明　細　書

発明の名称 ：

癌の浸潤を抑制するための医薬組成物、及び癌の浸潤を抑制する方法

技術分野

[0001] 本発明は、ＣＨＳＴ１５　ｓｉＲＮＡを有効成分とする、固形癌及び血液癌の進展を抑制するための医薬組成物に関する。原発巣の増殖だけでは癌による死亡を説明できず、癌死の大多数は浸潤・転移、さらにはそれによる再発が要因と考えられている。浸潤は、癌の悪性度の最たる特徴であり、かつ、癌治療効果の奏効性に対する大きな障壁となっている（文献１－８）。癌を原発巣に留めさせることができれば、免疫チェックポイント阻害剤よる抗腫瘍リンパ球の効果も発揮されやすくなる他、固形癌においては外科切除により完治させることも可能になってくる。しかし、実際に癌の浸潤を抑制し、癌を原発巣に留めておくような治療は未だ臨床応用されていない。

背景技術

[0002] 癌薬物療法における抗癌剤は、DNAの複製や合成、タンパク質合成、あるいは代謝経路などに作用し、細胞の増殖や分裂を阻害する事で殺細胞効果を発揮する治療薬が従来からの主流である。すなわち、活発に増殖・分裂する正常細胞に対しても細胞毒性を示すため、副作用がほぼ必発である。分子標的薬の登場により、より癌細胞に選択的に作用できるようになり、治療成績の向上に繋がってきているものの、副作用を含めて十分な成果を得ているとは言い難く、ほとんどの患者は一次化学療法への反応が減弱し、二次あるいは三次化学療法に進行する（文献１－８）。従来の細胞増殖・分裂抑制とは異なる作用機序の抗癌剤が期待される中、患者自身が有する抗腫瘍リンパ球の効果により癌細胞を殺傷する作用を有する免疫チェックポイント阻害剤が登場し、治療成績の更なる向上が認められてきた。しかし、その効果は未だ限定的であり、更なる抗癌剤による集学的・総合的な治療が求められてきている。

[0003] 原発巣の増殖だけでは癌による死亡を説明できず、癌死の大多数は浸潤・転移、さらにはそれによる再発が要因と考えられている。浸潤は、癌の悪性度の最たる特徴であり、かつ、癌治療効果の奏効性に対する大きな障壁となっている（文献１－８）。癌を原発巣に留めさせることができれば、免疫チェックポイント阻害剤よる抗腫瘍リンパ球の効果も発揮されやすくなる他、固形癌においては外科切除により完治させることも可能になってくる。しかし、実際に癌の浸潤を抑制し、癌を原発巣に留めておくような治療は未だ臨床応用されていない。

[0004] 糖硫酸転移酵素であるＣＨＳＴ１５（Carbohydratesulfotransferase 15）はコンドロイチン硫酸Ａ（ＣＳ－Ａ）のＧａｌＮＡｃ（４ＳＯ$_4$）残基の６位に硫酸基を転移し、高度に硫酸化されたコンドロイチン硫酸Ｅ（ＣＳ－Ｅ）を合成するII型の膜貫通型ゴルジタンパク質である（文献9、10）。正常なヒト組織ではほとんど発現していないが、炎症・線維化や、癌においてその発現が増強する事が知られている。ＣＨＳＴ１５　ｓｉＲＮＡによりｍＲＮＡの発現を抑制すると、CS-Eの合成が阻害され、線維化が抑制されることが、心線維化疾患、肺線維化疾患、並びに、消化管の線維化疾患で報告されている（文献11-16）。癌においては、ヒト膵癌細胞株Panc-1に対してin vitroで細胞増殖を抑制し、かつ、Panc-1皮下移植マウスモデルにおいても腫瘍サイズの増大を抑制することが報告されており、癌細胞増殖抑制による抗腫瘍効果が知られている（文献17）。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. CA Cancer J Clin 71:7-33, 2021.

