

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-524692

(P2007-524692A)

(43) 公表日 平成19年8月30日(2007.8.30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	2 G O 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 37/54	
A 6 1 P 5/24 (2006.01)	A 6 1 P 5/24	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-553684 (P2006-553684)	(71) 出願人	505066349
(86) (22) 出願日	平成17年2月21日 (2005.2.21)		ユニバーシティ・コート・オブ・ザ・ユニ
(85) 翻訳文提出日	平成18年10月18日 (2006.10.18)		バーシティ・オブ・エディンバラ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2005/000648		イギリス国, エディンバラ, EH8 9Y
(87) 国際公開番号	W02005/079810		L, サウス・ブリッジ, オールド・カレッジ
(87) 国際公開日	平成17年9月1日 (2005.9.1)		ジ
(31) 優先権主張番号	0403889.9	(74) 代理人	100081086
(32) 優先日	平成16年2月21日 (2004.2.21)		弁理士 大家 邦久
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100121050
			弁理士 林 篤史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ERβモジュレータの使用

(57) 【要約】

本発明はホルモン依存性腫瘍および他の増殖性疾患の診断に加えて、ホルモン依存性腫瘍および他の増殖性疾患を予防および/または治療する薬剤の製造におけるERモジュレータの使用に関する。本発明はホルモン依存性腫瘍および他の増殖性疾患の予防および/または治療におけるそれらの使用のための薬剤のスクリーニング法をも教示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ホルモン依存性腫瘍および他の増殖性疾患を予防および/または治療する薬剤の製造におけるエストロゲン受容体 (ER) モジュレータの使用。

【請求項 2】

ER モジュレータが ER に拮抗する/または作用する請求項 1 における使用。

【請求項 3】

ER モジュレータが ER アゴニストである請求項 1 における使用。

【請求項 4】

ホルモン依存性腫瘍および他の増殖性疾患を予防および/または治療する薬剤の製造における 7 β ヒドロキシステロイドおよび/または 7 β ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の使用。 10

【請求項 5】

7 β ヒドロキシステロイドが 7 α ヒドロキシステロイドおよび/または 7 β ヒドロキシステロイドである請求項 4 における使用。

【請求項 6】

ステロイドが以下の化合物からなるグループから選択される請求項 5 における使用；

i) 7 β ヒドロキシ DHEA (7DH)

ii) 7 β ヒドロキシ プレグネノロン

iii) 7 β ヒドロキシ エストラジオール 20

iv) 7 α , 3 α , 17 β アンドロステントリオール

v) 7 α , 3 α , 17 β アンドロスタントリオール

vi) 7 β ヒドロキシコレステロール

vii) 7 α , 25 β ヒドロキシコレステロール

viii) 7 α , 24 β ヒドロキシコレステロール

ix) 7 α , 27 β ヒドロキシコレステロールおよび

x) 他の 7 β ジ ヒドロキシ型および 7 β マルチ 水酸化型コレステロール。

【請求項 7】

薬剤を薬剤学的に許容しうる担体または希釈剤とともに投与する先行するいずれかの請求項における使用。 30

【請求項 8】

薬剤を直接または局所的に前立腺および/または乳房に投与する請求項 1 - 4 における使用。

【請求項 9】

ホルモン依存性腫瘍が前立腺癌あるいは乳癌である請求項 1 - 4 における使用。

【請求項 10】

増殖性疾患が前立腺あるいは乳房の疾患である請求項 1 - 4 における使用。

【請求項 11】

前立腺の疾患が前立腺の発達または前立腺加齢の疾患である請求項 10 における使用。

【請求項 12】 40

前立腺の疾患が良性前立腺肥大症 (BHP) および/または前立腺炎である請求項 10 における使用。

【請求項 13】

7 β ヒドロキシステロイドを生成する酵素がオキシステロール 7 β ヒドロキシラーゼ (CYP7B) である請求項 4 における使用。

【請求項 14】

7 β ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素が改変されている請求項 4 における使用。

【請求項 15】

7 β ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素が基質親和性を改善する 50

ように改変されている請求項 14 における使用。

【請求項 16】

7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素が遺伝子組換えまたは合成によって生成されたものである請求項 4 における使用。

【請求項 17】

前記 7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素を適切な基質と接触させることにより 7 ヒドロキシステロイドを供給する請求項 4 における使用。

【請求項 18】

前記 7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素を含む細胞を適切な基質と接触させることにより 7 ヒドロキシステロイドを供給する請求項 4 における使用

10

【請求項 19】

細胞が前記 7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素をコードする遺伝子を含むベクターにより形質転換されたものである請求項 18 における使用。

【請求項 20】

適切な基質が 7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素により 7 ヒドロキシステロイドに変換され得る化合物である請求項 17 と 18 における使用。

【請求項 21】

適切な基質が以下の化合物からなるグループから選択される請求項 20 における使用；

i) デヒドロエピアンドステロン (DHEA)

20

ii) 3 アンドロスタンジオール

iii) 3 アンドロステンジオール；および

iv) エストラジオール

【請求項 22】

ホルモン依存性腫瘍および他の増殖性疾患を治療する薬剤の製造における 7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素をコードする核酸の使用。

【請求項 23】

核酸が核酸ベクター内に含まれている請求項 22 における使用。

【請求項 24】

薬剤を薬剤学的に許容しうる担体とともに投与する請求項 22 における使用。

30

【請求項 25】

7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素がオキシステロール 7 ヒドロキシラーゼ (CYP7B) である請求項 22 における使用。

【請求項 26】

7 ヒドロキシステロイドの濃度または 7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の濃度を検出するまたは 7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素をコードする塩基配列における変異を検出する以下のステップを含む方法；

d) 患者由来サンプルの提供；

e) 7 ヒドロキシステロイドまたは 7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の濃度検出あるいは前記酵素をコードする核酸の塩基配列の確認；および

40

f) 前記検出濃度または前記核酸の塩基配列の正常濃度または正常塩基配列との比較。

【請求項 27】

ホルモン依存性腫瘍および他の増殖性疾患の治療に用いられる薬剤の効力の検出に用いる請求項 26 による方法。

【請求項 28】

腫瘍の進行段階の確認に用いる請求項 26 の方法。

【請求項 29】

患者が健康な人、ホルモン依存性腫瘍または他の増殖性疾患の罹患が疑われる人、それらに罹患する素因のある人、または罹患している人である請求項 26 の方法。

【請求項 30】

50

サンプルが生検である請求項 26 の方法。

【請求項 31】

生検が前立腺生検または乳房組織生検である請求項 30 の方法。

【請求項 32】

サンプルが体液である請求項 26 の方法。

【請求項 33】

サンプルが以下のものからなるグループから選択される請求項 32 の方法；

i) 血液；

ii) 尿；および / または

iii) 精液。

10

【請求項 34】

正常塩基配列が 7-βヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる機能性酵素をコードする請求項 26 の方法。

【請求項 35】

正常塩基配列が前記機能性酵素に影響する変異を含まない塩基配列である請求項 26 の方法。

【請求項 36】

7-βヒドロキシステロイドまたは 7-αヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の濃度を免疫学的検出技術によって検出する請求項 26 の方法。

【請求項 37】

7-βヒドロキシステロイドまたは 7-αヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の濃度をエライザ法によって検出する請求項 36 の方法。

20

【請求項 38】

7-βヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の濃度をウエスタンブロット法によって検出する請求項 26 の方法。

【請求項 39】

7-βヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の濃度を PCR および関連技術、例えば RT-PCR、定量的 PCR および定量的 RT-PCR によって検出する請求項 26 の方法。

【請求項 40】

7-βヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の濃度を分光光度分析および酵素反応によって検出する請求項 26 の方法。

30

【請求項 41】

患者において、7-βヒドロキシステロイドまたは 7-αヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素と相互作用できる分子を患者へ投与し、前記分子及び前記 7-βヒドロキシステロイドまたは 7-αヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素からなる複合体を検出することからなる、7-βヒドロキシステロイドまたは 7-αヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素を検出する方法

【請求項 42】

7-βヒドロキシステロイドまたは 7-αヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素と相互作用できる分子が抗体である請求項 41 の方法。

40

【請求項 43】

分子または抗体がさらに放射性標識を含む請求項 41 と 42 の方法。

【請求項 44】

分子または抗体がさらに放射性同位元素を含む請求項 41 と 42 の方法

【請求項 45】

7-βヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の活性をモジュレートすることのできる薬剤を同定する以下のステップを含む方法：

c) 薬剤を前記酵素によって 7-βヒドロキシステロイドに変換され得る基質の存在下、7-βヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素を含む前立腺細胞と接触させ

50

る；および

d)前記酵素によって7β-ヒドロキシステロイドに変換され得る基質の量を検出し前記濃度を正常濃度と比較する。

【請求項46】

ホルモン依存性腫瘍および他の増殖性疾患の治療および/または予防のための請求項45の方法によって同定された薬剤の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はホルモン依存性腫瘍および他の増殖性疾患の診断に加えて、ホルモン依存性腫瘍および他の増殖性疾患を予防および/または治療する薬剤の製造におけるERモジュレータの使用に関する。本発明はホルモン依存性腫瘍および他の増殖性疾患の予防および/または治療におけるそれらの使用のための薬剤のスクリーニング法をも教示する。

【背景技術】

【0002】

アンドロゲン (androgens) は多くの腺、例えば乳房、脳および前立腺の発達と機能に重要な役割を果たし、またホルモン依存性腫瘍および他の増殖性疾患例えば、前立腺癌 (Prostate Cancer) および良性前立腺肥大症 (BPH) の発症と維持にも関わっている (非特許文献1)。動物モデルとヒトでの最近の研究では、エストロゲン (estrogens) を含む他のステロイドホルモンも前立腺のような腺の成育と疾患にも関わることを示している (非特許文献2、3)。年齢と共に低下する精巣機能は血漿中テストステロン (testosterone: T) の濃度低下をもたらす (非特許文献4)。しかしながら、エストロゲン (17β-エストラジオール: E₂) の濃度は脂肪組織のような末梢組織における副腎アンドロゲン、特にデヒドロエピアンドステロン (dehydroepiandrosterone: DHEA) (非特許文献5) (図1を参照) の芳香族化 (aromatization) の促進により維持される (非特許文献6)。よって高齢男性においては、遊離E₂と遊離Tとの比率は40%まで増大する (非特許文献7)。中年での内分泌変化は長期間観察され、50歳代以降の前立腺のような腺にみられる病理と関連している可能性がある (非特許文献1、8、9)。

