(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
2003 年2 月20 日 (20.02.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/013605 A1

(51) 国際特許分類[7]: A61K 45/00, 38/19, 39/395, 31/245, 48/00, A61P 13/08, 13/00, A61K 35/00, A61P 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/08016

(22) 国際出願日: 2002 年8 月6 日 (06.08.2002)

(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2001-239306 2001 年8 月7 日 (07.08.2001) JP
特願2002-224215 2002 年7 月31 日 (31.07.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO, INC.) [JP/JP]; 〒105-8422 東京都 港区 虎ノ門二丁目２番１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): 古野 雅弘 (FURUNO,Masahiro) [JP/JP]; 〒236-0004 神奈川県 横浜市 金沢区福浦１−１３−２ 日本たばこ産業株式会社 医薬探索研究所内 Kanagawa (JP). 内藤 隆之 (NAITO,Takayuki) [JP/JP]; 〒236-0004 神奈川県 横浜市 金沢区福浦１−１３−２ 日本たばこ産業株式会社 医薬探索研究所内 Kanagawa (JP). 山本 好久 (YAMAMOTO,Yoshihisa) [JP/JP]; 〒569-1125 大阪府 高槻市 紫町１−１ 日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所内 Osaka (JP). 青木 淳賢 (AOKI,Junken) [JP/JP]; 〒154-0003 東京都 世田谷区 野沢１−３５−３−４１３ Tokyo (JP). 新井 洋由 (ARAI,Hiroyuki) [JP/JP]; 〒112-0002 東京都 文京区 小石川５−３５−８ Tokyo (JP). 筧 善行 (KAKEHI,Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒760-0013 香川県 高松市 扇町２−８−４４−５０３ Kagawa (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU,Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県 土浦市 卸町１−１−１ 関鉄つくばビル６階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDIES FOR PROSTATIC DISEASES

(54) 発明の名称: 前立腺疾患治療剤

(57) Abstract: It is intended to prevent and treat prostatic diseases. More specifically speaking, it is found out that the causes and mechanisms of the onset of prostatic diseases closely relate to interactions among LPA receptors expressed in epithelial cells and LPA serving as a ligand thereof and the interactions among various physiologically active substances thus secreted from the prostatic epithelial cells and prostatic interstitial cells; that prostatic interstitial cells proliferate owing to these interactions; and that a substance inhibiting the interactions between the LPA receptors and LPA inhibits the proliferation of prostatic cells. Based on these findings, there are provided medicinal compositions containing, as the active ingredient, a substance inhibiting intracellular signal transduction induced by stimulus mediated by Edg-7 receptor which is one of the LPA receptors and frequently expressed in prostatic epithelial cells. Using these compositions, the signal transduction and secretion of the physiologically active substances as described above are inhibited. It is intended that prostatic diseases can be thus prevented and/or treated.

[続葉有]

WO 03/013605 A1

(57) 要約:

本願は医薬分野に属し、前立腺疾患の予防・治療を目的とする。

具体的には、前立腺疾患の発生の原因・メカニズムが、前立腺上皮細胞に発現するＬＰＡ受容体とそのリガンドであるＬＰＡとの相互作用、及びその結果前立腺上皮細胞から分泌される種々の生理活性物質と前立腺間質細胞との相互作用に深く関係しており、それらの相互作用により前立腺細胞間質細胞が増殖すること、ならびにＬＰＡ受容体とＬＰＡとの相互作用を阻害する物質が前立腺細胞の増殖を阻害することを見出した。かかる知見に基き、ＬＰＡ受容体の一種で前立腺上皮細胞に多く発現するＥｄｇ－７受容体を介する刺激により惹起される細胞内シグナル伝達を阻害する物質を有効成分とする医薬組成物が提供され、当該組成物の採用により上記シグナル伝達及び生理活性物質の分泌が阻害され、結果として前立腺疾患の予防・治療が図られる。

明細書

前立腺疾患治療剤

技術分野

本発明は、Edg-7受容体（Endothelial cell differentiation gene 7 receptor；別名を「lp_{A3}（Lysophosphatidic acid receptor 3） receptor」という。）の生物活性、特にEdg-7受容体を介する刺激により惹起される細胞内へのシグナル伝達（例えば、細胞質内へのカルシウムイオン動員（Ca^{2+} influx））を阻害する活性を有する物質を含んでなる医薬組成物に関する。

具体的には、本発明は、Edg-7受容体を介する刺激による細胞内へのシグナル伝達（例えば、細胞質内カルシウムイオンの動員）の阻害により該細胞からのエンドセリン－１（Endothelin-1; ET-1）、インターロイキン－６（interleukin-6; IL-6）または脂質などの生理活性物質の分泌を阻害する活性を有する物質を含んでなる医薬組成物に関する。

さらに具体的には、本発明は、Edg-7受容体の生物活性、特にEdg-7受容体を介する刺激により惹起される細胞内へのシグナル伝達（例えば、細胞質内へのカルシウムイオンの動員（Ca^{2+} influx））を阻害する活性を有する物質を含んでなる前立腺疾患（特には、前立腺肥大症、前立腺癌）の進行の抑制または前立腺疾患を治療するための医薬組成物に関する。

背景技術

高齢者の割合が増加の一途をたどる我が国において、男性高齢者の健康的な生活を著しく損なう代表的な疾患は、50歳代以上の男性において排尿障害を引き起こす原因となっている前立腺肥大症（Benign prostatic hyperplasia；BPH）と悪性腫瘍を伴う前立腺癌である。

まず前立腺肥大症であるが、前立腺肥大症の成因には、遺伝的要因及び食生活等の環境的要因など多数の要因が関与すると考えられるが、未だその全貌は明らかとされていない。現在の我が国における前立腺肥大症患者は厚生省による調査では３０乃至４０万人とされているが、実際には４００万人以上と推定されている。

前立腺は若年期以後に発育増大しながら、３０歳代で正常の大きさである胡桃ほどの大きさに成長する。しかしながら、３０歳代以降では、前立腺の内腺部分に線維筋性の間質部分と腺性部分が混合した状態で肥大した良性の腺腫が発生し、この腺腫の増大化が即ち前立腺肥大症である（J. Urol., Vol.132, p.474-479, 1984）。

前立腺肥大症の発生頻度は、30乃至40歳代で約7.7%、50歳代で約40%、60歳代で約67.3%、70歳代で約92%、80歳代では100%であったとの報告がなされている（Jap. J. Urol., Vol.58, p.814, 1967）。この発生頻度は、欧米での報告とほぼ同様である。この良性腺腫の肥大に伴い、75歳ではその約50%において尿の勢いが弱くなるという障害が生じる。この前立腺肥大により、80歳代ではその約80%において、何らかの排尿障害が生じる（Prostate, Vol.16, p.253-261, 1990）。

上述したとおり、前立腺肥大の原因と発生のメカニズムは未だ十分には解明されていないが、40歳頃から起こる性ホルモンの逆転現象、即ち、男性ホルモンのテストステロンの分泌減少と副腎で産生される女性ホルモンのエストロゲンの分泌量の増加により誘導される前立腺の間質成分の増殖がその原因の一つとも言われている。

臨床症状的には、前立腺肥大症により起こる排尿障害は、上述した内腺内に生じる良性腺腫の増大、前立腺被膜の弾力性の低下、及び膀胱収縮力の低下の３つが大きな成因である（Urol. Clin. North Am., Vol.17, p.509, 1990）。

従って、今日における前立腺肥大症の治療は、その発生の原因を遮断すること

によるものではなく、上述のような臨床症状を和らげるための治療である。具体的には、腺腫の縮小を目的として抗アンドロゲン剤が、前立腺被膜の弾力性の回復の目的でα_1遮断剤（α_1ブロッカー剤）が、また膀胱の収縮力の増強の目的で抗コリンエステラーゼ剤が用いられている。

しかしながら、抗アンドロゲン剤では、腺上皮の30乃至40%を縮小させるに過ぎず、またその縮小効果と症状の改善の程度とは相関しない。また抗アンドロゲン剤とα1遮断剤との併用とその症状の改善効果も明確ではない。抗アンドロゲン剤での腺上皮の縮小効果が30乃至40%に過ぎないという事実は、前立腺肥大の発生の病因に上皮細胞（epithelial cell）の増殖だけでなく、間質細胞（stroma cell；ストローマ細胞）の増殖を伴う間質（ストローマ）の増大があることを示唆するものである。従って、今後の前立腺肥大症の治療には間質を縮小させることが課題とされている（薬局、Vol.51, No.3, p.29-36, 2000）。

しかしながら、前立腺の肥大に到る前立腺の上皮細胞及び間質細胞の増殖の原因及びメカニズムは未だ明らかにされていない。

一方、上述の前立腺肥大症と並んで男性高齢者において高い確立で発症する前立腺癌は、前立腺肥大症に見られる腫瘍が良性であるのに対し前立腺癌におけるそれは悪性である点でさらに深刻な問題である。

前立腺癌の死亡率は、欧米に比べ定率ではあるものの、日本においては前立腺癌による死亡率が他のどの癌によるそれにも比べ上昇してきているのは深刻な問題として捉えられている。さらに興味深いことには、剖検において発見される前立腺癌は致死癌の1,000倍以上であるという事実である。前立腺癌は初期の小さな悪性度の低い腫瘍細胞から大きな悪性度の高い癌に変化してゆく速度が極めて遅い癌であるともいえる。80歳代の日本男子の実に40%が前立腺癌を有している。

このような一般的な前立腺癌に加えて、最近、前立腺組織の上皮内に限定され細胞異型と腺細胞の多層化のみで診断される前立腺上皮内癌（prostatic intrae

pithelial neoplasm; PIN) が注目されている。PIN を有する男性の約 50%は前立腺癌に進行しているという報告もなされている。

前立腺癌の臨床症状としては、癌の増大による下部尿路症状；上部尿路の通過障害；リンパ節、肝臓または肺などへの転移に起因する症状；骨転移による骨痛や神経圧迫による痛みなどがある。

前立腺癌の危険因子としては、男性ホルモン、性生活、摂取カロリー、脂肪摂取、肉類の摂取、ビタミンA、ビタミンE、ビタミンD、アルコール摂取、コーヒー摂取、肥満、肝硬変など種々が挙げられるが詳細な成因は明らかになっていない。

上述した前立腺肥大に至らしめる前立腺の上皮細胞及び間質細胞の増殖のメカニズム並びに前立腺癌の発生及び進行のメカニズムを解明するために多くの研究者らが様々な角度から精力的な研究を進めている。

一方、最近になって本発明者らは、前立腺に高い発現の見られる遺伝子を探索することにより、ヒト前立腺の上皮細胞及び精巣に特に顕著な発現を認める新たなG蛋白質共役型受容体 (G-protein coupled receptor ; GPCR) である GLM01 受容体を同定した (国際出願公開 WO99/67383 号公報) 。またほぼ同じ頃坂東及び井上らのグループ並びにドンソン (Dong-soon) らのグループも GLM01 受容体と同一の GPCR である Edg-7 受容体 (Endothelial cell differentiation gene 7 receptor) を同定し報告している (J. Bio. Chem., Vol.274, No.39, p.27776-27785, 1999 ; Mol. Pharmacol., Vol.57, p.753-759, 2000) 。

GPCR である Edg-7 受容体は、他の GPCR である Edg-2 受容体 (J. Cell Biol., Vol.135, No.4, p.1071-1083, 1996 ; Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.231, No.3, p.619-622, 1997;Curr. Opin. Cell Biol., Vol.9 No.2, p.168-173, 1997 ; J. Cell Biochem. Suppl. 30-31, p.147-157, 1998 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.95, p.6151-6156, 1998) 及び Edg-4 受容体 (J. Bio. Chem., Vol.273, p.7906-7910, 1998 ; Genomics, Vol.64, p.155-169, 2000) とともに、細

胞に作用して様々な生物活性を引起こす生理活性物質であるリゾリン脂質（リゾフォスファチジン酸；Lysophosphatidic acid; LPA）の受容体、即ち"LPA受容体"の一つである（FEBS Letters, Vol.478, p.159-165, 2000；Prostaglandins & other Lipid Mediators, Vol.64, p.21-32, 2001）。

LPA受容体のリガンドであるLPAは、リン脂質（フォスファチジン酸；Phosphatidic acid；PA）が、フォスフォリパーゼA1（Phospholipase A1；PLA1）またはフォスフォリパーゼA2（Phospholipase A2；PLA2）の作用により脂肪酸の片方が遊離することによりグリセロール骨格に脂肪酸が１分子だけ結合した構造を有する。LPAとは、総称であり、その脂肪酸の種類、脂肪酸の結合位置、及び結合の種類により非常に多数のLPAが存在する。生体内には、1-アシルLPA、2-アシルLPA、1-アルキルLPA、1-アルケニルLPA、環状フォスファチジン酸（cyclic phosphatidic acid；cPA）などの種々の生理活性LPAが検出される。1-アシルLPAには、例えば、パルミチン酸（16:0）やステアリン酸（18:0）等の飽和脂肪酸を主に含み、一方、2-アシルLPAは、リノール酸（18:2）やアラキドン酸（20:4）等の不飽和脂肪酸を主に含んでいる。

LPAの生理活性は、上述した細胞膜上のLPA受容体を介して細胞内にシグナルを伝達することにより誘導され、その生理活性は、LPAが作用する細胞の種類によって多様である。LPAの生理活性としては、例えば、以下が報告されている。平滑筋収縮＜平滑筋細胞＞（Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., Vol.245, p.74-83, 1980）、血小板凝集＜血小板＞（Am. J. Pathol., Vol.96, p.423-438, 1979）、細胞増殖促進＜線維芽細胞、平滑筋細胞、Jurkat T細胞＞（Biochem. Biophys. Acta, Vol.1198, p.185-196, 1994）、細胞増殖の抑制（ミエローマ細胞）、血圧変動(疾患モデル動物)、塩素イオンの細胞内への流入（アフリカツメガエル卵母細胞）、細胞内へのカルシウム流入（種々の細胞種）、神経突起の退縮（PC12細胞）、ストレスファイバーの形成（線維芽細胞、Swiss 3T3細胞）、細胞接着（線維芽細胞）、癌細胞浸潤の促進（hepatoma細胞、calcinoma細胞）など。

