4 に示す。図 4 は、横軸の蛍光強度が細胞に含まれる D N A 量を反映しており、蛍光強度 600 付近に見られるピークが、G 2 / M 期の細胞集団を、蛍光強度 300 付近に見られるピークが、G 1 期の細胞集団を示す。また、G 1 期より蛍光強度の低い細胞集団は細胞死を起こしている細胞集団であり、G 1 期と G 2 / M 期の細胞集団を示すピークの間には存在する細胞集団は、S 期の細胞集団である。抗体、溶媒または h y d r o g e n p e r o x i d e 添加時それぞれのヒストグラムについて、上記細胞集団の細胞数を反映しているピークの高さの比をとった。

[0115] その結果、K M 4 0 0 8 H V 2 L V 3 処理細胞は溶媒処理細胞と比較して G 1 期の細胞が多く、S 期および G 2 / M 期の細胞が少ないことが判明し、G 1 期で細胞周期が停滞していることが明らかとなった (図 4) 。また、G 1 期よりも D N A 量が少ない細胞が K M 4 0 0 8 H V 2 L V 3 処理細胞で増加しており、細胞死が起きていることが示された (図 4) 。

[0116] 加えて、G 1 期での細胞周期の停滞をタンパクレベルで確認するため、実施例 4 と同様の方法で w e s t e r n b l o t を行い、p 2 1 のタンパク

量を解析した。p21は、p53などにより発現誘導されcyclinEとcyclin dependent kinase 2 (CDK2)との複合体あるいはcyclinDとcyclin dependent kinase 4/6 (CDK4/6)との複合体と結合してその機能を阻害することにより、S期への進行を妨げる働きを持つことが知られている (Proc Soc Exp Biol Med. 213:138-149, 1996)。

[0117] 一次抗体にはp21 (C19) antibody (Santa Cruz カタログNo. sc-397)、二次抗体にはAnti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (CST カタログNo. 7074)を用いた。western blotを行った結果、KM4008HV2LV3処理細胞では溶媒処理細胞と比較してp21のシグナルが増加しており、細胞周期の解析結果と同じく、G1期で細胞周期が停滞していることが示された。

[0118] [実施例6]

KM4008HV2LV3によって起こる細胞死の解析

実施例5においてKM4008HV2LV3処理細胞では細胞死が生じていることが示されたことから、Annexin Vで細胞を染色し、フローサイトメーターを用いて蛍光強度を測定することで、KM4008HV2LV3処理細胞における細胞死の解析を実施した。

[0119] SNU-16がん細胞を 2×10^4 個/mLの密度で10mLのアッセイ培地に播種し、37℃にて5% CO₂条件下で培養した。24時間培養後に、KM4008HV2LV3を含む培地 (KM4008HV2LV3を含む溶媒液 (10mM Sodium L-glutamate, 262mM D-Sorbitol, 0.05mg/mL PS80 pH5.7) をアッセイ培地で希釈したもの) (終濃度10μg/mL)、抗体の溶媒液、またはhydrogen peroxide (WAKO社製 カタログNo. 081-04215) (終濃度50mM) を添加した。

[0120] 72時間培養した後に浮遊している細胞を培養上清とともに回収した。接着している細胞に関してはD-PBS（－）（ナカライテスク社製 カタログNo. 14249-95）で洗浄後、TrypLE select（Invitrogen社製 カタログNo. 12563-011）を1.5mL添加し37℃にて5% CO₂条件下で5分間静置することで回収し、最初に回収した浮遊細胞と混合して後の操作に用いた。

[0121] 回収した細胞をD-PBS（－）で洗浄後、遠心分離し、沈殿を100μLのAnnexin V Binding Buffer（BD カタログNo. 556454）に懸濁し、5μLのannexin V-FITC（BD社製 カタログNo. 556420）および0.5μLのpropidium iodide（Invitrogen社製 カタログNo. P3566）を添加して暗所に15分間静置した。

[0122] 400μLのannexin V Binding Bufferを添加した後、フローサイトメーター（BD社製 FACS caliber）を用いて蛍光強度を測定した。データの解析にはFlowJo（Tree Star Inc. 社製）を用いた。

[0123] その結果、0.2mMのL-glutamineを含む培地で72時間培養すると、半数程度のSNU-16細胞はannexin V陽性になることが判明した。加えて、KM4008HV2LV3で処理した細胞は溶媒処理した細胞と比較してannexin V陽性細胞の割合が高いことが明らかとなった（図5）。この結果より、KM4008HV2LV3処理によりSNU-16が細胞死を起こしたことが示された。

[0124] [実施例7]

KM4008HV2LV3による細胞増殖の抑制の抗酸化物質による回復

実施例2および3より、KM4008HV2LV3処理細胞では酸化ストレスが生じていることが示されたことから、細胞増殖抑制との因果関係を検証するため、フローサイトメーターを用いて、抗酸化物質N-acetylcysteine（NAC）の添加の有無によるKM4008HV2LV3

