



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103547923 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 29

(21) 申请号 201280023071. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 04. 13

G01N 33/574 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/48 (2006. 01)

2011-091378 2011. 04. 15 JP

G01N 33/53 (2006. 01)

G07K 16/28 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 11. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2012/060114 2012. 04. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/141285 JA 2012. 10. 18

(71) 申请人 丁制药股份有限公司

地址 日本国神奈川县

(72) 发明人 远藤仁 冈安勋

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 蒋亭

权利要求书1页 说明书11页 附图5页

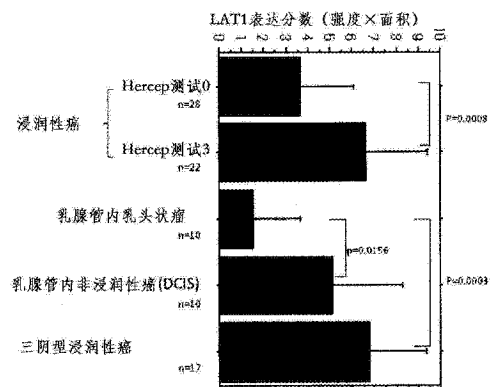
(54) 发明名称

乳腺癌的生物标记

(57) 摘要

本发明提供作为乳腺癌治疗的方针的标记, 其是含有抗 LAT1 单克隆抗体的乳腺癌的诊断试剂盒和 / 或诊断方法。乳腺管内肿瘤性病变中, 与良性的乳腺管内乳头状瘤相比较, 恶性的乳腺管内非浸润性癌中 LAT1 显著高表达, 因此抗 LAT1 单克隆抗体对于两病变的鉴别有用。另外, 作为以往的乳腺癌的分子靶向标记的 ER、PgR、HER2 均为阴性、且没有适合的分子靶向治疗方法的三阴性浸润癌的大多数中高表达 LAT1, 因此 LAT1 成为乳腺癌的新分子靶向标记, 利用本免疫组织学的方法诊断 LAT1 的表达, 并且以 LAT1 为对象的分子靶向治疗方法的开发是有效的。

乳腺肿瘤性病变中免疫反应性LAT1表达



1. 一种诊断试剂盒,其含有在乳腺肿瘤的诊断中用于 LAT1 的检测、鉴定或定量的抗 LAT1 单克隆抗体。
2. 根据权利要求 1 所述的诊断试剂盒,其中,所述乳腺肿瘤为乳腺管内肿瘤,所述诊断试剂盒用于诊断乳腺管内肿瘤的恶性程度。
3. 根据权利要求 1 所述的诊断试剂盒,其中,所述乳腺肿瘤为雌激素受体、孕酮受体和 HER2 均为阴性的三阴性乳腺癌。
4. 一种乳腺肿瘤的诊断试剂盒,其含有包含如下试剂盒的组合:雌激素受体的免疫染色试剂盒、孕酮受体的免疫染色试剂盒和 HER2 的免疫染色试剂盒、以及 LAT1 的免疫染色试剂盒。
5. 一种乳腺肿瘤的诊断方法,其包括以下工序:  
使抗 LAT1 单克隆抗体与从被测者摘取的乳腺组织接触,对所述组织中的 LAT1 进行检测、鉴定或定量的工序。
6. 根据权利要求 5 所述的诊断方法,其中,所述乳腺肿瘤为乳腺管内肿瘤,所述诊断方法对乳腺管内肿瘤的恶性程度进行诊断。
7. 根据权利要求 5 所述的诊断方法,其中,所述乳腺肿瘤为雌激素受体、孕酮受体和 HER2 均为阴性的三阴性乳腺癌。
8. 一种乳腺肿瘤的诊断方法,其包括雌激素受体的免疫染色、孕酮受体的免疫染色、HER2 的免疫染色和 LAT1 的免疫染色。

## 乳腺癌的生物标记

### 技术领域

[0001] 本发明涉及乳腺癌的生物标记,更详细而言涉及乳腺肿瘤的诊断试剂盒和诊断方法。

### 背景技术

[0002] 中性氨基酸转运蛋白(L-type amino acid transporter, L型氨基酸转运蛋白(LAT))是用于将甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、蛋氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、组氨酸、左旋多巴等中性氨基酸摄取到细胞内的跨膜型的蛋白质。本发明人进行了各种LAT的研究,目前为止发现了LAT1和作为其异形体(isoform)的LAT2、LAT3和LAT4。

[0003] 其中,LAT1是通过与氨基酸转运活性因子4F2hc共存而具有将亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、组氨酸等大型的中性氨基酸和左旋多巴 $\text{Na}^+$ 非依赖性转运的能力的12次跨膜蛋白。另外,在机体内,LAT1主要在胎盘、脾脏、大肠、精巢和血脑屏障中表达。另外,LAT1被确认在人胃印戒细胞癌细胞株、肺小细胞癌细胞株、黑色素瘤细胞株、成神经细胞瘤细胞株中表达,而且在肾癌、膀胱癌和前列腺癌的肿瘤组织中,通过免疫组织化学染色确认了其表达(参考专利文献1、非专利文献1和非专利文献2)。通过美法仑、BCH等抑制药来抑制LAT1,表达LAT1的培养细胞的增殖速度显著下降,因此可认为,基于LAT1的必需氨基酸向细胞内的摄取对于细胞增殖而言是必不可缺的,癌细胞能够通过高表达该LAT1来获得比正常细胞优越的营养状态,从而进行占优势地位的增殖。

[0004] LAT2是LAT1的异形体,与LAT1同样地具有12次跨膜结构,并且通过与4F2hc的共存而具有将大型的氨基酸、以及还包括甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺等小型的氨基酸在内的所有中性氨基酸 $\text{Na}^+$ 非依赖性转运的广泛底物选择性。LAT2被确认在脑、骨骼肌、肾脏、空肠、回肠、精巢和胎盘的正常组织中表达,而在肿瘤组织中未确认到其表达(参考专利文献2和非专利文献3)。LAT2与底物的亲和性比LAT1低,因此可认为LAT2承担在不需要活跃的细胞增殖的正常组织的细胞中的中性氨基酸的转运。

[0005] 另外,本发明人也发现了:转运L-型和D-型氨基酸的钠非依赖性小型中性氨基酸转运蛋白(参考专利文献3),将胱氨酸、碱性氨基酸和中性氨基酸作为底物的转运蛋白(参考专利文献4)等各种转运蛋白。转运蛋白是具有用于物质特异性地将细胞需要的各种物质摄取到细胞内的功能的跨膜型的蛋白质,对于机体组织的维持、增殖是不可缺的。因此,也提出了通过各种转运蛋白来诊断疾病的方法。例如报道有以下的方法等:考察含有肿瘤细胞、肿瘤组织或者具有肿瘤的脏器或其一部分的试样中是否有蛋白的表达或其表达量的方法(参考专利文献1);以使用阴离子转运蛋白的抗体为特征的肺、胸部疾病的诊断方法(参考专利文献5);将红细胞尿素转运蛋白的蛋白质或其片段或者核酸的定量值作为指标,来诊断被测者是否患有精神分裂症的方法(参考专利文献6);用体液制备细胞学制备物,使用与跨膜葡萄糖转运蛋白GLUT-1相结合的抗体,与从来自同一类型的组织的非恶性

组织的切片取得的组织试样中的 GLUT-1 表达水平进行比较,从过表达 GLUT-1 的恶性肿瘤中识别良性肿瘤的方法(参考专利文献 7)。

[0006] 在以乳腺癌的治疗作为对象的生物标记中,主要已知有雌激素受体(ER)、孕酮受体(PgR)和 HER2(也被称为 EGFR2、增殖要因的受体)这三种。在对它们分别利用肿瘤组织的免疫组织化学或 FISH 法进行检查而显示反应的阳性例中,选择以各自作为靶向的治疗方法。另一方面,这三种标记均为阴性的乳腺癌(在乳腺癌的肿瘤细胞中,没有雌激素受体、孕酮受体和 HER2 这三种蛋白质的表达)被称为三阴性乳腺癌,据报道称,其占全部乳腺癌病例的 12~25%(参考非专利文献 7~10)。尚未开发出针对该三阴性乳腺癌的适合的治疗方法,与现有的 3 标记中任意者为阳性的乳腺癌病例相比,其患者的预后也并不良好(参考非专利文献 9 和 10)。