非特許文献2：Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. Front Pharmacol 9:1300, 2018.

非特許文献3：Murciano-Goroff YR, Warner AB, Wolchok JD. The future of

cancer immunotherapy: microenvironment-targeting combinations. Cell Res 6:507-519, 2020.

非特許文献4：Hegde PS, Chen DS. Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy. Immunity52:17-35, 2020.

非特許文献5：Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. Nat Rev Immunol 11:651-668,2020.

非特許文献6：Murciano-Goroff YR, Taylor BS, Hyman DM, Schram AM. Toward a More Precise Future for Oncology. Cancer Cell 37:431-442,2020.

非特許文献7：Fisher G, Rittie L. Restoration of the basement membrane after wounding: a hallmark of young human skin alters with aging. J Cell Commun Signal 12: 401-411, 2018.

非特許文献8：Martinez M, Moon EK. CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment. Front Immunol10:128, 2019.

非特許文献9：Ohtake S, Kondo S, Morisaki T, et al. Expression of sulfotransferase involved in the biosynthesis of chondroitin sulfate E in the bone marrow derived mast cells. Biochemical Biophysica Acta 1780 : 687-95, 2008.

非特許文献10：Habuchi O, Moroi R, Ohtake S, et al. Enzymatic synthesis of chondroitin sulfate E by N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase purified from squid cartilage. Anal Biochem 310: 129-36, 2002.

非特許文献11：Kai Y, Tomoda K, Yoneyama H et al. Silencing of carbohydrate sulfotransferase 15 hinders murine pulmonary fibrosis development. Mol Ther Nucleic Acid 6: 163-172, 2017.

非特許文献12：Sato H, Sagara S, Nakajima S, et al. Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection, using siRNA-

based silencing of carbohydrate sulfotransferase 15 in pig. Endoscopy 49: 491-497, 2017.

非特許文献13：Suzuki K, Yokoyama J, Kawauchi Y, et al. Phase 1 clinical study of siRNA targeting carbohydrate sulfotransferase 15 in Crohn's disease patients with active mucosal lesions. J Crohns Colitis 11: 221-228, 2017.

非特許文献14：Suzuki K, Arumugam S, Yokoyama J, et al. Pivotal role of carbohydrate sulfotransferase 15 in fibrosis and mucosal healing in mouse colitis. PLoS One 11: e0158977, 2016.

非特許文献15：Watanabe K, Arumugam S, Sreedhar R, et al. Small interfering RNA therapy against carbohydrate sulfotransferase 15 inhibits cardiac remodeling in rats with dilated cardiomyopathy. Cell Signal 27: 1517-1524, 2015.

非特許文献16：Yamada S and Sugahara K. Potential therapeutic Application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate. Current Drug Discovery Technologies 5: 289-301, 2008.

非特許文献17：Takakura K, Shibazaki Y, Yoneyama H, et al. Inhibition of Cell Proliferation and Growth of Pancreatic Cancer by Silencing of Carbohydrate Sulfotransferase 15 In Vitro and in a Xenograft Model. PLoS One 10:e0142981, 2015.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、固形癌及び血液癌において、癌細胞の浸潤を抑制し、進展せずに留めておくための医薬組成物（以下、癌の浸潤抑制剤ともいう）の提供を課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、種々のヒト癌細胞株を用いて、ＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡの効果を調べたところ、従来技術から予測されていた

癌細胞の増殖抑制効果とは全く異質の、癌細胞の進展を抑制し、局所に留めておく効果を有する事を見出した。また、その効果は固形癌細胞のみならず、血液癌細胞に対しても有している事も見出した。増殖コントロールとは異なる機序で癌細胞を局所に留めておくことにより、従来の増殖・分裂抑制機序に基づく抗癌剤や分子標的医薬の副作用を軽減しうる併用療法、抗腫瘍免疫機序に基づく免疫チェックポイント阻害剤との併用療法、さらには、浸潤・転移の抑制による外科手術や放射線療法の効果を高めるなど、集学的な癌の治療、再発予防への応用が期待された。