処理細胞の増殖の変化を測定した。

- [0125] SNU-16を 2×10^4 個/mLの密度で1 mLのアッセイ培地に播種し、 37°C にて5% CO_2 条件下で24時間培養後、KM4008HV2LV3（終濃度 $10 \mu\text{g/mL}$ ）、抗体の溶媒液、hydrogen peroxide（終濃度 $50 \mu\text{M}$ ）あるいはNAC（Sigma社製 カタログNo. A9165）（終濃度 5mM ）を添加した。48あるいは72時間、 37°C にて5% CO_2 条件下で培養した後、浮遊している細胞を培養上清とともに回収した。
- [0126] 接着している細胞に関してはD-PBS（-）（ナカライテスク社製 カタログNo. 14249-95）で洗浄後、TrypLE select（Invitrogen社製 カタログNo. 12563-011）を1.5 mL添加し 37°C にて5% CO_2 条件下で5分間静置することで回収し、最初に回収した浮遊細胞と混合して後の操作に用いた。
- [0127] 回収した細胞はD-PBS（ナカライテスク カタログNo. 14249-95）による洗浄後、1 mL の3% fetal bovine serum in D-PBSに懸濁し、Flow-Count（Beckman Coulter社製 カタログNo. 7547053）およびpropidium iodide（Invitrogen社製 カタログNo. P3566）を添加し、フローサイトメーター（BD bioscience社製、FACS calibur）を用いて生細胞数の測定を行った。
- [0128] 得られたデータの解析にはFlowJo（Tree Star Inc.社製）を用いた。細胞をfront scatter（FSC）とside scatter（SSC）で展開し、濃度既知のbeadsの数に対する生細胞数の比から、細胞数を計算した。
- [0129] その結果、KM4008HV2LV3処理した細胞は溶媒処理した細胞と比較して細胞増殖が抑制されることを確認した。さらに、KM4008HV2LV3処理による細胞増殖の抑制は、NACの添加により回復することが判明した（図6）。この結果より、KM4008HV2LV3処理による増

殖抑制は、酸化ストレスによって誘導されていることが示された。

[0130] 本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更および変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお、本出願は、2012年10月24日付けで出願された米国仮出願（61／717，703号）に基づいており、その全体が引用により援用される。

