明　細　書

発明の名称 ： 神経浸潤抑制剤

技術分野

[0001] 本発明は、神経浸潤抑制剤に関する。さらに詳しくは、本発明は、インターロイキン６（IL-6）阻害剤を有効成分とする神経浸潤抑制剤に関する。

背景技術

[0002] インターロイキン６（IL-6）はB細胞刺激因子2(BSF2)あるいはインターフェロンβ2とも呼称されたサイトカインである。IL-6は、Bリンパ球系細胞の活性化に関与する分化因子として発見され（非特許文献１）、その後、種々の細胞の機能に影響を及ぼす多機能サイトカインであることが明らかになった（非特許文献２）。IL-6は、Tリンパ球系細胞の成熟化を誘導することが報告されている（非特許文献３）。

[0003] IL-6は、細胞上で二種の蛋白質を介してその生物学的活性を伝達する。一つは、IL-6が結合する分子量約80kDのリガンド結合性蛋白質のIL-6受容体である(非特許文献４、５)。IL-6受容体は、細胞膜を貫通して細胞膜上に発現する膜結合型の他に、主にその細胞外領域からなる可溶性IL-6受容体としても存在する。

[0004] もう一つは、非リガンド結合性のシグナル伝達に係わる分子量約130kDの膜蛋白質gp130である。IL-6とIL-6受容体はIL-6／IL-6受容体複合体を形成し、次いでgp130と結合することにより、IL-6の生物学的活性が細胞内に伝達される（非特許文献６）。

[0005] 膵がんは、今日でも多くの症例が切除不能な進行した状態で診断され、また唯一治癒が期待できる切除例においても多くは術後早期に再発することが多い。また、切除不能例で、且つ、performance status (PS)や主要臓器機能が良好である例は化学療法の適応となるが、現在の標準治療であってもその治療効果は十分ではない。たとえば，第一選択薬の位置づけにある、塩酸ゲムシタビンであっても、症状緩和効果における有効率は23.8%、生存期間中央

値は5.7ヶ月、1年生存率は18%（海外臨床第3相試験結果）である。また、日本では年間20000人が膵がんと診断され、死亡者数も22,260人（2004年，厚生労働省による人口動態調査）で、がんの死因別では第5位である。

[0006] 神経浸潤は膵がんの特徴的な浸潤様式のひとつとされ、膵がんでほぼ100%に神経浸潤が認められること、神経浸潤は重要な予後因子であること、神経浸潤は肝細胞の機能異常を招いて貧血、performance status (PS)の低下や低栄養などの悪液質症状と相関することなどを、これまでに本発明者らは明らかにしてきた。また、神経浸潤は癌性疼痛などの原因とされ、神経浸潤好発部位への放射線照射やその上位に位置する神経の切除により一定の症状コントロールを得たとの報告を散見する。しかし、神経浸潤のメカニズム、および神経浸潤に起因する症状が発現するメカニズムはほとんどわかっていないため、神経浸潤の制御および神経浸潤に起因する症状の制御については知見が乏しいのが現状である。一方、神経浸潤はがん種を問わずに広く認められ，前立腺がん，胃がん，頭頚部がんでは予後因子として報告されている。

[0007] なお、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76

非特許文献2：Akira, S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78

非特許文献3：Lotz, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258

非特許文献4：Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981

非特許文献5：Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828

非特許文献6：Taga, T. et al., Cell (1989) 58, 573-581

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 従って、本発明は、新規な神経浸潤抑制剤を提供することにある。又、本発明は新規な膵癌治療剤を提供する。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究した結果、膵癌の神経浸潤モデルにおいて、IL-6を阻害することにより神経浸潤が抑制されることを見出し、本発明を完成した。さらにヒト膵がん細胞株でIL-6受容体が発現していること、IL-6が膵がん細胞の走化能および遊走能および細胞内シグナルを亢進することを明らかにし、IL-6を阻害することにより膵癌を治療することが可能であることを見出した。さらに、IL-6阻害剤をマウス神経浸潤モデルに投与することにより、ヒト膵癌神経浸潤を抑制できることを見出した。

[0011] すなわち、本発明は、より具体的には以下の〔１〕～〔３２〕を提供するものである。

〔１〕 インターロイキン６（IL-6）阻害剤を有効成分とする膵癌治療剤。

〔２〕 IL-６阻害剤を有効成分とする細胞の神経浸潤抑制剤。

〔３〕 癌細胞の神経浸潤を抑制することを特徴とする〔２〕に記載の抑制剤。

〔４〕 膵癌細胞の神経浸潤を抑制することを特徴とする〔３〕に記載の抑制剤。

〔５〕 中枢側への神経浸潤を抑制することを特徴とする〔２〕～〔４〕いずれかに記載の抑制剤。

〔６〕 IL-6阻害剤がIL-6受容体に結合する物質であることを特徴とする〔１〕～〔５〕いずれかに記載の治療剤又は抑制剤。

〔７〕 IL-6阻害剤が抗IL-6受容体抗体であることを特徴とする〔６〕に記載の治療剤又は抑制剤。

〔８〕 抗IL-6受容体抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である〔７〕に記載の治療剤又は抑制剤。

〔９〕 IL-6阻害剤を対象に投与する工程を含む、膵癌の治療方法。

〔１０〕 IL-6阻害剤を対象に投与する工程を含む、細胞の神経浸潤抑制方法。

〔１１〕　癌細胞の神経浸潤を抑制することを特徴とする〔１０〕に記載の方法。

〔１２〕　膵癌細胞の神経浸潤を抑制することを特徴とする〔１１〕に記載の方法。

〔１３〕　中枢側への神経浸潤を抑制することを特徴とする〔１０〕～〔１２〕いずれかに記載の方法。

〔１４〕　IL-6阻害剤がIL-6受容体に結合する物質であることを特徴とする〔９〕～〔１３〕いずれかに記載の方法。

〔１５〕　IL-6阻害剤が抗IL-6受容体抗体であることを特徴とする〔１４〕に記載の方法。

〔１６〕　抗IL-6受容体抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である〔１５〕に記載の方法。

〔１７〕　膵癌治療剤を製造するための、IL-6阻害剤の使用。

〔１８〕　細胞の神経浸潤抑制剤を製造するための、IL-６阻害剤の使用。

〔１９〕　癌細胞の神経浸潤を抑制することを特徴とする〔１８〕に記載の使用。

〔２０〕　膵癌細胞の神経浸潤を抑制することを特徴とする〔１９〕に記載の使用。

〔２１〕　中枢側への神経浸潤を抑制することを特徴とする〔１８〕～〔２０〕いずれかに記載の使用。

〔２２〕　IL-6阻害剤がIL-6受容体に結合する物質であることを特徴とする〔１７〕～〔２１〕いずれかに記載の使用。

〔２３〕　IL-6阻害剤が抗IL-6受容体抗体であることを特徴とする〔２２〕に記載の使用。

〔２４〕　抗IL-6受容体抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である〔２３〕に記載の使用。

