



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105102986 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 25

- (21) 申请号 201480016470. 5 C07K 16/18(2006. 01)
- (22) 申请日 2014. 03. 20 C12N 15/09(2006. 01)
- (30) 优先权数据 C12Q 1/68(2006. 01)
 - 2013-061094 2013. 03. 22 JP G01N 27/62(2006. 01)
 - G01N 33/50(2006. 01)
- (85) PCT国际申请进入国家阶段日 G01N 33/53(2006. 01)
 - 2015. 09. 17 G01N 33/574(2006. 01)
- (86) PCT国际申请的申请数据
 - PCT/JP2014/057879 2014. 03. 20
- (87) PCT国际申请的公布数据
 - W02014/148627 JA 2014. 09. 25
- (71) 申请人 国立研究开发法人理化学研究所
地址 日本埼玉县
- (72) 发明人 植田幸嗣 中川英刀
- (74) 专利代理机构 北京邦信阳专利商标代理有
限公司 11012
代理人 黄泽雄 王燕
- (51) Int. Cl.
G01N 33/68(2006. 01)

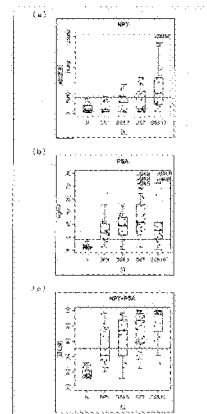
权利要求书1页 说明书17页 附图9页

(54) 发明名称

用于评价前列腺癌进度的分析方法、前列腺癌进度的评价方法、前列腺癌的检测方法以及检查试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及用于评价前列腺癌进度的分析方法以及前列腺癌进度的评价方法,其包括测定来自生物体采集的血液或尿液的试料中的神经肽Y的量的工序,本发明的前列腺癌的检测方法包括测定来自生物体采集的血液或尿液的试料中的、神经肽Y的量以及前列腺特异抗原的量的工序。



1. 一种用于评价前列腺癌进度的分析方法,其中,
包含测定试料中的神经肽 Y 的量的工序,所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。
2. 根据权利要求 1 所述的分析方法,其中,
还包含测定试料中的前列腺特异抗原、TMPRSS2:ERG 的 mRNA、及 PCA3RNA 中的至少一方的量的工序,所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。
3. 根据权利要求 1 所述的分析方法,其中,
还包含测定试料中的前列腺特异抗原的量的工序,所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。
4. 根据权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的分析方法,其中,
通过质量分析法或发光测定法测定神经肽 Y 的量。
5. 根据权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的分析方法,其中,
所述试料为全血、血清或血浆。
6. 根据权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的分析方法,其中,
在测定所述神经肽 Y 的量的工序中,将所述试料反相萃取 2 次以上得到含有神经肽 Y 的组分,测定所得到的组分的神经肽 Y 的量。
7. 一种前列腺癌的检测方法,其中,
包含测定试料中的神经肽 Y 的量以及前列腺特异抗原的量的工序,所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。
8. 一种前列腺癌进度的评价方法,其中,
包含测定试料中的神经肽 Y 的量的工序,所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。
9. 一种检查试剂盒,其是用于评价前列腺癌进度的检查试剂盒,包含用于测定试料中的神经肽 Y 的量的肽探针,所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。
10. 根据权利要求 9 所述的检查试剂盒,还包含以下至少一方:用于测定试料中的前列腺特异抗原的量的抗体或肽探针、用于测定试料中的 TMPRSS2:ERG 的 mRNA 的量的核酸探针或核酸引物、以及用于测定试料中的 PCA3RNA 的量的核酸探针或核酸引物,所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。
11. 一种检查试剂盒,其是用于评价前列腺癌进度的检查试剂盒,其中,
包含用于测定试料中的神经肽 Y 的量的抗体,
还包含以下至少一方:用于测定试料中的前列腺特异抗原的量的抗体或肽探针、用于测定试料中的 TMPRSS2:ERG 的 mRNA 的量的核酸探针或核酸引物、以及用于测定试料中的 PCA3RNA 的量的核酸探针或核酸引物,
所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。
12. 一种检查试剂盒,其是用于检测前列腺癌的检查试剂盒,包含用于测定试料中的神经肽 Y 的量的抗体或肽探针、以及用于测定试料中的前列腺特异抗原的量的抗体或肽探针,所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。

用于评价前列腺癌进度的分析方法、前列腺癌进度的评价方法、前列腺癌的检测方法以及检查试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及用于评价前列腺癌进度的分析方法、前列腺癌进度的评价方法、前列腺癌的检测方法、用于评价前列腺癌进度的检查试剂盒、以及用于检测前列腺癌的检查试剂盒。

背景技术

[0002] 已知前列腺特异抗原 (PSA) 是一种激肽释放酶 (Kallikrein)-3, 其从 1969 年被发现 (非专利文献 1)、1994 年被食品药品监督管理局 (FDA) 认可为 PSA 检查以来, 被认为是前列腺癌的最佳诊断手段 (非专利文献 2)。实际上, 在美国, 1 年内在 4400 万 50 岁以上的男性中至少有 70% 接受 PSA 检查。但是, 在 2011 年 10 月, 美国预防医学服务工作组 (USPSTF) 发布了有关前列腺癌的临床结果在统计上的证据, 主张不要再继续对健康的男性进行 PSA 检查 (非专利文献 3)。该结论单纯是基于以下考虑: 相对于前列腺癌患者的整体生存率而言 PSA 检查的好处还没有达到需要冒着扩大侵袭性的前列腺活组织检查的事例数以及扩大医疗费用的风险的程度。预估为了预防 1 个人患前列腺癌而死亡, 却要在 PSA 筛查中花掉 520 万美元 (非专利文献 4)。

[0003] 至今, 本领域一直在探索 PSA 以外的前列腺癌生物标记候补。例如, 非专利文献 5 中记载: 根据从患前列腺疾病的患者采集前列腺组织进行免疫染色的研究, 神经肽 Y (NPY) 以及巨噬细胞抑制因子 1 (MIC-1) 在前列腺上皮内肿瘤 (PIN) 患者及前列腺癌患者的前列腺组织中表达的情况较多。另外, 专利文献 1 记载了编码 NPY 的 mRNA 量, 在前列腺肿瘤组织中比在正常的前列腺组织中多。

[0004] (现有技术文献)

[0005] 专利文献

[0006] (专利文献 1) 日本公表专利公报“日本特表 2005-523727 号公报 (2005 年 8 月 11 日公表)”

[0007] 非专利文献

[0008] (非专利文献 1) Ablin, R. J., Pfeiffer, L., Gonder, M. J., and Soanes, W. A. (1969), *Experimental medicine and surgery* 27, 406-410.

[0009] (非专利文献 2) Catalona, W. J., Smith, D. S., Ratliff, T. L., Dodds, K. M., Coplen, D. E., Yuan, J. J., Petros, J. A., and Andriole, G. L. (1991), *The New England journal of medicine* 324, 1156-1161.

[0010] (非专利文献 3) Chou, R., Croswell, J. M., Dana, T., Bougatsos, C., Blazina, I., Fu, R., Gleitsman, K., Koenig, H. C., Lam, C., Maltz, A., Ruge, J. B., and Lin, K. (2011), *Annals of internal medicine* 155, 762-771.

[0011] (非专利文献 4) Brett, A. S., and Ablin, R. J. (2011), *The New England journal of medicine* 365, 1949-1951.

[0012] (非专利文献 5) Krishan K. Rasiah, James G. Kench, Margaret Gardiner-Garden, Andrew V. Biankin, David Golovsky, Phillip C. Brenner, Raji Kooner, Gordon F. O' Neill, Jennifer J. Turner, Warick Delprado, C. Soon Lee, David A. Brown, Samuel N. Breit, John J. Grygiel, Lisa G. Horvath, Phillip D. Stricker, Robert L. Sutherland, and Susan M. Henshall, (2006), *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006 ;15(4), 711-716.

发明内容

[0013] (发明所要解决的技术问题)

[0014] 如上所述, PSA 在临床上作为前列腺癌的生物标记使用。但是, 为了减少前列腺癌的过度诊断带来的上述危险, 强烈希望开发能够有效对 PSA 的低特异性予以弥补的检测方法。

[0015] 另外, 目前为止前列腺癌进度评价只能够通过进行了侵袭性高的活组织检查后, 根据病理性检查镜像来主观判断。如果在血液检查阶段等早期阶段就能够判断前列腺癌进度, 则可大大地减少患者的负担, 并且可使用客观标准确定迅速的治疗方针。因此, 期待开发能够极早进行的评价前列腺癌进度的方法。

[0016] 予以说明, 虽然非专利文献 5 中记载了前列腺组织中 NPY 的表达量, 但是对于 NPY 在其它的试料(血液及尿液等)中的存在量, 没有任何公开。对于各蛋白质而言, 其在组织中的表达量与其在其它试料中的存在量并不相关, 这是公知的。而且, 非专利文献 5 中公开前列腺组织中的 NPY 表达量与前列腺癌进度不相关。另外, 专利文献 1 中也没有记载 NPY 的肽量与前列腺癌进度之间的关系。而且, 非专利文献 5 及专利文献 1 中都没有记载灵敏度及特异性的验证数据。

[0017] 本发明就是鉴于上述问题而完成的发明, 其目的在于提供一种用于评价前列腺癌进度的分析方法、前列腺癌进度的评价方法、以及能够有效地对 PSA 的低特异性予以弥补的前列腺癌的检测方法等。

[0018] (用于解决技术问题的手段)

[0019] 本发明的用于评价前列腺癌进度的分析方法包含测定试料中的神经肽 Y 的量的工序, 所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。

[0020] 本发明的前列腺癌的检测方法包含测定试料中的神经肽 Y 的量及前列腺特异抗原量的工序, 所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。

[0021] 本发明的前列腺癌进度的评价方法包含测定试料中的神经肽 Y 的量的工序, 所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。

[0022] 本发明的检查试剂盒的一实施方式是用于评价前列腺癌进度的检查试剂盒, 其包含用于测定试料中的神经肽 Y 的量的肽探针, 所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。

[0023] 本发明的检查试剂盒的另一实施方式是用于评价前列腺癌进度的检查试剂盒, 包含用于测定试料中的神经肽 Y 的量的抗体, 还包含以下至少一方: 用于测定试料中的前列腺特异抗原的量的抗体或肽探针、用于测定试料中的 TMPRSS2:ERG 的 mRNA 的量的核酸探针或核酸引物、以及用于测定试料中的 PCA3RNA 的量的核酸探针或核酸引物, 所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。

[0024] 本发明的检查试剂盒的又一实施方式是一种用于检测前列腺癌的检查试剂盒,包含用于测定试料中的神经肽 Y 的量的抗体或肽探针、以及用于测定试料中的前列腺特异抗原的量的抗体或肽探针,所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。

[0025] 本说明书包含本申请的优先权基础即日本专利申请 2013-061094 号的说明书以及 / 或图面中记载的内容。

[0026] 发明的效果

[0027] 本发明能提供一种用于评价前列腺癌进度的分析方法、前列腺癌进度的评价方法、以及可有效地对 PSA 的低特异性予以弥补的前列腺癌的检测方法等。

附图说明

[0028] 图 1 是表示实施例中的 RefinerMS software 的整体工作流程的图。

[0029] 图 2 是表示实施例中的 QUEST-MS 技术的概要以及由 QUEST-MS 技术得到的纯化结果的图。

[0030] 图 3 表示实施例中的由 Expressionist proteome server 通过 Absent/Present Search 法得到的前列腺癌的生物标记的筛查结果。

[0031] 图 4 是表示实施例中的有关 NPY 的免疫组织化学染色解析结果的图。

[0032] 图 5 是表示实施例中的在生物标记的确认实验中使用的有关 NPY 的 MRM 条件优化的图。

[0033] 图 6 是表示实施例中的基于 MRM 评价 NPY 测定量的再现性的图。

[0034] 图 7 是表示实施例中的、NPY(MRM 色谱的面积)、PSA(通过医院中的 ELISA 测定的值)、或 NPY+PSA(逻辑曲线回归值)的各 ROC 曲线的比较图。

[0035] 图 8 是表示实施例中的、由 ROC 曲线解析来评价诊断潜在性的图。

[0036] 图 9 是表示实施例中手术前及手术后的样品中血浆 NPY 水平的结果的图。

具体实施方式

[0037] 本申请发明者这次独自开发了在生物标记的探索中有用的 QUEST-MS(Quick Enrichment of Small Targets for Mass Spectrometry) 技术。并且,为了鉴定前列腺癌的生物标记而应用 QUEST-MS 技术。其结果是,发现神经肽 Y(NPY) 与前列腺癌进度具有高度的相关性,并且发现 NPY 能够有效地对 PSA 的低特异性予以弥补,最终完成了本发明。