[0007] 另外,在乳腺管内肿瘤中,对于恶性的非浸润性乳腺管内癌(ductal carcinoma in situ,原位管癌;以下也称为 DCIS)与良性的乳腺管内乳头状瘤(intraductal papilloma,乳腺管内乳头状瘤)的鉴别,进行以往的利用 HE(苏木精、伊红)染色标本的病理组织诊断方法,然而明确的鉴别要素并不明确,难以鉴别的病变多。因此,期待开发能够明确判别的标记。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献 1:日本特开 2000-157286 号

[0011] 专利文献 2:日本特开 2000-342270 号

[0012] 专利文献 3:日本特开 2001-211886 号

[0013] 专利文献 4:日本特开 2001-46070 号

[0014] 专利文献 5:日本特开 2001-228146 号

[0015] 专利文献 6:日本特开 2001-245661 号

[0016] 专利文献 7:日本特表平 11-511245 号

[0017] 非专利文献

[0018] 非专利文献 1:Kanai, Y. 等, J. Biol. Chem. , 273, 23629-23632, 1998

[0019] 非专利文献 2:Yanagida O. 等, Biochim. Biophys. Acta. , 1514(2), 291-302, 2001

[0020] 非专利文献 3:Segawa, H. 等, J. Biol. Chem. , 274(28), 19745-19751, 1999

[0021] 非专利文献 4:Sakata T. 等, Pathol. Int. 59, 7-18, 2009

[0022] 非专利文献 5:Ichinohe M. 等, Pathol. Int. , 2011 出版中

[0023] 非专利文献 6:Oda K. 等, Cancer Sci. , 101, 173-179, 2010

[0024] 非专利文献 7:Rakha E. A. 等, Cancer 109, 25-32, 2007

[0025] 非专利文献 8:Liedtke C. 等, J. Clin. Oncol. 26, 1275-1281, 2008

[0026] 非专利文献 9:Sasaki Y. 等, Breast Cancer 16, 254-259, 2009

[0027] 非专利文献 10:Iwase H. 等, Breast Cancer 17, 118-124, 2010

[0028] 非专利文献 11:Sinicrope F. A. 等, Cancer Res. 55, 237-241, 1995

## 发明内容

[0029] 要解决的技术课题

[0030] 本发明提供一种乳腺肿瘤的诊断方法和诊断试剂盒。详细而言,第一方面,本发明涉及 ER、PgR、HER2 均为阴性的三阴型乳腺癌的诊断试剂盒和诊断方法。第二方面,本发明涉及以往难以进行简单鉴别的乳腺管内肿瘤的恶性程度的诊断试剂盒和诊断方法。

[0031] 解决课题的手段

[0032] 本发明人着眼于癌细胞特异性使用的癌型氨基酸转运蛋白,以开发癌的分子靶向疗法为目标进行了研究。正常的细胞主要使用 LAT2,而癌细胞使用氨基酸摄取效率良好的 LAT1。本发明人制备了针对 LAT1 的小鼠单克隆抗体,并开发了使用该抗体的免疫组织科学的研究方法(参考非专利文献 4)。通过该方法确认在前列腺癌、胃癌中与 LAT1 低表达病例相比 LAT1 高表达病例的预后显著不良(参考非专利文献 4 和 5),并且进行了 LAT1 特异性抑制物质的开发,并开发出将诊断和治疗一体化的对癌疗法(参考非专利文献 4~6)。

[0033] 本发明人运用如上所述 LAT1 在癌中高表达、进行效率良好的氨基酸的摄取、进行增殖的发现,以该 LAT1 作为对象的乳腺癌的分子靶向治疗为目标,使用抗 LAT1 单克隆抗体,对于乳腺管内肿瘤的 LAT1 表达进行了免疫组织学上的认真研究。结果发现,与乳腺管内乳头状瘤相比,在非浸润性乳腺管内癌中,LAT1 高表达,免疫染色方法对于乳腺管内肿瘤的良好或恶性的鉴别是有用的。

[0034] 另外发现,通过将抗 LAT1 单克隆抗体用于 ER、PgR 和 HER2 均为阴性的所谓三阴型乳腺癌组织,在其 17 例中 14 例这样的高比例中,LAT1 高表达。

[0035] 即,本发明人发现了肾、膀胱癌中特异的必需氨基酸转运蛋白 LAT1 和在正常细胞中存在的 LAT2。本发明人惊奇地发现,通过使用抗 LAT1 单克隆抗体,可以在乳腺管内肿瘤中鉴别肿瘤的恶性或良性,以及在所谓的三阴型的乳腺癌组织中,LAT1 以高概率表达。

[0036] 本发明(1)中涉及一种诊断试剂盒,其含有在乳腺肿瘤的诊断中用于 LAT1 的检测、鉴定或定量的抗 LAT1 单克隆抗体。

[0037] 本发明(2)涉及如上述(1)所述的诊断试剂盒,其中,所述乳腺肿瘤为乳腺管内肿瘤,所述诊断试剂盒用于诊断乳腺管内肿瘤的恶性程度。

[0038] 本发明(3)涉及如上述(1)所述的诊断试剂盒,其中,所述乳腺肿瘤为雌激素受体、孕酮受体和 HER2 均为阴性的三阴型乳腺癌。

[0039] 本发明(4)涉及一种乳腺肿瘤的诊断试剂盒,其含有包含如下试剂盒的组合:雌激素受体的免疫染色试剂盒、孕酮受体的免疫染色试剂盒和 HER2 的免疫染色试剂盒、以及 LAT1 的免疫染色试剂盒。

[0040] 本发明(5)涉及一种乳腺肿瘤的诊断方法,其包括:使抗 LAT1 单克隆抗体与从被测者摘取的乳腺组织接触,对所述组织中的 LAT1 进行检测、鉴定或定量的工序。

[0041] 本发明(6)涉及如上述(5)所述的诊断方法,其中,所述乳腺肿瘤为乳腺管内肿瘤,所述诊断方法对乳腺管内肿瘤的恶性程度进行诊断。

[0042] 本发明(7)涉及如上述(5)所述的诊断方法,其中,所述乳腺肿瘤为雌激素受体、孕酮受体和 HER2 均为阴性的三阴型乳腺癌。

[0043] 本发明(8)为乳腺肿瘤的诊断方法,其包括雌激素受体的免疫染色、孕酮受体的免疫染色、HER2 的免疫染色和 LAT1 的免疫染色。

[0044] 发明效果

[0045] 根据本发明(1)和(5),可以容易地进行以往困难的用于显示乳腺肿瘤中的治疗

方针的诊断。也就是说,通过乳腺肿瘤的使用抗 LAT1 抗体的免疫染色来考察乳腺癌的 LAT1 表达,使以 LAT1 为靶向的乳腺癌的抗癌疗法成为有效方法。

[0046] 根据本发明 (2) 和 (6),可以容易进行难以诊断的乳腺管内肿瘤的良性(乳腺管内乳头状瘤)或恶性(非浸润性乳腺管内癌)的鉴别。

[0047] ER、PrG 和 HER2 均为阴性的三阴性乳腺癌的预后不良的情况很多,但根据本发明 (3) 和 (7) 可以提供其治疗方针。

[0048] 根据本发明 (4) 和 (8),通过在以往已知的 ER、PgR 和 HER2 基础上组合使用抗 LAT1 单克隆抗体,可以对乳腺癌的诊断提供精度更高的治疗方针。

[0049] 本发明中,乳腺肿瘤只要是乳腺组织所含的肿瘤,就没有特别限定,可例举如,以乳腺管内乳头状瘤、乳头部腺瘤等良性肿瘤,非浸润癌(非浸润性乳腺管内癌等)、浸润癌[浸润性乳腺管癌(乳头样管状癌(乳头腺管癌)、实体管状癌(充实腺管癌)、硬癌)、特殊型]、帕哲氏病等恶性肿瘤为代表的肿瘤。另外,乳腺肿瘤根据另一分类,可分为作为恶性肿瘤的乳腺癌和良性肿瘤。