【0003】

前立腺において、エストロゲンは2種類のエストロゲン受容体 (ER)、ERα および ERβ と相互に作用しあう。この2種類の受容体は種々のエストロゲン様化合物に対するそれらの結合親和性、およびヒト前立腺におけるそれらの局在化において異なる (非特許文献10~13)。ERα は低濃度でのみ発現し、かつ間質に限られ、パラクリン様式で上皮の成育に影響を及ぼす (非特許文献14)。対照的に、ERβ は前立腺上皮に高度に発現される (非特許文献13)。ヒト前立腺におけるERβ の役割は明らかではない。ある研究において、ERβ ノックアウトマウスが、年齢とともに前立腺肥大症を発症することが報告され (非特許文献15) ていることから、抗増殖機能が示されている。しかしながら、他のERβ ノックアウトモデルはこの前立腺表現型を有していない。たとえこれらの研究がERα およびERβ の明らかな役割を示すとしても、これらエストロゲン様作用の原因であるリガンドの同定には至っていない。一方E₂はほとんどの標的細胞においてERα の主要なリガンドであり、ヒト前立腺でのE₂濃度は非常に低いので、おそらく受容体を活性化できない (非特許文献16)。このことは前立腺において局所的に生成される他のエストロゲン様リガンドがERβ のエストロゲン様活性の原因である可能性を高めている。実際、局所でのステロイド代謝が種々の器官におけるステロイド作用の重要な決定因子である (非特許文献17)。このように、前立腺における局所での代謝が、ステロイドの生物学的活性の鍵である可能性がある。

【0004】

最近、げっ歯類の海馬において同定され、かつDHEAの7β-ヒドロキシDHEA (7β-OH-DHEA) への7α-水酸化を触媒する新規なチトクロームP450であるオキシステロール7β-ヒドロキシラーゼ (CYP7B) (非特許文献18、19) がげっ歯類の前立腺に高度

に発現していることが判明した（非特許文献20）。CYP7Bノックアウト動物によって確かめられたように（非特許文献21、22、23）、CYP7BはDHEAの7水酸化にとって唯一の経路であり、前立腺と脳においてはDHEAの7水酸化の残渣すらみられない（非特許文献22）。P450の中でも肝臓よりも特異な肝外組織、特に海馬および前立腺（非特許文献19）において高度に発現されているという点でCYP7Bは通常とは異なっている。7ヒドロキシラーゼ活性はヒトでも報告されているが（非特許文献24）、ほとんどの組織においてこの反応原因となる酵素は不明である。

【0005】

特許文献1（国際特許WO97/37664号公報）は神経精神疾患、免疫疾患または内分泌疾患を治療するために7置換ステロイドおよび酵素CYP7Bの使用を開示しているが、前立腺疾患の治療におけるこのようなステロイドまたは酵素CYP7Bの使用の記載は開示されていない。

10

本発明はヒト前立腺におけるCYP7Bの発現が7HDを産生するDHEA代謝にとって主要経路であるという本発明者らによる観察に基づいている。

【0006】

【特許文献1】国際特許WO97/37664号公報

【非特許文献1】Bosland MC 2000 The role of steroid hormones in prostate carcinoma genesis. *J Natl Cancer Inst Monogr* 27: 39-66

【非特許文献2】Schweikert HU, Tunn UW, Habenicht UF, Arnold J, Senge T, Schulze H, Schoder FH, Blom JHM, Ennemoser O, Horniger W, Bartsch G 1993 Effects of estrogen deprivation on human benign prostatic hyperplasia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44: 573-576

20

【非特許文献3】Jarred RA, Cancilla B, Prins GS, Thayer KA, Cunha GR, Risbridger GP 2000 Evidence that estrogens directly alter androgen-regulated prostate development. *Endocrinology* 141: 3471-3477

【非特許文献4】Ferrini RL, Barrett-Connor E 1998 Sex hormones and age: a cross-sectional study of testosterone and estradiol and their bioavailable fractions in community-dwelling men. *Am. J Epidemiol* 147: 750-754

【非特許文献5】Labrie C, Belanger A, Labrie F 1988 Androgenic activity of dehydroepiandrosterone and androsterone in the rat ventral prostate. *Endocrinology* 123: 1412-1417

30

【非特許文献6】Nelson LR, Bulun SE 2001 Estrogens production and actions. *J Am Acad Dermatol* 45: S116-124

【非特許文献7】Ekman P 2000 The prostate as an endocrine organ: Androgens and estrogens. *Prostate* 10: 14-18

【非特許文献8】Risbridger GP, Bianco JJ, Ellem SJ, McPherson SJ 2003 International congress on hormonal steroids and hormones and cancer: Estrogens and prostate cancer. *End Related Cancer* 10: 187-191

【非特許文献9】Leav I, Ho SM, Ofner P, Merk FB, Kwan PW, Damassa D 1988 Biochemical alterations in sex hormone-induced hyperplasia and dysplasia of the dorsolateral prostates of Noble rats. *J Nat Cancer Inst* 80: 1045-1053

40

【非特許文献10】Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA 1997 Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor and . *Endocrinology* 138: 863-870

【非特許文献11】Brolin J, Skoog L, Ekman P 1992 Immunohistochemistry and biochemistry in detection of androgen, progesterone, and estrogen receptors in benign and malignant human prostatic tissue. *Prostate* 20: 281-295

【非特許文献12】Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, Head DR, Quinn DI, Makela S, Delprado W, Golovsky D, Brenner PC, O'Neill G, Kooner R, Stricker PD, Grygiel JJ

50

, Gustafsson JA, Sutherland RL 2001 Frequent loss of estrogen receptor- expression in the prostate cancer. *Cancer Res* 61: 5331-5335

【非特許文献 1 3】Leav I, Lau KM, Adams JY, McNeal JE, Taplin ME, Wang J, Singh H, Ho SM 2001 Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am J Pathol.* 159: 79-92

【非特許文献 1 4】Risbridger G, Wang H, Young P, Kurita T, Wang YZ, Lubahn D, Gustafsson JA, Cunha G, Wong YZ 2001 Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor-alpha mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Dev Biol* 229: 432-442

【非特許文献 1 5】Weihua Z, Makela S, Andersson LC, Salmi S, Saji S, Webster JI, Jensen EV, Nilsson S, Warner M, Gustafsson JA 2001 A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6330-6335

【非特許文献 1 6】Ghanadian R, Puah CM 1981 Relationships between oestradiol-17 beta, testosterone, dihydrotestosterone and 5 alpha-androstane-3 alpha, 27 beta-diol in human benign hypertrophy and carcinoma of the prostate. *J Endocrinol* 88: 255-262

【非特許文献 1 7】Seckl JR, Walker BR 2001 Steroid metabolism. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism. Vol 15.1 Bailliere Tindall, London;* 122

【非特許文献 1 8】Stapleton G, Steel M, Richardson M, Mason JO, Rose KA, Morris RG, Lathe R 1995 A novel cytochrome P450 expressed primarily in the brain. *J Biol Chem* 270: 29739-45

【非特許文献 1 9】Rose KA, Stapleton G, Dott K, Kieny MP, Best R, Schwarz M, Russell DW, Bjoorkheim I, Seckl JR, Lathe R 1997 Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyses the synthesis of neurosteroids 7 -hydroxy-DHEA and 7 -hydroxy-PREG. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4925-4930

【非特許文献 2 0】Martin C, Bean R, Rose K, Habib FK, Seckl JR 2001 CYP7B1 catalyses the 7 -hydroxylation of dehydroepiandrosterone and 25-hydroxycholesterol in rat prostate. *Biochem J* 355: 509-515

【非特許文献 2 1】Li-Hawkins J, Lund EG, Turley SD, Russell DW 2000 Disruption of the oxysterol 7alpha-hydroxylase gene in mice. *J Biol Chem* 275: 16536-16542

【非特許文献 2 2】Rose K, Allan A, Gauldie S, Stapleton G, Dobbie L, Dott K, Martin C, Wang L, Hedlund E, Gustafsson JA, Seckl J, Lathe R 2001 Targeting the gene encoding mouse neurosteroid hydroxylase CYP7B: vivid reporter activity in dentate gyrus and abolition of a major pathway of steroid and oxysterol hydroxylation. *J Biol Chem* 276: 23937-23944

【非特許文献 2 3】Weihua Z, Lahe R, Warner M, Gustafsson JA 2002 An endocrine pathway in the prostate, ERbeta, AR, 5alpha-androstane-3beta, 17beta-diol, and CYP7B1, regulates prostate growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13589-13594

【非特許文献 2 4】Li K Foo T, Adams JB 1978 Products of dehydroepiandrosterone metabolism by human mammary tumors and their influence on estradiol receptor binding. *Steroids* 31: 113-127

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

つまり本発明は ER の活性をモジュレートする薬剤に関する。さらに詳細に言えば本発明は ER をモジュレートできる 7 ヒドロキシステロイドおよび 7 ヒドロキシステロイドを生成する酵素に関する。7 ヒドロキシステロイド生成を触媒することのできる酵素の濃度が低下している時（例えば老人あるいは前立腺疾患の患者において）、前立腺

10

20

30

40

50

におけるエストロゲンとアンドロゲンとの間のバランスはアンドロゲン経路に有利に変化し、7-ヒドロキシステロイド(ER アゴニスト)の生成低下をもたらす。それに付随して7-ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の発現低下は、強力なアンドロゲンの合成にとって前立腺内の例えばネイティブDHEAの利用可能性を高める。

【0008】

ER はER の転写活性を抑制する能力を有するとされる。さらにER への結合によって、7-ヒドロキシステロイドは間質区画のER 活性をモジュレートすることができしたがって間質細胞の発育をコントロールできる。また、ER は前立腺の発癌およびアンドロゲン依存性腫瘍発育両者の初期相のモジュレートに加えて、前立腺細胞の分化と増殖において役割を果たしている。このように、7-ヒドロキシステロイドおよび7-ヒドロキシステロイド生成を触媒することのできる酵素は活性ステロイドの前立腺内濃度の制御において重要な役割を果たしており、ホルモン依存性癌および他の増殖性疾患例えば前立腺疾患の予防または臨床での治療において有用なツールである可能性がある。

10

【0009】

7-ヒドロキシステロイドはエストロゲン受容体ER に対するアゴニストであると考えられる。ER の発現は多くの組織例えば脳、乳房および特に前立腺の上皮において観察される(非特許文献13)。in vivoにおいて同様に分布するもう一種のエストロゲン受容体のER も前立腺の間質に低濃度で発現される。活性化に際し、ER はER の転写活性を抑制する能力を有することが判明した。7-ヒドロキシステロイドが前立腺上皮において選択的に結合してER をモジュレートすることは本発明者らの観察である。このような7-ヒドロキシステロイドはER の転写活性を抑制する効果を有するので、その結果間質細胞の発育をコントロールできる。それ故7-ヒドロキシステロイドまたは上皮においてER に結合しその活性をモジュレートする他の化合物はホルモン依存性腫瘍およびその他の増殖性疾患例えば、前立腺癌(PCa)および良性前立腺肥大症(BPH)の治療および/または予防に有用と思われる。

20

【0010】

このように第一にホルモン依存性腫瘍および他の増殖性疾患を予防および/または治療する薬剤の製造に対しER の使用を提供する。

【0011】

モジュレータという場合、ER に拮抗するかまたは作用する薬剤を意味する。モジュレータは好ましくはER アゴニストである。

30

【0012】

さらに、本発明はホルモン依存性腫瘍および他の増殖性疾患を予防および/または治療する薬剤の製造に対し7-ヒドロキシステロイドおよび/または7-ヒドロキシステロイドを生成する酵素の使用を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0013】

