

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 12 月 2 日 (02.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/103406 A1

(51) 国際特許分類: A61K 45/00, 31/57, 31/565, 31/198,  
31/03, A61P 7/00, 35/02, G01N 33/50, C12Q 1/32

一雄 (TODOKORO, Kazuo) [JP/JP]; 〒1620842 東京都  
新宿区市谷砂土原町 3-8-3-206 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/007566

(74) 代理人: 渡辺 望稔, 外 (WATANABE, Mochitoshi et  
al.); 〒1010032 東京都千代田区岩本町 2 丁目 1 2 番  
5 号 早川トナカイビル 3 階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2004 年 5 月 26 日 (26.05.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

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

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2003-147820 2003 年 5 月 26 日 (26.05.2003) JP  
特願 2003-398876  
2003 年 11 月 28 日 (28.11.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立  
行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND  
TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県  
川口市本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 独立行政法  
人理化学研究所 (THE INSTITUTE OF PHYSICAL  
AND CHEMICAL RESEARCH (RIKEN)) [JP/JP]; 〒  
3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP). 持  
田製薬株式会社 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL  
CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1608515 東京都新宿区四谷一丁  
目 7 番地 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可  
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,  
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,  
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,  
IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,  
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 永田 由香 (NA-  
GATA, Yuka) [JP/JP]; 〒3510021 埼玉県朝霞市西弁財  
2-5-12 ラフレシール 503 Saitama (JP). 戸所

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: THERAPEUTIC COMPOSITION FOR DISEASE ACCOMPANIED BY DECREASE OR INCREASE OF PLATELET

(54) 発明の名称: 血小板の減少または増加を伴う疾患の治療用組成物

(57) Abstract: A therapeutic composition for diseases accompanied by decrease or increase of platelets, which is capable of selective decrease or increase of platelets, having less influence on other hematocyte components and which does not involve any of extracorporeal circulation, whole blood transfusion and blood component transfusion, ensuring less side effects. In particular, a therapeutic composition for diseases accompanied by decrease of platelets or diseases accompanied by increase of platelets, comprising a substance exhibiting 3 $\beta$ -hydroxydehydrogenase activating activity or inhibiting activity.

(57) 要約: 本発明は、血小板を選択的に減少あるいは増加させ、他の血球成分に影響が少なく、体外循環や全血輸血あるいは成分輸血を伴わず、かつ副作用の少ない血小板の減少あるいは増加を伴う疾患の治療用組成物を提供することを目的とする。本発明は、3 $\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素活性化作用または阻害作用を有する物質を含有し、血小板の減少を伴う疾患または血小板の増加を伴う疾患の治療用組成物を提供する。



WO 2004/103406 A1

## 明細書

## 血小板の減少または増加を伴う疾患の治療用組成物

5

## 技術分野

本発明は、 $3\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素（以下、「 $3\beta$ HSD」と略記することがある）の活性化作用または阻害作用を有する物質を含有する、新規な巨核球からの血小板産生の調節剤に関する。

また、本発明は、エストロゲン受容体アゴニストまたはエストロゲン受容体アンタゴニストを含有する、新規な巨核球からの血小板産生の調節剤に関する。

また、本発明は、上記の調節剤を有効成分として含有することを特徴とする新規な血小板の減少を伴う疾患の治療用組成物に関する。

また、本発明は、上記の調節剤を有効成分として含有することを特徴とする新規な血小板の増加を伴う疾患の治療用組成物に関する。

15      また、本発明は、上記の調節剤を用いた、新規な巨核球からの血小板産生の調節方法に関する。

また、本発明は、上記の治療用組成物の新規なスクリーニング方法に関する。

## 背景技術

20      血小板は他の血球細胞と同様に骨髓中の多能性造血幹細胞に由来する。造血幹細胞から巨核球系前駆細胞、巨核芽球、前巨核球、巨核球へと成熟分化し、分離膜形成等の細胞質の成熟を終えると神経突起に似た細長い胞体突起

を形成 (proplatelet formation。以下、「PPF」と略記することがある。) し、その断裂により多数の血小板が血中に放出される。この血小板産生メカニズムは哺乳動物で共通していると考えられている。しかし、その分子メカニズムは依然として不明である。

- 5 巨核球特異的な転写因子NF- $\kappa$ Bのノックアウト (以下、「NF- $\kappa$ B<sup>-/-</sup>」と略記することがある。) マウスは血小板の大幅な減少により胎生あるいは新生児致死となる (シダサニ, アール. エー. (Shivdasani, R. A.) 等、セル (Cell)、(米国)、1995年、81巻、p. 695-70)。同様に、NF- $\kappa$ B<sup>-/-</sup>マウス由来の胚性幹細胞 (embryonic stem cell。以下、「ES細胞」と略記することがある。) をin vitroで巨核球・血小板系に分化誘導させると、巨核球まである程度正常に分化するがPPFが全く見られず血小板は産生されない。

- NF- $\kappa$ Bで産生増強される因子としては、 $\beta$ 1-チューブリン (レシン, ピー. (Lecine, P.) 等、ブラッド (Blood)、(米国)、2000年、96巻、p. 1366-1373) およびトロンボキサン合成酵素 (デブオウクス, S. (Deveaux, S.) 等、エンボ ジャーナル (EMBO Journal)、(英国)、1997年、16巻、p. 5654-5661) が報告されているが、いずれもNF- $\kappa$ B<sup>-/-</sup>マウスES細胞由来のPPFおよび血小板産生を復帰させることはできない。

血小板の減少を伴う疾患としては、例えば血小板減少性紫斑病、再生不良性貧血等が知られている。これらの疾患では、皮膚および可視粘膜に紫斑が

多発したり、出血症状や貧血を呈する。治療の基本は、副腎皮質ステロイド剤が用いられる。ステロイド剤の効果が低い症例や副作用が強い症例では摘脾、免疫グロブリン大量投与や血小板輸血が併用されている。しかしながら、効果のない症例があることおよび副作用あるいは感染の危険性などがあり、

5 血小板の減少を伴う疾患の治療剤として必ずしも満足できるものはないのが現状である。

一方、血小板の増加を伴う疾患として、例えば血小板増多症、血小板血症等が知られている。これらの疾患では血栓症あるいは血小板機能異常による出血傾向の危険性がある。治療の基本は血小板数を減じる目的で、緊急的には血小板交換除去（血小板フェレーシス）と骨髄抑制剤（6-メルカプトプリン、ブスルファン、メルファラン、ニトロソウレア、ヒドロキシウレア等）、抗癌剤（ラニムスチン等）が投与されているが、体外循環系への血液移動があり循環系疾患への対策が必要であり、かつ、他の血球成分減少の副作用に注意が必要である。また、対処療法として抗血小板剤（アスピリン、

10 チクロピジン、ジピリダモール等）が投与されているが、必ずしも根本的な治療ではない。血小板の増加を伴う疾患の治療剤として必ずしも満足できるものはないのが現状である。

15

#### 発明の開示

20 したがって、本発明の目的は、上記現状に鑑み、有効性が高く、血小板を選択的に減少あるいは増加させ、他の血球成分に影響が少なく、体外循環や全血輸血あるいは成分輸血を伴わず、かつ副作用の少ない血小板の減少ま

たは増加を伴う疾患の治療用組成物を提供することにある。

また、巨核球から血小板産生のメカニズムを研究する上で、巨核球から血小板産生を促進あるいは阻害する作用を有する調節剤が必要である。したがって、本発明は、このような調節剤および該調節剤を用いて巨核球からの血小板産生を調節する方法を提供することも目的とする。

また、本発明は、血小板の増加または減少を伴う疾患の治療用組成物のスクリーニング方法を提供することも目的とする。

上記目的を達成するため、本発明は、以下を提供する。

3  $\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素の活性化作用を有する物質を含有し、巨核球から血小板産生を増加させる作用を有する調節剤。

巨核球から血小板産生を増加させる作用を有する剤を製造するための3  $\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素の活性化作用を有する物質の使用（用途）。

また、エストロゲン受容体アゴニストを含有し、巨核球から血小板産生を増加させる作用を有する調節剤。

巨核球から血小板産生を増加させる作用を有する剤を製造するためのエストロゲン受容体アゴニストの使用（用途）。

また、上記の調節剤を有効成分として含有する血小板の減少を伴う疾患の治療用組成物。

上記の治療用組成物において、前記有効成分はリオチロニン、エストラジオールおよびゲニステインからなる群から選択される少なくとも1種であることが好ましい。

また、上記の治療用組成物において、前記血小板の減少を伴う疾患は、血

血小板減少性紫斑病、再生不良性貧血、白血病、溶血性尿毒症症候群、播種性血管内凝固症候群および放射線・制癌剤・骨髓抑制剤による副作用からなる群から選択されるいずれか1つであることが好ましい。

- 3  $\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素の活性化作用を有する物質と、巨核球とをインビトロで接触させて、巨核球の血小板産生を増加させる方法。

エストロゲン受容体アゴニストと、巨核球とをインビトロで接触させて、巨核球の血小板産生を増加させる方法。

また、3  $\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素阻害作用を有する物質を含有し、巨核球から血小板産生を減少させる作用を有する調節剤。

- 10 巨核球から血小板産生を減少させる作用を有する剤を製造するための3  $\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素阻害作用を有する物質の使用（用途）。

また、エストロゲン受容体アンタゴニストを含有し、巨核球から血小板産生を減少させる作用を有する調節剤。

- 巨核球から血小板産生を減少させる作用を有する剤を製造するためのエストロゲン受容体アンタゴニストの使用（用途）。

また、上記の調節剤を有効成分として含有することを特徴とする血小板の増加を伴う疾患の治療用組成物。

- 上記の治療用組成物において、前記有効成分は、トリロスタン、ミトタン、メドロキシプロゲステロン、タモキシフェン、メチピオスタン、トレミフェン、クロミフェンおよびICI 182780からなる群から選択される少なくとも1種であることが好ましい。