[0050] 上述乳腺管内肿瘤只要是乳腺管内所含的肿瘤,就没有特别限定,可例举如以乳腺管内乳头状瘤(良性肿瘤)和非浸润性乳腺管内癌(恶性肿瘤)为代表的肿瘤。

#### 附图说明

[0051] 图 1 示出 LAT1 表达强度的基准。以其染色度为基准,求出 LAT1 的表达度。

[0052] 图 2 示出乳腺管内乳头状瘤与非浸润性乳腺管内癌中的 LAT1 表达的比较。

[0053] 图 3 示出 ER、PgR 和 HER2 均为阴性的三阴性乳腺癌组织中高表达 LAT1 的例子。

[0054] 图 4 示出 HER2 阴性的乳腺癌组织中表达 LAT1 的例子。

[0055] 图 5 示出 HER2 阳性的乳腺癌组织中表达 LAT1 的例子。

[0056] 图 6 示出乳腺肿瘤性病变中 LAT1 表达的比较。

#### 具体实施方式

[0057] 本发明中所用的 LAT 是具有细胞增殖所需要的必需氨基酸的细胞膜转运能力的功能性蛋白,尤其是在癌细胞中特异性表达的 LAT 是与保证癌的增殖的必需氨基酸的细胞膜转运能力相一致的功能性蛋白,因此通过使用这些 LAT 的含有不同种类的 2 种以上的本发明的方法,不仅可以评价癌的有无,而且还可以可靠地评价癌的恶性程度。

[0058] 本发明的特征之一是,通过利用乳腺肿瘤的使用抗 LAT1 抗体的免疫染色来考察乳腺癌的 LAT1 表达,使以 LAT1 作为靶向的乳腺癌的抗癌疗法成为有效方法。

[0059] 作为本发明中在正常细胞中表达的 LAT,可例举如 LAT2。另外,作为本发明中在肿瘤细胞中表达的 LAT,可例举如 LAT1。

[0060] 作为本发明的试样,可例举如人等哺乳动物的乳腺肿瘤细胞。作为本发明的试样中的 LAT 的检测、鉴定或定量,只要是能够对 LAT 进行检测、鉴定或定量的方法,就没有特别限定。作为优选的方法,可例举如使用该 LAT 的抗体的方法。作为 LAT 的抗体,为对 LAT 蛋白的全长或其一部分具有反应性的抗体,只要对 LAT 具有特异性就没有特别限定,为了精度更好地进行,优选使用特异性高的单克隆抗体。

[0061] 本发明的抗体可以依据公知的抗体制造方法来制造。具体而言可以是以下抗体中

的任一种；将本发明的 LAT 或其一部分（包括天然体、重组体、化学合成物）或表达该蛋白的细胞作为免疫原使用，根据常法，对小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、鸡、兔子、山羊、绵羊等非人哺乳动物进行免疫而得到的天然型抗体；使用基因重组技术进行制造而得到的重组嵌合单克隆抗体和重组人型单克隆抗体（CDR-grafted 抗体，CDR 移植抗体）；以及使用产生人抗体的转基因动物等进行制造而得的人抗体。单克隆抗体的情况也包括具有 IgG、IgM、IgA、IgD、IgE 等中的任意一种同种型的单克隆抗体。优选 IgG 或 IgM。

[0062] 使用本发明的抗体时，为了成为能够对其结果进行检测、鉴定或定量的信号，优选事先制成标记化或能够标记化的抗体。作为本发明的标记化抗体，为利用酶、荧光物质、化学发光物质、生物素、抗生物素蛋白或  $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$  等放射性同位素等标记的抗体或具有与这些标记化物质相结合能力的抗体。

[0063] 本发明的用于标记抗体的“单独或通过与其他物质反应而能够带来可以检测的信号”的标记物质”是指，通过物理或化学的结合等使其与上述的抗体结合由此使该单克隆抗体的存在变得能够进行检测的用途中使用的物质。具体为酶、荧光物质、化学发光物质、生物素、抗生物素蛋白或上述放射性同位素等。具体而言，可列举：[例如，辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase) 等]、碱性磷酸酶、 $\beta$ -D-半乳糖激酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、醇脱氢酶、苹果酸脱氢酶、青霉素酶、过氧化氢酶、Apo 葡萄糖氧化酶、脲酶、荧光素酶或乙酰胆碱酯酶等酶，异硫氰酸荧光素、藻胆蛋白、稀土金属螯合物、丹磺酰氯或四甲基异硫氰酸罗达明等荧光物质， $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$  等放射性同位素，生物素，抗生物素蛋白或化学发光物质。

[0064] 在此，放射性同位素和荧光物质单独就可以带来能够检测的信号，酶、化学发光物质、生物素和抗生物素蛋白单独不能带来能够检测的信号，因此，通过再与 1 种以上的其他物质反应，能够带来能够检测的信号。例如，为酶的情况时，至少需要底物，可根据测定酶活性的方法（比色法、荧光法、生物发光法或化学发光法等）来使用各种底物。例如，为过氧化物酶时，使用过氧化氢作为底物。另外，为生物素时，通常至少以抗生物素蛋白或酶修饰抗生物素蛋白（例如链霉素抗生物素蛋白- $\beta$ -半乳糖激酶）作为底物进行反应，但不限于此。根据需要还可使用依赖于该底物的各种显色物质。例如，使用链霉素抗生物素蛋白- $\beta$ -半乳糖激酶作为生物素的底物时，可以使用 4-甲基伞形基- $\beta$ -D-半乳糖苷作为显色物质。

[0065] 本发明的标记化抗体可以用于检测、鉴定或定量本发明的 LAT，作为用于其的测定方法，可以使用惯用的免疫组织学技术并根据常法来进行实施（例如参考实验医学副刊、《細胞工学ハンドブック（细胞工程学手册）》、羊土社、201～213 页、1992 年）。另外，本发明的标记化抗体不仅可用于上述的免疫组织学的试验，而且还可以用于以下的蛋白质印迹法，即，利用常法从试样中的细胞、组织或者脏器或其一部分制备可溶性膜蛋白，使该可溶性膜蛋白与标记化抗体反应，由此确认可溶性膜蛋白中是否存在本发明的 LAT。在上述的免疫学的测定方法中，也可以使用以上述任意的标记物质标记后的标记化抗体，如考虑到检测灵敏度或定量灵敏度的高度和操作的便利性，优选使用以过氧化物酶等酶或生物素标记后的单克隆抗体。

[0066] 作为本发明的 LAT 的检测、鉴定或定量的方法，可以通过上述免疫组织学的技术等来进行，具体可例举如包括下述 (1) 和 (2) 的工序的方法。

[0067] (1) 使试样与本发明的标记化抗 LAT 抗体相接触的工序 ; 以及  
[0068] (2) 对于与该试样中的 LAT 相结合的标记化抗体, 根据与该标记化抗体相结合的标记物质的种类, 通过检测荧光、化学发光或放射活性来进行测定的工序。

[0069] 进一步具体而言, 可以例如包括如下工序。

[0070] (工序 1) 利用多聚甲醛等将从被测体中取的试样固定化, 制造固定化试样的工序 ;

[0071] (工序 2) 向该固定化试样中加入由生物素或过氧化物酶等酶标记后的本发明的标记化抗体, 进行抗原抗体反应的工序 ;

[0072] (工序 3) 接着, 将该固定化试样根据需要清洗后, 根据使用的酶的种类, 加入各种底物或者抗生物素蛋白或链霉素抗生物素蛋白 -  $\beta$  - 半乳糖激酶等酶修饰抗生物素蛋白, 使该底物、抗生物素蛋白或酶修饰抗生物素蛋白与标记抗体上的标记物质进行反应的工序 ;

[0073] (工序 4) 在工序 3 中加入酶修饰抗生物素蛋白时, 根据该修饰中使用的酶的种类加入各种底物 (例如, 4- 甲基伞形基 -  $\beta$  - D- 半乳糖苷等), 使与抗生物素蛋白相结合的酶与底物反应的工序 ;

