

(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
2011年12月29日(29.12.2011)

PCT

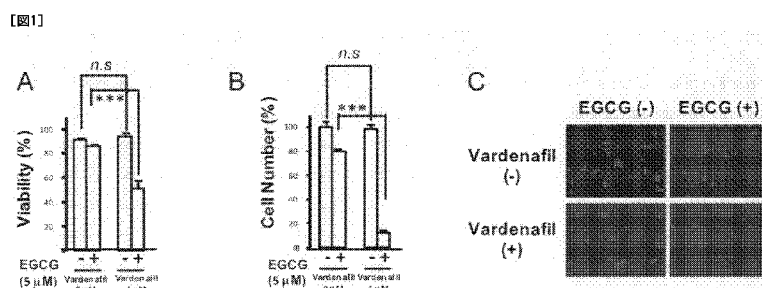
(10) 国際公開番号

WO 2011/162320 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/353 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) C07D 311/62 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) C07D 487/04 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/064349
(22) 国際出願日: 2011年6月23日(23.06.2011)
(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 2010-142520 2010年6月23日(23.06.2010) JP
(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 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; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 立花 宏文 (TACHIBANA, Hirofumi) [JP/JP]; 〒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: 小野 新次郎, 外(ONO, Shinjiro et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: COMBINATION OF EGCG OR METHYLATED EGCG AND A PDE INHIBITOR

(54) 発明の名称: EGCGまたはメチル化EGCGとPDE阻害剤との組み合わせ



(57) Abstract: Disclosed is a medicament characterized by the combination of: epigallocatechin gallate, methylated epigallocatechin gallate, or a pharmacologically permitted salt thereof; and a phosphodiesterase inhibitor.

(57) 要約: エピガロカテキンガレートまたはメチル化エピガロカテキンガレート、またはその医薬的に許容される塩と、ホスホジエステラーゼ阻害剤と、を組み合わせたことを特徴とする薬剤。

WO 2011/162320 A1

明 細 書

発明の名称 : EGCGまたはメチル化EGCGとPDE阻害剤との組み合わせ
技術分野

[0001] 本発明は、疾患、特に悪性腫瘍、アレルギー、肥満、動脈硬化、炎症及び筋萎縮等の疾患の予防または治療において有用な、エピガロカテキンガレート (Epigallocatechin gallate、以下「EGCG」と称することもある) またはメチル化エピガロカテキンガレート (以下「メチル化EGCG」と称することもある) とホスホジエステラーゼ (以下「PDE」と称することもある) 阻害剤との組み合わせに関する。

背景技術

[0002] がんは国民の死因の三分の一を占める病であり、適切な治療手段の確立が強く求められている。血液のがんとして知られている白血病において、オールトランスレチノイン酸 (ATRA) を用いた分化誘導療法やフィラデルフィア染色体を起因とするBCR/ABLタンパクに対する分子標的薬の導入により治療業績が改善しつつある。しかしながらこれらの薬剤に対して腫瘍が抵抗性を獲得し、治療が困難となるケースが非常に多く、未だ問題点が多い。よって従来とは全く異なった作用機作を持つ抗がん剤を開発することは従来の抗がん剤が効奏しなくなった患者に新たな選択肢を提供する。さらに、その用量規定毒性が異なったものであれば、従来の治療と組み合わせることが可能であり、より有効な治療戦略の立案が可能となる。

[0003] 緑茶に含まれる主要なカテキンの一種であるEGCGは抗がん作用を持つことが報告されており、現在慢性リンパ性白血病患者において臨床試験が行われている (非特許文献1及び2)。発明者らはこれまでにEGCGの抗がん作用を担う細胞膜上の標的分子として67 kDa Laminin Receptor (67LR) を同定した (非特許文献3～6)。この67LRは当初、基底膜の主要な構成成分であるラミニンと結合する細胞膜タンパク質として発見されたが (非特許文献7)、近年の研究において、67LRはがん細胞において発現が異常に亢進しており (

非特許文献8)、その発現と増殖、浸潤、転移の間に強い相関が認められている(非特許文献9から15)。リンパ球においても、67LRは正常リンパ球にはほとんど発現せず、白血病細胞において高発現しているという報告が数多くなされている(非特許文献16及び17)。最近、EGCGは67LRを介して選択的に白血病細胞のみを死滅させることが報告され(非特許文献16及び17)、EGCGが67LR陽性の白血病細胞に対する分子標的剤となりうることを示された。しかしながらEGCGの白血病細胞に対する致死作用は限定的であり(非特許文献2)、EGCGを抗がん剤として利用する上でその作用増強が強く望まれている。

[0004] EGCGは67LRを介して、さらに、抗アレルギー作用(非特許文献18~20)、抗肥満作用(非特許文献21及び22)、抗動脈硬化作用(非特許文献23)、抗炎症作用(非特許文献24)及び筋萎縮阻害作用(非特許文献25)等の作用を奏することが知られているが、その臨床への適用という点から、その作用増強が強く望まれている。

[0005] また、メチル化EGCGも抗がん作用(特許文献1)及び抗アレルギー作用(非特許文献26)等を奏することが知られているが、やはりその作用増強が強く望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1: 国際公開第2009/107262号

非特許文献

[0007] 非特許文献1: Cancer res, 2006;66:2500-2505

非特許文献2: J Clin Oncol, 2009;27:3808-3814

非特許文献3: Nat Struct Mol Biol, 2004;11:380-381

非特許文献4: Biochem Biophys Res Commun, 2005;333:628-635

非特許文献5: Biochem Biophys Res Commun, 2008;371:172-176

非特許文献6: J Biol Chem, 2008;283:3050-3058

非特許文献7: Biosci Rep, 2008;28:33-48

- 非特許文献8 : J Natl Cancer Inst, 1991;83:29-36
- 非特許文献9 : J Cell Biochem, 1997;67:155-165
- 非特許文献10 : Breast Cancer Res Treat, 1998;52:137-145
- 非特許文献11 : Cancer, 1993;72:455-461
- 非特許文献12 : J Pathol, 1996;179:376-380
- 非特許文献13 : Brain Res Bull, 2009;79:402-408
- 非特許文献14 : Clin Cancer Res, 1997;3:227-231
- 非特許文献15 : Clin Cancer Res, 1996;2:1777-1780
- 非特許文献16 : Br J Haematol, 2010;149:55-64
- 非特許文献17 : Blood, 2006;108:2804-2810
- 非特許文献18 : Biochem. Biophys. Res. Commun. 336, 674-681 (2005)
- 非特許文献19 : Biochem. Biophys. Res. Commun. 348, 524-531 (2006)
- 非特許文献20 : Arch. Biochem. Biophys. 76, 133-138 (2008)
- 非特許文献21 : Am J Physiol Cell Physiol. 297, C121-132 (2009)
- 非特許文献22 : Mol Nutr Food Res. 53, 349-360 (2009)
- 非特許文献23 : J. Mol. Cell. Cardiol. 48, 1138-1145 (2010)
- 非特許文献24 : J. Immunol., 185, 33-45 (2010)
- 非特許文献25 : Biofactors. 35, 279-29 (2009)
- 非特許文献26 : Biochem. Biophys. Res. Commun. 364, 79-85 (2007)

発明の概要

- [0008] 本発明者らは最近、EGCGの多発性骨髄腫細胞株に対する致死作用において、67LRを介したNO産生が重要であることを見出した(後記参考文献18)。そこで、NOに起因するシグナル伝達経路を促進することにより、EGCGの抗がん作用を増強できるのではないかと考えた。cGMPはNOのシグナル伝達において重要な役割を果たすメディエーターであり(後記参考文献19)、cGMPの分解酵素であるホスホジエステラーゼを阻害することで、NOのシグナル伝達が促進されることが知られている。
- [0009] ホスホジエステラーゼは生体内において重要なセカンドメッセンジャーで

あるcGMPやcAMPの分解に関与する酵素であり、循環器疾患(後記参考文献20)や男性の性機能障害である勃起不全症(後記参考文献21及び22)の創薬ターゲットとして注目されている。また、ホスホジエステラーゼ5(PDE5)が腫瘍において高発現していることも明らかになっている(後記参考文献23)。

[0010] そこで、PDE阻害剤とEGCGを組み合わせることで、EGCGの抗がん作用が増強できるのではないかと考えたに至った。

[0011] そして本発明者らは、PDE阻害剤とEGCGを組み合わせることでEGCGのがん細胞致死作用が増強されることを見つけ、本発明に至った。

[0012] これまでにEGCGの抗がん作用を増強しようとする研究は数多くあるものの、PDE阻害と組み合わせることに着目した研究はなく、本発明により、それらの併用により抗がん作用が顕著に増強されることが示された。

[0013] また、EGCGの抗がん作用には67LRが関係していることから、がんのみならず、EGCGが67LRを介して作用を発揮することが知られている疾患等に対しても、PDE阻害剤との組み合わせが有効であると考えられる。

[0014] 本発明の要旨は以下の通りである。

[1] エピガロカテキンガレートまたはメチル化エピガロカテキンガレート、またはその医薬的に許容される塩と、ホスホジエステラーゼ阻害剤と、を組み合わせたことを特徴とする薬剤；

[2] がん、アレルギー、肥満、動脈硬化、炎症または筋萎縮の治療で使用するための[1]に記載の薬剤；

[3] 67LR陽性の疾患の治療で使用するための[1]または[2]に記載の薬剤；

[4] 前記ホスホジエステラーゼ阻害剤がホスホジエステラーゼ3阻害剤またはホスホジエステラーゼ5阻害剤である[1]～[3]のいずれか一つに記載の薬剤；

[5] 前記ホスホジエステラーゼ阻害剤がバルデナフィルである、[1]～[3]のいずれか一つに記載の薬剤；

[6] エピガロカテキンガレートまたはメチル化エピガロカテキンガレート

、またはその医薬的に許容される塩と、とホスホジエステラーゼ阻害剤との組み合わせを患者に投与することを含む、がん、アレルギー、肥満、動脈硬化、炎症または筋萎縮の治療方法；

[7] a) エピガロカテキンガレートまたはメチル化エピガロカテキンガレート、またはその医薬的に許容される塩を含有する第一の単位剤形；

b) ホスホジエステラーゼ阻害剤を含有する第二の単位剤形；及び

c) 前記第一の単位剤形及び第二の単位剤形を収容するための容器手段；を含んでなる、がん、アレルギー、肥満、動脈硬化、炎症または筋萎縮の治療で使用するためのキット。

図面の簡単な説明

[0015] [図1] 図1は、多発性骨髄腫細胞に対するEGCGの細胞致死作用(A)及び細胞増殖抑制作用(B)におけるPDE5阻害剤との組み合わせの効果を示す。

[図2] 図2は、急性骨髄腫性白血病細胞に対するEGCGの細胞致死作用(A)及び細胞増殖抑制作用(B)におけるPDE5阻害剤との組み合わせの効果を示す。

[図3] 図3は、多発性骨髄腫細胞に対するEGCGとPDE5阻害剤の細胞致死作用(A)及び細胞増殖抑制作用(B)における67LRの影響を示す。

[図4] 図4は、急性骨髄性白血病細胞に対するEGCGとPDE5阻害剤の細胞致死作用(A)及び細胞増殖抑制作用(B)における67LRの影響を示す。

[図5] 図5は、多発性骨髄腫細胞に対するEGCGとPDE5阻害剤のアポトーシス誘導活性における67LRの影響を示す。

[図6] 図6は、急性骨髄性白血病細胞に対するEGCGとPDE5阻害剤のアポトーシス誘導活性における67LRの影響を示す。

[図7] 図7は、ヒト前立腺がん細胞株PC3に対するEGCGの細胞致死作用(A)及び細胞増殖抑制作用(B)におけるPDE5阻害剤との組み合わせの効果を示す。

[図8] 図8は、ヒト多発性骨髄腫細胞株RPMI8226に対するEGCGの細胞致死作用及び細胞増殖抑制作用におけるPDE5阻害剤との組み合わせの効果を示す。

[図9] 図9は、患者由来多発性骨髄腫に対するEGCGの細胞致死作用及び細胞増殖抑制作用におけるPDE5阻害剤との組み合わせの効果を示す。

[図10]図10は、ヒト形質細胞腫ARH77に対するEGCGの細胞致死作用及び細胞増殖抑制作用におけるPDE5阻害剤との組み合わせの効果を示す。

[図11]図11は、慢性骨髄性白血病細胞株K562に対するEGCGの細胞致死作用及び細胞増殖抑制作用におけるPDE5阻害剤との組み合わせの効果を示す。

[図12]図12は、ヒト乳がん細胞株MCF-7に対するEGCGの細胞増殖抑制作用におけるPDE5阻害剤との組み合わせの効果を示す。

[図13]図13は、ヒト胃がん細胞株MKN45に対するEGCGの細胞増殖抑制作用におけるPDE5阻害剤との組み合わせの効果を示す。

[図14]図14は、ヒト膵臓がん細胞株PANC-1に対するEGCGの細胞致死作用及び細胞増殖抑制作用におけるPDE5阻害剤との組み合わせの効果を示す。

[図15]図15は、ヒト臍帯静脈内皮細胞HUVECの生存率および細胞増殖に対するEGCGとPDE5阻害剤との組み合わせの効果を示す。

[図16]図16は、健常者由来末梢血リンパ球の生存率および細胞増殖に対するEGCGとPDE5阻害剤との組み合わせの効果を示す。

[図17]図17は、Balb/cマウスに移植したマウス形質細胞腫細胞株MPC11の腫瘍形成に対するEGCGとPDE5阻害剤との組み合わせの効果を示す。

[図18]図18は、ヒト多発性骨髄腫細胞株U266に対するメチル化EGCGとPDE5阻害剤との組み合わせの効果を示す。

[図19]図19は、前立腺がん細胞株PC-3および膵臓がん細胞株PANC-1に対するメチル化EGCGとPDE5阻害剤との組み合わせの効果を示す。

[図20]図20は、慢性骨髄性白血病細胞株K562に対するEGCGの細胞増殖抑制作用におけるPDE3阻害剤との組み合わせの効果を示す。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明によれば、エピガロカテキングレート又はその医薬的に許容される塩、又はメチル化エピガロカテキングレート又はその医薬的に許容される塩と、ホスホジエステラーゼ阻害剤とを組み合わせたことを特徴とする、疾患の治療での使用に適した薬剤が提供される。また、本発明によれば、EGCG又はその医薬的に許容される塩、又はメチル化EGCG又はその医薬的に許容され

る塩と、PDE阻害剤との組み合わせを患者に投与することを含む、疾患の治療方法が提供される。本発明は特に、がん、アレルギー、肥満、動脈硬化、炎症及び筋萎縮等の疾患、又は、67LR陽性の疾患の治療に有用である。

