

(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2014-185944

(P2014-185944A)

(43) 公開日 平成26年10月2日(2014.10.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 GO 4 1
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	2 GO 4 5
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 P	4 BO 2 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	4 BO 6 3
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V	4 HO 4 5
審査請求 有 請求項の数 10 O L (全 27 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-61094 (P2013-61094)
 (22) 出願日 平成25年3月22日 (2013. 3. 22)
 (11) 特許番号 特許第5429725号 (P5429725)
 (45) 特許公報発行日 平成26年2月26日 (2014. 2. 26)

(71) 出願人 503359821
 独立行政法人理化学研究所
 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
 (74) 代理人 110000338
 特許業務法人HARAKENZO WOR
 LD PATENT & TRADEMA
 RK
 (72) 発明者 植田 幸嗣
 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2
 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研
 究所内
 (72) 発明者 中川 英刀
 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2
 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研
 究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺癌の進行度の評価方法、前立腺癌の検出方法、および検査キット

(57) 【要約】

【課題】 新規な前立腺癌の進行度の評価方法および前立腺癌の検出方法等を提供する。

【解決手段】 本発明の前立腺癌の進行度の評価方法は、生体から採取した血液または尿に由来する試料において、ニューロペプチド Y の量を測定する工程を含んでおり、また、本発明の前立腺癌の検出方法は、生体から採取した血液または尿に由来する試料において、ニューロペプチド Y の量および前立腺特異抗原の量を測定する工程を含んでいる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体から採取した血液または尿に由来する試料において、ニューロペプチド Y の量を測定する工程を含む、前立腺癌の進行度の評価方法。

【請求項 2】

生体から採取した血液または尿に由来する試料において、前立腺特異抗原、TMPRSS2:ERG の mRNA、および PCA3 RNA のうちの少なくとも 1 つの量を測定する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の評価方法。

【請求項 3】

生体から採取した血液または尿に由来する試料において、前立腺特異抗原の量を測定する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の評価方法。

10

【請求項 4】

質量分析法または発光測定法によってニューロペプチド Y の量を測定する、請求項 1～3 の何れか 1 項に記載の評価方法。

【請求項 5】

上記試料は全血液、血清または血漿である、請求項 1～4 の何れか 1 項に記載の評価方法。

【請求項 6】

上記ニューロペプチド Y の量を測定する工程において、上記試料を逆相抽出に 2 回以上供してニューロペプチド Y を含む画分を取得して、得られた画分についてニューロペプチド Y の量を測定する、請求項 1～5 の何れか 1 項に記載の評価方法。

20

【請求項 7】

生体から採取した血液または尿に由来する試料において、ニューロペプチド Y の量および前立腺特異抗原の量を測定する工程を含む、前立腺癌の検出方法。

【請求項 8】

前立腺癌の進行度を評価するための検査キットであって、

生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるニューロペプチド Y の量を測定するための抗体またはペプチドプローブを含む、検査キット。

【請求項 9】

生体から採取した血液または尿に由来する試料における前立腺特異抗原の量を測定するための抗体またはペプチドプローブ、TMPRSS2:ERG の mRNA の量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、および、PCA3 RNA の量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、のうちの少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 8 に記載の検査キット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、前立腺癌の進行度の評価方法、前立腺癌の検出方法、および前立腺癌の進行度を評価するための検査キットに関するものである。

【背景技術】

40

【0002】

前立腺特異抗原 (PSA) は、カリクレイン-3 としても知られているが、1969 年に発見され (非特許文献 1)、1994 年に食品医薬品局 (FDA) が PSA テストを承認して以降、前立腺癌の最適な診断ツールとして認識されてきた (非特許文献 2)。実際、米国において、1 年間に、4400 万人いる 50 歳以上の男性のうちの少なくとも 70 % が PSA テストを受けている。しかしながら、2011 年 10 月に、米国予防医学作業部会 (USPSTF) は、前立腺癌の臨床結果についての統計上の証拠を公表し、健康な男性に対する PSA テストをこれ以上続けないよう主張した (非特許文献 3)。この結論は、単純に、前立腺癌患者の全生存率に対する PSA テストの利益が、侵襲性の前立腺生検の事例数および医療費を拡大するリスクを冒してまで行うほどではない、という考えに

50

基づくものであった。前立腺癌による1つの死を防ぐために、5200万米ドルがPSAスクリーニングに費やされているであろうと見積もられた（非特許文献4）。

【0003】

PSA以外の前立腺癌バイオマーカーの候補が、現在までに探索されてきた。例えば、非特許文献5には、前立腺疾患の患者から前立腺組織を採取して免疫染色を行う研究によって、前立腺上皮内腫瘍（PIN）患者および前立腺癌患者において、ニューロペプチドY（NPY）およびMIC-1の前立腺組織における発現が多いことが記載されている。また、特許文献1には、NPYをコードするmRNAの量が、正常な前立腺組織と比較して前立腺腫瘍組織では多いことが記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特表2005-523727号公報（2005年8月11日公表）

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Ablin, R. J., Pfeiffer, L., Gonder, M. J., and Soanes, W. A. (1969), Experimental medicine and surgery 27, 406-410.

【非特許文献2】Catalona, W. J., Smith, D. S., Ratliff, T. L., Dodds, K. M., Coplen, D. E., Yuan, J. J., Petros, J. A., and Andriole, G. L. (1991), The New England journal of medicine 324, 1156-1161.

【非特許文献3】Chou, R., Croswell, J. M., Dana, T., Bougatsos, C., Blazina, I., Fu, R., Gleitsmann, K., Koenig, H. C., Lam, C., Maltz, A., Rugge, J. B., and Lin, K. (2011), Annals of internal medicine 155, 762-771.

【非特許文献4】Brett, A. S., and Ablin, R. J. (2011), The New England journal of medicine 365, 1949-1951.

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

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上述のように、PSAが前立腺癌のバイオマーカーとして臨床で使用されている。しながら、前立腺癌の過剰診断による上述のリスクを低減するために、PSAの特異度の低さを効果的に補完し得る検出方法の開発が強く望まれている。

【0007】

また、前立腺癌の進行度の評価は、従来、侵襲性の高い生検を行った後、病理的な検鏡像から主観的に判断するほかない。血液検査段階などの早期において前立腺癌の進行度が評価できれば、患者の負担を大きく低減し、客観的な基準を用いて迅速な治療方針の決定を行うことができる。そのため、早期に行うことができる、前立腺癌の進行度の評価方法の開発も望まれている。

【0008】

なお、非特許文献5は、前立腺組織におけるNPYの発現量について述べたものであり、その他の試料（血液、尿など）における存在量については何も示されていない。組織における発現量が、その他に由来する試料における存在量と相関していないことは、種々のタンパク質について知られているところである。さらに、非特許文献5では、前立腺組織におけるNPYの発現量は前立腺癌の進行度と相関していないことが示されている。また、特許文献1は、NPYのペプチド量と前立腺癌の進行度との関係についての記載したも

10

20

30

40

50

のではない。さらに、非特許文献 5 および特許文献 1 は何れも、感度および特異度についての検証データはない。

【0009】

本発明は上記の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、前立腺癌の進行度の評価方法および P S A の特異度の低さを効果的に補完し得る前立腺癌の検出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】

【0010】

本願発明者らは、今回、バイオマーカーの探索において有用な Q U E S T - M S (Quick Enrichment of Small Targets for Mass Spectrometry) 技術を独自に開発した。そして、前立腺癌のバイオマーカーを同定するために、Q U E S T - M S 技術を適用した。その結果、ニューロペプチド Y (N P Y) が前立腺癌の進行度と高度な関連性を有していること、および、N P Y が P S A の特異度の低さを効果的に補完し得ることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0011】

すなわち、本発明に係る前立腺癌の進行度の評価方法は、生体から採取した血液または尿に由来する試料において、ニューロペプチド Y の量を測定する工程を含むものである。

【0012】

本発明に係る前立腺癌の進行度の評価方法は、生体から採取した血液または尿に由来する試料において、前立腺特異抗原、前立腺特異抗原、T M P R S S 2 : E R G の m R N A 、および P C A 3 R N A のうちの少なくとも 1 つの量を測定する工程をさらに含むことが好ましい。

【0013】

本発明に係る前立腺癌の進行度の評価方法は、生体から採取した血液または尿に由来する試料において、前立腺特異抗原の量を測定する工程をさらに含むことがより好ましい。

【0014】

本発明に係る前立腺癌の進行度の評価方法は、質量分析法または発光測定法によってニューロペプチド Y の量を測定する場合がある。

【0015】

本発明に係る前立腺癌の進行度の評価方法において、上記試料は全血液、血清または血漿であることが好ましい。

【0016】

本発明に係る前立腺癌の進行度の評価方法は、上記ニューロペプチド Y の量を測定する工程において、上記試料を逆相抽出に 2 回以上供してニューロペプチド Y を含む画分を取得して、得られた画分についてニューロペプチド Y の量を測定する場合がある。

【0017】

本発明に係る前立腺癌の検出方法は、生体から採取した血液または尿に由来する試料において、ニューロペプチド Y の量および前立腺特異抗原の量を測定する工程を含む。

【0018】

本発明に係る検査キットは、前立腺癌の進行度を評価するための検査キットであって、生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるニューロペプチド Y の量を測定するための抗体またはペプチドプローブを含む。

【0019】

本発明に係る検査キットは、生体から採取した血液または尿に由来する試料における前立腺特異抗原の量を測定するための抗体またはペプチドプローブ、T M P R S S 2 : E R G の m R N A の量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、および、P C A 3 R N A の量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、のうちの少なくとも 1 つをさらに含むことが好ましい。

【発明の効果】

【0020】

10

20

30

40

50

本発明は、前立腺癌の進行度の評価方法、および、P S Aの特異度の低さを効果的に補完し得る前立腺癌の検出方法等を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】実施例における、RefinerMS softwareの全体的なワークフローを示す図である。

【図2】実施例における、Q U E S T - M S技術の概要およびQ U E S T - M S技術による精製の結果を示す図である。

【図3】実施例における、ExpressionistプロテオームサーバーにおけるAbsent/Present Search法による前立腺癌のバイオマーカーのスクリーニングの結果を示す。

【図4】実施例における、N P Yについての免疫組織化学的な染色解析の結果を示す図である。

【図5】実施例における、バイオマーカーの確認実験において用いたN P YについてのM R M条件の最適化を示す図である。

【図6】実施例における、M R Mに基づくN P Y測定の量的再現性の評価を示す図である。

【図7】実施例における、N P Y (M R Mクロマトグラムの面積)、P S A (病院におけるE L I S Aによって測定された値)、またはN P Y + P S A (ロジスティック曲線回帰スコア)のそれぞれについてのR O C曲線の比較を示す図である。

【図8】実施例における、R O C曲線解析による診断潜在性の評価を示す図である。

【図9】手術前および手術後のサンプルにおける血漿N P Yレベルの結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

