(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2010-14689
(P2010-14689A)
(43)公開日　平成22年1月21日(2010.1.21)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	M	2G045
G01N 33/574	(2006.01)	G01N	33/574	A	4B024
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	Z	4B063
G01N 33/15	(2006.01)	G01N	33/15	Z	
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAA	

審査請求 未請求　請求項の数 27　ＯＬ　（全 23 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2008-276003 (P2008-276003)
(22)出願日　平成20年10月27日 (2008.10.27)
(31)優先権主張番号　特願2008-149728 (P2008-149728)
(32)優先日　平成20年6月6日 (2008.6.6)
(33)優先権主張国　日本国 (JP)

（出願人による申告）平成２０年度、文部科学省、地域科学技術振興事業委託事業、産業技術力強化法第１９条の適用を受ける特許出願

(71)出願人　590002389
静岡県
静岡県静岡市葵区追手町９番６号
(74)代理人　100107984
弁理士　廣田　雅紀
(74)代理人　100102255
弁理士　小澤　誠次
(74)代理人　100096482
弁理士　東海　裕作
(74)代理人　100123168
弁理士　大▲高▼　とし子
(74)代理人　100120086
弁理士　▲高▼津　一也
(74)代理人　100131093
弁理士　堀内　真

最終頁に続く

(54)【発明の名称】プロテオミクス解析を用いたメラノーママーカーの同定

(57)【要約】
【課題】本発明の課題は、生体試料中のメラノーママーカーの検出又は定量により、簡便かつ迅速にメラノーマの判定を行う方法や、メラノーマの判定用キットや、メラノーマ患者の予後予測方法等を提供することにある。
【解決手段】発明者らは、プロテオミクス学的手法を用いてメラノーマ患者血漿中に含まれるタンパクを網羅的に解析し、健常者血漿中のタンパクと比較検討することによって、メラノーマに特異的なタンパクの同定を試みた。一般的に腫瘍マーカーの血中含有量は、がんの進行に伴い上昇する傾向があるため、発明者らは、腫瘍マーカーが高発現していると考えられるステージIVの患者血漿を採取し、二次元カラムクロマトグラフィー及び質量分析による網羅的なタンパク解析を行った。その結果、メラノーマ患者血漿中に特異的に発現する９つのタンパクを同定することに成功し、本発明を完成するに至った。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトから採取した生体試料中に存在する、以下のメラノーママーカー遺伝子から選ばれる少なくとも１以上の遺伝子を検出又は定量することを特徴とするメラノーマの判定方法。
beta-actin（β－ＡＣＴ）遺伝子、complement component 6 precursor（ＣＣ６Ｐ）遺伝子、Plasminogen（ＰＬＡ）遺伝子、pro-platelet basic protein precursor（ＰＰＢＰ）遺伝子、Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 precursor（ＩＡＩＨ４）遺伝子、apolipoprotein F precursor（ＡｐｏＦ）遺伝子、Complement factor H-related protein 1 precursor（ＦＨＲ１）遺伝子、ハプトグロブリン（ＨＰ）遺伝子、及びSerum amyloid A2（ＳＡＡ２）遺伝子
【請求項２】
ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子から選ばれる少なくとも１以上の遺伝子を検出又は定量することを特徴とする請求項１に記載のメラノーマの判定方法。
【請求項３】
少なくとも１以上のメラノーママーカー遺伝子に特異的に結合する分子を用いて、メラノーママーカー遺伝子を検出又は定量することを特徴とする請求項１又は２記載のメラノーマの判定方法。
【請求項４】
メラノーママーカー遺伝子に特異的に結合する分子が、ヌクレオチド又はタンパクであることを特徴とする請求項３記載のメラノーマの判定方法。
【請求項５】
ヒトから採取した生体試料中に存在する、以下のメラノーママーカータンパクから選ばれる少なくとも１以上のタンパクを検出又は定量することを特徴とするメラノーマの判定方法。
beta-actin（β－ＡＣＴ）タンパク、complement component 6 precursor （ＣＣ６Ｐ）タンパク、Plasminogen（ＰＬＡ）タンパク、pro-platelet basic protein precursor（ＰＰＢＰ）タンパク、Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 precursor（ＩＡＩＨ４）タンパク、apolipoprotein F precursor（ＡｐｏＦ）タンパク、Complement factor H-related protein 1 precursor（ＦＨＲ１）タンパク、ハプトグロブリン（ＨＰ）タンパク、及びSerum amyloid A2（ＳＡＡ２）タンパク
【請求項６】
ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＦＨＲ１タンパク、及びＳＡＡ２タンパクから選ばれる少なくとも１以上のタンパクを検出又は定量することを特徴とする請求項５記載のメラノーマの判定方法。
【請求項７】
少なくとも１以上のメラノーママーカータンパクに特異的に結合する分子を用いて、メラノーママーカータンパクを検出又は定量することを特徴とする請求項５又は６記載のメラノーマの判定方法。
【請求項８】
メラノーママーカータンパクに特異的に結合する分子が、抗体又はアプタマーであることを特徴とする請求項７記載のメラノーマの判定方法。
【請求項９】
生体試料が、血液、又は血清若しくは血漿であることを特徴とする請求項１～８のいずれか記載のメラノーマの判定方法。
【請求項１０】
以下のメラノーママーカー遺伝子から選ばれる少なくとも１以上の遺伝子に特異的に結合し、該遺伝子を検出又は定量することができる分子を備えたことを特徴とするメラノーマの判定用キット。
β－ＡＣＴ遺伝子、ＣＣ６Ｐ遺伝子、ＰＬＡ遺伝子、ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子

、ＡｐｏＦ遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、ＨＰ遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子
【請求項１１】
ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子から選ばれる少なくとも１以上の遺伝子を備えたことを特徴とする請求項１０記載の判定用キット。
【請求項１２】
メラノーママーカー遺伝子に特異的に結合する分子が、ヌクレオチド又はタンパクであることを特徴とする請求項１０又は１１記載のメラノーマの判定用キット。
【請求項１３】
以下のメラノーママーカータンパクから選ばれる少なくとも１以上のタンパクに特異的に結合し、該タンパクを検出又は定量することができる分子を備えたことを特徴とするメラノーマの判定用キット。
β－ＡＣＴタンパク、ＣＣ６Ｐタンパク、ＰＬＡタンパク、ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＡｐｏＦタンパク、ＦＨＲ１タンパク、ＨＰタンパク、及びＳＡＡ２タンパク
【請求項１４】
ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＦＨＲ１タンパク、及びＳＡＡ２タンパクから選ばれる少なくとも１以上のタンパクを備えたことを特徴とする請求項１３記載の判定用キット。
【請求項１５】
メラノーママーカータンパクに特異的に結合する分子が、抗体又はアプタマーであることを特徴とする請求項１３又は１４記載のメラノーマの判定用キット。
【請求項１６】
被検物質の存在下で培養したメラノーマ細胞における、以下のメラノーママーカー遺伝子から選ばれる少なくとも１以上の遺伝子を検出又は定量し、被検物質の非存在下における場合と比較・評価することを特徴とするメラノーマ治療剤のスクリーニング方法。
β－ＡＣＴ遺伝子、ＣＣ６Ｐ遺伝子、ＰＬＡ遺伝子、ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＡｐｏＦ遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、ＨＰ遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子
【請求項１７】
ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子から選ばれる少なくとも１以上の遺伝子を検出又は定量する請求項１６に記載のメラノーマ治療剤のスクリーニング方法。
【請求項１８】
被検物質の存在下で培養したメラノーマ細胞における、以下のメラノーママーカータンパクから選ばれる少なくとも１以上のタンパクを検出又は定量し、被検物質の非存在下における場合と比較・評価することを特徴とするメラノーマ治療剤のスクリーニング方法。
β－ＡＣＴタンパク、ＣＣ６Ｐタンパク、ＰＬＡタンパク、ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＡｐｏＦタンパク、ＦＨＲ１タンパク、ＨＰタンパク、及びＳＡＡ２タンパク
【請求項１９】
ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＦＨＲ１タンパク、及びＳＡＡ２タンパクから選ばれる少なくとも１以上のタンパクを検出又は定量することを特徴とする請求項１８に記載のメラノーマ治療剤のスクリーニング方法。
【請求項２０】
メラノーマの腫瘍マーカー遺伝子として、以下の遺伝子を使用する方法。
β－ＡＣＴ遺伝子、ＣＣ６Ｐ遺伝子、ＰＬＡ遺伝子、ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＡｐｏＦ遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、ＨＰ遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子
【請求項２１】
メラノーマの腫瘍マーカーとして、以下のタンパクを使用する方法。
β－ＡＣＴタンパク、ＣＣ６Ｐタンパク、ＰＬＡタンパク、ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＡｐｏＦタンパク、ＦＨＲ１タンパク、ＨＰタンパク、及びＳＡＡ２タンパ

ク
【請求項２２】
ヒトから採取した生体試料中に存在する、以下の遺伝子から選ばれる少なくとも１以上のメラノーママーカー遺伝子を定量することを特徴とするメラノーマ患者の予後予測方法。
β－ＡＣＴ遺伝子、ＣＣ６Ｐ遺伝子、ＰＬＡ遺伝子、ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＡｐｏＦ遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、ＨＰ遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子
【請求項２３】
ＰＰＢＰ遺伝子を定量することを特徴とする請求項２２に記載のメラノーマ患者の予後予測方法。
【請求項２４】
ヒトから採取した生体試料中に存在する、以下のメラノーママーカータンパクから選ばれる少なくとも１以上のタンパクを定量することを特徴とするメラノーマ患者の予後予測方法。
β－ＡＣＴタンパク、ＣＣ６Ｐタンパク、ＰＬＡタンパク、ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＡｐｏＦタンパク、ＦＨＲ１タンパク、ＨＰタンパク、及びＳＡＡ２タンパク
【請求項２５】
ＰＰＢＰタンパクを定量することを特徴とする請求項２４記載のメラノーマ患者の予後予測方法。
【請求項２６】
メラノーマ患者の予後予測因子として、以下の遺伝子を使用する方法。
β－ＡＣＴ遺伝子、ＣＣ６Ｐ遺伝子、ＰＬＡ遺伝子、ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＡｐｏＦ遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、ＨＰ遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子
【請求項２７】
メラノーマ患者の予後予測因子として、以下のタンパクを使用する方法。
β－ＡＣＴタンパク、ＣＣ６Ｐタンパク、ＰＬＡタンパク、ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＡｐｏＦタンパク、ＦＨＲ１タンパク、ＨＰタンパク、及びＳＡＡ２タンパク
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ヒトから採取した生体試料中の、メラノーママーカー遺伝子又はメラノーママーカータンパクを検出又は定量することを特徴とするメラノーマの判定方法や、メラノーマの判定用キットや、メラノーマ患者の予後予測方法等に関する。
【背景技術】
【０００２】
メラノーマは悪性黒色腫と呼ばれる皮膚がんの一種であり、皮膚を構成するメラニン細胞（色素細胞、メラノサイトとも呼ばれる）又はメラニン細胞関連母斑細胞のがん化したものである（例えば、非特許文献１）。皮膚がんの種類は多様であるが、メラノーマは極めて悪性度が高く、進行が早いため、皮膚がんによる死亡者の約８割がメラノーマ患者である。日本におけるメラノーマの発生数は人口１０万人当たり１．５～２人程度であり、年間１５００人～２０００人程度発生していると推測されている。一方、欧米の発生率は人口１０万人あたり１０数人以上であり、特にオーストラリアの発生率は人口１０万人あたり２０数人以上にのぼり、世界一発生数が高いと言われている。近年、欧米やオーストラリアだけでなく日本においてもメラノーマの罹患率及び死亡率は増加傾向にあり、大きな問題となってきている。
【０００３】
メラノーマは初期段階の治療により完治しやすいため、早期の診断／治療が極めて重要とされている。しかし、その診断は難しい上に、皮膚生検を行うことで転移を誘発する可能性が指摘されていることから、病理診断に必要な組織標本を容易に得ることができず、