[0038] (1. 用于评价前列腺癌进度的分析方法以及前列腺癌进度的评价方法)

[0039] 本发明的用于评价前列腺癌进度的分析方法包括测定来自从生物体采集的血液或尿液的试料中的神经肽 Y(NPY) 量的工序。

[0040] 本发明的前列腺癌进度的评价方法包括测定来自从生物体采集的血液或尿液的试料中 NPY 量的工序。

[0041] 本发明的分析方法以及评价方法优选包含测定 NPY 量的工序以及测定前列腺特异抗原(PSA)、TMPRSS2:ERG 的 mRNA 以及 PCA3(prostate cancer antigen3;prostate cancer gene 3)RNA 中至少一方的量的工序。本发明的分析方法以及评价方法更优选包括测定 NPY 量的工序以及测定 PSA 的量的工序。

[0042] 予以说明,以下将本发明中测得的多肽(NPY 及 PSA) 统称为“前列腺癌标记肽”。

另外,以下将本发明中测得的 RNA (TMPRSS2:ERG 的 mRNA 以及 PCA3RNA) 统称为“前列腺癌标记 RNA”。另外,将“前列腺癌标记肽”及“前列腺癌标记 RNA”统称为“前列腺癌标记”。

[0043] “前列腺癌标记肽”不仅包括上述多肽的全长,还包括其片断,还包括上述多肽的前体。即,例如“测定 NPY 的量”是指测定全长的 NPY 多肽、NPY 多肽的片断以及 NPY 多肽的前体中的至少一种。要测定其量的 NPY 可以为例如 NPY₁₋₉₇、NPY₁₋₂₈、NPY₂₉₋₉₇、NPY₆₈₋₉₇、NPY₂₉₋₆₇ 或 NPY₂₉₋₆₄。另外,也可以为它们的分解物。另外,还可以为 NPY₃₁₋₄₇、NPY₅₄₋₆₁、NPY₆₈₋₈₀ 或 NPY₈₁₋₈₈、或包含这些中任一部分的全长 NPY 或 NPY 片断。

[0044] “前列腺癌标记 RNA”中不仅包括上述 RNA 的全长,也包括其片断,也包括 RNA 的前体。予以说明, TMPRSS2:ERG 为 TMPRSS2 基因与 ERG 基因的融合 mRNA。TMPRSS2:ERG 的 TMPRSS2 与 ERG 的融合方式没有特别的限定,可以举出例如文献:Jianghua Wang, Yi Cai, Chengxi Ren, and Michael Ittmann, Cancer Res 2006 ;66 :8347-8351. 中记载的方式。PCA3RNA 为 PCA3 基因的转录产物,为未编码 (non-coding) RNA。

[0045] 特别的是,在前列腺癌患者的血清中会检测到与健康人的血清相比更多的上述前列腺癌标记肽。因此,特别是通过测定血清中的前列腺癌标记肽的存在量,再与健康人的存在量相比,可测出前列腺癌。另外,特别的是,上述前列腺癌患者的尿液中与健康人的尿液相比,能够检测到更多的前列腺癌标记 RNA。因此,特别是通过测定尿液中的前列腺癌标记 RNA 的存在量,再与健康人的存在量相比较,可测出前列腺癌。

[0046] 进而, NPY 相对于前列腺癌的特异性优良,且其量与前列腺癌进度高度相关(参照后述实施例),因此,特别优选作为用于评价前列腺癌进度的生物标记。

[0047] 在此,“前列腺癌”是指包括腺癌(前列腺腺癌)在内的前列腺产生的恶性肿瘤。

[0048] “进度”是指基于格里森评分(Gleason Score) (GS)、TNM 分类或血清 PSA 值等的基准而得到的进度。予以说明,在本发明中,“进度”不仅包括在癌症的情况下评价癌进度,还包括未患癌的评价。“前列腺癌进度的评价”不仅仅包括针对患有前列腺癌的受检对象评价癌进度,还包括将受检对象评价为未患前列腺癌。即,“前列腺癌进度的评价”中也包括“未患前列腺癌”的评价。

[0049] “灵敏度”是指对出现特定疾病的集团进行检测时呈现阳性(受检对象异常值)的比例(真阳性的比例)。另外,“特异性”是指对未出现特定疾病的集团进行检查时呈现阴性(正常值)的比例(真阴性的比例)。另外,“阳性准确率”是指在检查中,显示阳性的受检对象中的实际患病的个体的比例。另外,“阴性准确率”是指在检查中,显示阴性的受检对象中的实际未患病的个体的比例。

[0050] 本发明的分析方法以及评价方法只要包含测定来自从生物体采集的血液或尿液的试料中的 NPY 量的工序即可,其它的具体工序以及使用的器具以及装置没有特别的限定。

[0051] 本说明书中,“测定前列腺癌标记的量”是指测定生物体试料或对其进行纯化而得到的试料中的前列腺癌标记的存在量或浓度。“前列腺癌标记的量”可以为绝对量(绝对质量或绝对浓度),也可以为相对量(相对质量或相对浓度)。另外,例如可以为质量分析中的峰面积、或发光测定中的发光强度等,也可以为相对于规定的基准的倍数。

[0052] 本发明中使用的“试料”是来自从生物体(受检对象)采集的血液或尿液的试料。作为来自血液的试料,可以举出例如全血、血清、血浆等。在测定 NPY 的量时以及测定 PSA 的

量时，“试料”优选为其中的全血、血清以及血浆，更优选为血清及血浆。测定 TMRSS2:ERG 的 mRNA 的量时以及测定 PCA3RNA 的量时，“试料”优选其中的尿液。

[0053] 另外，受检对象为人、小鼠、大鼠、兔子及猴等，优选为人。作为采血的部位，可以举出例如肘窝皮静脉、桡侧皮静脉以及尺侧皮静脉等。予以说明，在测定多种前列腺癌标记的量时，可以使用同一个试料进行测定，也可以使用不同的试料进行测定。

[0054] 另外，受检对象可以预先已知患有前列腺癌，或者未知是否患有前列腺癌。在得知患有前列腺癌的情况下，可评价该受检对象的前列腺癌进行到何种程度。另外，在未知是否患有前列腺癌的情况下，可评价该受检对象是否患有前列腺癌，以及在患有前列腺癌的情况下可以评价前列腺癌达到了何种程度。

[0055] 作为本发明的评价方法的一例，可以通过测定来自受检对象的生物体试料中的 NPY 的量，再测定来自对照受检对象（健康人及各种进度的前列腺癌患者）的生物体试料中的 NPY 的量，将两者进行比较来评价前列腺癌进度。具体而言，通过比较来自受检对象的试料中的 NPY 量与来自各对照受检对象的试料中的 NPY 的量，可以在统计学上评价该受检对象是否患有前列腺癌以及罹患的前列腺癌进行到什么进度。来自对照受检对象的试料中的 NPY 量可使用预先测定的值。或者，也可预先测定来自对照受检对象的生物体试料中的 NPY 的量，再以此为基础确定与各进度对应的量的范围，如果来自受检对象的生物体试料中的 NPY 量处于与某一进度对应的量的范围内，即可判断其进度。

[0056] 另外，通过将与健康人及各进度的前列腺癌患者不同的良性前列腺肥大症 (BPH) 患者也列入对照受检对象范围，可以更高精度判定进度。本发明的分析方法及评价方法中，尤其可以更高精度区别容易呈伪阳性的 BPH 和前列腺癌。

[0057] 予以说明，对照受检对象中至少有进度不同的 2 名以上的前列腺癌患者即可，有时也可不含有健康人及 BPH 患者。

[0058] 在对受检对象的 NPY 量和对照受检对象的 NPY 量进行比较时，其显著性差异可以通过例如 t 检验、F 检验、卡方检验或 Mann-Whitney's U test 等统计学方法进行判断。

[0059] 进而，通过组合 NPY 和上述其它前列腺癌标记进行评价，可以对前列腺癌进度进行更准确的评价。

[0060] 作为一例，组合 NPY 和 PSA 进行评价时，可以使用例如测定的 NPY 量及 PSA 量进行逻辑回归运算。计算方法使用例如文献：Pepe, M. S., Cai, T., and Longton, G. (2006), *Biometrics* 62, 221-229. 中记载的方法即可。根据该逻辑回归值可算出前列腺癌进度。对于 NPY 与 PSA 的组合而言，灵敏度及特异性均良好，可对前列腺癌进度进行更准确的评价。

[0061] 另外，除了可对 NPY 与 PSA 的组合运用逻辑回归法以外，还可以对 NPY 与至少一种其它的前列腺癌标记的组合运用逻辑回归法。

[0062] 测定前列腺癌标记肽量的方法只要能够对前列腺癌标记肽的存在量进行定量或半定量，则没有特别的限定，可以使用例如利用针对各前列腺癌标记肽具有特异性的免疫学手法的方法、利用针对各前列腺癌标记肽具有特异性的肽探针的方法、液相色谱法以及质量分析法等。作为使用抗体的方法，可以举出例如 ELISA 法、定量蛋白质印迹法、放射免疫测定法、免疫层析法以及免疫沉降法等。作为 ELISA 法的种类，没有特别的限定，可以举出所谓抗原测定体系（测定生物试料中含有的抗原量）的、利用直接吸附法而进行的 ELISA、利用竞争法而进行的 ELISA、利用夹层法 (Sandwich 法) 进行的 ELISA、以及利用微

流路式或微球等的专门用于微量试料的测定的 ELISA 等。

[0063] 对各前列腺癌标记肽具有特异性的抗体可以为单克隆抗体,也可以为多克隆抗体,但优选为单克隆抗体。例如,人的 NPY 以及 PSA 的氨基酸序列可以从 UniProt 等公共数据库获得。例如,数据库 UniProt 中,人的 NPY 的注册序号为 P01303,人的 PSA 的注册序号为 P07288。基于这些信息,本领域技术人员能够容易地确定适合的氨基酸序列来作为用于制作对各前列腺癌标记肽具有特异性的抗体的抗原。

[0064] 本发明中,“抗体”包括免疫球蛋白的全部类型(class)以及亚类(subclass)以及抗体的功能性片段。所述抗体的概念中包括多克隆抗体及单克隆抗体中的任一天然型抗体,还包括使用基因重组技术制造的抗体以及该抗体的功能性片段。“抗体的功能性片段”是指具有所述抗体的一部分区域,且具有抗原结合能力的物质(与结合性片段同义)。天然型抗体没有特别的限定,能来自包括人、小鼠、大鼠、猴子、羊、兔子、骆驼、无峰驼、牛以及鸡等在内的所有的物种。作为使用基因重组而制造的抗体,没有特别的限定,可以举出通过改变天然型抗体的基因而得到的人类化抗体以及灵长类化抗体等的嵌合抗体、合成抗体、重组抗体、突变抗体以及接枝键合抗体(例如与其它蛋白质及放射性标志等结合或融合后的抗体)。对于已经使用基因重组技术而制造的抗体而言,也包括如上所述那样与改变天然型抗体的基因的情况相同地实施了同样的改变的抗体。另外,作为抗体的功能性片段,可以举出例如 F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv(variable fragment of antibody)、sFv、dsFv(disulphide stabilized Fv)以及 dAb(single domain antibody)等。

[0065] 进而,本发明中结合性片段的概念中也包括,在维持针对目标多肽的反应性的范围内经过了突变的抗体片段和结合性片段。上述的突变可使用本领域技术人员适宜选择的基因改变技术等公知的技术进行。

[0066] 用可引起足能被检测到的信号的报告分子(reporter molecular)来标记第二抗体且将该第二抗体与上述抗体形成复合体,便能进行上述抗体的检测。或者,上述抗体可以预先用报告分子标记。报告分子例如为酶、含有发荧光团的分子、或含有放射性核种的分子。作为这样的报告分子,有各种各样公知的物质,适宜选择即可。

[0067] 报告分子使用酶时,酶可以使用例如过氧化酶、β-半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶或乙酰胆碱酯酶等。这些酶与抗体的结合可通过使用马来酰亚胺化合物等交联剂的公知方法进行。作为底物,可以根据所使用的酶的种类使用公知的物质。例如,酶使用过氧化酶时,可以使用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺等。另外,酶使用碱性磷酸酶时,可以使用对硝基酚等。作为放射性核种,可以使用¹²⁵I 或³H 等。作为荧光色素,可以使用异硫氰酸荧光素(FITC)或四甲基若丹明异硫氰酸盐(TRITC)等。