〔1. 前立腺癌の進行度の評価方法〕

本発明に係る前立腺癌の進行度の評価方法は、生体から採取した血液由来または尿由来の試料において、ニューロペプチドY (N P Y)の量を測定する工程を含んでいる。また、本発明に係る前立腺癌の進行度の評価方法では、好ましくは、N P Yの量を測定する工程に加え、さらに、前立腺特異抗原 (P S A)、T M P R S S 2 : E R Gのm R N A、およびP C A 3 (prostate cancer antigen 3; prostate cancer gene 3) R N Aのうちの少なくとも1つの量を測定する工程を含んでいる。本発明に係る前立腺癌の進行度の評価方法では、より好ましくは、N P Yの量を測定する工程に加え、さらに、P S Aの量を測定する工程を含んでいる。

【0023】

なお、本発明において測定され得るポリペプチド (N P YおよびP S A)をまとめて、以下「前立腺癌マーカーペプチド」と称する。また、本発明において測定され得るR N A (T M P R S S 2 : E R Gのm R N AおよびP C A 3 R N A)をまとめて、以下「前立腺癌マーカーR N A」と称する。また、「前立腺癌マーカーペプチド」および「前立腺癌マーカーR N A」をまとめて、以下「前立腺癌マーカー」と称する。

【0024】

「前立腺癌マーカーペプチド」には、上記ポリペプチドの全長だけでなく、そのフラグメントも包含され、また、上記ポリペプチドの前駆体も包含される。すなわち、例えば、「N P Yの量を測定する」とは、全長のN P Yポリペプチド、N P Yポリペプチドのフラグメント、およびN P Yポリペプチドの前駆体のうちの少なくとも1つを測定することを意味する。量が測定されるN P Yは、例えば、N P Y₁₋₉₇、N P Y₁₋₂₈、N P Y₂₉₋₉₇、N P Y₆₈₋₉₇、N P Y₂₉₋₆₇またはN P Y₂₉₋₆₄であり得る。また、これらの分解物であり得る。また、N P Y₃₁₋₄₇、N P Y₅₄₋₆₁、N P Y₆₈₋₈₀もしくはN P Y₈₁₋₈₈、またはこれらの何れか部分を含む全長N P YもしくはN P Yフラグメントであり得る。

【0025】

「前立腺癌マーカーR N A」には、上記R N Aの全長だけでなく、そのフラグメントも

包含され、また、上記はRNAの前駆体も包含される。なお、TMPRSS2:ERGは、TMPRSS2遺伝子とERG遺伝子との融合mRNAである。TMPRSS2:ERGにおけるTMPRSS2とERGとの融合様式は、特に限定されず、例えば、文献:Jianghua Wang, Yi Cai, Chengxi Ren, and Michael Ittmann, Cancer Res 2006; 66: 8347-8351.に記載されているものが挙げられる。PCA3 RNAは、PCA3遺伝子の転写産物であり、non-coding RNAである。

【0026】

PSAは、特に、前立腺癌患者由来の血清において、健常人由来の血清に比してより多く検出される。そのため、特に、血清中の前立腺癌マーカーペプチドの存在量を測定して健常人における存在量と比較することにより、前立腺癌を検出し得る。また、上述の前立腺癌マーカーRNAは、特に、前立腺癌患者由来の尿において、健常人由来の尿に比してより多く検出される。そのため、特に、尿中の前立腺癌マーカーRNAの存在量を測定して健常人における存在量と比較することにより、前立腺癌を検出し得る。

【0027】

さらに、NPYについては、前立腺癌における特異度が優れており、また、その量が前立腺癌の進行度と高度に相関している（後述の実施例参照）ため、とりわけ、前立腺癌の進行度を評価するためのバイオマーカーとして特に好ましい。

【0028】

ここで、「前立腺癌」とは、腺癌（前立腺腺癌）を包含する前立腺に発生する悪性腫瘍を指す。

【0029】

「進行度」とは、Gleason Score (GS)、TNM分類、または血清PSA値等の基準に基づく進行度を指す。なお、本発明において、「進行度」には、癌である場合にその進行具合を評価するだけでなく、癌でないとの評価も包含され得る。「前立腺癌の進行度の評価」は、前立腺癌に罹患している被験体についてその進行度を評価することだけでなく、被験体が前立腺癌に罹患していないと評価することも包含され得る。すなわち、「前立腺癌の進行度の評価」には、「前立腺癌に罹患していない」という評価も含まれ得る。

【0030】

「感度」とは、特定の疾患を発症している集団に対して検査を行ったときの陽性（異常被験体値）を示す割合（真の陽性の割合）を指す。また、「特異度」とは、特定の疾患を罹患していない集団に対して検査を行ったときの陰性（正常値）を示す割合（真の陰性の割合）を指す。また、「陽性的中率」は、検査において陽性を示した被験体のうち、実際に疾患を罹患している個体の割合を指す。また、「陰性的中率」は、検査において陰性を示した被験体のうち、実際に疾患を罹患していない個体の割合を意味している。

【0031】

本発明に係る前立腺癌の進行度の評価方法は、生体から採取した血液または尿に由来する試料においてNPYの量を測定する工程を含めばよく、その他の具体的な工程、ならびに使用する器具および装置は特に限定されるものではない。

【0032】

本明細書において、「前立腺癌マーカーの量を測定する」とは、生体試料またはこれを精製して得られる試料における前立腺癌マーカーの存在量または濃度を測定することを意図している。「前立腺癌マーカーの量」は、絶対量（絶対質量または絶対濃度）であってもよいし、相対量（相対質量または相対濃度）であってもよい。また、例えば、質量分析におけるピーク面積、発光測定における発光強度等であってもよく、所定の基準に対して何倍であるかを示す値であってもよい。

【0033】

本発明において用いる「試料」は、生体（被検体）から採取した血液または尿に由来する試料である。血液に由来する試料としては、例えば、全血液、血清、血漿などが挙げられる。NPYの量を測定する場合およびPSAの量を測定する場合には、「試料」は、中でも、全血液、血清および血漿が好ましく、血清および血漿がより好ましい。TMPRS

10

20

30

40

50

S 2 : E R G の m R N A の量を測定する場合および P C A 3 R N A の量を測定する場合には、「試料」は尿であることが好ましい。

【0034】

また、被験体は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサルなどであり、好ましくはヒトである。採血部位としては、例えば、肘窩皮静脈、橈側皮静脈、尺側皮静脈などが挙げられる。なお、複数種の前立腺癌マーカーの量を測定する場合、同一試料を用いて測定してもよいし、互いに異なる試料を用いて測定してもよい。

【0035】

また、被験体は、前立腺癌に罹患していることが予めわかっているか否かわかっているか、前立腺癌に罹患しているか否かわかっているか、その被験体の前立腺癌がどの程度進行しているか評価することができる。また、前立腺癌に罹患しているか否かわかっている場合、その被験体が前立腺癌に罹患しているか否か、および罹患している場合に前立腺癌がどの程度進行しているか評価することができる。

10

【0036】

本発明の評価方法の一例として、被験体由来の生体試料中における N P Y の量を測定し、対照被験体（健常人および各進行度の前立腺癌患者）由来の生体試料中におけるこの N P Y の量を測定し、両者を比較することによって、前立腺癌の進行度を評価することができる。具体的には、被験体由来の試料における N P Y の量と、各対照被験体由来の試料における N P Y の量とを比較して、統計学的に、この被験体が前立腺癌に罹患しているか、および前立腺癌に罹患している場合にはどの程度の進行度であるかを評価することができる。対照被験体由来の試料における N P Y の量は予め測定したものをを用いることが可能である。あるいは、予め対照被験体由来の生体試料における N P Y の量を測定して、これに基づいて各進行度における量の範囲を定めておき、被験体由来の生体試料において N P Y の量がある進行度の量の範囲内にある場合に、その進行度であると判定することも可能である。

20

【0037】

また、対照被験体として、健常人および各進行度の前立腺癌患者とは別に、良性前立腺肥大症（B P H）患者を加えることによって、より高精度で進行度を判定することができる。本発明に係る前立腺癌の進行度の評価方法は、特に、偽陽性となりやすい B P H と前立腺癌とを、より高精度で区別することができる。

30

【0038】

なお、対照被験体は、進行度が異なる 2 以上の前立腺癌患者を少なくとも含んでいればよく、健常人および B P H 患者を含んでいない場合もあり得る。

【0039】

被検者の N P Y の量と対照被験体の N P Y の量とを比較する場合、その有意差は、例えば、t 検定、F 検定、カイ二乗検定、または Mann-Whitney's U test 等の統計学的手法によって判断できる。

【0040】

さらに、N P Y と上述した他の前立腺癌マーカーとを組み合わせることで評価を行うことによって、前立腺癌の進行度についてより正確な評価を行うことが可能となる。

40

【0041】

一例として、N P Y の量と P S A の量とを組み合わせることで評価を行う場合、例えば、N P Y の量および P S A の量を用いて、ロジスティック回帰スコアを算出する。算出方法は、例えば、文献：Pepe, M. S., Cai, T., and Longton, G. (2006), Biometrics 62, 221-229. に記載の方法を用いればよい。このロジスティック回帰スコアに基づいて前立腺癌の進行度を算出する。N P Y と P S A との組み合わせは、感度および特異度の何れもが特に良好であり、前立腺癌の進行度についてさらに正確な評価を行うことが可能となる。

【0042】

また、ロジスティック回帰法は、N P Y と P S A との組み合わせ以外にも、N P Y と少

50

なくとも1つの他の前立腺癌マーカーとの組み合わせに対して、用いることができる。

【0043】

前立腺癌マーカーペプチドの量を測定する方法は、前立腺癌マーカーペプチドの存在量を定量的もしくは半定量的に決定できる限り、特に限定されるものではなく、例えば、各前立腺癌マーカーペプチドに対して特異的な抗体を用いた免疫学的手法を用いた方法、各前立腺癌マーカーペプチドに対して特異的なペプチドプローブを用いた方法、液体カラムクロマトグラフィー法および質量分析法などを用いることができる。抗体を用いた方法としては、例えば、ELISA法、定量ウェスタンブロッティング法、ラジオイムノアッセイ法、イムノクロマトグラフィー法、および免疫沈降法などが挙げられる。ELISA法の種類としては、特に限定されないが、いわゆる抗原測定系（生物試料中に含まれる抗原量の測定）である、直接吸着法によるELISA、競合法によるELISA、サンドイッチ法によるELISA、およびマイクロ流路式またはマイクロビーズなどを利用した、微量試料の測定に特化したELISAなどが挙げられる。

10

【0044】

各前立腺癌マーカーペプチドに特異的な抗体は、モノクローナル抗体であってもよく、ポリクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体であることが好ましい。例えば、ヒトのNPYおよびPSAのアミノ酸配列はUniProt等の公共データベースより入手可能である。例えば、データベースUniProtにおいて、NPYの登録番号はP01303であり、PSAの登録番号はP07288である。これらの情報に基づけば、当業者は容易に各前立腺癌マーカーペプチドに特異的な抗体を作製するための抗原として適切なアミノ酸配列を決定することができる。