〔２５〕　膵癌を治療する方法に使用するためのIL-6阻害剤。

〔２６〕　細胞の神経浸潤の抑制するための方法に使用するためのIL-６阻害

剤。

〔２７〕　癌細胞の神経浸潤を抑制することを特徴とする〔２６〕に記載のIL-６阻害剤。

〔２８〕　膵癌細胞の神経浸潤を抑制することを特徴とする〔２７〕に記載のIL-６阻害剤。

〔２９〕　中枢側への神経浸潤を抑制することを特徴とする〔２６〕～〔２８〕いずれかに記載のIL-６阻害剤。

〔３０〕　IL-6阻害剤がIL-6受容体に結合する物質であることを特徴とする〔２５〕～〔２９〕いずれかに記載のIL-６阻害剤。

〔３１〕　IL-6阻害剤が抗IL-6受容体抗体であることを特徴とする〔３０〕に記載のIL-６阻害剤。

〔３２〕　抗IL-6受容体抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である〔３１〕に記載のIL-６阻害剤。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]ヒト膵がん細胞株における、IL-6α受容体(IL6R) mRNA発現量（Ａ）およびIL-6β受容体(gp130)のmRNA発現量（Ｂ）を示す図である。

[図2]ヒトリコンビナントIL-6を用いた、IL-6のヒト膵がん細胞株に対する増殖能、走化能、遊走能への影響を測定した結果を示す図である。ＡおよびＢ：細胞数の経時的計測による細胞増殖能の測定、Ｃ：chemotaxis assayによる走化能の測定、Ｄ：wound healing assayによる遊走能の測定、の結果を示す。

[図3]ヒトリコンビナントIL-6(rhIL6)を用いた、IL-6のヒト膵がん細胞株Capan-1に対する細胞内シグナルへの影響をウエスタンブロット法を用いて評価した結果示す図である。Ａ：細胞内リン酸化STAT3タンパク質発現、Ｂ：細胞内リン酸化Erk1/2タンパク質発現、Ｃ：細胞内リン酸化Aktタンパク質発現、を示す。

[図4]ヒト膵がん細胞株を用いた、マウス神経浸潤モデルを示す写真および図である。Ａ：４週間後の神経浸潤肉眼像、Ｂ：経時的浸潤距離を示すグラフ

、Ｃ：４週間後の神経浸潤組織像、を示す。

[図5]神経浸潤モデルと各種神経損傷モデルにおけるマウスIL-6発現分布を示す写真および図である。Ａ：神経浸潤モデル像、ＢおよびＣ：RT-PCR（Ｂ）または蛍光免疫染色（Ｃ）による神経浸潤モデルおよびその他神経損傷モデルにおけるマウスIL-6発現量、を示す。

[図6]神経浸潤部における膵がん細胞のリン酸化STAT3タンパク発現の結果を示す図である。

[図7]gp130ノックダウンによる神経浸潤距離抑制効果を示す図である。

[図8]IL-6Rノックダウンによる神経浸潤距離抑制効果を示す図である。

[図9]マウス神経浸潤モデルへのJAK阻害剤 AG490又は抗IL-6受容体抗体の投与の、神経浸潤への影響を示す図である。A：JAK阻害剤 AG490投与時の経時的浸潤距離を示すグラフである。DMSO：コントロール群、AG490：AG490投与群を示す。B：抗IL-6受容体抗体投与時の経時的浸潤距離を示すグラフである。hIgG：コントロール群、MRA：抗IL-6受容体抗体の投与群を示す。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明において「IL-6阻害剤」とは、IL-6によるシグナル伝達を遮断し、IL-6の生物学的活性を阻害する物質である。IL-6阻害剤の具体的な例として、IL-6に結合する物質、IL-6受容体に結合する物質、gp130に結合する物質などを挙げることができる。また、IL-6阻害剤としては、IL-6による細胞内シグナルとして重要なSTAT3リン酸化を阻害する物質、例えばAG490などを挙げることができる。IL-6阻害剤には、特に限定されないが、抗IL-6抗体、抗IL-6受容体抗体、抗gp130抗体、IL-6改変体、可溶性IL-6受容体改変体、IL-6部分ペプチド、IL-6受容体部分ペプチド、これらと同様の活性を示す低分子化合物などが含まれる。

[0014] IL-6阻害剤の好ましい態様として、IL-6受容体阻害剤、特に抗IL-6受容体抗体を挙げることができる。

[0015] 本発明で用いられる抗体の由来は特に限定されるものではないが、好ましくは哺乳動物由来であり、より好ましくはヒト由来の抗体を挙げることが出

来る。

[0016] 本発明で使用される抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。通常、この抗体はIL-6、IL-6受容体、gp130等と結合することにより、IL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

[0017] モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6受容体、IL-6、gp130等を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

[0018] 具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗IL-6受容体抗体を作製する場合、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6受容体は、欧州特許出願公開番号EP 325474に、マウスIL-6受容体は日本特許出願公開番号特開平3-155795に開示されたIL-6受容体遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

[0019] IL-6受容体蛋白質は、細胞膜上に発現しているものと細胞膜より離脱しているもの（可溶性IL-6受容体）（Yasukawa, K. et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676）との二種類がある。可溶性IL-6受容体は細胞膜に結合しているIL-6受容体の実質的に細胞外領域から構成されており、細胞膜貫通領域あるいは細胞膜貫通領域と細胞内領域が欠損している点で膜結合型IL-6受容体と異なっている。IL-6受容体蛋白質は、本発明で用いられる抗IL-6受容体抗体の作製の感作抗原として使用されうる限り、いずれのIL-6受容体を使用してもよい。

[0020] IL-6受容体の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細

胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のIL-6受容体蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6受容体蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6受容体を発現している細胞やIL-6受容体蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

[0021] 同様に、IL-6を抗体取得の感作抗原として用いる場合には、ヒトIL-6は、Eur. J. Biochem (1987) 168, 543-550 、J. Immunol.(1988)140, 1534-1541 、あるいはAgr. Biol. Chem. (1990)54, 2685-2688に開示されたIL-6遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。また、抗gp130抗体取得の感作抗原としは、欧州特許出願公開番号EP 411946に開示されたgp130遺伝子／アミノ酸配列を用いることができる。

[0022] 感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

[0023] 感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

[0024] このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

[0025] 前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3X63Ag8.653 (Kearney, J. F. et al. J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550) 、P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7) 、NS-1 (Kohler.

G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol.(1976) 6, 511-519 ）、MPC-11 (Margulies. D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415 ）、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270 ）、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21 ）、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323）、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133 ）等が適宜使用される。

[0026] 前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルシュタインらの方法 (Kohler. G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46）等に準じて行うことができる。

[0027] より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (PEG) 、センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

[0028] 免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1～10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

[0029] 細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1000～6000程度のPEG溶液を通常、30～60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

[0030] 当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の

細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。

[0031] また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原蛋白質又は抗原発現細胞で感作し、感作Bリンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、所望の抗原又は抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原又は抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 94/25585、WO 96/34096、WO 96/33735参照）。

[0032] このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

[0033] 当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

[0034] 例えば、抗IL-6受容体抗体産生ハイブリドーマの作製は、特開平3-139293に開示された方法により行うことができる。PM-1抗体産生ハイブリドーマをBALB/cマウスの腹腔内に注入して腹水を得、この腹水からPM-1抗体を精製する方法や、本ハイブリドーマを適当な培地、例えば、10%ウシ胎児血清、5%BM-Condimed H1（Boehringer Mannheim製）含有RPMI1640培地、ハイブリドーマSFM培地（GIBCO-BRL製）、PFHM-II培地（GIBCO-BRL製）等で培養し、その培養上清からPM-1抗体を精製する方法で行うことができる。

