

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-500026

(P2014-500026A)

(43) 公表日 平成26年1月9日(2014.1.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30	4 H 0 4 5
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 F	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-542671 (P2013-542671)
 (86) (22) 出願日 平成22年12月6日 (2010.12.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年8月5日 (2013.8.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/IT2010/000484
 (87) 国際公開番号 W02012/077139
 (87) 国際公開日 平成24年6月14日 (2012.6.14)

(71) 出願人 505247498
 ティーエイチディー エス.ピー.エー.
 THD S. P. A.
 イタリア国, アイ-42015 コッレジ
 ーオ (アールイー), 1, ヴィア デルイ
 ンダストリア
 Via dell' Industria,
 1, I-42015 Correggi
 o (RE), Italy
 (74) 代理人 110001494
 前田・鈴木国際特許業務法人
 (72) 発明者 バスティア, フィリッポ
 イタリア, アイ-41019 ソッツィ
 ガッリ ディ ソリエラ (モデナ), ヴ
 ィア カナーレ 564

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌腫の診断のための方法およびその利用法

(57) 【要約】

【課題】本願発明は、特に、大腸癌、胃癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、卵巣癌、肝臓癌、腎臓癌、甲状腺癌、膀胱癌、もしくはすい臓癌などの、癌腫をもしくはそれに関連する残存病変の診断のため、もしくは癌腫の予後の診断のため、もしくは癌腫に侵された人の経過をモニタリングするため、もしくは悪性腫瘍に対する抗がん治療の効果を観察する方法に関する。

【解決手段】本願発明の方法は、分析される人の血液派生物のサンプルと成体幹細胞を接触させる工程と、該幹細胞の少なくとも上皮マーカーの発現を免疫蛍光法、免疫組織化学法、ELISAもしくはRT-PCRなどの手段により確認する工程とを有する。

【選択図】 図9

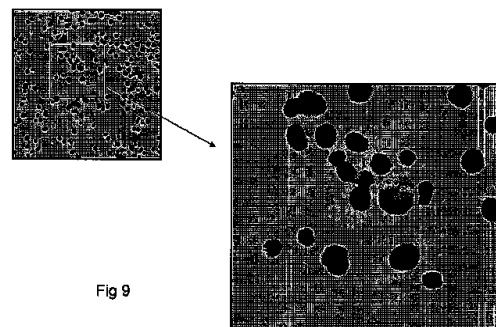


Fig 9

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌腫もしくはそれに関連する残存病変の診断のための、もしくは癌腫の予後診断のための、もしくは癌腫に対する抗癌治療の効果をモニタリングするための、もしくは癌腫に侵された人の経過を観察するための方法であって、

(i) 血液派生物 (h a e m o - d e r i v a t i v e) の単離されたサンプルと単離された成体幹細胞を接触させる工程と、

(i i) 前記成体幹細胞内の少なくとも上皮マーカーの発現を確認する工程と、を有する方法。

【請求項 2】

前記癌腫は、大腸癌、胃癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、肝臓癌、卵巣癌、腎臓癌、甲状腺癌、膀胱癌、すい臓癌の中から選択される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記血液派生物の単離されたサンプルは、血清もしくは血しょうである請求項 1 もしくは 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記幹細胞は、多能性幹細胞であり、好ましくは前記多能性幹細胞は、間葉系幹細胞、C D 1 3 3 ⁺細胞、C D 4 4 ⁺細胞、C D 9 0 ⁺細胞、C D 2 9 ⁺細胞、C D 1 0 5 ⁺細胞、C D 1 1 7 ⁺細胞、C D 5 6 ⁺細胞、および C D 7 3 ⁺細胞から選択される請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記上皮マーカーは、サイトケラチンであり、好ましくは、C K - 1 8、C K - 1 9、C K - 2 0 および C K - 2 1 のの中から選択され、さらに好ましくは C K - 1 9 である請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

血液派生物のサンプルと幹細胞を接触させる工程 (i) は、支持体の上に幹細胞を播種する工程と、該サンプルを幹細胞のための培養液に希釈する工程と、を含む請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

該血液派生物のサンプルの培養液への前記希釈は、1 : 2 から 1 : 2 0 であり、好ましくは 1 : 4 から 1 : 8 である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

該培養液に希釈された前記サンプルは、前記幹細胞に加えられる請求項 6 もしくは 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記幹細胞は、4 8 時間から 1 8 0 時間、好ましくは 9 0 時間から 1 5 0 時間の範囲において該培養液内に希釈された該サンプル内で成長される前記請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 0】

少なくとも上皮マーカーの発現を確認する前記工程は、免疫蛍光法、免疫組織化学法、E L I S A もしくは R T - P C R の手段により行われ、好ましくは、該 P C R はリアルタイムである請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1】

少なくとも上皮マーカーの発現を E L I S A の手段により確認する前記工程は、

- 血液派生物の該サンプルと接触している該幹細胞を溶解する工程と、
- 前記工程において得られたタンパク質溶解のアリコット (a l i q u o t) を上皮マーカーに対する少なくとも抗体と接触させ、前記抗体は好ましくは好適な支持体に吸収されている工程と、
- 少なくとも上皮マーカーと前記抗体の間の結合を特定する工程と、を有する請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

少なくとも上皮マーカーの発現を免疫蛍光法的手段により確認する前記工程は、

- 血液派生物の前記サンプルと接触している該幹細胞をスライドの上に固定する工程と、
- 前記工程において固定された前記幹細胞を上皮マーカーに対する少なくとも抗体に接触させる工程と、
- 分化した幹細胞により発現する少なくとも上皮マーカーと前記抗体の間の結合を特定する工程と、を有する請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

少なくとも上皮マーカーの発現を確認する前記工程は、該培養液に希釈された血液派生物の前記サンプルを該細胞から除去した後に達成される請求項 10 から 12 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 14】

癌腫に対する抗癌治療の効果のモニタリングは、病気の人が対象とされた種々の治療ステージにおいて、該病気の人から得られた単離サンプル内の少なくとも上皮マーカーの発現レベルを比較することを含む請求項 1～10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

60%～100%、好ましくは70%～90%の特異性を特徴とする請求項 1～14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

60%～100%、好ましくは70%～90%の感度を特徴とする請求項 1～15 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 17】

請求項 1～16 のいずれかに記載の方法を実施するためのキットであって、

- 上皮マーカーに対する少なくとも抗体であって、前記抗体が好ましくはフルオロクロムもしくは酵素と共役し、または少なくとも上皮系のマーカーの増幅のための少なくとも一対のオリゴヌクレオチドと共役している抗体および／または、
- 幹細胞のサンプルおよび／または
- 前記幹細胞を培養するための培養液と、を有するキット。