[0068] 可以使用利用将第二抗体固相化而得的金胶体的凝聚效应进行检测的免疫层析法等简便的测定体系。

[0069] 另外,在使用肽探针的方法中,可以使用例如上述报告分子所标识的肽探针。

[0070] 由此,在前列腺癌标记肽的量的测定中,可以使用包含发色或荧光测定的发光测定法、或放射测定法等。

[0071] 质量分析法使用公知的质量分析装置进行即可。由于使用质量分析装置的质量分析法的灵敏度及精度优良,因此可以进行准确的判断。进而,通过使用能够多种成分同时分析的多通道型质量分析装置,可以一次性测定 2 种以上的前列腺癌标记肽的量。进而,也可

以同时测定与前列腺癌以外的其它疾病相关的生物标记,可以尝试一次性测定各种疾病。另外,为了进行更精确的检测,优选使用联用(tandem)型质量分析装置(MS/MS)。作为本发明的检测方法中使用的质量分析装置,只要可以定量则没有特别的限定,可以使用四极杆质量分析装置及飞行时间质量分析装置等现有公知的质量分析装置。

[0072] 测定前列腺癌标记肽的量的方法优选质量分析法或发光测定法。

[0073] 在前列腺癌标记肽量的测定中使用的试料,优选在测定前列腺癌标记肽的量之前进行2次以上的反相萃取,并进行浓缩制成包含NPY的组分,对该组分进行NPY量的测定。由此,可以有效地除去大的蛋白质(例如,>20kDa),提高NPY量的测定精度。作为包含NPY的组分而回收的组分只要包含NPY,则并不限定其分子量的范围,回收包含例如分子量小于20kDa的肽的组分即可。另外,在也测定NPY以外的前列腺癌标记肽量的情况下,可以根据其分子量来确定回收的组分。反相萃取优选使用例如后述的实施例中记载的QUEST-MS技术。

[0074] 另外,使用质量分析法进行测定时,使用于前列腺癌标记肽量的测定中的试料优选在从生物体采集之后且测定前列腺癌标记肽量之前进行改性处理。作为改性处理,可以举出例如添加离液序列高的盐(chaotropic salt)、酸改性、加热处理以及添加表面活性剂等处理。作为改性剂,可以举出例如尿素以及胍基乙酸等。接着,优选进行还原及烷基化。还原及烷基化使用公知的方法即可。通过上述改性、还原及烷基化的处理,肽中的半胱氨酸的二硫键被切断和封端。因此,在质量分析前进行的消化处理中,可以基于胰凝乳蛋白酶等消化酶进行充分消化。

[0075] 予以说明,在测定多种前列腺癌标记肽的量时,根据其种类的不同,测定方法可以不同也可以相同。

[0076] 测定前列腺癌标记RNA量的方法只要能够将前列腺癌标记RNA的存在量定量或者半定量,则没有特别的限定,可以采用使用例如PCR法等核酸扩增法将RNA扩增的方法等。作为使用核酸扩增法的方法,可以举出例如逆转录PCR法、实时(Real time)PCR以及定量RT-PCR等。作为直接检测RNA的方法,可以举出RNA印迹杂交法等。予以说明,在测定前列腺癌标记RNA的量时,可以将生物体试料中含有的RNA作为模板来制备cDNA。

[0077] 人的TMPRSS2:ERG以及PCA3的碱基序列可通过NCBI等公共数据库得到。例如,数据库NCBI中,人的TMPRSS2的注册序号为NM_005656,人的ERG的注册序号为NM_004449,人的PCA3的注册序号为NR_015342。另外,TMPRSS2:ERG的TMPRSS2与ERG的融合方式的例子记载于例如文献:Jianghua Wang, Yi Cai, Chengxi Ren, and Michael Ittmann, Cancer Res 2006 ;66 :8347-8351. 中。根据这些信息,本领域技术人员可以容易地设计用于使TMPRSS2:ERG的mRNA或PCA3RNA扩增的适合的引物。另外,根据上述信息,本领域技术人员可以容易地设计用于通过RNA印迹杂交法等检测TMPRSS2:ERG的mRNA或PCA3RNA的适合的核酸探针。

[0078] 予以说明,在测定多种前列腺癌标记RNA的量时,根据其种类不同,测定的方法可以不同,也可以相同。

[0079] (2. 前列腺癌的检测方法)

[0080] 本发明的前列腺癌的检测方法包含检测来自从生物体采集的血液或尿液的试料中的、NPY量及PSA量的工序。

[0081] 举出本发明的检测方法的一例：测定来自受检对象的生物体试料中的 NPY 量及 PSA 量，再测定来自对照受检对象（健康人）的生物体试料中的该 NPY 量及 PSA 的量，将这两者进行比较即可检测前列腺癌。具体而言，例如使用测定的 NPY 量及 PSA 量，分别计算受检对象及对照受检对象的逻辑回归值。计算方法使用例如文献：Pepe, M. S., Cai, T., and Longton, G. (2006), *Biometrics* 62, 221-229. 中记载的方法即可。发现两者的逻辑回归值存在显著性差异时，就判断该受检对象患有前列腺癌或者患有前列腺癌的可能性高。来自对照受检对象的试料中的 NPY 量及 / 或 PSA 量可使用预先测定的值。或者，也可预先测定来自对照受检对象的生物体试料中的 NPY 量以及 PSA 量，计算逻辑回归值，根据该值确定逻辑回归值的正常值范围，当来自受检对象的生物体试料的逻辑回归值不在上述正常值范围内时，判断为患有前列腺癌。

[0082] 另外，通过在对照受检对象中加入与健康人不同的 BPH 患者，能够以更高的精度判断是否患有前列腺癌。本发明的前列腺癌的检测方法特别是能够以更高的精度将容易呈伪阳性的 BPH 与前列腺癌相区别。

[0083] 在对受检对象的逻辑回归值和对照受检对象的逻辑回归值进行比较时，其显著性差异可以通过例如 t 检验、F 检验、卡方检验或 Mann-Whitney's U test 等统计学方法来判断。

[0084] 测定 NPY 的量以及 PSA 的量的方法，只要能够将它们的存在量定量或半定量地确定，则没有特别的限定，使用例如上述（1. 用于评价前列腺癌进度的分析方法以及前列腺癌进度的评价方法）的栏中记载的方法即可。

[0085] 本发明的前列腺癌的检测方法可以通过 NPY 有效地对 PSA 的低特异性予以弥补（也可参照后述的实施例）。此时，不会使 PSA 的灵敏度过度降低。即，灵敏度及特异性均良好，可以准确地检测前列腺癌。特别是特异性的提高可以减少过度诊断以及不需要的活组织检查，进而缓解男性的身体及精神的压力。

[0086] （3. 检查试剂盒）

[0087] 本发明的检查试剂盒的一实施方式为用于评价前列腺癌进度的检查试剂盒，包含用于测定来自从生物体采集的血液或尿液的试料中的 NPY 量的肽探针。本发明的检查试剂盒优选包含以下至少一方：用于测定来自从生物体采集的血液或尿液的试料中的 PSA 量的抗体或肽探针、用于测定 TMPRSS2:ERG 的 mRNA 量的核酸探针或核酸引物、以及用于测定 PCA3RNA 量的核酸探针或核酸引物。

[0088] 本发明的检查试剂盒的又一实施方式是用于评价前列腺癌进度的检查试剂盒，包含用于测定来自从生物体采集的血液或尿液的试料中的神经肽 Y 量的抗体，还包含以下至少一方：用于测定来自从生物体采集的血液或尿液的试料中的前列腺特异抗原量的抗体或肽探针、用于测定 TMPRSS2:ERG 的 mRNA 量的核酸探针或核酸引物、以及用于测定 PCA3RNA 量的核酸探针或核酸引物。

[0089] 肽探针是指与 NPY 或 PSA 特异性结合的肽性探针。具体而言，可以举出例如与 NPY 或 PSA 特异性结合的肽序列。试剂盒中所包含的肽探针除了包含天然氨基酸以外，还可包含非天然型氨基酸。

[0090] 核酸探针是指与 TMPRSS2:ERG 的 mRNA 或 PCA3RNA 特异性结合的核酸探针，更具体而言可以举出 TaqMan 探针以及 Invader 探针等。核酸引物是指能够将 TMPRSS2:ERG 的

mRNA 或 PCA3RNA 或将它们逆转录之后的 cDNA 特异性地扩增的核酸引物,更具体而言,可以举出在核酸扩增法中使用的引物。

[0091] 本领域技术人员可以根据从上述公共数据库得到的氨基酸序列或碱基序列的信息容易地设计抗体、肽探针、核酸探针以及核酸引物。

[0092] 用于评价前列腺癌进度的检查试剂盒还可根据需要进行以下至少一方:在免疫学上用于检测抗体或肽探针的各种试剂(第二抗体、报告分子以及缓冲剂等)及器具(检测板以及移液管等)、用于检测核酸探针的各种试剂(缓冲剂等)及器具(检测板以及移液管等)、核酸扩增法中使用的各种试剂(多聚酶、各 dNTP 及缓冲剂等)及器具(试管以及移液管等)、检查试剂盒的使用说明书、测定时使用的对照用的试料、解析测定结果时使用的对照用的数据等。予以说明,用于评价前列腺癌进度的检查试剂盒的使用说明书中记录了上述(1. 用于评价前列腺癌进度的分析方法以及前列腺癌进度的评价方法)的栏中说明的本发明的分析方法和/或评价方法的内容。

[0093] 本发明的检查试剂盒的又一实施方式是一种用于检测前列腺癌的检查试剂盒,包含用于测定来自生物体采集的血液或尿液的试料中的神经肽 Y 量的抗体或肽探针、以及用于测定前列腺特异抗原量的抗体或肽探针。

[0094] 用于检测前列腺癌的检查试剂盒还可根据需要进行以下至少一方:在免疫学上用于检测抗体或肽探针的各种试剂(第二抗体、报告分子及缓冲剂等)及器具(检测板及移液管等)、检查试剂盒的使用说明书、测定时使用的对照用的试料、解析测定结果时使用的对照用的数据等。予以说明,用于检测前列腺癌的检查试剂盒的使用说明书中记录有上述(2. 前列腺癌的检测方法)的栏中说明的本发明的检测方法的内容。

[0095] 虽然没有特别限定,但是用于评价前列腺癌进度的检测试剂盒以及用于检测前列腺癌的检查试剂盒优选为例如利用 ELISA 法或免疫层析法的检查试剂盒。

[0096] (4. 其它)

[0097] 通过上述(1. 用于评价前列腺癌进度的分析方法以及前列腺癌进度的评价方法)的栏下说明的分析方法或评价方法、或在上述(2. 前列腺癌的检测方法)的栏下说明的检测方法而得到的结果可用作医生诊断时的一种诊断材料。另外,通过进行上述(1. 用于评价前列腺癌进度的分析方法以及前列腺癌进度的评价方法)的栏下说明的分析方法或评价方法、或上述(2. 前列腺癌的检测方法)的栏下说明的检测方法,对于出现可能患了前列腺癌的结果的受检对象,可以根据需要结合医生的诊断结果进行治疗。在此,作为治疗的一例,可以举出由医生、或者有些情况下是医生以外的专家进行的化学疗法、放射治疗以及外科手术等。特别是本发明的分析方法及评价方法可以评价前列腺癌进度,因此可以根据进度迅速确定适合的治疗方法。

[0098] 更具体而言,例如根据经本发明的方法所得到的结果,医生判断为“前列腺癌进度高”时,可以在考虑其它检查方法(直肠诊断检查、超声波检查、MRI 检查等)的结果、受检对象的年龄以及家族史等的基础上进行前列腺活组织检查。通常,根据前列腺活组织检查的结果就可以确诊有无患前列腺癌,并确立治疗方针。对于医生判断“前列腺癌进度高”而言,可以预先设置规定的基准值,受检对象的测定值在该基准值以上时,判断为“前列腺癌进度高”。

[0099] 另一方面,通过经本发明的方法所得到的结果,医生判断为“未患前列腺癌”或者

“前列腺癌进度低”时,之后可以定期进行 NPY 以及 PSA 等前列腺癌标记的测定,观察经过。予以说明,前列腺癌进度的评价并不限于“高”“低”这 2 个级别,可以设定更多的级别。