配列表フリーテキスト

[0131] 配列番号3－人工配列の説明：A S C T 2 プライマー（F w カタログ N o . 1）の塩基配列

配列番号4－人工配列の説明：A S C T 2 プライマー（R v カタログ N o . 1）の塩基配列

配列番号5－人工配列の説明：A S C T 2－m y c／H i s の塩基配列

配列番号6－人工配列の説明：A S C T 2－m y c／H i s のアミノ酸配列

配列番号7－人工配列の説明：N－A S C T 2 プライマー（カタログ N o . 1）の塩基配列

配列番号8－人工配列の説明：N－A S C T 2 プライマー（カタログ N o . 2）の塩基配列

配列番号9－人工配列の説明：N－A S C T 2 プライマー（カタログ N o . 3）の塩基配列

配列番号10－人工配列の説明：N－A S C T 2 プライマー（カタログ N o . 4）の塩基配列

配列番号11－人工配列の説明：C－A S C T 2－m y c／H i s プライマー（F w カタログ N o . 2）の塩基配列

配列番号12－人工配列の説明：C－A S C T 2－m y c／H i s プライマー（R v カタログ N o . 2）の塩基配列

配列番号13－人工配列の説明：C－A S C T 2－m y c／H i s プライマー（R v カタログ N o . 3）の塩基配列

配列番号14－人工配列の説明：A S C T 2 ペプチド（2－16，C y s）

のアミノ酸配列

配列番号 15 –人工配列の説明：プライマー（m G 3 a 2）の塩基配列

配列番号 16 –人工配列の説明：プライマー（m G 2 b a 1）の塩基配列

配列番号 17 –人工配列の説明：プライマー（m K a 1）の塩基配列

配列番号 38 –人工配列の説明：c K M 4 0 0 8 V H / c K W 4 0 1 2 V H
プライマー（F w）の塩基配列

配列番号 39 –人工配列の説明：c K M 4 0 0 8 V H プライマー（R v）の
塩基配列

配列番号 40 –人工配列の説明：c K M 4 0 0 8 V L / c K M 4 0 1 2 V L
プライマー（F w）の塩基配列

配列番号 41 –人工配列の説明：c K M 4 0 0 8 V L / c K M 4 0 1 2 V L
プライマー（R v）の塩基配列

配列番号 42 –人工配列の説明：c K M 4 0 1 2 V H プライマー（R v）の
塩基配列

配列番号 43 –人工配列の説明：プライマー（r G 2 a）の塩基配列

配列番号 44 –人工配列の説明：プライマー（r K a 2）の塩基配列

配列番号 55 –人工配列の説明：c K M 4 0 1 8 V H プライマー（F w）の
塩基配列

配列番号 56 –人工配列の説明：c K M 4 0 1 8 V H プライマー（R v）の
塩基配列

配列番号 57 –人工配列の説明：c K M 4 0 1 8 V L プライマー（F w）の
塩基配列

配列番号 58 –人工配列の説明：c K M 4 0 1 8 V L プライマー（R v）の
塩基配列

配列番号 59 –人工配列の説明：マウス A S C T 2 –m y c / H i s の塩基
配列

配列番号 60 –人工配列の説明：マウス A S C T 2 –m y c / H i s のアミ
ノ酸配列

配列番号 61－人工配列の説明：マウス A S C T 2－m y c／H i s プライマー（F w）の塩基配列

配列番号 62－人工配列の説明：マウス A S C T 2－m y c／H i s プライマー（R v）の塩基配列

配列番号 63－人工配列の説明：ヒト A S C T 2 N c o l サイト変異導入用プライマー（F w）の塩基配列

配列番号 64－人工配列の説明：ヒト A S C T 2 N c o l サイト変異導入用プライマー（R v）の塩基配列

配列番号 65－人工配列の説明：ヒト A S C T 2 B a m l l l サイト導入用プライマー（F w）の塩基配列

配列番号 66－人工配列の説明：ヒト A S C T 2 B a m l l l サイト導入用プライマー（R v）の塩基配列

配列番号 67－人工配列の説明：マウス A S C T 2 N c o l サイト変異導入用プライマー（F w）の塩基配列

配列番号 68－人工配列の説明：マウス A S C T 2 N c o l サイト変異導入用プライマー（R v）の塩基配列

配列番号 69－人工配列の説明：ヒト A S C T 2 E L 4 マウス型置換用プライマー（F w）の塩基配列

配列番号 70－人工配列の説明：ヒト A S C T 2 E L 4 マウス型置換用プライマー（R v）の塩基配列

配列番号 71－人工配列の説明：K M 4 0 0 8 H V O のアミノ酸配列

配列番号 72－人工配列の説明：K M 4 0 0 8 L V O のアミノ酸配列

配列番号 73－人工配列の説明：K M 4 0 0 8 H V O の塩基配列

配列番号 74－人工配列の説明：K M 4 0 0 8 L V O の塩基配列

配列番号 75－人工配列の説明：H V 2 の塩基配列

配列番号 76－人工配列の説明：H V 2 のアミノ酸配列

配列番号 77－人工配列の説明：H V 4 の塩基配列

配列番号 78－人工配列の説明：H V 4 のアミノ酸配列

配列番号 79－人工配列の説明：HV7の塩基配列

配列番号 80－人工配列の説明：HV7のアミノ酸配列

配列番号 81－人工配列の説明：HV10の塩基配列

配列番号 82－人工配列の説明：HV10のアミノ酸配列

配列番号 83－人工配列の説明：LV3の塩基配列

配列番号 84－人工配列の説明：LV3のアミノ酸配列

配列番号 87－人工配列の説明：HV2合成遺伝子の塩基配列

配列番号 88－人工配列の説明：LV3合成遺伝子の塩基配列

配列番号 89－人工配列の説明：HV10合成遺伝子の塩基配列

請求の範囲

- [請求項1] 中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含む、細胞内酸化ストレス促進剤。
- [請求項2] 前記中性アミノ酸がグルタミンである請求項1記載の細胞内酸化ストレス促進剤。
- [請求項3] 前記モノクローナル抗体が中性アミノ酸トランスポーターの細胞外領域に結合する抗体である、請求項1または2記載の細胞内酸化ストレス促進剤。
- [請求項4] 前記モノクローナル抗体がシステムASCアミノ酸トランスポーター2（ASCT2）の細胞外領域に結合する抗体である、請求項1または2記載の細胞内酸化ストレス促進剤。
- [請求項5] 前記モノクローナル抗体が（A）～（C）から選ばれる1の抗体である、請求項1～4のいずれか1項に記載の細胞内酸化ストレス促進剤。
- （A）抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号26、27および28で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号29、30および31で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。
- （B）抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号32、33および34で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号35、36および37で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。
- （C）抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号49、50および51で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列

番号 5 2、5 3 および 5 4 で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

[請求項6] 前記細胞が癌細胞である、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の細胞内酸化ストレス促進剤。

[請求項7] 中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含み、かつ細胞内の酸化ストレスを促進させることを特徴とする細胞増殖抑制剤。

[請求項8] 前記中性アミノ酸がグルタミンである請求項 7 記載の細胞増殖抑制剤。

[請求項9] 前記モノクローナル抗体が中性アミノ酸トランスポーターの細胞外領域に結合する抗体である、請求項 7 または 8 記載の細胞増殖抑制剤。

[請求項10] 前記モノクローナル抗体が A S C T 2 の細胞外領域に結合する抗体である、請求項 7 または 8 記載の細胞増殖抑制剤。

[請求項11] 前記モノクローナル抗体が (A) ～ (C) から選ばれる 1 の抗体である、請求項 7 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の細胞増殖抑制剤。

(A) 抗体の V H の C D R 1、C D R 2 および C D R 3 が、それぞれ配列番号 2 6、2 7 および 2 8 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体の V L の C D R 1、C D R 2 および C D R 3 が、それぞれ配列番号 2 9、3 0 および 3 1 で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

(B) 抗体の V H の C D R 1、C D R 2 および C D R 3 が、それぞれ配列番号 3 2、3 3 および 3 4 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体の V L の C D R 1、C D R 2 および C D R 3 が、それぞれ配列番号 3 5、3 6 および 3 7 で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

(C) 抗体の V H の C D R 1、C D R 2 および C D R 3 が、それぞれ配列番号 4 9、5 0 および 5 1 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ

、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号52、53および54で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

[請求項12] 前記細胞が癌細胞である、請求項7～11のいずれか1項に記載の細胞増殖抑制剤。

[請求項13] 中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を投与することを含む、細胞内酸化ストレス促進方法。