一方、生体内におけるLPAの産生の経路については、LPAは血漿中には少なく、血清中に豊富に存在していることからその主要な産生の場所が血小板であろうと考えられているが（Am. J. Physiol., Vol.267, C204-C210, 1994）、未だ明らかにされていない。

前述のEdg-7受容体のリガンドとしてのLPAについては、1-オレオイルLPA及び2-アシルLPAといった不飽和脂肪酸を有するLPAのみがEdg-7受容体に作用して細胞質内にカルシウムイオンの動員（Ca^{2+} influx）を引起こすことが明らかにされている（J. Biol. Chem., Vol.274, p.27776-27785, 1999）。

他のLPA受容体であるEdg-2受容体には、不飽和脂肪酸を有する1-オレオイルLPAだけでなく、飽和脂肪酸を有する1-ステアロイルLPAも作用することが明らかとされている（J. Cell Biol., Vol.135, p.1071-1083, 1996；J. Biol. Chem., Vol.273, p.1506-1510, 1998）。また、Edg-4受容体もEdg-2受容体と同様に不飽和脂肪酸を有するLPA及び飽和脂肪酸を有するLPAのどちらにも反応することが分かっている。

これまでのところ、上述した前立腺と前立腺疾患（前立腺肥大症、前立腺癌など）なる技術分野とLPA受容体とLPAなる技術分野という２つの技術分野は各々別個の技術分野として研究が進められており互いの関連性についてはほとんど報告されていない。

強いて挙げるとすれば、（１）本発明者らを含め他の複数のグループにより最近同定されたLPA受容体の１つであるEdg-7受容体が、前立腺の上皮細胞及び精巣に高い発現が認められること（国際出願公開WO99/67383号公報；J. Bio. Chem., Vol.274, No.39, p.27776-27785, 1999；Mol. Pharmacol., Vol.57, p.753-759, 2000））、（２）Edg-7受容体を介するLPAの刺激により細胞からのエンドセリン-1（Endothelin-1；ET-1）及びインターロイキン-6（Interleukin-6；IL-6）の分泌が誘導される（国際出願公開WO99/67383号公報）、（３）Edg-2受容体は、哺乳動物のほぼ全身の器官組織に発現が認められ、前立腺においても発現

が認められること（J. Bio. Chem., Vol.273, p.7906-7910, 1998）、及び（4）前立腺癌細胞由来の細胞株であるPC-3細胞株がLPAの刺激により増殖すること（J. Cell Physiol., Vol.174, No.2, p.261-272, 1998）のみである。

発明の開示

上述したとおり、50歳代の男性のほぼ半分以上、さらに80歳代の男性のほぼ100%に発症し排尿障害を引き起こす前立腺肥大症は、未だその発症の原因及びメカニズムも解明されていないことから、既存の薬剤療法は前立腺肥大症の原因を遮断するものではなく、その臨床症状（良性腺腫の増大、前立腺被膜の弾力性の低下、及び膀胱収縮力の低下）を和らげるための治療に過ぎず根本的な治療ではない。また、それらの既存の薬剤療法は、前立腺肥大の直接的な成因である前立腺間質細胞（stroma cell；ストローマ細胞）の増殖を抑制するものではない。

また、最近になって死亡率が増加してきており高齢男性において発生する前立腺癌についても、その発生及び進行の原因及びメカニズムは明らかにされておらず、その発生及び進行を抑制する薬剤及び根本的な治療方法は提供されていない。

即ち、本発明は、前立腺肥大や前立腺癌の発生や進行に間接的または直接的に深く関与する前立腺上皮細胞からの種々生理活性物質の分泌、並びに前立腺肥大の直接的な成因となる前立腺間質細胞の増殖を主とする前立腺肥大の発生の原因及びメカニズムを解明するとともに、その発生原因を直接的に制御することにより前立腺疾患（前立腺肥大症、前立腺癌など）の発生の予防、症状の進行の抑制、及び／または該前立腺疾患を治療する方法及び薬剤を提供することを目的とする。

さらには、当該方法または薬剤を、既存の治療方法（例えば前立腺肥大症の治療においては、抗アンドロゲン剤、α1遮断剤、あるいは抗コリンエステラーゼ剤などによる薬剤療法）と併用することにより前立腺疾患（前立腺肥大症や前立

腺癌など）の治療効果を増大させることを目的とする。

本発明者らは、上記目的の達成のために、前立腺の上皮細胞及び精巣に高い発現が認められるLPA受容体であるEdg-7受容体及びそのリガンドであるLPAの生物学的相互作用、Edg-7受容体と同様にLPA受容体の１つであり他の種々の組織と同様に前立腺や精巣でも発現が認められるEdg-2受容体とそのリガンドであるLPAの生物学的相互作用、並びに生体内でのLPAの産生のメカニズムに関して鋭意研究を重ねた。

その結果、（１）LPA受容体のリガンドであるLPAが男性の精液中に含まれること、（２）精液中のLPAが前立腺上皮細胞に高い発現の見られるLPA受容体であるEdg-7受容体に作用して細胞内にシグナルを伝達すること、（３）Edg-7受容体の高い発現の見られる前立腺上皮細胞にLPAを作用させることにより該上皮細胞からET-1、IL-6及び脂質等の種々の生理活性物質が分泌されること、（４）LPA受容体であるEdg-2受容体を発現する前立腺間質細胞にLPAを作用させることにより該間質細胞が増殖すること、及び（５）LPAで刺激をした前立腺上皮細胞の培養上清（LPAの刺激により誘導され分泌されたET-1、IL-6及び脂質等の種々の生理活性物質を含んでいる）を前立腺間質細胞に作用させることにより該間質細胞が増殖するという新たな知見を世界に先駆けて初めて見出した。

これらの画期的な新たな知見から、男性固有の疾患である前立腺疾患、特に前立腺肥大の発生のメカニズムが、男性固有の精液中に含まれるLPAと前立腺の上皮細胞上のLPA受容体であるEdg-7受容体との相互作用に始まり、その結果前立腺上皮細胞から種々の生理活性物質がさらに分泌され、それらの生理活性物質が前立腺の間質細胞に作用することにより該間質細胞が増殖し、その結果前立腺の肥大が進行するというプロセスを経るものであることが示唆された。また同じく男性固有の疾患である前立腺癌の発生及び進行のメカニズムに、刺激により誘導される前立腺上皮細胞からの種々生理活性物質（例えば、IL-6、ET-1及び脂質など）が深く関与することが示唆された。

即ち、本発明は、前立腺上皮細胞や精巣に高い発現が見られるLPA受容体であるEdg-7受容体とそのリガンド（特にはLPA）との相互作用、LPA等の刺激によりEdg-7受容体を介するシグナル伝達により誘導される前立腺上皮細胞からの種々の生理活性物質の分泌、該生理活性物質と前立腺間質細胞との相互作用といった一連の相互作用が前立腺疾患（前立腺肥大や前立腺癌など）の発生の原因及びメカニズムであることを見出すとともに、該Edg-7受容体を介する細胞内へのシグナル伝達（例えば、細胞質内カルシウムイオンの動員）及び／または該細胞からの種々生理活性物質の分泌を阻害する物質を見出し本発明を完成するに到った。

本発明の医薬組成物は、前立腺疾患（特には、前立腺肥大症または前立腺癌）の発症の予防、該前立腺疾患の進行の抑制または該前立腺疾患を治療するための医薬品として有用である。また、本発明の医薬組成物は、前立腺疾患（特には前立腺肥大）を抑制することにより排尿障害に代表されるような当該疾患に付随する疾患の症状を緩和または治療することも可能である。

さらに、本発明の医薬組成物は、前立腺疾患（前立腺肥大症や前立腺癌など）の既存の治療方法（例えば前立腺肥大症の場合には、抗アンドロゲン剤、α1遮断剤、あるいは抗コリンエステラーゼ剤などによる薬剤療法が挙げられる。）と併用することにより前立腺疾患（前立腺肥大症や前立腺癌など）の治療効果を増大させることも可能である。

即ち、本発明は、下記(1)乃至(10)に記載されるとおりの発明である。

(1) Edg-7受容体を介する刺激により惹起される細胞内へのシグナル伝達を阻害する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、前立腺疾患の発症の予防、前立腺疾患の進行の抑制、前立腺疾患の治療または前立腺肥大に付随する疾患の治療をするための医薬組成物。

(2) 該物質が、細胞質内へのカルシウムイオンの動員を阻害する活性を有するものであることを特徴とする前記(1)に記載の医薬組成物。

(3) 該物質が、前立腺上皮細胞からの生理活性物質の分泌を阻害する活性を有

するものであることを特徴とする前記(1)に記載の医薬組成物。

(4) 該生理活性物質が、エンドセリン-１ (ET-1) 、インターロイキン-６ (IL-6) または脂質であることを特徴とする前記(3)に記載の医薬組成物。

(5) 該前立腺疾患が、前立腺肥大症または前立腺癌であることを特徴とする前記(1)乃至前記(4)のいずれかに記載の医薬組成物。

(6) 該前立腺肥大に付随する疾患が排尿障害であることを特徴とする前記(1)乃至前記(5)のいずれかに記載の医薬組成物。

(7) 該物質が、Edg-7受容体拮抗物質であることを特徴とする前記(1)乃至前記(6)のいずれかに記載の医薬組成物。

(8) 該物質が、Edg-7受容体に結合する抗体またはその一部であることを特徴とする前記(1)乃至前記(6)のいずれかに記載の医薬組成物。

(9) 該物質が、ＤＮＡまたはＲＮＡであることを特徴とする前記(1)乃至前記(6)のいずれかに記載の医薬組成物。

(10) 該物質が、化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記(1)乃至前記(6)のいずれかに記載の医薬組成物。

以下、本発明で用いられる語句の意味、並びに物質の製造方法を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。

本発明における「哺乳動物」とは、ヒト、ウシ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、及びモルモット等を意味し、好ましくは、ヒト、ウシ、ラット、マウスまたはハムスターであり、特に好ましくは、ヒトである。

本発明でいう「脂質」とは、次のような性状を有する物として定義される任意の物質を意味する。

一般的に水に溶けにくく有機溶媒に溶けやすい生体に存在するあぶら状の物質の総称。多種類の物質があるが、特に脂肪酸の誘導体が多くの割合を占め、次の三種類に大別することができる。

(1)単純脂質： 中性脂質(脂肪酸のグリセリド)、蝋(脂肪酸と高級アルコール

とのエステル)、ステロールエステル、ビタミンAのエステル及びビタミンDのエステルなど。

(2)複合脂質： リンまたはリンと窒素を含むリン脂質、糖を構成成分に持つ糖脂質、硫酸基やスルホン基を持つスルホリピッドなど。

(3)誘導脂質： 上記2つの分類に属する物の前駆物質や代謝物質と考えられる脂肪酸、高級アルコール、ステロール、炭化水素であるカロテノイドやスクアレン、脂溶性ビタミンなど。

このような脂質の中には、中性脂質のようにタンパク質及び糖のように単独で生体成分の大きな部分となりエネルギー源として重要な役割を担うもの、また少量で有効なホルモン、ビタミンあるいはプロスタグランジンやロイコトリエンのようなものもある。複合脂質は、血液成分としての他に、脂質二分子膜として細胞の原形質膜やミトコンドリアの構成成分として、あるいはミクロソームやクロロプラストなどの生体膜系の主要構成成分として存在する。また、ろうは、細胞の保護物質としての役割を担っている。中性脂質やリン脂質の生合成には、ホスファチジン酸が中間体として大きな役割を演じている。

一方、上述したように脂質を水に難溶性で且つ有機溶媒に溶けやすいという性状で定義する場合には、現在生化学上重要とされている水溶性の脂質が定義から外れることから、脂質を「長鎖脂肪酸とアルコールとのエステル及びそれに類似した物質群。」と定義する場合も多い。

本発明でいうLPAとは、リゾホスファチジン酸(Lysophosphatidic acid)の略称であり、フォスファチジン酸(Phosphatidic acid;PA)が、フォスフォリパーゼA1(Phospholipase A1;PLA1)またはフォスフォリパーゼA2(Phospholipase A2;PLA2)の作用により脂肪酸の片方が遊離することによりグリセロール骨格に脂肪酸が1分子だけ結合した構造を有する物質である。

LPAには、その脂肪酸の種類、脂肪酸の結合位置、及び結合の種類により非常に多数のLPAが存在し、本発明でいうLPAには、特に断わりのない限り、下記に

定義するLPA受容体のリガンドとしての任意のLPAを意味する。

哺乳動物（例えば、ヒト）の生体内には、1-アシルLPA（パルミチン酸（16:0）やステアリン酸（18:0)等の飽和脂肪酸を主に含む。）、2-アシルLPA（リノール酸（18:2）やアラキドン酸（20:4）等の不飽和脂肪酸を主に含む。）、1-アルキルLPA、1-アルケニルLPA、環状フォスファチジン酸（cyclic phosphatidic acid；cPA）などの種々の生理活性LPAが検出されが、本発明でいうLPAには該LPA受容体に結合して生理活性を誘導するものであればそれらの任意が包含される。

本発明におけるLPA受容体とは、上述のLPAをリガンドとして結合することにより細胞内にシグナルを伝達し、生体に対して様々な生理現象を引き起こす細胞膜上の受容体を意味する。

具体的には、下記に定義する既報に報告されるとおりのEdg-7受容体（lp_{A3}受容体）、Edg-2受容体（vzg-1受容体、Rec.1.3受容体とも呼ばれる。）及びEdg-4受容体（lp_{A2}受容体とも呼ばれる。）などを意味する。好ましくは、ヒトのLPA受容体であり、より好ましくはヒトのEdg-7受容体である。

