

(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
2010 年 5 月 14 日(14.05.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/053199 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01) C12R 1/91 (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2009/069134

(22) 国際出願日: 2009 年 11 月 10 日(10.11.2009)

(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:
61/112,836 2008 年 11 月 10 日(10.11.2008) US

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人日本大学(NIHON UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 日臺 智明 (HIDAI Chiaki) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

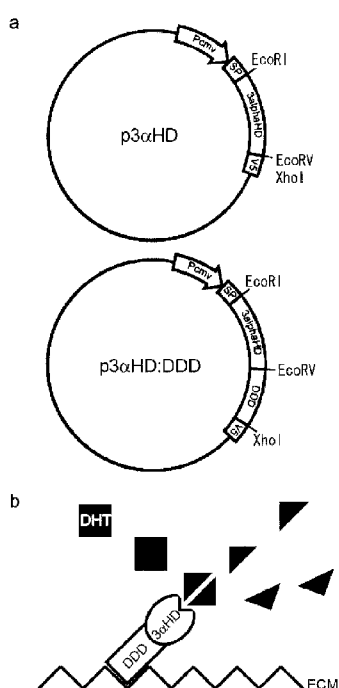
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, 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, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING PROSTATE CANCER, AND METHOD FOR TREATING PROSTATE CANCER

(54) 発明の名称: 前立腺癌の治療用医薬組成物及び前立腺癌の治療方法

[図1]



(57) Abstract: Disclosed is a pharmaceutical composition for treating prostate cancer, which can exhibit the therapeutic effect locally and therefore can produce no systemic adverse side effect, and can largely reduce physical or mental pain or distress in a patient. Also disclosed is a method for treating prostate cancer by using the composition. The pharmaceutical composition for treating prostate cancer comprises a gene which encodes a fusion protein composed of a domain which is derived from endothelial cell locus 1 protein and on which an extracellular matrix can be deposited and a testosterone-degrading enzyme.

(57) 要約: 局所的に治療効果を発揮させることにより、全身における副作用がなく、患者における物理的あるいは精神的苦痛を大きく低減させ得る、前立腺癌の治療用医薬組成物、及び当該組成物を用いた前立腺癌の治療方法を提供する。本発明の前立腺癌治療用医薬組成物は、内皮細胞遺伝子座-1 タンパク質由来の細胞外基質沈着ドメインと、テストステロン分解酵素との融合タンパク質をコードする遺伝子を含むものである。



(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, 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 (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, 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))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

前立腺癌の治療用医薬組成物及び前立腺癌の治療方法

技術分野

[0001] 本発明は、前立腺癌の治療用医薬組成物、及び前立腺癌の治療方法に関する。

背景技術

[0002] 前立腺癌の治療法としては、従来、外科手術や放射線療法とならんで、内分泌療法が行われている。この治療法は、前立腺癌細胞が男性ホルモン依存性に増殖することを利用した方法である。よって、女性ホルモンの投与、男性ホルモン（テストステロン）受容体拮抗薬の投与に加え、より完全に男性ホルモン作用を阻止するために男性ホルモンの産生部位である精巣の摘出が併用されることも多い。

しかしながら、内分泌療法治療薬は全身投与であるため、病巣に対して有効である一方、hot flash等の全身での副作用が出現する。また、単独の方法で内分泌療法を継続すると効果が低下し、再燃することも多い。さらに精巣の摘出は、癌とは別の心理的苦痛を患者に与えることになる。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0003] そこで、本発明が解決しようとする課題は、局所的に治療効果を発揮させることにより、全身における副作用がなく、患者における身体的あるいは精神的苦痛を大きく低減させ得る、前立腺癌の治療用医薬組成物、及び当該医薬組成物を用いた前立腺癌の治療方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0004] 本発明者は、上記課題を解決するべく鋭意検討を行った。その結果、内皮細胞遺伝子座-1（以下、Del-1）タンパク質由来の細胞外基質沈着ドメイン（以下、DDD）と、テストステロン分解酵素である 3α -ヒドロキシステロイドデヒ

ドロゲナーゼ (3α -hydroxysteroid dehydrogenase; 以下、 3α HD) との融合タンパク質をコードする組換えDNA (以下、 $p3\alpha$ HD:DDD) を作製し、それを細胞に遺伝子導入することにより、テストステロン分解活性のある細胞外基質 (以下、ECM) を産生させることに成功した。そして、当該細胞外基質に包まれた前立腺癌の癌組織やその周囲において、テストステロンを代謝させ、他臓器に影響することなく局所的に男性ホルモン濃度を低下させることにより、前立腺癌の治療効果を高めることができることを見出し、本発明を完成した。

[0005] 具体的には、テストステロン依存性の増殖するヒト前立腺癌細胞株LNCap由来の細胞 (以下、LNCap細胞) に 3α HD遺伝子を導入すると増殖速度は0.6倍に低下し、同細胞に 3α HD遺伝子にDDD遺伝子を組み合わせて導入すると (すなわち、 3α HDとDDDとの融合タンパク質をコードする遺伝子を導入すると) 増殖速度は0.4倍に抑制された。 3α HD遺伝子とDDD遺伝子を組合せて導入された細胞が産生した細胞外基質は、培養液交換後にもテストステロン代謝作用を維持しており、LNCap細胞の増殖を抑制することができた。これらの結果から、 3α HD遺伝子とDDD遺伝子との組換えDNA、及び当該DNAから産生される 3α HDとDDDとの融合タンパク質は、前立腺癌の新たな治療薬及び治療方法に用いることができる点で、極めて有用なものである。

また、本発明の治療方法と従来の内分泌療法とを併用することで、患者への過度の負担を軽減しつつ、内分泌療法の治療効果を高めることもできる。

[0006] すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 内皮細胞遺伝子座-1タンパク質 (Del-1) 由来の細胞外基質沈着ドメイン (DDD) と、テストステロン分解酵素との融合タンパク質をコードする遺伝子を含む、前立腺癌治療用医薬組成物。

上記(1)の医薬組成物において、テストステロン分解酵素としては、例えば、 3α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (3α HD) が挙げられる。

上記(1)の医薬組成物において、上記融合タンパク質 (具体的には、DDDと 3α HDとの融合タンパク質) をコードする遺伝子としては、例えば、以下の(a)又は(b)のDNAを含む遺伝子が挙げられる。