[0100] 如后述的实施例所示,纤维连接蛋白 (fibronectin) 以及电子转移黄素蛋白质 - 辅酶脱氢酶也被鉴定为前列腺癌的候补生物标记。因此,纤维连接蛋白以及电子转移黄素蛋白质 - 辅酶脱氢酶均可通过与 NPY 和 / 或 PSA 组合使用,进行前列腺癌进度评价以及前列腺癌的检测。评价方法和检测方法与上述同样即可。

[0101] (5. 总结)

[0102] 由此,本发明的用于评价前列腺癌进度的分析方法包含测定来自从生物体采集的血液或尿液的试料中的神经肽 Y 量的工序。

[0103] 本发明的用于评价前列腺癌进度的分析方法优选还包含测定来自从生物体采集的血液或尿液的试料中的、前列腺特异抗原、TMPRSS2:ERG 的 mRNA 以及 PCA3RNA 中至少一方的量的工序。

[0104] 本发明的用于评价前列腺癌进度的分析方法优选还包含测定来自从生物体采集的血液或尿液的试料中的前列腺特异抗原量的工序。

[0105] 本发明的用于评价前列腺癌进度的分析方法中,有时通过质量分析法或发光测定法来测定神经肽 Y 的量。

[0106] 本发明的用于评价前列腺癌进度的分析方法中,所述试料优选为全血、血清或血浆。

[0107] 本发明的用于评价前列腺癌进度的分析方法中,有时在测定上述神经肽 Y 量的工序中,将上述试料反相萃取 2 次以上,取得包含神经肽 Y 的组分,对得到的组分测定神经肽 Y 的量。

[0108] 本发明的前列腺癌的检测方法包含测定来自从生物体采集的血液或尿液的试料中的、神经肽 Y 量以及前列腺特异抗原量的工序。

[0109] 本发明的前列腺癌进度的评价方法包含测定来自从生物体采集的血液或尿液的试料中的神经肽 Y 量的工序。

[0110] 本发明的检查试剂盒的一实施方式是用于评价前列腺癌进度的检查试剂盒,包含用于测定来自从生物体采集的血液或尿素的试料中的神经肽 Y 量的肽探针。

[0111] 本发明的检查试剂盒的又一实施方式优选还包含以下至少一方:用于测定试料中的前列腺特异抗原的量的抗体或肽探针、用于测定试料中的 TMPRSS2:ERG 的 mRNA 量的核酸探针或核酸引物、以及用于测定试料中的 PCA3RNA 量的核酸探针或核酸引物;所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。

[0112] 本发明的检查试剂盒的又一实施方式为用于评价前列腺癌进度的检查试剂盒,包含用于测定试料中的神经肽 Y 量的抗体,还包含以下至少一方:用于测定试料中的前列腺特异抗原的量的抗体或肽探针、用于测定试料中的 TMPRSS2:ERG 的 mRNA 量的核酸探针或核酸引物、以及用于测定试料中的 PCA3RNA 量的核酸探针或核酸引物;所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。

[0113] 本发明的检查试剂盒的又一实施方式是用于测定前列腺癌的检查试剂盒,包含用于测定试料中的神经肽 Y 的量的抗体或肽探针、以及用于测定试料中的前列腺特异抗原的量的抗体或肽探针,所述试料来自从生物体采集的血液或尿液。

[0114] 以下示出实施例对本发明的实施方式进行详细的说明。当然,本发明并不限于以下的实施例,细微部分可以进行各种各样的变更。进而,本发明并不限于上述的实施方式,在权利要求所示的范围内可以进行各种变更,将各公开的技术手段适当组合而得到的实施方式也包含在本发明的技术范围内。另外,本说明书中记载的文献也可以全部作为参考而援引在此。

[0115] 实施例

[0116] (实验顺序)

[0117] (试剂)

[0118] 三(2-羧基乙基)膦(TCEP)、碘乙酰胺以及碳酸氢铵从Sigma-Aldrich公司购入。尿素从GE Healthcare公司购入。Trypsin Gold从Promega公司购入。三氟乙酸(TFA)从株式会社岛津制作所购入。

[0119] (血浆样品)

[0120] 在高知大学医学部附属医院采集了用于筛查生物标记的EDTA-血浆样品(n = 116、表1)。予以说明,采血部位为腕静脉。

[0121] (表1)

[0122]

组	n	平均年龄	性别
健康对照者	24	69.1	男性
BPH*	19	68.9	男性
PCa** (GS*** 5-6)	20	65.3	男性
PCa** (GS*** 7)	28	69.7	男性
PCa** (GS*** 8-10)	25	68.1	男性
总计	116	68.2	男性

[0123] * 良性前列腺肥大症 ** 前列腺癌 *** 格里森评分(Gleason score)

[0124] 在确认生物标记的实验中,在癌研究会有明医院(JFCR)癌筛查服务中心采集了26名健康人的血浆样品作为对照。另外,确认实验中,在高知大学医学部附属医院、京都大学医学部附属医院以及岩手医科大学附属医院采集了来自19名良性前列腺肥大症(BPH)患者的血浆样品以及来自65名前列腺癌患者的血浆样品(表2)。予以说明,采血部位为腕静脉。

[0125] (表2)

[0126]

组	n	平均年龄	性别
健康对照者	26	69.1	男性
BPH*	19	68.9	男性
PCa** (GS*** 5-6)	17	65.9	男性
PCa** (GS*** 7)	30	64.2	男性
PCa** (GS*** 8-10)	18	66.1	男性
总计	110	64.0	男性

[0127] * 良性前列腺肥大症 ** 前列腺癌 *** 格里森评分 (Gleason score)

[0128] 向上述所有患者完整地说明了实验顺序,并让他们签署了同意书。以下的实验得到了各设施内伦理委员会的认可。包括理化学研究所伦理委员会、高知大学医学部、JFCR、京都大学、以及岩手医科大学的设施内审查委员会。

[0129] (QUEST-MS 纯化)

[0130] 在 96 孔的聚丙烯制板上,将 20 μ L 的血浆样品与 80 μ L 的含有 10M 尿素的 50mM 碳酸氢铵混合。接着,将样品使用 5mM TCEP 在 37°C 还原 15 分钟,并使用 25mM 碘乙酰胺在室温下烷基化 15 分钟。再将样品用 50mM 碳酸氢铵稀释 4 倍,并放置于平衡后的 Oasis HLB 96-孔超微淋洗板 (μ Elution Plate) (每孔 2mg 吸附剂、30 μ m 粒径、Waters 公司制) 上。予以说明,在固相萃取板上进行的全部操作是使用特别订制的 96 孔自动注射器进行的。

[0131] 用 500 μ L 的 70% 乙腈预先使 Oasis 板湿润,接着,用 500 μ L 的含有 0.1% TFA 的 2% 乙腈,以 250 μ L/分 的速度平衡。以 100 μ L/分 的速度载入样品后,使用 500 μ L 的含有 0.1% TFA 的 2% 乙腈,以 250 μ L/分 的速度将板清洗 2 次。使用 100 μ L 的 40% 乙腈,以 100 μ L/分 的速度使蛋白质洗脱,接着,在第 2 次对 Oasis 板进行纯化之前,用 0.1% TFA 稀释 5 倍。对稀释后的样品以与上述第一次纯化相同的条件进行了处理。

[0132] 将洗脱液使用真空离心脱水装置进行冷冻干燥,使用 8ng/ μ L 的含有 Trypsin Gold (Promega 公司制) 的 50mM 碳酸氢铵在 37°C 下消化 6 小时。添加 50 μ L 的含有 1.2% TFA 的 4% 乙腈,以使消化反应停止。

[0133] (LC/MS/MS 分析)

[0134] 上述 QUEST-MS 纯化后,使用在 Ultimate 3000nano-flow HPLC (Thermo Fisher Scientific 公司制) 上配备的质量分析装置 (LTQ-Orbitrap-Velosmass spectrometer, Thermo Fisher Scientific 公司制) 对 1 μ L 样品进行分析。使用 0.1% 甲酸作为溶剂 A,使用含有 0.1% 甲酸的乙腈作为溶剂 B,用 C18Chip-column (75 μ m \times 200mm, 日京 TECHNOS 株式会社公司制) 分离肽。此时的流速为 250nL/分,溶剂 B 的梯度为 2 ~ 30% 下 95 分钟,30 ~ 95% 下 15 分钟。将洗脱得到的肽在 2000V 的喷雾电压下离子化,用数据依赖型片断法 (fragment method) 得到 MS 数据。测定扫描 (survey scan) 是在 m/z 400 ~ 1600、分辨率 60,000、AGC 目标值 1.0×10^6 离子数 (ion count) 的条件下进行的。将各测定扫描中强度处于前 20 位的前体离子,提供给具有线性离子阱且 AGC 目标值为 5000 离子数的普通 CID 扫描模式下的低分辨率 MS/MS 来取得数据。

[0135] (Expressionist RefinerMS 的无标签 (label free) 定量)

[0136] 将来自 LTQ Orbitrap-Velos 质量分析装置的原始数据输入 Expressionist

RefinerMS module(Genedata AG 公司制)。Expressionist RefinerMS module 的后续数据处理以及无标记定量分析均通过自公司的服务器系统进行。RefinerMS 软件的整个工作流程如图 1 所示。对 2D MS 色谱面 ($x = m/z$, $y = RT$) 上的 10 个数据点中的每个点设定 Spectrum Grid,接着,以 RT Window = 500scans 以及 Quantile = 80 的条件,进行第 1 次的 Chemical Noise Subtraction。在第 2 次的 Chemical Noise Subtraction 中,对每 3 个 RT 扫描,通过 Moving average estimator 对色谱图进行平滑化,除去强度小于 1000 的信号。在第 3 次以及第 4 次的 Chemical Noise Subtraction 中分别以 minimum RT length = 8scans 的 RT Structure Removal、以及 minimum m/z length = 4points 的 m/z Structure Removal 的条件,处理了数据。对降噪后数据的每 10 个扫描设定 Chromatogram Grid,并使用下述的参数进行 Chromatogram RT Alignment: m/z Window = 10points、RT Window = 10scans、Gap Penalty = 1、RT Search Interval = 2minutes、Alignment Scheme = pairwise alignment based tree。接着,使用下述的参数,通过 Summed Peak Detection Activity 来检测暂时得以平均化的色谱中的峰:Summation Window = 2minutes、Overlap = 50、Minimum Peak Size = 10scans、Maximum Merge Distance = 4data points、Gap/Peak Ratio = 10、Method = curvature-based peak detection、Peak Refinement Threshold = 5、Consistency Filter Threshold = 0.6。最后,通过 Summed Isotope Clustering Activity,将源自同一分子的同位素峰分组,划归出同位素群集。此时的参数如下:Minimum Charge = 1、Maximum Charge = 8、Maximum Missing Peaks = 0、First Allowed Gap Position = 3、Ionization = protonation、RT Tolerance = 0.1minute、 m/z Tolerance = 0.05Da、Minimum Cluster Size Ratio = 0.5。

[0137] (Expressionist Analyst 的生物标记的提取)

[0138] 为了使新的生物标记群的特异性最大化,通过 Absent/Present Search 算法来筛选所检测到的未重复的 153,057 个肽。Absent/Present Search 算法用以提取在 2 个组(“健康对照者 +BPH”对“前列腺癌”)之间表现出“全”或“无”的特征的肽。选择了在 43 名对照者的至多 1 人中被检测到且在 73 名前列腺癌患者的至少 11 人中被检测到的肽,并将该肽提供给进一步的确认实验。

[0139] (蛋白质的鉴定)

[0140] 使用 Proteome Discoverer 1.3software(Thermo Fischer Scientific 公司制)进行 SEQUEST 数据库搜索。将 MS/MS 数据,对照人类蛋白质数据库 SwissProt2012_09(20,235sequences) 进行检索。检索参数如下:Enzyme Name = Trypsin、Precursor Mass Tolerance = 3ppm、Fragment Mass Tolerance = 0.8Da、Dynamic Modification = Oxidation(M)、Static Modification = Carbamidomethyl(C)。SEQUEST Decoy Database Search 接受了 FDR(false discovery rate) 小于 1% 的肽鉴定。Raw data 公开于 PRIDE 数据库 (<http://www.ebi.ac.uk/pride/>) 中。

[0141] (关于 NPY 的 MRM(多反应监测,multiple reaction monitoring))