本発明におけるEdg-7（Endothelial cell differentiation gene 7）受容体（別称をGLM01受容体あるいはlp_{A3}受容体ともいう。）とは、前述に記載したとおりの既報に報告される構造及び機能を有する哺乳動物のG蛋白質共役型受容体(G-protein coupled receptor；GPCR)を意味する（<ヒトEdg-7> GenBank Accession Number： NP036284；国際出願公開WO99/67383号公報；J. Bio. Chem., Vol. 274, No. 39, p. 27776-27785, 1999；Mol. Pharmacol., Vol. 57, p. 753-759, 2000；Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 273, No. 3, p. 805-810, 2000；<マウスEdg-7> GenBank Accession Number： NP036284；Gene, Vol. 267, No. 2, p. 243-253, 2001；<ラットEdg-7> GenBank Accession Number：NP076459）。

特に好ましくはヒト由来のEdg-7受容体を意味する（GenBank Accession Number： NP036284；国際出願公開WO99/67383号公報；J. Bio. Chem., Vol. 274, No

.39, p.27776-27785, 1999 ; Mol. Pharmacol., Vol.57, p.753-759, 2000 ; Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.273, No.3, p.805-810, 2000) 。

本発明におけるEgd-2 (Endothelial cell differentiation gene 2) 受容体 (別称をvzg-1受容体、lp_{A1}受容体、recl.3受容体あるいはGPCR26ともいう。) とは、前述に記載したとおりの既報に報告される構造及び機能を有する哺乳動物のG蛋白質共役型受容体を意味する (<ヒトEdg-2> GenBank Accession Number : NP001392.1 ; J. Cell Biol., Vol.135, No.4, p.1071-1083, 1996 ; Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.231, No.3, p.619-622, 1997 ; Curr. Opin. Cell Biol., Vol.9 No.2, p.168-173, 1997 ; J. Cell Biochem. Suppl. 30-31, p.147-157, 1998 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.95, p.6151-6156, 1998 ; <マウスEdg-2> GenBank Accession Number : AAC34301 ; Genomics, Vol.51, No.3, p.364-378, 1998 ; J. Cell Biol., Vol.135, No.4, p.1071-1083, 1996 ; <ラットEdg-2> GenBank Accession Number : Q61130 ; J. Cell Biol., Vol.135, No.4, p.1071-1083, 1996 ; Brain Res. Mol. Brain Res., Vol.42, No.2, p.245-254, 1996 ; Eur. J. Neurosci., Vol.10, No.3, p.1045-1053, 1998) 。

特に好ましくはヒト由来のEdg-2受容体を意味する (GenBank Accession Number : NP001392.1 ; J. Cell Biol., Vol.135, No.4, p.1071-1083, 1996 ; Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.231, No.3, p.619-622, 1997 ; Curr. Opin. Cell Biol., Vol.9 No.2, p.168-173, 1997 ; J. Cell Biochem. Suppl. 30-31, p.147-157, 1998 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.95, p.6151-6156, 1998) 。

本発明における「受容体を介する刺激により惹起される細胞内へのシグナル伝達」とは、例えば、以下に述べるような「細胞質内へのカルシウムイオンの動員」や、細胞質内のシグナル伝達分子を介する任意のシグナル伝達を意味する。

本発明における「受容体を介する刺激による細胞質内へのカルシウムイオンの動員」とは、種々の生体内リガンドが細胞膜受容体に結合することにより起こる細胞質内へのカルシウムイオン (Ca^{2+}) の動員を意味する。

このカルシウムイオンの動員の機構には、大きくわけて２種類あり、１つは、小胞体やミトコンドリア等の細胞内カルシウム貯蔵部位からのカルシウムイオンの放出である。他の一つは、形質膜に存在する受容体作動性カルシウムチャネル（receptor operated Ca^{2+} channel; ROC）及び電位依存性カルシウムチャネル（voltage-dependent Ca^{2+} channel; VDC）を通じた細胞外からのカルシウムイオンの流入である。

この細胞質内へのカルシウムイオンの動員により上昇したカルシウムイオンはセカンドメッセンジャーとして細胞内シグナル伝達、ひいては細胞の発育、増殖、分化及び機能調節に極めて重要な役割を果たしている。

例えば、G蛋白質共役型受容体であるEdg-7受容体やEdg-2受容体などのLPA受容体のリガンドであるLPAは、カルシウムイオン動員リガンドであり、LPAがLPA受容体に結合することにより細胞質内にカルシウムイオンの動員（Ca^{2+} influx）が誘導される。

Edg7受容体のようなGPCRにリガンドが結合すると、そのシグナルがG蛋白質を介して変換され、フォスフォリパーゼCの活性化、ジアリルグリセロールやイノシトールリン酸などのメッセンジャーの産生、細胞質内カルシウムイオンの増大、プロテインキナーゼCの活性化、及び蛋白質のリン酸化といった細胞内での生物学的応答を経て伝達され、細胞機能が調節されるとともに、細胞の発育、増殖及び分化が誘導される。

即ち、本発明における「細胞質内へのカルシウムイオンの動員」とは、受容体とそのリガンドの相互作用により惹起され、細胞の発育及び細胞の増殖を制御する細胞の生物学的応答を意味する。

本発明を構成する「物質」、具体的には「Edg-7受容体を介する刺激により惹起される細胞内へのシグナル伝達（例えば、細胞質内へのカルシウムイオンの動員）を阻害する活性を有する物質」あるいは「前立腺上皮細胞からの生理活性物質の分泌を阻害する活性を有する当該物質」には、自然界に存在する天然の物質

あるいは人工的に調製される任意の物質を意味する。

本発明における該「物質」としては、具体的には、(1) Edg-7受容体拮抗物質、(2) Edg-7受容体に結合する抗体若しくはその一部、(3) Egd-7受容体に結合するポリペプチド、及び(3) DNA若しくはRNAが挙げられる。

該「Edg-7受容体拮抗物質」とは、Edg-7受容体のリガンド(例えば、LPA)が該受容体に結合するのを競合的または非競合的に阻害する任意の物質を意味する。この拮抗物質には、以下に定義する抗体またはその一部、ポリペプチド、及び化学的に合成された化合物が包含される。好ましくは化学的に合成された化合物である。

該「抗体」としては、Edg-7受容体に結合するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部が挙げられる。好ましくはモノクローナル抗体またはその一部である。該モノクローナル抗体には、非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体だけでなく、組換えキメラモノクローナル抗体(実験医学(臨時増刊号)、第1.6巻、第10号、1988年及び特公平3-73280号公報等)、組換えヒト型モノクローナル抗体及びヒトモノクローナル抗体(Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997; 特表平4-504365号公報; 特表平7-509137号公報; 日経サイエンス、6月号、第40～第50頁、1995年; 国際出願公開WO94/25585号公報; Nature, Vol.368, p.856-859, 1994; 及び特表平6-500233号公報; 日系サイエンス、1997年4月号、第78頁乃至84頁など)が包含される。

該「ポリペプチド」は、Edg-7受容体に結合する任意のポリペプチドを意味する。該ポリペプチドには、オリゴペプチド、融合ポリペプチド、及びそれらの化学修飾体が包含される。オリゴペプチドとしては、5乃至30個のアミノ酸、好ましくは5乃至20個のアミノ酸からなるペプチドを挙げることができる。該化学修飾は、生体に投与された場合の血中半減期の増大あるいは経口投与時における消化管での分解に対する耐性若しくは吸収性の増大の目的等の種々の目的に応じて

設計することができる。

該「DNA」とは、Edg-7受容体をコードするDNA（cDNA及びゲノミックDNAを含む）の塩基配列を基に設計されるアンチセンスDNA医薬として有用な「該DNAの部分塩基配列を含むDNAあるいはそれらを化学修飾した化学修飾DNA」を意味する。即ち、該アンチセンスDNAは、Edg-7受容体をコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることにより、該Edg-7受容体をコードするDNAのmRNAへの転写あるいは該mRNAの蛋白への翻訳を阻害することができる。

該「RNA」とは、前述のEdg-7受容体をコードするRNAの塩基配列を基に設計されるアンチセンスRNA医薬として有用な「該RNAの部分塩基配列を含むRNAあるいはそれらを化学修飾した化学修飾RNA」を意味する。該アンチセンスRNAは、該Edg-7受容体をコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることにより、該Edg-7受容体をコードするDNAのmRNAへの転写あるいは該mRNAの蛋白への翻訳を阻害することができる。

ここで、「部分塩基配列」とは、任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。該部分塩基配列としては、連続した5乃至100塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した5乃至70塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した5乃至50塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した5乃至30塩基の部分塩基配列が挙げられる。

また、該DNAまたはRNAをアンチセンス医薬として用いる場合には、該DNAまたはRNAが患者の体内に投与された場合の血中半減期の増大（安定性）、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該DNAまたはRNAの塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、オリゴヌクレオチドの構造中のリン酸結合、リボース、核酸塩基、糖部位、3'及び／または5'末端等の化学修飾が挙げられる。

リン酸結合の修飾としては、1以上の該結合を、ホスホジエステル結合（D-オ

リゴ）、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合（S-オリゴ）、メチルホスホネート結合（MP-オリゴ）、ホスホロアミデート結合、非リン酸結合及びメチルホスホノチオエート結合のいずれかまたはそれらの組み合わせへの変更を挙げることができる。リボースの修飾としては、2'-フルオロリボースあるいは2'-O-メチルリボースへなどへの変更を挙げることができる。核酸塩基の修飾としては、5-プロピニルウラシルまたは2-アミノアデニンなどへの変更が挙げられる。

「化学的に合成された化合物」とは、上述の抗体、ポリペプチド、DNA及びRNAを除く任意の化合物であって、分子量約100乃至約1000以下の化合物、好ましくは分子量約100乃至約800の化合物であり、より好ましくは分子量約100乃至約600の化合物を挙げることができる。

上述したポリペプチド、該ポリペプチドの一部（断片）及び融合ポリペプチドは、後述するような遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

本発明における「Edg-7受容体に結合する抗体」は、Edg-7受容体（特に好ましくはヒトEdg-7受容体）を発現する細胞（天然の細胞、株化細胞、腫瘍細胞など）、Edg-7受容体（特に好ましくはヒトEdg-7受容体）をその細胞表面に高発現するように遺伝子組換技術を用いて作製された形質転換体、Edg-7受容体（特に好ましくはヒトEdg-7受容体）を構成するポリペプチド（特に好ましくは細胞外領域を構成するポリペプチド）、または該Edg-7の細胞外領域と他の蛋白質との全部若しくは一部（ヒトIgFc、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、Hisタグなど）とからなる融合ポリペプチドを抗原として用い、該抗原をマウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ等の哺乳動物に免疫して得られる天然型抗体、遺伝子組換技術を用いて製造され得るキメラ抗体及びヒト型抗体（CDR-grafted抗体）、並びにヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され

得るヒト抗体も包含する。

モノクローナル抗体には、IgG、IgM、IgA、IgD あるいは IgE のいずれのアイソタイプを有するモノクローナル抗体もが包含される。好ましくは、IgG または IgM である。

ポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体は、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。即ち、例えば、前述のような抗原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）と ともに、哺乳動物、好ましくは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギに免疫する。

ポリクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。またモノクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た該抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髄腫系細胞（ミエローマ細胞）からハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。

モノクローナル抗体は、具体的には下記のようにして製造することができる。即ち、前述のような抗原を免疫原とし、該免疫原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、非ヒト哺乳動物、具体的には、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ、好ましくはマウス、ラットあるいはハムスター（後述するヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む）の皮下内、筋肉内、静脈内、フッドパッド内あるいは腹腔内に１乃至数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約１乃至 14 日毎に１乃至４回免疫を行って、最終免疫より約１乃至５日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。免疫を施す回数及び時間的イ

ンターバルは、使用する免疫原の性質などにより、適宜変更することができる。

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法（ネイチャー(Nature)、Vol.256, p.495-497, 1975）及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された非ヒト哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製される。

細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマP3/X63-AG8.653（653）、P3/NSI/1-Ag4-1（NS-1）、P3/X63-Ag8.U1（P3U1）、SP2/0-Ag14（Sp2/0、Sp2）、PAI、F0あるいはBW5147、ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag.2.3.、ヒト由来ミエローマU-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、D1R11あるいはCEM-T15を使用することができる。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の前述の免疫感作で用いた免疫抗原に対する反応性を、例えばＲＩＡやＥＬＩＳＡ等の酵素免疫測定法によって測定することにより行なうことができる。

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行い、得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。

インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、

培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

基本培地としては、例えば、Ham'F12培地、MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地等の低カルシウム培地及びMCDB104培地、MEM培地、D-MEM培地、RPMI1640培地、ASF104培地あるいはRD培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び／または種々無機あるいは有機物質等を含有することができる。

モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（ＤＥＡＥまたはＤＥ５２等）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインＡカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。

本発明における「抗体の一部」とは、前述のようなモノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的には$F(ab')_2$、Fab'、Fab、Fv (variable fragment of antibody)、sFv、dsFv (disulphide stabilised Fv) あるいはdAb (single domain antibody) などを意味する (Exp. Opin. Ther. Patents, 第６巻, 第５号, 第441～456頁, 1996年)。

本発明における前立腺疾患とは、具体的には、例えば、前立腺肥大症及び前立腺癌などが挙げられる。前立腺肥大あるいは前立腺肥大症とは、前述した既報に報告されているとおりに症状及び病態を示す疾患である (薬局、Vol.51, No.3, p.3-50, 2000)。

本発明における「前立腺疾患に付随する疾患」とは、排尿障害や排尿障害に伴う膀胱拡張や腎不全を意味する。排尿障害を症状で分類すると刺激症状 (残尿感、尿意切迫、昼間頻尿、夜間頻尿) と閉塞症状 (遷延性排尿、苒延性排尿、尿腺途絶、尿腺細小、いきみ) に分類される。本発明における排尿障害とはそれらい

ずれかの症状を呈する状態を意味する。

本発明における「前立腺上皮細胞からの生理活性物質の分泌」とは、前立腺上皮細胞が該細胞に高い発現の見られるEdg-7受容体を介する刺激を受けた場合に、当該細胞において誘導される種々生理活性物質の分泌を意味する。該生理活性物質には、サイトカイン、増殖因子、ホルモン、酵素あるいは脂質などが包含される。好ましくはサイトカイン、増殖因子または酵素である。サイトカインとしては、例えば、IL-1、IL-6及びET-1などが挙げられる。