【請求項 18】

前記抗体は、サイトケラチン、好ましくは、CK-18、CK-19、CK-20 および CK-21 の中から選択され、さらに好ましくは CK-19 に対する抗体である請求項 17 に記載のキット。

30

【請求項 19】

少なくとも上皮マーカーに対する前記抗体に対する二次抗体をさらに有し、前記二次抗体はフルオロクロムもしくは酵素と共役している請求項 17 もしくは 18 に記載のキット。

【請求項 20】

使い捨て、滅菌されたもしくは滅菌可能な器具をさらに有し、好ましくはマルチウェルであり、前記ウェルは好ましくは前記少なくとも上皮マーカーに対する少なくとも抗体により前処理されている請求項 17～19 のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】

前記キットは、該確認工程を行うのに有利な物質をさらに有し、前記物質は、逆転写酵素、DNA の増幅のための酵素、塩、ヌクレオチドの混合液、界面活性剤、還元剤を有する少なくとも上皮系のマーカーの増幅を行うための溶液、もしくは細胞溶解のための溶液、洗浄溶液、固定液、ブロッキング液、中和溶液、もしくは特定溶液のなかから選択される請求項 17～20 のいずれかに記載のキット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願発明は、癌腫もしくは癌腫に関係する残存病変、もしくは癌腫の予後の診断のための方法に関する。

さらに、本願発明は、癌腫に対して行われる治療の効果をモニタリングすること、もし

50

くは癌腫に侵された人の経過を観察することを可能にする。

【背景技術】

【0002】

癌腫は、高発生率を特徴とする上皮由来の腫瘍である。

【0003】

いくつかの癌腫、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、肝癌もしくは前立腺癌などは、現在、人口において最も多くみられる腫瘍を代表している。

【0004】

特に、大腸癌は、異常増殖を介して、死亡原因の2番目／3番目になっていると予想されている。

【0005】

このようなタイプの腫瘍の外科的および医薬的な治療、および診断の近年における目覚ましい進歩と特に関係しているとする、上記の疫学的データはむしろ混乱をきたすものである。

【0006】

大腸癌は、通常は進行が遅いことが特徴であり、したがって、早期発見が患者の生存にとって非常に重要である。

【0007】

結腸および直腸の悪性腫瘍の早期発見には、常にスクリーニングが重要な手段であり、さらに最良の治療を決めるためにも重要な手段である。最も一般的に使われているスクリーニング法は、排泄物における潜血をテストするものである。

【0008】

このタイプの検査で陽性と診断された人に対しては、出血の原因を特定する目的でさらなる検査（大腸内視鏡検査もしくはオパーククリズマ（opaque clisma）など）が行われる。

【0009】

出血は、大腸癌とは異なる、もしくは二次的な反応によるものかもしれない。例えば、痔、憩室炎および憩室症、慢性炎症、虫垂炎、腸管虚血もしくは腸管過敏症、腸結核、子宮内膜症もしくは異物の存在、または粘膜浸食減少、潰瘍もしくは血管形成異常を伴う食道胃十二指腸炎などの消化器官の最初の通過の病変などと、出血は関係している可能性がある。

【0010】

大腸癌の信頼できる新しいスクリーニングの開発では、排泄物のDNAテストがあるが、これはまだ日常的な医療行為にはなっていない。このテストは、腫瘍に関連する変異DNA配列の同定および定量を可能にしている（しかしながら、このような変異に関連している腫瘍は数パーセントでしかない）。このようなタイプのテストで定量されたDNAは、排泄物内の腫瘍性細胞の数に直接的に比例している。該細胞は、大腸癌の始まりと進行の両方に関連している剥離の工程に由来している。

【0011】

大腸内視鏡検査、オパーククリズマ、PETおよびCTは、スクリーニング技術に関連もしくは補完している技術である。特に、これらは、大腸の病変領域および病変の周辺領域を定性的および定量的に評価する。

【0012】

これらの技術は、しかしながら侵襲的で且つかなり高価であるが、特に外科的介入を詳細に計画するためには重要である。今日では、これが今でも、結腸および直腸の癌のための最良の治療アプローチである。

【0013】

外科的治療に続いて、再発を防ぐ目的で患者は通常、免疫賦活療法を行う。

【0014】

これらの療法では、放射線治療と一緒にもしくはなしで化学療法を行う。

10

20

30

40

50

【0015】

化学放射線治療は、手術段階の前もしくは後において効果を奏することができる。手術前段階においては、化学放射線治療は使用のサイズを減少させるために役立つことができ、結果として外科的介入の危険度も減らすことができる。

【0016】

この点に関し、外科的介入において、肛門の肛門括約筋および上挙筋を切らなくてすむように、通常は従来のアプローチを利用する。

【0017】

さらに、手術前の放射線化学療法は、このように非常に侵襲的な介入において生存率を上げるために使われる。

10

【0018】

最近では、遺伝子調査（K-RASテストと呼ばれる）が確立され、これは、診断時に大腸癌の予想される反応を予測するのに使われ、これにより患者の治療をカスタマイズする。

【0019】

この検査は、増殖に関連するシグナルを伝達する役割を担うK-RASタンパク質を特定する工程を含んでおり、したがって、このK-RASタンパク質は重要な腫瘍源である。特に、このテストでは、K-RASタンパク質が突然変異を起こしていないかどうかを特定する。

【0020】

大腸癌の診断および治療における飛躍的な進歩に関わらず、現在、大腸癌に侵された人の30%が早期の段階で亡くなっている。これは、該疾病の微小残留物が消えずに残ることに起因して数年（4～5年）で増殖するためである。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

この点において、本願発明の課題は、癌腫の診断（特に、早期診断）のための方法もしくはそれに関連した残留病変の診断のための方法であり、本願発明は、従来技術のスクリーニング方法もしくは診断方法の欠点を取り除くものである。

【0022】

特に、癌腫の診断のための方法もしくはそれに関連した残留病変の診断のための方法は、従来の方法よりも素早く、より侵襲性が少なく、より特異的且つ感度をあげることを可能にすることが望まれている。

30

【課題を解決するための手段】

【0023】

この課題は、添付の特許請求の範囲に記載の、癌腫もしくはそれに関連した残留病変の診断のための方法、または癌腫の予後もしくは癌腫に侵された人の経過観察のための方法、または抗癌治療の効果をモニタリングするための方法により解決できる。