[0074] (工序 5) 根据需要, 将固定化试样清洗, 使酶反应和显色反应停止的工序 ; 以及

[0075] (工序 6) 在显微镜下观察固定化试样, 从而测定比色强度、荧光强度或发光强度的工序。

[0076] 作为本发明的检测、鉴定或定量方法, 以使用免疫染色法的、乳腺组织中的癌细胞的检测方法为例进一步详细地进行说明。本发明的方法是检测来自乳腺组织的癌细胞及其碎片, 并诊断其恶性程度的方法。本发明的方法中, 可以通过免疫染色来直接视觉地观察 LAT1 的有无, 因此在阴性或阳性的判断中不需要特殊的能力, 可以简便且可靠地进行。

[0077] 作为本发明的检测、鉴定或定量方法的具体示例, 可例举如下 (1) ~ (4) 中列举的方法, 但没有特别限定。

[0078] (1) 基于组织及涂片法的癌细胞的检测

[0079] 对摘出组织进行福尔马林固定、石蜡包埋后, 制备成  $3\mu\text{m}$  厚的组织切片, 放置到载玻片上。将该切片脱石蜡后, 分别用与氨基酸转运蛋白特异性结合的抗 LAT1 和 LAT2 抗体进行处理 (一抗处理)。一抗处理后, 利用与各一抗特异性结合的由酶或 DAB (3, 3' - 二氨基联苯胺四盐酸盐)、甲基绿、Mayer 氏苏木精等荧光色素等标记的二抗对样品进行处理 (标记二抗处理)。使用酶标记后的二抗时, 加入底物溶液, 使之显色后, 使用光学显微镜观察细胞, 进行阳性或阴性的判定。使用被荧光色素标记后的二抗时, 在二抗处理后, 使用荧光显微镜进行观察, 判定癌细胞的有无。另外, 在涂片法中, 将摘出细胞直接涂布到玻璃上、或用离心机进行分离, 分成细胞成分和液体成分, 对细胞成分 (沉淀物) 进行免疫染色。即, 将沉淀物涂布到载玻片上, 用乙醇液或 10% 福尔马林液体等进行固定后, 进行与组织切片同样的免疫染色, 从而进行判定。

[0080] (2) 基于冷冻包埋法的癌细胞的检测

[0081] 将摘出组织用 OCT 冰冻切片包埋剂 (O. C. T. Compound) 包埋后, 用液氮迅速冷冻, 在低温恒温器中切成薄片制作玻片标本。将该标本用 10% 福尔马林、乙醇液等进行固定后, 用上述 (1) 记载的方法进行免疫染色。为摘出细胞的情况下, 用离心机进行分离, 对沉淀物

成分用 10% 福尔马林固定后,再次进行离心,弃去上清得到细胞成分。在将细胞成分用加热块等加热的同时,加入 2% 琼脂糖 50  $\mu$  L 并混合,在 4 $^{\circ}$ C 下使之固化,将沉淀物成分封入到凝胶内。对固化后的凝胶用 OCT 冰冻切片包埋剂进行封入,制作冷冻块,将冷冻块在低温恒温器中切成薄片制作玻片标本。根据常规对玻片标本上的细胞进行处理,进行免疫组织荧光染色,然后利用荧光显微镜对染色后的标本进行观察,判定癌细胞的有无。

[0082] (3) 基于摘出细胞的石蜡包埋法的癌细胞的检测

[0083] 根据情况,也可以对封入沉淀物后的凝胶用以下方法进行处理,并实施利用石蜡标本的考察。用 4% 福尔马林在 4 $^{\circ}$ C 将凝胶处理过夜后,用 PBS 进行清洗,依据常规进行脱水、透明。透明后,依据常规将凝胶包埋在石蜡中,制作石蜡块。将制作的块在低温恒温器中切成薄片制作玻片标本。依据常规,对制作的玻片标本进行脱石蜡处理后,进行免疫组织荧光染色,然后用荧光显微镜观察染色后的标本,并判定癌细胞的有无。通过本方法,可以利用免疫组织化学的方法等来识别乳腺癌组织。

[0084] (4) 使用 ELISA 法的癌细胞的检测

[0085] 通过利用 ELISA 法检测摘出组织中所含的 LAT 蛋白,可以将摘出组织中的 LAT 蛋白量化,从而可以进行进一步定量的判定。将样品用表面活性剂和超声波进行处理后,利用超离心以 4 $^{\circ}$ C、100000 $\times$ g 进行离心分离,弃去上清得到蛋白质颗粒。向颗粒中加入适量的 10%BSA/PBST,通过超声波处理使之悬浮。将其作为样品,进行 ELISA 法。

[0086] 首先,将样品以 100  $\mu$  L/ 孔的量添加到免疫板中,在 4 $^{\circ}$ C 下放置过夜。弃去样品溶液,添加封闭溶液,在室温下放置 1 小时。弃去孔内的封闭溶液,添加适当稀释后的抗 LAT 一抗溶液,在室温下放置 2 小时(在此期间,抗 LAT 抗体与孔的底面的各 LAT 蛋白质相结合)。弃去一抗液体,用 PBST 清洗后,加入适当稀释后的标记二抗,在室温下放置 1 小时。用 PBST 清洗孔内,加入底物溶液使之显色或化学发光,用分光光度计或微放射计对其色素量或发光的程度进行测定,从而确认、判定有无 LAT 蛋白的存在。

[0087] 本发明的另一特征在于,可以判定乳腺管内肿瘤组织中的肿瘤的恶性程度。本发明的判定试样中乳腺管内肿瘤中的肿瘤恶性程度的方法,通过对在正常细胞中表达的 LAT 进行定量,可以获知正常细胞的量。另外,通过对在肿瘤细胞中表达的 LAT 进行定量,可以获知肿瘤细胞的量。而且,由于这些细胞需要同种的 LAT,因此从该两者的定量值可以获知整体的何种程度已肿瘤细胞化。因此,本发明中也提供对试样中的细胞的肿瘤的恶性程度进行判定的方法,该方法包括:对试样中的在正常细胞中表达的 LAT2 进行定量,并对在肿瘤细胞中表达的 LAT1 进行定量,对两者的定量值进行比较。

[0088] 本发明的另一特征为:能够提供乳腺肿瘤是雌激素受体、孕酮受体和 HER2 均为阴性的三阴型乳腺癌的、乳腺肿瘤的治疗方针。三阴型乳腺癌的大多数中 LAT1 为高表达,因此可知,对于目前难以治疗的三阴型乳腺癌而言,以 LAT1 作为靶向的治疗是有效的。需要说明的是,无论是否是三阴型,都对乳腺癌整体考察有无 LAT1 的表达,由此以 LAT1 作为靶向的治疗是有效的。

[0089] 本发明的另一特征是:通过将 ER(雌激素受体)的免疫染色、PgR(孕酮受体)的免疫染色和 HER2 的免疫染色以及 LAT1 的免疫染色组合,可以进行乳腺癌的诊断。本发明中,如果在 ER、PgR 和 HER2 的免疫染色的基础上使用利用抗 LAT1 单克隆抗体的 LAT1 的免疫染色,则可以更准确地诊断乳腺癌。ER、PgR 和 HER2 的免疫染色可以使用市售品。例如,

在 ER 和 PgR 的免疫染色中可以使用 Ventana XT 系统 (Ventana Japan、东京、日本), 另外, 作为 HER2 的免疫染色试剂盒, 可以使用 DAKO EGFR pharmDx 试剂盒 (Dako North America Inc., 卡平特里亚, CA, USA), 只要是能够测定 ER、PgR 和 HER2 的方法, 就不限于此。通过评价 ER 和 PgR 表达状态的有无, 可以推定雌激素、孕酮或它们的类似物等的激素疗法的效果。通过评价 HER2 基因表达状态的有无, 可以推定乳腺癌中的抗 HER2 药剂的效果。与此相同, 通过使用抗 LAT1 单克隆抗体的 LAT1 的免疫染色试剂盒来评价 LAT1 表达状态的有无, 由此可以推定 LAT1 转运蛋白抑制剂的效果。这些免疫染色可以同时进行, 也可以分别单独进行。