未だに視診と触診のみで判断されるケースが多い。これらのことから、メラノーマの確実な早期診断のための腫瘍マーカーの開発が急がれている。

【０００４】

現在までに、メラノーマの腫瘍マーカーとして、５－Ｓ－ＣＤ(5-S-cysteinyldopa)、ＭＩＡ (melanoma inhibitory activity)、ＮＳＥ(neurone-specific enolase)、ＬＡＳＡ－Ｐ(lipid-bound sialic acid)、ＬＤＨ(lactate dehydrogenase) 、Ｓ１００等が知られている（例えば、非特許文献２）。また、グリピカン３（ｇｌｙｐｉｃａｎ－３；ＧＰＣ３）（例えば、特許文献１）や、ＳＰＡＲＣ（Secreted protein,acidic rich in cysteine）（別名osteonectinまたはBM-40）（例えば、特許文献２）がメラノーマの腫瘍マーカーとして提案されている。それらのいくつかは、病状のモニタリングや治療効果の予測のためのマーカーとして有効であることが報告されているが、メラノーマの早期診断においては感度や特異性の上で限界があることが知られている。このため、メラノーマの早期診断用マーカーの同定は急務であり、患者のＱＯＬ向上につながると言える。また、臨床現場では、メラノーマの早期診断だけでなく、治療のモニタリングや再発予測、さらには予後診断においても有効な腫瘍マーカーの同定が期待されている。

【特許文献１】ＷＯ２００５／０３９３８０

【特許文献２】ＷＯ２００６／０４３３６２

【非特許文献１】「細胞および分子免疫学」（eds）Abbas A. K., Lechtman, A.H., Pober, J.S.; W.B. Saunders Company, Philadelphia: 340-341 (1991)

【非特許文献２】Brochez L., Br. J. Dermatol. 149: 256-268 (2000)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

本発明の課題は、生体試料中のメラノーママーカーの検出又は定量により、簡便かつ迅速にメラノーマの判定を行う方法や、メラノーマの判定用キットや、メラノーマ患者の予後予測方法等を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【０００６】

最近、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）又は２次元電気泳動と質量分析（ＭＳ）を組み合わせたプロテオミクス学的手法を用いたタンパクの同定法が確立されつつあり、試料中に混在する多くのタンパクを、短時間で網羅的に解析することが可能となってきている。この手法を用いて新規の腫瘍マーカーを同定しようとする試みは数多くなされているが、メラノーマ患者の血漿を用いた解析報告はほとんどなく、未だ十分に研究されていない。発明者らは、プロテオミクス学的手法を用いて、メラノーマ患者血漿中に含まれるタンパクを網羅的に解析し、健常者血漿中のタンパクと比較検討することによって、メラノーマに特異的なタンパクの同定を試みた。一般的に腫瘍マーカーの血中含有量は、がんの進行に伴い上昇する傾向があるため、発明者らは、腫瘍マーカーが高発現していると考えられる臨床病期第ＩＶ期の患者血漿を採取し、二次元カラムクロマトグラフィー及び質量分析による網羅的なタンパク解析を行った。その結果、メラノーマ患者血漿中に特異的に発現する９つのタンパクを同定することに成功し、本発明を完成するに至った。また、同定したタンパク質のうちpro-platelet basic protein precursor（ＰＰＢＰ）に関して、現在最も臨床現場で利用されている５－Ｓ－ＣＤとメラノーママーカーとしての能力を比較したところ、ＰＰＢＰは、感度および陰性予測値において５－Ｓ－ＣＤより優れており、メラノーマ症例のモニタリングにもＰＰＢＰは５－Ｓ－ＣＤより有用であることが確認された。

【０００７】

すなわち本発明は、（１）ヒトから採取した生体試料中に存在する、beta-actin（β－ＡＣＴ）遺伝子、complement component 6 precursor（ＣＣ６Ｐ）遺伝子、Plasminogen（ＰＬＡ）遺伝子、pro-platelet basic protein precursor（ＰＰＢＰ）遺伝子、Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 precursor（ＩＡＩＨ４）遺伝子、apolipopro

tein F precursor（ＡｐｏＦ）遺伝子、Complement factor H-related protein 1 precursor（ＦＨＲ１）遺伝子、ハプトグロブリン（ＨＰ）遺伝子、及びSerum amyloid A2（ＳＡＡ２）遺伝子から選ばれる少なくとも１以上のメラノーママーカー遺伝子を検出又は定量することを特徴とするメラノーマの判定方法や、（２）ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子から選ばれる少なくとも１以上の遺伝子を検出又は定量することを特徴とする上記（１）に記載のメラノーマの判定方法や、（３）少なくとも１以上のメラノーママーカー遺伝子に特異的に結合する分子を用いて、メラノーママーカー遺伝子を検出又は測定することを特徴とする上記（１）又は（２）記載のメラノーマの判定方法や、（４）メラノーママーカー遺伝子に特異的に結合する分子が、ヌクレオチド又はタンパクであることを特徴とする上記（３）記載のメラノーマの判定方法に関する。

【０００８】

また本発明は、（５）ヒトから採取した生体試料中に存在する、beta-actin（β－ＡＣＴ）タンパク、complement component 6 precursor （ＣＣ６Ｐ）タンパク、Plasminogen（ＰＬＡ）タンパク、pro-platelet basic protein precursor（ＰＰＢＰ）タンパク、Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 precursor（ＩＡＩＨ４）タンパク、apolipoprotein F precursor（ＡｐｏＦ）タンパク、Complement factor H-related protein 1 precursor（ＦＨＲ１）タンパク、ハプトグロブリン（ＨＰ）タンパク、及びSerum amyloid A2（ＳＡＡ２）タンパクから選ばれる少なくとも１以上のメラノーママーカータンパクを検出又は測定することを特徴とするメラノーマの判定方法や、（６）ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＦＨＲ１タンパク、及びＳＡＡ２タンパクから選ばれる少なくとも１以上のタンパクを検出又は定量することを特徴とする上記（５）記載のメラノーマの判定方法や、（７）少なくとも１以上のメラノーママーカータンパクに特異的に結合する分子を用いて、メラノーママーカータンパクを検出又は測定することを特徴とする上記（５）又は（６）記載のメラノーマの判定方法や、（８）メラノーママーカータンパクに特異的に結合する分子が、抗体又はアプタマーであることを特徴とする上記（７）記載のメラノーマの判定方法や、（９）生体試料が、血液、又は血清若しくは血漿であることを特徴とする上記（１）～（８）のいずれか記載のメラノーマの判定方法に関する。

【０００９】

さらに本発明は、（１０）β－ＡＣＴ遺伝子、ＣＣ６Ｐ遺伝子、ＰＬＡ遺伝子、ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＡｐｏＦ遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、ＨＰ遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子から選ばれる少なくとも１以上のメラノーママーカー遺伝子に特異的に結合し、該遺伝子を検出又は定量することができる分子を備えたことを特徴とするメラノーマの判定用キットや、（１１）ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子から選ばれる少なくとも１以上の遺伝子を備えたことを特徴とする上記（１０）記載の判定用キットや、（１２）メラノーママーカー遺伝子に特異的に結合する分子が、ヌクレオチド又はタンパクであることを特徴とする上記（１０）又は（１１）記載のメラノーマの判定用キットや、（１３）β－ＡＣＴタンパク、ＣＣ６Ｐタンパク、ＰＬＡタンパク、ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＡｐｏＦタンパク、ＦＨＲ１タンパク、ＨＰタンパク、及びＳＡＡ２タンパクから選ばれる少なくとも１以上のメラノーママーカータンパクに特異的に結合し、該タンパクを検出又は定量することができる分子を備えたことを特徴とするメラノーマの判定用キットや、（１４）ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＦＨＲ１タンパク、及びＳＡＡ２タンパクから選ばれる少なくとも１以上のタンパクを備えたことを特徴とする上記（１３）記載の判定用キットや、（１５）メラノーママーカータンパクに特異的に結合する分子が、抗体又はアプタマーであることを特徴とする上記（１３）又は（１４）記載のメラノーマの判定用キットに関する。

【００１０】

また本発明は、（１６）被検物質の存在下で培養したメラノーマ細胞における、β－ＡＣＴ遺伝子、ＣＣ６Ｐ遺伝子、ＰＬＡ遺伝子、ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＡｐｏＦ遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、ＨＰ遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子から選ばれる少なくとも

１以上のメラノーママーカー遺伝子を検出又は定量し、被検物質の非存在下における場合と比較・評価することを特徴とするメラノーマ治療剤のスクリーニング方法や、（１７）ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子から選ばれる少なくとも１以上の遺伝子を検出又は定量する上記（１６）に記載のメラノーマ治療剤のスクリーニング方法や、（１８）被検物質の存在下で培養したメラノーマ細胞における、β－ＡＣＴタンパク、ＣＣ６Ｐタンパク、ＰＬＡタンパク、ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＡｐｏＦタンパク、ＦＨＲ１タンパク、ＨＰタンパク、及びＳＡＡ２タンパクから選ばれる少なくとも１以上のメラノーママーカータンパクを検出又は定量し、被検物質の非存在下における場合と比較・評価することを特徴とするメラノーマ治療剤のスクリーニング方法や、（１９）ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＦＨＲ１タンパク、及びＳＡＡ２タンパクから選ばれる少なくとも１以上のタンパクを検出又は定量することを特徴とする上記（１８）に記載のメラノーマ治療剤のスクリーニング方法や、（２０）メラノーマの腫瘍マーカー遺伝子として、β－ＡＣＴ遺伝子、ＣＣ６Ｐ遺伝子、ＰＬＡ遺伝子、ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＡｐｏＦ遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、ＨＰ遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子を使用する方法や、（２１）メラノーマの腫瘍マーカーとして、β－ＡＣＴタンパク、ＣＣ６Ｐタンパク、ＰＬＡタンパク、ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＡｐｏＦタンパク、ＦＨＲ１タンパク、ＨＰタンパク、及びＳＡＡ２タンパクを使用する方法に関する

【００１１】

さらに本発明は、（２２）ヒトから採取した生体試料中に存在する、β－ＡＣＴ遺伝子、ＣＣ６Ｐ遺伝子、ＰＬＡ遺伝子、ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＡｐｏＦ遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、ＨＰ遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子から選ばれる少なくとも１以上のメラノーママーカー遺伝子を定量することを特徴とするメラノーマ患者の予後予測方法や、（２３）ＰＰＢＰ遺伝子を定量することを特徴とする上記（２２）に記載のメラノーマ患者の予後予測方法や、（２４）ヒトから採取した生体試料中に存在する、β－ＡＣＴタンパク、ＣＣ６Ｐタンパク、ＰＬＡタンパク、ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＡｐｏＦタンパク、ＦＨＲ１タンパク、ＨＰタンパク、及びＳＡＡ２タンパクから選ばれる少なくとも１以上のメラノーママーカータンパクを定量することを特徴とするメラノーマ患者の予後予測方法や、（２５）ＰＰＢＰタンパクを定量することを特徴とする上記（２４）記載のメラノーマ患者の予後予測方法や、（２６）メラノーマ患者の予後予測因子として、β－ＡＣＴ遺伝子、ＣＣ６Ｐ遺伝子、ＰＬＡ遺伝子、ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＡｐｏＦ遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、ＨＰ遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子を使用する方法や、（２７）メラノーマ患者の予後予測因子として、β－ＡＣＴタンパク、ＣＣ６Ｐタンパク、ＰＬＡタンパク、ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＡｐｏＦタンパク、ＦＨＲ１タンパク、ＨＰタンパク、及びＳＡＡ２タンパクを使用する方法に関する。