[0035] 本発明には、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺

伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Borrebaeck C. A. K. and Larrick J. W. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。

[0036] 具体的には、目的とする抗体を産生する細胞、例えばハイブリドーマから、抗体の可変（V）領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299 ）、AGPC法（Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987)162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia製）等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit（Pharmacia製）を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

[0037] 得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDER RACE Kit（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1988)85, 8998-9002 ; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res.(1989)17, 2919-2932）を使用することができる。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、デオキシ法により確認する。

[0038] 目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。又は、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。

[0039] 本発明で使用される抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよ

う発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

[0040] 本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト化（Humanized）抗体等を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

[0041] キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 92-19759参照）。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

[0042] ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体またはヒト型化抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR)をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている（欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 92-19759参照）。

[0043] 具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（FR; framework region）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 92-19759参照）。

[0044] CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K.et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

[0045] キメラ抗体、ヒト化抗体には、通常、ヒト抗体C領域が使用される。ヒト抗体重鎖C領域としては、Cγなどが挙げられ、例えば、Cγ1、Cγ2、Cγ3又はCγ4を使用することができる。ヒト抗体軽鎖C領域としては、例えば、κまたはλを挙げることができる。また、抗体又はその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

[0046] キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC領域からなり、またヒト化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域からなり、これらはヒト体内における抗原性が低下しているため、医薬品として使用される抗体として有用である。

[0047] 本発明に使用されるヒト化抗体の好ましい具体例としては、ヒト化PM-1抗体が挙げられる（国際特許出願公開番号WO 92-19759参照）。

[0048] また、ヒト抗体の取得方法としては先に述べた方法のほか、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することもできる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を含む適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に周知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考にすることができる。

[0049] 前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させることができる。哺乳類細胞を用いた場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー（human cytomegalovirus immediate early promoter/enhanc

er）を挙げることができる。

[0050] また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40（SV40)等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1α（HEF1α）などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

[0051] 例えば、SV40プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法（Mulligan, R. C. et al., Nature (1979) 277, 108-114）、また、HEF 1αプロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushimaらの方法（Mizus hima, S. and Nagata, S. Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322 ）に従えば容易に実施することができる。

[0052] 宿主として原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌（E.coli)、枯草菌が知られている。

[0053] 大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法（War d, E. S. et al., Nature (1989) 341, 544-546 ; Ward, E. S. et al. FASEB J. (1992) 6, 2422-2427 ）、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法（Better, M. et al. Science (1988) 240, 1041-1043 ）に従えばよい。

[0054] 抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列（Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169 , 4379-4383)を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド（refold）して使用する（例えば、WO9 6/30394を参照）。

[0055] 複製起源としては、SV40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス（BPV)等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主

細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ（APH）遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ecogpt）遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）遺伝子等を含むことができる。

[0056] 本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

[0057] 宿主として真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、又は真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1)哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、ミエローマ、BHK(baby hamster kidney)、HeLa、Veroなど、(2)両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3)昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5などが知られている。植物細胞としては、ニコチアナ・タバクム(Nicotiana tabacum)由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス（Saccharomyces)属、例えばサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、糸状菌、例えばアスペルギルス属（Aspergillus)属、例えばアスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）などが知られている。

[0058] これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をin vitroで培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、in vivoにて抗体を産生してもよい。

[0059] 一方、in vivoの産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系などがある。

[0060] 哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシなどを用いることができる（Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993）。また、昆虫としては、カイコを用いることができる。植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。

[0061] これらの動物又は植物に抗体遺伝子を導入し、動物又は植物の体内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギβカゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい（Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702 ）。

[0062] また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る（Maeda, S. et al., Nature (1985) 315, 592-594）。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えばpMON530に挿入し、このベクターをAgrobacterium tumefaciensのようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばNicotiana tabacumに感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る（Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol.(1994)24, 131-138）。

[0063] 上述のようにin vitro又はin vivoの産生系にて抗体を産生する場合、抗体重鎖（H鎖）又は軽鎖（L鎖）をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい（国際特許出願公開番号WO 94-11523参照）。

[0064] 本発明で使用される抗体は、本発明に好適に使用され得るかぎり、抗体の断片やその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')

2、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェインFv（scFv）が挙げられる。

[0065] 具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496 、Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 497-515 、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663 、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-66、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137参照）。

[0066] scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリンカーを介して連結される（Huston, J. S. et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883）。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

[0067] scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖又は、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖又は、L鎖V領域をコードするDNAを鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNAおよびその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合せて増幅することにより得られる。

[0068] また、一旦scFvをコードするDNAが作製されれば、それらを含有する発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、scFvを得ることができる。

[0069] これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本発明でいう「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

[0070] 抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール（PEG)等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

[0071] 前記のように産生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。プロテインAカラムに用いる担体として、例えば、HyperD、POROS、SepharoseF.F.等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

[0072] 例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用される抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。これらのクロマトグラフィーはHPLC（High performance liquid chromatography）に適用し得る。また、逆相HPLC（reverse phase HPLC）を用いてもよい。

[0073] 上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又はELISA等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、PBS(-)で適当に希釈した後、280nmの吸光度を測定し、1mg/mlを1.35ODとして算出する。また、ELISAによる場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M重炭酸緩衝液（pH9.6）で1μg/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG(TAG製）100μlを96穴プ

レート（Nunc製）に加え、４℃で一晩インキュベーションし、抗体を固相化する。ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用される抗体又は抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG（CAPPEL製）100μｌを添加し、室温にて１時間インキュベーションする。

[0074] 洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG（BIO SOURCE製）100μｌを加え、室温にて１時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550（Bio-Rad製）を用いて405nmでの吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

[0075] 抗IL-6抗体の具体的な例としては、特に限定されないが、MH166(Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol. (1998) 18, 951-956)やSK2抗体(Sato K et al., 第21回日本免疫学会総会、学術記録（1991）21, 166)などを挙げることができる。

[0076] 抗IL-6受容体抗体の具体的な例としては、特に限定されないが、MR16-1抗体（Tamura, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924-11928)、PM-1抗体（Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906）、AUK12-20抗体、AUK64-7抗体あるいはAUK146-15抗体（国際特許出願公開番号WO 92-19759)などが挙げられる。これらのうちで、ヒトIL-6受容体に対する好ましいモノクローナル抗体としてはPM-1抗体が例示され、またマウスIL-6受容体に対する好ましいモノクローナル抗体としてはMR16-1抗体が挙げられるが、これに限定されない。又、ヒト化抗IL-6受容体抗体の好ましい例としては、ヒト化PM-1抗体(Tocilizumab、MRA)を挙げることができる。ヒト化抗IL-6受容体抗体の他の好ましい例としてはWO2009/041621に記載された抗体を挙げることができる。さらに、抗IL-6受容体抗体の他の好ましい態様として、ヒト化PM-1抗体（Tocilizumab、MRA）が認識するエピトープと同じエピトープを認識する抗IL-6受容体抗体を挙げることができる。

[0077] 抗gp130抗体の具体的な例としては、特に限定されないが、AM64抗体（日本公開公報　特開平3-219894）、4B11抗体、2H4抗体（アメリカ特許公報　US5571513）、B-P8抗体（日本公開公報　特開平8-291199）などが挙げられる。