(a) 配列番号7に示される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号7に示される塩基配列からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、かつ細胞外基質沈着活性及びテストステロン分解活性を有するタンパク質をコードするDNA。

[0007] (2) 上記(1)記載の医薬組成物を前立腺癌の患者に投与することを含む、前立腺癌の治療方法。

(3) 上記(1)記載の医薬組成物を含む、前立腺癌の治療用キット。

[0008] (4) 以下の(a)又は(b)のDNAを含む遺伝子。

(a) 配列番号7に示される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号7に示される塩基配列からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、かつ細胞外基質沈着活性及びテストステロン分解活性を有するタンパク質をコードするDNA。

[0009] (5) 以下の(a)又は(b)のタンパク質。

(a) 配列番号8に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(b) 配列番号8に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ細胞外基質沈着活性及びテストステロン分解活性を有するタンパク質。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、局所的に治療効果を発揮させることにより、全身における副作用がなく、患者における物理的あるいは精神的苦痛を大きく低減させることができる、前立腺癌の治療用医薬組成物、及び当該医薬組成物を用いた前立腺癌の治療方法等を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本実施例に用いたプラスミドDNA等の概略図である。 a: 遺伝子導入のために構築したプラスミドDNAの概略図である。 サイトメガロウィルスのプロモーター領域(Pcmv)、シグナルペプチドのcDNA (SP)、3 α HDのcDNA (3 α lpha

HD) 及びDDDのcDNAを、pcDNA3Dベクター (Invitrogen) に組み込んだ。 b : 遺伝子導入実験の概要を示す図である。DDDは長方形で表し、 3α HDは楕円で表した。黒塗りの四角は、 3α HDの作用を受ける前のDHTを表し、黒塗りの三角は、 3α HDの作用を受けたDHTを表す。鋸歯状の線は、細胞外基質 (ECM) を表す。

[図2]細胞を用いた酵素作用の検出結果を示す図である。 a : LNCap細胞のDHT依存性増殖の結果を示す図である。結果は、平均±標準誤差で表した (実験回数は6回)。 b : ウェスタンブロットによる、培養液 (Medi)、細胞 (Cell) 及びECMに含まれる、組換えタンパク質の検出結果を示す図である。

[0012] [図3] 3α HDによるLNCap細胞の増殖抑制の結果を示す図である。 a : LNCap細胞の増殖をp 3α HDかp 3α HD:DDDの導入後に評価した結果を示す図である。 β ガラクトシダーゼのcDNAを遺伝子導入効率の指標 (control) として同時に導入した。 b : LNCap細胞の増殖を、導入する遺伝子量を変えて評価した結果を示す図である。白抜きのグラフ (cell number) はLNCap細胞の数を示し、黒塗りのグラフ (β -gal) は導入効率の指標 (control) としての β ガラクトシダーゼ活性を示す。結果は、平均±標準誤差で表した (実験回数は6回)。 $p < 0.01$ をもって有意差がある (**) とした。

[図4]DDDによって 3α HDをECMに結合させた効果を示す図である。 a : p 3α HD:DDDの遺伝子導入により作製したECM上ではLNCap細胞の増殖が抑制されたことを示す図である。 b : p 3α HD:DDDの遺伝子導入により作製したECMが血清中のDHTを減少させたことを示す図である。 c : p 3α HD:DDDの遺伝子導入により作製したECMの効果がDHTの添加により打ち消されたことを示す図である。結果は、平均±標準誤差で表した (実験回数は6回)。 $p < 0.01$ をもって有意差がある (**) とした。

発明を実施するための最良の形態

[0013] 以下、本発明について詳しく説明するが、本発明の範囲はこれらの説明に拘束されることはなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更し実施し得る。

なお、本明細書は、本願優先権主張の基礎となる米国仮出願 61/112,836号明細書（2008年11月10日出願）の全体を包含する。また、本明細書において引用された全ての刊行物、例えば先行技術文献、及び公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込まれる。

[0014] 1. 本発明の概要

遺伝子治療において治療効果を改善し副作用を下げるためには、DNAから産生されるタンパク質を標的の組織に効率的に分布させる技術の開発が求められる。本発明者は、細胞外基質沈着タンパク質である内皮細胞遺伝子座-1 (Del-1) タンパク質が、当該Del-1中の細胞外基質沈着ドメイン(DDD)を介して細胞外基質(ECM)に結合することを報告した。本発明においては、目的のタンパク質とDDDとの融合タンパク質を作製することで、当該目的タンパク質を、その機能を損なうことなく、ECMに固相化できることを示した。ヒト前立腺癌由来の細胞株LNCap細胞は、男性ホルモン依存性に増殖する。このLNCap細胞と、ジヒドロテストステロン(以下、DHT)を異化する 3α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3α HD)とを用いて研究した。 3α HDとDDDとの融合タンパク質をコードするcDNA (p 3α HD:DDD) を作製して細胞に導入した。ECMに結合した 3α HDの効果は、LNCap細胞の増殖とDHTの濃度を測定して評価した。その結果、DDDは酵素タンパク質の機能を保った状態でECMに固相化できることが解った。

[0015] マウスのDel-1は、主に胎児の血管内皮細胞と肥大型軟骨細胞が分泌する細胞外基質沈着タンパク質である[Hidai C et al. Cloning and characterization of developmental endothelial locus-1: an embryonic endothelial cell protein that binds the α v β 3 integrin receptor. Genes Dev (1998) 12:21.]. Del-1は、3つのEGFドメイン (E1、E2、E3) と2つのジスコインタンパク質 (C1、C2) から構成される。本発明者は、C1のC末端側がDel-1のECMへの沈着に必須であること、またC1のN末端とE3の存在がC1の機能を増強することを報告した[Hidai C et al. Discoidin domain of Del-1 protein contributes to its deposition in the extracellular matrix. Cell Tiss

ue Res (2007) 330:83.]. 本発明者は、G1のC末端側をDel-1 deposition domain (DDD)と呼ぶことにした。DDDとalkaline phosphatase (AP)の融合タンパク質はAPの発色反応を通して、APのECMへの沈着を評価することができる。