【発明の効果】

【００１２】

本発明の方法によれば、血液サンプル中のメラノーママーカーを検出又は定量することにより、血液サンプルの採取源がメラノーマ患者であるかどうかを簡便かつ迅速に判定することができる他、該患者の予後を予測することも可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１３】

本発明のメラノーマの判定方法としては、ヒトから採取した生体試料中に存在するメラノーママーカー遺伝子、具体的には、beta-actin（β－ＡＣＴ）遺伝子、complement component 6 precursor （ＣＣ６Ｐ）遺伝子、Plasminogen（ＰＬＡ）遺伝子、pro-platelet basic protein precursor（ＰＰＢＰ）遺伝子、Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 precursor（ＩＡＩＨ４）遺伝子、apolipoprotein F precursor（ＡｐｏＦ）遺伝子、Complement factor H-related protein 1 precursor（ＦＨＲ１）遺伝子、ハプトグロブリン（ＨＰ）遺伝子、及びSerum amyloid A2（ＳＡＡ２）遺伝子（以下、これらを総称して「本件メラノーママーカー遺伝子」ということがある）から選ばれる少なくとも

１以上のメラノーママーカー遺伝子を検出又は定量する方法や、ヒトから採取した生体試料中に存在するメラノーママーカータンパク、具体的には、beta-actin（β－ＡＣＴ）タンパク、complement component 6 precursor （ＣＣ６Ｐ）タンパク、Plasminogen（ＰＬＡ）タンパク、pro-platelet basic protein precursor（ＰＰＢＰ）タンパク、Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 precursor（ＩＡＩＨ４）タンパク、apolipoprotein F precursor（ＡｐｏＦ）タンパク、Complement factor H-related protein 1 precursor（ＦＨＲ１）タンパク、ハプトグロブリン（ＨＰ）タンパク、及びSerum amyloid A 2（ＳＡＡ２）タンパク（以下、これらを総称して「本件メラノーママーカータンパク」ということがある）から選ばれる少なくとも１以上のメラノーママーカータンパクを検出又は定量する方法であれば、特に制限されるものではなく、上記生体試料としては、例えば、血液、血清、血漿等の血液由来のサンプルやリンパ液、尿、唾液等の、ヒトから採取された生体試料であれば特に制限されるものではないが、なかでも血液、血清、血漿等の血液由来のサンプル、特に血漿を好例として挙げることができる。なお、本明細書において、「メラノーマ」とは、黒色腫、転移性黒色腫、メラニン細胞又はメラニン細胞関連母斑細胞のいずれかから発生する悪性腫瘍であり、黒色腫、黒色がん、黒色上皮腫、黒色肉腫、表在拡大型黒色腫、結節性黒色腫、悪性ほくろ黒色腫、末端性ほくろ性黒色腫、侵襲性黒色腫、または家族性非定型色素母斑－黒色腫（ＦＡＭ－Ｍ）症候群等を含むものである。

【００１４】

本明細書において、「メラノーママーカー遺伝子から選ばれる少なくとも１以上の遺伝子を検出又は定量する」とは、β－ＡＣＴ遺伝子、ＣＣ６Ｐ遺伝子、ＰＬＡ遺伝子、ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＡｐｏＦ遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、ＨＰ遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子から選ばれる１以上の遺伝子を検出及び／又は定量する限り特に制限さるものではないが、なかでも、ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子から選ばれる１以上の遺伝子を検出及び／又は定量することが好ましい。また、検出及び／又は定量にあたっては、例えば、本件メラノーママーカー遺伝子ＤＮＡを直接検出及び／又は定量してもよいし、該遺伝子のｍＲＮＡやｃＤＮＡを検出及び／又は定量してもよいが、本件メラノーママーカー遺伝子に特異的に結合する分子を用いて検出及び／又は定量することが好ましく、上記分子としては、本件メラノーママーカー遺伝子に特異的に結合するヌクレオチドや、抗体等のタンパク等を具体的に例示することができる。メラノーママーカー遺伝子を検出及び／又は定量するより具体的な方法としては、ＤＮＡやｃＤＮＡを検出又は定量する場合には、本件メラノーママーカー遺伝子に特異的に結合するプライマーやプローブ用の標識化ヌクレオチドを用いたサザンブロット法を、ｍＲＮＡを検出又は定量する場合には、上記プローブを用いたノーザンブロット法等を用いることができる他、マイクロアレイやマイクロチップを用いる方法を適用することもできる。ここで、サザンブロット法やノーザンブロット法に用いるプライマーやプローブ用の標識化ヌクレオチドとしては、本件メラノーママーカー遺伝子のセンス鎖又はアンチセンス鎖と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチドを標識化した標識化ヌクレオチドを挙げることができる。また、マイクロアレイやマイクロチップとしては、本件メラノーママーカー遺伝子に特異的に結合する分子が少なくとも１つ以上固定化されているマイクロアレイ又はマイクロチップを例示することができる。

【００１５】

本明細書において「ストリジェントな条件下」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいい、より具体的には、７０％以上、より好ましくは８５％以上、さらに好ましくは９５％以上の相同性を有するポリヌクレオチド同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いポリヌクレオチド同士がハイブリダイズしない条件、あるいは、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗浄条件である６５℃、１×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、又は０．１×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件を挙げることができる。また、上記「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド」とは、ＤＮＡ又はＲＮＡなどの核酸をプ

ローブとして使用し、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるヌクレオチドを意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のポリヌクレオチドの断片を固定化したフィルターを用いて、０．７～１．０ＭのＮａＣｌ存在下、６５℃でハイブリダイゼーションを行った後、０．１～２倍程度のＳＳＣ溶液（１倍濃度のＳＳＣ溶液の組成は、１５０ｍＭ塩化ナトリウム、１５ｍＭクエン酸ナトリウム）を用い、６５℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるヌクレオチドをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリーマニュアル（Molecular cloning, A laboratory manual）、第３版、第６章に記載の方法で行うことができる。

【００１６】

上記プローブの標識化に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質、ランタニド元素、スピン試薬などを挙げることができ、上記放射性同位元素としては、〔^{125}Ｉ〕、〔^{131}Ｉ〕、〔^{3}Ｈ〕、〔^{14}Ｃ〕、〔^{32}Ｐ〕、〔^{33}Ｐ〕、〔^{35}Ｓ〕、〔^{59}Ｆｅ〕等を、上記酵素としては、β－ガラクトシダーゼ、β－グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等をそれぞれ具体例として挙げることができる。また、上記蛍光物質としては、シアニン蛍光色素（Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社製）等）、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート等を、発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニン等をそれぞれ具体例として挙げることができる。

【００１７】

被検試料（生体試料）中の本件メラノーママーカー遺伝子発現量が微量の場合には、ＤＮＡやＲＮＡをＰＣＲ法やＬＡＭＰ法等により増幅することができる。上記ＰＣＲ法としては、ＲＴ－ＰＣＲ法、リアルタイムＰＣＲ法、コンペティティブＰＣＲ法を具体例として挙げることができる。また、上記ＰＣＲ反応等に用いるプライマーは、例えば、本明細書に記載の本件メラノーママーカー遺伝子の配列情報に基づいて配列を適宜設計し、適当なオリゴヌクレオチド合成装置を用いて作製することができる。

【００１８】

上記リアルタイムＰＣＲ法としては、例えば、細胞内のトータルＲＮＡやｍＲＮＡから逆転写酵素を用いてｃＤＮＡを合成し、このｃＤＮＡを鋳型に目的領域をＰＣＲ反応により増幅し、リアルタイムモニタリング用試薬を用いて増幅産物の生成過程をリアルタイムでモニタリングし、解析する方法を挙げることができ、リアルタイムモニタリング試薬としては、例えば、ＳＹＢＲ（登録商標：MolecularProbes社製）ＧｒｅｅｎＩや、ＴａｑＭａｎ（登録商標：Applied Biosystems社製）プローブ等があげられる。リアルタイムＰＣＲ法は、生体試料から単離したｍＲＮＡ等の微量のＲＮＡであっても簡便に発現を検出又は定量することができるので特に好ましく挙げられる。

【００１９】

上記コンペティティブＰＣＲ法としては、例えば、細胞内のトータルＲＮＡやｍＲＮＡから逆転写酵素を用いてｃＤＮＡを合成し、このｃＤＮＡとＤＮＡコンペティターとを同一チューブ内で反応させる方法や、さらに前記逆転写反応時にｍＲＮＡとともにＲＮＡコンペティターを加えて反応させる方法等を挙げることができる。またコンペティターのプライマー配列以外の内部配列としては、例えば、増幅目的ｍＲＮＡの配列と相同配列を用いることも、非相同な配列を用いることもできる。

【００２０】

また、前述のように本件メラノーママーカー遺伝子の検出又は定量には、マイクロアレイやマイクロチップを用いる方法を適用することができる。通常、マイクロアレイやマイクロチップは、プローブが支持体上の定められた領域に固定されているアレイ又はチップであり、アレイ又はチップの支持体としては、ハイブリダイゼーションに使用可能なものであればよく、例えばガラス、シリコン、プラスチックなどの基板や、ニトロセルロース

膜、ナイロン膜等を好適に用いることができる。マイクロアレイやマイクロチップの製造方法は特に制限されず、例えば、以下に示す文献に記載されたような当業者に公知の任意の方法で製造することができる（ＤＮＡマイクロアレイ 実戦マニュアル、林崎良英 監修（羊土社）；DNA Microarrays -A Practical Approach-, Edited by Mark Schene, Oxford University Press 1999；Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays；Nat Biotechnol. 1996 Dec;14(13):1675-80；Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho MH, Lockhart DJ. Genome-wide expression monitoring in Saccharomyces cerevisiae；Nat Biotechnol. 1997 Dec; 15(13):1359-67）

【００２１】

マイクロアレイやマイクロチップに用いるプローブは、ＤＮＡであってもよいし、ＲＮＡであってもよいが、プローブの安定性に優れていることからＤＮＡプローブであることが好ましい。マイクロアレイやマイクロチップを用いることにより、被検試料中や対照試料中に存在する本件メラノーママーカー遺伝子を非常に簡便に検出又は定量することができる。本発明におけるマイクロアレイやマイクロチップの使用方法については特に制限されず、通常の方法で使用することができる。例えば、生体試料（被検試料や対照試料）からｍＲＮＡを調製し、該ｍＲＮＡを鋳型とした逆転写反応を行う際に、適切な標識を付したプライマーや標識ヌクレオチドを使用することにより、標識されたｃＤＮＡを得ることができる。この標識化ｃＤＮＡとマイクロアレイやマイクロチップ表面上に固定された本発明におけるプローブとの間でハイブリダイゼーションを行わせ、被検試料とのハイブリダイゼーション及び対照試料とのハイブリダイゼーションのそれぞれ結果を比較することにより、本件メラノーママーカー遺伝子の有無の検出や、発現量を定量を行い、メラノーマの判定を行うことができる。ハイブリダイゼーションは公知の方法で実施すればよく、その条件は使用するマイクロアレイ（マイクロチップ）や標識ｃＤＮＡに適したものを適宜選択すればよい。例えば、モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリーマニュアル（Molecular cloning, A laboratory manual）、第３版、第６章に記載を参考にしてハイブリダイゼーション条件を選択することができる。