20

【0045】

本発明において「抗体」とは、免疫グロブリンのすべてのクラスおよびサブクラス、ならびに抗体の機能的断片を含む形態であることを意図している。当該抗体はポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のいずれの天然型抗体も含む概念であり、その他に、遺伝子組換え技術を用いて製造される抗体、ならびに当該抗体の機能的断片を含む。「抗体の機能的断片」とは、前述の抗体の一部分の領域を有し、かつ抗原結合能を有しているもの（結合性断片と同義）を指す。天然型抗体は、特に限定はされないが、ヒト、マウス、ラット、サル、ヤギ、ウサギ、ラクダ、ラマ、ウシおよびニワトリなどを含む、あらゆる生物種に由来し得る。遺伝子組換え技術を用いて製造される抗体としては、特に限定はされないが、天然型抗体を遺伝子改変して得られるヒト化抗体および霊長類化抗体などのキメラ抗体、合成抗体、組換え抗体、変異導入抗体およびグラフト結合抗体（例えば、他のタンパク質および放射性標識などがコンジュゲートまたは融合している抗体）が挙げられ、既に遺伝子組換え技術を用いて製造された抗体に対して、上述のように天然型抗体を遺伝子改変する場合と同様の改変を施した抗体も含まれる。また、抗体の機能的断片としては、具体的には例えばF(ab')₂、Fab'、Fab、Fv (variable fragment of antibody)、sFv、dsFv (disulphide stabilized Fv) およびdAb (single domain antibody) 等が挙げられる。

30

【0046】

さらに、本発明において結合性断片は、対象とするタンパク質に対して反応性を維持する範囲において変異導入された抗体断片も結合性断片の概念として含んでいる。前述の変異導入は、当業者によって適宜選択される、遺伝子改変技術等の公知の技術を用いて行われる。

40

【0047】

上述の抗体の検出は、検出可能なシグナルを誘引できるレポーター分子で標識した二次抗体と複合体を形成させることによって行い得る。あるいは、上述の抗体がレポーター分子で予め標識されていてもよい。レポーター分子は、例えば、酵素、発蛍光団含有分子、または放射性核種含有分子である。このようなレポーター分子は、様々なものが公知であり、適宜選択すればよい。

【0048】

50

レポーター分子として酵素を用いる場合、酵素としては、例えば、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼ等を用いることができる。これら酵素と抗体との結合は、マレイミド化合物等の架橋剤を用いる公知の方法によって行うことができる。基質としては、使用する酵素の種類に応じて公知の物質を用いることができる。例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジシンを、また酵素としてはアルカリホスファターゼを用いる場合には、パラニトルフェノール等を用いることができる。放射性核種としては、 ^{125}I または ^3H 等を用いることができる。蛍光色素としては、フルオロレッシェンスイソチオシアネート (FITC) またはテトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC) 等を用いることができる。

10

【0049】

二次抗体を固相化した金コロイドの凝集で検出するイムノクロマトグラフィーなどの簡便な測定系を用いることもできる。

【0050】

また、ペプチドプローブを用いた方法では、例えば、上述のレポーター分子が標識されたペプチドプローブを用いることができる。

【0051】

このように、前立腺癌マーカーペプチドの量の測定においては、発色もしくは蛍光測定を包含する発光測定法、または放射測定法などを用いることができる。

【0052】

質量分析法は、公知の質量分析装置を用いて行えばよい。質量分析装置を用いた質量分析法は、感度および精度に優れているため、正確な判定を行うことができる。さらに、多成分同時分析が可能なマルチチャンネル型の質量分析装置を用いることにより、2以上の前立腺癌マーカーペプチドの量を一度に測定することが可能となる。さらには、前立腺癌以外の他の疾患に関するバイオマーカーも同時に測定することが可能となり、一度に様々な疾患についての検出を試みる事が可能となる。また、より精度よく検出をおこなうためには、タンデム質量分析装置 (MS/MS) を用いることが好ましい。本発明の検出方法において用いられる質量分析装置としては定量可能であれば特に限定されず、四重極型および飛行時間型など従来公知の型の質量分析装置を用いることが可能である。

20

【0053】

前立腺癌マーカーペプチドの量を測定する方法は、中でも、質量分析法または発光測定法が好ましい。

30

【0054】

前立腺癌マーカーペプチドの量の測定に用いられる試料は、前立腺癌マーカーペプチドの量の測定を行う前に、逆相抽出に2回以上供することによって、NPYを含む画分として濃縮して、この画分についてNPYの量の測定を行うことが好ましい。これにより、大きなタンパク質 (例えば、 $>20\text{ kDa}$) が効率的に除去され、NPYの量の測定の精度が高まる。NPYを含む画分として回収する画分は、NPYを含む限りその分子量の範囲に限定されず、例えば、分子量が 20 kDa 未満のペプチドを含むような画分を回収すればよい。また、NPY以外の前立腺癌マーカーペプチドの量も測定する場合には、その分子量に合わせて逆相抽出は、例えば、後述の実施例に記載されているQUEST-MS技術を用いることが好ましい。

40

【0055】

また、質量分析法を用いて測定を行う場合、前立腺癌マーカーペプチドの量の測定に用いられる試料は、生体から採取した後、前立腺癌マーカーペプチドの量の測定を行う前に、変性処理を行うことが好ましい。変性処理としては、例えば、カオトロピック塩の添加、酸変性、加熱処理、界面活性剤の添加等が挙げられる。変性剤としては、例えば、尿素、グアニジン塩酸等が挙げられる。次いで、還元およびアルキル化を行うことが好ましい。還元およびアルキル化は公知の方法を用いればよい。これらの変性、還元およびアルキル化の処理によって、ペプチド中のシステインのジスルフィド結合が切断およびブロッキ

50

ングされる。そのため、質量分析の前に行う消化処理において、トリプシン等の消化酵素による消化を十分に行うことができる。

【0056】

なお、複数の前立腺癌マーカーペプチドの量を測定する場合、その種類によって測定する方法が異なってもよいし、同じであってもよい。

【0057】

前立腺癌マーカーRNAの量を測定する方法は、前立腺癌マーカーRNAの存在量を定量的もしくは半定量的に決定できる限り、特に限定されるものではなく、例えば、PCR法等の核酸増幅法を用いてRNAを増幅する手法などを用いることができる。核酸増幅法を用いた方法としては、例えば、逆転写PCR法、リアルタイムPCR、および定量RT-PCR等が挙げられ、直接的にRNAを検出する方法としてはノーザンブロット法等が挙げられる。なお、前立腺癌マーカーRNAの量を測定する際に、生体試料に含まれるRNAを鋳型にしてcDNAを調製してもよい。

【0058】

ヒトのTMPRSS2:ERGおよびPCAの塩基配列はNCBI等の公共データベースより入手可能である。例えば、データベースNCBIにおいて、TMPRSS2の登録番号はNM_005656であり、ERGの登録番号はNM_004449であり、PCA3の登録番号はNR_015342である。また、TMPRSS2:ERGにおけるTMPRSS2とERGとの融合様式の例は、例えば、文献:Jianghua Wang, Yi Cai, Chengxi Ren, and Michael Ittmann, Cancer Res 2006; 66: 8347-8351.に記載されている。これらの情報に基づけば、当業者は容易にTMPRSS2:ERGのmRNAまたはPCA3 RNAを増幅するための適切なプライマーを設計することができる。また、これらの情報に基づけば、当業者は容易にTMPRSS2:ERGのmRNAまたはPCA3 RNAをノーザンブロット法等により検出するための適切な核酸プローブを設計することができる。

【0059】

なお、複数の前立腺癌マーカーRNAの量を測定する場合、その種類によって測定する方法が異なってもよいし、同じであってもよい。

【0060】

〔2. 前立腺癌の検出方法〕

本発明に係る前立腺癌の検出方法は、生体から採取した血液または尿に由来する試料において、NPYの量およびPSAの量を測定する工程を含んでいる。

【0061】

本発明の検出方法の一例として、被験体由来の生体試料中におけるNPYの量およびPSAの量を測定し、対照被験体（健常人）由来の生体試料中におけるこのNPYの量およびPSAの量を測定し、両者を比較することによって、前立腺癌を検出することができる。具体的には、例えば、測定したNPYの量およびPSAの量を用いて、ロジスティック回帰スコアを被験体および対照被験体のそれぞれについて算出する。算出方法は、例えば、文献:Pepe, M. S., Cai, T., and Longton, G. (2006), Biometrics 62, 221-229.に記載の方法を用いればよい。このロジスティック回帰スコアについて両者の間で有意な相違が見られた場合には、この被験体が前立腺癌に罹患しているか、または前立腺癌に罹患している可能性が高いと判定することができる。対照被験体由来の試料におけるNPYの量および／またはPSAの量は予め測定したものをを用いることが可能である。あるいは、予め対照被験体由来の生体試料におけるNPYの量およびPSAの量を測定し、ロジスティック回帰スコアを算出して、これに基づいてロジスティック回帰スコアの正常値範囲を定めておき、被験体由来の生体試料においてロジスティック回帰スコアがその正常値範囲から外れた場合に、前立腺癌に罹患していると判定することも可能である。

【0062】

また、対照被験体として、健常人とは別に、BPH患者を加えることによって、より高精度で前立腺癌に罹患しているか否かについて判定することができる。本発明に係る前立腺癌の検出方法は、特に、偽陽性となりやすいBPHと前立腺癌とを、より高精度で区別

することができる。

【0063】

被検者のロジスティック回帰スコアと対照被験体のロジスティック回帰スコアとを比較する場合、その有意差は、例えば、t検定、F検定、カイ二乗検定、またはMann-Whitney's U test等の統計学的手法によって判断できる。

【0064】

NPYの量およびPSAの量を測定する方法は、これらの存在量を定量的もしくは半定量的に決定できる限り、特に限定されるものではなく、例えば、上記〔1. 前立腺癌の進行度の評価方法〕の欄において記載された方法を用いればよい。

【0065】

本発明に係る前立腺癌の検出方法は、PSAの特異度の低さを、NPYによって効果的に補完している（後述の実施例も参照）。その際、PSAの感度をあまり低下させることがない。すなわち、感度および特異度の何れもが良好であり、前立腺癌をより正確に検出することが可能となる。特に特異度の向上は、過剰診断および不要な生検を減らすことができ、ひいては男性の身体的および精神的ストレスの緩和につながる。

【0066】

〔3. 検査キット〕

本発明に係る検査キットは、前立腺癌の進行度を評価するための検査キットであって、生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるNPYの量を測定するための抗体またはペプチドプローブを含んでいる。本発明に係る検査キットでは、好ましくは、生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるPSAの量を測定するための抗体またはペプチドプローブ、TMPRSS2:ERGのmRNAの量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、および、PCA3 RNAの量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、のうちの少なくとも1つをさらに含んでいる。

【0067】

ペプチドプローブとは、NPYまたはPSAと特異的に結合するペプチド性のプローブを指す。具体的には例えば、NPYまたはPSAと特異的に結合するペプチド配列が挙げられる。キットに含まれるペプチドプローブは、天然アミノ酸の他に、非天然型アミノ酸を含んで構成されていてもよい。