[0016] 疾病治療においては、治療物質を標的組織に集めることで、組織での濃度を高めることができる。それによって治療効果を高め、他の組織への分布を防ぎ、副作用を抑止することができる。本発明の目的は、目的の酵素タンパク質にDDDを付加（融合）し、酵素活性を損なうことなくECMに固相化することである。理論上、酵素はその活性を保持すると考えられるが、細胞とECMの間の空間は単なる空洞ではないため、その部分で融合タンパク質が実際に細胞に対して機能するかどうかを確認する必要があった。

[0017] 本発明者は、LNCap細胞を用いて酵素活性を評価する方法を試みた。LNCap細胞は、ヒト前立腺癌由来の細胞株であり、男性ホルモン依存性に増殖する[Horoszewicz JS et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. Cancer Res (1983) 43:1809.; van Bokhoven A et al. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. Prostate (2003) 57:205.]. DHTを 5α -androstane- 3α , 17β -diolに異化する酵素である 3α HDを、ECMに固相化するために、 3α HDにDDDを付加（融合）し[Penning TM et al. Human 3α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. Biochem J (2000) 351:67.], 組み換え 3α HDのN末端にシグナルペプチドを付加して、融合タンパク質が細胞外に分泌されるようにした(図1a、図1b)。その結果、DDDを融合した 3α HDタンパク質は、ECMに局在し、そのECMはLNCap細胞の増殖を抑制することができた。

[0018] 多くの前立腺癌がテストステロン依存性に増殖する。本発明においては、テストステロンを代謝する酵素 3α -hydroxysteroid dehydrogenase (3α HD)とDel-1由来の細胞外基質沈着ドメイン(DDD)との融合タンパク質のための組換えDNA (p 3α HD:DDD)を作製し、それを細胞に遺伝子導入することにより、

テストステロン分解活性のある細胞外基質 (ECM) を作製することに成功した。こうして作製されたECMは、培養液中のテストステロンを代謝し、当該ECM上のLNCap細胞の増殖を抑制した。

[0019] 2. 本発明の医薬組成物及び治療方法

2.1 医薬組成物

本発明の医薬組成物は、内皮細胞遺伝子座-1 (Del-1) タンパク質由来の細胞外基質沈着ドメイン (DDD) と、テストステロン分解酵素との融合タンパク質をコードする遺伝子を含むことを特徴とする、前立腺癌の治療用医薬組成物であり、いわゆる遺伝子治療剤として用いることができるものである。

ここで、上記細胞外基質沈着ドメイン (DDD) としては、限定はされないが、内皮細胞遺伝子座-1 (Del-1) タンパク質の全長アミノ酸配列 (配列番号2) 中の第122番目～第316番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列 (配列番号4) であることが好ましい。なお、DDDのアミノ酸配列をコードするDNAは、Del-1 タンパク質の全長アミノ酸配列をコードする塩基配列 (配列番号1) 中の第982番目～第1566番目の塩基からなる塩基配列 (配列番号3) であることが好ましい。

[0020] また、テストステロン分解酵素としては、テストステロンの分解活性 (代謝活性) を有する酵素タンパク質であればよく、限定はされないが、例えば、 3α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (3α HD) であることが好ましい。 3α HDのアミノ酸配列及び当該アミノ酸配列をコードするDNAは、それぞれ、配列番号6及び配列番号5に示されるものである (GenBank Accession number: BAD18929, AB178898)。ただし、配列番号5に示される塩基配列中3' 末端の3塩基 (第970番目～第972番目の塩基) は、終止コドンであるため、DDDとの融合タンパク質をコードする遺伝子においては除かれた状態となる (配列番号7参照)。

[0021] 本発明において、DDDとテストステロン分解酵素 (具体的には 3α HD) との融合タンパク質をコードする遺伝子としては、限定はされないが、例えば、以下の(a)又は(b)のDNAを含む遺伝子が好ましい。

(a) 配列番号7に示される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号7に示される塩基配列からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、かつ細胞外基質沈着活性及びテストステロン分解活性を有するタンパク質をコードするDNA。

[0022] 配列番号7に示される塩基配列のうち、第1番目～第75番目の塩基からなる塩基配列は、Del-1タンパク質のシグナルペプチドをコードするDNA（すなわち配列番号1に示される塩基配列中の第619番目～第693番目の塩基からなる塩基配列）であり、第76番目～第1047番目の塩基からなる塩基配列は、3 α HDのアミノ酸配列をコードするDNAであり、第1048番目～第1629番目の塩基からなる塩基配列は、DDDのアミノ酸配列をコードするDNAである。

[0023] 上記(b)のDNAは、上記(a)のDNAの変異型のDNAに相当するものであるが、このような変異型DNAは、例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) 等に記載の部位特異的変位誘発法に準じて調製することができる。具体的には、Kunkel法や Gapped duplex法等の公知手法により、部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キットを用いて調製することができ、当該キットとしては、例えば、QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit（ストラタジーン社製）、GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System（インビトロジェン社製）、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System（Mutan-K、Mutan-Super Express Km等：タカラバイオ社製）等が好ましく挙げられる。また、変異型DNAは、所望のアミノ酸のコドンを示す塩基となるようにミスセンス変異が導入されるように設計したPCRプライマーを用い、上記(a)のDNA等をテンプレートとして、適当な条件下でPCRを行うことにより調製することもできる。PCRに用いるDNAポリメラーゼは、限定はされないが、正確性の高いDNAポリメラーゼであることが好ましく、例えば、Pwo DNAポリメラーゼ（ロシュ・ダイアグノスティックス）、Pfu DNAポリメラーゼ（プロメガ）、プラチナPfx DNAポリメ

ラーゼ（インビトロジェン）、KOD DNAポリメラーゼ（東洋紡）、KOD-plus-ポリメラーゼ（東洋紡）等が好ましい。PCRの反応条件は、用いるDNAポリメラーゼの最適温度、合成するDNAの長さや種類等により適宜設定すればよい。

[0024] また、上記(b)の変異型DNAは、上記(a)のDNA若しくはそれと相補的な塩基配列からなるDNA、又はこれらを断片化したものをプローブとして用い、コロニーハイブリダイゼーション、プラークハイブリダイゼーション、及びサザンブロット等の公知のハイブリダイゼーション法を実施し、cDNAライブラリーやゲノムライブラリーから得ることができる。ライブラリーは、公知の方法で作製されたものを利用してもよいし、市販のcDNAライブラリーやゲノムライブラリーを利用してもよく、限定はされない。ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等を適宜参照することができる。