例えば、前立腺上皮細胞をEgd-7受容体のリガンドであるLPAで刺激した場合に該細胞からの分泌が誘導される生理活性物質としては、例えば、IL-6及びET-1が挙げられるがこの限りではない。

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トローチ剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。

これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびペッサリーなどが含まれる。

投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分（前記の本発明に係る「物質」など）の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき10μgから1000mg（あるいは10μgから500mg）の範囲で投与することができる。しかしながら、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。

とりわけ注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に0.1μｇ抗体／ml担体～10mg抗体／ml担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、１回の投与において１kg体重あたり、１μｇ～100mgの割合で、好ましくは50μｇ～50mgの割合で、１日あたり１回～数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。

また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。

そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

本発明の医薬組成物は、前立腺疾患（特には、前立腺肥大症、前立腺癌）の発症の予防、前立腺疾患の進行の抑制または前立腺疾患を治療するための医薬品として有用である。また、本発明の医薬組成物は、そうして前立腺疾患（前立腺肥大、前立腺癌など）を抑制することにより前立腺疾患（前立腺肥大、前立腺癌など）によって引き起こされる排尿障害等の症状を緩和または治療することも可能である。

さらに、本発明の医薬組成物は、前立腺疾患（前立腺肥大症や前立腺癌など）の既存の治療方法（例えば、前立腺肥大の治療の場合には抗アンドロゲン剤、α1遮断剤、あるいは抗コリンエステラーゼ剤などによる薬剤療法。）と併用することにより前立腺疾患（前立腺肥大症や前立腺癌など）の治療効果を増大させるこ

とも可能である。

図面の簡単な説明

図１は、抗 Edg-7 受容体抗体を用いた組織免疫染色によるヒト前立腺組織での Edg-7 受容体の発現の状態を示す写真である。

図２は、ヒト前立腺の上皮細胞及び間質細胞の各々での各種 LPA 受容体（Edg-2、Edg-4 及び Edg-7）の相対的発現量を示す図である。

図３は、ヒト前立腺上皮細胞を LPA の不存在下で培養した場合の細胞の形態を示す写真である。

図４は、ヒト前立腺上皮細胞を LPA の存在下で培養した場合の細胞の形態を示す写真である。

図５は、LPA 刺激によるヒト前立腺間質細胞の LPA 濃度依存的な細胞増殖を示す図である。

図６は、LPA 刺激によるヒト前立腺上皮細胞からの LPA 濃度依存的な ET-1 の分泌の増加を示す図である。

図７は、LPA 刺激によるヒト前立腺上皮細胞からの LPA 濃度依存的な IL-6 の分泌の増加を示す図である。

図８は、各種 LPA 受容体（Edg-2、Edg-4 及び Edg-7）を発現する組換え細胞での精液刺激による細胞内カルシウムイオンの上昇（細胞質内へのカルシウムイオンの動員）を示す図である。

図９は、LPA 存在下で培養して得たヒト前立腺上皮細胞の各種の培養上清を、Edg-4 受容体または Edg-7 受容体を発現する組換え細胞に添加した場合の、該細胞質内でのカルシウムイオンの上昇（細胞質内へのカルシウムイオンの動員）の程度を示す図である。

分図 A は、前立腺上皮細胞への LPA の添加から１時間後に回収した培養上清を Edg-4 受容体発現組換え細胞に加えた場合の細胞質内カルシウムイオンの上昇の

程度を示す。

分図Ｂは、前立腺上皮細胞へのLPAの添加から１時間後に回収した培養上清をEdg-7受容体発現組換え細胞に加えた場合の細胞質内カルシウムイオンの上昇の程度を示す。

分図Ｃは、前立腺上皮細胞へのLPAの添加から６時間後に回収した培養上清をEdg-4受容体発現組換え細胞に加えた場合の細胞質内カルシウムイオンの上昇の程度を示す。

分図Ｄは、前立腺上皮細胞へのLPAの添加から６時間後に回収した培養上清をEdg-7受容体発現組換え細胞に加えた場合の細胞質内カルシウムイオンの上昇の程度を示す。

図１０は、LPA存在下で培養して得たヒト前立腺上皮細胞の培養上清または該培養上清から抽出した脂質成分を、ヒト前立腺間質細胞に添加して培養した場合の該間質細胞の増殖の程度を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明が該実施例に記載される態様のみに限定されるものではないことは言うまでもない。

〔実施例１〕　抗Edg-7受容体抗体によるヒト前立腺組織切片の免疫染色

ヒト前立腺組織でのEdg-7受容体の発現を抗Edg-7受容体抗体を用いた免疫染色により解析した。

前立腺肥大症（Benign prostatic hyperplasia；BPH）に罹患している患者の外科的治療時に採取した前立腺組織を４％パラフォルムアルデヒドに4℃で一晩浸漬して固定化した後パラフィンに包埋した。次いで該組織をスライスし８μｍの厚さの組織切片を調製し、この組織切片を以下の免疫染色に用いた。

組織切片をキシレンに浸漬してパラフィンを除き、段階的にエタノール水溶液に浸漬した後リン酸緩衝液（PBS）に水和した。該組織切片を、0.01Mのクエン酸

緩衝液（pH6.0）中でマイクロウェーブオーブンで20分加熱することにより抗原性を回復させた。また、該組織切片を0.33%過酸化水素水／メタノール溶液で処理して内在性パーオキシダーゼ活性を阻害した。次いで該組織切片を冷やしたリン酸緩衝液に浸した後、1.35%の正常ウサギ由来血清（Vector Laboratories, Burlingame, CA)／リン酸緩衝液で室温下30分間処理することによりブロッキングした。

該切片に、1%ウシ血清アルブミン（Sigma, St.Louis, MO）で30倍に希釈した抗ヒトEdg-7受容体ラットモノクローナル抗体を載せ4℃で一晩インキュベートした。該抗体の組織切片への結合の程度をVECTASTAIN Elite ABC Rat IgG Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用い、当該キットに添付の取扱説明書に従ってABC (avidin-biotinylated enzyme complex) 法により解析した。発色基質として3,3'-diaminobenzidine (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて組織切片への抗体の結合を可視化した。また、切片をMayer's hematoxylin (Wako Pure Chemical Industories, Osaka, Japan) を用いて対比染色した。

結果を図1に示す。

この結果、抗Edg-7受容体抗体により前立腺上皮細胞の主分泌細胞の分泌腔側細胞膜が特異的に染色された。

この結果は、ヒトEdg-7受容体が、前立腺上皮細胞の主分泌細胞の分泌腔側膜表面に高く発現していることを示す。

〔実施例2〕　ヒト前立腺の上皮細胞及び間質細胞におけるLPA受容体（Edg-2, Edg-4, Edg-7）の発現

ヒト前立腺の上皮細胞及び間質細胞におけるLPA受容体（Edg-2, Edg-4, Edg-7）の発現及びそれらの相対的発現量をRT-PCR法を用いて解析した。

前立腺肥大症（BPH）に罹患している患者の外科的手術時に採取した前立腺組織を固定化した後スライスし、4μmの厚さの凍結切片を調製した。該組織切片を95%エタノールに浸した後、DEPC処理水で洗浄し、OCT Comoundを除去した。次い

で、該切片を95%エタノール及び100%エタノールで順次洗い、キシレンで２回洗浄した後、PixCell II（Acturus社製）を用いてレーザーキャプチャーマイクロダイセクション（各細胞につき2,000回づつ）により上皮細胞と間質細胞を各々分離した。上皮細胞及び間質細胞の各々を30μlのTRIzol（Life Technology社）に懸濁し、凍結した。

各々の細胞につき、TRIzol溶液から全RNAを調製し、各20μlの滅菌蒸留水に溶解した。調製したRNA（20μl）の内、各14μlはランダムヘキサマー（random hexamer）をプライマーとして、全70μlで逆転写反応を行いcDNAを合成した。残りの各6μlは、逆転写酵素を加えずに全30μlで同様の反応を行った。反応は、TaqMan Reverse Transcription Reagents (PE Biosystems, N808-0234) を用い、取扱説明書に従い行った。PCR反応は、TaqMan PCR Core Reagent Kit (Applied Biosystems, P/N N808-0228) 及びSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, P/N N4309155) を用い、取扱説明書に従い行った。測定は、ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systemを用いて取扱説明書に従って行った。

プライマーは、ヒトEdg-2受容体については、配列番号１及び配列番号２に記載のDNAを、ヒトEdg-4受容体については、配列番号３及び配列番号４に記載のDNAを、またEdg-7受容体については、配列番号５及び配列番号６に記載のDNAを用いた。なお、cDNAの定量は、各受容体のcDNAの段階的希釈物で作出した検量線に基づき行った。

結果を図２に示す。

この結果、前立腺の上皮細胞ではEdg-7受容体の顕著な発現が見られ、また間質細胞ではEdg-2受容体の顕著な発現が見られた。

〔実施例３〕　リゾフォスファチジン酸（LPA）による前立腺上皮細胞の形態変化

LPA受容体であるEdg-7受容体の高い発現が確認された前立腺上皮細胞に対してLPAが与える形態学的変化の有無を解析した。

ヒト正常前立腺上皮細胞（Clonetics社、CC-2555）を培地PrEGM（Clonetics

社）を用いて 9.6×10^4 cells/well の濃度で6穴プレートに播種した。一晩培養した後、各ウェルに10μMの1-oleoyl LPA（Avanti Polar Lipid社）を添加した。

LPAの添加から6時間後に細胞の形態変化を顕微鏡下で写真撮影した。LPA添加から2日間培養した後、各ウェルにトリプシンEDTA（1ml）を添加し室温下で5分間静置した後、トリプシン阻害剤（1ml）を添加して反応を止め、次いで、細胞を剥がして細胞を懸濁させた。懸濁した細胞を遠心分離（1,300rpm×5分）した後、ISTON II（15ml）に懸濁し、コールターカウンターZM型を用いて細胞数を計数した。

なお、対照として、LPAを加えないで上記と同様の試験を行った。

結果を図3及び図4に示した。

この結果、ヒト正常前立腺上皮細胞にLPAを作用させると細胞が凝集し明らかな形態変化が観察された。また細胞の増殖の程度については、LPAを作用させた場合には $2.6\pm0.5\times10^5$ cells/well であり、一方LPAを加えない場合には $4.2\pm0.5\times10^5$ cells/well であった。

〔実施例4〕　LPAによる前立腺間質細胞の増殖

LPA受容体であるEdg-2受容体の高い発現が確認された前立腺間質細胞の増殖に対してLPAが与える効果の有無を解析した。

ヒト正常前立腺間質細胞（Clonetics社、CC-2508）をSCGM（Clonetics社）及びSCBM（Clonetics社）を1:9で混合して調製した培地（1/10SCGM）を用いて 3.2×10^3 cells/well の濃度で96穴プレートに播種した。一晩培養した後、各ウェルに各種濃度の1-oleoyl LPA（Avanti Polar Lipid社）を添加した。

LPA添加から一晩培養した後、各ウェルにBrdUを添加して培養した。測定直前4時間におけるBrdUの細胞内への取込量をCell Proliferation ELISA Kit（Roche Diagnostic社）を用いて取扱説明書に従って測定した。

なお、対照として、LPAを加えないで上記と同様の試験を行った。

結果を図５に示した。

この結果、ヒト正常前立腺間質細胞にLPAを作用させるとLPAの濃度依存的に増殖した。

〔実施例５〕　LPAによる前立腺上皮細胞からのET-1及びIL-6の分泌に対する効果

前立腺由来の細胞からは、エンドセリン-1（Endothelin-1；ET-1）及びインターロイキン-6（Interleukin-6；IL-6）が分泌されることが報告されている。

本試験では、前立腺の上皮細胞からのこれらの因子の分泌の有無、並びに該上皮細胞からのこれらの因子の分泌に対するLPA刺激の効果について解析した。

＜5-1＞　前立腺上皮細胞からのET-1及びIL-6の分泌

ヒト正常前立腺上皮細胞（Clonetics社、CC-2555）を培地PrEGM（Clonetics社）を用いて9.6×10^4 cells/wellの濃度で６穴プレートに播種した。一晩培養した後、各ウェルに10μMの1-oleoyl LPA（Avanti Polar Lipid社）を添加した。LPAの添加から２日間培養した後、培養上清を回収した。

該培養上清中に含まれるET-1を、BIOTRAK human Endothelin-1 Immunoassay kit（Amersham Pharmacia Biotech社）を用いて、またIL-6の量を、Quantikine Human IL-6 ELISA Kit（R&D社）を用いて取扱説明書に従って定量した。

なお、対照として、LPAを加えないで上記と同様にして試験をした。

その結果、前立腺上皮細胞（LPAを加えない場合）からET-1及びIL-6が各々3.8±1.0pM及び5.4±0.4pg/ml分泌されており、前立腺上皮細胞からET-1及びIL-6が分泌されることが分かった。

また、LPAを加えて培養した場合の前立腺上皮細胞からのET-1及びIL-6の分泌量は、各々55.6±10.0pM及び61.7±8.0pg/mlであり、LPAを加えない場合の分泌量に比べ、各々14.6倍及び11.5倍に増加していた。

この結果は、LPAが前立腺上皮細胞に発現するLPA受容体であるEdg-7受容体に作用することにより、該上皮細胞からのET-1及びIL-6の分泌が増加されるこ

とを示している。

さらに、前立腺上皮細胞からのET-1及びIL-6の分泌に対するLPAの濃度による効果を以下のとおり解析した。

<5-2> 各種濃度のLPAによる前立腺上皮細胞からのET-1の分泌

ヒト正常前立腺上皮細胞（Clonetics社、CC-2555）をPrEGM（Clonetics社）及びPrEBM（Clonetics社）を1:19で混合して調製した培地（1/20PrEGM）を用いて2.0×10^4 cells/wellの濃度で24穴プレートに播種した。一晩培養した後、各ウェルに各種濃度の1-oleoyl LPA（Avanti Polar Lipid社）を添加した。LPAの添加から24時間培養した後、培養上清を回収した。該培養上清中に含まれるET-1の量を、BIOTRAK human Endothelin-1 Immunoassay kit（Amersham Pharmacia Biotech社）を用いて取扱説明書に従って定量した。