[0078] 本発明で使用されるIL-6改変体は、IL-6受容体との結合活性を有し、且つIL-6の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、IL-6改変体はIL-6受容体に対しIL-6と競合的に結合するが、IL-6の生物学的活性を伝達しないため、IL-6によるシグナル伝達を遮断する。

[0079] IL-6改変体は、IL-6のアミノ酸配列のアミノ酸残基を置換することにより変異を導入して作製される。IL-6改変体のもととなるIL-6はその由来を問わないが、抗原性等を考慮すれば、好ましくはヒトIL-6である。具体的には、IL-6のアミノ酸配列を公知の分子モデリングプログラム、たとえば、WHATIF（Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56 ）を用いてその二次構造を予測し、さらに置換されるアミノ酸残基の全体に及ぼす影響を評価することにより行われる。適切な置換アミノ酸残基を決定した後、ヒトIL-6遺伝子をコードする塩基配列を含むベクターを鋳型として、通常行われるPCR法によりアミノ酸が置換されるように変異を導入することにより、IL-6改変体をコードする遺伝子が得られる。これを必要に応じて適当な発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、産生及び精製方法に準じてIL-6改変体を得ることができる。

[0080] IL-6改変体の具体例としては、Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93 、及びSavino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367 、WO 96-18648 、WO96-17869に開示されているIL-6改変体を挙げることができる。

[0081] IL-6受容体部分ペプチドはIL-6受容体のアミノ酸配列においてIL-6とIL-6受容体との結合に係わる領域の一部又は全部のアミノ酸配列からなるペプチドである。このようなペプチドは、通常１０～８０、好ましくは２０～５０、より好ましくは２０～４０個のアミノ酸残基からなる。

[0082] IL-6受容体部分ペプチドはIL-6受容体のアミノ酸配列において、IL-6とIL-6受容体との結合に係わる領域を特定し、その特定した領域の一部又は全部のアミノ酸配列に基づいて通常知られる方法、例えば遺伝子工学的手法又はペプチド合成法により作製することができる。

[0083] IL-6受容体部分ペプチドを遺伝子工学的手法により作製するには、所望の

ペプチドをコードするDNA配列を発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、産生及び精製方法に準じて得ることができる。

[0084] IL-6受容体部分ペプチドをペプチド合成法により作製するには、ペプチド合成において通常用いられている方法、例えば固相合成法又は液相合成法を用いることができる。

[0085] 具体的には、続医薬品の開発第１４巻ペプチド合成　監修矢島治明廣川書店1991年に記載の方法に準じて行えばよい。固相合成法としては、例えば有機溶媒に不溶性である支持体に合成しようとするペプチドのC末端に対応するアミノ酸を結合させ、α-アミノ基及び側鎖官能基を適切な保護基で保護したアミノ酸をC末端からN末端方向の順番に１アミノ酸ずつ縮合させる反応と樹脂上に結合したアミノ酸又はペプチドのα-アミノ基の該保護基を脱離させる反応を交互に繰り返すことにより、ペプチド鎖を伸長させる方法が用いられる。固相ペプチド合成法は、用いられる保護基の種類によりBoc法とFmoc法に大別される。

[0086] このようにして目的とするペプチドを合成した後、脱保護反応及びペプチド鎖の支持体からの切断反応をする。ペプチド鎖との切断反応には、Boc法ではフッ化水素又はトリフルオロメタンスルホン酸を、又Fmoc法ではTFAを通常用いることができる。Boc法では、例えばフッ化水素中で上記保護ペプチド樹脂をアニソール存在下で処理する。次いで、保護基の脱離と支持体からの切断をしペプチドを回収する。これを凍結乾燥することにより、粗ペプチドが得られる。一方、Fmoc法では、例えばTFA中で上記と同様の操作で脱保護反応及びペプチド鎖の支持体からの切断反応を行うことができる。

[0087] 得られた粗ペプチドは、HPLCに適用することにより分離、精製することができる。その溶出にあたり、蛋白質の精製に通常用いられる水-アセトニトリル系溶媒を使用して最適条件下で行えばよい。得られたクロマトグラフィーのプロファイルのピークに該当する画分を分取し、これを凍結乾燥する。このようにして精製したペプチド画分について、マススペクトル分析による分子量解析、アミノ酸組成分析、又はアミノ酸配列解析等により同定する。

[0088] 本発明のIL-6阻害剤は神経浸潤の抑制に使用することが可能である。本発明において「神経浸潤」とは、癌細胞その他の細胞が神経組織へ侵入して発育する様式であり、組織破壊（破壊性発育）などを伴うこともある。本発明において好ましい神経浸潤として、癌細胞の神経浸潤を挙げることができる。癌細胞の浸潤を抑制する場合、対象となる癌種は特に限定されず、膵癌、胃癌、前立腺癌、頭頸部癌、乳癌、肺癌、大腸癌、卵巣癌など如何なる癌種でもよいが、膵癌細胞の浸潤を抑制することが好ましい。神経浸潤の抑制は末梢側への神経浸潤の抑制でも、中枢側への神経浸潤の抑制でもどちらでもよいが、膵癌細胞が中枢側に神経浸潤する傾向があることから、中枢側への神経浸潤（例えば、神経損傷部位から中枢側への神経浸潤）を抑制することが好ましい。

[0089] 本発明において「神経浸潤の抑制」とは、神経浸潤の発生の抑制、神経浸潤の発生率の低下、神経浸潤距離の短縮、神経浸潤速度の遅延などを意味する。

[0090] 本発明のIL-6阻害剤により神経浸潤を抑制することにより、神経浸潤に伴う諸症状（例えば、癌性疼痛などの痛み、貧血、performans status(PS)の低下、低栄養、等）を治療、抑制することが可能である。従って、本発明にはIL-6阻害剤を含む神経浸潤に伴う諸症状の治療剤、抑制剤も含まれる。

[0091] 本発明の膵癌治療剤は、膵癌の治療および／または予防において使用することが可能である。

[0092] 本発明において「膵癌治療」とは、膵癌の発生の抑制、膵癌の発生率の低下、膵癌細胞の増殖の抑制、膵癌組織の縮小、膵癌の症状の改善、膵癌の転移の抑制などを意味する。

[0093] 本発明で使用されるIL-6阻害剤の効果は、例えばシグナル伝達阻害活性を指標として評価することができるがこれに限定されない。IL-6阻害剤のシグナル伝達阻害活性は、通常用いられる方法により評価することができる。具体的には、IL-6依存性ヒト骨髄腫株（S6B45,KPMM2）、ヒトレンネルトＴリンパ腫細胞株KT3、あるいはIL-6依存性細胞MH60.BSF2を培養し、これにIL-6を

添加し、同時にIL-6阻害剤を共存させることによりIL-6依存性細胞の^{3}H-チミジン取込みを測定すればよい。また、IL-6受容体発現細胞であるU266を培養し、^{125}I標識IL-6を添加し、同時にIL-6阻害剤を加えることにより、IL-6受容体発現細胞に結合した^{125}I標識IL-6を測定する。上記アッセイ系において、IL-6阻害剤を存在させる群に加えIL-6阻害剤を含まない陰性コントロール群をおき、両者で得られた結果を比較すればIL-6阻害剤のIL-6阻害活性を評価することができる。