前記有効成分は、トリロスタンであることがより好ましい。

また、上記の治療用組成物において、前記血小板の増加を伴う疾患は、血小板増多症、血小板血症、慢性骨髄性白血病および慢性骨髄増殖症候群からなる群から選択されるいずれか1つであることが好ましい。

3  $\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素阻害作用を有する物質と、巨核球とをインビ  
5 トロで接触させて、巨核球の血小板産生を減少させる方法。

エストロゲン受容体アンタゴニストと、巨核球とをインビトロで接触させて、巨核球の血小板産生を減少させる方法。

本発明は、また、下記工程(A)、または(A)および(B)を含むことを特徴とする3  $\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素活性化作用または阻害作用を有す  
10 る物質を有効成分として含有することを特徴とする血小板の減少または増加を伴う疾患の治療用組成物のスクリーニング方法を提供する。

(A) 3  $\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素にその基質となる物質および被検物質を添加して3  $\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素の活性を測定する工程、

(B) 培養巨核球に被検物質を添加して胞体突起形成を測定する工程。

15

#### 図面の簡単な説明

図1 A~Cは、実験例1における、マウスのES細胞由来の巨核球の顕微鏡写真であり、図1 Aは、分化誘導10日目のNF-E2<sup>+/+</sup>のES細胞の顕微鏡写真(倍率600倍)であり、図1 Bは、分化誘導12日目のNF-E2<sup>-/-</sup>のES細胞の顕微鏡写真(倍率600倍)であり、図1 Cは、分化誘導10日目の3  $\beta$ HSD遺伝子を導入したNF-E2<sup>-/-</sup>のES細胞の顕微鏡写真(倍率600倍)である。

20

図2は、実施例1におけるPPFの測定結果を示したグラフであり、対照でのPPFを100%として示している。

図3は、実施例2におけるPPFの測定結果を示したグラフであり、対照でのPPFを100%として示している。

- 5 図4は、実施例3でエストロゲン受容体アゴニストであるエストラジオールを添加して培養した場合におけるPPFの測定結果を示したグラフであり、対照でのPPFを100%として示している。

図5は、実施例4におけるマウスの末梢血中の血小板数の測定結果を示したグラフであり、対照での血小板数を100%として示している。

10

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について、さらに詳細に説明する。

本発明者は、巨核球からの血小板産生のメカニズムについて鋭意研究を行ない、下記実験例1および2に示すように、巨核球における胞体突起形成

- 15 (PPF) および血小板産生に $3\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素( $3\beta$ HSD)が重要な役割を果たしていること、および $3\beta$ HSD遺伝子をNF- $\kappa$ Bのノックアウト(NF- $\kappa$ B<sup>-/-</sup>)マウスの胚性幹(ES)細胞に導入し巨核球・血小板系に分化誘導させると、PPFが起こり血小板産生能が復帰することを見いだした。

- 20 (実験例1) 巨核球からの血小板産生に関与する因子の単離および同定

シダサニ, アール. エー. (Shivdasani, R. A.) 等(セル(Cell)、1995年、81巻、p. 695-704が作製したNF-



E2の異型接合体（以下、「NF-E2<sup>+/-</sup>」と略記することがある。）マウス（ジャクソンラボラトリーより入手）を交配し、発生4日目の胚盤胞由来の正常（以下、「NF-E2<sup>+/+</sup>」と略記することがある。）のES細胞およびNF-E2<sup>-/-</sup>のES細胞を樹立した。各ES細胞を20%ウシ胎児血清含有 $\alpha$ -MEM（ギブコ（Gibco）-BRL、グランドアイランド（Grand Island）、ニューヨーク、米国）培養液中で、OP9細胞（仲野等、サイエンス（Science）、1994年、265巻、p. 1098-1101）と37℃で3日間共培養し、次いで組換えマウストロンボポエチン（以下、「TPO」と略記することがある。）（50単位/ml）添加で8日間培養し、巨核球へ分化誘導した。マウス組換えTPOは、ナガタ、ワイ。（Nagata, Y.）等、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー（Journal of Biological Chemistry）、1995年、270巻、p. 19673-19675に記載の方法で、マウスTPOをコードするcDNAを挿入したpME18で形質転換したCOS-7細胞の培養上澄から調製した。その全RNAをRNeasy Mini Kit（キアゲン（Qiagen）、バレンシア（Valencia）、カリフォルニア、米国）を用いそのマニュアルに従って単離した。次いで、PCR-select cDNA subtraction kit（クローンテック（clontech）、パロ アルト（Palo Alto）、カリフォルニア、米国）を用いてサブトラクティブ（Subtractive）-PCR法をそのマニュアルに従って行い、NF-E2の下流に存在してPPFを制御する可能性のある因子を単離した。

その結果、 $3\beta$ HSDをコードするcDNAフラグメントが最も頻度が高く  
(約16%)検出された。 $3\beta$ HSDのcDNAをp cDNA3.1発現ベ  
クター(インビトロゲン)に挿入した。また、ノーザンブロットおよびイム  
ノブロットを用いて、NF-E2<sup>+/+</sup>のES細胞由来巨核球および骨髓由来  
5 巨核球では $3\beta$ HSDが発現しているのに対し、NF-E2<sup>-/-</sup>のES細胞  
由来巨核球では $3\beta$ HSDが発現がないことを確認した。

(実験例2)  $3\beta$ HSD導入による血小板産生への影響

NF-E2<sup>-/-</sup>のES細胞に $3\beta$ HSDの遺伝子をエレクトロポレーション  
法で導入し、 $3\beta$ HSD発現クローンを得た。NF-E2<sup>+/+</sup>のES細胞、  
10 NF-E2<sup>-/-</sup>のES細胞および $3\beta$ HSD遺伝子を導入したNF-E2<sup>-/-</sup>  
のES細胞をそれぞれ20%ウシ胎児血清含有 $\alpha$ -MEM培地中でOP9  
腫瘍細胞と37℃、3日間共培養し、次いでマウス組換えTPO(50単位  
/ml)添加で8日間培養し、分化誘導8日目に顕微鏡写真を撮影してPPF  
Fを起こしている細胞数を計測し、その割合を求めた。また、NF-E2<sup>+/+</sup>  
15 <sup>+</sup>のES細胞および $3\beta$ HSD遺伝子を導入したNF-E2<sup>-/-</sup>のES細胞  
について、培養10日目(分化誘導10日目)に顕微鏡写真を撮影し、NF  
-E2<sup>-/-</sup>のES細胞については、培養12日目(分化誘導12日目)に顕  
微鏡写真を撮影して、同様にPPFを起こしている細胞数を計測し、その割  
合を求めた。

20 図1Aは、分化誘導10日目のNF-E2<sup>+/+</sup>のES細胞の顕微鏡写真  
(倍率600倍)であり、図1Bは、分化誘導12日目のNF-E2<sup>-/-</sup>の  
ES細胞の顕微鏡写真(倍率600倍)であり、図1Cは、分化誘導10日

目の  $3\beta\text{HSD}$  遺伝子を導入した  $\text{NF-E}2^{-/-}$  の ES 細胞の顕微鏡写真  
(倍率 600 倍) である。図 1 A から明らかなように、 $\text{NF-E}2^{+/+}$  の E  
S 細胞より分化誘導させた巨核球では、分化誘導 10 日目に PPF が観察さ  
れたが、図 1 B から明らかなように、 $\text{NF-E}2^{-/-}$  の ES 細胞より分化誘  
導させた巨核球では、分化誘導 12 日目においても PPF が観察されなかつ  
た。一方、図 1 C から明らかなように、 $3\beta\text{HSD}$  遺伝子を導入した  $\text{NF-E}2^{-/-}$  の ES 細胞では、分化誘導 10 日目に PPF が観察された。

また、分化誘導 8 日目に測定した PPF について、 $\text{NF-E}2^{-/-}$  の ES  
細胞から分化誘導させた巨核球では PPF が全く起こらなかったが、 $3\beta\text{H}$   
SD 遺伝子を導入した  $\text{NF-E}2^{-/-}$  の ES 細胞より分化誘導させた巨核球  
では、ほとんどが PPF を起こし、 $3\beta\text{HSD}$  遺伝子の導入により、巨核球  
の血小板産生能が復帰したことが確認された。

$3\beta\text{HSD}$  は、哺乳動物において、エストラジオールを含めて全てのステ  
ロイドホルモン生合成の鍵となる酵素であり、 $\Delta 5$ -プレグネノロンからプ  
ロゲステロン、 $17\alpha$ -ヒドロキシプレグネノロンから  $17\alpha$ -ヒドロキシプ  
ロゲステロンおよびデヒドロエピアンドロステロンから  $\Delta 4$ -アンドロステ  
ンジオンへの変換酵素として知られている。

本発明者は、上記の知見に基づいて、 $3\beta\text{HSD}$  活性化作用を有する物質  
あるいは  $3\beta\text{HSD}$  阻害作用を有する物質をマウス骨髓細胞由来の巨核球に  
添加したところ、 $3\beta\text{HSD}$  活性化作用を有する物質を添加した場合には、  
巨核球からの PPF が促進され、一方  $3\beta\text{HSD}$  阻害作用を有する物質を添  
加した場合には巨核球からの PPF が阻害されることを見出した。

また、本発明者らは、エストロゲン受容体アゴニストであるエストラジオールをマウス骨髄細胞由来の巨核球に添加したところ、巨核球のP F Fが促進されることを見出した。

また、本発明者らは、エストロゲン受容体アンタゴニストであるタモキシフェンまたはICI 182780をマウスに *in vivo* で投与したところ、マウスの末梢血中の血小板数が減少することを見出した。

