

(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
2018年5月17日(17.05.2018)



(10) 国際公開番号
WO 2018/088426 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01) *G01N 33/92* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/040240
- (22) 国際出願日: 2017年11月8日(08.11.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願 2016-217890 2016年11月8日(08.11.2016) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人九州大学 (KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者: 立花 宏文 (TACHIBANA Hirofumi); 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 棚井 澄雄, 外 (TANAI Sumio et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: ANTICANCER AGENT AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 抗癌剤及びその使用

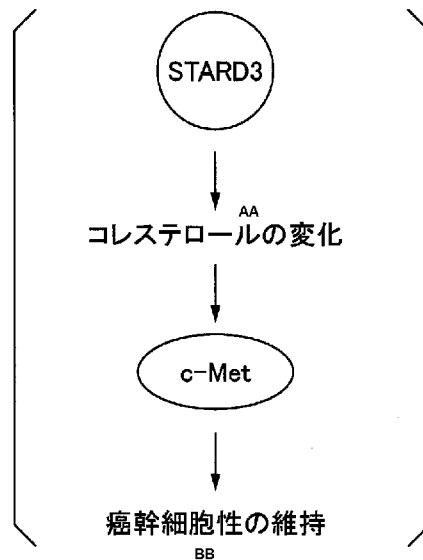
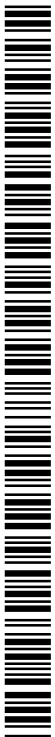


FIG. 29:
AA Cholesterol change
BB Maintenance of stemness of cancer stem cells

(57) Abstract: Provided is an anticancer agent that contains an inhibitor of StAR-related lipid transfer domain containing 3 (STARD3)/cholesterol change/C-Met pathway as an active ingredient.

(57) 要約: StAR-related lipid transfer domain containing 3 (STARD3) /コレステロールの変化/c-Met経路の阻害剤を有効成分として含有する、抗癌剤。



WO 2018/088426 A1

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：抗癌剤及びその使用

技術分野

[0001] 本発明は、抗癌剤及びその使用に関する。より詳細には、抗癌剤、癌治療用医薬組成物及び抗癌剤のスクリーニング方法に関する。本願は、2016年11月8日に、日本に出願された特願2016-217890号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 癌は現代社会における主要な死亡原因の1つである。癌の治療法の開発のために多くの取り組みがなされているが、外科的切除が可能な初期の癌を除き、依然として治癒が困難な場合が多い。特に、メラノーマ（悪性黒色腫）、トリプルネガティブ乳癌、肝臓癌は予後が悪く、その治療法の開発が求められている。

[0003] 手術不能な癌の多くは、化学療法又は放射線療法で治療される。しかしながら、腫瘍細胞を完全に排除することは極めて難しく、多くの場合、治療抵抗性細胞が出現し、再発してしまう。

[0004] 癌の再発や転移の原因として近年提唱されているのが、癌幹細胞仮説である（例えば、非特許文献1を参照）。癌幹細胞仮説では、腫瘍組織中にも、正常組織と同様な幹細胞が存在し、それらは自己を複製する能力を持つとともに、少数存在するだけで元の腫瘍組織と同様の腫瘍を形成する能力を有すると考えられている。そして、癌幹細胞は抗癌剤や放射線への抵抗性を有するため、治療の際に残存しやすく、再発や転移の原因となっていると考えられている。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Viale A., et al., Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function, Nature, 514 (7524), 6

28-632, 2014.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] このような背景のもと、癌幹細胞にも有効であり、再発や転移のリスクが少ない癌治療法の確立が求められている。そこで、本発明は、新たな抗癌剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明は以下の態様を含む。

[1] S t A R - r e l a t e d l i p i d t r a n s f e r d o m a i n c o n t a i n i n g 3 (S T A R D 3) / コレステロールの変化 / c - M e t 経路の阻害剤を有効成分として含有する、抗癌剤。

[2] S T A R D 3 / コレステロールの変化 / c - M e t 経路の阻害剤が、S T A R D 3 阻害剤、コレステロール動態制御剤又は c - M e t 阻害剤である、[1] に記載の抗癌剤。

[3] S T A R D 3 / コレステロールの変化 / c - M e t 経路の阻害剤が、67 k D a ラミニンレセプター (67 L R) アゴニストである、[1] 又は [2] に記載の抗癌剤。

[4] 前記 67 L R アゴニストがエピガロカテキングレート又はその誘導体である、[1] ~ [3] のいずれか一項に記載の抗癌剤。

[5] 前記癌が、メラノーマ、乳癌又は肝臓癌である、[1] ~ [4] のいずれかに記載の抗癌剤。

[6] 前記乳癌が、トリプルネガティブ乳癌である、[5] に記載の抗癌剤。

[7] 癌幹細胞阻害剤である、[1] ~ [6] のいずれかに記載の抗癌剤。

[8] 癌転移抑制剤である、[1] ~ [7] のいずれかに記載の抗癌剤。

[9] [1] ~ [8] のいずれかに記載の抗癌剤と薬学的に許容される担体とを含有する、癌治療用医薬組成物。

[10] 被験物質の存在下で、細胞中の S T A R D 3 の発現量を測定する工

程と、S T A R D 3の発現量が前記被験物質の非存在下における発現量と比較して低下していた場合に、前記被験物質は抗癌剤であると判断する工程と、を備える、抗癌剤のスクリーニング方法。

[11] 被験物質の存在下で、S T A R D 3の活性を測定する工程と、S T A R D 3の活性が前記被験物質の非存在下における活性と比較して低下していた場合に、前記被験物質は抗癌剤であると判断する工程と、を備える、抗癌剤のスクリーニング方法。

[12] 被験物質の存在下で、細胞中のコレステロールの存在量を測定する工程と、コレステロールの存在量が前記被験物質の非存在下における存在量と比較して低下していた場合に、前記被験物質は抗癌剤であると判断する工程と、を備える、抗癌剤のスクリーニング方法。

[13] 被験物質の存在下で、細胞中のc-Me tの発現量を測定する工程と、c-Me tの発現量が前記被験物質の非存在下における発現量と比較して低下していた場合に、前記被験物質は抗癌剤であると判断する工程と、を備える、抗癌剤のスクリーニング方法。

[14] 被験物質の存在下で、c-Me tの活性を測定する工程と、c-Me tの活性が前記被験物質の非存在下における活性と比較して低下していた場合に、前記被験物質は抗癌剤であると判断する工程と、を備える、抗癌剤のスクリーニング方法。

[15] 前記癌が、メラノーマ、乳癌又は肝臓癌である、[10]～[14]のいずれかに記載の抗癌剤のスクリーニング方法。

[16] 前記乳癌が、トリプルネガティブ乳癌である、[15]に記載の抗癌剤のスクリーニング方法。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、新たな抗癌剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]実験例1において、Genetic suppressor elements (GSE) 法によりS T A R D 3遺伝子を同定した過程を説明する

図である。

[図2] (a) は、実験例2におけるウエスタンブロットの結果を示す写真である。(b) は、(a) の結果を数値化したグラフである。

[図3] (a) 及び (b) は、それぞれ、実験例3における対照のB16細胞 (Sc r - s h R N A) 及びSTARD3の発現を抑制したB16細胞 (S T A R D 3 - s h R N A) の顕微鏡写真である。(c) は、実験例3における定量PCRの結果を示すグラフである。

[図4] (a) 及び (b) は、実験例4におけるウエスタンブロットの結果を示す写真である。

[図5] (a) 及び (c) は、実験例5におけるスフェロイドアッセイの結果を示す代表的な顕微鏡写真である。(b) 及び (d) は、実験例5におけるスフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。

[図6] (a) は、実験例6における免疫組織染色の結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。(b) は、実験例6の免疫組織染色の結果をまとめたグラフである。

[図7] 実験例7の検討結果を示すグラフである。

[図8] (a) ~ (c) は、実験例8で測定した細胞増殖曲線を示すグラフである。

[図9] (a) は、実験例9における、STARD3の発現を抑制したB16細胞を移植したマウス (S T A R D 3 - s h R N A) 及び対照マウス (S c r - s h R N A) の代表的な写真である。(b) は、実験例9において、各マウスから摘出した腫瘍組織を示す代表的な写真である。(c) は、実験例9における各マウスの腫瘍体積の測定結果を示すグラフである。(d) は、実験例9における各マウスの生存曲線を示すグラフである。

[図10] 実験例10において、各マウスから摘出した肺の写真である。

[図11] 実験例11の検討結果を示すグラフである。

[図12] (a) 及び (b) は、実験例12における測定結果を示すグラフである。

[図13] (a) ~ (c) は、実験例13におけるスフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。

[図14] (a) 及び (c) は、実験例14におけるウエスタンブロットの結果を示す写真である。(b) は、(a) の結果を数値化したグラフである。(d) は、(c) の結果を数値化したグラフである。

[図15] 実験例15におけるスフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。

[図16] 実験例16におけるスフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。

[図17] 実験例17の結果を示すグラフである。

[図18] (a) は、実験例18におけるウエスタンブロットの結果を示す写真である。(b) は、(a) の結果を数値化したグラフである。

[図19] (a) は、実験例19におけるウエスタンブロットの結果を示す写真である。(b) は、(a) の結果を数値化したグラフである。

[図20] (a) は、実験例20におけるウエスタンブロットの結果を示す写真である。(b) は、(a) の結果を数値化したグラフである。

[図21] (a) は、実験例21におけるウエスタンブロットの結果を示す写真である。(b) は、(a) の結果を数値化したグラフである。(c) は、実験例21におけるスフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。

[図22] 実験例22における免疫組織染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

[図23] (a) は、実験例23におけるウエスタンブロットの結果を示す写真である。(b) は、(a) の結果を数値化したグラフである。

[図24] 実験例24におけるスフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。

[図25] (a) は、実験例25において、マウスから摘出した肺の代表的な写真である。(b) は、実験例25における肺転移小結節数の測定結果を示すグラフである。(c) は、実験例25における肺重量の測定結果を示すグラ

フである。(d)は、実験例25におけるAST活性の測定結果を示すグラフである。(e)は、実験例25におけるALT活性の測定結果を示すグラフである。

[図26]実験例26における定量PCRの結果を示すグラフである。

[図27]実験例27におけるウエスタンブロットの結果を示す写真である。

[図28]実験例28におけるスフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。

[図29]発明者らが明らかにしたSTAR D3 / コレステロールの変化 / c-Met 経路の模式図である。

[図30] (a) ~ (c) は、実験例29におけるウエスタンブロットの結果を示す写真及びその結果を数値化したグラフである。

[図31] (a) ~ (c) は、実験例30におけるスフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。

[図32] (a) 及び (b) は、実験例31におけるウエスタンブロットの結果を示す写真及びその結果を数値化したグラフである。

[図33]実験例32におけるスフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。

[図34] (a) は、実験例33におけるウエスタンブロットの結果を示す写真である。(b) 及び (c) は、(a) の結果を数値化したグラフである。

[図35]実験例34におけるスフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。

[図36] (a) は、実験例35におけるウエスタンブロットの結果を示す写真である。(b) 及び (c) は、(a) の結果を数値化したグラフである。

発明を実施するための形態

[0010] [抗癌剤]

1 実施形態において、本発明は、STAR D3 / コレステロールの変化 / c-Met 経路の阻害剤を有効成分として含有する、抗癌剤を提供する。

[0011] 実施例において後述するように、発明者らは、癌幹細胞が癌幹細胞性を維

持する新たな機構を明らかにした。図29は、発明者らが明らかにした癌幹細胞性の維持経路である、STAR D 3 / コレステロールの変化 / c - M e t 経路の模式図である。

[0012] 図29に示すように、STAR D 3の発現が上昇すると、STAR D 3が発現していない場合と比較して、コレステロールに変化が生じる。ここで、コレステロールの変化とは、コレステロールの細胞内局在の変化、細胞内コレステロール量の存在量の変化等のコレステロールの動態の変化が挙げられる。コレステロールの変化に伴い、c - M e tの発現が上昇し、更にc - M e tが活性化される。その結果、細胞の癌幹細胞性が維持される。

[0013] ここで、STAR D 3は、コレステロール輸送に関わる膜タンパク質の一種である。ヒトSTAR D 3のmRNAのRefSeq IDはNM_001165937、NM_001165938、NM_006804等であり、マウスSTAR D 3のmRNAのRefSeq IDはNP_067522、NM_021547等である。

[0014] また、c - M e tは肝細胞増殖因子(HGF)の受容体である。ヒトc - M e tのmRNAのRefSeq IDはNM_000245、NM_001127500、NM_001324401等であり、マウスc - M e tのmRNAのRefSeq IDはNM_008591等である。

[0015] 実施例において後述するように、STAR D 3 / コレステロールの変化 / c - M e t経路を阻害することにより、癌細胞の増殖を抑制することができる。また、癌幹細胞の機能を阻害することができる。

[0016] より詳細には、癌細胞におけるSTAR D 3の活性を阻害するか、癌細胞にコレステロール動態制御剤を作用させると、c - M e tの発現量が低下する。その結果、癌幹細胞マーカーである、Oct-4、CD271、JARID1B等の発現量が低下し、癌細胞の増殖が抑制され、癌幹細胞の機能も阻害される。

[0017] したがって、本実施形態の抗癌剤は、癌幹細胞阻害剤、癌転移抑制剤等といかえることもできる。

- [0018] 本実施形態の抗癌剤が治療の対象とする癌は、特に限定されず、メラノーマ、乳癌、肝臓癌等であってもよい。また、本実施形態の抗癌剤が治療の対象とする乳癌は、トリプルネガティブ乳癌であってもよい。なお、トリプルネガティブ乳癌は、エストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PgR）、HER2が全て陰性である乳癌である。
- [0019] メラノーマ、トリプルネガティブ乳癌、肝臓癌は、予後が悪く、有効な治療剤が求められている。これに対し、実施例において後述するように、本実施形態の抗癌剤は、これらの癌を効果的に治療することができ、再発や転移のリスクを低減することができる。また、実施例において後述するように、本実施形態の抗癌剤は、メラノーマ幹細胞、乳癌幹細胞、肝臓癌幹細胞の機能を抑制することができる。乳癌幹細胞は、トリプルネガティブ乳癌の癌幹細胞であってもよい。
- [0020] 本明細書において、癌幹細胞阻害剤とは、癌幹細胞の機能を阻害する物質を意味する。癌幹細胞の機能とは、少数存在するだけで元の腫瘍組織と同様の腫瘍を形成する機能であるといえることができる。癌幹細胞の機能は、実施例において後述する、スフェロイドアッセイ、癌の転移能の測定等により測定することができる。すなわち、癌幹細胞の機能とは、スフェロイドを形成する機能、癌を転移させる機能等といえることができる。また、本明細書において、癌幹細胞の機能のことを癌幹細胞性という場合がある。また、細胞が癌幹細胞の機能を有することを、細胞が癌幹細胞性を有するという場合がある。
- [0021] 実施例において後述するように、本実施形態の抗癌剤を投与することにより、細胞レベルにおいて、癌細胞の増殖を抑制すること、スフェロイド形成能を抑制すること等ができる。また、生体レベルにおいて、腫瘍体積の増加、癌の転移等を抑制することができる。
- [0022] 本明細書において、癌幹細胞とは、癌幹細胞マーカーを高発現している癌細胞であるということもできる。ここで、癌幹細胞マーカーとしては、Oct-4、CD271、JARID1B等が挙げられる。癌幹細胞マーカーを

高発現しているとは、対照細胞と比較して癌幹細胞マーカーの発現量がより高いことを意味する。対照細胞としては正常細胞等が挙げられる。あるいは、癌幹細胞とは、スフェロイド形成能を有する細胞、インビボにおいて転移して腫瘍を形成する能力を有する細胞であるということもできる。

[0023] 本実施形態の抗癌剤において、STARD3／コレステロールの変化／c-Met経路の阻害剤は、STARD3阻害剤であってもよいし、コレステロール動態制御剤であってもよいし、c-Met阻害剤であってもよい。また、コレステロール動態制御剤としては、コレステロールの局在を変化させる物質、コレステロールの存在量を変化させる物質等が挙げられ、例えば、コレステロール輸送阻害剤、コレステロール合成阻害剤、ステロイドの代謝に関与する酵素の阻害剤等が挙げられる。本実施形態の抗癌剤において、コレステロール動態制御剤は、細胞内のコレステロールの動態を変化させることにより、c-Metの活性化を抑制する物質であることが好ましい。

[0024] コレステロール輸送阻害剤としては、例えばU-18666A（CAS番号：3039-71-2）等が挙げられる。コレステロール合成阻害剤としては、例えばU-18666A（CAS番号：3039-71-2）、フルバスタチン（CAS番号：93957-55-2）等が挙げられる。ステロイドの代謝に関与する酵素の阻害剤としては、例えばフィナステリド（CAS番号：98319-26-7）等が挙げられる。

[0025] 本実施形態の抗癌剤において、STARD3阻害剤は、STARD3の発現阻害剤であってもよいし、STARD3の活性を抑制する物質であってもよい。また、c-Met阻害剤は、c-Metの発現阻害剤であってもよいし、c-Metのリン酸化レベルを低下させる物質等であってもよい。

[0026] STARD3又はc-Metの発現阻害剤としては、例えば、siRNA、shRNA、miRNA、リボザイム、アンチセンス核酸、低分子化合物等が挙げられる。

[0027] siRNA (small interfering RNA) は、RNA干渉による遺伝子サイレンシングのために用いられる21~23塩基対の低

分子2本鎖RNAである。細胞内に導入されたsiRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)と結合する。この複合体はsiRNAと相補的な配列を持つmRNAに結合し切断する。これにより、配列特異的に遺伝子の発現を抑制する。

[0028] siRNAは、センス鎖及びアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドをDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、例えば、適当なアニーリング緩衝液中、90～95℃で約1分程度変性させた後、30～70℃で約1～8時間アニーリングさせることにより調製することができる。

[0029] shRNA(short hairpin RNA)は、RNA干渉による遺伝子サイレンシングのために用いられるヘアピン型のRNA配列である。shRNAは、ベクターによって細胞に導入し、U6プロモーター又はH1プロモーターで発現させてもよいし、shRNA配列を有するオリゴヌクレオチドをDNA/RNA自動合成機で合成し、siRNAと同様の方法によりセルフアニーリングさせることにより調製してもよい。細胞内に導入されたshRNAのヘアピン構造は、siRNAへと切断され、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)と結合する。この複合体はsiRNAと相補的な配列を持つmRNAに結合し切断する。これにより、配列特異的に遺伝子の発現を抑制する。

[0030] miRNA(microRNA、マイクロRNA)は、ゲノム上にコードされ、多段階的な生成過程を経て最終的に約20塩基の微小RNAとなる機能性核酸である。miRNAは、機能性のncRNA(non-coding RNA、非コードRNA：タンパク質に翻訳されないRNAの総称)に分類されており、他の遺伝子の発現を調節するという、生命現象において重要な役割を担っている。特定の塩基配列を有するmiRNAを生体に投与することにより、STAR3の発現を阻害することができる。

[0031] リボザイムは、触媒活性を有するRNAである。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、RNAを切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNAの部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能と

なっている。リボザイムは、グループ I イントロン型、RNase P に含まれる M1 RNA 等の 400 ヌクレオチド以上の大きさのものであってもよく、ハンマーヘッド型、ヘアピン型等と呼ばれる 40 ヌクレオチド程度のものであってもよい。

[0032] アンチセンス核酸は、標的配列に相補的な核酸である。アンチセンス核酸は、三重鎖形成による転写開始阻害、RNA ポリメラーゼによって局部的に開状ループ構造が形成された部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつある RNA とのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエクソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNA とのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNA の翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制等により、標的遺伝子の発現を抑制することができる。

[0033] siRNA、shRNA、miRNA、リボザイム及びアンチセンス核酸は、安定性や活性を向上させるために、種々の化学修飾を含んでもよい。例えば、ヌクレアーゼ等の加水分解酵素による分解を防ぐために、リン酸残基を、例えば、ホスホロチオエート(PS)、メチルホスホネート、ホスホジチオネート等の化学修飾リン酸残基に置換してもよい。また、少なくとも一部をペプチド核酸(PNA)等の核酸類似体により構成してもよい。

[0034] また、上述したように、本実施形態の抗癌剤は、STARD3又はc-Metの活性を抑制する物質であってもよい。STARD3又はc-Metの活性を抑制する物質としては、例えば、STARD3に対する特異的結合物質、c-Metに対する特異的結合物質等が挙げられる。

[0035] ここで、特異的結合物質としては、抗体、抗体断片、アプタマー、低分子化合物等が挙げられる。抗体は、例えば、マウス等の動物に、STAR D 3タンパク質又はその断片を抗原として免疫することによって作製することができる。あるいは、例えば、ファージライブラリーのスクリーニングにより作製することができる。抗体断片としては、Fv、Fab、scFv等が挙げられる。上記の抗体は、モノクローナル抗体であることが好ましい。また、市販の抗体であってもよい。

[0036] アプタマーとは、標的物質に対する特異的結合能を有する物質である。アプタマーとしては、核酸アプタマー、ペプチドアプタマー等が挙げられる。標的物質に特異的結合能を有する核酸アプタマーは、例えば、systematic evolution of ligand by exponential enrichment (SELEX) 法等により選別することができる。また、標的物質に特異的結合能を有するペプチドアプタマーは、例えば酵母を用いたTwo-hybrid法等により選別することができる。

