

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5568807号
(P5568807)

(45) 発行日 平成26年8月13日(2014.8.13)

(24) 登録日 平成26年7月4日(2014.7.4)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	M
GO 1 N 33/574	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/50	(2006.01)	GO 1 N 33/574	A
GO 1 N 33/15	(2006.01)	GO 1 N 33/50	Z
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	GO 1 N 33/15	Z

請求項の数 19 (全 21 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)
 (65) 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)
 審査請求日 平成23年10月27日(2011.10.27)
 (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

(73) 特許権者 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) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

メラノーマを判定するために、ヒトから採取した生体試料中に存在する、pro-platelet basic protein precursor (P P B P) 遺伝子を検出又は定量する方法。

【請求項2】

P P B P 遺伝子に特異的に結合する分子を用いて、P P B P 遺伝子を検出又は定量することを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】

P P B P 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2記載の方法。

【請求項4】

メラノーマを判定するために、ヒトから採取した生体試料中に存在する、pro-platelet basic protein precursor (P P B P) タンパクを検出又は定量する方法。

【請求項5】

P P B P タンパクに特異的に結合する分子を用いて、P P B P タンパクを検出又は定量することを特徴とする請求項4記載の方法。

【請求項6】

P P B P 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5記載の方法。

【請求項7】

10

20

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 ~ 6 のいずれか記載の方法。

【請求項 8】

PPBP 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。

【請求項 9】

PPBP 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 8 記載のメラノーマの判定用キット。

【請求項 10】

PPBP 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。

10

【請求項 11】

PPBP 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 10 記載のメラノーマの判定用キット。

【請求項 12】

被検物質の存在下で培養したメラノーマ細胞における、PPBP 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。

【請求項 13】

被検物質の存在下で培養したメラノーマ細胞における、PPBP 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。

20

【請求項 14】

メラノーマの腫瘍マーカー遺伝子として、PPBP 遺伝子を使用する方法。

【請求項 15】

メラノーマの腫瘍マーカーとして、PPBP タンパクを使用する方法。

【請求項 16】

メラノーマ患者の予後を予測するために、ヒトから採取した生体試料中に存在する、PPBP 遺伝子を定量する方法。

【請求項 17】

メラノーマ患者の予後を予測するために、ヒトから採取した生体試料中に存在する、PPBP タンパクを定量する方法。

30

【請求項 18】

メラノーマ患者の予後予測因子として、PPBP 遺伝子を使用する方法。

【請求項 19】

メラノーマ患者の予後予測因子として、PPBP タンパクを使用する方法。

【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。

40

【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、

50

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た。

【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。

10

【0004】

現在までに、メラノーマの腫瘍マーカーとして、5-S-C D (5-S-cysteinyldopa)、M I A (melanoma inhibitory activity)、N S E (neurone-specific enolase)、L A S A - P (lipid-bound sialic acid)、L D H (lactate dehydrogenase)、S 1 0 0 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 (g l y p i c a n - 3 ; G P C 3) (例えば、特許文献1)や、S P A R C (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。

20

【特許文献1】WO 2005 / 039380

【特許文献2】WO 2006 / 043362

【非特許文献1】「細胞および分子免疫学」(eds) Abbas A. K., Lichtman, 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】

30

【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た。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

40

50

て、現在最も臨床現場で利用されている 5 - S - C D とメラノーママーカーとしての能力を比較したところ、P P B P は、感度および陰性予測値において 5 - S - C D より優れており、メラノーマ症例のモニタリングにも P P B P は 5 - S - C D より有用であることが確認された。

【 0 0 0 7 】

すなわち本発明は、(1) メラノーマを判定するために、ヒトから採取した生体試料中に存在する、pro-platelet basic protein precursor (P P B P) 遺伝子を検出又は定量する方法や、(2) P P B P 遺伝子に特異的に結合する分子を用いて、P P B P 遺伝子を検出又は定量することを特徴とする上記 (1) 記載の方法や、(3) P P B P 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 (2) 記載の方法に関する。

10

【 0 0 0 8 】

また本発明は、(4) メラノーマを判定するために、ヒトから採取した生体試料中に存在する、pro-platelet basic protein precursor (P P B P) タンパクを検出又は測定する方法や、(5) P P B P タンパクに特異的に結合する分子を用いて、P P B P タンパクを検出又は定量することを特徴とする上記 (4) 記載の方法や、(6) P P B P 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 (5) 記載の方法や、(7) 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) ~ (6) のいずれか記載の方法に関する。