このような薬剤の製造において好ましいステロイドは7-ヒドロキシステロイドおよび7-ヒドロキシステロイド、より具体的には例えば、7-ヒドロキシDHEA(7DH)、7-ヒドロキシプレグネノロン、7-ヒドロキシエストラジオール、7 β ,3 α ,17 β アンドロステントリオール、7 β ,3 α ,17 α アンドロスタントリオール、プラス7-ヒドロキシコレステロール、7 α ,25 α ヒドロキシコレステロール、7 α ,24 α ヒドロキシコレステロール、7 α ,27 α ヒドロキシコレステロールおよび他の7 α -ジヒドロキシ型および7 α -マルチ水酸化型コレステロールを含む。

40

【0014】

このような治療は、薬剤学的に許容しうる担体または希釈剤とともに7-ヒドロキシステロイドまたは7-ヒドロキシステロイドの生成を触媒できる酵素の、患者への投与を含む。これはホルモン依存性腫瘍または他の増殖性疾患の予防および/または治療にこのような治療の必要な患者に対して、例えば消化管投与(例えば経口投与)、経粘膜投与、非

50

経口投与、経皮投与、吸入または局所投与または座薬としての投与にと、それぞれ適切な剤形に調剤できる。好ましい投与経路は適切な腺、例えば7-ヒドロキシステロイドまたは7-ヒドロキシステロイドの生成を触媒できる酵素に対する標的として前立腺が好都合である。

【0015】

ER をモジュレートできる化合物、7-ヒドロキシステロイドまたは7-ヒドロキシステロイドの生成を触媒できる酵素の患者への投与効果は、罹患した前立腺においてエストロゲンとアンドロゲン間のバランスを是正する効果およびER 活性をモジュレートする、例えば、前立腺における間質細胞の発育をコントロールする効果と考えられる。例えば前立腺疾患の治療の場合、身体の他の部位、例えば脳で形成される7-ヒドロキシステロイドまたは7-ヒドロキシステロイドの生成を触媒できる酵素に影響しないようにまたは影響が最小限となるように、前立腺または前立腺の近傍への直接投与または局所投与が好ましい。

10

【0016】

上述薬剤/製剤により治療できる可能性のあるホルモン依存性腫瘍および他の増殖性疾患の例は乳癌のような疾患に加えて前立腺の疾患、例えば良性前立腺肥大症(BPH)、前立腺炎および前立腺癌(PCa)、前立腺の成育および前立腺加齢の疾患を含む。

【0017】

望ましい様式で機能する酵素の例は熟練した読者に明白な国際特許WO 97/37664号公報で開示されているように、P450チトクローム酵素の一種であるCYP7Bを含む。しかしながら十分確立した技術を用いる当業者は、酵素活性を改変する多くの方法で前記酵素を操作し得るであろうと理解される。酵素改変の例は基質に対してより大きな親和性を与えるための、活性部位でのアミノ酸の改変を含む。このことは部位特異的突然変異誘発または他のPCRに基づいた方法(マニアティス(Maniatis)ら、1989年)のような当該技術においてよく知られた技術を用いて達成できる。このような改変法の詳細は国際特許WO 97/37664号公報においても示されている。

20

【0018】

酵素に関していえば、酵素が蛋白質、ペプチド、それらの断片または一部、および前記蛋白質、ペプチド、それらの断片または一部をコードする核酸を含むであろうことは、無論のこと言うまでもない。蛋白質、ペプチド、それらの断片または一部、例えばCYP7Bが7-ヒドロキシステロイドの生成を触媒することもできることは、無論のこと言うまでもない。

30

【0019】

ここで述べたすべての蛋白質、ペプチド、それらの断片または一部は、例えば遺伝子組換えによって発現させることができる。すなわち前記蛋白質、ペプチド、それらの断片または一部をコードする発現可能な核酸を細菌、例えば大腸菌および真核生物、例えば、酵母、昆虫または哺乳類の細胞のような適切な細胞に導入することができる。前記蛋白質は当該技術において知られた適切な技術を用いて、適切な細胞から精製することもできる。当業者は7-ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の生成を可能にする国際特許WO 97/37664号公報の教示を理解することができるであろう。具体的には国際特許WO 97/37664号公報は本発明者らの観察の結果として、ホルモン依存性腫瘍および他の増殖性疾患の治療に有用な可能性のある7-ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素CYP7Bの生成を容易にする情報を当業者に提供する。

40

【0020】

ホルモン依存性腫瘍または他の増殖性疾患の治療および/または予防において用いられるステロイドは、7-ヒドロキシステロイド、好ましくは7-ヒドロキシステロイド、具体的には例えば、7-ヒドロキシ DHEA (7DH)、7-ヒドロキシ プレグネノロン、7-ヒドロキシ エストラジオール、7- β , 3- α , 17- α アンドロステントリオール、7- β , 3- α , 17- α アンドロスタントリオール、それらのすべての7-

50

水酸化型、プラス 7 ヒドロキシコレステロール、7 25 ヒドロキシコレステロール、7 24 ヒドロキシコレステロール、7 27 ヒドロキシコレステロールおよびコレステロールの他の 7 ジ ヒドロキシ型および 7 マルチ 水酸化型である。このようなステロイドは合成によって、または例えば、遺伝子組換えによって生成された前記 7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素、例えば CYP 7 B を用いることによって生成することができる。7 ヒドロキシステロイドを生成するために、適切な基質、例えば直接に前記酵素、または例えば細胞培養などに添加される。前記細胞培養等は、前記基質から 7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することもできる前記酵素あるいは蛋白質、ペプチド、それらの断片、あるいは一部をコードする遺伝子を含むベクターで形質転換した細胞からなる。

10

【0021】

基質に関しては、7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素によって 7 ヒドロキシステロイドに変換され得る化合物を意味する。例えばプレグネノロン、デヒドロエピアンドステロン (DHEA)、3 アンドロスタンジオール、3 アンドロスタンジオールおよび エストラジオールは、7 ヒドロキシステロイド生成を触媒することのできる酵素によって、7 ヒドロキシステロイドに変換され得る、いずれも適切な基質である。本発明の他の態様として、7 ヒドロキシステロイドおよび / または 7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の有効量を、それらを必要とする患者に投与することからなるホルモン依存性腫瘍または他の増殖性疾患に罹患している、または罹患する素因を有する患者における治療法および / または予防法を提供する。

20

【0022】

本発明のさらに別の態様として、7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素をコードする機能異常遺伝子を有する患者の治療手段を提供する。“異常”という場合正常な腺、例えば前立腺において発現される遺伝子と異なる様式で、ある手段、例えば抑圧によって前記遺伝子の、例えば変異またはダウンレギュレーションの結果として機能する遺伝子を意味する。このような治療は前記酵素をコードし、正常に機能する遺伝子を含む適切なベクターの腺への投与からなる。“正常に機能する”という場合正常な腺において、発現する遺伝子と同様の様式で機能する遺伝子を意味する。適切なベクターの例は、適切な基質から 7 ヒドロキシステロイドの産生を触媒することのできる機能性酵素を発現することのできる遺伝子を含むように改変されたプラスミド、リポソーム、アデノウイルス、ワクシニアウイルスまたはヘルペスウイルスのベクターを含む。

30

【0023】

例えば、7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素をコードする変異遺伝子、またはあるメカニズムによりダウンレギュレートされるようになった前記酵素をコードする遺伝子から生じるホルモン依存性腫瘍、および他の増殖性疾患の治療において利用する遺伝子療法ベクターを、好ましくは好都合な標的が適切な腺であるように投与すべきである。ベクターは例えば局所投与、経粘膜投与、非経口投与、経皮投与、消化管投与 (経口投与)、または吸入に適切な製剤で薬学的に許容できる担体とともに投与される。有効な投与はベクターが腺に直接または近傍に伝達されるように、非経口投与、局所投与または経粘膜投与の方法による。

40

【0024】

もう一つの態様として本発明は、患者における 7 ヒドロキシステロイドの濃度、または 7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の濃度の診断法、または 7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素をコードする塩基配列における突然変異の、以下のステップからなる検出法を提供する：

- a) 患者からサンプルを採取する；
- b) 7 ヒドロキシステロイドまたは 7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の濃度を検出する、または前記酵素をコードする核酸の塩基配列を確かめる；および
- c) 前記検出濃度または前記核酸の塩基配列を正常濃度あるいは正常配列と比較する。

50

患者に関しては健常人、ホルモン依存性腫瘍または他の増殖性疾患の疑われる人、これらを発症または罹患する素因を有する人を意味する。

【0025】

サンプルは生検の形、例えば前立腺生検、または適切なサンプルに血液、尿または精液サンプルを含む。例えば、血液は一般にサンプル採取時における、身体の7-ヒドロキシステロイドまたは7-ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の濃度を検出する手段を提供する。例えば前述したタイプの前立腺疾患に罹患し、サンプルを採取し、かつ前述したアッセイにより検査した患者に、血液中の7-ヒドロキシステロイドまたは7-ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の異常濃度がみられ、前記アッセイにより検出された異常濃度が明確に前立腺の疾患によるものかどうかを確認するため、さらに検査することが望ましい。前立腺疾患の場合、前立腺生検または尿サンプルは、前立腺における7-ヒドロキシステロイドまたは7-ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の濃度を最も正確に測定できることが考えられる。

10

【0026】

異常濃度は、健康な患者から測定されたときの正常濃度に比した場合、高濃度または低濃度であると解釈される。もし患者で検出された濃度と正常濃度間に違いがあれば、その場合患者には適切な治療薬、例えば7-ヒドロキシステロイドまたは他の適切な薬剤または7-ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素を投与するか、またはさらなる検査にまわされる。

【0027】

正常な塩基配列とは7-ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる機能的な酵素をコードする塩基配列、または前記の機能的な酵素の発現に影響を及ぼす変異を構成しない塩基配列であると解釈される。変異は欠失、置換、逆位あるいは転座であると解釈される。

20

【0028】

7-ヒドロキシステロイドまたは7-ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素濃度を検出するのに用いられる方法の例は捕捉、直接または間接酵素免疫検査法(ELISA法)を含み、ELISA法において、例えば7-ヒドロキシステロイドに特異的な抗体あるいは7-ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素、例えばCYP7Bに反応する抗体を、マイクロタイタープレート、または他の適切なものに結合させ、分析するサンプルを適切な時間、接触させる。適切な時間とは抗体とそのエピトープとの間で相互作用が生じるような長さである。7-ヒドロキシステロイドまたは7-ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の捕捉後、前記ステロイド、または前記酵素に特異的な二次抗体を適切な時間、接触させる。抗原抗体相互作用はそこで、二次抗体と相互作用できる抗体の使用によって検出され、カラーメトリック化学ルミネセンス反応を経て濃度を伝達できる酵素と共役する。このような共役酵素はセイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)およびアルカリ性ホスファターゼ(AlkP)を含むが、これらに限定されない。他のタイプの共役分子は蛍光抗体または放射性同位元素で標識した抗体を含む。

30

【0029】

7-ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の濃度を検出する他の手段は、当業者に良く知られた、ウエスタンブロットおよび他の関連技術、RT-PCR、PCR、定量的PCR、定量的RT-PCR(マニアティス(Maniasis)において規定されている)、分光光度分析および酵素反応を含む。