[0037] (67kDaラミニンレセプターアゴニスト)

ところで、発明者らは、以前に、癌細胞では67kDaラミニンレセプター(以下、「67LR」という場合がある。)の発現が亢進している場合があり、67LRアゴニストが67LRに結合すると、Aktが活性化され、内皮性一酸化窒素合成酵素(eNOS)が活性化され、一酸化窒素(NO)及びcGMPの産生が誘導され、タンパク質キナーゼC δ (PKC δ)が活性化され、産生スフィンゴミエリナーゼ(ASM)が活性化され、その結果、細胞死が誘導されること等を明らかにしてきた。

[0038] 実施例において後述するように、発明者らは、癌細胞に67LRアゴニストを作用させると、STAR D 3の発現が低下し、c-Metの発現が低下し、c-Metのリン酸化レベルが低下することを明らかにした。発明者らはまた、癌細胞に67LRアゴニストを作用させると、癌幹細胞の機能が阻害されることを明らかにした。

[0039] したがって、67LRアゴニストはSTARD3阻害剤であるということができる。あるいは、67LRアゴニストはSTARD3発現阻害剤であるということができる。あるいは、67LRアゴニストはc-Met阻害剤であるということができる。あるいは、67LRアゴニストはc-Met発現阻害剤であるということができる。あるいは、67LRアゴニストはc-Met経路の阻害剤（c-Metシグナリングの阻害剤）であるということができる。あるいは、67LRアゴニストはSTARD3／コレステロールの変化／c-Met経路の阻害剤であるということができる。

[0040] 67LRアゴニストとしては、緑茶に含まれる主要なカテキンの一種であるエピガロカテキンガレート（Epigallocatechin-O-gallate、以下、「EGCG」という場合がある。）、例えばメチル化EGCG等のEGCG誘導体、ウーロン茶重合ポリフェノール、ウーロン茶重合ポリフェノール誘導体、プロシアニジン、抗67LR抗体（67LRアゴニスト抗体）等が挙げられる。

[0041] ウーロン茶重合ポリフェノールとは、半発酵というウーロン茶の独特の製造方法において、酵素反応や熱重合反応により形成される、カテキン類が複雑に結合した化合物の総称であり、例えばカテキン類の2量体、カテキン類の3量体等が挙げられる。カテキン類の2量体としては、例えば、ウーロンホモビスフラバンA、モノデスガロイルウーロンホモビスフラバンA、ウーロンホモビスフラバンB、ウーロンホモビスフラバンC等のウーロンホモビスフラバン類等が挙げられる。

[0042] [癌治療用医薬組成物]

1実施形態において、本発明は、上述した抗癌剤と薬学的に許容される担体とを含有する、癌治療用医薬組成物を提供する。本実施形態の医薬組成物は、癌幹細胞阻害用医薬組成物、癌転移抑制用医薬組成物等とイイかえることもできる。

[0043] 上記の医薬組成物は、例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤等の形態で経口的に、あるいは、注射剤、坐剤、皮膚外用剤等

の形態で非経口的に投与することができる。皮膚外用剤としては、より具体的には、軟膏剤、貼付剤等の剤型が挙げられる。

[0044] 薬学的に許容される担体としては、通常医薬組成物の製剤に用いられるものを特に制限なく用いることができる。より具体的には、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴム等の結合剤；デンプン、結晶性セルロース等の賦形剤；アルギン酸等の膨化剤；水、エタノール、グリセリン等の注射剤用溶剤；ゴム系粘着剤、シリコーン系粘着剤等の粘着剤等が挙げられる。

[0045] 医薬組成物は添加剤を含んでいてもよい。添加剤としては、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤；ショ糖、乳糖、サッカリン、マルチトール等の甘味剤；ペパーミント、アカモノ油等の香味剤；ベンジルアルコール、フェノール等の安定剤；リン酸塩、酢酸ナトリウム等の緩衝剤；安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等の溶解補助剤；酸化防止剤；防腐剤等が挙げられる。

[0046] 医薬組成物は、上述した抗癌剤、薬学的に許容される担体及び添加剤を適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することができる。

[0047] 医薬組成物の投与量は、患者の症状、体重、年齢、性別等によって異なり、一概には決定できないが、経口投与の場合には、例えば、投与単位形態あたり0.1～100mg/kg体重の有効成分（抗癌剤）を投与すればよい。また、注射剤の場合には、例えば、投与単位形態あたり0.01～50mgの有効成分を投与すればよい。

[0048] また、医薬組成物の1日あたりの投与量は、患者の症状、体重、年齢、性別等によって異なり、一概には決定できないが、例えば、成人1日あたり0.1～100mg/kg体重の有効成分を1日1回又は2～4回程度に分けて投与すればよい。

[0049] [抗癌剤のスクリーニング方法]
(第1実施形態)

1 実施形態において、本発明は、被験物質の存在下で、細胞中の S T A R D 3 の発現量を測定する工程と、S T A R D 3 の発現量が前記被験物質の非存在下における発現量と比較して低下していた場合に、前記被験物質は抗癌剤であると判断する工程と、を備える、抗癌剤のスクリーニング方法を提供する。本実施形態のスクリーニング方法は、癌幹細胞阻害剤又は癌転移抑制剤のスクリーニング方法であるということもできる。

[0050] 本実施形態のスクリーニング方法において、細胞としては、例えば癌細胞株を用いることができる。細胞は癌幹細胞であるか、癌幹細胞を含んでいてもよい。ここで、癌幹細胞は上述したものと同様であり、例えば、O c t - 4、C D 2 7 1、J A R I D 1 B 等の癌幹細胞マーカーを高発現している癌細胞であってもよい。あるいは、スフェロイド形成能を有する細胞であってもよい。また、被験物質としては、特に制限されず、例えば化合物ライブラリー等を用いることができる。

[0051] 本実施形態のスクリーニング方法において、S T A R D 3 の発現量は、例えばマイクロアレイ、リアルタイム P C R 等により遺伝子レベルで測定してもよく、E L I S A、プロテインチップ、ウエスタンブロット等によりタンパク質レベルで測定してもよい。

[0052] 実施例において後述するように、S T A R D 3 の発現量を低下させる物質は、インビボ及びインビトロにおいて、癌細胞の増殖を抑制することができる。また、癌幹細胞の機能を阻害することができる。

[0053] 本実施形態のスクリーニング方法により得られる抗癌剤が治療の対象とする癌は、特に限定されず、メラノーマ、乳癌、肝臓癌等であってもよい。また、上記の乳癌は、トリプルネガティブ乳癌であってもよい。

[0054] 現在、癌幹細胞維持機構としては、W n t / β -c a t e n i n 経路、H e d g e h o g 経路、N o t c h 経路等が知られている。しかしながら、これらの因子をノックアウトしたマウスはいずれも胎生致死であることが知られている。したがって、これらの因子は正常幹細胞においても重要な機能を有していると考えられる。

[0055] これに対し、STARD3ノックアウトマウスは、高脂肪食を与えた場合にコレステロールエステルをやや蓄積しやすいものの、生存期間、発癌、体重において野生型マウスとの相違が認められない。このため、STARD3は比較的安全な創薬ターゲットであるといえる。

[0056] (第2実施形態)

1実施形態において、本発明は、被験物質の存在下で、STARD3の活性を測定する工程と、STARD3の活性が前記被験物質の非存在下における活性と比較して低下していた場合に、前記被験物質は抗癌剤であると判断する工程と、を備える、抗癌剤のスクリーニング方法を提供する。本実施形態のスクリーニング方法は、癌幹細胞阻害剤又は癌転移抑制剤のスクリーニング方法であるということもできる。

[0057] 本実施形態のスクリーニング方法によれば、STARD3阻害剤をスクリーニングすることができる。本実施形態のスクリーニング方法は、細胞レベルで行ってもよく、非細胞レベル(試験管レベル)で行ってもよい。細胞を用いる場合には、上述した第1実施形態のスクリーニング方法におけるものと同様の細胞を用いることができる。また、被験物質としては、特に制限されず、例えば化合物ライブラリー等を用いることができる。

[0058] STARD3の活性を低下させる物質は、インビボ及びインビトロにおいて、癌細胞の増殖を抑制することができる。また、癌幹細胞の機能を阻害することができる。

[0059] 本実施形態のスクリーニング方法により得られる抗癌剤が治療の対象とする癌は、特に限定されず、メラノーマ、乳癌、肝臓癌等であってもよい。また、上記の乳癌は、トリプルネガティブ乳癌であってもよい。

[0060] (第3実施形態)

1実施形態において、本発明は、被験物質の存在下で、細胞中のコレステロールの存在量を測定する工程と、コレステロールの存在量が前記被験物質の非存在下における存在量と比較して低下していた場合に、前記被験物質は抗癌剤であると判断する工程と、を備える、抗癌剤のスクリーニング方法を

提供する。本実施形態のスクリーニング方法は、癌幹細胞阻害剤又は癌転移抑制剤のスクリーニング方法であるということもできる。

[0061] 実施例において後述するように、STAR D 3の発現を抑制した癌細胞は、増殖が抑制されており、癌幹細胞の機能が抑制されており、コレステロールの存在量が減少していた。また、コレステロール動態制御剤を作用させた癌細胞では、癌幹細胞の機能が抑制されていた。

[0062] 本実施形態のスクリーニング方法において、細胞としては、例えば癌細胞株を用いることができる。細胞は癌幹細胞であるか、癌幹細胞を含んでいてもよい。ここで、癌幹細胞は上述したものと同様であり、例えば、Oct 4、CD 2 7 1、JAR I D 1 B等の癌幹細胞マーカーを高発現している癌細胞であってもよい。あるいは、スフェロイド形成能を有する細胞であってもよい。また、被験物質としては、特に制限されず、例えば化合物ライブラリー等を用いることができる。

[0063] 本実施形態のスクリーニング方法により得られる抗癌剤が治療の対象とする癌は、特に限定されず、メラノーマ、乳癌、肝臓癌等であってもよい。また、上記の乳癌は、トリプルネガティブ乳癌であってもよい。

[0064] (第4実施形態)

1実施形態において、本発明は、被験物質の存在下で、細胞中のc-Metの発現量を測定する工程と、c-Metの発現量が前記被験物質の非存在下における発現量と比較して低下していた場合に、前記被験物質は抗癌剤であると判断する工程と、を備える、抗癌剤のスクリーニング方法を提供する。本実施形態のスクリーニング方法は、癌幹細胞阻害剤又は癌転移抑制剤のスクリーニング方法であるということもできる。

[0065] 本実施形態のスクリーニング方法において、細胞としては、上述した第1実施形態のスクリーニング方法におけるものと同様の細胞を用いることができる。また、被験物質としては、上述した第1実施形態のスクリーニング方法におけるものと同様のものを用いることができる。

[0066] 本実施形態のスクリーニング方法において、c-Metの発現量は、例え

ばマイクロアレイ、リアルタイムPCR等により遺伝子レベルで測定してもよく、ELISA、プロテインチップ、ウエスタンブロット等によりタンパク質レベルで測定してもよい。

[0067] 実施例において後述するように、c-Metの発現量を低下させる物質は、癌細胞の増殖を抑制することができる。また、癌幹細胞の機能を阻害することができる。

[0068] 本実施形態のスクリーニング方法により得られる抗癌剤が治療の対象とする癌は、特に限定されず、メラノーマ、乳癌、肝臓癌等であってもよい。また、上記の乳癌は、トリプルネガティブ乳癌であってもよい。

[0069] (第5実施形態)

1実施形態において、本発明は、被験物質の存在下で、c-Metの活性を測定する工程と、c-Metの活性が前記被験物質の非存在下における活性と比較して低下していた場合に、前記被験物質は抗癌剤であると判断する工程と、を備える、抗癌剤のスクリーニング方法を提供する。本実施形態のスクリーニング方法は、癌幹細胞阻害剤又は癌転移抑制剤のスクリーニング方法であるということもできる。

[0070] 本実施形態のスクリーニング方法によれば、c-Met阻害剤をスクリーニングすることができる。本実施形態のスクリーニング方法は、細胞レベルで行ってもよく、非細胞レベル(試験管レベル)で行ってもよい。細胞を用いる場合には、上述した第1実施形態のスクリーニング方法におけるものと同様の細胞を用いることができる。また、被験物質としては、特に制限されず、例えば化合物ライブラリー等を用いることができる。c-Metの活性としては、例えばヒトやマウスのc-Metタンパク質の場合、1234番目のチロシン残基(Tyr1234)のリン酸化を測定すればよい。

[0071] c-Metの活性を低下させる物質は、インビボ及びインビトロにおいて、癌細胞の増殖を抑制することができる。また、癌幹細胞の機能を阻害することができる。

[0072] 本実施形態のスクリーニング方法により得られる抗癌剤が治療の対象とする癌は、特に限定されず、メラノーマ、乳癌、肝臓癌等であってもよい。また、上記の乳癌は、トリプルネガティブ乳癌であってもよい。

[0073] [その他の実施形態]

1実施形態において、本発明は、STAR D 3 / コレステロールの変化 / c - M e t 経路の阻害剤の有効量を、治療を必要とする患者に投与することを含む、癌の治療方法を提供する。本実施形態の治療方法が対象とする癌は、特に限定されず、メラノーマ、乳癌、肝臓癌等であってもよい。また、上記の乳癌は、トリプルネガティブ乳癌であってもよい。

[0074] 本実施形態の治療方法は、癌幹細胞の阻害方法、癌幹細胞のスフェロイド形成能を阻害する方法、癌幹細胞の癌幹細胞マーカーの発現を抑制する方法、癌の転移を抑制する方法等といいかえることもできる。

[0075] 本実施形態の方法において、STAR D 3 / コレステロールの変化 / c - M e t 経路の阻害剤としては、上述したものが挙げられる。また、STAR D 3 / コレステロールの変化 / c - M e t 経路の阻害剤は、1種を単独で用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。また、既存の抗癌剤と併用して用いてもよい。

[0076] 1実施形態において、本発明は、癌の治療のための、STAR D 3 / コレステロールの変化 / c - M e t 経路の阻害剤を提供する。本実施形態が治療の対象とする癌は、特に限定されず、メラノーマ、乳癌、肝臓癌等であってもよい。また、上記の乳癌は、トリプルネガティブ乳癌であってもよい。

[0077] 本実施形態において、「癌の治療」は、「癌幹細胞の阻害」、「癌幹細胞の機能の阻害」、「スフェロイド形成能の阻害」、「癌幹細胞マーカーの発現の抑制」、「癌の転移の抑制」等といいかえることもできる。また、STAR D 3 / コレステロールの変化 / c - M e t 経路の阻害剤としては、上述したものが挙げられる。

[0078] 1実施形態において、本発明は、抗癌剤の製造のための、STAR D 3 / コレステロールの変化 / c - M e t 経路の阻害剤の使用を提供する。本実施

形態の抗癌剤が対象とする癌は、特に限定されず、メラノーマ、乳癌、肝臓癌等であってもよい。また、上記の乳癌は、トリプルネガティブ乳癌であってもよい。

[0079] 本実施形態において、「抗癌剤」は、「癌幹細胞阻害剤」、「スフェロイド形成阻害剤」、「癌幹細胞マーカーの発現抑制剤」、「癌の転移抑制剤」等といいかえることもできる。また、STARD3／コレステロールの変化／c-Met経路の阻害剤としては、上述したものが挙げられる。

実施例

[0080] 次に実験例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実験例に限定されるものではない。

[0081] [材料及び方法]

(試薬)

エピガロカテキンガレート (EGCG、型式「E4143」)、カタラーゼ (型式「C100」)、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) (型式「S5395」)、抗 β -アクチン抗体 (型式AS441)、コレステロール (型式「C8667」) はシグマアルドリッチ社より購入した。アレクサフルオロ488ヤギ抗ウサギIgG抗体 (型式「A-11034」) はインビトロジェン社より購入した。抗STARD3抗体はプロテインテック社より購入した。抗Oct-4抗体、抗CD271抗体、抗JARID1B抗体、抗Met抗体はセルシグナリングテクノロジー社より購入した。U-18666A (型式「10009869」) はケイマンケミカル社より購入した。フルバスタチンはLKTラボラトリーズ社より購入した。フィナステリドは東京化成工業株式会社より購入した。リコンビナントマウスHGF (型式「550-84491」) はR&Dシステムズ社より購入した。

[0082] (細胞培養)

マウスメラノーマ細胞株B16、ヒトメラノーマ細胞株MeWo、A375、ヒト乳癌細胞株MDA-MB-231、マウス乳癌細胞株4T1、肝臓癌細胞株HepG2を5%又は10%ウシ胎児血清 (FCS) 添加DMEM

培地にて37℃、水蒸気飽和した5%CO₂条件下で継代し、対数増殖期で培養維持した。

[0083] (Genetic suppressor elements (GSE) ライブラリー)

GSE library (MFL-ESP) はマウス胚cDNA (型式「ML8000BB」、クロンテック社) を制限酵素EcoRI、SphIで断片化し、pLPCX改変レトロウイルスvectorに導入した。pVSV-G vectorは、タカラバイオ株式会社より購入した。pTarget (商標) Mammalian Expression Vector Systemはプロメガ社より購入した。

[0084] (GSEライブラリーの導入及びEGCGによるセレクション)

EcoPack-293、AmphoPack-293パッケージング細胞を、それぞれ 2.0×10^5 個/mLに調整して5mLディッシュに播種し、10%FBS含有DMEM培地で培養した。翌日、 $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ MFL-ESP $3 \mu\text{L}$ 、 $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ pVSV-G $3 \mu\text{L}$ 、FuGENE6トランスフェクション試薬 (ロシュ社) $6 \mu\text{L}$ を混合したものを、各パッケージング細胞に導入した。翌日、パッケージング細胞の培養上清をフィルター ($0.22 \mu\text{m}$) に通し、ポリブレン (ヘキサジメチリンブロミド、シグマアルドリッチ社) を終濃度 $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加した後、前日 1×10^4 個/mLに調整して5mLディッシュに播種し、5%FBS含有DMEM培地で培養しておいたB16細胞に添加し、培養上清中のウイルスを感染させた。パッケージング細胞には新しい10%FBS含有DMEM培地を添加し、培養を継続した。培地交換を12時間ごとに計4回行った。感染が終了したB16細胞を 1×10^4 個/mLに調整して、96ウェルプレートに $0.1 \text{ mL}/\text{ウェル}$ ずつ播種し、2%FBS含有DMEM培地で24時間回復培養を行った。回復培養後、終濃度 $50 \mu\text{M}$ のEGCGを添加した1%FBS含有DMEM培地で約1ヶ月間セレクションを行った。

[0085] (定量RT-PCR (qRT-PCR))

TRIzol試薬（インビトロジェン社）を用いて細胞からRNAを抽出し、PrimeScript RT reagent kit（タカラバイオ株式会社）を用いてcDNAを合成した。得られたcDNAを用いて定量PCRを行った。定量PCRにはThermal Cycler Dice Real Time System TP800（タカラバイオ株式会社）を用いた。マウスMicrophthalmia Transcription Factor（MITF）増幅用センスプライマーの塩基配列を配列番号3に示し、アンチセンスプライマーの塩基配列を配列番号4に示す。また、マウスチロシナーゼ増幅用センスプライマーの塩基配列を配列番号5に示し、アンチセンスプライマーの塩基配列を配列番号6に示す。また、 β -アクチン増幅用センスプライマーの塩基配列を配列番号7に示し、アンチセンスプライマーの塩基配列を配列番号8に示す。

[0086]（ウエスタンブロット）

溶解バッファー（Tris-HCl（pH7.5）、150mM NaCl、1% Triton-X100、1mM EDTA、50mM NaF、30mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル（PMSF）、 $2.0\mu\text{M}/\text{mL}$ アプロチニン）に細胞を懸濁し、 $500\times g$ で5分間遠心した後、上清をSDS-PAGEサンプルバッファー（0.057M Tris-HCl、pH6.8、9.1%グリセロール、1.8%SDS、0.02%プロモフェノールブルー、0.65M 2-メルカプトエタノール）で2倍希釈し、5分間煮沸してSDS-PAGEのサンプルとした。

[0087] 続いて、上記のサンプルをSDS-PAGEゲルに供して電気泳動を行った。続いて、ゲル中のタンパク質を、60分間、100Vの電圧をかけてニトロセルロース膜（Schleicher & Schuell社）に転写した。2.5%BSA-TTBS（0.1%Tween20含有Tris buffered saline；20mM Tris-HCl、pH7.6）を用いて室温で1時間ブロッキング後、一次抗体を2.5%BSA-TTBSで希釈し、 4°C で一晩反応させた。TTBSで洗浄後、2.5%BSA-

TTBSで希釈した二次抗体溶液を1時間反応させた。続いて、TTBSで3回洗浄した後、Enhanced Chemiluminescence Reagent (ECL) Advance western Blotting Detection (GEヘルスケア社)を用いて発色反応を行い、発光強度を解析した。

[0088] (ヒトメラノーマ及び乳癌患者由来の組織を用いた免疫組織染色)

ヒトメラノーマ組織アレイ(型式「ME802」、US BIOMAX社)及び乳癌組織アレイ(型式「BR1503」、US BIOMAX社)をキシレンに10分間浸漬した後、再度新しいキシレンに浸漬し10分間静置した。続いて、100%、95%、70%のエタノールを作製し、濃度の濃い順に5分間ずつスライドガラスを浸し、最後に5分間リン酸緩衝液(PBS)に浸漬して脱パラフィン処理を行った。