20

【 0 0 0 9 】

さらに本発明は、(8) P P B P 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、(9) P P B P 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 (8) 記載のメラノーマの判定用キットや、(1 0) P P B P 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、(1 1) P P B P 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 (1 0) 記載のメラノーマの判定用キットに関する。

30

【 0 0 1 0 】

また本発明は、(1 2) 被検物質の存在下で培養したメラノーマ細胞における、P P B P 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、(1 3) 被検物質の存在下で培養したメラノーマ細胞における、P P B P 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、(1 4) メラノーマの腫瘍マーカー遺伝子として、P P B P 遺伝子を使用する方法や、(1 5) メラノーマの腫瘍マーカーとして、P P B P タンパクを使用する方法に関する。

40

【 0 0 1 1 】

さらに本発明は、(1 6) メラノーマ患者の予後予測するために、ヒトから採取した生体試料中に存在する、P P B P 遺伝子を定量する方法や、(1 7) メラノーマ患者の予後予測するために、ヒトから採取した生体試料中に存在する、P P B P タンパクを定量する方法や、(1 8) メラノーマ患者の予後予測因子として、P P B P 遺伝子を使用する方法や、(1 9) メラノーマ患者の予後予測因子として、P P B P タンパクを使用する方法に関する。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 2 】

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

50

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 (- A C T) 遺伝子、complement component 6 precursor (C C 6 P) 遺伝子、Plasminogen (P L A) 遺伝子、pro-platelet basic protein precursor (P P B P) 遺伝子、Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 precursor (I A I H 4) 遺伝子、apolipoprotein F precursor (A p o F) 遺伝子、Complement factor H-related protein 1 precursor (F H R 1) 遺伝子、ハプトグロブリン (H P) 遺伝子、及びSerum amyloid A2 (S A A 2) 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 (- A C T) タンパク、complement component 6 precursor (C C 6 P) タンパク、Plasminogen (P L A) タンパク、pro-platelet basic protein precursor (P P B P) タンパク、Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 precursor (I A I H 4) タンパク、apolipoprotein F precursor (A p o F) タンパク、Complement factor H-related protein 1 precursor (F H R 1) タンパク、ハプトグロブリン (H P) タンパク、及びSerum amyloid A2 (S A A 2) 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 (F A M - 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、 - A C T 遺伝子、C C 6 P 遺伝子、P L A 遺伝子、P P B P 遺伝子、I A I H 4 遺伝子、A p o F 遺伝子、F H R 1 遺伝子、H P 遺伝子、及びS A A 2 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れるものではないが、なかでも、P P B P 遺伝子、I A I H 4 遺伝子、F H R 1 遺伝子、及びS A A 2 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、ブラン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、コロニーあるいはブラン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、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^{33}\text{P}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ 、 $[^{59}\text{Fe}]$ 等を、上記酵素としては、 α -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】

10

20

30

40

50

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

10

20

30

40

50

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、-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事ができ、上記分子としては、本件メラノーママーカ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事ができる。

10

【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る。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、慣用のプロトコルを用いて、本件メラノーママーカ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。

20

【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(Jayase na SD, 1999, Clin. Chem., 45: 1628-1650)やin vitro selection法(Elington AD, S zostak JW, 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 $10^{14} \sim 10^{15}$ 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る。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。

30

40

【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遺伝子及び/又は本件メラノーママーカ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

50

ー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。

【 0 0 2 7 】

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、P P B P 遺伝子、I A I H 4 遺伝子、F H R 1 遺伝子、及びS A A 2 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、P P B P タンパク、I A I H 4 タンパク、F H R 1 タンパク、及びS A A 2 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、洗浄剤等の試薬を含んでいてもよい。

10

【 0 0 2 8 】

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、P P B P 遺伝子、I A I H 4 遺伝子、F H R 1 遺伝子、及びS A A 2 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、P P B P タンパク、I A I H 4 タンパク、F H R 1 タンパク、及びS A A 2 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、N C C - K T、G 3 6 1、M M G - 1、C 3 2、R P M I 7 9 5 1、K U - M E L T C - 1、M E L - 0 0 1 (P)、M E W O、A 3 7 5、T D M M 1、S E K I 等を好例として挙げるができる。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。