【0024】

本願発明の方法は、単離した幹細胞と検査する人の血液派生物（haemoderivative）のサンプルとを接触させる工程を含む。

40

【0025】

続いて、該接触が、幹細胞に少なくとも上皮マーカーの発現を誘導していなかを確認する工程が行われる。少なくとも上皮マーカーを発現している幹細胞は、血液派生物の該サンプルと接触したことにより上皮表現型を示す幹細胞である。

【0026】

血液派生物のサンプルによる処理のあとに該幹細胞が少なくとも上皮マーカーの発現は、その人が癌腫に侵されていることを示し、もしくは癌腫に関連する残存病変を有していることを示している。当然、病気もしくは残存病変の存在は、幹細胞を上皮的に分化促進する要因がその人の血液内に存在することを示している。

50

【0027】

さらに、血液派生物のサンプルと接触した幹細胞による少なくとも上皮マーカーの発現の同定は、癌腫に対するもしくは癌腫の残存病変に対する治療の効果、進行および／または結果の指標となる。

【0028】

最後に、血液派生物のサンプルと接触した幹細胞による少なくとも上皮マーカーの発現は、癌腫の進行を示し、したがってその予後も示す。

【0029】

悪性腫瘍に対する治療（外科的もしくは放射線化学療法的）を行った人の血液派生物のサンプルと接触した幹細胞による少なくとも一つの女卑マーカーの発現の同定は、治療の経過観察を可能にする。

10

【0030】

本願発明の方法は、公知の放射線もしくは内視鏡による治療と比較するとより素早くさらに侵襲性が少ない。実際、血液サンプルだけで、癌腫もしくはそれに関連する残留病変の診断のための方法を可能にしており、または癌腫の予後を診断するための方法、または癌腫に対する抗癌治療の効果をモニタリングするための方法、または癌腫に侵され、治療が必要な人の経過観察のための方法を可能にしている。

【0031】

さらに、該方法は、従来のスクリーニングの方法と比較して特異性が高く、さらに高感度である。

20

【0032】

上述のように、排泄物の潜血検査もしくは排泄物のDNA検査は、容易に偽陽性および偽陰性を出してしまう（例えば、痔のある人は、上記の検査に対して偽陽性を示すことがある）。排泄物の潜血検査は、非癌腫の病変がある人の場合であっても陽性反応を示すことができ、排泄物のDNA検査では（医療現場での標準的な使用には至っていない）、検査する突然変異のうち、癌腫のケースのうち少しのパーセントしか発現していないため（例えば、直腸結腸ガンのうちの60%）、多数の偽陰性を出してしまう。

【0033】

さらには、排泄物のDNA検査には、洗練され、さらに効果な実験方法が必要とされる。

30

【0034】

本願発明の方法は、病気の人を、正確且つ信用できる正しいリスクカテゴリーにそれぞれ分類することを可能にし、そして結果的に特定の患者に対する最も適切な治療を特定する段階において、医療従事者の仕事を促進する。

【0035】

本願発明は、図とともに以下に詳細に記載する。

【0036】

図1～9は、健康な人（図1～3）と癌腫に侵された人（図4～9）の血清の存在下で培養した骨髓細胞の免疫染色画像を示す。図7～9は、それぞれ図4～6の拡大図である。

40

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】図1は、健康な人の血清の存在下で培養した骨髓細胞の免疫染色画像を示す。

【図2】図2は、健康な人の血清の存在下で培養した骨髓細胞の免疫染色画像を示す。

【図3】図3は、健康な人の血清の存在下で培養した骨髓細胞の免疫染色画像を示す。

【図4】図4は、癌腫に侵された人の血清の存在下で培養した骨髓細胞の免疫染色画像を示す。

【図5】図5は、癌腫に侵された人の血清の存在下で培養した骨髓細胞の免疫染色画像を示す。

【図6】図6は、癌腫に侵された人の血清の存在下で培養した骨髓細胞の免疫染色画像を

50

示す。

【図 7】図 7 は、図 4 の拡大図である。

【図 8】図 8 は、図 5 の拡大図である。

【図 9】図 9 は、図 6 の拡大図である。

【0038】

図 1、4、7 の黒い部分は、核マーカー T O - P R O（全ての細胞核を標す）の局在化であり、図 2、5、8 における灰色の部分は C K - 1 9 マーカーを示す。図 3、6、9 は、核シグナルおよび C K - 1 9 シグナルの重複を示している。該図は、癌腫に侵された人の血清内に置かれた細胞だけが（図 4～9）、C K - 1 9 陽性であることを明確に示しており（図 5 および 8）；図 2 は、まったく信号がない。さらに、C K - 1 9 シグナルが細胞質内であることが証明されている。

10

【0039】

本願発明の方法は、癌腫をもしくはそれに関連する残存病変の診断のため、もしくは癌腫の予後の診断のため、もしくは癌腫に侵された人の経過をモニタリングするため、もしくは悪性腫瘍に対する抗がん治療の効果を観察するために使用される。本願発明の方法は、

（i）単離した幹細胞を血液派生物の単離したサンプルと接触させる工程と、

（i i）前記幹細胞における少なくとも一つの上皮マーカーの発現を確認もしくは評価す工程と、を有する。

【0040】

20

本願発明の方法は、科学的論理に基づいており、腫瘍に侵された人において、癌腫は、例えば初発病巣は、幹細胞、例えば骨髓にある幹細胞、の上皮細胞への分化を誘導するシグナルを出すことができるということに基づいている。これらの細胞は、D E C s、散在性上皮細胞と呼ぶ。D E C s は、初期の癌の特徴はなく（例えば、同じ突然変異などはない）、したがってこれらは上皮細胞へと分化した常在細胞（間葉系由来の）に由来している。特に、この分化は、初期の腫瘍細胞から出されるシグナルに誘導されていることが示されている。

【0041】

本願発明の方法は、初期の段階の癌腫の診断を可能にし、もしくは進行した段階の癌腫の診断も可能にしている。癌腫は、好ましくは以下に示すもののうちの一つである：大腸癌、胃癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、卵巣癌、肝臓癌、腎臓癌、甲状腺癌、膀胱癌、もしくはすい臓癌。

30

【0042】

さらに、本願発明の方法は、残存病変の診断にも関連しており、好ましくは癌腫に関連した微視的残存病変の診断に関する。

【0043】

残存病変は、癌腫の継続を意味しているが（例えば、微小転移巣もしくは微視的癌細胞など）、医療的には特定できず、もしくは通常の診断装置では特定できない（例えば、C T スキャン、磁気共鳴、超音波検査など）。