【００２２】

上記標識化ｃＤＮＡの作製に用いられる標識物質としては、放射性同位元素、蛍光物質、化学発光物質、発光団を有する物質等の物質を用いることができる。例えば、蛍光物質としては、Ｃｙ２、ＦｌｕｏｒＸ、Ｃｙ３、Ｃｙ３．５、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７、イソチオシアン酸フルオレセイン（ＦＩＴＣ）、テキサスレッド、ローダミン等が挙げられる。また、標識化ｃＤＮＡに代えて、標識化ｍＲＮＡや、ｃＤＮＡより転写あるいは増幅された標識化核酸を用いることもできる。標識核酸の検出法は、用いられる標識物質の種類により、適宜選択すればよく、前記Ｃｙ３及びＣｙ５を標識物質として用いる場合、Ｃｙ３は５３２ｎｍ、Ｃｙ５は６３５ｎｍの波長でスキャンすることにより検出又は定量することができる。標識物質からのシグナルの強度を検出又は定量することによって、被検試料中や対照試料中に存在する本件メラノーママーカー遺伝子の発現を検出又は定量することができる。

【００２３】

本明細書中において、「メラノーママーカータンパクから選ばれる少なくとも１以上のタンパクを検出又は定量する」とは、β－ＡＣＴタンパク、ＣＣ６Ｐタンパク、ＰＬＡタンパク、ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＡｐｏＦタンパク、ＦＨＲ１タンパク、ＨＰタンパク、及びＳＡＡ２タンパクから選ばれる少なくとも１以上のタンパクを検出又は定量する限り特に制限されるものではないが、なかでも、ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＦＨＲ１タンパク、及びＳＡＡ２タンパクから選ばれる１種以上のタンパクを検出又は定量することが好ましい。また、検出又は定量にあたっては、本件メラノーママーカータンパクに特異的に結合する分子を用いる方法を好例として挙げることができ、上記分子としては、本件メラノーママーカータンパクに特異的に結合する抗体や、アプ

タマー等を好例として具体的に挙げることができる。

【００２４】

上記抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、２つのエピトープを同時に認識することができる二機能性抗体等を例示することができ、また、これら抗体のＦａｂ断片やＦ（ａｂ’）$_2$断片等も使用しうるが、モノクローナル抗体を用いることが好ましい。これら抗体は、慣用のプロトコールを用いて、本件メラノーママーカータンパク又はそのペプチド断片を抗原として作製することができる。本件マーカータンパクに特異的に結合する抗体を用いて、生体試料中に存在する本件メラノーママーカータンパクを検出又は定量する場合、ＲＩＡ法、ＥＬＩＳＡ法、蛍光抗体法等の公知の免疫学的測定法を用いることができる。また、抗体は適当な標識剤により標識されていてもよく、標識剤は特に制限されないが、前述の標識化ヌクレオチドを作製する際に用いる標識剤と同様の標識剤を用いることができる。

【００２５】

アプタマーは、タンパク、アミノ酸、抗生物質等の各種分子に特異的に結合する核酸分子であり、本発明におけるアプタマーとは、本件メラノーママーカータンパクに特異的に結合するＤＮＡやＲＮＡ等の核酸アプタマーを意味する。これら核酸アプタマーの作製・探索方法としては種々の公知方法を用いることができるが、中でもＳＥＬＥＸ法（Jayasena SD, 1999, Clin. Chem., 45: 1628-1650）やin vitro selection法（Ellington AD, SzostakJW, Nature, 1990 Aug 30; 346 (6287): 818-22.）を具体的に例示することができる。例えば、インビトロでの選択および増幅の反復法によってオリゴヌクレオチドの非常に大きなコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングするための方法であるＳＥＬＥＸ法によって本件メラノーママーカー遺伝子に特異的に結合する核酸アプタマーは、容易に選択することができる。ライブラリーは典型的には、２つの固定された配列領域がフランキングした10^{14}～10^{15}のランダムＤＮＡ配列を含み、固体支持体に固定されている標的分子に結合する配列は、簡単な洗浄工程によって結合していない配列から分離することができ、標的に結合した配列の集団を、２つの固定された配列領域に対するプライマーを使用してＰＣＲにより増幅する。この濃縮されたライブラリーを、次の選択／増幅サイクルに使用することができ、より濃縮されたライブラリーから標的核酸の配列情報を得るために、クローニングした後、配列を決定することによって、目的とする核酸アプタマーを同定することができる。

【００２６】

本発明のメラノーマの判定方法においては、生体試料中に存在する、本件メラノーママーカー遺伝子及び／又は本件メラノーママーカータンパクを検出又は定量する工程の後に、検出又は定量結果を評価する工程を含んでいてもよい。検出又は定量結果の評価は、健常者又はメラノーマ患者から採取した生体試料における検出又は定量の結果を基準として行うことができる。例えば、ある生体試料について、該生体試料の採取源がメラノーマ患者であるかどうか、又は該生体試料中にメラノーマ細胞が含まれるかどうか判定する場合、健常者から採取した生体試料と同種の被検試料（生体試料）中に存在する、本件メラノーママーカー遺伝子や本件メラノーママーカータンパクの検出又は定量を行い、その結果を比較検討することにより判定する。

【００２７】

本発明のメラノーマの判定用キットとしては、本件メラノーママーカー遺伝子及び／又は本件メラノーママーカータンパクから選ばれる少なくとも１以上の遺伝子及び／又はタンパクを検出又は定量することのできるキットであれば特に制限されるものではないが、なかでも、メラノーママーカー遺伝子として、ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子から選ばれる１以上の遺伝子を検出又は定量することのできるキットや、メラノーママーカータンパクとして、ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＦＨＲ１タンパク、及びＳＡＡ２タンパクから選ばれる１以上のタンパクを検出又は定量することのできるキットが好ましい。また、上記メラノーマの判定用キットは、ヌクレオチド又はタンパク等の本件メラノーママーカー遺伝子の少なくとも１以上に特異

的に結合する分子や、抗体やアプタマー等の本件メラノーママーカータンパクから選ばれる１以上のタンパクに特異的に結合する分子を備えていてもよい。なお、上記ヌクレオチド又はタンパク等の本件メラノーママーカー遺伝子の少なくとも１以上に特異的に結合する分子や、抗体やアプタマー等の本件メラノーママーカータンパクから選ばれる１以上のタンパクに特異的に結合する分子等の作製方法は前述のとおりであり、本発明のメラノーマの検出用キットは、さらに、ハイブリダイズ試薬、洗浄剤等他の試薬を含んでいてもよい。

【００２８】

本発明のメラノーマ治療剤のスクリーニング方法としては、被検物質の存在下で培養したメラノーマ細胞における、本件メラノーママーカー遺伝子及び／又は本件メラノーママーカータンパクから選ばれる少なくとも１以上の遺伝子及び／又はタンパクを検出又は定量し、被検物質の非存在下における場合と比較・評価する方法であれば特に制限されるものではないが、なかでも、メラノーママーカー遺伝子として、ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子から選ばれる１以上の遺伝子を検出又は定量する方法や、メラノーママーカータンパクとして、ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＦＨＲ１タンパク、及びＳＡＡ２タンパクから選ばれる１以上のタンパクを検出又は定量する方法を好例として挙げることができる。上記マーカー遺伝子及び／又はマーカータンパクの検出又は定量には、前述の本発明のメラノーマの判定方法と同様の方法を用いることができる。また、上記メラノーマ細胞としては、特に制限されないが、ヒト由来のメラノーマ培養細胞株を用いることが好ましく、具体的には、ＮＣＣ－ＫＴ、Ｇ３６１、ＭＭＧ－１、Ｃ３２、ＲＰＭＩ７９５１、ＫＵ－ＭＥＬＴＣ－１、ＭＥＬ－００１（Ｐ）、ＭＥＷＯ、Ａ３７５、ＴＤＭＭ１、ＳＥＫＩ等を好例として挙げることができる。メラノーマ細胞における、本件メラノーママーカー遺伝子及び／又は本件メラノーママーカータンパクの検出又は定量を行う際には、サンプルとして培養後のメラノーマ細胞をそのまま用いることも、培養細胞溶解物や培養上清等を調整して用いることもできる。

【００２９】

本発明のメラノーマの腫瘍マーカー遺伝子として本件メラノーママーカー遺伝子を使用する方法や、本発明のメラノーマの腫瘍マーカーとして本件メラノーママーカータンパクを使用する方法としては、具体的に、上述のメラノーマの判定方法や、メラノーマの判定用キットや、メラノーマ治療剤のスクリーニング方法や、メラノーマの発症メカニズムの解明における本件メラノーママーカー遺伝子や本件メラノーママーカータンパクの使用方法を挙げることができる。

【００３０】

また、本発明のメラノーマ患者の予後予測方法にとしては、ヒトから採取した生体試料中に存在するメラノーマー遺伝子、具体的には、β－ＡＣＴ遺伝子、ＣＣ６Ｐ遺伝子、ＰＬＡ遺伝子、ＰＰＢＰ遺伝子、ＩＡＩＨ４遺伝子、ＡｐｏＦ遺伝子、ＦＨＲ１遺伝子、ＨＰ遺伝子、及びＳＡＡ２遺伝子から選ばれる少なくとも１以上のメラノーママーカー遺伝子を定量することを特徴とするメラノーマ患者の予後予測方法や、ヒトから採取した生体試料中に存在するメラノーマータンパク、具体的には、β－ＡＣＴタンパク、ＣＣ６Ｐタンパク、ＰＬＡタンパク、ＰＰＢＰタンパク、ＩＡＩＨ４タンパク、ＡｐｏＦタンパク、ＦＨＲ１タンパク、ＨＰタンパク、及びＳＡＡ２タンパクから選ばれる少なくとも１以上のメラノーママーカータンパクを定量することを特徴とするメラノーマ患者の予後予測方法であれば特に制限されるものではないが、なかでも、ＰＰＢＰ遺伝子やＰＰＢＰタンパクを定量する方法が好ましく、より具体的には、生体試料中のＰＰＢＰの発現量と、上記生体試料の採取源である患者の生存期間との間に、正の相関関係があることを指標として、前記患者の予後を予測する方法を例として挙げることができる。なお、生体試料中に存在する、本件メラノーママーカー遺伝子や、本件メラノーママーカータンパクの定量は、上述の検出又は定量する方法に従って行うことができる。本発明のメラノーマ患者の予後因子として本件メラノーママーカー遺伝子を使用する方法や、メラノーマ患者の予後因子として本件メラノーママーカータンパクを使用する方法としては、例えば、上述のメラノ

ーマ患者の予後予測方法や、メラノーマ患者の予後に関与するメカニズムの解明において、本件メラノーママーカー遺伝子や、本件メラノーママーカータンパクを使用する方法を挙げることができる。

【００３１】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例１】

【００３２】

［実験に用いた抗体］

ポリクローナルウサギ抗ヒトＮＡＰ－２抗体はPepro Tech社、ポリクローナルウサギ抗ヒトＳＡＡ抗体はSanta Cruz Biotechnology社、ポリクローナルヤギ抗ヒトＦａｃｔｏｒ Ｈ抗体はCalbiochem社からそれぞれ購入した。ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体とペルオキシダーゼ結合ウサギ抗ヤギＩｇＧ抗体は、Bio Rad Lab社とAbcam社からそれぞれ購入した。