【0068】

核酸プローブとは、TMPRSS2:ERGのmRNAまたはPCA3 RNAと特異的に結合する核酸プローブを指し、より具体的にはTaqManプローブおよびInvaderプローブ等が挙げられる。核酸プライマーとは、TMPRSS2:ERGのmRNAもしくはPCA3 RNAまたはこれを逆転写したcDNAを特異的に増幅することができる核酸プライマーを指し、より具体的には核酸増幅法で用いるプライマーが挙げられる。

【0069】

本発明に係る検査キットは、さらに、必要に応じて、抗体またはペプチドプローブを免疫学的に検出するための各種試薬（二次抗体、レポーター分子、およびバッファー等）および器具（プレートおよびピペット等）、核酸プローブを検出するための各種試薬（バッファー等）および器具（プレートおよびピペット等）、核酸増幅法に用いる各種試薬（ポリメラーゼ、各dNTPおよびバッファー等）および器具（チューブおよびピペット等）、検査キットの使用説明書、測定の時に用いられる対照用となる試料、測定結果を解析するときに用いられる対照用のデータ、等のうちの少なくとも1つを備えていてもよい。なお、検査キットの使用説明書には、上記〔1. 前立腺癌の進行度の評価方法〕の欄で説明した、本発明に係る評価方法の内容が記録されている。

【0070】

特に限定されないが、検査キットは、例えば、ELISA法またはイムノクロマトグラフィー法に基づく検査キットであることが好ましい。

【0071】

本発明はまた、前立腺癌を検出するための検査キットであって、生体から採取した血液

10

20

30

40

50

または尿に由来する試料における N P Y の量を測定するための抗体またはペプチドプローブ、および、P S A の量を測定するための抗体またはペプチドプローブを含んでいる検査キットを提供する。当該検査キットは、さらに、必要に応じて、抗体またはペプチドプローブを免疫学的に検出するための各種試薬（二次抗体、レポーター分子、およびバッファー等）および器具（プレートおよびピペット等）、検査キットの使用説明書、測定の時に用いられる対照用となる試料、測定結果を解析するときに用いられる対照用のデータ、等のうちの少なくとも1つを備えていてもよい。なお、検査キットの使用説明書には、上記〔2. 前立腺癌の検出方法〕の欄で説明した、本発明に係る検出方法の内容が記録されている。

【0072】

〔4. その他〕

後述の実施例で示されるように、フィブロネクチンおよび電子移動フラボタンパク質—ユビキノンドヒドロゲナーゼも、前立腺癌の候補バイオマーカーとして同定された。そのため、フィブロネクチンおよび電子移動フラボタンパク質—ユビキノンドヒドロゲナーゼは何れも、N P Y および／または P S A と組み合わせて用いることによって、前立腺癌の進行度の評価および前立腺癌の検出を行い得る。評価方法および検出方法は、上述と同様に行えばよい。

【0073】

以下に実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された文献の全てが参考として援用される。

【実施例】

【0074】

〔実験手順〕

（試薬）

トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（T C E P）、ヨードアセトアミドおよび重炭酸アンモニウムは、Sigma-Aldrich社から購入した。尿素は、GE Healthcare社から購入した。Trypsin Goldは、Promega社から入手した。トリフルオロ酢酸（T F A）は、株式会社島津製作所から購入した。

【0075】

（血漿サンプル）

バイオマーカーのスクリーニングのための E D T A—血漿サンプル（n = 116、表1）を、高知大学医学部附属病院で採取した。なお、採血部位は腕静脈であった。

【0076】

〔表1〕

群	n	平均年齢	性別
健康対照者	24	69.1	男性
BPH*	19	68.9	男性
PCa** (GS*** 5-6)	20	65.3	男性
PCa** (GS*** 7)	28	69.7	男性
PCa** (GS*** 8-10)	25	68.1	男性
Total	116	68.2	男性

*良性前立腺肥大症 **前立腺癌 ***Gleason score

【0077】

バイオマーカーの確認実験のために、対照として、40人の健康な人からの血漿サンプルを、がん研究会有明病院（J F C R）のがんスクリーニングセンターで採取した。また

、確認実験のために、20人の良性前立腺肥大症（BPH）患者からの血漿サンプル、および65人の前立腺癌患者からの血漿サンプルを、高知大学医学部附属病院、京都大学医学部附属病院、および岩手医科大学附属病院で採取した（表2）。なお、採血部位は腕静脈であった。

【0078】

【表2】

群	n	平均年齢	性別
健康対照者	26	69.1	男性
BPH*	19	68.9	男性
PCa** (GS*** 5-6)	17	65.9	男性
PCa** (GS*** 7)	30	64.2	男性
PCa** (GS*** 8-10)	18	66.1	男性
Total	110	64.0	男性

*良性前立腺肥大症 **前立腺癌 ***Gleason score

10

【0079】

上述の全ての患者に対して実験手順を完璧に説明し、同意書を記載してもらっている。以下の実験は、それぞれの施設内倫理委員会による承認を得ている；理化学研究所倫理委員会、高知大学医学部、JFCR、京都大学、および岩手医科大学の施設内審査委員会。

20

【0080】

（QUEST-MS精製）

96穴ポリプロピレン製プレート上で、20 μ Lの血漿サンプルを80 μ Lの10M尿素 in 50mM 重炭酸アンモニウムと混合した。次いで、サンプルを、5mM TCEPを用いて37℃で15分間還元し、25mM ヨードアセトアミドを用いて室温で15分間アルキル化した。さらにサンプルを50mM 重炭酸アンモニウムで4倍希釈し、平衡化したOasis HLB 96-well μ Elution Plate（2mg sorbent per well、30 μ m particle size、Waters社製）にロードした。なお、固相抽出プレート上での全ての操作は、特注の96穴シリンジロボットを用いて行った。

【0081】

30

Oasis Plateを500 μ Lの70% アセトニトリルで予め湿潤させ、次いで500 μ Lの0.1% TFA in 2% アセトニトリルで、250 μ L/分の速度で平衡化した。100 μ L/分の速度でサンプルをロードした後、プレートを500 μ Lの0.1% TFA in 2% アセトニトリルを用いて250 μ L/分の速度で2回洗浄した。100 μ Lの40% アセトニトリルを用いて、100 μ L/分の速度でタンパク質を溶出し、続いて2回目のOasis Plate精製の前に0.1% TFAで5倍希釈した。希釈したサンプルを上述した1回目の精製と同じ条件で処理した。

【0082】

溶出液を真空遠心脱水装置を用いて凍結乾燥し、8 ng/ μ LのTrypsin Gold（Promega社製）in 50mM 重炭酸アンモニウムを用いて、37℃で6時間消化した。50 μ Lの1.2% TFA in 4% アセトニトリルを添加して、消化反応を停止させた。

40

【0083】

（LC/MS/MS分析）

上述のQUEST-MS精製後、1 μ Lのサンプルを、Ultimate 3000 nano-flow HPLC（Thermo Fisher Scientific社製）に装備されている質量分析装置（LTQ-Orbitrap-Velos mass spectrometer, Thermo Fisher Scientific社製）を用いて分析した。0.1% ギ酸を溶媒A、0.1% ギ酸 in アセトニトリルを溶媒Bとして使い、C18 Chip-column（75 μ m $\times$ 200 mm、日京テクノス株式会社製）でペプチドを分離した。その際の流速は250 nL/分とし、溶媒Bの勾配は、2～30%、95分間、30～95%、15分間とした。溶出したペプチドを2000Vのスプレー電圧でイオン化し、MSデータをデー

50

タ依存型フラグメント法で取得した。測定スキャン (survey scan) は、 m/z 400 ~ 1600、分解度 60,000、AGC ターゲット値 1.0×10^6 イオンカウントで行った。各測定スキャンにおける上位 20 の強度の前駆イオンを、リニアイオントラップで AGC ターゲット値 5000 イオンカウントのノーマル CID スキャンモードを用いた低分解能 MS/MS 取得に供した。

【0084】

(Expressionist RefinerMSにおけるラベルフリー定量)

LTQ Orbitrap-Velos 質量分析装置からの生データを、Expressionist RefinerMS module (Genedata AG社製) にロードした。Expressionist RefinerMS moduleは、その後のデータ処理およびラベルフリー定量分析について、社内サーバーシステムで行うものである。RefinerMS softwareの全体的なワークフローは図1に示すとおりである。2D MSクロマトグラム面 ($x = m/z$ 、 $y = RT$) 上の10個のデータポイント毎にSpectrum Gridをセッティングし、次いで第1のChemical Noise SubtractionをRT Window = 500 scansおよびQuantile = 80を用いて行った。第2のChemical Noise Subtractionにおいて3 RT スキャン毎にMoving average estimatorによってクロマトグラムを滑らかにした後、1000未満の強度のシグナルを排除した。第3および第4のChemical Noise Subtractionに、それぞれ、minimum RT length = 8 scansのRT Structure Removalおよびminimum m/z length = 4 pointsの m/z Structure Removalを用いて、データを適用した。Chromatogram Gridをノイズ減算データ上の10スキャン毎にセットし、次のパラメーターを用いてChromatogram RT Alignmentを行った： m/z Window = 10 points、RT Window = 10 scans、Gap Penalty = 1、RT Search Interval = 2 minutes、Alignment Scheme = pairwise alignment based tree。続いで、一時的平均化クロマトグラムにおけるピークを、次のパラメーターを用いて、Summed Peak Detection Activityによって検出した：Summation Window = 2 minutes、Overlap = 50、Minimum Peak Size = 10 scans、Maximum Merge Distance = 4 data points、Gap/Peak Ratio = 10、Method = curvature-based peak detection、Peak Refinement Threshold = 5、Consistency Filter Threshold = 0.6。最後に、Summed Isotope Clustering Activityが、1つの分子に由来する同位体ピークを同位体クラスターにグループ化した。このときのパラメーターは次のとおりである：Minimum Charge = 1、Maximum Charge = 8、Maximum Missing Peaks = 0、First Allowed Gap Position = 3、Ionization = protonation、RT Tolerance = 0.1 minute、 m/z Tolerance = 0.05 Da、Minimum Cluster Size Ratio = 0.5。

【0085】

(Expressionist Analystにおけるバイオマーカーの抽出)

新規なバイオマーカーセットの特異度を最大化すべきであるため、重複のない153,057個の検出されたペプチドをAbsent/Present Searchアルゴリズムによってフィルタリングした。Absent/Present Searchアルゴリズムは、2つの群 (健康対照者 + BPH 対前立腺癌) 間で全か無かである特徴を示しているペプチドを抽出するものである。43人の対照の間で多くても1人、かつ、73人の前立腺癌患者の間で少なくとも11人において検出されたペプチドを選択して、さらなる確認実験に供した。

【0086】

(タンパク質の同定)