[0008] より具体的には、本発明は以下の〔１〕～〔８〕を提供するものである。

［１］ＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡを含む、癌の浸潤を抑制するための医薬組成物。

［２］癌の転移を抑制するための、［１］記載の医薬組成物。

［３］癌が、固形癌又は血液癌である、［１］又は［２］記載の医薬組成物。

［４］癌を留めておくことにより進展を抑制することを特徴とする、〔１〕～〔３〕のいずれか記載の医薬組成物。

［５］ＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡを投与する工程を含む、癌の浸潤を抑制する方法。

［６］癌の浸潤を抑制する方法において用いるための、ＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡ。

［７］癌の浸潤抑制剤の製造における、ＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡの使用。

［８］ＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡを使用する工程を含む、癌の浸潤抑制剤の製造方法。

発明の効果

[0009] 癌細胞の進展には、原発巣での増殖、浸潤、転移、転移巣での血管新生、というプロセスがあり、各異なるメカニズムで制御されている。既存の抗癌剤や分子標的医薬の多くは増殖抑制が主体であるが、正常細胞へも影響を及

ぼすことによる副作用の問題がある。また、細胞の増殖・遊走のDichotomy（増殖か遊走かの二者択一）により、増殖が抑制されると逆に遊走が活発化し得ることが、とりわけ遊走能の高い癌細胞においては抗癌剤や放射線治療に対する一因とされる。そのため、CHST15 siRNAにおいても、従来報告されていた増殖抑制作用から考えると、逆に遊走を活発化させる可能性が懸念されていた。

そこで、既報のPanc-1細胞と同じく膵癌ではあるが別細胞株であるBxPC-3細胞を用いて、in vitro試験を実施したところ、CHST15 siRNAを加えてCHST15 の発現を抑制することにより、増殖抑制効果はほとんど認めなかったが、浸潤が抑制されると言う予想外の結果を得た。更に驚くべくことに、固形癌のみならず、血液癌に対してもこの浸潤抑制効果を有することが初めて明らかになった。

本発明によれば、従来の増殖・分裂抑制機序に基づく抗癌剤や分子標的医薬の副作用を軽減しうる併用療法、抗腫瘍免疫機序に基づく免疫チェックポイント阻害剤との併用療法、さらには、浸潤・転移の抑制による外科手術や放射線療法の効果を高めるなど、集学的な癌の治療、再発予防への応用が可能である。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図１は、ヒト膵癌細胞株BxPC-3における、CHST15 siRNAによるノックダウン効果（A）、増殖抑制効果（B）、および浸潤抑制効果（C）を示す。

[図2]図２は、各種ヒト癌細胞株における、CHST15 siRNAによる浸潤抑制効果を示す。ヒト甲状腺未分化癌細胞株ASH-３、ヒト肺癌細胞株A549、ヒト乳癌細胞株BT-549、ヒト胃癌細胞株NUGC-3、ヒト卵巣癌細胞株OVCAR-3などの固形癌の他、ヒト多発性骨髄腫の癌細胞株RPMI8226においても浸潤抑制を示した。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明を詳細に説明する。

本発明者は、ＣＨＳＴ１５(Carbohydrate sulfotransferase 15)遺伝子の

発現を抑制することにより、固形癌のみならず、血液癌に対しても浸潤抑制効果が発揮されることを見出した。より詳しくは、本発明者は、ＣＨＳＴ１５遺伝子の発現をＲＮＡｉ（RNA interferance；RNA干渉）効果によって抑制することにより、固形癌のみならず、血液癌に対しても浸潤抑制効果があることを見出した。

[0012] 本発明のＣＨＳＴ１５遺伝子は特に制限されるものではないが、通常、動物由来であり、より好ましくは哺乳動物由来であり、最も好ましくはヒト由来である。なお、本発明のCHST15は、別称として、ＧａｌＮＡｃ４Ｓ－６ＳＴ（N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-0 sulfotransferase)とも呼ばれる。