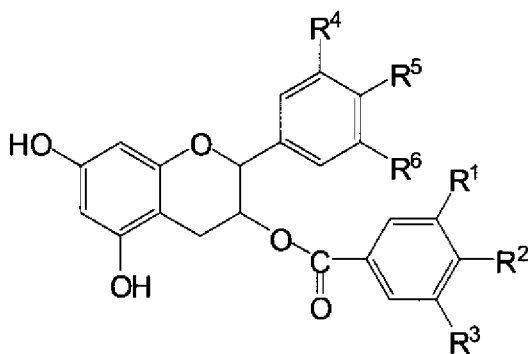
[0017] 本明細書において、「組み合わせ」という用語は、組み合わせの各成分が、同時に、連続的に、または個別に、患者に投与されることを想定している。したがって、本発明のEGCG又はメチル化EGCG、又はその医薬的に許容される塩と、PDE阻害剤とを組み合わせた薬剤は、一つの単位剤形中にその二つの成分が含有されている形態の薬剤であってもよく、または、EGCG又はメチル化EGCG、又はその医薬的に許容される塩を含有する第一の単位剤形と、PDE阻害剤を含有する第二の単位剤形とを組み合わせた形態の薬剤であってもよい。

[0018] 本明細書において、「67LR陽性の疾患」とは、白血病細胞において67LRが高発現しているというような、その疾患の部位（細胞）において67LRの発現が異常に亢進している疾患をいう。

[0019] EGCG（（-）-エピガロカテキン-3-O-ガレート）は緑茶葉等に含有されるポリフェノール化合物の一種である。

[0020] メチル化EGCGは、下記の式（I）：

[0021] [化1]



(I)

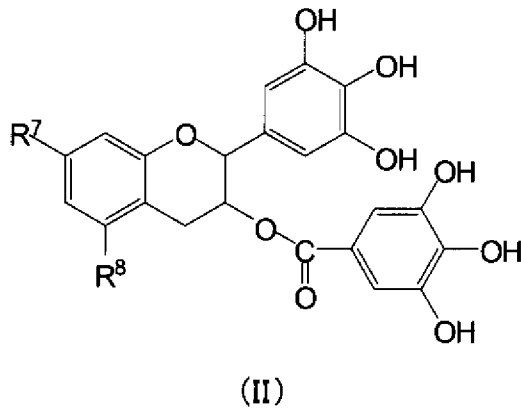
（式中、 $R^1 \sim R^6$ はそれぞれ独立に水素原子、ヒドロキシル基又はメトキシ基を表し、且つ、 $R^1 \sim R^6$ の少なくとも一つはメトキシ基を表す）の化合物

である。例えば、 $R^1 \sim R^6$ の一つがメトキシ基であり、他がヒドロキシル基である化合物、または、 $R^1 \sim R^6$ の二つがメトキシ基であり、他がヒドロキシル基である化合物が挙げられる。具体的には、 $3''$ - O -メチル-エピガロカテキン- 3 -ガラート、 $4''$ - O -メチル-エピガロカテキン- 3 -ガラート、 $3''$ 、 $4''$ - O -ジメチル-エピガロカテキン- 3 -ガラート、 $3''$ 、 $5''$ - O -ジメチル-エピガロカテキン- 3 -ガラート、 $4'$ - O -メチル-エピガロカテキン- 3 -ガラート、 $4'$ 、 $4''$ - O -ジメチル-エピガロカテキン- 3 -ガラート、 $4'$ 、 $3''$ 、 $4''$ - O -トリメチル-エピガロカテキン- 3 -ガラート、 $4'$ 、 $3''$ 、 $5''$ - O -トリメチル-エピガロカテキン- 3 -ガラート、 $3'$ 、 $5'$ - O -ジメチル-エピガロカテキン- 3 -ガラート、 $3'$ 、 $5'$ 、 $4''$ - O -トリメチル-エピガロカテキン- 3 -ガラート、 $3'$ 、 $5'$ 、 $3''$ 、 $4''$ - O -テトラメチル-エピガロカテキン- 3 -ガラート、 $3'$ 、 $5'$ 、 $3''$ 、 $5''$ - O -テトラメチル-エピガロカテキン- 3 -ガラート、 $3'$ 、 $4'$ 、 $5'$ - O -トリメチル-エピガロカテキン- 3 -ガラート、 $3'$ 、 $4'$ 、 $5'$ 、 $4''$ - O -テトラメチル-エピガロカテキン- 3 -ガラート、 $3'$ 、 $4'$ 、 $5'$ 、 $3''$ 、 $4''$ - O -ペンタメチル-エピガロカテキン- 3 -ガラート、及び $3'$ 、 $4'$ 、 $5'$ 、 $3''$ 、 $5''$ - O -ペンタメチル-エピガロカテキン- 3 -ガラート等である。メチル化EGCGは、EGCGと同様に、67LRを介してその各種作用を奏する。メチル化EGCGとしては、 $3''$ - O -メチル-エピガロカテキン- 3 -ガラート及び $4''$ - O -メチル-エピガロカテキン- 3 -ガラートが好ましい。

[0022] メチル化EGCGとしては、また、下記の式(11)：

[0023]

[化2]



(式中、 R^7 及び R^8 はそれぞれ独立にヒドロキシル基又はメトキシ基を表し、且つ、 R^7 及び R^8 の少なくとも一つはメトキシ基を表す)の化合物が挙げられる。具体的には、7-O-メチルーエピガロカテキン-3-ガレート等である。

[0024] EGCG及びメチル化EGCGは、例えば、緑茶葉の抽出液から、HPLC、合成吸着剤クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー及びゲルろ過等の手法により単離することができる。また、EGCG及びメチル化EGCGは公知の方法で合成することもできる。

[0025] 本発明において、EGCG及びメチル化EGCGは、その医薬的に許容される塩として用いることもできる。医薬的に許容される塩としては、例えば、アルカリ金属（ナトリウム、カリウム及びリチウム等）との塩、及びアルカリ土類金属（カルシウム及びマグネシウム等）との塩が挙げられる。塩は、例えば、EGCG又はメチル化EGCGとアルカリ金属又はアルカリ土類金属の水酸化物又は水素化物とを反応させて製造することができる。

[0026] ホスホジエステラーゼ阻害剤は、cAMP及びcGMP等の環状リン酸ジエステルを加水分解する酵素を阻害する物質であり、非選択的なPDE阻害剤と選択的なPDE阻害剤とが知られている。本発明では、非選択的なPDE阻害剤及び選択的なPDE阻害剤のいずれも用いることができる。

[0027] 非選択的なPDE阻害剤としては、例えば、カフェイン、テオフィリン、テオ

ブロミン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX) 及びペントキシフィリン (pentoxifylline) 等が挙げられる。

[0028] 選択的なPDE阻害剤としては、例えば、8-メトキシ-3-イソブチル-1-メチルキサンチン等のPDE1阻害剤、エリスロ-9-(2-ヒドロキシ-3-ノニル) アデニン塩酸塩 (EHNA hydrochloride) 等のPDE2阻害剤、シロスタミド (cilostamide)、ミルリノン (milrinone) 及びトレキシシン (trequisin) 等のPDE3阻害剤、エタゾラート塩酸塩 (etazolate hydrochloride) 及びデンプフィリン (denbufylline) 等のPDE4阻害剤、及び、バルデナフィル (vardenafil)、シルデナフィル (sildenafil)、ザプリナスト (zaprinast)、タダラフィル (tadalafil)、ジピリダモール (dipyridamole)、4-{[3', 4'-(メチレンジオキシ)ベンジル]アミノ}-6-メトキシキナゾリン、及び1-(3-クロロアニリノ)-4-フェニルフタラジン (MY-5445) 等のPDE5阻害剤が挙げられる。本発明では、PDE3阻害剤またはPDE5阻害剤が好ましく、そして、EGCG又はその医薬的に許容される塩とPDE5阻害剤との組み合わせ、または、EGCG又はその医薬的に許容される塩とPDE3阻害剤との組み合わせ、が好ましい。

[0029] 本発明は、EGCG又はその医薬的に許容される塩、又はメチル化EGCG又はその医薬的に許容される塩と、PDE阻害剤とを組み合わせることを特徴とする。そして、以下の実施例より理解されるように、これら二つの成分を組み合わせることで用いることにより、それぞれ単独で用いた場合に比して、顕著に増強されたがん細胞に対する致死作用が示される。また、EGCGとPDE5阻害剤との併用による抗がん作用は完全に67LR依存的であり、67LR陰性の正常細胞に重大な副作用を及ぼすことなく67LR陽性のがん細胞に対して選択的に抗がん作用を発揮することが判った。

[0030] したがって、本発明のEGCG又はその医薬的に許容される塩、又はメチル化EGCG又はその医薬的に許容される塩と、PDE阻害剤と、を組み合わせた薬剤はがんの治療に有用である。本発明の薬剤は、EGCGが67LRを介して抗がん作用を発揮するがん（例えば、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、前立腺がん、

メラノーマ、乳がん、肺がん、子宮頸がん及び結腸がん)の治療に特に有用である。

[0031] また、本発明は、PDE阻害剤を組み合わせることにより、EGCGまたはメチル化EGCGの作用が増強されるということに基づく。そのため、本発明の薬剤は、がんだけではなく、67LR陽性の疾患、または、EGCG又はメチル化EGCGがそれぞれ単独でも治療に有効な作用を奏する疾患、または、EGCG又はメチル化EGCGが67LRを介して治療に有効な作用を奏する疾患、例えば、アレルギー、肥満、動脈硬化、炎症及び筋萎縮等の疾患の治療に有用である。

[0032] 本発明の薬剤は、活性成分(EGCGまたはメチル化EGCG、またはその医薬的に許容される塩、またはPDE阻害剤)に医薬的に許容できる希釈剤又は担体を適用して製剤化し、投与に適した剤形として提供することができる。希釈剤又は担体としては、医薬的に許容されるものであれば特に制限はなく、例えば、結合剤、崩壊剤、酸味料、発泡剤、人工甘味料、香料、滑沢剤、着色剤、安定化剤、緩衝剤、抗酸化剤及び界面活性剤等が挙げられる。剤形には特に制限はなく、例えば、散剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤及び錠剤等の固形製剤、及び、水剤、懸濁剤及び乳剤等の液剤、等の形態で提供することができる。そして、これら製剤は、希釈剤又は担体を使用し、慣用的方法で製造することができる。

[0033] 投与されるEGCG又はメチル化EGCG、又はその医薬的に許容される塩の量、及びPDE阻害剤の量は、対象とする疾患に対して所望の治療効果を奏するに有効な量、例えば所望の抗がん作用を提供するために有効な量、である。

[0034] EGCG又はメチル化EGCG、又はその医薬的に許容される塩の一日投与量としては、例えば、0.01mg~5000mgであり、または0.1mg~50mgであり、または、0.5mg~20mgであり、または1.0mg~10mgである。

[0035] PDE阻害剤の一日投与量としては、例えば、0.01mg~2000mgであり、または0.1mg~50mgであり、または、0.5mg~20mgであり、または1.0mg~10mgである。

[0036] また、PDE阻害剤の一日投与量は、EGCG又はメチル化EGCG、又はその医薬的に許容される塩の一日投与量1質量部について、例えば0.01～100質量部、又は0.1～10質量部、又は0.5～5質量部、とすることができる。

[0037] 本発明のEGCG又はメチル化EGCG、又はその医薬的に許容される塩とPDE阻害剤とを組み合わせた薬剤は、がんの治療のために単独で用いてもよいし、または他の抗がん剤と組み合わせ用いてもよく、また、外科手術又は放射線治療と組み合わせてもよい。

実施例

[0038] 以下、実施例および比較例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0039] [材料及び方法]

(1) EGCGとPDE5阻害剤の組み合わせによる細胞増殖抑制作用及び細胞致死作用の検討

ヒト多発性骨髄腫細胞株U266は10% ウシ胎児血清(FCS) (BIOLOGICAL INDUSTRIES)添加RPMI RPMI1640培地(NISSUI PHARMACEUTICAL Co. LTD.、東京)にて37℃、水蒸気飽和した5% CO₂条件下で継代、維持した。細胞は対数増殖期で培養維持した。ヒト急性骨髄性白血病細胞株HL60は10% ウシ胎児血清(FCS)添加RPMI 1640培地にて37℃、水蒸気飽和した5% CO₂ 条件下で継代、維持した。細胞は対数増殖期で培養維持した。培養に使用したRPMI 1640培地は、超純水1LあたりRPMI 1640培地(コスモ・バイオ株式会社、東京)10.4g、HEPES(和光純薬工業株式会社、大阪)2.38g、注射用ペニシリンG カリウム 20万単位(明治製菓株式会社、東京) 0.5vial、硫酸ストレプトマイシン注射用 1g(明治製菓株式会社、東京) 0.1vial、NaHCO₃(Nacalai tesque, Inc. Kyoto)2.0gを懸濁した後、フィルター滅菌した。その後、ウシ胎児血清(FCS)をRPMI 1640培地に添加し、細胞培養に使用した。

[0040] トリパンブルー法によるEGCGとバルデナフィルの組み合わせによる抗がん作用の検討において用いたトリパンブルー(和光純薬)は、1%の濃度となるよ

うにPBSに懸濁したものをトリパンブルー染色液とした。用いるPBSは超純水1Lに対し、NaCl(Nacalai tesque, Inc. 京都)8.0g、KCl(Nacalai tesque, Inc.、京都)0.2g、Na₂HPO₄(Nacalai tesque, Inc.、京都)1.15g、KH₂PO₄(Nacalai tesque, Inc.、京都)0.2gを溶解し調製しオートクレーブ滅菌した。

[0041] U266及びHL60を1% FCS含有RPMI 1640に 5×10^4 cells/mL(U266)及び 1×10^4 cells/mL (HL60)となるようそれぞれ調整して24 well plate(FALCON社)に播種し、バルデナフィルが終濃度で5 μ Mとなるよう添加した。用いたバルデナフィル(Toronto Research Chemicals Inc.)は10%ジメチルスルホキシド(DMSO)(Nacalai tesque, Inc.、京都)添加超純水にて5mMとなるように調整し、-30°Cにて保存した。使用に際しては適宜解凍して用いた。

[0042] バルデナフィルの添加後直ちにインキュベーターに戻し、3時間経過後、EGCG(Sigma)を終濃度で5 μ Mとなるように添加した。用いたEGCGは10%ジメチルスルホキシド(DMSO)(Nacalai tesque, Inc.、京都)添加超純水にて5mMとなるように調整し、-30°Cにて保存した。使用に際しては適宜解凍して用いた。