SEQUESTデータベースサーチを、Proteome Discoverer 1.3 software (Thermo Fischer Scientific社製) を用いて行った。MS/MSデータをヒトタンパク質データベースSwissProt 2012_09 (20,235 sequences) に対して検索した。検索パラメーターは次のとおりである：Enzyme Name = Trypsin、Precursor Mass Tolerance = 3 ppm、Fragment Mass Tolerance = 0.8 Da、Dynamic Modification = Oxidation (M)、Static Modification = Carbamidomethyl (C)。SEQUEST Decoy Database SearchにおいてFDR (false discovery rate) が1%未満であるペプチド同定を受け入れた。Raw dataはPRIDEデータベースに公開される (<http://www.ebi.ac.uk/pride/>)。

【0087】

(NPYについてのMRM (multiple reaction monitoring))

終濃度 $1 \text{ fmol} / \mu\text{L}$ のBSAトリプシン消化物を内部対照として添加したことを除いて、上述のように血漿サンプルをQUEST-M S法に供し、次いで、Agilent 1200 nano-flow HPLC system (Agilent Technologies社製) に付属の4000 QTRAP mass spectrometer (AB Sciex社製) を用いて分析した。0.1% ギ酸を溶媒A、0.1% ギ酸 in アセトニトリルを溶媒Bとして用い、C18 Chip-column ($75 \mu\text{m} \times 200 \text{ mm}$, 日京テクノ株式会社製) でペプチドを分離した。流速は $250 \text{ nL} / \text{分}$ とし、溶媒Bの勾配は、2~30%, 10分間、30~95%, 5分間の2段階直線勾配とした。NPYおよびBSA (KYA technologies社製) に特異的なMRMトランジションを、Analyst 1.5 software (AB Sciex社製) のMRMモードによって同時にモニターした。装置の設定は次のとおりである: Ionization spray voltage = 2200 V、Curtain gas (N₂) = 12 psi、CAD = 4、Decustering potential = 70 V、Entrance potential = 10 V、Q1 resolution = HIGH、Q3 resolution = LOW、Pause in between = 2 msec。得られたMRMクロマトグラムをMulti Quant 2.02 software (AB Sciex社製) を用いて解析した。各トランジションのマスクロマトグラムを、1 pt windowで滑らかにし、ピーク面積を定量した。12個のNPYのトランジションについて衝突エネルギーを最適化した後、NPY₈₁₋₈₈ ペプチドに相当するQ1/Q3 = 466.23/272.20のみを用いて実質的に定量を行った。このトランジションが最も高い感度を示したからである。そして、NPY₈₁₋₈₈ のピークの面積を、同様に測定したBSAペプチドを用いて、次のとおりに標準化した: Normalized NPY = Area (NPY₈₁₋₈₈, Q1/Q3 = 466.2/272.2) / Area (BSA66-75, Q1/Q3 = 582.3/951.5) $\times 10000$ 。

【0088】

(銀染色および画像解析)

QUEST-M S精製の効果を評価するために、精製したサンプルの1/5を16% Tris-tricine SDS-PAGEゲル (Life Technologies社製) で分離した。SilverQuest Silver Staining kit (Life Technologies社製) を用いて、使用説明書に従って、ゲルを染色した。染色したゲルをGS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad Laboratories社製) を用いてスキャンし、Image J softwareによって解析した。

【0089】

(免疫組織化学的染色)

Ventana automated immunohistochemical systems (Ventana Medical Systems社製) を用いて、免疫組織化学的実験を行った。8人の前立腺癌患者から採取された外科検体または生検検体のスライス切片 (ホルマリンで固定してパラフィンに埋入されている) を用いた。8人の前立腺癌患者には、前立腺上皮内腫瘍 (PIN) の病変を有している3人が含まれていた。スライス切片を、1:400希釈したポリクローナル抗NPY抗体 (Abcam社製) 溶液と共に16分間インキュベートした。自動化されたプロトコールは、ビオチン標識二次抗体およびヘマトキシリン対比染色したジアミノベンジジン基質を用いる、間接的ビオチン-アビジンシステムに基づいた。結合の特異性を、一次抗体としてウサギ非免疫血清を用いたネガティブ染色によって確認した。

【0090】

[結果]

(QUEST-M S技術による低分子量ポリペプチドの濃縮)

正確なバイオマーカーのスクリーニングおよび血液中の小さい標的ポリペプチドによる均一な臨床応用のためには、高感度、高再現性、高ハイスループット、低コスト、および操作容易性を示す前分析的な精製方法が必要である。これらの基準を満たすために、我々は、血漿中の20 kDa未満のタンパク質についての簡単かつ効果的な濃縮方法を確立し (図2の(a))、quick enrichment of small targets for mass spectrometry (QUEST-M S) と名付けた。QUEST-M S法は、粗血漿からの変性、還元、アルキル化、および続くタンデム逆相抽出 (96サンプルあたり1.5時間しか要しなかった) から構成される。

【0091】

乾燥させたQ U E S T - M S精製サンプルは、S D S - P A G EまたはE L I S Aなどのタンパク質アッセイ用に直接用いることができる。同Q U E S T - M S精製サンプルは、トリプシン処理後に質量分析に供することもできる。

【0092】

Oasis HLB plateによる1～4回目の逆相抽出後の、低分子量タンパク質の濃縮効果を可視化するために、各段階における粗血漿および精製タンパク質を16% Tris-tricineゲルで分離し、銀染色を行った。その結果を図2の(b)に示す。このゲルの定量デンストメトリー解析の結果を図2の(c)に示す。染色したゲルの5つのレーンの定量密度クロマトグラムは、固相抽出ステップごとの、 $>20\text{ kDa}$ のタンパク質の効果的な除去を示した。特に、Oasis HLB plateによる2回目の逆相抽出によって、 20 kDa 未満の低分子量タンパク質の割合が90%を超えた。このような小さいタンパク質の容易できれいな分離の原理は、孔径(8 nm)より大きい巨大なタンパク質を流出させること、および、中程度の大きさのタンパク質($20\sim100\text{ kDa}$)がOasisポリマービーズ上の疎水性残基に対する過剰の吸収強度によって溶出するのを回避することに基づいている。逆相抽出を3回以上繰り返すと低分子量タンパク質の精製度は高まるが、スループットおよびコストにおける優位性の観点から、バイオマーカーのさらなる探索および確認実験には2回精製したサンプルを用いた。

【0093】

(前立腺癌に対する低分子量バイオマーカーのスクリーニング)

施設間におけるサンプリングのあらゆる偏りを避けるために、バイオマーカーのスクリーニング段階で分析した116個の血漿サンプル(表1)を、1つの病院で採取し、厳格に管理された標準的な操作手順を用いた。 $20\text{ }\mu\text{L}$ の各血漿サンプルを、Q U E S T - M S精製の前に、1回凍結融解した。116個の精製サンプルのL C / M S / M S分析から、153, 057個の重複のないペプチドを検出し、上述のようにExpressionist Refine rMS moduleにおいて定量した。特に、この低分子量プロテオームのカタログは、4つのP S A由来ペプチドを含んでいた： $\text{I}_{25}\text{VGGWECEK}_{33}$ ($m/z = 539.25$, $z = +2$)、 $\text{H}_{34}\text{SQPWQVLVA SR}_{45}$ ($m/z = 469.92$, $z = +3$)、 $\text{A}_{48}\text{VCGGVLVHPQWVLTAAHCIR}_{68}$ ($m/z = 782.08$, $z = +3$)、および $\text{L}_{126}\text{SEPAELTDAVK}_{137}$ ($m/z = 636.84$, $z = +2$)。これらのペプチドは、対照群(健康対照者+B P H患者)では、それぞれ4、3、4、5のケースで検出された。一方、前立腺癌患者群では、それぞれ15、13、10、11のケースで検出された。病院によって提供されるP S Aテストの値に従うと、P S Aに対する我々の方法の検出限界値は、約 10 ng/mL と見積もることができた。この結果は、サンプルの平均に基づく一般的な比較テスト(t検定、A N O V Aなど)が特異的マーカーの抽出に適切ではないことを示唆するものであった。対照群における低濃度の腫瘍マーカーの有効値は、かなり少ないはずだからである。一般に、理想的な腫瘍マーカーの検出頻度は、対照のサンプルでは0に近く、これはt検定またはA N O V Aの適用から除外され得る。

【0094】

次いで、新規なバイオマーカーのセットの特異度を最大化するために、Absent/Present Searchアルゴリズムを用いた。その結果、43人の対照(24人の健康対照者+19人のB P H患者)において0または1のケースで検出され、かつ、73人の前立腺癌患者において少なくとも11のケースで検出された189個のペプチドを同定した。図3の(a)において、153, 057個の全ペプチドのうちの189個のペプチドが前立腺癌特異的な検出パターンを示しており、これらは対照群において0または1のケースでしか検出されなかった。なお、189個のペプチドの定量的情報は2次元平面上の黒いドットまたは線で示されている。X軸は110人の個人を示し、Y軸はL C / M S / M Sにおけるピーク強度を示している。図3の(b)は、検出頻度に基づく189個の候補バイオマーカーペプチドの分類を示している。例えば、62個のペプチドは11個の前立腺癌サンプルで検出され、1個の対照サンプル(健康対照またはB P H)で検出されている。

【0095】

上述の抽出されたペプチドは、P S Aと比較して前立腺癌患者の診断において、同等以

上に高感度である上、偽陽性の割合が低い、候補バイオマーカーとみなすことができた。一方、SEQUESTデータベースサーチ解析 ($FDR < 0.01$) を用いて、116個のスクリーニングサンプルから1126個の重複のない血漿タンパク質を同定した。タンパク質同定データセットに対して189個の候補バイオマーカーをマッチングしたところ、表3に記載されている3つのペプチドを首尾よく同定した。mRNAの発現が脳神経系および前立腺特異的である観点から、ニューロペプチドY (NPY) を続く確認実験に用いた。

【0096】

【表3】

UniProt accession number	UniProt ID	タンパク質名	配列*	Absent/Present Search における検出頻度	
				対照**	PCa***
P01303	NPY_HUMAN	Pro-neuropeptide Y	S ⁶⁸ SPETLISDLLMR ⁸⁰	0	11
P02751	FINC_HUMAN	Fibronectin	Q ¹⁰⁴¹ YNVGPSVSK ¹⁰⁵⁰	1	11
Q16134	ETFD_HUMAN	Electron transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase	G ²¹³ IATNDVGIIQK ²²³	1	11

*配列中の数字はアミノ酸番号を示す

**健康対照者またはBPH患者の間で検出されたケース数

***前立腺癌患者の間で検出されたケース数

【0097】

(前立腺癌組織におけるNPYの発現)

図4にNPYについての免疫組織化学的な染色の結果を示す。図4の(a)および(b)は、前立腺癌におけるNPYの代表的な免疫染色パターンを示しており、Gleason Scoreはそれぞれ、3+4 (a) および 4+5 (b) である。抗NPY抗体を用いた免疫反応性を前立腺癌組織で観察したところ、前立腺癌細胞の細胞質では免疫反応性は非常に強かったが、非癌の前立腺上皮では免疫反応性は弱かった(図4の(b)の右側)。図4の(c)は、抗NPY抗体を用いた細胞質の免疫反応性がハイグレードの前立腺上皮内腫瘍(PIN)の前駆細胞においても観察されたことを示している。これらの結果は、前立腺における腫瘍性病変が高いNPY発現を示すことを示唆するものであった。

