

(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
2017年1月26日(26.01.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/014312 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 38/00 (2006.01) A61P 15/00 (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/071604
- (22) 国際出願日: 2016年7月22日(22.07.2016)
- (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 2015-145108 2015年7月22日(22.07.2015) JP
- (71) 出願人: 株式会社セルペップ(CELLPEP CO., LTD.) [JP/JP]; 〒6068225 京都府京都市左京区田中門前町103-5 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 安田 佳子(YASUDA, Yoshiko); 〒6068225 京都府京都市左京区田中門前町103-5 株式会社セルペップ内 Kyoto (JP). 星合 晃(HOSHI-AI, Hiroshi); 〒5890022 大阪府大阪狭山市西山台2丁目12番11号 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所 Osaka (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, BN, 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, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, 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))

(54) Title: AGENT FOR TREATING/IMPROVING FEMALE HORMONE-DEPENDENT PROLIFERATIVE DISEASES

(54) 発明の名称: 女性ホルモン依存性増殖性疾患治療・改善剤

(57) Abstract: Provided is an agent for treating/improving female hormone-dependent proliferative diseases containing a low-molecular peptide, especially an erythropoietin mimetic peptide (EMP), in particular EMP9, having an erythropoietin receptor antagonizing action. EMP9 is administered intravenously or directly to the focus of adenomyosis, endometriosis, uterine fibroids, or benign prostatic hypertrophy proliferative organ disease, which are female hormone-dependent diseases, and these diseases can be improved or treated.

(57) 要約: エリスロポエチン受容体拮抗作用を有する低分子ペプチド、特にエリスロポエチンミメティックペプチド(EMP)、とりわけEMP9を含有してなる女性ホルモン依存性増殖性疾患治療・改善剤を提供する。女性ホルモン依存性疾患である腺筋症、内膜症、子宮筋腫、前立腺肥大症の増殖性臓器疾患の病巣にEMP9を直接あるいは静注により投与し、これらの疾患を改善あるいは治療できる。



WO 2017/014312 A1

明 細 書

発明の名称：女性ホルモン依存性増殖性疾患治療・改善剤

技術分野

[0001] 本発明は、女性ホルモン依存性増殖性疾患治療・改善剤に関する。

背景技術

[0002] 従来、腺筋症および内膜症に対する治療手段として、外科的切除、あるいはGnRHアゴニスト、アロマターゼ阻害剤、エストロゲン製剤等のホルモン製剤の投与またはそれらを併用する方法が用いられている。しかし、これらのホルモン製剤を適用する場合は一時的に症状が軽減されるが、骨粗鬆症などの副作用のために長期間使用出来ない。さらに、内膜症・腺筋症そのものの病理的成因についての詳細な研究は進んでいない。そのため、抜本的な根治的治療手段は確立していないのが現状である。

[0003] エリスロポエチン（Epo）は、血球の増殖と分化に関与し、腎臓または肝臓で産生され血液中に放出される。エリスロポエチンは赤血球前駆細胞のうち赤芽球バースト形成細胞（BFU-E）と赤芽球コロニー形成細胞（CFU-E）に作用し、その分化と増殖を促進し、赤血球の産生を誘導していると考えられている（非特許文献1：Krantz S.B., Blood, Vol. 77, pp 419-434 (1991)）。エリスロポエチンが前駆細胞の細胞膜に存在するエリスロポエチン受容体（EpoR）と結合すると、受容体の細胞質内領域に存在するヤヌスキナーゼ（Janus Kinase）2（JAK2）のリン酸化が起こり、ついで細胞質内の基質のリン酸化が誘発される。その基質の1つである転写因子シグナルトランスデューサーアクティベータートランスクリプション-5（STAT5）がリン酸化され（P-STAT5）、これが核内に伝達され、前駆細胞の増殖を促し（非特許文献2：Ihle J.N., Nature, Vol. 377, pp 591-594 (1995)）、赤血球の分化、すなわち、グロビンmRNAの細胞内集積、ヘモグロビンの産生が起こるとされている（非特許文献3：D' Andrea A. D. et al., Cell, Vol. 57, pp 277-285 (1989)）。また、遺伝子欠損マウス

の実験から、エリスロポエチンは成人型赤血球産生に不可欠な因子であることが判明した（非特許文献4：Wu et al., Cell, Vol. 83, pp 59-67 (1995)）。

[0004] エリスロポエチンが赤血球造血に関する部位以外の正常組織でその遺伝子を発現している部位として、着床直後のマウス胚体（非特許文献5：Yasuda et al., Develop. Growth Differ., Vol. 35, pp 711-722 (1993)）、ヒト、サル、およびマウスの脳（非特許文献6：Marti H. H. et al., Eur. J. Neurol. Sci., Vol. 8, pp 666-676 (1996)）、ヒト胎盤（非特許文献7：Conrad et al., FASEB. J., Vol. 10, pp 760-768 (1996)）等が知られている。

[0005] 着床直後のマウス子宮内腔にエリスロポエチン抗体や可溶型エリスロポエチン受容体を注入してエリスロポエチン情報を遮断すると、3日後の子宮内腔では、それぞれ36.2%および80%の胚が発生停止を示し、胎盤の発達の障害がそれぞれ88.2%と85%に認められた（非特許文献8：Yasuda et al., Congenit. Anom. Vol. 47, pp 22-23 (2007)）。このことはエリスロポエチン受容体を発現する胚や胎盤原基の発達はエリスロポエチン情報に依存していることを示唆する。一方、遺伝子欠損マウスの実験から、エリスロポエチン遺伝子は心筋の発生（非特許文献9：Wu et al., Development, Vol. 126, pp 3597-3605 (1999)）や脳の発生（非特許文献10：Yu et al., Development, Vol. 129, pp 505-516 (2002)）に不可欠のものであることが明らかにされた。さらに、筋芽細胞の増殖にエリスロポエチン情報は関与しているが、筋管形成には関与しないことが明らかにされ（非特許文献11：Ogilvie et al., J. Biol. Chem., Vol. 275, pp 39754-39761 (2000)）、これらのことは平滑筋細胞の増殖にエリスロポエチンが関与していることを示唆している。

[0006] また、本発明者らはエリスロポエチン遺伝子がヒト子宮頸管、子宮内膜および卵巣に発現し、さらにエリスロポエチン受容体がこれらの女性生殖器の組織構成すなわち頸管上皮表層、頸管基質内の血管内皮細胞、子宮内膜表層、および子宮腺上皮細胞、脱落膜細胞、卵巣胚上皮細胞、原始卵胞内の卵母

細胞質および卵胞上皮細胞、果粒膜細胞の内卵胞膜細胞と介在する毛細血管内皮細胞に発現していることを見出した（非特許文献 12 : Yasuda et al., Ital. J. Anat. Embryol., Vol. 106 (supplement 2) pp 215-222 (2001))。すなわち、女性生殖器のこれらのエリスロポエチン受容体発現部位はエリスロポエチン情報伝達が関与しているが、その機能そのものについては明らかにされていないのが現状である。

[0007] エリスロポエチン遺伝子は低酸素になると低酸素誘導因子 ($HIF-1\alpha$) によって、その遺伝子発現が増強される。そのことにより循環血中の赤血球数が増え、低酸素状態が改善される仕組みになっていることが明らかにされた（非特許文献 13 : Semenza G. L. and Wang G. U., Mol. Cell. Biol., Vol. 12, pp 5447-5454 (1992) ; 非特許文献 14 : Bunn H. F. and Poyton R. O., Physiol. Rev., Vol. 76 (1996))。ところが、子宮内膜に発現しているエリスロポエチン遺伝子は、 $HIF-1\alpha$ によって増強されないで、エストロゲン依存性で増強され、さらにエリスロポエチン蛋白もエストロゲン依存性で分泌されることが明らかにされた（非特許文献 15 : Yasuda et al., J. Biol. Chem., Vol. 273, pp 25381-25387(1998))。

また、本発明者らは妊娠マウスの妊娠 11 日から 18 日の間エチニルエストラジオール (E_2) オリーブ油溶液 1 日量 0.02 mg/kg 体重を経口投与で 1 日 1 回投与し、その妊娠マウスより得た F_1 雌マウスを 16 週齢で卵巣摘出した群としない群を作成し、以後 32 週齢まで飼育し、32 週齢の子宮を観察した。卵巣摘出マウスの子宮内膜の 5 例中 1 例は子宮腺過形成を 4 例は糸状の子宮を示した。卵巣非摘出マウスの子宮内膜は全 3 例中 3 例に腺筋症を認めた（非特許文献 16 : Yasuda et al., Am. J. Obstet. Gynecol., Vol. 130, pp 506-508 (1978))。このことは、胎生期 E_2 曝露は成熟後の子宮腺の過形成を誘導し、卵摘後も胎生期 E_2 曝露は成マウス子宮内膜におけるエストラジオール (E_2) 含量が高い状態を誘発することを示唆する。また、同様の処置による成雄マウスの精巣では、テストステロン産生量が有意に低く、反対に E_2 の含量が有意に高かった。胎生期 E_2 曝露量に対し

て、用量効果的に E_2 含量が高いことを見出した。すなわち、胎生期 EE_2 曝露はアロマターゼ量を増強し、テストステロンから E_2 に変換される量が多いことが示唆された（非特許文献17：Yasuda et al., Am. J. Obstet. Gynecol., Vol. 159, pp 1246-1250 (1988)）。このことは、 EE_2 胎生期投与により、性成熟後のマウス子宮内膜に誘発される腺筋症はアロマターゼ量の増強によるプロゲステロン、アンドロステンディオン、テストステロン等の E_2 への変換が正常より高い可能性を示す。したがって、 E_2 は子宮内膜でのエリスロポエチン遺伝子を増強させ、エリスロポエチンの過剰な分泌を誘発する。そのために内膜のエリスロポエチン受容体発現部位、腺上皮、脱落膜細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞等に作用してそれらの部位の増殖を促進すると考えられる。これらの結果から腺筋症における異所性子宮腺上皮や基質細胞、平滑筋細胞の増殖は、アロマターゼ遺伝子の局所における高発現が局所の E_2 過産生を誘導し、それにより、子宮内膜のエリスロポエチン遺伝子およびエリスロポエチンの分泌を高める。このエリスロポエチンが子宮内膜のエリスロポエチン受容体を発現している子宮腺上皮、基質細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞の増殖に係わっていることが推測された。実際、内膜症患者の腹水におけるエリスロポエチン含量は正常患者の腹水と比べ、有意に高いことが報告されている（非特許文献18：Matsuzaki et al., Hum. Reprod., Vol. 18, pp 52-156 (2003)）。近年になって、 EE_2 の 0.01 mg/kg 体重胎生期曝露マウスにさらに性成熟後（8週齢）に EE_2 0.01 mg/kg 体重を週2回20週齢まで投与し、28週齢で子宮と卵巣を観察したところ、胎生期投与のみと比べて侵襲性の腺筋症の発現頻度と腺ガン様変化の出現頻度が胎生期投与の群よりも有意に高いことを報告した（非特許文献19：Koike et al., Congenit. Anom., Vol. 53, pp 9-17 (2013)）。

[0008] 本発明の特徴は高発現しているアロマターゼや E_2 の産生・分泌の阻害を目的とするのではなく、 E_2 が関与するエリスロポエチンの当該局所における機能を阻止し、腺筋症等の症状を改善することにある。

本発明者らはこれまでにエリスロポエチン抗体、エリスロポエチン受容体

蛋白質などのエリスロポエチン拮抗物質が着床後のマウス子宮脱落膜体、マウス胚とそれを取り囲む脱落膜の成長を阻止し、その結果、胚は死か成長停止となる現象はエリスロポエチン抗体やエリスロポエチン受容体蛋白質の投与量と用量効果関係にあることを示した。対照として与えた β -ガラクトシダーゼ抗体や変性エリスロポエチン受容体蛋白質にはこれらの現象は、起きない（ β -ガラクトシダーゼ抗体）か、あるいは統計的に有意に低頻度（変性エリスロポエチン受容体）を示すことを見出している（非特許文献20：Yasuda et al., Congenit. Anom., Vol. 47, pp 23-23 (2007)）。しかし、これらのエリスロポエチン拮抗物質はいずれも蛋白質であり、エリスロポエチンシグナルの遮断によって増殖性の子宮腺上皮細胞、基質細胞、血管内皮細胞および平滑筋細胞の増殖抑制効果を発現するペプチドなどの低分子化合物等については全く知られていない。

[0009] 本発明者らの特許文献1（特開平10-101574号公報）には、エリスロポエチン拮抗物質を有効成分として含有する、増殖性臓器疾患の治療・改善剤が開示されている。また、特許文献2（特開2002-326958号公報）には、エリスロポエチン拮抗物質を有効成分として含有する、肥厚性瘢痕、ケロイドまたは関節炎症性疾患の予防・治療剤が、特許文献3（特開2003-201252号公報）には、エリスロポエチンミメティックペプチドを含有してなる増殖性臓器疾患、慢性関節炎症性疾患、肥厚性瘢痕またはケロイド予防・治療剤が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：特開平10-101574号公報

特許文献2：特開2002-326958号公報

特許文献3：特開2003-201252号公報

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Krantz S.B., Blood, Vol. 77, pp 419-434 (1991))

非特許文献2：Ihle J.N., Nature, Vol. 377, pp 591-594 (1995))

非特許文献3 : 、D' Andrea A. D. et al., Cell, Vol. 57, pp 277-285 (1989))

非特許文献4 : Wu et al., Cell, Vol. 83, pp 59-67 (1995))

非特許文献5 : Yasuda et al., Develop. Growth Differ., Vol. 35, pp 711-722 (1993))

非特許文献6 : Marti H. H. et al., Eur. J. Neu. Sci., Vol. 8, pp 666-676 (1996))

非特許文献7 : Conrad et al., FASEB. J., Vol. 10, pp 760-768 (1996))

非特許文献8 : Yasuda et al., Congenit. Anom. Vol. 47, pp 22-23 (2007)
)

非特許文献9 : Wu et al., Development, Vol. 126, pp 3597-3605 (1999))

非特許文献10 : Yu et al., Development, Vol. 129, pp 505-516 (2002))

非特許文献11 : Ogilvie et al., J. Biol. Chem., Vol. 275, pp 39754-39761 (2000))

非特許文献12 : Yasuda et al., Ital. J. Anat. Embryol., Vol. 106 (supplement 2) pp 215-222 (2001))

非特許文献13 : Semenza G. L. and Wang G. U., Mol. Cell. Biol., Vol. 12, pp 5447-5454 (1992)

非特許文献14 : Bunn H. F. and Poyton R. O., Physiol. Rev., Vol. 76 (1996))

非特許文献15 : Yasuda et al., J. Biol. Chem., Vol. 273, pp 25381-25387 (1998))

非特許文献16 : Yasuda et al., Am. J. Obstet. Gynecol., Vol. 130, pp 506-508 (1978))

非特許文献17 : Yasuda et al., Am. J. Obstet. Gynecol., Vol. 159, pp 1246-1250 (1988))

非特許文献18 : Matsuzaki et al., Hum. Reprod., Vol. 18, pp 52-156 (2003))

非特許文献19: Koike et al., Congenit. Anom., Vol. 53, pp 9-17 (2013)

非特許文献20: Yasuda et al., Congenit. Anom., Vol. 47, pp 23-23 (2007)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明はペプチドなどの低分子化合物を有効成分として含有する、女性ホルモン依存性増殖性疾患、例えば、腺筋症、内膜症および前立腺肥大症の治療・改善剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、エリスロポエチン受容体拮抗作用を有する低分子ペプチドが、予想外にも優れた上記増殖組織抑制作用を有することを見出した。本発明は、これらの知見に基づいてさらに検討を重ねた結果、完成するに至った。

[0014] すなわち、本発明は、

(1) エリスロポエチン受容体拮抗作用を有する低分子ペプチドを含有してなる女性ホルモン依存性増殖性疾患治療・改善剤、

(2) エリスロポエチン受容体拮抗作用を有する低分子ペプチドがエリスロポエチンミメティックペプチド(EMP)である上記(1)記載の剤、

(3) エリスロポエチン受容体拮抗作用を有する低分子ペプチドがエリスロポエチンミメティックペプチド6、7、9、12、22、23、24、25、33および39から選ばれる上記(1)記載の剤、

(4) エリスロポエチン受容体拮抗作用を有する低分子ペプチドがエリスロポエチンミメティックペプチド9(EMP9)である上記(1)記載の剤、および

(5) 女性ホルモン依存性増殖性疾患が腺筋症、内膜症、子宮筋腫または前立腺肥大症である上記(1)～(4)いずれか1項記載の剤を提供するものである。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、本発明のエリスロポエチン受容体拮抗作用を有する低分子ペプチド、特に、エリスロポエチンミメティックペプチド、とりわけエリスロポエチンミメティックペプチド9を含有してなる女性ホルモン依存性増殖性疾患治療・改善剤を、女性ホルモン依存性疾患である腺筋症、内膜症、子宮筋腫、前立腺肥大症の増殖性臓器疾患の病巣に直接あるいは静注により投与することにより、これらの疾患を改善あるいは治療することができる。

図面の簡単な説明

- [0016] [図1]腺筋症組織標本におけるE p o Rタンパク画分の電気泳動図である。
- [図2a] E p o R発現細胞（腺上皮）とその周辺組織の組織像である。
- [図2b] E p o R発現細胞（平滑筋繊維）とその周辺組織の組織像である。
- [図3] エストラジオールレセプター（E s t R） α 発現細胞を示す組織像である。
- [図4] E s t R α 発現細胞を示す組織像である。
- [図5] アロマターゼ発現細胞を示す組織像である。
- [図6] アロマターゼ発現細胞を示す組織像である。
- [図7] E p o RとE s t R α の共存を示す組織像である。
- [図8] E p o RとE s t R α の共存を示す組織像である。
- [図9] E p oとアロマターゼの共存を示す組織像である。
- [図10] E p oとアロマターゼの共存を示す組織像である。
- [図11] 腺上皮におけるS T A T 5とP S T A T 5の共発現を示す組織像である。
- [図12] 平滑筋細胞におけるS T A T 5とP S T A T 5の共発現を示す組織像である。
- [図13] 腺筋症組織における血管の密度を示すグラフである。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ (Student' t-test) aは統一血管数でDc症例との間に $p<0.001$ で差があったものを示す。
- [図14] 腺構造の破壊を示す標本組織のH・E染色像である。

[図15]腺構造の破壊を示す標本組織のH・E染色像である。

[図16]平滑筋組織の欠損部位が多発している標本組織のH・E染色像である。

。

[図17]腺上皮と基質細胞のアポトーシス死を示す標本組織のTdT反応像である。

[図18]平滑筋細胞のアポトーシス死を示す標本組織のTdT反応像である。

[図19]腺脱落細胞壊死を示す標本組織のTdT反応像である。

[図20]EMP9処置による血管内皮細胞の局在に関する組織像である。

[図21]EMP9処置による血管内皮細胞の喪失に関する組織像である。

[図22]腺筋症組織のEMP9による血管の破壊を示すグラフである。 $**P<0.01$, $***P<0.001$ (Student' t-test)

[図23]EMP9処置腺筋腫を示す。

[図24]図23の腫瘍の横断切片のホルマザン反応後のものを示す。

[図25]生食水処置の腺筋種の横断切片ホルマザン反応後のものを示す。

[図26]移植後未処置の腺筋腫を示す。

[図27]移植材料の移植前と移植後の組織像である。

[図28]移植後の腺筋腫の組織像である。

[図29]EMP9処置腺筋腫での腺体の変化と平滑筋断裂を示す組織像である。

[図30]EMP9処置による腺体の崩壊を示す組織像である。

[図31]アロマターゼ染色による生食水処置での腺筋腫を示す組織像である。

[図32]EMP9処置による腺上皮細胞のアポトーシス死を示す組織像である。

[図33]抗FVIII陽性微小血管の分布の組織像を示す。

[図34]EMP9処置による腺筋腫の血管崩壊 (ex vivo) を示すグラフである。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ (Student' t-test)

[図35]腺筋症標本におけるSTAT5-チロシンリン酸の発現を示す電気泳動図である。

[図36a]腺筋症標本in vitro EMP 9 処置によるSTAT5とP-STAT5を示す組織像である。

[図36b]腺筋症標本in vitroリン酸生食緩衝液処置によるSTAT5とP-STAT5を示す組織像である。

[図37a]EMP 9 ex vivo処置の腺筋腫を示す組織像である。

[図37b]生食水ex vivo処置の腺筋腫を示す組織像である。

[図38a]EMP 9 ex vivo処置の腺筋腫を示す組織像である。

[図38b]図38aの腺上皮稀薄部位の拡大像である。

[図38c]生食水処置の腺筋腫の組織像である。

[図38d]図38cの矢印部位の強拡大組織像である。

[図39]前立腺肥大症(BPH)組織に発現するEpORとEstR α の局在を示す組織像である。

[図40]BPHの腺上皮におけるEpORとEstR α の共存を示す標本の組織像である。

[図41]増殖性の平滑筋細胞を示す組織像である。

[図42]BPH標本におけるEpORタンパクの発現を示す電気泳動図である。

[図43]EMP 9 処置によるBPHの病理組織学的所見を示す組織像である。

[図44]EMP 9 処置によるBPH組織血管網の破壊を示す組織像である。

[図45]BPH組織におけるEMP 9 処置組織での血管径の異なる血管密度の変化を示すグラフである。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ (Student' t-test)

発明を実施するための形態

[0017] 本発明の女性ホルモン依存性増殖性疾患予防・治療剤（以下、「本発明の剤」と略記する）に用いられるエリスロポエチン受容体拮抗作用を有する低分子ペプチドとしては、エリスロポエチンの部分配列と類似したアミノ酸配列を有するペプチドであって、少なくとも5個以上、好ましくは5～30個程度特に好ましくは15～25個程度のアミノ酸残基からなる低分子ペプチ

ドなどが用いられる。なかでも、バイオケミストリー(Biochemistry 37, 369 9, 1998)に記載されたエリスロポエチンミメティックペプチド(EMP)、特に、EMP 6、EMP 7、EMP 9、EMP 12、EMP 22、EMP 23、EMP 24、EMP 25、EMP 33、EMP 39が好ましく、そのなかでもEMP 9が特に好ましい。

[0018] 配列番号1にEMP 9のアミノ酸は配列を示す。本発明の剤で使用するペプチドとしては、好ましくは、アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドなどが用いられる。

配列番号1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドとは、配列番号1で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するペプチドなどが挙げられる。

さらに、例えば、配列番号1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1から7個程度、より好ましくは1から5個程度、さらに好ましくは1から3個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1から7個程度、より好ましくは1から5個程度、さらに好ましくは1から3個）のアミノ酸が付加または挿入されたアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1から7個程度、より好ましくは1から5個程度、さらに好ましくは1から3個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはそれらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するペプチドなども用いられる。

[0019] 配列番号1の配列は、ペプチド表記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する低分子ペプチドをはじめとするエリスロポエチン受容体拮抗作用を有する低分子ペプチドは、C末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO⁻）であるが、C末端がアミド（

—CONH₂) またはエステル (—COOR) であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチル、 α -ナフチルメチルなどのC₆₋₁₂アリールC₁₋₂アルキル基のほか、ピバロイルオキシメチルエステルなどが用いられる。