[0089] 続いて、ビーカーに10mMクエン酸ナトリウム(pH6.0)を入れスライドガラスを浸漬し、脱イオン水を入れた圧力鍋に入れた。加圧後10分間熱処理し、スライドガラスを取り出した後、30分間空冷した。続いて、5%BSAを用いて室温で1時間ブロッキング後、目的の抗体を希釈した5%BSAに置換し、4℃で一晩反応させた。続いて、脱イオン水で洗浄後、アレクサフルオロ488抗ウサギIgG抗体を希釈した5%BSAを室温で1時間反応させ、目的のタンパク質を標識した。さらに、脱イオン水で洗浄後、核を染色するDAPI含有の5%BSAに置換し、室温で約5分間静置した。最後に脱イオン水で洗浄後、カバーガラスを載せて蛍光顕微鏡で観察した。

[0090] (RNA干渉法による遺伝子の発現抑制)

Non-targeting Scr-shRNA(型式「SHC016」、以下、「Scr-shRNA」という場合がある。)及びshRNAs targeting STAR3(ヒト用:型式「TRCN0000155584」、マウス用:型式「TRCN0000105330」、以下、「STAR3-shRNA」という場合がある。)レンチウイルスベクタ

ーはシグマアルドリッチ社より購入して使用した。型式「TRCN0000155584」の標的配列を配列番号1に示し、型式「TRCN0000105330」の標的配列を配列番号2に示す。ベクターの精製はマニュアル通りに行った。

[0091] STARD3に対する一過性ノックダウンsiRNAとしては、Ambion In Vivo Pre-designed Negative control siRNA #1 (型式「#4457289」、以下、「Scr-siRNA」という場合がある。)及びAmbion In Vivo Pre-designed STARD3 siRNA (型式「#s81858」、以下、「STARD3-siRNA」という場合がある。)をサーモフィッシャーサイエンティフィック社より購入して使用した。

[0092] c-Metに対する一過性ノックダウンsiRNAとしては、Mission negative control siRNA (型式「SIC-001」、以下、「Ctl-siRNA」という場合がある。)及びsiRNA targeting c-Met (型式「SASI_Mm01_00095875」、以下、「c-Met-siRNA」という場合がある。)をシグマアルドリッチ社より購入して使用した。

[0093] (受容体チロシンキナーゼ (RTKs) 活性測定)

細胞を無血清培地で24時間前培養した後、10%FBS-DMEM培地に置換し、37℃で30分間インキュベートし、RTKsのリン酸化誘導を行った。その後、phospho-RTK array kit (R&Dシステムズ社)を用いて、各種RTKsのリン酸化レベルを測定した。

[0094] (スフェロイドアッセイ)

細胞を2000個/ウェルとなるように希釈し、Corning Ultra-Low Attachment Surface 24 well plates (型式「3473」、コーニング社)に播種し、EGF (20 ng/mL、BDバイオサイエンス社)、bFGF (10 ng/mL、BDバイオサイエンス社)及びB27 (1:50希釈、インビトロジェン社)含

有無血清DMEM培地で21日間培養した。その後、スフェロイド数をカウントした。

[0095] (動物実験)

《腫瘍体積及び生存率の測定》

5週齢の雌性C57BL/6Jマウスに、スクランブルshRNA (Scrr-shRNA) 又はSTAR D3の発現を抑制するshRNA (STAR D3-shRNA) を安定導入したB16細胞を 5×10^5 個/匹となるように背部皮下に移植した。2日に1回腫瘍体積を測定した。腫瘍体積は次の式(1)により算出した。

$$\text{腫瘍体積} = \text{長さ} \times \text{幅}^2 / 2 \quad (1)$$

また、生存曲線はKaplan-Meier法を用いて作成し、two-way ANOVA検定により比較した。

[0096] 《肺転移の検討1》

5週齢の雌性C57BL/6Jマウスに、スクランブルshRNA (Scrr-shRNA) 又はSTAR D3の発現を抑制するshRNA (STAR D3-shRNA) を安定導入したB16細胞を 5×10^5 個/匹となるように尾静脈に移植した。3週間後、肺を摘出し肺転移を観察した。

[0097] 《肺転移の検討2》

4週齢の雌性BALB/cマウスに4T1細胞を 1×10^5 個/ $200 \mu\text{L}$ PBSとなるように背部皮下に移植した。1週間毎に皮下腫瘍内及び周囲に 15 nM /マウスのスクランブルsiRNA (Scrr-siRNA) 又はSTAR D3の発現を抑制するsiRNA (STAR D3-siRNA) を同量のアテロコラーゲンと合わせて投与した。腫瘍体積及び体重を2日に1回測定した。最終日に肺における転移の評価及び血清中のALT/AST活性を測定した。

[0098] (細胞全体のコレステロール量の測定)

Scramble-shRNA又はSTAR D3-shRNAを安定導入したB16細胞又はMeWo細胞 1×10^6 個/サンプルを、マイクロホモジ

ナイザーを用いて200 μ Lの有機混合液（クロロホルム：イソプロパノール：NP-40=7：11：0.1）で抽出した。続いて、15,000 \times gで10分間遠心分離し、上清を新しいチューブに移し、スピードバック遠心濃縮システム（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）でコレステロールを含む脂質を乾燥させた。続いて、100 μ L Cholesterol Assay Bufferで乾燥した脂質を溶解し、ボルテックスマキサーで均一に混合し、25 μ Lの抽出液を用いてTotal Cholesterol and Cholesterol Ester Colorimetric/Fluorometric Assay Kit（Biovision社）により細胞全体のコレステロール量を測定した。

[0099] [実験例1]

（Genetic suppressor elements (GSE) 法によるSTARD3の同定）

発明者らは、以前に、緑茶カテキンであるエピガロカテキンガレート（EGCG）が癌細胞の増殖抑制作用を有することを明らかにした。そこで、EGCGによる細胞増殖抑制作用に必要な因子の同定を試みた。具体的には、マウスメラノーマ細胞株であるB16細胞にGSEライブラリーを導入し、約1か月間EGCG含有培地で選択した。これにより、EGCGの細胞増殖抑制作用に対して耐性を示す細胞を獲得した。メラノーマ幹細胞は脱分化状態にあり、メラニン合成能が低下していることが知られているため、耐性細胞の中から色素量を指標として分化状態にある細胞を選択した。この細胞に導入されている遺伝子断片をシーケンスにより解析したところ、Star-related lipid transfer domain containing 3 (STARD3) が同定された。図1は、STARD3遺伝子を同定した過程を説明する図である。

[0100] [実験例2]

（EGCGによるSTARD3タンパク質発現の阻害）

STARD3タンパク質の発現に対するEGCGの影響をウエスタンブロ

ットにより検討した。具体的には、B16細胞を、終濃度5 μ MのEGCGを含有する培地（5ユニット/mL SOD、200ユニット/mLカタラーゼ、1%FCS）中で、0、24、48、72及び96時間培養し、STAR D3タンパク質の発現をウエスタンブロットにより検出した。対照として、 β -アクチンタンパク質を検出した。

[0101] 図2（a）はウエスタンブロットの結果を示す写真である。また、図2（b）は、図2（a）の結果を数値化したグラフである。

[0102] その結果、EGCGの処理により、処理時間依存的にSTAR D3タンパク質の発現量が減少することが明らかとなった。

[0103] [実験例3]

（STAR D3特異的な発現抑制によるメラノーマの分化の促進）

STAR D3のメラノーマ幹細胞への関与を検討するため、STAR D3の発現をRNA干渉法により抑制したB16細胞を作製し、色素合成を評価した。

[0104] 図3（a）及び（b）は、それぞれ、対照のB16細胞（Scr-shRNA）及びSTAR D3の発現を抑制したB16細胞（STAR D3-shRNA）の顕微鏡写真である。その結果、STAR D3の発現を抑制したB16細胞は、対照と比較して細胞が黒いことが明らかとなった。

[0105] 続いて、各細胞からRNAを回収し、メラノーマの分化マーカーであるMicrophthalmia Transcription Factor（MITF）及びチロシナーゼ遺伝子の発現量を定量PCRで測定した。また、内部標準として β -アクチン遺伝子の発現量を測定した。

[0106] 図3（c）は定量PCRの結果を示すグラフである。その結果、STAR D3の発現を抑制したB16細胞では、対照と比較して、MITF及びチロシナーゼの発現量が有意に高いことが明らかとなった。この結果は、STAR D3の発現抑制がメラノーマ細胞の分化を促進することを示す。

[0107] [実験例4]

（STAR D3の発現抑制が癌幹細胞マーカーの発現に及ぼす影響の検討）

Oct-4は、メラノーマを含む様々な癌において癌幹細胞マーカーとなりうることが示されている。また、CD271、JARID1Bは、メラノーマ幹細胞マーカーとして報告されている。そこで、マウスメラノーマ細胞株B16及びヒトメラノーマ細胞株MeWoに、それぞれSTAR3の発現を抑制するshRNA (STAR3-shRNA)を導入し、これらのマーカーの発現量をウエスタンブロットにより検討した。

[0108] 図4(a)及び(b)はウエスタンブロットの結果を示す写真である。図4(a)はB16細胞の結果を示し、図4(b)はMeWo細胞の結果を示す。その結果、いずれの細胞においてもSTAR3の発現抑制によりOct-4、CD271、JARID1Bの発現量が減少したことが明らかとなった。この結果は、STAR3の発現抑制がメラノーマ幹細胞機能を阻害することを示す。

[0109] [実験例5]

(STAR3の発現抑制がスフェロイド形成能に及ぼす影響の検討)

スフェロイド形成能は、癌幹細胞機能の指標の一つである。そこで、B16細胞及びMeWo細胞に、それぞれSTAR3の発現を抑制するshRNA (STAR3-shRNA)を導入し、これらの細胞のスフェロイド形成能を測定した。対照にはスクランブルshRNA (Scr-shRNA)を導入した細胞を用いた。

[0110] 図5(a)～(d)はスフェロイドアッセイの結果を示す写真及びグラフである。図5(a)はB16細胞の代表的な顕微鏡写真である。図5(b)はB16細胞のスフェロイド数を計測した結果を示すグラフである。また、図5(c)はMeWo細胞の代表的な顕微鏡写真である。図5(d)はMeWo細胞のスフェロイド数を計測した結果を示すグラフである。

[0111] その結果、いずれの細胞においてもスフェロイド形成能が抑制されることが明らかとなった。この結果は、STAR3の発現抑制がメラノーマ幹細胞機能を阻害することを更に支持するものである。

[0112] [実験例6]

(メラノーマ患者の腫瘍組織におけるSTARD3の発現の検討1)

正常皮膚組織とメラノーマ患者の腫瘍組織におけるSTARD3の発現を免疫組織染色により評価した。図6(a)は免疫組織染色の結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図6(b)は免疫組織染色の結果をまとめたグラフである。その結果、正常皮膚組織と比較して、メラノーマ患者の腫瘍組織では、STARD3の発現量が高いことが明らかとなった。

[0113] [実験例7]

(メラノーマ患者の腫瘍組織におけるSTARD3の発現の検討2)

マイクロアレイデータベースGEOにおけるアクセッション番号GSE3189をもとに、正常ヒト皮膚組織とメラノーマ患者の腫瘍組織におけるSTARD3 mRNAの発現量を比較した。図7は、検討結果を示すグラフである。その結果、メラノーマ患者の腫瘍組織では、STARD3の発現量が高いことが明らかとなった。

[0114] [実験例8]

(STARD3の発現抑制によるメラノーマ細胞増殖の阻害)

マウスメラノーマ細胞株であるB16細胞、ヒトメラノーマ細胞株であるA375細胞及びMeWo細胞にそれぞれSTARD3の発現を抑制するshRNA(STARD3-shRNA)を導入し、細胞増殖を検討した。対照にはスクランブルshRNA(Scr-shRNA)を導入した各細胞を用いた。

[0115] 図8(a)～(c)は、測定した細胞増殖曲線を示すグラフである。図8(a)はB16細胞の結果を示し、図8(b)はA375細胞の結果を示し、図8(c)はMeWo細胞の結果を示す。その結果、いずれの細胞においても、STARD3の発現抑制により細胞増殖が顕著に抑制されることが明らかとなった。

[0116] [実験例9]

(STARD3の発現抑制によるメラノーマ腫瘍成長の阻害)

STARD3の発現を抑制するshRNA(STARD3-shRNA)

を導入したB16細胞を、5週齢の雌性C57BL/6Jマウスの背部皮下に移植し、生存期間を評価した。対照には、スクランブルshRNA (Scr-shRNA) を導入したB16細胞を移植したマウスを用いた。また、2日に1回各マウスの腫瘍体積を測定した。腫瘍体積が4000mm³に達した時点でマウスを安楽死させた。

[0117] 図9(a)はSTAR D3の発現を抑制したB16細胞を移植したマウス (STAR D3-shRNA) 及び対照マウス (Scr-shRNA) の代表的な写真である。また、図9(b)は、各マウスから摘出した腫瘍組織を示す代表的な写真である。また、図9(c)は各マウスの腫瘍体積の測定結果を示すグラフである。また、図9(d)は各マウスの生存曲線を示すグラフである。

[0118] その結果、対照マウスと比較して、STAR D3の発現を抑制したB16細胞を移植したマウスでは腫瘍成長が顕著に抑制されることが明らかとなった。また、対照マウスと比較して、STAR D3の発現を抑制したB16細胞を移植したマウスは生存期間が有意に延長されることが明らかとなった。

[0119] [実験例10]

(STAR D3の発現抑制によるメラノーマ細胞の肺転移阻害)

STAR D3の発現を抑制するshRNA (STAR D3-shRNA) を導入したB16細胞をマウスの尾静脈から移植し、肺転移を誘発させた。対照には、スクランブルshRNA (Scr-shRNA) を導入したB16細胞を移植したマウスを用いた。続いて、3週間後に各マウスから肺を摘出し、メラノーマの肺転移に対するSTAR D3の影響を検討した。図10は、各マウスから摘出した肺の写真である。

[0120] その結果、STAR D3の発現を抑制したB16細胞を移植したマウスでは、肺転移が観察されないことが明らかとなった。この結果から、STAR D3の発現抑制により、メラノーマ細胞の肺転移が阻害されることが明らかとなった。

[0121] [実験例11]

(STARD3の発現がメラノーマ患者の予後に与える影響)

マイクロアレイデータベースGEOにおけるアクセッション番号GSE65904をもとに、メラノーマ患者におけるSTARD3の発現量と生存期間の関連を解析した。STARD3の発現レベルに基づいて、患者を2グループに分割し、Kaplan-Meier法に基づき生存期間を解析した。

[0122] 図11は、検討結果を示すグラフである。その結果、STARD3の発現量が高いグループは生存期間が751日と算出され、STARD3の発現量が低いグループは生存期間が1164日と算出された。この結果から、STARD3の発現量が高い患者は予後が悪いことが明らかとなった。

[0123] [実験例12]

(STARD3の発現抑制によるコレステロール量の減少)

STARD3の発現とコレステロール量との関連を検討した。具体的には、STARD3の発現を抑制するshRNA (STARD3-shRNA)を導入したB16細胞及びMeWo細胞中のコレステロール量を測定した。対照には、スクランブルshRNA (Scr-shRNA)を導入したB16細胞及びMeWo細胞を使用した。

[0124] 図12(a)及び(b)は、測定結果を示すグラフである。図12(a)はB16細胞の結果であり、図12(b)はMeWo細胞の結果である。その結果、いずれの細胞においても、STARD3の発現抑制により細胞全体のコレステロール量が有意に減少することが明らかとなった。

[0125] [実験例13]

(コレステロール動態制御剤がスフェロイド形成能に及ぼす影響の検討)

コレステロール動態制御剤の存在下でメラノーマ細胞株を培養し、スフェロイド形成能を評価した。コレステロール動態制御剤としては、U-18666A、フィナステリド、及びフルバスタチンを使用した。

[0126] 図13(a)～(c)はスフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。図13(a)はB16細胞の培地に0、1、25及び2.5 μ MのU-18666Aを添加してスフェロイドアッセイを行った結果である。図13(

b) は MeWo 細胞の培地に 0、1、2.5 及び 2.5 μ M の U-18666A を添加してスフェロイドアッセイを行った結果である。図 13 (c) は B16 細胞の培地に 2.5 μ M のフィナステリド又は 2.5 μ M のフルバスタチンを添加してスフェロイドアッセイを行った結果である。対照にはコレステロール動態制御剤を添加していない B16 細胞を使用した。

[0127] その結果、各コレステロール動態制御剤の添加により、B16 細胞及び MeWo 細胞のスフェロイド形成能が阻害されることが明らかとなった。この結果は、コレステロール動態制御剤がメラノーマ幹細胞機能を阻害することを示す。

[0128] [実験例 14]

(コレステロール動態制御剤が癌幹細胞マーカーの発現に及ぼす影響の検討)

コレステロール動態制御剤の存在下で B16 細胞を培養し、癌幹細胞マーカーである Oct-4 の発現量をウエスタンブロットにより検討した。内部標準として、 β -アクチンの発現量を検討した。コレステロール動態制御剤としては、U-18666A、フィナステリド、及びフルバスタチンを使用した。

[0129] 図 14 (a) ~ (d) はウエスタンブロットの結果を示す写真である。図 14 (a) は U-18666A の結果である。図 14 (b) は、図 14 (a) の結果を数値化したグラフである。図 14 (c) は 2.5 μ M のフィナステリド又は 2.5 μ M のフルバスタチンを添加した培地で培養した B16 細胞のウエスタンブロットの結果を示す写真である。対照にはコレステロール動態制御剤を添加していない B16 細胞を使用した。図 14 (d) は、図 14 (c) の結果を数値化したグラフである。

[0130] その結果、いずれのコレステロール動態制御剤の存在下においても Oct-4 の発現量が減少したことが明らかとなった。この結果は、コレステロール動態制御剤がメラノーマ幹細胞機能を阻害することを更に支持するものである。

[0131] [実験例 15]

(コレステロールによるメラノーマ幹細胞機能の増強)

B16細胞をコレステロール添加培地で培養し、スフェロイドアッセイを行った。図15は、スフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。その結果、コレステロールの存在下でB16細胞のスフェロイド形成能が増強されることが明らかとなった。この結果は、コレステロールがメラノーマ幹細胞機能を増強することを示す。

[0132] [実験例 16]

(STAR3の発現抑制によるコレステロールのメラノーマ幹細胞機能増強作用の消失)

STAR3の発現を抑制するshRNA (STAR3-shRNA) を導入したB16細胞及び対照のスクランブルshRNA (Scr-shRNA) を導入したB16細胞の培地にコレステロールを添加し、スフェロイドアッセイを行った。図16はスフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。

[0133] その結果、対照のB16細胞ではコレステロールの添加によりスフェロイド形成能が増強された。一方、STAR3の発現を抑制したB16細胞ではコレステロールを添加してもスフェロイド形成能に変化はみられないことが明らかとなった。この結果から、STAR3の発現抑制が、コレステロールによるメラノーマ幹細胞機能の増強を消失させることが明らかとなった。

[0134] [実験例 17]

(STAR3の発現抑制による受容体チロシンキナーゼ (RTKs) の活性阻害)

STAR3の発現抑制がRTKsの活性に影響を与えるか否かについて検討した。STAR3の発現を抑制するshRNA (STAR3-shRNA) 又はスクランブルshRNA (Scr-shRNA) を安定導入したB16細胞におけるRTKsのリン酸化レベルをphospho-RTK

array kit (R&Dシステムズ社) を用いて評価した。

[0135] 図17は、実験結果を示すグラフである。その結果、STARD3の発現抑制により活性が低下するRTKsが存在することが明らかとなった。特に、c-Met (HGFR) の活性の低下が顕著であった。

[0136] [実験例18]

(STARD3の発現抑制によるc-Metの阻害)

STARD3の発現を抑制するshRNA (STARD3-shRNA) 又はスクランブルshRNA (Scr-shRNA) を安定導入したB16細胞における、c-Metタンパク質の1234番目のチロシン残基 (Ty r 1 2 3 4) のリン酸化及びc-Metタンパク質の発現をウエスタンブロットにより検討した。

[0137] 図18(a)はウエスタンブロットの結果を示す写真である。図18(b)は図18(a)の結果を数値化したグラフである。その結果、STARD3の発現抑制によりc-MetのTy r 1 2 3 4のリン酸化及びc-Metの発現量が減少することが明らかとなった。

[0138] [実験例19]

(コレステロール輸送阻害剤U-18666Aによるc-Metの阻害)

B16細胞を0、1、及び2.5 μ MのU-18666Aの存在下で96時間培養し、c-MetのTy r 1 2 3 4のリン酸化及びc-Metの発現をウエスタンブロットにより検討した。

[0139] 図19(a)はウエスタンブロットの結果を示す写真である。図19(b)は図19(a)におけるc-Metの発現量の結果を数値化したグラフである。その結果、U-18666Aの存在下ではc-MetのTy r 1 2 3 4のリン酸化レベル及びc-Metの発現量が減少することが明らかとなった。この結果から、コレステロールがc-Metの活性を制御することが明らかとなった。

[0140] [実験例20]

(c-Metの発現抑制によるメラノーマ幹細胞マーカー発現の阻害)

メラノーマ幹細胞に対するc-Metの影響を検討した。具体的には、c-Metの発現を抑制するsiRNA (c-Met-siRNA) 又はスクランブルsiRNA (Ctrl-siRNA) をB16細胞に導入して96時間後に、Oct-4の発現をウエスタンブロットにより検討した。