【0098】

(NPYについてのMRMに基づく反復解析)

異なる病院または分析方法によるばらつきを評価するために、独立したサンプルセットおよび別の質量分析定量法MRMを用いて、NPYについての確認実験をさらに行った。ここでは、健康対照として高知大学医学部附属病院サンプルの代わりにJFCRからのサンプルを用い、前立腺疾患のサンプルとして京都大学および岩手医科大学からのサンプルを用いた(表2)。110個のQUEST-MS精製したサンプルを、NPY由来の4つの異なるペプチドをターゲットとして、4000 QTRAP質量分析装置で分析した。MRM測定の前に、まず、4つのNPYペプチドそれぞれに対する3つのランジションの中から、最も高いMRMクロマトグラムピーク強度を与え得る最適なランジションおよび衝突エネルギー(CE)を探した。その結果を、図5の(a)および(b)に示す。NPY₈₁₋₈₈に対応するランジションQ1/Q3 = 466.2/272.2が、CE = 17 eVにおいて、NPYに関して最も感度が良いレポーターイオン対であることがわかった。なお、図5の(a)において、Q1またはQ3の右側の数字はそれぞれ、四重極1または3におけるm/zのセッティングを示している。

【0099】

さらに10 fmolの消化BSAを各サンプルに添加し、分析間のばらつきを標準化するための内部対照として用いた。次いで、MRMに基づくNPY測定の量的再現性を、6

つの異なる時点における3つの血漿サンプルを分析することによって評価した。その結果を図6に示す。図6において、エラーバーは3つの独立した測定の標準偏差を示している。図6に示すように、変動係数(CV)は一貫して3.5%より小さかった。上述の最適化したMRM条件を用いて、血漿のNPYを110のケースで定量し、その結果を図7の(a)のボックスプロットに示している。また、図7の(b)に、ELISAによって定量したPSAの濃度を示す。これらの結果から、特にBPH患者とGleason Score(GS)5-6の前立腺癌患者との間で、PSAテスト($p=0.2746$, t検定)と比較して、NPYはより高い診断特異度があることが示された($p=0.0396$, t検定)。この結果は、バイオマーカーのスクリーニング実験におけるNPYのAbsent/Present Search分析でのNPYの前立腺癌特異的な検出を裏付けるものであった。

10

【0100】

なお、図7において、破線は対照群(N+BPH)と前立腺癌群との境界を示している。この境界は後述の図8に示されるROC曲線解析によって算出されたものである。大きく外れた値はプロットの上の領域に各濃度を併記して示した。

【0101】

NPYは高い特異度を有していたが、感度をさらに向上させるために、ロジスティック回帰法を用いて、NPYおよびPSAのコンビネーションによる診断システムを確立することを試みた(図7の(c))。ROC曲線の曲線下の面積(AUC)が最大となるように、ロジスティック回帰スコアを算出した(文献:Pepe, M. S., Cai, T., and Longton, G. (2006), Biometrics 62, 221-229.に従った)。図8の(a)~(c)に、110の血漿サンプルのNPY(MRMクロマトグラムの面積)、PSA(病院におけるELISAによって測定された値)、またはNPY+PSA(ロジスティック曲線回帰スコア)のそれぞれを用いて作成した3つのROC曲線の比較を示す。なお、図8において、「x=」で表される接点は、各マーカーによって与えられる最適な限界値を示す。また、「Sens.」は感度、「Spec.」は特異度、「PV+」は陽性的中率、「PV-」は陰性的中率を示す。

20

【0102】

45人の対照(25人に健康対照者および20人のBPH患者)と65人の前立腺癌患者との区別におけるPSAの感度および特異度は、それぞれ、87.7%および66.7%であった。一方、NPYとPSAとの組み合わせにおける感度および特異度は、それぞれ、81.5%および82.2%であった。この結果は、PSAテストの感度の高さを顕著には失うことなく、PSAテストの特異度の低さをNPYが補完し得ることを明確に示すものであった。これは、過剰診断および不要な生検を減らすことができ、ひいては男性の身体的および精神的ストレスの緩和につながるものである。

30

【0103】

また、NPYは前立腺癌の進行度と相関性が高く、NPY単独で、またはNPYとPSAとの組み合わせで、進行度をより正確に評価し得ることが示された。

【0104】

さらに、治療応答の評価に対するNPYの有効性を実証するために、4人の前立腺癌患者から採取した手術前および手術後のサンプルを分析した。図9に3回のMRM分析の結果を示す。図9において日数は経尿道前立腺切除手術(TURP)からの経過時間を表す。エラーバーは3回の独立した測定の標準偏差を示す。図9に示すように、手術の5~7日後、3人の患者(患者2~4)では、血漿NPYレベルの減少を示した(* $p<0.05$, スチューデントt検定)。特に、患者4におけるNPYレベルは、手術の5日後、カットオフ値(5189.0)未満まで減少した。一方、患者1では手術の1ヶ月後、NPYレベルのわずかな変化しかみられなかった。患者1における長期間の高いNPY濃度は、臨床的証拠はないが、再発または微小転移巣の存在を反映したのではないかと考えられた。