エリスロポエチン受容体拮抗作用を有する低分子ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の低分子ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば、上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、エリスロポエチン受容体拮抗作用を有する低分子ペプチドには、分子内のアミノ酸の側鎖上にある、例えば、OH、COOH、NH₂、SHなどが適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

[0020] 配列番号 1

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Ala Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys Pro Gln Gly Gly

[0021] エリスロポエチン受容体拮抗作用を有する低分子ペプチドは哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル、ヒトなど）の細胞 [例えば、異所性増殖性内膜腺上皮、増殖性内膜基質細胞、増殖性平滑筋細胞、介在する血管内皮細胞など] または血球系の細胞もしくはその培養細胞株などに由来するペプチド、合成ペプチド、組換え型ペプチドの何れであってもよい。

また、ペプチド合成法に準じて製造することもできるし、当該低分子ペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製

造することができる。

[0022] 哺乳動物の細胞または組織から製造する方法として、例えば、ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行い、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより単離精製することができる。

[0023] ペプチド合成法に準じて製造する方法として、例えば、本発明の剤に含有される低分子ペプチドは、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいはエリスロポエチンを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。すなわち、本発明の剤に含有される低分子ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的の低分子ペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の文献に記載された方法が挙げられる。

M. Bodanszky and M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966)

Schroeder and Luecke, The Peptide, Academic Press, New York (1965)

泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株）（1975年）

矢島治明および榊原俊平、生化学実験講座1、タンパク質の化学IV、205、（1977年）矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

[0024] より具体的には、本発明の剤に含有される低分子ペプチドの合成には、通常市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチ

ルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニルヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする低分子ペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から低分子ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の低分子ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行った後に樹脂を添加することができる。

[0025] 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。

反応温度は、ペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範

囲から適宜選択され、通常 -20°C から 50°C の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5から4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

[0026] 原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、tert-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、C1-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、tert-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化、（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナンシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、tert-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、tert-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂

－Bz l、2－ニトロベンジル、Br－Z、tert－ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4－メトキシ－2，3，6－トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロフェノール、2，4，5－トリクロロフェノール、2，4－ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N－ヒドロキシスクシミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

[0027] 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd黒あるいはPd－炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また、液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約－20℃から40℃の温度で行われるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1，4－ブタンジチオール、1，2－エタンジチオールなどのようなカオチン補足剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2，4－ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記1，2－エタンジチオール、1，4－ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

[0028] 目的とする低分子ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いた部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した部分ペプチドとを製造し、この两部分ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗低分子ペプチドを得ることができる。この粗分子ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の低分子ペプチドのアミド体を得ることができる。

低分子ペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、低分子ペプチドのアミド体と同様にして、所望の低分子ペプチドのエステル体を得ることができる。

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて目的の低分子ペプチドを単離精製することができる。上記方法で得られる低分子ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

より具体的には、本発明の剤に含有される低分子ペプチドはBiochemistry 37, 3699, 1998に記載された方法で製造される。

[0029] 本発明の剤に含有される低分子ペプチドは、腫瘍増殖抑制作用などを有しているので、本発明の剤は、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ハムスタ

一、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒトなど）に対して、腺筋症、内膜症、子宮筋腫および前立腺肥大症の予防・治療剤として有用である。

[0030] 本発明の剤に含有される低分子ペプチドは、毒性が低く、医薬製剤の製造法で一般的に用いられている自体公知の手段に従って、そのままあるいは薬理的に許容される担体と混合して、例えば錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、散剤、顆粒剤、カプセル剤、（ソフトカプセルを含む）、液剤、注射剤、坐剤、徐放剤等の医薬製剤として、経口的または非経口的（例、局所、直腸、静脈、点眼投与等）に安全に投与することができる。特に、女性ホルモン依存性疾患である腺筋症、内膜症、子宮筋腫、前立腺肥大症の増殖性臓器疾患の病巣に直接あるいは静注により投与できる剤形が好ましい。

本発明の剤の製造に用いられてもよい薬理的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が挙げられ、例えば固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤および崩壊剤、あるいは液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤および無痛化剤等が挙げられる。さらに必要に応じ、通常防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、吸着剤、湿潤剤等の添加物を適宜、適量用いることもできる。

賦形剤としては、例えば乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、コーンスターチ、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸等が挙げられる。

滑沢剤としては、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカ等が挙げられる。

結合剤としては、例えば結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、デンプン、ショ糖、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等が挙げられる。

崩壊剤としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、

レーヒドロキシプロピルセルロース等が挙げられる。

溶剤としては、例えば注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油等が挙げられる。

溶解補助剤としては、例えばポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム等が挙げられる。

懸濁化剤としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン、等の界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等の親水性高分子等が挙げられる。

等張化剤としては、例えばブドウ糖、D-ソルビトール、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール等が挙げられる。

緩衝剤としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩等の緩衝液等が挙げられる。

無痛化剤としては、例えばベンジルアルコール等が挙げられる。

防腐剤としては、例えばパラヒドロキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸等が挙げられる。

抗酸化剤としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸、 α -トコフェロール等が挙げられる。

[0031] 本発明の剤において、低分子ペプチドの含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常、製剤全体に対して約0.1～100重量%、好ましくは約10～99.9重量%、さらに好ましくは約20～99重量%程度である。

本発明の剤において、低分子ペプチド以外の成分の含有量は、製剤の形態

によって相違するが、通常、製剤全体に対して約 10～99.9 重量%、好ましくは約 20～90 重量%程度である。

本発明の剤の投与量は、低分子ペプチドの種類、投与ルート、症状、患者の年齢などによっても異なるが、例えば、腺筋症を治療する目的で静注など非経口的に投与する場合、1 日当たり体重 1 kg あたり低分子ペプチドとして約 0.005～50 mg、好ましくは約 0.05～10 mg、さらに好ましくは約 0.2～4 mg を 1～3 回に分割投与できる。

[0032] 本発明の剤は、低分子ペプチド以外に、適宜、他の医薬と適量配合して、または適量併用して使用することもできる。

このような併用薬としては、例えば、女性ホルモン依存性増殖の治療に供することのできる種々のホルモン製剤が挙げられる。具体的には、免疫抑制作用の低い医薬、例えば、GnRH アゴニスト、抗エストロゲン製剤およびアロマターゼ阻害剤、分泌療法薬（LH-RH アゴニストおよびアンタゴニスト、性ホルモンアンタゴニスト、性ホルモン合成阻害薬など）などが挙げられる。

また、 α_1 -ブロッカーであるフェントールアミンやアトロピン製剤などの自律神経遮断剤が本発明の剤と併用し得る。

[0033] 本発明の剤と併用薬との併用に際しては、本発明の剤と併用薬の投与時期は限定されず、本発明の剤と併用薬とを、投与対象に対し、同時に投与してもよいし、時間差をおいて投与してもよい。併用薬の投与量は、临床上用いられている投与量に準ずればよく、投与対象、投与ルート、疾患、組み合わせ等により適宜選択することができる。

本発明の剤と併用薬の投与形態は、特に限定されず、投与時に、本発明の剤と併用薬とが組み合わせられていればよい。このような投与形態としては、例えば、（１）本発明の剤と併用薬とを別々に製剤化して得られる２種の製剤の同一投与経路での同時投与、（２）本発明の剤と併用薬とを別々に製剤化して得られる２種の製剤の同一投与経路での時間差をおいての投与、（３）本発明の剤と併用薬とを別々に製剤化して得られる２種の製剤の異なる投

与経路での時間差をおいての投与（例えば、本発明の剤→併用薬の順序での投与、あるいは逆の順序での投与）などが挙げられる。以下、これらの投与形態をまとめて、本発明の併用剤と略記する。

[0034] 本発明の併用剤は、毒性が低く、例えば、本発明の剤または（および）上記併用薬を自体公知の方法に従って、薬理的に許容される担体と混合して医薬組成物とすることができる。

本発明の併用剤の製造に用いられてもよい薬理的に許容される担体としては、前記した本発明の医薬組成物に使用されるものと同様のものを使用することができる。

本発明の剤および併用薬を同時に製剤化して単剤として使用する場合、本発明の併用剤におけるエリスロポエチン受容体拮抗物質またはそのプロドラッグの含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常、製剤全体に対して約0.1～100重量%、好ましくは約10～99.9重量%、さらに好ましくは約20～90重量%程度である。

また、本発明の併用剤における併用薬に含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常、製剤全体に対して約0.1～100重量%、好ましくは約10～99.9重量%、さらに好ましくは約20～90重量%程度である。本発明の併用剤において、エリスロポエチン受容体拮抗物質またはそのプロドラッグおよび併用薬以外の成分の含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常、製剤全体に対して約10～99.9重量%、好ましくは約20～90重量%程度である。

本発明の併用剤におけるエリスロポエチン受容体拮抗物質またはそのプロドラッグとの併用薬との配合比は、投与対象、投与ルート、疾患等により適宜選択することができる。

本発明の併用剤の投与量は、エリスロポエチン受容体拮抗物質またはそのプロドラッグおよび併用薬の種類、投与ルート、症状、患者の年齢などによっても異なるが、例えば、腺筋症を治療する目的で非経口的に投与する場合、1日当たり体重1kgあたりエリスロポエチン受容体拮抗物質またはその

プロドラッグおよび併用薬として約0.005～50mg、好ましくは約0.05～10mg、さらに好ましくは約0.2～4mgを1～3回に分割投与できる。

[0035] 本発明の剤に含有されるエリスロポエチン受容体拮抗物質および併用薬物をそれぞれ別々に製剤化する場合も同様の含有量でよい。

本発明の剤に含有されるエリスロポエチン受容体拮抗物質と併用薬をそれぞれ別々に製剤化して併用投与するに際しては、本発明の剤と併用薬を含有する医薬組成物とを同時期に投与してもよいが、併用薬を含有する医薬組成物を先に投与した後、本発明の剤を投与してもよいし、本発明の剤を先に投与し、その後で併用薬を含有する医薬組成物を投与してもよい。時間差を置いて投与する場合、時間差は投与する有効成分、剤形、投与方法により異なるが、例えば、併用薬を含有する医薬組成物を先に投与する場合、併用薬を含有する医薬組成物を投与した後1分から3日以内、好ましくは10分～1日以内、より好ましくは15分～1時間以内に本発明の剤を投与する方法が挙げられる。本発明の剤を先に投与する場合、本発明の剤を投与した後、1分～1日以内、好ましくは10分～6時間以内、より好ましくは15分から1時間に本発明の剤を投与する方法が挙げられる。

[0036] 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Leu	: ロイシン
Val	: バリン

P r o	: プロリン
S e r	: セリン
C y s	: システイン
T h r	: トレオニン
T y r	: チロシン
H i s	: ヒスチジン
T r p	: トリプトファン
G l n	: グルタミン
L y s	: リジン
P h e	: フェニルアラニン

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

[0037] EMP 9 の腺筋症に対する効果

1) 標本の採取・処置および検索方法

a) 採取

十分な説明により同意の得られた患者の切除組織片を用いた。切除後、直ちに組織片をストレプトマイシン・ペニシリン混入 D-MEM 培養液 (Sigma) に移し、実験開始まで冷暗所 (8℃) に保存した。標本数は 15 症例であった。病巣と非病巣が得られる場合は両者を、非病巣が取れない場合は病巣のみを標本とした。未処置と *in vitro* 処置後の組織片および *ex vivo* の腺筋腫 (ヌードマウスへの腺筋症組織標本移植による腫瘍、以下、腺筋腫と称する) はそれぞれ冷培養液で洗滌後、液体窒素で凍結、またはザンボニ (Zamboni) 固定液で固定した。凍結材料は生化学的検索に、固定材料は病理組織学的および免疫組織化学的検索に供した。

[0038] b) 薬物

エリスロポエチンと類似の赤血球増殖作用を有するペプチドとして合成されたエリスロポエチンミメティックペプチド (Erythropoietin mimetic pept

ides) の内のEMP 1 とEMP 9 をペプチド研究所（箕面、大阪）に作製依頼した。EMP 1 はエリスロポエチンと類似の作用を有し、EMP 9 はエリスロポエチン受容体拮抗作用を有する（Johnson D.L. et al., Biochemistry, Vol. 37, pp3699-3710 (1998)）。

[0039] c) 腺筋症標本への処置（E p o - E p o R 情報遮断）方法

i) in vitro 実験

器官培養下で処置したEMP 9 の10 mg、5 mg または1 mg / ml を0.025 M リン酸緩衝液で溶かし、標本片に直接注入した。さらにエリスロポエチン様作用を誘導するためにEMP 1 の、EMP 9 10 mg / ml の等価量である0.06 mg / ml を使用した（Johnson D.L. et al., Biochemistry, Vol. 37, pp3699-3710 (1998)）。対照はリン酸緩衝液を用いた。4 症例（34、47、42、48 歳）の標本を用い、切除後1時間から24時間の標本を50 mg ~ 80 mg 大の大きさに切断し、シャーレ内で薬物を0.5 μ l / mg 組織重量の用量で、注射針（ハミルトン32 G）と注射筒で組織片の異なった部位に注入した。1時間毎の3回注入と4回注入を行った。注入時以外は37℃、5%CO₂の条件下、シャーレ内で培養液を入れずに反応させた。最終の注入後はD-MEM培養液を用いたいかだ法により、24穴培養皿（Falcon、3047）で培養した。4~6組織片を1処置として使用した。

[0040] ii) ex vivo 実験

ヌードマウス（BalbC nu/nu、CLEA）を5週齢で購入し、1週間後に移植に供した。術後標本組織片をゴム板上とシャーレ内で片刃（フェザー剃刀）とハサミで細切した（1 mm ~ 3 mm）。細切片をよく混和し、培養液で湿潤な状態にした0.1 ~ 0.3 ml 量のものを肩甲骨間皮下部位に麻酔下で移植した。術後切除から移植開始に要した時間は30分から24時間であった。1症例標本につき3匹から12匹のマウスを使用した。ヌードマウスはケージ毎に1匹ずつの飼育とした。移植後1週間で薬物をマウスの体表から腫瘍内に注入（IT）または腹腔内注入

(I P) した。EMP 9 の 10、5 または 1 mg / ml 生理的食塩水(生食水、大塚製薬)溶液を投与した。対照としては生食水を用いた。薬物投与後 1 週間あるいは投与開始後 1 週間または 2 週間の時点で、深麻酔下でヌードマウスの背面肩甲骨に切開を入れ、腫瘍の外表観察後、腫瘍を摘出した。腫瘍のマクロ観察下での生死部位判定の為に、11 症例中 9 症例由来の腫瘍を脳スライサー (NeuroScience Idea、Osaka) で 1 mm の厚さの横断切片を作製し、切片をホルマザン染色後、マクロ観察を行った。2 症例由来の腺筋腫とホルマザン処置後の切片は凍結またはザンボニ液で固定し、生化学的検査と病理組織学的検査に使用した。移植に使用した標本は 11 症例で、動物は I T が 29 匹、I P が 36 匹、無処置のもの 8 匹で総数 73 匹を使用した。

[0041] d) 病理組織学的および免疫組織学的検索方法

ザンボニ液で固定した術後の標本、および *in vitro*、*ex vivo* の系で処置した標本を 25% 蔗糖リン酸緩衝溶液で凍結保護した後、凍結し、6 ~ 7 μ m の連続凍結切片を作製した。切片は 70 ~ 98 μ m 離れた箇所の切片 5 枚を 1 枚のスライドに貼付し、複数枚のスライドを作製した。そのうちの 1 枚はヘマトキシリン・エオジン (H・E) 染色に、他は免疫染色に使用した。一次抗体は以下のものを使用した。抗 N 末 E p o R 抗体 (Yasuda et al., *Develop. Growth Differ.*, Vol. 35, pp711-722 (1993))、抗 E p o 抗体 (R & D 社)、抗エストロゲンレセプター (Estrogen receptor、E s t R) - α 抗体 (Santa Cruz 社)、抗アロマターゼ (Aromatase、A r o m) 抗体 (abcam 社)、抗 VIII 因子 (F VIII) 抗体 (DAKO 社)、抗 P C N A 抗体 (Santa Cruz 社)、抗 S T A T 5 抗体と抗 P - S T A T 5 a / b 抗体 (Santa Cruz 社)、抗 F 4 / 8 O 抗体 (Serotec 社)、抗 C D 1 6 3 抗体 (Santa Cruz 社) を用いて反応させ、それぞれの 2 次抗体で処理し、D A B 反応により発色あるいは蛍光二次抗体を用いて蛍光発光させ、観察に供した。

[0042] e) 生化学的検索方法

i) 量的 R T - P C R 法による転写の検索

イ) E p o m R N A、ロ) E p o R m R N A、ハ) アロマターゼ m R N

A、ニ) 平滑筋ーミオシン (myosin) mRNA (MYH-11 mRNA)、ホ) エストラジオールレセプター (Estradiol-receptor) α mRNA の発現量を、それぞれの組織標本の 18S rRNA mRNA の発現量の比として算出した。各組織片から全RNAをトリゾール (Trizol、Gibco BRL) 液を用いて抽出し、AMV-逆転写酵素を用いてcDNAを作成し、ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) でQuantitative PCR Supermix-UDG (Invitrogen) を用いて、PCR反応を行った。Epo、EpoR、アロマターゼ、Sm-ミオシン (MYH 11)、エストラジオールレセプター- α 、18S rRNA等のプライマーやプローブはApplied BiosystemのAssay-on Demand Gene Expressionによる製品とTaq Man Ribosomal RNA control試薬を用いた。それぞれのcDNAの10倍希釈プラスミッド液を用いて、それぞれの標準曲線を求めた。PCRの反応は、変性を50℃ 2分と95℃ 10分、アニーリングを95℃で40サイクル15分、伸長を60℃ 1分で行った。それぞれのデータは少なくとも3回の独立した実験で得たものによった。

[0043] ii) ウェスタンブロット法によるEpoRの証明

凍結組織片をポリトロン (Polytron) で粉砕し、公知の方法で可溶化緩衝液を用いてタンパク画分を抽出した (Yasuda et al., 2003)。膜成分画分を分離した後、各標本より抽出した膜画分のタンパク量100 μ gをSDS-PAGEで電気泳動を行い、PVDV膜に移した。抗EpoR抗体 (C-20、Santa Cruz O. 1 μ ml) または抗N末EpoR抗体; (1:100; Yasuda et al., Develop. Growth Differ., Vol.35, pp711-722 (1993)) を用いて免疫反応させ、2次抗体と化学発光 (Amersham Bioscience) を用いて可視化した。

[0044] iii) エストロゲン含有量の測定

凍結組織片を、25 mMリン酸緩衝液を用いてポリトロンで粉砕し、組織上清中のエストラジオール17 β をECLA (電気化学発光免疫測定法) による方法で測定した。それぞれの上澄のタンパク含量はウシアルブミンを標準としてタンパク定量キット (Bio Rad) を用いて測定した。

[0045] 2) 結果

a) 腺筋症組織におけるエリスロポエチン情報伝達系とエストロゲン反応系の発現

i) 腺筋症標本における E p o R タンパクの発現

図 1 にタンパク画分の電気泳動図を示す。陽性対照として P C - 3 細胞株膜画分を示した。図 1 に示すごとく、65 k D a の大きさの E p o R タンパクの存在が全ての検査標本で認められた。図中、アルファベットは患者識別、数字は年齢を示す。P C - 3 は前立腺癌細胞株 (Yasuda et al., Carcinogenesis, 24;1021-1029, 2003) である。

[0046] ii) E p o R、E s t R α およびアロマターゼの発現部位

E p o は分泌型のタンパクなので、通常の免疫染色の局在は必ずしも E p o タンパクのみを証明することにならないので、E p o 応答部位として E p o R のタンパク局在部位として証明した。それぞれの組織における E p o R の発現部位と E s t R α およびアロマターゼの発現部位、ならびに共存タンパク部位 (Merge) を図 2 ~ 図 12 に示す。

[0047] 図 2 a は、E p o R 発現細胞 (腺上皮) とその周辺の組織を示す。腺上皮細胞 (大きい矢印)、血管内皮細胞 (小さい矢印)、基質細胞 (矢尻) に陽性反応が認められる。目盛棒は 50 μ m を示す。

図 2 b は、E p o R 発現細胞 (平滑筋繊維) とその周辺の組織を示す。平滑筋細胞 (大きい矢印)、血管周辺部 (小さい矢印) に陽性反応が認められる。目盛棒は 50 μ m を示す。

図 3 は、E s t R α 発現細胞を示す。腺上皮細胞 (矢尻)、血管内皮細胞 (小さい矢印)、平滑筋線維 (大きい矢印) に陽性反応が認められる。目盛棒は 50 μ m を示す。

図 4 は、E s t R α 発現細胞を示す。中膜平滑筋線維 (大きい矢印)、血管内皮細胞 (小さい矢印) に陽性反応が認められる。目盛棒は 50 μ m を示す。

図 5 は、アロマターゼ発現細胞を示す。腺上皮細胞 (大きい矢印)、平滑

筋線維（小さい矢印）、基質細胞（矢尻）、脱落細胞（二重矢印）に陽性反応が認められる。目盛棒は50 μ mを示す。

図6は、アロマターゼ発現細胞を示す。平滑筋線維（大きい矢印）、基質細胞（矢尻）に陽性反応が認められる。目盛棒は50 μ mを示す。

図7は、EpoRとEstR α の共存（Mr）を示す。腺上皮細胞（矢印）に顕著に発現している。目盛棒は50 μ mを示す。

図8は、EpoRとEstR α の共存（Yk）を示す。腺上皮細胞（矢印）、基質細胞（星印）に顕著に発現している。目盛棒は50 μ mを示す。

図9は、Epoとアロマターゼの共存（Mr）を示す。腺上皮細胞（矢印）に顕著に発現している。目盛棒は10 μ mを示す。

図10は、Epoとアロマターゼの共存（Mr）を示す。平滑筋線維（矢印）、腺上皮細胞（二重矢印）に顕著に発現している。目盛棒は10 μ mを示す。

図11は、腺上皮におけるSTAT5とPSTAT5の共発現（lz）を示す。腺上皮細胞（矢印）に顕著に発現している。目盛棒は50 μ mを示す。

図12は、平滑筋細胞におけるSTAT5とPSTAT5の共発現（lz）を示す。平滑筋細胞（矢印）に顕著に発現している。目盛棒は50 μ mを示す。

[0048] iii) 腺筋症切除標本における各種mRNAの発現量

表1に腺筋症における種々のmRNAの発現量を示す。

腺筋症標本でのEpo mRNAとS α -ミオシンmRNAの発現量は正常内膜におけるよりも、有意に高値を示した（ $P < 0.001$ ）。アロマターゼmRNAの発現量は正常内膜よりも高値を示したが、有意差は認められなかった。反対にEpoR mRNAの発現量は腺筋症での発現量が正常内膜より有意に低値を示した（ $P < 0.001$ ）。

[表1]

	エリスロポエチン			エリスロポエチン受容体			アロマトラーゼ		
	症例数	検素数	Mean $\pm$ SEM	症例数	検素数	Mean $\pm$ SEM	症例数	検素数	Mean $\pm$ SEM
腺筋症 正常内膜	6	53	219.87 $\pm$ 26.53 ^a	6	15	24.94 $\pm$ 3.89 ^c	9	61	0.79 $\pm$ 0.10
	4	36	35.93 $\pm$ 7.27 ^b	4	12	58.34 $\pm$ 7.66 ^d	4	33	0.58 $\pm$ 0.11
	Sm-ミオシン			エストラジオール受容体					
	症例数	検素数	Mean $\pm$ SEM	症例数	検素数	Mean $\pm$ SEM			
腺筋症 正常内膜	8	87	4399.90 $\pm$ 740.20 ^e	6	18	20.89 $\pm$ 3.23			
	4	48	643.85 $\pm$ 201.99 ^f	4	12	39.71 $\pm$ 11.78			