【0044】

40

癌腫に侵された人の経過観察は、癌腫に侵された人もしくは癌腫の残存病変の治療（手術もしくは化学放射線治療）の後の段階に関連している。

【0045】

本願発明の方法は、i n v i t r oで行われ；特に血液派生物（もしくは血液の由来物）の単離サンプルに対して行われる。検査に使われる血液派生物は、血清もしくは血漿である。

【0046】

本願発明の目的として、言及された幹細胞は、好ましくは成体幹細胞、より好ましくは多能性幹細胞であり、さらに好ましくは間葉系幹細胞、C D 1 3 3 + 細胞（すなわち、C D 1 3 3 タンパク質を発現している細胞）、C D 4 4 + 細胞、C D 9 0 + 細胞、C D 2 9

50

$+$ 細胞、CD105 $+$ 細胞、CD117 $+$ 細胞、CD56 $+$ 細胞、およびCD73 $+$ 細胞のうちから選択される。

【0047】

本願発明の方法により発現が計測される少なくとも一つの上皮マーカーは、少なくともサイトケラチンである。

【0048】

サイトケラチンは、腫瘍診断の分野において特に有利なフィラメントタンパク質である。サイトケラチンは、上皮細胞に発現しており、したがって悪性の上皮細胞の存在を検知するのに有利なマーカーである。

【0049】

本願発明の方法に使われるサイトケラチンは、好ましくは、サイトケラチン18、19、20および21から選択され、さらに好ましくはサイトケラチンは、CK-19である。

【0050】

血液派生物のサンプルと幹細胞を接触させる工程(i)は、細胞成長に適した支持体(例えば、ディッシュもしくはフラスコなど)の上に幹細胞を播種する工程と、血液派生物のサンプルを使用する幹細胞に適した培養液に希釈する工程とを含む。培養液は、例えば、好ましくは成長因子を加えたアルファ-MEMもしくはStemSpanである。

【0051】

培養液での血液派生物のサンプルの希釈は、1:2から1:20であり、好ましくは1:4から1:8である。

【0052】

一度、培養液で希釈されると、幹細胞に血液派生物サンプルが加えられる。該幹細胞は、血液派生物を有する範囲で、48時間~180時間、好ましくは90~150時間の間成長させる。

【0053】

この間、血液派生物が一以上の適切な分化シグナルを有していれば、幹細胞は上皮細胞へと分化する。

【0054】

分化シグナルは、癌腫から循環システムに放出され、したがって、癌腫に侵されている場合のみ血液派生物に存在する。

【0055】

この期間が終わると、培養液中で分化した幹細胞(上皮細胞へと)の存在を確認する工程へ進むことができ、幹細胞において、分化した少なくとも上皮マーカー(もしあれば)の発現を評価することができる。

【0056】

少なくとも上皮マーカーの発現を特定する前に、好ましくは培養液に希釈されている血液派生物のサンプルを細胞から取り除く。

【0057】

該発現は、この分野によく知られた一般的な検知方法で特定される。これらの方法の非限定的な例としては、免疫蛍光法、免疫細胞化学、ELISA(酵素結合免疫結合法)、RT(逆転写)-PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)などであり、好ましくはRT-PCRはリアルタイムテストである。本願発明の方法に係る好ましい方法は、免疫蛍光法とRT-PCRである。

【0058】

本願発明の方法は、一つの血液派生物サンプルおよび一群の血液派生物サンプルの両方において実現できる。例えば、幹細胞を6、12、24、36、48、もしくは96ウェルのマルチウェルプレートに入れることができる。適切な培養液に希釈された血液派生物のサンプルは、各ウェルにいれられ、幹細胞と接触させるために上述の時間置かれる。

【0059】

10

20

30

40

50

少なくとも上皮マーカーを特定する工程は、したがって様々なウェルで同時に達成できる。このようにすることにより、本願発明の方法は、一群の血液派生物に適用することができ、さらに異なる患者由来のものでも達成できる。

【0060】

マルチウェルシステムの使用は、例えば、ELISAリーダーもしくは蛍光光度計などを使って、顕微鏡での陽性シグナルの手動での読み取りおよび自動読み取りの両方を可能にしている。

【0061】

ELISAの手段により、少なくとも上皮マーカーの発現の特定する工程（ii）が達成された場合、血液派生物のサンプルと接触した幹細胞は、細胞溶解工程が行われる。

10

【0062】

該溶解工程は、細胞膜の構成を壊す適切な溶液で細胞を処理することも含み、細胞の全タンパク質の回復を可能にしている。すなわち、細胞タンパク質の溶解物の回収を可能にしている。

【0063】

細胞タンパク質の前記溶解物は、溶解の瞬間の細胞の特徴と生物学的活性を表すものであり、さらに存在すれば、分化した幹細胞で発現した少なくとも上皮マーカーを含んでいる。すなわち。癌腫に侵された人の血液派生物もしくは癌腫の残存病変のサンプルと接触した後に上皮細胞へと分化した幹細胞である。

【0064】

血液派生物のサンプルと接触した細胞から得られたタンパク質溶解物のサンプルは、タンパク質溶解物内の少なくとも上皮マーカーの存在を同定および定量するためにELISAアッセイを行う。

20

【0065】

ELISAによる少なくとも上皮マーカーの発現の同定は、例えば、マルチウェルプレート、好ましくは96ウェルを有するウェルで達成される。

【0066】

前記プレートは、該プレート内で抗体を吸収できるようにする目的で、少なくとも前記上皮マーカー（一次抗体）に対する少なくとも抗体により前処理をされていてもよい。もしくは、前記一次抗体の吸収は、本願発明の方法の工程の途中においてその場で達成されてもよい。

30

【0067】

タンパク質ライセートのアリコット（aliquat）は、前記プレートに吸収された一次抗体と接触させられる。

【0068】

前記抗体は、血液派生物と接触し分化した幹細胞に発現する少なくとも上皮マーカーと結合する。

【0069】

前記結合の特定は、少なくとも一つの上皮マーカー（二次抗体）に対するは新たな抗体の使用もしくは前記一次抗体に対する抗体（二次抗体）の使用により達成される。両方の抗体は、好ましくは、好適な基質（本願方法を行う際に添加する）と反応して分析するサンプルの発色を特定する酵素（例えば、ジアミノベンジンもしくはアルカリホスファターゼもしくはHRP）と結合している。