[0141] 図20(a)はウエスタンブロットの結果を示す写真である。図20(b)は図20(a)の結果を数値化したグラフである。その結果、c-Metの発現抑制によりOct-4の発現量が減少することが明らかとなった。この結果は、c-MetがOct-4の発現を正に制御していることを示す。

[0142] [実験例21]

(肝細胞増殖因子HGFによるメラノーマ幹細胞機能の増強)

c-MetのリガンドであるHGFが、メラノーマ幹細胞機能に与える影響を検討した。具体的には、0、10、25、50ng/mLのHGFの存在下でB16細胞を30分間刺激し、c-MetのTyr1234のリン酸化及びOct-4の発現量をウエスタンブロットにより検討した。また、50ng/mLのHGFの存在下でB16細胞を培養し、スフェロイドアッセイを行った。

[0143] 図21(a)は、ウエスタンブロットの結果を示す写真である。図21(b)は図21(a)の結果を数値化したグラフである。図21(c)は、スフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。その結果、HGFの存在下ではc-MetのTyr1234のリン酸化が促進され、Oct-4の発現量が増加することが明らかとなった。また、HGFの存在下ではB16細胞のスフェロイド形成能が増強されることが明らかとなった。以上の結果から、c-Metの活性化がメラノーマ幹細胞機能を増強することが明らかとなった。

[0144] [実験例22]

(正常ヒト乳腺組織と比較してトリプルネガティブ乳癌腫瘍組織においてSTARD3が高発現する)

正常乳腺組織とトリプルネガティブ乳癌腫瘍組織におけるSTARD3の

発現量を免疫組織染色により比較した。なお、トリプルネガティブ乳癌は、エストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PgR）、HER2が全て陰性である乳癌であり、予後が不良であることが知られている。

[0145] 図22は免疫組織染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。その結果、トリプルネガティブ乳癌腫瘍組織においてSTAR D3の発現量が高いことが明らかとなった。

[0146] [実験例23]

（コレステロール動態制御剤がトリプルネガティブ乳癌細胞株におけるc-Metの発現に与える影響）

コレステロール動態制御剤の存在下でヒトトリプルネガティブ乳癌細胞株であるMDA-MB-231細胞を培養し、c-Metの発現をウエスタンブロットにより検討した。内部標準として、 β -アクチンの発現量を検討した。コレステロール動態制御剤としては、0及び5 μ MのU-18666Aを使用した。

[0147] 図23（a）はウエスタンブロットの結果を示す写真である。図23（b）は図23（a）の結果を数値化したグラフである。その結果、U-18666Aの存在下ではトリプルネガティブ乳癌細胞株におけるc-Metの発現量が減少することが明らかとなった。この結果から、トリプルネガティブ乳癌細胞においても、コレステロールがc-Metの活性を制御することが明らかとなった。

[0148] [実験例24]

（コレステロール輸送阻害剤がトリプルネガティブ乳癌細胞株のスフェロイド形成能に与える影響）

コレステロール動態制御剤の存在下でヒトトリプルネガティブ乳癌細胞株であるMDA-MB-231細胞を培養し、スフェロイドアッセイを行った。コレステロール動態制御剤としては、0、1.25及び2.5 μ MのU-18666Aを使用した。

[0149] 図24は、スフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。その結果、

U-18666Aの存在下では、MDA-MB-231細胞のスフェロイド形成能が阻害されることが明らかとなった。この結果は、コレステロール動態制御剤がトリプルネガティブ乳癌の癌幹細胞機能を阻害することを示す。

[0150] [実験例25]

(STAR D3を標的としたs i R N Aの局所投与によるトリプルネガティブ乳癌細胞の肺転移阻害)

マウストリプルネガティブ乳癌細胞株である4 T 1をマウス背部皮下に移植し、腫瘍を形成させた。続いて、1週間毎に皮下腫瘍内及び周囲に15 n M / マウスのスクランブルs i R N A (S c r - s i R N A) 又はSTAR D3の発現を抑制するs i R N A (STAR D3 - s i R N A) を同量のアテロコラーゲンと合わせて投与した。4週間後に肺を摘出し、肺転移の指標として肺転移小結節数及び肺重量を測定した。また、s i R N Aの投与による毒性を評価するために、血清中のA L T / A S T活性を測定した。

[0151] 図25 (a) はマウスから摘出した肺の代表的な写真である。矢頭は肺転移小結節を示す。図25 (b) は肺転移小結節数の測定結果を示すグラフである。図25 (c) は肺重量の測定結果を示すグラフである。図25 (d) はA S T活性の測定結果を示すグラフである。図25 (e) はA L T活性の測定結果を示すグラフである。図25 (d)、(e) 中、「n. s.」は有意差が存在しないことを示す。

[0152] その結果、STAR D3 - s i R N Aを投与したマウスでは肺転移小結節数が少なく、肺重量の増加も抑制されたことが明らかとなった。また、STAR D3 - s i R N Aの投与によるA S T / A L T活性の変化は認められなかった。以上の結果から、STAR D3 - s i R N Aの投与は生体に重篤な影響を与えることなくトリプルネガティブ乳癌細胞の転移を抑制できることが明らかとなった。

[0153] [実験例26]

(肝臓癌組織におけるSTAR D3の発現の検討)

マイクロアレイデータベースG E Oにおけるアクセッション番号G S E 5

4236をもとに、正常肝臓組織と肝臓癌患者の腫瘍組織におけるSTAR D3 mRNAの発現量を比較した。図26は、検討結果を示すグラフである。その結果、正常肝臓組織と比較して、肝臓癌患者の腫瘍組織では、STAR D3の発現量が高いことが明らかとなった。

[0154] [実験例27]

(コレステロール動態制御剤が肝臓癌幹細胞機能に及ぼす影響の検討1)

コレステロール動態制御剤の存在下で肝臓癌細胞株HepG2を培養し、c-Met及び癌幹細胞マーカーであるOct-4の発現量をウエスタンブロットにより検討した。内部標準として、 β -アクチンの発現量を検討した。コレステロール動態制御剤としては、0、1.25及び2.5 μ MのU-18666Aを使用した。

[0155] 図27はウエスタンブロットの結果を示す写真である。その結果、コレステロール動態制御剤の存在下では、肝臓癌細胞株におけるc-Met及びOct-4の発現量が減少したことが明らかとなった。この結果から、コレステロール動態制御剤が肝臓癌幹細胞機能を阻害することが明らかとなった。

[0156] [実験例28]

(コレステロール動態制御剤が肝臓癌幹細胞機能に及ぼす影響の検討2)

コレステロール動態制御剤の存在下で肝臓癌細胞株HepG2を培養し、スフェロイドアッセイを行った。コレステロール動態制御剤としては、0、1.25及び2.5 μ MのU-18666Aを使用した。

[0157] 図28は、スフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。その結果、コレステロール動態制御剤の存在下では、HepG2細胞のスフェロイド形成能が阻害されることが明らかとなった。この結果は、コレステロール動態制御剤が肝臓癌幹細胞機能を阻害することを示す。

[0158] [実験例29]

(67LRアゴニストによるSTAR D3の発現低下作用)

マウスメラノーマ細胞株であるB16、ヒト乳癌細胞株であるMDA-MB-231、マウス乳癌細胞株である4T1の培地に67LRアゴニストを

添加し、S T A R D 3の発現に与える影響を検討した。6 7 L Rアゴニストとしては、E G C Gを使用した。

[0159] マウスメラノーマ細胞株B 1 6を 1×10^4 個/mLの細胞密度で24ウェルプレートに1 mL/ウェルずつ播種し、5% F B S - D M E M培地で24時間前培養した。その後、終濃度0、1、 $10 \mu\text{M}$ のE G C Gを含有する培地（5ユニット/mL S O D、200ユニット/mLカタラーゼ、1% F B S）中で96時間培養した。

[0160] 続いて、各細胞を細胞溶解バッファーに溶解させて回収し、ウエスタンブロット法によりS T A R D 3タンパク質発現量を測定した。内部標準として β -アクチンタンパク質を測定した（ $n=3$ ）。図30（a）はウエスタンブロットの結果を示す写真及びその結果を数値化したグラフである。図30（a）のグラフにおいて、結果は平均値±標準偏差で表し、「**」はダネットの検定において $P < 0.01$ で有意差が存在することを表し、「n. s .」は有意差がないことを表す。

[0161] また、ヒト乳癌細胞株M D A - M B - 2 3 1を 1×10^4 個/mLの細胞密度で24ウェルプレートに1 mL/ウェルずつ播種し、10% F C S - R P M I培地で24時間前培養した。その後、終濃度0、1、5、 $10 \mu\text{M}$ のE G C Gを含有する培地（5ユニット/mL S O D、200ユニット/mLカタラーゼ、1% F C S）中で96時間培養した。

[0162] 続いて、各細胞を細胞溶解バッファーに溶解させて回収し、ウエスタンブロット法によりS T A R D 3タンパク質発現量を測定した。内部標準として β -アクチンタンパク質を測定した（ $n=3$ ）。図30（b）はウエスタンブロットの結果を示す写真及びその結果を数値化したグラフである。図30（b）のグラフにおいて、結果は平均値±標準偏差で表し、「***」はダネットの検定において $P < 0.001$ で有意差が存在することを表す。

[0163] また、マウス乳癌細胞株4 T 1を 1×10^4 個/mLの細胞密度で24ウェルプレートに1 mL/ウェルずつ播種し、10% F C S - R P M I培地で24時間前培養した。その後、終濃度0、1、5、 $10 \mu\text{M}$ のE G C Gを含有

する培地（5ユニット/mL SOD、200ユニット/mLカタラーゼ、1%FCS）中で72時間培養した。

[0164] 続いて、各細胞を細胞溶解バッファーに溶解させて回収し、ウエスタンブロット法によりSTAR D3タンパク質発現量を測定した。内部標準として β -アクチンタンパク質を測定した（ $n=3$ ）。図30（c）はウエスタンブロットの結果を示す写真及びその結果を数値化したグラフである。図30（c）のグラフにおいて、結果は平均値±標準偏差で表し、「**」はダネットの検定において $P<0.01$ で有意差が存在することを表し、「***」は $P<0.001$ で有意差が存在することを表す。

[0165] 以上の結果、67LRアゴニストを作用させると、マウスメラノーマ細胞株B16、ヒト乳癌細胞株MDA-MB-231、マウス乳癌細胞株4T1におけるSTAR D3の発現量が低下することが明らかとなった。この結果は、67LRアゴニストがSTAR D3発現阻害剤（発現抑制剤）であることを示す。

[0166] [実験例30]

（67LRアゴニストがスフェロイド形成能に及ぼす影響の検討）

スフェロイド形成能は、癌幹細胞機能の指標の一つである。そこで、マウスメラノーマ細胞株B16、マウス乳癌細胞株4T1、ヒト肝臓癌細胞株HepG2の培地に67LRアゴニストを添加し、これらの細胞のスフェロイド形成能に与える影響を検討した。67LRアゴニストとしては、EGCGを使用した。

[0167] マウスメラノーマ細胞株B16を2000個/mLの細胞密度で96ウェル低接着プレート（コーニング社）に100 μ L/ウェルずつ播種し、終濃度0又は10 μ MのEGCGを添加した、20ng/mL EGF、20ng/mL bFGF、B27（1:50希釈、インビトロジェン社）、5ユニット/mL SOD、200ユニット/mLカタラーゼを含有する無血清DMEM培地中で21日間培養後、スフェロイド数を測定した（ $n=6$ ）。

[0168] 図31（a）はスフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。図31

(a) 中、結果は平均値±標準偏差で表し、「**」はダネットの検定において $P < 0.01$ で有意差が存在することを表す。

[0169] また、マウス乳癌細胞株4T1を2000個/mLの細胞密度で24ウェル低接着プレート（コーニング社）に1mL/ウェルずつ播種し、終濃度0、1、5、10 μ MのEGCGを添加した、20ng/mL EGF、20ng/mL bFGF、B27（1:50希釈、インビトロジェン社）、5ユニット/mL SOD、200ユニット/mLカタラーゼを含有する無血清DMEM培地中で21日間培養後、スフェロイド数を測定した（ $n = 3$ ）。

[0170] 図31（b）はスフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。図31（b）中、結果は平均値±標準偏差で表し、「*」はダネットの検定において $P < 0.05$ で有意差が存在することを表し、「**」はダネットの検定において $P < 0.01$ で有意差が存在することを表す。

[0171] また、ヒト肝臓癌細胞株HepG2を500個/mLの細胞密度で24ウェル低接着プレート（コーニング社）に1mL/ウェルずつ播種し、終濃度0又は10 μ MのEGCGを添加した、20ng/mL EGF、20ng/mL bFGF、B27（1:50希釈、インビトロジェン社）、5ユニット/mL SOD、200ユニット/mLカタラーゼを含有する無血清DMEM培地中で21日間培養後、スフェロイド数を測定した（ $n = 3$ ）。

[0172] 図31（c）はスフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。図31（c）中、結果は平均値±標準偏差で表し、「***」はダネットの検定において $P < 0.001$ で有意差が存在することを表す。

[0173] 以上の結果、67LRアゴニストを作用させると、マウスメラノーマ細胞株B16、マウス乳癌細胞株4T1、ヒト肝臓癌細胞株HepG2のスフェロイド形成能が低下することが明らかとなった。この結果は、67LRアゴニストが癌幹細胞阻害剤であることを示す。

[0174] [実験例31]

（67LRアゴニストによるc-Metの発現低下作用）

マウスメラノーマ細胞株B16、及びヒト乳癌細胞株MDA-MB-231の培地に67LRアゴニストを添加し、c-Metの発現に与える影響を検討した。67LRアゴニストとしては、EGCGを使用した。

[0175] マウスメラノーマ細胞株B16を 1×10^4 個/mLの細胞密度で24ウェルプレートに1mL/ウェルずつ播種し、5%FBS-DMEM培地で24時間前培養した。その後、終濃度0、1、 $10 \mu\text{M}$ のEGCGを含有する培地（5ユニット/mL SOD、200ユニット/mLカタラーゼ、1%FBS）中で96時間培養した。

[0176] 続いて、各細胞を細胞溶解バッファーに溶解させて回収し、ウエスタンブロット法によりc-Metタンパク質発現量を測定した。内部標準として β -アクチンタンパク質を測定した（ $n=3$ ）。図32（a）はウエスタンブロットの結果を示す写真及びその結果を数値化したグラフである。図32（a）のグラフにおいて、結果は平均値±標準偏差で表し、「**」はダネットの検定において $P < 0.01$ で有意差が存在することを表し、「***」はダネットの検定において $P < 0.001$ で有意差が存在することを表す。

[0177] また、ヒト乳癌細胞株MDA-MB-231を 1×10^4 個/mLの細胞密度で24ウェルプレートに1mL/ウェルずつ播種し、10%FCS-RPMI培地で24時間前培養した。その後、終濃度0、1、5、 $10 \mu\text{M}$ のEGCGを含有する培地（5ユニット/mL SOD、200ユニット/mLカタラーゼ、1%FCS）中で96時間培養した。

[0178] 続いて、各細胞を細胞溶解バッファーに溶解させて回収し、ウエスタンブロット法によりc-Metタンパク質発現量を測定した。内部標準として β -アクチンタンパク質を測定した（ $n=3$ ）。図32（b）はウエスタンブロットの結果を示す写真及びその結果を数値化したグラフである。図32（b）のグラフにおいて、結果は平均値±標準偏差で表し、「***」はダネットの検定において $P < 0.001$ で有意差が存在することを表す。

[0179] 以上の結果、67LRアゴニストを作用させると、マウスメラノーマ細胞株B16、ヒト乳癌細胞株MDA-MB-231におけるc-Metの発現

量が低下することが明らかとなった。この結果は、67LRアゴニストがc-Met発現阻害剤（発現抑制剤）であることを示す。

[0180] [実験例32]

（STAR D3の発現抑制が乳癌細胞のスフェロイド形成能に及ぼす影響の検討）

スフェロイド形成能は、癌幹細胞機能の指標の一つである。そこで、shRNAを用いてヒト乳癌細胞株MDA-MB-231におけるSTAR D3の発現を抑制し、スフェロイド形成能に与える影響を検討した。

[0181] STAR D3の発現を抑制するshRNA（STAR D3-shRNA）を導入したMDA-MB-231細胞及び対照のスクランブルshRNA（Sc r-shRNA）を導入したMDA-MB-231細胞をそれぞれ2000個/mLの細胞密度で24ウェル低接着プレート（コーニング社）に1mL/ウェルずつ播種し、20ng/mL EGF、20ng/mL bFGF、B27（1:50希釈、インビトロジェン社）を含有する無血清RPMI培地中で21日間培養後、スフェロイド数を測定した（n=3）。

[0182] 図33はスフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。図33中、結果は平均値±標準偏差で表し、「***」はスチューデントのt検定において $P < 0.001$ で有意差が存在することを表す。

[0183] その結果、ヒト乳癌細胞株MDA-MB-231におけるSTAR D3の発現抑制はスフェロイド形成を阻害することが明らかとなった。つまり、乳癌細胞におけるSTAR D3の発現抑制は癌幹細胞機能を阻害することが明らかとなった。

[0184] [実験例33]

（STAR D3の発現抑制が乳癌細胞のc-Metシグナリングに及ぼす影響の検討）

shRNAを用いてヒト乳癌細胞株MDA-MB-231におけるSTAR D3の発現を抑制し、c-Metシグナリングに与える影響を検討した。

[0185] STAR D3の発現を抑制するshRNA（STAR D3-shRNA）

を導入したMDA-MB-231細胞及び対照のスクランブルshRNA (Scr-shRNA) を導入したMDA-MB-231細胞をそれぞれ 1×10^6 個/mLの細胞密度で24ウェルプレートに1 mL/ウェルずつ播種し、10% FCS-RPMI培地で24時間培養した。

[0186] 続いて、各細胞を細胞溶解バッファーに溶解させて回収し、ウエスタンブロット法によりc-MetのTy r 1 2 3 4のリン酸化、c-Metの発現及びSTARD3の発現を検討した。内部標準として β -アクチンタンパク質を測定した ($n=3$)。図34 (a) はウエスタンブロットの結果を示す写真である。

[0187] 図34 (b) は、図34 (a) の結果に基づいてc-Metの発現量を数値化したグラフである。また、図34 (c) は、図34 (a) の結果に基づいてリン酸化c-Metの存在量を数値化したグラフである。図34 (b) 及び (c) 中、結果は平均値 \pm 標準偏差で表し、「*」はスチューデントのt検定において $P < 0.05$ で有意差が存在することを表す。

[0188] その結果、ヒト乳癌細胞株MDA-MB-231におけるSTARD3の発現抑制は、c-Metのリン酸化レベル及びc-Metの発現量を低下させることが明らかとなった。この結果は、STARD3の発現抑制が乳癌細胞におけるc-Met経路 (c-Metシグナリング) を阻害することを示す。

[0189] [実験例34]

(STARD3の発現抑制が肝臓癌細胞のスフェロイド形成能に及ぼす影響の検討)

スフェロイド形成能は、癌幹細胞機能の指標の一つである。そこで、shRNAを用いてヒト肝臓癌細胞株HepG2におけるSTARD3の発現を抑制し、スフェロイド形成能に与える影響を検討した。

[0190] STARD3の発現を抑制するshRNA (STARD3-shRNA) を導入したHepG2細胞及び対照のスクランブルshRNA (Scr-shRNA) を導入したHepG2細胞をそれぞれ200個/mLの細胞密度

で24ウェル低接着プレート（コーニング社）に1 mL／ウェルずつ播種し、20 ng/mL EGF、20 ng/mL bFGF、B27（1：50希釈、インビトロジェン社）を含有する無血清DMEM培地中で21日間培養後、スフェロイド数を測定した（n=4）。

[0191] 図35はスフェロイドアッセイの結果を示すグラフである。図35中、結果は平均値±標準偏差で表し、「***」はスチューデントのt検定において $P < 0.001$ で有意差が存在することを表す。

[0192] その結果、ヒト肝臓癌細胞株HepG2におけるSTAR D3の発現抑制はスフェロイド形成を阻害することが明らかとなった。つまり、肝臓癌細胞におけるSTAR D3の発現抑制は癌幹細胞機能を阻害することが明らかとなった。

[0193] [実験例35]

（STAR D3の発現抑制が肝臓癌細胞のc-Metシグナリングに及ぼす影響の検討）

shRNAを用いてヒト肝臓癌細胞株HepG2におけるSTAR D3の発現を抑制し、c-Metシグナリングに与える影響を検討した。

[0194] STAR D3の発現を抑制するshRNA（STAR D3-shRNA）を導入したHepG2細胞及び対照のスクランブルshRNA（Scr-shRNA）を導入したHepG2細胞をそれぞれ 1×10^5 個/mLの細胞密度で12ウェルプレートに2 mL／ウェルずつ播種し、10%FCS-DMEM培地で48時間培養した。

[0195] 続いて、各細胞を細胞溶解バッファーに溶解させて回収し、ウエスタンブロット法によりc-MetのTy r 1 2 3 4のリン酸化、c-Metの発現及びSTAR D3の発現を検討した。内部標準として β -アクチンタンパク質を測定した（n=3）。図36（a）はウエスタンブロットの結果を示す写真である。