【００３３】

［ヒト血漿サンプルの採取］

メラノーマ患者の臨床検体を用いた研究は、国立がんセンター及び静岡がんセンターの倫理審査委員会において承認済みである。また、全てのメラノーマ患者からインフォームドコンセントを得た上で採血を行った。国立がんセンター２１例及び静岡がんセンター１０例は、組織学的に転移性メラノーマで、ステージIVの患者であり、前治療終了後４週以上経過している。これら転移性メラノーマの３１例は、樹状細胞ワクチンの臨床試験に登録されており、いくつかの実験において、樹状細胞ワクチン投与を受け、臨床的に有意な反応を示したメラノーマ患者の血漿サンプルがＰＰＢＰと５－Ｓ－ＣＤレベルを測定するために用いられた。同様に、健常人ドナー１０例の血液は、インフォームドコンセントを得た後、採血を行った。全ての採血サンプルはFicoll Paque（GE Helthcare Amersham Biosciences社製）を用いて遠心分離し、上清を回収して血漿を得た後、使用するまで－８０℃にて保存した。

【００３４】

［血漿サンプルのグループ化］

解析の効率化を考慮して、血漿混合サンプルを表１のように調製した。健常人５例分（Normal-1～Normal-5）を同量ずつ混合し、NORmix-1とした。２２例のメラノーマ患者血漿は（Melanoma-1～Melanoma-22）、４～７例分をそれぞれ１グループとして同量ずつ混合し、MELmix-1、2、3、4とした。残りのメラノーマ血漿（Normal-6-10, Melanoma-23～Melanoma-31）は、さらなる実験に用いた。

【００３５】

【表１】

<Healthy>

Group Name	Plasma				
NORmix-1	Normal-1	Normal-2	Normal-3	Normal-4	Normal-5

<Melanoma>

Group Name	Plasma						
MELmix-1	Melanoma-1	Melanoma-2	Melanoma-3	Melanoma-4	Melanoma-5		
MELmix-2	Melanoma-6	Melanoma-7	Melanoma-8	Melanoma-9			
MELmix-3	Melanoma-10	Melanoma-11	Melanoma-12	Melanoma-13	Melanoma-14	Melanoma-15	
MELmix-4	Melanoma-16	Melanoma-17	Melanoma-18	Melanoma-19	Melanoma-20	Melanoma-21	Melanoma-22

【実施例２】

【００３６】

［血漿サンプルの調製］

ヒト血漿中に高濃度に含まれる６種類のタンパク（アルブミン、ＩｇＧ、ＩｇＡ、トラ

ンスフェリン、ハプトグロブリン、及びアンチトリプシン）を効率的に除去する目的で、血漿混合サンプル（各７０μＬ）をThe Multiple Affinity Removal Spin Cartridge（Agilent Technologies社製）で処理した。処理は製品に添付のスタンダードプロトコールに準じて実施し、Spin Cartridgeの通り抜け画分を回収した。

【００３７】

続いて、回収したサンプルの濃縮及びトリプシン処理を行った。遠心濃縮装置のセントリコンＹＭ－３（分画分子量＝３０００Ｄａ、Millipore社製）を蒸留水で洗浄した後、前記通り抜け画分をセントリコンに添加し、サンプル量が約３００μＬ程度になるまで７５００Ｇ、４℃で遠心濃縮した。濃縮画分のタンパク濃度をBCA protein assay kit（PIERCE社製）を用いて測定した後、２００μｇの血漿タンパクを１００ｍＭ重炭酸アンモニウムで２倍希釈し、トリプシン溶液を添加した（基質：トリプシン ＝５０：１ｗ／ｗ）。このペプチド混合物を３７℃で１６時間反応させることで、血漿タンパクをトリプシン消化し、その後、１０％トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）を適量添加して溶液のｐＨを下げた。

【実施例３】

【００３８】

［陽イオン交換カラムによる１次元目分離］

陽イオン交換カラム（HiTrap SP HP、GE Helthcare Amersham Biosciences社製）をセットしたAKTAprime plusクロマトグラフィーシステム（GE HelthcareAmershamBiosciences社製）を用いて、血漿タンパクから得られたペプチド混合物の１次元目の分離を行った。ペプチド混合物を、平衡化バッファー（０．００５％ＴＦＡ溶液、ｐＨ３．２）で５ｍｌに希釈し、陽イオン交換カラムにインジェクションした。２カラムボリューム（Ｃ．Ｖ．）の平衡化バッファーでカラムを洗浄した後、溶出バッファー（５００ｍＭ酢酸アンモニウム溶液、ｐＨ３．２）でペプチドを溶出した。グラジェントモード（０－１００％、１６Ｃ．Ｖ．）で溶出し、流速は全工程１．０ｍｌ／ｍｉｎで行い、波長２１４ｎｍでピークを検出した。１ｍｌごとの溶出画分を遠心濃縮し、２次元分離用サンプルとした。

【００３９】

［逆相カラムによる２次元目分離］

逆相カラムをセットしたnanoLCシステム（Ultimate HPLC, Switchos, Famos auto sampler, LC packings社製）を用いて、得られた陽イオン交換分離画分の２次元目の分離を行った。まず、前処理としてプレカラム（３００μｍＩ．Ｄ．×５ｍｍ、Ｃ１８の１００Å、LC packings社製）による脱塩・濃縮を行った後、本カラム（７５μｍＩ．Ｄ．×１５ｃｍ、Ｃ１８の１００Å、LC packings社製）による分離を行った。プレカラムにサンプルをインジェクションし、０．１％ＴＦＡ溶液で数分間プレカラムを洗浄することによって、脱塩・濃縮した後、バルブを切り替え、平衡化バッファー（水：アセトニトリル＝９５：５、０．０５％ＴＦＡ）により平衡化済みの本カラムを、プレカラムに接続させた。その後、溶出バッファー（水：アセトニトリル＝２０：８０、０．０４％ＴＦＡ）による１５０分間のグラジェント溶出を行い（１４５分：０－６５％→５分：９５％、流速＝３００ｎＬ／ｍｉｎ）、波長２１４ｎｍでピークを検出した。溶出画分は、Probotシステム（LC packings社製）を用いて、質量分析用のターゲットプレートに１分ごとにマトリックス溶液（５０％ｖ／ｖアセトニトリル、０．５％ｖ／ｖＴＦＡ）に溶解したalpha-cyano-4-hydroxy-trans-cinnamic acidと混合させながらスポッティングした（３００ｎＬ／スポット）。

【００４０】

［質量分析によるタンパクの同定］

ターゲットプレート上のスポットを風乾させた後、4700 proteomics analyzer （Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry、Applied Biosystems社製）を用いて質量分析を行った。キャリブレーションを実施した後、レーザー強度を２３００～２５００程度にセットし、８００～３０００Ｄａのイオンを標的としたＭＳ／ＭＳ解析を実施した。得られたＭＳ／ＭＳスペクトルについて、ＮＣＢＩデー

ターベースを用いたＭＡＳＣＯＴサーチ（www.matrixscience.com）を行い、タンパクを同定した。

【実施例４】

【００４１】

［細胞培養］

１１種類のヒトメラノーマ細胞株（ＮＣＣ－ＫＴ、Ｇ３６１、ＭＭＧ－１、Ｃ３２、ＲＰＭＩ７９５１、ＫＵ－ＭＥＬＴＣ－１、ＭＥＬ－００１（Ｐ）、ＭＥＷＯ、Ａ３７５、ＴＤＭＭ１、ＳＥＫＩ）と正常メラノサイトはAmerican Type Culture Collectionから購入した。全てのメラノーマ細胞株は、１０％ウシ胎児血清（Gibco社製）、２ｍＭグルタミン（Cambrex Biosciences、LONZA社製）、１００units／ｍＬペニシリン（Gibco社製）、１００μｇ／ｍＬストレプトマイシン（Gibco社製）を含むＲＰＭＩ１６４５培地で培養した。一方、メラノサイトは、０．５％ウシ胎児血清、１０ｎｇ／ｍＬホルボールミリスチン酸アセテート、３μｇ／ｍＬヘパリン、５μｇ／ｍＬトランスフェリン、０．４％ウシ下垂体抽出物、３ｎｇ／ｍＬヒト線維芽細胞増殖因子－Ｂ、５μｇ／ｍＬインスリン、０．１８μｇ／ｍＬハイドロコルチゾン含有のｍｅｄｉｕｍ２５４培地（Cascade Biologicals社製）で培養した。全ての培養は３７℃、５％CO_2 in 空気中の条件下で行った。

【実施例５】

【００４２】

［同定タンパクのリアルタイムＰＣＲ解析］

7500 Real Time PCR System （Applied Biosystems社製）を用いて同定タンパクのリアルタイムＰＣＲを実施した。ノーマライズのための内因性コントロールは、ハウスキーピング遺伝子であるβアクチンを用いた。ＰＣＲプライマーとTaq Man プローブはApplied Biosystemsから購入した。まず、NucleoSpin RNA kit（NIPPON Genetics社製）を用いて細胞から全ＲＮＡを抽出し、全ＲＮＡの品質を2100 Bioanalyzer （Agilent社製）で確認した。次に、High Capacity cDNA Reverse Transcription kit（Applied Biosystems社製）を用いて２μｇの全ＲＮＡからｃＤＮＡを合成した。Taq Man 定量ＰＣＲ反応は、Taq Man Universal PCR Master Mix（Applied Biosystems社製）中に１μＬのｃＤＮＡと１μＬのプライマー/プローブ混合物を含んだ総量２０μＬで実施した。ＰＣＲの反応は、５０℃で２分、９５℃で１０分、９５℃で１５秒を４０サイクル、６０℃で１分の条件で行った。得られた結果は7500 Fast SDS Software（Applied Biosystems社製）で解析し、ｍＲＮＡ発現量はコントロールであるメラノサイトに対する相対比で算出した。

【００４３】

［イムノブロット解析］

各血漿タンパク（５０μｇ）は、2-メルカプトエタノール入りのＳＤＳサンプルバッファー（ＦａｃｔｏｒＨのみ非還元条件）と混合し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを実施した。次に、ゲルからＰＶＤＦ膜にタンパクを転写し、ＰＶＤＦ膜を室温で１時間ブロッキングを行った（抗ＮＡＰ－２抗体：５％スキムミルク/ＴＢＳ，抗ＳＡＡ抗体：５％スキムミルク／０．５％Ｔｗｅｅｎ２０－ＴＢＳ、 抗ＦａｃｔｏｒＨ抗体：５％スキムミルク／ＰＢＳ（－））。続いて、４℃で一晩、１次抗体（抗ＮＡＰ－２抗体，抗ＳＡＡ抗体，抗ＦａｃｔｏｒＨ抗体）と反応させた後、目的バンドをＨＲＰラベル２次抗体とＥＣＬ（GE healthcare Amersham Bioscience社製）で発色させた。検出バンドの定量は、ImageQuantsoftware（GE healthcare Amersham Bioscience社製）を用いて実施した。

【００４４】

［血漿ＰＰＢＰ及び５－Ｓ－ＣＤレベルの測定］

免疫療法（樹状細胞ワクチン投与）を受け、臨床的に腫瘍の縮小を認めたメラノーマ患者３０症例と健常人１０例由来の血漿を用いた。ＰＰＢＰに対する抗体を用いたイムノブロット解析を用いて血漿中のＰＰＢＰの検出を行った。検出バンドの定量は、ImageQuant software（GE healthcare Amersham Bioscience）を用いたデンシトメトリー解析にて実施した。ＰＰＢＰの半定量値のカットオフ値は、５．０とした。血漿５－Ｓ－ＣＤレベル