※a, b間、c, d間、e, f間: P<0.001で差あり。(Student's t-test)

[0049] iv) 腺筋症、筋腫および正常内膜標本におけるE₂の含有量

表2に、子宮内膜病変におけるE₂の含有量を示す。

腺筋症組織での E_2 の組織内含有量は筋腫や正常内膜の組織と比べ高く、正常内膜との間に有意差を示した ($P < 0.05$)。

[表2]

標 本	例 数	E_2 (pg/ml)	protein (mg/ml)	E_2 (pg/mg protein)
腺 筋 症	12	97.6 ± 25.7^a	5.6 ± 0.5	18.9 ± 5.6
筋 腫	5	59.6 ± 19.7^b	5.6 ± 1.2	10.5 ± 2.5
正常内膜	4	32.5 ± 4.1^c	4.7 ± 3.5	14.3 ± 14.6

※a, c間、b, c間に $P < 0.05$ で有意差あり (Student's t-test)

[0050] v) 腺筋症における血管の分布

腺筋症組織標本における血管分布密度を見る目的で、図13のグラフに標本切片内の一定区域の血管数を腺上皮周辺、平滑筋部位およびそれらの合計した血管数を示した。血管密度は症例によって有意差を示す程差異があった。また、12症例中10症例において腺病巣部域の方が平滑筋部域よりも多数の血管を有していた ($p < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$)。

[0051] vi) 腺筋症の性状のまとめ

腺筋症では正常子宮内膜の組織と比べて、特にEpo mRNAの発現が有意に高く、全症例においてEpo Rタンパクが発現していることが明らかとなった。また、このEpo R発現局所、すなわち、Epo応答部位にはEst R α も共存し、さらにアロマターゼタンパクも共存している。 E_2 の含有量も高い。これらのことは血液中より運搬されて来るテストステロンやアンドロステンダイオン結合タンパクが局所のアロマターゼでエストロゲンに変換され、このエストロゲンがEpo産生をin situで増強し、Epo Rを介してSTAT5-PSTAT5の経路が腺上皮細胞、基質細胞、平滑筋細胞で情報伝達を増強し、それらの細胞の増殖が誘導されていることを示している。

[0052] b) 腺筋症のEMP9処置による増殖性組織崩壊の誘導

b-1. in vitro実験

i) in vitroにおけるEMP9処置の病理組織変化

EMP 9 直接注入による腺筋症組織における病理変化を図 1 4 ～図 1 9 に示す。

図 1 4 は腺構造の破壊を示す Hr (EMP 9 15. 0) 標本組織の H・E 染色像である。腺体の破壊 (大きい矢印、破壊程度 + 3 とした)、基質細胞の壊死 (小さい矢印)、基質細胞の融解 (* 印) および平滑筋細胞組織の欠損 (無核・死**) が認められる。目盛棒は 50 μ m を示す。

図 1 5 は腺構造の破壊を示す Hr (EMP 9 7. 5) 標本組織の H・E 染色像である。腺上皮細胞の腺腔内への脱落 (*)、上皮の扁平化および嚢胞化 (*)、上皮の喪失した嚢胞 (***) が認められ、基質細胞の壊死 (小さい矢印) と希釈化が認められる。目盛棒は 50 μ m を示す。

図 1 6 は平滑筋組織の欠損部位が多発している Mh (EMP 9 20. 0) 標本組織の H・E 染色像である。欠損部を矢印で示してある。目盛棒は 50 μ m を示す。

図 1 7 は腺上皮と基質細胞のアポトーシス死を示す Hr (EMP 9 15. 0) 標本組織の TdT 反応像である。矢印は陽性反応を示す核、矢尻は染色質濃縮、二重矢印は壊死像を示す。目盛棒は 10 μ m を示す。

図 1 8 は平滑筋細胞のアポトーシス死を示す Mh (EMP 9 20. 0) 標本組織の TdT 反応像である。矢印は陽性反応を示す核である。目盛棒は 10 μ m を示す。

図 1 9 は腺脱落細胞壊死を示す Hr (緩衝液) 標本組織の TdT 反応像である。矢印はアポトーシス死、二重矢印は壊死を示し、目盛棒は 10 μ m を示す。

[0053] すなわち、EMP 9 直接注入による腺筋症組織では、腺体構造の破壊 (図 1 4、図 1 5)、平滑筋細胞の無核像や、断裂、欠損部位の多発 (図 1 6)、基質細胞の変性・アポトーシス死・壊死 (図 1 7) と血管内皮細胞の破綻と血管中膜平滑筋細胞変性が認められた。これらの細胞変性・死はアポトーシス死を示した (図 1 7、1 8)。対照群の脱落した腺上皮細胞はアポトーシス死でなく壊死で、基質細胞にアポトーシス死を認めた (図 1 9)。また

、処置群と比べ、細胞死は少ない。これらの病理所見のうち、腺上皮増殖部における腺体および平滑筋部における平滑筋の破壊の程度と頻度を表3にまとめた。

[0054] [表3]

標 本 (患者年齢)	処 置										病 理 組 織 解 析									
	組 織 片 注 入 (mg/ml)					濃 度 頻 度 (μg/ml)					腺 体 崩 壊 度 (%)					平 滑 筋 組 織 部 の 変 性 壊 死 像 (%)				
	組 織 片 注 入	濃 度	頻 度	注 入 量	注 入 回 数	注 入 量	注 入 回 数	注 入 量	注 入 回 数	注 入 量	0	+1	+2	+3	有 限 全 20%	有 限 全 20%	無 限 全 20%	有 限 全 20%	有 限 全 20%	無 限 全 20%
Ig (48)	3	E9	5	3	7.5	12	5	9	50	0	0	0	8.0	92.0	25.8	40.5	25.8	8.0	25.8	8.0
	3	E9	1	3	1.5	12	10	28	206	0	0	2.9	1.5	95.6	23.7	50.3	21.0	5.0	21.0	5.0
	3	PB	—	3	—	—	10	24	159	0	0	27.0	34.0	39.0	51.3	39.0	9.7	0	9.7	0
	2	無	—	—	—	—	12	11	45	133	3.8	20.3	33.1	42.9	39.7	44.4	14.5	1.3	14.5	1.3
Hr (34)	2	E9	10	3	15.0	24	10	23	177	1.1	29.4	54.2	15.3	39.1	28.8	26.1	6.1	26.1	6.1	6.1
	2	E9	5	3	7.5	24	10	22	276	4.3	14.8	22.5	58.3	26.3	57.3	14.3	2.0	14.3	2.0	2.0
	2	PB	—	3	—	—	8	21	112	7.2	28.6	45.5	18.8	30.7	47.3	18.7	3.3	18.7	3.3	3.3
	1	針	—	3	—	—	5	11	242	5.8	26.0	52.9	15.3	78.3	17.7	4.0	0	4.0	0	0
Yh (42)	3	E9	10	4	10.0	12	7	22	41	4.9	12.2	29.3	53.7	16.0	27.3	54.7	2.0	54.7	2.0	2.0
	3	E9	5	4	5.0	12	5	13	19	10.5	5.3	57.9	26.3	10.7	46.0	43.3	0	43.3	0	0
	3	PB	—	4	—	—	7	35	98	4.1	9.0	33.7	53.1	29.3	54.3	16.3	0	16.3	0	0
	3	針	—	4	—	—	12	35	85	36.5	54.1	9.4	0	31.3	47.1	20.5	1.0	20.5	1.0	1.0
Mh (47)	2	E9	10	4	20.0	14	10	43	92	1.1	15.2	35.9	47.8	49.7	44.7	5.6	0	5.6	0	0
	3	E9	10	1	5.0	14	10	27	76	15.8	19.7	30.3	34.2	35.0	51.7	12.3	1.0	12.3	1.0	1.0
	2	E9	5	4	10.0	14	10	30	77	6.4	13.0	30.0	50.6	52.0	39.3	8.0	0.7	8.0	0.7	0.7
	2	E1	0.08	4	0.12	14	8	24	45	64.4	17.8	4.4	13.3	68.9	30.7	0.4	0	0.4	0	0
2	PB	—	4	—	—	—	8	34	99	24.2	32.3	18.2	25.3	65.0	33.7	1.3	0	1.3	0	0

※E9: EMP9; E1: EMP1; PB: リン酸緩衝液; 無: 培養のみ

※ *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001 (Chi-square test)

[0055] 腺体破壊の程度の高いものの頻度は緩衝液や針注入、無処置のものにも認められたが、その誘因がアポトーシス死か壊死かの差はこの分析では明らかに出来ない。そこで、崩壊像が0のものの頻度をEMP9処置群と対照群との間で比べた。

表3に示すごとく、EMP9処置群では対照群と比べて有意に腺体正常像の頻度は少なかった($P < 0.05$ 、 $P < 0.001$)。一方、EMP1処置群は有意に正常像の頻度が高かった($P < 0.001$)。平滑筋細胞への障害は一定区画での有核平滑筋細胞の占める面積が20%以上のものはEMP9処置群で緩衝液処置と比べ有意に少ない($P < 0.001$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)のが2症例(IgとYh)で認められ、反対にEMP1処置群では有意に多い($P < 0.001$ 、 $P < 0.01$)のを認めた。無核の平滑筋領域に白血球侵入を認めるものの頻度はEMP9処置群において緩衝液処置群と比べて有意に高い($P < 0.001$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)のが3症例で認められた(Ig、Yh、Mh)。無核の平滑筋細胞のみは1症例において、EMP9処置群が緩衝液処置群よりも頻度が高かった($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。EMP9は腺体を崩壊し、平滑筋細胞をも死に至らしめ、腺筋症の増殖を阻害し、全体を破壊することが示唆された。

[0056] ii) EMP9処置による血管の破壊

図20～図21にEMP9処置による血管破壊を示す組織像である。

図20はEMP9処置による血管内皮細胞の局在に関する組織像で、aは基質細胞部の局在、bは平滑筋細胞部の局在を示す。目盛棒は10 μm を示す。

図21はEMP9処置による血管内皮細胞の喪失に関する組織像で、矢印は血管内皮細胞の欠損した血管を示す。目盛棒は10 μm を示す。

図22は、腺筋症組織のEMP9による血管の破壊を示すグラフである。

[0057] すなわち、一定区画面積内の血管数は腺周辺部と平滑筋部では前者が後者より多く(図20)、EMP9処置群では内皮細胞の破壊が認められ(図2

1)、また対照群と比べ、血管数が有意に減少していた(図22)。全血管数はEMP9処置群において対照群と比べて有意に減少していた($P < 0.001$)。同濃度のEMP9処置では投与回数の多い方が有意な減少を示した($P < 0.01$ 、 $P < 0.001$)。またEMP9の等量濃度のEMP1処置ではEMP9と比べて有意に血管数が多かった($P < 0.001$)。腺病巣域にある血管数は、全症例において、EMP9処置群での血管数は対照群と比べて有意に低値を示した($P < 0.001$)。平滑筋増殖域では3症例中1症例において、EMP9総量10および20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 組織重量処置群では対照群に比べ有意に減少していた($P < 0.001$)。これらの結果からEMP9は腺筋症の血管崩壊を誘導し、しかも腺増殖病巣では平滑筋増殖域よりも崩壊効果が高いことが認められた。

[0058] iii) *in vitro*におけるEMP9処置による腺筋症組織の生化学的分析

表4に、EMP9またはEMP1処置腺筋症組織標本における各種mRNAの発現量の変化(*in vitro*)を示す。表4の価は、個々の処置標本におけるEpo mRNA、EpoR mRNA、アロマターゼmRNAおよびS-ミオシンmRNAの発現量をそれぞれの18S-rRNA mRNAの発現量の比として示したものである。

[表4-1]

症例	処置	経口mg 当分の EMPs. 1 挿入量(μg)	Epo mRNA /18S rRNA mRNA x 10 ³		EpoR mRNA /18S rRNA mRNA x 10 ³		Aromatase /18S rRNA mRNA x 10 ³		Ser-myosin /18S rRNA mRNA x 10 ³	
			平均±標準誤差	検出数	平均±標準誤差	検出数	平均±標準誤差	検出数	平均±標準誤差	検出数
Ig (48)	無処置 ^a	—	0.49 ± 0.01	3	0.55 ± 0.04	3	1.08 ± 0.10	3	2522.88 ± 108.22	3
	3E ₉ 01-12	1.5	0.28 ± 0.01	3	0.32 ± 0.01	3	0.59 ± 0.04	3	430.91 ± 2.13	3
	3E ₉ 05-12	7.5	0.40 ± 0.06	3	0.29 ± 0.01	3	0.51 ± 0.06	3	394.17 ± 15.96	3
	3PBS-12	0	0.49 ± 0.11	3	0.72 ± 0.11	3	1.15 ± 0.27	3	683.23 ± 88.24	3
Hr (34)	未処置 ^b	—	132.62 ± 38.23	3	30.69 ± 7.62	3	0.24 ± 0.08	3	1103.95 ± 16.19	9
	針挿入	—	33.65 ± 6.12	3	37.21 ± 4.63	3	0.09 ± 0.05	2	593.87 ± 14.64	3
	3E ₉ 10-24	15	17.06 ± 0.87	3	25.10 ± 0.88	3	0.20 ± 0.08	3	490.85 ± 12.61	3
	3E ₉ 05-24	7.5	27.62 ± 2.52	3	27.23 ± 4.57	3	0.15 ± 0.04	2	727.04 ± 27.64	3
	3PBS-24	0	45.62 ± 6.77	3	39.14 ± 7.30	3	0.13 ± 0.05	3	490.35 ± 33.65	3

[0059] [表4-2]

症例	処置	処置開始 直後の EDMPの 投入量(μg)	Epo mRNA /18S rRNA mRNA $\times 10^3$		EpoR mRNA /18S rRNA mRNA $\times 10^3$		Aromatase /18S rRNA mRNA $\times 10^3$		5 α -myosin /18S rRNA mRNA $\times 10^3$	
			平均 $\pm$ 標準誤差	検出数	平均 $\pm$ 標準誤差	検出数	平均 $\pm$ 標準誤差	検出数	平均 $\pm$ 標準誤差	検出数
Mh (47)	未処置	—	62.81 $\pm$ 4.35	3	33.56 $\pm$ 1.43	3	0.12 $\pm$ 0.02	3	885.44 $\pm$ 90.88	3
	4E ₉ 10-14	20	46.35 $\pm$ 6.99	3	52.49 $\pm$ 1.41	3	0.26 $\pm$ 0.05	3	518.32 $\pm$ 29.45	3
	4E ₉ 0.06-14	0.12	93.16 $\pm$ 7.90	2	33.70 $\pm$ 1.29	3	0.30 $\pm$ 0.07	3	812.85 $\pm$ 18.79	3
	4PBS-14	0	2571.60 $\pm$ 860.99	3	79.88 $\pm$ 6.46	3	0.57 $\pm$ 0.12	3	1376.97 $\pm$ 91.42	3
Yh (42)	未処置	—	1.67 $\pm$ 0.07	3	2.71 $\pm$ 0.05	3	33.25 $\pm$ 2.06	3	2318.89 $\pm$ 11.76	3
	針挿入	—	0.64 $\pm$ 0.09	3	2.02 $\pm$ 0.22	3	66.84 $\pm$ 6.46	3	760.68 $\pm$ 61.48	3
	4E ₉ 10-12	20	0.93 $\pm$ 0.22	3	1.93 $\pm$ 0.22	3	41.10 $\pm$ 3.15	3	1236.82 $\pm$ 150.87	3
	4E ₉ 05-12	10	1.09 $\pm$ 0.07	3	1.53 $\pm$ 0.24	3	46.34 $\pm$ 8.74	3	1378.11 $\pm$ 221.89	3
	4PBS-12	—	1.02 $\pm$ 0.12	3	1.67 $\pm$ 0.07	3	92.53 $\pm$ 5.90	3	1498.26 $\pm$ 41.05	3

[0060] 表4中各記号は下記を示す：

a 無処置：培養した標本細片

b 未処置：術後の組織標本

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Student' t-test)

[0061] E p o m R N A の発現量は H r と Y h、M h において無処置、P B S 処置と比べ、有意差は示さなかったが、減少している。また、E M P 1 処置は E M P 9 と比べ有意に上昇を示した ($P < 0.05$)。E p o R m R N A の発現量は、E M P 9 処置群では緩衝液処置群と比べ有意差を示さなかったが、3 症例で低下、1 症例で同等の値を示した。アロマターゼ m R N A 発現量については E M P 9 処置群の 1 症例については針挿入や緩衝液処置群と比べて有意に低下を示した ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。2 症例で低下を示した。S m - ミオシン m R N A の発現量は E M P 9 処置群では 2 症例において緩衝液処置群と比べ有意に低下を示した (I g、M h) ($P < 0.05$ 、 $P < 0.001$)、他の 2 症例では E M P 9 低濃度処置群との間に有意に低下 (H r) ($P < 0.01$) か、有意差はないが低下 (Y h) を示した。4 種の m R N A の発現量については、E M P 9 処置により対照群と比べて、アロマターゼや S m - ミオシンの m R N A は有意差をもって低下するのが認められた。E p o m R N A については、全症例で対照と比べ低下していた。E p o m R N A は増殖性腺病巣部に強く発現する。従って個々の標本には症例毎のまた同一症例においても腺病巣の混入の程度すなわち組織構成に差異がある可能性をもつので、有意差を示さなかったものと考えられる。

[0062] 表5に E M P 9 処置による腺筋症組織片内の E₂ の含有量を示す。表5に示すごとく、E M P 9 に対して用量効果的に E₂ 含有量の低下を示した。有意差は示さなかったが、対照群と比べても低値を示した。また、E M P 1 の処置では対照と比べて高値を示した。

[表5]

症 例	処 置	濃度 (mg/ml)	頻度 (毎時)	処置後 (時間)	組織mg当たりの EMP9又は(EMP1) の処置量(μ g)	E ₂ (pg/ml)	protein (mg/ml)	E ₂ (pg/mg protein)
Hr (34)	針挿入	—	3	24	0	55	1.4	39.2
	EMP9	10	3	24	15	49	2.3	21.3
	EMP9	5	3	24	7.5	57	2.6	22.0
	緩衝液	—	3	24	0	60	2.2	27.3
Mh(47)	無処置	—	—	—	20 10 (0.12) 0	85	6.4	13.1
	EMP9	10	4	13		33	2.7	12.2
	EMP9	5	4	13		34	2.4	14.2
	EMP1	0.06	4	13		43	2.3	18.7
	緩衝液	—	4	13		30	2.1	14.3

[0063] iv) in vitro処置のまとめ

表3～表5および図14～図22に示した所見から、腺筋症組織はEMP9の局所注入によって、増殖性腺上皮、平滑筋組織の崩壊と血管系の破壊により病巣が破壊することが推測される。さらに生化学的分析の所見はこれらの病理組織の結果を裏付けている。

[0064] b-2. ex vivo実験

i) ex vivoにおける腺筋腫のEMP9による組織崩壊の誘導

ヌードマウスにおける腺筋腫

図23～図26にヌードマウスの腺筋腫種標本を示す。

図23はMr4.0処置の腺筋腫で、矢印は、腋窩動脈からの枝の腫瘍栄養動脈である。

図24は図23の腫瘍の横断切片のホルマザン反応後のものを示し、赤色部が陽性で生存を示す。

図25はMr生食水処置の腺筋腫の横断切片ホルマザン反応後のものを示す。

図26はMr移植後未処置の腺筋腫を示す。細片移植から15日後のものである。

[0065] すなわち、移植ヌードマウスを深麻酔下で屠殺し、切開後、腫瘍の観察を行ったところ、図23に示すような腫瘍を全ての宿主で認めた。摘出腫瘍の1mm切片のホルマザン染色マクロ標本を画像に取り込み、画像上で図24、図25、図26に示すように、赤色の生存部と白色の非生存部の占める面積を画像上での方眼記入により計算し、それぞれの部域全体に対する率として表した。その結果を、下記の表6に示す。

染色後の標本はザンボニ液で固定するか、あるいは液体窒素で凍結してそれぞれ病理組織学および生化学的解析に供した。

[0066] ii) EMP9の腫瘍内注入または腹腔内注入による腺筋腫の生存抑制

表6にEMP9処置によるヌードマウス移植腺筋腫の生存抑制（マクロ観察）の観察結果を示す。表6から明らかなごとく、IPの高濃度（4.0m

g／匹) 投与群4例のうち3例において、生食水投与群または無投与群と比べて、腺筋腫生存部が有意に低値を示した ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。反対に、 E_2 投与群では腺筋腫の生存部はEMP9および生食投与群の生存部と比べて、有意に高値を示した ($P < 0.01$ 、 $P < 0.001$)。 E_2 の局所増強により、局所のEpo誘導による生存部の増加を示唆する。一方、ITでは4例全てにEMP9の用量効果的に生存部は低値を示したが、有意差は認められなかった。生食投与群の2例の腺筋腫の生存部は、EMP9投与群より高値か、同値を示した。無投与群の2例は2例共にEMP9投与群と比べ高値を示した。

留意すべきことは、細切片の混合物を移植したため、腺筋腫形成に当たっては同一患者の標本であっても増殖性腺病巣の混合の差によって腫瘍の形態に差異が生ずることである。そのことは欠損部の大きさに反映されていると考えられる。EMP9処置群の腫瘍は対照群と比べて、欠損部が必ずしも大きくない。欠損部の大きさはEMP9処置との関連性が明確でない (Iz、Ss、Mg、Mr)。ただし、 E_2 投与群では欠損部は無処置群と比べて小さい。すなわち、 E_2 による生存力増強が、細片組織間の結合を強固にしたと考えられる。

結論として、マクロ的検索方法でEMP9高濃度腹腔内処置は腺筋腫の生存を抑制することが明らかとなった。

[0067]

[表6-1]

投与 標本	使用 動物数	処置					検出 陽性反応面積 ^c	欠損度 ^d
		注入方法 ^a	注入物	濃度(mg/ml)	投与回数(日)	投与量 (mg/kg)		
Ht	4	IT	EMP9	5.0	3	1.5	0	0.33 ± 0.07
	4	IT	EMP9	1.0	3	0.3	10	0.47 ± 0.09
	4	IT	生食水	—	3	—	10	0.53 ± 0.06
Tb	2	IT	EMP9	10.0	4	4.0	4	0.50 ± 0.07
	2	—	—	—	—	—	5	0.61 ± 0.11
Iz	2	IT	EMP9	5.0	3 x 3	2.25	9	0.26 ± 0.05
	2	IT	EMP9	1.0	3 x 3	0.45	7	0.37 ± 0.05
	2	IT	生食水	—	3 x 3	—	8	0.27 ± 0.07
	2	—	—	—	—	—	6	0.41 ± 0.08
Ss	3	IT	EMP9	5.0	3 x 3 ^e	2.25	11	0.35 ± 0.05
	3	IT	EMP9	1.0	3 x 3 ^e	0.45	9	0.41 ± 0.08
	3	IT	生食水	—	3 x 3 ^e	—	12	0.41 ± 0.04
Kw	2	IP	EMP9	1.0	4	0.4	6	0.48 ± 0.07
	1	IP	生食水	—	4	—	4	0.68 ± 0.09