[0094] 本発明の治療剤または抑制剤が投与される対象は哺乳動物である。哺乳動物は、好ましくはヒトである。

[0095] 本発明の治療剤または抑制剤は、医薬品の形態で投与することが可能であり、経口的または非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、坐薬、注腸、経口性腸溶剤などを選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.01mgから100mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1～1000mg、好ましくは5～50mgの投与量を選ぶことができる。好ましい投与量、投与方法は、たとえば抗IL-6受容体抗体の場合には、血中にフリーの抗体が存在する程度の量が有効投与量であり、具体的な例としては、体重1kgあたり１ヶ月（４週間）に0.5mgから40mg、好ましくは1mgから20mgを１回から数回に分けて、例えば２回／週、１回／週、１回／２週、１回／４週などの投与スケジュールで点滴などの静脈内注射、皮下注射などの方法で、投与する方法などである。投与スケジュールは、患者の状態の観察および血液検査値の動向を観察しながら２回／週あるいは１回／週から１回／２週、１回／３週、１回／４週のように投与間隔を延ばしていくなど調整することも可能である。

[0096] 本発明の治療剤または抑制剤には、保存剤や安定剤等の製剤上許容しうる担体が添加されていてもよい。製剤上許容しうる担体とは、上記の薬剤とともに投与可能な材料を意味する。製剤上許容される材料としては、例えば、滅菌水や生理食塩水、安定剤、賦形剤、緩衝剤、防腐剤、界面活性剤、キレ

ート剤(EDTA等)、結合剤等を挙げることができる。

[0097] 本発明において、界面活性剤としては非イオン界面活性剤を挙げることができ、例えばソルビタンモノカプリレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート等のソルビタン脂肪酸エステル；グリセリンモノカプリレート、グリセリンモノミリステート、グリセリンモノステアレート等のグリセリン脂肪酸エステル；デカグリセリルモノステアレート、デカグリセリルジステアレート、デカグリセリルモノリノレート等のポリグリセリン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビットテトラステアレート、ポリオキシエチレンソルビットテトラオレエート等のポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル；ポリオキシエチレングリセリルモノステアレート等のポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル；ポリエチレングリコールジステアレート等のポリエチレングリコール脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンプロピルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンセチルエーテル等のポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル；ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（ポリオキシエチレン水素ヒマシ油）等のポリオキシエチレン硬化ヒマシ油；ポリオキシエチレンソルビットミツロウ等のポリオキシエチレンミツロウ誘導体；ポリオキシエチレンラノリン等のポリオキシエチレンラノリン誘導体；ポリオキシエチレンステアリン酸アミド等のポリオキシエチレン脂肪酸アミド等のＨＬＢ６～１８を有するもの、等を典型的例として挙げることができる

。

[0098] また、界面活性剤としては陰イオン界面活性剤も挙げることができ、例えばセチル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、オレイル硫酸ナトリウム等の炭素原子数１０～１８のアルキル基を有するアルキル硫酸塩；ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウム等の、エチレンオキシドの平均付加モル数が２～４でアルキル基の炭素原子数が１０～１８であるポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩；ラウリルスルホコハク酸エステルナトリウム等の、アルキル基の炭素原子数が８～１８のアルキルスルホコハク酸エステル塩；天然系の界面活性剤、例えばレシチン、グリセロリン脂質；スフィンゴミエリン等のフィンゴリン脂質；炭素原子数１２～１８の脂肪酸のショ糖脂肪酸エステル等を典型的例として挙げることができる。

[0099] 本発明の薬剤には、これらの界面活性剤の１種または２種以上を組み合わせて添加することができる。本発明の製剤で使用する好ましい界面活性剤は、ポリソルベート２０，４０，６０又は８０などのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルであり、ポリソルベート２０及び８０が特に好ましい。また、ポロキサマー（プルロニックＦ－６８（登録商標）など）に代表されるポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールも好ましい。

[0100] 界面活性剤の添加量は使用する界面活性剤の種類により異なるが、ポリソルベート２０又はポリソルベート８０の場合では、一般には０．００１～１００ｍｇ／ｍＬであり、好ましくは０．００３～５０ｍｇ／ｍＬであり、さらに好ましくは０．００５～２ｍｇ／ｍＬである。

[0101] 本発明において緩衝剤としては、リン酸、クエン酸緩衝液、酢酸、リンゴ酸、酒石酸、コハク酸、乳酸、リン酸カリウム、グルコン酸、カプリル酸、デオキシコール酸、サリチル酸、トリエタノールアミン、フマル酸等　他の有機酸等、あるいは、炭酸緩衝液、トリス緩衝液、ヒスチジン緩衝液、イミダゾール緩衝液等を挙げることが出来る。

[0102] また溶液製剤の分野で公知の水性緩衝液に溶解することによって溶液製剤を調製してもよい。緩衝液の濃度は一般には１～５００ｍＭであり、好まし

くは５～１００ｍＭであり、さらに好ましくは１０～２０ｍＭである。

[0103] また、本発明の薬剤は、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリン等の蛋白質、アミノ酸、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物、糖アルコールを含んでいてもよい。

[0104] 本発明においてアミノ酸としては、塩基性アミノ酸、例えばアルギニン、リジン、ヒスチジン、オルニチン等、またはこれらのアミノ酸の無機塩（好ましくは、塩酸塩、リン酸塩の形、すなわちリン酸アミノ酸）を挙げることが出来る。遊離アミノ酸が使用される場合、好ましいpH値は、適当な生理的に許容される緩衝物質、例えば無機酸、特に塩酸、リン酸、硫酸、酢酸、蟻酸又はこれらの塩の添加により調整される。この場合、リン酸塩の使用は、特に安定な凍結乾燥物が得られる点で特に有利である。調製物が有機酸、例えばリンゴ酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸、フマル酸等を実質的に含有しない場合あるいは対応する陰イオン（リンゴ酸イオン、酒石酸イオン、クエン酸イオン、コハク酸イオン、フマル酸イオン等）が存在しない場合に、特に有利である。好ましいアミノ酸はアルギニン、リジン、ヒスチジン、またはオルニチンである。さらに、酸性アミノ酸、例えばグルタミン酸及びアスパラギン酸、及びその塩の形（好ましくはナトリウム塩）あるいは中性アミノ酸、例えばイソロイシン、ロイシン、グリシン、セリン、スレオニン、バリン、メチオニン、システイン、またはアラニン、あるいは芳香族アミノ酸、例えばフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、または誘導体のN-アセチルトリプトファンを使用することもできる。

[0105] 本発明において、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物としては、例えばデキストラン、グルコース、フラクトース、ラクトース、キシロース、マンノース、マルトース、スクロース、トレハロース、ラフィノース等を挙げることができる。

[0106] 本発明において、糖アルコールとしては、例えばマンニトール、ソルビトール、イノシトール等を挙げることができる。

[0107] 本発明の薬剤を注射用の水溶液とする場合には、例えば生理食塩水、ブド

ウ糖やその他の補助薬（例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム）を含む等張液と混合することができる。また該水溶液は、適当な溶解補助剤（例えばアルコール(エタノール等)、ポリアルコール(プロピレングリコール、PEG等)、非イオン性界面活性剤(ポリソルベート80、HCO-50)等）と併用してもよい。