本発明の第一の態様は、 $3\beta$ HSD活性化作用を有する物質を含有し、巨核球から血小板産生を増加させる作用を有する調節剤である。

ここで、「 $3\beta$ HSD活性化作用を有する物質」とは、 $3\beta$ HSDの酵素活性を促進する物質である。このような物質としては、具体的には例えば、  
10 リオチロニンが挙げられる。

本発明の第二の態様は、 $3\beta$ HSD阻害作用を有する物質を含有し、巨核球から血小板産生を減少させる作用を有する調節剤である。

ここで、「 $3\beta$ HSD阻害作用を有する物質」とは、 $3\beta$ HSDの酵素活性を阻害する物質である。このような物質として、例えば、トリロスタン、  
15 ミトタン、メドロキシプロゲステロンが挙げられる。

上記第一の態様および第二の態様の調節剤に含有される物質として例示した物質が、 $3\beta$ HSD活性化作用または阻害作用を有すること自体は公知である。たとえば上記リオチロニン（1 nM）あるいはトリロスタン（100  
20  $\mu$ M）がブタ黄体細胞のプロゲステロン分泌を促進あるいは抑制すること（グレゴラシュツック，イー．エル．（Gregoraszcuk, E. L.）等、エンドクライン レギュレーションズ（Endocrine Re

gulations)、1999年、33巻、p. 155-160)、トリロスタンがラットあるいはウシ副腎皮質ミトコンドリアの $3\beta$ HSDを特異的に阻害する( $K_m=2\mu M$ )こと(ポッツ, ジー. オー. (Potts, G. O.) 等、ステロイズ (Steroids)、1978年、32巻、p. 257-267、および、ヒワタシ アツオ、ジャーナル オブ バイオケミストリー (Journal of Biochemistry、1985年、98巻、p. 1519-1526)、ミトタンが $3\beta$ HSDを阻害する(50%阻害濃度 $8\mu M$ )こと(オジマ、エム、日本内分泌学会雑誌、1985年、61巻、p. 168-178)、さらには酢酸メドロキシプロゲステロンがヒトの $3\beta$ HSDを阻害する( $K_i=3\mu M$ )こと(リー, ティー. シー. (Lee, T. C.) 等、ザ ジャーナル オブ クリニカル エンドクリノロジー アンド メタボリズム (The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism)、1999年、84巻、p. 2104-2110)が報告されている。

しかしながら、 $3\beta$ HSDが巨核球からのPPFおよび血小板産生に重要な役割を果たすことはこれまで知られておらず、本発明者らによって新たに見出された知見であり、したがって、 $3\beta$ HSDの活性化作用を有する物質あるいは $3\beta$ HSDの阻害作用を有する物質が、巨核球からの血小板産生の促進あるいは阻害の調節剤として作用することは、本発明で初めて見出されたものである。

なお、第一の態様の調節剤に含有される $3\beta$ HSD活性作用を有する物質

として市販品を使用してもよい。例えば、リオチロニンはナトリウム塩の形で、甲状腺機能低下症等の治療剤サイロニン（大正製薬株式会社）等として日本国内で市販されている。同様に、第二の態様の調節剤に含有される  $3\beta$  HSD 阻害作用を有する物質として、市販品を使用してもよい。例えば、トリロスタンは、特発性アルドステロン症等の治療剤デソパン錠<sup>TM</sup>（持田製薬株式会社）として日本国内で市販されており、クッシング症候群治療剤モドラスタン（modorastane<sup>TM</sup>）（サノフィ（SANOFI））、肺癌治療剤のモドレナル（modrenal<sup>TM</sup>）（バイオエンビジョン（bioenvision））として国外で市販・開発されている。ミトタンは、副腎癌等の治療剤オペプリム<sup>TM</sup>（株式会社ヤクルト）として、日本国内で市販されている。メドロキシプロゲステロンは、酢酸塩の形で、無月経等の治療剤ヒスロン<sup>TM</sup>（協和発酵工業株式会社）等として日本国内で市販されている。上記薬剤はいずれも安全性の高い医薬品であり、かつ入手可能である。

第一の態様および第二の態様の調節剤は、巨核球から血小板産生のメカニズムを研究する実験用の調節剤として有用である。したがって、本発明は、第一の態様または第二の態様の調節剤を用いた、巨核球からの血小板産生の調節方法を第三の態様として提供する。本発明の調節方法では、ヒトのまたはマウス等の哺乳動物の巨核球を培養する際に、第一の態様または第二の態様の調節剤を培養環境に添加することで、第一の態様の調節剤を添加した場合には、培養後における巨核球からの PPF を増加させて、血小板産生を増加させる。一方、第二の態様の調節剤を添加した場合には、培養後における巨核球からの PPF を減少させて、血小板産生を減少させる。すなわち、本

発明の調節方法によれば、巨核球からの血小板産生を選択的に増加または減少させることができる。

また、第一の態様および第二の態様の調節剤は、血小板減少あるいは増加を伴う疾患に関する治療・研究等への応用が可能であり、これらの調節剤の  
5 血小板の減少あるいは増加を伴う疾患に関する治療への応用は、本発明の調節剤の好適用途である。

すなわち、本発明の第四の態様は、 $3\beta$ HSD活性化作用を有する物質を含有し、巨核球から血小板産生を増加させる作用を有する本発明の第一の態様の調節剤を有効成分として含有することを特徴とする血小板の減少を伴う  
10 疾患の治療用組成物であり、本発明の第五の態様は、 $3\beta$ HSD阻害作用を有する物質を含有し、巨核球から血小板産生を減少させる作用を有する本発明の第二の態様の調節剤を該調節剤を有効成分として含有することを特徴とする血小板の増加を伴う疾患の治療用組成物である。

本明細書において、「血小板の減少を伴う」の語は、原因のいかんを問わず  
15 血中の血小板数が正常値に満たない状態であり、ヒトであれば例えば10万個/ $\mu$ L以下に減少した状態である。「血小板の減少を伴う疾患」としては、例えば、血小板減少性紫斑病、再生不良性貧血、白血病、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫、血管腫、骨髄線維症、溶血性尿毒症症候群、発作性夜間ヘモグロビン尿症、播種性血管内凝固症候群、サルコイドーシス、門脈亢進症、  
20 肝硬変、巨赤芽球性貧血、骨髄巨核球低形成（ファンコーニ症候群、トロンボポエチン欠乏症、新生児風疹）、放射線および制癌剤や骨髄抑制剤等の薬物の副作用、敗血症、結核症、ウイルス性感染症、自己免疫性溶血性貧血合

併症、全身性エリスマトーデス、リンパ増殖性疾患、脾機能亢進症、先天性血小板減少症、大量出血、輸血後紫斑病あるいは体外循環等が挙げられる。

血小板の減少を伴う疾患では、出血傾向があり、外傷による大量出血や臓器内出血の危険性が増大する。また、可視粘膜に紫斑が多発したり、貧血等を呈する。

「血小板の増加を伴う」の語は、原因のいかんを問わず血中の血小板数が正常値より増加した状態であり、ヒトであれば例えば40万個/ $\mu$ L以上に増加した状態である。「血小板の増加を伴う疾患」としては、例えば、血小板増多症、鉄欠乏性貧血などの造血亢進、癌、血小板血症、慢性骨髓性白血病、骨髓線維症、本態性血小板増加症、真正赤血球増加症あるいは慢性骨髓増殖症候群等が挙げられる。

血小板の増加を伴う疾患では、血栓傾向があり、脳血栓や心筋梗塞の危険性が増大する。一方、血小板数が多いにもかかわらず血小板機能異常を伴い出血症状を呈する例もある。また、一過性脳虚血発作様、手足のしびれあるいは狭心症様の症状があらわれることがある。

血小板の減少あるいは増加を伴う疾患は、コールターカウンター等の血球計数装置あるいは顕微鏡下で血中の血小板数を計数することで容易に診断できる。

「治療用組成物」とは、既に血小板の減少あるいは増加を呈した状態で投与する場合に限らず、血小板の減少あるいは増加が予想される状態で予防的に投与する組成物を含む。また、血小板産生メカニズムは哺乳動物で共通していると考えられることから、本発明の治療用組成物はヒトに限らず、イヌ、



ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギあるいはネズミ等の哺乳動物に使用することができる。

第四の態様および第五の態様の治療用組成物は、有効成分を化合物（精製の際に不可避免的に含まれる他の成分を含む場合もある）単独で投与するか、  
5   あるいは、有効成分の化合物に一般的に用いられる適当な担体または媒体の類、例えば賦形剤、結合剤、滑沢剤、着色剤、香味剤、必要に応じて滅菌水や植物油、更には無害性有機溶媒あるいは無害性溶解補助剤（たとえばグリセリン、プロピレングリコール）、乳化剤、懸濁化剤（例えばツイーン80、アラビアゴム溶液）、等張化剤、pH調整剤、安定化剤、無痛化剤などと適  
10   宜選択組み合わせで適当な医薬用製剤に調製することができる。また、調節剤のところで例示した市販の製剤を投与することもできる。

さらには、血小板の減少を伴う疾患の場合、副腎皮質ステロイド剤、摘脾、免疫グロブリンや血小板輸血および／またはインターロイキン3、6、7あるいは11、エリスロポエチンやTPO等の巨核球の分化・成熟を促進する  
15   物質と併用することができる。一方、血小板の増加を伴う疾患の場合、6-メルカプトプリン、ブスルファン、メルファラン、ニトロソウレア、ヒドロキシウレア、ラニムスチン等の骨髄抑制剤やアスピリン、チクロピジン、ジピリダモール等の抗血小板剤と併用することができる。「併用」とは、本発明の血小板の減少あるいは増加を伴う疾患の治療用組成物の有効成分である  
20   化合物と巨核球の分化・成熟を促進する物質、あるいは骨髄抑制剤および／または抗血小板剤とを各々が別個に含有される複数剤とし、この複数剤を同時投与すること、もしくは逐次投与すること、またはこれらを混合して一剤

の形で同時投与することを包含する。

製剤の剤形としては、錠剤、カプセル剤、マイクロカプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液体製剤、坐剤、シロップ剤、吸入剤、点眼剤、軟膏、注射剤（乳濁性、懸濁性、非水性）、あるいは用時乳濁または懸濁して用い  
5 る固形注射剤の形で、経口および静脈内あるいは動脈内、吸入、点眼、直腸内、膣内あるいは外用を問わず患者に投与される。予防的な効果が望まれる場合は経口投与が好ましく、比較的速効性が望まれる場合は静脈内あるいは動脈内投与が好ましい。また、体外血液循環に添加すること、および吸入剤として公知のネブライザー等を用いて投与することもできる。

10 本発明の血小板の減少あるいは増加を伴う疾患の治療用組成物の投与量は対象となる作用を現すのに十分な量とされるが、その有効成分、剤形、投与方法、1日当たりの投与回数、症状の程度、体重、年齢、性別、他剤併用条件等によって適宜増減することができる。

例えば、リオチロニンナトリウムを経口投与する場合には、成人には0.