結果を図6に示す。

この結果から、LPAの濃度依存的に前立腺上皮細胞からのET-1の分泌が誘導されることが分かった。

<5-3> 各種濃度のLPAによる前立腺上皮細胞からのIL-6の分泌

ヒト正常前立腺上皮細胞（Clonetics社、CC-2555）をPrEGM（Clonetics社）及びPrEBM（Clonetics社）を1:19で混合して調製した培地（1/20PrEGM）を用いて2.0×10^4 cells/wellの濃度で24穴プレートに播種した。一晩培養した後、各ウェルに各種濃度の1-oleoyl LPA（Avanti Polar Lipid社）を添加した。LPAの添加から24時間培養した後、培養上清を回収した。該培養上清中に含まれるIL-6の量を、Quantikine Human IL-6 ELISA Kit（R&D社）を用いて取扱説明書に従って定量した。

結果を図7に示す。

この結果から、LPAの濃度依存的に前立腺上皮細胞からのIL-6の分泌が誘導されることが分かった。

〔実施例6〕 LPA受容体（Edg-2, Edg-4, Edg-7）に対するヒト精液の反応性

男性の精液中におけるLPAの存在、並びに該精液の３種のLPA受容体（Edg-2受容体、Edg-4受容体、及びEdg-7受容体）、特に前立腺上皮細胞に高く発現するEdg-7受容体に対する反応性を解析した。

各受容体の精液に対する反応性は、各受容体を発現する組換え細胞に精液を加えて誘導されるであろう細胞質内へのカルシウムイオンの動員（細胞質内カルシウム濃度の増大）の程度を測定することにより解析した。

既報に従って、ヒトEdg-2受容体、ヒトEdg-4受容体及びヒトEdg-7受容体の各々を発現させるためのバキュロウイルスベクターを作製した（J. Biol. Chem., Vol.274, p.27776-27785, 1999；FEBS Letters, Vol.478, p.159-165, 2000）。該ベクターを用いて各受容体をコードする遺伝子を導入した組換えバキュロウイルスを調製した。宿主細胞として用いる昆虫細胞Sf9は、無血清培地EX-CELL420（JRH Bioscience社）を用いて27℃で培養した。

Sf9細胞（6×10^5個）に上記で得た各組換えバキュロウイルスを感染させ、27℃で培養して各種LPA受容体を発現する組換え細胞を調製した。48時間後に、細胞をMBS栄養液（pH6.2）で穏やかに洗浄した後、2mMのFura-2-acetoxymethyl ester（Fura-2-AM; Molecular Probes Inc.）を組換え細胞に取込ませた。なお、該MBSは、10mMのNaCl、60mMのKCl、17mMの$MgCl_2$、10mMの$CaCl_2$、110mMのsucrose、4mMのglucose、脂肪酸フリー（fatty acid-free）の0.1%ウシ血清アルブミン（Sigma社）及び10mMのmorpholinoethanesulfonic acidからなる。次いで、細胞をMBSで洗浄して過剰のFura-2AMを除去した後、細胞を1×10^6 cells/mlの濃度でMBSに再懸濁させた。

該再懸濁させた各種LPA受容体を発現する組換え細胞の各々に健康な日本人男性から採取した精液を添加し、精液の添加の前後の細胞質内カルシウムイオン濃度をCAF-110細胞質内カルシウム測定装置（日本分光社）を用いて、励起波長340nm及び380nm並びに蛍光波長500nmで測定した。

結果を図８に示す。

この結果、ヒト精液は、Edg-7受容体を発現する細胞に対してのみ反応し、細胞質内カルシウムイオン濃度を上昇させることが明らかとなった。

この結果並びにLPA受容体であるEdg-7受容体の高い発現が前立腺上皮細胞に見られるという事実（上述）から、精液中に含まれるLPAは前立腺上皮細胞上のEdg-7受容体に作用して前立腺上皮細胞に生物学的応答を惹起することを示している。

〔実施例７〕　LPA刺激した前立腺上皮細胞からの脂質の産生

前記実施例において、LPAの刺激により前立腺上皮細胞からのET-1及びIL-6の分泌がLPAの濃度依存的に増加することを明らかにした。本試験では、LPAの刺激による前立腺上皮細胞からの脂質の産生の有無をLPA刺激による細胞質内カルシウムイオンの増加を指標に解析した。

ヒト正常前立腺上皮細胞（Clonetics社、CC-2555）を培地PrEGM（Clonetics社）を用いて培養フラスコ（75cm^2）に播種した。1日培養後、培地をPrEGMに交換しさらに1日間培養した。次いで、培地を新しい2.5mg/mlの脂肪酸フリー（fatty acid-free）牛血清アルブミン（Sigma製）を添加したPrEBM（15ml/dish）に交換し、10μMの1-oleoyl LPA（Avanti Polar Lipids社）を添加して細胞培養した。LPAの添加から1時間及び6時間後の各々に培養上清を回収した。

T-25フラスコ中でSf9細胞（５×10^{6}個）に、前記実施例で調製したヒトEdg-4受容体及びヒトEdg-7受容体の各々をコードするDNAを導入した組換えバキュロウイルスを感染させ、2日間培養し各々の受容体を発現する組換え細胞を調製した。フラスコから細胞を剥がし、2mMのFura-2-acetoxymethyl ester（Fura-2-AM; Molecular Probes Inc.；10ml）を含むMBS栄養液（pH6.2）中に懸濁させた。なお、該MBSは、10mMのNaCl、60mMのKCl、17mMの$MgCl_2$、10mMの$CaCl_2$、110mMのsucrose、4mMのglucose、脂肪酸フリー（fatty acid-free）の0.1%ウシ血清アルブミン（Sigma社）及び10mMのmorpholinoethanesulfonic acidからなる。遮光し、27℃で1時間培養し、Fura-2AMを細胞に取込ませた。次いで、細胞

をMBSで洗浄して過剰のFura-2AMを除去した後、細胞を1×10^6 cells/mlの濃度でMBSに再懸濁させた。

再懸濁させた各細胞を150μl/well（1.5×10^5 cells/well）の濃度で96穴マイクロプレートに分注し、上記で回収した前立腺上皮細胞の培養上清の各々（50μl/well）を添加し、該培養上清の添加の前後の細胞質内カルシウムイオン濃度をFDSS2000（浜松フォトニクス社）を用いて、励起波長340nmによる蛍光と励起波長380nmでの蛍光の比を測定した。

結果を図９（分図A、B、C及びD）に示す。

この結果、前立腺上皮細胞へのLPAの添加から１時間後に回収した培養上清を組換え細胞に加えた場合には、Edg-4受容体発現組換え細胞及びEdg-7受容体発現組換え細胞のいずれにおいても細胞質内カルシウムイオンの上昇（細胞質内へのカルシウムイオンの動員）が見られた（分図A及びB）。

一方、前立腺上皮細胞へのLPAの添加から６時間後に回収した培養上清（"6時間培養上清"）を組換え細胞に加えた場合には、Edg-4受容体発現組換え細胞では、細胞質内カルシウムイオンの上昇（細胞質内へのカルシウムイオンの動員）が見られたが（分図C）、該"6時間培養上清"をEdg-7受容体発現組換え細胞に加えた場合には細胞質内カルシウム濃度の上昇は見られなかった（分図D）。

この結果は下記のように解析された。

（１）　前立腺上皮細胞に添加した1-oleoyl LPAが、添加から６時間後には消失し、その代わりに該細胞の培養上清中にEdg-4受容体には反応する脂質であるLPA（例えば、1-palmytoyl LPA）が産生されたと解釈された。

（２）しかし、さらなる解析の結果、該"６時間培養上清"中には、Edg-7受容体に反応する脂質（添加した1-oleoyl LPA）が残存しているが、その活性が何らかの原因でマスクされているものと考えられた。

そこで、LPAで刺激された前立腺上皮細胞から、LPA以外に前立腺間質細胞を増殖させる物質が産生されるか否かを検討するために次の実験を行った。

〔実施例８〕　LPA刺激した前立腺上皮細胞からの脂質の産生及び該上皮細胞の培養上清の前立腺間質細胞の増殖活性

<8-1>　LPA刺激した前立腺上皮細胞の培養上清の取得

ヒト前立腺上皮細胞（Clonetics社；4428-1）を培地PrEGM（Clonetics社）を用いて培養フラスコ（75cm^2）に播種した。１日培養後、培地をPrEBMに交換しさらに１日間培養した。次いで、培地を2.5mg/mlの脂肪酸フリー牛血清アルブミン（Sigma製）を添加したPrEBM（15ml/dish）に交換し、10μMの1-oleoyl LPA（Avanti Polar Lipids社）を添加して細胞培養した。LPAの添加から６、12、24、36及び48時間後の各々に培養上清を回収した。

<8-2>　LPA刺激前立腺上皮細胞の培養上清からの脂質成分の抽出

上記で回収したLPA刺激した前立腺上皮細胞の培養上清（3.6 ml）をガラス遠心管に分注し、1 N塩酸（400 μl）、MeOH（10 ml）及び$CHCl_3$（5 ml）を添加し、激しく攪拌して混合した。次いで、$CHCl_3$（5 ml）及びMilli Q水（5 ml）を添加し、激しく攪拌して混合した後、3,000 rpmで５分間遠心し、下層（有機溶媒層）をパスツールピペットで回収した。

遠心上層（水層）に、混合液（$CHCl_3$/MeOH/Milli Q Water = 10/10/9）を加え十分に攪拌した後静置して得た下層（有機溶媒層；11 ml）を添加し、激しく攪拌し混合した後、3,000 rpmで５分間遠心し下層（有機溶媒層）をパスツールピペットで回収した。

２回の遠心分離で得られた各下層（有機溶媒層）をナス型フラスコに合わせ、ロータリーエバポレーターで減圧乾固した。次いで、混合溶液（$CHCl_3$/MeOH= 1/1；3.6 ml）添加して溶解、回収し、－20℃で保存した。

<8-3>　前立腺上皮細胞で増殖試験

前立腺間質細胞の増殖は、市販のキット（Cell Proliferation ELISA, BrdU (Colorimetric；Roche Diagnostics製）を用いて測定した。

ヒト正常前立腺間質細胞（Clonetcs社、CC-2508）をSCGM（Clonetcs社）お

よびSCBM（Clonetics社）を１：19で混合して調整した培地（1/20 SCGM）を用いて96穴マイクロプレートに分注し（250 μl/well；3.2×10^3 dcells/well）一晩培養した。

培養上清のうち200μl/wellを除き、上記で回収したLPA刺激前立腺上皮細胞の培養上清及び上記で該培養上清から調製した脂質抽出液を乾固しBSA含有PrEBMに再溶解した溶液を50 μl/well添加して培養した。

一方、ポジティブコントロールとして、培養上清全量を除き、SCGMとBSA含有PrEBMとの１：１混合液を100 μl/well添加した。

22.8時間の培養後、Cell Proliferation ELISAキットの取扱説明書に従い、BrdU標識液（10μl/well）を添加してさらに４時間培養した後、ELISAを行い細胞増殖の程度を測定した。また、培養上清中のLPAの濃度も同時に測定した。

結果を図10に示す。

その結果、培養開始時点（０時間）での細胞増殖活性は、前立腺上皮細胞を刺激するために加えた1-oleoyl LPAによるものであると考えられた。

また、添加された1-oleoyl LPAは培養上清中から急速に減少した。それにもかかわらず前立腺上皮細胞培養上清の前立腺間質細胞に対する増殖活性は増加したことから、LPA刺激された前立腺上皮細胞培養上清中に前立腺間質細胞を増殖させる生理活性物質が産生されたことが示された。

また、脂質成分の前立腺間質細胞に対する増殖活性は24時間迄は減少するものの、培養上清全体（total）の前立腺間質細胞に対する増殖活性は増加していることから、LPA刺激された前立腺上皮細胞の培養上清中に前立腺間質細胞に対する増殖活性を有する水溶性の生理活性物質が産生されたと考えられた。

さらに、脂質成分中の前立腺間質細胞に対する増殖活性は、LPA濃度が培養時間の経過とともに減少しほぼゼロに近づいた約24時間以降で上昇に転じ48時間目まで暫時増加した。これは、添加されたLPAの減少の効果と、LPA刺激で新たに産生された前立腺間質細胞に対する増殖活性を持つ脂質の効果が重ねられてい

るからであると考えられた。

なお、LPAを添加しないで培養したヒト正常前立腺上皮細胞の培養液、および該培養上清からの脂質抽出液中には、上記のようなヒト正常前立腺間質細胞を増殖させる活性は見られなかった。

この結果から、LPAで刺激される事により、前立腺上皮細胞培養上清中に、前立腺間質細胞に対する増殖活性を持つ生理活性物質が新たに誘導される事、また該前立腺間質細胞に対する増殖活性を持つ物質には、水溶性の物質と脂質性の物質がある事が示された。

前記に示した各種試験結果から、男性固有の疾患である前立腺疾患、特に前立腺肥大の発生のメカニズムが、男性の精液中に含まれるLPAと前立腺の上皮細胞上のLPA受容体であるEdg-7受容体との相互作用に始まり、その結果前立腺上皮細胞から種々の生理活性物質（水溶性物質及び脂質など）が分泌され、それらの生理活性物質が前立腺の間質細胞に作用することにより該間質細胞が増殖する事が示された、このプロセスは前立腺肥大の進行に深く関与すると推察された。

最近の研究により前立腺癌の患者の前立腺組織ではET-1の発現が上昇しておりET-1が前立腺癌の標的になりうることが示唆されている（Invest. New Drugs, 20(2), 173-82, 2002）。また、前立腺癌の患者の組織では正常な組織に比べてIL-6蛋白の産生の顕著な増加が観察され、IL-6は前立腺癌の進行にオートクラインに働く因子であることが報告されている(Am. J. Pathol., 159(6), 2159-65, 2001）。