40

【産業上の利用可能性】

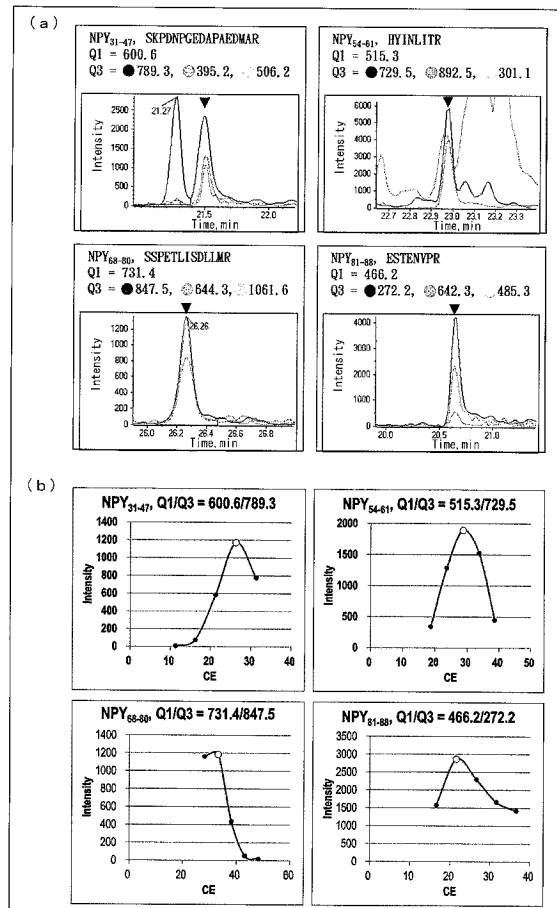
【0105】

本発明は、前立腺癌の進行度の評価および前立腺癌の検出に利用することができる。そ

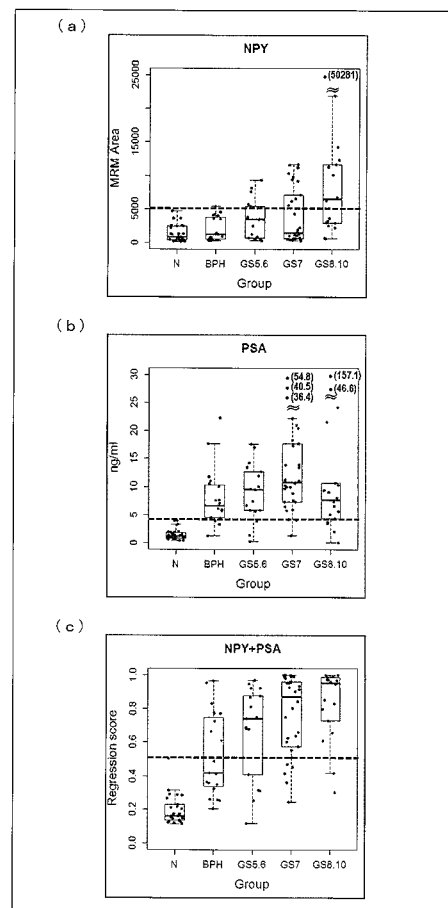
50

のため、本発明は、診断医療分野および保健医学分野に広く利用することができる。

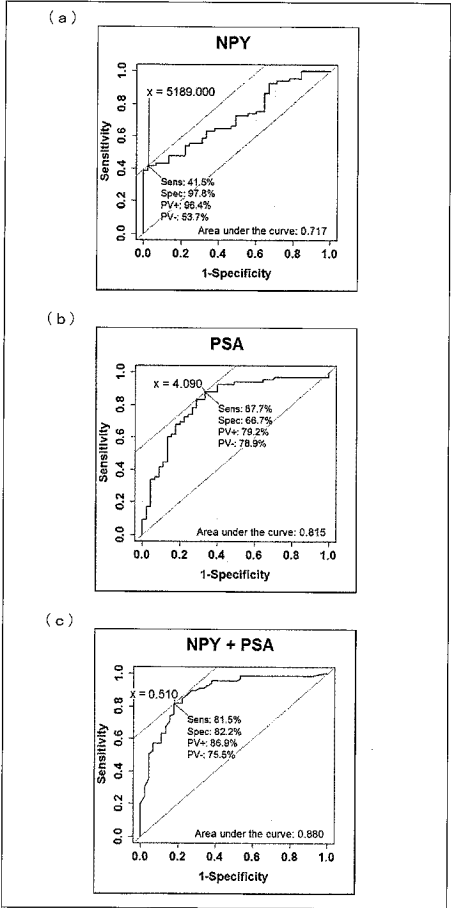
【図 5】



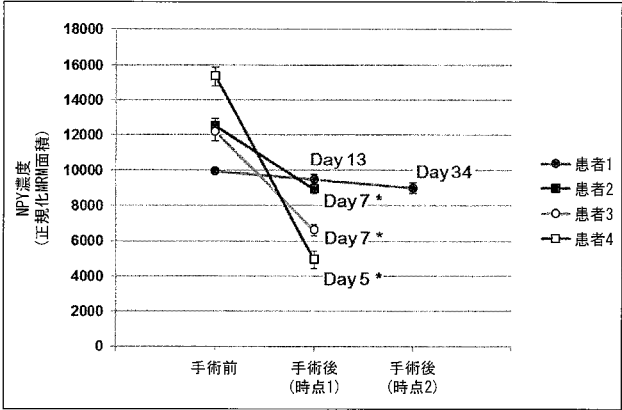
【図 7】



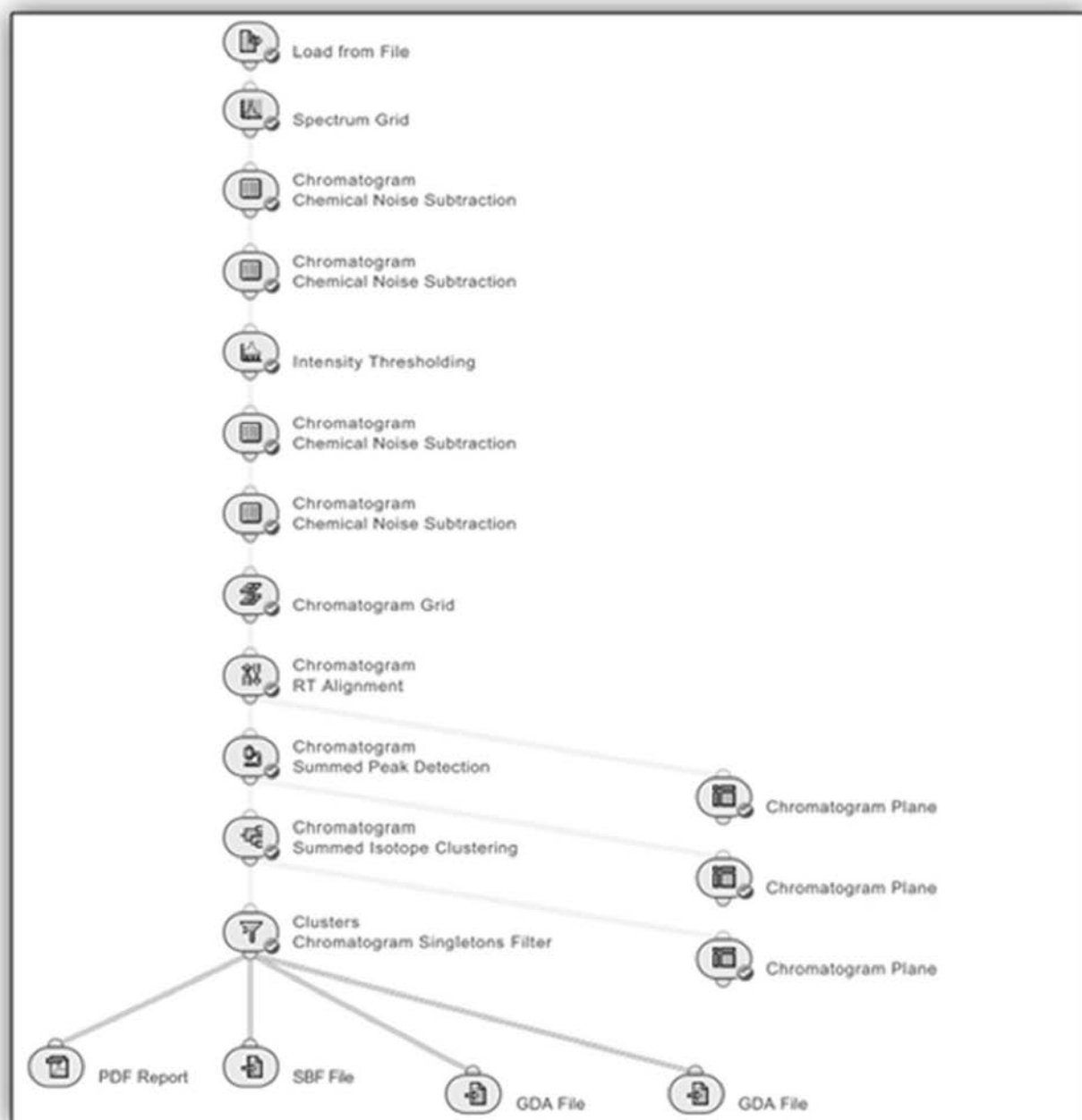
【図 8】



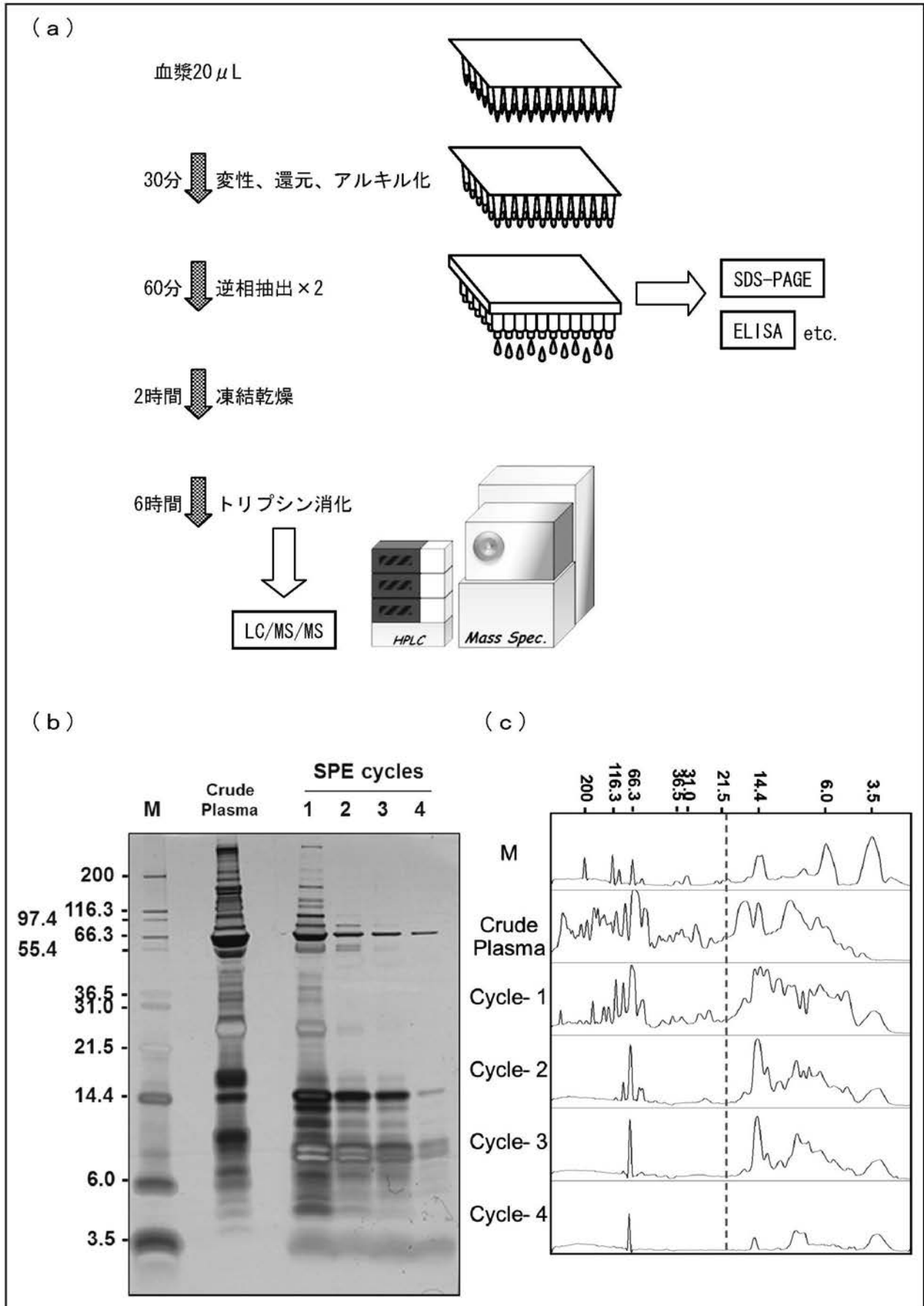
【図 9】



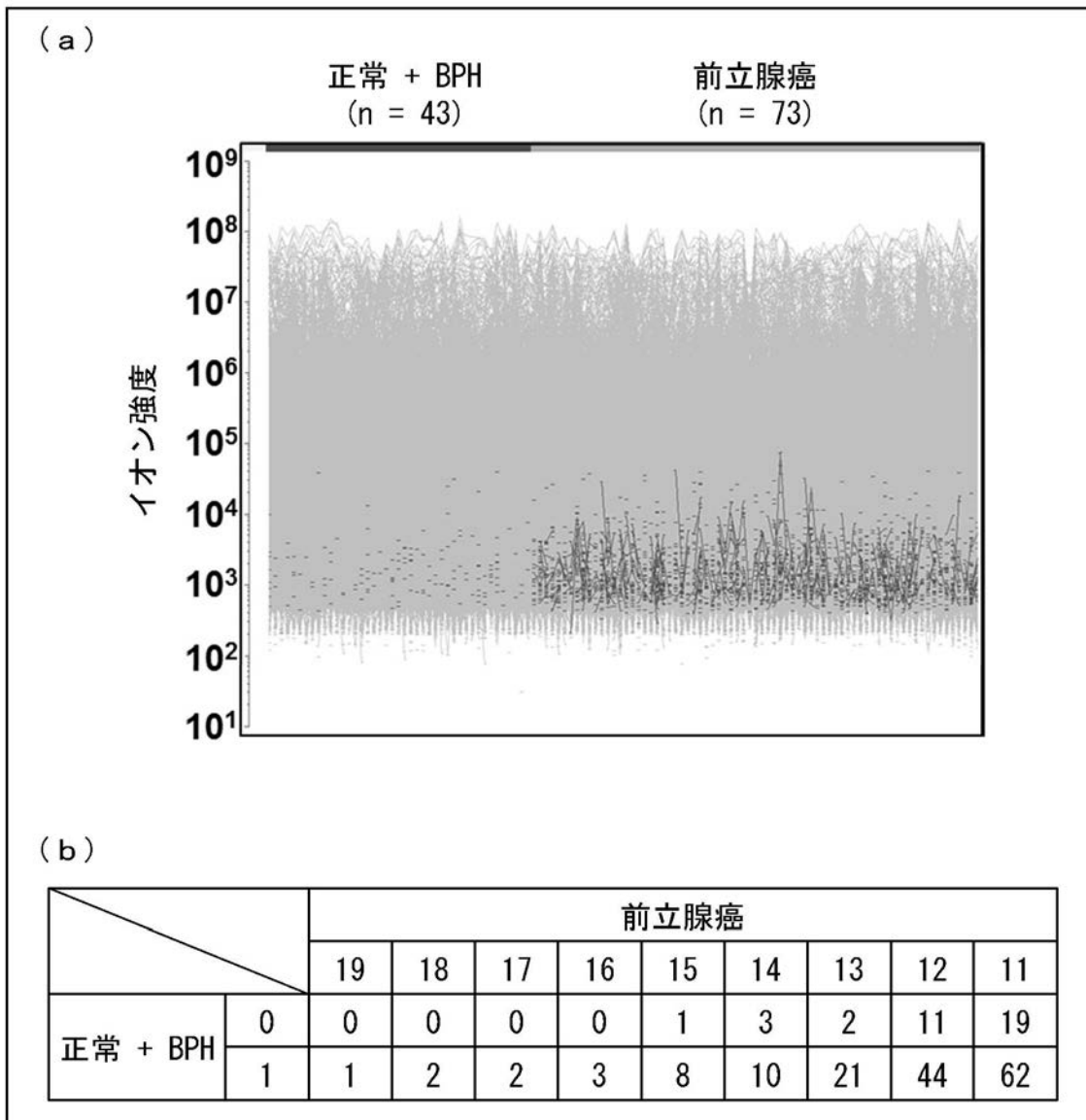
【 図 1 】



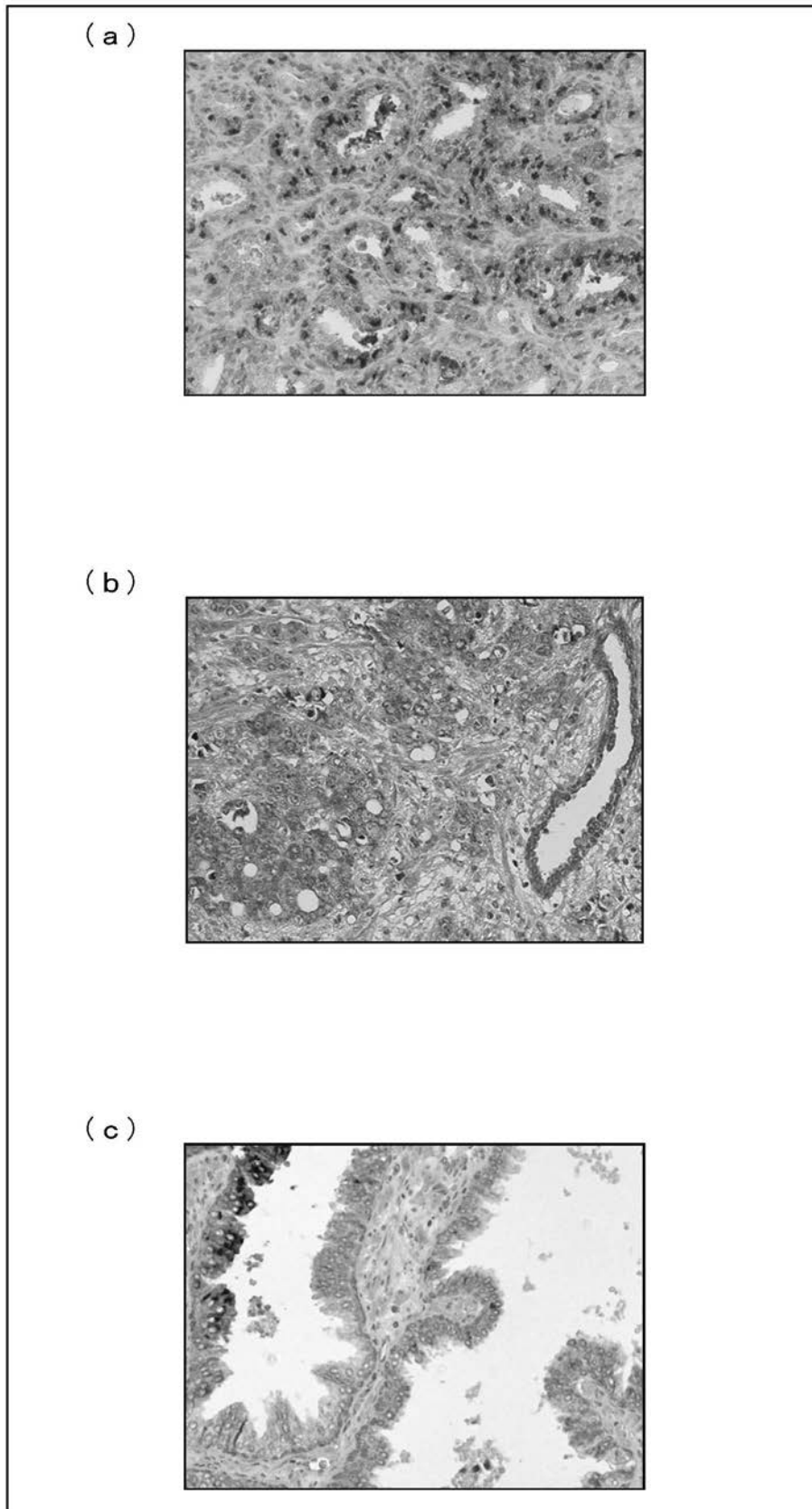
【図 2】



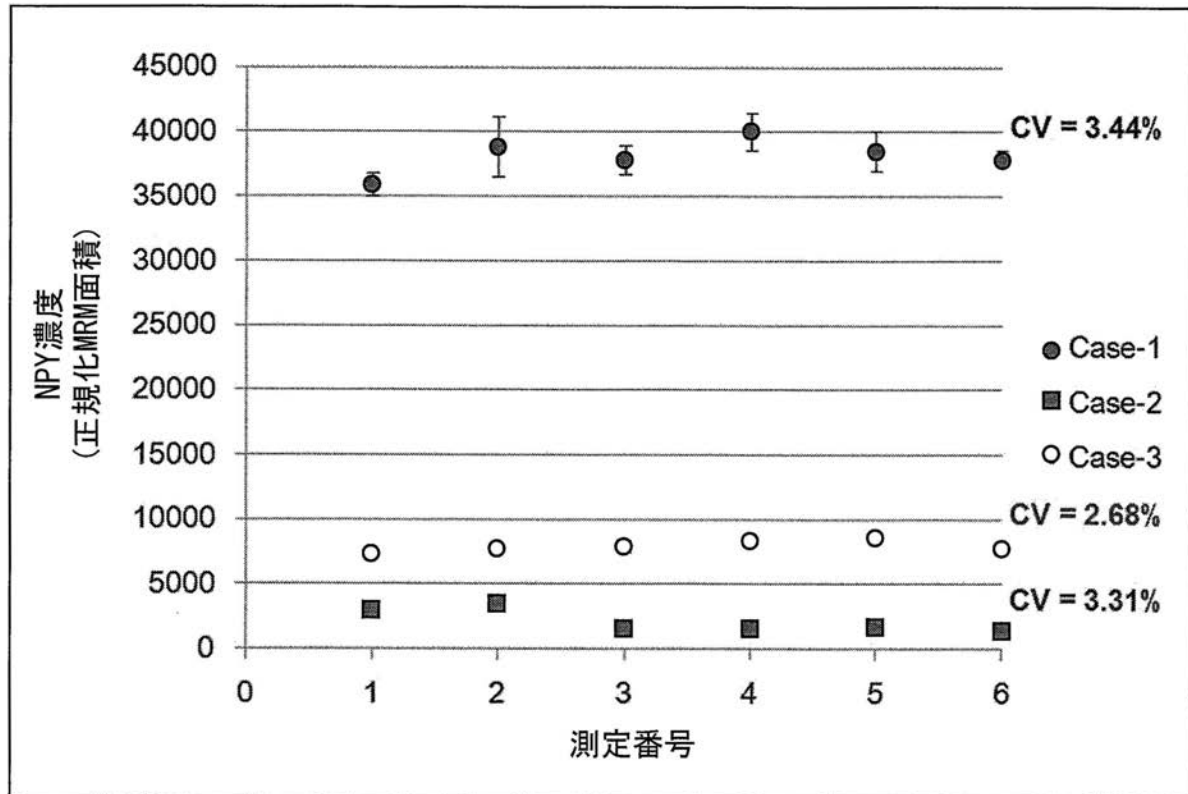
【図 3】



【図 4】



【図 6】



【手続補正書】

【提出日】平成25年7月31日(2013.7.31)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体から採取した血液または尿に由来する試料において、ニューロペプチド Y の量を測定する工程を含む、前立腺癌の進行度の評価のための分析方法。

【請求項 2】

生体から採取した血液または尿に由来する試料において、前立腺特異抗原、TMPRSS2:ERG の mRNA、および PCA3 RNA のうちの少なくとも 1 つの量を測定する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の分析方法。

【請求項 3】

生体から採取した血液または尿に由来する試料において、前立腺特異抗原の量を測定する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の分析方法。

【請求項 4】

質量分析法または発光測定法によってニューロペプチド Y の量を測定する、請求項 1 ～ 3 の何れか 1 項に記載の分析方法。

【請求項 5】

上記試料は全血液、血清または血漿である、請求項 1 ～ 4 の何れか 1 項に記載の分析方法。

【請求項 6】

上記ニューロペプチド Y の量を測定する工程において、上記試料を逆相抽出に 2 回以上供してニューロペプチド Y を含む画分を取得して、得られた画分についてニューロペプチ

ド Y の量を測定する、請求項 1 ～ 5 の何れか 1 項に記載の分析方法。

【請求項 7】

生体から採取した血液または尿に由来する試料において、ニューロペプチド Y の量および前立腺特異抗原の量を測定する工程を含む、前立腺癌の検出方法。

【請求項 8】

前立腺癌の進行度を評価するための検査キットであって、

生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるニューロペプチド Y の量を測定するためのペプチドプローブを含む、検査キット。

【請求項 9】

生体から採取した血液または尿に由来する試料における前立腺特異抗原の量を測定するための抗体またはペプチドプローブ、TMPRSS2：ERG の mRNA の量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、および、PCA3 RNA の量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、のうちの少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 8 に記載の検査キット。

【請求項 10】

前立腺癌の進行度を評価するための検査キットであって、