[0013] 本発明のＣＨＳＴ１５（ＧａｌＮＡｃ４Ｓ－６ＳＴ）の配列は、例えば、アクセッション番号ＮＭ＿０１５８９２に基づいて取得することができる。一例として、本発明のＣＨＳＴ１５遺伝子の塩基配列を配列番号：３に、該遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を配列番号：４へ記載する。上記以外のアミノ酸配列からなるタンパク質であっても、例えば配列番号：４に記載された配列と高い同一性（通常７０％以上、好ましくは８０％以上、より好ましくは９０％以上、最も好ましくは９５％以上）を有し、かつ、上記タンパク質が有する機能を持つタンパク質は、本発明のＣＨＳＴ１５タンパク質に含まれる。上記タンパク質とは、例えば、配列番号：４に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が付加、欠失、置換、挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、通常変化するアミノ酸数が３０アミノ酸以内、好ましくは１０アミノ酸以内、より好ましくは５アミノ酸以内、最も好ましくは３アミノ酸以内である。

[0014] 本発明における上記遺伝子には、例えば、配列番号：３に記載の塩基配列からなるＤＮＡに対応する他の生物における内在性の遺伝子（ヒトの上記遺伝子のホモログ等）が含まれる。また、配列番号：３に記載の塩基配列からなるＤＮＡに対応する他の生物の内在性のＤＮＡは、一般的に、それぞれ配列番号：３に記載のＤＮＡと高い同一性（相同性）を有する。高い同一性と

は、好ましくは７０％以上、さらに好ましくは８０％以上、より好ましくは９０％以上（例えば、９５％以上、さらには９６％、９７％、９８％または９９％以上）の相同性を意味する。この相同性は、ｍＢＬＡＳＴアルゴリズム（Altschul et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7）によって決定することができる。また、該ＤＮＡは、生体内から単離した場合、それぞれ配列番号：３に記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすると考えられる。ここで「ストリンジェントな条件」としては、例えば「2×SSC、0.1%SDS、50℃」、「2×SSC、0.1%SDS、42℃」、「1×SSC、0.1%SDS、37℃」、よりストリンジェントな条件として「2×SSC、0.1%SDS、65℃」、「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」および「0.2×SSC、0.1%SDS、65℃」の条件を挙げることができる。

[0015] 本明細書において、「ＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡ」は、「ＣＨＳＴ１５　ｓｉＲＮＡ」と表現することもでき、好ましくは一方の鎖の３’端及び他方の鎖の３’端にオーバーハングした塩基を有する構造のｓｉＲＮＡであり、より好ましくは、配列番号：１および２に記載されたＲＮＡがハイブリダイズした構造のｓｉＲＮＡである。

[0016] 本発明におけるｓｉＲＮＡは、必ずしも全てのヌクレオチドがリボヌクレオチド（ＲＮＡ）でなくともよい。即ち、本発明において、ｓｉＲＮＡを構成する１もしくは複数のリボヌクレオチドは、分子自体としてＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制する機能を有するものであれば、対応するデオキシリボヌクレオチドであってもよい。この「対応する」とは、糖部分の構造は異なるものの、同一の塩基種（アデニン、グアニン、シトシン、チミン（ウラシル））であることを指す。例えば、アデニンを有するリボヌクレオチドに対応するデオキシリボヌクレオチドとは、アデニンを有するデオキシリボヌクレオチドのことを言う。また、前記「複数」とは特に制限されないが、好ましくは２～５個程度の少数を指す。