[0196] 図36（b）は、図36（a）の結果に基づいてリン酸化c-Metの存在量を数値化したグラフである。また、図36（c）は、図36（a）の結

果に基づいてc-Metの発現量を数値化したグラフである。図34(b)及び(c)中、結果は平均値±標準偏差で表し、「***」はスチューデントのt検定において $P < 0.001$ で有意差が存在することを表す。

[0197] その結果、ヒト肝臓癌細胞株HepG2におけるSTAR3の発現抑制は、c-Metのリン酸化レベル及びc-Metの発現量を低下させることが明らかとなった。この結果は、STAR3の発現抑制が肝臓癌細胞におけるc-Met経路(c-Metシグナリング)を阻害することを示す。

産業上の利用可能性

[0198] 本発明によれば、新たな抗癌剤を提供することができる。

請求の範囲

- [請求項1] S t A R - r e l a t e d l i p i d t r a n s f e r d o
m a i n c o n t a i n i n g 3 (S T A R D 3) / コレステロ
ールの変化 / c - M e t 経路の阻害剤を有効成分として含有する、抗
癌剤。
- [請求項2] S T A R D 3 / コレステロールの変化 / c - M e t 経路の阻害剤が
、 S T A R D 3 阻害剤、コレステロール動態制御剤又は c - M e t 阻
害剤である、請求項 1 に記載の抗癌剤。
- [請求項3] S T A R D 3 / コレステロールの変化 / c - M e t 経路の阻害剤が
、 6 7 k D a ラミニンレセプター (6 7 L R) アゴニストである、請
求項 1 又は 2 に記載の抗癌剤。
- [請求項4] 前記 6 7 L R アゴニストがエピガロカテキングレート又はその誘導
体である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の抗癌剤。
- [請求項5] 前記癌が、メラノーマ、乳癌又は肝臓癌である、請求項 1 ～ 4 のい
ずれか一項に記載の抗癌剤。
- [請求項6] 前記乳癌が、トリプルネガティブ乳癌である、請求項 5 に記載の抗
癌剤。
- [請求項7] 癌幹細胞阻害剤である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の抗癌
剤。
- [請求項8] 癌転移抑制剤である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の抗癌剤
。
- [請求項9] 請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の抗癌剤と薬学的に許容される
担体とを含有する、癌治療用医薬組成物。
- [請求項10] 被験物質の存在下で、細胞中の S T A R D 3 の発現量を測定する工
程と、
 S T A R D 3 の発現量が前記被験物質の非存在下における発現量と
比較して低下していた場合に、前記被験物質は抗癌剤であると判断す
る工程と、を備える、

抗癌剤のスクリーニング方法。

[請求項11]

被験物質の存在下で、S T A R D 3の活性を測定する工程と、
S T A R D 3の活性が前記被験物質の非存在下における活性と比較して低下していた場合に、前記被験物質は抗癌剤であると判断する工程と、を備える、

抗癌剤のスクリーニング方法。

[請求項12]

被験物質の存在下で、細胞中のコレステロールの存在量を測定する工程と、

コレステロールの存在量が前記被験物質の非存在下における存在量と比較して低下していた場合に、前記被験物質は抗癌剤であると判断する工程と、を備える、

抗癌剤のスクリーニング方法。

[請求項13]

被験物質の存在下で、細胞中のc - M e tの発現量を測定する工程と、

c - M e tの発現量が前記被験物質の非存在下における発現量と比較して低下していた場合に、前記被験物質は抗癌剤であると判断する工程と、を備える、

抗癌剤のスクリーニング方法。

[請求項14]

被験物質の存在下で、c - M e tの活性を測定する工程と、

c - M e tの活性が前記被験物質の非存在下における活性と比較して低下していた場合に、前記被験物質は抗癌剤であると判断する工程と、を備える、

抗癌剤のスクリーニング方法。

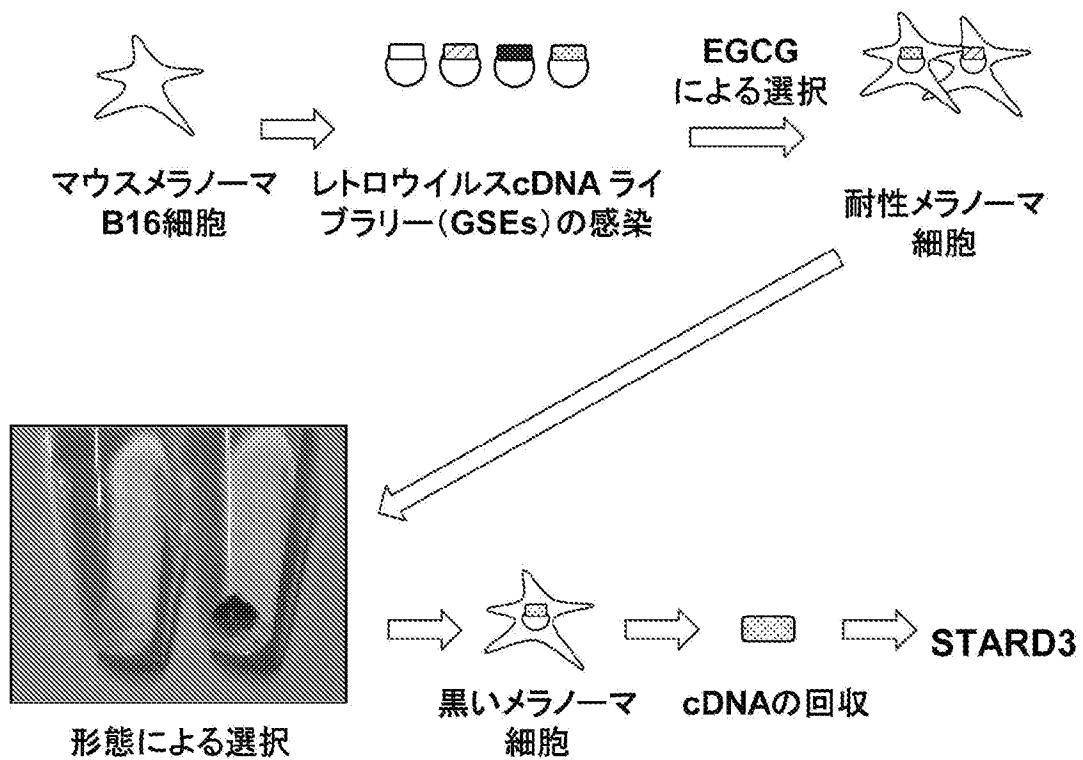
[請求項15]

前記癌が、メラノーマ、乳癌又は肝臓癌である、請求項10～14のいずれか一項に記載の抗癌剤のスクリーニング方法。

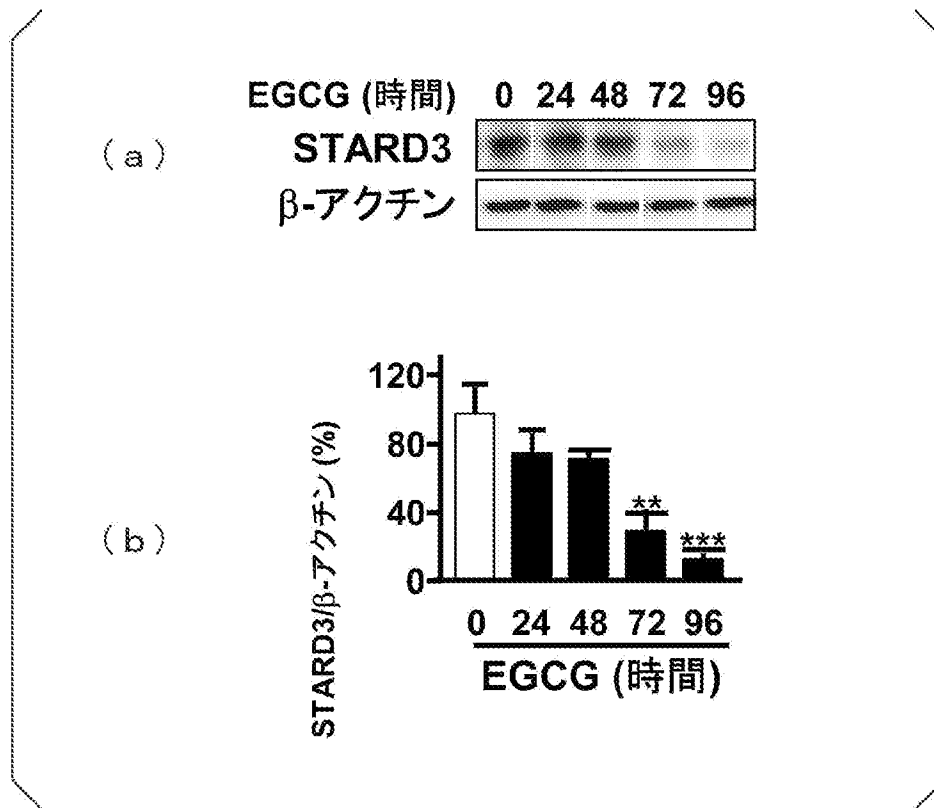
[請求項16]

前記乳癌が、トリプルネガティブ乳癌である、請求項15に記載の抗癌剤のスクリーニング方法。

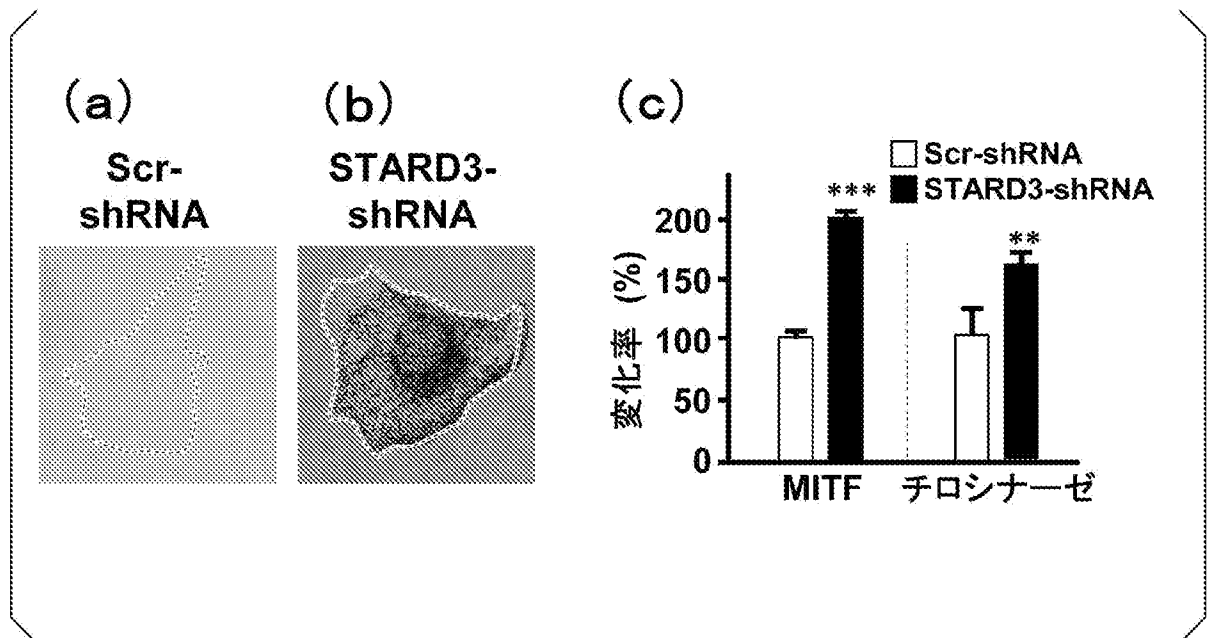
[図1]



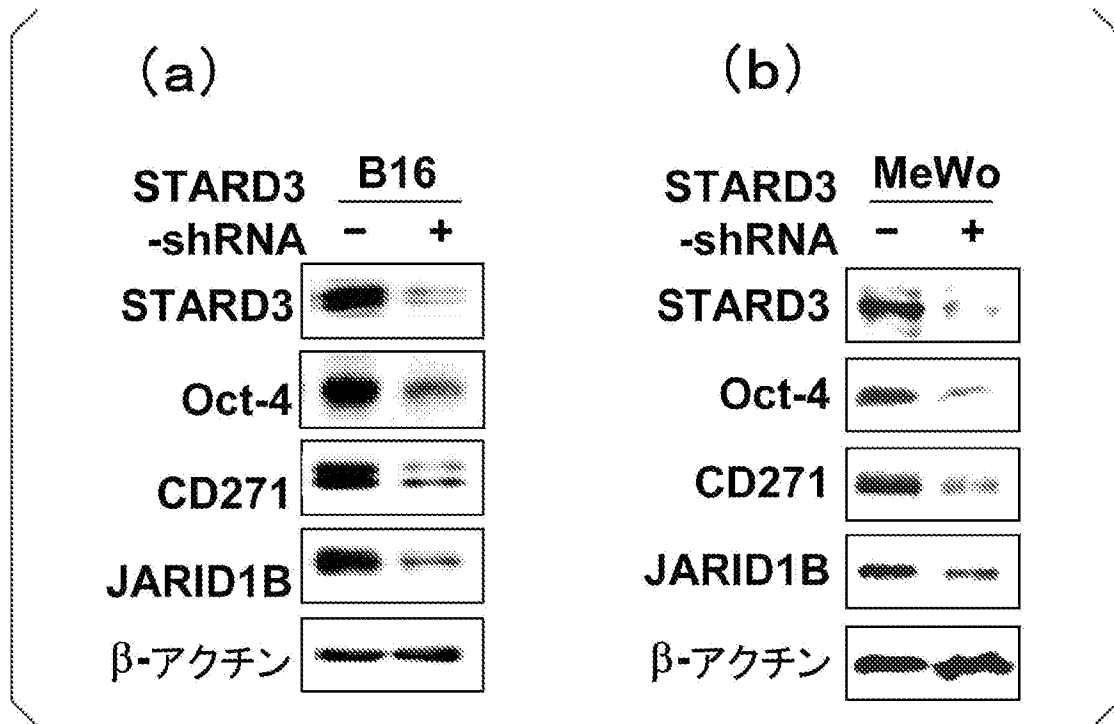
[図2]



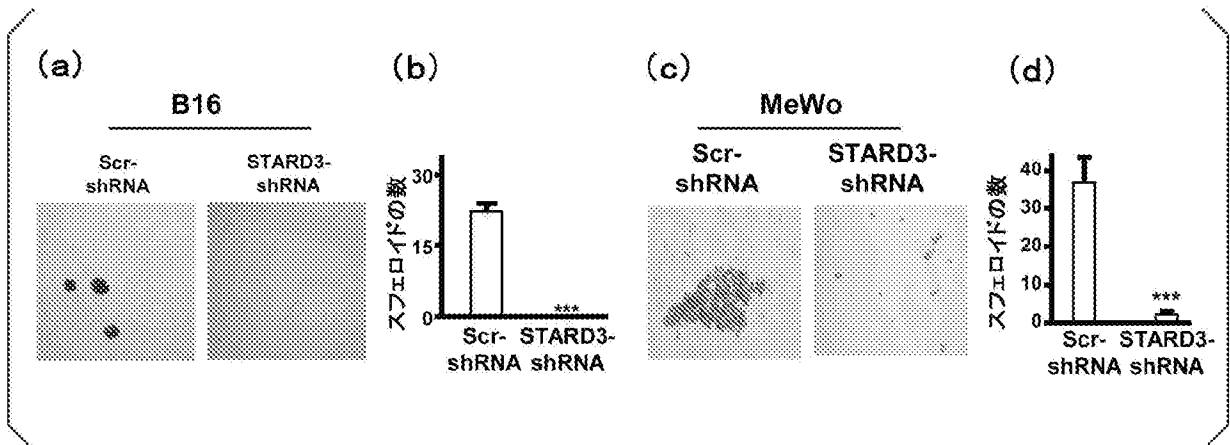
[図3]



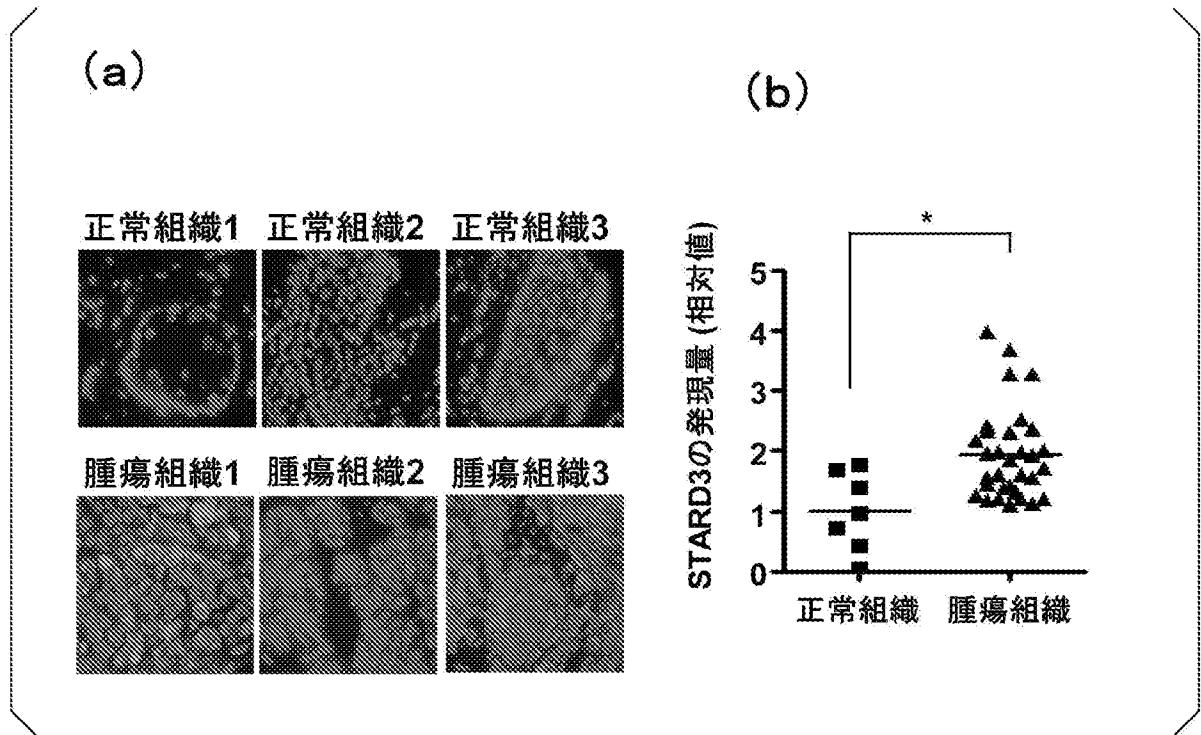
[図4]



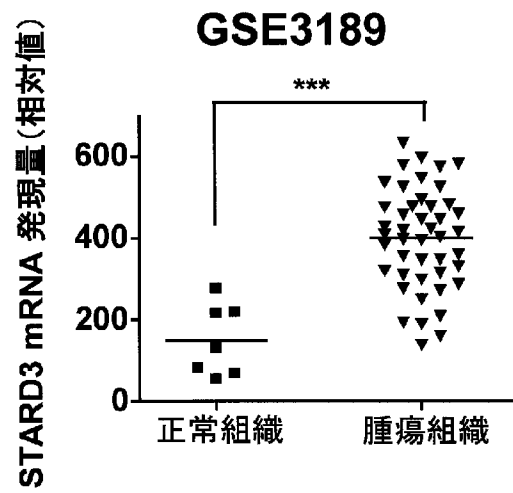
[図5]



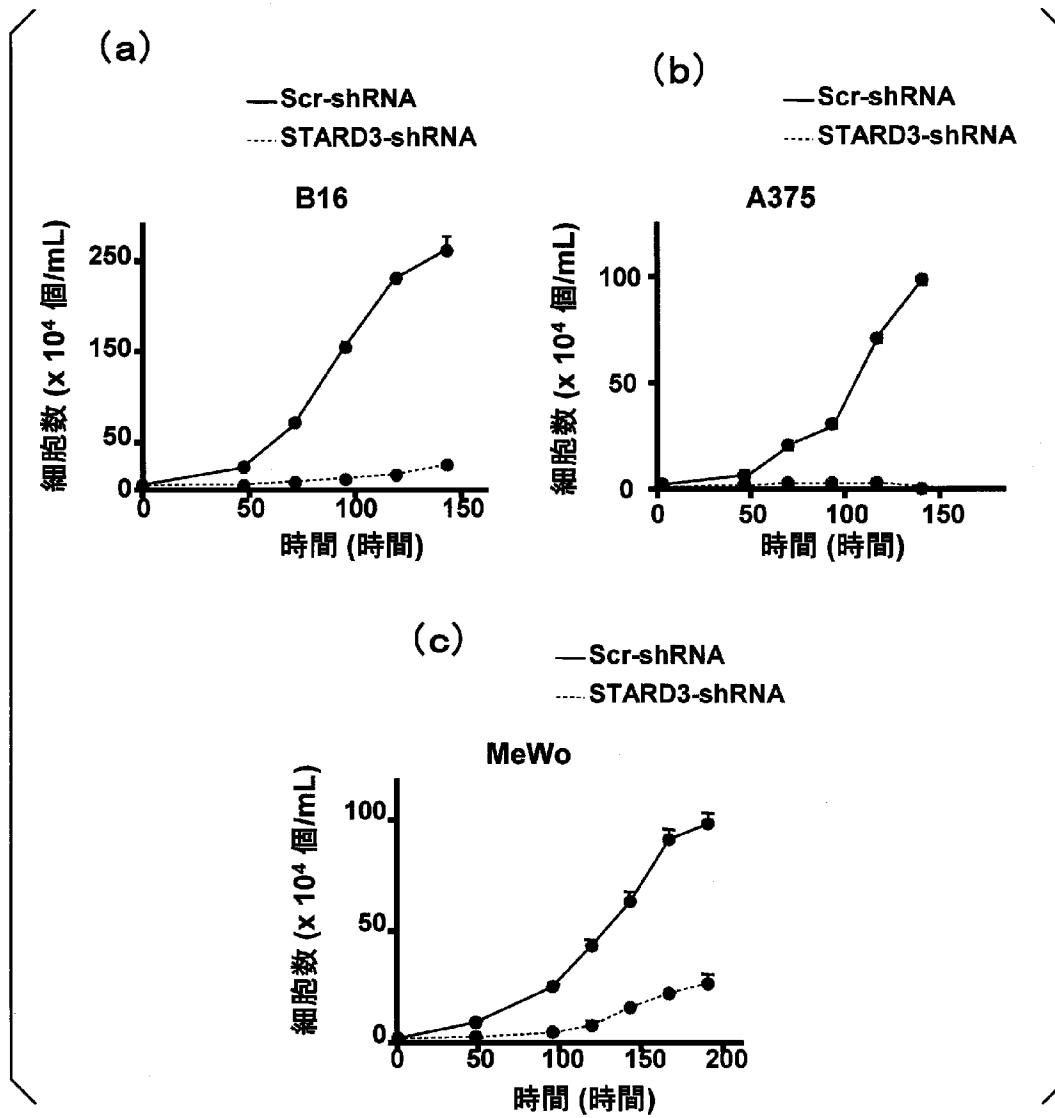
[図6]