[0043] EGCG添加後、直ちにインキュベーターにもどし、96時間培養した。その後、十分に懸濁した細胞培養液に、終濃度が0.1%となるようトリパンブルー染色液を添加し10分経過後、細胞数を血球計算盤(BECTON DICKINSON)により計測した。染色されないものを生細胞とみなし、細胞生存率はトリパンブルー染色を行い、その全細胞数に対する染色されない細胞の割合で求めた。その後顕微鏡(KEYENCE)による細胞の写真の撮影を行った。実験結果の統計処理にはTukey' s testを用いた。

[0044] (2) EGCGとPDE5阻害剤の組み合わせによる細胞増殖抑制作用及び細胞致死作用における67LR関与の検討

トリパンブルー法によるEGCGとバルデナフィルの組み合わせによる抗がん作用の検討において用いたトリパンブルーは1%の濃度となるようにPBSに懸濁したものをトリパンブルー染色液とした。用いるPBSは超純水1Lに対し、NaCl 8.0g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄ 1.15g、KH₂PO₄ 0.2gを溶解し調製しオートクレーブ滅菌した。

[0045] ヒト多発性骨髄腫細胞株U266及びヒト急性骨髄性白血病細胞株HL60を1%FCS含有RPMI 1640に 5×10^4 cells/mL(U266)及び 1×10^4 cells/mL(HL60)となるよう調整して96 well plate(FALCON社)に播種し、バルデナフィルが終濃度で $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。その後直ちに、終濃度が $20 \mu\text{g/mL}$ となるよう抗67LRモノクローナル抗体であるMLuc5(Abcam)を添加した。アイソタイプ対照抗体添加群ではMouse IgM(コスモ・バイオ株式会社、東京)が終濃度で $20 \mu\text{g/mL}$ となるよう添加した。用いたバルデナフィルは10%ジメチルスルホキシド(DMSO)添加超純水にて 5mM となるよう調整し、 -30°C にて保存した。使用に際しては適宜解凍して用いた。

[0046] 各種抗体の添加後直ちにインキュベーターに戻し、3時間経過後、EGCGを終濃度で $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。用いたEGCGは10%ジメチルスルホキシド(DMSO)添加超純水にて 5mM となるよう調整し、 -30°C にて保存した。使用に際しては適宜解凍して用いた。

[0047] EGCG添加後、直ちにインキュベーターにもどし、96時間培養した。その後、十分に懸濁した細胞培養液に終濃度が0.1%となるようトリパンブルー染色液を添加し10分経過後、細胞数を血球計算盤により計測した。染色されないものを生細胞とみなし、細胞生存率はトリパンブルー染色を行い、その全細胞数に対する染色されない細胞の割合で求めた。実験結果の統計処理にはTukey's testを用いた。

[0048] (3) EGCGとPDE5阻害剤(バルデナフィル)の組み合わせによるアポトーシス誘導作用における67LR関与の検討

Annexin V PI重染色法によるEGCGとバルデナフィルの組み合わせによる抗がん作用の検討において用いたヨウ化プロピジウム(PI)染色液はPI(Sigma)を $50 \mu\text{g/mL}$ の濃度となるようPBSに懸濁したものをPI染色液とした。用いたPBSは超純水1Lに対し、NaCl 8.0g、KCl 0.2 g、 Na_2HPO_4 1.15g、 KH_2PO_4 0.2gを溶解し調製しオートクレーブ滅菌した。用いたAnnexin V Binding Bufferは10mM HEPES, 140mM NaCl; 2.5mM CaCl_2 (Wako); pH 7.4となるよう調整しフィルター滅菌に供した。

[0049] U266及びHL60を1%FCS含有RPMI 1640に 5×10^4 cells/mL (U266)及び 1×10^4 cells/mL (HL60)になるよう調整して96 well plateに播種し、バルデナフィルが終濃度で $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。その後直ちに、終濃度が $20 \mu\text{g/mL}$ となるよう抗67LRモノクローナル抗体であるMLuc5を添加した。アイソタイプ対照抗体添加群ではMouse IgMの終濃度が $20 \mu\text{g/mL}$ となるよう添加した。

[0050] 用いたバルデナフィルは10%ジメチルスルホキシド(DMSO)添加超純水にて5mMとなるよう調整し、 -30°C にて保存した。使用に際しては適宜解凍して用いた。各種抗体の添加後直ちにインキュベーターに戻し、3時間経過後、EGCGを終濃度で $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。用いたEGCGは10%ジメチルスルホキシド(DMSO)添加超純水にて5mMとなるよう調整し、 -30°C にて保存した。使用に際しては適宜解凍して用いた。

[0051] EGCG添加後、直ちにインキュベーターにもどし、96 時間培養した。その後、十分に懸濁した細胞培養液を $300 \times g$ 5分にて遠心し、上清を除去した後、Annexin V Binding Bufferにて懸濁し、細胞数を血球計算盤により計測し再び $300 \times g$ 5分にて遠心し、 1×10^6 cells/mLとなるようAnnexin V Binding Bufferにて懸濁した。この細胞懸濁液 $100 \mu\text{L}$ に対しAnnexin V Alexa Fluor 488 Conjugateを $5 \mu\text{L}$ (Invitrogen)添加しさらに事前に調製したPI染色液 $2 \mu\text{L}$ を上から添加し、室温にて15分放置した。その後、Annexin V Binding Buffer $400 \mu\text{L}$ を上から添加し、フローサイトメーターであるFACS Caliber(Becton, Dickinson and Company)を用いて測定を行った。コンペンセーションをかけたのちAnnexin V Alexa Fluor 488 ConjugateはFL 1にて測定し、陽性とみなされた細胞をアポトーシス細胞とした。解析はCell Quest (Becton, Dickinson and Company)にておこなった。実験結果の統計処理にはTukey's testを用いた。

[0052] (4) ヒト前立腺がんに対するEGCGとPDE5阻害剤の組み合わせによる細胞増殖抑制作用及び細胞致死作用の検討

ヒト前立腺がん細胞株PC3は10%ウシ胎児血清(FCS)添加RPMI RPMI1640培地にて 37°C 、水蒸気飽和した5% CO_2 条件下で継代、維持した。細胞は対数増殖期

で培養維持した。培養に使用したRPMI 1640培地は、超純水1LあたりRPMI 1640培地 10.4g、HEPES 2.38g、注射用ペニシリンG カリウム 20万単位 0.5 vial、硫酸ストレプトマイシン注射用 1g 0.1 vial、 NaHCO_3 2.0gを懸濁した後、フィルター滅菌した。その後、ウシ胎児血清(FCS)をRPMI 1640培地に添加し、細胞培養に使用した。

[0053] トリパンブルー法によるEGCGとバルデナフィルの組み合わせによる抗がん作用の検討において用いたトリパンブルーは、1%の濃度となるようにPBSに懸濁したものをトリパンブルー染色液とした。用いるPBSは超純水1Lに対し、NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、 Na_2HPO_4 1.15g、 KH_2PO_4 0.2gを溶解し調製しオートクレーブ滅菌した。

[0054] PC3は10%FCS含有RPMI 1640に 1×10^4 cells/mLとなるようそれぞれ調整して24 well plate(NUNC社)に播種し、24時間前培養後バルデナフィルが終濃度で5 μM となるよう添加した2%FCS RPMIに置換した。用いたバルデナフィルは10%ジメチルスルホキシド(DMSO)添加超純水にて5mMとなるように調整し、 -30°C にて保存した。使用に際しては適宜解凍して用いた。バルデナフィルの添加後直ちにインキュベーターに戻し、2時間経過後、EGCGを終濃度で10 μM となるように添加した。用いたEGCGは10%ジメチルスルホキシド(DMSO)添加超純水にて5mMとなるように調整し、 -30°C にて保存した。使用に際しては適宜解凍して用いた。

[0055] EGCG添加後、直ちにインキュベーターにもどし、72時間培養した。その後、十分に懸濁した細胞培養液に終濃度が0.1%となるようトリパンブルー染色液を添加し10分経過後、細胞数を血球計算盤により計測した。染色されないものを生細胞とみなし、細胞生存率はトリパンブルー染色を行い、その全細胞数に対する染色されない細胞の割合で求めた。顕微鏡による細胞の写真の撮影を行った。実験結果の統計処理にはTukey's testを用いた。

[0056] [結果]

(1) 多発性骨髄腫細胞に対するEGCGの細胞致死作用 (A) 及び細胞増殖抑制作用 (B) におけるPDE5阻害剤の組み合わせ効果

EGCG抵抗性因子であると考えられるcGMP特異的分解酵素であるPDE5に対する選択的阻害剤（バルデナフィル）によるEGCGの多発性骨髄腫に対する作用の増強について検討を行った。

[0057] ヒト多発性骨髄腫細胞株U266を24 well plateに 5×10^4 cells/mLとなるように播種し、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルを添加し、3時間経過後、EGCGを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、血球計算板を用いてトリパンブルー染色法による細胞生存率測定及び生細胞数測定を実施した。結果を図1に示す（ $n=3$, Tukey' s test, ***: $P<0.001$ ）。

[0058] 図1に示されるように、EGCGおよびバルデナフィルはそれぞれ単独では細胞に対して何ら毒性を示さなかったものの、EGCGとバルデナフィルを組み合わせた場合、極めて強力にがん細胞の生存率の低下を引き起こした（A）。また生細胞数に対するEGCGの作用もバルデナフィルの存在によって顕著に増強した（B）。さらに顕微鏡写真においても同様の結果が得られた（C）。これらことからPDE5選択的阻害剤であるバルデナフィルは多発性骨髄腫細胞に対するEGCGの作用を顕著に増強することが明らかになった。

[0059] （2）急性骨髄腫性白血病細胞に対するEGCGの細胞致死作用（A）及び細胞増殖抑制作用（B）におけるPDE5阻害剤の組み合わせ効果

EGCG抵抗性因子であると考えられるcGMP特異的分解酵素であるPDE5に対する選択的阻害剤（バルデナフィル）によるEGCGの急性骨髄性白血病細胞に対する作用の増強について検討を行った。

[0060] ヒト急性骨髄性白血病細胞HL60を24 well plateに 1×10^4 cells/mLとなるように播種し、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルを添加し、3時間経過後、EGCGを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、血球計算板を用いてトリパンブルー染色法による細胞生存率測定及び生細胞数測定を実施した。結果を図2に示す（ $n=3$, Tukey' s test, ***: $P<0.001$ ）。

[0061] 図2に示されるように、EGCGおよびバルデナフィルはそれぞれ単独では細胞に対して何ら毒性を示さなかったものの、EGCGとバルデナフィルを組み合わせた場合、極めて強力にがん細胞の生存率の低下を引き起こした（A）。

また生細胞数に対するEGCGの作用もバルデナフィルの存在によって顕著に増強した（B）。さらに顕微鏡写真においても同様の結果が得られた（C）。これらことからPDE5選択的阻害剤であるバルデナフィルは急性骨髄性白血病細胞に対するEGCGの作用を顕著に増強することが明らかになった。

[0062] （3）多発性骨髄腫細胞に対するEGCGとPDE5阻害剤の細胞致死作用（A）及び細胞増殖抑制作用（B）における67LR関与の検討

EGCG抵抗性因子であると考えられるcGMP特異的分解酵素であるPDE5に対する選択的阻害剤（バルデナフィル）によるEGCGの多発性骨髄腫細胞に対する作用の増強について検討を行った。

[0063] ヒト多発性骨髄腫細胞株U266を96 well plateに 5×10^4 cells/mLとなるように播種し、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルを添加し、その後直ちに、終濃度が $20 \mu\text{g/mL}$ となるように抗67LRモノクローナル抗体であるMLuc5を添加した。アイソタイプ対照抗体添加群ではMouse IgMが終濃度で $20 \mu\text{g/mL}$ となるように添加した。3時間経過後、EGCGを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、血球計算板を用いてトリパンブルー染色法による細胞生存率測定及び生細胞数測定を実施した。結果を図3に示す（ $n=3$, Tukey' s test, ***: $P < 0.001$ ）。

[0064] 図3に示されるように、EGCGおよびバルデナフィルはそれぞれ単独では細胞に対して何ら毒性を示さなかったものの、EGCGとバルデナフィルを組み合わせた場合、極めて強力ががん細胞の生存率の低下を引き起こした（A）。また生細胞数に対するEGCGの作用もバルデナフィルの存在によって顕著に増強した（B）。さらに、EGCGとバルデナフィルの組み合わせによる両作用は抗67LR抗体処理によって完全にキャンセルされた（A）及び（B）。以上の結果から、EGCGとバルデナフィルの組み合わせによるがん細胞致死作用は67LR依存的事であることが明らかになった。

[0065] （4）急性骨髄性白血病細胞に対するEGCGとPDE5阻害剤の細胞致死作用（A）及び細胞増殖抑制作用（B）における67LR関与の検討

EGCG抵抗性因子であると考えられるcGMP特異的分解酵素であるPDE5に対す

る選択的阻害剤（バルデナフィル）によるEGCGの急性骨髄性白血病細胞に対する作用の増強について検討を行った。

[0066] 急性骨髄性白血病細胞株HL60を96 well plateに 1×10^4 cells/mLとなるように播種し、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルを添加し、その後直ちに、終濃度が $20 \mu\text{g/mL}$ となるように抗67LRモノクローナル抗体であるMLuc5を添加した。アイソタイプ対照抗体添加群ではMouse IgMが終濃度で $20 \mu\text{g/mL}$ となるように添加した。3時間経過後、EGCGを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、血球計算板を用いてトリパンブルー染色法による細胞生存率測定及び生細胞数測定を実施した。結果を図4に示す（ $n=3$, Tukey' s test, ***: $P < 0.001$ ）。

[0067] 図4に示されるように、EGCGおよびバルデナフィルはそれぞれ単独では細胞に対して何ら毒性を示さなかったものの、EGCGとバルデナフィルを組み合わせた場合、極めて強力にがん細胞の生存率の低下を引き起こした（A）。また生細胞数に対するEGCGの作用もバルデナフィルの存在によって顕著に増強した（B）。さらに、EGCGとバルデナフィルの組み合わせによる両作用は抗67LR抗体処理によって完全にキャンセルされた（A）及び（B）。以上の結果から、EGCGとバルデナフィルの組み合わせによるがん細胞致死作用は67LR依存的事であることが明らかになった。

[0068] （5）多発性骨髄腫細胞に対するEGCGとPDE5阻害剤のアポトーシス誘導活性における67LR関与の検討

EGCG抵抗性因子であると考えられるcGMP特異的分解酵素であるPDE5に対する選択的阻害剤（バルデナフィル）によるEGCGの多発性骨髄腫細胞に対する作用の増強について検討を行った。