#### [0090] (试剂盒)

[0091] 另外, 本发明提供了用于进行上述本发明的各方法中的任意一种的诊断试剂盒。也就是说, 本发明涉及在乳腺肿瘤的诊断中用于 LAT1 的检测、鉴定或定量的、含有抗 LAT1 单克隆抗体的诊断试剂盒。关于所述诊断试剂盒, 乳腺肿瘤为乳腺管内肿瘤, 所述诊断试剂盒可以用于诊断乳腺管内肿瘤的恶性程度, 乳腺肿瘤也可以为雌激素受体、孕酮受体和 HER2 均为阴性的三阴性乳腺癌。另外, 本发明还涉及乳腺肿瘤的诊断试剂盒, 该诊断试剂盒含有包含如下试剂盒的组合: 雌激素受体的免疫染色试剂盒、孕酮受体的免疫染色试剂盒和 HER2 的免疫染色试剂盒、以及 LAT1 的免疫染色试剂盒。另外, 本发明还涉及不管乳腺肿瘤的雌激素受体、孕酮受体、HER2 的检测结果是阳性、阴性, 均可鉴定 LAT1 的表达的试剂盒。

[0092] 详细而言, 提供用于对从被测体中取的试样中的肿瘤细胞进行检测、鉴定或定量的试剂盒, 所述试剂盒含有用于对试样中的正常细胞中表达的 LAT2 进行检测、鉴定或定量的试剂盒, 以及用于对试样中的肿瘤细胞中表达的 LAT1 进行检测、鉴定或定量的试剂盒。

[0093] 本发明的用于对 LAT 进行检测、鉴定或定量的诊断试剂盒, 含有用于可以对 LAT 进行检测、鉴定或定量的材料, 例如含有用标记物质进行标记的标记化抗体等, 该标记物质为上述的单独或通过与其他物质反应而能够带来可以检测的信号的物质。本发明的试剂盒中的、用于对在正常细胞中表达的 LAT 进行检测、鉴定或定量的试剂盒以及用于对在肿瘤细胞中表达的 LAT 进行检测、鉴定或定量的试剂盒, 均是用于对 LAT 进行检测、鉴定或定量的试剂盒的 1 种, 为了进行定量, 优选为相同种类的测定用套盒 (セット), 但不限于此。

[0094] 例如, 可以将用于对在正常细胞中表达的 LAT (例如 LAT2) 进行检测、鉴定或定量的试剂盒制成用荧光物质标记化的试剂盒, 将用于对在肿瘤细胞中表达的 LAT (例如 LAT1) 进行检测、鉴定或定量的试剂盒制成用放射性同位素标记化的试剂盒, 但优选用不同波长的荧光物质标记化的试剂盒, 和用不同的放射性同位素标记化的试剂盒。

#### [0095] (实验方法)

[0096] 对于本发明中的 LAT 的作用进行更具体的说明。首先, 本发明人进行了 LAT 的免疫组织学的研究。对通过外科处置而摘取、并进行了石蜡包埋的乳腺肿瘤细胞的组织标本进行脱石蜡和封闭后, 在最终浓度  $2 \mu\text{g}/\text{mL}$  的抗 LAT 抗体 (LAT1 为小鼠抗人 LAT1 单克隆抗体 (参考非专利文献 1 的 23631 页图 3A)、LAT2 为兔抗人 LAT2 多克隆抗体 (抗 hEST3A-N 抗体、株式会社转基因、熊本) 于  $4^\circ\text{C}$  处理过夜。利用 PBS 清洗后, 均添加 ChemMate DAKO ENVISION System 试剂盒 (DAKO ChemMate ENVISION System HRP 试剂盒) 的通用抗体, 在

室温下处理 30 分钟,然后通过 DAB(3, 3' - 二氨基联苯胺四盐酸盐)底物溶液进行显色。

[0097] 结果,确认了利用 LAT1 抗体的癌细胞的特异染色,另一方面,对于 LAT2 未确认到特异染色。图 1 ~ 图 5 示出使用抗 LAT1 单克隆抗体的染色试验的结果。例如,图 1 示出显示出 LAT1 表达强度的基准,图 2 示出恶性非浸润性乳腺管内癌中的 LAT1 的表达例,图 3 示出三阴性乳腺癌中的 LAT1 的高表达例,图 4 示出 HER2 阴性的乳腺癌中的 LAT1 的表达例,图 5 示出 HER2 阳性的乳腺癌中的 LAT1 的表达例。以下分别对其进行说明。

[0098] 图 1 示出 LAT1 表达强度的基准。关于 LAT1 表达,通过对 Sinicrope 的方法(参考非专利文献 11)改良后的方法(参考非专利文献 4),将由表达的强度(intensity)[0(阴性)、1(轻度的阳性)、2(中度的阳性)和 3(强度的阳性)]与表达区域的面积(area)[0(阴性)、1(局部的、10% 以下)、2(部分的、大于 10% 且 30% 以下)和 3(弥漫性、大于 30%)]的乘积而得到的值作为评价价值(分数)。依据其染色度,求出 LAT1 的表达度。图 1 表示 LAT1 表达强度的标准,从左侧开始依次表示强度 0、强度 1、强度 2、强度 3。

[0099] (乳腺管内肿瘤中的恶性、良性的鉴别)

[0100] 图 2 示出同为乳腺管内肿瘤的乳腺管内乳头状瘤与非浸润性乳腺管内癌的比较。上部中进行了基于 HE(苏木精、伊红)染色的处理、下部中进行了基于 LAT1 免疫染色的处理。左上作为良性的乳腺管内乳头状瘤的 HE 染色照片,右上作为恶性的非浸润性乳腺管内癌的 HE 染色照片。左下是进行了 LAT1 处理的乳腺管内乳头状瘤的照片,右下是进行了 LAT1 处理的非浸润性乳腺管内癌的照片。由图 2 可知,在乳腺管内乳头状瘤中,几乎没有看到 LAT1 的表达,另一方面,在非浸润性乳腺管内癌的细胞膜中观察到 LAT1 的强表达。与乳腺管内乳头状瘤组的 LAT1 表达分数相比较,非浸润性乳腺管内癌组的 LAT1 表达分数显著高。因此,通过将 LAT1 作为生物标记,可以利用简便的方法对目前难以鉴别的乳腺管内乳头状瘤和非浸润性乳腺管内癌进行诊断。

[0101] 乳腺管内肿瘤中,良性的乳腺管内乳头状瘤与恶性的非浸润性乳腺管内癌的鉴别在组织诊断上很重要,对于判断手术切除的必要性是不可缺的。然而,对于两种肿瘤的鉴别,利用以往的基于 HE 染色标本的病理组织诊断方法中,可靠的鉴别要素并不明确,难以鉴别的病变多。通过本发明发现,在良性的乳腺管内乳头状瘤中,LAT1 表达极低,与 LAT1 高表达的恶性的非浸润性乳腺管内癌成为对照。因此,通过 LAT1 的免疫组织学的表达的评价,可以鉴别良性或恶性。

[0102] (三阴性乳腺癌的诊断)

[0103] 图 3 示出 ER(雌激素受体)、PgR(孕酮受体)、HER2 均为阴性的三阴性乳腺癌细胞中的 LAT1 表达的观察结果。从左侧开始依次示出利用 HE(苏木精、伊红)染色(标准染色)、HER2、ER、PgR、LAT1 进行处理后的情况。该例是 ER、PgR 和 HER2 均为阴性的三阴性乳腺癌细胞在 LAT1 中显示强度 3(高强度)的阳性的示例。三阴性组 17 例中有 14 例(约 83%)为 LAT1 高表达(分数为 6 以上),因此认为 LAT1 作为三阴性乳腺癌的生物标记是有用的。