[0068] [表6-2]

試験 標本	使用 動物数	処 置					抽出 注入数(日)	検査 ^b 臓器片 (状態)	陽性反応面積 ^c	欠損度 ^d
		注入方法 ^a	濃度(mg/ml)	投与回数(日)	相対重量 (mg/個)	注入量 (mg/個)				
Mg	2	IP	EMP9	4	—	0.4	7	6	0.45 ± 0.09	—h
	1	IP	生食水	4	—	—	7	2	0.59 ± 0.09	
Kg	2	IP	EMP9	4	4	4.0	8	7	0.26 ± 0.05	—h
	2	IP	生食水	4	—	—	8	6	0.46 ± 0.07	
	3	IP	E ₂ ^g	1 × 3 ^e	9 × 10 ⁻⁵	—	8	9	0.69 ± 0.04	
Kg	1	IP	EMP9	4	4	4.0	14	2	0.13 ± 0.07	—h
	3	IP	E ₂	1 × 3 ^e	9 × 10 ⁻⁵	—	14	11	0.77 ± 0.08	
	1	—	—	—	—	—	14 ^f	3	0.35 ± 0.16	
Yk	2	IP	EMP9	4	4	4.0	7	9	0.61 ± 0.04	—h
	2	IP	生食水	4	—	—	7	6	0.64 ± 0.07	
Mr	2	IP	EMP9	4	4	4.0	8	9	0.31 ± 0.13	—h
	3	IP	EMP9	4	4	2.0	8	9	0.65 ± 0.08	
	2	IP	生食水	4	—	—	8	7	0.82 ± 0.10	
	1	—	—	—	—	—	8 ^f	4	0.75 ± 0.08	

[0069] 表 6 中各記号は下記を示す：

a：I T 腫瘍内、I P 腹腔内

b：異なった動物由来の腫瘍片 1～3 片

c：全面積を 1 とする

d：各切片の欠損の程度（+ 1～+ 4）を判定し、頻度を掛けたもの

e：1 週間における投与回数

f：無処置マウスでの摘出は注入マウスと同時期

g：17 β -エストラジオール

h：Tbの10.0mg/mlのEMP9を1日4回IT投与した場合とKgの10.0mg/mlのEMP9を1日4回IP投与した場合の比較、 $p < 0.05$ (Student' t-test)

細胞癒合 g:good fusion; b:better fusion; p partial fusion; n:non-fusion

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Student' t-test)

[0070] iii) EMP 9 処置による腺筋症の病理組織変化

移植材料は標本の細切組織であるため均一でないが、腺筋症の特性である腺組織と平滑筋組織とで構成する腫瘍を得た。

移植材料の標本とその腺筋腫の組織像を図 27 に、また、移植後の組織像を図 28～図 32 に示す。

図 27 は移植前の組織像を示し、a は移植前の組織、b、c は腺筋腫の組織像で、a における矢印は基質細胞に囲まれた腺体、二重矢印は平滑筋を示す（I z）。b では生食水処置の腺体（矢印）と平滑筋部（二重矢印）が認められ、c では崩壊している腺体（矢印）、無核および欠損部（*）が認められる。目盛棒は 20 μ m を示す。

図 28 は移植後の腺筋腫の腺上皮（T b）を示す組織像で、a は腺上皮（矢印）の増殖像、b～d は、各々、Ep o R 陽性、アロマターゼ陽性、S m-ミオシン陽性の平滑筋線維の局在と腺体（*）を示す像である。目盛棒は 20 μ m を示す。

図 29 は EMP 9 処置腺筋腫での腺体の変化と平滑筋断裂（H r t）を示

す組織像である。aはE p o R陽性の上皮細胞を有する退行変性を示す嚢胞（矢印）と隣接する嚢胞（*）、bはE p o R陽性を示す脱落上皮細胞で嚢胞化を示す。cは対照群に認められる嚢胞化（矢印）と嚢胞（*）を示す。dはa、bと同一標本の平滑筋部位で、欠損部（*）と血球の侵入を示す。目盛棒は20 μ mを示す。

図30はEMP9処置による腺体の崩壊（M u r）を示す組織像である。a、bはEMP処置腺筋腫での退行変性化している腺体を示す像である。c、dはそれぞれの腺体のアロマターゼ染色像で、アロマターゼの消失部が上皮崩壊部に認められる（小さい矢印）。目盛棒は20 μ mを示す。

図31はアロマターゼ染色による生食水処置での腺筋腫（M r）を示す組織像である。aは腺体の嚢胞化（矢印）を示す像、bはaの強拡大像で、アロマターゼの局在（小さい矢印）を示す。目盛棒は20 μ mを示す。

図32はEMP9処置による腺上皮細胞のアポトーシス死（M r）を示す組織像である。aはアポトーシスを示す腺上皮細胞（矢印、T d T反応）、bは生食水処置のアポトーシス死を示さない腺上皮（矢印、T d T反応）を示す像である。目盛棒は20 μ mを示す。

[0071] すなわち、移植前の組織では腺体は単層立法上皮で周辺を基質細胞が取り囲み、平滑筋組織も存在する（図27a）。腺筋腫では生食水処置では腺上皮の増殖と基質細胞に囲まれ平滑筋組織の混在した形態を示した（図27b）。EMP9処置では腺上皮の脱落および細胞死を認め、周辺組織の欠損を認めた（図27c）。移植後、無処置の腺筋腫（図28a）の免疫染色では、腺組織と周辺の基質細胞にE p o R陽性反応（図28b）を認め、腺上皮はアロマターゼ陽性反応（図28c）を示し、S m -ミオシン陽性の平滑筋線維の局在（図28d）を認めた。

EMP9処置により腺上皮の脱落を有する腺体（図29a、b）をその脱落度において、退行変性（図29a）、嚢胞化（図29b）および嚢胞（図29a）へと進行するのを認めた。この変化はin vitroの処置で認めた像と類似する（図15）。さらに平滑筋部位の無核化、組織欠損、単核細胞侵入

(図 2 9 d) が認められた。生食水処置においても、嚢胞化 (図 2 9 c) や嚢胞 (図 2 9 c) が認められた。

EMP 9 処置での退行変性を示す上皮細胞ではアロマターゼ陽性反応細胞が消失していた (図 3 0 a、b、c、d)。生食水処置で認めた嚢胞の (図 3 1 a) 薄い扁平化した腺上皮細胞はアロマターゼ陽性 (図 3 1 b) を示した。このような場合は正常腺とした。また、脱落する腺上皮細胞は EMP 9 処置でアポトーシス死が顕著であったが生食水処置では異なった (図 3 2 a、b)。これらの組織所見を個々の腺筋腫において検査したものを表 7 にまとめた。

[0072]

[表7-1]

移植 標本 (投与方法)	EMP9 総投与量 (mg/尾)	観察数			個体の変化			平滑筋領域の変化	
		細胞塊 切片数	標本 総数	正常 (%)	進行変性 (%)	壊死化 (%)	細胞 (%)	無核+単核細胞 (切片当たり%)	
Ht (IT)	1.5	4	210	0	17 (8.1)	41 (19.5)	152 (72.4)	66.7	
	0.3	2	113	0	15 (13.3)	24 (21.2)	74 (65.5)	57.1	*
	生食	4	173	10 (5.8)	56 (32.4)	50 (28.9)	57 (32.9)	53.1	*
	無処置	1	24	2 (8.3)	9 (37.5)	2 (8.3)	11 (45.8)	50.0	
Tb (IT)	4.0	3	182	6 (3.3)	45 (24.7)	62 (34.1)	69 (37.9)	36.0	
	無処置	3	101	17 (16.8)	20 (19.8)	38 (37.6)	26 (25.7)	34.0	
Iz (IT)	2.25	2	102	0	3 (2.9)	39 (38.2)	60 (58.8)	66.0	*
	0.45	3	25	1 (4.0)	2 (8.0)	12 (48.0)	10 (40.0)	48.0	*
	生食	3	15	0	2 (13.3)	7 (46.7)	6 (40.0)	53.8	
	無処置7	3	41	6 (14.6)	5 (12.2)	17 (41.5)	13 (31.7)	58.0	
	無処置17	3	59	4 (6.8)	3 (5.1)	22 (37.3)	30 (50.8)	39.6	
Ss (IT)	2.25	6	166	0	6 (3.6)	94 (56.6)	66 (39.8)	77.5	*
	0.45	8	248	0	9 (3.6)	77 (31.0)	162 (65.3)	78.8	*
	生食	6	361	0	18 (5.0)	268 (74.2)	75 (20.8)	55.0	*

[0073] [表7-2]

移植 標本 (投与方法)	EMP9 総投与量 (mg/尾)	観察数		腺体の変化				平滑筋領域の変化	
		組織塊 切片数	腺体 総数	正常 (%)	退行変性 (%)	囊腫化 (%)	壊死 (%)	無核+原核壊死 (切片当たり%)	
Kw (IP)	0.4 生食	2 10	273	7 (2.6)	5 (1.8)	110 (40.3)	151 (55.3)	22.0	22.0
		2 8	193	8 (4.1)	6 (3.1)	115 (59.6)	64 (33.2)	40.0	40.0
Mg (IP)	0.4 生食	3 16	90	7 (7.7)	8 (8.9)	55 (61.1)	20 (22.2)	54.5	54.5
		4 20	158	6 (3.8)	1 (0.6)	78 (49.4)	73 (46.2)	37.3	37.3
Kg (IP)	4.0 生食	4 20	57	4 (7.0)	2 (3.5)	42 (73.7)	9 (15.8)	66.7	66.7
		4 20	35	7 (20.0)	4 (11.4)	16 (45.7)	8 (22.9)	40.9	40.9
	E ₂ 9x10 ⁻⁵	3 12	55	25 (45.5)	0	17 (30.9)	13 (23.6)	45.3	45.3
Mr (IP)	4.0	1 6	55	1 (1.8)	2 (3.6)	35 (63.6)	17 (30.9)	44.7	44.7
	2.0 生食	2 10	54	2 (3.7)	4 (7.4)	36 (66.7)	12 (22.2)	61.4	61.4
		3 10	65	11 (16.9)	1 (1.5)	27 (41.5)	26 (40.0)	47.1	47.1
	無処置	3 12	40	1 (2.5)	0	11 (27.5)	28 (70.0)	28.3	28.3

[0074] 表 7 において、*、**、*** χ^2 検定、* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

[0075] 表 7 に示すごとく、EMP 9 処置では正常腺体の存在は生食水処置や無処置の腺筋腫と比べて全腺筋腫例で少なく、4 例においては生食水処置と比べて有意に ($P < 0.05$, $P < 0.01$, Ht、Tb、Kg、Mr) 少なかった。反対にこれらの腫瘍では腺体の嚢胞化 ($P < 0.001$, $P < 0.01$, Ss、Kg、Mr) や嚢胞形成 ($P < 0.001$, $P < 0.01$, Ht、Ss、Kw) が有意に高くなっている。退行性腺体はEMP 9 処置で有意に多く認められた ($P < 0.01$, Mg)。一方、無核化した平滑筋領域の宿主の単核細胞 (マクロファージや好中球) の侵入による除去は 1 例 (Kw) を除いてEMP 9 処置群で生食処置群と比べて有意に多く認められた ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, Ht、Iz、Ss、Mg、Kg、Mr)。これらの現象から、EMP 9 処置はEpoやアロマトーゼ活性のある腺体を退行変性化し、さらにこれらのタンパク活性の喪失した嚢胞への変化を誘導することが示された。この腺体の嚢胞化や平滑筋の欠損はin vitroにおけるEMP 9 処置で認めた変化と類似している。ex vivoでは、さらに宿主の貧食細胞による無核化平滑筋除去の促進が加わり、腺筋腫の消失が予測される。

[0076] iv) EMP 9 処置による腺筋腫の血管破壊

腺筋腫での微小血管数を算出した。

図 3 3 に抗FVIII陽性微小血管の分布 (Ht) の組織像を示す。a はEMP 9 処置による腺筋腫の血管内皮の消失した血管 (矢印)、b は生食水処置による腺筋腫の血管 (矢印) の像を示す。目盛棒は $20 \mu\text{m}$ である。

図 3 4 は、EMP 9 処置による腺筋腫の血管崩壊 (ex vivo) を示すグラフである。

図 3 3 a、b で示した様にEMP 9 処置の腺筋腫における血管内皮細胞は崩壊して抗FVIII抗体で陽性反応を示さない (図 3 3 a) が、対照の生食水処置では陽性反応を示す血管が多く認められた (図 3 3 b)。それぞれの腺筋腫における血管数は図 3 4 のとおりである。

観察した全例において無処置および生食水処置の腺筋腫の血管分布数と比べて、EMP9処置群の血管数は有意に減少していた ($P < 0.001$ 、 $P < 0.01$)。また2例において血管崩壊に対するEMP9の用量効果関係の存在することを認めた。

v) EMP9処置による腺筋腫における生化学的分析

4種のmRNAの発現量の変化を調べ、その結果を表8にまとめた。

[0077]

[表8-1]

症例 (検査方法)	処置	検査項目 Epo mRNA /18S rRNA mRNA x 10 ⁶ Epo mRNA /18S rRNA mRNA x 10 ⁶ Epo mRNA /18S rRNA mRNA x 10 ⁶	Epo mRNA /18S rRNA mRNA x 10 ⁶ 平均 ± 標準偏差	Epo mRNA /18S rRNA mRNA x 10 ⁶ 平均 ± 標準偏差	Aromatase /18S rRNA mRNA x 10 ³ 平均 ± 標準偏差	Sim-myosin /18S rRNA mRNA x 10 ⁴ 平均 ± 標準偏差	検査数
			平均 ± 標準偏差	平均 ± 標準偏差	平均 ± 標準偏差	平均 ± 標準偏差	
Ht (IT)	未移植	—	235.77 ± 170.55	3	—	—	—
	E ₀	0.3	5.89 ± 0.69	3	0.98 ± 0.11	2.00 ± 0.03	9
	E ₀	1.5	44.04 ± 4.32	3	0.54 ± 0.18	2.49 ± 0.03	9
	生食水	—	5.78 ± 1.19	3	0.87 ± —	2.13 ± 0.17	9
Kw (IP)	未移植	—	169.19 ± 22.85	3	—	637.23 ± 28.14	3
	E ₀	0.4	50.42 ± 5.71	3	0.38 ± —	12.68 ± 0.41	3
	E ₀	—	10.70 ± 2.43	3	0.48 ± —	—	—
	生食水	—	15.89 ± 1.42	3	0.06 ± 0.01	11.81 ± 0.44	3
Mg (IP)	未移植	—	54.51 ± 0.47	3	0.05 ± 0.02	33.85 ± 0.56	3
	E ₀	—	158.12 ± 5.20	3	—	1594.86 ± 258.32	3
	E ₀	—	21.06 ± 2.45	3	0.67 ± 0.11	11.31 ± 0.64	3
	生食水	—	23.65 ± 4.35	3	0.41 ± 0.14	9.90 ± 1.35	3

[0078]

[表8-2]

症例 (原発方法)	処置	接種 量 10^5 CFU 10^5 CFU 接種量 (g)	Eco mRNA /18S rRNA mRNA $\times 10^3$		EcoR mRNA /18S rRNA mRNA $\times 10^3$		Aromatase /18S rRNA mRNA $\times 10^3$		Sm-MycDalo /18S rRNA mRNA $\times 10^3$	
			平均 $\pm$ 標準偏差	検体数	平均 $\pm$ 標準偏差	検体数	平均 $\pm$ 標準偏差	検体数	平均 $\pm$ 標準偏差	検体数
Mr (IP)	未接種	—	173.34 $\pm$ 24.29	3	10.55 $\pm$ 1.40	3	0.49 $\pm$ 0.04	6	1297.85 $\pm$ 145.35	9
	E ₀	4.0	4.81 $\pm$ 1.88	12	16.61 $\pm$ 0.50	3	0.90 $\pm$ 0.12	9	12.30 $\pm$ 1.88	9
	E ₁	2.0	4.11 $\pm$ 1.87	12	18.35 $\pm$ 0.82	3	0.75 $\pm$ 0.07	9	11.52 $\pm$ 1.31	9
	生食水	—	1.35 $\pm$ 0.92	10	13.95 $\pm$ 1.71	3	0.47 $\pm$ 0.07	9	10.28 $\pm$ 0.58	9
	未接種	—	2.30 $\pm$ 1.34	10	23.86 $\pm$ 5.23	2	0.73 $\pm$ 0.04	9	12.66 $\pm$ 1.31	9
Kg (IP)	未接種	—	38.01 $\pm$ 4.55	12	2.89 $\pm$ 0.51	3	0.50 $\pm$ 0.10	9	1025.06 $\pm$ 58.66	9
	E ₀	4.0	0.26 $\pm$ 0.03	12	1.86 $\pm$ 0.40	3	0.22 $\pm$ 0.03	9	10.75 $\pm$ 0.91	9
	生食水	—	0.05 $\pm$ 0.01	12	0.91 $\pm$ 0.05	3	0.17 $\pm$ 0.01	9	5.91 $\pm$ 0.68	9
	E ₂	9 $\times 10^5$	0.04 $\pm$ 0.01	12	1.14 $\pm$ 0.18	3	0.14 $\pm$ 0.01	9	4.40 $\pm$ 0.37	9
	未接種	—	0.04 $\pm$ 0.01	11	3.56 $\pm$ 0.17	3	0.03 $\pm$ 0.004	9	7.15 $\pm$ 0.71	9
Dc (IP)	未接種	—	9.79 $\pm$ 0.27	9	0.57 $\pm$ 0.02	9	1.55 $\pm$ 0.11	9	2582.85 $\pm$ 91.74	9
	E ₀	2.0	0.18 $\pm$ 0.02	18	0.57 $\pm$ 0.02	18	0.74 $\pm$ 0.09	18	32.75 $\pm$ 2.63	18
	生食水	—	0.17 $\pm$ 0.02	18	0.45 $\pm$ 0.01	18	0.39 $\pm$ 0.04	18	10.17 $\pm$ 0.73	18
	未接種	—	0.21 $\pm$ 0.02	18	0.71 $\pm$ 0.03	18	0.94 $\pm$ 0.13	18	36.16 $\pm$ 1.70	18
	未接種(4日)	—	0.16 $\pm$ 0.02	9	0.34 $\pm$ 0.01	9	0.51 $\pm$ 0.05	9	13.50 $\pm$ 0.51	9

[0079] 表8中、* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Student' t-test)

表8に示すごとく、E p o mRNAについては1例(M g)の発現量が生食水処置群と比べて有意に低下($P < 0.001$)を示し、他の3例(H t、K w、K g)は反対に有意に高値を示す($P < 0.01$ 、 $P < 0.001$)かあるいは殆ど変化を示さなかった。E p o R mRNAについては2例(M g、Y k)において、生食水処置と比べて有意に減少($P < 0.05$)を示したが、反対に1例(D c)では生食水処置の方が有意に低値を示した($P < 0.001$)。アロマターゼmRNAについては、2例(M r、D c)において生食水処置の方が有意に低値($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)を示した。S m-ミオシンmRNAについては、1例(M g)において生食水処置と比べ有意に低値($P < 0.001$)を示した他は2例(K g、D c)において反対に生食水処置の方が有意に高値($P < 0.001$)を示した。これらからアロマターゼを除いてEMP9処置群の内の14.3~28.6%がそれぞれのmRNA発現量の有意な低下を示した。また、腺筋症標本内のE p o R mRNAは正常子宮内膜のE p o R mRNAより有意に低値を示した(表1)ことを考慮すると、EMP9処置により正常に近い状態に誘導されたことが示唆される。

[0080] vi) ex vivo処置のまとめ

腺筋症標本の組織材料の細切片を移植して作成した腺筋腫は、腺筋症と同様に腺を形成し、平滑筋組織を交えた腫瘍となった。EMP9処置により、腺上皮細胞のアポトーシス死による腺の退行変性、嚢胞化が誘導され、腺体はE p o Rやアロマターゼ活性のない嚢胞となる。さらに平滑筋細胞の無核化が起こり、これらの組織は宿主のマクロファージや好中球による排除が誘導され、崩壊した腺腫の吸収・消失へと誘導されることが示唆される病理所見を得た。腺体の嚢胞化および嚢胞への変化はin vitroにおけるEMP9の腺筋症標本への直接の処置においても認められた。したがって、ヒト生体における腺筋症に対してEMP9処置はその崩壊と治癒を誘導する効果があると判断される。

[0081] b-3. EMP9処置によって誘導されたEpo-EpOR情報伝達遮断によるin vitroおよびex vivoにおける病巣の崩壊

i) 腺筋症標本におけるSTAT5-チロシンリン酸の発現

腺筋症5標本においてSTAT5のチロシンリン酸化を証明するためにSTAT5の免疫沈降とP-Tyrのウエスタンブロット法を行った。

図35は腺筋症標本におけるSTAT5-チロシンリン酸の発現を示す電気泳動図である。

図35に示す様に1症例(Kg)を除いてSTAT5タンパクのバンドを発現し、かつそのうちの1例(Dg)にチロシンリン酸(P-Tyr)の発現を認めた。この結果は使用した症例の標本に腺体を含む割合が少ないか、あるいは保存中に弱められ非常に情報量が少ないために、陽性反応を得るのが難しいことを示唆するが、Epo-EpORタンパクの発現(図1)とその発現部位にSTAT5とP-STAT5が共発現していた(図11、12)事象から、腺筋症はEpo-EpOR情報伝達の制御を受けていることが明らかとなる。

[0082] ii) 腺筋腫におけるSTAT5-PSTAT5の発現

腺筋腫は各腫瘍の大きさが生化学的にSTAT5免疫沈降を行うに十分なタンパク抽出が出来なかったので、免疫組織化学的に検索した。

図36～図38にその結果の組織像を示す。

図36aは、腺筋症標本in vitro EMP9処置(1g、総量1.5mg)によるSTAT5とP-STAT5を示す組織像である。この処置例では、共発現を呈さない腺上皮の破壊(矢印)と基質細胞の破壊(*)が認められる。目盛棒は50μmを示す。

図36bは、腺筋症標本in vitroリン酸生食緩衝液処置(1g、PBS)によるSTAT5とP-STAT5を示す組織像である。この処置例では、共発現を示す腺上皮(矢印)や基質細胞(二重矢印)が認められる。目盛棒は50μmを示す。

図37aは、EMP9 ex vivo処置(1T)の腺筋腫を示す組織像で、破

壊部ではP－STAT5は発現しないか低発現である。EMP9投与（SS、総量0.45mg）例で、矢印は腺上皮破壊部を示し、P－STAT5の発現は殆ど認められない。目盛棒は50μmを示す。

図37bは、生食水ex vivo処置（IT）の腺筋腫を示す組織像で、腺上皮および基質細胞での共発現を示す。生食投与（SS、対照）例で、矢印は共発現を示す腺上皮の核を示す。目盛棒は50μmを示す。

図38aは、EMP9 ex vivo処置（IP）の腺筋腫を示す組織像で、稀薄化した破壊進行中の腺上皮はP－STAT5が発現しないか低発現を示す。EMP9投与（Mg、0.4mg）例で、腺上皮の離脱（星印）と稀薄化（矢印）が認められる。目盛棒は50μmを示す。