20

30

【 0 0 2 9 】

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ができる。

40

【 0 0 3 0 】

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マーカー遺伝子、具体的には、- A C T 遺伝子、C C 6 P 遺伝子、P L A 遺伝子、P P B P 遺伝子、I A I H 4 遺伝子、A p o F 遺伝子、F H R 1 遺伝子、H P 遺伝子、及びS A A 2 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

50

試料中に存在するメラノーマタンパク、具体的には、 - A C Tタンパク、C C 6 Pタンパク、P L Aタンパク、P P B Pタンパク、I A I H 4タンパク、A p o Fタンパク、F H R 1タンパク、H Pタンパク、及びS A A 2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、P P B P遺伝子やP P B P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P P B P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。

10

【 0 0 3 1 】

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】

【 0 0 3 2 】

20

[実験に用いた抗体]

ポリクローナルウサギ抗ヒトN A P - 2抗体はPepro Tech社、ポリクローナルウサギ抗ヒトS A A抗体はSanta Cruz Biotechnology社、ポリクローナルヤギ抗ヒトF a c t o r 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I g G抗体とペルオキシダーゼ結合ウサギ抗ヤギI g G抗体は、Bio Rad Lab社とAbcam社からそれぞれ購入した。

【 0 0 3 3 】

[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P P B Pと5 - S - C D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 Healthcare 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 - 8 0 にて保存した。

30

【 0 0 3 4 】

[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。

40

【 0 0 3 5 】

【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

10

【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 g G、I g A、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 7 0 μ L) 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】

20

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 Y M - 3 (分画分子量 = 3 0 0 0 D a、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 3 0 0 μ L 程度になるまで 7 5 0 0 G、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、2 0 0 μ g の血漿タンパクを 1 0 0 m M 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 = 5 0 : 1 w / w) 。このペプチド混合物を 3 7 で 1 6 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、1 0 % トリフルオロ酢酸 (T F A) を適量添加して溶液の p H を下げた。

【実施例 3】

30

【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 Healthcare Amersham Biosciences 社製) をセットした AKTApriime plus クロマトグラフィシステム (GE Healthcare Amersham Biosciences 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 . 0 0 5 % T F A 溶液、p H 3 . 2) で 5 m l 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 (5 0 0 m M 酢酸アンモニウム溶液、p H 3 . 2) でペプチドを溶出した。グラジエントモード (0 - 1 0 0 %、1 6 C . V .) で溶出し、流速は全工程 1 . 0 m l / m i n で行い、波長 2 1 4 n m でピークを検出した。1 m l 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。

40

【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 (3 0 0 μ m I . D . × 5 m m、C 1 8 の 1 0 0、LC packings 社製) による脱塩・濃縮を行った後、本カラム (7 5 μ m I . D . × 1 5 c m、C 1 8 の 1 0 0、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 % T F A 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 = 9

50

5 : 5、0 . 0 5 % T F A) 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 = 2 0 : 8 0、0 . 0 4 % T F A) による 1 5 0 分間のグラジエント溶出を行い（1 4 5 分：0 - 6 5 % 5 分：9 5 %、流速 = 3 0 0 n L / m i n）、波長 2 1 4 n m 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（5 0 % v / v アセトニトリル、0 . 5 % v / v T F A）に溶解したalpha-cyano-o-4-hydroxy-trans-cinnamic acidと混合させながらスポットティングした（3 0 0 n L / スポット）。

【 0 0 4 0 】

[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 2 3 0 0 ~ 2 5 0 0 程度にセットし、8 0 0 ~ 3 0 0 0 D a のイオンを標的とした M S / M S 解析を実施した。得られた M S / M S スペクトルについて、N C B I データベースを用いた M A S C O T サーチ（www.matrixscience.com）を行い、タンパクを同定した。

【 実施例 4 】

【 0 0 4 1 】

[細胞培養]