[0069] ヒト多発性骨髄腫細胞株U266を96 well plateに 5×10^4 cells/mLとなるように播種し、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルを添加し、その後直ちに、終濃度が $20 \mu\text{g/mL}$ となるように抗67LRモノクローナル抗体であるMLuc5を添加した。アイソタイプ対照抗体添加群ではMouse IgMが終濃度で $20 \mu\text{g/mL}$ となるように添加した。3時間経過後、EGCGを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。

96時間後、Annexin V PI重染色法によるアポトーシス細胞率測定を実施した。結果を図5に示す (n=3, Tukey' s test, ***:P<0.001)。

[0070] 図5に示されるように、バルデナフィル単独では細胞に対して何ら毒性を示さないものの、EGCGは単独でアポトーシスを誘導した。さらに、EGCGのアポトーシス誘導作用はバルデナフィルと併用することで顕著に増強された。また、EGCG単独、およびEGCGとバルデナフィルの組み合わせ、によるアポトーシス誘導作用は抗67LR抗体処理によって完全に消失した。以上の結果から、バルデナフィルは67LRを介したEGCGのがん細胞に対するアポトーシス誘導作用を顕著に増強することが明らかになった。

[0071] (6) 急性骨髄性白血病細胞に対するEGCGとPDE5阻害剤のアポトーシス誘導活性における67LR関与の検討

EGCG抵抗性因子であると考えられるcGMP特異的分解酵素であるPDE5に対する選択的阻害剤 (バルデナフィル) によるEGCGの急性骨髄性白血病細胞に対する作用の増強について検討を行った。

[0072] 急性骨髄性白血病細胞株HL60を96 well plateに 1×10^4 cells/mLとなるように播種し、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルを添加し、その後直ちに、終濃度が $20 \mu\text{g/mL}$ となるように抗67LRモノクローナル抗体であるMLuc5を添加した。アイソタイプ対照抗体添加群ではMouse IgMが終濃度で $20 \mu\text{g/mL}$ となるように添加した。3時間経過後、EGCGを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、Annexin V PI重染色法によるアポトーシス細胞率測定を実施した。結果を図6に示す (n=3, Tukey' s test, ***:P<0.001, **:P<0.01)。

[0073] 図6に示されるように、バルデナフィル単独では細胞に対して何ら毒性を示さないものの、EGCGは単独でアポトーシスを誘導した。さらに、EGCGのアポトーシス誘導作用はバルデナフィルと併用することで顕著に増強された。また、EGCG単独、およびEGCGとバルデナフィルの組み合わせ、によるアポトーシス誘導作用は抗67LR抗体処理によって完全に消失した。以上の結果から、バルデナフィルは67LRを介したEGCGのがん細胞に対するアポトーシス誘導作用を顕著に増強することが明らかになった。

[0074] (7) ヒト前立腺がん細胞株PC3に対するEGCGの細胞致死作用 (A) 及び細胞増殖抑制作用 (B) におけるPDE5阻害剤の組み合わせ効果

EGCG抵抗性因子であると考えられるcGMP特異的分解酵素であるPDE5に対する選択的阻害剤 (バルデナフィル) によるEGCGの前立腺がんに対する作用の増強について検討を行った。

[0075] ヒト前立腺がん細胞株PC3を24 well plateに 1×10^4 cells/mLとなるように播種し、24時間前培養後、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルが添加された培地に置換し、2時間経過後、EGCGを終濃度が $10 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、血球計算板を用いてトリパンプルー染色法による細胞生存率測定及び生細胞数測定を実施した。結果を図7に示す ($n=3$, Tukey' s test, ***: $P < 0.001$)。

[0076] 図7に示されるように、EGCGおよびバルデナフィルはそれぞれ単独では細胞に対して何ら毒性を示さなかったものの、EGCGとバルデナフィルを組み合わせた場合、極めて強力にがん細胞の生存率の低下を引き起こした (A)。また生細胞数に対するEGCGの作用もバルデナフィルの存在によって顕著に増強した (B)。さらに顕微鏡写真においても同様の結果が得られた (C)。これらことからPDE5選択的阻害剤であるバルデナフィルは前立腺がんに対するEGCGの作用を顕著に増強することが明らかになった。

[0077] (8) ヒト多発性骨髄腫細胞株RPMI8226に対するEGCGの細胞致死作用及び細胞増殖抑制作用におけるPDE5阻害剤の併用効果

バルデナフィルによるEGCGの多発性骨髄腫細胞に対する作用の増強について検討を行った。ヒト多発性骨髄腫細胞株RPMI8226を24 well plateに 5×10^4 cells/mLとなるように播種し、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルを添加し、3時間経過後、EGCGを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、トリパンプルー染色法により細胞生存率 (A) 及び生細胞数 (B) を測定した。EGCG、バルデナフィル未添加群をコントロールとし、100%とした。結果を図8に示す ($n=3$, Tukey' s test, *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$)。

[0078] 図8に示されるように、EGCGおよびバルデナフィルはそれぞれ単独では細

胞に対して何ら毒性を示さなかったものの、EGCGとバルデナフィルを組み合わせた場合、極めて強力にがん細胞の生存率の低下を引き起こした（A）。また生細胞数に対するEGCGの作用もバルデナフィルの存在によって顕著に増強した（B）。

[0079] （9）患者由来多発性骨髄腫に対するEGCGの細胞致死作用及び細胞増殖抑制作用におけるPDE5阻害剤の併用効果

バルデナフィルによるEGCGの患者由来多発性骨髄腫細胞に対する作用の増強について検討を行った。患者由来多発性骨髄腫細胞を24 well plateに 5×10^4 cells/mLとなるように播種し、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルを添加し、3時間経過後、EGCGを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、トリパンブルー染色法により細胞生存率（A）及び生細胞数（B）を測定した。EGCG、バルデナフィル未添加群をコントロールとし、100%とした。結果を図9に示す（ $n=3$, Tukey's test, $***:P<0.001$ ）。

[0080] 図9に示されるように、EGCGはバルデナフィルと併用することで多発性骨髄腫患者由来リンパ球に対する顕著な細胞増殖抑制作用を示した。

[0081] （10）ヒト形質細胞腫ARH77に対するEGCGの細胞致死作用及び細胞増殖抑制作用におけるPDE5阻害剤の併用効果

バルデナフィルによるEGCGの形質細胞腫に対する作用の増強について検討を行った。ヒト形質細胞腫ARH77を24 well plateに 5×10^4 cells/mLとなるように播種し、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルを添加し、3時間経過後、EGCGを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、トリパンブルー染色法により細胞生存率（A）及び生細胞数（B）を測定した。EGCG、バルデナフィル未添加群をコントロールとし、100%とした。結果を図10に示す（ $n=3$, Tukey's test, $** : P<0.01$, $*** : P<0.001$ ）。

[0082] 図10に示されるように、EGCGはバルデナフィルと併用することでヒト形質細胞腫細胞株に対する顕著な細胞増殖抑制作用を示した。

[0083] （11）慢性骨髄性白血病細胞株K562に対するEGCGの細胞致死作用及び細胞増殖抑制作用におけるPDE5阻害剤の併用効果

バルデナフィルによるEGCGの慢性骨髄性白血病細胞に対する作用の増強について検討を行った。ヒト慢性骨髄性白血病細胞株K562を24 well plateに 5×10^4 cells/mLとなるように播種し、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルを添加し、3時間経過後、EGCGを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、トリパンブルー染色法により細胞生存率(A)及び生細胞数(B)を測定した。EGCG、バルデナフィル未添加群をコントロールとし、100%とした。結果を図11に示す($n=3$, Tukey's test, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$)。

[0084] 図11に示されるように、EGCGはバルデナフィルと併用することでヒト慢性骨髄性白血病細胞株に対する顕著な細胞増殖抑制作用を示した。

[0085] (12) ヒト乳がん細胞株MCF-7に対するEGCGの細胞増殖抑制作用におけるPDE5阻害剤の併用効果

バルデナフィルによるEGCGの乳がん細胞に対する作用の増強について検討を行った。ヒト乳がん細胞株MCF-7を24 well plateに 1×10^4 cells/mLとなるように播種し24時間前培養した。その後、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルを添加し、3時間経過後、EGCGを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、トリパンブルー染色法により生細胞数を測定した。EGCG、バルデナフィル未添加群をコントロールとし、100%とした。結果を図12に示す($n=3$, Tukey's test, ***: $P<0.001$)。

[0086] 図12に示されるように、EGCGはバルデナフィルと併用することでヒト乳がん細胞株に対する顕著な細胞増殖抑制作用を示した。

[0087] (13) ヒト胃がん細胞株MKN45に対するEGCGの細胞増殖抑制作用におけるPDE5阻害剤の併用効果

バルデナフィルによるEGCGの胃がん細胞に対する作用の増強について検討を行った。ヒト胃がん細胞株MKN45を24 well plateに 1×10^4 cells/mLとなるように播種し24時間前培養した。その後、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルを添加し、3時間経過後、EGCGを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、トリパンブルー染色法により生細胞数を測定した。EGCG、バルデナフィル未添加群をコントロールとし、100%とした。結果を図13に示す

(n=3, Tukey' s test, ***:P<0.001)。

[0088] 図13に示されるように、EGCGはバルデナフィルと併用することでヒト胃がん細胞株に対する顕著な細胞増殖抑制作用を示した。

[0089] (14) ヒト膵臓がん細胞株PANC-1に対するEGCGの細胞致死作用及び細胞増殖抑制作用におけるPDE5阻害剤の併用効果

バルデナフィルによるEGCGの膵臓がん細胞に対する作用の増強について検討を行った。ヒト膵臓がん細胞株PANC-1を24 well plateに 1×10^4 cells/mLとなるように播種し24時間前培養した。その後、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルを添加し、3時間経過後、EGCGを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、トリパンプルー染色法により細胞生存率(A)及び生細胞数(B)を測定した。EGCG、バルデナフィル未添加群をコントロールとし、100%とした。結果を図14に示す(n=3, Tukey' s test, **:P<0.01, ***:P<0.001)。

[0090] 図14に示されるように、EGCGはバルデナフィルと併用することでヒト膵臓がん細胞株に対する顕著な細胞増殖抑制作用を示した。

[0091] (15) ヒト臍帯静脈内皮細胞HUVECの生存率および細胞増殖に対するEGCGとPDE5阻害剤の併用効果

バルデナフィルによるEGCGの臍帯静脈内皮細胞に対する作用の増強について検討を行った。ヒト臍帯静脈内皮細胞HUVECを24 well plateで5%FCS含有EGM-2培地に 2×10^4 cells/mLにて播種し、24時間前培養後した。その後各濃度(0~ $5 \mu\text{M}$)のバルデナフィルを添加したSOD(5U/mL)、Catalase(200U/mL)含有1%FCS RPMI1640培地に置換し、3時間処理した。その後、EGCGを終濃度 $5 \mu\text{M}$ となるように添加した。96時間後、トリパンプルー染色法により細胞生存率(A)及び生細胞数(B)を測定した。EGCG、バルデナフィル未添加群をコントロールとし、100%とした。結果を図15に示す(n=3, Tukey' s test)。

[0092] 図15に示されるように、EGCGとバルデナフィルの併用は正常細胞(HUVEC)に対して毒性を示さなかった。

[0093] (16) 健常者由来末梢血リンパ球の生存率および細胞増殖に対するEGCGとPDE5阻害剤の併用効果

バルデナフィルによるEGCGの健常者由来末梢血リンパ球に対する作用の増強について検討を行った。健常者由来末梢血リンパ球PBMCを24 well plateに 5×10^4 cells/mLとなるように播種し、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルを添加し、3時間経過後、EGCGを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、トリパンブルー染色法により細胞生存率(A)及び生細胞数(B)を測定した。EGCG、バルデナフィル未添加群をコントロールとし、100%とした。結果を図16に示す($n=3$, Tukey's test)。

[0094] 図16に示されるように、EGCGとバルデナフィルの併用は正常細胞(末梢血リンパ球)に対して毒性を示さなかった。

[0095] (17) Balb/cマウスに移植したマウス形質細胞腫細胞株MPC11の腫瘍形成に対するEGCGとPDE5阻害剤の併用効果

バルデナフィルによるEGCGの形質細胞腫に対する作用の増強について検討を行った。マウス形質細胞腫細胞株MPC11を24 well plateに 5×10^4 cells/mLとなるように播種し、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルを添加し、3時間経過後、EGCGを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、トリパンブルー染色法により生細胞数を測定した。EGCG、バルデナフィル未添加群をコントロールとし、100%とした。結果を図17(A)に示す($n=3$, Tukey's test, **: $P < 0.01$)。

[0096] 図17(A)に示されるように、EGCGはバルデナフィルと併用することでマウス形質細胞腫細胞株に対する顕著な細胞増殖抑制作用を示した。

[0097] また、5週齢メスbalb/cマウスを1週間予備飼育したのち、マウス多発性骨髄腫細胞株MPC11を 5×10^7 cells/mLとなるようにRPMI培地に懸濁した懸濁物100mLを、右背部に皮下注射移植した。移植4日後、EGCG(15mg/kg i.p.)及びバルデナフィル(5 mg/kg i.p.)の投与を二日に一回実施し、ノギスにて腫瘍体積の測定を実施した。結果を図17(B)に示す。図中、EGCG及びVDNはそれぞれ、EGCG及びバルデナフィルの単独投与を、EGCG/VardenafilはEGCGとバ

ルデナフィルとの併用を示す。

[0098] 図17(B)に示されるように、EGCG及びバルデナフィルをそれぞれ単独に投与した群ではマウス形質細胞腫細胞株の腫瘍形成に対する阻害作用は全く観察されなかったが、EGCGとバルデナフィルを併用した群では顕著な抗腫瘍作用が観察された。

[0099] (18) ヒト多発性骨髄腫細胞株U266に対するメチル化EGCGとPDE5阻害剤の併用効果

ヒト多発性骨髄腫細胞株U266を24 well plateに 5×10^4 cells/mLとなるように播種し、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルを添加し、3時間後、EGCG 3''メチルまたはEGCG 7メチルを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、トリパンブルー染色法により生細胞数を測定した。未添加群をコントロールとし、100%とした。EGCG 3''メチル、EGCG 7メチル、バルデナフィル未添加群をコントロールとし、100%とした。結果を図18に示す ($n=3$, Tukey's test, $***:P<0.001$)。

[0100] 図18に示されるように、EGCG 3''メチル及びEGCG 7メチルはいずれも、バルデナフィルと併用することで多発性骨髄腫細胞に対する顕著な細胞増殖抑制作用を示した。