[0142] 除了添加最终浓度为 $1\text{fmol}/\mu\text{L}$ 的 BSA 胰凝乳蛋白酶消化物作为内部对照之外,以上述方式将血浆样品提供于 QUEST-MS 法,接着,使用 Agilent 1200nano-flow HPLC system(Agilent Technologies 公司制)附带的 4000QTRAP mass spectrometer(AB Sciex 公司制)进行分析。使用 0.1% 甲酸作为溶剂 A,使用含有 0.1% 甲酸的乙腈作为溶剂 B,

用 C18Chip-column (75 $\mu\text{m} \times 200\text{mm}$, 日京 TECHNOS 株式会社制) 分离肽。流速为 250nL/分, 溶剂 B 的梯度为在 2 ~ 30% 下 10 分钟、在 30 ~ 95% 下 5 分钟的这 2 个阶段的直线梯度。将对 NPY 及 BSA (KYA technologies 公司制) 具有特异性的 MRM 离子对, 通过 Analyst 1.5 software (AB Sciex 公司制) 的 MRM 模式同时进行监测。装置的设定如下: Ionization spray voltage = 2200V、Curtain gas (N_2) = 12psi、CAD = 4、Declustering potential = 70V、Entrance potential = 10V、Q1 resolution = HIGH、Q3 resolution = LOW、Pause in between = 2msec。将得到的 MRM 色谱使用 MultiQuant 2.02 software (AB Sciex 公司制) 进行解析。使各离子对的质谱在 1pt window 下平滑化, 对峰面积进行定量。在对 12 个 NPY 的离子对的碰撞能量进行了优化后, 单以与 NPY₈₁₋₈₈ 肽相对应的 Q1/Q3 = 466.23/272.20, 进行实质上的定量。这是由于该离子对可显示最高的灵敏度的缘故。进而, 使用以同样方式测定的 BSA 肽, 将 NPY₈₁₋₈₈ 的峰面积以如下所述的方式标准化: Normalized NPY = Area (NPY₈₁₋₈₈, Q1/Q3 = 466.2/272.2) / Area (BSA₆₆₋₇₅, Q1/Q3 = 582.3/951.5) $\times 10000$ 。

[0143] (银染色及图像解析)

[0144] 为了评价 QUEST-MS 纯化的效果, 用 16% Tris-tricine SDS-PAGE 凝胶 (Life Technologies 公司制) 分离了纯化的样品的 1/5。使用 SilverQuest Silver Staining kit (Life Technologies 公司制), 根据使用说明书对凝胶进行染色。将染色后的凝胶使用 GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad Laboratories 公司制) 进行扫描, 再通过 Image J software 进行解析。

[0145] (免疫组织的化学染色)

[0146] 使用 Ventana automated immunohistochemical systems (Ventana Medical Systems 公司制) 进行免疫组织的化学实验。使用从 8 名前列腺癌患者采集的外科受检对象或活体受检对象的 slice 切片 (用福尔马林固定并埋入石蜡)。8 名前列腺癌患者中包括具有前列腺上皮内肿瘤 (PIN) 病变的 3 名患者。将 slice 切片与以 1:400 稀释后的多克隆抗 NPY 抗体 (Abcam 公司制) 溶液共同培养 16 分钟。自动化的实验报告 (protocol) 基于了间接式生物素-抗生物素蛋白体系, 该间接式生物素-抗生物素蛋白体系中使用了被标记有生物素的第二抗体、及经苏木精对比染色后的二氨基联苯胺底物。通过使用兔子非免疫血清作为第一抗体进行负染色来确认结合的特异性。

[0147] (结果)

[0148] (基于 QUEST-MS 技术的低分子量多肽的浓缩)

[0149] 为了利用正确的生物标记的筛查以及血液中的小靶多肽来进行均匀的临床应用, 需要显示高灵敏度、高再现性、高处理量、低成本以及操作容易性的预分析性纯化方法。为了满足这些基准, 本申请发明者们确立了关于血浆中小于 20kDa 的蛋白质的简单且有效的浓缩方法 (图 2 的 (a)), 并起名为 quick enrichment of small targets for mass spectrometry (QUEST-MS)。QUEST-MS 法包括对粗血浆进行改性、还原、烷基化以及后续的联用 (tandem) 反相萃取 (每 96 个样品仅仅需要 1.5 小时)。

[0150] 干燥后的 QUEST-MS 纯化样品可以直接用于 SDS-PAGE 或 ELISA 等蛋白质检测。该 QUEST-MS 纯化样品可在胰凝乳蛋白酶处理后进行质量分析。

[0151] 为了体现利用 Oasis HLB plate 进行 1 ~ 4 次反相萃取后的、低分子量蛋白质的浓缩效果, 可以用 16% Tris-tricine 凝胶将各阶段的粗血浆以及纯化蛋白质分离, 再进行

银染色。将该结果示于图 2 的 (b)。将该凝胶的定量密度分析解析的结果示于图 2 的 (c)。染色后的凝胶的 5 个泳道 (lane) 的定量密度色谱表明了各固相提取步骤中有效地除去了 >20kDa 的蛋白质。特别是通过利用 Oasis HLB plate 进行 2 次反相萃取, 小于 20kDa 的低分子量蛋白质的比例超过 90%。这些小的蛋白质得以良好且容易地分离, 是基于了避免使孔径大于 (8nm) 的巨大的蛋白质流出以及避免中等程度大小的蛋白质 (20 ~ 100kDa) 因相对于 Oasis 聚合物珠上疏水性残基的过度吸收强度而被洗脱的原则。重复反相萃取 3 次以上时, 虽然可以提高低分子量蛋白质的纯化度, 但是从处理能力及成本的优越性的观点出发, 在生物标记的进一步探索以及确认实验中使用纯化了 2 次的样品。

[0152] (针对前列腺癌的低分子量生物标记的筛查)

[0153] 为了避开设施间的采样偏差, 在 1 个医院采集了在生物标记的筛查阶段所分析的 116 个血浆样品 (表 1), 使用严格管理下的标准操作规程。将 20 μ L 各血浆样品在 QUEST-MS 纯化之前冷冻溶解一次。根据 116 个纯化样品的 LC/MS/MS 分析, 检测出 153, 057 个未重复的肽, 如上所述, 在 Expressionist RefinerMS module 中定量。特别是该低分子量蛋白质组的样本中包含 4 种来自 PSA 的肽: $I_{25}VGGWECEK_{33}$ ($m/z = 539.25, z = +2$)、 $H_{34}SQPWQLVASR_{45}$ ($m/z = 469.92, z = +3$)、 $A_{48}VCGGVLVHPQWVLTAAH CIR_{68}$ ($m/z = 782.08, z = +3$)、以及 $L_{126}SEPAELTDAVK_{137}$ ($m/z = 636.84, z = +2$)。这些肽在对照组 (健康对照者 +BPH 患者) 中分别被检测到 4、3、4、5 例。另一方面, 这些肽在前列腺癌患者组中分别被检测到 15、13、10、11 例。根据医院提供的 PSA 检查的值, 估计本申请发明者的方法中针对 PSA 的检测极限值约为 10ng/mL。该结果表明, 根据样品的平均值进行的一般的比较检验 (t 检验以及 ANOVA 等) 并不适合特异性标记的提取。这是由于对照组的低浓度肿瘤标记的有效值理应非常少的缘故。通常, 对照样品的肿瘤标记的理想检测频率接近于 0, 因此对于对照样品可以不运用 t 检验或 ANOVA。

[0154] 接着, 为了使新生物标记群的特异性最大化, 使用 Absent/PresentSearch 算法。其结果是鉴定出了在 43 名对照 (24 人的健康对照者 +19 人的 BPH 患者) 中被检测到 0 或 1 例且在 73 名前列腺癌患者中被检测到至少 11 例的 189 个肽。图 3 的 (a) 中, 153, 057 个的全部肽中, 189 个肽显示了前列腺癌特异性的检测图案, 这些肽在对照组中仅被检测到 0 或 1 例。予以说明, 189 个肽的定量信息用 2 维平面上的黑点或线表示。X 轴表示 110 个人, Y 轴表示 LC/MS/MS 的峰强度。图 3 的 (b) 表示基于检测频率的 189 个候补生物标记肽的分类。例如, 有 62 个肽在 11 个前列腺癌样品中被检测到且在 1 个对照样品 (健康对照或 BPH) 中被检测到。

[0155] 在前列腺癌患者的诊断中, 上述提取的肽与 PSA 相比, 具有同等以上的高灵敏度, 而且伪阳性的比例低, 可以视为生物标记的候补。另一方面, 使用 SEQUEST 数据库搜索解析 ($FDR < 0.01$), 从 116 个筛查样品中鉴定出了 1126 个未重复的血浆蛋白质。将 189 个候补生物标记与蛋白质鉴定数据群进行匹配, 结果成功地鉴定出表 3 所示的 3 个肽。从 mRNA 在大脑神经系统表达以及具前列腺特异性的观点出发, 将神经肽 Y (NPY) 用于了后续的确认真验。

[0156] (表 3)

[0157]

UniProt 注册序号	UniProt ID	蛋白质名	序列*	Absent/Present Search 中的检测频率	
				对照**	PCa***
P01503	NPY_HUMAN	Pro-neuropeptide Y	S ⁸⁸ SPE ¹ TLISD ¹¹ LMR ⁸	0	11
P02751	FN1_HUMAN	Fibronectin Electron transfer fl	Q ¹⁰⁴ Y ¹ NVGPSVSK ¹⁰⁵³	1	11
Q16134	ETFD_HUMAN	avoprotein ubiquinon e oxidoreductase	G ²¹² IATNDVGIQK ²²³	1	11

[0158] * 序列中的数字表示氨基酸序号

[0159] ** 健康对照者或 BPH 患者检查出的例数

[0160] *** 前列腺患者之间检查出的例数

[0161] (前列腺癌组织中的 NPY 表达)

[0162] 图 4 表示关于 NPY 的免疫组织化学染色结果。图 4 的 (a) 及 (b) 表示前列腺癌的 NPY 的代表性免疫染色图案。格里森评分 (Gleason Score) 分别为 3+4(a) 以及 4+5(b)。在前列腺癌组织中观察使用抗 NPY 抗体的免疫反应性,发现在前列腺癌细胞的细胞质中,免疫反应性非常强,但是在非癌的前列腺上皮中免疫反应性弱(图 4 的 (b) 的右侧)。图 4 的 (c) 表示使用抗 NPY 抗体的细胞质的免疫反应性在高级别的前列腺上皮内肿瘤 (PIN) 的前体细胞中也被观察到。这些结果表明了前列腺肿瘤性病变更高的 NPY 表达。

[0163] (基于 NPY 的 MRM 的反复解析)

[0164] 为了评价不同的医院或分析方法的偏差,使用独立的样品组以及其它的质量分析定量法 MRM,进一步进行关于 NPY 的确认实验。在此,作为健康对照,使用来自 JFCR 的样品来代替高知大学医学部附属医院的样品,作为前列腺疾患的样品,使用来自京都大学以及岩手医科大学的样品(表 2)。以来自 NPY 的 4 种不同的肽作为靶,将 110 个 QUEST-MS 纯化后的样品用 4000QTRAP 质量分析装置进行了分析。在进行 MRM 测定之前,首先,从分别与 4 种 NPY 肽对应的 3 个离子对中,找出能够给予最高的 MRM 色谱峰强度的最佳离子对以及冲突能量 (CE)。其结果示于图 5(a) 以及 (b)。得知,对应于 NPY₈₁₋₈₈ 的离子对 Q1/Q3 = 466.2/272.2 在 CE = 17eV 时,为 NPY 灵敏度最高的报告离子对。予以说明,在图 5(a) 中, Q1 或 Q3 的右侧的数字分别表示四极杆 1 或 3 的 m/z 的设定。

[0165] 进而,向各样品中添加 10fmol 的消化 BSA,用作使分析间的偏差标准化的内部对照。接着,通过分析 6 个不同时刻的 3 个血浆样品来评价基于 MRM 的 NPY 测定的量再现性,将其结果示于图 6。图 6 中,误差棒 (error bar) 表示 3 个独立测定的标准偏差。如图 6 所示,变动系数 (CV) 均比 3.5% 小。使用上述优化后的 MRM 条件,将 110 个的个例的血浆中的 NPY 进行定量,将其结果示于图 7(a) 的盒形图。另外,图 7(b) 中表示 ELISA 定量后的 PSA 的浓度。根据这些结果可知,特别是 BPH 患者与格里森评分 (Gleason Score) (GS) 5-6 的前列腺癌患者之间,与 PSA 检查 (p = 0.2746, t 检验) 相比, NPY 显示了更高的诊断特异性 (p = 0.0396, t 检验)。该结果可以证明在生物标记的筛查实验中, NPY 的 Absent/Present Search 分析中能够利用 NPY 来特异性地检测出前列腺癌。