[0017] 本発明のｓｉＲＮＡは、当業者においては市販の核酸合成機を用いて適宜

作製することが可能である。また、所望のＲＮＡの合成については、一般の合成受託サービスを利用することが可能である。

[0018] 本発明のＣＨＳＴ１５　ｓｉＲＮＡは、単剤で癌の浸潤を抑制する、又は癌を留めておく効果を有することから、本発明は、ＣＨＳＴ１５　ｓｉＲＮＡを有効成分として含む、癌の浸潤抑制剤、すなわち癌の浸潤を抑制する治療または予防するための医薬組成物を提供する。あるいは、本発明は、ＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡを投与する工程を含む、癌の浸潤を抑制するする方法、癌の浸潤を抑制する方法において用いるためのＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡ、復剤の製造におけるＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡの使用、およびＣＨＳＴ１５の発現を抑制するｓｉＲＮＡを使用する（製剤化するおよび/または薬学的もしくは生理学的に許容される担体と混合する）工程を含む癌の浸潤抑制剤の製造方法を提供する。

[0019] 本発明における治療または予防の対象となる癌とは、本発明のＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡが治療効果を発揮する固形癌、及び血液癌であれば特に限定されないが、乳腺、心臓、肺、小腸、大腸、脾臓、腎臓、膀胱、頭部、頸部、卵巣、前立腺、脳、膵臓、皮膚、骨、骨髄、血液、胸腺、子宮、精巣、及び肝臓の癌又は腫瘍を含む。特定の実施態様では、本発明における治療又は予防の対象となる癌は、腫瘍も含み、腺腫、腺癌、血管肉腫、星状細胞腫、上皮癌、胚細胞腫、神経膠芽腫、神経膠腫、血管内皮腫、血管肉腫、血腫、肝芽腫、白血病、リンパ腫、髄芽腫、黒色腫、神経芽細胞腫、骨肉腫、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、肉腫、奇形腫、末端黒子型黒色腫、日光角化症、腺癌、腺様嚢胞癌、腺腫、腺肉腫、腺扁平上皮癌、星細胞腫、バルトリン腺癌、基底細胞癌、気管支腺癌、毛細血管カルチノイド、細胞癌、癌肉腫、胆管細胞癌、軟骨肉腫、嚢胞腺腫、卵黄嚢腫瘍、子宮内膜増殖症、子宮内膜間質肉腫、類内膜腺癌、上衣腫、ユーイング肉腫、限局性結節性過形成、ガストリン産生腫瘍、生殖系列腫瘍、神経膠腫、グルカゴン産生腫瘍、血管芽腫、血管内皮腫、血管腫、肝腺腫、肝腺腫症、肝細胞癌、

インスリナイト、上皮内腫瘍、上皮内扁平細胞腫瘍、浸潤性扁平細胞癌、大細胞癌、脂肪肉腫、肺癌、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、平滑筋肉腫、黒色腫、悪性黒色腫、悪性中皮腫、神経鞘腫、髄芽腫、髄上皮腫、中皮腫、粘表皮癌、骨髄性白血病、神経芽細胞腫、神経上皮腺癌、結節性黒色腫、骨肉腫、卵巣癌、漿液性乳頭状腺癌、下垂体腫瘍、形質細胞腫、偽肉腫、前立腺癌、肺芽腫、腎細胞癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、肉腫、漿液性癌、扁平細胞癌、小細胞癌、軟組織癌、ソマトスタチン分泌腫瘍、扁平上皮癌、扁平上皮細胞癌、未分化癌、ぶどう膜黒色腫、疣状癌、膣／外陰部癌、ＶＩＰ（血管作動性腸管ペプチド）産生腫瘍、及びウィルムス腫瘍、脳癌、頭頸部癌、結腸直腸癌、急性骨髄性白血病、前駆Ｂ細胞急性リンパ芽球性白血病、膀胱癌、星細胞腫、好ましくはグレードＩＩ、ＩＩＩ、又はＩＶの星細胞腫、神経膠芽腫、多形神経膠芽腫、小細胞癌、及び非小細胞癌、好ましくは非小細胞肺癌、肺腺癌、転移性黒色腫、アンドロゲン非依存性転移性前立腺癌、アンドロゲン依存性転移性前立腺癌、前立腺腺癌、乳癌、乳管癌、であり、特に好ましくは神経膠芽腫、膵臓癌、乳癌、膀胱癌、腎臓癌、頭頸部癌、卵巣癌、大腸癌、子宮頸癌、前立腺癌、肺癌、胃癌、甲状腺癌、又は骨髄腫である。