[0108] 所望によりさらに希釈剤、溶解補助剤、ｐＨ調整剤、無痛化剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を含有してもよい。

[0109] 本発明において、含硫還元剤としては、例えば、Ｎ－アセチルシステイン、Ｎ－アセチルホモシステイン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸及びその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、並びに炭素原子数１～７のチオアルカン酸等のスルフヒドリル基を有するもの等を挙げることができる。

[0110] また、本発明において酸化防止剤としては、例えば、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、α－トコフェロール、酢酸トコフェロール、Ｌ－アスコルビン酸及びその塩、Ｌ－アスコルビン酸パルミテート、Ｌ－アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルあるいはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（ＥＤＴＡ）、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム等のキレート剤を挙げることが出来る。

[0111] また、必要に応じ、マイクロカプセル(ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル)に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム(リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)とすることもできる("Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed., 1980等参照)。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明に適用し得る(Langer et al., J.Biomed.Mater.Res. 1981, 15: 167-277; Langer, Chem. Tech. 1982, 12: 98-105;米国特許第3,773,919号;欧州特許出願公開(EP)第

58,481号; Sidman et al., Biopolymers 1983, 22: 547-556;EP第133,988号)。

[0112] 使用される製剤上許容しうる担体は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

[0113] 本発明は、IL-6阻害剤を、神経浸潤が発症した対象または発症する可能性がある対象に投与する工程を含む、対象において神経浸潤を抑制する方法に関する。

又、本発明はIL-6阻害剤を、膵癌を発症した対象または発症する可能性がある対象に投与する工程を含む、対象において膵癌を治療および／または予防する方法に関する。

[0114] 本発明において、「対象」とは、本発明の治療剤または抑制剤を投与する生物体、該生物体の体内の一部分をいう。生物体は、特に限定されるものではないが、動物（例えば、ヒト、家畜動物種、野生動物）を含む。

[0115] また、「生物体の体内の一部分」については特に限定されないが、好ましくは疾患部位などを挙げることが出来る。

[0116] 本発明において、「投与する」とは、経口的、あるいは非経口的に投与することが含まれる。経口的な投与としては、経口剤という形での投与を挙げることができ、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を選択することができる。

[0117] 非経口的な投与としては、注射剤という形での投与を挙げることができ、注射剤としては、皮下注射剤、筋肉注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を挙げることができる。また、投与すべきオリゴヌクレオチドを含む遺伝子を遺伝子治療の手法を用いて生体に導入することにより、本発明の方法の効果を達成することができる。また、本発明の薬剤を、処置を施したい領域に局所的に投与することもできる。例えば、手術中の局所注入、カテーテルの使用、または本発明のペプチドをコードするDNAの標的化遺伝子送達により投与することも可能である。

[0118] 本発明の方法を実践する際に、本発明の薬剤は、少なくとも1つの他の薬剤

（例えば、他の神経浸潤抑制剤や他の膵癌治療剤）と共に薬学的組成物の一部として投与されてもよい。一つの態様において、本発明の薬剤および他の薬剤は、実質的に同時に投与されてもよい。

[0119] 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

[0120] 本発明を実施例によりさらに詳しく説明するが、本発明はこれに限定されない。種々の変更、修飾が当業者には可能であり、これらの変更、修飾も本発明に含まれる。

[0121] <材料と方法>

細胞

ヒト膵癌細胞株である、Capan-1、BxPC-3をAmerican Type Culture Collection (ATCC)より購入し、ATCCが推奨するマニュアルに沿って、培養および継代を37度で5%CO_2の条件を維持できる恒温槽を用いて行った。

[0122] 細胞数計測

細胞をdishより採取し、トリパンブルーおよび血球計測盤を用いて生細胞を計測した。

[0123] Chemotaxis assay

底面に8μmのポアを有するCell culture insert (BD Falcon)を24ウェルに挿入し、Cell culture insertをupper chamberとして、ウェルをlower chamberとして用いた。Lower chamberに、非血清培養液とヒトリコンビナントIL-6 (hrIL6) (R&D systems)を用いて調製したhrIL6 vehicle 0、1、10、100ng/mlを600μl注入し、upper chamberに2×10^6個/mlの細胞浮遊液 100μlを注入した。24時間培養した後、ポアを通過した細胞数を計測した。各群12回の測定を行い、hrIL6 0ng/ mlでポアを通過する平均細胞数を除算した数を補正値として記録した。

[0124] Wound healing assay

24ウェルに3×10^5個/mlの細胞浮遊液を1 mlずつ注入して24時間培養する。

非血清培地に交換して24時間培養した後、ウェルの中央部分をガラス棒でこすり帯状の無細胞領域を作製し、その幅を計測し、hrIL6 vehicle 0、1、10、100ng/mlに培地を交換する。24時間培養した後、無細胞領域の幅の変化を測定した。各群12回の測定を行い、hrIL6 0ng/ mlでの平均変化長を除算した数を補正値として記録した。

[0125] 抗体

ウエスタンブロットに使用した一次抗体は、抗リン酸化STAT3抗体（Santa Cruz）、抗STAT3抗体（Santa Cruz）、抗リン酸化Erk1/2抗体（Cell Signaling）、抗Erk1/2抗体（Cell Signaling）、抗リン酸化Akt抗体（Cell Signaling）、抗Akt抗体（Cell Signaling）、抗Actin抗体（Santa Cruz）であった。蛍光免疫染色に用いた一次抗体は、抗S100抗体（DAKO）、抗マウスIL-6抗体（Santa Cruz）であり、核染色はDRAQ5(AXXORA)を用いた。免疫染色には、抗リン酸化STAT3抗体（Santa Cruz）を用いた。

[0126] ウエスタンブロット

Lysate buffer (20mM Hepes-NaOH pH7.0、0.5% NP-40、15% Glycerol、300 mM NaCl、1mM EDTA、10mM NaF)を用いて細胞溶解液を作製した。蛋白濃度をBCA Protein Assay Kit (PIERCE)を用いて測定した後、20 mgの蛋白を含有する細胞溶解液を7.5%もしくは12% アクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、polyvinylidene difluoride membrane (Millipore)に転写した。メンブレンに抗体を添加し、蛋白発現をEnhanced Chemiluminescence Reagent (Amersham Biosciences)を用いて画像化した。

[0127] リン酸化STAT3免疫染色とその評価法

抗原賦活は10mMクエン酸バッファー内で95℃ 10分間のマイクロウェーブを用いた加熱処理にて行い、発色はDABを用いた。検体として、4週経過した26匹のマウス神経浸潤モデルより採取した坐骨神経26本を用いた。神経浸潤部の中枢側先端および末梢側先端を関心領域として、対物40倍レンズを用いて、1視野当たりのがん細胞数とリン酸化STAT3陽性がん細胞数を計測してlabeling indexを次の計算式で算出した：(リン酸化STAT3陽性がん細胞数)/(がん