生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるニューロペプチド Y の量を測定するための抗体を含み、

生体から採取した血液または尿に由来する試料における前立腺特異抗原の量を測定するための抗体またはペプチドプローブ、TMPRSS2：ERG の mRNA の量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、および、PCA3 RNA の量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、のうちの少なくとも 1 つをさらに含む、検査キット。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

F ターム (参考) 2G041 CA01 DA05 EA04 FA12 GA09 HA01 LA07 LA08
2G045 AA26 CA25 CA26 CB03 DA14 DA36 FB02 FB03
4B024 AA12 CA09 CA12 DA03 HA14
4B063 QA19 QQ03 QQ53 QQ79 QR36 QR48 QR55 QR72 QS33 QS34
QX01
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 EA51 FA71

专利名称(译)	用于评估前列腺癌进展的方法，用于检测前列腺癌的方法和测试试剂盒		
公开(公告)号	JP2014185944A	公开(公告)日	2014-10-02
申请号	JP2013061094	申请日	2013-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
[标]发明人	植田幸嗣 中川英刀		
发明人	植田 幸嗣 中川 英刀		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/574 G01N33/50 G01N33/53 G01N27/62 C07K16/18 C12Q1/68 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/57434 C07K16/30 C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/158 G01N21/6486 G01N33/6848 G01N2333/5755 H01J49/0027		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/574.A G01N33/50.P G01N33/53.M G01N27/62.V C07K16/18 C12Q1/68.A C12N15/00.A C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA05 2G041/EA04 2G041/FA12 2G041/GA09 2G041/HA01 2G041/LA07 2G041/LA08 2G045/AA26 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA12 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/HA14 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR72 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	JP5429725B1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

这种用于评估前列腺癌阶段和该前列腺癌阶段评估方法的分析方法包括测量源自从受试者收集的血液或尿液的样品中神经肽Y的量的步骤，并且该前列腺癌检测方法包括这样的步骤，其中测量源自从受试者收集的血液或尿液的样品中神经肽Y和前列腺特异性抗原的量。

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

*良性前列腺肥大症 **前列腺癌 ***Gleason score