1 1 種類のヒトメラノーマ細胞株（N C C - K T、G 3 6 1、M M G - 1、C 3 2、R P M I 7 9 5 1、K U - M E L T C - 1、M E L - 0 0 1（P）、M E W O、A 3 7 5、T D M M 1、S E K I）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、1 0 % ウシ胎児血清（Gibco社製）、2 m M グルタミン（Cambrex Biosciences、LONZA社製）、1 0 0 u n i t s / m L ペニシリン（Gibco社製）、1 0 0 μ g / m L ストレプトマイシン（Gibco社製）を含む R P M I 1 6 4 5 培地で培養した。一方、メラノサイトは、0 . 5 % ウシ胎児血清、1 0 n g / m L ホルボールミリスチン酸アセテート、3 μ g / m L ヘパリン、5 μ g / m L トランスフェリン、0 . 4 % ウシ下垂体抽出物、3 n g / m L ヒト線維芽細胞増殖因子 - B、5 μ g / m L インスリン、0 . 1 8 μ g / m L ハイドロコルチゾン含有の m e d i u m 2 5 4 培地（Cascade Biologicals社製）で培養した。全ての培養は 3 7 ° C、5 % C O ₂ in 空気中の条件下で行った。

【 実施例 5 】

【 0 0 4 2 】

[同定タンパクのリアルタイム P C R 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 P C R 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 アクチンを用いた。P C R 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 R N A を抽出し、全 R N A 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 2 μ g の全 R N A から c D N A を合成した。Taq Man 定量 P C R 反応は、Taq Man Universal PCR Master Mix（Applied Biosystems社製）中に 1 μ L の c D N A と 1 μ L のプライマー/プローブ混合物を含んだ総量 2 0 μ L で実施した。P C R の反応は、5 0 ° C で 2 分、9 5 ° C で 1 0 分、9 5 ° C で 1 5 秒を 4 0 サイクル、6 0 ° C 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、m R N A 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。

【 0 0 4 3 】

[イムノプロット解析]

各血漿タンパク（5 0 μ g）は、2-メルカプトエタノール入りの S D S サンプルバッ

10

20

30

40

50

ファー (Factor H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%Tween 20-TBS、抗Factor H抗体: 5%スキムミルク/PBS(-))。続いて、4で一晚、1次抗体 (抗NAP-2抗体, 抗SAA抗体, 抗Factor H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、ImageQuant software (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プ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 x 250 mm, 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、1.5~8 nMであり、カットオフ値を8 nMにセットした。

【0045】

[免疫組織化学解析]

イムノプロット解析により、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

10

20

30

40

50

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: -ACT、complement component 6 precursor: CC6P、Plasminogen: PLA、pro-platelet basic protein precursor: PPBP、Inter-alpha-trypsininhibitor heavy chain H4 precursor: IAHH4、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 -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IAHH4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。

10

20

【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、IAHH4)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)。

30

【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プロット解析]

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プ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FHR1(37kDa)とFHR1(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)。

40

【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

50

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 P P B P または S A A の発現レベルが高かったそれぞれの患者の摘出腫瘍 (P P B P : Melanoma-5、S A A : 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 P P B P 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、S A A は腫瘍組織において弱い発現が確認できた (図 6)。

【実施例 1 1】

【 0 0 5 1】

[結果 : P P B P 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、P P B P 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 P P B P 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 Immunoblotting にて検出されたバンドの体積を定量し、P P B P 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 2 7 人の P P B P 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 3 1 のメラノーマ症例の全生存期間と上記の P P B P 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 P P B P 産生量が 2 0 以上と 2 0 未満のグループ間で生存期間の比較を行った。P P B P 産生量が 2 0 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、P P B P 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 1 2】

【 0 0 5 2】

[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 P P B P と 5 - S - C D レベル]

メラノーマ患者 3 0 症例と健常人 1 0 例由来の血漿中のマーカー濃度は、P P B P が 24.9 ± 18.4 と 4.5 ± 11.2 ($p = 0.0047$) で、5 - S - C D 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、P P B P がそれぞれ 8 7 . 1 %、9 0 . 0 % で、5 - S - C D が 3 2 . 3 %、1 0 0 % であった (図 8)。総合的な評価では、P P B P は、感度および陰性予測値において 5 - S - C D 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 P P B P 及び 5 - S - C D 値を比較した。P P B P 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 - C D 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 P P B P は有用であることが確認された。

【 0 0 5 3】

[結果 : メラノーマ患者血漿中の P P B P レベルと生存期間との相関]

次に評価可能な 3 0 人のメラノーマ症例の全生存期間と上記の P P B P 及び 5 - S - C D 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 P P B P 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 1 0 - A)。さらに Kaplan-Meier 法を用いて P P B P 産生量が 2 0 以上 ($n = 16$: 平均生存期間 6.9 ± 3.6 か月) と 2 0 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 1 0 - B 左)。P P B P 産生量が 2 0 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 - S C D 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 1 0 - B 右)。以上より P P B P 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ということがわかった。