15  $1\mu\text{g}/\text{日} \sim 500\mu\text{g}/\text{日}$ 、好ましくは $5\mu\text{g}/\text{日} \sim 75\mu\text{g}/\text{日}$ を1回あるいは2～3回に分割投与することが好ましい。トリロスタンを経口投与する場合には、成人には $10\text{mg}/\text{日} \sim 5000\text{mg}/\text{日}$ 、好ましくは $240\text{mg}/\text{日} \sim 480\text{mg}/\text{日}$ を1回あるいは2～4回に分割投与することが好ましい。ミトタンを経口投与する場合には、成人には $100\text{mg}/\text{日} \sim 1$   
20  $0\text{g}/\text{日}$ 、好ましくは $1.5\text{g}/\text{日} \sim 3\text{g}/\text{日}$ を1回あるいは2～3回に分割投与することが好ましい。酢酸メドロキシプロゲステロンを経口投与する場合には、成人には $0.1\text{mg}/\text{日} \sim 500\text{mg}/\text{日}$ 、好ましくは $2.5\text{m}$

g／日～15mg／日を1回あるいは2～3回に分割投与することが好ましい。吉草酸エストラジオールを筋肉内注射する場合には、成人には1mg～50mgを、好ましくは5mg～10mgを1～4週ごとに投与することが好ましい。

- 5      いずれにおいても、血中の血小板数をモニターしながら投与量・回数・期間を調節することが好ましい。

本発明の第四の態様の治療用組成物は、下記（a）の形態で使うことができる。（a）個体から分離した造血幹細胞、巨核球系前駆細胞、巨核芽球、前巨核球あるいは巨核球のいずれかを含む細胞の培養環境に該治療用組成物を添加することでインビトロで血小板産生を増加させ、産生された血小板を回収し、血小板の減少をとまなう疾患を有する同一個体あるいは他の個体に血小板輸血する。この培養環境にはインターロイキン3，6，7あるいは11、エリスロポエチンやTPO等の巨核球の分化・成熟を促進する物質をさらに添加して培養することもできる。

- 10      成物を添加することでインビトロで血小板産生を増加させ、産生された血小板を回収し、血小板の減少をとまなう疾患を有する同一個体あるいは他の個体に血小板輸血する。この培養環境にはインターロイキン3，6，7あるいは11、エリスロポエチンやTPO等の巨核球の分化・成熟を促進する物質をさらに添加して培養することもできる。
- 15      該治療用組成物の上記使用形態における添加量は対象となる作用を現すのに十分な量とされるが、その有効成分、培養環境、他剤併用条件等によって適宜増減することができ、PPF形成状況や産生された血小板数をモニターしながら添加量を調節することが好ましい。

- 本発明の第六の態様は、エストロゲン受容体アゴニストを含有し、巨核球から血小板産生を増加させる作用を有する調節剤である。

ここで、エストロゲン受容体アゴニストとしては、例えば、エストラジオール、ゲニステインが挙げられる。

本発明の第七の態様は、エストロゲン受容体アンタゴニストを含有し、巨核球から血小板産生を減少させる作用を有する調節剤である。

ここで、エストロゲン受容体アンタゴニストとしては、タモキシフェン、クエン酸タモキシフェン、メチピオスタン、トレミフェン、クロミフェン、  
5 I C I 1 8 2 7 8 0 が挙げられる。

なお、本発明の第六の態様の調節剤に含有されるエストロゲン受容体アゴニストおよび本発明の第七の態様の調節剤に含有されるエストロゲン受容体アンタゴニストは、市販品を使用してもよい。このような市販品としては、  
例えば、エストロゲン受容体アゴニストであるエストラジオールは、例えば  
10 吉草酸とのエステル形で、無月経等の治療薬ペラニン<sup>TM</sup>（持田製薬株式会社）等として日本国内で市販されている。一方、エストロゲン受容体アンタゴニストであるクエン酸タモキシフェンは、抗乳癌剤ノルバテックス<sup>TM</sup>およびノルバテックス<sup>TM</sup>D（アストラゼネカ株式会社）等として日本国内で市販されている。これ以外にも、メピチオスタンは、抗乳癌剤チオデロン<sup>TM</sup>（塩  
15 野義製薬株式会社）として、トレミフェンはクエン酸塩の形で抗閉経後乳癌剤フェアストン<sup>TM</sup>（日本科薬株式会社）、クロミフェンはクエン酸塩の形で不妊症の排卵誘発剤スパクロミン<sup>TM</sup>（株式会社科薬）として日本国内で市販されており、I C I 1 8 2 7 8 0 は抗乳癌剤フルバストラン（F a s l o d e x<sup>TM</sup>、A s t r a Z e n e c a）として米国で市販されている。

20 本発明の第六の態様および第七の態様の調節剤は、本発明の第一の態様および第二の態様の調節剤と同様に、巨核球から血小板産生のメカニズムを研究する実験用の調節剤として有用である。したがって、本発明は、第六の態

様および第七の態様の調節剤を用いた巨核球からの血小板産生の調節方法を第八の態様として提供する。具体的な調節方法については、本発明の第三の態様で記載したのと同様である。すなわち、第六の態様または第七の態様の調節剤をヒトまたはマウス等のほ乳動物の巨核球の培養環境に添加すること  
5 で、第六の態様の調節剤を添加した場合には、培養後における巨核球からの P P F を増加させて、血小板産生を増加させることができる。一方、第七の態様の調節剤を添加した場合には、培養後における巨核球からの P P F を減少させて、血小板産生を減少させることができる。

また、本発明の第六の態様および第七の態様の調節剤は、血小板減少ある  
10 いは増加を伴う疾患に関する治療・研究等への応用が可能であり、これらの調節剤の血小板の減少あるいは増加を伴う疾患に関する治療への応用は、本発明の調節剤の好適用途である。

すなわち、本発明の第九の態様は、エストロゲン受容体アゴニストを含有し、巨核球から血小板産生を増加させる作用を有する本発明の第六の態様の  
15 調節剤を有効成分として含有することを特徴とする血小板の減少を伴う疾患の治療用組成物であり、本発明の第十の態様は、エストロゲン受容体アンタゴニストを含有し、巨核球から血小板産生を減少させる作用を有する本発明の第七の態様の調節剤を有効成分として含有することを特徴とする血小板の増加を伴う疾患の治療用組成物である。

20 なお、本発明の第九の態様および第十の態様の治療用組成物の使用形態は、それぞれ本発明の第四の態様および第五の態様の治療用組成物の使用形態と同様である。

本発明の第十一の態様は、 $3\beta$ HSD活性化作用を有する物質を有効成分として含有する血小板の減少を伴う疾患の治療用組成物または $3\beta$ HSD阻害作用を有する物質を有効成分として含有することを特徴とする血小板の増加を伴う疾患の治療用組成物のスクリーニング方法である。

- 5 本発明の第十一の態様のスクリーニング方法では、 $3\beta$ HSDにその基質となる物質および被検物質を添加して $3\beta$ HSDの酵素活性を測定する。

- $3\beta$ HSDの酵素活性は、精製された $3\beta$ HSDあるいは副腎ミクロゾーム等の $3\beta$ HSDを含有する試料にその基質およびニコチンアデニンジヌクレオチド（以下、「 $\text{NAD}^+$ 」と略記することがある。）またはニコチンア  
10 デニンジヌクレオチドリリン酸（以下、「 $\text{NADP}^+$ 」と略記することがある。）を添加し反応させ、脱水素され変換された物質または還元されたニコチンアデニンジヌクレオチド（以下、「 $\text{NADH}$ 」と略記することがある。）または還元されたニコチンアデニンジヌクレオチドリリン酸（以下、「 $\text{NADPH}$ 」と略記することがある。）を吸光度等で測定することにより  
15 測定することができる。

- $3\beta$ HSDは、例えば、ウシ副腎ミクロゾームから常法により精製することができる。また、マウスやラットの副腎ミクロゾームのホモジネートを用いることもできる。 $3\beta$ HSDの基質および脱水素され変換された物質の組み合わせとしては、例えば、 $\Delta 5$ -プレグネノロンからプロゲステロン、1  
20 7-ヒドロキシプレグネノロンから $17\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロンおよびデヒドロエピアンドロステロンから $\Delta 4$ -アンドロステンジオンが挙げられる。 $\text{NADH}$ あるいは $\text{NADPH}$ の定量は、例えば、波長260nmある