[0101] (19) 前立腺がん細胞株PC-3および膵臓がん細胞株PANC-1に対するメチル化EGCGとPDE5阻害剤の併用効果

ヒト前立腺がん細胞株PC3またはヒト膵臓がん細胞株PANC-1を24 well plateに 1×10^4 cells/mLとなるように播種し、24時間前培養した。その後、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようバルデナフィルを添加し、3時間経過後、EGCG 7メチルを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、トリパンブルー染色法により生細胞数を測定した。未添加群をコントロールとし、100%とした。結果を図19に示す ($n=3$, Tukey's test, $** : P < 0.01$, $*** : P < 0.001$)。

[0102] 図19に示されるように、EGCG 7メチルはバルデナフィルと併用することで前立腺がん細胞株および膵臓がん細胞株の細胞増殖を顕著に抑制した。

[0103] (20) 慢性骨髄性白血病細胞株K562に対するEGCGの細胞増殖抑制作用に

おけるPDE3阻害剤の併用効果

Phosphodiesterase IIIに対する選択的阻害薬であるトレキシシンによるEGCGの慢性骨髄性白血病細胞に対する作用の増強について検討を行った。ヒト慢性骨髄性白血病細胞株K562を24 well plateに 5×10^4 cells/mLとなるように播種し、終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるようトレキシシンを添加し、3時間経過後、EGCGを終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう添加した。96時間後、トリパンブルー染色法により生細胞数を測定した。EGCG、トレキシシン未添加群をコントロールとし、100%とした。結果を図20に示す ($n=3$, Tukey's test, ***: $P<0.001$)。

[0104] 図20に示されるように、EGCGはトレキシシンと併用することで慢性骨髄性白血病細胞株の細胞増殖を顕著に抑制した。

[0105] (21) バルデナフィルとの併用によるEGCGの抗炎症作用 (Toll-like receptor (TLR)2及びTLR 4発現低下作用) の増強

マウスマクロファージ細胞株RAW 264.7を5 mL dishに 1×10^5 cells/mLとなるように播種し、1% FCS-DMEMにて24時間前培養を行った。次にバルデナフィルを $5 \mu\text{M}$ となるように添加し、さらにその3時間後、EGCGをそれぞれ $0 \mu\text{M}$ 及び $10 \mu\text{M}$ となるように添加した。24時間後に細胞を回収し、Toll-like receptor (TLR)2及びTLR 4発現をウエスタンブロット法を用いて測定した。結果を表1に示す。EGCGはバルデナフィルと併用することでTLR2及びTLR4の発現量を顕著に低下させた。

[0106] [表1]

表1

Vardenafil (5 μM)	-	-	+	+
EGCG (10 μM)	-	+	-	+
TLR2 発現量(%)	100	90	112	16
TLR4 発現量(%)	100	57	112	16

[0107] [考察]

以上の結果から、PDE3阻害剤及びPDE5阻害剤がEGCGの抗がん作用の増強剤として有効であることが判明した。また、EGCGとPDE5阻害剤の併用が67LR陽性がんに対する分子標的薬として極めて有効であることが示された。また、EGCGとPDE5阻害剤の併用が正常細胞に対して毒性を示さないことが判明した。

[0108] [参考文献]

- (1) Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H, et al. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer res*, 2006;66:2500-2505.
- (2) Shanafelt TD, Call TG, and Zent CS, et al. Phase I trial of daily oral Polyphenon E in patients with asymptomatic Rai stage 0 to II chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 2009;27:3808-3814.
- (3) Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, Yamada K. A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol*, 2004;11:380-381.
- (4) Umeda D, Tachibana H, Yamada K. Epigallocatechin-3-O-gallate disrupts stress fibers and the contractile ring by reducing myosin regulatory light chain phosphorylation mediated through the target molecule 67 kDa laminin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005;333:628-635.
- (5) Umeda D, Yano S, Yamada K, Tachibana H. Involvement of 67-kDa laminin receptor-mediated myosin phosphatase activation in antiproliferative effect of epigallocatechin-3-O-gallate at a physiological concentration on Caco-2 colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008;371:172-176.
- (6) Umeda D, Yano S, Yamada K, Tachibana H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) signaling pathway through 67-kDa laminin receptor. *J Biol Chem*, 2008;283:3050-3058.
- (7) Nelson J, McFerran NV, Pivato G, et al. The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease. *Biosci Rep*, 2008;28:33-4

8.

(8) Cioce V, Castronovo V, and Shmookler BM, et al. Increased expression of the laminin receptor in human colon cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1991;83:29-36.

(9) Menard S, Castronovo V, Tagliabue E, Sobel ME. New insights into the metastasis-associated 67 kD laminin receptor. *J Cell Biochem*, 1997;67:155-165.

(10) Menard S, Tagliabue E, Colnaghi MI. The 67 kDa laminin receptor as a prognostic factor in human cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1998;52:137-145.

(11) Vacca A, Ribatti D, and Roncali L, et al. Melanocyte tumor progression is associated with changes in angiogenesis and expression of the 67-kilodalton laminin receptor. *Cancer*, 1993;72:455-461.

(12) Sanjuan X, Fernandez PL, and Miquel, et al. Overexpression of the 67-kD laminin receptor correlates with tumour progression in human colorectal carcinoma. *J Pathol*, 1996;179:376-380.

(13) Chen FX, Qian YR, Duan YH, et al. Down-regulation of 67LR reduces the migratory activity of human glioma cells in vitro. *Brain Res Bull*, 2009;79:402-408.

(14) Fontanini G, Vignati S, and Chine S, et al. 67-Kilodalton laminin receptor expression correlates with worse prognostic indicators in non-small cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res*, 1997;3:227-231.

(15) Basolo F, Pollina L, and Pacini F, et al. Expression of the Mr 67,000 laminin receptor is an adverse prognostic indicator in human thyroid cancer: an immunohistochemical study. *Clin Cancer Res*, 1996;2:1777-1780.

(16) Britschgi A, Simon HU, Tobler A, Fey MF, Tschan MP. Epigallocatechin-3-gallate induces cell death in acute myeloid leukaemia cells an

d supports all-trans retinoic acid-induced neutrophil differentiation via death-associated protein kinase 2. *Br J Haematol*, 2010;149:55-64

.

(17) Shamma MA, Neri P, Koley H, et al. Specific killing of multiple myeloma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate extracted from green tea: activity and therapeutic implications. *Blood*, 2006;108:2804-2810

.

(18) 弘津 圭祐 et al. 緑茶カテキン受容体 67LR を介した EGCG のアポトーシス誘導機構 第6回 日本カテキン学会 抄録集、p41

(19) Rivero-Vilches FJ, de Frutos S, Saura M, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M, et al.

Differential relaxing responses to particulate or soluble guanylyl cyclase activation on endothelial cells: a mechanism dependent on PKG-I alpha activation by NO/cGMP. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003;285:C891-898.

(20) Ravipati G, McClung JA, Aronow WS, Peterson SJ, Frishman WH. Type 5 phosphodiesterase inhibitors in the treatment of erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Cardiol Rev*. 2007;15:76-86.

(21) Valiquette L, Montorsi F, Auerbach S. Vardenafil demonstrates first-dose success and reliability of penetration and maintenance of erection in men with erectile dysfunction - RELY-II. *Can Urol Assoc J*, 2008;2:187-195.

(22) Boolell M, Allen MJ, Ballard SA, Gepi-Attee S, Muirhead GJ, Naylor AM, Osterloh IH, Gingell C, et al. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int J Impot Res*, 1996;8:47-52.

(23) 仲原 正明 et al. 悪性腫瘍肝転移における 5'-Nucleotidophosphodiesterase-V の腫瘍 marker としての意義：他の腫瘍 marker との比較検討日本

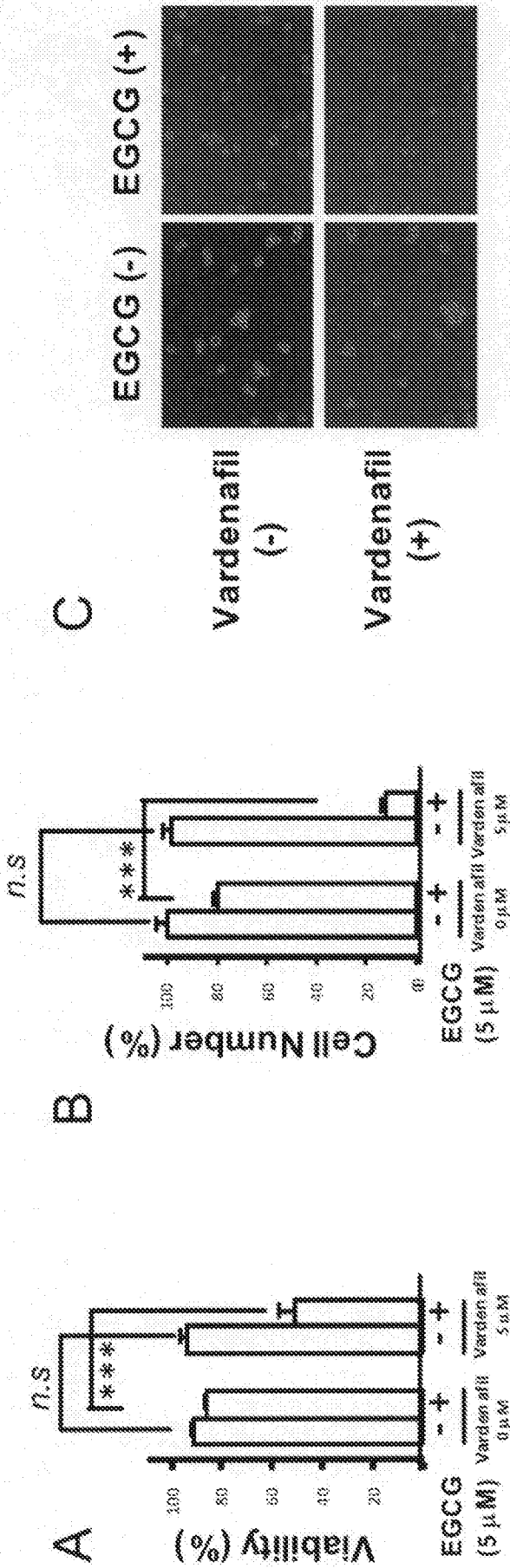
消化器外科学会学会誌

第23回日本消化器外科学会総会 日消外会誌 17巻 2号 p196

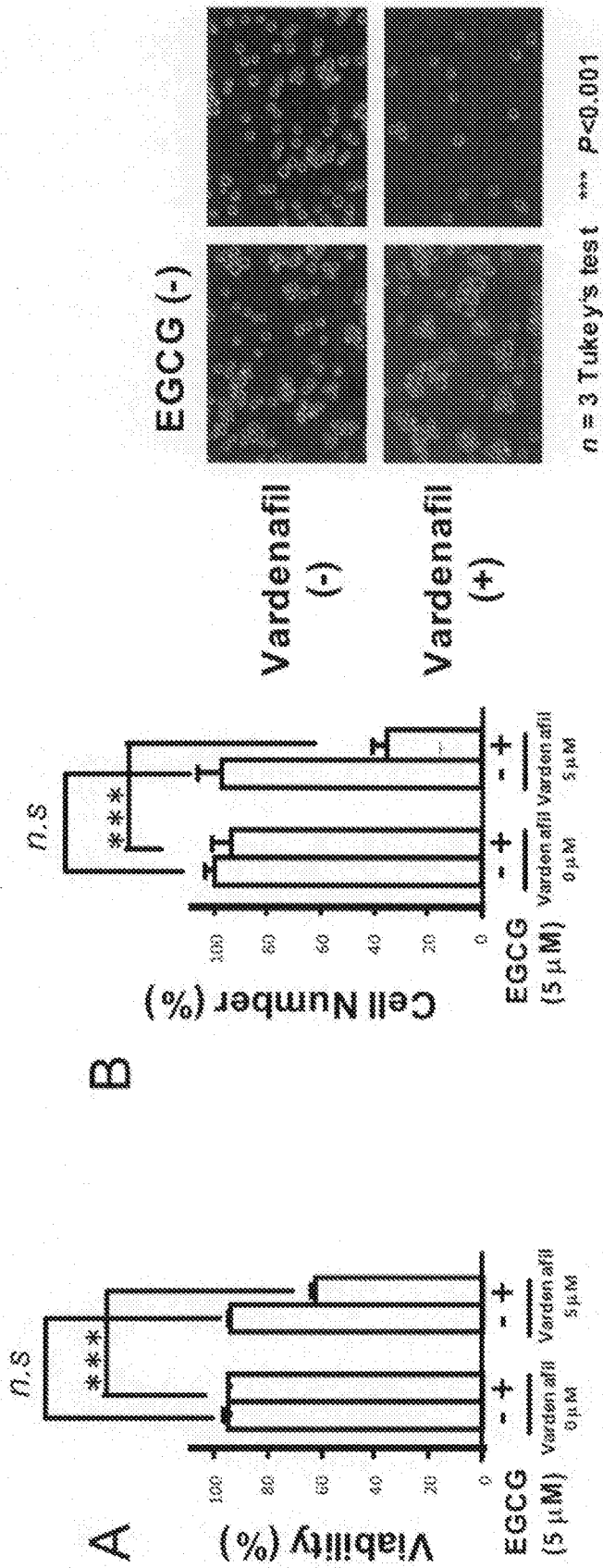
請求の範囲

- [請求項1] エピガロカテキンガレートまたはメチル化エピガロカテキンガレート、またはその医薬的に許容される塩と、ホスホジエステラーゼ阻害剤と、を組み合わせたことを特徴とする薬剤。
- [請求項2] がん、アレルギー、肥満、動脈硬化、炎症または筋萎縮の治療で使用するための、請求項1に記載の薬剤。
- [請求項3] 67LR陽性の疾患の治療で使用するための、請求項1または請求項2に記載の薬剤。
- [請求項4] 前記ホスホジエステラーゼ阻害剤がホスホジエステラーゼ3阻害剤またはホスホジエステラーゼ5阻害剤である、請求項1～請求項3のいずれか一項に記載の薬剤。
- [請求項5] 前記ホスホジエステラーゼ阻害剤がバルデナフィルである、請求項1～請求項3のいずれか一項に記載の薬剤。
- [請求項6] a) エピガロカテキンガレートまたはメチル化エピガロカテキンガレート、またはその医薬的に許容される塩を含有する第一の単位剤形；
b) ホスホジエステラーゼ阻害剤を含有する第二の単位剤形；及び
c) 前記第一の単位剤形及び第二の単位剤形を収容するための容器手段；
を含んでなる、がん、アレルギー、肥満、動脈硬化、炎症または筋萎縮の治療で使用するためのキット。