40

【0070】

発色の強度は、好適な装置の使用により特定され、これは、癌腫もしくはその残存病変に侵された人の少なくとも血液派生物のサンプルとの接触により上皮細胞のうち分化した幹細胞により発現する少なくとも上皮マーカーの量を示す。

【0071】

前記幹細胞における少なくとも上皮マーカーの発現を確認する工程（ii）は、PCR、好ましくはRT-PCR、より好ましくはリアルタイムRT-PCRの手段により達成

50

される。

【0072】

この場合、DNAもしくはcDNA（目的の遺伝子に対応するメッセンジャーDNAの逆転写により得られる）の増幅には、一以上の対のオリゴヌクレオチドを使用することができ、対の各オリゴヌクレオチドは、二つのDNAフィラメントのうちの一つと結合できる。各DNAフィラメントにオリゴヌクレオチド対が結合した後、典型的なPCRを使い、それらの間にあるDNA配列を増幅することが可能になる。

【0073】

対の各オリゴヌクレオチドは、は、15～30ヌクレオチドにより好ましくは構成される。前記オリゴヌクレオチドは、目的の遺伝子配列に基づいて設計することができ、これは例えば、目的の配列から開始するオリゴヌクレオチドを作るための現在可能なアルゴリズムの使用により設計される。目的の遺伝子は、好ましくはサイトケラチン、好ましくはサイトケラチン18、19、20もしくは21をエンコードするものである。

【0074】

工程(i i)における前記幹細胞における少なくとも一つの上皮マーカーの発現の確認もしくは評価が、免疫蛍光法による場合には、前記幹細胞は、固定剤と共にもしくは無しでスライドの上に置かれる。その後、幹細胞は、フルオロクロムもしくは酵素と共役した、少なくとも上皮マーカーに対する特定の抗体と接触させられる。特定の抗体がフリーである（共役していない）場合、該特定の抗体に対するフルオロクロムもしくは酵素と共役した二次抗体を使用して確認する。前記抗体は、癌腫もしくはその残存病変に侵された人の少なくとも血液派生物のサンプルと接触した幹細胞により発現する少なくとも上皮マーカー（もしあれば）と結合する。

【0075】

この作業が行われると、分化した幹細胞による少なくとも上皮マーカーの発現が、顕微鏡下で観察される。

【0076】

本願発明の方法においては、血液派生物の単離したサンプルと接触させた後の幹細胞における上皮マーカーの発現は、癌腫もしくはその残存病変を示すものである。

【0077】

さらには、前記発現は、癌腫の進行の度合を示すものであり、それにより病態の予後を予測することが可能である。

【0078】

本願発明の方法は、癌腫もしくはそれに関連した残存病変に侵された人、さらに腫瘍を除去するなどの治療をした人の経過観察を可能にしている。幹細胞サンプルによる少なくとも上皮マーカーの発現の特定が、癌腫に侵された人が対象となった治療（腫瘍を除去することができた）後の工程により得られた血液派生物のサンプルに影響されている場合、該病気の再発を観察することができる。

【0079】

これは、癌腫に侵された人の治療後のステージにおいて、少なくとも上皮マーカーの発現が特定された場合に、すばやい治療的介入を保証している。

【0080】

この状況において、前記人が対象とされた治療後のステージにおいて得られた血液派生物サンプルには、幹細胞を上皮細胞へと分化させることが出来る新たなシグナルがあるはずであり、これは、前記人が新たな腫瘍もしくはそれに関連する残存病変に侵されていることを示唆する。

【0081】

そして、本願発明の方法は、抗癌治療、特に化学／放射線治療の効果を観察するのに使われる。

【0082】

この場合、該方法は、前記人が対象とされる治療の種々のステージにおける病気の人の

10

20

30

40

50

血液派生物のサンプルと接触した後の幹細胞の少なくとも上皮マーカーの発現レベルを比較することを含む。

【0083】

前記発現レベルの変化は、治療自体の進行を示す。

【0084】

例えば、初期のステージと比較して進行したステージでの治療において発現レベルが低減しているということは、治療の効果を示している。本願発明は、60%～100%、好ましくは70%～90%の特異性を特徴としている。

【0085】

本願発明の感度としては、60%～100%、好ましくは70%～90%の範囲である。

10

【0086】

さらなる実施形態では、本願発明の方法は、調査技術を組み合わせる目的で現在使われている他の診断／予後判断方法と一緒に使われてもよい。

【0087】

例えば、該方法は、特に各患者に合わせた治療／予後方針を決定する目的で、大腸内視鏡検査、オペッククリズマ、排泄物DNA検査および他の可能な調査技術と組み合わせることができる。

【0088】

公知の調査技術および本願発明の方法により得られた完成した医療データは、癌腫を治療するのに非常に有利であるパーソナライズされた治療方針の定義を促進および向上する。

20

【0089】

本願発明のさらなる観点は、少なくとも上皮マーカーに対する少なくとも抗体（一次抗体と定義する）、もしくは少なくとも上皮マーカーのcDNAもしくはDNAの増幅のための少なくとも対のオリゴヌクレオチド；および／または少なくとも幹細胞のサンプル；および／または前記幹細胞を培養する手段を有するキットに関する。上皮マーカーに対する前記抗体は、サイトケラチン、好ましくはサイトケラチン18、サイトケラチン19、サイトケラチン20もしくはサイトケラチン21に対するものであり、さらに好ましくはサイトケラチン19に対するものである。

30

【0090】

上皮マーカーに対する前記抗体は、一般的な免疫蛍光法（例えば、テキサスレッド（Texas red）、フルオレセイン（FITC）、フィコエリスリン（PE）、テトラメチルローダミンイソシアネート（TRITC））の手段による同定に好適なフルオロクロムと直接共役でき、もしくは前記抗体は、例えば免疫組織化学などの一般的な染色アッセイを使うことにより同定できるタンパク質などの適切な分子と共役できる（例えば、前記分子は、ジアミノベンジジン、アルカリホスファターゼもしくはHRPでもよい）。

【0091】

もしくは、一次抗体はフリーであってもよい。この場合、同定には、前述のように共役した二次抗体（一次抗体に対する）が使われる。後者の場合、該キットは、さらに二次抗体を有し、すなわち一次抗体に対する抗体を有する。前記二次抗体は、同定のためにフルオロクロムもしくは酵素と共役している。