[請求項14] 前記中性アミノ酸がグルタミンである請求項13記載の方法。

[請求項15] 前記モノクローナル抗体が中性アミノ酸トランスポーターの細胞外領域に結合する抗体である、請求項13記載の方法。

[請求項16] 前記モノクローナル抗体がシステムASCアミノ酸トランスポーター2（ASCT2）の細胞外領域に結合する抗体である、請求項13記載の方法。

[請求項17] 前記モノクローナル抗体が（A）～（C）から選ばれる1の抗体である、請求項13記載の方法。

（A）抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号26、27および28で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号29、30および31で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

（B）抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号32、33および34で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号35、36および37で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

（C）抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号49、50および51で示されるアミノ酸配列を含み、かつ

、抗体のV LのC D R 1、C D R 2およびC D R 3が、それぞれ配列番号5 2、5 3および5 4で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

[請求項18] 前記細胞が癌細胞である、請求項1 3記載の方法。

[請求項19] 中性アミノ酸の細胞内取り込み阻害活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片を投与し、かつ細胞内の酸化ストレスを促進させることを含む、細胞増殖抑制方法。

[請求項20] 前記中性アミノ酸がグルタミンである請求項1 9記載の方法。

[請求項21] 前記モノクローナル抗体が中性アミノ酸トランスポーターの細胞外領域に結合する抗体である、請求項1 9記載の方法。

[請求項22] 前記モノクローナル抗体がA S C T 2の細胞外領域に結合する抗体である、請求項1 9記載の方法。

[請求項23] 前記モノクローナル抗体が(A)～(C)から選ばれる1の抗体である、請求項1 9記載の方法。

(A) 抗体のV HのC D R 1、C D R 2およびC D R 3が、それぞれ配列番号2 6、2 7および2 8で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のV LのC D R 1、C D R 2およびC D R 3が、それぞれ配列番号2 9、3 0および3 1で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

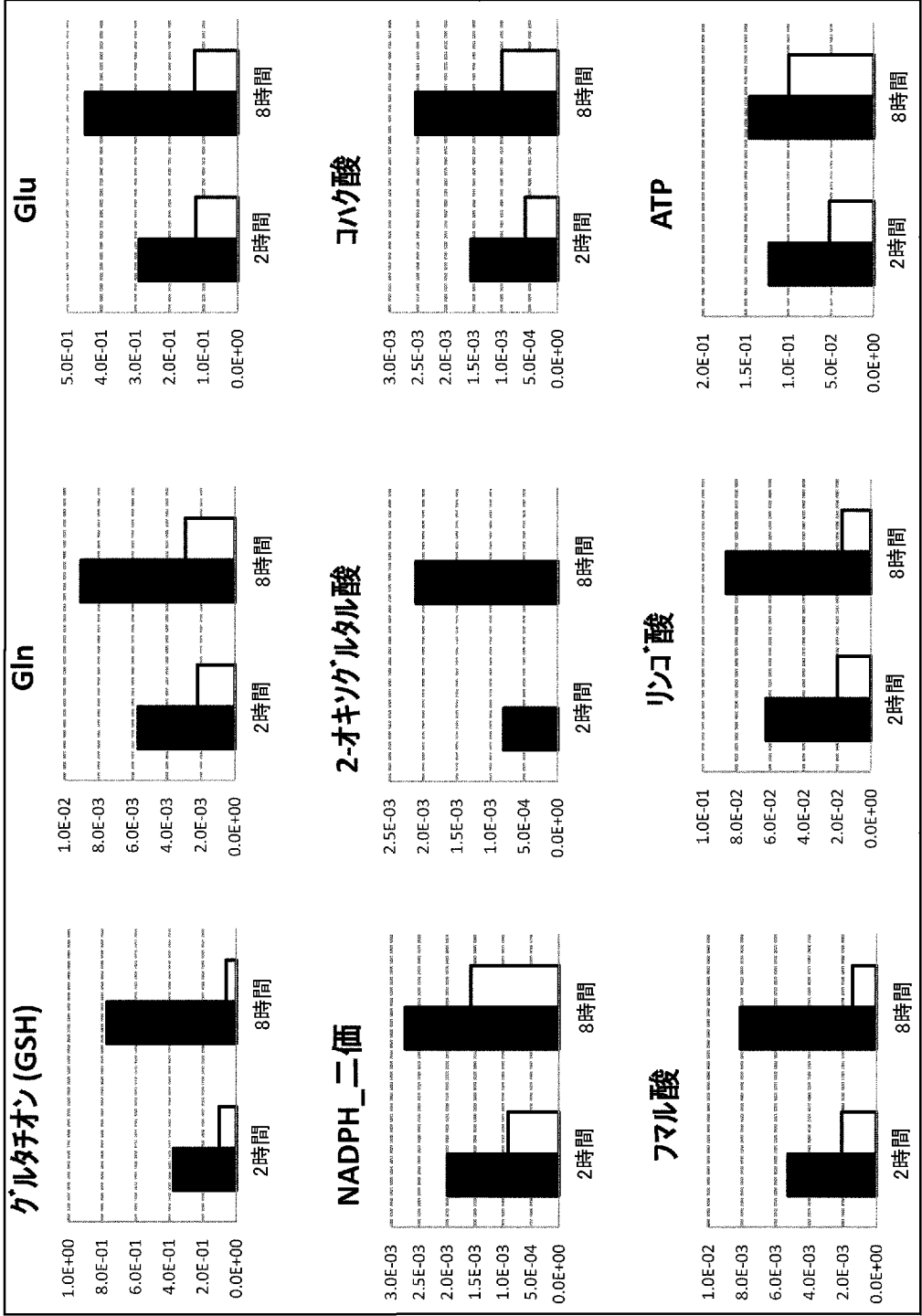
(B) 抗体のV HのC D R 1、C D R 2およびC D R 3が、それぞれ配列番号3 2、3 3および3 4で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のV LのC D R 1、C D R 2およびC D R 3が、それぞれ配列番号3 5、3 6および3 7で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