10

20

30

40

50

【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。

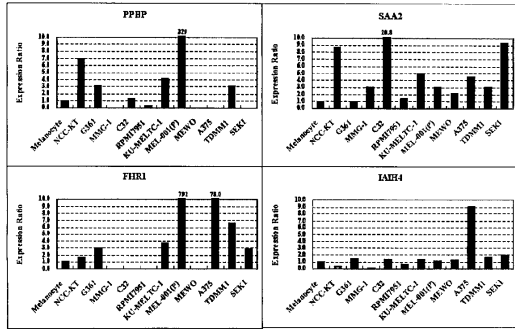
【図9】免疫療法(樹状細胞ワクチン)を受け、臨床的に明らかな腫瘍の縮小を認めた2症例における治療経過中のPPBP及び5-S-CD値を比較した結果を示す図である。

【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。

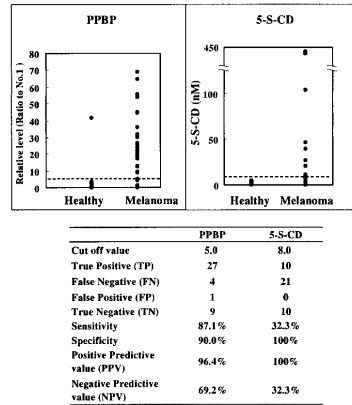
10

20