細胞数)。

[0128] 神経浸潤モデル

使用するマウスは、6週令、オスの重度免疫不全マウス(SCIDマウス)である。バルビタール50mg/kgをマウス腹腔内投与して麻酔し、左坐骨神経を露出して、坐骨神経内に1.0×10^4個/μlのがん細胞浮遊液2.5μlをマイクロシリンジおよび30ゲージ針を用いて直接注入した。評価する時期にがん細胞を注入した坐骨神経を採取し、組織標本を作製する場合には、4%パラホルムアルデヒドの中で4℃ 一昼夜の間静置して固定した。固定した前記坐骨神経は、3μmの厚みで薄切し、神経浸潤距離の測定のためヘマトキシリン・エオジン染色または、免疫染色した。神経浸潤距離の測定は、神経長軸方向に薄切された切片と対物ミクロメーター（三啓）を用い、全腫瘍範囲の長軸を計測した。組織中mRNA抽出には、採取組織をただちにマルチビーズショッカー(安井器械)で破砕した検体を用いた。

[0129] RNA抽出とreal time RT-PCR

Dishより採取した細胞ペレット、もしくは破砕した組織断片をからTRIzol(Life Technologies)を用いてtotal RNAを採取した。cDNAは、1×10^3 ngのtotal RNAより、ExScript RT reagent Kit (Takara-bio)およびTakara PCR Thermal Cycler Dice (Takara-bio)を用いて、Takara-bio社が推奨するマニュアルに従って合成した。Real time RT-PCRは、Smart Cycler II System (Cepheid)、SYBR RT-PCR kit (Takara-bio)を用いた。プライマーは、ヒトIL-6α受容体(IL6R)、ヒトIL-6β受容体(gp130)、ヒトGAPDH、マウスIL-6、マウスEGF、マウスGAPDHのcDNAをそれぞれ特異的に増幅するプライマーを用いた。プライマー配列は、ヒトIL6R：forward tgagctcagatatcgggctgaac（配列番号：１）；reverse cgtcgtggatgacacagtgatg（配列番号：２）、ヒトgp130：forward gaagcaagtgggatcacctatgaa（配列番号：３）；reverse ctgtagccttgagtatggatgga（配列番号：４）、ヒトGAPDH：forward gcaccgtcaaggctgagaac（配列番号：５）；reverse atggtggtgaagacgccagt（配列番号：６）、マウスIL-6：forward ccacttcacaagtcggaggctta（配列番号：７）；reverse gcaagtgca

tcatcgttgttcatac（配列番号：８）、マウスEGF：forward catcatggtggtggctgtctg（配列番号：９）；reverse cacttccgcttggctcatca（配列番号：１０）、マウスGAPDH：forward aaatggtgaaggtcggtgtg（配列番号：１１）；reverse tgaaggggtcgttgatgg（配列番号：１２）、であった。定量はTakara-bio社が推奨する方法にて行った。

[0130] mRNAノックダウン

mRNA発現のノックダウンには、Ambion社が作製したsiRNAを用いた。使用したsiRNAは、ヒトIL6R siRNA、ヒトgp130 siRNA、Negative Control#1 siRNAであった。がん細胞を3.5cm dishに2×10^5個撒き、48時間培養した後、siRNA 20μMおよびDharmaFECT transfection reagent 4 (Dharmacon) 8μlを加えた。24時間後に細胞を採取し、mRNA発現解析もしくは神経浸潤モデルに使用した。

[0131] 統計解析

解析ソフトは、STATVIEW 5.0を用いた。平均値の差の検定は、student-t両側検定を用いた。図中のエラーバーは標準偏差を示すように作成した。

[0132] 〔実施例１〕

ヒト膵がん細胞株における、IL-6α受容体(IL6R)およびIL-6β受容体(gp130)の細胞内mRNA発現をreal time RT-PCRを用いて検討した。ヒト膵がん細胞株において、IL6R mRNA(図１Ａ)およびgp130 mRNA(図１Ｂ)の明瞭な発現を認めた。

[0133] 〔実施例２〕

ヒトリコンビナントIL-6を用いて、IL-6のヒト膵がん細胞株に対する増殖能、走化能、遊走能への影響を、細胞数の経時的計測（図２ＡおよびＢ）、chemotaxis assay（図２Ｃ）、wound healing assay（図２Ｄ）を用いて検討した。IL-6は膵がん細胞株の細胞増殖には影響を及ぼさないが、走化能および遊走能を亢進させることが明らかとなった。

[0134] 〔実施例３〕

ヒトリコンビナントIL-6(rhIL6)を用いて、IL-6のヒト膵がん細胞株Capan-

1に対する細胞内シグナルへの影響を、リン酸化STAT3(pSTAT3)（図３Ａ）、リン酸化Erk1/2（pErk1/2)（図３Ｂ）、リン酸化Akt(pAkt)（図３Ｃ）についてウエスタンブロット法を用いて評価した。細胞内のリン酸化STAT3蛋白発現はrhIL6を添加して15分後に、リン酸化Erk1/2蛋白発現は１時間後にそれぞれ明らかな亢進を認めた。リン酸化Akt発現への影響は認められなかった。

[0135] 〔実施例４〕

膵がんの重要な浸潤様式は神経浸潤距離である。神経浸潤を再現し、かつ神経浸潤距離が計測可能なマウス神経浸潤モデルを作製することは、膵がんの重要な腫瘍浸潤様式を制御する治療法を検討する上で重要である。神経浸潤モデルは、免疫不全マウスの坐骨神経内にヒト膵がん細胞株Capan-1を直接注入することで作製された。肉眼的に、神経浸潤部は表面不整で明らかに正常神経より太い（図４Ａ）。組織学的神経浸潤距離は、注入時Capan-1神経内拡散距離よりも、1週間後で明らかに長く、その距離は経時的に増大する（図４Ｂ）。また、神経浸潤は注入部より中枢側へ進展しており（図４Ｃ）、これはヒト膵がん神経浸潤と同一の特徴である。

[0136] 〔実施例５〕

ヒト膵がん神経浸潤は、腫瘍周囲の神経組織を損傷することが報告されている。神経損傷は、損傷部より末梢側の神経組織においてIL-6発現を亢進させることがわかっている。神経浸潤による神経組織のIL-6発現動態を検討するため、神経浸潤モデルを用いて、神経浸潤中枢側および末梢側の神経組織内（図５Ｂ）に発現するマウスIL-6(mIL6) mRNAをそれぞれreal time RT-PCR法にて評価した。mIL6は神経浸潤中枢側で高発現していたが、その他の神経損傷モデルではその傾向を認めなかった（図５Ｂ）。mIL6蛋白発現を蛍光免疫染色にて確認すると、シュワン細胞のマーカーであるS100陽性細胞領域に一致してIL6陽性顆粒を認めた（図５Ｃ）。神経浸潤モデルにおいてmIL6分泌細胞の一つはシュワン細胞であることが明らかとなった。また、EGFは神経損傷において高発現するとされる分子であるが、マウスEGF(mEGF) mRNA発現動態はmIL6とは異なり中枢側で高発現する傾向を認めなかった。この結果は、

神経浸潤部における腫瘍-神経相互作用にはIL-6が強く関わっていることを示唆する。

[0137] 〔実施例６〕

IL-6の重要な細胞内シグナルであるリン酸化STAT3(pSTAT3)蛋白の膵がん細胞内発現を、免疫染色を用いて検討すると、神経浸潤中枢方向に一致してリン酸化STAT3発現が亢進していた（図６）。この結果は、神経浸潤中枢側の神経組織におけるIL-6発現の亢進と分布が一致する。