は、Ｌ－６２００インテリジェントポンプ、Ｌ－７２００オートサンプラー(Hitachi high-technologies 社製)、Wakosil-5C18HG分離カラム（４．６×２５０ｍｍ，和光純薬工業社製）及び ECD-300アンペロメトリック検出器を備えているＨＰＬＣシステムを使用して定量した。血漿５－Ｓ－ＣＤの正常範囲は、１．５～８ｎＭであり、カットオフ値を８ｎＭにセットした。

【００４５】

［免疫組織化学解析］

イムノブロット解析により、血漿サンプル中にＰＰＢＰとＳＡＡの発現が確認できた患者のメラノーマ腫瘍組織切片を用いて、免疫組織化学染色を実施した。１次抗体として抗ＮＡＰ－２抗体，抗ＳＡＡ抗体を、２次抗体としてＨＲＰラベル抗体を用いた。フォルマリン固定切片のＨＥ染色及び免疫染色はＳＲＬ株式会社に依頼した。

【実施例６】

【００４６】

［結果：健常者血漿を用いた再現性の確認］

今回実施したプロテオミクス解析方法が再現性のあるものかどうかを確認するために、健常者血漿（NORmix-1）を用いて２回の繰り返し実験を実施した。高濃度タンパクを除去したNORmix-1の陽イオン交換クロマト分離を実施し、ピークが検出できた画分についてnanoLCによる逆相クロマト分離を行った。全てのフラクションの逆相クロマトグラフィーにより得られた結果を図１－Ａに示す。１回目と２回目の逆相クロマトチャートを比較した結果、全フラクションにおいて、ほぼ同様のクロマトチャートが得られた。さらに、質量分析から得られたＭＳ／ＭＳスペクトルを用いたデーターベースサーチにより同定されたタンパクについて比較した。一般的なパラメーターでＭＡＳＣＯＴサーチを行った結果、同定された総タンパク数は、１回目は１２４個、２回目は１８７個だったが、２回の繰り返し解析で共通するタンパク数はわずか６１個だった（データ示さず）。そこで、低スコアのペプチドマッチを除くために、ＭＡＳＣＯＴサーチのパラメーターを厳しく設定したところ、ランダムヒットするタンパク群が減少した。その結果、１回目と２回目で同定された総タンパク数はそれぞれ３７個と５１個であり、２回の解析で共通するタンパクは３０個であった（図１－Ｂ）。以上のことから、今回実施したプロテオミクス解析方法は、ある一定レベルの再現性があることが示された。

【実施例７】

【００４７】

［結果：メラノーマ血漿中に高発現するタンパクの同定］

次に、実施例６と同様の条件でメラノーマ血漿について解析した。表１に示すように４つのグループ（MELmix-1～MELmix-4）に分けたサンプルのそれぞれを解析した結果、各グループ間で多くの異なるピークが検出された（図２）。例えば、MELmix-1は、他のグループと比較して７５分から１００分で溶出されるペプチドが多いことから、疎水性ペプチドを多く含んでいることが示唆される。健常者血漿及びメラノーマ血漿の解析から同定された総タンパク数を図３－Ａにまとめた。健常者とメラノーマそれぞれについて同定された全てのタンパクの同定頻度をカウントし、重複しないタンパクの総数を算出した結果、健常者は５８個、メラノーマは７２個だった（図３－Ｂ）。さらに、健常者とメラノーマで重なるタンパクを削除することによって、健常者に発現しておらずメラノーマ患者に特異的に発現する２４個のタンパク群を選出した。そのうち、少なくとも１回はスコアが７０以上であったタンパクをピックアップしたところ、図３－Ｃに示すように９個の候補タンパクが得られた（beta-actin：β－ＡＣＴ、complement component 6 precursor ：ＣＣ６Ｐ、Plasminogen：ＰＬＡ、pro-platelet basic protein precursor：ＰＰＢＰ、Inter-alpha-trypsininhibitor heavy chain H4 precursor：ＩＡＩＨ４、apolipoprotein F precursor：ＡｐｏＦ、Complement factor H-related protein 1 precursor：ＦＨＲ１、ハプトグロブリン：ＨＰ、Serum amyloidA2：ＳＡＡ２）。これらの９個のタンパクは、メラノーマ患者血漿中に特異的に発現していることが示唆された。なお、配列番号１及び２にβ－ＡＣＴのアミノ酸及び遺伝子配列を、配列番号３及び４にＣＣ６Ｃのアミノ酸及

び遺伝子配列を、配列番号５及び６にＰＬＡのアミノ酸及び遺伝子配列を、配列番号７及び８にＰＰＢＰのアミノ酸及び遺伝子配列を、配列番号９及び１０にＩＡＩＨ４のアミノ酸及び遺伝子配列を、配列番号１１及び１２にＡｐｏＦのアミノ酸及び遺伝子配列を、配列番号１３及び１４にＦＨＲ１のアミノ酸及び遺伝子配列を、配列番号１５及び１６にＨＰのアミノ酸及び遺伝子配列を、配列番号１７及び１８にＳＡＡ２のアミノ酸及び遺伝子配列をそれぞれ示す。

【実施例８】

【００４８】

［結果：メラノーマ細胞株における同定タンパクのｍＲＮＡ発現］

９個の候補タンパクのｍＲＮＡがメラノーマ細胞中で発現しているかどうかを確認するために、リアルタイムＰＣＲを実施した。１１種類のメラノーマ細胞株と正常組織であるメラノサイトを用いてリアルタイムＰＣＲを行ったところ、９個のうち４個のタンパク（ＰＰＢＰ、ＳＡＡ、ＦＨＲ１、ＩＡＩＨ４）のｍＲＮＡが多くのメラノーマ細胞で発現していること、また、その発現量はメラノサイトにおける発現量と比較すると顕著に高いことが確認できた（図４）。一方、残りの５個のタンパクは、ほとんど検出できなかった（データ示さず）。

【実施例９】

【００４９】

［結果：メラノーマ患者血漿を用いた同定タンパクのイムノブロット解析］

次に、プロテオミクス学的手法とリアルタイムＰＣＲで選出されたタンパクが、実際に個々の患者血漿中で発現しているかどうか確認するためにイムノブロット解析を行った。全ての健常者血漿（５例）とメラノーマ患者血漿（３１例）をＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、膜に転写後、それぞれの抗体を用いて検出した。その結果、ＰＰＢＰ（ＮＡＰ－２、ＣＸＣＬ－７としても知られる）はほとんどのメラノーマ患者血漿中で検出でき、いくつかの血漿中では健常者と比較して高発現していた（図５－Ａ）。ＳＡＡは８メラノーマ患者血漿中で高発現しており、健常者血漿中では全く検出できなかった（図５－Ｂ）。また、ＦＨＲ１は糖鎖残基数の違いでＦＨＲ１α（３７ｋＤａ）とＦＨＲ１β（４３ｋＤａ）の２つの異なる構造が存在することが報告されているが、両方のフォーム共に、健常者血漿と比較するとメラノーマ患者血漿中で高発現していた（図５－Ｃ）。さらに、追加解析として、別の健常者血漿５サンプルを用いて解析を行った結果、ＰＰＢＰ、ＳＡＡ、ＦＨＲ１ともに発現レベルはかなり低かった（データ示さず）。

【実施例１０】

【００５０】

［結果：腫瘍組織におけるＰＰＢＰとＳＡＡタンパクの免疫組織化学解析］

ＰＰＢＰとＳＡＡタンパクの腫瘍組織における発現を調べるために免疫組織染色を実施した。個々の患者血漿のイムノブロット解析結果から、血漿中のＰＰＢＰまたはＳＡＡの発現レベルが高かったそれぞれの患者の摘出腫瘍（ＰＰＢＰ：Melanoma-5、ＳＡＡ：Melanoma-18）について、それぞれの抗体を用いて免疫組織染色を行った。その結果、コントロールと比較するとＰＰＢＰは明らかに強く染まり、腫瘍組織における発現が確認できた。一方、ＳＡＡは腫瘍組織において弱い発現が確認できた（図６）。

【実施例１１】

【００５１】

［結果：ＰＰＢＰタンパクの半定量的解析］

図５に示すイムノブロット解析の結果から、ＰＰＢＰタンパクがメラノーマ患者の血漿中に高頻度に検出されたことを受けて、画像解析ソフトウェアを使用することによりＰＰＢＰタンパクの発現量を半定量的に解析した。GEヘルスケア社のImageQuant TLを用いてImmnoblottingにて検出されたバンドの体積を定量し、ＰＰＢＰタンパクの濃度を示す指標（相対的産生量）として数値化した（図７－Ａ、relative level）。メラノーマ患者２７人のＰＰＢＰタンパクの相対的産生量の平均値は、２６．７±１７．８であり、明らかに患者血漿中で有意に増加を認めた。次に、今回登録された３１のメラノーマ症例の全生存

期間と上記のＰＰＢＰの相対的産生量（relative level）との相関および予後因子としての可能性につき検討した。まず生存期間と産生量には、低いながらも有意な負の相関関係が認められた（ｒ＝－０．４２１、ｐ＝０．０２７９）。さらにKaplan-Meier法を用いてＰＰＢＰ産生量が２０以上と２０未満のグループ間で生存期間の比較を行った。ＰＰＢＰ産生量が２０未満のグループにて有意に生存期間の延長が認められた（ｐ＝０．００３、Logrank test）。以上より、ＰＰＢＰはメラノーママーカー候補としてだけでなく、予後因子としても活用しうる可能性があると考えられた。

【実施例１２】

【００５２】

［結果：樹状細胞ワクチンの投与前後におけるメラノーマ患者血漿中のＰＰＢＰと５－Ｓ－ＣＤレベル］

メラノーマ患者３０症例と健常人１０例由来の血漿中のマーカー濃度は、ＰＰＢＰが２４．９±１８．４と４．５±１１．２（ｐ＝０．００４７）で、５－Ｓ－ＣＤが３８．９±１１０．１と１．２±１．３（ｐ＝０．０４４０７）で、ともにメラノーマ患者で有意に高かった。マーカーとしての感度（Sensitivity）と特異性（Specificity）は、ＰＰＢＰがそれぞれ８７．１％，９０．０％で、５－Ｓ－ＣＤが３２．３％，１００％であった（図８）。総合的な評価では、ＰＰＢＰは、感度および陰性予測値において５－Ｓ－ＣＤより優れていた。さらに免疫療法（樹状細胞ワクチン）を受け、臨床的に明らかな腫瘍の縮小を認めた２症例において、治療経過中のＰＰＢＰ及び５－Ｓ－ＣＤ値を比較した。ＰＰＢＰ値は、腫瘍の縮小に一致して徐々に低下を認めたのに対し、５－Ｓ－ＣＤ値は全期間を通して有意な増加は認めなかった（図９）。これより実際のメラノーマ症例のモニタリングにもＰＰＢＰは有用であることが確認された。

【００５３】

［結果：メラノーマ患者血漿中のＰＰＢＰレベルと生存期間との相関］

次に評価可能な３０人のメラノーマ症例の全生存期間と上記のＰＰＢＰ及び５－Ｓ－ＣＤ値との相関、並びに予後因子としての可能性につき検討した。まず生存期間とＰＰＢＰ値には、低いながらも有意な負の相関関係が認められた（ｒ＝－０．４２１　ｐ＝０．０２７９、図１０－Ａ）。さらにＫａｐｌａｎ－Ｍｅｉｅｒ法を用いてＰＰＢＰ産生量が２０以上（ｎ＝１６：平均生存期間６．９±３．６か月）と２０未満（ｎ＝１４：１４．７±９．６か月）のグループ間で生存期間の比較を行った（図１０－Ｂ左）。ＰＰＢＰ産生量が２０未満のグループにて有意に生存期間の延長が認められた（ｐ＝０．００３，Logrank test）。しかし、５－ＳＣＤ値は８以上の高値群（ｎ＝１０：平均生存期間６．５±４．３か月）と低値群（ｎ＝２０：平均生存期間１２．０±８．６か月）の間で有意差は認めなかった（図１０－Ｂ右）。以上よりＰＰＢＰはメラノーママーカー候補としてだけでなく、予後因子としても活用しうることがわかった。