40

異常な塩基配列の検出は良く知られた技術、例えばアガロースゲル電気泳動、PCRおよび関連技術、RT-PCR、サザンブロットイング(Southern blotting)、ノーザンブロットイング(Northern blotting)、制限酵素分析およびDNA塩基配列決定を含む。

【0030】

本発明のさらなる態様として、7-ヒドロキシステロイドまたは7-ヒドロキシステロ

50

イドの生成を触媒する酵素を患者において検出する方法を提供し、その方法は7 ヒドロキシステロイドまたは7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素と相互作用でき、および前記抗体あるいは分子、および前記7 ヒドロキシステロイドまたは7 ヒドロキシステロイドの産生を触媒することのできる酵素からなる複合体を検出できる抗体、または分子を患者に投与することからなる。

【0031】

前記複合体の検出は例えば、放射性同位元素によりラベルされた前記抗体、または分子、または例えば炭素13のようなアイソトープからなる前記抗体または分子の使用を含む。体内、例えば前立腺における7 ヒドロキシステロイドまたは7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の濃度は例えば、磁気共鳴イメージング(MRI)、
10 磁気共鳴スペクトロスコピー(MRS)あるいはコンピュータ体軸断層(CAT)走査によって測定される。

【0032】

もう一つの実施態様において、7 ヒドロキシステロイドまたは7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素と相互作用できる一次抗体または分子は患者に投与可能であり、前記一次抗体または分子と相互作用できる二次抗体または分子を用いて検出できる。この詳細な実施態様において二次抗体または分子は放射性同位元素によりラベルされているかまたはMRIまたはコンピュータ体軸断層撮影法(CATスキャン)により
20 検出できるように炭素13のような同位元素を含むことが望ましい。

【0033】

このような方法は例えば前立腺において、7 ヒドロキシステロイドまたは7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素濃度の検出を可能にする。このような検査の結果から患者が健康である、ホルモン依存性腫瘍または他の増殖性疾患に罹患している、罹患しやすいまたは快方に向かっていることを指摘することができる。
30

【0034】

ここで述べられた酵素は、薬剤評価試験において用いられる。本発明のこの点での態様において、細胞、または正常組織、または病変組織から得られた細胞は、7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の発現をモジュレートする薬剤のアッセイにおける基剤として用いられる。健康な組織または病変組織由来の細胞株が有利に用いられる。このようなアッセイに対する適切な細胞株の例として、例えば正常なヒト前立腺細胞株PNT2(ECCAC No:95012613)、ヒト前立腺癌細胞株PC3(ECCAC No:90112714)または前立腺癌細胞株LNCapクローンFGC(ECCAC No:89110211)を含む。この
30 ようなアッセイは薬剤、例えば、7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の活性または発現をモジュレートできる低分子の有機分子、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを同定することができる。前記アッセイによって同定された薬剤は単独でまたは7 ヒドロキシステロイドの産生を触媒することのできる酵素またはin vivoで前記酵素の活性または発現がモジュレートできるようにin vivoで7 ヒドロキシステロイドに変換しうる基質とともに投与できる可能性がある。

【0035】

このようにさらなる点において7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の活性をモジュレートできる薬剤の同定における以下のステップからなるアッセイを提供する：
40

a) 前記酵素によって7 水酸化ヒドロキシステロイドに変換しうる基質の存在下、薬剤を7 水酸化ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素からなる前立腺細胞と接触させ；および

b) 前記酵素によって7 水酸化ヒドロキシステロイドに変換された基質の量を検出し、前記濃度を正常濃度と比較する。

【0036】

基質の7 ヒドロキシステロイドへの変換に有利な条件の基質の存在下において、選択した細胞または細胞株に薬剤を接触させる必要があることは無論である。
50

【0037】

7 ヒドロキシステロイドに変換された基質の量を検出するために用いられる方法の例としては、免疫学に基づいたアッセイ方法、例えば前述したようなELISA法または変換基質の濃度を適切に表す他の化学ルミネセンスアッセイ法、蛍光アッセイ法または分光光度分析または例えば薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー質量分析のようなアッセイの使用を含む。

【0038】

このような方法によって同定できる薬剤は低分子の有機分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。

【0039】

“正常濃度”は正常組織、非病変組織またはそれら由来の細胞/細胞株における7 ヒドロキシステロイドの生成を触媒することのできる酵素の濃度として測定できる。

【0040】

もう一つの点においてホルモン依存性腫瘍および他の増殖性疾患の治療および/または予防に対する上記方法により同定された薬剤の使用を提供する。そのような薬剤は7 ヒドロキシステロイドの産生を触媒することのできる酵素の活性をモジュレートできる低分子の有機分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。

【実施例】

【0041】

材料および方法

実験対象

BPH患者からのパラフィン包埋前立腺組織が病理部門(Western General Hospital、エディンバラ)によって提供された。CYP7B活性の測定と細胞培養のために、新鮮な前立腺サンプルがホルモン除去による治療を受けず前立腺の経尿道切除術(TRUP)を受けている患者(年齢56~70歳)から得られた。本研究では生検サンプルは用いられなかった。各検体の無作為に選択した前立腺小片をそれらの良性状態および肥大の存在を確認するために組織病理学的に評価した。インフォームドコンセントを得て採取したサンプルのみについて研究し、我々のプロトコールは地元の研究倫理委員会によって承認された。

【0042】

ステロイド

[1, 2, 6, 7-³H]₄ DHEA (60Ci/mmol)、[4-¹⁴C] DHEA (53.8mCi/mmol) および[1, 2-³H]₂ 5 αアンドロステンジオール(A/エンジオール)(42Ci/mmol)を米国ボストンのNENライフサイエンスプロダクツ社(NEN Life Science Products社)から購入し、[2, 4, 6, 7-³H]₄ E₂を米国ボストンのパーキンエルマーライフサイエンス社(Perkin Elmer Life Sciences社)から購入した。非放射性ステロイドとクロトリマゾールは英国プールのシグマアルドリッチ社(Sigma Aldrich社)から得られた。7DHは米国ニューポートのステロイドインコーポレーション社(Steraloids Inc社)から購入した。トリロスタンは英国ニューカースルのさのふいウィンスロップディベロップメントセンター(Sanofi Winthrop Development Centre)によって快く提供され、ICI 182, 780は英国ブリストルのトクリス社(Tocris社)から購入した。

【0043】

7 ヒドロキシラーゼ活性

7 ヒドロキシラーゼ活性は全ヒト前立腺片で測定した。外科用BPHサンプルを5%活性炭処理血清(DCC-FCS)と0.3 μM濃度の放射性同位体で標識されたステロイド基質を補足したBPMI 1640培地中で、48時間まで37 °Cでインキュベートした。ステロイドを酢酸エチルにより培地から抽出し、乾燥し、分析まで-20 °Cで貯蔵した。回収は~90%であった(Martin C, Bean R, Rose K, Habib FK, Seckl JR 2001 CYP7B1 catalyses the 7- α -hydroxylation of dehydroepiandrosterone and 25-hydroxycholesterol in rat prostate. Biochem J 355: 509-515)。7HDへのDHEAの変換は以前に述べたように(Martin C, Bean R, Rose K, Habib FK, Seckl JR 2001 CYP7B1 catalyses

10

20

30

40

50

the 7 α -hydroxylation of dehydroepiandrosterone and 25-hydroxycholesterol in rat prostate. *Biochem J* 355: 509-515) T L Cで評価し、ホスフォイメージャー (FLA-2000、フジフィルム) を用いて定量した。

【0044】

高速液体クロマトグラフィー

オンラインシンチレーション計数 (Berthold) による高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) (Waters) を、7HD および DHEA に対しそれぞれ7分および24分の保持時間を与える移動相 (水、メタノールおよびアセトニトリル、容積が55:25:20、1 ml/分) を用いて逆相 C18 カラム (Luna, Phenomenex) で行なった (Martin C, Bean R, Rose K, Habib FK, Seckl JR 2001 CYP7B1 catalyses the 7 α -hydroxylation of dehydroepiandrosterone and 25-hydroxycholesterol in rat prostate. *Biochem J* 355: 509-515)。

10

【0045】

RNA抽出

以前に述べたようにヒト前立腺組織および細胞から全RNAを単離し (Chomczynski P, Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159)、RNAをフリー水に再懸濁し、-70 $^{\circ}$ Cで貯蔵した。全サンプルをアガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色 (ethidium bromide staining) により判定したとき、無傷の18S RNAと28S RNAを有していた。

【0046】

オリゴヌクレオチドプライマー、逆転写およびCYP7B cDNAのPCR増幅

PCRのための5'プライマーおよび3'プライマー (オズウェルDNAサービス (Oswel DNA Service)、英国サザンプトン) はヒトCYP7B cDNAのヌクレオチド329-347および1006-1025にそれぞれ相当する5' dAAGCCTAAATGATGTGCTCC 3' および5' dGAGTGGTCTGAACTTACG 3' とした (Wu Z, Martin KO, Javitt NB, Chiang JYL 1999 Structure and functions of human oxysterol 7 α -hydroxylase cDNAs and gene CYP7B1. *J Lipid Res* 40: 2195-2203)。逆転写 (RT) は10 mMのTris 塩酸 (pH9.0)、50 mMの塩化カリウム、2.5 mMの塩化マグネシウム、0.1% (w/v) Triton X 100、1 mMのdNTPs、10単位のRNasin (プロメガ社 (Promega社)、英国サザンプトン)、1 μ gの全RNA、12単位のAMV逆転写酵素 (プロメガ社 (Promega社)、英国サザンプトン) および0.1 nmolの3' PCRプライマーを含む20 μ lで行なった。反応は室温で10分、続いて42 $^{\circ}$ Cで30分それから95 $^{\circ}$ Cで5分 (逆転写酵素を失活させるため) インキュベートした。その後のPCR増幅は50 mMの塩化カリウム、10 mMのTris 塩酸 (pH9.0)、2.5 mMの塩化マグネシウム、0.2 mMのdNTPs、0.1 nMの5' PCRプライマーおよび2.5単位のTaqポリメラーゼ (プロメガ社 (Promega社)、英国サザンプトン) を含む80 μ lのバッファーを加えて行なった。94 $^{\circ}$ Cで5分の“ホットスタート”後、30サイクルのPCRを行なった: 94 $^{\circ}$ Cで1分、56 $^{\circ}$ Cで1分、72 $^{\circ}$ Cで1分引き続いて72 $^{\circ}$ Cで10分。増幅産物を1% (w/v) アガロースゲルで電気泳動により分析した。逆転写酵素を除いた反応では産生物は検出されなかった。

20

30

40

【0047】

クローニングおよびRT-PCR産生物の塩基配列決定

PCR産生物はpGEM (T) easy (プロメガ社 (Promega社)、英国サザンプトン) にサブクローニングされ、両鎖について塩基配列決定が行われた。

【0048】

mRNA in situ ハイブリダイゼーションに対するCYP7Bプローブ

pGEM (T) EasyにサブクローニングしたCYP7BのPCR断片を以前に述べたように“アンチセンス”および“センス”cRNAプローブを生成させるためにSP6またはT7RNAポリメラーゼに対する鋳型として用いた (Habib FK, Ross M, Bayne CW, Grigor K, Buck AC, Bollina P, Chapman K 1998 The localisation and expression