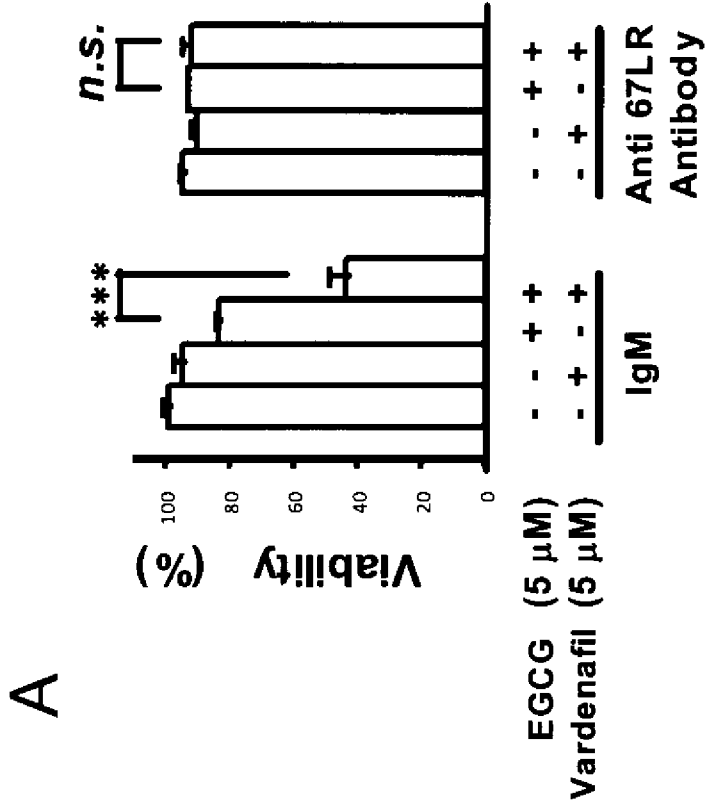
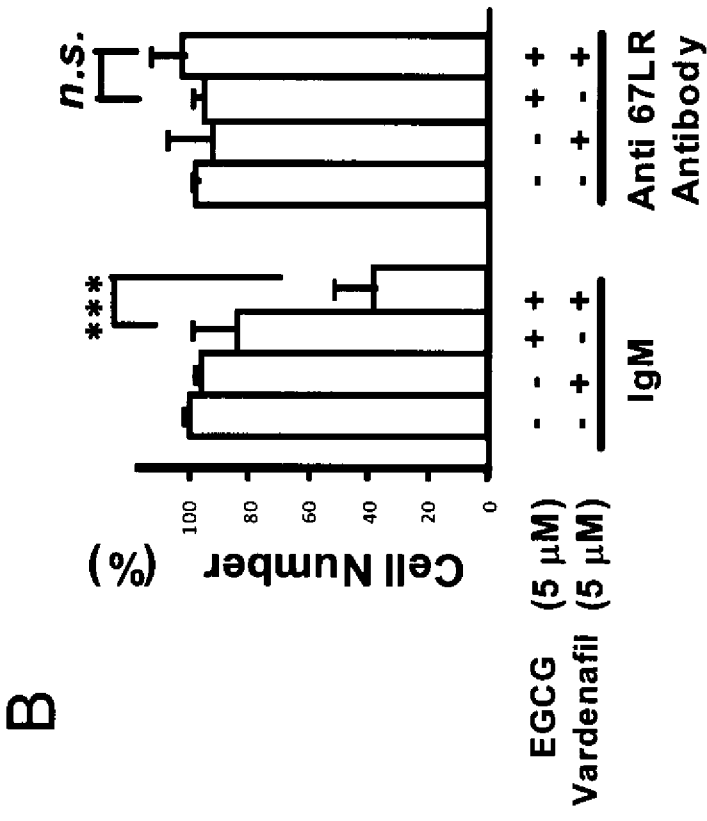
[図1]



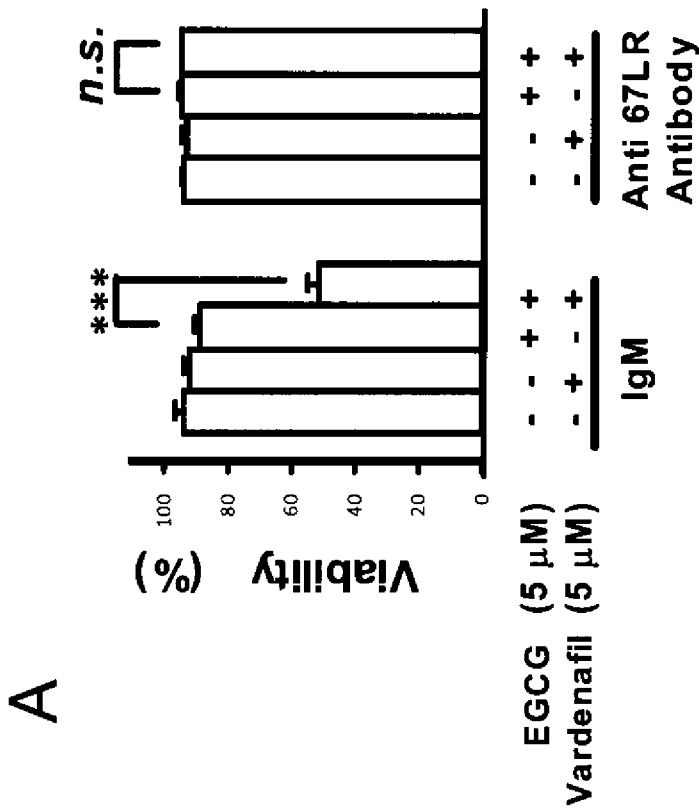
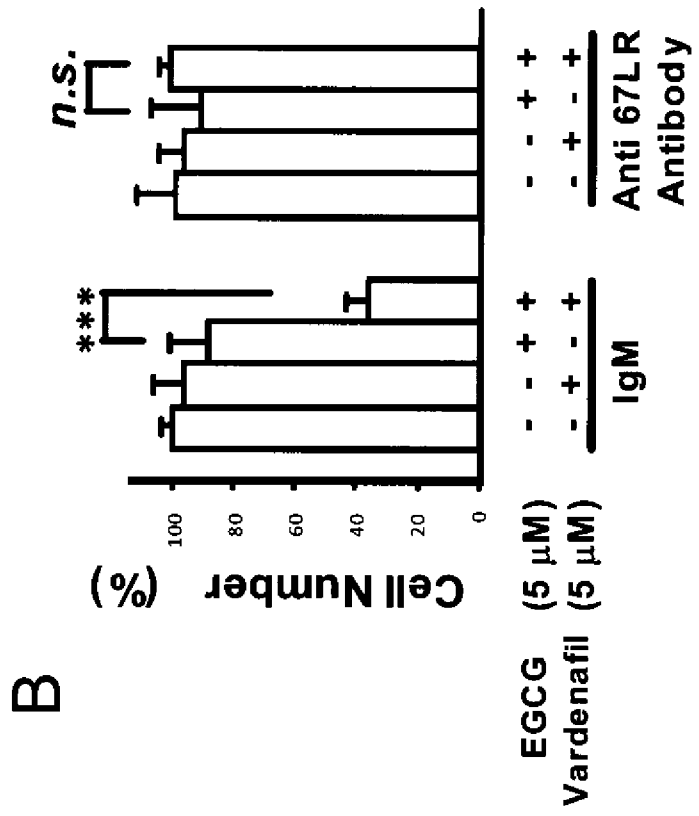
[圖2]



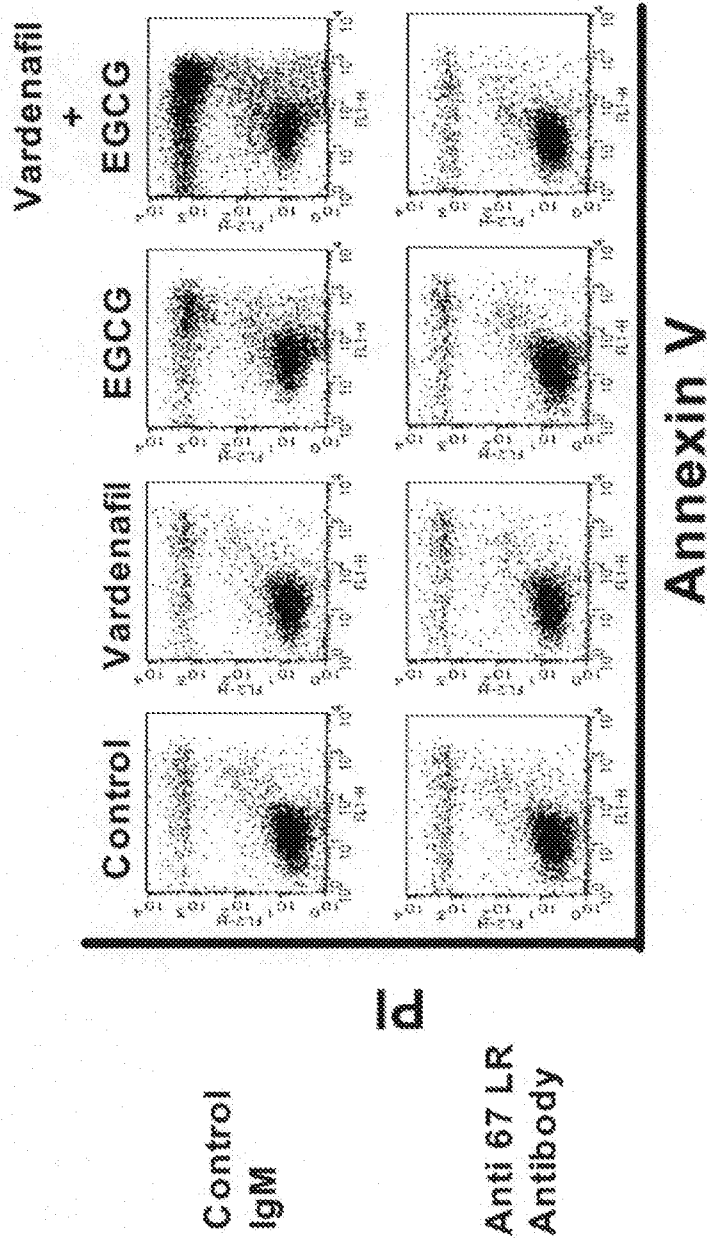
[圖3]



[図4]

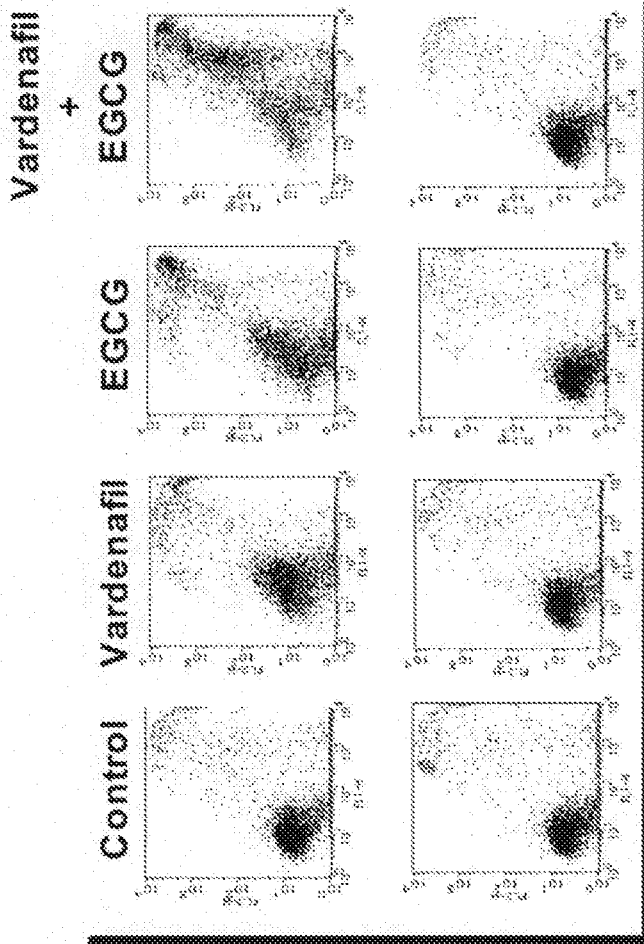


[圖5]



10

[6]

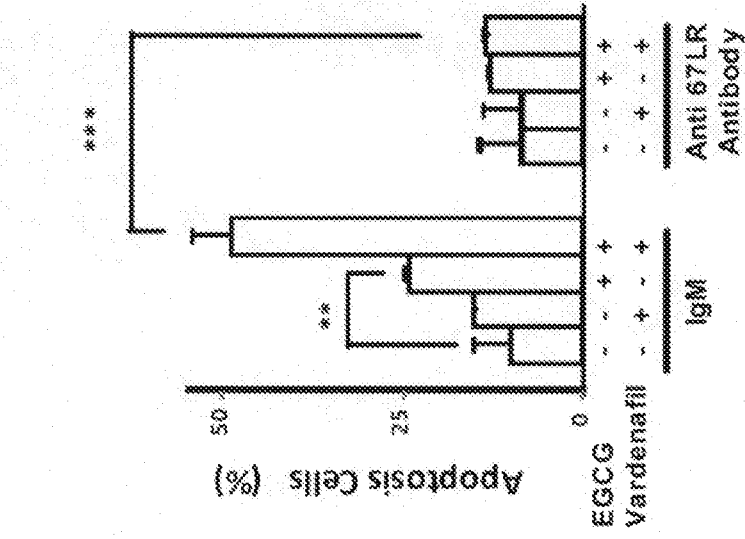


Control
IgM

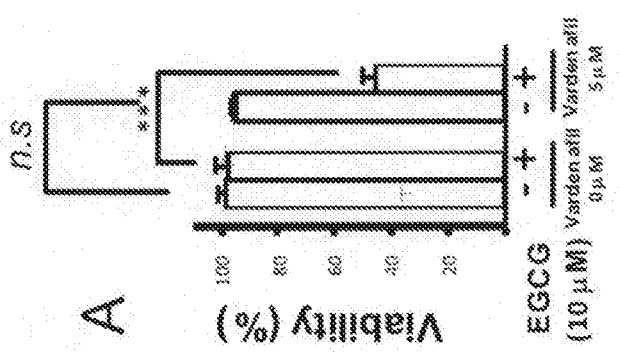
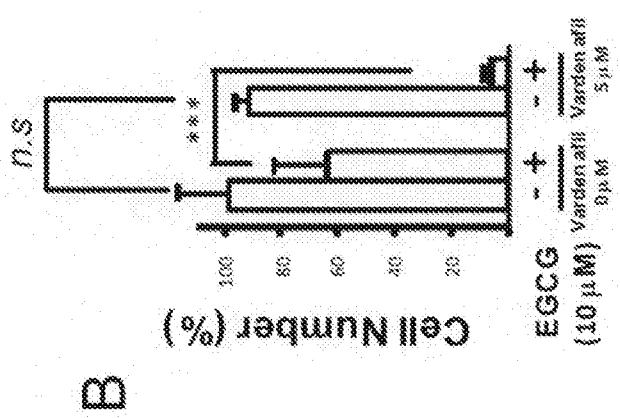
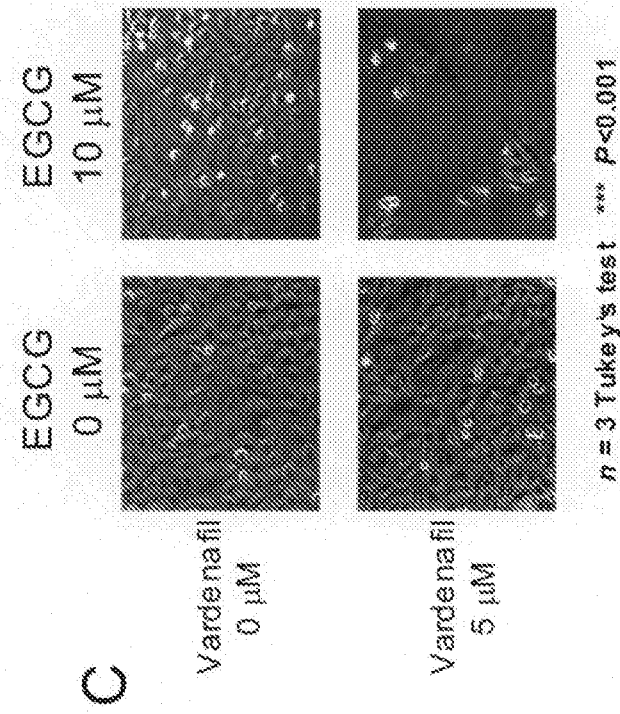
Anti 67 LR
Antibody