【図面の簡単な説明】

【００５４】

【図１】健常者血漿サンプルを、（Ａ）逆相クロマトグラフィーにより分析した結果を示すグラフと（Ｂ）質量分析により同定されたタンパクの数を示す図である。Ｆｒ．１～１７は、陽イオン交換カラムによる１次元目のクロマトグラフィーにより得られたフラクション番号を示す。

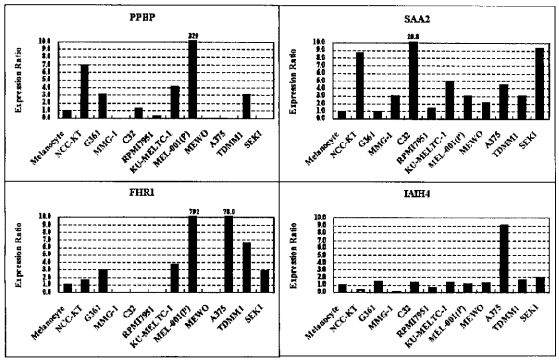
【図２】４つのグループ（MELmix-1～MELmix-4）のメラノーマ患者血漿サンプルを、逆相クロマトグラフィーにより分析した結果を示す図である。Ｆｒ．１～１７は、陽イオン交換カラムによる１次元目のクロマトグラフィーにより得られたフラクション番号を示す。

【図３】質量分析の結果から（Ａ）同定された健常者又はメラノーマ血漿中のタンパクの総数、（Ｂ）健常者とメラノーマにおけるそれらのタンパクの発現パターン、及び（Ｃ）健常者に発現しておらずメラノーマ患者にのみ特異的に発現するタンパクのうち、メラノーマの腫瘍マーカー候補となりうる９個のタンパクを示す図である。

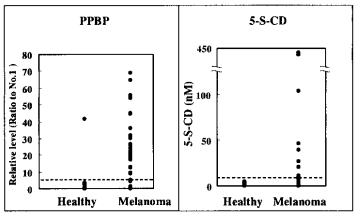
【図４】１１の培養メラノーマ細胞における、メラノーマ腫瘍マーカー候補タンパク（ＰＰＢＰ、ＳＡＡ、ＦＨＲ１、ＩＡＩＨ４）のｍＲＮＡ発現を、リアルタイムＰＣＲ法によ

り検討した結果を示す図である。
【図５】健常又はメラノーマ患者血漿中の（Ａ）ＰＰＢＰ、（Ｂ）ＳＡＡ、及び（Ｃ）ＦＨＲ１タンパクの発現をウエスタンブロット法により検討した結果を示す図である。レーン１～５は健常者血漿、レーン６～３６はメラノーマ患者血漿を示す。
【図６】免疫組織染色法により、腫瘍組織におけるＰＰＢＰとＳＡＡタンパク発現を検討した結果を示す図である。
【図７】ウエスタンブロット法により得られた結果を、画像解析ソフトウェアより半定量的に解析し、ＰＰＢＰタンパク発現量と、生存期間の相関を調べた結果を示す図である。
【図８】メラノーマ患者と健常人の血漿中のＰＰＢＰと５－Ｓ－ＣＤレベルを測定した結果を示す図である。
【図９】免疫療法（樹状細胞ワクチン）を受け、臨床的に明らかな腫瘍の縮小を認めた２症例における治療経過中のＰＰＢＰ及び５－Ｓ－ＣＤ値を比較した結果を示す図である。
【図１０】全生存期間と上記のＰＰＢＰ及び５－Ｓ－ＣＤ値との相関、並びに予後因子としての可能性につき検討した結果を示す図である。

【図４】

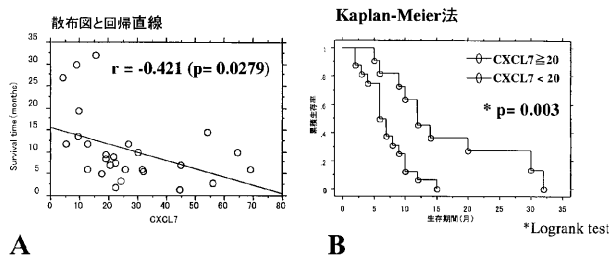


【図８】

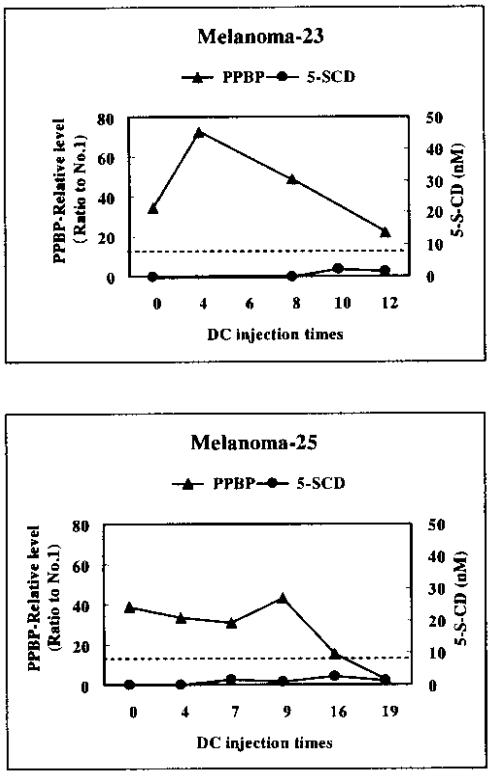


	PPBP	5-S-CD
Cut off value	5.0	8.0
True Positive (TP)	27	10
False Negative (FN)	4	21
False Positive (FP)	1	0
True Negative (TN)	9	10
Sensitivity	87.1%	32.3%
Specificity	90.0%	100%
Positive Predictive value (PPV)	96.4%	100%
Negative Predictive value (NPV)	69.2%	32.3%

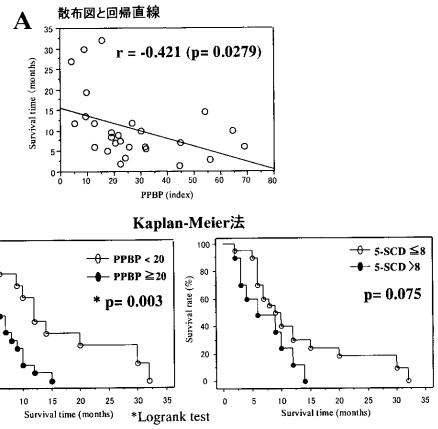
【図７】



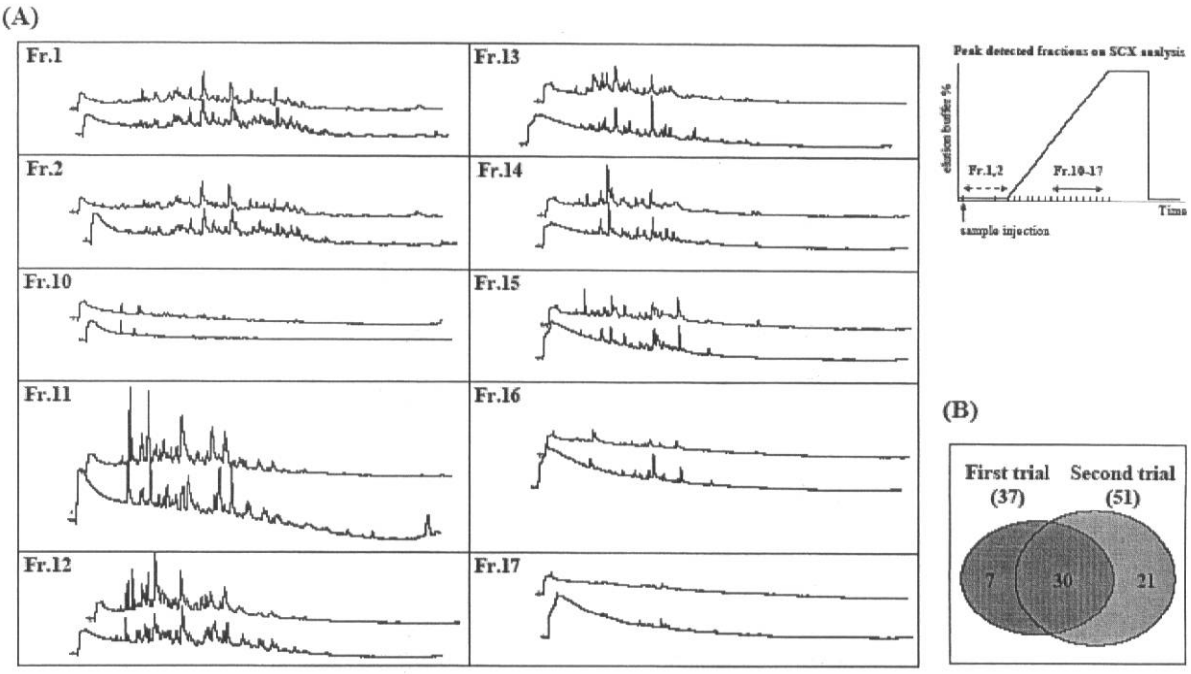
【図９】


Melanoma-23
PPBP
5-SCD
PPBP-Relative level (Ratio to No.1)
5-S-CD (nM)
DC injection times
Melanoma-25
PPBP
5-SCD
PPBP-Relative level (Ratio to No.1)
5-S-CD (nM)
DC injection times