図38bは、図38aの腺上皮稀薄部位の拡大像である。図38aの強拡大部のP－STAT5の低発現を示す。目盛棒は50μmを示す。

図38cは、生食水処置（IP）の腺筋腫の組織像である。STAT5とP－STAT5共発現を示す腺筋腫内の腺体と平滑筋線維が認められる。生食水投与（Mg、0対照）例で、矢印は腺体を示す。目盛棒は50μmを示す。

図38dは、図38cの矢印部位の強拡大組織像である。矢印は個々の腺細胞を示す。細胞質と核に共発現している。目盛棒は10μmを示す。

図36a、b、図37a、b、図38a～dに示す様にEpOR発現を認めた腺上皮・基質細胞の崩壊・変性を示す部位においては、EMP9処置例ではSTAT5とP－STAT5の共発現は認められなかった。

[0083] 以上、腺筋症標本のin vitroおよびex vivo系でのEMP9処置実験の意義をまとめると、腺筋症組織およびその移植腫においてもEpORが機能的であることが、STAT5－P－STAT5の共発現が増殖性細胞の組織で認められたことで明らかとなった。

かくして、EMP9処置は病巣におけるEpORの機能停止へと導く、すなわち、STAT5のリン酸化を阻止することによって、増殖組織を崩壊へと誘導する。

実施例 2

[0084] EMP 9 の前立腺肥大症に対する効果

1) 標本の採取・処置および検索方法

a) 採取

充分な説明により同意の得られた前立腺肥大症 (benign prostate hypertrophy、BPH) の患者の増殖部位除去術 (transurethral resection of the prostate、TURP) で摘出された組織片の中で病理検査用に供した残余のものを使用した。切除標本は術後直ちに凍結するかあるいはストレプトマイシン・ペニシリン混入DMEM培養液 (Sigma) に移し、実験開始まで冷暗所 (8℃) に保存した。標本数は15症例であった。凍結保存のものは生化学的検索に、培養液保存のものはin vitro処置後、組織学的解析に使用した。

[0085] b) 薬物

ペプチド研究所製のEMP 9を使用した。

c) 処置

in vitro器官培養法を用いた。標本塊に注射針 (ハミルトン32G) で、直接EMP 9のリン酸生食緩衝液または対照としてリン酸生食緩衝液を注入した。器官培養の方法は実施例1と同様である。

d) 検索方法

薬物処置後12～17時間の標本塊をザンボニ液にて固定し、組織標本作製した。通常のヘマトキシリン・エオジン染色標本ではEMP 9の平滑筋および腺房に対する影響を検索した。一方、分布血管への影響は抗FVIII抗体による免疫染色標本で検索した。

[0086] 2) BPHにおけるEpoR情報発現

a) 病理組織学的特徴

図39は、BPH組織に発現するEpoRとEstR α の局在を示す組織像である。aは腺と平滑筋を抗EpoR抗体で染色した像で、矢印は腺上皮細胞、*印は平滑筋細胞を示す。bはEpoRを発現している平滑筋細胞群

(矢印)の像、cは、平滑筋細胞のS mーミオシン(染色性に濃淡有り、矢印)の像で、dは、平滑筋細胞でのE s t R α (矢印)を示す像である。目盛棒は20 μ mを示す。

図40はBPHの腺上皮におけるE p o RとE s t R α の共存を示す標本(1U、70)の組織像で、腺上皮のE p o RとE s t R α とは共存している。矢印は腺上皮細胞、二重矢印は血管内皮細胞を示し、目盛棒は50 μ mを示す。

図41は増殖性の平滑筋細胞を示す組織像で、矢印はP C N A陽性反応を示す核である。目盛棒は20 μ mを示す。

[0087] BPHは図39aに示すように、E p o R陽性反応を示す上皮を持つ腺房と、周辺部では主にE p o R陽性反応(図39b)を示す平滑筋線維から成立している。さらに平滑筋線維は平滑筋ミオシン抗体陽性反応(図39c)とエストラジオール受容体 α (E s t R α)抗体に陽性反応を示した(図39d)。図40に示すごとく、E p o RとE s t R α とは共発現し、これらの腺上皮や平滑筋細胞はエリスロポエチンやエストラジオールによって増殖することが考えられ、実際に増殖性抗体(P C N A)に陽性反応を示した。図41に平滑筋線維の核にP C N A陽性反応を示した。

[0088] b) BPH標本組織におけるE p o Rの発現

4症例の組織抽出液の膜分画でE p o Rタンパクの検索を、抽出液中のタンパク分画で β -アクチン(actin)の検索をウエスタンブロット法によって行った。結果を図42に示す。

図42は、BPH標本におけるE p o Rタンパクの発現を示す電気泳動図である。

各レーンは20 μ gのタンパク量を用いた。4症例共に発現の濃淡があるが、E p o Rタンパクのバンドを認めた。

c) BPH標本組織での各種m R N Aの発現

表9に各種m R N Aの発現量を示した。

[表9]

	標本数	検索数	発現量/18S rRNA mRNA $\times 10^9$ 平均 $\pm$ 標準誤差
Epo mRNA	4	12	2.23 $\pm$ 0.82
EpoR mRNA	4	12	1.14 $\times 10^3 \pm 0.23 \times 10^3$
アロマターゼ mRNA	3	9	1.25 $\pm$ 0.51
Sm-ミオシン mRNA	3	9	22.3 $\times 10^6 \pm 11.3 \times 10^6$
エストラジオール受容体 α	3	9	1.48 $\times 10^3 \pm 1.03 \times 10^3$

腺筋症標本組織での発現量（実施例1の表1）と比べると、アロマターゼとSm-ミオシンmRNAの発現量が高い。

[0089] d) EMP9処置によるBPHの病理組織学的所見

図43は、EMP9処置によるBPHの病理組織学的所見を示す組織像である。a～cは平滑筋部、e～hは腺房部を示す。aはEMP9処置（SS、5.0 μ g/組織mg）例の平滑筋組織のH・E像である。bはaの近隣切片の抗EpoR抗体反応像、cはaの近隣切片でのTdT処置結果、dは同一EpoR抗体を用いた陽性対照である。マウス赤芽球細胞表面（小さい矢印）と卵黄嚢上皮細胞（大きい矢印）にEpoRの発現が認められ、矢印は平滑筋線維の断裂（a、b）、平滑筋細胞のTdT陽性の核（c）を示し、*印は無構造部位を示す。eはEMP9処置（IU、5.0 μ g/組織mg）例の崩壊した腺房のH・E像である。fはeの近隣切片のTdT処置像、gはEMP9処置（IU、2.5 μ g/組織mg）崩壊した腺房のTdT処置像、hはPBS処置（IU、対照）の小さな腺房の集合像である。矢印はeとfは同一死細胞を指す。f、g、hはTdT陽性の核（g～h）。a～c、e～hは同倍率で目盛棒は20 μ mを示す。

[0090] EMP9の2用量（10mg/mlおよび5mg/ml、組織mg当たり5.0および2.5 μ g）で処置すると、EpoRを発現している平滑筋線維は無核となり断片化され、ついには無構造の物質に置き換えられてしまった（図43a、b、c）。平滑筋線維および核の断片化はアポトーシス死を示した（図43c）。また、腺房ではEMP9によって腺構造の崩壊と内容物の分散を示し（図5e、g、f）、脱落した上皮細胞はアポトーシス死を

示した（435 g、f）。PBSで処置したものは腺構造の破壊は認められず、少数のアポトーシス死を示す腺上皮が認められた（図43 h）。

表10にEMP9処置におけるBPH組織崩壊像を示す。これは全例のH・E染色標本において解析した結果をまとめたものである。

[表10-1]

標 本 (標本名)	調 査				調 査 所				調 査 所 集 計				其 の 他			
	調査方法	調査人数	調査回数	調査期間	調査回数	調査人数	調査回数	調査期間	調査回数	調査人数	調査回数	調査期間	調査回数	調査人数	調査回数	調査期間
Tnb (09)	3	10	4	5.0	12	10	13	0	2	11	11	11	199	76	87	56
													(66.3)	(38.2)	(33.7)	(23.1)
	3	5	4	2.5	12	10	21	5	3	13	13	13	157	65	51	41
													(52.3)	(41.4)	(32.5)	(26.1)
	3	PBS	4	—	12	10	30	7	12	11	11	11	214	146	53	15
													(71.5)	(68.2)	(24.8)	(7.0)
Yk (72)	2	10	4	5.0	12	10	17	0	7	10	10	10	137	49	41	47
													(45.7)	(35.8)	(29.8)	(34.3)
	2	5	4	2.5	12	10	0	0	0	0	0	0	205	87	58	52
													(66.3)	(42.4)	(32.2)	(25.4)
	2	PBS	4	—	12	10	3	0	0	3	3	3	246	170	56	20
													(82.6)	(88.1)	(22.8)	(8.1)
KN (70)	3	10	4	5.0	12	10	20	0	19	1	1	1	182	47	51	84
													(60.7)	(25.8)	(28.8)	(46.2)
	3	5	4	2.5	12	10	15	0	10	5	5	5	231	64	70	36
													(77.9)	(21.7)	(30.3)	(42.4)
	3	PBS	4	—	12	10	6	1	5	0	0	0	216	91	81	64
													(72.0)	(42.1)	(28.2)	(29.8)
BU (70)	4	10	4	5.0	12	10	9	0	4	5	5	5	210	46	123	41
													(70.0)	(21.8)	(58.6)	(19.3)
	4	5	4	2.5	12	10	26	2	11	13	13	13	196	35	118	42
													(66.3)	(18.4)	(60.2)	(21.4)
	4	PBS	4	—	12	10	28	12	9	9	9	9	209	100	76	24
													(66.7)	(38.0)	(36.0)	(12.0)
	—	—	—	—	—	10	16	16	0	0	0	0	201	201	0	0
													(100.0)	(100.0)	(0.0)	(0.0)

[0091] [表10-2]

通 過		調 査 期 間			調 査 地 域			調 査 方 法			調 査 結 果		
通 過 年 次	通 過 月 日	通 過 時 間	通 過 地 点	調 査 人 員	調 査 方 法	調 査 地 域	調 査 方 法	調 査 結 果	調 査 地 域	調 査 方 法	調 査 結 果	調 査 地 域	調 査 方 法
4	10	4	5.0	17	15	11	0	0	0	0	0	0	0
4	5	4	2.5	17	15	21	0	0	0	0	0	0	0
4	PBS	4	—	17	8	26	0	0	0	0	0	0	0
—	—	—	—	—	10	1	0	0	0	0	0	0	0
4	10	4	5.0	16	10	3	0	0	0	0	0	0	0
4	5	4	2.5	16	12	15	0	0	0	0	0	0	0
4	PBS	4	—	16	10	22	0	0	0	0	0	0	0
3	10	4	5.0	12	10	12	0	0	0	0	0	0	0
3	5	4	2.5	12	10	1	0	0	0	0	0	0	0
3	PBS	4	—	12	10	0	0	0	0	0	0	0	0

[0092] 表10において、aは300区画内の内訳（各内訳の全存在数に対する割合、%）を示す。*、**、*** χ^2 検定、* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

[0093] 腺分散（図43e）は、それぞれの対照と比べてEMP9高濃度処置7例中6例において、低濃度処置では7例中5例において有意に高頻度に現れた（ $P<0.001$ 、 $P<0.05$ ）。腺分散を示さなかったもののうち腺上皮脱落を示したものは、それぞれの対照と比べてEMP9高濃度で2例（KN、IA）、低濃度で2例（KN、Nkt）において有意に多かった（ $P<0.001$ ）。

平滑筋線維で有核細胞をもつ区画は、EMP9処置の高および低濃度で4例において対照と比べて有意に少なかった（ $P<0.001$ 、 $P<0.05$ ）。反対に無核を示す細胞を有する区画はEMP9処置高濃度で4例、低濃度で3例において対照と比べて有意に多かった（ $P<0.001$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.05$ ）。平滑筋線維が無核で断片化を示したものは、EMP9処置の高濃度で4例、低濃度で5例、それぞれの対照と比べて有意に多かった（ $P<0.001$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.05$ ）。また、この5例のうち1例においてEMP9の断片化に対して用量効果関係を示した。無構造領域の出現頻度は高濃度処置3例において対照と比べて有意に高かった（ $P<0.001$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.05$ ）。

[0094] e) EMP9処置によるBPH組織血管網の破壊

図44はEMP9処置によるBPH組織血管網の破壊を示す組織像である。aはBPH無処置（IU）の血管分布（抗FVIII抗体）を示す像、bはEMP9処置（IU、 $5.0\mu\text{g}/\text{組織mg}$ ）例を示す像、cはPBS処置（IU、対照）例を示す像で、矢印は陽性反応を示す崩壊（b）または正常（c）の血管内皮細胞を示す。*印は腺房の腔を示す。a～cは同倍率で目盛棒は $20\mu\text{m}$ を示す。

BPHに分布する血管は図44aに示す様に腺房を取り囲んで直径の異なる血管が分布している。EMP9 $10\text{mg}/\text{ml}$ 処置群では崩壊した腺房の周囲に血管内皮細胞の破損した血管が多く認められた（図44b）が、対照

では内皮の破損は少なかった（図44c）。

[0095] 抗FVIII抗体で染色した組織標本で直径を3群（ $a > 10 \mu m$ 、 $b = 10 - 3 \mu m$ 、 $c < 3 \mu m$ ）に分け、それらの分布数を、一定面積（ $5.7 \times 10^{-3} mm^2$ ）を一区画として数え、1標本につき50区画数えた。それらの血管密度を図45に示す。

図45は、BPH組織におけるEMP9処置組織での血管径の異なる血管密度の変化を示すグラフである。

また、図45からEMP9処置とPBS処置と比較して、それぞれの直径または合計数の間に有意に血管減少を示した例の有意差出現を一覧にして表11に示す。

[表11]

症例 直径	EMP9処置 濃度(mg/ μ l)	Tnb	YK	KN	IU	Nkt	IA	SS	MN
$a > 10 \mu m$	10	**	***	—	***	—	—	***	—
	5	***	—	—	—	—	*	**	—
$b = 10-3 \mu m$	10	***	**	—	**	—	***	*	***
	5	***	—	—	—	—	—	—	***
$c < 3 \mu m$	10	—	***	**	—	—	*	***	***
	5	*	*	—	—	—	—	—	**
合計数	10	**	***	**	—	*	***	***	***
	5	***	**	—	—	—	—	—	***

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ で有意差あり。

[0096] 表11に示すごとく、EMP9処置により、a、b、c共にEMP9処置により有意に減少したのは8例中3例であった（ $P < 0.001$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ）。8例中6例はaとbまたはbとcで対照群との間に有意差を示した。合計血管数においては、EMP9処置群は1例を除いて高および低濃度共に、あるいは高濃度のみに対照群と比べ有意な減少を示した。合計数で有意差を示さなかった1例は、高濃度処置群のaとbの大きさの血管数の有意な減少を示した。したがって、EMP9処置はBPHの血管網を障害することが明らかとなった。

[0097] 以上、BPH組織標本におけるEMP9処置の効果をまとめると、BPHではEpo mRNA、EpoR mRNA、アロマターゼmRNA、Est

R α mRNAおよびS α -ミオシンmRNAの発現が認められ、E α Rタンパクの発現とE α RとE α t R α が腺上皮や平滑筋に共存していることが明らかになった。とくにアロマターゼmRNAが高いことから、BPHでは血液経由で運ばれて来るテストステロンやデハイドロエピアンドロステロンなどがin situでエストロゲンに変換される可能性があることを示唆している。したがって、BPHの発生機序は腺筋症や子宮内膜で認められた (Yasuda et al., JBC, Vol. 273, pp 25381-25387 (1998)) ようにこのエストロゲンによりエリスロポエチン分泌が誘導され、E α Rの発現している腺上皮細胞、平滑筋線維および血管内皮細胞の増殖が促進されることによると考えられる。

かくして、EMP9の組織直接注入はE α Rを介する情報を遮断することによって、腺房上皮細胞、平滑筋細胞にアポトージス死を誘導し、微小血管網の破壊も相俟ってBPHを崩壊へと導く可能性を有することが明らかとなった。

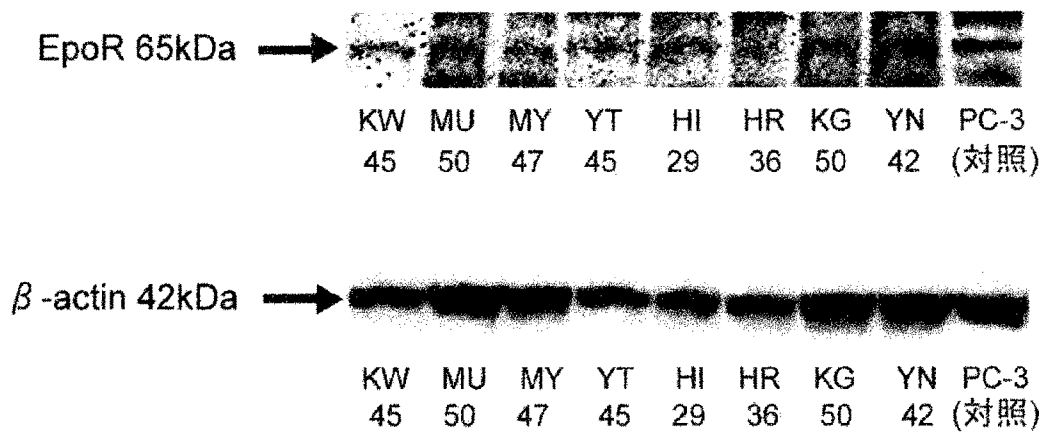
産業上の利用可能性

[0098] 以上のとおり、本発明によれば、腺筋症、内膜症、子宮筋腫、前立腺肥大症のような女性ホルモン依存性増殖性疾患の治療・改善に有用な医薬が提供できる。

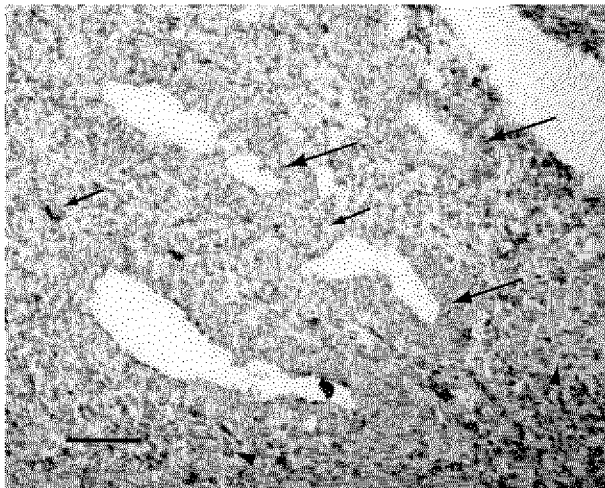
請求の範囲

- [請求項1] エリスロポエチンミメティックペプチド9を含有してなる、腺筋症、内膜症、子宮筋腫または前立腺肥大症の治療・改善剤。
- [請求項2] 腺筋症の治療・改善剤である請求項1記載の剤。
- [請求項3] 内膜症の治療・改善剤である請求項1記載の剤。
- [請求項4] 子宮筋腫の治療・改善剤である請求項1記載の剤。
- [請求項5] 前立腺肥大症の治療・改善剤である請求項1記載の剤。

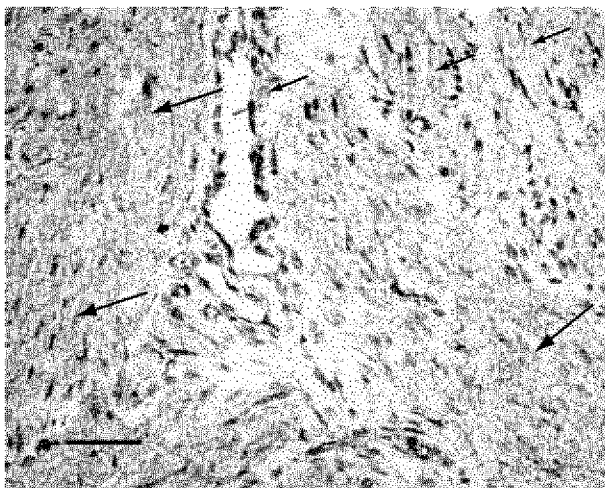
[図1]



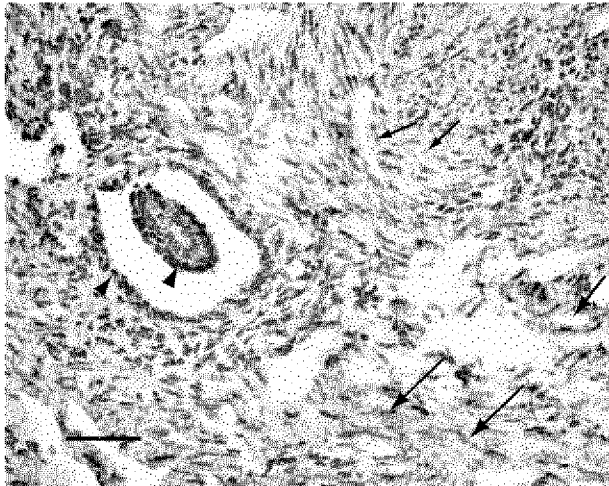
[図2a]



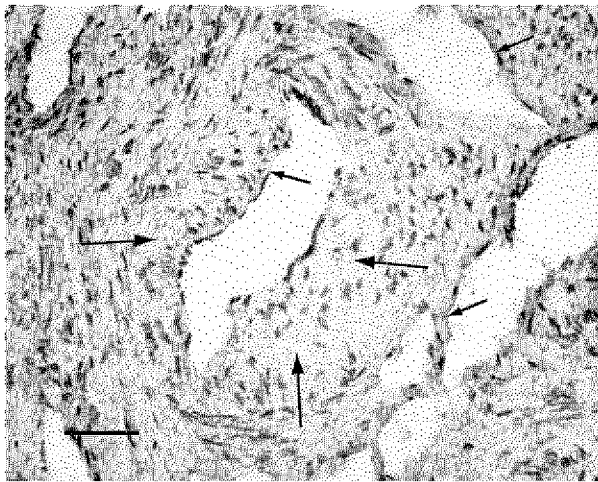
[図2b]



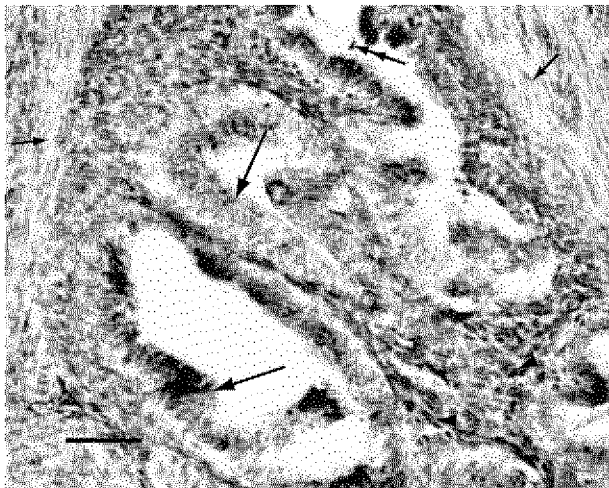
[図3]