[0025] 上記(b)の変異型DNAは、前述の通り、上記(a)のDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするDNAであるが、ここで、「ストリンジेंटな条件」とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄時の条件であって、例えば、バッファーの塩（ナトリウム）濃度が150～900mMであり、温度が55～75℃での条件、好ましくは塩（ナトリウム）濃度が150～200mMであり、温度が60～70℃での条件をいう。また、当該ハイブリダイズするDNAとしては、上記(a)のDNAの塩基配列に対して少なくとも40%以上、好ましくは約80%以上、81%以上、82%以上、83%以上、84%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、99.9%以上の相同性を有する塩基配列であることが好ましい。

[0026] 上記(b)の変異型DNAは、細胞外基質沈着活性及びテストステロン分解活性を有するタンパク質をコードするDNAであるが、ここで、細胞外基質沈着活

性とは、細胞外基質に結合する活性を意味する。細胞外基質沈着活性は、DNAにアルカリホスファターゼなどのマーカーをコードするDNAを連結し、これを所定の細胞（例えばcos7細胞、CHO細胞、NIH3T3細胞、LNCap細胞等）に導入して培養する。培養容器からその培養上清及び細胞を除去した後、培養容器に残った細胞外基質にアルカリホスファターゼの基質を加えて発色させ、沈着活性を測定する。細胞外基質に沈着すると、マーカー（アルカリホスファターゼ）を指標として結合活性を測定することができるとともに、結合位置を同定することができる。例えば、可溶性アルカリホスファターゼ基質を用いると、基質が発色（例えば、黄色等に発色）するため、特異的な波長での吸光度を測定することで容易に沈着活性を測定することができる。また、沈着性アルカリホスファターゼを用いると、沈着部位が発色（例えば、紫等）するため、顕微鏡観察等によりその沈着部位を容易に同定することができる。なお、マーカーはアルカリホスファターゼに限定されるものではなく、その他にも、GFPやその変異型、mycやHisなどのtag、GST蛋白、アイソトープ、ビオチン化蛋白などを用いることができる。また、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、 β ガラクトシダーゼなどのレポーター遺伝子を用いてアッセイすることも可能である。

[0027] また、テストステロン分解活性とは、テストステロンの生物学的活性を破壊する活性を意味し、当該活性は、例えば、テストステロン依存性に増殖する細胞を用いた増殖能の測定等により測定することができる。

[0028] また本発明において、DDDとテストステロン分解酵素（具体的には 3α HD）との融合タンパク質としては、限定はされないが、例えば、以下の(a)、(b)又は(c)のタンパク質が好ましい。

(a) 配列番号8に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(b) 配列番号8に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ細胞外基質沈着活性及びテストステロン分解活性を有するタンパク質。

(c) 配列番号8に示されるアミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ細胞外基質沈着活性及びテストステロン分解活性を有するタンパク質。

[0029] 配列番号8に示されるアミノ酸配列のうち、第1番目～第25番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は、Del-1タンパク質のシグナルペプチド部分（すなわち配列番号2に示されるアミノ酸配列中の第1番目～第25番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列）であり、第26番目～第349番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は、3 α HDのアミノ酸配列部分であり、第350番目～第543番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は、DDDのアミノ酸配列部分である。

[0030] 上記(b)のタンパク質は、において、「1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」としては、例えば、1個～10個程度、好ましくは1個～5個程度のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列であることが好ましい。上記欠失、置換、付加等の変異の導入は、部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット、例えばGeneTailor™Site-Directed Mutagenesis System（インビトロジェン社）、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System（Mutan-K、Mutan-Super Express Km等：タカラバイオ社製）を用いて行うことができる。

[0031] 上記(c)のタンパク質において、「80%以上の相同性を有するアミノ酸配列」としては、例えば、配列番号8で表されるアミノ酸配列に対して、約80%以上、81%以上、82%以上、83%以上、84%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、99.9%以上の相同性を有するアミノ酸配列であることが好ましい。当該相同性の数値は一般的に大きい程好ましい。

[0032] 上記(b)及び(c)のタンパク質において、細胞外基質沈着活性及びテストステロン分解活性に関する説明は、前述した上記(b)の変異型DNAにおける説明

が同様に適用できる。

[0033] 本発明の医薬組成物は、上記融合タンパク質をコードする遺伝子以外にも他の成分を適宜含むことができる。他の成分としては、当該医薬組成物の用法（使用形態）に応じて必要とされる製薬上の各種成分（薬学的に許容し得る各種担体等）が挙げられる。例えば、薬剤製造上一般に用いられる賦形剤、充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、潤滑剤、界面活性剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、無痛化剤、安定化剤、等張化剤等が挙げられる。

[0034] 遺伝子治療剤として用いられる本発明の医薬組成物は、注射により直接投与する方法のほか、上記融合タンパク質をコードする核酸（DNA等）を含む遺伝子が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。上記ベクターとしては、発現ベクターとして使用できる公知の各種プラスミドベクターを用いるほか、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター及びレンチウイルスベクター等のウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することもできる。なお、市販の遺伝子導入キット（例えば、製品名：アデノエクスプレス、クローンテック社製）を用いることもできる。本発明においては、当該融合タンパク質をコードする核酸（DNA等）を含む遺伝子が組込まれたベクター（組換えベクター）も包含される。さらに、本発明においては、当該組換えベクターを目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入して得ることができる形質転換体も包含される。宿主としては、本発明の遺伝子DNAを発現し得るものであれば限定されず、例えば、当該分野において周知の細菌、酵母、動物細胞等を用いることができる。

[0035] 本発明の医薬組成物の投与量は、一般には、製剤中の有効成分の配合割合を考慮した上で、投与対象（患者）の年齢、体重、病気の種類、病状のほか、投与経路、投与回数、投与期間等を勘案し、適宜、広範囲に設定することができる。例えば、成人患者に本発明の医薬組成物を投与する場合は、限定はされないが、患者の体重に対し、一日あたり $0.1 \mu\text{g/kg} \sim 1000\text{mg/kg}$ 程度で