50

of 5 α -reductase types I and II mRNAs in human hyperplastic prostate and in prostate primary cultures. J Endocrinol 156: 509-517)。

【0049】

CYP7B mRNA in situハイブリダイゼーション

パラフィン包埋切片(5 μ m)をキシレン中でパラフィン除去し、リン酸バッファー生理食塩水(PBS)に浸し、PBS中プロテイナーゼK(20mg/ml)で37 $^{\circ}$ Cで10分間処理した。切片を4%のparaホルムアルデヒド(v/v)中で20分間固定し、それから0.1Mのトリエタノールアミン中0.25%の無水酢酸(v/v)で10分間処理した。湿室におけるジゴキシゲニン標識リボプローブ(DIG)との50 $^{\circ}$ C、14-16時間のハイブリダイゼーション、RNase A処理および洗浄は以前に述べたとおりであった(Habib FK, Ross M, Bayne CW, Grigor K, Buck AC, Bollina P, Chapman K 1998 The localisation and expression of 5 α -reductase types I and II mRNAs in human hyperplastic prostate and in prostate primary cultures. J Endocrinol 156: 509-517)。

10

【0050】

ハイブリダイゼーション後、DIG標識リボプローブは室温で30分DIG アルカリホスファターゼ共役抗体1:2500(ベーリンガーマンハイム社(Boehringer Mannheim社))を用いて視覚化し、洗浄しベーリンガーマンハイム社(Boehringer Mannheim社)の現像液を用いて一夜現像した。非特異的ハイブリダイゼーションは同一条件下でDIG標識“センス”プローブとのインキュベーションにより測定した。

20

【0051】

ER の免疫組織化学

免疫組織化学的研究はヒトER α に対する市販のモノクローナル抗体(セロテック社(Serotec社)、英国オックスフォード)を用いて、以前に記述されているように(Saunders PT, Millar MR, Williams K, Macpherson S, Harkiss D, Anderson RA, Orr B, Groome NP, Scobie G, Fraser HM 2000 Differential expression of estrogen receptor- α and androgen receptor in the ovaries of marmosets and humans. Biol Reprod 63: 1098-1105)行なった。

【0052】

前立腺の初代細胞培養

分離した間質細胞および上皮細胞の初代培養を確立するために、BPH小片を用いた(Chaproniere DM, McKeelan WL 1986 Serial culture of single adult human prostatic epithelial cells in serum-free medium containing low calcium and a new growth factor from bovine brain. Cancer Res 46: 819-824, Habib FK, Ross M, Bayne CW 2000 Development of a new in vitro model for the study of benign prostatic hyperplasia. Prostate 9: 15-20)。上皮細胞と間質細胞の共培養は以前に記述されているとおりであった(Habib FK, Ross M, Bayne CW 2000 Development of a new in vitro model for the study of benign prostatic hyperplasia. Prostate 9: 15-20)。

30

【0053】

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

COS-1細胞とHe p G 2細胞をペニシリン(25単位/ml)、ストレプトマイシン(25 μ g/ml)および10%のウシ胎児血清(v/v)を含む高グルコースのデルベコ(Dulbecco's)最小必須培地中で保存した。細胞は5 \times 10⁵細胞/ディッシュの密度で接種し、接着させるために一夜放置した。形質導入当日に、培地を10%のDCC FCS(v/v)を追加したフェノールレッドを除いたDMEMで置換した。形質移入は標準方法に従い、リン酸カルシウム法を用いて10 μ gのDNA(1 μ gの発現プラスミド、1-5 μ gのレポータープラスミド、内部コントロールとして用いた ガラクトシダーゼをコードする1 μ gのpCH110(Phrmcia社)および3-7 μ gのpGEM3)により行なった。発現プラスミドは、マウスのER α 受容体(mER α は英国ロンドンのM.パーカー(M.Parker)教授から贈られた(White R, Lees JA, Ham J, Parker M 1987 Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. Mol Endo 1: 735-744))、ヒトER α 受容体(hER

50

; 英国ロンドンのR.ホワイト (R.White) 教授から (Cowley SW, Parker MJ 1999 A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69: 165-175)) およびヒトアンドロゲン受容体 (pSVARo; オランダロッテルダムのA.ブリンクマン (A.Brinkman) 教授) とした。マウスのER 受容体はヒトER と88%の一致を示し、両種は大多数のステロイドに対して同じ選択性を示す。レポータープラスミドは、エストロゲン反応性に対し (ERE) TKLuc (カナダモントリオールのV.ジゲール (V.Giguere) 博士から贈られた)、およびアンドロゲン反応性に対し PSA (PSA61-luc、オランダロッテルダムのJ.トラップマン (J.Trapman) 教授) とした。24時間後、培地を変え細胞をステロイド (E₂、DHT、7HDまたは適切な濃度のエタノール) で処理した。細胞溶解後、ルシフェラーゼと ガラクトシダーゼの活性を (Leckie C, Chapman KE, Edwards CR, Seckl JR 1995 LLC-PK1 cells model 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 regulation of glucocorticoid access to renal mineralocorticoid receptors. *Endocrinology* 136: 5561-5569) で述べたように測定した。データを相対的なルシフェラーゼ / ガラクトシダーゼとして表わし、少なくとも3回の独立した実験からの平均 ± S.E.M. (標準誤差) である。

【0054】

リガンド競合試験

ヒトER クローンを製造者の指示 (プロメガ社 (Promega社)、英国サザンプトン) に従い、TnT 共役網状赤血球溶解システムを用いて *in vitro* で合成した。翻訳反応の混合物をTEDGMoバッファー (40mMのトリス/塩酸、pH7.4/1mMのEDTA/10% (v/v) のグリセロール/10mMのNa₂MoO₄/10mMのDTT) で5倍に希釈しその0.1mlを0、1、5、10、20、50および250 μMの7DHのいずれかの存在下で、4 で16時間0.5nMの[2, 4, 6, 7-³H]₄ E₂ (比放射能89Ci/mmol) とともにインキュベートした。結合および非結合ステロイドをろ過により分離した。

【0055】

統計解析

統計的比較 (シグマスタット (Sigma Stat) を用いた) は分散分析 (ANOVA) および順位和検定によった。有意差は $p < 0.05$ と設定した。

【0056】

実施例 1: ヒト前立腺によるDHEAからのP450に依存した7HDの生成

ヒト前立腺にCYP7B活性が存在するかどうかを明らかにするため、全前立腺小片でDHEAの代謝を測定した。DHEAは *in vitro* で遺伝子組換えCYP7Bに対する最良の基質であると、以前に報告されていた (Rose KA, Stapleton G, Dott K, Kieny MP, Best R, Schwarz M, Russell DW, Bjoorkheim I, Seckl JR, Lathe R 1997 Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyses the synthesis of neurosteroids 7 α -hydroxy-DHEA and 7 α -hydroxy-PREG. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4925-4930)。DHEAおよびA/エンジールの7 α 水酸化が、全ヒト前立腺の小片において明確に検出可能で、それは時間に依存した (図2)。

【0057】

“E” (図2) の印を付けた放射性化合物は、非標識である市販の対照化合物であるの7ヒドロキシDHEA、遺伝子組換えCYP7Bを形質導入したHeLa細胞由来の蛋白抽出物によるDHEA代謝の主要産生物、さらには以前に記述されているように (Martin C, Bean R, Rose K, Habib FK, Seckl JR 2001 CYP7B1 catalyses the 7 α -hydroxylation of dehydroepiandrosterone and 25-hydroxycholesterol in rat prostate. *Biochem J* 355: 509-515) DHEA代謝のラット前立腺産生物とも同様に共に移動した (データは示していない)。A/エンジール、A/エンジオン (共にスポット “B”) も前立腺組織において以前に報告されているように (Mitamura K, Nakagawa T, Shimada K, Namiki M, Koh E, Mizokami A, Honma S 2002 Identification of dehydroepiandrosterone metabolites formed from human prostate homogenate using liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 961: 97-

105)、DHEAから生成された。反応中に生じた異なる標識化合物のより良い分離のために、非標識ステロイドの標準品を用いてHPLCにより、それらを分析した。HPLCにより検出されたDHEA代謝体全体の50%以上は、CYP7Bの産生物で(9%がA/エントリオールを表す)、37%のみが3 β -HSDおよび17 β -HSDの産生物であった(結果は示していない)。ヒト前立腺小片によるDHEAの7 α -水酸化は、クロトリマゾール(1 μ M)によって阻害され7HDの産生がP450依存性であることが確認された(図2)。少量の生成物である“C”および“D”の生成もクロトリマゾールの存在下で低下し、このことはそれらもP450酵素の生成物であることを示唆する。特異的に3 β -HSD活性を阻害するトリロスタンは、首尾よくA/アンジオンの産生をブロックしたにもかかわらず、放射性7HDの産生を40%増大させた(図2)。少量の生成物である“C”および“D”はトリロスタンにより影響を受けなかった。ヒト前立腺で観察されたDHEAの7 α -水酸化はCYP7B代謝の生成物であるものと矛盾しなかった。

10

【0058】

実施例2: ヒト前立腺においてCYP7Bが発現される。

前立腺でのCYP7Bの発現を立証するために、4種類の異なるヒト前立腺サンプル由来のRNAについてRT-PCRを行なった。CYP7Bに特異的なプライマーは予想通り696bpの断片を増幅した(図3)。PCR産生物が同一であることは、予測断片を生じたHindIII、PstIおよびSspIによる消化によって立証された(図3)。サブクローニングされたPCR産生物の塩基配列決定は、ヒトCYP7Bとしてその同一性を確認した(Wu Z, Martin KO, Javitt NB, Chiang JYL 1999 Structure and functions of human oxysterol 7 α -hydroxylase cDNAs and gene CYP7B1. J Lipid Res 40: 2195-2203)。

20

【0059】

実施例3: CYP7B mRNAはヒト前立腺においてER 免疫反応性と共に局在する。

ヒト前立腺におけるCYP7B mRNAの発現部位を決定するために、サブクローニングしたPCR産生物から作成されたcRNAプローブを用いて、前立腺のパラフィン包埋切片についてin situ mRNAハイブリダイゼーションを行なった。CYP7B mRNAは間質と脈管構造にはほとんど発現はされず、上皮において高度に発現していた(図4A)。“センス”RNAプローブにハイブリダイズした対照切片はハイブリダイゼーションの背景レベルは低かった(図4B)。我々は特異的なER 抗体を用いて、ヒト前立腺サンプルにおいてER の局在をも決定した(図4C)。興味深いことに、ER は高分子量のサイトケラチン標識により確かめられたように、上皮細胞(主として上皮の基底領域)においても発現された。この結果はER のCYP7Bとの共発現を示唆する。

30

【0060】

実施例4: CYP7B mRNA発現は、上皮細胞の初代培養において維持され、間質の上皮細胞との共培養によって増加する。

CYP7B mRNAと7 α -ヒドロキシラーゼ活性の両者はヒト前立腺上皮細胞の初代培養において検出された(図5)。さらに、上皮のCYP7B活性は上皮細胞と間質細胞との共培養の5日後に促進され($p < 0.001$; 図5C)、このことはCYP7Bの上皮での高発現が間質細胞と上皮細胞との共培養により生じた拡散性因子に依存することを示唆する。間質細胞だけにCYP7B mRNAが認められず、CYP7B mRNAが上皮に限られるin situハイブリダイゼーションの知見と矛盾しない。