いは340nmでの吸光度を測定することで算出することができる。

本発明の第十一の態様のスクリーニング方法では、さらに、ヒト、マウス、ラット等の哺乳類の巨核球培養系に被検物質を添加してPPFの変動を測定することができる。例えば、巨核系培養系における、巨核球からのPPFを  
5 100%とし、その際に、インターロイキン3、6、7あるいは11、エリスロポエチンやTPO等の巨核球の分化・成熟を促進する物質を添加することもできる。

これらの測定系に被検物質を添加した場合の3 $\beta$ HSD活性の変動あるいはPPF変動を測定および評価することにより、3 $\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素活性化作用または阻害作用を有する物質を有効成分として含有することを  
10 特徴とする血小板の減少または増加を伴う疾患の治療用組成物のスクリーニングを行うことができる。

例えば、被検物質の中から、1mM以下、好ましくは0.1mM以下、より好ましくは0.01mM以下の添加により、対照の3 $\beta$ HSDの酵素活性  
15 を10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは70%以上活性化または阻害する被検物質を選定し、その物質を有効成分として含有することを特徴とする血小板の減少または増加を伴う疾患の治療用組成物をスクリーニングすることができる。さらに、上記で選定された被検物質の中から、10mM以下、好ましくは1mM以下、より好ま  
20 しくは0.1mM以下の添加により、巨核球からのPPFを10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは30%以上、さらに好ましくは50%以上活性化または阻害する被検物質を選定し、その物質を有効成分として含

有することを特徴とする血小板の減少または増加を伴う疾患の治療用組成物をスクリーニングすることができる。

(実施例)

以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は  
5 これらに限定されない。

(実施例1)  $3\beta$ HSD活性化作用を有する物質を含有する調節剤によるマウスの巨核球における血小板産生能への影響

正常マウス(BDF1マウス、6~8週齢)の骨髓腔をCATCH培地  
(1mM アデノシン(シグマ(Sigma)、セントルイス(St. Lu  
10 is)、ミズーリ、米国)、2mM テオフィリン(ワコー、大阪、日本)  
および13.6mM クエン酸ナトリウム水和物(ナカライタスク、京都、  
日本)含有のハンクス バランスド塩溶液(Hank's balanced  
d salt solution)(ギブコ(Gibco)-BRL、グランドアイランド(Grand Island)、ニューヨーク、米国)で洗  
15 浄して骨髓細胞を取得し、巨核球を調製した。調製した巨核球( $3 \times 10^3$   
個/ml)に、 $3\beta$ HSD活性化作用を有する物質としてリオチロニン(1  
00pM)を含有する調節剤を添加して、1%ウシ血清アルブミン含有無血  
清Sクローン培地(S-clone、サンコー、日本)で37℃、24時間  
培養し、顕微鏡写真を撮影して、PPFを起こしている細胞数を計測し、そ  
20 の割合を求めた。同様に、リオチロニンを添加せずに、マウス巨核球を24  
時間培養して、顕微鏡写真を撮影して、PPFを起こしている細胞数を計測  
し、その割合を求めた(対照)。



図2は、PPFの測定結果を示したグラフであり、対照でのPPFを100%として示している。図2に示すように、3 $\beta$ HSD活性化作用を有する物質としてリオチロニンを含む調節剤を添加して培養したマウス巨核球では、PPFが約50%増加しており、血小板産生能が促進されたことが確認された。

(実施例2) 3 $\beta$ HSD阻害作用を有する物質を含む調節剤によるマウスの巨核球における血小板産生能への影響

正常マウス(BDF1マウス、6~8週齢)の骨髓腔をCATCH培地で洗浄して骨髓細胞を取得し、巨核球を調製した。調製した巨核球(3 $\times$ 10<sup>3</sup>個/ml)に、3 $\beta$ HSD阻害作用を有する物質としてトリロスタンを濃度0.09mM、0.45mMおよび0.9mMで溶媒DMSOに溶解させた調節剤を添加して、1%ウシ血清アルブミン含有無血清Sクロン培地で37℃、24時間培養し、顕微鏡写真を撮影して、PPFを起こしている細胞数およびその割合を計測した。同様に、トリロスタンを添加せずに、マウス巨核球を24時間培養したもの(対照)、およびDMSOのみを添加して24時間培養したもの(溶媒)について、顕微鏡写真を撮影して、PPFを起こしている細胞数およびその割合を計測した。

図3は、PPFの計測結果を示したグラフであり、対照でのPPFを100%として示している。図3に示すとおり、3 $\beta$ HSD阻害作用を有する物質としてトリロスタンを含有する調節剤を添加して培養したマウス巨核球では、濃度依存的にPPFが減少しており、血小板産生能が阻害されたことが確認された。なお、DMSOのみを添加して培養したもの(溶媒)では、対

照とほぼ同程度のPPFを有することが確認された。

(実施例3) ステロイドによるマウスの巨核球における血小板産生能への影響

巨核球の前駆細胞のc-kit<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>細胞をオダ, エム (Oda, M.) 等、ジーンズ ツー セルズ (Genes to Cells)、2003年、8巻、p. 9-16に記載の方法に準じて正常マウスの骨髄より調製した。すなわち、BDF-1マウス骨髄細胞を蛍光イソシアネート結合抗マウスCD41抗体 (ビーディー ファーミンゲン (BD Pharmingen)、サンディエゴ (San Diego)、カリフォルニア、米国) およびAPC結合抗マウスCD117 (c-kit) 抗体 (ビーディー ファーミンゲン (BD Pharmingen)、サンディエゴ (San Diego)、カリフォルニア、米国) と水上で1時間インキュベートした。細胞を、0.05% NaN<sub>3</sub>および2%ウシ胎児血清含有のリン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄し、c-kit<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>細胞をFACS Vantage SE (ビーディー ファーミンゲン (BD Pharmingen)、サンディエゴ (San Diego)、カリフォルニア、米国) を用いて調製した。

調製したc-kit<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>細胞 (2×10<sup>3</sup>個/ml) に、副腎皮質ホルモンの代謝経路で形成されるステロイドであるエストラジオール、テストステロンもしくはプロゲステロン、または合成ステロイドであるデキサメタゾンを各々濃度2.3nM、23nM、230nMおよび2.3μMで添加して、1%ウシ胎児血清およびマウスTPO (50単位/ml) 含有Sク

ローン培地で37℃、5日間培養し、顕微鏡写真を撮影して、PPFを起こしている細胞数を計測し、その割合を求めた。また、同様に、ステロイドを添加せずに、マウス巨核球を24時間培養したものについて、顕微鏡写真を撮影して、PPFを起こしている細胞数を計測し、その割合を求めた（対5 照）。

PPFの測定の結果、エストロゲン受容体アゴニストであるエストラジオールを添加して培養したものについては、対照に比べてPPFの増加が確認されたが、他のステロイドを添加して培養したものでは、対照と有意な違いは認められなかった。

10 図4は、エストラジオールを添加した例でのPPFの測定結果を示したグラフであり、対照でのPPFを100%として示している。図4に示すとおり、エストラジオールを添加して培養した例では、添加したエストラジオールに対して、濃度依存的にPPFが増加しており、血小板産生能が促進されたことが確認された。

15 （実施例4）エストロゲン受容体アンタゴニストの*in vivo*投与によるマウスの末梢血中の血小板数への影響

エストロゲン受容体アンタゴニストとして、タモキシフェン（シグマ（Sigma）、セントルイス（St. Louis）、ミズーリ、米国）またはICI182780（トクリス（Tocris）、ブリストル（Bristol）20 1）、英国）を溶媒（ゴマ油：エタノール＝19：1）に2.5mg/mLの濃度で溶解させた溶液100μLを正常マウス（BDF1マウス、8週齢、雄、n＝7）の腹腔内に1日1回9日間連続投与した。投与開始後、尾静脈

から採血 ( $2 \mu\text{L}$ ) を行い、末梢血中の血小板数をブレヒャークロンカイト (Brecher-Cronkite) 法で測定した (0、2、4、6、8、11、14および20日目 (1日1回))。また、対照として、エストロゲン受容体アンタゴニストの代わりに  $100 \mu\text{L}$  の溶媒 (ゴマ油: エタノール = 19 : 1) のみを BDF I マウスの腹腔内に 1日1回 9日間連続投与し、尾静脈から採血 ( $2 \mu\text{L}$ ) を行い、末梢血中の血小板数をブレヒャークロンカイト (Brecher-Cronkite) 法で測定した (0、2、4、6、8、11、14および20日目 (1日1回))。

図5は、末梢血中の血小板数の測定結果を示したグラフであり、対照での血小板数の測定値を100%としている。

図5から明らかなように、投与開始から5～6日後から血小板数が減少し始め、エストロゲン受容体アンタゴニストの投与を続ける限り、血小板数はさらに減少した。そして、投与開始から8～11日後に血小板数は最も減少した。血小板数は、タモキシフェンを投与した例では、対照に比べて最大で45%減少し、ICI 182780を投与した例では対照に比べて最大で25%減少した。投与終了後、5日以内に血小板数は元のレベルに戻った。マウスの血小板の半減期は5～6日であるので、エストロゲン受容体アンタゴニスト投与から末梢血中の血小板数の減少が認められるまでに5～6日間を要したことは、エストロゲン受容体アンタゴニストの投与によって、新たに産生された血小板の巨核球から末梢血中への放出が抑制されたことを示している。これらの結果から、エストロゲン受容体アンタゴニストを *in vivo* で投与した場合に、血小板産生を抑制することが確認された。

(実施例5)  $3\beta$ HSD活性化作用または阻害作用を有する物質を有効成分として含有することを特徴とする血小板の減少または増加を伴う疾患の治療用組成物のスクリーニング