(C) 抗体のV HのC D R 1、C D R 2およびC D R 3が、それぞれ配列番号4 9、5 0および5 1で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のV LのC D R 1、C D R 2およびC D R 3が、それぞれ配列番号5 2、5 3および5 4で示されるアミノ酸配列を含むモノクロー

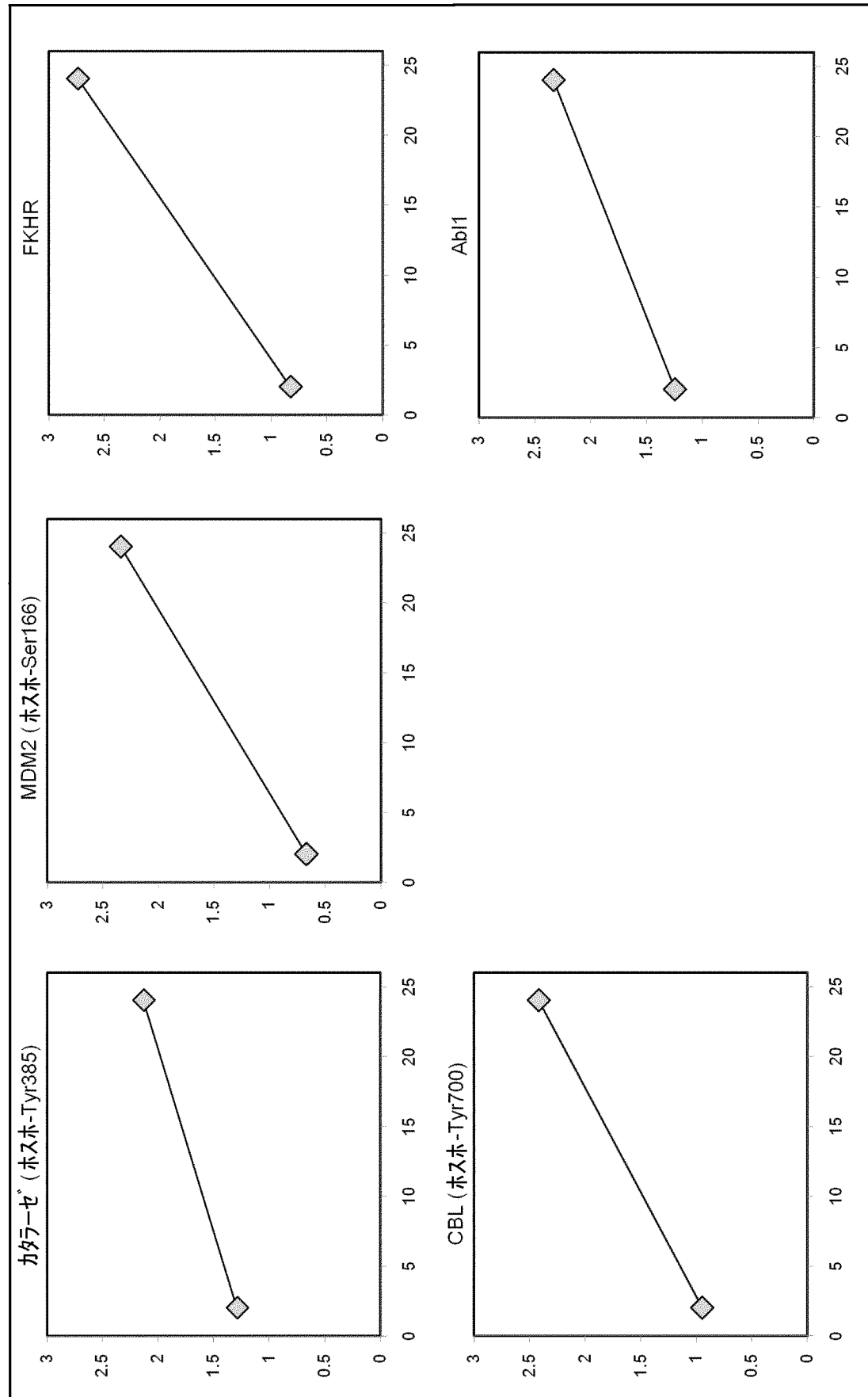
ナル抗体。

[請求項24] 前記細胞が癌細胞である、請求項19記載の方法。

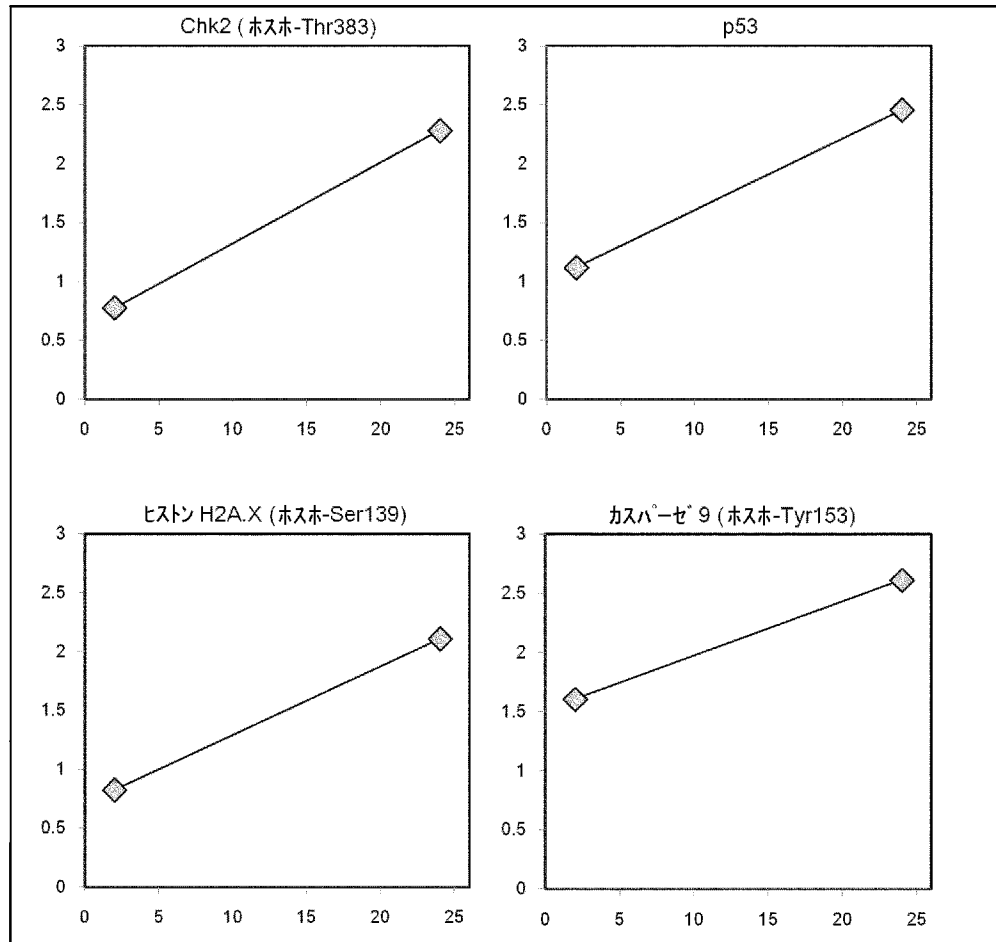
[図1]



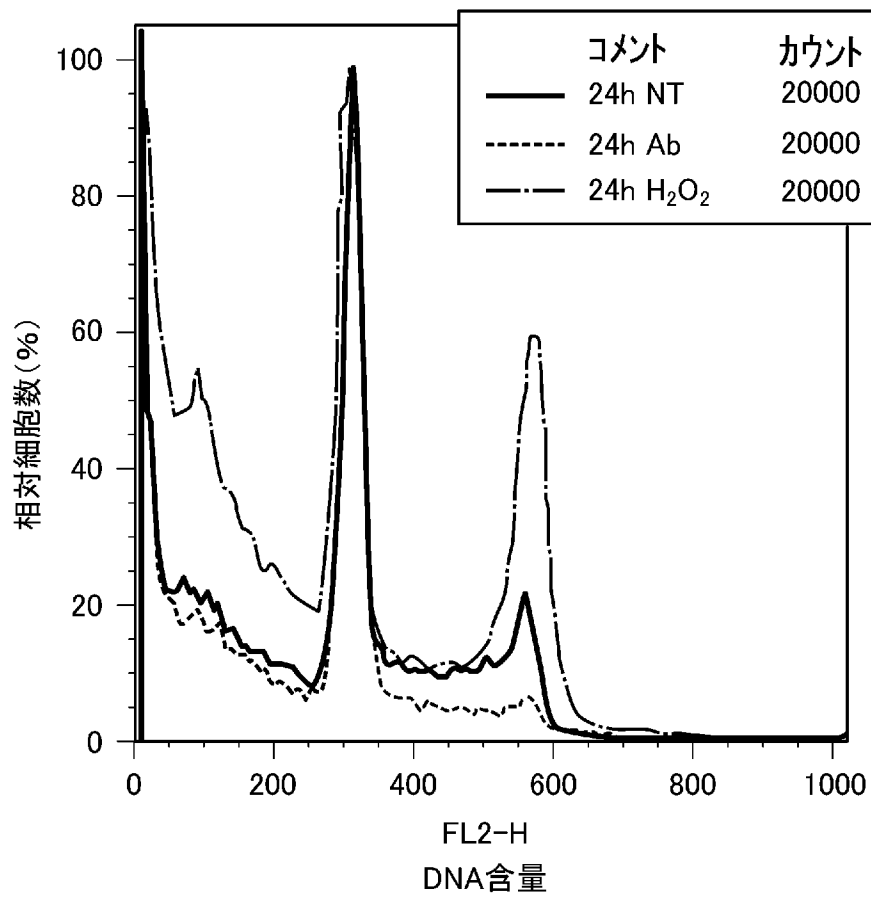
[図2]