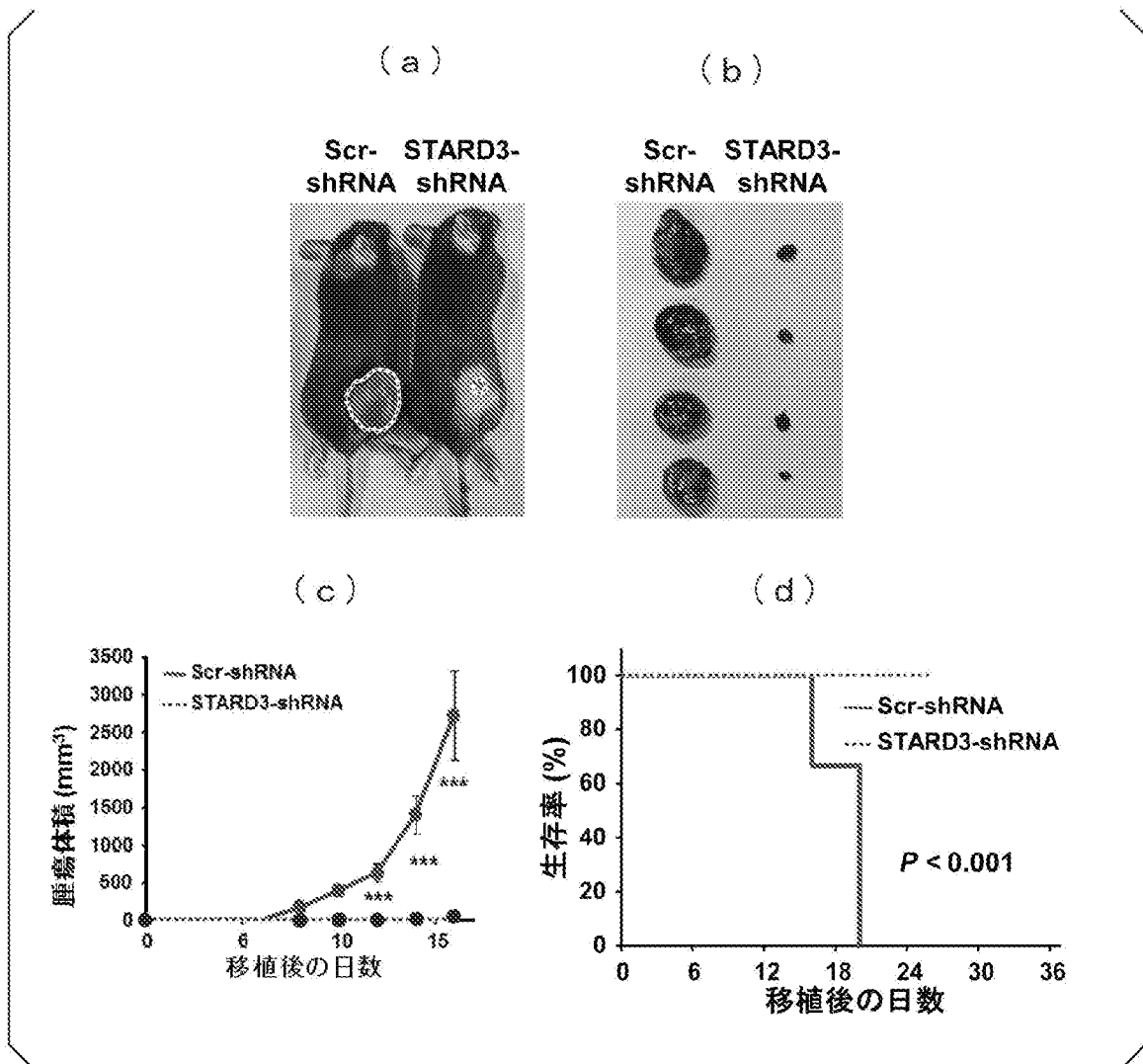
[図7]



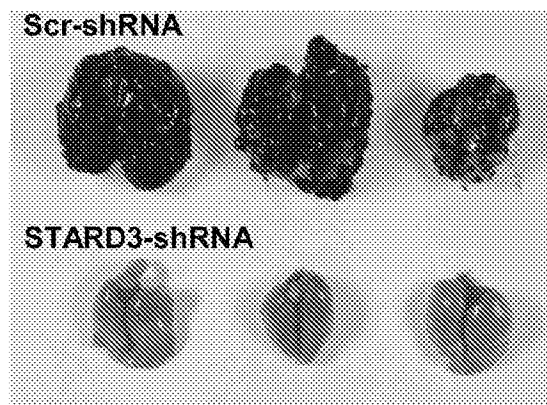
[図8]



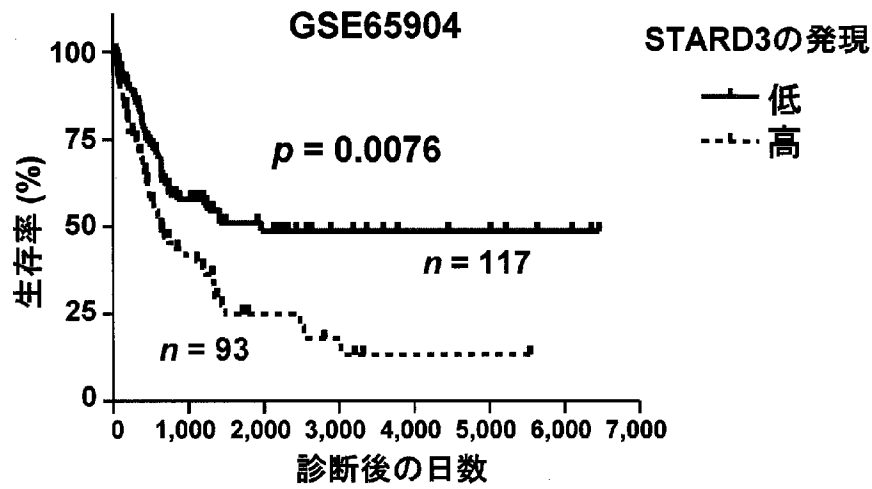
[図9]



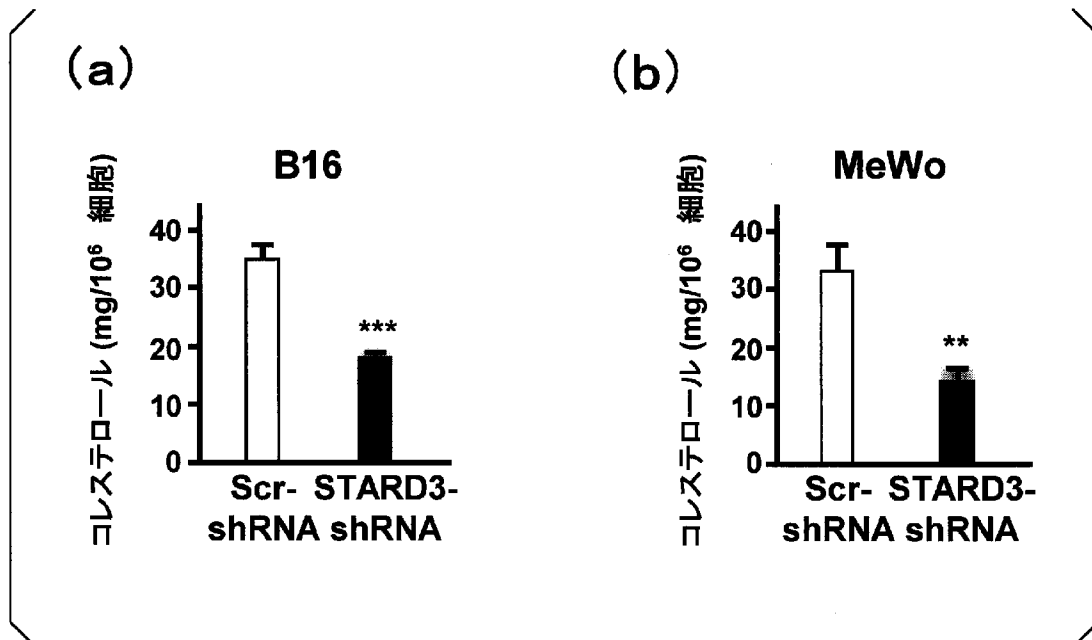
[図10]



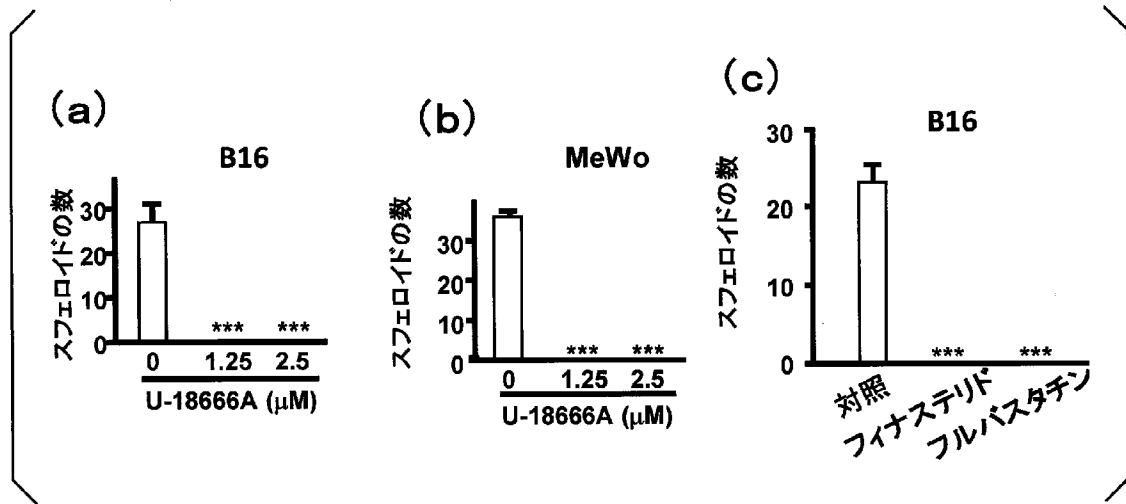
[図11]



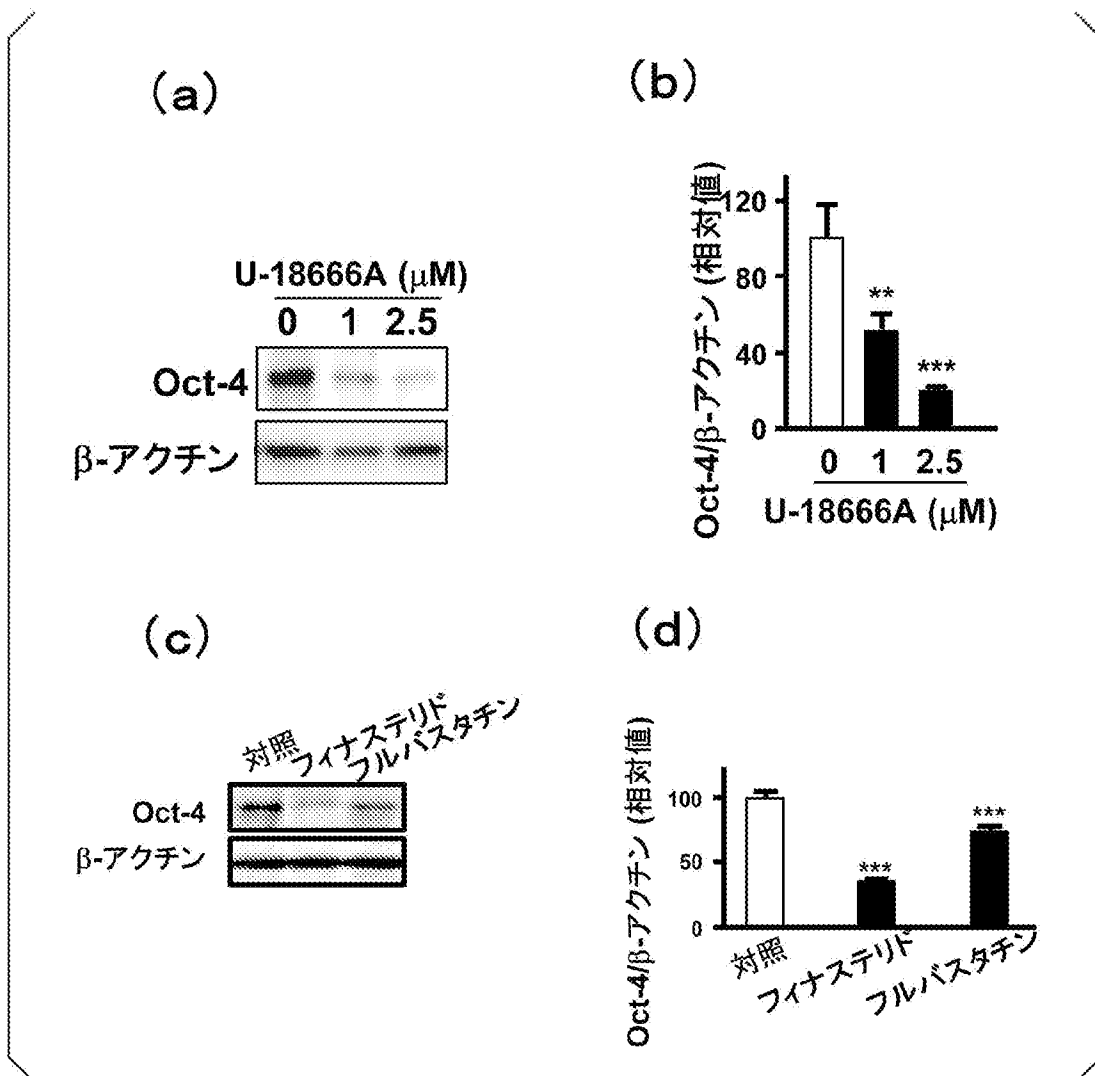
[図12]



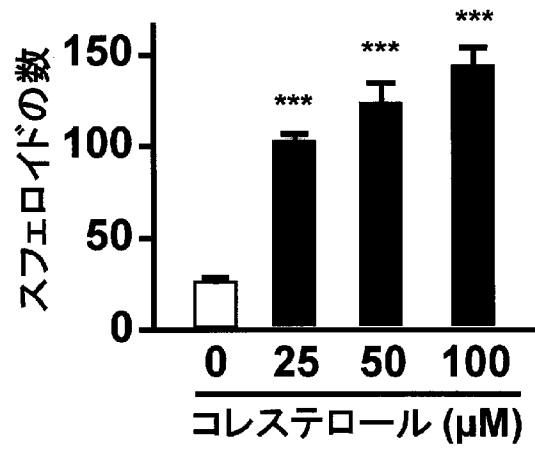
[図13]



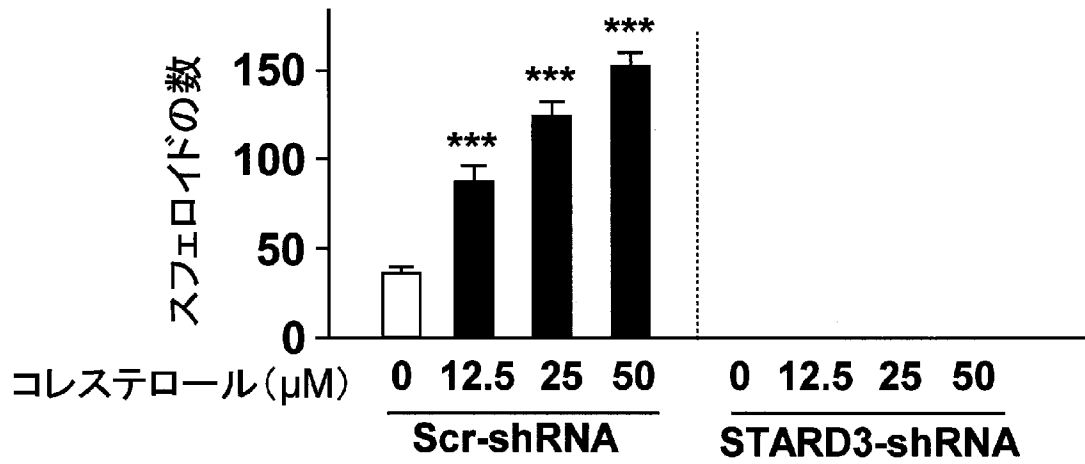
[図14]



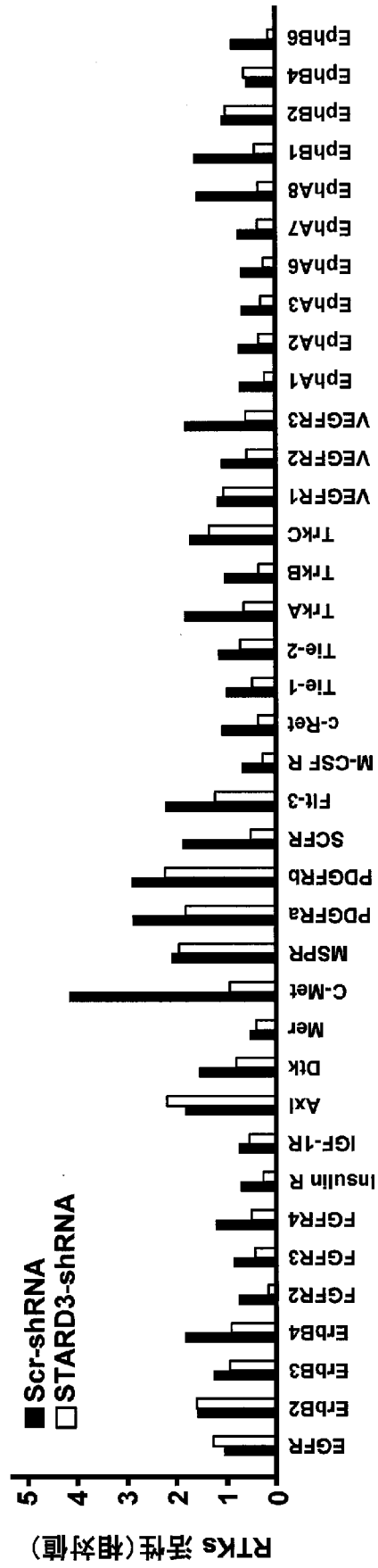
[図15]



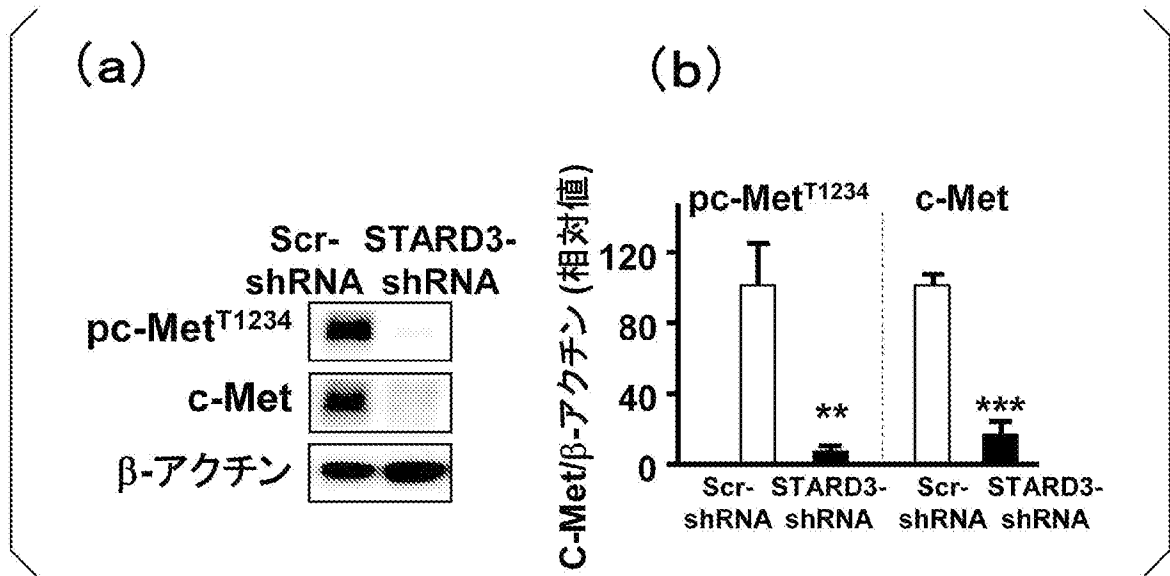
[図16]