正常ラット (Sprague-Dawley、雄性) 副腎ミクロゾームの  
5 ホモジネートを用い、ポッツ、ジー. オー. (Potts, G. O.) 等、  
ステロイズ (Steroids)、32巻、257-267頁、1978年  
に記載の方法に準拠して、被検物質の  $3\beta$ HSD活性に及ぼす影響を測定す  
ることで、 $3\beta$ HSD活性化作用または阻害作用を有する物質を有効成分と  
して含有することを特徴とする血小板の減少または増加を伴う疾患の治療用  
10 組成物をスクリーニングする。

すなわち、70mM ショ糖、11.5mM NaCl、15.4mM  
KCl、5mg/ml ウシ血清アルブミン、0.84mM  $\text{NAD}^+$ 、8.  
5~68  $\mu\text{M}$   $\Delta^5$ -プレグネノロン含有の75mM グリシン緩衝液 (p  
H9.5) 1mlにラット副腎ミクロゾームのホモジネート (副腎6.7m  
15 g相当分) と、被検物質 (0.1  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$  および1mM) を添加し、  
これを室温でインキュベートしながら波長340nmでの吸光度変化を測定  
し、被検物質を添加しない対照の測定結果と比較することで活性化作用ある  
いは阻害作用の強度を算出する。

その結果、リオチロニンナトリウム塩に  $3\beta$ HSD活性化作用が、トリロ  
20 スタン、ミトタンおよび酢酸メドロキシprogesteronに  $3\beta$ HSD阻害作  
用が確認される。さらに、実施例1、2で使用した方法と同様の手順で、培  
養巨核球に被検物質を添加してPPFを測定して得られる結果と合わせて評

価することにより、これら被検物質が本発明の $3\beta$ HSD活性化作用または阻害作用を有する物質を有効成分として含有することを特徴とする血小板の減少または増加を伴う疾患の治療用組成物に成り得ることのスクリーニングを行うことができる。

- 5      以下、実施例6～9では、本発明の $3\beta$ HSD活性化作用または阻害作用を有する物質を有効成分として含有することを特徴とする血小板の減少または増加を伴う疾患の治療用組成物から医薬用製剤を製造した製造例を示す。

(実施例6) リオチロニン除放性錠剤

|    |                   |           |
|----|-------------------|-----------|
|    | リオチロニンナトリウム       | 0.005 g   |
| 10 | メトセルK 100 M (顆粒内) | 16.125 g  |
|    | リン酸2カルシウム・2水和物    | 181.670 g |
|    | メトセルK 100 M (顆粒間) | 16.125 g  |
|    | ステアリン酸マグネシウム      | 1.075 g   |

- 本実施例では、 $3\beta$ HSD活性化作用を有する物質としてリオチロニンを
- 15   含有することを特徴とする血小板の減少を伴う疾患の治療用組成物の錠剤を製造した。実際の手順としては、リオチロニンナトリウムのエタノール溶液をリン酸2カルシウム・2水和物に注いで乾燥させ、メトセルK 100 M (顆粒内)、メトセルK 100 M (顆粒間) およびステアリン酸マグネシウムと共に、各成分を上記の量で混合した。これを圧縮して215 mgの錠剤
- 20   を製造した。

(実施例7) トリロスタン錠剤

|        |       |
|--------|-------|
| トリロスタン | 6.0 g |
|--------|-------|

ラクトース 6.0 g

ポリビニルピロリドン 0.4 g

ステアリン酸マグネシウム 0.1 g

本実施例では、 $3\beta$ HSD阻害作用を有する物質としてトリロスタンを含む  
5 有することを特徴とする血小板の増加を伴う疾患の治療用組成物の錠剤を製造した。実際の手順としては、上記各成分を秤量後混合し、湿式造粒装置で造粒した。これを打錠機を用いて125mgの錠剤を製造した。

(実施例8) ミトタンカプセル剤

本実施例では、 $3\beta$ HSD阻害作用を有する物質としてミトタンを含有す  
10 ることを特徴とする血小板の増加を伴う疾患の治療用組成物のカプセル剤を製造した。実際の手順としては、ミトタン500mgを秤量して0号ゼラチンカプセルに封入し、カプセル剤を製造した。

(実施例9) 酢酸メドロキシプロゲステロン錠剤

酢酸メドロキシプロゲステロン 0.5 g

15 コーンスターチ 1.5 g

ヒドロキシプロピルセルロース 0.3 g

ステアリン酸マグネシウム 0.2 g

乳糖 12.5 g

本実施例では、 $3\beta$ HSD阻害作用を有する物質として酢酸メドロキシ  
20 プロゲステロンを含有することを特徴とする血小板の増加を伴う疾患の治療用組成物の錠剤を製造した。実際の手順として、上記各成分を秤量後混合し、湿式造粒装置で造粒した。これを打錠機を用いて150mgの錠剤を製造し

た。

### 産業上の利用可能性

本発明の巨核球から血小板産生量を増加させる、または減少させることを  
5 特徴とする調節剤は、巨核球から血小板産生のメカニズムを研究する実験用  
の試薬として有用である。また、本発明の調節剤は、血小板減少あるいは増  
加を伴う疾患に関する治療・研究等への応用が可能である。

本発明の調節剤を有効成分として含有する血小板の減少あるいは増加を伴  
う疾患の治療用組成物は、ヒトおよび動物において血小板数の正常化が必要  
10 な疾患、例えば、血小板減少性紫斑病、再生不良性貧血、急性白血病、血栓  
性血小板減少性紫斑病、溶血性尿毒症症候群や血小板増多症、血小板血症、  
慢性骨髄増殖症候群等に対して、他の血球成分への影響等の副作用の少ない  
治療剤として有用である。

また、本発明の $3\beta$ HSD活性化作用または阻害作用を有する物質を有効  
15 成分として含有することを特徴とする血小板の減少または増加を伴う疾患の  
治療用組成物のスクリーニング方法は、上記のような各種疾患の治療剤、お  
よび血小板減少あるいは増加を伴う疾患に関する治療・研究に用いるための  
物質を効率よく識別する方法として有用である。



## 請求の範囲

1.  $3\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素活性化作用を有する物質を含有し、巨核球から血小板産生を増加させる作用を有する調節剤。
- 5 2.  $3\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素阻害作用を有する物質を含有し、巨核球から血小板産生を減少させる作用を有する調節剤。
3. 請求の範囲第1項に記載の調節剤を有効成分として含有する血小板の減少を伴う疾患の治療用組成物。
4. 前記有効成分が、リオチロニンである請求の範囲第3項に記載の治療用組成物。
- 10 5. 前記血小板の減少を伴う疾患が、血小板減少性紫斑病、再生不良性貧血、白血病、溶血性尿毒症症候群、播種性血管内凝固症候群および放射線・制癌剤・骨髓抑制剤による副作用からなる群から選択されるいずれか1つである請求の範囲第3項または第4項に記載の治療用組成物。
- 15 6. 請求の範囲第2項に記載の剤を有効成分として含有することを特徴とする血小板の増加を伴う疾患の治療用組成物。
7. 前記有効成分が、トリロスタン、ミトタンおよびメドロキシプロゲステロンからなる群から選択される少なくとも1種である請求の範囲第6項に記載の治療用組成物。
- 20 8. 前記有効成分が、トリロスタンである請求の範囲第6項に記載の治療用組成物。
9. 前記血小板の増加を伴う疾患が、血小板増多症、血小板血症、慢性骨髓性白

血病および慢性骨髄増殖症候群からなる群から選択されるいずれか1つである請求の範囲第6項ないし第8項のいずれか1つに記載の治療用組成物。

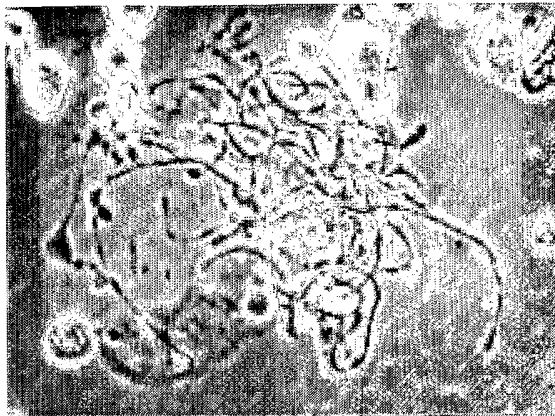
10. 下記工程(A)、または(A)および(B)を含むことを特徴とする $3\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素活性化作用または阻害作用を有する物質を有効成分として含有することを特徴とする血小板の減少または増加を伴う疾患の治療用組成物のスクリーニング方法。

(A)  $3\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素にその基質となる物質および被検物質を添加して $3\beta$ -ヒドロキシ脱水素酵素の活性を測定する工程