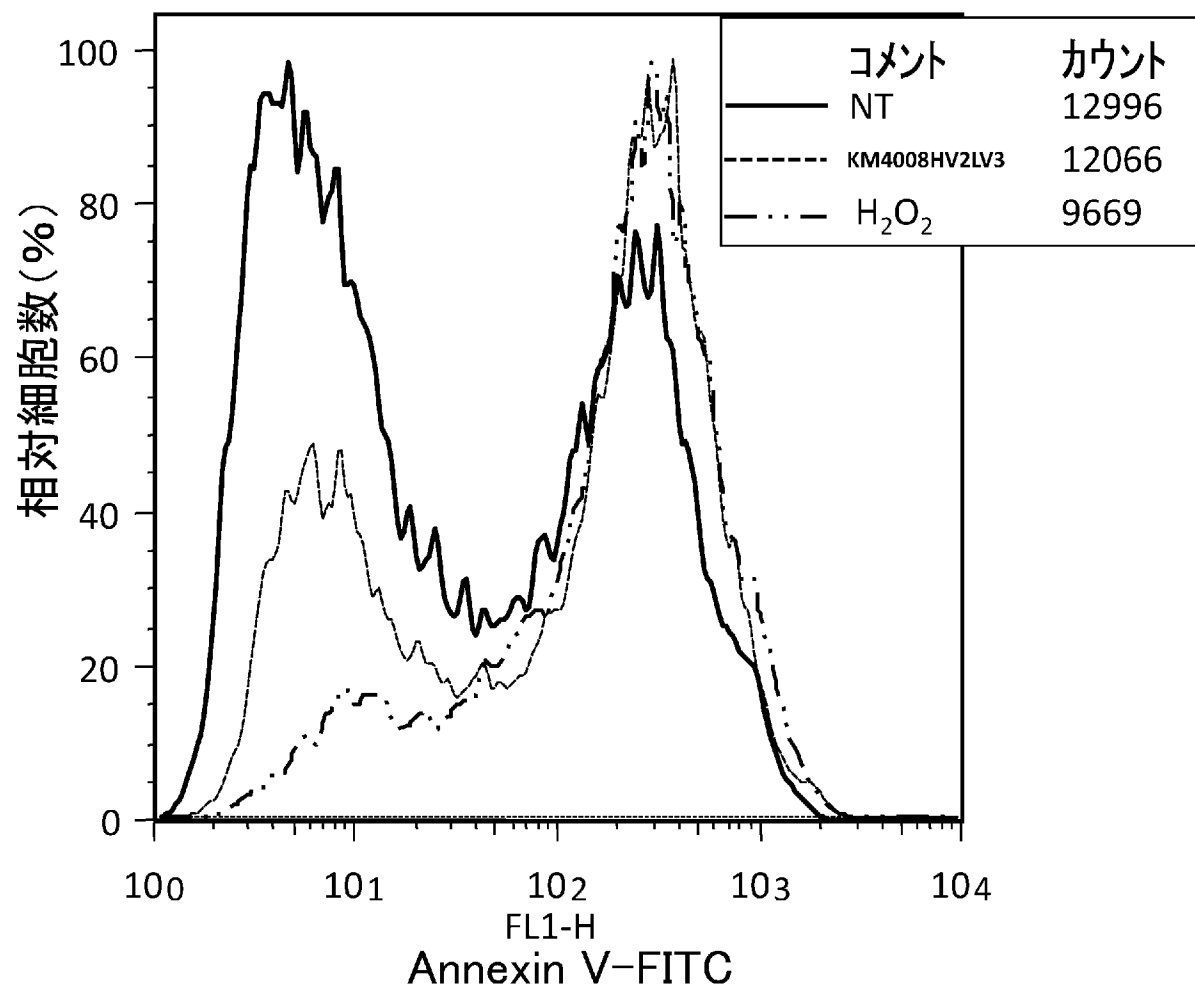
[図3]