[0020] 本発明において、「癌の浸潤を抑制する」とは、癌細胞を原発巣に留めておくことであり、癌の進行・転移を予防すること、及び／又は癌治療効果を高めることを意味する。なお、本発明における「治療」には、必ずしも完全な治療効果を有する場合に限定されず、部分的な効果を有する場合であってもよい。

[0021] 本発明の癌の浸潤を抑制させるための医薬組成物は、薬学的または生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合し、経口、あるいは非経口的に投与することができる。経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型とすることができる。非経口剤としては、注射剤、点滴剤、外用薬剤、吸入剤（ネブライザー）あるいは座剤等の剤型を選択することができる。注射剤には、皮下注射剤、筋肉

注射剤、腹腔内注射剤、頭蓋内投与注射剤、あるいは鼻腔内投与注射剤等を示すことができる。外用薬剤には、経鼻投与剤、あるいは軟膏剤等を示すことができる。主成分である本発明の医薬組成物を含むように、上記の剤型とする製剤技術は公知である。

[0022] 例えば、経口投与用の錠剤は、本発明の組織整合性を回復させるための医薬組成物に賦形剤、崩壊剤、結合剤、および滑沢剤等を加えて混合し、圧縮整形することにより製造することができる。賦形剤には、乳糖、デンプン、あるいはマンニトール等が一般に用いられる。崩壊剤としては、炭酸カルシウムやカルボキシメチルセルロースカルシウム等が一般に用いられる。結合剤には、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロース、あるいはポリビニルピロリドンが用いられる。滑沢剤としては、タルクやステアリン酸マグネシウム等が公知である。

[0023] 本発明の癌の浸潤を抑制するための医薬組成物を含む錠剤は、マスキングや、腸溶性製剤とするために、公知のコーティングを施すことができる。コーティング剤には、エチルセルロースやポリオキシエチレングリコール等を用いることができる。

[0024] また注射剤は、主成分である本発明の癌の浸潤を抑制するための医薬組成物を適当な分散剤とともに溶解、分散媒に溶解、あるいは分散させることにより得ることができる。分散媒の選択により、水性溶剤と油性溶剤のいずれの剤型とすることもできる。水性溶剤とするには、蒸留水、生理食塩水、あるいはリンゲル液等を分散媒とする。油性溶剤では、各種植物油やプロピレングリコール等を分散媒に利用する。このとき、必要に応じてパラベン等の保存剤を添加することもできる。また注射剤中には、塩化ナトリウムやブドウ糖等の公知の等張化剤を加えることができる。更に、塩化ベンザルコニウムや塩酸プロカインのような無痛化剤を添加することができる。

[0025] また、本発明の癌の浸潤を抑制するための医薬組成物を、賦形剤又は担体を伴って又は伴わずに、固形、液状、あるいは半固形状の組成物とすることにより外用剤とすることができる。固形、あるいは液状の組成物については

、先に述べたものと同様の組成物とすることで外用剤とすることができる。半固形状の組成物は、適当な溶剤に必要に応じて増粘剤を加えて調製することができる。溶剤には、水、エチルアルコール、あるいはポリエチレングリコール等を用いることができる。増粘剤には、一般にベントナイト、ポリビニルアルコール、アクリル酸、メタクリル酸、あるいはポリビニルピロリドン等が用いられる。この組成物には、塩化ベンザルコニウム等の保存剤を加えることができる。また、担体としてカカオ脂のような油性基材、あるいはセルロース誘導体のような水性ゲル基材を組み合わせることにより、座剤とすることもできる。