(B) 培養巨核球に被検物質を添加して胞体突起形成を測定する工程

1/5

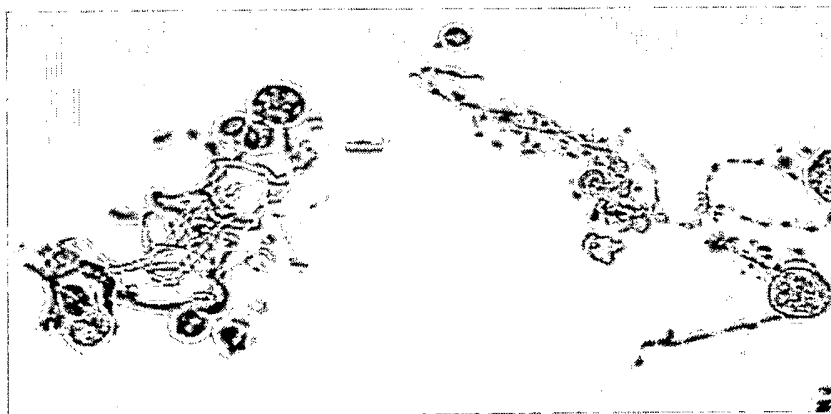
**FIG. 1A**



**FIG. 1B**

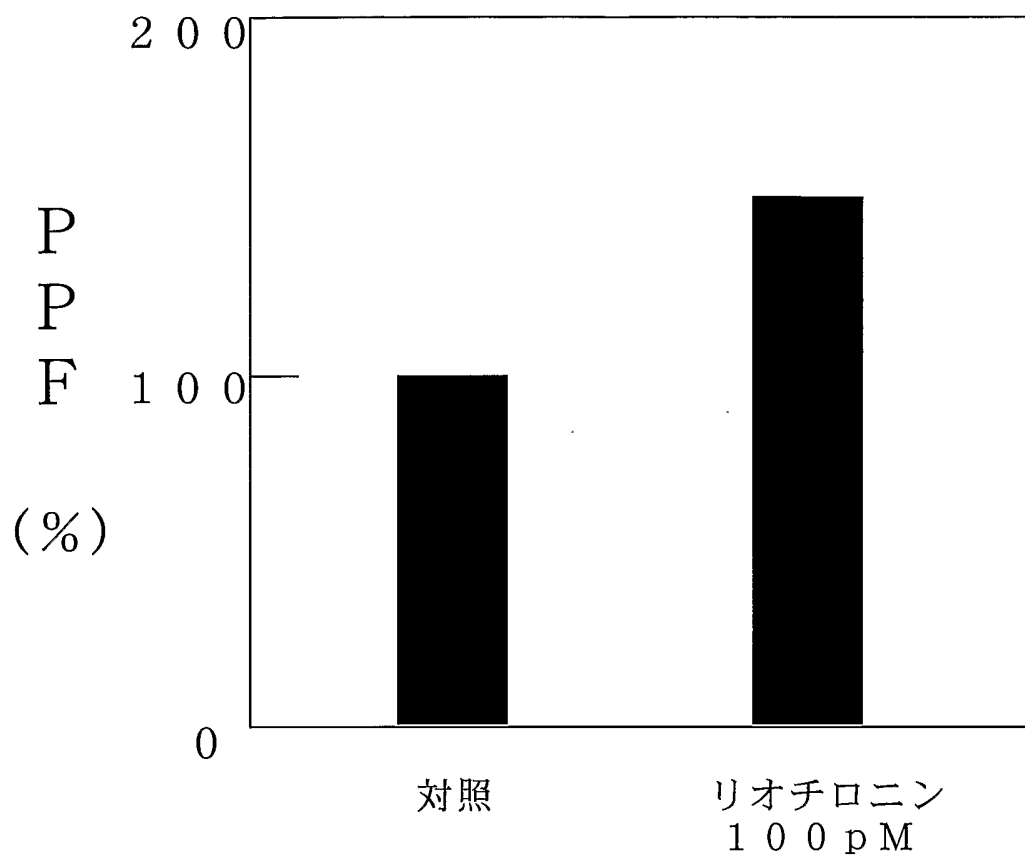


**FIG. 1C**



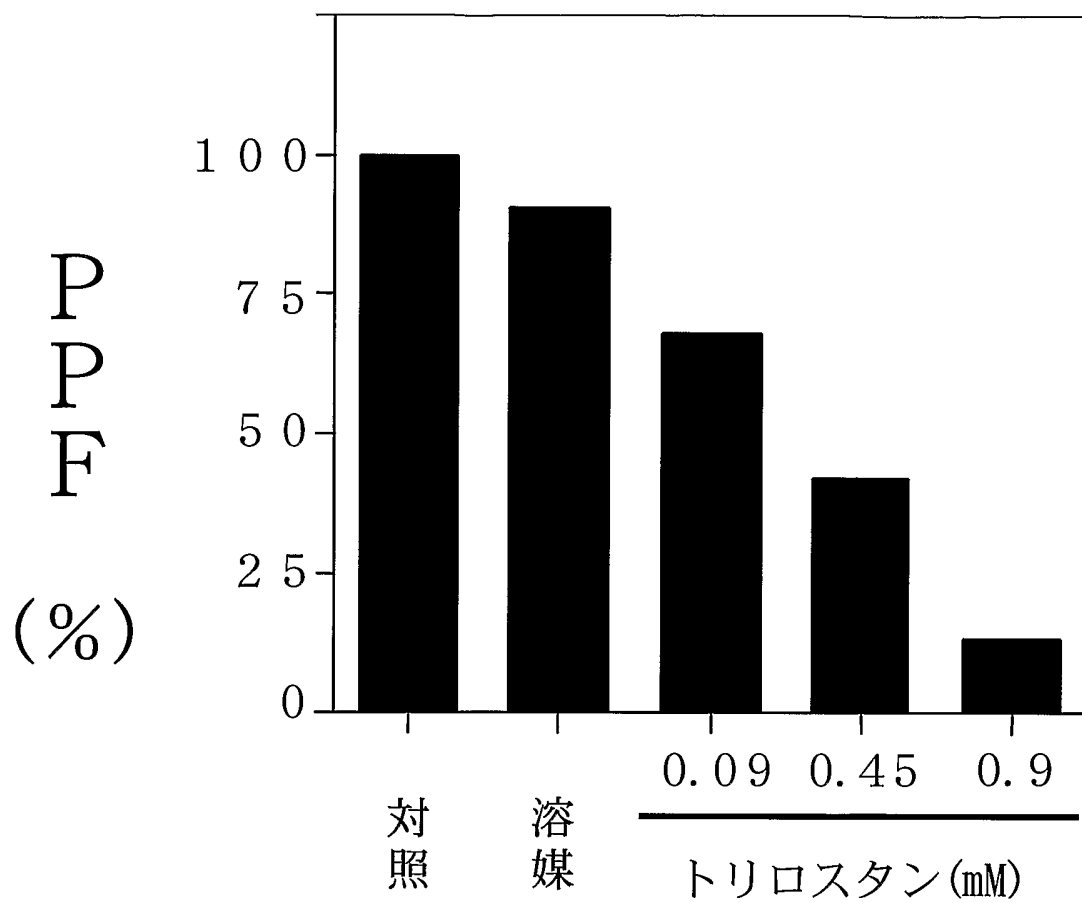
2/5

FIG. 2



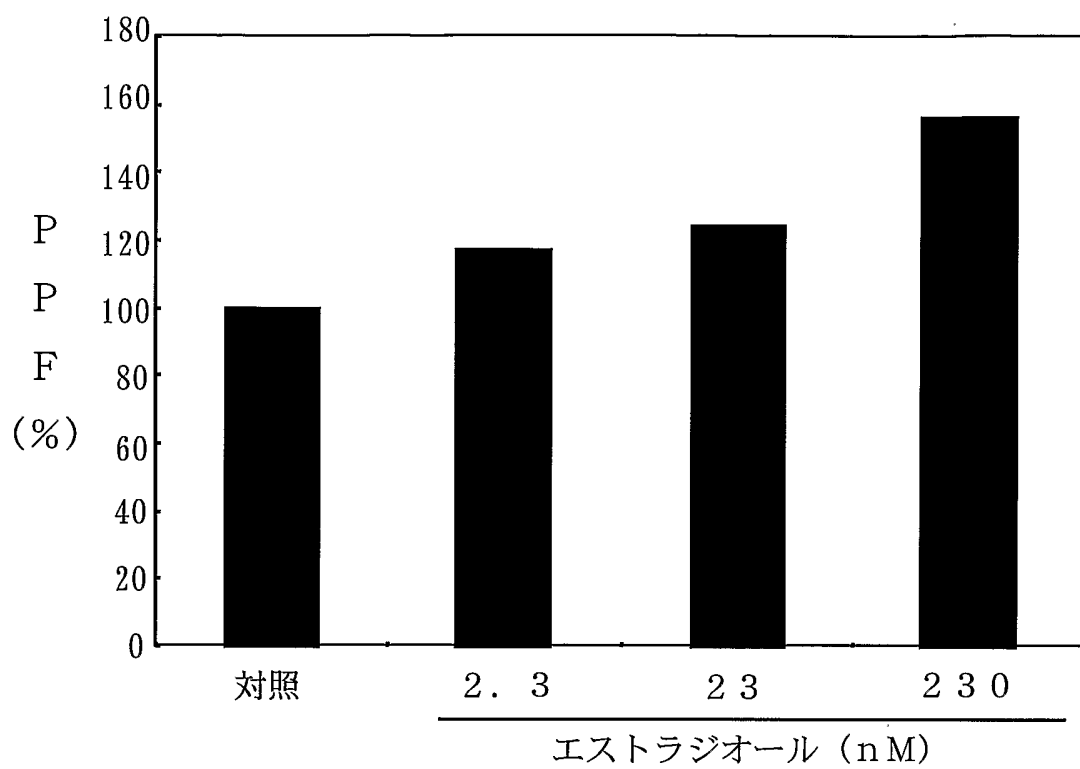
3/5

FIG. 3



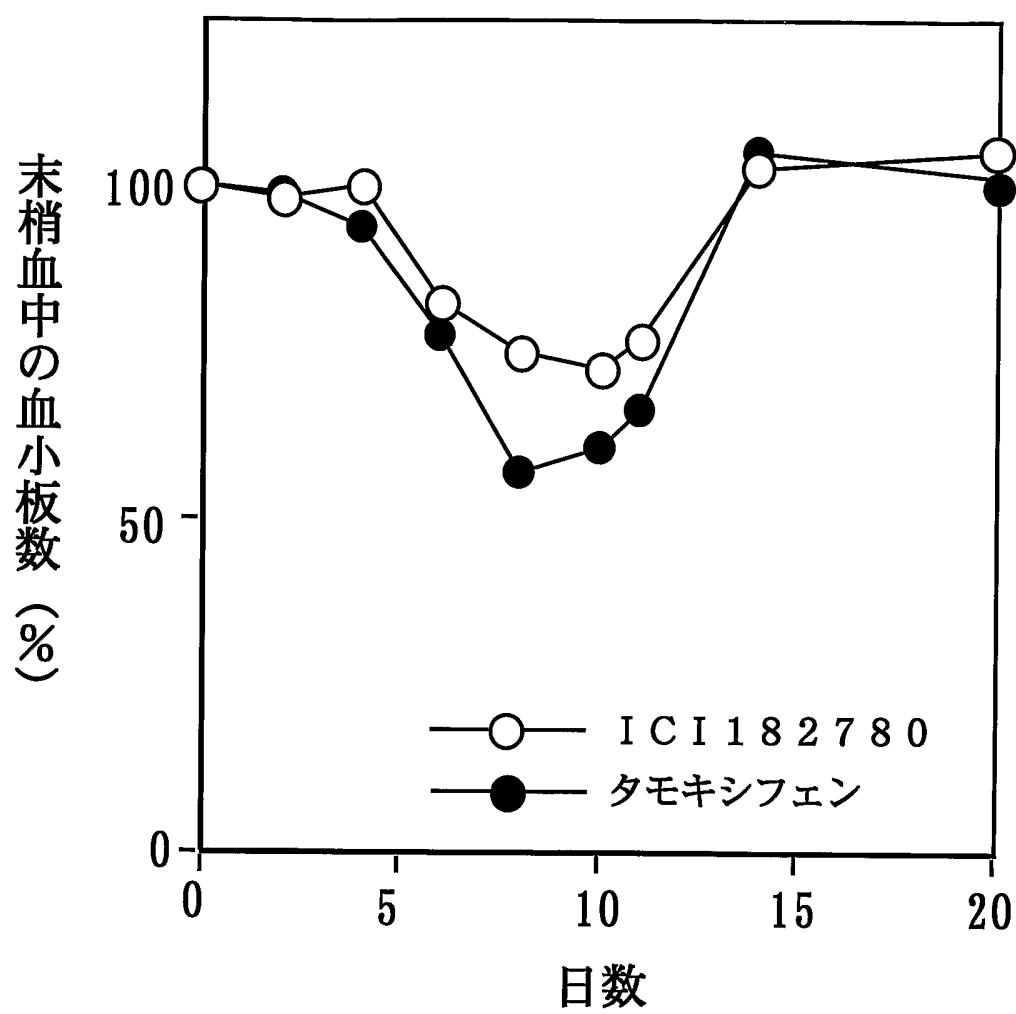
4/5

FIG. 4



5/5

FIG. 5



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007566

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K45/00, 31/57, 31/565, 31/198, 31/03, A61P7/00, 35/02,  
G01N33/50, C12Q1/32

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.<sup>7</sup> A61K45/00, 31/57, 31/565, 31/198, 31/03, A61P7/00, 35/02,  
G01N33/50, C12Q1/32

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/CAPLUS/EMBASE/BIOSIS (STN), JMEDPLUS (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                               | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | Matsumura I. et al., 'Molecular control of megakaryopoiesis and thrombopoiesis.', Int. J.Hematol., 2002 June; 75(5): 473-83                                                                                      | 1-10                  |
| A         | Khetawat G. et al., 'Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor beta and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression.', Blood., 01 April, 2000 (01.04.00); 95(7): 2289-96 | 1-10                  |
| A         | Tarantino MD. et al., 'The estrogen receptor is present in human megakaryocytes.', Ann N.Y.Acad. Sci., 18 April, 1994 (18.04.94); 714: 293-6                                                                     | 1-10                  |

☐ 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  
02 August, 2004 (02.08.04)

Date of mailing of the international search report  
17 August, 2004 (17.08.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## &lt;Subject of search&gt;

(1) With respect to claims 1 and 3-5

Claim 1 relates to a regulation agent capable of increasing platelet production from megakaryocytes which comprises as an active ingredient a compound defined by desirable property "substance having  $3\beta$ -hydroxydehydrogenase activating activity". Although claim 1 comprehends all compounds with the above property, it appears that only some of the claimed compounds are disclosed within the meaning of PCT Article 5 and that hence the support by disclosure in the description within the meaning of PCT Article 6 is lacked.

Further, since with respect to the "substance having  $3\beta$ -hydroxydehydrogenase activating activity", the scope of compounds with the above property cannot be identified even if technical common knowledge at the time of filing of this application is taken into account, claim 1 also fails to satisfy the requirement of clarity within the meaning of PCT Article 6.

Likewise, claims 3 and 5 quoting claim 1 lack the support by disclosure in the description within the meaning of PCT Article 6 and also lack the requirement of clarity within the meaning of PCT Article 6.

Therefore, search with respect to the inventions of claims 1, 3 and 5 has been conducted on the relationship between  $3\beta$ -hydroxydehydrogenase and platelet production from megakaryocytes and on regulation agents capable of increasing platelet production from megakaryocytes which comprise as an active ingredient compounds concretely described in the description and defined in claim 4. With respect to claim 4, complete search has been carried out.

(2) With respect to claims 2 and 6-9

Claim 2 relates to a regulation agent capable of decreasing platelet production from megakaryocytes which comprises as an active ingredient a compound defined by desirable property "substance having  $3\beta$ -hydroxydehydrogenase inhibiting activity". Although claim 2 comprehends all compounds with the above property, it appears that only some of the claimed compounds are disclosed within the meaning of PCT Article 5 and that hence the support by disclosure in the description within the meaning of PCT Article 6 is lacked.

Further, since with respect to the "substance having  $3\beta$ -hydroxydehydrogenase inhibiting activity", the scope of compounds with the above property cannot be identified even if technical common knowledge at the time of filing of this application is taken into account, claim 2 also fails to satisfy the requirement of clarity within the meaning of PCT Article 6.

Likewise, claims 6 and 9 quoting claim 2 lack the support by disclosure in the description within the meaning of PCT Article 6 and also lack the requirement of clarity within the meaning of PCT Article 6.