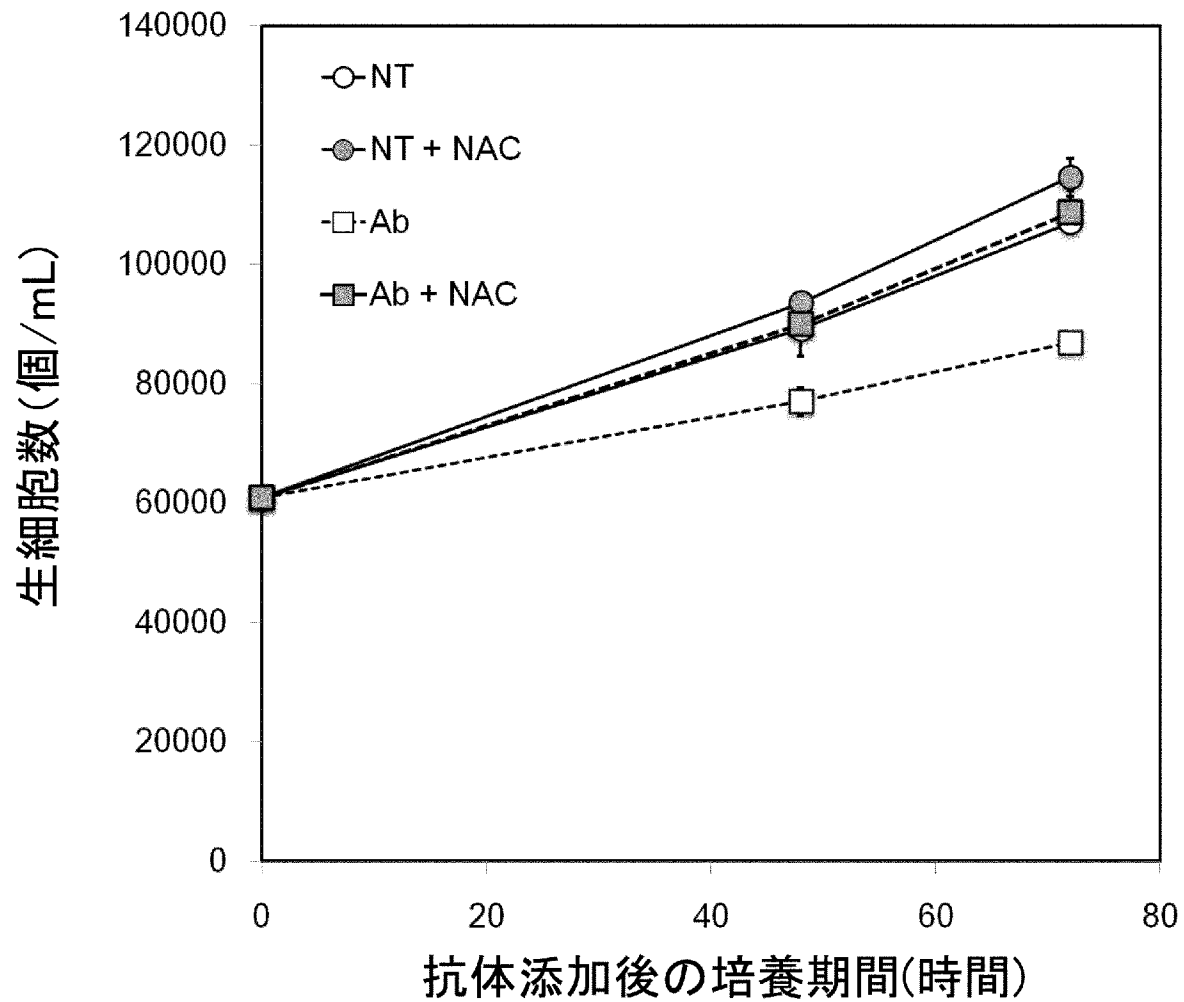
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/078850

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/30(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)

C12N15/00-15/90, C07K14/00-19/00

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

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

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamIII), MEDLINE/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	WO 2011/087091 A1 (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.), 21 July 2011 (21.07.2011), entire text; Problems that the Invention is to solve; Effects of the Invention; examples (particularly, examples 7, 15); claims; drawings & US 2012/0039904 A1 & TW 2011032355 A & KR 2012115511 A & CN 102803294 A & JP 2011-550020 A & US 8501180 B2	<u>7-12</u> 1-6
<u>Y</u> A	TAZUKE Yuko, et al., Protective mechanism of glutamine on the expression of proliferating cell nuclear antigen after cisplatin-induced intestinal mucosal injury., Pediatric surgery international, 2011, Vol.27, No.2, pages 151-158	<u>1-6</u> 7-12



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

"I" 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
05 December, 2013 (05.12.13)

Date of mailing of the international search report
17 December, 2013 (17.12.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/078850

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.: 13-24
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
(See extra sheet)
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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/078850

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

The inventions described in claims 13-24 relate to a method for promoting oxidative stress in a cell and a method for inhibiting the proliferation of a cell, each of which comprises administering a specific antibody, and therefore pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy. Thus, the inventions of these claims relate to a subject matter which this international searching authority is not required, under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/30(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. C12N15/00-15/90, C07K14/00-19/00

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

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(JDreamIII), MEDLINE/WPIDS(STN)

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
<u>X</u> Y	WO 2011/087091 A1(協和発酵キリン株式会社)2011.07.21, 全文、例えば、発明が解決しようとする課題、発明の効果、実施例(特に、実 施例 7&15)、請求の範囲、図面 & US 2012/0039904 A1 & TW 2011032355 A & KR 2012115511 A & CN 102803294 A & JP 2011-550020 A & US 8501180 B2	<u>7-12</u> 1-6
<u>Y</u> A	TAZUKE Yuko, et al., Protective mechanism of glutamine on the expression of proliferating cell nuclear antigen after cisplatin-induced intestinal mucosal injury., Pediatric surgery international, 2011, Vol.27, No.2, pages 151-158	<u>1-6</u> 7-12

☐ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 5 . 1 2 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

1 7 . 1 2 . 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 1 0 0 - 8 9 1 5

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）

清水 晋治

4 B

3 5 3 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

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（PCT第17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 13-24 は、この国際調査機関が調査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 1 3 - 2 4 は、特定の抗体を投与することを含む細胞内酸化ストレス促進方法に係る発明及び細胞増殖抑制方法に係る発明であるところ、手術又は治療による人体の処置方法に該当し、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
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。