40

【0092】

該キットは、該方法を実施するための、使い捨て、滅菌もしくは滅菌可能な器具を有していてもよく、例えば少なくとも上皮マーカーに対する少なくとも抗体により前処理された（もしくは前処理なしでもよい）マルチウェルプレートなどを有していてもよい。

【0093】

該キットは、該同定方法を行うために有利な物質をさらに有していてもよく、例えば少なくとも上皮系マーカーのcDNA／DNAを逆転写および増幅するのに適切な溶液、例えば逆転写酵素、DNAの増幅のための酵素、塩、ヌクレオチドの混合液、界面活性剤、

50

還元剤などを有してもよい。

【0094】

さらに、前記物質は、細胞溶解、洗浄、固定、ブロッキング、中和もしくは同定のための溶液であってもよい。

【0095】

前記キットは、癌腫に侵されているかどうか、もしくは癌腫に関連する残存病変があるかどうか、もしくは癌腫に侵された人の予後を診断するのに有利である。

【0096】

さらに、前記キットは、癌腫に侵されたひとの治療の効果もしくは経過観察をモニタリングするのに使用できる。言い換えれば、該キットは、本願発明の方法を達成するのに使

10

【実施例】

【0097】

細胞

StemCell Technologies社から骨髓からのヒト単核細胞（BM-MNCs）を購入した。

【0098】

10%の血清（間葉系幹細胞用のウシ胎児血清、StemCell Technologies社）およびペニシリン／ストレプトマイシン1x（StemCell Technologies社）を含む培養液に250μlのDNase I（1mg/ml）を使

20

【0099】

該細胞は、血清サンプルによる刺激実験を開始する前に最低でも3日間培養された。

【0100】

細胞を成長および増幅するのに使われた増殖培養液は、Alpha MEMもしくはStemSpan SFEM（血清フリー増殖培養液、StemCell Technologies社）により構成され、成長因子が添加されている（StemSpan CC100-StemCell Technologies社）。

【0101】

BM-MNCのヒト血清による刺激アッセイ

30

血清は、大腸癌に侵された人および健康な人からの血液サンプルから得られた。

【0102】

癌腫に侵された19人が、本願発明の方法によりテストされ、より詳しくは、この人達は、異なるステージの腺癌に侵されていた。

【0103】

表1は、癌腫に侵された18人に関する医療データをまとめたものである。

【0104】

また、表1は、健康な人に関する実験データについても報告している。特に12の健康な人のサンプルが分析された（S1-12）。

【0105】

表から以下のことが分かる：

- 1) 腫瘍の組織学的診断；
- 2) 国際腫瘍分類（international tumor staging）（pTNMで現され、Tは、内臓被膜への進展度、Nは、リンパ節の状態、Mは、転移の有無を現す。）；
- 3) CK-19の陽性（BM-MNCsがCK-19⁺を示す）、すなわちCK-19を発現する細胞の存在。

【0106】

表1

40

サンプル	組織学的診断	pTNM	BM-MNC CK-19 ⁺
CCR-1	中程度に分化した腺癌－ 粘液性		+
CCR-2	非常に分化した腺癌－化 学放射線治療後		+
CCR-3	非常に分化した腺癌	T3N1M1	+
CCR-4	中程度に広がった腺癌－ 肝転移	T3N2M1	+
CCR-5	絨毛腺腫に非常に分化し た腺癌(悪性腫瘍化する 高リスクを伴って始まる腫	T3N0Mx	+
CCR-6	中程度に分化した腺癌	T3N0Mx	+
CCR-7	ほとんど分化していない 腺癌	T3N3Mx	+
CCR-9	非常に広がった腺癌－管 状腺腫-胆のう炎	T3N0Mx	+
CCR-11	中程度に分化した腺癌		+
CCR-12	中程度に分化した腺癌		+
CCR-16	中程度に分化した腺癌	T3N2M1	+
CCR-18	ほとんど分化していない 腺癌		+
CCR-20	中程度に分化した腺癌	T3N2Mx	+
CCR-21	非常に分化した腺癌	T3N0Mx	+
CCR-22	中程度に分化した腺癌	T3N2Mx	+
CCR-23	中程度に分化した腺癌－ 粘液性	T4N2Mx	+
CCR-24	非常に分化した腺癌	T2N0Mx	+
CCR-25	中程度に分化した腺癌－ 粘液性	T4N3Mx	+
S-1			-
S-2			-
S-3			-
S-4			-
S-5			-
S-6			+
S-7			-
S-8			+
S-9			-
S-10			+
S-11			-
S-12			-

10

20

30

【0107】

各血清サンプルは、0.22 μmの孔を有する適切なフィルター（Corning Costar）と滅菌された。

【0108】

合計で約100000セルが各ウェルに播種された（約100000セル/cm²）。250 μlの血清が1250 μlの培養液に加えられた（すなわち、血清が1：6に希釈された）。

【0109】

5%CO₂の雰囲気下の37℃で120時間の培養後、細胞を回収し、CK19シグナルを免疫蛍光法で特定した。

40

【0110】

すべての実験は、二回行われた。

【0111】

免疫蛍光法

BM-MNCsは、培養されていた支持体から剥離され、100 μlのPBSに懸濁された。

【0112】

そして、細胞は、極性スライドの上に均等に分散され、乾燥するために室温に一晩置か

50

れた。

【0113】

その後、細胞は、96%エタノールで室温において10分間スライドの上に固定された。

【0114】

TBS（トリス緩衝液）で洗浄した後、上述のように固定された細胞は、抗体による非特異的な干渉を減らす目的でブロッキング工程が行われた（すなわち、バックグラウンドのノイズを減らした）。

【0115】

ブロッキング工程は、室温で15分間、濃度3%のヤギ血清のTBS（Sigma）内で行われた。

【0116】

ヒトのサイトケラチン-19に対するマウスのモノクローナル抗体である一次抗体（抗ヒトサイトケラチン、DAKO）が使われて、BM-MNCsの特定のタンパク質を特定した。

【0117】

該抗体は、PBSにより1:50に希釈して使われ（始めの濃度は21mg/l、最終的な濃度は0.42mg/l）、スライドに固定された細胞とモノクローナル抗体の間の反応は4℃で一晩行われた。

【0118】

これにつづいて、細胞は、TBSにより洗浄され、結合していない抗体が除去された。そして、PBSで1:100に希釈された（始めの濃度は2mg/l、最終的な濃度は0.02mg/l）二次抗体（Alexa Fluor 488, Invitrogen）と共に室温において30分間培養された。