あることが好ましく、より好ましくは $1\mu\text{g/kg}$ ～ 100mg/kg 程度である。

[0036] 2.2 治療方法

本発明の治療方法は、上記本発明の医薬組成物を前立腺癌の患者に投与することを特徴とする前立腺癌の治療方法である。また本発明は、前立腺癌を治療するための上記医薬組成物の使用、及び、前立腺癌の治療のための薬剤を製造するための上記医薬組成物の使用も含むものである。本発明の医薬組成物の投与量及び投与形態等については、前記2.1項で述べた通りである。

また、本発明の治療方法は、例えば、従来の内分泌療法と併用してもよい。当該内分泌療法は、患者の病状や副作用の程度、あるいは投与効果などを考慮し、適宜選択することができる。このように併用した場合は、患者への過度の負担を軽減しつつ、内分泌療法の治療効果を高めることも可能である。

[0037] 2.3 治療用キット

本発明においては、構成成分として、前述した本発明の遺伝子を含むことを特徴とする、前立腺癌の治療用キットも提供される。本発明のキットは、局所的に治療効果を発揮させることにより、全身における副作用がなく、患者における物理的あるいは精神的苦痛を大きく低減させることができるため、前立腺癌の治療の分野に限らず、各種実験及び研究等の分野においても極めて有用性が高いものである。

[0038] 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例 1

[0039] 1. 材料及び方法

<細胞培養と細胞増殖の評価>

LNCap細胞 (CRL-1740) とCos-7細胞 (CRL-1651) はATCCから購入し、 α -minimum essential medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) に10% 牛胎児血清 (Invitrogen) を加えて、5% CO_2 存在下に 37°C で培養した。LNCap細胞のDHT依存性を調べるため、24穴の培養皿に50%の密度に細胞を播き、 $300\mu\text{l}$ の無血清培養液

VP-SFM (Invitrogen)で培養した。培養液には種々の濃度のDHT (Wako, Osaka, Japan)を添加した。4日間の培養後に30 μ lのWST-1 (Takara, Otsu, Japan)を添加し、1時間培養して405nmの吸光度を測定した。実験は3回行った。

[0040] <プラスミドDNAの構築>

まず、Del-1のシグナルペプチド (MKHLVAAWLLVGLSLGVPQFGKGD I (配列番号9)) をコードするcDNAを適宜作製し、pcDNA3Dベクター (Invitrogen) に組み込んでpcDNA3Sを準備した。次に、ヒトの3 α HD遺伝子 (GenBank Accession number: AB178898) を、市販のヒトRNAを鋳型とし、下記のプライマーを用いてRT-PCRにより増幅した。

5' -AAGAATTCATGAACTCCAAATGTCATTGTGTCAT-3' (配列番号10)

5' -AAGATATCGTATTCATCCAAAAATGGCCAATTAG-3' (配列番号11)

[0041] 増幅したDNA断片をシグナルペプチドの3' 末端に挿入して、p3 α HD (図1a) を作製した。さらに、Del-1タンパク質由来の細胞外基質沈着ドメインであるDDD (Del-1のアミノ酸122-316) を、公知の方法 [Hidai C et al., Genes Dev (1998) 12:21.] に従い、下記のプライマーを用いて増幅した。

5' -AAGATATCTGTGAAGCTGAGCCTTGCAGAAAT-3' (配列番号12)

5' -AACTCGAGCATGTCCATGTTGAGTGTTCTGAA-3' (配列番号13)

増幅したDNA断片を3 α HD遺伝子の下流に挿入して、p3 α HD:DDD (図1a) を作製した。

これらのプラスミドによりコードされる組換えタンパク質は、C末端にpcDNA3D由来のV5タグがつくことになる。

[0042] <ウェスタンブロット>

ウェスタンブロットのためのECMのサンプルは、公知の方法 [Hidai C et al., Cell Tissue Res (2007) 330:83.] に従い、Cos-7細胞を6穴の培養皿に播き、pcDNA3S、p3 α HD、p3 α HD:DDDをそれぞれLipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて遺伝子導入することにより作製した。96時間後に培養液を回収し、EDTAを使って細胞を回収した。残ったECMはスクレーパーで回収した。それぞれのサンプルは10% trichloroacetic acid (Wako) で固定され、SDS-PAGEに

よる電気泳動後にPVDF膜(ATT0, Tokyo, Japan)に移された。抗V5抗体(Invitrogen)と反応後にECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham, Piscataway, NJ)を用いて検出した。

[0043] <外因性 3α HDの評価>

LNCap細胞は24穴の培養皿に50%に播き、Lipofectamine2000を使用して1 μ gのpcDNA3S、p3 α HD、p3 α HD:DDDをそれぞれ導入した。導入率を標準化するために0.1 μ gのLacZ遺伝子を同時に導入した。細胞数はWST-1 (Takara)を用いて計測し、LacZ遺伝子の発現量は β -galactosidase enzyme activity assay system (Promega, Madison, WI)を用いて計測した。pcDNA3Sを導入して得られた数値を1として表した。実験は3回行った。

[0044] <ECMの評価>

3α HDによって修飾されたECMは、公知の方法[Hidai C et al., Cell Tissue Res (2007) 330:83.]に従い、Cos細胞を24穴の培養皿に50%に播き、Lipofectamine2000を使用して1 μ gのpcDNA3S、p3 α HD、p3 α HD:DDDをそれぞれ導入することにより作製した。導入率を標準化するために、0.1 μ gのLacZ遺伝子を同時に導入した。4日後に培養液を10 mM EDTAをprotease inhibitor cocktail (PIERCE, Rockford, IL)を含むPBSで置換して、4°Cで12時間待った。ピペットを使って細胞を回収し、100 μ lのtris buffered saline (TBS)に再浮遊させた。超音波により細胞を壊し、セルライセートの β -galactosidase活性を測定した。残されたECMに1 $\times$ 10⁴個のLNCap細胞を播き、7日間培養した後、WST-1で細胞数を評価した。外因性のDHTの効果を見る時には、種々の量のDHT (Wako)を培養液中に添加した。pcDNA3Sを用いた実験結果を1として、他の結果を数値化した。実験は3回行った。

[0045] <DHTの測定>

3α HDにより修飾されたECMは上記のように作製した。日本大学医学部の倫理委員会の承認を得て健康な男性ボランティアから採血し、血清を分離した。得られた血清にprotease inhibitor cocktail (PIERCE)を加え、ECMと37°Cで96時間反応させた。血清中のDHT濃度をDihydrotestosterone ELISA kit