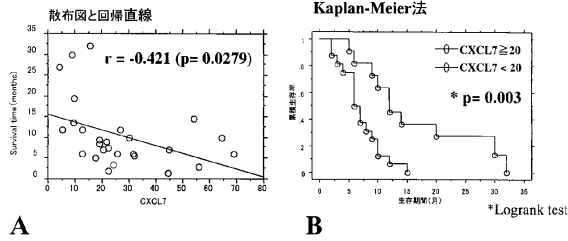
【 図 4 】



【 図 8 】



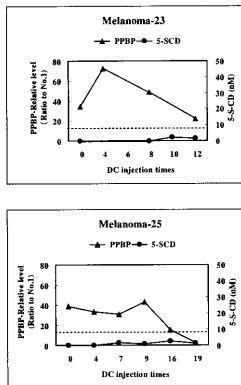
【 図 7 】



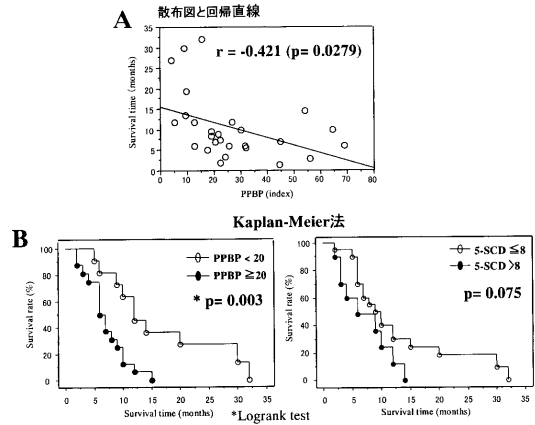
A

B

【 図 9 】



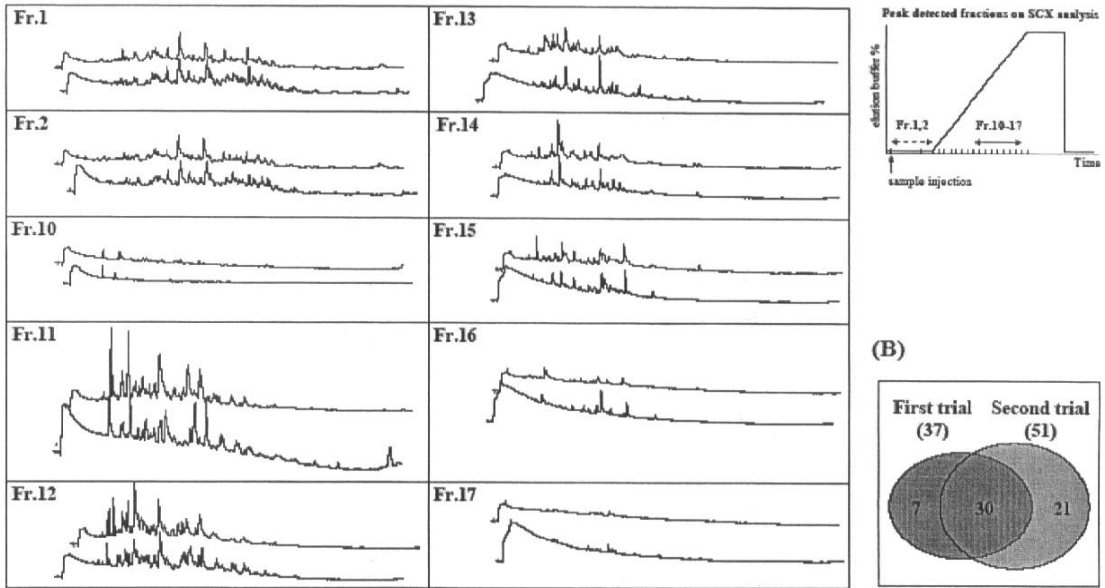
【 図 10 】



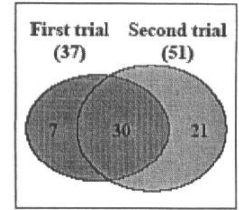
B

【 図 1 】

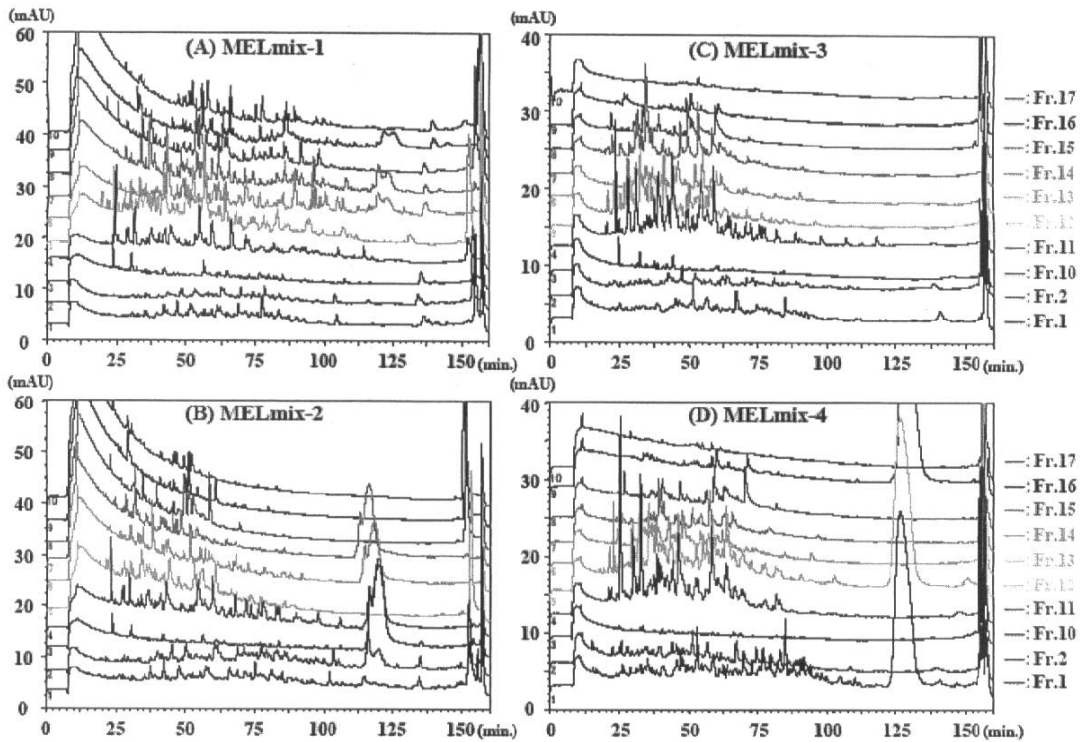
(A)