[0166] 予以说明,图 7 中,虚线表示对照组 (N+BPH) 与前列腺癌群的边界。该边界通过后述的图 8 所示的 ROC 曲线解析算出。较大偏离的值在标绘图 (plot) 的上方区域中与其浓

度并记。

[0167] 虽然 NPY 具有高的特异性,但是为了进一步使灵敏度提高,使用逻辑回归法尝试确立基于 NPY 与 PSA 的组合的诊断系统(图 7 的(c))。为了使 ROC 曲线的曲线下面积(AUC)最大,计算逻辑回归值(根据文献:Pepe, M. S., Cai, T., and Longton, G. (2006), *Biometrics* 62,221-229.)。图 8 的(a)~(c)中表示分别使用 110 个血浆样品的 NPY(MRM 色谱的面积)、PSA(通过医院的 ELISA 测定的值)、及 NPY+PSA(逻辑曲线回归值)而作成的 3 个 ROC 曲线的比较。予以说明,图 8 中,“x =”所示的切点表示各标记所呈现的最佳极限值。另外,“Sens”表示灵敏度,“Spec”表示特异性,“PV+”表示阳性准确率,“PV-”表示阴性准确率。

[0168] 45 名对照(25 人健康对照者以及 20 人的 BPH 患者)与 65 名前列腺癌患者的区别中,PSA 的灵敏度以及特异性分别为 87.7% 以及 66.7%。另一方面,NPY 与 PSA 的组合的灵敏度以及特异性分别为 81.5% 以及 82.2%。该结果表明:NPY 可以在不显著性失去 PSA 检查的高灵敏度的情况下,弥补 PSA 检查的特异性低的这一问题。这可以减少过度诊断和不需要的活组织检查,进而缓解男性的身体以及精神压力。

[0169] 另外,NPY 与前列腺癌进度相关性高,通过单独使用 NPY,或者通过 NPY 与 PSA 的组合,可以进一步准确地评价进度。

[0170] 进而,为了实际证明 NPY 在疗效评价中的有效性,分析了从 4 个前列腺癌患者中采集的手术前以及手术后的样品。图 9 表示 3 次 MRM 分析的结果。图 9 中,天数表示经尿道前列腺切除手术(TURP)后的经过时间。误差棒表示 3 次独立测定的标准偏差。如图 9 所示,手术 5~7 日后,3 位患者(患者 2~4)中的血浆 NPY 水平有所减少(* $p < 0.05$, t 检验)。特别是,患者 4 的 NPY 水平在手术的 5 日后,减少至小于 cut off 值(5189.0)。另一方面,患者 1 在手术 1 个月后,NPY 水平仅稍有变化。虽然没有临床证据,但是推测患者 1 的长期居高的 NPY 浓度是已复发或有微小转移病灶的反映。

[0171] (产业上的利用可能性)