40

【0061】

実施例5: 7HDはER を活性化するが、ER あるいはARは活性化しない。

CYP7B産生物の7HDの可能な機能をさらに評価するために、エストロゲンおよびアンドロゲンに反応するレポーター遺伝子によるコトランスフェクションアッセイにおいてER α 、ER β およびARをトランスアクティベートするその能力を分析した。COS-1細胞とHe p G 2細胞の両方を用い、これら両細胞株は、アンドロゲン(PSA)またはエストロゲン(ERE)に反応するレポーター遺伝子を活性化するためには外因性のAR、ER α およびER β を必要とする。最初の実験において、E $_2$ によるER α の最大の活

50

性化は10 nMのE₂で認められ、一方ERの最大の活性化は50 nMのE₂で得られた。7HDも著しくERを活性化した(図6Aおよび図6B)。7HDは6.2 μMのEC₅₀でERを介した転写を有意に活性化した。7HDの転写活性効果はE₂の最小限以下の投与量(0.1 nM; p<0.01)に付加的なものであった(図6B)。この効果はERの最小の非特異的活性化のみによりもたらされ、7HDの同様の濃度のようにERに対して特異的であった(図6C)。さらに、7HDはPSAルシフェラーゼレポーターのアンドロゲン受容体依存転写を活性化できなかった。一方5αDHTは明らかに強力な活性化をもたらした(図6D)。7HDがERを介して転写を活性化することを確かめるために、特異的抗アンドロゲンのICI 182,780を用いた。期待したように、ICI 182,780(1 μM)単独ではER活性またはER活性を刺激できなかったが、ER受容体またはER受容体でコトランスフェクトした細胞において、E₂誘導および7HD誘導ルシフェラーゼの転写を完全に消失させた(図6B)。

【0062】

[³H] E₂結合を阻害する7HDの能力は、TnT共役網状赤血球溶解システムを用いる我々のヒトERクローン(hER)からin vitroで合成したヒトER受容体を用いた競合結合アッセイによっても測定された(図7)。我々の競合試験において、7HDはER受容体と相互作用し、[³H] E₂結合を用量依存的に阻害した。

【0063】

オキシステロールである7βヒドロキシラーゼ(CYP7B)はヒト前立腺において発現し、この反応経路は本器官におけるDHEA代謝の50%以上の原因となる。対照的に、古くから知られているアンドロゲンおよびエストロゲンへのDHEAの代謝は比較的副次的な経路を形成している。さらに、7HDはERに対する特異的アゴニストであるが、ERまたはARに対しては異なることが本発明者らによって示され、このことはヒト前立腺において7HDはERに対する内因性リガンドとして作用する可能性を示唆している。同時にデータはCYP7Bが前立腺内の活性ステロイドを生成し、それらがイントラクリンであるエストロゲン：アンドロゲンのバランス、および潜在的な病因に影響を与えるという見方を裏付けている。

【0064】

ヒトにおけるDHEAの7β水酸化は、最初は尿中7HDの同定(Schneider JJ, Lebart ML 1959 Fractionation and isolation of steroid conjugates. Recent Prog Horm Res 15: 201-230、Okada M, Fukushima DK, Gallagher TF 1959 Isolation and characterization of 3β-hydroxy⁵steroids in adrenal carcinoma. J Biol Chem 234: 1688-1692)により、その後の皮膚、脳、乳房組織および胎児組織における7HD生成の検出(Farendin I, Fazekas AG, Toth I, Kokai K, Julesz M 1969 Transformation in vitro of [4-¹⁴C]-dehydroepiandrosterone into 7-oxygenated derivatives by normal human male and female skin tissue. J Invest Derm 52:357-361、Sulcova J, Capkova A, Jirasek JE, Starka L 1968 7-hydroxylation of dehydroepiandrosterone in human foetal liver, adrenals and chorion in vitro. Acta Endocrinol 7: 591-599)により長年知られていた。前立腺における3βヒドロキシステロイドの7β水酸化については以前に述べたが、原因となる酵素は今まで同定されなかった(Li K Foo T, Adams JB 1978 Products of dehydroepiandrosterone metabolism by human mammary tumors and their influence on estradiol receptor binding. Steroids 31: 113-127、Sundin M, Warner M, Haaparanta T, Gustafsson JA 1987 Isolation and catalytic activity of cytochrome P-450 from ventral prostate of control rats. J Biol Chem 262: 12293-12297)。本発明において、我々はその機能的酵素活性に加えて、CYP7B mRNAが上皮に局在することを示すためにRT-PCR、in situハイブリダイゼーション、生化学的および細胞培養アプローチを組み合わせて利用した。本発明はCYP7Bが前立腺において7β水酸化を触媒する最も有力な酵素であることを確認したものの、他の酵素もおそらく含まれる可能性がある。しかしながら、CYP7Bを欠くマウスは前立腺においてDHEAの7β(または7α-)水酸化の残渣をまったく示さず(Rose K, Allan A, Gauldie S, Stap 40

leton G, Dobbie L, Dott K, Martin C, Wang L, Hedlund E, Gustafsson JA, Seckl J, Lathe R 2001 Targeting the gene encoding mouse neurosteroid hydroxylase CYP7B: vivid reporter activity in dentate gyrus and abolition of a major pathway of steroid and oxysterol hydroxylation. *J Biol Chem* 276: 23937-23944) CYP7Bは関連する唯一の酵素であることが確認された。

【0065】

DHEAの7 α -水酸化はin vivoとin vitroにおいて前立腺上皮に限られる。これは前立腺組織の一部にのみ関連したステロイドの代謝酵素であることを結びつけ、7HD活性はもっぱら上皮に限られる可能性を提起した最初の報告である。我々のコトランスフェクションアッセイは、7HDが上皮にも局在するER α を活性化することができることを示す(Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, Head DR, Quinn DI, Makela S, Delprado W, Golovsky D, Brenner PC, O'Neill G, Kooner R, Stricker PD, Grygiel JJ, Gustafsson JA, Sutherland RL 2001 Frequent loss of estrogen receptor- α expression in the prostate cancer. *Cancer Res* 61: 5331-5335、Leav I, Lau KM, Adams JY, McNeal JE, Taplin ME, Wang J, Singh H, Ho SM 2001 Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am J Pathol.* 159: 79-92)。E₂の最小濃度以下において、ER α に対する7HDの効果はE₂に相加的である。7HDは明らかにE₂より有効ではなかったが、ER α の同様の最大の活性となった。DHEAおよびその硫酸塩がマイクロモル濃度で循環する一方、血清エストロゲンがピコモル濃度であるとすれば、CYP7Bは前立腺上皮内においてER α を活性化するのに十分な7HDを生成し、そのうえ前立腺内E₂の非常に低い濃度を達成した明らかな可能性がある(Voigt KD, Bartsch W 1986 Intratissular androgens in benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. *J Steroid Biochem* 25: 749-757)。実際、7HDはE₂それ自身より重要なER α リガンドであると考えられる。同様な提案が前立腺において局所的に生成されたER α リガンドでもあるA/アンジオールに対してなされた(Weihua Z, Lahe R, Warner M, Gustafsson JA 2002 An endocrine pathway in the prostate, ERbeta, AR, 5 α -androstane-3beta, 17beta-diol, and CYP7B1, regulates prostate growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13589-13594、Weihua Z, Makela S, Andersson LC, Salmi S, Saji S, Webster JI, Jensen EV, Nilsson S, Warner M, Gustafsson JA 2001 A role for estrogen receptor- α in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6330-6335)。ここに報告されたデータはDHEAはプロホルモンであり、7HDはその活性代謝体であるという見方を裏付けている。CYP7Bの存在下、DHEAは前立腺の成育および病因に影響を及ぼすER α アゴニスト、7HDとして作用するエストロゲン様ステロイドに代謝される。

【0066】

興味深いことに、上皮のCYP7B活性は上皮細胞と間質細胞の共培養により高められる。このことが共培養における上皮の分化の結果を反映するのか、あるいは間質細胞と上皮細胞との間の“クロストーク(crosstalk)”シグナル伝達の結果であるか否かは不明である。前立腺の共培養する前の特徴は、1つのタイプの細胞により生成された拡散性因子の存在を示唆し、次に他のタイプの細胞の分化と遺伝子発現に影響を及ぼすことを示唆する(Habib FK, Ross M, Bayne CW 2000 Development of a new in vitro model for the study of benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 9: 15-20、Bayne WC, Donnelly F, Chapman K, Bollina P, Buck C, Habib FK 1998 A novel co-culture model for benign prostatic hyperplasia expressing both isoforms of 5 α -reductase. *J Clin Endocrinol Meta* 83: 206-213、Bayne CW, Ross M, Inglis NF 2003 Induction of 5 α -reductase type II mRNA transcription in primary cultured prostate epithelial cells by a soluble factor produced by primary cultured prostate fibroblast cells. *Eur J Cancer* 39: 1004-1011)。前立腺の間質成分と上皮成分との間の“クロストーク(crosstalk)”がDHEA代謝の重要なレギュレーターであり、その結果腺のホルモン状態を調整する。

【 0 0 6 7 】

前立腺および他の組織における 7 H D に対する生物学的役割の実際はこれまで確認されておらず、この問題を解明する試みは 7 H D に対する確立した受容体がないため妨げられていた。最近の研究は C Y P 7 B の発現がげっ歯動物の発育中に低下したり (Bean R, Seckl JR, Lathe R, Martin C 2001 Ontogeny of the neurosteroid enzyme Cyp7b in the mouse. *Mol Cell Endocrinol* 174: 137-144)、ストレスとアルツハイマー病によっても変わること示しており (Graham M, Noble J, Andrew R, Rasmuson S, Olsson T, Seckl J, Yau J 2000 Regulation of Cyp7b expression during stress and ageing in rats and Alzheimer's disease in humans. *Eur J Neuroscience* 12: p184.01 (Abstract)、Yau J, Rasmuson S, Andrew R, Graham M, Noble J, Olsson T, Fuchs E, Lathe R, Seckl J R Dehydroepiandrosterone 7-hydroxylase CYP7B: predominant expression in primate hippocampus and reduced expression in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, in press.)、C Y P 7 B の発現は環境シグナルに反応し、少なくとも脳での老化中に変化することを示唆する。前立腺 C Y P 7 B の減量は選択的 E R α アゴニストの合成を減少させることで、エストロゲン経路よりもアンドロゲン経路に有利であるように、エストロゲンとアンドロゲンとの間のバランスを変える。それに付随して、C Y P 7 B の発現の低下は、強力なアンドロゲンの合成にとって前立腺内のネイティブ D H E A の利用可能性を増す。ヒト前立腺上皮と全前立腺に関し E R α に結合する 7 H D の正確な効果は、未だ知られていない。骨組織に示されるように、E R α に対して果たす役割の一つとしては、E R α を介する遺伝子転写をモジュレートすることである (Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Ohlsson C 2003 Estrogen receptor (ER)-reduces ER α -regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ER α and ER β in mice. *Mol Endocrinol* 17:203-208)。レポーター遺伝子アッセイは、E R β が E R α の転写活性を抑制する能力のあることを証明した (Hall JM, McDonnell DP 1999 The estrogen receptor β -isoform (ER β) of the human estrogen receptor modulates ER α transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140 :5566-5578)。7 H D は E R α への結合により、間質区画における E R α 活性をモジュレートすることができ、それにより間質細胞の発育をコントロールできる。また、E R α は前立腺発癌およびアンドロゲン依存性腫瘍発育の両者の初期相のモジュレートに加えて、前立腺細胞の分化と増殖において役割を果たすことが示唆される (Signoretti S, Loda M 2001 Estrogen receptor beta in prostate cancer: brake pedal or accelerator? *Am J Pathol* 159 :13-1)。このように、C Y P 7 B は活性ステロイドの前立腺内濃度の制御において重要な役割を果たし、前立腺疾患の予防または臨床治療において有用なツールとなる。