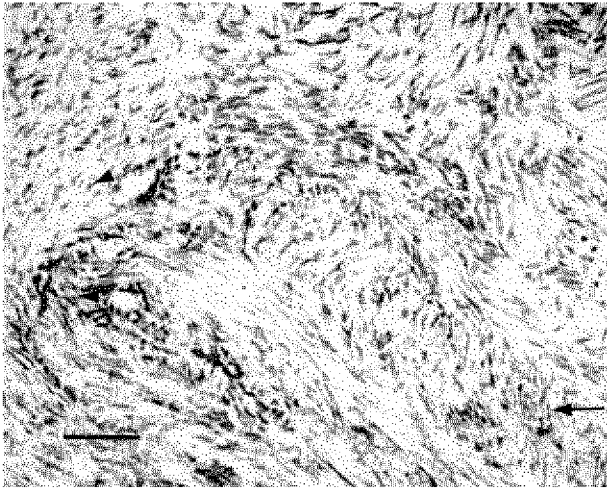
[図4]



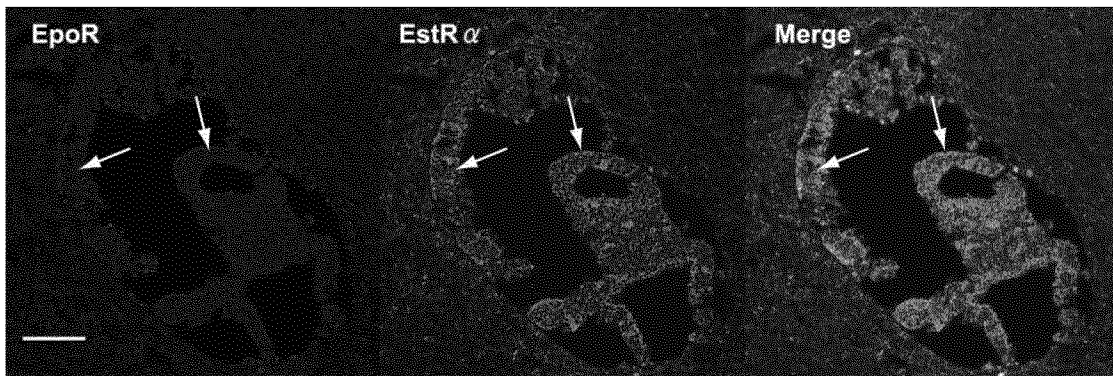
[図5]



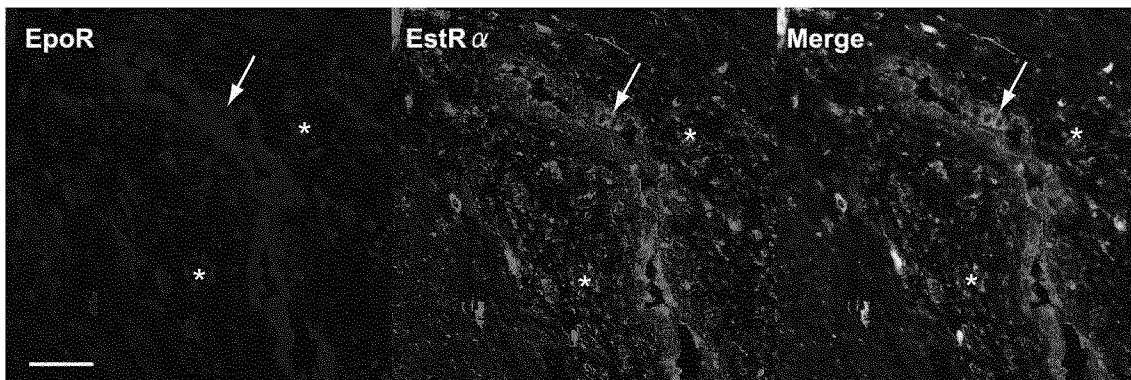
[図6]



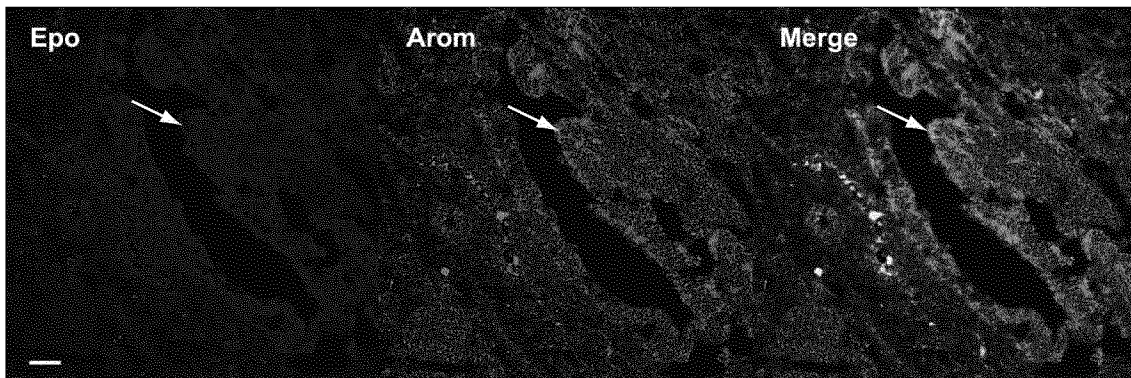
[図7]



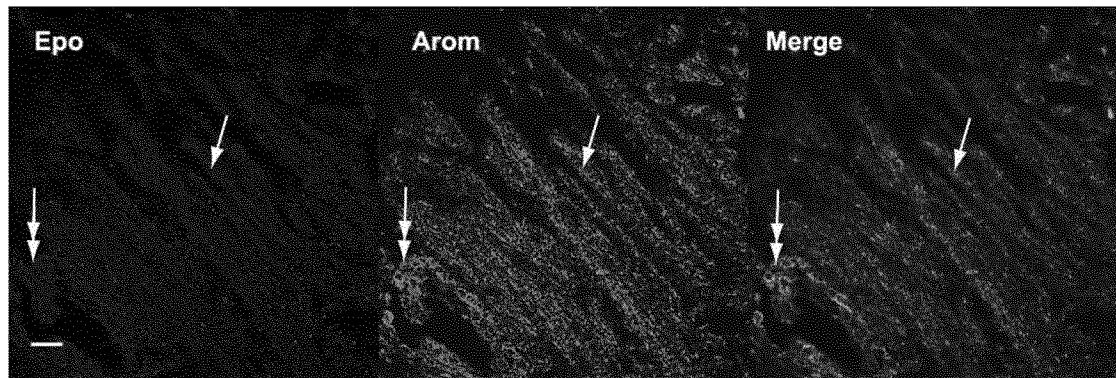
[図8]



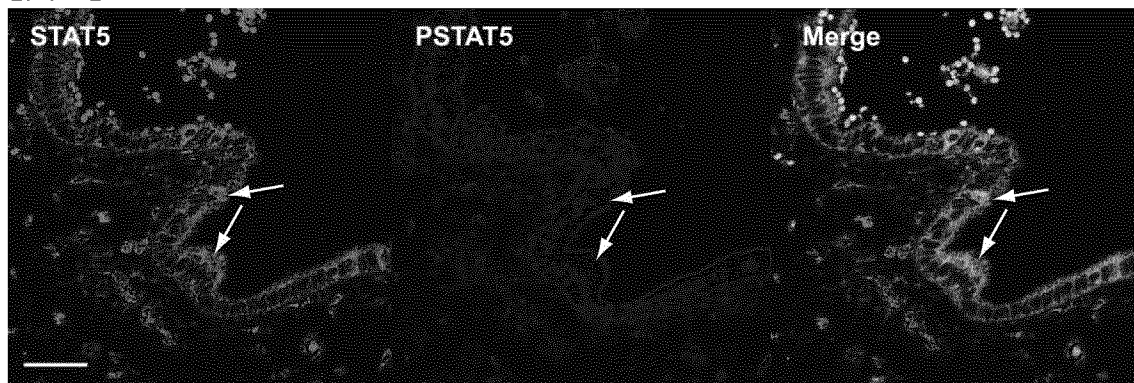
[図9]



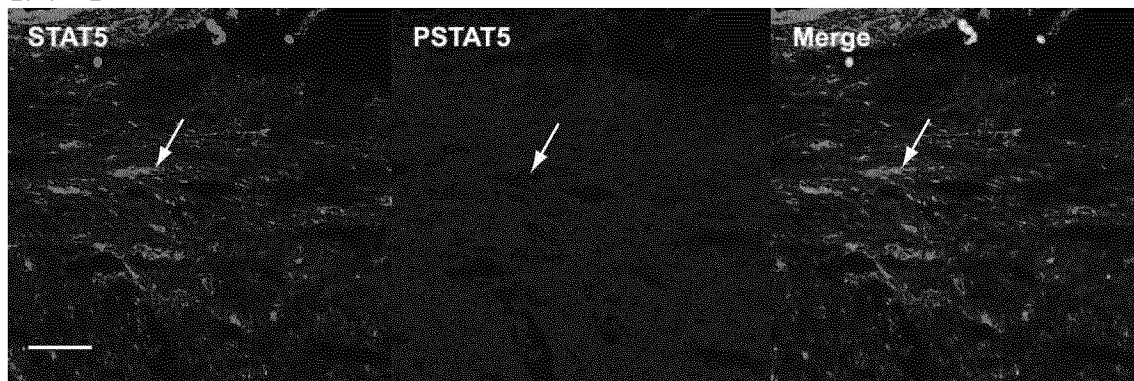
[図10]



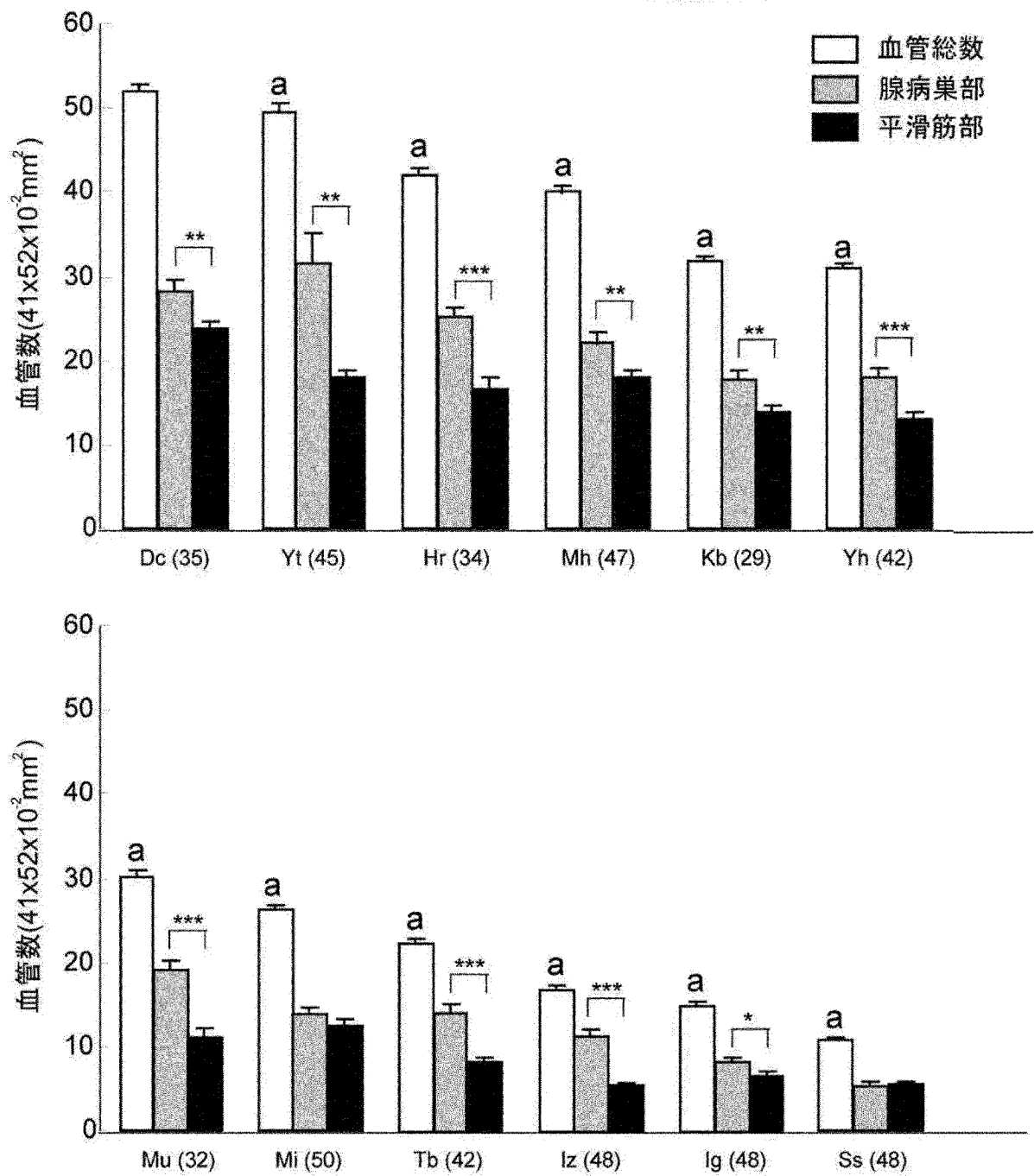
[図11]



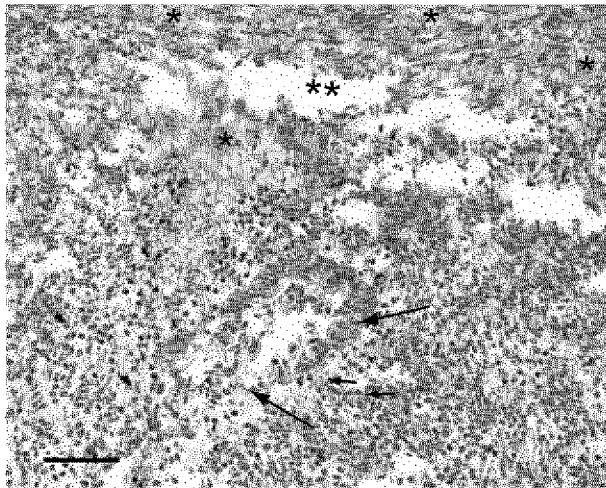
[図12]



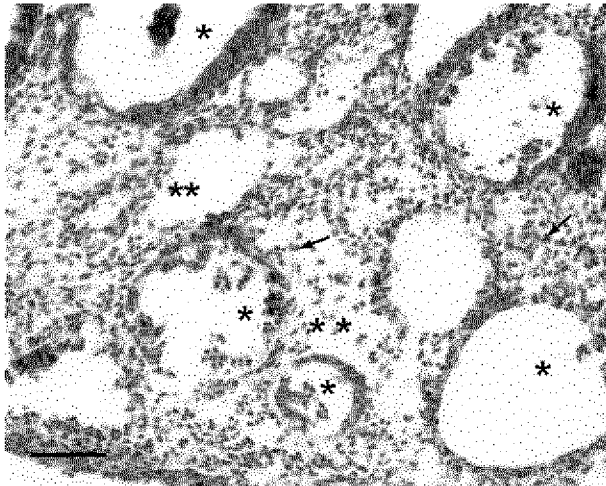
[図13]



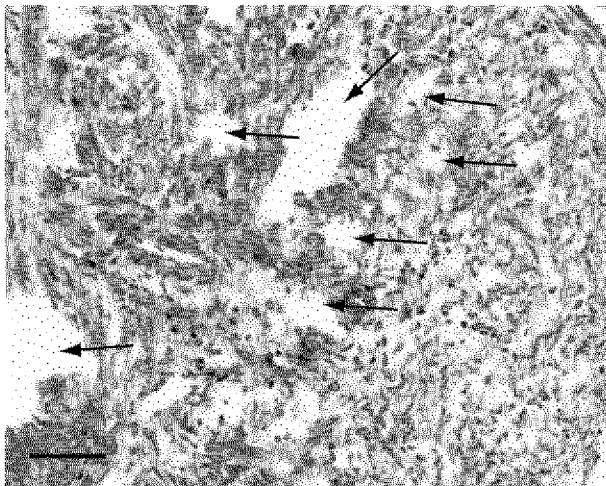
[図14]



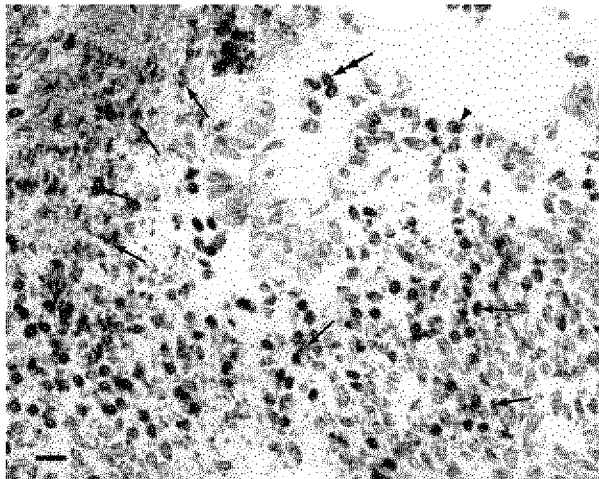
[図15]



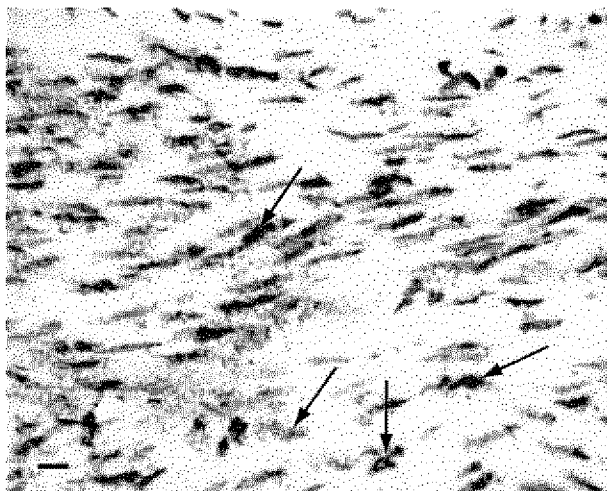
[図16]



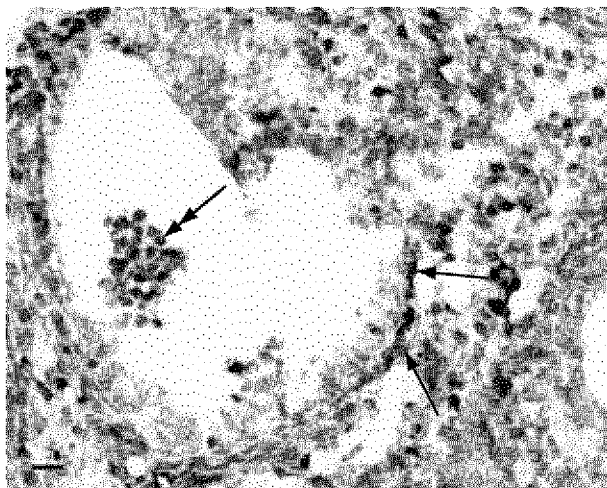
[図17]



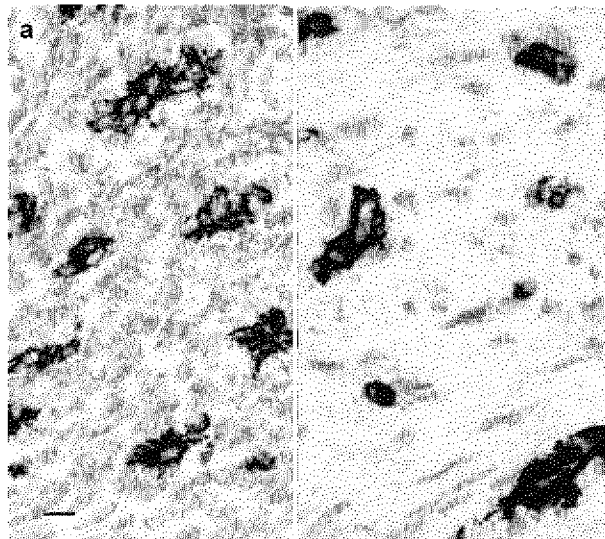
[図18]



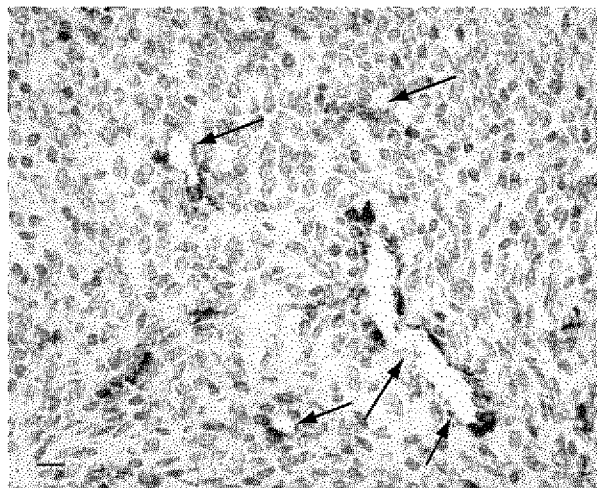
[図19]



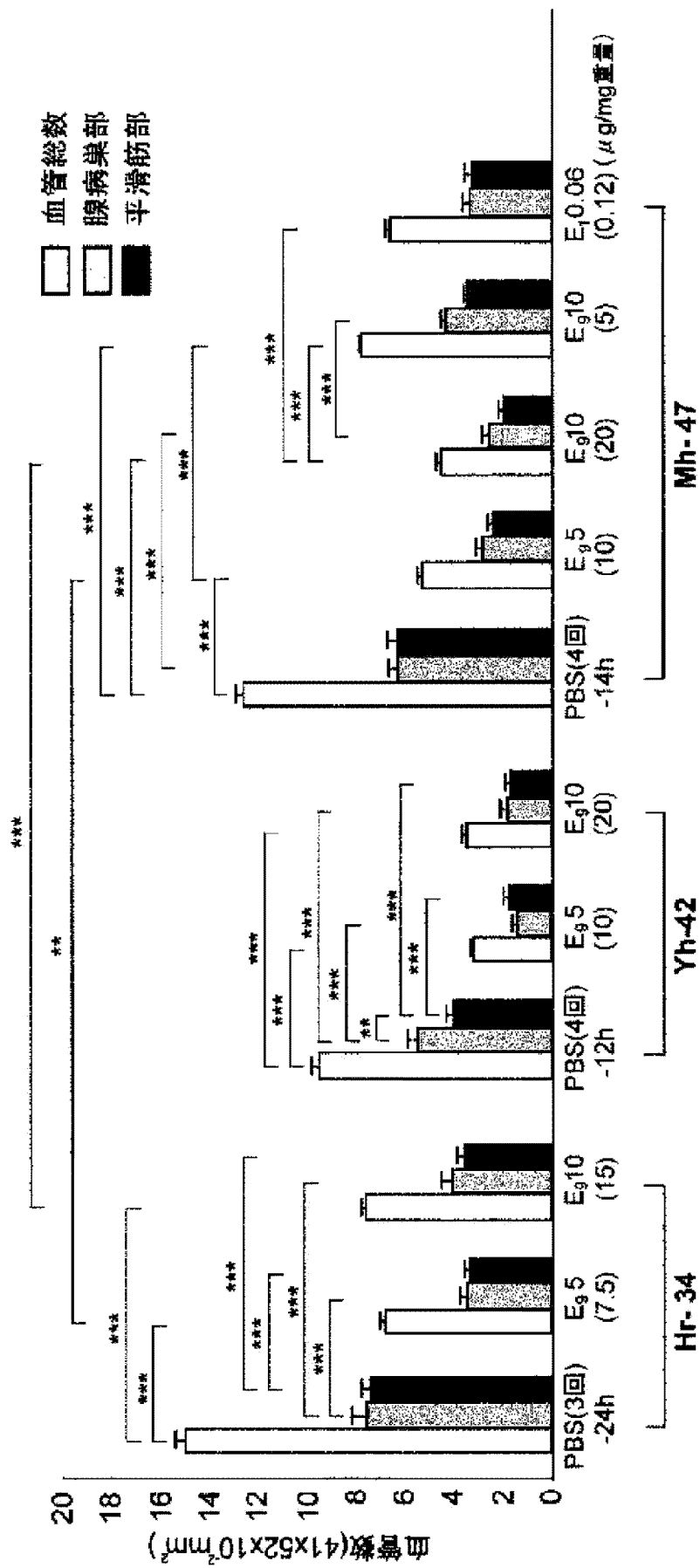
[図20]