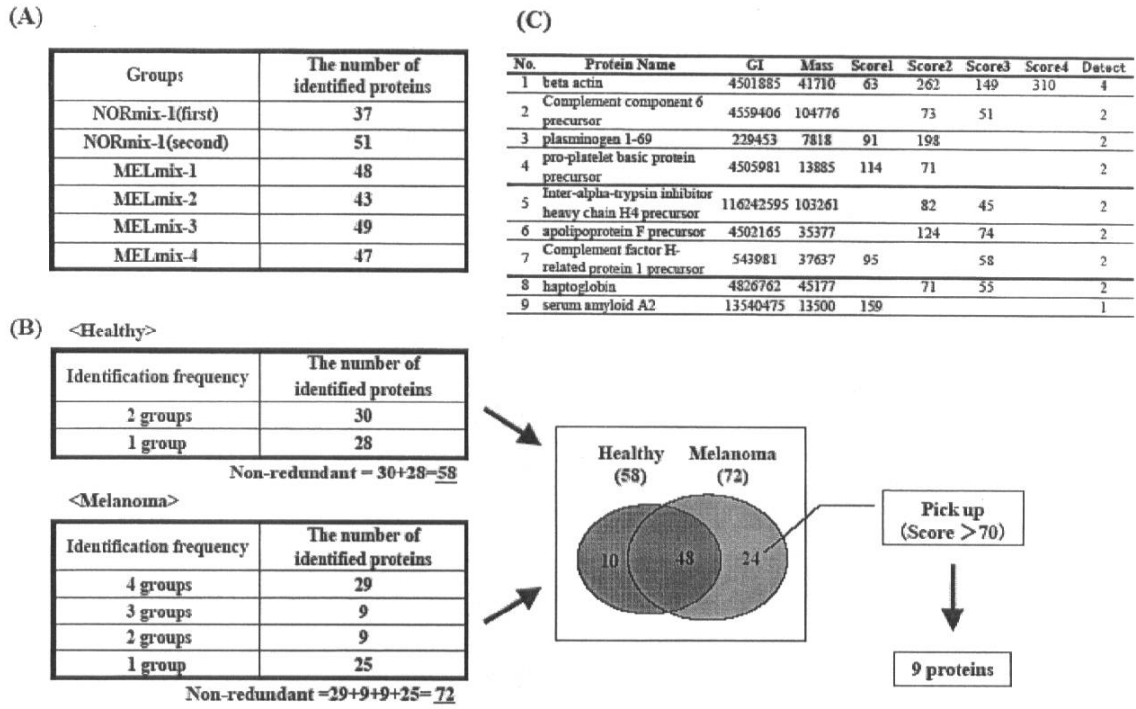
(B)