【 0 0 6 8 】

結論として、C Y P 7 B はヒト乳房と前立腺の両者において高度に発現する。さらに、C Y P 7 B m R N A は乳癌および前立腺癌に特異に発現し、C Y P 7 B が性ステロイド感受性癌組織において重要な役割のあることを示唆する。C Y P 7 B 測定は腫瘍の病期分類および治療の手引きにおける診断または予後において有効である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 6 9 】

【 図 1 】 D H E A のステロイド経路を示す模式図。 図中 3 β H S D、3 α ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ；17 β H S D、17 α ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ；7 H D、7 α ヒドロキシ D H E A；A / エンジオン、5 α アンドロステンジオン；A / エンジオール、5 α アンドロステンジオール；A / アンジオール、5 α アンドロスタンジオール；E₁、エストロン；E₂、17 β エストラジオールおよび D H T、5 α ジヒドロテストステロンを示す。

【 図 2 】 7 H D はヒト前立腺の薄片において D H E A から生成されることを示す図。(A) トリロスタン無し (レーン 1) または 1 μ M のトリロスタン (レーン 2) ; または 1 μ M のクロトリマゾール (レーン 3) ; または 1 μ M のクロトリマゾールプラス 1 μ M

10

20

30

40

50

のトリロスタン（レーン4）の存在下培地中24時間インキュベーション後ヒト前立腺小片におけるDHEA産物のTLC分析の図。（B）ヒト前立腺サンプル（n=2-7）による $[^{14}\text{C}]$ 7HD産生のタイムコースを示すグラフ。

【図3】ヒト前立腺におけるCYP7BmRNAのRT-PCR分析図。

【図4】CYP7BmRNAとERはヒト前立腺上皮において、ともに局在していることを示す顕微鏡写真。BPH切片におけるCYP7B（A）をコードするmRNA in-situハイブリダイゼーションおよびER（C）の免疫染色の代表的な高分解像。CYP7BmRNAに対する代表的な“センス”対照切片、およびERに対する対照切片（一次抗体のない）はそれぞれ（B）および（D）に示される。

【図5】CYP7Bは上皮細胞の初代培養において発現され、間質細胞との共培養によって増加することを示す図。（A）全ヒト前立腺（WP、レーン1）、初代間質細胞（St、レーン2）および上皮細胞（Ep、レーン3）におけるCYP7BmRNAのRT-PCRによる検出のための泳動図。Mは分子量マーカー。（B）間質細胞（St）、上皮細胞（Ep）の初代培養または上皮細胞と間質細胞の共培養（Ep+St）の $[^{14}\text{C}]$ DHEAとの24時間のインキュベーションにより生じた生成物のTLC分離を示す図。矢印は7HDを示す。（C）上皮細胞（Ep）、間質細胞（St）および上皮細胞または間質細胞の共培養による24時間でのDHEAからの $[^{14}\text{C}]$ 7HDの生成量を示すグラフ。*、 $p < 0.001$ 、Ep対St+Ep。

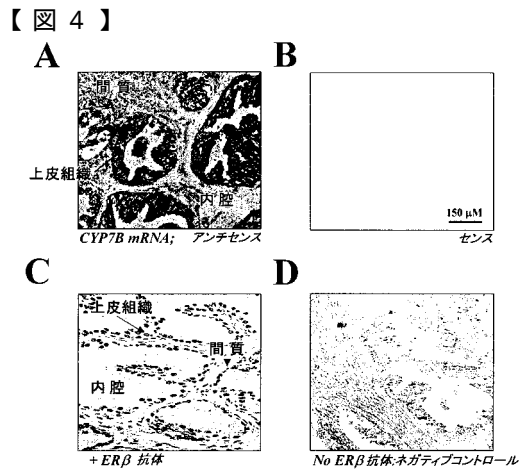
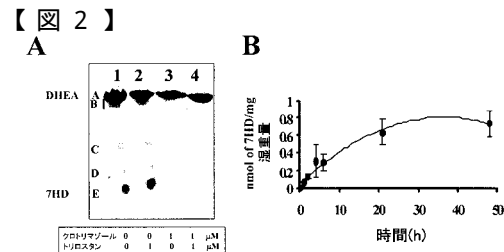
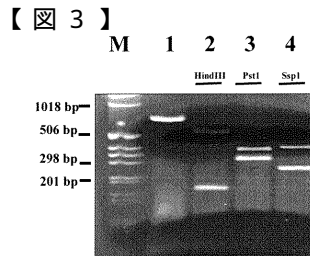
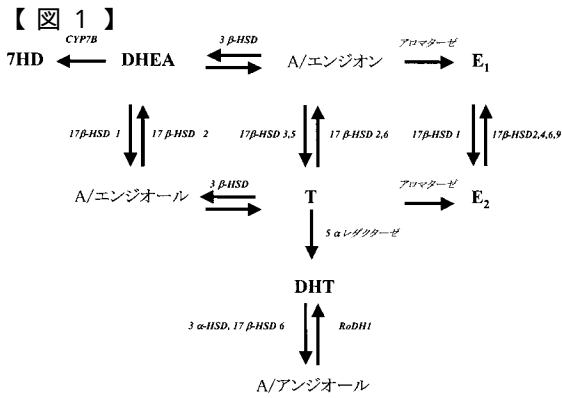
【図6】7HDによるER（A、B）、ER（C）およびアンドロゲン受容体（AR:D）のトランスアクチベーションを示すグラフ。示された数値はそれぞれ3回行なわれた3~5個の独立した実験の平均である。（A）と（B）はHepG2細胞におけるERによる（ERE）TK-Lucのトランスアクチベーション、（C）はCOS細胞におけるERによる（ERE）TK-Lucのトランスアクチベーションおよび（D）はhARを含むCOS1細胞におけるPSA-Lucレポーターコンストラクトのトランスアクチベーション。データは20nMの E_2 （hER；対照と比較してx4倍の誘導；AとB）、10nMの E_2 （mER；対照と比較してx7倍の誘発量；C）および10nMのDHT（hAR；対照と比較してx17倍の誘発量）で得られた最大誘発量の百分率として表す。*、 $p < 0.001$ ；、 $p < 0.05$ ；7HD対7HD無しの対照；、 $p < 0.01$ 、 E_2 対7HD+ E_2 。

【図7】in vitroで合成されたER蛋白に結合する $[3\text{H}]$ E_2 に対する7HDによる競合割合を示すグラフ。ER蛋白を含む網状赤血球分解物は5nMの $[3\text{H}]$ E_2 および指示された倍率の過剰の7HDで16時間平衡に達した。データは7HD（0-250 μM ）の存在下、結合した $[3\text{H}]$ E_2 を表す。7HD無しでの $[3\text{H}]$ E_2 結合を100%と設定した。*、 $p < 0.001$ および、 $p < 0.01$ ；7HD対7HD無しの対照。

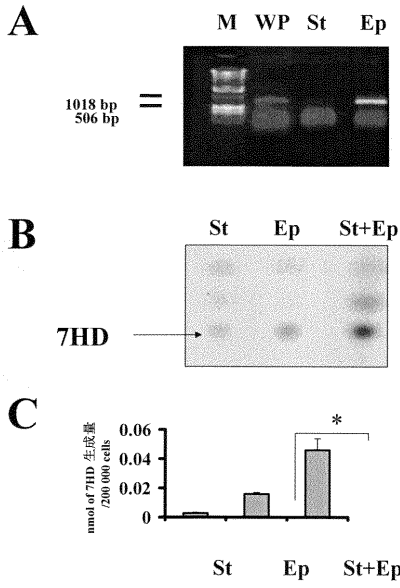
【図8】ヒト乳房においてCYP7Bが発現されることを示す泳動図。ヒト乳房におけるCYP7Bの発現を立証するために、4個の異なるヒト乳房サンプル由来のRNAについてRT-PCRを行なった：正常組織の1サンプルおよびエストロゲン受容体陽性（ER+）またはエストロゲン受容体陰性（ER-）の乳癌の3サンプル。ヒト前立腺（BPH）由来の全RNAをPCRに対するポジティブコントロールとして用い、cDNAの水による置換を汚染を調べるためのネガティブコントロールとして用いた。CYP7B特異的プライマーは水を除いた全サンプルにおいて期待された696bp断片を増幅した（図1を参照）。ヒト乳房サンプルにおけるCYP7BmRNAの濃度は高いが、乳癌サンプルの1つは他のサンプルよりもCYP7BmRNA濃度ははるかに低く、このことは乳癌においてCYP7Bの発現が異なることを示唆する。乳癌において前駆体の性ステロイド代謝/活性化の濃度が変動しやすいことを意味する。このことは診断/予後テストの開発を可能にする。レーン2：対照の正常乳房組織（0.2 μg ）；レーン3：エストロゲン受容体陽性（ER+）腫瘍（0.2 μg ）；レーン4：もう一つのER+腫瘍（0.2 μg ）；レーン5：ER陰性腫瘍（0.2 μg ）。レーン1：ヒト前立腺由来のポジティブコントロールRNA（1 μg ）；レーン6：ネガティブコントロールの水。注；ER+およびER-乳癌におけるCYP7BmRNAの明確な発現。

【図9】乳房組織と乳癌におけるCYP7B mRNAの発現を示すグラフ。乳癌におけるCYP7B mRNA発現の変化を検出するためにリアルタイムPCRを用いた。標準法によってランダムプライマーおよびOmni s c r i p t 逆転写キット (Qiagen社) を用いて全RNAの0.2 μg (乳房) から最初のストランドcDNAを産生させた。それから内部標準 (いずれもApplied Biosystems) としてGAPDHに対するTaqmanプライマーに加えてヒトCYP7B (Hs00191385_ml) に対するTaqman Master MixおよびTaqman特異的プライマーを用いてリアルタイムRT-PCRの鑄型としてcDNA反応 (0.2 μl) を用いた。各サンプルのCYP7B mRNA発現濃度を施設管理 (不変の) 転写物としてGAPDH mRNAと比較した。リアルタイムPCRのデータを分析し、 $p < 0.05$ が有意と考えられた。CYP7B mRNA発現は正常乳房組織の対照と比べてER+およびER-の両腫瘍の乳癌においてダウンレギュレートしていた。アロマターゼ阻害剤による2週間の乳癌治療はCYP7B mRNAを変えなかった。CYP7B mRNAは無傷の乳房におけるよりたとえ低濃度でも乳癌で発現していることをデータは示している。CYP7B mRNAは明らかに正常な乳房組織において検出され、乳癌においては有意に低い濃度で検出された。乳癌におけるCYP7B mRNAの発現は変動し、エストロゲン受容体 (ER) の状態と関係はなかった。CYP7B mRNAはアロマターゼ阻害剤 (AR Inh) による2週間の治療によって変わらなかった、* $p < 0.005$ 。