[0026] 本発明の癌の浸潤を抑制するための医薬組成物を遺伝子治療剤として使用する場合は、本発明の癌の浸潤抑制剤または医薬組成物を注射により直接投与する方法のほか、核酸が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。上記ベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター等が挙げられ、これらのウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することができる。

[0027] また、本発明の癌の浸潤を抑制するための医薬組成物をリポソームなどのリン脂質小胞体に導入し、その小胞体を投与することも可能である。ｓｉＲＮＡを保持させた小胞体をリポフェクション法により所定の細胞に導入する。そして、得られる細胞を例えば静脈内、動脈内等に全身投与する。

[0028] また本発明は、本発明の癌の浸潤を抑制するための医薬組成物を個体（例えば、患者）またはその腫瘍組織へ投与する工程を含む、対象における癌の浸潤を抑制する方法を提供する。本発明の対象となる個体は、腫瘍を発症し得る生物であれば特に制限されないが、好ましくはヒトである。対象への投与は、例えば、経口投与、腫瘍内投与、皮内投与、もしくは皮下投与、または静脈内注射など当業者に公知の方法により行うことができる。全身投与、または腫瘍組織内への直接的な局所投与が可能である。また、本発明のｓｉＲＮＡを目的の細胞、組織または器官に導入するために、市販の遺伝子導入

キットを用いることもできる。

[0029] 本発明の癌の浸潤を抑制するための医薬組成物は、安全とされている投与量の範囲内において、ヒトを含む哺乳動物対象に対して、必要量（有効量）が投与される。本発明の癌の浸潤を抑制するための医薬組成物の投与量は、剤型の種類、投与方法、対象の年齢や体重、対象の症状等を考慮して、最終的には当業者（医師または獣医師）の判断により適宜決定することができる。一例を示せば、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なるが、例えば本発明のＣＨＳＴ１５　ｓｉＲＮＡの局所投与での投与量は１日１回あたり１ pM～1 mM程度であり、単回投与又は１週間間隔～１か月間隔（例えば１週間間隔、２週間間隔又は１か月間隔）、あるいは連日投与される。

[0030] なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0031] 以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

なお、本実施例において使用した「ＣＨＳＴ１５　ｓｉＲＮＡ」は、配列番号：１および２に記載されたＲＮＡがハイブリダイズした構造のｓｉＲＮＡである。

本実施例に用いたGalNac 4S-6ST siRNA薬の塩基配列について以下に示す。配列は必ずしも本例のみに限定されない。

［human GalNac4-6STsiRNA］(Gene Bank accession number NM_015892)

（北海道システムサイエンス社製）

5’-ggagcagagcaagaugaauacaauc-ag -3’（配列番号：１）

3’-ua-ccucgucucguucuacuuauguuag -5’（配列番号：２）

[0032] ＜実施例１＞

先行文献で細胞増殖抑制作用が知られているPanc-1細胞はヒト膵癌細胞株であることから、同じくヒト膵癌細胞株であるBxPC-3細胞を使用した。Panc-

1細胞と比較して、BxPC-3細胞株においてはCOX-2、PGE2、VEGFの発現が高いと報告されており、血管新生能に違いがある可能性が示唆されているが、増殖能や浸潤能については両細胞間に大きな差異は報告されていない（総説文献：Deer EL, et al. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. Pancreas. 39:425-435, 2010）。