(IBL, Hamburg, Germany)を用いて測定した。pcDNA3Sを用いた実験結果を1として、他の結果を数値化した。実験は3回行った。

[0046] <統計処理>

結果は平均±標準誤差で表した。Dunn検定あるいはWilcoxon検定を行い、 $p < 0.01$ をもって有意(**)とした。

[0047] 2. 結果及び考察

LNCap細胞の男性ホルモン依存性を確認するため、細胞を無血清培地に様々な濃度のDHTを添加して培養した。これまでに報告されているように、LNCap細胞の増殖はDHTの添加に応じて濃度依存性に亢進した[Horoszewicz JS et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. Cancer Res (1983) 43:1809. ; van Bokhoven A et al. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. Prostate (2003) 57:205.] (図2a)。次に、 3α HDの組換えタンパク質の分布を調べた。陰性対照となるプラスミドpcDNA3SはシグナルペプチドのcDNAのみ発現するが、サイズが小さいのでゲル上には現れない(図2b)。p 3α HDとp 3α HD:DDDは予測された通り43 kDaと65 kDaのタンパク質を発現した(図2b)。p 3α HDに由来するタンパク質はECMには分布せず、培養液と細胞内で検出された。p 3α HD:DDDに由来するタンパク質はDDDを含むことから予測された通りECMで検出された。ウェスタンブロットの結果では、培養液内に含まれる 3α HD:DDDタンパク質量はECMより多かったが、培養液とECMの容量を考慮すると濃度についてはECMの方がはるかに高いと考えられた。DDDの存在によってタンパク質がECMに濃縮されたことが認められた。

[0048] 3α HDの組み換えタンパク質がLNCap細胞の増殖に何らかの影響を及ぼすか検討するため、LNCap細胞に遺伝子導入を行った。p 3α HDあるいはp 3α HD:DDDの遺伝子導入は培養6日後の評価で細胞増殖を抑制していることが判った(図3a)。遺伝子導入率は凡そ同じであることを確認するため、同時にLacZ遺伝子の導入を行い、 β -galactosidase活性を測定した。p 3α HD:DDDの遺伝子導入はp 3α HDより有効な傾向を示した(図3a)。

[0049] 細胞増殖抑制効果が遺伝子導入に使用するp 3α HDのDNA量依存するかどうか

実験を行った（図3b）。使用するDNAの量が増えるに従い、増殖抑制効果は増した。従って、p3 α HDの導入による増殖抑制は、遺伝子導入手技によるアーチファクトではなく、p3 α HDに特異的な効果であると考えられた。

DHTが減少するのは3 α HDを発現する細胞内であって、ECMでは機能していない可能性がある。そこで、細胞を取り除いた後に残るECMだけを用いて実験した（図4a）。遺伝子導入効率を標準化するため、 β -galactosidase活性を利用した。p3 α HDを導入された細胞が産生したECM上では、対照群と同様に細胞が増殖した。しかし、p3 α HD:DDDが導入された細胞の産生したECM上では、LNCap細胞の増殖は抑制された。

[0050] 上記の結果から考えられるメカニズムは、ECM内に含まれる3 α HDが培養液中のDHTの濃度を下げることにより、細胞の増殖が抑制されるというものである。このことを確認するため、血清中のDHTの濃度を測定した（図4b）。p3 α HD:DDDが遺伝子導入された細胞により産生されたECMと血清を96時間反応させることにより、DHT濃度は減少した。

p3 α HD:DDDの導入がDHTの減少を介して細胞増殖を抑制することを証明するため、外因性のDHTによりp3 α HD:DDDの効果が打ち消されるかどうかを確認した（図4c）。外因性のDHTの添加したところ、p3 α HD:DDDを使用したにも関わらず、LNCap細胞の増殖は維持された。

[0051] 本実施例においては、DDDが目的酵素をその活性を維持したままでECMに固相化することができ、DDDとの融合タンパク質に医学生物学的な効果が期待されることが示された。例えば、細胞療法においては、細胞に何らかの目的タンパク質とDDDとの融合タンパク質のcDNAを予め導入しておくことができる。DDDは種々の細胞のECMに沈着できるので、自由に細胞を選び、酵素の供給源として利用することができる。

[0052] また、DDD融合タンパク質のcDNAを組織特異的なプロモーターの支配下に置くことにより、細胞や組織を選んで遺伝子治療を行うことが可能である。この場合、全体のタンパク質発現量が少なくても、タンパク質がECMに沈着することにより十分な局所濃度を得ることができる。さらには、標的となる組織

に沈着する酵素によって活性化される薬剤を開発して、局所での効果を期待することもできる。

- [0053] 酵素だけでなく、FASリガンドのようなリガンドタンパク質もDDDのパートナーとして利用できる[EI0jeimy S et al. FasL gene therapy: a new therapeutic modality for head and neck cancer. Cancer Gene Ther (2006) 13: 739.]。通常、FASリガンドのような細胞障害性のあるタンパク質を強制発現させると、その細胞自身が障害を受けてしまい、タンパク質の発現はそれ以上起こらないが、目的タンパク質が細胞外基質に残存していれば、それにより治療効果が持続することも期待できる。