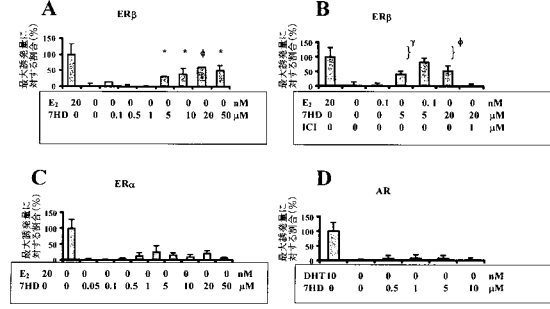
10



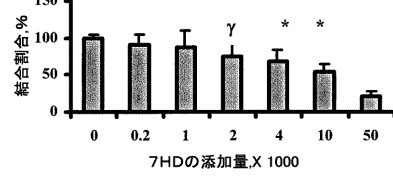
【 図 5 】



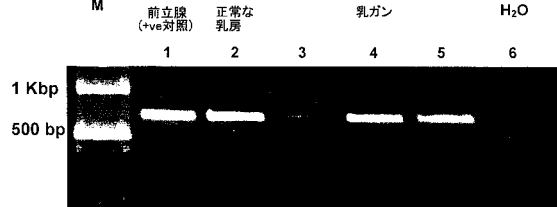
【 図 6 】



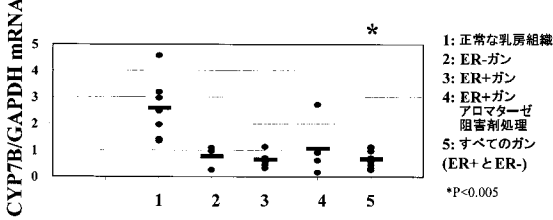
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/GB2005/000648
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K31/57 A61K31/565 A61K38/46 G01N33/50 A61P35/00		
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) IPC 7 A61K G01N A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, PAJ, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	MARTIN CECILE ET AL: "CYP7B generates a selective estrogen receptor beta agonist in human prostate" JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM, vol. 89, no. 6, June 2004 (2004-06), pages 2928-2935, XP009047604 ISSN: 0021-972X the whole document ----- -/--	1-46
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 13 May 2005		Date of mailing of the international search report 23/05/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fayos, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP2005/000648

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARTIN CECILE ET AL: "cyp7b1 catalyses the 7alpha-hydroxylation of dehydroepiandrosterone and 25-hydroxycholesterol in rat prostate" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 355, no. 2, 15 April 2001 (2001-04-15), pages 509-515, XP009047575 ISSN: 0264-6021 abstract	26, 30, 34-36, 39-41, 45
Y	the whole document	1-46
X	ZHANG WEIHUA ET AL: "An endocrine pathway in the prostate, ERbeta, AR, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol, and CYP7B1, regulates prostate growth" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 99, no. 21, 15 October 2002 (2002-10-15), pages 13589-13594, XP001205755 ISSN: 0027-8424 abstract figure 1	1-3
Y	the whole document	1-46
X	US 5 763 433 A (MORFIN ET AL) 9 June 1998 (1998-06-09) column 4, line 38 - line 48 example I claims 6,25	1-7, 17, 46 1-46
A	WO 97/37664 A (BRITISH TECHNOLOGY GROUP LTD; LATHE, RICHARD; ROSE, KENNETH, ANDREW; S) 16 October 1997 (1997-10-16) claims 1-33 page 3, line 25 - page 4, line 7 page 10, line 25 - page 11, line 3; examples 4-6	1-25 26, 34-36, 40-42 26-45
P,Y	KIM S B ET AL: "The human cytochrome P4507B1: catalytic activity studies" JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE LTD., OXFORD, GB, vol. 92, no. 5, December 2004 (2004-12), pages 383-389, XP004742877 ISSN: 0960-0760 page 388, column 1, paragraph 2	1-46
A	US 4 011 314 A (PETZOLDT ET AL) 8 March 1977 (1977-03-08) the whole document	1-46

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC/JB2005/000648

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2001/041696 A1 (DRAY FERNAND) 15 November 2001 (2001-11-15) the whole document -----	1-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int'l Application No
 PCT/GB2005/000648

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5763433	A	09-06-1998	FR 2696934 A1 22-04-1994
			AT 241990 T 15-06-2003
			CA 2147352 A1 28-04-1994
			DE 69333023 D1 10-07-2003
			DE 69333023 T2 06-05-2004
			EP 0665752 A1 09-08-1995
			ES 2201063 T3 16-03-2004
			WO 9408588 A1 28-04-1994
			JP 8505124 T 04-06-1996
			JP 8505124 T 04-06-1996
WO 9737664	A	16-10-1997	AU 716503 B2 24-02-2000
			AU 2302197 A 29-10-1997
			CA 2250874 A1 16-10-1997
			EP 0954317 A2 10-11-1999
			WO 9737664 A2 16-10-1997
			JP 2000511404 T 05-09-2000
			NZ 331975 A 22-12-2000
			US 6420353 B1 16-07-2002
			ZA 9703013 A 09-10-1998
			ZA 9703013 A 09-10-1998
US 4011314	A	08-03-1977	DE 2449327 A1 22-04-1976
			DE 2535997 A1 24-02-1977
			AT 348695 B 26-02-1979
			AT 775475 A 15-07-1978
			AT 357706 B 25-07-1980
			AT 909877 A 15-12-1979
			AU 8571075 A 21-04-1977
			BE 834489 A1 14-04-1976
			CA 1054143 A1 08-05-1979
			CH 619268 A5 15-09-1980
			CH 619240 A5 15-09-1980
			CS 205009 B2 30-04-1981
			CS 205010 B2 30-04-1981
			DD 125588 A5 04-05-1977
			DK 439975 A ,B, 15-04-1976
			ES 441784 A1 01-04-1977
			FI 752836 A ,B, 15-04-1976
			FR 2287908 A1 14-05-1976
			GB 1528796 A 18-10-1978
			HU 176715 B 28-04-1981
			IE 42167 B1 18-06-1980
			IL 48276 A 12-03-1979
			JP 51065747 A 07-06-1976
			NL 7512041 A 20-04-1976
			NO 753455 A ,B, 20-04-1976
			NZ 178886 A 28-04-1978
			PH 13802 A 01-10-1980
			PL 101461 B1 30-12-1978
			PL 103989 B1 31-07-1979
			SE 405254 B 27-11-1978
			SE 7511438 A 15-04-1976
			SU 676170 A3 25-07-1979
			SU 677666 A3 30-11-1981
			YU 243975 A1 30-06-1982
			YU 294281 A1 30-06-1982
			ZA 7506487 A 23-02-1977
ZA 7506487 A 23-02-1977			
US 2001041696	A1	15-11-2001	FR 2760362 A1 11-09-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB2005/000648

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2001041696	A1	AU 6840298 A	29-09-1998
		DE 69807454 D1	02-10-2002
		DE 69807454 T2	17-04-2003
		EP 0973524 A1	26-01-2000
		ES 2183341 T3	16-03-2003
		WO 9840074 A1	17-09-1998
		JP 2001515488 T	18-09-2001
		US 2002165214 A1	07-11-2002

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 13/08	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 セクル・ジョナサン・アール

イギリス国, エディンバラ EH4 2XU, エンドクリノロジー・ユニット・モレキュラー・メ
ディスン・センター・ウエスタン・ジェネラル・ホスピタル, ユニバーシティ・オブ・エディンバ
ラ

(72) 発明者 マーチン・セシル・パスカル

イギリス国, エディンバラ EH4 2XU, エンドクリノロジー・ユニット・モレキュラー・メ
ディスン・センター・ウエスタン・ジェネラル・ホスピタル, ユニバーシティ・オブ・エディンバ
ラ

F ターム(参考) 2G045 AA40

4C084 AA02 AA17 BA44 DC01 NA05 ZB262 ZC102 ZC112

专利名称(译)	使用ERβ调节剂		
公开(公告)号	JP2007524692A	公开(公告)日	2007-08-30
申请号	JP2006553684	申请日	2005-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	爱丁堡大学		
申请(专利权)人(译)	爱丁堡大学的大学院		
[标]发明人	セクルジヨナサンアール マーチンセシルパスカル		
发明人	セクル・ジヨナサン・アール マーチン・セシル・パスカル		
IPC分类号	A61K45/00 A61P35/00 A61K38/46 A61P5/24 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 A61P13/08 A61K31/565 A61K31/57 G01N33/74		
CPC分类号	A61K31/565 A61K31/57 A61K38/44 A61P13/08 C12Y114/1306 C12Y114/131 G01N33/5011 G01N33/743 G01N2333/723		
FI分类号	A61K45/00 A61P35/00 A61K37/54 A61P5/24 G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z A61P13/08		
F-TERM分类号	2G045/AA40 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DC01 4C084/NA05 4C084/ZB262 4C084/ZC102 4C084/ZC112		
代理人(译)	大家 邦久 林淳		
优先权	2004003889 2004-02-21 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及ERbeta调节剂在制备用于预防和/或治疗激素依赖性癌症和其它增殖性疾病以及诊断激素依赖性癌症和其它增殖性疾病的药物中的用途。本发明还教导了一种筛选用于预防和/或治疗激素依赖性癌症和其它增殖性疾病的药剂的方法。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公表特許公報(A)	(11) 特許出願公表番号 特表2007-524692 (P2007-524692A) (43) 公表日 平成19年8月30日(2007.8.30)
(51) Int. Cl.	FI	テーマコード(参考)
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	2G045
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	4C084
A61K 38/46 (2006.01)	A61K 37/54	
A61P 5/24 (2006.01)	A61P 5/24	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	D
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号 特願2006-553684 (P2006-553684)	(71) 出願人 505066349	
(86) (22) 出願日 平成17年2月21日(2005.2.21)	ユニバーシティ・コート・オブ・ザ・ユニバーシティ・オブ・エディンバラ	
(86) 国際出願提出日 平成18年10月18日(2006.10.18)	イギリス国, エディンバラ, EH8 9Y L, サウス・ブリッジ, オールド・カレッジ	
(86) 国際出願番号 PCT/GB2005/000648		
(87) 国際公開番号 W02005/078810		
(87) 国際公開日 平成17年9月1日(2005.9.1)		
(31) 優先権主張番号 0403889.9	(74) 代理人 100081086	
(32) 優先日 平成16年2月21日(2004.2.21)	弁理士 大家 邦久	
(33) 優先権主張国 英国 (GB)	100121050	
	弁理士 林 篤史	