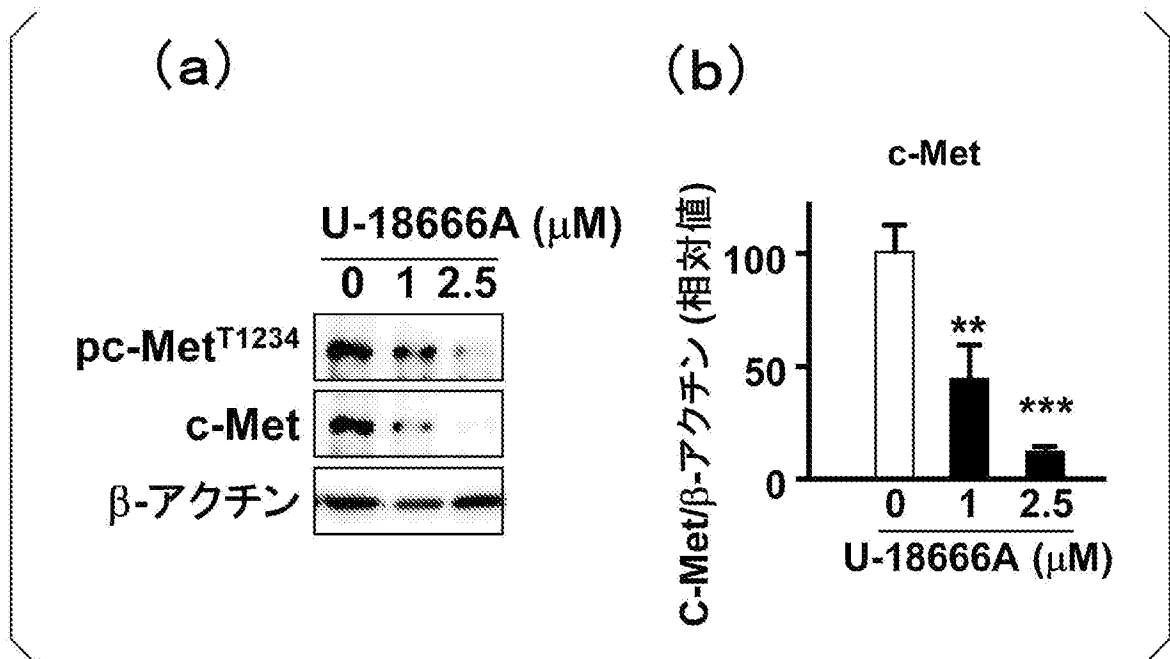
[図17]



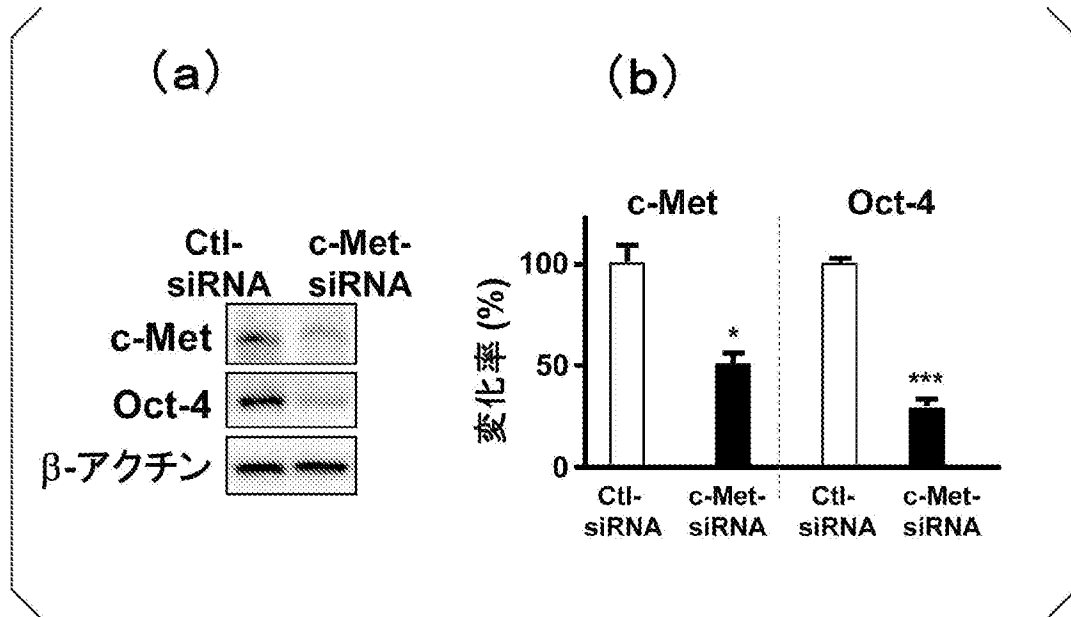
[図18]



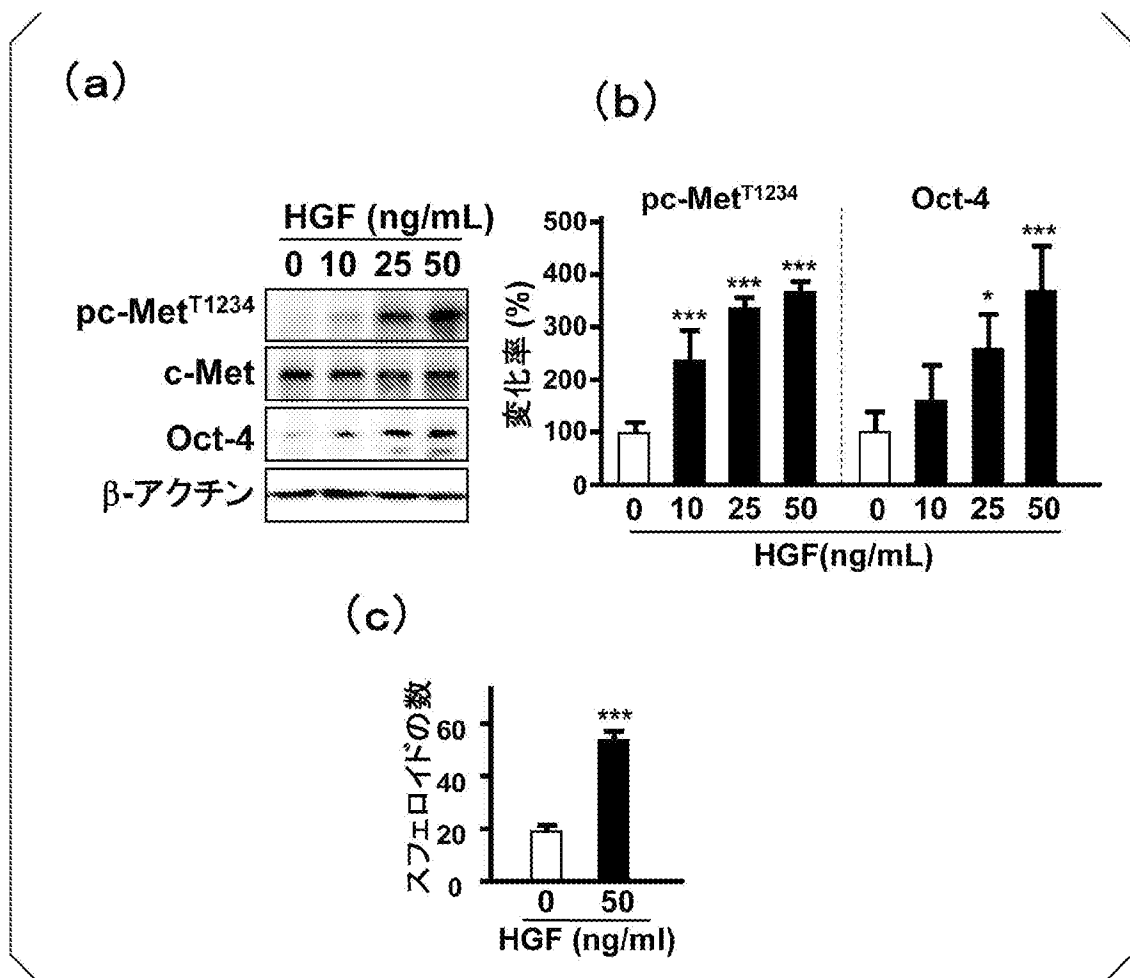
[図19]



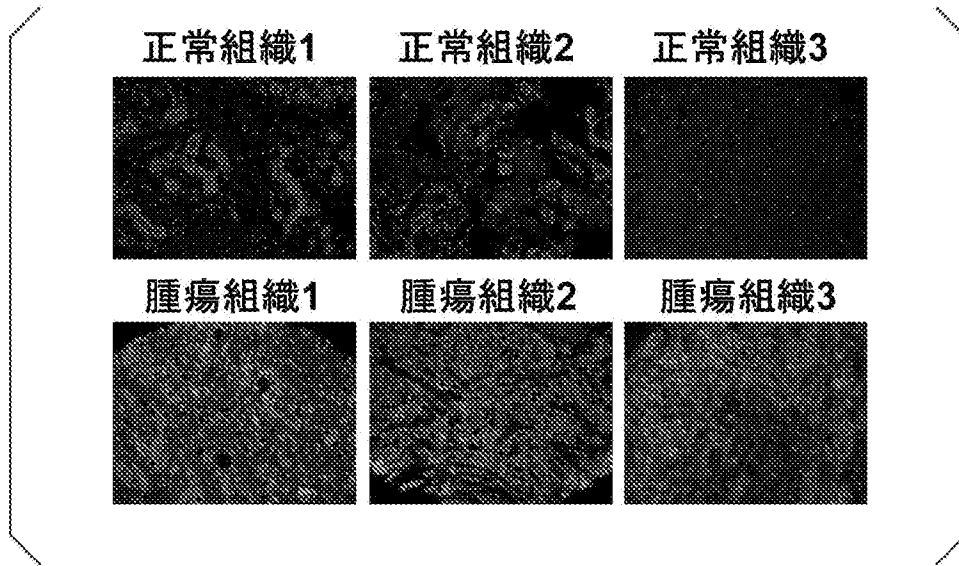
[図20]



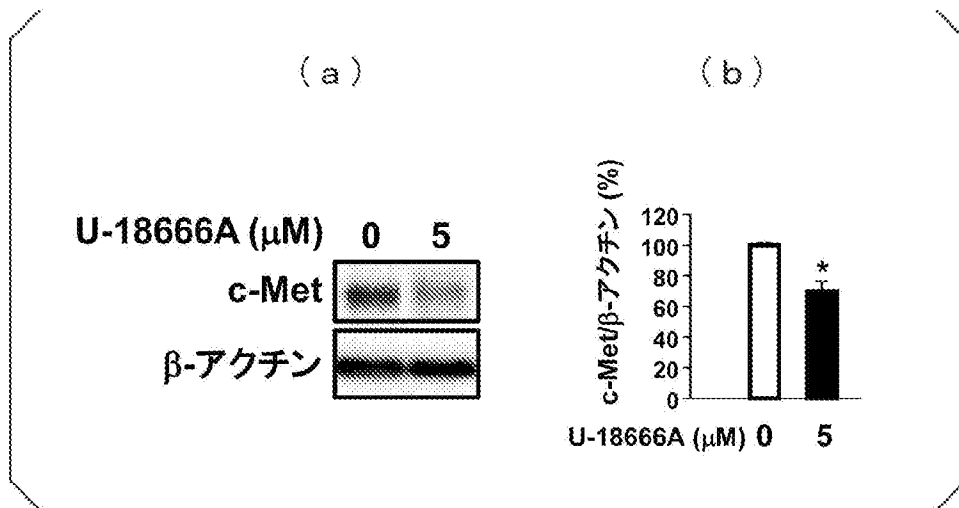
[図21]



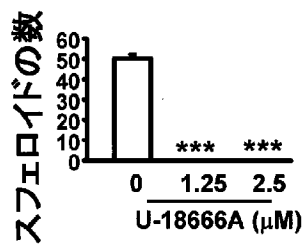
[図22]



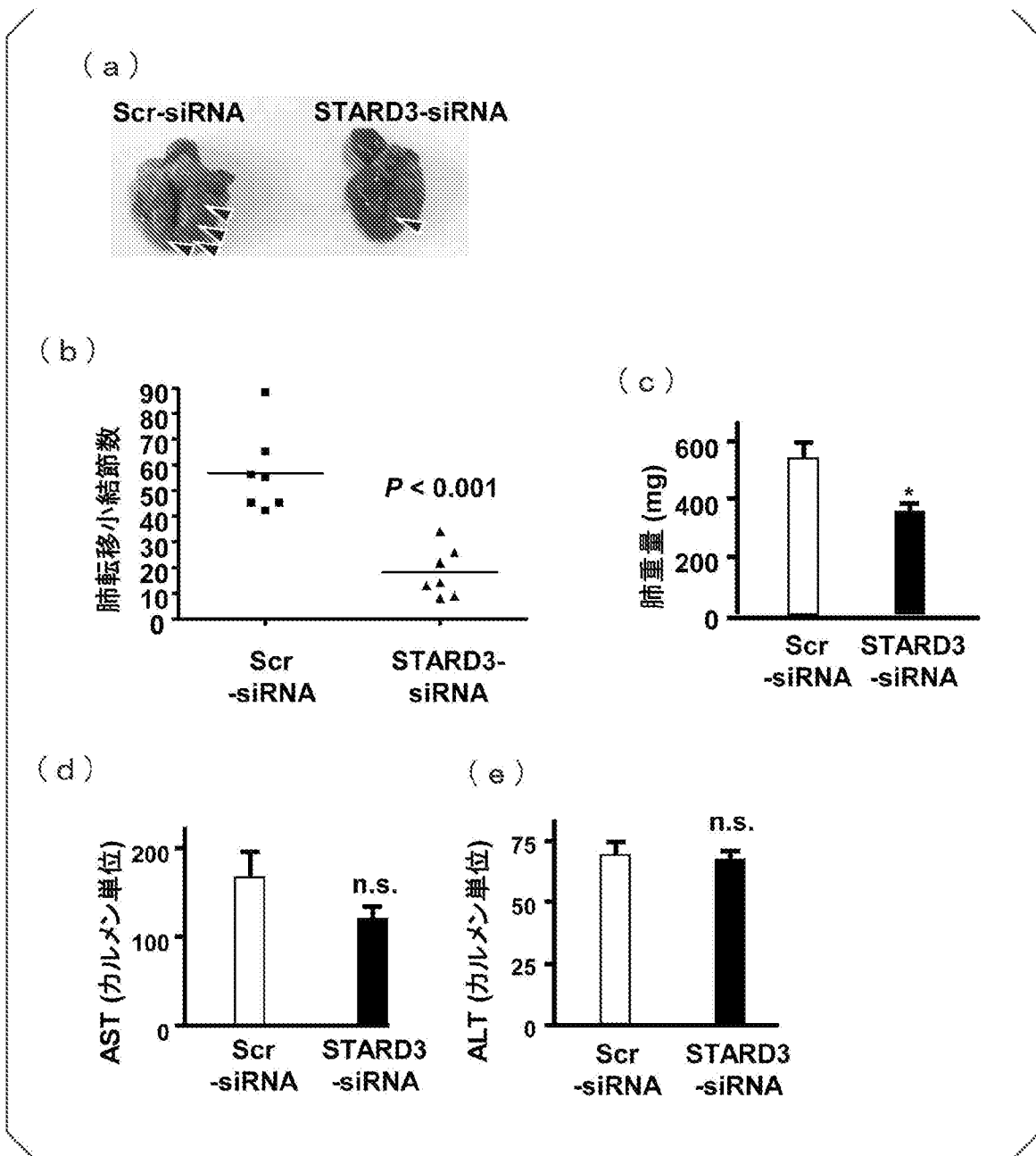
[図23]



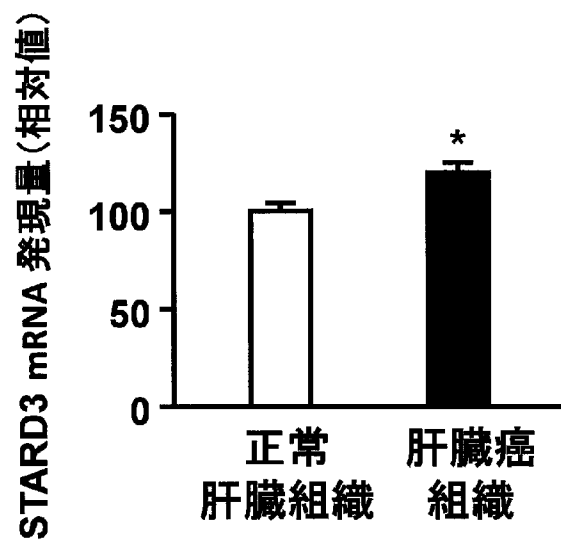
[図24]



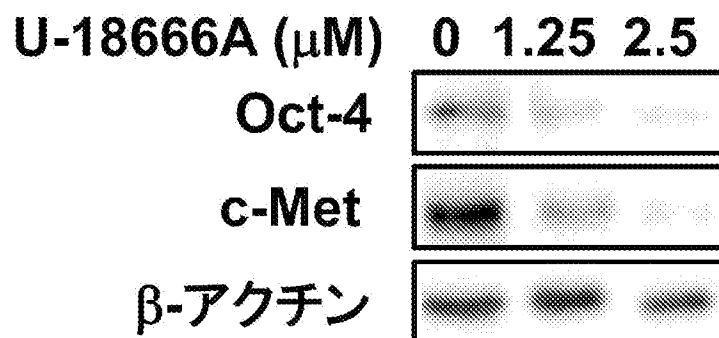
[図25]



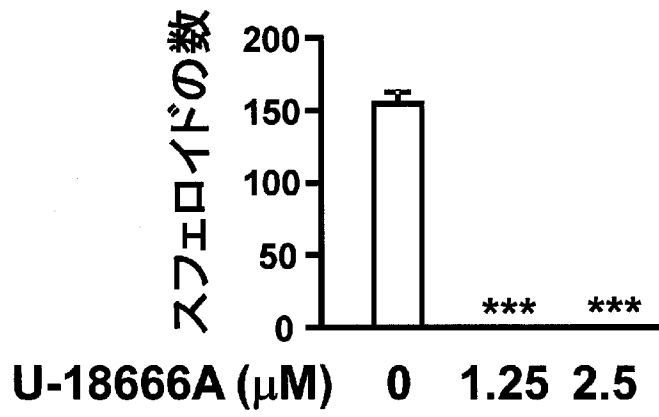
[図26]



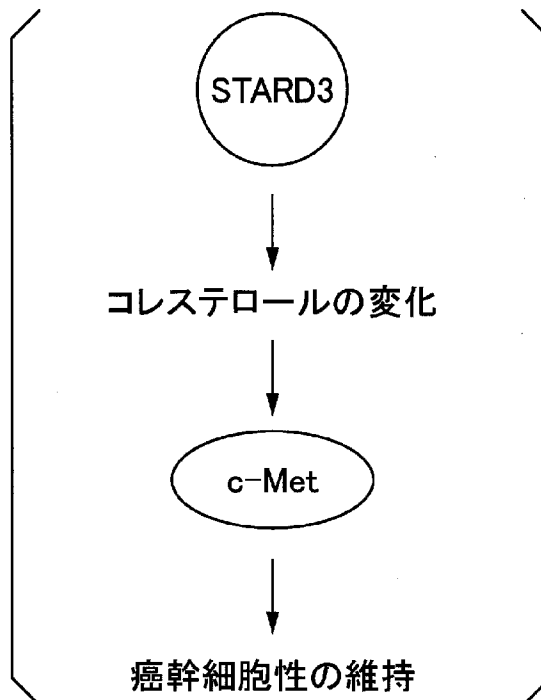
[図27]