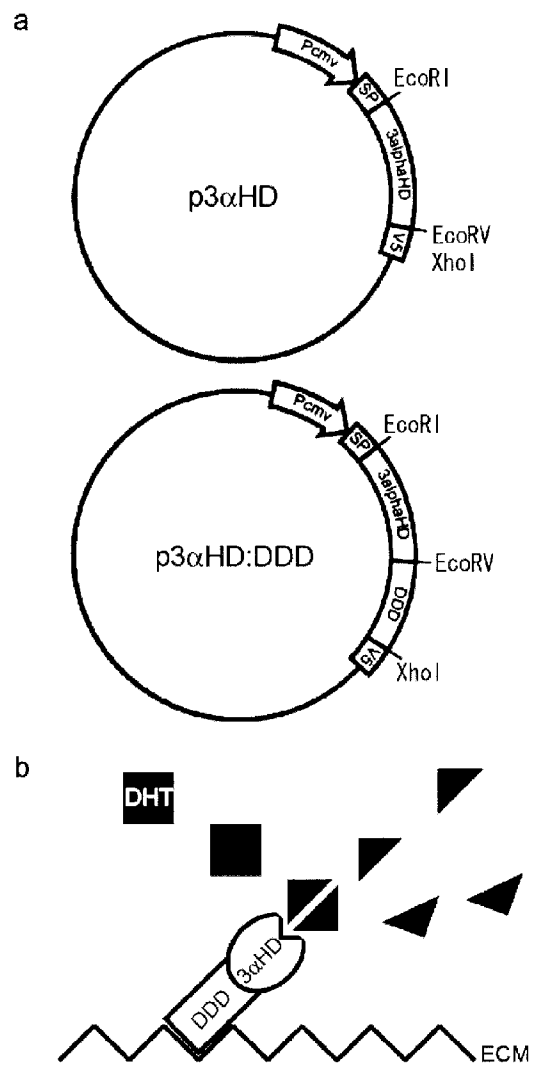
配列表フリーテキスト

- [0054] 配列番号7：組換えDNA
配列番号8：合成コンストラクト（組換えタンパク質）
配列番号10：合成DNA
配列番号11：合成DNA
配列番号12：合成DNA
配列番号13：合成DNA

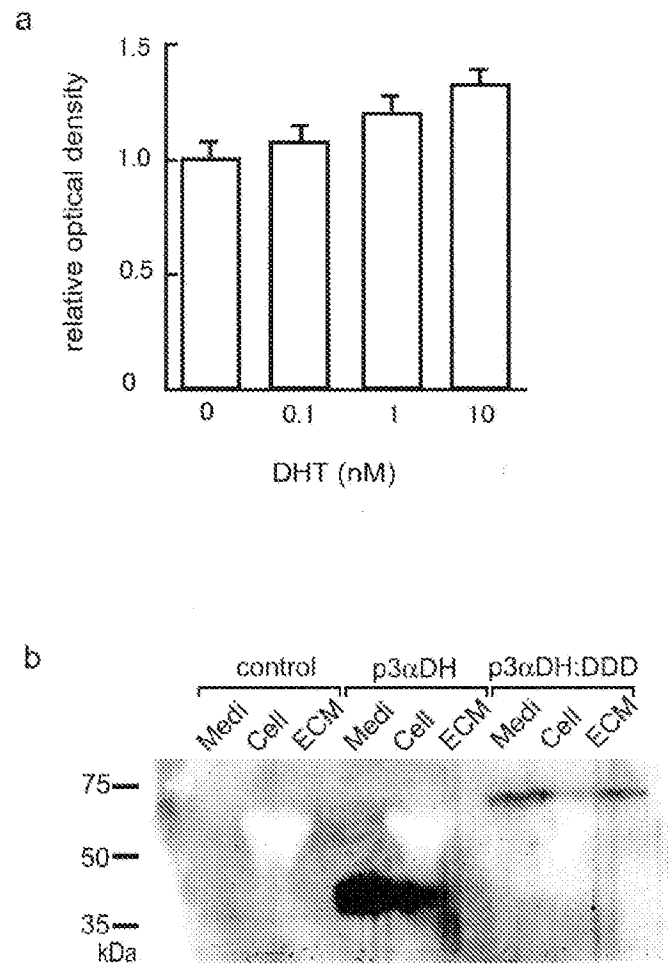
請求の範囲

- [請求項1] 内皮細胞遺伝子座-1タンパク質由来の細胞外基質沈着ドメインと、テストステロン分解酵素との融合タンパク質をコードする遺伝子を含む、前立腺癌治療用医薬組成物。
- [請求項2] 前記テストステロン分解酵素が、 3α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼである、請求項1記載の組成物。
- [請求項3] 前記融合タンパク質をコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)のDNAを含む遺伝子である、請求項1又は2記載の組成物。
- (a) 配列番号7に示される塩基配列からなるDNA
 - (b) 配列番号7に示される塩基配列からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、かつ細胞外基質沈着活性及びテストステロン分解活性を有するタンパク質をコードするDNA。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物を前立腺癌の患者に投与することを含む、前立腺癌の治療方法。
- [請求項5] 以下の(a)又は(b)のDNAを含む遺伝子。
- (a) 配列番号7に示される塩基配列からなるDNA
 - (b) 配列番号7に示される塩基配列からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、かつ細胞外基質沈着活性及びテストステロン分解活性を有するタンパク質をコードするDNA。
- [請求項6] 以下の(a)又は(b)のタンパク質。
- (a) 配列番号8に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。
 - (b) 配列番号8に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ細胞外基質沈着活性及びテストステロン分解活性を有するタンパク質。

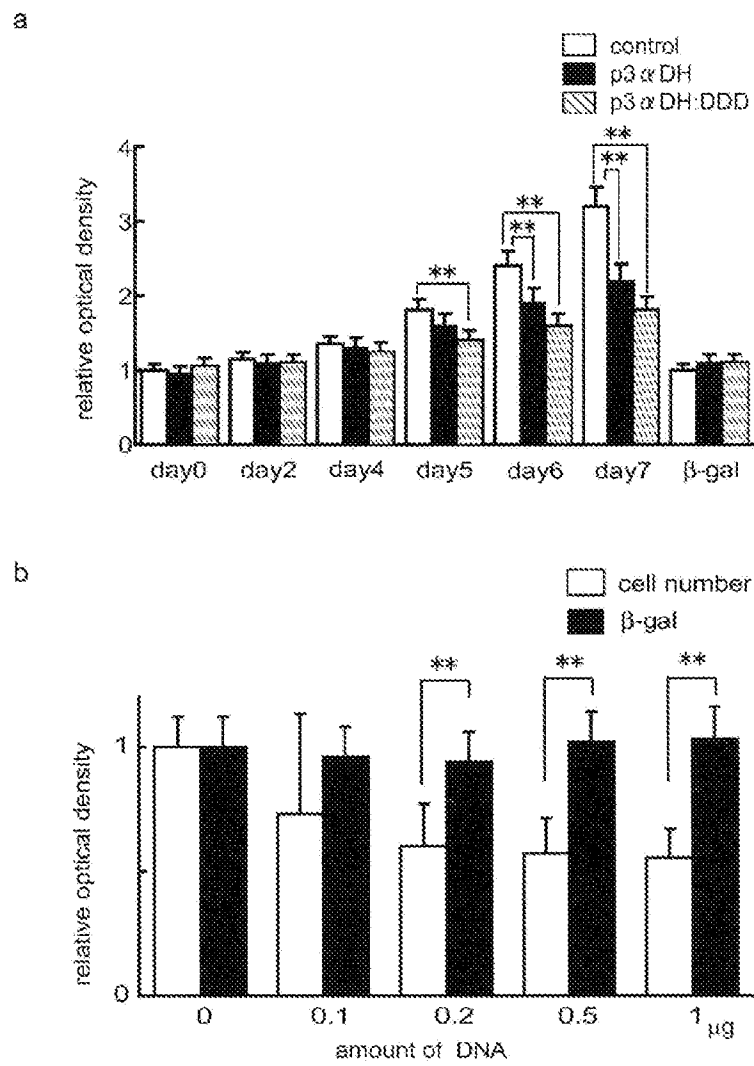
[図1]