即ち、上述した試験結果から、前立腺上皮細胞上のEdg-7受容体を介するシグナル伝達により誘導される該上皮細胞からの種々生理活性物質（特に、ET-1やIL-6など）が前立腺癌の発生や進行に深く関与することが示された。

しかして、前立腺上皮細胞や精巣の細胞で高発現するEdg-7受容体は前立腺肥大症や前立腺疾患の症状の抑制や治療のための治療方法や薬剤の開発のために極めて重要な標的であることが示された。

〔実施例９〕 Edg-7受容体を介するシグナル伝達及び前立腺上皮細胞からの生理活性物質の分泌の阻害

〈9-1〉 LPA刺激による細胞質内カルシウム濃度の増加の阻害

Sf9細胞をフラスコに播き接着させた後、前記実施例で調製したヒトEdg-7受容体をコードするDNAを導入した組換えバキュロウイルス（1ml）を加え細胞に感染させ、2日間培養してヒトEdg-7受容体を発現する組換え細胞を調製した。細胞を剥がし、50mlチューブに移し遠心し培地を捨てた。回収した細胞分画を、Mes-Tris（pH6.2）で希釈したFura-2（Fura-2-acetoxymethyl ester; Molecular Probes Inc.；2μM）を含む栄養液中に懸濁させ（30ml/flask）27℃で1時間培養してFura-2を細胞内に取り込ませた。次いで細胞をMes-Tris（pH6.2）で遠心洗浄した。細胞をトリパンブルーで染色して細胞数を計数し2.5×10^5cells/mlに調製した。

細胞懸濁液（500μl）を市販の細胞内カルシウム濃度測定器（CAF-110；日本分光製）のキュベットに加え、次いで下記化合物の溶液（5μl）を加えた。

4-[2-(2-9H-Fluoren-9-yl-acetylamino)-ethyl]-benzoic acid 2-[2-methoxy-2-(3-trifluoromethyl-phenyl)-ethylamino]-ethyl ester

該化合物の添加から60秒後にLPA溶液（5μl；終濃度：1μM）を加え、励起光（波長340nm; 380nm）を照射して発生する蛍光（波長：500nm）を検出し細胞内カルシウム濃度を求めた。

なお、対照として、上記の化合物を加えない場合の細胞内カルシウム濃度を同様にして求めた［値：A］。

その結果、前記で求めた値Aを50%阻害する上記化合物の濃度は、1.5μMであった。

〈9-2〉 LPA刺激前立腺上皮細胞からのIL-6の分泌の阻害

ヒト前立腺上皮細胞を栄養培地（F12:RPMI1640=1:1の混合物；成長因子を添加。）中でコンフルエントになるまで培養した。次いで培地を捨て、PBSで細胞を

洗浄した。Tripsin-EDTAを用いて細胞を剥がして細胞を回収し、遠心後、細胞数を計数し5×10^5cells/mlに調製し、24穴マイクロプレートに2×10^4cells/well（400μl/well）で播種した。細胞を24時間静置培養した後、上記化合物（終濃度：0.1、1及び10μM）を添加し、その直後にLPA溶液（終濃度：1μM）を添加した。化合物添加から6時間培養後の培養上清（300μl/well）を回収し、遠心により上清（200μl）を回収し、前記実施例に記載と同様にして該遠心上清中に含まれるIL-6の濃度を測定した。

なお、対照として、上記の化合物を加えない場合のIL-6濃度を同様にして求めた［値：A］。

その結果、前記で求めた値Aを50%阻害する上記化合物の濃度は、2.3μMであった。

産業上の利用の可能性

本発明の医薬組成物は、前立腺疾患（例えば、前立腺肥大及び前立腺癌など）の発症の予防、該前立腺疾患の進行の抑制または該前立腺疾患を治療するための医薬品として有用である。

また、本発明の医薬組成物は、そうして前立腺疾患（特には前立腺肥大）を抑制することにより前立腺疾患（特には前立腺肥大）によって引き起こされる排尿障害等の症状を緩和または治療することが可能である。

さらに、本発明の医薬組成物は、前立腺疾患の既存の治療方法（例えば前立腺肥大症の治療の場合には、抗アンドロゲン剤、α1遮断剤、あるいは抗コリンエステラーゼ剤などによる薬剤療法）と併用することにより該前立腺疾患（例えば前立腺肥大症、前立腺癌など）の治療効果を増大させることが可能である。

請求の範囲

１．　Edg-7受容体を介する刺激により惹起される細胞内へのシグナル伝達を阻害する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、前立腺疾患の発症の予防、前立腺疾患の進行の抑制、前立腺疾患の治療または前立腺肥大に付随する疾患の治療をするための医薬組成物。

２．　該物質が、細胞質内へのカルシウムイオンの動員を阻害する活性を有するものであることを特徴とする請求項１に記載の医薬組成物。

３．　該物質が、前立腺上皮細胞からの生理活性物質の分泌を阻害する活性を有するものであることを特徴とする請求項１に記載の医薬組成物。

４．　該生理活性物質が、エンドセリン－１（ET-1）、インターロイキン－６（IL-6）または脂質であることを特徴とする請求項３に記載の医薬組成物。

５．　該前立腺疾患が、前立腺肥大症または前立腺癌であることを特徴とする請求項１乃至請求項４のいずれかに記載の医薬組成物。

６．　該前立腺肥大に付随する疾患が排尿障害であることを特徴とする請求項１乃至請求項５のいずれかに記載の医薬組成物。

７．　該物質が、Edg-7受容体拮抗物質であることを特徴とする請求項１乃至請求項６のいずれかに記載の医薬組成物。

８．　該物質が、Edg-7受容体に結合する抗体またはその一部であることを特徴とする請求項１乃至請求項６のいずれかに記載の医薬組成物。

９．　該物質が、ＤＮＡまたはＲＮＡであることを特徴とする請求項１乃至請求項６のいずれかに記載の医薬組成物。

１０．　該物質が、化学的に合成された化合物であることを特徴とする請求項１乃至請求項６のいずれかに記載の医薬組成物。

図1

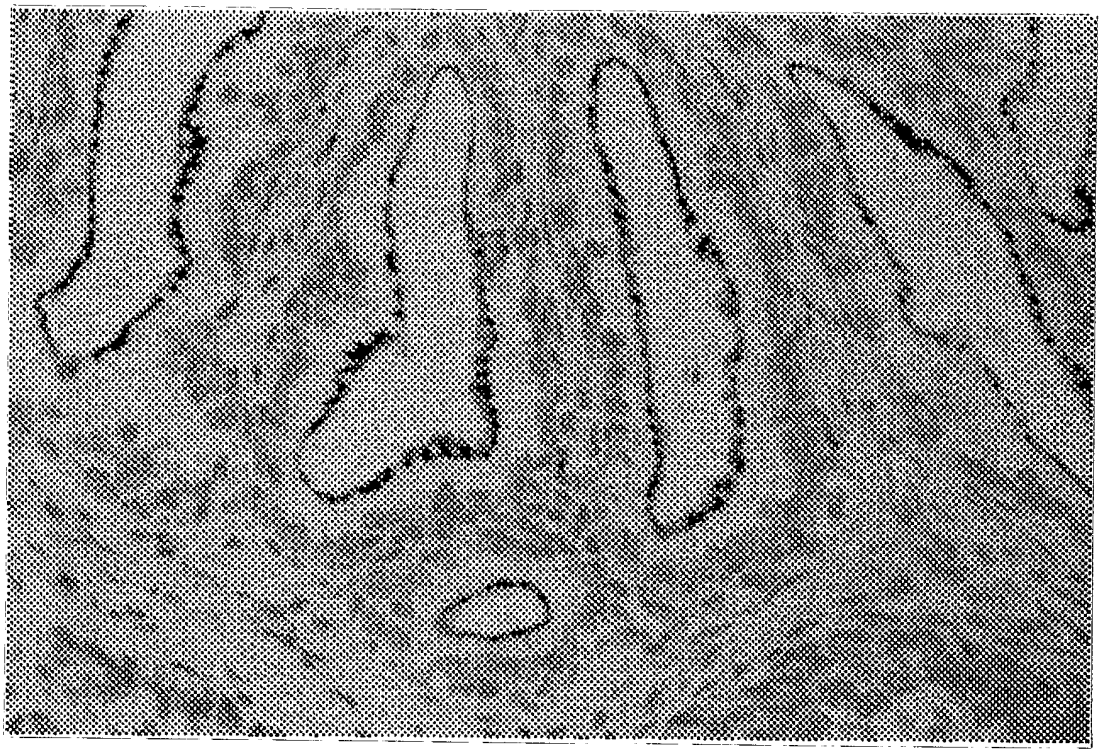


図2

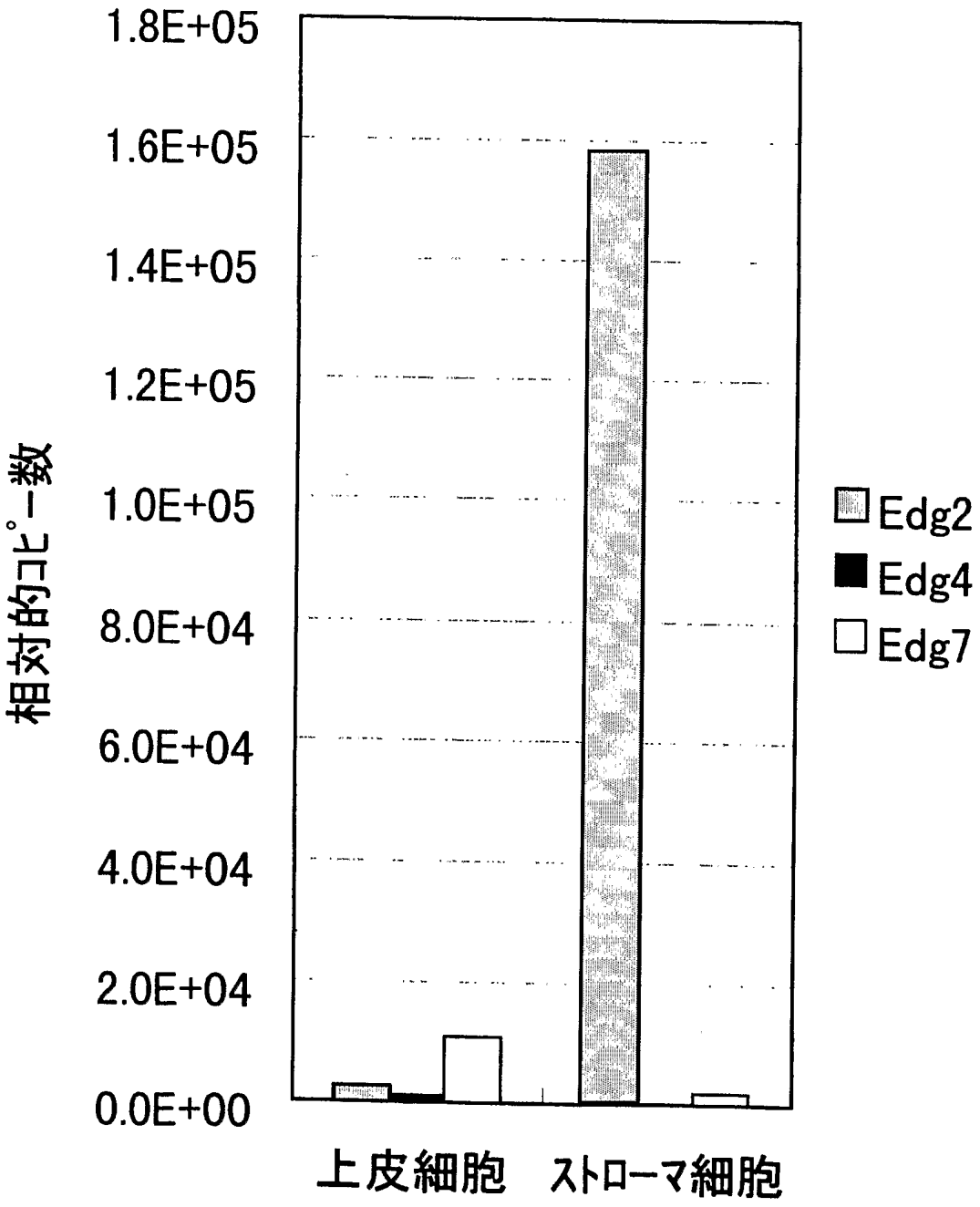

1.8E+05
1.6E+05
1.4E+05
1.2E+05
1.0E+05
8.0E+04
6.0E+04
4.0E+04
2.0E+04
0.0E+00
相対的コピー数
Edg2
Edg4
Edg7
上皮細胞
ストローマ細胞