【0119】

陽性シグナルの読み取り（つまり、蛍光発色している細胞）は、共焦点顕微鏡を使って行われた。顕微鏡で細胞を観察する前に、TO-PRO（Invitrogen）が加えられ、蒸留水で1:7000に希釈し、細胞核を染色した。

【0120】

画像を回収し、インタラクティブLCSソフトウェア（Leica, Wetzlar社、ドイツ）を使って分析した。

結果を、表1および図4～9にまとめており、癌腫に侵された人の血清すべてが腫瘍由来のシグナルを有し、これは間葉系細胞の上皮細胞への分化を誘導できるものである。

【0121】

健康な人から得られた血清は、間葉系幹細胞の上皮細胞への分化をin vitroで誘導することはできない。12人のうち3人の健康な人のみのごくわずかな陽性を示した（サンプルS-6、8、および10を参照）。

【0122】

健康な人の血清で処理された間葉系幹細胞は、顕微鏡下の観察で、染色された核のみを示した（図1～3の黒いシグナル）。サイトケラチン19に関連する細胞質シグナルは、観察されなかった（図1（染色された核）、図2（CK-19染色）、図3（二つの染色を重ねたもの）を参照）。

【0123】

癌腫に侵された人の血清により処理された間葉系幹細胞は、細胞核を囲むサイトケラチン19に関連する強い細胞質シグナル（図4～6と、拡大図である図7～9、シグナルは灰色）を示した（図4および図7（染色された核）、図5および図8（CK-19染色）、および図6および図9（二つの染色を重ねたもの）を参照）。

【0124】

本願方法の特異性および感度の計算

本願発明の方法の特異性は、以下の式により計算された：

10	
20	
30	
40	
50	

特異性 = 真陰性／全健康な人の数 = 真陰性／（真陰性＋偽陽性）

本願発明の方法の感度は、以下の式により計算された：

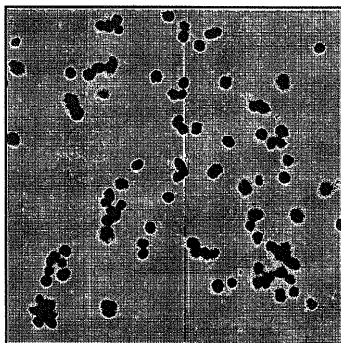
感度 = 真陽性／全病気の人の数 = 真陽性／（真陽性＋偽陰性）

【 0 1 2 5 】

本願発明の方法は、特性が 9 4 . 8 % であり、感度が 7 5 % であった。

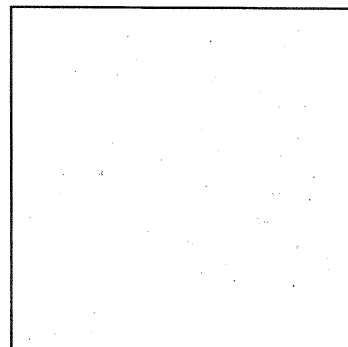
【 図 1 】

図1



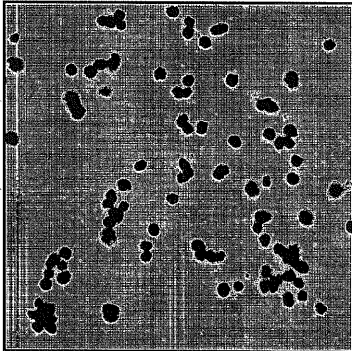
【 図 2 】

図2



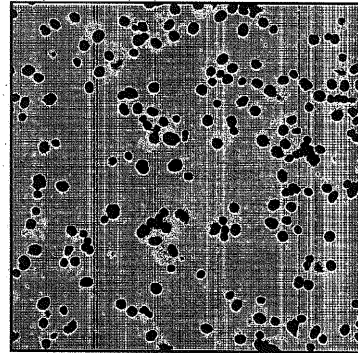
【図 3】

図3



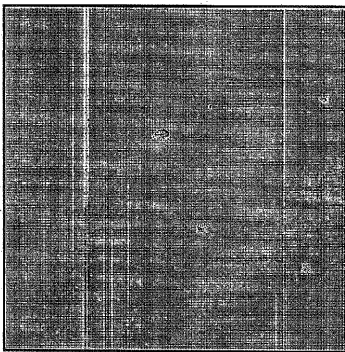
【図 4】

図4



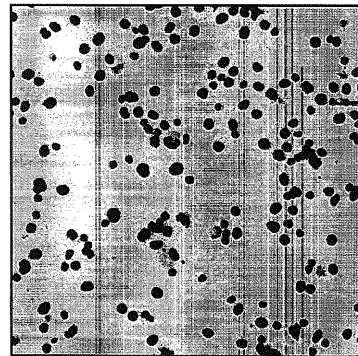
【図 5】

図5



【図 6】

図6



【図 7】

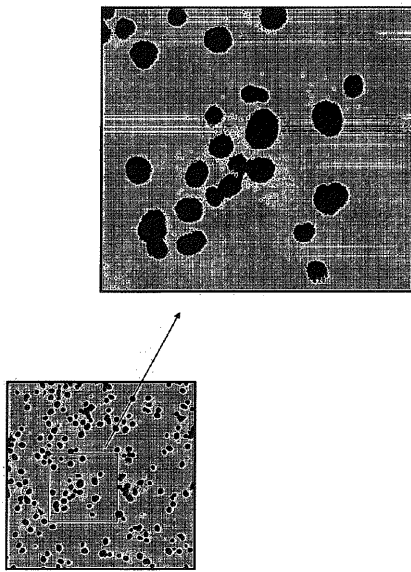


図 7

【図 8】

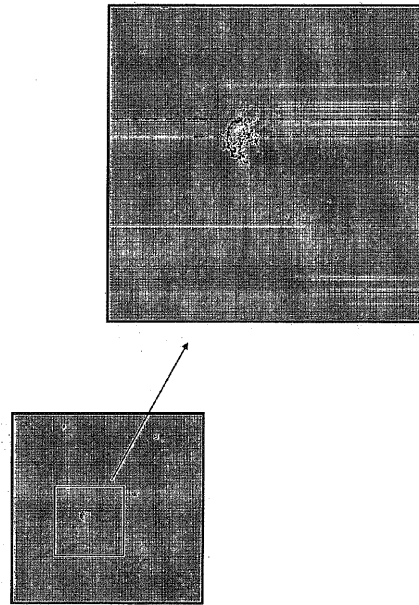


図 8

【図 9】

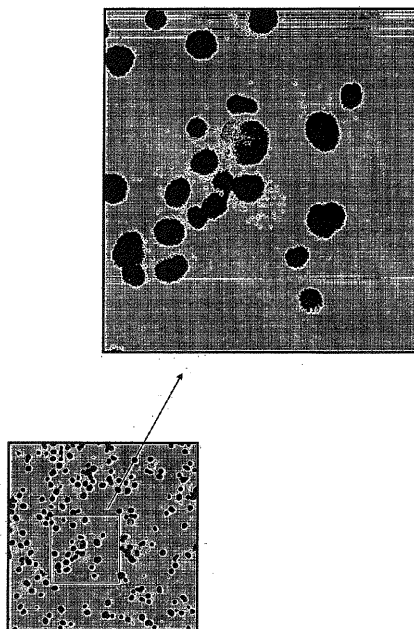


図 9

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IT2010/000484

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/50 G01N33/574
ADD.