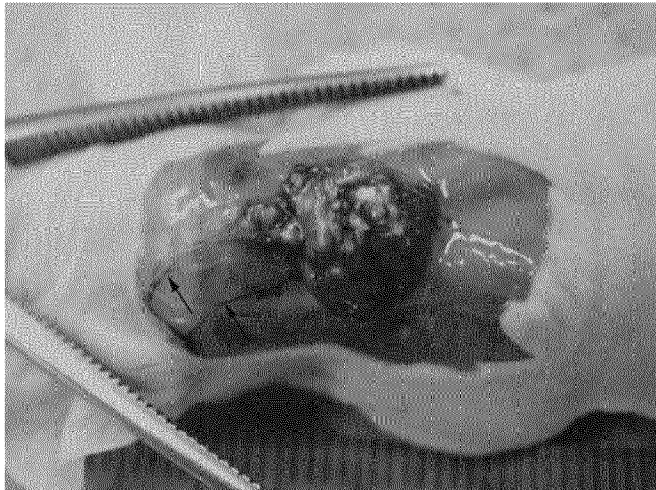
[図21]



[図22]



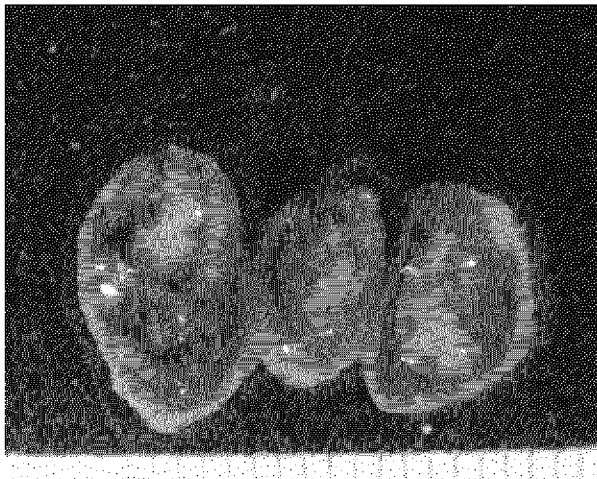
[図23]



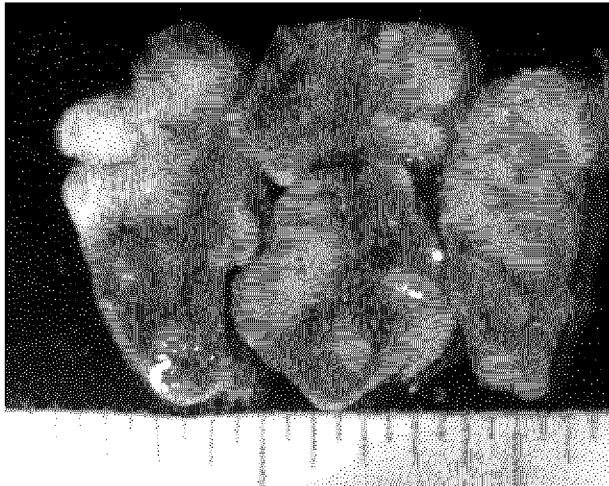
[図24]



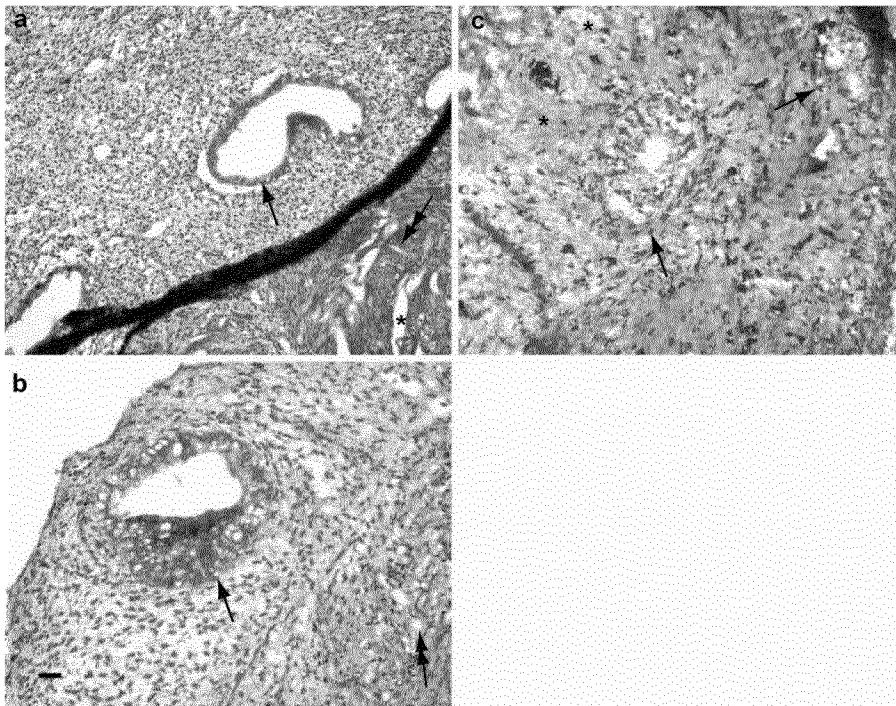
[図25]



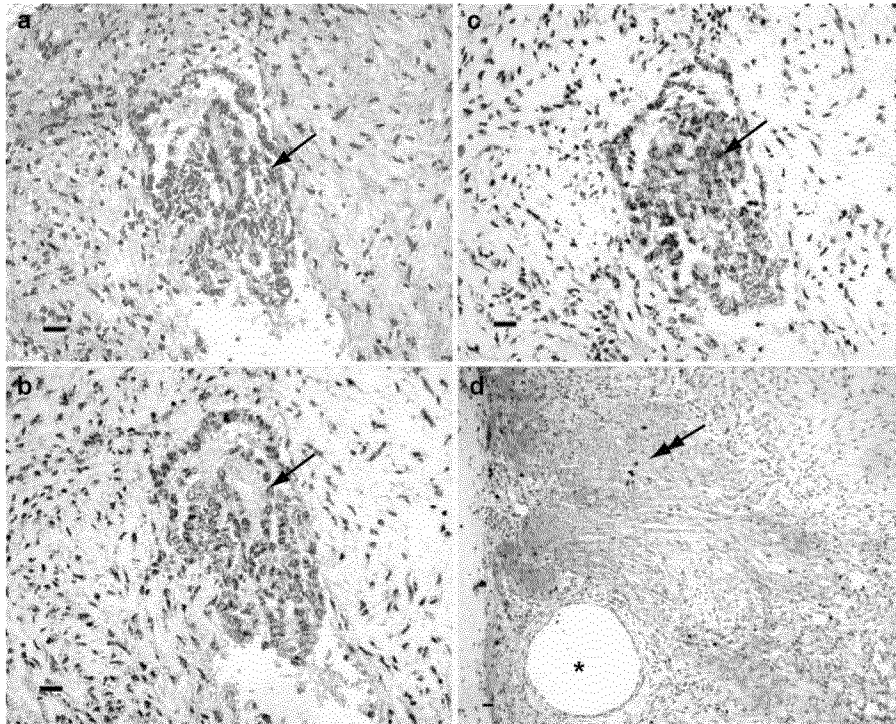
[図26]



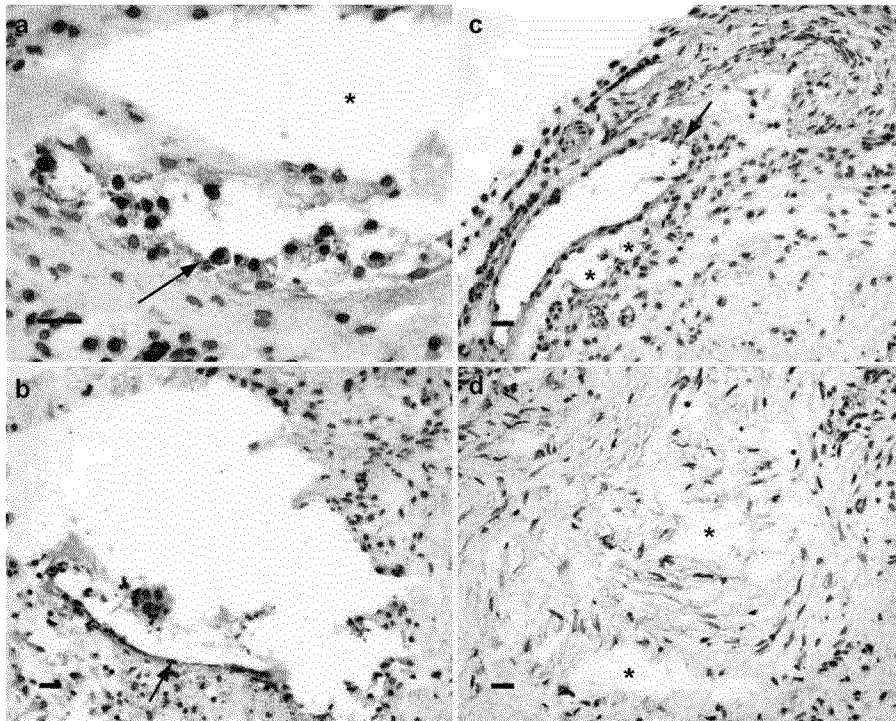
[図27]



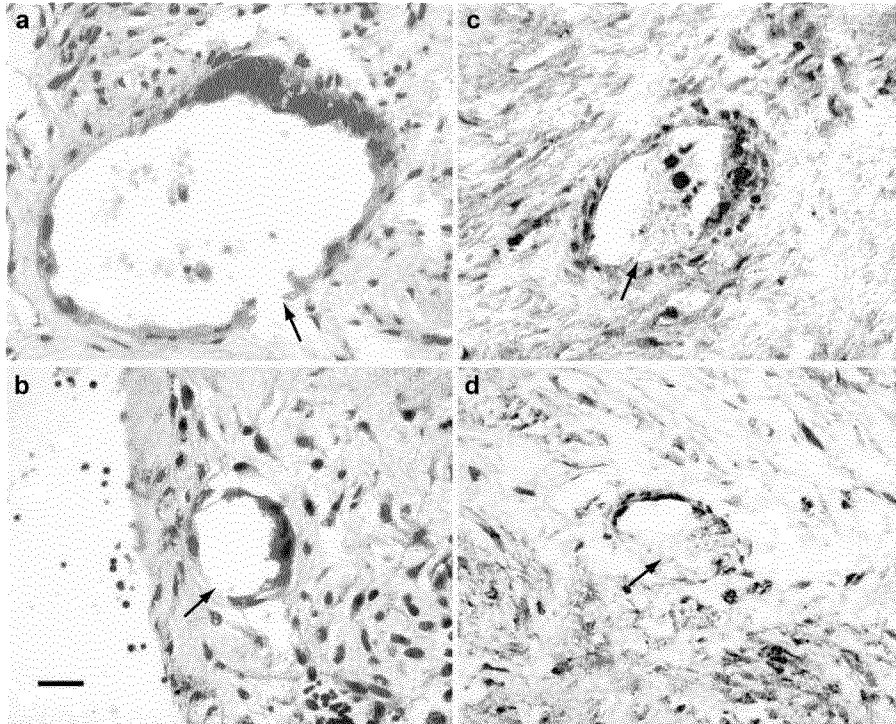
[図28]



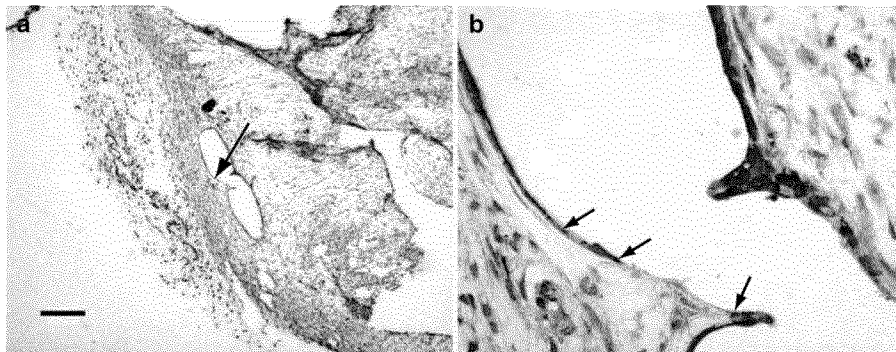
[図29]



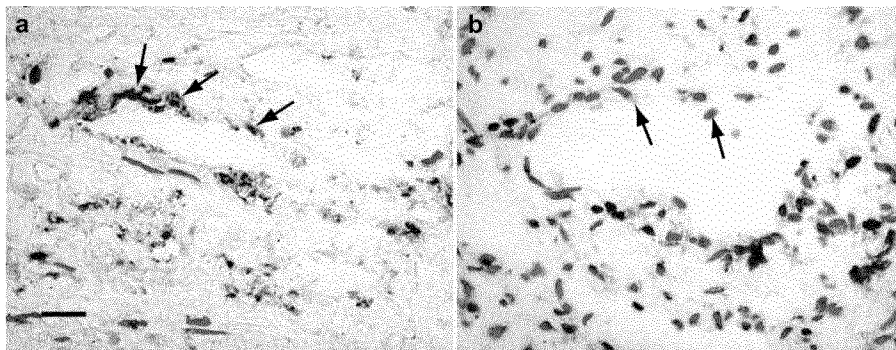
[図30]



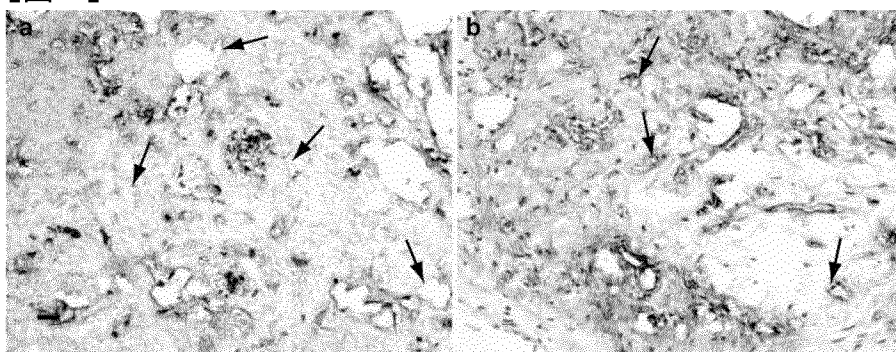
[図31]



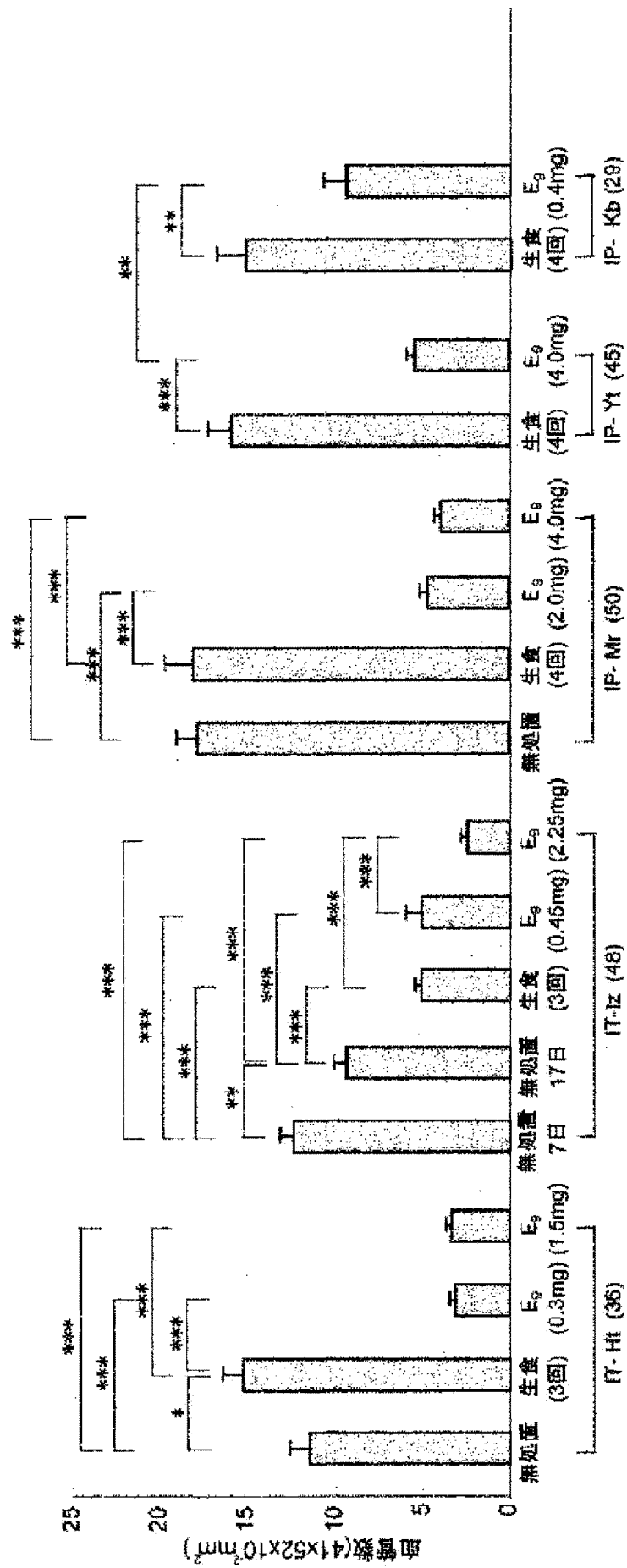
[図32]



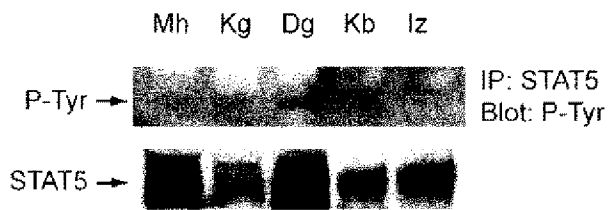
[図33]



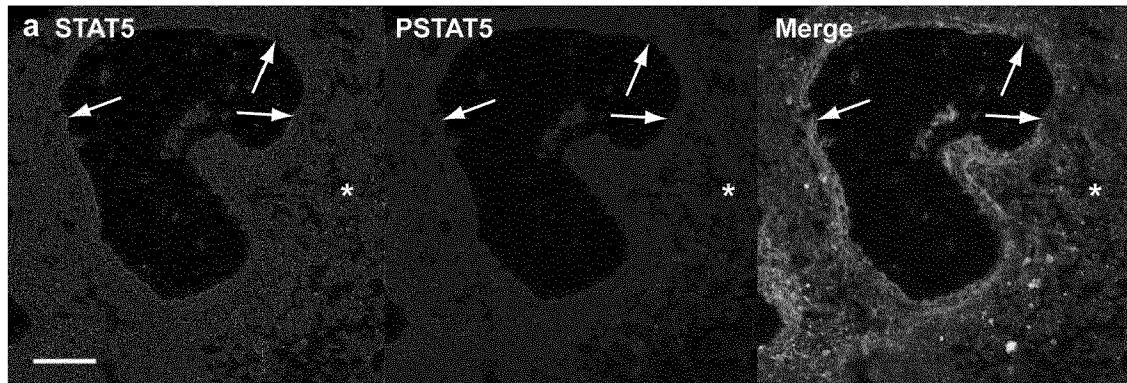
[図34]



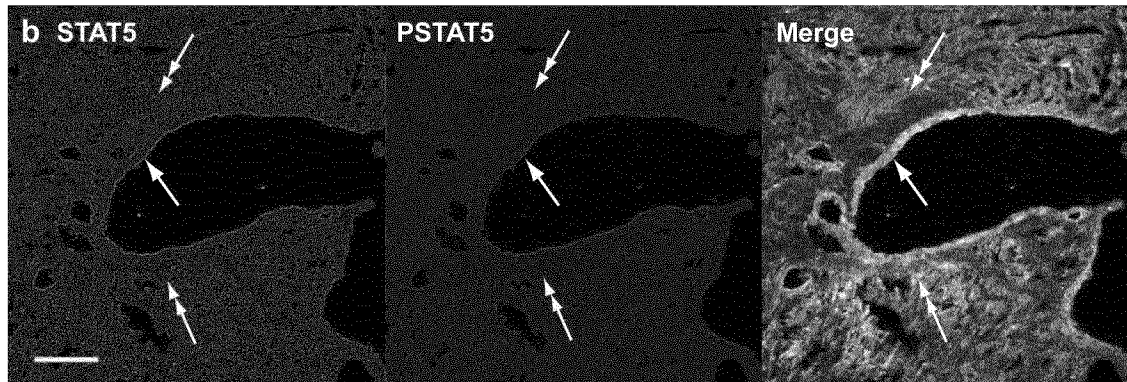
[図35]



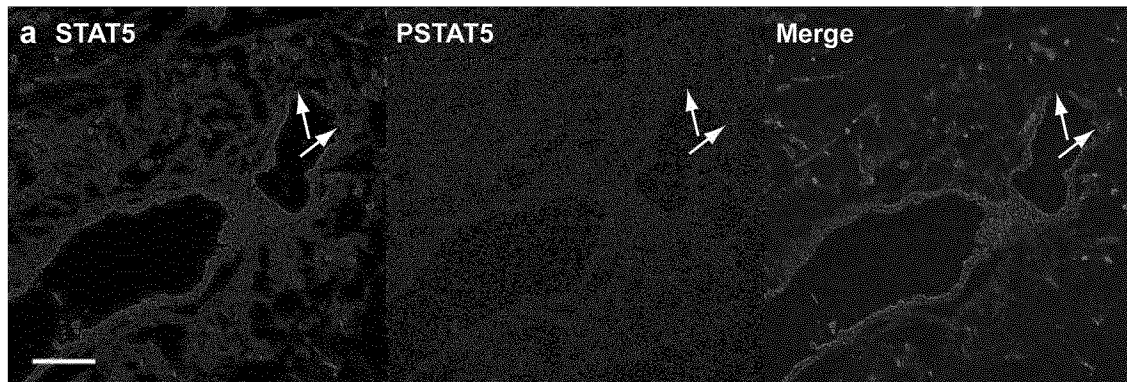
[図36a]