[0138] 〔実施例７〕

IL-6による細胞内シグナルには、gp130の介在が必要である。siRNAを用いて膵がん細胞のgp130 mRNA発現をノックダウンした膵がん細胞株を用いて神経浸潤モデルを作製すると、神経浸潤距離が抑制された（図７）。この結果は、神経浸潤には、IL-6由来を含むgp130を介するシグナルが重要であることを示す。

[0139] 〔実施例８〕

IL-6による細胞内シグナルには、IL-6受容体(IL6R)の介在が必要である。siRNAを用いて膵がん細胞のIL6R mRNA発現をノックダウンした膵がん細胞株を用いて神経浸潤モデルを作製すると、神経浸潤距離が抑制された（図８）。この結果は、神経浸潤には、IL-6を介するシグナルが重要であることを示す。

[0140] 〔実施例９〕

次に、マウス神経浸潤モデルにJAK阻害剤又は抗IL-6受容体抗体を投与し、これらの阻害剤の神経浸潤への影響を確認した。

<u>JAK阻害剤のマウス神経浸潤モデルへの投与実験</u>

STAT3リン酸化を阻害するJAK阻害剤 AG490 (CALBIOCHEM) をDMSOに溶解し、生理食塩水で希釈し、DMSO 1%のAG490液を調製した。神経浸潤モデル作製2日後より、AG490 0.5mgをマウスの腹腔内へ連日投与し、モデル作製から2週後にがん細胞を注入した坐骨神経を採取し、神経浸潤距離を測定した。コントロール群は、DMSO 1%液を同様の方法で投与した。使用したマウスの数は、

AG490群とDMSO群ともに7匹であった。

抗IL-6受容体抗体のマウス神経浸潤モデルへの投与実験

ヒトIL-6受容体を阻害する抗IL-6受容体抗体（中外製薬、トシリズマブ）を生理食塩水に溶解し、マウス神経浸潤モデルにモデル作製1週後より、抗IL-6抗体阻害抗体 5μg/gを週2回投与した。モデル作製から3週後にがん細胞を注入した坐骨神経を採取し、神経浸潤距離を測定した。コントロール群は、生理食塩水に溶解したヒトIgG（Sigma）5μg/gを同様の方法で投与した。使用したマウスの数は、抗IL-6受容体抗体群 6匹、コントロール群4匹であった。

統計解析

解析ソフトは、STATVIEW 5.0を用いた。平均値の差の検定は、student-t両側検定を用いた。図中のエラーバーは標準偏差を示すように作成した。

[0141] IL-6による細胞内シグナルとして重要なSTAT3リン酸化のJAK（Janus Kinase）阻害剤AG490を、がん細胞注入2日後より12日間連日腹腔内投与すると、神経浸潤が抑制されることが明らかとなった（図９A）。この結果は、神経浸潤には、IL-6より下流の細胞内シグナルであるJAK-STATが重要であることを示している。

また、ヒトIL-6の阻害作用をするため、抗ヒトIL-6受容体抗体をがん細胞注入1週後より週2回投与を2週間継続すると、神経浸潤が抑制されることが明らかとなった（図９B）。この結果から、ヒト膵癌神経浸潤が抗ヒトIL-6受容体抗体により阻害されたと考えられる。

産業上の利用可能性

[0142] 本発明において、抗IL-6受容体抗体を投与することにより、膵癌において神経浸潤を抑制することが可能であることが示された。さらに抗IL-6受容体抗体を投与することにより、膵癌の治療が可能であることが示された。

請求の範囲

[請求項1] インターロイキン６（IL-6）阻害剤を有効成分とする膵癌治療剤。

[請求項2] IL-６阻害剤を有効成分とする細胞の神経浸潤抑制剤。

[請求項3] 癌細胞の神経浸潤を抑制することを特徴とする請求項２に記載の抑制剤。

[請求項4] 膵癌細胞の神経浸潤を抑制することを特徴とする請求項３に記載の抑制剤。

[請求項5] 中枢側への神経浸潤を抑制することを特徴とする請求項２～４いずれかに記載の抑制剤。

[請求項6] IL-6阻害剤がIL-6受容体に結合する物質であることを特徴とする請求項１～５いずれかに記載の治療剤又は抑制剤。

[請求項7] IL-6阻害剤が抗IL-6受容体抗体であることを特徴とする請求項６に記載の治療剤又は抑制剤。

[請求項8] 抗IL-6受容体抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である請求項７に記載の治療剤又は抑制剤。

[請求項9] IL-6阻害剤を対象に投与する工程を含む、膵癌の治療方法。

[請求項10] IL-6阻害剤を対象に投与する工程を含む、細胞の神経浸潤抑制方法。

[請求項11] 癌細胞の神経浸潤を抑制することを特徴とする請求項１０に記載の方法。

[請求項12] 膵癌細胞の神経浸潤を抑制することを特徴とする請求項１１に記載の方法。

[請求項13] 中枢側への神経浸潤を抑制することを特徴とする請求項１０～１２いずれかに記載の方法。

[請求項14] IL-6阻害剤がIL-6受容体に結合する物質であることを特徴とする請求項９～１３いずれかに記載の方法。

[請求項15] IL-6阻害剤が抗IL-6受容体抗体であることを特徴とする請求項１４に記載の方法。

[請求項16] 抗IL-6受容体抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である請求項１５に記載の方法。

[請求項17] 膵癌治療剤を製造するための、IL-6阻害剤の使用。

[請求項18] 細胞の神経浸潤抑制剤を製造するための、IL-６阻害剤の使用。

[請求項19] 癌細胞の神経浸潤を抑制することを特徴とする請求項１８に記載の使用。

[請求項20] 膵癌細胞の神経浸潤を抑制することを特徴とする請求項１９に記載の使用。

[請求項21] 中枢側への神経浸潤を抑制することを特徴とする請求項１８～２０いずれかに記載の使用。

[請求項22] IL-6阻害剤がIL-6受容体に結合する物質であることを特徴とする請求項１７～２１いずれかに記載の使用。

[請求項23] IL-6阻害剤が抗IL-6受容体抗体であることを特徴とする請求項２２に記載の使用。

[請求項24] 抗IL-6受容体抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である請求項２３に記載の使用。

[請求項25] 膵癌を治療する方法に使用するためのIL-6阻害剤。

[請求項26] 細胞の神経浸潤の抑制するための方法に使用するためのIL-６阻害剤。

[請求項27] 癌細胞の神経浸潤を抑制することを特徴とする請求項２６に記載のIL-６阻害剤。

[請求項28] 膵癌細胞の神経浸潤を抑制することを特徴とする請求項２７に記載のIL-６阻害剤。

[請求項29] 中枢側への神経浸潤を抑制することを特徴とする請求項２６～２８いずれかに記載のIL-６阻害剤。

[請求項30] IL-6阻害剤がIL-6受容体に結合する物質であることを特徴とする請求項２５～２９いずれかに記載のIL-６阻害剤。

[請求項31] IL-6阻害剤が抗IL-6受容体抗体であることを特徴とする請求項３０

に記載のIL－６阻害剤。

[請求項32] 抗IL-6受容体抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である請求項３１に記載のIL－６阻害剤。