16

Annexin V

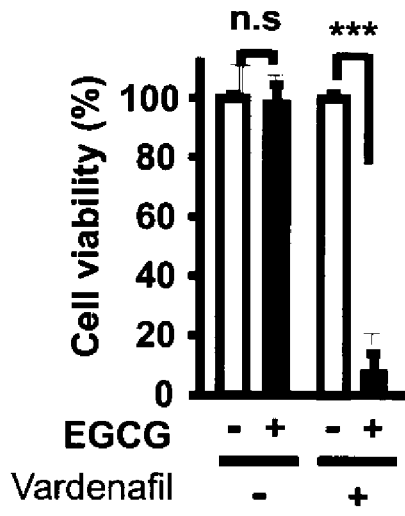


[Fig. 7]

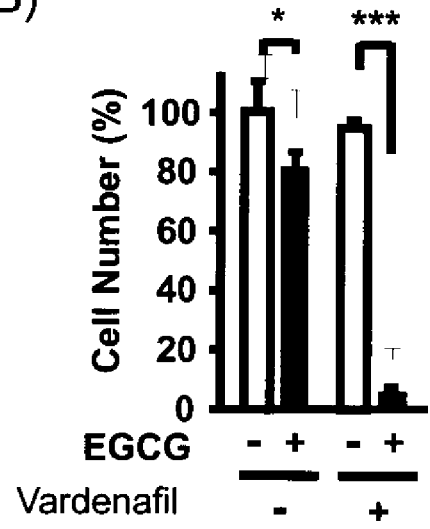


[圖8]

(A)



(B)



[図9]

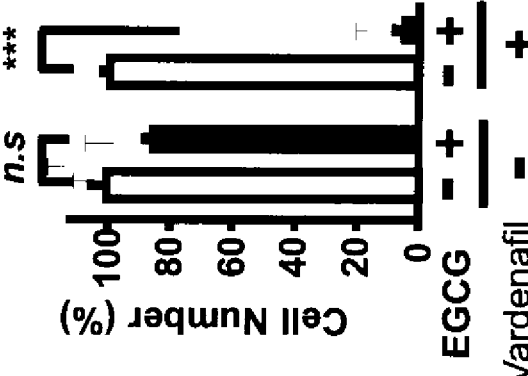
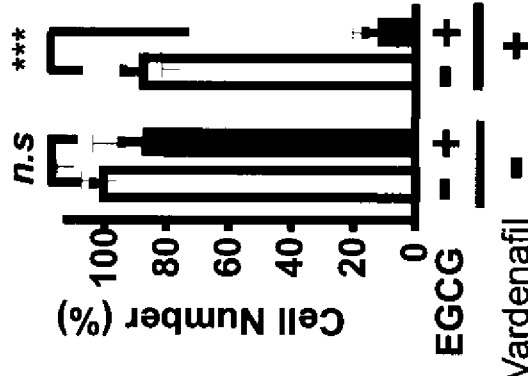
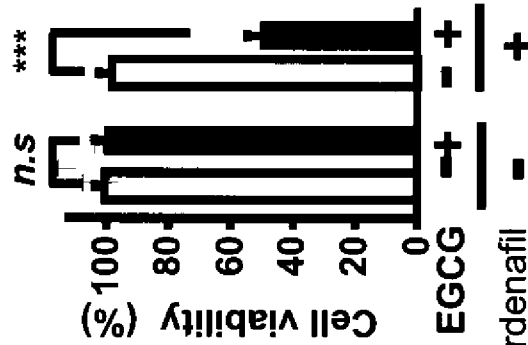
(A)

多発性骨髄腫患者
由来リンパ球1

多発性骨髄腫患者
由来リンパ球2

多発性骨髄腫患者
由来リンパ球1

多発性骨髄腫患者
由来リンパ球2

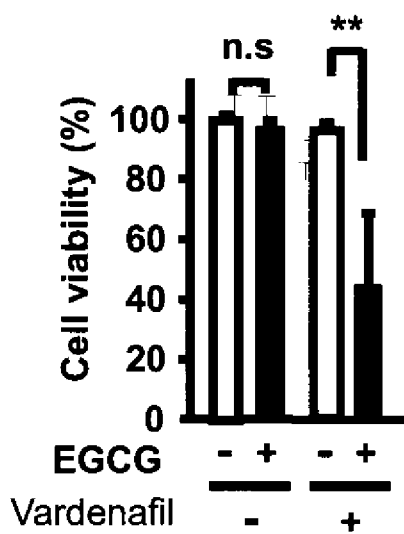


(B)

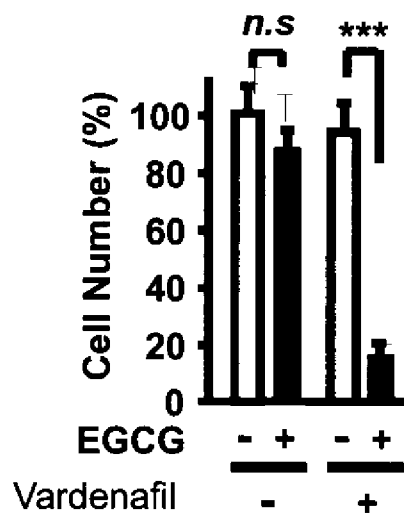
(B)

[圖10]

(A)

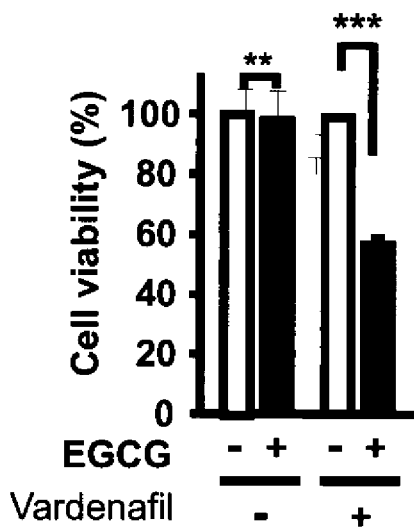


(B)

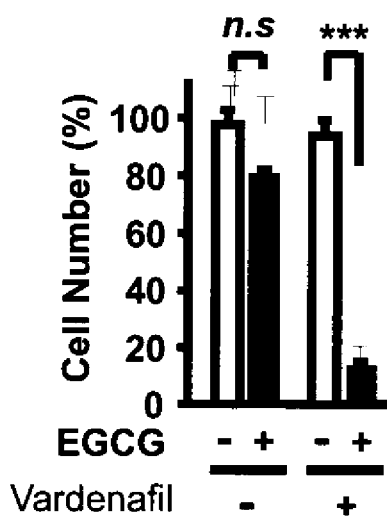


[圖11]

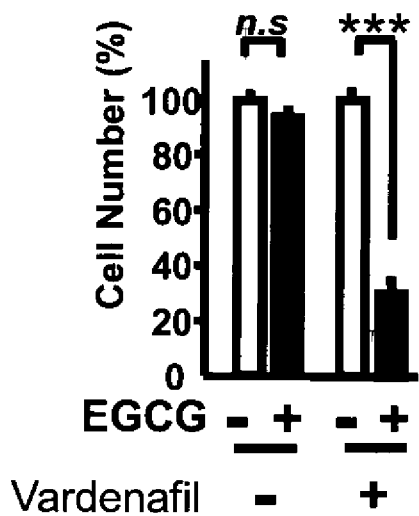
(A)



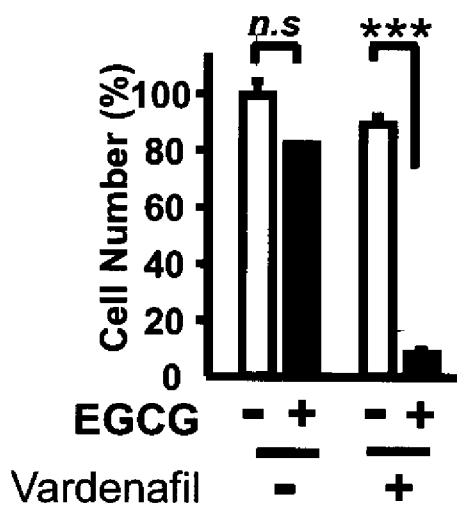
(B)



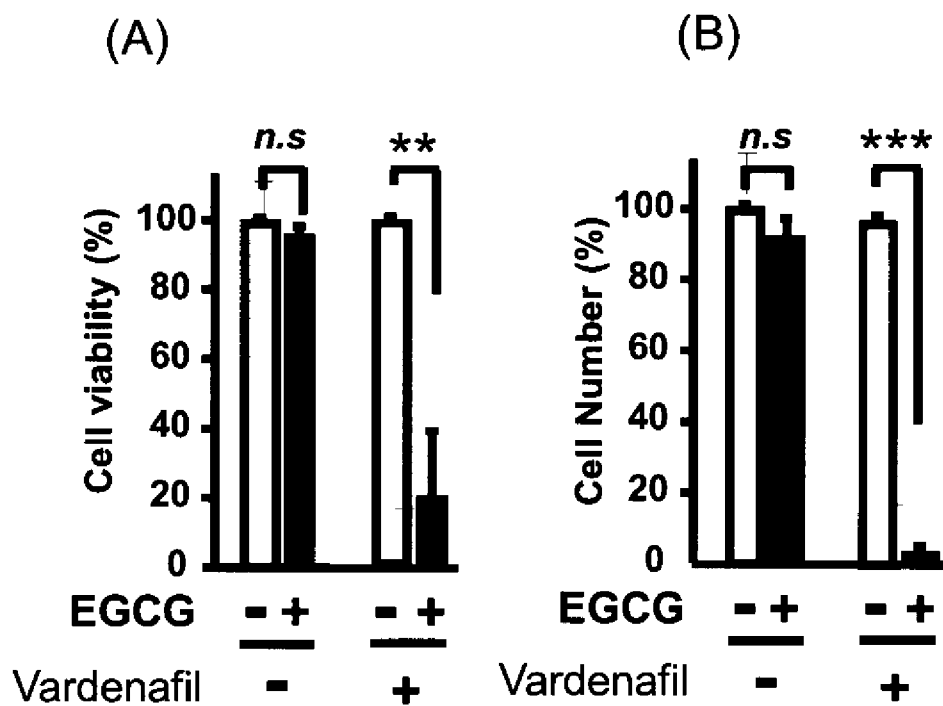
[圖12]



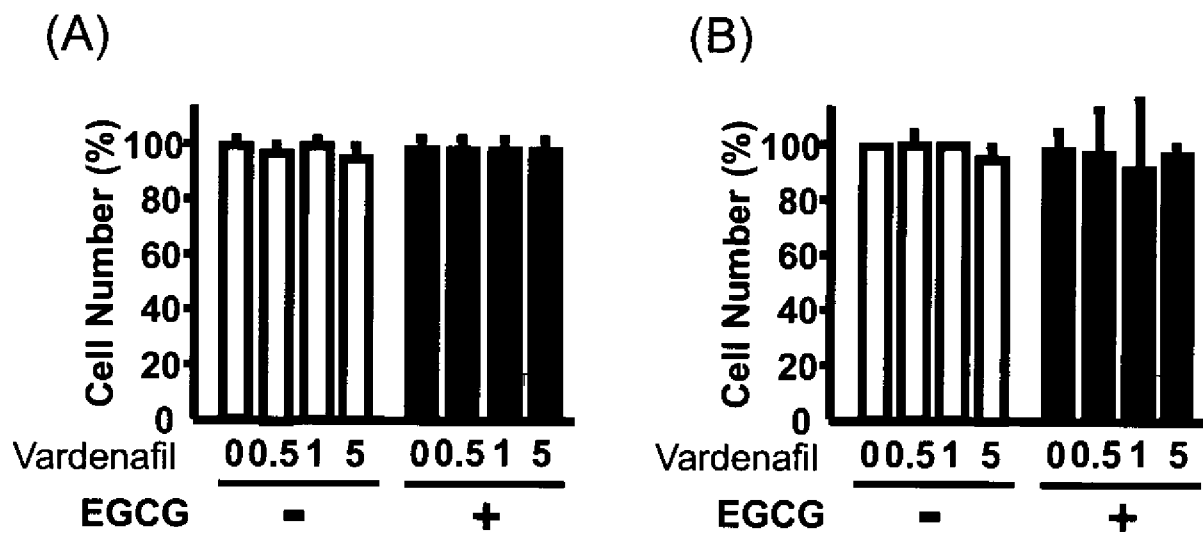
[圖13]