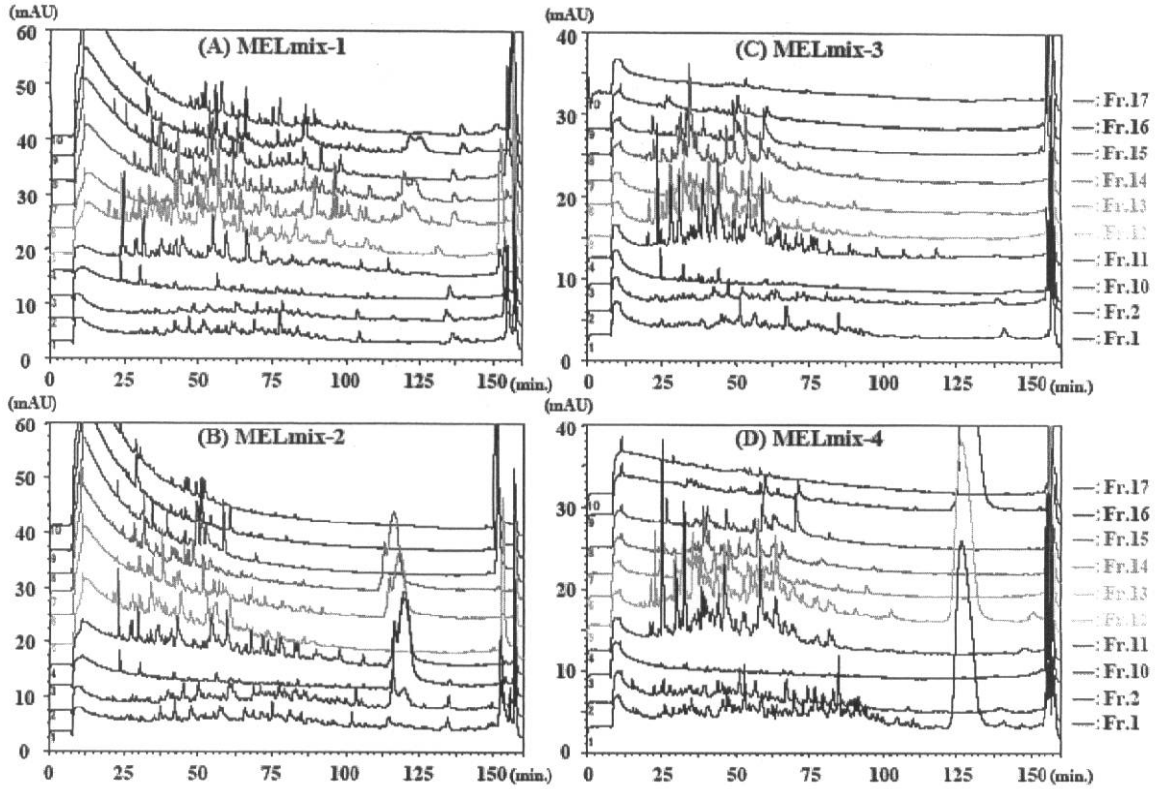
【図１０】


A
散布図と回帰直線
r = -0.421 (p= 0.0279)
Survival time (months)
PPBP (index)
B
Kaplan-Meier法
PPBP < 20
PPBP ≧20
* p= 0.003
5-SCD ≦8
5-SCD >8
p= 0.075
Survival rate (%)
Survival time (months)
*Logrank test

【図１】


(A)
Fr.1
Fr.2
Fr.10
Fr.11
Fr.12
Fr.13
Fr.14
Fr.15
Fr.16
Fr.17
Peak detected fractions on SCX analysis
elution buffer %
Fr.1,2
Fr.10-17
Time
sample injection
(B)
First trial (37)
Second trial (51)
7
30
21

【図２】



【図３】

(A)

Groups	The number of identified proteins
NORmix-1(first)	37
NORmix-1(second)	51
MELmix-1	48
MELmix-2	43
MELmix-3	49
MELmix-4	47

(B) <Healthy>

Identification frequency	The number of identified proteins
2 groups	30
1 group	28

Non-redundant = 30+28=58

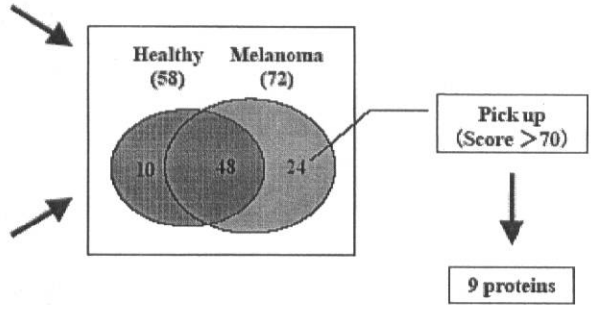
<Melanoma>

Identification frequency	The number of identified proteins
4 groups	29
3 groups	9
2 groups	9
1 group	25

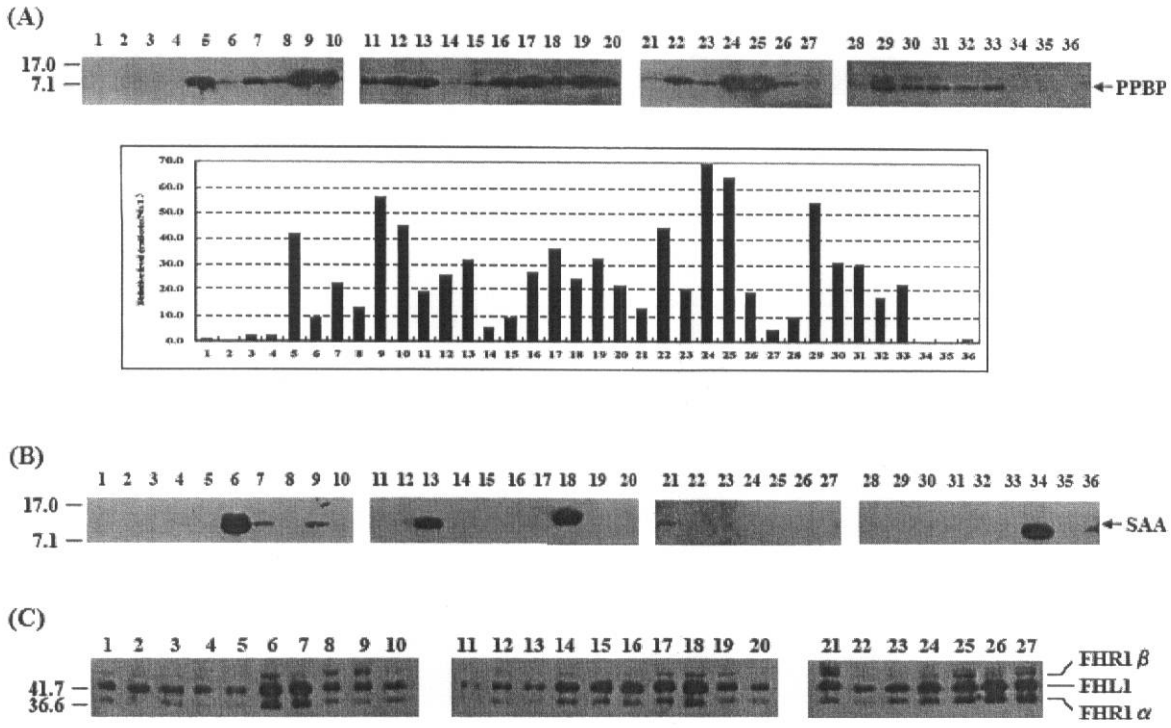
Non-redundant =29+9+9+25= 72

(C)

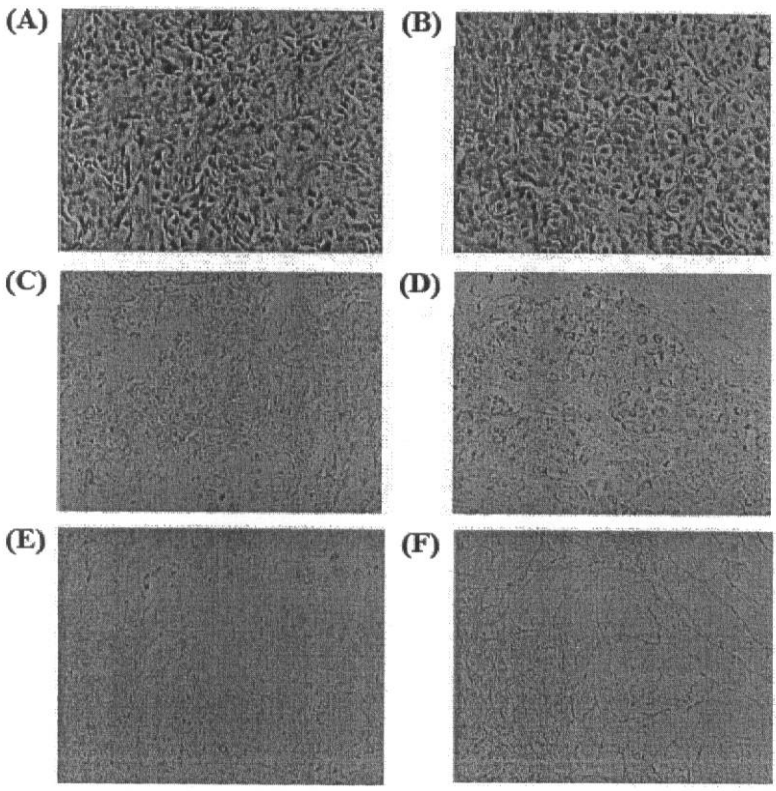
No.	Protein Name	GI	Mass	Score1	Score2	Score3	Score4	Detect
1	beta actin	4501885	41710	63	262	149	310	4
2	Complement component 6 precursor	4559406	104776		73	51		2
3	plasminogen 1-69	229453	7818	91	198			2
4	pro-platelet basic protein precursor	4505981	13885	114	71			2
5	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 precursor	116242595	103261		82	45		2
6	apolipoprotein F precursor	4502165	35377		124	74		2
7	Complement factor H-related protein 1 precursor	543981	37637	95		58		2
8	haptoglobin	4826762	45177		71	55		2
9	serum amyloid A2	13540475	13500	159				1



【図５】



【図６】



【配列表】

2010014689000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 15/09	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ａ	

(72)発明者 秋山 靖人
静岡県駿東郡長泉町下長窪１００７番地 静岡県立静岡がんセンター研究所 免疫治療研究部内
(72)発明者 瀧川 雅子
静岡県駿東郡長泉町下長窪１００７番地 静岡県立静岡がんセンター研究所 免疫治療研究部内

Ｆターム(参考) 2G045 AA26 CA25 CA26 DA13 DA36 FB02 FB03 GC15
4B024 AA12 CA04 CA20 HA14
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ52 QR08 QR62 QS25 QS34

专利名称(译)	使用蛋白质组学分析鉴定黑素瘤标志物		
公开(公告)号	JP2010014689A	公开(公告)日	2010-01-21
申请号	JP2008276003	申请日	2008-10-27
申请(专利权)人(译)	静冈县		
[标]发明人	秋山靖人 瀧川雅子		
发明人	秋山 靖人 瀧川 雅子		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 G01N33/50 G01N33/15 C12Q1/68 C12N15/09		
FI分类号	G01N33/53.M G01N33/574.A G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A C12Q1/68.AZN.A G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/GC15 4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34		
代理人(译)	▲▼高津哉 堀内申		
优先权	2008149728 2008-06-06 JP		
其他公开文献	JP5568807B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的一个目的提供的生物样品，简单和用于执行黑素瘤，测定试剂盒或黑色素瘤，黑色素瘤患者预后预测方法等的快速测定方法在检测或黑素瘤标记物的定量就是这样。 使用蛋白质组学生物学技术甲发明人已全面分析包含在黑素瘤患者中的血浆蛋白，通过与血浆蛋白的健康受试者，在黑色素瘤特异性蛋白质比较尝试过。一般肿瘤标记物血液含量，因为它们倾向于与癌症的进展上升，患者血浆阶段IV的发明人考虑的肿瘤标记物中高度表达，收集，通过二维柱色谱和质谱进行全面的蛋白质分析。结果，我们成功地鉴定了在黑素瘤患者血浆中特异性表达的9种蛋白质，并完成了本发明。 【选择图】无

<Healthy>

Group Name	Plasma				
NORmix-1	Normal-1	Normal-2	Normal-3	Normal-4	Normal-5

<Melanoma>

Group Name	Plasma						
MELmix-1	Melanoma-1	Melanoma-2	Melanoma-3	Melanoma-4	Melanoma-5		
MELmix-2	Melanoma-6	Melanoma-7	Melanoma-8	Melanoma-9			
MELmix-3	Melanoma-10	Melanoma-11	Melanoma-12	Melanoma-13	Melanoma-14	Melanoma-15	
MELmix-4	Melanoma-16	Melanoma-17	Melanoma-18	Melanoma-19	Melanoma-20	Melanoma-21	Melanoma-22

【実施例２】

【００３６】

［血漿サンプルの調製］

ヒト血漿中に高濃度に含まれる６種類のタンパク（アルブミン、Ｉ