図3

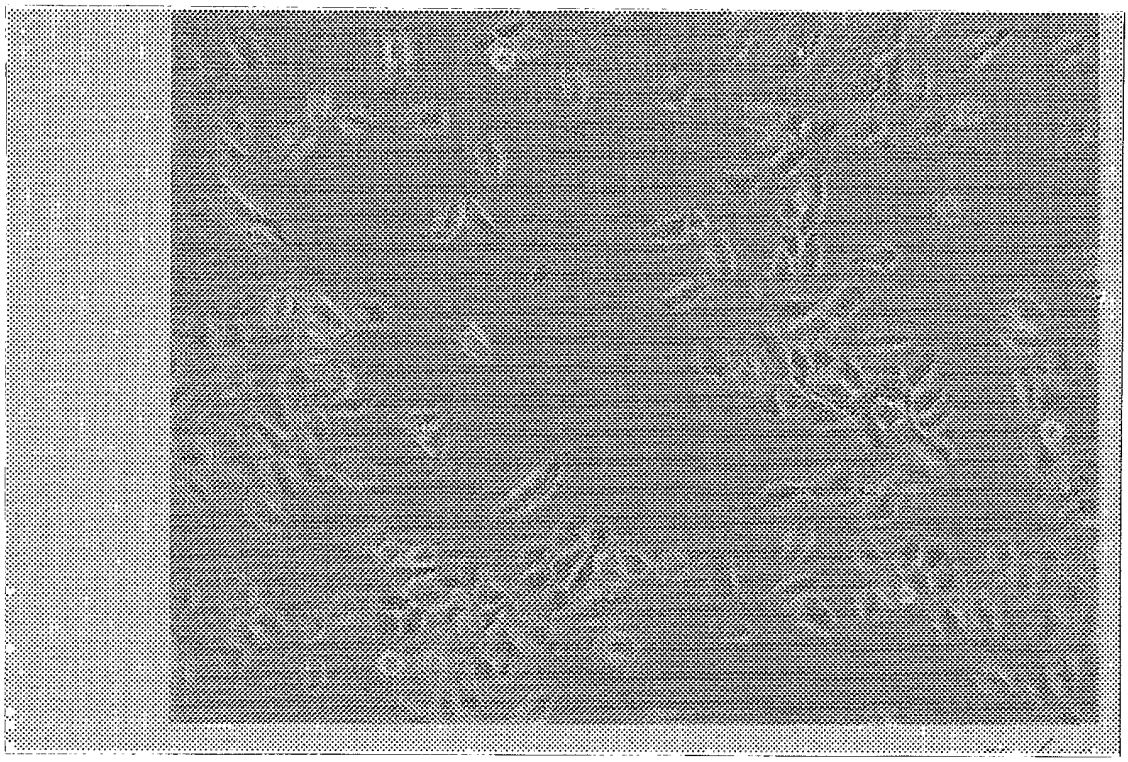


図4

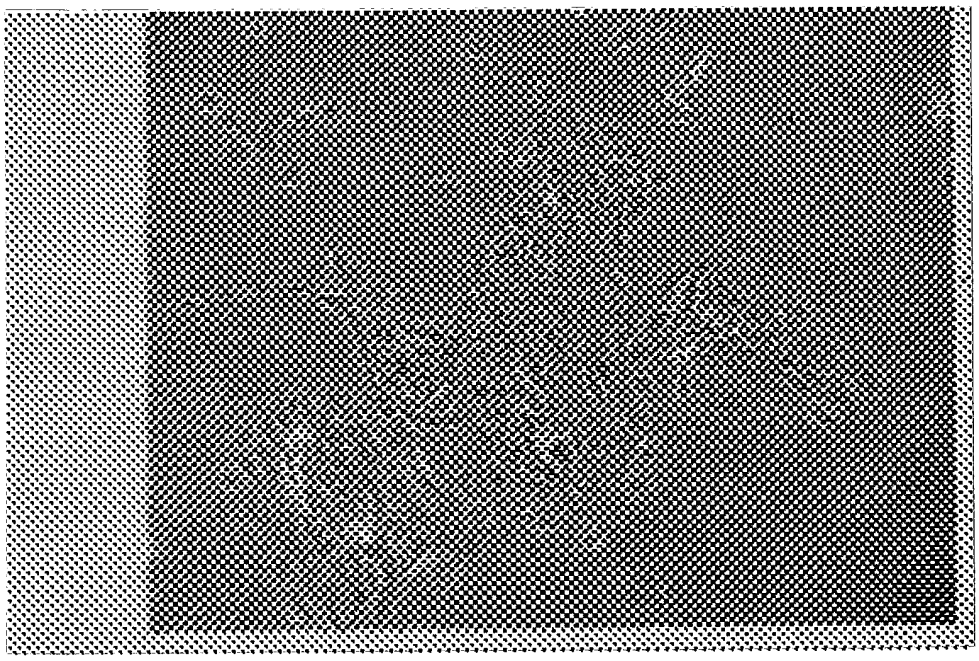
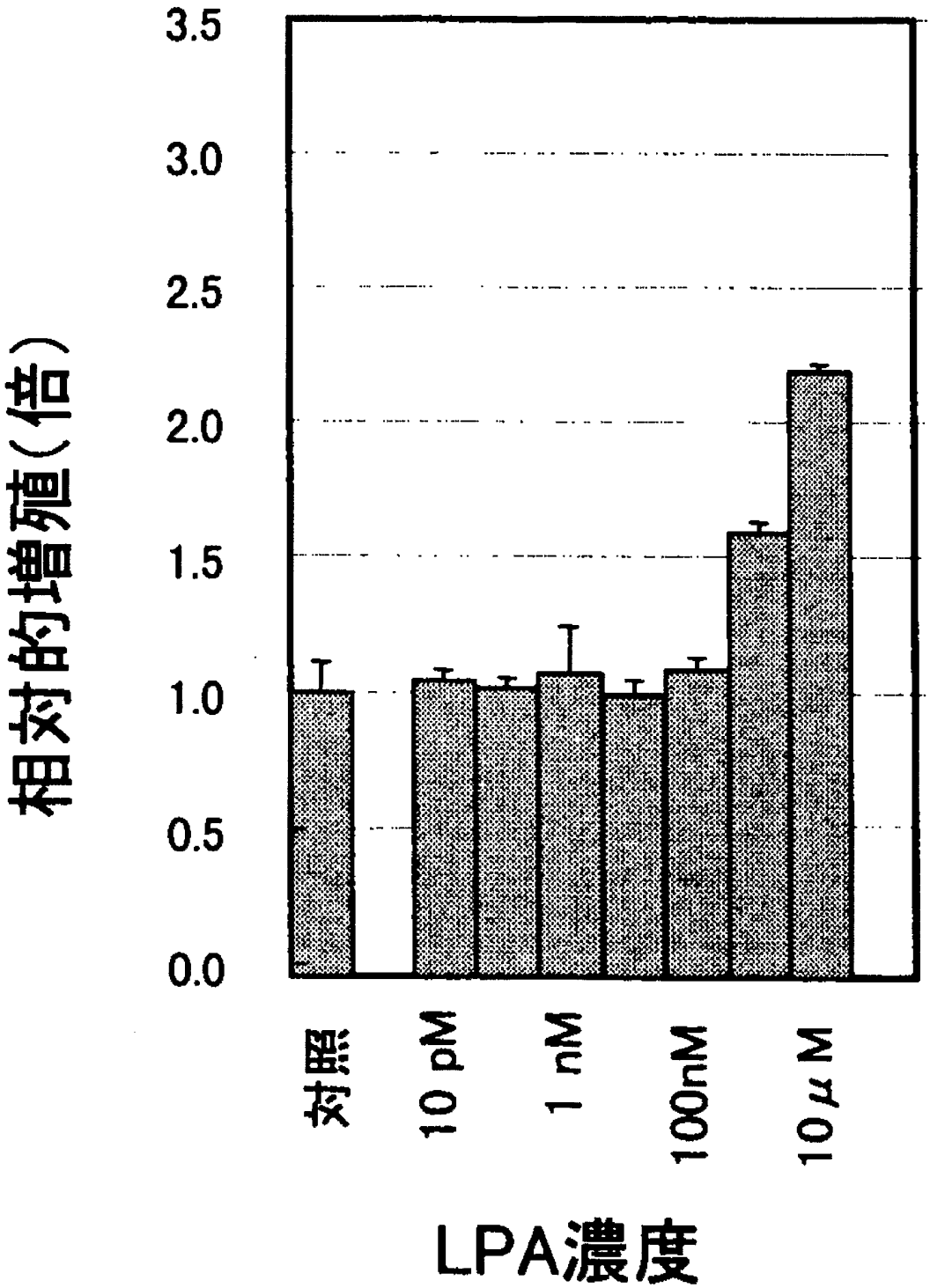


図5



ET-1濃度(pM)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
LPA無し
10 pM
100 pM
1 nM
10 nM
100 nM
1 μM
10 μM
LPA濃度

図6

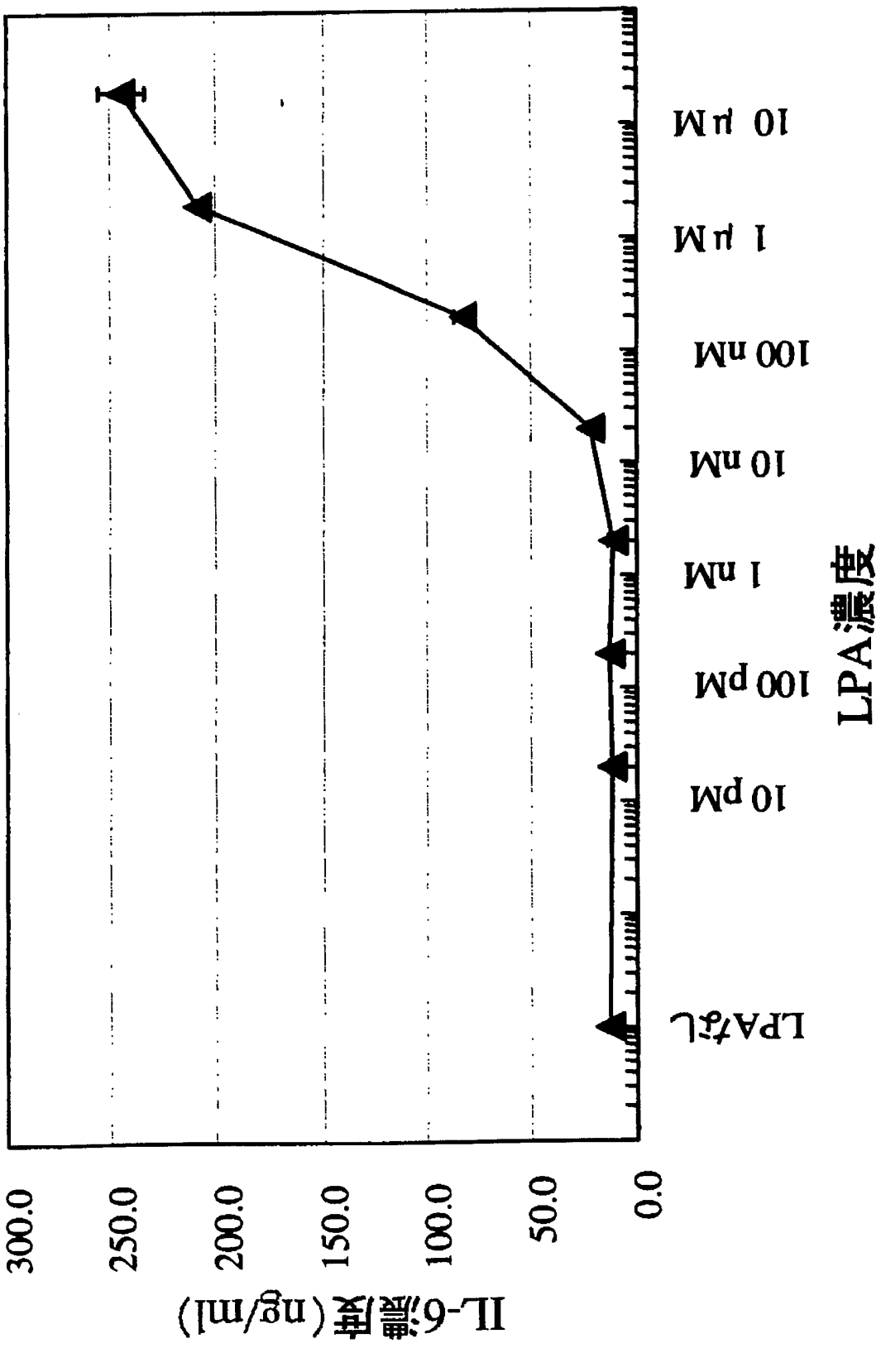

IL-6濃度(ng/ml)
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
LPA濃度
LPAなし
10 pM
100 pM
1 nM
10 nM
100 nM
1 μM
10 μM

図7

図8

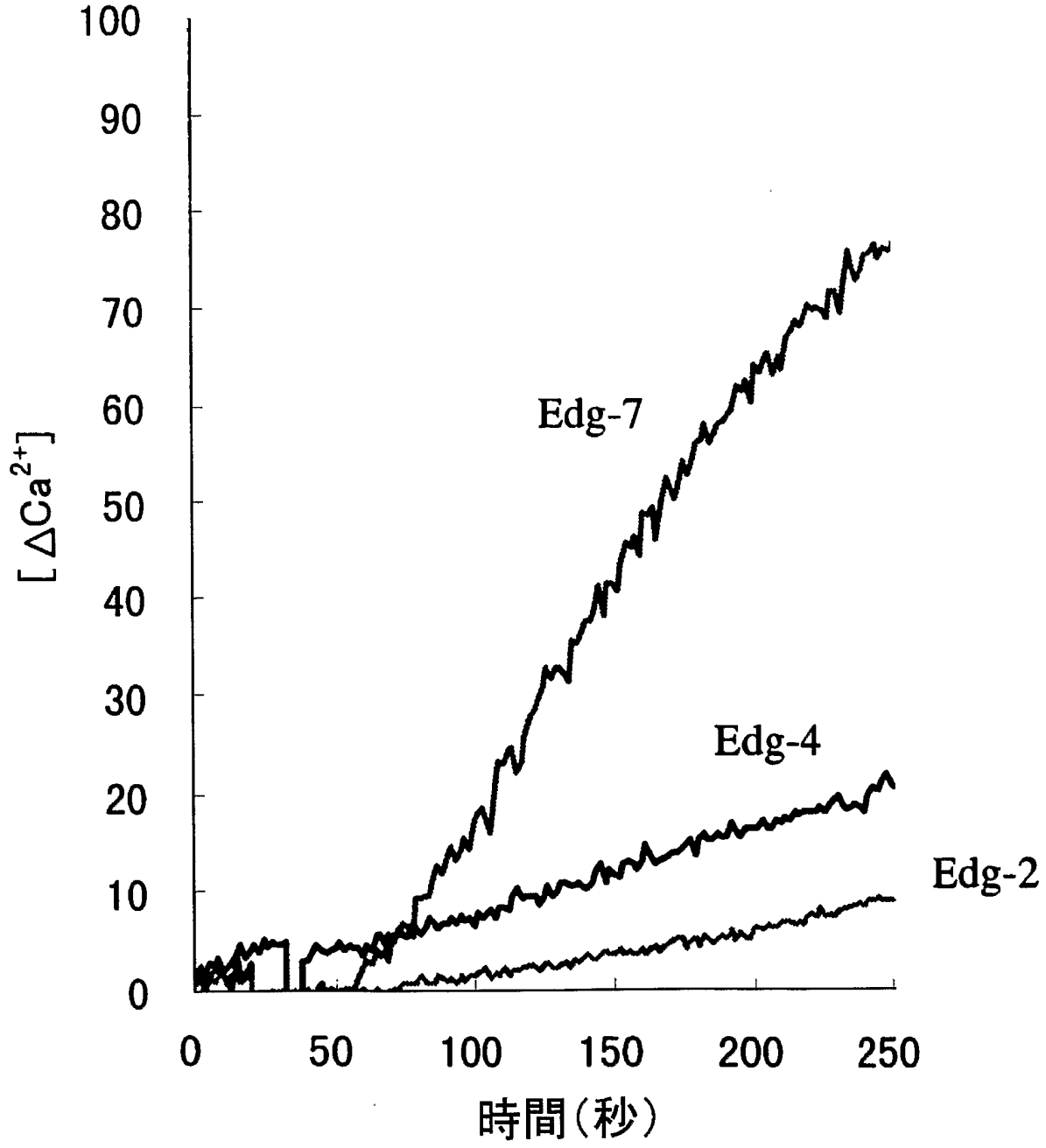

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
[ΔCa2+]
Edg-7
Edg-4
Edg-2
0
50
100
150
200
250
時間(秒)