Therefore, search with respect to the inventions of claims 2, 6 and 9 has been conducted on the relationship between  $3\beta$ -hydroxydehydrogenase and platelet production from megakaryocytes and on regulation agents capable of decreasing platelet production from megakaryocytes which comprise as an active ingredient compounds concretely described in the description and defined in claim 7. With respect to claims 7 and 8, complete search has been carried out.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                |                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))<br>Int. Cl <sup>7</sup> A61K45/00, 31/57, 31/565, 31/198, 31/03, A61P7/00, 35/02, G01N33/50, C12Q1/32                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                |                  |
| B. 調査を行った分野<br>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))<br>Int. Cl <sup>7</sup> A61K45/00, 31/57, 31/565, 31/198, 31/03, A61P7/00, 35/02, G01N33/50, C12Q1/32                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                |                  |
| 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)<br><br>MEDLINE/CAPLUS/EMBASE/BIOSIS(STN) JMEDPLUS(JOIS)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                |                  |
| C. 関連すると認められる文献                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                |                  |
| 引用文献の<br>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<br>請求の範囲の番号 |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Matsumura I et al. 'Molecular control of megakaryopoiesis and thrombopoiesis.' Int J Hematol. 2002 Jun; 75(5): 473-83.                                                                         | 1-10             |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Khetawat G et al. 'Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor beta and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression.' Blood. 2000 Apr 1; 95(7): 2289-96. | 1-10             |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Tarantino MD et al. 'The estrogen receptor is present in human megakaryocytes.' Ann N Y Acad Sci. 1994 Apr 18; 714: 293-6.                                                                     | 1-10             |
| <input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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<br>「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<br>「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<br>「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)<br>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献<br>「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<br>「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<br>「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<br>「&」 同一パテントファミリー文献 |                                                                                                                                                                                                |                  |
| 国際調査を完了した日<br>02.08.2004                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 国際調査報告の発送日<br>17.8.2004                                                                                                                                                                        |                  |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/J P)<br>郵便番号100-8915<br>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)<br>川口 裕美子                                                                                                                                                                     | 4C 9829          |
| 電話番号 03-3581-1101 内線 3452                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                |                  |

## &lt;調査の対象について&gt;

(1) 請求の範囲1, 3-5について

請求の範囲1は、「 $3\beta$ -ヒドロキシ脱水酵素活性化作用を有する物質」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする巨核球から血小板産生を増加させる作用を有する調節剤に関するものである。そして、請求の範囲1は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「 $3\beta$ -ヒドロキシ脱水酵素活性化作用を有する物質」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲1は、PCT第6条における明確性の要件も欠いている。

請求の範囲1を引用する請求の範囲3, 5についても同様に、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものであり、また、PCT第6条における明確性の要件も欠いている。

よって、請求の範囲1, 3, 5に係る発明についての調査は、 $3\beta$ -ヒドロキシ脱水酵素と巨核球からの血小板産生との関係について、及び、明細書に具体的に記載され、請求の範囲4に特定されている化合物を有効成分とする巨核球から血小板産生を増加させる作用を有する調節剤について行った。また、請求の範囲4については、完全な調査を行った。

(2) 請求の範囲2, 6-9について

請求の範囲2は、「 $3\beta$ -ヒドロキシ脱水酵素阻害作用を有する物質」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする巨核球から血小板産生を減少させる作用を有する調節剤に関するものである。そして、請求の範囲2は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「 $3\beta$ -ヒドロキシ脱水酵素阻害作用を有する物質」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲2は、PCT第6条における明確性の要件も欠いている。

請求の範囲2を引用する請求の範囲6, 9についても同様に、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものであり、また、PCT第6条における明確性の要件も欠いている。

よって、請求の範囲2, 6, 9に係る発明についての調査は、 $3\beta$ -ヒドロキシ脱水酵素と巨核球からの血小板産生との関係について、及び、明細書に具体的に記載され、請求の範囲7に特定されている化合物を有効成分とする巨核球から血小板産生を減少させる作用を有する調節剤について行った。また、請求の範囲7, 8については、完全な調査を行った。