[0104] 浸润癌中,对于三阴性乳腺癌目前为止没有有效的分子靶向治疗,在该三阴性乳腺癌组的大多数中,确认了 LAT1 的高表达。由于三阴性乳腺癌在临床上预后不良的病例较多,因此该观察结果与 LAT1 高表达的前列腺癌例较 LAT1 低表达例而言预后不良的情况相一致。因此,提示对于三阴性乳腺癌而言,抗 LAT1 分子靶向疗法(抗 LAT1 抗体、作用于

LAT1 转运蛋白的物质等)是有用的,今后能够期待以 LAT1 作为靶向的抗癌疗法的引入。

[0105] 图 4 示出浸润性癌中 HER2 阴性例(在 Hercep 测试中分数为 0)且 LAT1 阳性的乳腺癌的示例。从左侧依次为用 ER、PgR、HER2 和 LAT1 进行处理的情况。该例中,ER 和 PgR 在核中显示阳性,HER2 显示阴性,LAT1 在细胞膜中显示中强度的阳性(强度 2)。

[0106] 图 5 示出在浸润性癌中 HER2 阳性例(在 Hercep 测试中分数为 3)且 LAT1 为高表达的阳性的乳腺癌的示例。从左侧依次为 HE(苏木精、伊红)染色的情况、经 HER2 处理后的情况、经 LAT1 处理后的情况。结果确认了,HER2 阳性例(Hercep 测试中分数为 3)中 LAT1 抗体也为强度 3(高强度)的染色。图 4 和图 5 中,在浸润性癌中 HER2 阳性例(Hercep 测试中分数为 3)组中的 LAT1 表达分数与 HER2 阴性例(Hercep 测试中分数为 0)组相比显著地高。

[0107] 根据以上,LAT1 可以成为用于鉴别以往难以诊断的乳腺管内肿瘤的良性或恶性的新的诊断工具。另外,LAT1 可以成为目前为止的对 ER、PrG 和 HER2 均为阴性的三阴型乳腺癌的治疗极其有望的生物标记。

[0108] 实施例

[0109] 以下,通过实施例更具体地说明本发明,本发明不限于实施例的任何限定。

[0110] 参考例 1 实验样品的选取

[0111] 本发明人从所属机构中自 2005 年至 2009 年外科切除的乳腺的肿瘤性病变中进行随机抽取,使用乳腺管内乳头状瘤(intraductal papilloma)10 例、非浸润性乳腺管内癌(DCIS)10 例和浸润癌(invasive carcinoma)67 例共计 87 例的手术材料的病理测试体。其中,ER、PgR、HER2 均为阴性的三阴型浸润癌为 17 例。

[0112] 实施例 1 使用抗 LAT 抗体的染色

[0113] 对参考例 1 中所有选取的乳腺的肿瘤性病变制作 10% 福尔马林固定石蜡包埋块,再从肿瘤性病变的最大比例面的代表块制作 3 $\mu$ m 的薄切切片,在 5 分钟微波赋活后,使本发明人制备的小鼠抗 LAT1 单克隆抗体(参考非专利文献 1 的 23631 页图 3A)在 4 $^{\circ}$ C 以下的温度反应过夜。添加 DAKO ChemMate ENVISION System HRP 试剂盒的通用抗体,使之在室温下反应 30 分钟后,利用 DAB(3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐)底物溶液使其显色。核染色中实施甲基绿或 Mayer 氏苏木精染色。ER 和 PgR 的免疫染色中使用 Ventana XT 系统(Ventana Japan、东京、日本),HER2 的免疫染色通过 DAKO EGFR pharmDx 试剂盒(Dako North America Inc.,卡平特里亚,CA,USA)来进行。另外,对于 LAT2,使用兔抗人 LAT2 多克隆抗体(抗 hEST3A-N 抗体、株式会社转基因、熊本)。

[0114] 结果,在大多数的乳腺癌细胞中表达 LAT1(LAT1 表达分数为 0~9)、LAT2 虽然是轻度的但也表达了(LAT2 表达分数为 0~3)。另一方面,正常细胞中的 LAT1 表达分数为 0~1, LAT2 分数为 1~4。

[0115] 关于 LAT1 表达,通过对 Sinicrope 的方法(参考非专利文献 11)改良后的方法(参考非专利文献 4),将由表达的强度(intensity)[0(阴性)、1(轻度的阳性)、2(中度的阳性)、3(强度的阳性)]与表达区域的面积(area)[0(阴性)、1(局部的、10%以下)、2(部分的、大于 10%且 30%)、3(弥漫性、大于 30%)]的乘积而得的值作为评价价值(分数)。关于统计处理,以各组的平均值 $\pm$ 标准偏差来表示,2 组间的比较采用非参数的曼-惠特尼 U(Mann-Whitney U) 检验,危险率 5% 以下、有显著性。

[0116] 结果

[0117] 将实施例 1 的结果示于图 6。图 6 中示出乳腺肿瘤中 LAT1 表达的比较。

[0118] (1) 非浸润性乳腺管内癌和乳腺管内乳头状瘤的 LAT1 表达的比较

[0119] 与良性的乳腺管内乳头状瘤 (intraductal papilloma) 组的  $1.5 \pm 2.1$  相比较,恶性的非浸润性乳腺管癌 (DCIS) 组的 LAT1 表达分数显著性高 ( $p=0.0156$ ),其值为  $5.1 \pm 3.2$ 。

[0120] (2) HER2 阳性例与阴性例的 LAT1 表达的比较

[0121] 浸润性癌 (invasive carcinoma) 中,与 HER2 阴性例 (Hercep 测试中的分数为 0) 组的  $3.6 \pm 2.4$  相比较, HER2 阳性例 (Hercep 测试中的分数为 3) 组的 LAT1 表达分数显著性高 ( $p=0.0008$ ),其值为  $6.6 \pm 2.8$ 。由此,HER2 阳性例的 LAT1 分数高,从细胞增殖的方面可以说恶性程度高。

[0122] (3) 三阴性乳腺癌组中的 LAT1 表达

[0123] ER、PgR 和 HER2 均为阴性的三阴性乳腺癌组的大多数为 LAT1 高表达病例 (分数为 6 以上的是 17 例中 14 例,即约 83%),该 17 例的 LAT1 表达分数显示高值,为  $6.8 \pm 2.6$ 。由此可以认为,三阴性乳腺癌组的大多数中 LAT1 分数高,将 LAT1 作为对象的分子靶向治疗是有效的。