図9

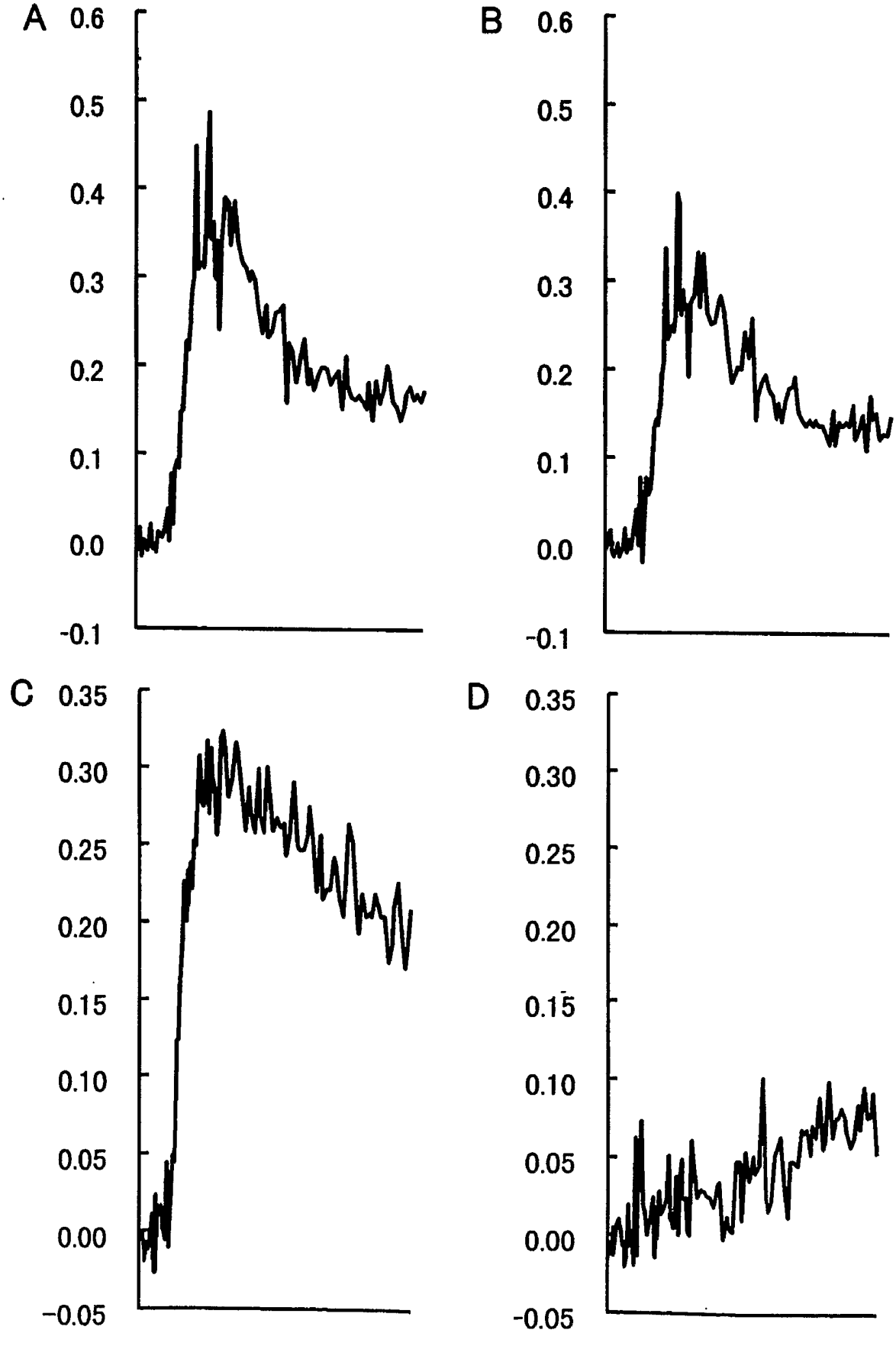
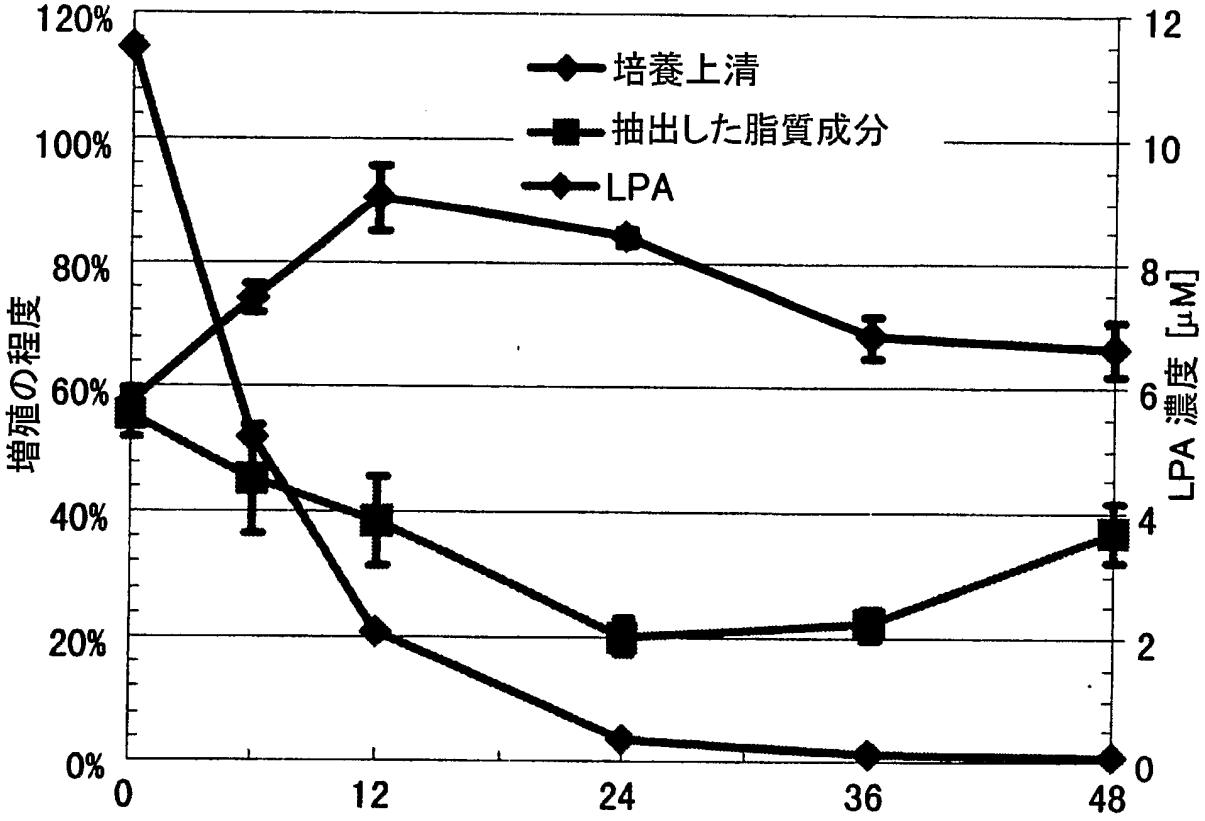

A
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
B
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
C
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
-0.05
D
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
-0.05

図１０


120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
増殖の程度
0
12
24
36
48
12
10
8
6
4
2
0
LPA 濃度 [μM]
培養上清
抽出した脂質成分
LPA

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Tobacco, Inc.

<120> Therapeutic Composition To Treat Prostatic Diseases

<130> J1-A0203P

<140>

<141>

<150> JP 2001-239306

<151> 2001-08-07

<150> JP 2002-224215

<151> 2002-07-31

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially synthesized primer sequence

<400> 1

CGGAGACTGA CTGTTAGCAC ATG 23

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially synthesized primer sequence

<400> 2

CCGTAATGTG CCTCTCGATT G 21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially synthesized primer sequence

<400> 3

AGGCTGTGAG TCCTGCAATG T 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially synthesized primer sequence

<400> 4

TCTCAGCATC TCGGCAAGAG T 21

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially synthesized primer sequence

<400> 5

CCAACCTCAT GGCCTTCCT 19

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially synthesized primer sequence

<400> 6

TCCTCCGGCG GCTGAT 16

「配列表フリーテキスト」

配列番号：1

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列。

配列番号：2

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列。

配列番号：3

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列。

配列番号：4

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列。

配列番号：5

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列。

配列番号：6

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/08016

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] A61K45/00, A61K38/19, A61K39/395, A61K31/245, A61K48/00, A61P13/08, A61P13/00, A61K35/00, A61P43/00

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)
Int.Cl[7] A61K45/00, A61K38/19, A61K39/395, A61K31/245, A61K48/00, A61P13/08, A61P13/00, A61K35/00, A61P43/00

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 practicable, search terms used)
MEDLINE(STN), CAPLUS(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/67383 A1 (Japan Tobacco Inc.), 29 December, 1999 (29.12.99), Claims; page 5, lines 2 to 14; page 12, line 15 to page 13, line 6; page 20, line 25 to page 21, line 5; line 6 to page 26, line 5; example 4 & JP 2000-152792 A	1-10
Y	EP 878479 A2 (SmithKline Beecham Corp.), 18 November, 1998 (18.11.98), Claims; particularly, claims 12, 14; page 3, lines 9, 20; page 11, line 52; page 12, lines 1, 14; line 39 to page 13, line 4; lines 32 to 55 (particularrly, line 53); page 14, line 45 to page 15, line 15 & US 5266718 A & JP 5-238997 A	1-10

[X] 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 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 October, 2002 (15.10.02)	29 October, 2002 (29.10.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/08016

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FITZGERALD, L.R. et al., Identification of an EDG7 variant, HOFNH30, a G-protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. Biochem.Biophys.Res.Commun., 2000, Vol.273, No.3, pages 805 to 810	1-10
A	IM, D.S. et al., Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate. Mol.Pharmacol., 2000, Vol.57, No.4, pages 753 to 759	1-10
A	BANDOH, K., AOKI, J. et al., Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. J.Biol.Chem., 1999, Vol.274, No.39, pages 27776 to 27785, particularly, page 27783, left column, lines 4 to 12	1-10
A	EP 518769 A1 (ADIR & CIE), 16 December, 1992 (16.12.92), & US 5266718 A & JP 5-238997 A	1-10

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０２／０８０１６

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））
Int.Cl[7]　A61K45/00, A61K38/19, A61K39/395, A61K31/245, A61K48/00, A61P13/08, A61P13/00, A61K35/00, A61P43/00

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[7]　A61K45/00, A61K38/19, A61K39/395, A61K31/245, A61K48/00, A61P13/08, A61P13/00, A61K35/00, A61P43/00

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

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）
ＭＥＤＬＩＮＥ（ＳＴＮ），ＣＡＰＬＵＳ（ＳＴＮ），ＥＭＢＡＳＥ（ＳＴＮ），ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）

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	関連する請求の範囲の番号
X	WO 99/67383 A1 (JAPAN TOBACCO INC) 1999.12.29　請求の範囲、第５頁第2-14行、第12頁第15行-第13頁第６行、第20頁第25行-第21頁第５行、第21頁第６行-第26頁第５行、実施例４ ＆　JP 2000-152792 A	1-10

☒ 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	国際調査報告の発送日
１５．１０．０２	29.10.02

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｃ	８８２８
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	大久保元浩　印		
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２		

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第2ページ）（１９９８年7月）

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	関連する請求の範囲の番号
Y	EP 878479 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 1998.11.18 claims, 特にclaim12・14、第３頁第９行及び第20行、第11頁第52行、第12頁第１行及び第14行、第12頁第39行-第13頁第４行、第13頁第32-55行（特に第53行）、第14頁行第45行-第15頁第15行 & US 5266718 A & JP 5-238997 A	1-10
Y	FITZGERALD, L.R.et al. Identification of an EDG7 variant, HOFNH30, a G-protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. Biochem.Biophys.Res.Commun., 2000, Vol.273, No.3, p.805-810	1-10
A	IM, D.S.et al. Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate. Mol.Pharmacol., 2000, Vol.57, No.4, p.753-759	1-10
A	BANDOH, K., AOKI, J.et al. Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. J.Biol.Chem., 1999, vol.274, No.39, p.27776-27785 特にp.27783左欄第4-12行	1-10
A	EP 518769 A1 (ADIR & CIE) 1992.12.16 & US 5266718 A & JP 5-238997 A	1-10