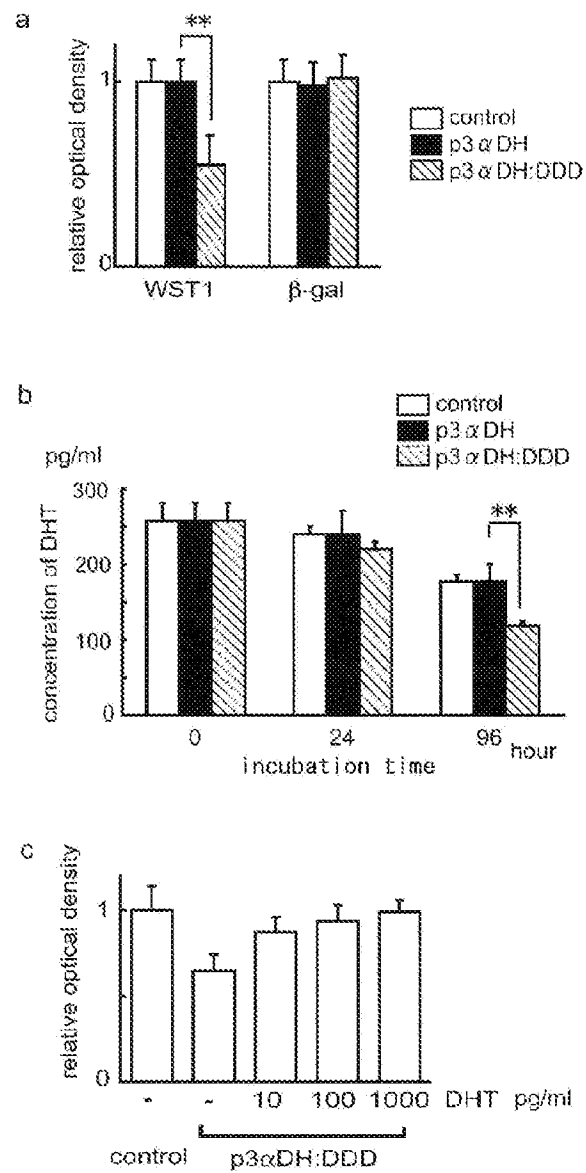
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/069134

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K48/00(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K38/04(2006.01)i, A61K38/43(2006.01)i, A61P13/08(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N9/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12R1/91(2006.01)n

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)

A61K48/00, A61K38/00, A61K38/04, A61K38/43, A61P13/08, A61P35/00, C12N9/04, C12N15/09, C12R1/91

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	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

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

CAP/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), 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.
Y	RIZNER, T.L. et al, Role of human type 3 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C2) in androgen metabolism of prostate cancer cells, Chem Biol Interact, 2003, Vol.143-144, p.401-9	1-3, 5, 6
Y	HIDAI, C. et al, Discoidin domain of Dell protein contributes to its deposition in the extracellular matrix, Cell Tissue Res, 2007, Vol.330, No.1, p.83-95	1-3, 5, 6
Y	WO 2005/001093 A1 (Nihon University), 06 January 2005 (06.01.2005), claims 15 to 23; page 17, line 17 to page 19, line 2; page 20, lines 4 to 22; page 26, line 25 to page 27, line 5 & EP 1650302 A1 & US 2006/199184 A1 & US 7517655 B2	1-3, 5, 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
03 December, 2009 (03.12.09)

Date of mailing of the international search report
15 December, 2009 (15.12.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/069134

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	HIDAI, C. et al, The Dell deposition domain can immobilize 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the extracellular matrix without interfering with enzymatic activity, Bioprocess Biosyst Eng, 2009, Vol.32, No.5, p.569-73	1-3, 5, 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/069134

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.: 4
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention as set forth in claim 4 includes the methods for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, (Continued to extra sheet)
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:

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/069134

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K48/00(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K38/04(2006.01)i, A61K38/43(2006.01)i,
A61P13/08(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N9/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i,
C12R1/91(2006.01)n

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 (I P C))

Int.Cl. A61K48/00, A61K38/00, A61K38/04, A61K38/43, A61P13/08, A61P35/00, C12N9/04, C12N15/09, C12R1/91

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 9 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 9 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 9 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)

CAP/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), 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
Y	RIZNER, T.L. et al, Role of human type 3 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C2) in androgen metabolism of prostate cancer cells, Chem Biol Interact, 2003, Vol.143-144, p.401-9	1-3, 5, 6
Y	HIDAI, C. et al, Discoidin domain of Dell protein contributes to its deposition in the extracellular matrix, Cell Tissue Res, 2007, Vol.330, No.1, p.83-95	1-3, 5, 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

0 3 . 1 2 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

1 5 . 1 2 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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)

伊藤 基章

4 C

4 1 4 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. c の続き)

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ

☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット

☐ 紙形式

☒ 電子形式

c. 提出時期

☒ 出願時の国際出願に含まれていたもの

☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

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 4 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、
請求項4に係る発明は、手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法を包含するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
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。

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ので、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ので、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。

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
Y	WO 2005/001093 A1 (学校法人日本大学) 2005.01.06, 請求項15-23、第17頁第17行～第19頁第2行目、第20 頁第4～22行目、第26頁第25行～第27頁第5行目等 & EP 1650302 A1 & US 2006/199184 A1 & US 7517655 B2	1-3, 5, 6
P, X	HIDAI, C. et al, The Dell deposition domain can immobilize 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in the extracellular matrix without interfering with enzymatic activity, Bioprocess Biosyst Eng, 2009, Vol.32, No.5, p.569-73	1-3, 5, 6