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)
G01N

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SILVA J M ET AL: "Detection of epithelial tumour RNA in the plasma of colon cancer patients is associated with advanced stages and circulating tumour cells", GUT, BRITISH MEDICAL ASSOCIATION, LONDON, UK, vol. 50, no. 4, 1 April 2002 (2002-04-01), pages 530-534, XP003005191, ISSN: 0017-5749, DOI: DOI:10.1136/GUT.50.4.530 the whole document ----- -/-	1-18

☒ 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 document 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

28 June 2011

Date of mailing of the international search report

08/07/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Trommsdorff, Marion

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IT2010/000484

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GERVASONI A ET AL: "Molecular signature detection of circulating tumor cells using a panel of selected genes", CANCER LETTERS, NEW YORK, NY, US, vol. 263, no. 2, 18 May 2008 (2008-05-18), pages 267-279, XP022603229, ISSN: 0304-3835, DOI: DOI:10.1016/J.CANLET.2008.01.003 [retrieved on 2008-02-08] table 4 -----	1-18
X	JAW-YUAN WANG ET AL: "Molecular Detection of Circulating Tumor Cells in the Peripheral Blood of Patients with Colorectal Cancer Using RT-PCR: Significance of the Prediction of Postoperative Metastasis", WORLD JOURNAL OF SURGERY ; OFFICIAL JOURNAL OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SURGERY/SOCIÉTÉ INTERNATIONALE DE CHIRURGIE, SPRINGER-VERLAG, NE, vol. 30, no. 6, 4 May 2006 (2006-05-04), pages 1007-1013, XP019422844, ISSN: 1432-2323, DOI: DOI:10.1007/S00268-005-0485-Z figure 1 -----	1-18
X	STATHOPOULOU A ET AL: "Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, US, vol. 20, no. 16, 15 August 2002 (2002-08-15), pages 3404-3412, XP002407126, ISSN: 0732-183X, DOI: DOI:10.1200/JCO.2002.08.135 page 3405; table 1 -----	1-18
X	MICHEL MARTINE ET AL: "Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: Keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage", JOURNAL OF CELL SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB, vol. 109, no. 5, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 1017-1028, XP002216781, ISSN: 0021-9533 page 1022; figure 6 ----- -/--	17-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IT2010/000484

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TSOUMA AIKATERINI ET AL: "Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer: Detection Methods and Clinical Significance", ANTICANCER RESEARCH, vol. 28, no. 6B, November 2008 (2008-11), pages 3945-3960, XP002644177, the whole document -----	1-21

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/48 (2006.01)		C 1 2 M 1/34	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		C 1 2 M 1/34	E
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		G 0 1 N 33/48	P
		G 0 1 N 33/53	D
		G 0 1 N 33/574	D

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 アルトモーレ, ドナート
 イタリア, 7 0 0 5 4 ジョヴィナッツォ (バーリ), ヴィア レッチェ 1

(72)発明者 ディ レオ, アルフレード
 イタリア, 7 0 0 4 3 モノポリ (バーリ), ヴィア フィリッポ トゥラーティ 1

(72)発明者 ロテッリ, マリア テレーザ
 イタリア, 7 0 0 1 6 ノイカッタロ (バーリ), ヴィア ストラータ プロヴィンチャーレ
 ペル ノイカッタロ 6 1

(72)発明者 バローネ, ミケーレ
 イタリア, 7 0 1 2 4 バーリ, ヴィアーレ ディ ラウレンティス 2 3/ディー

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA24 AA26 BA13 BB24 CA25 CA26 CB01 CB02 DA36
 FA16 FB03 FB12
 4B029 AA08 BB11 BB15 CC02 GA03 GB10
 4B063 QA19 QQ03 QQ08 QQ53 QQ79 QR36 QR48 QR62 QR72 QR77
 QS02 QS33 QS34 QX01
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 EA51 FA71

专利名称(译)	癌的诊断方法及其使用方法		
公开(公告)号	JP2014500026A	公开(公告)日	2014-01-09
申请号	JP2013542671	申请日	2010-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	THD股份公司		
申请(专利权)人(译)	茶H.迪上课.复制.呃.		
[标]发明人	バスティアフィリッポ アルトモーレドナート ディレオアルフレード ロテッリマリアテレーザ バローネミケーレ		
发明人	バスティア, フィリッポ アルトモーレ, ドナート ディレオ, アルフレード ロテッリ, マリアテレーザ バローネ, ミケーレ		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/04 C12Q1/68 C07K16/30 C12M1/34 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/5073 G01N33/57419 G01N33/57484 G01N2800/50 G01N2800/52 G01N2800/56		
FI分类号	C12Q1/02 C12Q1/04 C12Q1/68.A C07K16/30 C12M1/34.F C12M1/34.Z C12M1/34.E G01N33/48.P G01N33/53.D G01N33/574.D		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/BA13 2G045/BB24 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FB03 2G045/FB12 4B029/AA08 4B029/BB11 4B029/BB15 4B029/CC02 4B029/GA03 4B029/GB10 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA51 4H045/FA71		
其他公开文献	JP6018074B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及诊断与其相关的癌或残留疾病，或用于癌的预后，或用于监测针对癌的抗肿瘤疗法的有效性，或用于监测癌症的随访的方法。受癌症影响的个体，特别是结肠直肠癌，胃癌，乳腺癌，肺癌或前列腺癌，肝癌，卵巢癌，肾癌，甲状腺癌，癌膀胱或胰腺癌。本发明的方法在于将成体干细胞与待分析个体的血红素衍生物样品接触，并通过免疫荧光，免疫组织化学，ELISA检测干细胞中至少上皮标记物的表达。或RT-PCR。