[0172] 本发明可用于前列腺癌进度的评价以及前列腺癌的检测。因此,本发明可广泛用于诊断医疗领域以及保健医学领域。

[0173] 本说明书中引用的全部刊行物、专利以及专利申请可直接作为参考而援引于本说明书中。

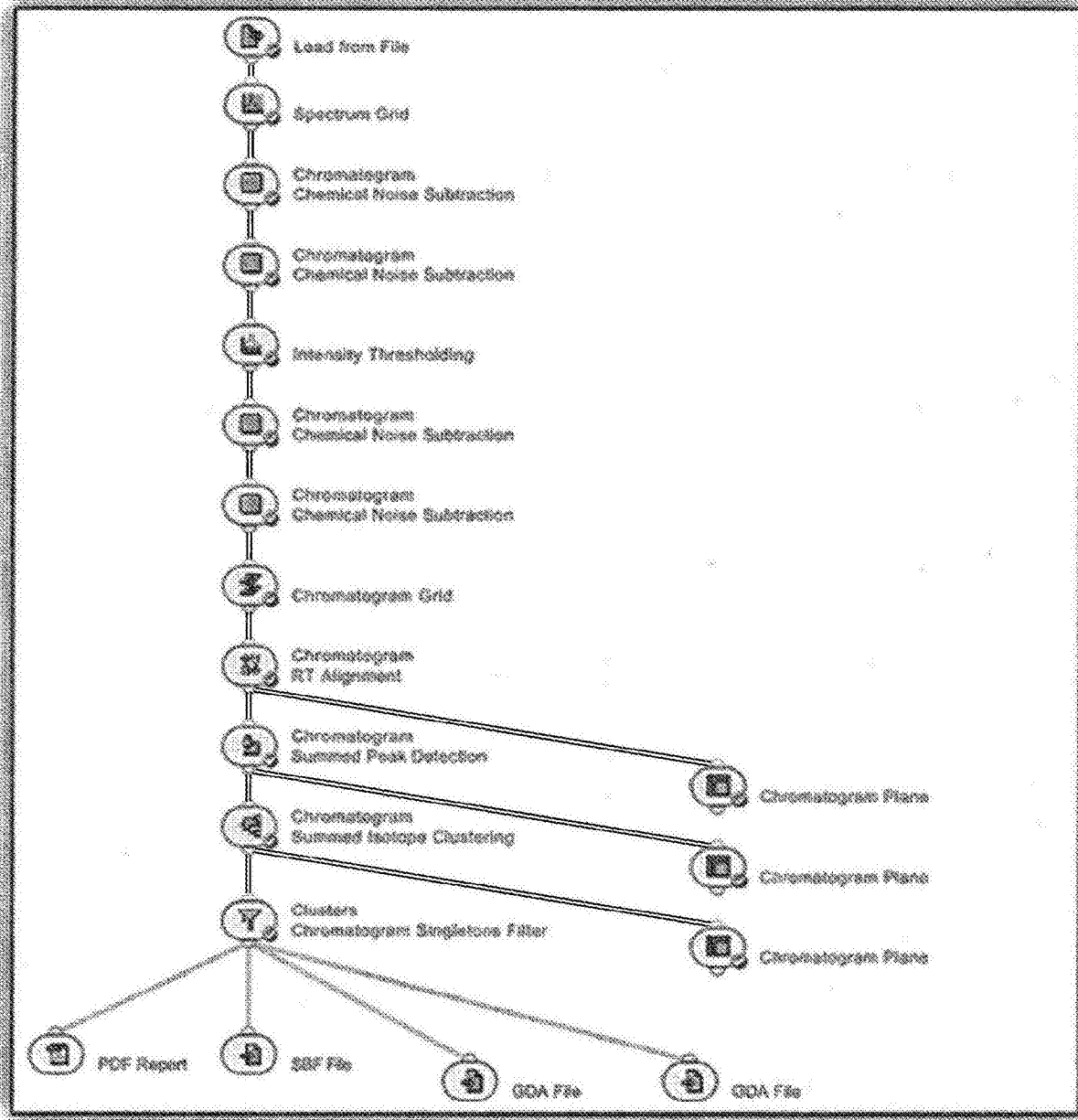


图 1

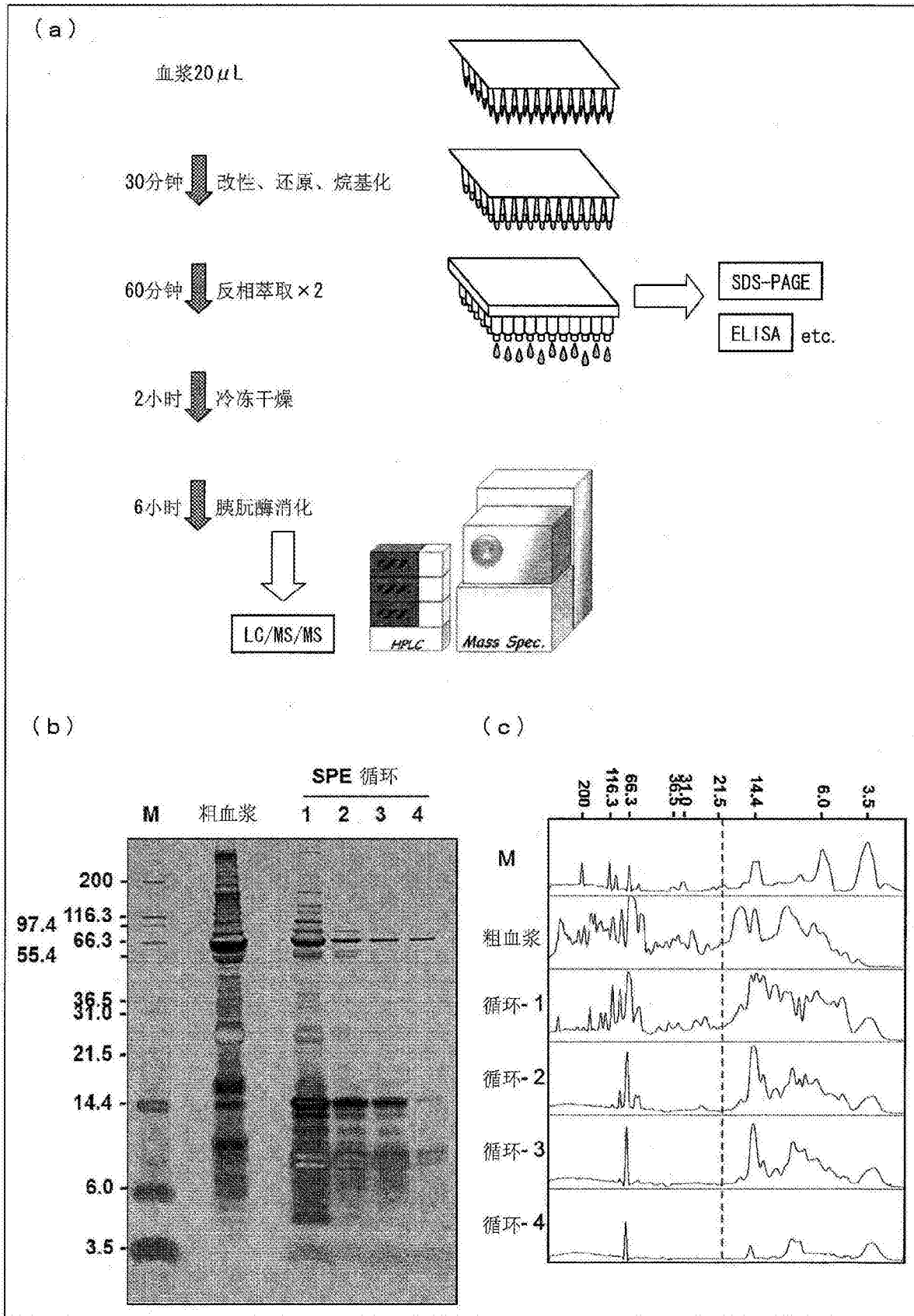


图 2

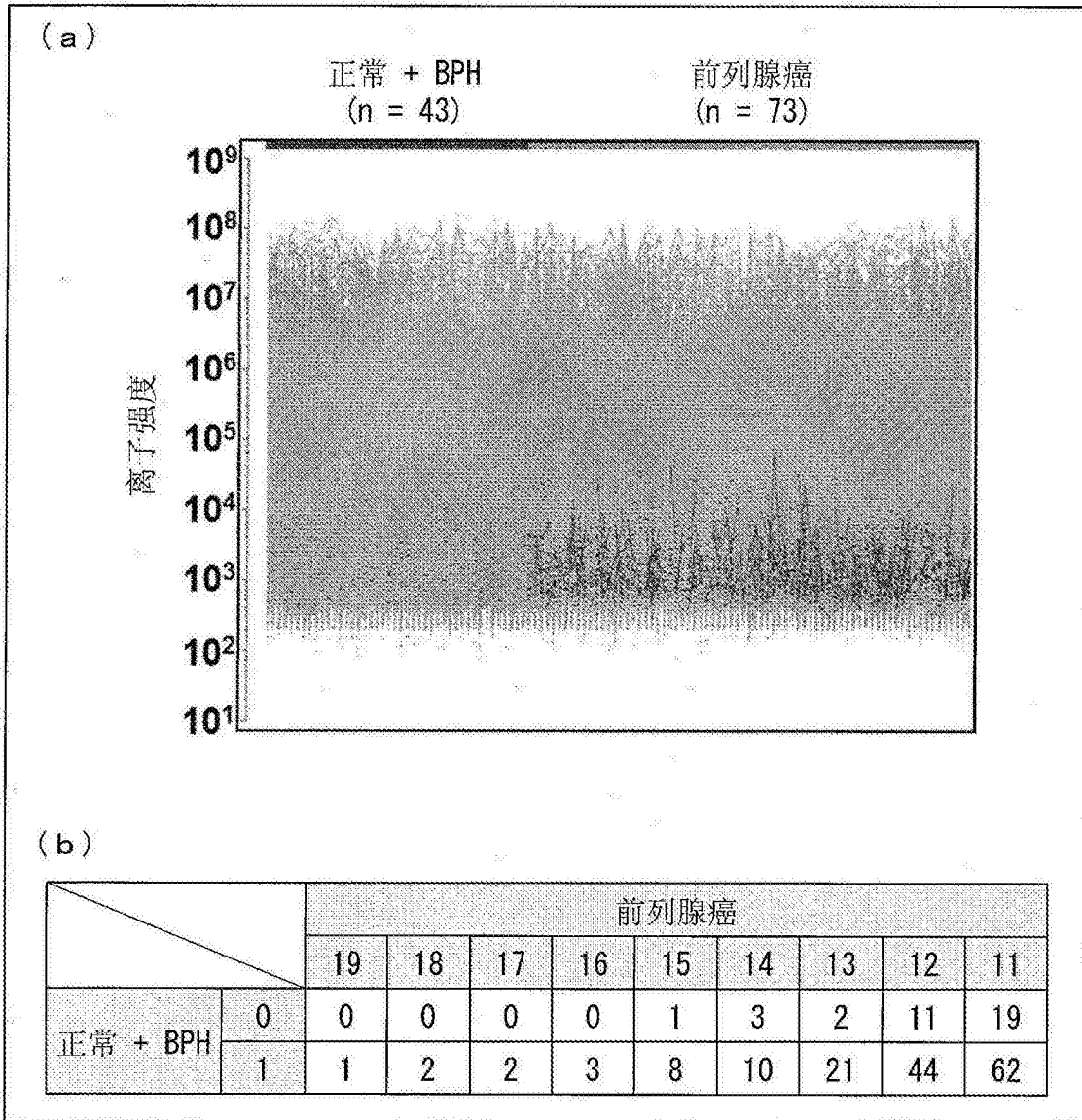


图 3

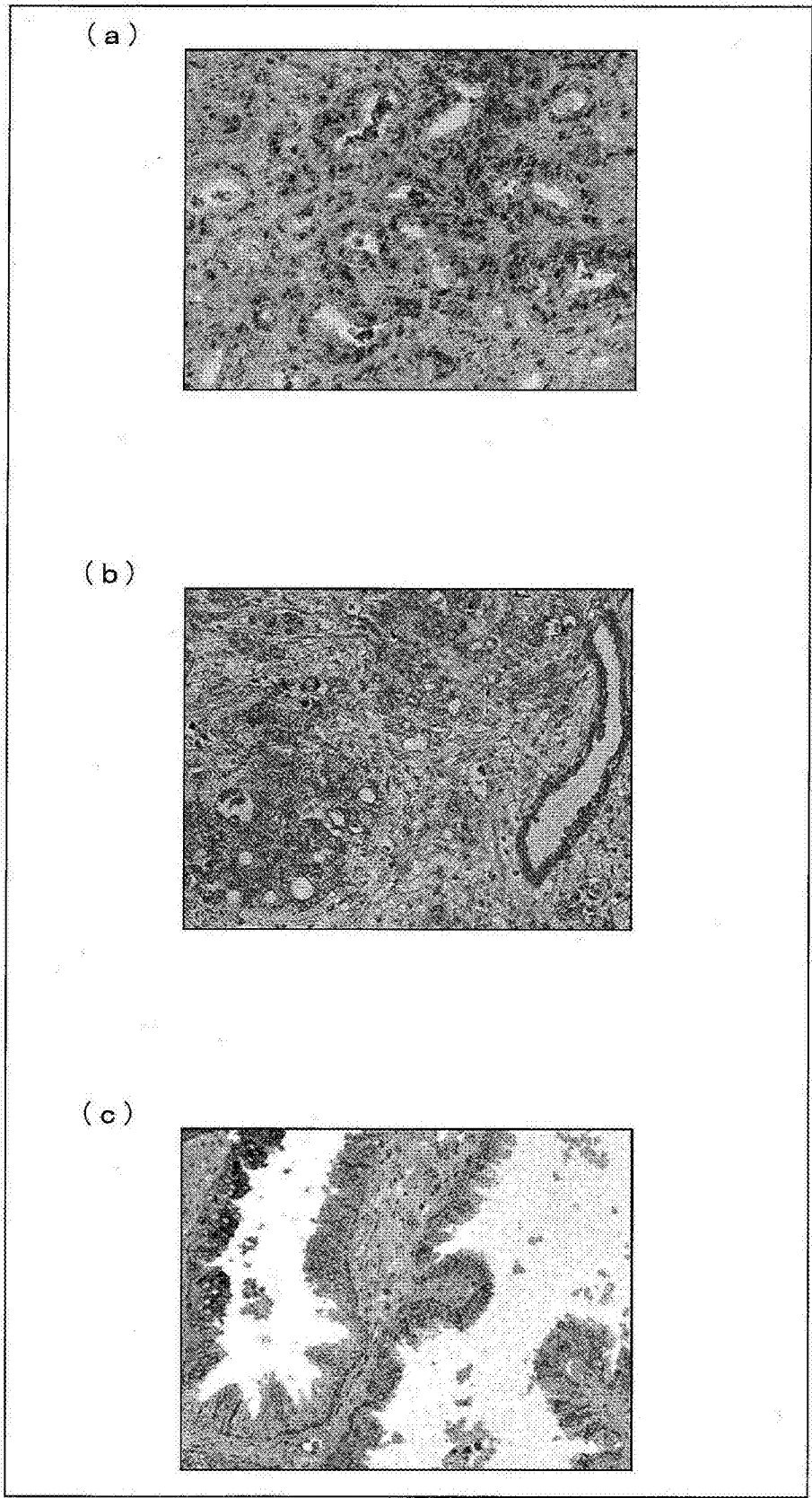


图 4

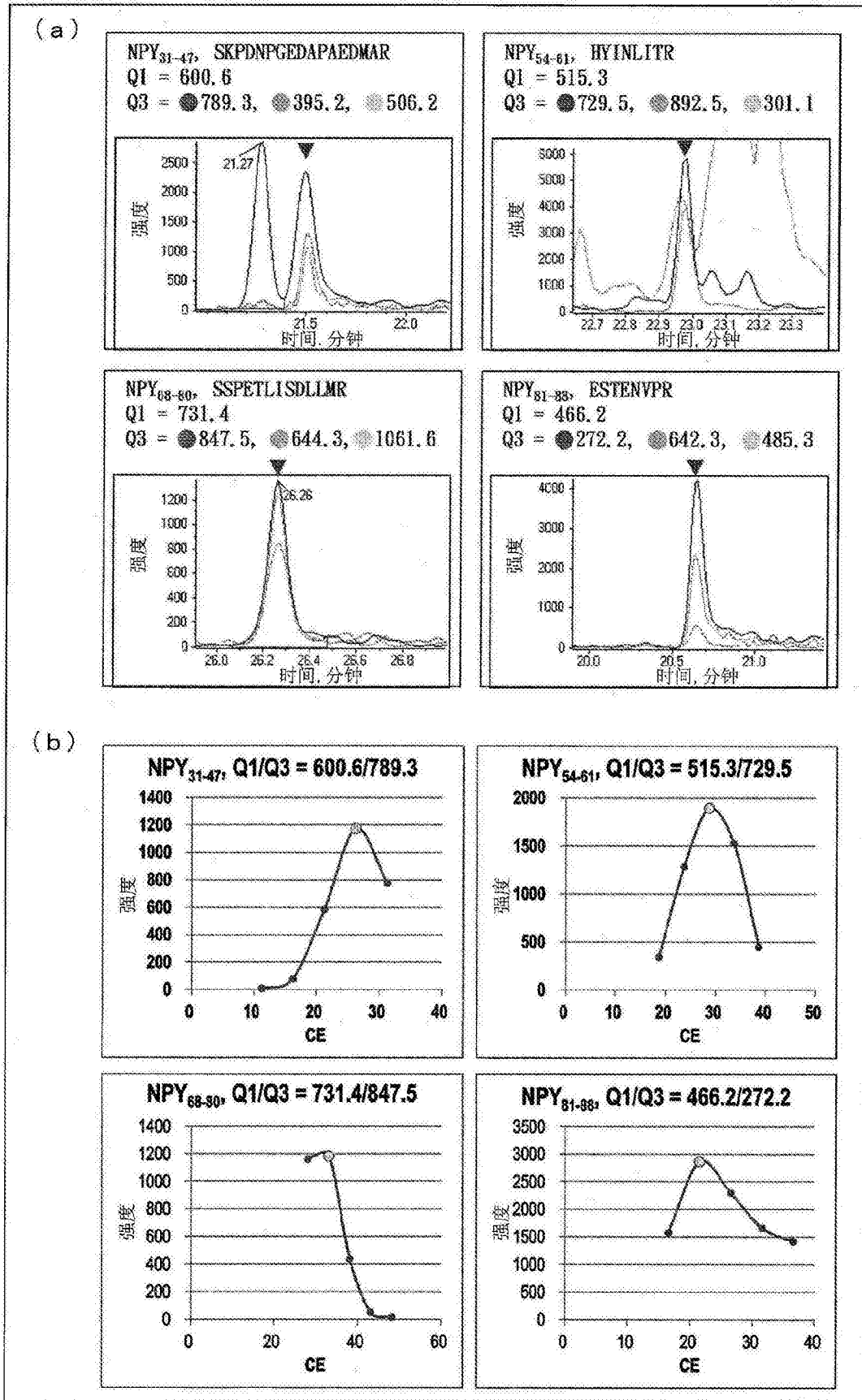


图 5

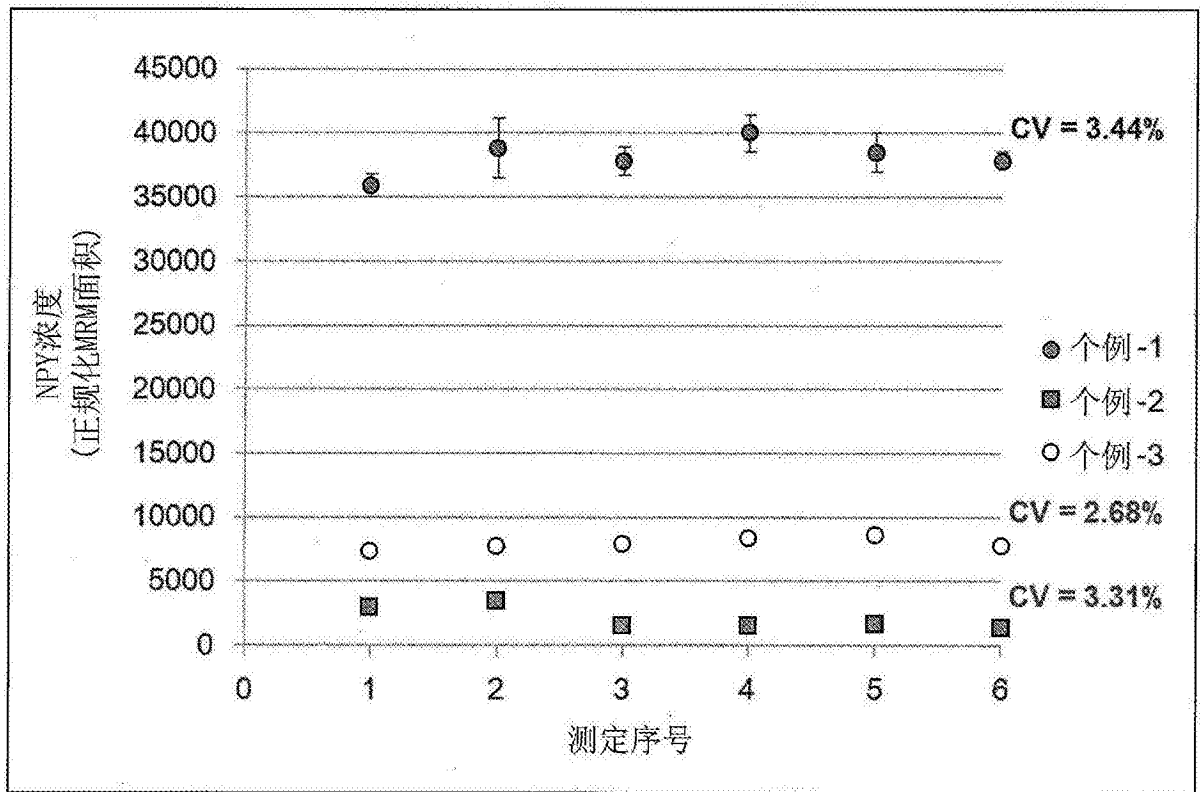


图 6

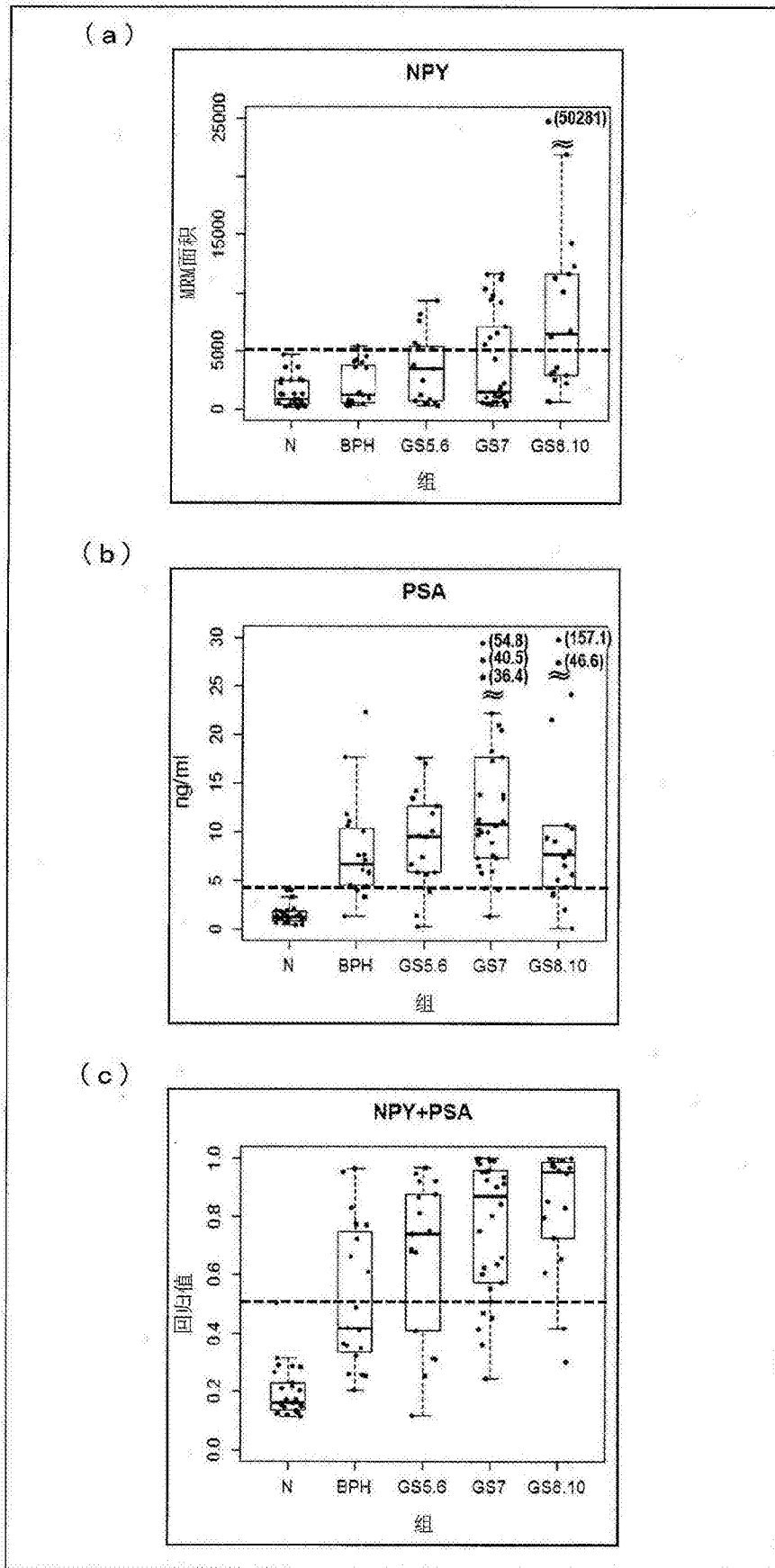


图 7

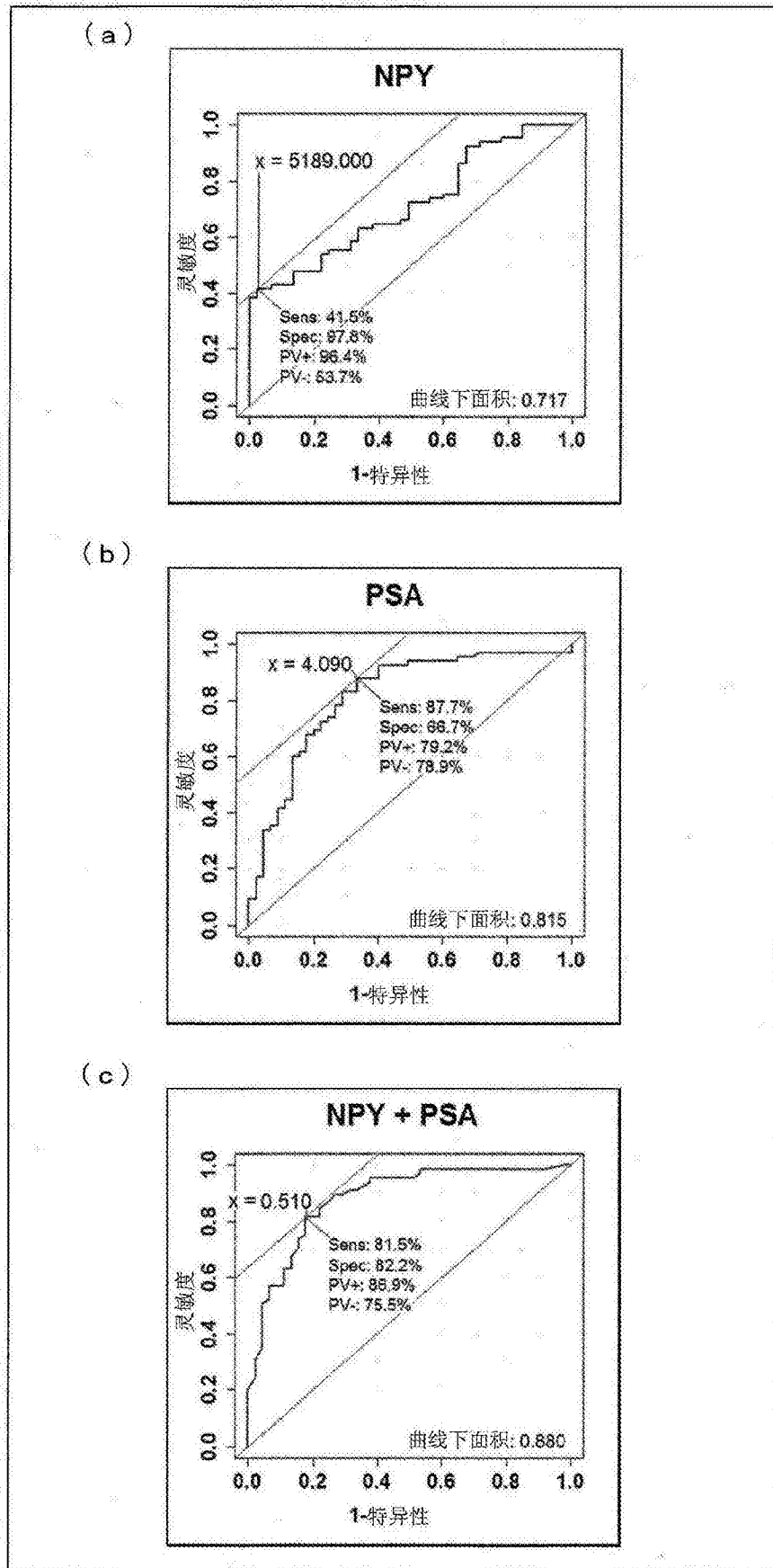


图 8

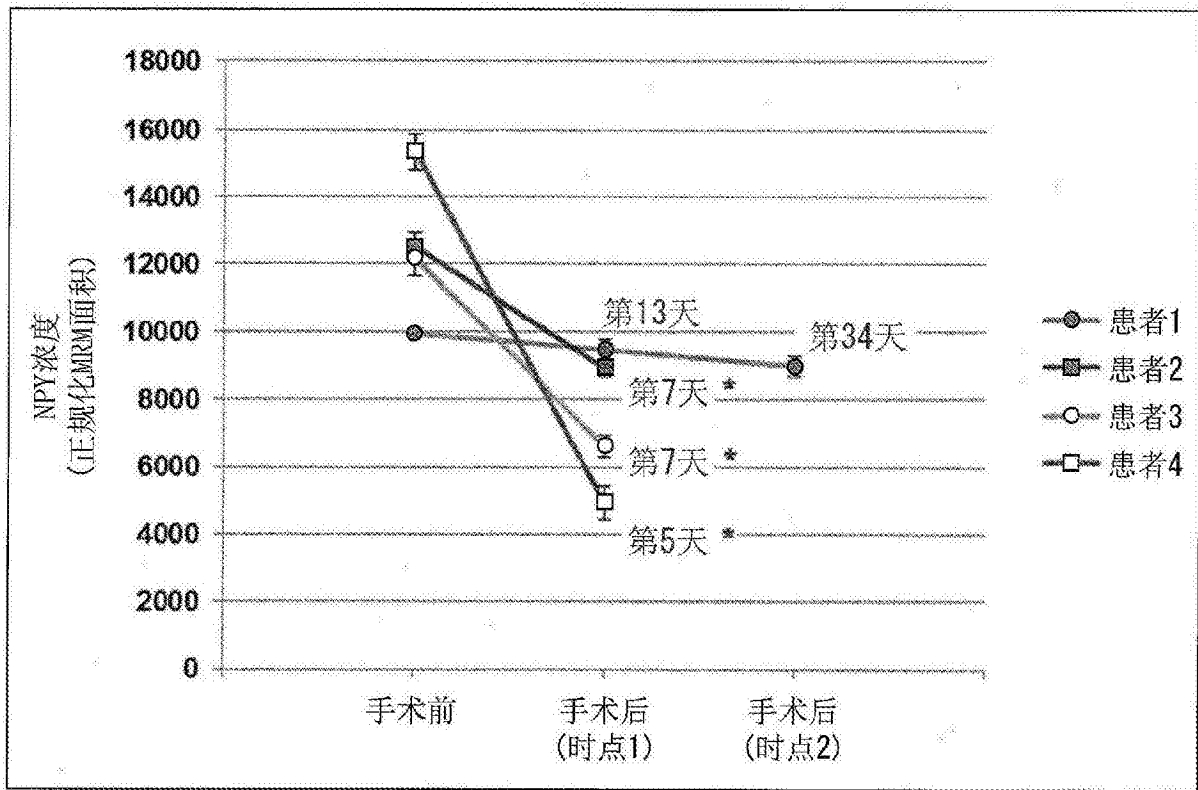


图 9

专利名称(译)	用于评价前列腺癌进度的分析方法、前列腺癌进度的评价方法、前列腺癌的检测方法以及检查试剂盒		
公开(公告)号	CN105102986A	公开(公告)日	2015-11-25
申请号	CN201480016470.5	申请日	2014-03-20
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
申请(专利权)人(译)	国立研究开发法人理化学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	国立研究开发法人理化学研究所		
[标]发明人	植田幸嗣 中川英刀		
发明人	植田幸嗣 中川英刀		
IPC分类号	G01N33/68 C07K16/18 C12N15/09 C12Q1/68 G01N27/62 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	C07K16/18 C07K16/30 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/158 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/57434 G01N33/68 G01N2333/5755 G01N21/6486 G01N33/6848 H01J49/0027		
代理人(译)	黄泽雄 王燕		
优先权	2013061094 2013-03-22 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于评价前列腺癌进度的分析方法以及前列腺癌进度的评价方法，其包括测定来自从生物体采集的血液或尿液的试料中的神经肽Y的量的工序，本发明的前列腺癌的检测方法包括测定来自从生物体采集的血液或尿液的试料中的、神经肽Y的量以及前列腺特异抗原的量的工序。