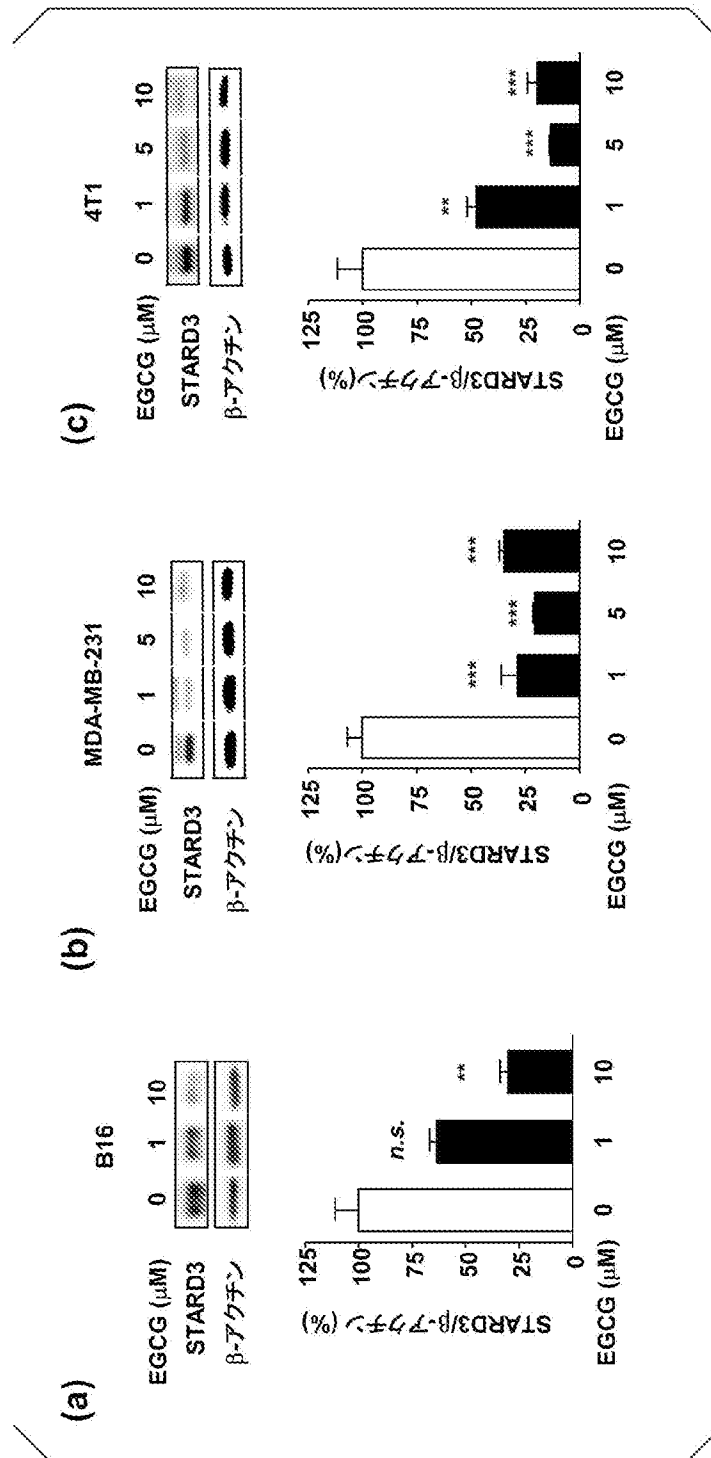
[図28]



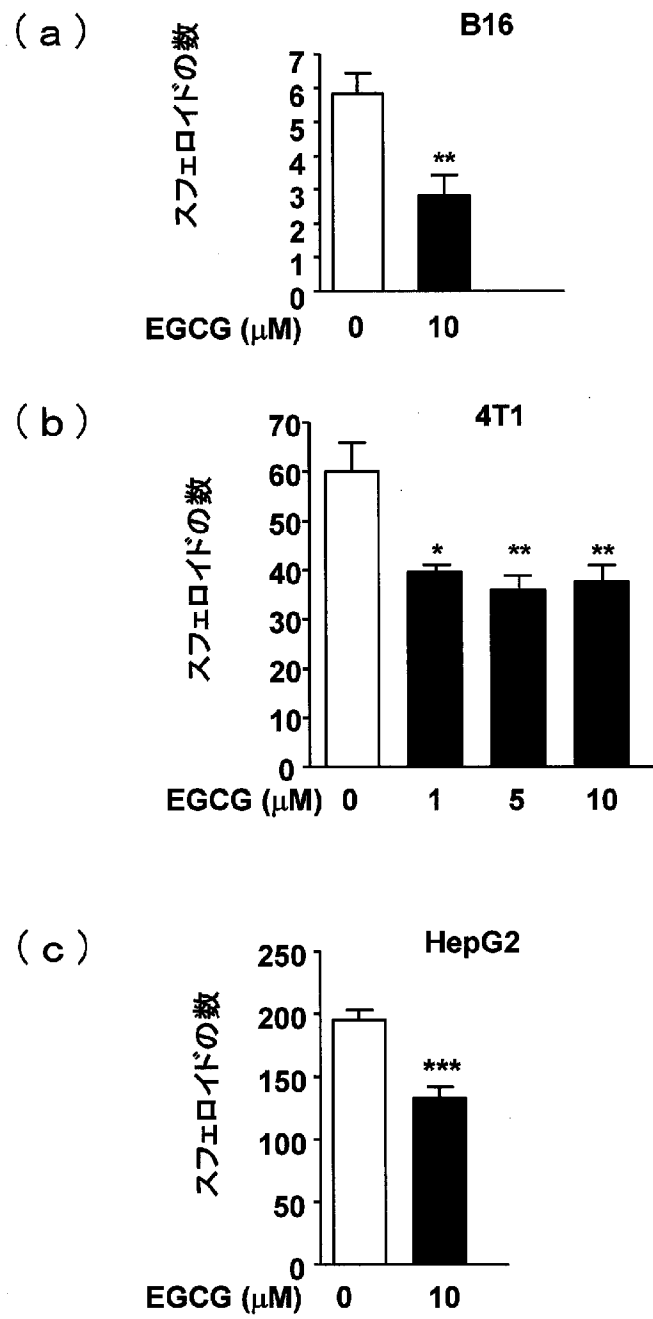
[図29]



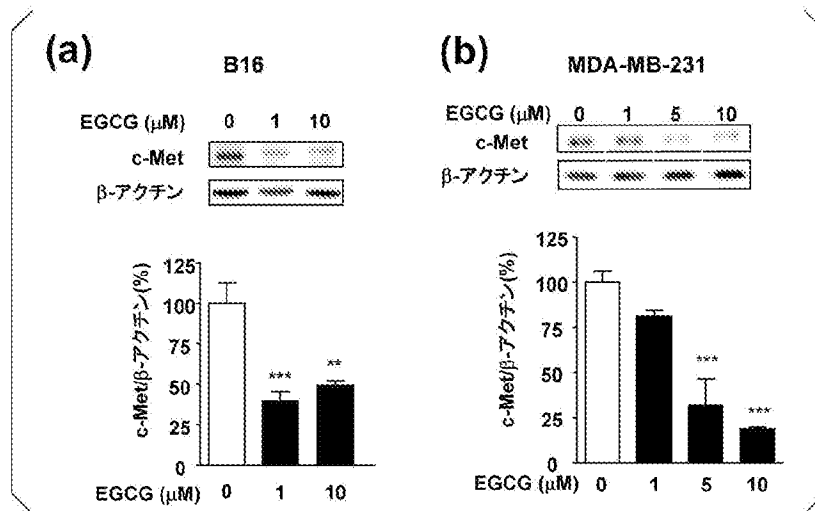
[図30]



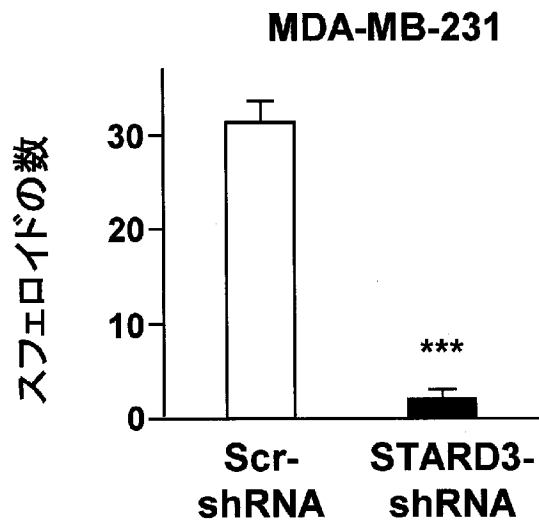
[図31]



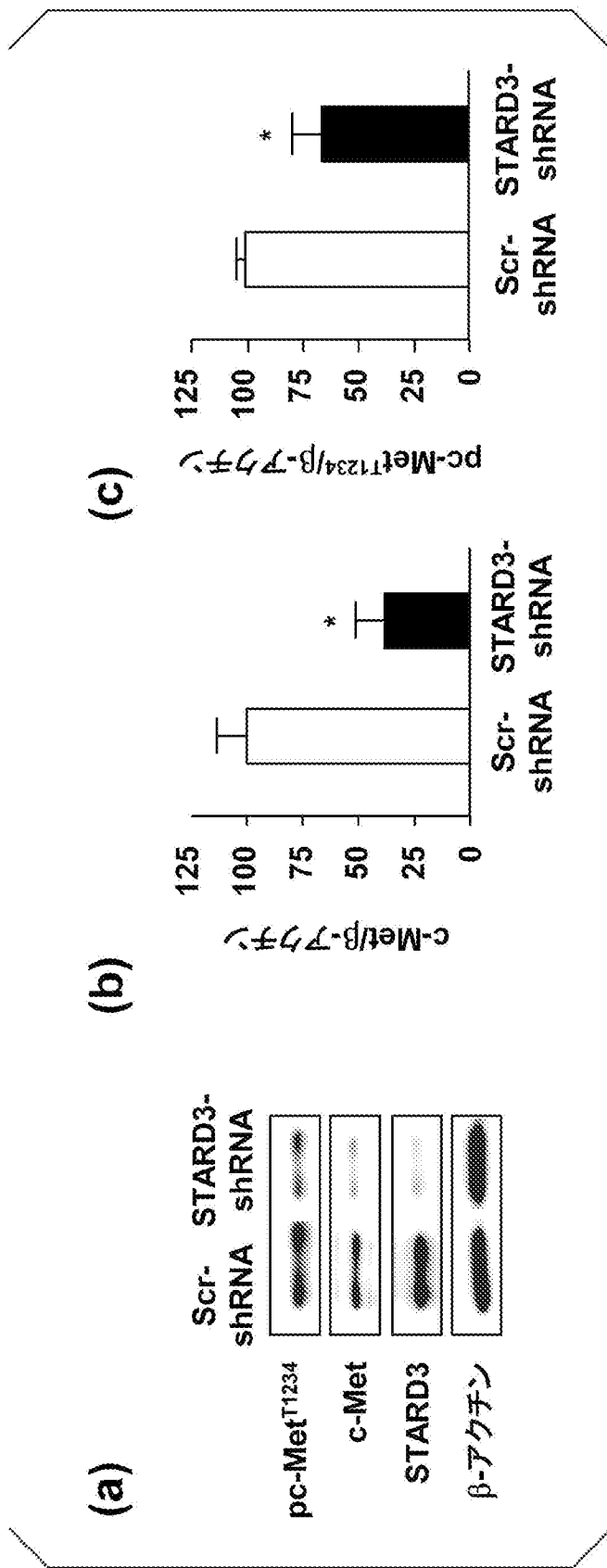
[図32]



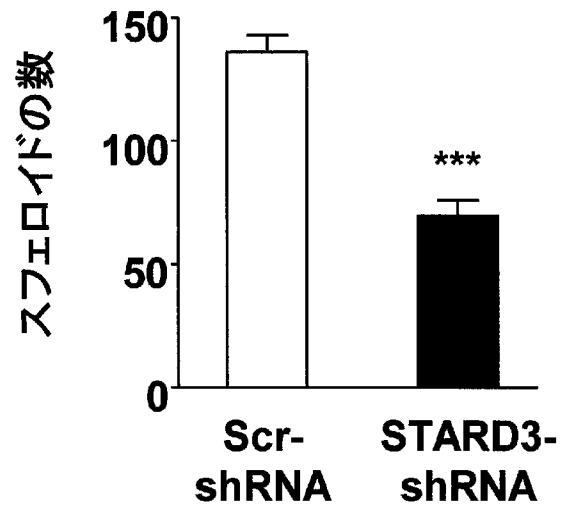
[図33]



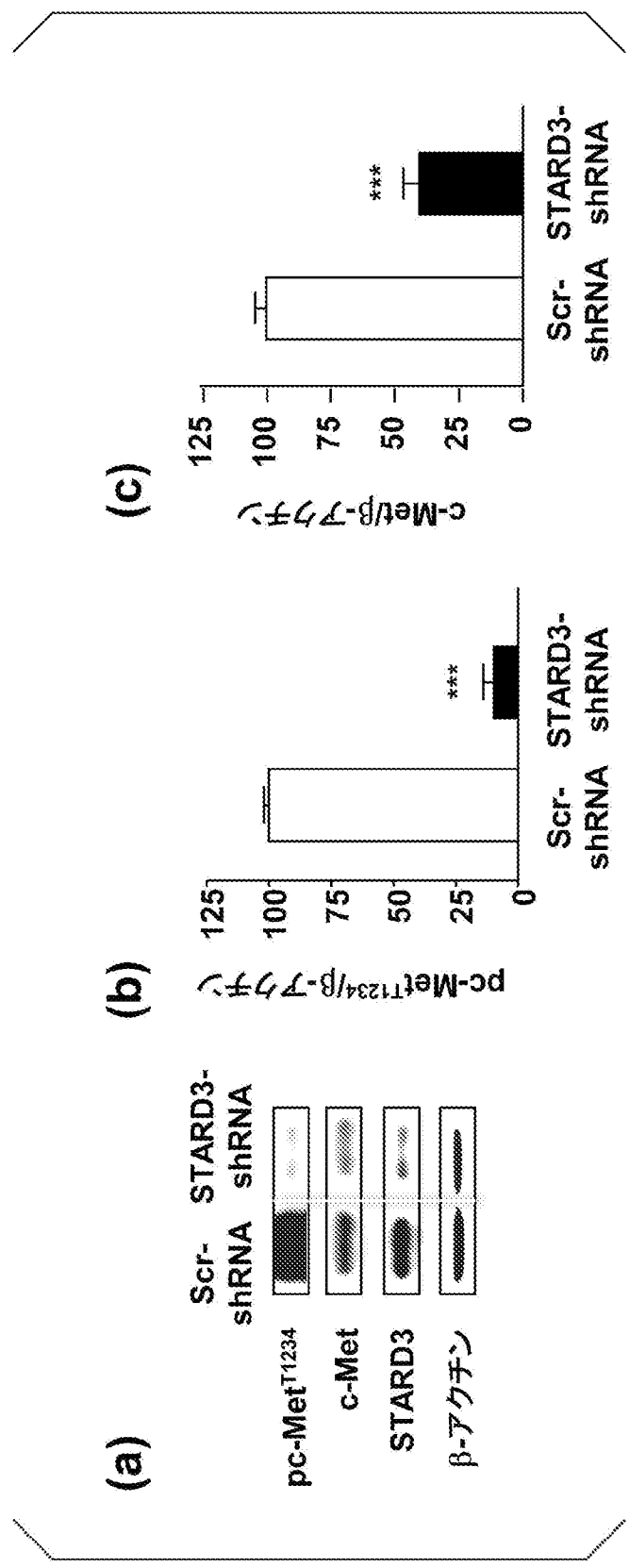
[図34]



[図35]



[図36]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/040240

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl. A61K45/00 (2006.01) i, A61K31/353 (2006.01) i, A61P35/00 (2006.01) i,
 A61P35/04 (2006.01) i, C12Q1/68 (2006.01) i, G01N33/15 (2006.01) i,
 G01N33/50 (2006.01) i, G01N33/68 (2006.01) i, G01N33/92 (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)
 Int.Cl. A61K45/00, A61K31/353, A61P35/00, A61P35/04, C12Q1/68, G01N33/15,
 G01N33/50, G01N33/68, G01N33/92

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2017
Registered utility model specifications of Japan	1996-2017
Published registered utility model applications of Japan	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHILPI, Arunima, et al., "Mechanisms of DNA methyltransferase-inhibitor interactions: Procyanidin B2 shows new promise for therapeutic intervention of cancer", Chem Biol Interact., 2015, vol. 233, pp. 122-38, p. 134, right column, fig. 146	1-9
X	KANUGULA, K. Anantha, et al., "Statin-induced inhibition of breast cancer proliferation and invasion involves attenuation of iron transport: intermediacy of nitric oxide and antioxidant defence mechanisms", FEBS J., 2014, vol. 281, pp. 3719-38, abstract	1, 2, 5-9

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 07 December 2017 (07.12.2017)	Date of mailing of the international search report 19 December 2017 (19.12.2017)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/040240

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HASSAN, Y. Ebrahim, et al., "(1S, 2E, 4S, 7E, 11E)-2, 7, 11-Cembratriene-4, 6-diol semisynthetic analogs as novel c-Met inhibitors for the control of c-Met-dependent breast malignancies.", Bioorg Med Chem., September 2016, vol. 24, pp. 5748-5761, abstract	1, 2, 5-9, 13-16
X	KAO, Jessica, et al., "RNA interference-based functional dissection of the 17q12 amplicon in breast cancer reveals contribution of coamplified genes", Genes, Chromosomes & Cancer, 2006, vol. 45, pp. 761-9, abstract	1, 2, 5-11, 15, 16
X	JP 2014-505047 A (THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI) 27 February 2014, claims 1, 3, 4, 44, paragraphs [0160]-[0163], fig. 2 & US 2014/0005187 A1 & WO 2012/092114 A2 (claims 1, 3, 4 and 44, paragraphs [0166]-[0169], fig. 2) & EP 2658544 A2	1, 2, 5-9, 12, 15, 16
X	THOMPSON, M. Ian, et al., "The Influence of Finasteride on the Development of Prostate Cancer", N Engl J Med, 2003, vol. 349, pp. 215-224, abstract	1, 2, 5-9
A	KUMAZOE, Motofumi, et al., "67-kDa laminin receptor increases cGMP to induce cancer-selective apoptosis", J Clin Invest., 2013, vol. 123, no. 2, pp. 787-99	1-16

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/353(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/04(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i, G01N33/92(2006.01)i</p>												
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K45/00, A61K31/353, A61P35/00, A61P35/04, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/68, G01N33/92</p>												
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年		
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2017年											
日本国実用新案登録公報	1996-2017年											
日本国登録実用新案公報	1994-2017年											
<p>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)</p> <p>CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>SHILPI Arunima, et al., Mechanisms of DNA methyltransferase-inhibitor interactions: Procyanidin B2 shows new promise for therapeutic intervention of cancer, Chem Biol Interact., 2015, Vol.233, p.122-38, p.134, right column, Fig.14b</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>KANUGULA K. Anantha et al., Statin-induced inhibition of breast cancer proliferation and invasion involves attenuation of iron transport: intermediacy of nitric oxide and antioxidant defence mechanisms, FEBS J., 2014, Vol.281, p.3719-38, Abstract</td> <td>1, 2, 5-9</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	SHILPI Arunima, et al., Mechanisms of DNA methyltransferase-inhibitor interactions: Procyanidin B2 shows new promise for therapeutic intervention of cancer, Chem Biol Interact., 2015, Vol.233, p.122-38, p.134, right column, Fig.14b	1-9	X	KANUGULA K. Anantha et al., Statin-induced inhibition of breast cancer proliferation and invasion involves attenuation of iron transport: intermediacy of nitric oxide and antioxidant defence mechanisms, FEBS J., 2014, Vol.281, p.3719-38, Abstract	1, 2, 5-9	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号										
X	SHILPI Arunima, et al., Mechanisms of DNA methyltransferase-inhibitor interactions: Procyanidin B2 shows new promise for therapeutic intervention of cancer, Chem Biol Interact., 2015, Vol.233, p.122-38, p.134, right column, Fig.14b	1-9										
X	KANUGULA K. Anantha et al., Statin-induced inhibition of breast cancer proliferation and invasion involves attenuation of iron transport: intermediacy of nitric oxide and antioxidant defence mechanisms, FEBS J., 2014, Vol.281, p.3719-38, Abstract	1, 2, 5-9										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「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	「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	「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	「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	「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)	「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	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
「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	「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											
「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	「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											
「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)	「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											
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献											
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願												
<p>国際調査を完了した日</p> <p>07.12.2017</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>19.12.2017</p>											
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>菊池 美香</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3439</p>	<table border="1"> <tr> <td>4U</td> <td>3954</td> </tr> </table>	4U	3954								
4U	3954											

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	HASSAN Y. Ebrahim et al., (1S, 2E, 4S, 7E, 11E)-2, 7, 11-Cembratriene-4, 6-diol semisynthetic analogs as novel c-Met inhibitors for the control of c-Met-dependent breast malignancies., Bioorg Med Chem., 2016.09, Vol.24, p.5748-5761, Abstract	1, 2, 5-9, 13-16
X	KAO Jessica et al., RNA interference-based functional dissection of the 17q12 amplicon in breast cancer reveals contribution of coamplified genes, Genes, Chromosomes & Cancer, 2006, Vol.45, p.761-9, Abstract	1, 2, 5-11, 15, 16
X	JP 2014-505047 A (ザ・キュレーターズ・オブ・ザ・ユニバーシテ ィ・オブ・ミズーリ) 2014.02.27, 請求項1、3、4、44、[0160]~[0163]、図2 & US 2014/0005187 A1 & WO 2012/092114 A2 (Claims 1, 3, 4 and 44, [0166]-[0169], Fig.2) & EP 2658544 A2	1, 2, 5-9, 12, 15, 16
X	THOMPSON M. Ian et al., The Influence of Finasteride on the Development of Prostate Cancer, N Engl J Med, 2003, Vol.349, p.215-224, Abstract	1, 2, 5-9
A	KUMAZOE Motofumi et al., 67-kDa laminin receptor increases cGMP to induce cancer-selective apoptosis, J Clin Invest., 2013, Vol.123, No.2, p.787-99	1-16