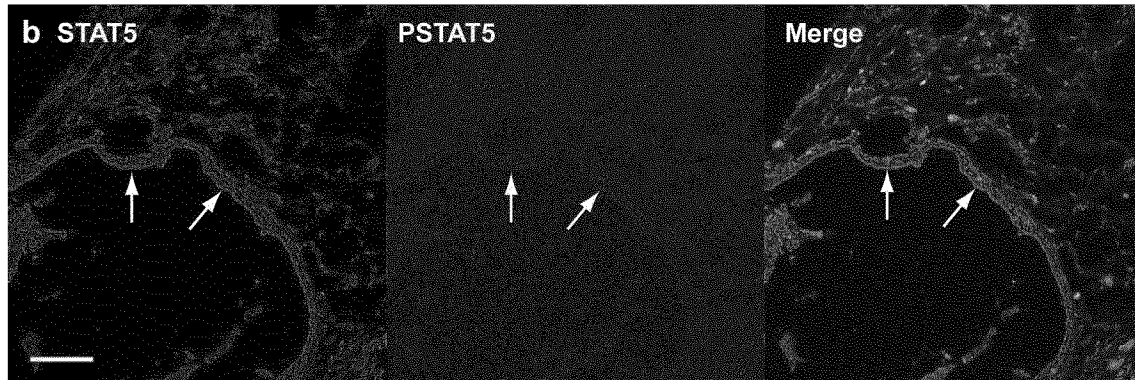
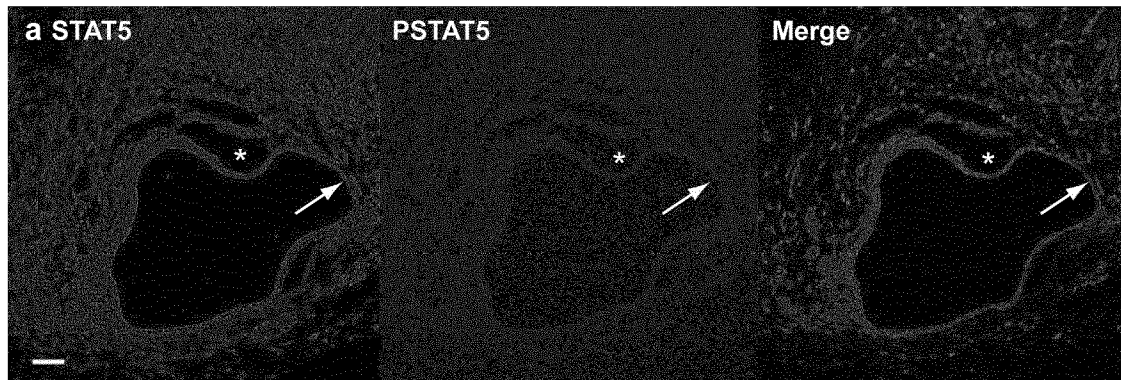
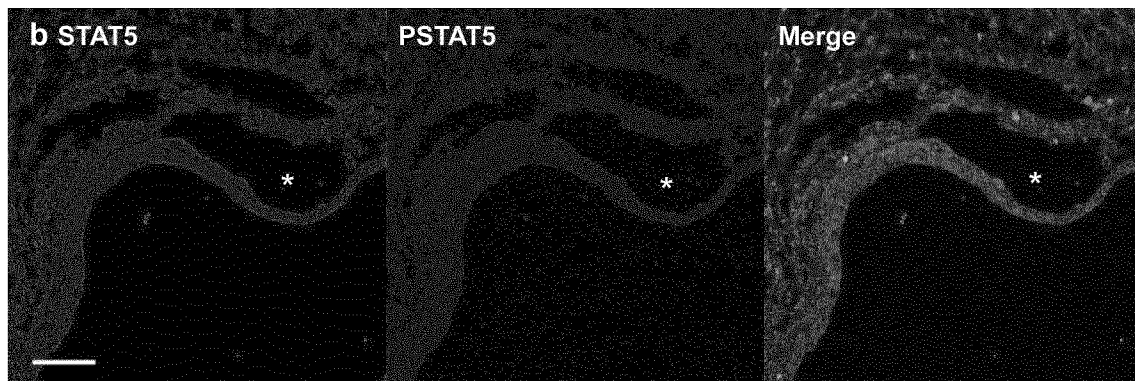
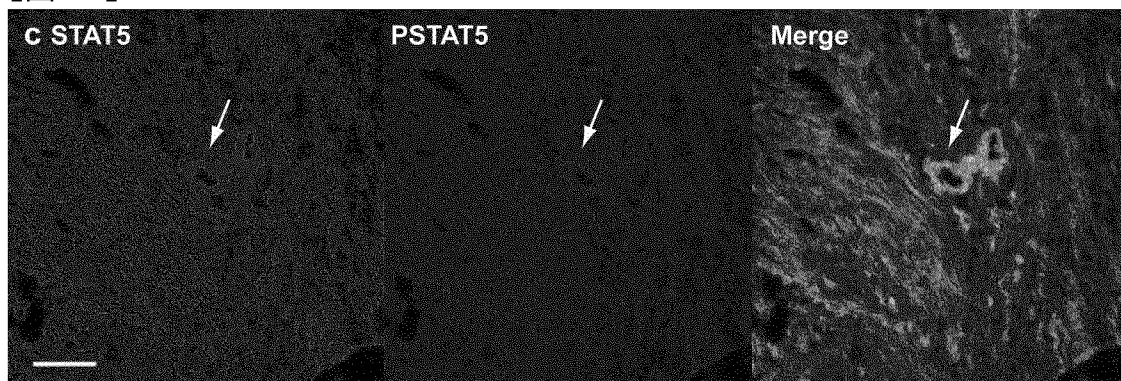


[図36b]

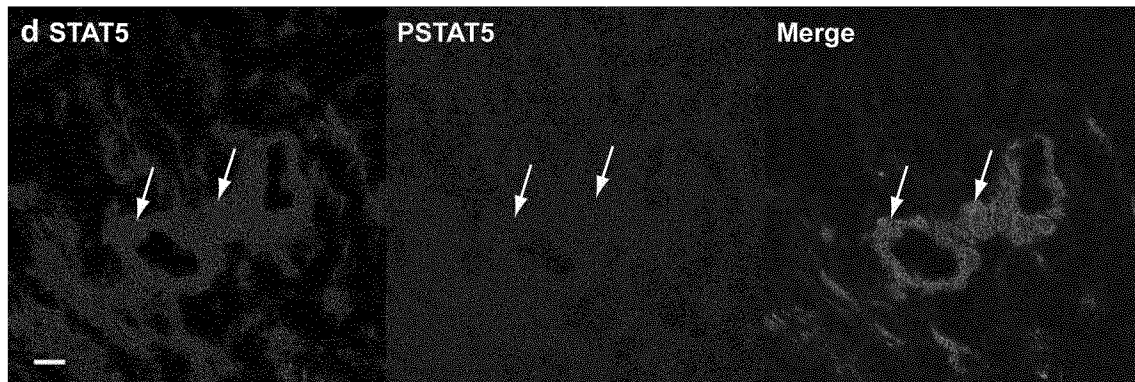


[図37a]

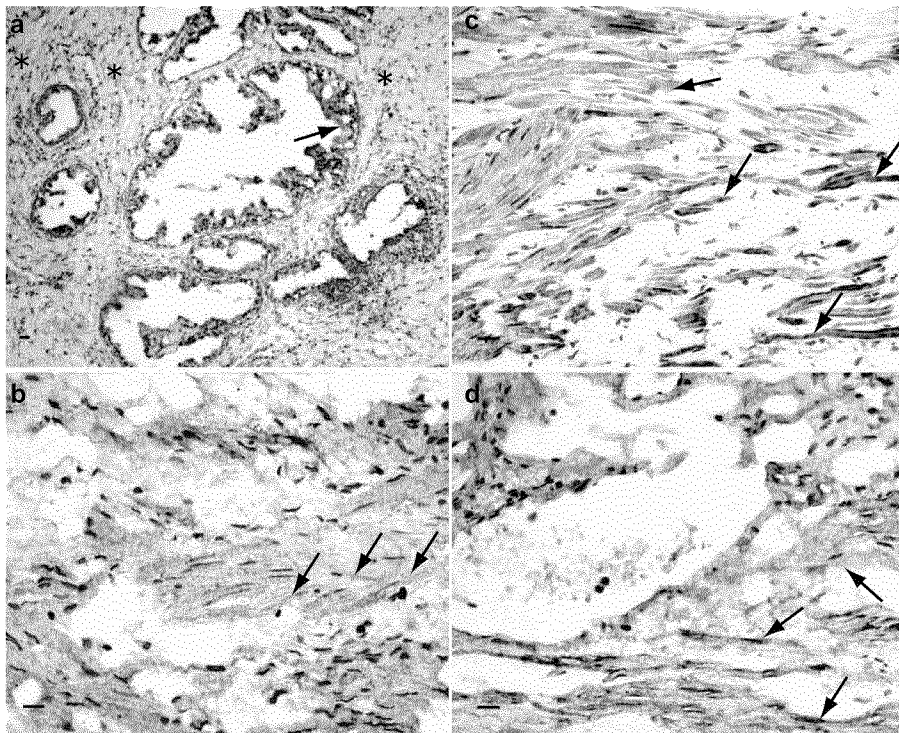


[37b][38a][38b][38c]

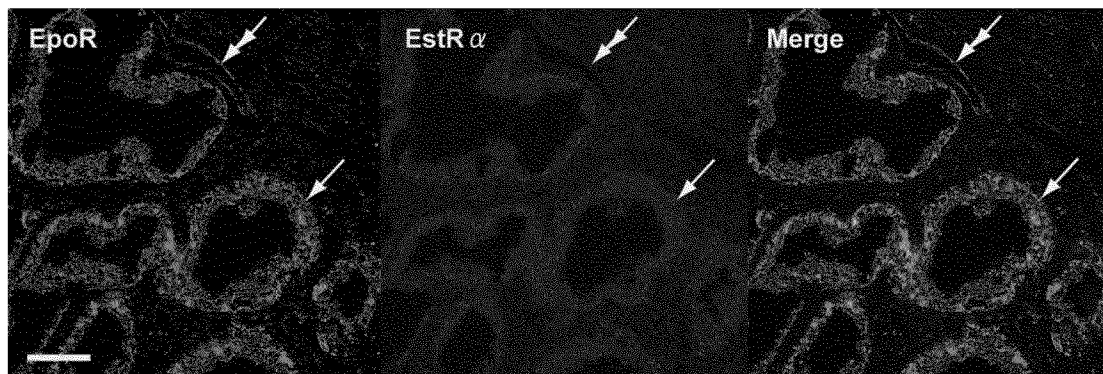
[図38d]



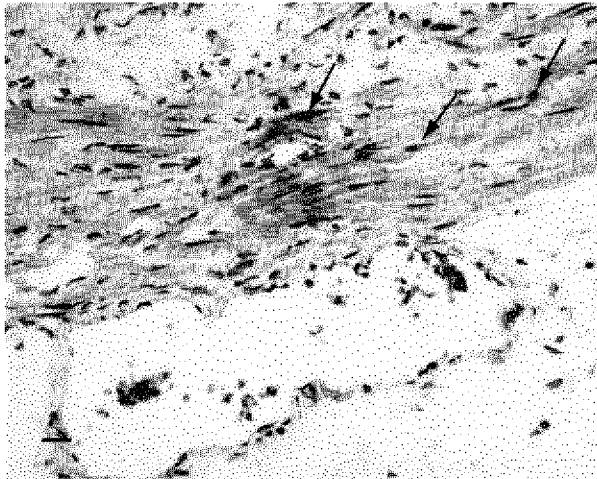
[図39]



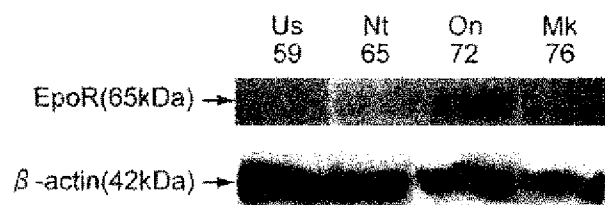
[図40]



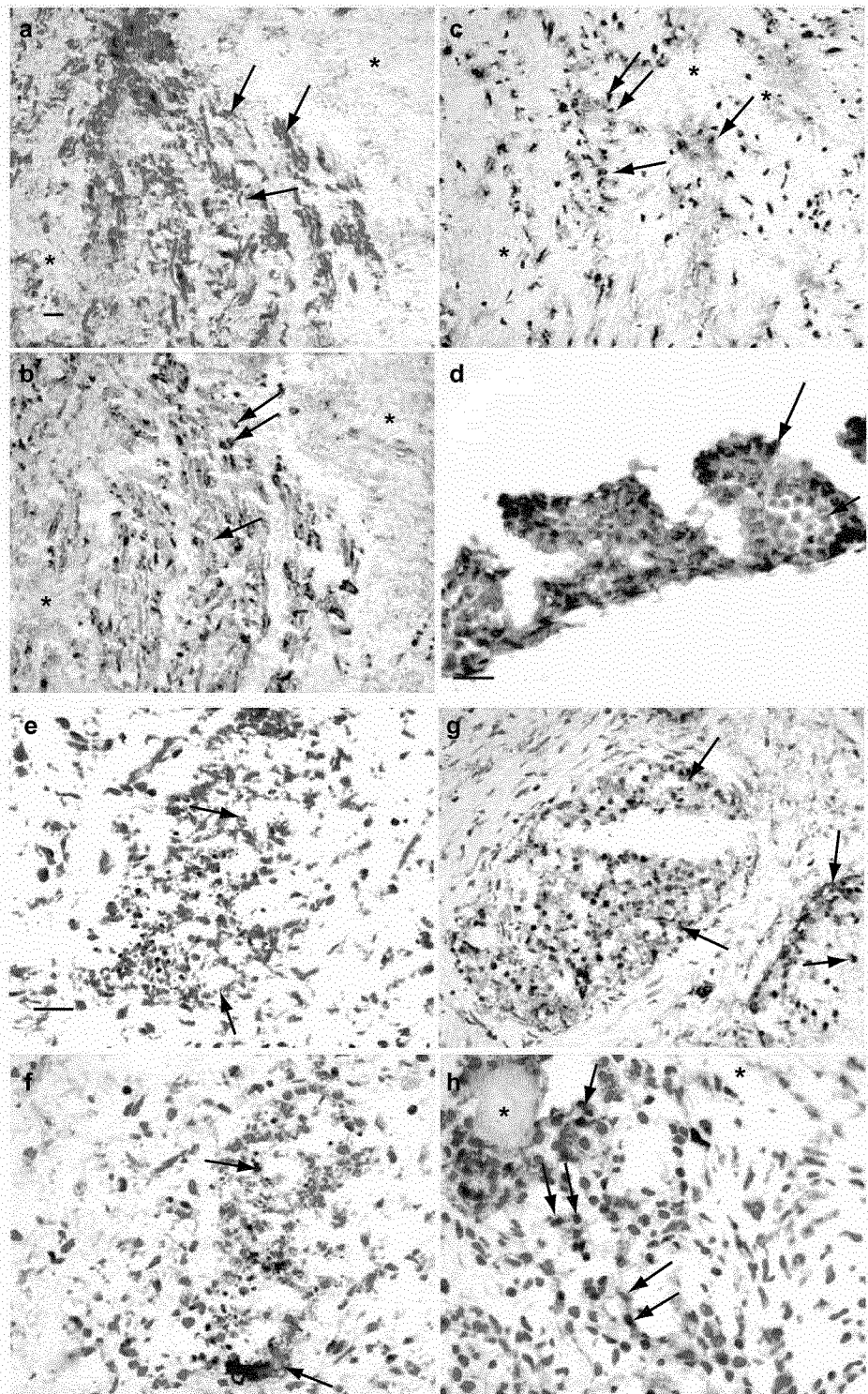
[図41]



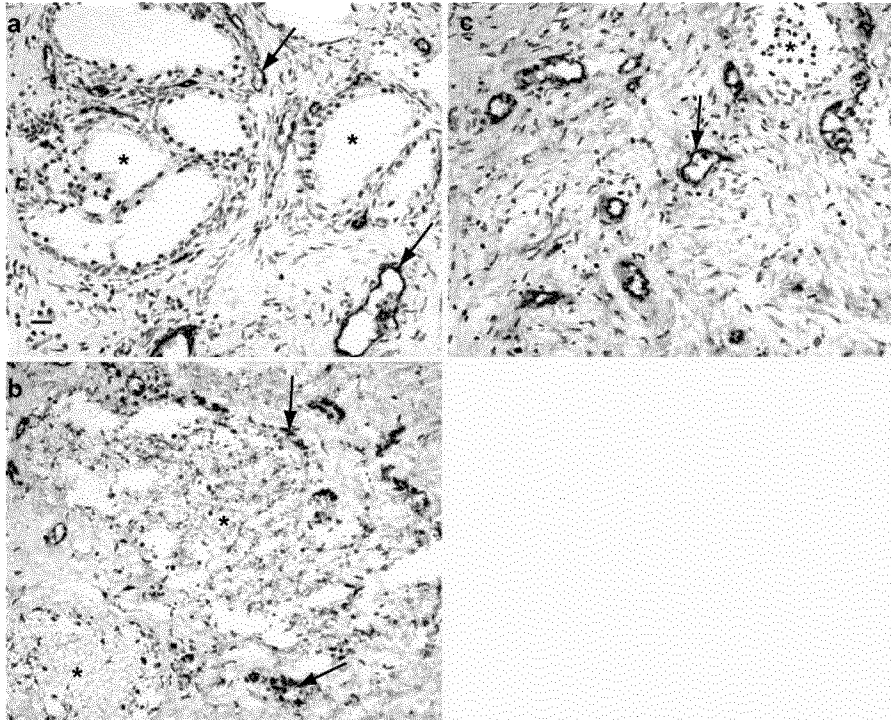
[図42]



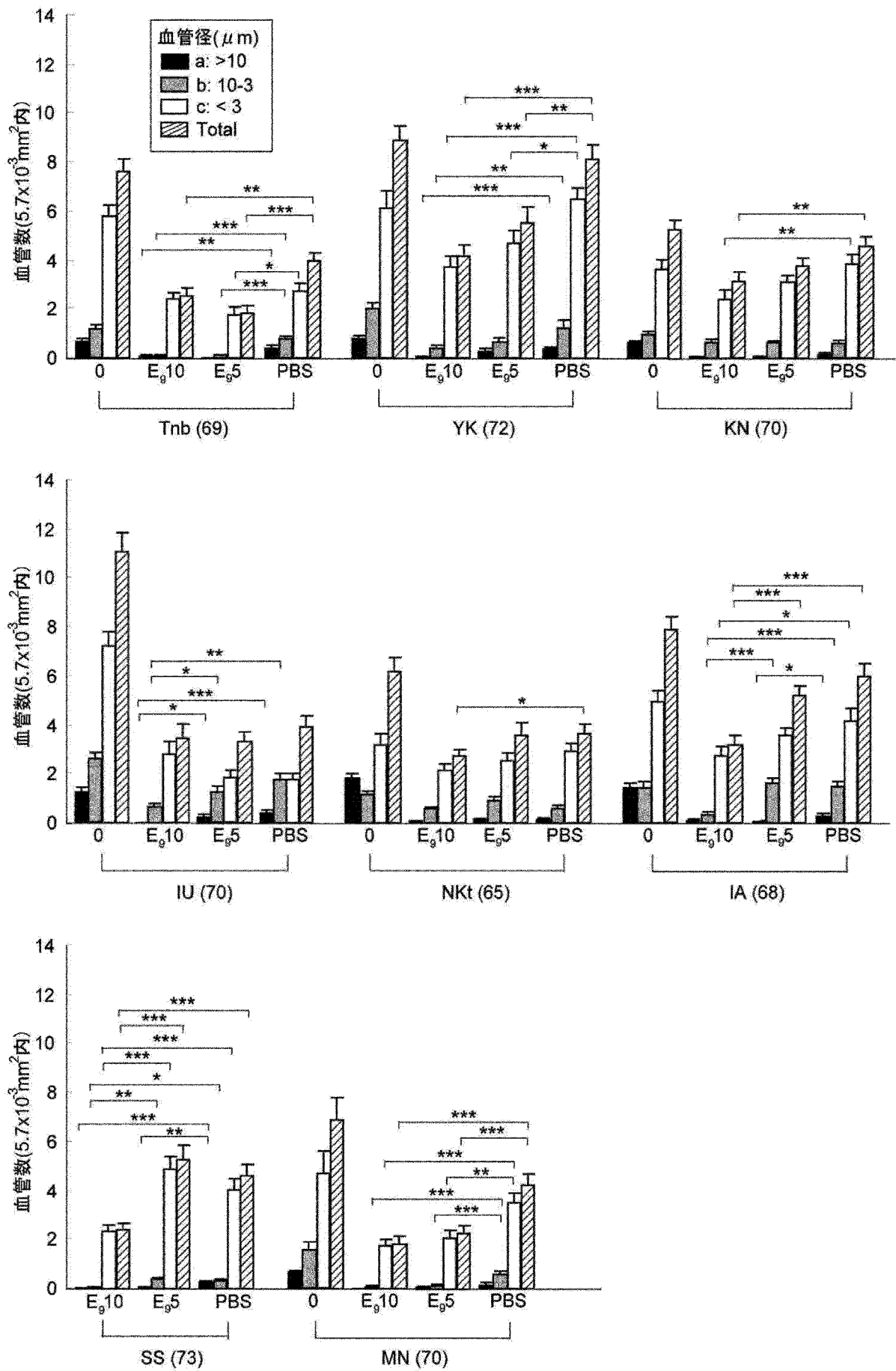
[図43]



[図44]



[図45]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/071604

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/00(2006.01)i, A61P13/08(2006.01)i, A61P15/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K38/00, A61P13/08, A61P15/00, A61P43/00

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CApus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 10-101574 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 21 April 1998 (21.04.1998), claim 1; example 4 (Family: none)	1-5
A	YASUDA Y. et al., Erythropoietin Receptor Antagonist Suppressed Ectopic Hemoglobin Synthesis in Xenografts of HeLa Cells to Promote Their Destruction, PLOS ONE, 2015.04, Vol.10, No.4, e0122458, Abstract	1-5

☒ 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
05 August 2016 (05.08.16)

Date of mailing of the international search report
06 September 2016 (06.09.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/071604

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-201252 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 18 July 2003 (18.07.2003), claim 5 & US 2004/0266676 A1 claim 5 & WO 2003/037377 A1 & EP 1459762 A1 & DE 60227417 D & AT 399561 T & DK 1459762 T	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A61P13/08(2006.01)i, A61P15/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K38/00, A61P13/08, A61P15/00, 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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/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 請求項の番号
A	JP 10-101574 A (雪印乳業株式会社) 1998.04.21, 請求項1、実施例4 (ファミリーなし)	1-5
A	YASUDA Y. et al., Erythropoietin Receptor Antagonist Suppressed Ectopic Hemoglobin Synthesis in Xenografts of HeLa Cells to Promote Their Destruction, PLOS ONE, 2015.04, Vol.10, No.4, e0122458, Abstract	1-5

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

05.08.2016

国際調査報告の発送日

06.09.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

4 U

9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

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
A	JP 2003-201252 A (武田薬品工業株式会社) 2003.07.18, 請求項 5 & US 2004/0266676 A1, クレーム 5 & WO 2003/037377 A1 & EP 1459762 A1 & DE 60227417 D & AT 399561 T & DK 1459762 T	1-5