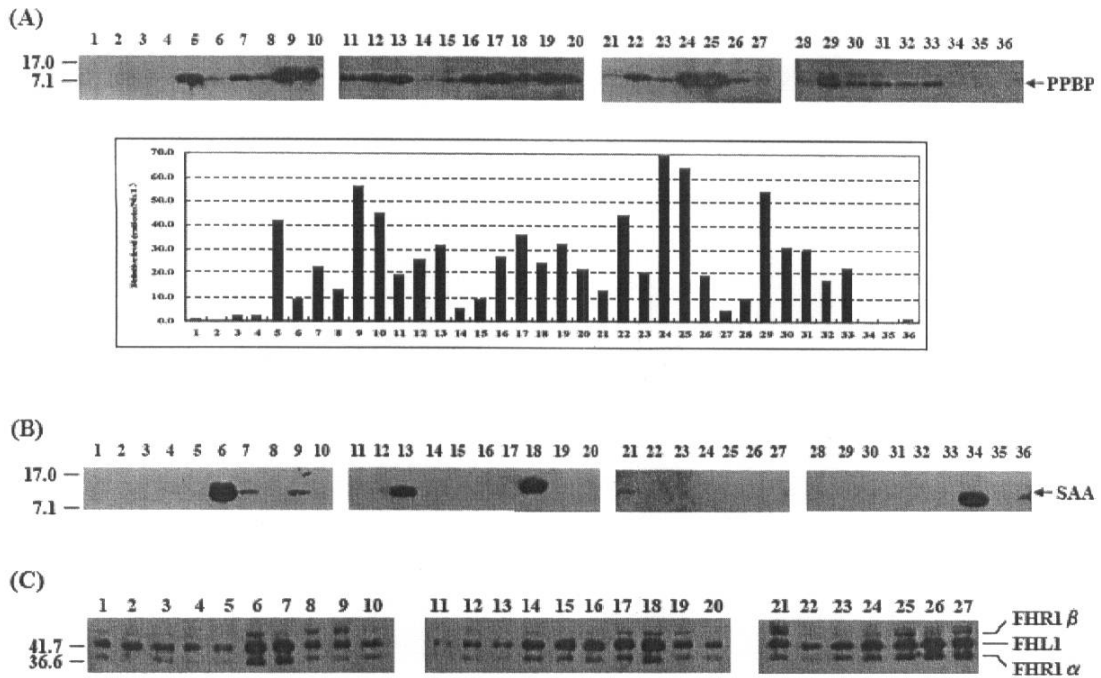
【 図 2 】



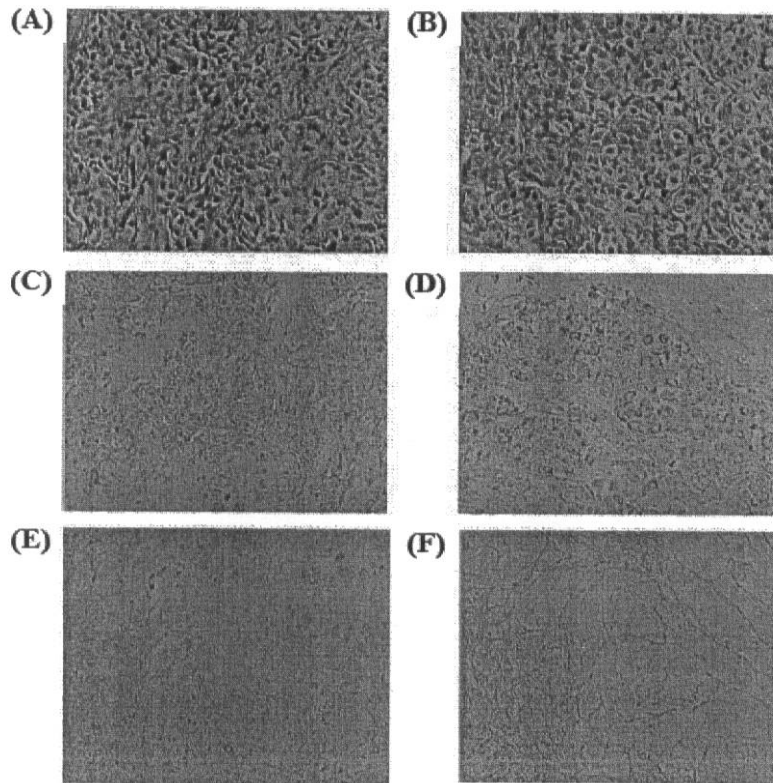
【 図 3 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 配列表 】

0005568807000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/68 Z N A A

(72)発明者 秋山 靖人
静岡県駿東郡長泉町下長窪 1 0 0 7 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 1 0 0 7 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

審査官 吉田 将志

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 7 / 0 4 5 9 9 6 (W O , A 1)
特表 2 0 0 8 - 5 1 4 2 0 5 (J P , A)
特表 2 0 0 3 - 5 0 8 0 1 6 (J P , A)
国際公開第 2 0 0 8 / 0 1 3 9 1 2 (W O , A 1)
特開 2 0 0 7 - 3 0 0 8 3 2 (J P , A)
Benjamin J. Curry , MART-1 Is Expressed Less Frequently on Circulating Melanoma Cells i
n Patients Who Develop Distant Compared With Locoregional Metastases , Journal of Clini
cal Oncology , 1 9 9 9 年 8 月 , Vol.17/No.8 , 2562-2571

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 9 8
C 1 2 Q 1 / 6 8
G 0 1 N 3 3 / 1 5
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E (S T N)

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	JP5568807B2	公开(公告)日	2014-08-13
申请号	JP2008276003	申请日	2008-10-27
申请(专利权)人(译)	静冈县		
当前申请(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		
FI分类号	G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/574.A G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12Q1/68.ZNAA C12N15/00.A C12Q1/68.AZN.A		
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		
审查员(译)	吉田正志		
优先权	2008149728 2008-06-06 JP		
其他公开文献	JP2010014689A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供简单快速地确定黑素瘤的方法和试剂盒，并提供用于预测黑素瘤患者预后的方法等，通过检测或定量测定黑色素瘤标记物。生物样本。解决方案：使用蛋白质组学技术对黑素瘤患者血浆中含有的蛋白质进行全面分析，并与健全个体的血浆中的蛋白质进行比较，从而确定黑素瘤特异性蛋白质。由于肿瘤标志物的血液内容物通常随着癌症的进展而趋于增加，因此提取肿瘤标志物被认为是高度发育的IV期患者的血浆，然后提取全面的蛋白质使用二维柱色谱和质谱进行分析。结果，成功鉴定了在黑素瘤患者的血浆中特异性发育的9种蛋白质。

<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