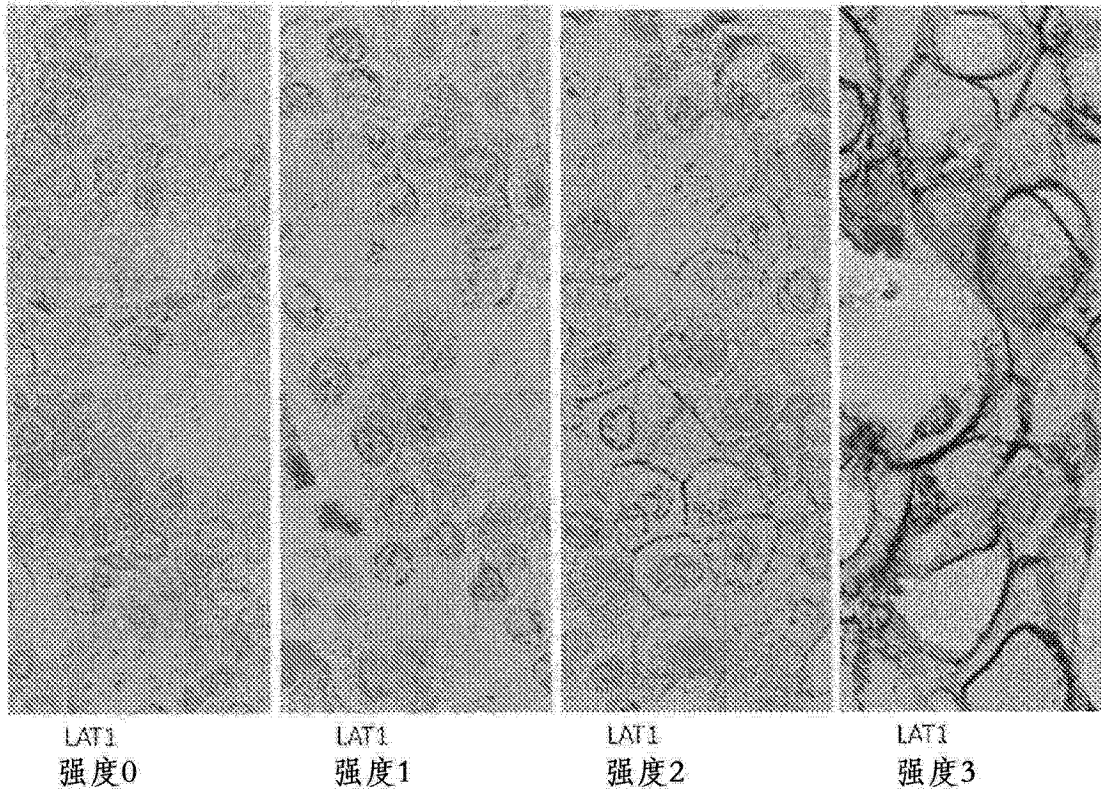


图 1

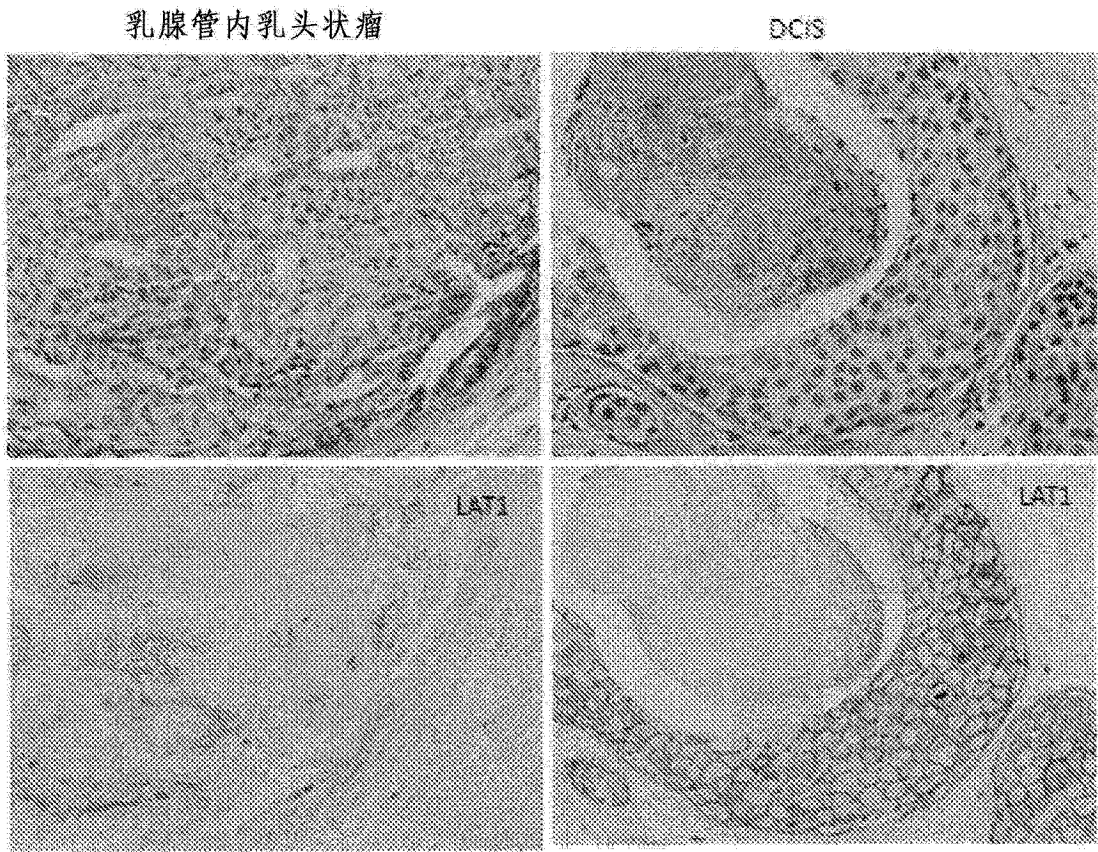


图 2

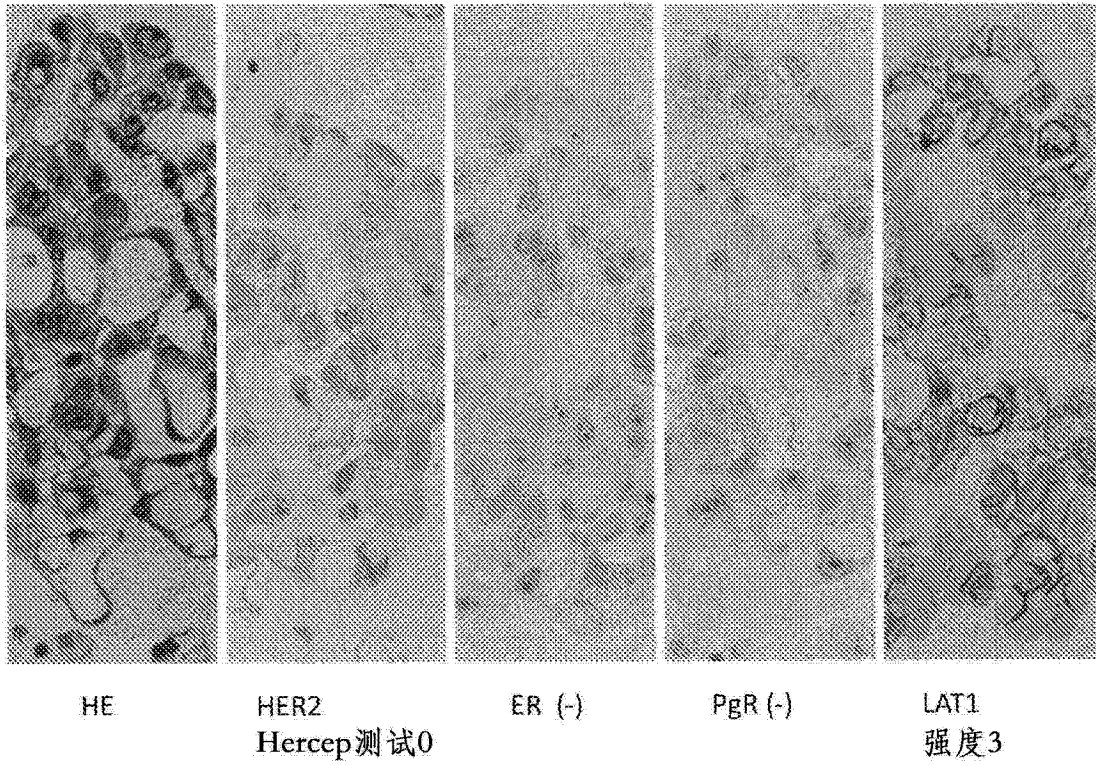


图 3

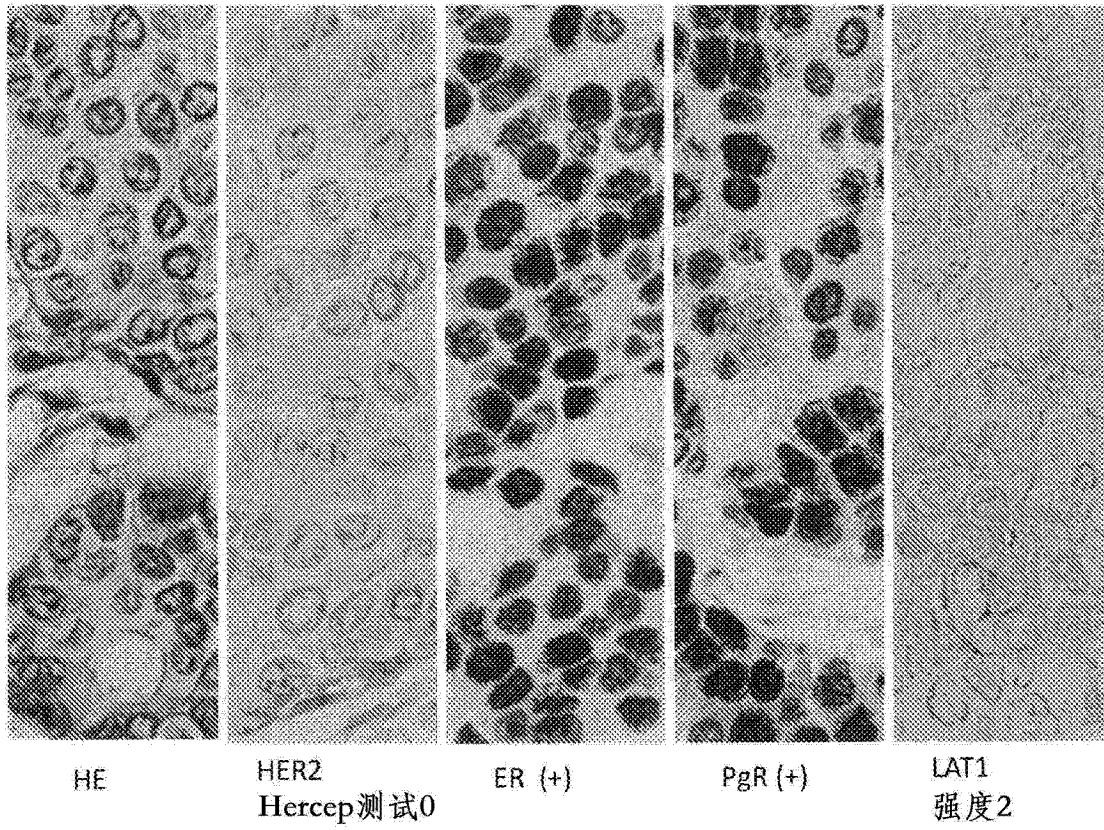


图 4

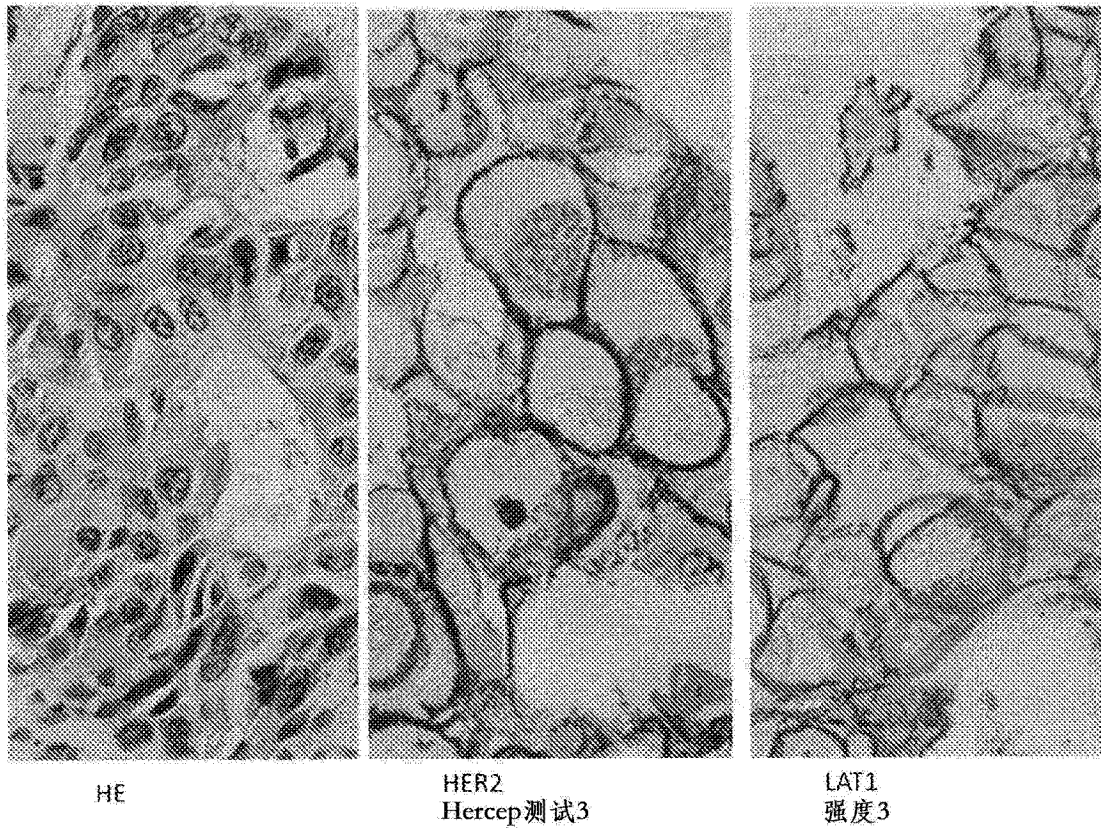


图 5

乳腺肿瘤性病变中免疫反应性LAT1表达

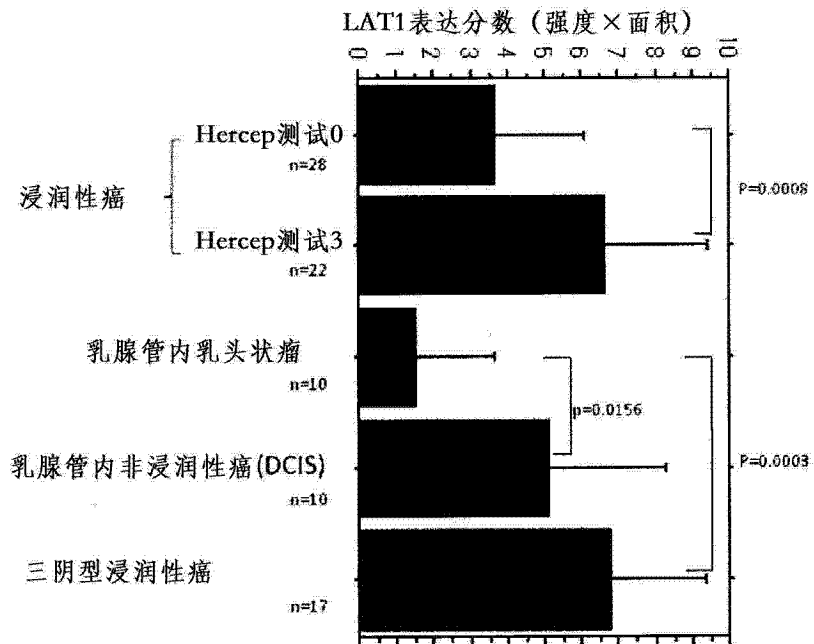


图 6

专利名称(译)	乳腺癌的生物标记		
公开(公告)号	<a href="#">CN103547923A</a>	公开(公告)日	2014-01-29
申请号	CN201280023071.2	申请日	2012-04-13
申请(专利权)人(译)	J制药股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	J制药股份有限公司		
[标]发明人	远藤仁 冈安勋		
发明人	远藤仁 冈安勋		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53 C07K16/28		
CPC分类号	G01N33/57415 C07K16/28		
优先权	2011091378 2011-04-15 JP		
其他公开文献	CN103547923B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供作为乳腺癌治疗的方针的标记，其是含有抗LAT1单克隆抗体的乳腺癌的诊断试剂盒和/或诊断方法。乳腺管内肿瘤性病变中，与良性的乳腺管内乳头状瘤相比较，恶性的乳腺管内非浸润性癌中LAT1显著高表达，因此抗LAT1单克隆抗体对于两病变的鉴别有用。另外，作为以往的乳腺癌的分子靶向标记的ER、PgR、HER2均为阴性、且没有适合的分子靶向治疗方法的三阴型浸润癌的大多数中高表达LAT1，因此LAT1成为乳腺癌的新分子靶向标记，利用本免疫组织学的方法诊断LAT1的表达，并且以LAT1为对象的分子靶向治疗方法的开发是有效的。

乳腺肿瘤性病变中免疫反应性LAT1表达