In vitroの試験において、BxPC-3細胞を定法に基づき培養した。24 wellプレートに各ウェル0.5 x 10^5 cellsの密度となるように調整し、CHST15 siRNAをトランスフェクトした。トランスフェクトは、リポフェクタミンRNAiMAX試薬（Thermo Fisher Science社製）を用い、siRNAの濃度が50 nMもしくは500 nMになるように調整し、CO_2濃度5%, 37° Cで加湿条件下にて48時間培養して行なった。なお、陰性対照としては、vehicle（生理食塩水）を使用した。48時間培養後、24 wellプレートの各ウェルの細胞よりtotal RNAを抽出し、0.1 μgのtotal RNAを用いてcDNAを合成した。合成したcDNAを1 ng/μL（テンプレート量が5 ng/reaction）となるようにDNase/RNase-Free Waterで希釈し、qPCR法を用いてCHST15 mRNAの発現を測定した。結果を図1Aに示す。50 nMのCHST15 siRNAは、BxPC-3細胞のCHST15 mRNAを顕著に抑制した。

一方、トランスフェクション終了後の細胞を回収し、増殖能並びに浸潤能を評価した。細胞増殖については、1.0×10^4 ～1.0×10^6 Cells/mLの密度で、CO_2濃度5%, 37° Cで加湿条件下にて24時間培養後、Cell Counting Kit-8 (DOJINDO Chemical Research社製）を用い、プレートリーダーを用いてOD450 nMで測定した。結果を図1Bに示す。500 nMのCHST15 siRNAは、BxPC-3細胞の増殖には影響を及ぼさなかった。

細胞浸潤については、0.2×10^5 Cells/300μLの密度に調整後、CytoSelect 24-well Cell Invasion Assay Kit (CELL BIOLABS社製）を用いて、細胞浸潤試験を行なった。24時間、48時間と培養し、浸潤した細胞を染色後、プレートリーダーを用いて、OD560 nMで測定した。結果を図1Cに示す。50 nMのCHST15 siRNAは、BxPC-3細胞の浸潤を顕著に抑制した。これは、癌細胞を添加したwellに留めておく効果があることを示している。

[0033] ＜実施例２＞

実施例１と同様の方法で、種々のヒト癌細胞株を用いて、CHST15 siRNAをトランスフェクトし、Cell Invasion Assayを実施した。ヒト癌細胞は、A549（肺癌）、NUGC-3（胃癌）、ASH-3（未分化型甲状腺癌）、BT-549（乳癌）、OVCAR-3（卵巣癌）、RPMI8226（骨髄腫）、と固形癌のみならず血液癌を含めて解析した。結果を図２に示す。50 nMのCHST15 siRNAは、実施した全ての種類のヒト癌細胞の浸潤を明らかに抑制した。

[0034] 考察：

ＣＨＳＴ１５　ｓｉＲＮＡは、ヒト固形癌細胞のみならずヒト血液癌細胞の浸潤を抑制した。癌細胞を留めておくことにより、癌の進展を抑制することが示唆された。

産業上の利用可能性

[0035] 本発明のＣＨＳＴ１５　ｓｉＲＮＡは、ヒト癌細胞株の浸潤を顕著に抑制し、しかもその効果は固形癌のみならず、予想外のことに血液癌においても認められた。癌細胞を原発部分（固形癌においては原発固形臓器、血液癌においては骨髄あるいはリンパ臓器）に留めておくことにより、新たな癌治療効果を導き出せることが考えられた。

これらの結果より、本発明のＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡは癌の浸潤を抑制するために有用であることが示された。

請求の範囲

[請求項1] ＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡを含む、癌の浸潤を抑制するための医薬組成物。

[請求項2] 癌の転移を抑制するための、請求項１記載の医薬組成物。

[請求項3] 癌が、固形癌又は血液癌である、請求項１又は２記載の医薬組成物。

[請求項4] 癌を留めておくことにより進展を抑制することを特徴とする、請求項１～３のいずれか一項記載の医薬組成物。

[請求項5] ＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡを投与する工程を含む、癌の浸潤を抑制する方法。

[請求項6] 癌の浸潤を抑制する方法において用いるための、ＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡ。

[請求項7] 癌の浸潤抑制剤の製造における、ＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡの使用。

[請求項8] ＣＨＳＴ１５遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡを使用する工程を含む、癌の浸潤抑制剤の製造方法。