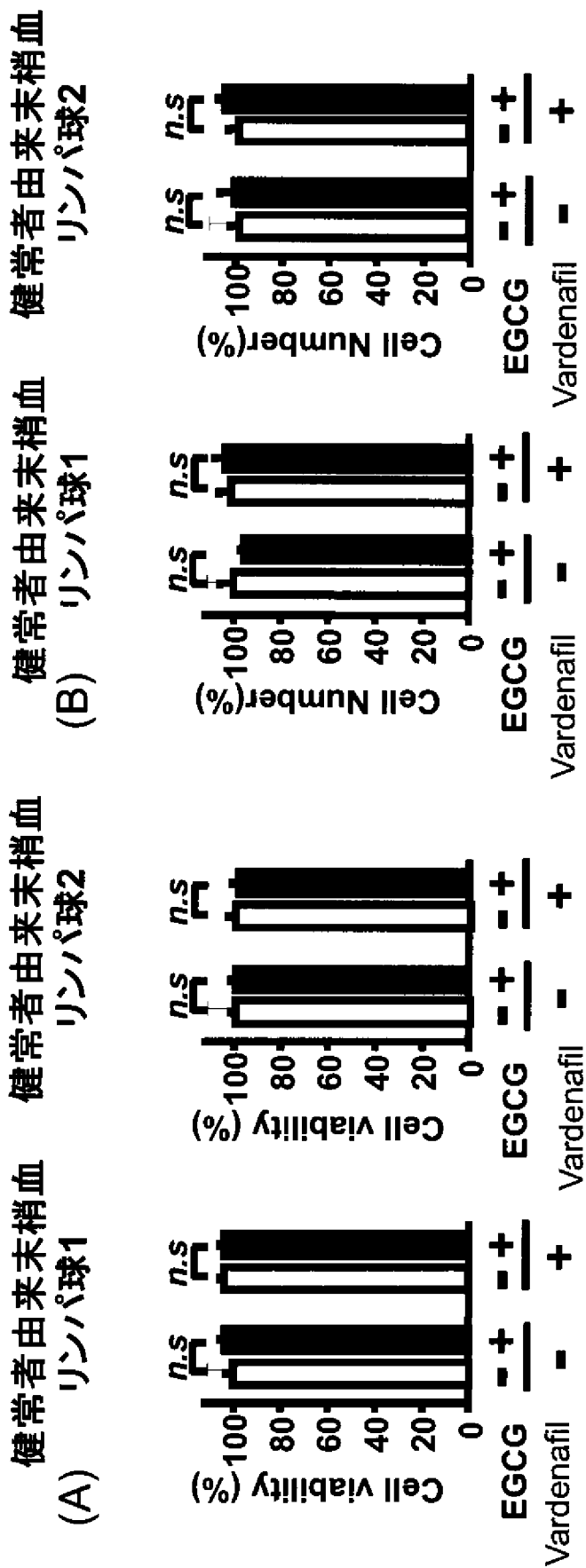
[圖14]



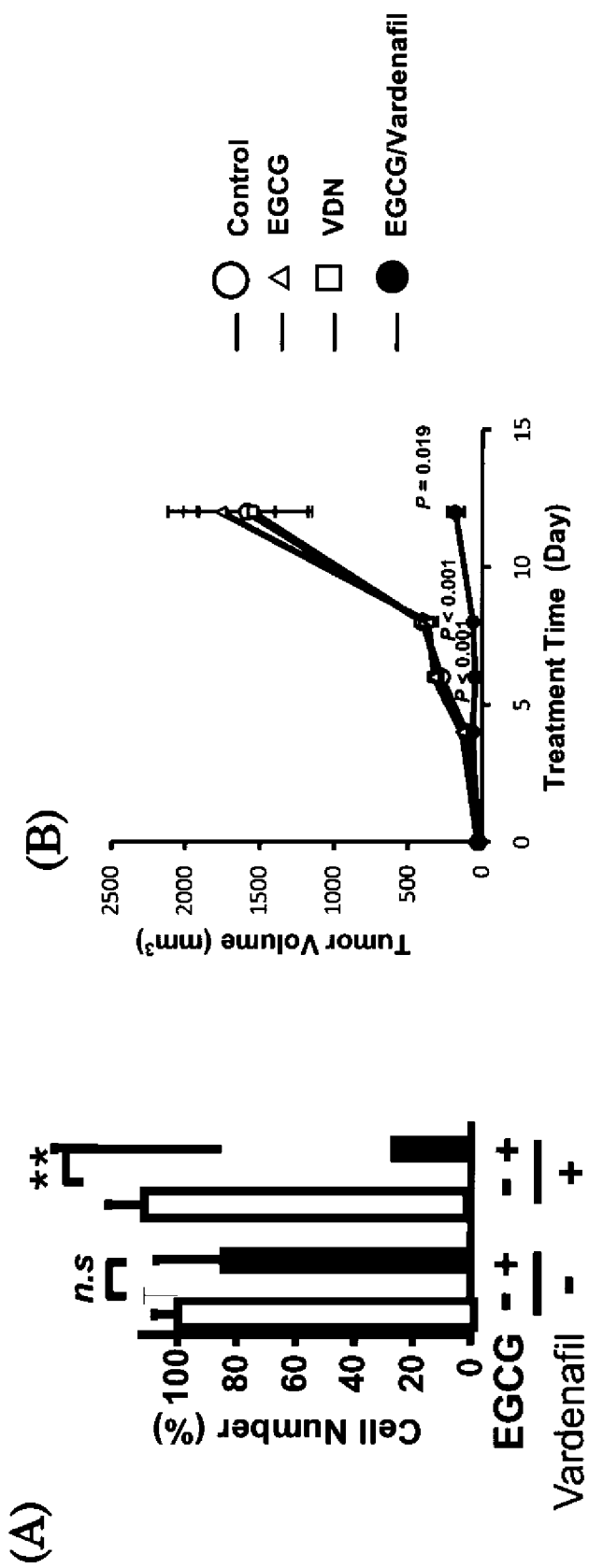
[圖15]



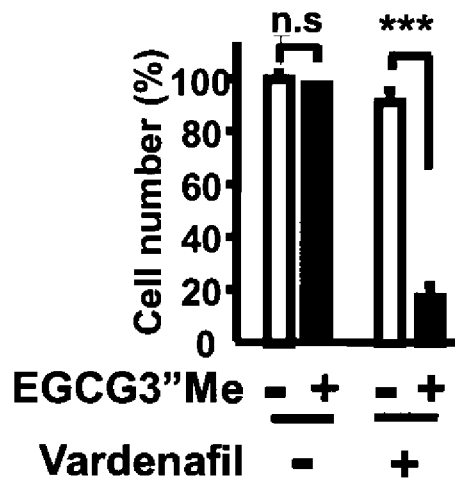
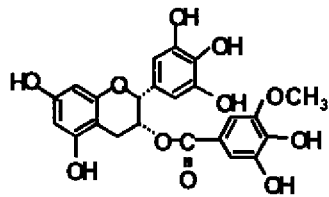
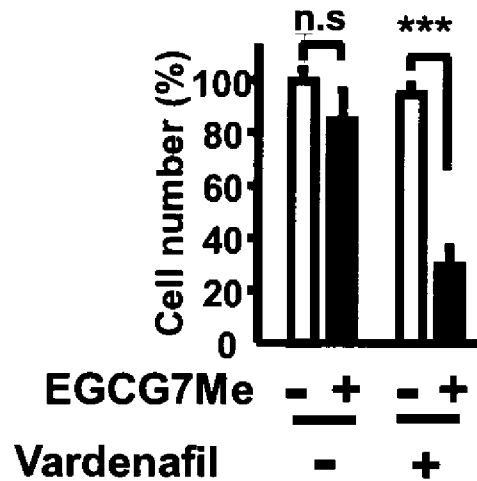
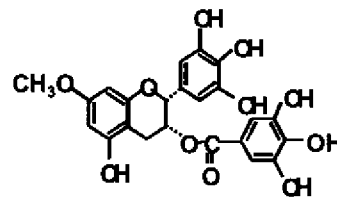
[図16]



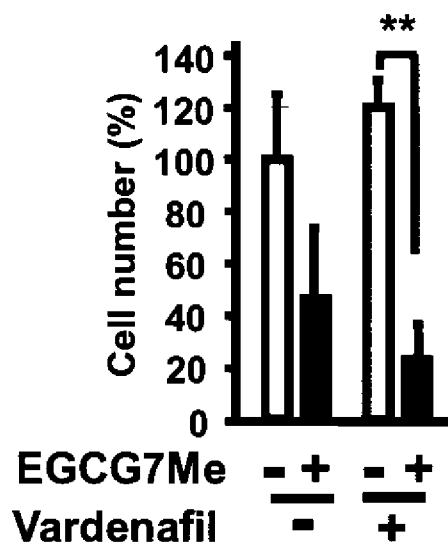
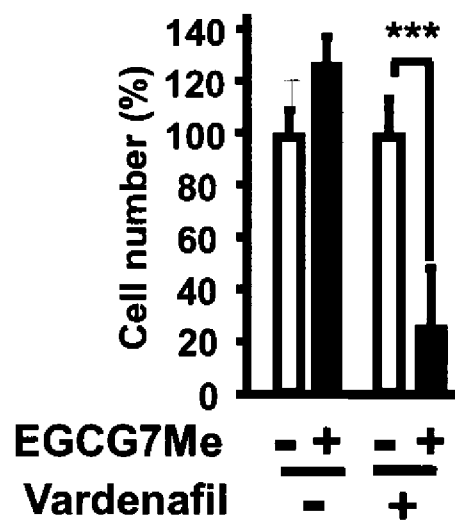
[Figure 17]



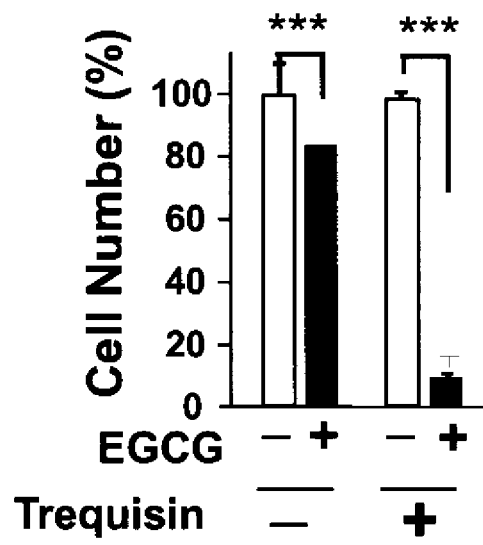
[圖18]

EGCG 3'' Me**EGCG 7 Me**

[圖19]

PC-3**PANC-1**

[図20]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/064349

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/353(2006.01)i, A61K31/53(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P21/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, C07D311/62(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)

A61K9/00-9/72, 31/33-31/80, 45/00-45/08, 47/00-47/48, A61P1/00-43/00, C07D311/62, C07D487/04

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2004-161678 A (Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.), 10 June 2004 (10.06.2004), claims 1 to 4; paragraphs [0032], [0056] (Family: none)	1-3 4-6
X A	Hirofumi TACHIBANA et al., "Ryokucha Catechin wa Laminin Receptor (67LR) o Kaishite Gan Saibo no Zoshoku o Yokusei suru", Vitamins, 2004, 78 (10), pages 513 to 514	1-3 4-6
A	UMEDA, D. et al, Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate signaling pathway through 67-kDa laminin receptor, J Biol Chem, 2008, Vol.283, No.6, p.3050-8	1-6

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 July, 2011 (07.07.11)Date of mailing of the international search report
19 July, 2011 (19.07.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/064349

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Motofumi KUMAZOE et al., "Phosphodiesterase V Sogaizai wa EGCG/67LR Signal Dentatsu Keiro o Zokyo suru Koto de EGCG no Tahatsusei Kotsuzuishu ni Taisuru Saibo Chishi Sayo o Sokushin suru", Dai 15 Kai Nippon Food Factor Gakkai Koto Happyo Endai (No.0-9 announced on 04 October 2010 (04.10.2010)), 12 September 2010 (12.09.2010), [retrieved on 2011.07.07], Retrieved from the Internet: <URL:http://www.myu.ac.jp/~jsoff-15/Jsoff2010%8C%FB%93%AA%94%AD%95%5C%83X%83P%83W%83%85%81%5B%83%8B%28H22.9.11%29.pdf>	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/064349

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C07D487/04(2006.01) i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/064349

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions in claims 1 - 3 cannot be considered to have novelty since the inventions are described in the following documents 1 and 2, and therefore does not have a special technical feature.

Document 1: JP 2004-161678 A (Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.), 10 June 2004 (10.06.2004)

Document 2: Hirofumi TACHIBANA et al., "Ryokucha Catechin wa Laminin Receptor (67LR) o Kaishite Gan Saibo no Zoshoku o Yokusei suru", Vitamins, 2004, 78(10), pages 513 to 514

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K31/353(2006.01)i, A61K31/53(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P21/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, C07D311/62(2006.01)i, C07D487/04(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K9/00-9/72, 31/33-31/80, 45/00-45/08, 47/00-47/48, A61P1/00-43/00, C07D311/62, C07D487/04

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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	JP 2004-161678 A (丸善製薬株式会社) 2004.06.10, 請求項1-4、【0032】、【0056】 (ファミリーなし)	1-3 4-6
X A	立花宏文ら, 緑茶カテキンはラミニンレセプター(67LR)を介してがん細胞の増殖を抑制する, ビタミン, 2004, 78(10), p.513-514	1-3 4-6
A	UMEDA, D. et al, Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate signaling pathway through 67-kDa laminin receptor, J Biol Chem, 2008, Vol.283, No.6, p.3050-8	1-6

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

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

国際調査を完了した日

07.07.2011

国際調査報告の発送日

19.07.2011

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

澤田 浩平

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

3338

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
P, X	熊添基文ら, ホスホジエステラーゼ V 阻害剤は EGCG/67LR シグナル伝達経路を増強することで EGCG の多発性骨髄腫に対する細胞致死作用を促進する, 第15回日本フードファクター学会口頭発表演題 (2010. 10. 04 発表の番号 0-9) , 2010. 09. 12, [retrieved on 2011. 07. 07] Retrieved from the Internet: <URL:http://www.myu.ac.jp/~jsoff-15/Jsoff2010%8C%FB%93%AA%94%AD%95%5C%83X%83P%83W%83%85%81%5B%83%8B%28H22. 9. 11%29. pdf>	1-6

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項1-3に係る発明は、以下の文献1、2に記載されており、新規性が認められないから、特別な技術的特徴を有しない。

文献1：JP 2004-161678 A（丸善製薬株式会社）2004.06.10

文献2：立花宏文ら，緑茶カテキンはラミニンレセプター(67LR)を介してがん細胞の増殖を抑制する，ビタミン，2004，78(10)，p.513-514

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。